

**Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Prehrambena tehnologija**

TENA STIPIĆ
0058219536

**Formulacija mikroinkapsuliranih i liofiliziranih proizvoda izvedenih iz
kombuche s karakterizacijom njihovog antimikrobnog i antioksidacijskog
potencijala**

ZAVRŠNI RAD

Predmet: Mikrobiologija

Mentor: dr. sc. Deni Kostelac

Zagreb, 2024.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski sveučilišni studij Prehrambena tehnologija

Zavod za biokemijsko inženjerstvo
Laboratorij za opću mikrobiologiju i mikrobiologiju namirnica

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

**Formulacija mikroinkapsuliranih i liofiliziranih proizvoda izvedenih iz kombuche s
karakterizacijom njihovog antimikrobnog i antioksidacijskog potencijala
Tena Stipić, 0058219536**

Sažetak: Kombucha je svjetski poznat osvježavajući napitak dobiven fermentacijom čaja uz dodatak šećera i simbiotske kulture bakterija i kvasaca (SCOBY). Ovaj blago gazirani napitak se konzumira diljem svijeta zbog svojih dobro poznatih terapijskih i profilaktičkih svojstava. U ovom radu pripremljene su kombuche od crnog čaja, dvije vrste zelenih čajeva, bobica drijenka te je napravljen vinski ocat korištenjem SCOBY kulture. Pripremljenim uzorcima od kombuche ispitana je antimikrobna aktivnost, antioksidativna aktivnost i sposobnost inhibicije formiranja biofilmova antimikrobnih mikroorganizama. Također su provedene mikroinkapsulacija i liofilizacija uzoraka kombuche za izradu prototipa proizvoda zbog velikog potencijala kombuche da postane funkcionalan proizvod s funkcionalnim svojstvima. Liofilizirani mikroinkapsulati su podvrgnuti simulaciji gastrointestinalnog trakta, nakon čega je povedeno ispitivanje antioksidativne aktivnosti. Dobiveni rezultati istraživanja su pokazali kako uzorci kombuche pokazuju zamjetnu antimikrobnu aktivnost, inhibiraju formiranje biofilmova patogenih mikroorganizama te iskazuju vrlo visoku antioksidacijsku aktivnost. Također, rezultati određivanja antioksidacijske aktivnosti su pokazali da mikroinkapsulacija u alginatni nosač sprječava otpuštanje aktivnih komponenti u želucu. Dodatno, razvijen je model procjene mase konačnog proizvoda nakon podvrgavanja procesima mikroinkapsulacije i liofilizacije kombuche.

Ključne riječi: kombucha, antimikrobna aktivnost, antioksidacijska aktivnost, mikroinkapsulacija, liofilizacija

Rad sadrži: 33 stranice, 13 slika, 1 tablica, 49 literaturna navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: dr. sc. Deni Kostelac

Datum obrane: 17. lipanj, 2024.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Undergraduate thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
University undergraduate study Food Technology

Department of Biochemical Engineering
Laboratory for General Microbiology and Food Microbiology

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Food Technology

**The formulation of microencapsulated and freeze-dried products derived from kombucha with
characterization of their antimicrobial and antioxidant potential**

Tena Stipić, 0058219536

Abstract: Kombucha is a globally renowned refreshing beverage obtained through the fermentation of tea with added sugar and a symbiotic culture of bacteria and yeast (SCOBY). This mildly carbonated drink is consumed worldwide due to its well-known therapeutic and prophylactic properties. In this study, kombuchas were prepared from black tea, two types of green tea, Cornelian cherry berries, and a wine vinegar was made using the SCOBY culture. The prepared kombucha samples were tested for antimicrobial activity, antioxidant activity, and the ability to inhibit biofilm formation by antimicrobial microorganisms. Additionally, microencapsulation and lyophilization of the kombucha samples were conducted to develop product prototypes, given the great potential of kombucha to become a functional product with beneficial properties. The lyophilized microencapsulates were subjected to a gastrointestinal tract simulation, followed by an evaluation of their antioxidant activity. The research results showed that kombucha samples exhibit notable antimicrobial activity, inhibit biofilm formation by pathogenic microorganisms, and display very high antioxidant activity. Furthermore, the results of antioxidant activity determination indicated that microencapsulation in an alginate carrier prevents the release of active components in the stomach. Additionally, a model for estimating the final product mass after the processes of microencapsulation and freeze-drying of kombucha was developed.

Keywords: kombucha, antimicrobial activity, antioxidant activity, microencapsulation, freeze-drying

Thesis contains: 33 pages, 13 figures, 1 table, 49 references

Original in: Croatian

Thesis is deposited in printed and electronic form in the Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: Deni Kostelac, PhD

Thesis defended: 17th of June 2024

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1 KOMBUCHA.....	2
2.2 NAČINI PROIZVODNJE	3
2.2.1. FERMENTACIJA.....	3
2.2.2 SKLADIŠTENJE I ČUVANJE	4
2.3. KEMIJSKI SASTAV	5
2.4. MIKROBNI SUSTAV	6
2.5. UTJECAJ NA ZDRAVLJE	7
2.5.1 ANTIKANCEROGENO DJELOVANJE.....	8
2.5.2 HEPATOPROTEKTIVNO DJELOVANJE KOMBUČHE.....	8
2.5.3 KORIŠTENJE NASTALOG CELULOZNOG SLOJA U LIJEČENJU	9
2.5.4 OSTALI POZITIVNI UČINCI NA ZDRAVLJE KONZUMACIJOM KOMBUČHE.....	9
2.6 ANTIMIKROBNA AKTIVNOST.....	9
2.7. ANTIOKSIDATIVNA AKTIVNOST	11
3. EKSPERIMENTALNI DIO	13
3.1 MATERIJALI.....	13
3.1.1 PRIPREMA HRANJIVE PODLOGE-ČAJA.....	13
3.1.2. MIKROORGANIZMI.....	13
3.1.3. FERMENTACIJA.....	13
3.1.4. HRANJIVE PODLOGE	14
3.1.5. APARATURA I PRIBOR.....	15
3.1.6. KEMIKALIJE.....	15
3.2 METODE.....	16
3.2.1 ANTIMIKROBNA AKTIVNOST.....	16
3.2.2 ODREĐIVANJE BIOFILMOVA.....	17
3.2.3 SPOSOBNOST UKLANJANJA DPPH SLOBODNIH RADIKALA.....	17
3.2.4 MIKROINKAPSULACIJA UZORAKA KOMBUČHE.....	18
3.2.5 LIOFILIZACIJA MIKROINKAPSULIRANE KOMBUČHE	18
3.2.6 IZLAGANJE LIOFILIZIRANIH MIKROKAPSULA KOMBUČHE SIMULIRANIM UVJETIMA GASTRO-	

INTESTINALNOG SUSTAVA.....	19
3.2.7 ODREĐIVANJE UKLANJANJA DPPH SLOBODNIH RADIKALA NAKON IZLAGANJA SIMULIRANIM UVJETIMA GASTRO INTESTINALNIM UVJETIMA.....	20
3.2.8 STATISTIČKA OBRADA PODATAKA	20
4. REZULTATI I RASPRAVA	21
4.1 ODREĐIVANJE ANTIMIKROBNE AKTIVNOSTI.....	21
4.2. SPOSOBNOST INHIBICIJE FORMIRANJA BIOFILMOVA PATOGENA UZ POMOĆ UZORAKA KOMBUCHE.....	23
4.3. SPOSOBNOST UKLANJANJA DPPH RADIKALA.....	24
4.4. MIKROINKAPSULACIJA UZORAKA KOMBUCHE I LIOFILIZACIJA NASTALIH MIKROINKAPSULATA.....	26
4.5. ODREĐIVANJE SPOSOBNOSTI UKLANJANJA DPPH SLOBODNIH RADIKALA NAKON IZLAGANJA SIMULIRANIM UVJETIMA GASTRO-INTESTINALNOG SUSTAVA.....	27
5. ZAKLJUČCI	29
4. POPIS LITERATURE	30

1. UVOD

Kombucha je zaslađeni čaj koji nastaje fermentacijom SCOBY kulture (simbiotic culture of bacteria and yeast). Podrijetlom dolazi iz sjevero-istočne Kine, a danas je sve više popularno gazirano piće u zapadnom svijetu koje se osim zbog svog okusa konzumira i zbog raznih benefita koja ima na ljudski organizam. (Greenwalt i sur., 1998)

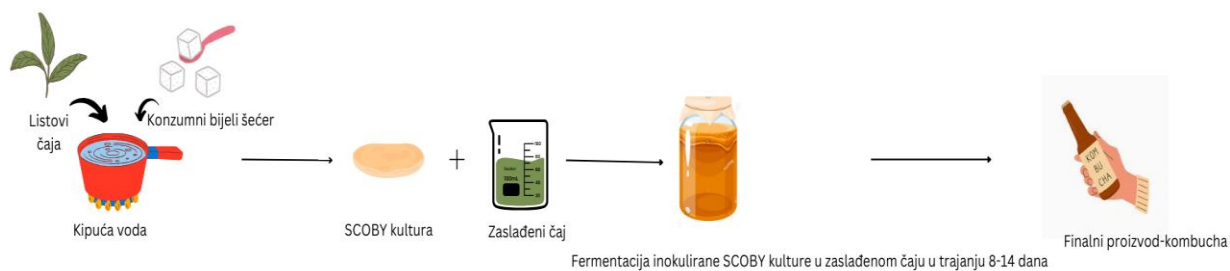
Poznato je da se fermentirani čaj prvo koristio u Manduriji, 220. pr. Kr. Od tamo, konzumacija se proširila na Rusiju (gdje postoji mnogo literatue o „Teakvasu), Njemačku, Francusku (Antolak i sur., 2021). Danas je kombucha najpopularnija u Sjedinjenim Američkim Državama (Blanc 1996), dok se interes u Hrvatskoj tek počinje povećavati. Kombucha svojoj sve većoj popularnosti može zahvaliti upravo zbog svojih funkcionalnih svojstva na zdravlje. Smatra se da može smanjiti razinu kolesterola i krvnog tlaka, potići gubitak težine, poboljšati funkcije jetre, žiježda, imunološkog i probavnog sustava, smanjiti kalcifikacije bubrega, povećati vitalnost, pomoći u borbi protiv akni, ukloniti bore, pročistiti žučne vrećice, poboljšati probavu, ublažiti bolove kod artitritisa, inhibirati proliferaciju raka, liječiti AIDS i mnoge druge koristi (Jayabalan i sur., 2014; Coton i sur., 2017) Ključnu ulogu u samoj proizvodnji kombuche imaju starter kulture koje se sastoje od različitih vrsta bakterija i kvasaca. Najdominatnije vrste kvasaca u kombuchi su *Zygosaccharomyces bailii*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Torulospora delbreuckii*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Brettanomyces bruxellensis* i *Candida stellata* (Teoh i sur., 2004). Od bakterija, u najvećem udjelu nalaze se *K. xylinus*, *K. kombuchae*, *A. aceti*, *A. pasteurianus*, *A. nitrogenifigens*, *G. sacchari* (Antolak i sur., 2021). Te simbiotske kulture osim što proizvode etanol i CO₂ prilikom fermentacije, također proizvode velike količine aminokiselina, organskih kiselina, vitamina, enzima, polifenole i antimikrobne tvari (Chong i sur., 2023). Može se reći da je raznolikost mikroorganizama u kombuchi uvelike istražena, međutim sama dinamika sustava tijekom fermentacije koja pridonosi antimikrobnim i antioksidativnim svojstvima zahtijeva daljnja istraživanja (Laureys i sur., 2020).

Cilj ovog rada bio je proizvesti 5 različitih tipova kombucha, ispitati antimikrobna i antioksidacijska svojstva pet različitih tipova kombuche. Dodatno, ispitano je zadržavanje funkcionalnih svojstava istih nakon mikroinkapsulacije i liofilizacije s ciljem zaštite od stresnih uvjeta GI trakta i produljenja trajnosti tijekom skladištenja.

2. TEORIJSKI DIO

2.1 Kombucha

Napitak kombucha izvorno je dobio ime po doktoru Kombu iz Koreje, koji je upravo tim napitkom liječio tadašnjeg Japanskog cara (Júnior i sur., 2022). Tada se za kombuchu vjerovalo da liječi probavne tegobe i ima detoksikacijska svojstva. Kombucha se dobiva fermentacijom zaslađenog crnog, zelenog ili oolong plavog čaja uz dodatak simbiotske kulture bakterija i kvasaca (SCOBY) (Coton i sur., 2017). Najčešće se u 1 litru kipuće vode dodaje 50-100 g konzumnog bijelog šećera. Potom se stavljaju listovi odabranog čaja na prethodno određeno vrijeme (najčešće do 5 min) (Jayabalan i sur., 2014; Dutta i Paul 2019). Nakon što se dobiveni čaj ohladio na sobnu temperaturu (približno 20°C), prebacuje se u staklenku gdje se inokulira SCOBY kulturom i tekućinom u kojoj je SCOBY kultura donešena (Coton i sur., 2017), pokriva gazom i čuva na suhom i mračnom mjestu na sobnoj temperaturi (18-28°C) 8-14 dana (Teoh i sur., 2004). Što se tiče samog okusa, kombucha ima lagano kiselkast okus s blagom dozom mjehurića (CO₂) (Martínez Leal i sur., 2018), a s obzirom na vrlo mali udio alkohola (< 0.5 %) smatra se odličnom zamjenom za jača alkoholna pića. Li i suradnici (2022) su u svojem istraživanju pokazali da se kombucha može proizvesti ne samo od crnog, zelenog ili oolong čaja nego i od voća poput grejpa, pitaje i guave. Osim voća, kombucha se može proizvesti različitim vrstama čajeva. Tako su Battikh i suradnici (2012) proizveli kombuchu od timjana, mente, ružmarina, matičnjaka i komorača i prema vrsti čaja uspoređivali antimikrobnu aktivnost. Sve vrste kombucha osim timjana su pokazale antimikrobnu aktivnost. Kayisoglu i Coskun (2020) uspoređivali su kombuche napravljene od zelenog čaja, crnog čaja, čaja od mente, čaja od lipe i čaja od kadulje. Istraživanje je pokazalo da je čaj od mente imao značajno povećanje fenola i bio je najbolje senzorski ocijenjen. Ovim istraživanjima se dokazuje da se kombucha osim običnog crnog, zelenog i oolong čaja može proizvesti s drugim vrstama čajeva i voćem. Tako proizvedene kombuche mogu imati bolji kemijski sastav i veći značaj na ljudsko zdravlje od uobičajenih vrsta.



Slika 1. Slikoviti prikaz pripreme kombuche (vlastita slika)

2.2 Načini proizvodnje

2.2.1. Fermentacija

Fermentacija kombuche se još naziva i prirodnom fermentacijom jer se u običan čaj dodaje manja količina čaja prethodno obogaćenim mikrobnom simbiotičkom kulturom bakterija i kvasaca. Taj način proizvodnje koji se još naziva i backslopping, se koristi kod proizvodnje vodenog i mliječnog kefira, kiselog tijesta i fermentiranog mesa i žitarica. Na početku fermentacije, medij je aeroban, s velikim udjelom saharoze i blago kiseo zbog dodavanja čaja obogaćenog mikrobnom kulturom. Snižavanje pH je uzrok rasta i metabolizma bakterija i kvasaca koji proizvode octenu kiselinu i bakterije mliječne kiseline dovode do stvaranja velike količine organskih kiselina. (Laureys i sur., 2020). Prilikom fermentacije kombuche najčešći supstrat je disaharid saharoza koja se invertazom hidrolizira na glukozu i fruktozu u periplazmi stanica kvasca. Glavni produkti fermentacije su glukozu, fruktozu, saharoza a metaboliti etanol, octena kiselina, glukonska kiselina, glukuronska kiselina, D - saharozna kiselina i ponekad mliječna kiselina (Greenwalt i sur., 1998; Li i sur., 2022) Stanice kvasaca cijepaju saharozu na glukozu i fruktozu i proizvode etanol. Bakterije octene kiseline pretvaraju glukozu u glukonsku kiselinu, a fruktozu u octenu kiselinu. Nastala octena kiselina stimulira kvasac da proizvodi etanol, a etanol pomaže bakterijama octene kiseline da rastu i proizvode octenu kiselinu. Također, nastali etanol i octena kiselina imaju antimikrobnu aktivnost protiv patogenih bakterija, čime osiguravaju zaštitu od moguće kontaminacije čajne gljive (Liu i sur., 1996). Završetkom fermentacije dobivamo konačan proizvod – napitak kombucha koji se sastoji od fermentiranog čaja, novonastalog celuloznog sloja “kćeri” SCOBY koji je povezan na “majku” SCOBY. Dužom fermentacijom “kćer” SCOBY se može potpuno odvojiti od “majke” SCOBY, pri čemu “kćer” pluta na vrhu staklenke, dok “majka” tone na dnu. Nakon fermentacije,

fermentirani čaj se konzumira, a celulozni slojevi SCOBY-a se koriste za proizvodnju nove serije kombuche (Jayabalan i sur., 2014; Dutta i Paul 2019). Fermentirani čaj, nakon što se filtrira kroz gazu može „sačuvati“ na tri načina; može se čuvati u hermetički zatvorenim bocama u frižideru, može se u čuvati hermetički zatvorenim bocama uz dodan zaslađeni čaj na sobnoj temperaturi pri čemu dolazi do sekundarne fermentacije u kojoj se formira CO₂, te se može pomiješati s kavom, sokom, voćem i drugim „infuzijama“ i čuvati na sobnoj temperaturi uz pojavu CO₂ (Coelho i sur., 2020). Okus kombuche se tijekom fermentacije mijenja – počinje kao ugodno kiseli i blago gazirani a tijekom vremenom sve više po okusu slični octu (Dufresne i Farnworth 2000). Fermentacijom kombuche se osim simbiotskih odnosa razvijaju i selektivni pritisci koji utječu na stvaranje raznolikosti mikrobiološke flore i potrošnju supstrata i proizvodnju metabolita. Primjerice, etanol koji proizvodi kvasac inhibira rast određenih mikroorganizama. Jedan od glavnih selektivnih pritisaka je kiseli stres koji se stvara zbog proizvodnje organskih kiselina od strane kvasaca, bakterija octene kiseline i bakterija mliječne kiseline. pH čaja kombuche počinje od 5 - 7, a završetkom fermentacije pH pada na 2 - 4, produljenom inkubacijom može doći i ispod 2 (Laureys i sur., 2020). Na proces fermentacije utječe i vrsta čaja koja se koristi za pripremu kombuche. Najčešće su to zeleni i crni čaj, a ključni spojevi u čaju su katehini čije koncentracije tijekom fermentacije padaju, kao i koncentracija kofeina koji potiče sintezu celuloze. Tijekom fermentacije, koncentracija žutih pigmenata - teflavina raste, dok koncentracija smeđih pigmenata - tearugibina pada što proizlazi iz pretvorbe tearubigina u teaflavine što objašnjava promjenu boje tamno smeđeg čaja u svjetlo smeđu kombuchu. Ukupni sadržaj fenola raste uz antioksidativnu aktivnost tokom fermentacije (Chakravorty i sur., 2016).

Duljom fermentacijom povećavaju se količine bioaktivnih spojeva poput polifenola, vitamina B, vitamina C te esencijalnih minerala poput željeza, mangana, cinka, bakra i nikla. Na početku fermentacije dolazi do smanjenja fenolnih i flavonoidnih spojeva, dok se njihova količina povećava tijekom nje. Osim što duljim vremenom fermentacije formiraju se gore navedeni spojevi koji su od velike važnosti za zdravlje čovjeka, produljena fermentacija također potiče proizvodnju organskih kiselina od strane SCOBY-a (Coelho i sur., 2020; Abaci i sur., 2022).

2.2.2 Skladištenje i čuvanje

Najčešće staklenka s čajem i inokuliranom SCOBY kulturom se pokriva s gazom kako bi se spriječila kontaminacija vanjskim mikroorganizmima i nakupljanje tlaka u staklenci zbog proizvodnje CO₂, a pritom se dopušta pristup kisiku (Laureys i sur., 2020).

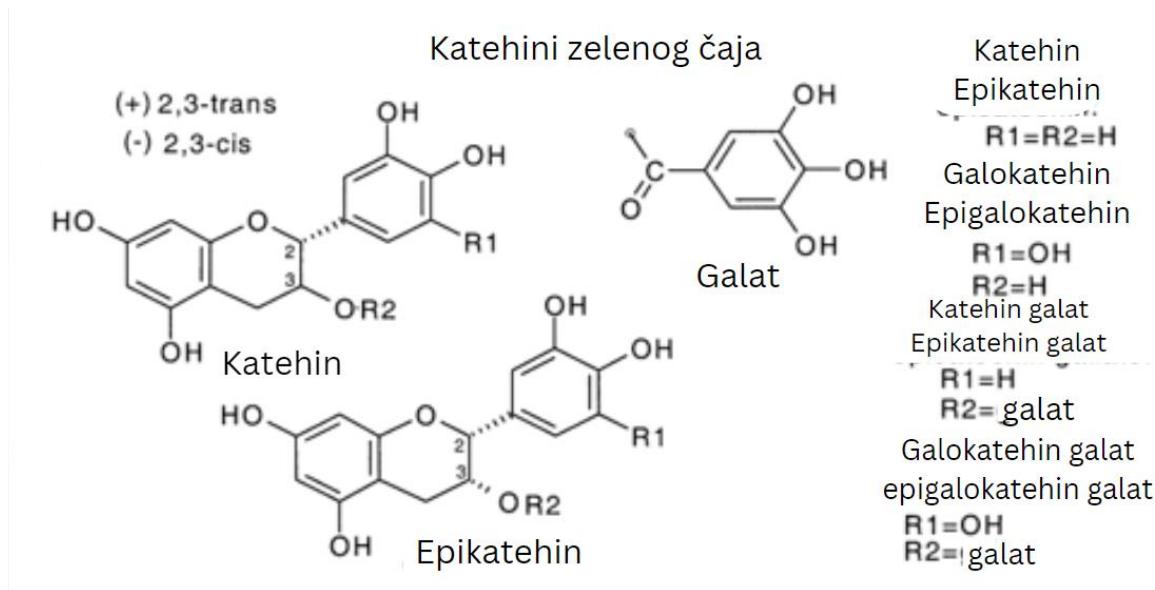
Jayabalan i suradnici (2008) istraživali su utjecaj visoke temperature (50-90°C) na biokativne

sastojke i antioksidativna svojstva kombucha tijekom skladištenja od 3 mjeseca pri čemu su otkrili da visoka temperatura ne može biti odgovarajuća metoda čuvanja kombuche. S druge strane, Tan i suradnici (2020) su proučavali kako skladištenje kombuche pri 4°C 9 mjeseci utječu na pH, antioksidativna svojstva, udio flavonoida i fenolnih spojeva, te su zaključili kako udio flavonoida i ukupnih fenola znatno pada nakon 4 mjeseca skladištenja.

2.3. Kemijski sastav

U kombuchi su pronađeni šećeri poput saharoze, fruktoze i glukoze, vitamini E, H, A, B1, B2, B6, B12 i C, 14 različitih aminokiselina, biogenih amina, purina, pigmenata, lipida, proteina i nekih hidrolitičkih enzima. Fermentirani čaj sadrži i etanol, ugljični dioksid, fenole, tvari s antibiotskim svojstvima, kao i određene polifenole iz čaja, minerale, anione i neke manje poznate produkte metabolizma kvasaca i bakterija (Jayabalan i sur., 2014). Čaj sadrži flavonole; kvercetin, kemferol, miricetin i njihove glikozide. U čaju se mogu naći različite aminokiseline, poput teanina koji je specifičan za čajnu biljku čini 50% ukupnih aminokiselina. Razgradnja aminokiselina sudjeluje u biogenezi arome čaja. U razvoju arome igraju važnu ulogu klorofil i karotenoidi, lipidi i hlapljivi spojevi makar nisu u zastupljeni u velikoj količini (Dufresne i Farnworth 2000).

Vrlo bitni i karakteristični polifenoli čaja su flavonoidi kojih su u najvećem udjelu katehini (flavan-3-oli): (-) epikatehin (EC), (-) epikatehin galat (ECG), (-) epigalokatehin (EGC), (-) epigalokatehin galat (EGCG), (+) katehin (C) i (*) galokatehin (GC). Upravo ovi sastojci uzrokuju gorčinu i slatkasti okus čaja. Osim katehina, vrlo bitni sastojci kombuche su i organske kiseline poput glukonske, glukuronske, jabučne, oksalne, limunske i L- mliječne kiseline, koje uz proteine stvaraju antimikrobnu aktivnost kombuche snižavanjem pH prilikom fermentacije (Dufresne i Farnworth 2000; Sreeramulu i sur., 2001).



Slika 2. Kemijske strukture katehina u zelenom čaju (preuzeto i prilagođeno prema Dufresne i Farnworth, 2000.)

2.4. Mikrobnii sustav

Prilikom fermentacije kombuche najdominantniji mikroorganizmi su kvasci i bakterije octene kiseline. Bakterije mliječne kiseline se mogu pronaći, ali nisu dio nužnog mikrobioma kombuche jer ih ne nalazimo uvijek. Mikroorganizmi koje smatramo da uzrokuju kvarenje kombuche su plijesni jer su povezani s mikotoksinima i štetnim zdravstvenim učincima (Murphy i sur., 2018). Relativno dugotrajan proces fermentacije omogućuje rast različitih mikroorganizama. To objašnjava da konačan proizvod može sadržavati mikroorganizme koji nisu najbolje prilagođeni početku procesa fermentacije, i obrnuto. Kvasci su neizostavan "sastojak" kombuche jer su uvijek prisutni tijekom procesa fermentacije zbog pretvorbe šećera (Laureys i sur., 2020). Otkriveno je mnoštvo vrsta ovih mikroorganizama poput *Saccharomyces*, *Saccharomycodes*, *Schizosaccharomyces*, *Zygosaccharomyces*, *Brettanomyces/Dekkera*, *Candida*, *Torulospora*, *Koleckera*, *Pichia*, *Mycotorula* i *Mycoderma*. Kvasci iz roda *Saccharomyces* identificirani su kao *Saccharomyces sp.* i *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces bisporus*, *Saccharomycoides ludwigii*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Zygosaccharomyces sp.*, *Zygosaccharomyces rouxii* i *Zygosaccharomyces bailii*. U privatnim domaćinstvima u Njemačkoj otkriveni su različiti sastavi kvasaca koji sadrže *Brettanomyces*, *Zygosaccharomyces* i *Saccharomyces spp.* kao dominantne kvasce. Kombuche iz sjeverne Amerike sadrže najčešće *Zygosaccharomyces* i *S. cerevisiae*. (Roussin, 1996).

Candida sp. prisutna je u većini napitaka od kombuche. Herrera i Calderon- Villagomez

(1989.) u kombuchama iz Meksika su otkrili *Candida stellata*. U Saudijskoj Arabiji, Ramadani i Abulreesh (2010.) izolirali su i identificirali četiri kvasca; *Candida guilliermondi*, *Candida colliculosa*, *Candida kefir* i *Candida krusei*.

Bakterije octene kiseline su, uz kvasce najčešće prisutni mikroorganizmi u procesu fermentacije kombuche. Iako postoji 17 rodova bakterija octene kiseline, oni koji se nalaze u kombuču pripadaju rodovima *Acetobacter*, *Gluconobacter*, *Gluconacetobacter* i *Komagataeibacter*. Smatra se da je *Komagataeibacter xylinus* najkarakterističniji mikroorganizam fermentacije kombuche, odgovoran za proizvodnju celuloznog sloja (Gaggia i sur., 2019). Međutim, u literaturi to nije uvijek jasno jer je ovaj mikroorganizam klasificiran kao *Acetobacter xylinus*, *Acetobacter xylinum*, *Acetobacter aceti* subsp. *xylinus*, *Gluconobacter xylinus*, *Gluconacetobacter xylinus*, pa čak i nekim dodatnim imenima (Laureys i sur., 2020). Uz njega, najmnogobrojnije vrste bakterija octene kiseline su *A. Pasteurianus*, *A. Aceti* i *Gluconobacter oxidans* (Liu i sur., 1996). Najprepoznatljivija karakteristika bakterija octene kiseline je njihova sposobnost periplazmičke oksidacije alkohola, aldehida, šećera i šećernih alkohola u prisutnosti kisika, pri čemu dehidrogenaze koje su smještene na vanjskoj površini citoplazmatske membrane igraju ključnu ulogu. Primjerice, etanol se može oksidirati u acetaldehid, koji se dalje može oksidirati u octenu kiselinu. Glukoza se može oksidirati u različite spojeve poput glukonske kiseline, glukuronske kiseline, 2 - ketogluconatne kiseline, 5 - ketogluconatne kiseline, 2,5 - diketogluconatne kiseline i glukuronske kiseline. Općenito, vrste *Acetobacter* i *Gluconacetobacter* preferiraju oksidaciju etanola nad glukozom, dok *Gluconobacter* vrste preferiraju oksidaciju glukoze, glicerola, glukonske kiseline i sorbitola nad etanolom (Gomes i sur., 2018).

Sievers i suradnici (1995) otkrili su da se celulozni sloj u fermentiranom čaju sastoji od mješovite kulture *A. Xylinum* i *Zygosaccharomyces sp.* Boesch i suradnici (1998) otkrili su novi soj bakterijske vrste *Acetobacter*, pod nazivom *Acetobacter intermedius sp. nov.* izolirajući ga iz kombuche. Novu vrstu fiksatora dušika, *Acetobacter nitrogenifigens sp. nov.*, i fiksatora dušika koji proizvodi celulozu, *Gluconobacter kombuchae sp. nov.* iz fermentiranog čaja otkrili su Dutta i Paul (2019).

2.5. Utjecaj na zdravlje

Potrošači kombuche tvrde da kombucha sadrži mnoge benefite za ljudsko zdravlje. Ipak, većina tih benefita utvrđena je samo na eksperimentalnim modelima i nedostaje znanstvenih dokaza temeljenih na ljudskim modelima. (Jayabalan i sur., 2014)

Velika većina svojstava kombuche povezana je upravo s proizvodnjom kiselina. Smatra se da vezanje glukonske kiseline na toksine stvara detoksikacijsko djelovanje, čime se povećava

njihovo izlučivanje iz organizma preko bubrega ili crijeva. Ovaj način djelovanja pomaže u ublažavanju bolesti poput gihta, reume, artitisa ili bubrežnih kamenaca, koji su posljedica nakupljanja toksina u tijelu. Isto tako, teški metali se ili onečišćenja doprijela iz okoliša se mogu ukloniti glukuronidacijom. Međutim, postojanje i djelovanje glukuronske kiseline u kombuchi i stvaranje glukuronskih spojeva još uvijek su tema rasprave (Hoffman, 1998.).

2.5.1 Antikancerogeno djelovanje

Brojna istraživanja pokazala su da kombucha sadrži polifenole koji imaju sposobnost inhibicije mutacije gena, inhibicije proliferacije stanica raka, sposobnost zaustavljanja metastaza izdvajaju se kao mogući mehanizmi antikancerogenih osobina (Watawana i sur., 2015).

1951. godine Centralna onkološka istraživačka jedinica i Ruska akademija znanosti u Moskvi otkrili su da svakodnevna konzumacija kombuche ima povezanost s velikom otpornošću na rak. Tokom 60-ih prošlog stoljeća razni znanstvenici su otkrili antitumorske učinke kombuche i njena ljekovita svojstva u liječenju raka, detoksikacije učinke i utvrdili da dugoročna konzumacija potiče proizvodnju interferona i omogućuje normalnu funkciju imunološkog sustava (Dufresne i Farnworth, 2000). Kod pacijenata oboljelih od raka primjećeno je nedostatak L- laktične kiseline u njihovim vezivnim tkivima, te im je pH krvi veći od 7.5. Za ponovno uspostavljanje ravnoteže pH vrijednosti krvi i koncentracije mliječne kiseline može pomoći kombucha (Roche, 1988.). Utvrđeno je da kombucha sadrži D-saharsku kiselinu-1,4-lakton (DSL) koji je poznat po tome što inhibira aktivnost glukuronidaze, enzima za kojeg se smatra da je neizravno povezan s rakom zbog toga što ima sposobnost hidrolize glukuronida i proizvodnje aglikona koji uzrokuju rak (Deghrigue i sur., 2013).

2.5.2 Hepatoprotektivno djelovanje kombuche

Neka istraživanja su dokazala da kombucha zbog svojih hepatoprotektivnih svojstava protiv raznih okološnih zagađenja u životinjskim modelima i staničnim linijama može onemogućiti hepatotoksičnost izazvanu različitim onečišćenjima. Kombucha (pripremljena fermentacijom crnog čaja) testirana je protiv protiv paracetamola, karbontetraklorida, aflatoksina B1, klorida kadmija, TBHP i acetaminofena. Dokazano je da učinkovito ublažava fiziološke promjene izazvane toksinima iz jetre. Djelotvornost hepatoprotektivnog djelovanja kombuche istraživana je mjerenjem markera toksičnosti jetre (serumski glutaminski piruvat transaminaza, serumski glutaminski oksaloacetat transaminaza, malondialdehid, alkalna fosfataza, gama-glutamil transpeptidaza, reduciranog glutaciona, antioksidativnih enzima (glutation-S-transferaza, glutacion peroksidaza, glutacion reduktaza, katalaza i superoksid dismutaza), različitih razina kreatinina i uree, razina dušikovog oksida u jetri, te histopatološkom analizom tkiva jetre.

(Jayabalan i sur., 2014)

2.5.3 Korištenje nastalog celuloznog sloja u liječenju

Osim samog napitka koji se dobiva fermentacijom čaja, razni pozitivni učinci na zdravlje primjećeni su konzumacijom ili korištenjem celuloznog mikrobnog sloja koji nastaje prilikom fermentacije. Primjerice, u bolnici Nossa Senhora da Conceição u brazilskom gradu Lagarto upravo taj celulozni mikrobnj sloj se koristio za proizvodnju umjetne kože.

Neki znanstvenici su ovu kožu koristili kako bi ubrzali proces zacijeljivanja i kao antiseptik prilikom pričvršćivanja kod otvorene rane (tzv. "Bioskin"). Osim ovog primjera, mikrobnj celulozni sloj koji nastaje fermentacijom čaja može se koristiti u prehrambenoj industriji i biofarmaceutici. Veliki potencijal korištenja ovog celuloznog sloja proizlazi iz visoke čistoće i posebnih fizikalno-kemijskih svojstava prisutnih u fermentiranom čaju. (Vicente i sur., 2001).

2.5.4 Ostali pozitivni učinci na zdravlje konzumacijom kombuche

Ovaj napitak također je povezan s utjecajem na crijevnu mikrofloru kod ljudi gdje djeluje kao probiotik, pri čemu olakšava normalizaciju crijevnih aktivnosti i time sudjeluje u stvaranju ravnoteže crijevne flore. Osim probiotičkih svojstava, ima sposobnost poboljšanja zdravlja kose, kože i noktiju, smanjuje stres i živčane poremećaje, olakšava glavobolju, ublažava nesanicu, sprječava upale mjehura. Također, dokazano je i da smanjuje kalcifikaciju bubrega kao i smanjenje menstrualnih poremećaja, poboljšanje vida, regeneraciju stanica, olakšavanje bronhitisa i astme i poboljšanje općeg metabolizma (Jayabalan i sur., 2014). Prilikom fermentacije kombucha čaja, jedna od organskih kiselina je mliječna kiselina koja može poboljšati cirkulaciju krvi i pomoći u prevenciji konstipacije, ali isto tako može imati laksativni učinak. Osim mliječne, proizvodi se i oksalna kiselina koja pomaže prilikom proizvodnje adenozin tri fosfata (ATP) (Dufresne i Farnworth 2000; Jayabalan i sur., 2014).

2.6 Antimikrobna aktivnost

Napitak kombucha predmet je mnogih istraživanja antimikrobne aktivnosti zbog svoje sposobnosti inhibicije patogenih mikroorganizama. Antimikrobna aktivnost kombuche povezuje se s niskim pH ovog napitka, onosno velikim udjelom organskih kiselina, naročito octene kiseline i katehina kao i određenih velikih proteina koji se proizvode tijekom fermentacije (Sreeramulu i sur., 2001). Steinkraus i suradnici (1996) otkrili su da čaj koji sadrži 4.36 g suhog čaja i 10 % saharoze po litri ima slabu antibiotsku aktivnost, osim one uzrokovane octenom kiselinom koja je jedan od primarnih produkata fermentacije. S druge

strane, kombucha koja sadrži 33 g/L ukupne kiseline pokazala je antimikrobnu aktivnost protiv *Agrobacterium tumefaciens*, *Bacillus cereus*, *Salmonella choleraesuis* serotip *Typhimurium*, *Staphylococcus aureus* i *Escherichia coli*, ali ne i za *Candida albicans* (Greenwalt i sur., 1998). Polifenoli iz čaja inhibiraju *Streptococcus mutans* (Sakanaka, Him, Taniguchi & Yamamoto, 1989), *S. sobuinus* (Sakanaka, Sato, Him & Yamamoto, 1990) i *Porphyromonas gingivalis*, bakterije koje uzrokuju propadanje zuba. Polifenoli rade na način da sprječavaju sintezu netopljivih glukana pomoću glikoziltransferaza i adheziju bakterija ovisnih o saharozi na zub i epitel smanjenjem aktivnosti kolagenaze (Mitscher et al., 1997; Sakanaka et al., 1990, 1996). Općenito je poznato da su Gram - negativne bakterije patogenije od Gram - pozitivnih, zbog posjedovanja lipopolisaharida u njihovim vanjskim membranama. Upravo te strukture djeluju kao prepreka koje sprječavaju prodor antibiotika u bakterijske stanice, pridonoseći otpornosti na antibiotike. U istraživanjima u kojima su se proučavala antibakterijska svojstva kombucha, najčešće se kao test organizmi koristile bakterije Gram-negativna *Escherichia coli* i Gram-pozitivna *Staphylococcus aureus* (Nyiew i sur., 2022). Deghrigue i suradnici (2013) istražili su da konvencionalna kombucha (nastala fermentacijom crnog i zelenog čaja) sadrži jača antimikrobna svojstva protiv Gram - negativnih bakterija od Gram - pozitivnih bakterija, što je dokazano većim zonama inhibicije. Ovom spoznajom, osjetljivost Gram - negativnih bakterija prema kombuchi može koristiti za budućnost u kojoj se kombucha može koristiti kao izvor novih antimikrobnih sredstava. Kombucha je pokazala sposobnost inhibicije rasta patogenih mikroorganizama poput *Helicobacter pylori* (uzročnik peptičkih ulkusa), *Escherichia coli* (uzročnik uobičajene proljeva), *Entamoeba cloacae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermis*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Bacillus cereus*, *Aeromonas hydrophila*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enteritidis*, *Shigella sonnei*, *Leuconostoc monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Campylobacter jejuni* i *Candida albicans* (Dufresne i Farnworth 2000; Sreeramulu i sur., 2001).

Kombucha također pokazuje i antifungalnu aktivnost protiv raznih vrsta kvasaca i plijesni (Nyiew i sur. 2022). U istraživanjima u kojima se ispitala antimikrobna aktivnost kombuche korištene su četiri vrste plijesni. Kada se kombucha testirala protiv *Aspergillus niger* i *Aspergillus flavus*, primjećeno je da nije pokazala nikakvu antimikrobnu aktivnost (Četojević-Simin i sur., 2008). Ovo istraživanje kosi se s dokazima istraživanja Yuniarto i suradnika (2016) u kojima je pokazano da kombucha od crnog čaja pokazuje antifungalnu aktivnost protiv *A. flavus* (koja je bila jednaka onoj od 5696 µg/mL). Nazemi i suradnici (2019) dokazali su antifungalnu aktivnost kombucha dobivene fermentacijom crnog čaja protiv različitih sojeva *A. fumigatus*, uključujući one otporne na azole (vrstu antifungalnih lijekova). Kombucha je u ovom istraživanju pokazala jaku antifungalnu aktivnost inhibirajući rast *Aspergillus fumigatus*

smanjenjem suhe težine micelija nakon tretmana. Prilikom istraživanja Talawat i suradnici (2006) dokazali su da kombucha nastala fermentacijom crnog čaja posjeduje najveću inhibicijsku aktivnost, a *Vibrio parahaemolytica* je pokazala najveću osjetljivost na fermentirani čaj.

Osim crnog i zelenog čaja, za dobivanje kombuche može se fermentirati i neka druga vrsta čaja. Na taj način može se dobiti kombucha od čaja za koji je poznato da u sebi nosi antimikrobna svojstva, tako primjerice se uzima miloduh i melisa. Ulje miloduha ima antibakterijsku aktivnost prema *Staphylococcus*, a ulje melise pokazalo je posebnu učinkovitost protiv *Pseudomonas aeruginosa*, koja je otporna na penicilin, zatim *Escherichia coli*, *Salmonella enterica serovar Typhi*, *Shigella sonnei* i *Sarcina lutea* (Mimica-Dukic i sur., 2004). Općenito, kombucha proizvedena od infuzija cvjetova "dobiva" jaču antibakterijsku aktivnost od kombucha koja je proizvedena ekstraktima (Nyiew i sur., 2022).

Na antimikrobnu aktivnost kombuche može utjecati nekoliko faktora; toplinska obrada, trajanje fermentacije, neutralizacija. Pod neutralizacijom se smatra podešavanje niskog pH kombuche (2-3) na 7, zbog toga što kiselost ima važnu ulogu u antibakterijskim svojstvima kombuche. S druge strane, jedno istraživanje je dokazalo da neutralizirana kombucha dobivena fermentacijom crnog čaja je potpuno zadržala svoja antimikrobna svojstva protiv *Bacillus cereus* (Četojević-Simin i sur., 2008). Sreeramulu i suradnici (2001) također su pokazali da antibakterijska svojstva kombuche protiv *Escherichia coli*, *Shigella sonnei*, *Salmonella enterica serovara Typhimurium* i *Salmonella enteritidis* nisu pogođena neutralizacijom, čime možemo zaključiti da kiselost nije jedini faktor koji je osjetljiv na antimikrobna svojstva. Toplinska obrada ima mali efekt na antimikrobna svojstva, s obzirom da se nakon toplinske obrade zadržavaju sva ili skoro sva antimikrobna svojstva (Nyiew i sur., 2022).

S obzirom na trajanje fermentacije, antimikrobna aktivnost se povećava s produljenjem trajanja fermentacije (Sreeramulu i sur., 2000; Talawat i sur., 2006). Tako na primjer u istraživanju koje su proveli Vohra i suradnici (2019) antibakterijska aktivnost se nastavila povećavati i nakon mjesec dana fermentacije. Kada su antibakterijske aktivnosti testirane protiv bakterija izoliranih iz dijabetičkih ulkusa na stopalu, povećavale su se sve do 14. Dana fermentacije.

2.7. Antioksidativna aktivnost

Antioksidativna aktivnost kombucha povezuje se s njenim mnogim benefitima na zdravlje poput prevencije raka, poboljšanja imuniteta i olakšavanja upala i artiritisa (Jayabalan i sur., 2014). Jayabalan i suradnici (2008) istražili su antioksidativnu sposobnost kombuche napravljene fermentacijom crnog i zelenog čaja i otpadnog dijela čaja. Dokazali su da ukupni fenolni spojevi,

sposobnost hvatanja slobodnih radikala DPPH, superoksidnog radikala te inhibicijska aktivnost protiv hidroksilnog radikala medijatora linolne kiseline rastu s produljenjem trajanja fermentacije. S druge strane, sposobnost hvatanja hidroksilnog radikala (askorbinska kiselina-željezo EDTA), sposobnost antilipidne peroksidacije i snaga redukcije smanjuju.

Malbaša i suradnici (2011) istraživali su utjecaj tri starter kulture (mješovite kulture octenih bakterija i *Zygosaccharomyces spp.*, mješovita kultura octenih bakterija i *S. cerevisiae* te autohtona lokalna kombucha) na antioksidativne aktivnosti zelenog i crnog čaja u kombuchi prema DPPH i hidroksilnim radikalima. Najviša antioksidativna aktivnost je primjećena kod autohtone kombuche od zelenog čaja i kulturom octenih bakterija s kvascem *Zygosaccharomyces spp.* u napitku od crnog čaja. Antioksidativna aktivnost kombucha testirano je protiv citotoksičnosti inducirane terc-butil hidroperoksidom (TBHP) pomoću hepatocita miševa čime se dokazalo da kombucha neutralizira promjene inducirane TBHP-om i sprječava smrt stanica.

Antioksidativna aktivnost kombucha pripisuje se njenim sadržajem polifenola, askorbinske kiseline i DSL. Istraženo je da kombucha ima veću antioksidativnu aktivnost od ne fermentiranog čaja. Vjeruje se da do te pojave dolazi upravo zbog proizvodnje niskomolekularnih komponenti i modifikacija u strukturi polifenola čaja od strane enzima koje proizvode kvasci i bakterije tijekom fermentacije (Jayabalan i sur., 2014).

Prilikom fermentacije kombucha primjećena je povećana aktivnost hvatanja slobodnih radikala. Sama razina aktivnosti ovisi o vremenu fermentacije, normalnoj mikrobioti kulture kombuche, koja određuje prirodu metabolita i vrsti čaja. Iako produljenom fermentacijom se povećava antioksidativna aktivnost, također se povećava udio organskih kiselina, koje iznad određene količine mogu uzrokovati štetu za ljudsko zdravlje prilikom izravne konzumacije. Kako bi se znala metabolička putanja tijekom fermentacije kombucha potrebno je znati koji ekstracelularni enzimi stvaraju strukturalne modifikacije komponenti. Metaboličke manipulacije mogu biti jedna od učinkovitih metoda za poboljšanje antioksidacijskih aktivnosti i učinkovitosti fermentacije kombuche (Jayabalan i sur., 2014).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1 Materijali

3.1.1 Priprema hranjive podloge-čaja

- Uzorak YERBA MATE (Y) - u 2 L vrele vode je dodano 16 g yerba mate zelenog čaja i 160 g konzumnog bijelog šećera
- Uzorak CRNI ČAJ (C) - u 2 L vrele vode je dodano 16 g Assam TGFOP1 koomsong crnog čaja i 160 g konzumnog bijelog šećera
- Uzorak OCAT (O) - u staklenku (400 g) tijekom dva mjeseca stavljena su vina Cabernet Sauvignon Select od vinarija Belje, G točka Galić (Cabernet Sauvignon i Merlot) i Merlot od vinarije Medea da dođu do površine staklenke te je u uzorak dodano 80-100 g konzumnog bijelog šećera. Tijekom dva mjeseca uzgoj je ponovljen tri puta.
- Uzorak YERBA MATE I SENCHA (YS) - u 2 L vrele vode je dodano 8 g yerba mate zelenog čaja i 8 g sencha zeelnog čaja te 160 g konzumnog bijelog šećera.
- Uzorak DRENAK (D) - u 2 L vrele vode je dodano 300 g zamrznutih bobica drijenka i pušteno da kuha dok bobice nisu pustile boju, a potom je dodano 130 g konzumnog bijelog šećera.

3.1.2. Mikroorganizmi

Kao inokulant prethodno opisanih hranjivih podloga korištena je SCOBY kultura.

3.1.3. Fermentacija

Fermentacija napitka kombucha provedena je na način da su pripremljene hranjive podloge prebačene u prethodno sterilizirane staklenke od 4 L te je u staklenke dodana SCOBY kultura i matična tekućina. Staklenke su prekrivene gazom i ostavljene na suhom i mračnom mjestu 10 dana (Slika 3).



Slika 3. Uzorci Y, YS, C nakon fermentacije (vlastita slika)

3.1.4. Hranjive podloge

- MRS (De Man, Rogosa i Sharpe) agar (Biolife, Italija) sastava: pepton 10,0 gL⁻¹; goveđi ekstrakt 10,0 gL⁻¹; ekstrakt kvasca 5,0 gL⁻¹; glukoza 20,0 gL⁻¹; dinatrijev hidrogenfosfat 2,0 gL⁻¹; natrijev acetat 5,0 gL⁻¹; amonijev citrat 2,0 gL⁻¹; magnezijev sulfat 0,2 gL⁻¹; manganov sulfat 0,05 gL⁻¹; agar 15,0 gL⁻¹; Tween 80 1,0 gL⁻¹; pH vrijednost podloge je 6,5; sterilizacija pri 121 °C/15 min. Navedeni sadržaj je otopljen u destiliranoj vodi dobro promješšan i nakon sterilizacije razliven u petrijeve zdjelice.
- Sladni agar sastava: sladni ekstrakt (praškasti) 20 g L⁻¹; pepton 6 g L⁻¹; glukoza 20 g L⁻¹; agar 15 g L⁻¹; pH 5,5; sterilizacija pri 121 °C tijekom 15 min.
- HA (hranjivi agar) (Biolife, Italija) sastava: pepton 15,0 gL⁻¹; mesni ekstrakt 3,0 gL⁻¹; NaCl 5,0 gL⁻¹; K₃PO₄ 0,3 gL⁻¹; agar 18,0 gL⁻¹; u destiliranoj vodi; pH podloge je 7,3; sterilizacija pri 121 °C/ 15min.

- HB (hranjivi bujon) (Biolife, Italija) - istog sastava kao i hranjivi agar, ali bez dodanog agara.

3.1.5. Aparatura i pribor

- analitička vaga, Entris (Sartorius, Göttingen, Njemačka)
- autoklav (Sutjeska, Beograd, Srbija)
- automatske pipete (Eppendorf, Hamburg, Njemačka)
- centrifuga, 5424R (Eppendorf, Hamburg, Njemačka)
- centrifuga, Z 206 A (Hermle Labortechnik GmbH, Wehingen, Njemačka)
- čitač mikrotitarskih pločica, Sunrise (Tecan, Grödig, Austrija)
- Eppendorf tubice (2ml)
- Erlenmeyerove tikvice
- filteri za šprice „Minisart“, PTFE, 0.22 µm (Sartorius, Göttingen, Njemačka)
- hladnjak sa zamrzivačem, CUef 3311 (Liebherr, Kirchdorf, Njemačka)
- igla za šricu (0.40x80 mm)
- kivete (50 ml)
- laboratorijske čaše
- laboratorijski stalci
- liofilizator Christ Alpha 1-2 LD plus freeze dryer (Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Osterode, Germany)
- magnetna mješalica (Domel, Železniki, Slovenija)
- magnetska miješalica, Lab Stir (Gilson, Middleton, WI, SAD)
- mikrobiološka ušica
- mikrobiološke epruvete (16x160 mm, 18x180 mm)
- mikrotitarske pločice s 96, 24 i 12 jažica (Falcon, SAD)
- Petrijeve zdjelice (Ø 10 cm)
- pH-metar, MP220 (Mettler Toledo, Greifensee, Švicarska)
- plastična posuda za odlaganje otpadnog materijala
- štapići po Drigalskom
- tehnička vaga, Extend (Sartorius, Göttingen, Njemačka)
- tesmostat, (Sutjeska, Beograd)
- vibracijska miješalica, V-1 plus (Biosan, Riga, Latvija)

3.1.6. Kemikalije

- alginat (Merck, Darmstadt, Njemačka)
- amonijev persulfat (Sigma-Aldrich Biochemie GmbH, Taufkirchen, Njemačka)
- dimetilsulfoksid (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- dinatrijev hidrogenfosfat (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- etanol 70 % (v v-1) (Gram-mol, Zagreb, Hrvatska)
- etanol, 96% (Gram-mol, Zagreb, Hrvatska)

- Etidij bromid (Sigma, St. Louis, MO, SAD)
- etilendiamintetraoctena kiselina, dinatrijeva sol (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- fetalni teleći serum (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD)
- glicerol (Gram-mol, Zagreb, Hrvatska)
- glicin (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- kalijev dihidrogenfosfat (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- kalijev hidroksid (Merck, Darmstadt, Njemačka)
- kalijev klorid (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- kristal-violet 1% otopina (Biognost, Zagreb, Hrvatska)
- ledena octena kiselina (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- metanol (Merck, Darmstadt, Njemačka)
- natrijev citrat dihidrat (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- natrijev dodecilsulfat (Sigma-Aldrich Biochemie GmbH, Taufkirchen, Njemačka)
- natrijev hidroksid (Gram-mol, Zagreb, Hrvatska)
- natrijev klorid (J.T. Baker, Phillipsburg, NY, SAD)
- standardna puferaska otopina pH 4 (Mettler-toledo, Greifensee, Švicarska)
- standardna puferaska otopina pH 7 (Mettler-toledo, Greifensee, Švicarska)

3.2 Metode

3.2.1 Antimikrobna aktivnost

Antimikrobna aktivnost uzoraka kombuche i octa određena je prilagođenim postupkom prema (Frece i sur., 2010) i Ratsep (2014) u polistirenskim mikrotitarskim pločicama s 96 jažica. Određena je antimikrobna aktivnost prema: *Escherichia coli* ATCC®25922™, *Listeria monocytogenes* ATCC®23074™, *Salmonella typhimurium* ATCC®29631™ i *Staphylococcus aureus* ATCC®25923™.

U polistirensku mikrotitarsku pločicu s 96 jažica dodano je 240 µL uzoraka kombuche, 30 µL medija za patogene te su inokulirane s 10 µL prethodno uzgojenog ispitivanog test-mikroorganizma. Inkubacija je provedena na 37°C tokom 24 sata te je izmjerena apsorbancija na 620 nm pomoću čitača mikrotitarskih pločica. U razdoblju od 24 sata praćen je rast i izračunata inhibicija izrazom:

$$\text{Inhibicija (\%)} = (1 - A_t/A_0) \times 100 \quad [1]$$

gdje je:

A_t = apsorbancija u vremenu t

A_0 = apsorbancija u vremenu 0

Kontrolni uzorci su umjesto uzoraka kombuche sadržavali neinokulirani MRS bujon tretiran isto kao i ostali uzorci, a slijepe probe bili su uzorci bez dodatka patogenih mikroorganizama.

3.2.2 Određivanje biofilmova

Sposobnost formiranja biofilmova određena je prema metodi opisanoj u Kostelac i sur. (2021). U polistirenskim mikrotitarskim pločicama s 12 jažica dodano je 2ml MRS bujona, a uzorci kombuche su naciepljeni sa 100 μL suspenzije prethodno uzgojenih bakterijskih kultura. Pločice su stavljene na inkubaciju na 37 °C tijekom 48 h. Sadržaj jažica je ispražnjen nakon inkubacije pipetiranjem na način da se dno jažica ne grebe. Nastali talog bakterijskih stanica ispran je 2ml sterilne vode uz mješanje. Stanice koje su preostale (adhezirane u biofilm) fiksirane su dodatkom 2 mL metanola i inkubacijom tijekom 15 min. Nakon fiksiranja, metanol je uklonjen a pločice su osušene na zraku. Adhezirane stanice obojane su dodatkom 1 % -tnog kristal violeta tijekom 5 min, a višak boje je uklonjen ispiranjem s deioniziranom vodom. Nakon toga, dodano je 2 mL 33% octene kiseline zbog čega dolazi do otpuštanja vezane vode te je mjerena optička gustoća (OD) pri 595 nm pomoću čitača mikrotitarskih pločica. Kao negativnu kontrolu korišteni su neinokulirani uzorci.

3.2.3 Sposobnost uklanjanja DPPH slobodnih radikala

Sposobnost uklanjanja DPPH slobodnih radikala, kao mjera ukupne antioksidativne aktivnosti, određena je prema Kostelac i sur. (2021). Uzorci kombuche su pripremljeni na način da je od svakog uzroka uzeto 10 mL i stavljeno u centrifugu na 6000 rpm⁻¹ 15 min, te je potom svaki uzorak filtriran kroz filter za špricu u prethodno sterilizirane kivete.

U polistirenske mikrotitarske pločice s 24 jažice dodano je 1975 μL otopine DPPH radikala (0,07 mM) i 25 μL uzorka kombuche te je stavljeno na 30 min u mrak. Nakon 30 min, pipetirano je 240 μL svake otopine u polistirenske mikrotitarske pločice s 96 jažica te je izmjerena apsorbancija na 620 nm u mikrotitarskom čitaču. Kontrola je sadržavala otopinu DPPH radikala je demineraliziranu vodu. Postotak uklanjanja preostalih DPPH sad slobodnih radikala izračunat je prema izrazu:

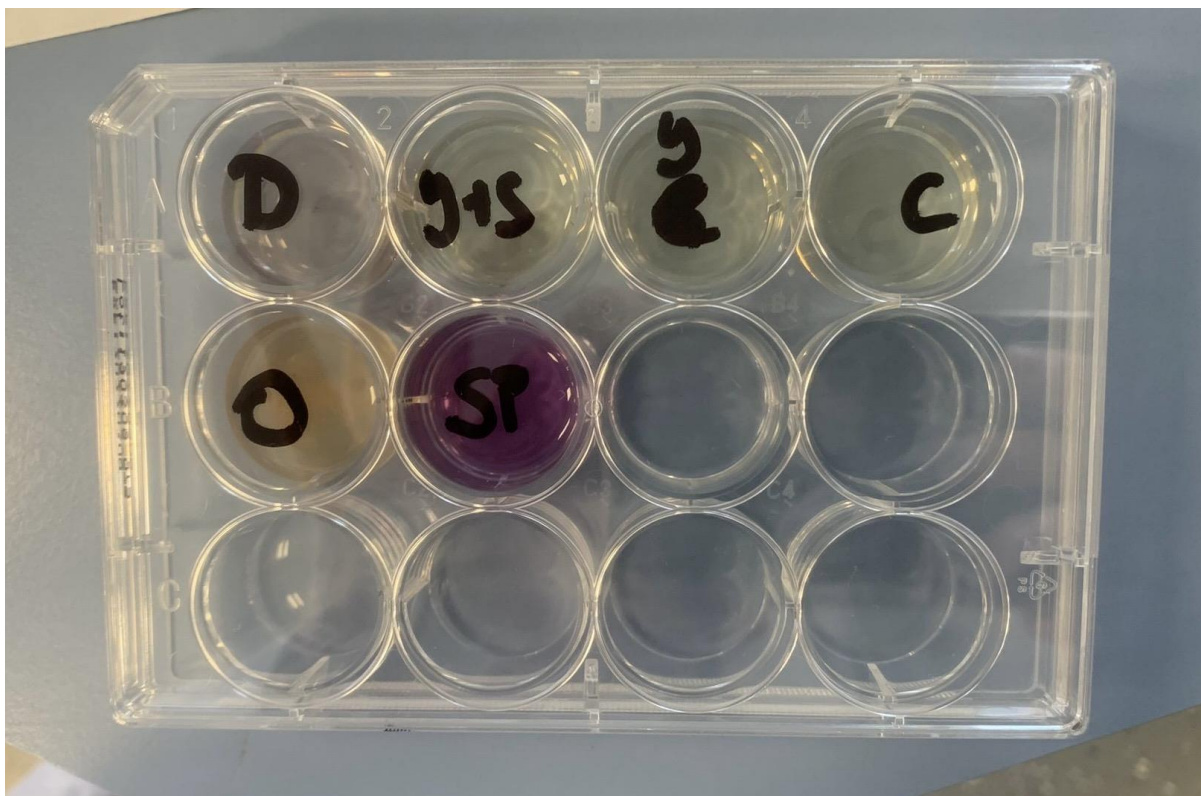
$$\text{Uklanjanje radikala (\%)} = [1 - (A - A_{bl} / A_c)] * 100 \quad [4]$$

gdje je:

A - apsorbancija uzorka

A_{bl} - apsorbancija slijepe probe

A_c - apsorbancija kontrolnog uzorka



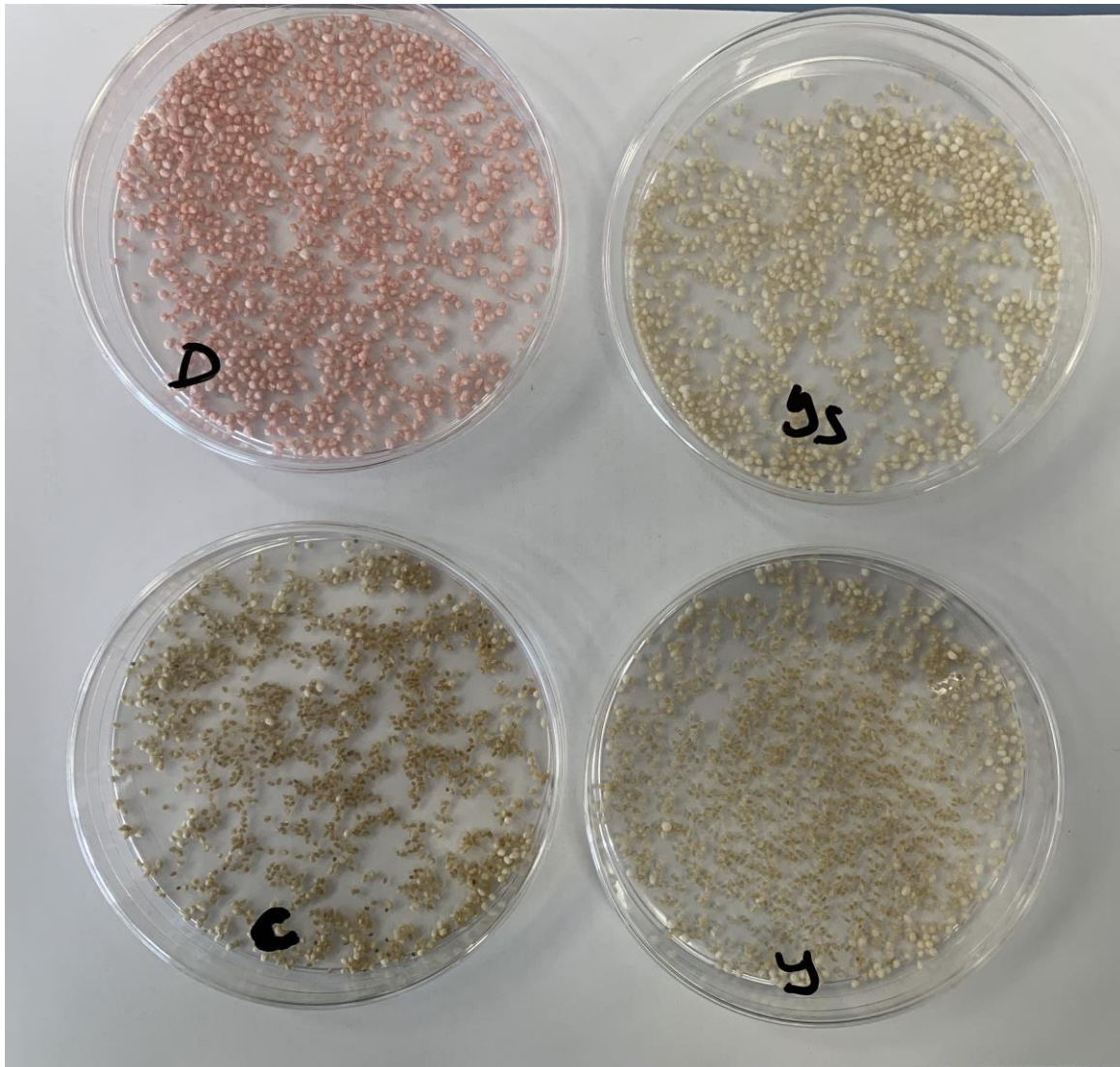
Slika 4. Provedba eksperimenta sposobnosti uklanjanja DPPH slobodnih radikala (vlastita slika)

3.2.4 Mikroinkapsulacija uzoraka kombuche

Mikroinkapsulacija uzoraka kombuche provedena je na način da je u 20 mL uzorka kombuche dodano 0,4 g natrijevog alginata (3 %). Otopina alginata u suspenziji je pomoću šprice postepeno dodana u 25ml 2 % -tne otopine CaCl_2 uz miješanje na magnetnoj mješalici. Nastali mikroenkapsulati ostavljeni su u otopini CaCl_2 , kako bi očvrsnuli tijekom 20 min te su potom uklonjeni preko cijedila.

3.2.5 Liofilizacija mikroinkapsulirane kombuche

Nastali očvrsnuti mikroenkapsulati uzoraka kombuche mase 10 g prvo su staljeni na zamrzavanje, a potom liofilizirani u Christ Alpha 1-2 LD plus freeze dryer (Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Osterode, Germany) na 24 sata.



Slika 5. Liofilizirani mikroinkapsulati uzoraka kombuche (vlastita slika)

3.2.6 Izlaganje liofiliziranih mikrokapula kombuche simuliranim uvjetima gastrointestinalnog sustava

Određeni su uvjeti preživljavanja mikroenkapsulirane kombuche u uvjetima želuca i crijeva. Navedeni uvjeti su simulirani pripremom otopina kako je postavljeno u radu Marques i sur. (2011.) uz prilagođene koncentracije enzima pankreatina i pepsina prema Frece (2007).

3.2.6.1 Priprema simuliranih uvjeta želuca

Uvjeti koji oponašaju prirodne uvjete želuca ostvareni su otapanjem pepsina (3 gL^{-1}) u otopini sljedećih soli (gL^{-1}): NaCl 9,0, KCl 0,8946, NaH_2PO_4 0,8878, Na_2SO_4 1,680, NaHCO_3 1,680, $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ 0,1981 te podešavanjem pH na 3,0 pomoću koncentrirane kloridne kiseline.

3.2.6.2 Priprema simuliranih uvjeta u crijevima

Uvjeti koji oponašaju uvjete u tankom crijevu ostvareni su otapanjem pankreatina (1 gL^{-1}) i žučnih soli ($3,0 \text{ gL}^{-1}$) u otopini sljedećih soli (gL^{-1}): NaCl 9,0, KCl 0,8946, NaH_2PO_4 0,8878, Na_2SO_4 1,680, NaHCO_3 1,680, $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ 0,1981 te podešavanjem pH na 7,0 pomoću natrijev lužine.

3.2.7 Određivanje uklanjanja DPPH slobodnih radikala nakon izlaganja simuliranim uvjetima gastro intestinalnim uvjetima

Liofilizirani mikroenkapsulati uzorka kombuche nakon što su podvrgnuti simuliranom gastro intestinalnom sustavu korišteni za mjerenje uklanjanja DPPH slobodnih radikala. Metoda se od prethodno korištene metode uklanjanja DPPH radikala razlikuje što je umjesto $25 \mu\text{L}$ uzorka, uzeto 0.2 g nastalih mikroenkapsulata nakon simuliranih uvjeta želuca, odnosno $100 \mu\text{L}$ nastale otopine nakon simuliranih uvjeta crijeva.

3.2.8 Statistička obrada podataka

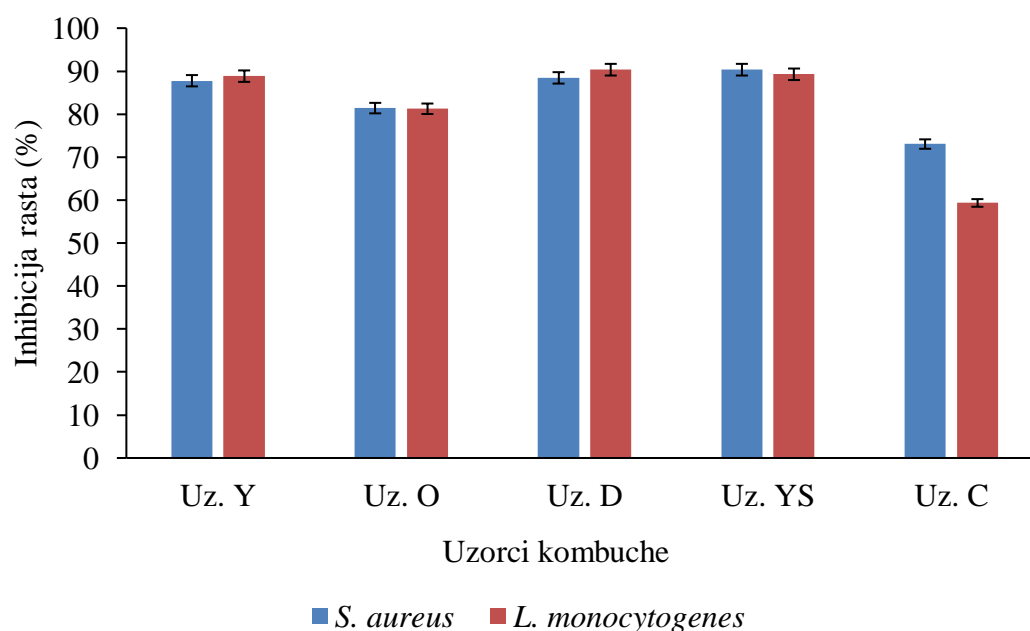
Rezultati eksperimanata izraženi su kao srednje vrijednosti ponovljenih eksperimenata \pm standardna devijacija. Statističke razlike među ponavljanjima određene su t-testom, a usporedbe među grupama provede su korištenjem ANOVA testa. Statistička značajnost podešena je na $p < 0,05$ te su sve usporedbe rađene pomoću programa Excel.

4. REZULTATI I RASPRAVA

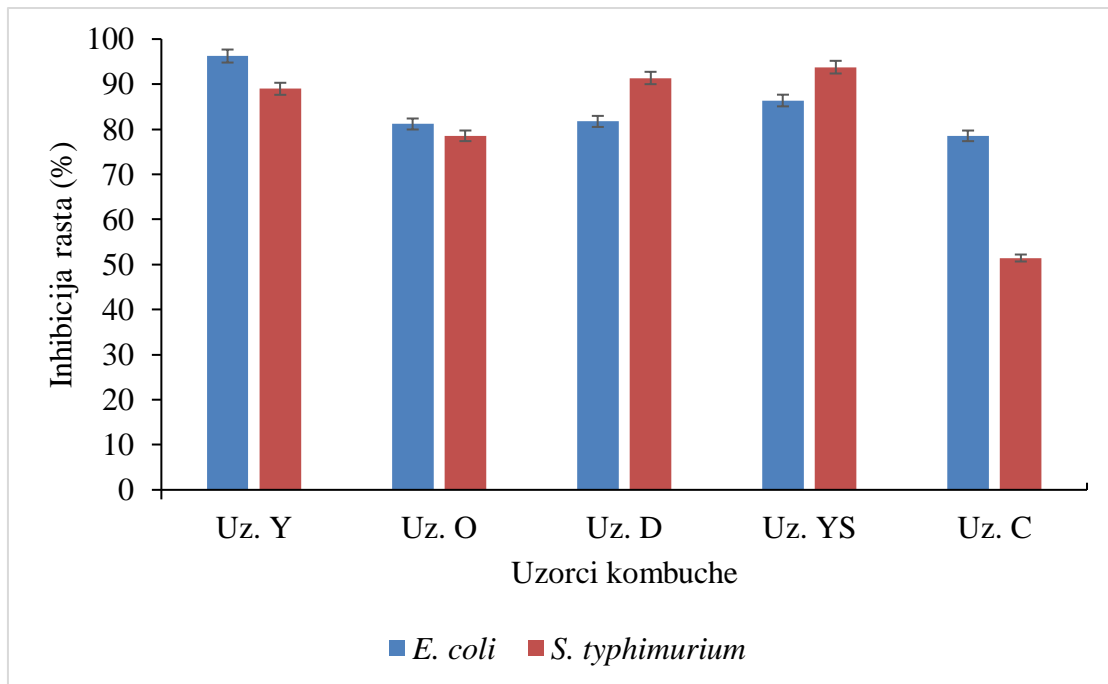
U ovom radu određena je antimikrobna aktivnost uzoraka kombuche, sposobnost uklajnanja DPPH slobodnih radikala, određivanje biofilmova patogenih bakterija i mikroinkapsulacija i liofilizacija mikroinkapsuliranih uzoraka kombuche koji su bili izloženi simulaciji gastrointestinalnog sustava. Dodatno, ispitana je antioksidacijska aktivnost nakon simulacije gastrointestinalnih uvjeta.

4.1 Određivanje antimikrobne aktivnosti

Ispitana je antimikrobna aktivnost uzoraka kombuche na patogene mikroorganizme *E. coli*, *S. aureus*, *S. typhimurium* te *L. monocytogenes*. Rezultati su prikazani na slikama 6 i 7.



Slika 6. Sposobnost uzoraka kombuche da inhibiraju rast *S. aureus* i *L. monocytogenes* tijekom 24 sata uzgoja pri 37 °C.



Slika 7. Sposobnost uzoraka kombuche da inhibiraju rast *E. coli* i *S. typhimurium* tijekom 24 sata uzgoja pri 37 °C.

Iz rezultata (slika 6) može se zaključiti kako su svi uzorci u odnosu na kontrolu pokazali visoku antimikrobnu aktivnost prema *Salmonella aureus* (preko 75 %). Što se tiče antimikrobne aktivnosti prema *Listeria monocytogenes*, svi uzorci osim uzorka C inhibirali su patogeni mikroorganizam preko 80 %, dok je uzorak C uspješno inhibirao oko 60 %, što se i dalje smatra vrlo uspješnom inhibicijom.

Iz rezultata (slika 7) zaključuje se kako su uzorci kombuche u odnosu na kontrolu pokazali visoku antimikrobnu aktivnost prema *Escherichia coli* (preko 80 %). Antimikrobna aktivnost prema *Salmonella typhimurium* je kod svih uzoraka vrlo visoka (preko 75 %), osim za uzorak C, za koji je oko 55 %.

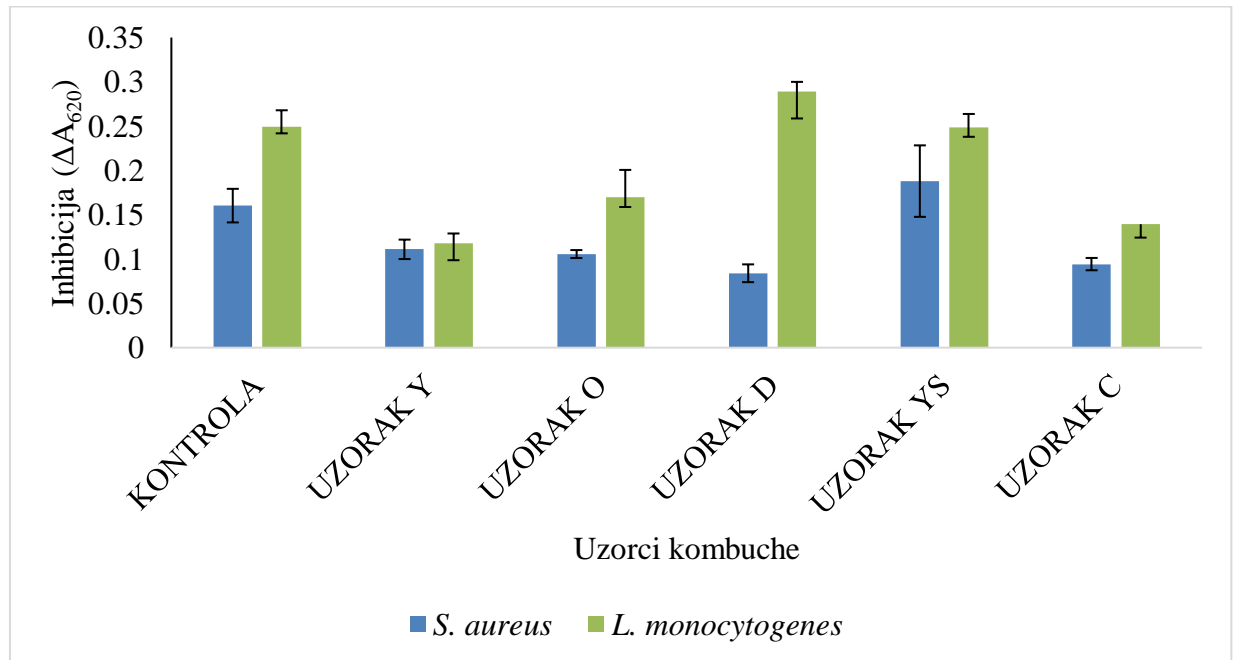
Rezultati dobiveni u istraživanju koje su proveli Battikh i suradnici (2012) djelomično se kose s dobivenim rezultatima u ovom radu. U istraživanju ispitana je antimikrobna aktivnost kombuche od crnog i zelenog čaja fermentiranih 21 dan. Rezultati istraživanja su pokazali da antimikrobna aktivnost fermentiranog crnog čaja je najveća prema patogenom mikroorganizmu *L. monocytogenes*, dok za druge patogene mikroorganizme nije bila značajna. Antimikrobna aktivnost se povećavala dodavajući kiselinu fermentiranom crnom čaju, ali zagrijavanjem fermentiranog crnog čaja nije primjećena antimikrobna aktivnost. Time se može zaključiti da je fermentirani crni čaj ima antimikrobni potencijal prema patogenim mikroorganizmima zahvaljujući svojem sadržaju organskih kiselina. Fermentirani zeleni čaj pokazao je još veću antimikrobnu

aktivnost prema *L. monocytogenes*, dok drugi patogeni mikroorganizmi nisu pokazali znakove inhibicije. Dodatnim zakiseljavanjem octenom kiselinom, antimikrobna aktivnost bila je još veća, te je stagnirala prilikom zagrijavanja. Ovim rezultatima se može zaključiti kako utjecaj na antimikrobni potencijal fermentiranog zelenog čaja nemaju samo organske kiseline, već i ostale biološke komponente čaja poput bakeriocina, proteina i enzima. Hou i suradnici (2021) su u svojoj recenziji o antimikrobnom potencijalu kombuche uspoređivanjem niza istraživanja donijeli zaključak kako antimikrobna aktivnost kombuche potječe od njenog sadržaja organskih kiselina, polifenola i bakterija mliječne kiseline. Međutim, sami mehanizam antimikrobne aktivnosti i dalje je podložan raspravi.

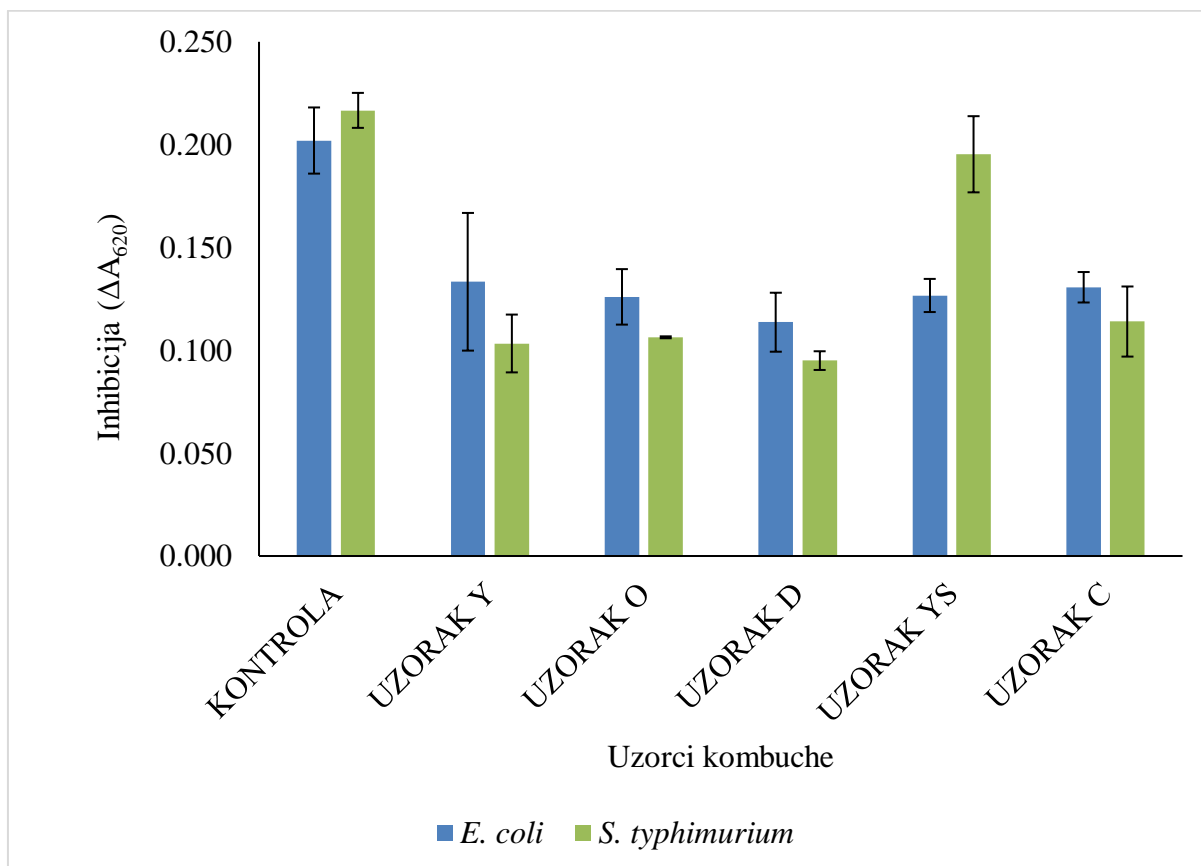
Dosada nisu objavljena nikakva istraživanja u kojem su rezultati dobiveni fermentacijom uzoraka soka od drienka (uzorak D) i octa (uzorak O) koji su istraživani u ovom radu.

4.2. Sposobnost inhibicije formiranja biofilмова patogena uz pomoć uzoraka kombuche

U ovom radu određena je sposobnost formiranja biofilмова odabranih patogenih bakterija u prisustvu uzoraka kombuche u odnosu na kontrolni uzorak. Rezultati su prikazani u grafovima na slikama 8 i 9.



Slika 8. Djelovanje uzoraka kombuche na formaciju biofilмова patogena *S. aureus* i *L. monocytogenes*



Slika 9. Djelovanje uzoraka kombuche na formaciju biofilmova patogena *E. coli* i *S. typhimurium*

Iz dobivenih rezultata (Slika 8) može se uočiti kako su svi uzorci kombuche statistički značajno inhibirali formaciju biofilmova *S. aureus*, osim uzorka YS. Što se tiče *L. monocytogenes*, uočena je statistički značajna inhibicija kod većine uzoraka, osim uzorka D i YS.

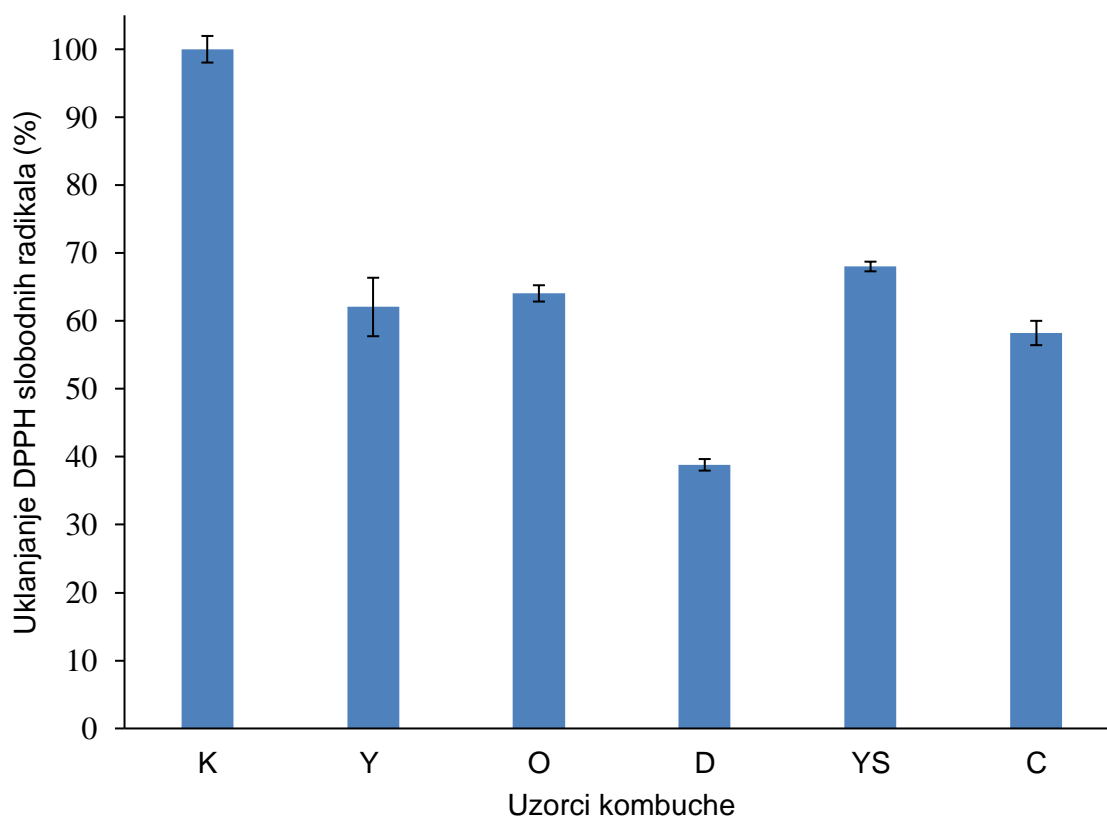
Iz dobivenih rezultata (Slika 9) vidljivo je kako su svi uzorci pripremljenih kombucha statistički značajno smanjili proizvodnju biofilmova *E. coli*. Kod *S. typhimurium*, uočena je statistički značajna inhibicija kod svih uzoraka osim uzorka YS.

Sposobnost kombuche za inhibiciju formiranja biofilmova patogenih organizama nije provedeno u nitijednom istraživanju do sada. Ipak, bitno je naglasiti kako je antimikrobna aktivnost kombuche i njenih derivata itekako prepoznata od niza znanstvenika.

4.3. Sposobnost uklanjanja DPPH radikala

Antioksidativna aktivnost se smatra jednim od najbitnijih funkcionalnih svojstva funkcionalnih prehrambenih proizvoda stoga je u ovom radu određena sposobnost

uklanjanja DPPH radikala uzorka kombuche kao način antioksidativne aktivnosti. Rezultati su prikazani na grafu u slici 10.



Slika 10. Rezultati sposobnosti uklanjanja DPPH radikala

Iz dobivenih rezultata (Slika 10) može se uočiti kako je statistički najveću antioksidativnu aktivnost pokazao uzorak YS (70 %) , dok najmanju uzorak D (35 %). Za uzorak D može se smatrati da je prilikom provedbe samog pokusa smetala sama boja uzorka (crveno – roza). Međutim, ta pretpostavka se kosi s rezultatom uzorka O, čija je boja tamno crvena. Potrebna su dodatna istraživanja kako bi se mehanički objasnile interakcije bioaktivnih komponenti u navedenim uvjetima.

U istraživanju koje su proveli Jayabalan i suradnici (2008), u kojem su među ostalim određivali sposobnost uklanjanja DPPH radikala tijekom procesa fermentacije crnog, zelenog i bijelog čaja, otkriveno je kako zeleni čaj ima uvjerljivo najveću sposobnost uklanjanja DPPH radikala (88 %), dok je crni čaj imao nešto niži postotak (80 %). Također, tijekom fermentacije udio fenolnih spojeva se fermentacijom čajeva postepeno povećavao. Stoga se smatra da je antioksidativna aktivnost kombuche direktno povezana s količinom polifenola i katehina u kombuchi.

Rezultate ovog rada potvrđuju i rezultati istraživanja koje su proveli Fu i suradnici (2014). U istraživanju su ispitivali antioksidativnu aktivnost kombucha pripremljenih od tri različite vrste čaja. Rezultati su pokazali da je najbolju sposobnost uklanjanja DPPH radikala pokazao zeleni čaj niske cijene (preko 88 %), dok je crni čaj pokazao najlošiju (oko 30 %).

4.4. Mikroinkapsulacija uzoraka kombuche i liofilizacija nastalih mikroinkapsulata

U ovom radu provedena je mikroinkapsulacija uzoraka kombuche koji su potom podvrgnuti liofilizaciji u svrhu izradnje prototipa proizvoda. Dodatan cilj ovog rada bila je procjena uspješnosti prototipa procesa stoga je iz provedenih eksperimenata izvedena formula procjene dobivene mase konačnog proizvoda. Rezultati provedenih metoda prikazani su u Tablici 1 i u grafu na slici 11.

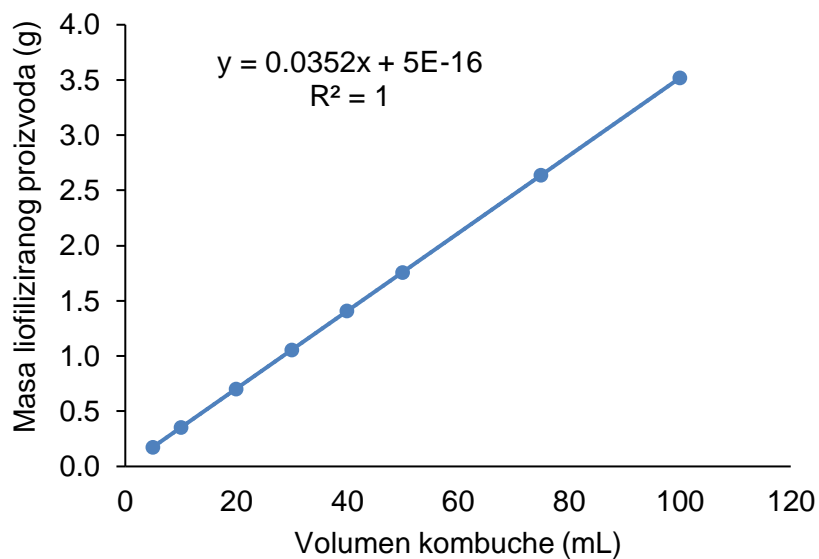
$$m_{\text{proizvoda}} (g) = \frac{V_{(ml)}}{1.99} \times 0.07$$

gdje je broj 1.99 razlomak volumena i prosječne vrijednosti masa dobivenih liofilizacijom, a broj 0.07 udio suhe tvari liofiliziranog mikroinkapsulata.

Tablica 1. Određivani parametri volumena početnog uzorka i masa tijekom provedbe postupaka mikroinkapsulacije i liofilizacije različitih uzoraka kombuche

	UZORAK Y	UZORAK YS	UZORAK D	UZORAK C
Volumen kombuche, V [mL]	20	20	20	20
Masa kapsula prije liofilizacije, m ₀ [g]	9.30	10.55	10.56	9.84
Masa kapsula nakon liofilizacije, m ₁ [g]	0.65	0.75	0.75	0.70
m ₁ /m ₀	0.07	0.07	0.07	0.07
(m ₁ /m ₀) × 100 [%]	6.99	7.11	7.10	7.11

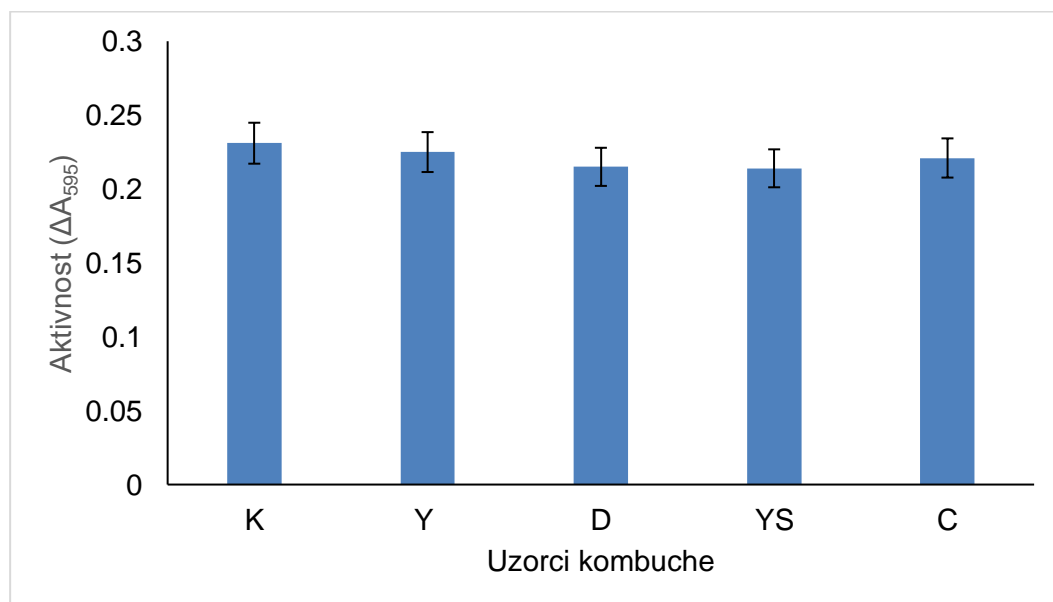
Prilikom mikroonkapsulacije korišten je Na-alginat kao omotač za bioaktivne komponente i njihovu zaštitu od stresnih uvjeta gastrointestinalnog trakta. Također, alginat omogućuje postepeno otpuštanje u donjem dijelu gastrointestinalnog sustava i ciljano ispoljavanje funkcionalnih karakteristika (Frent i sur., 2022). Smisao provedbe liofilizacije u ovom radu je uklanjanje vode sublimacijom koja ne utječe na uništenje bioloških struktura i da su proizvodi stabilni tijekom transporta i skladistenja. (Capela i sur., 2006)



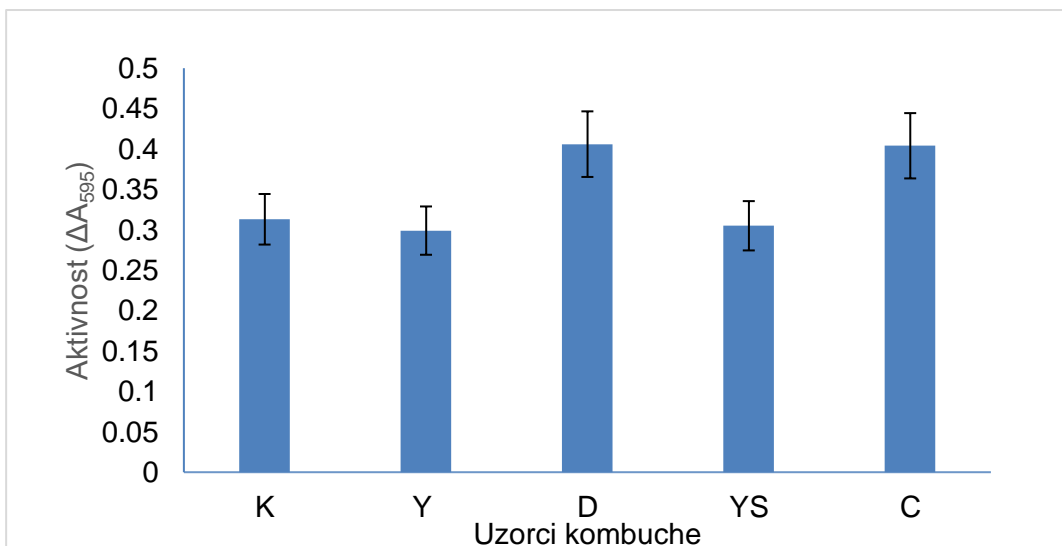
Slika 11. Graf ovisnosti mase liofiliziranog proizvoda o volumenu uzorka

4.5. Određivanje sposobnosti uklanjanja DPPH slobodnih radikala nakon izlaganja simuliranim uvjetima gastro-intestinalnog sustava

U ovom radu provedena je simulacija gastrointestinalnog sustava i proučavana antioksidativna aktivnost liofiliziranih mikroinkapsulata koji predstavljaju veliki potencijal kao funkcionalni proizvod za tržište. Rezultati provedene metode prikazani su u grafovima na slici 12 i 13.



Slika 12. Sposobnost uklanjanja DPPH radikala uzoraka u želucu



Slika 13. Sposobnost uklanjanja DPPH radikala uzoraka u crijevima

Iz dobivenih rezultata (Slika 12) može se zaključiti kako provedbom ovog eksperimenta nije uočena značajna promjena, odnosno nije detektirana antioksidativna aktivnost. Moguće objašnjenje dobivenih rezultata je da je alginatni omotač zaštitio antioksidacijske efekte sadržane u kombuchi od mjerne otopine, što je iznimno važno jer je potvrda da ne dolazi do otpuštanja u želucu. Što se tiče dobivenih rezultata za sposobnost uklanjanja DPPH radikala (Slika 13), uzorak D i V pokazali su veću antioksidativnu aktivnost kombucha od kontrolnog uzorka, što se smatra nepravilno napravljenim eksperimentom. Do sada nije mjerena antioksidativna aktivnost u crijevnom sadržaju ovog sastava te smatram da je potrebno još studija zbog toga što sam prototip proizvoda pokazuje veliki potencijal kao funkcionalni proizvod s funkcionalnim svojstvima. Za usporedbu, Mohsin i suradnici (2022) su proveli istraživanje o efektima mikroinkapsulacije kombucha na antioksidativnu i antimikrobnu aktivnost. Rezultati istraživanja mikroinkapsulacije kombuche arapskom gumom pokazali su da sposobnost uklanjanja DPPH radikala se značajno smanjila samom mikroinkapsulacijom kombuche.

5. ZAKLJUČCI

Obzirom na dobivene rezultate može se zaključiti:

1. U ovom radu određena je antimikrobna aktivnost različitih vrsta kombuche prema patogenim mikroorganizmima *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* i *Salmonella typhimurium*. Najbolju antimikrobnu aktivnost prema *E. coli* pokazala je kombucha dobivena fermentacijom zelenog čaja Yerba mate, prema *S. aureus* i *S. typhimurium* kombucha dobivena fermentacijom mješavine zelenih čajeva Yerba mate i Sencha, dok je prema *L. monocytogenes* pokazao uzorak kombuche od bobica drijenka.
2. Uspješno je provedena inhibicija formiranja biofilmova prethodno navedenih patogenih mikroorganizmima uzorcima kombuche. Gotovo svi uzorci su vrlo uspješno inhibirali formaciju biofilmova patogenih mikroorganizama uz par iznimaka. Uzorak kombuche dobivene fermentacijom mješavine zelenih čajeva Yerba mate i Sencha nije značajno inhibirao formaciju biofilmova *S. aureus* i *L. monocytogenes* i *S. Typhimurium*. Uzorak kombuche od bobica drijenka nije značajno inhibirao formaciju biofilmova *L. monocytogenes*.
3. Određena je sposobnost uklanjanja DPPH radikala uzoraka kombuche kao način određivanja antioksidativne aktivnosti. Statistički najveću sposobnost uklanjanja DPPH radikala pokazao je uzorak kombuche od mješavine zelenih čajeva Yerba mate i Sencha, dok je najmanju sposobnost za uklanjanje DPPH radikala pokazao uzorak kombuche od bobica drijenka.
4. Provedena je mikroinkapsulacija, a zatim i liofilizacija uzoraka kombuche u svrhu stvaranja prototipa proizvoda od uzoraka kombuche. Dobiveni liofilizirani mikroinkapsulati bili su podvrgnuti simulaciji gastrointestinalnog trakta. Tijekom simulacije želuca, mikroinkapsulati su ostali formirani. Međutim, djelovanjem različitih soli i enzima prilikom simulacije crijeva mikroinkapsulati su se potpuno otopili. Razlog ovome je korištenje Na-alginata, koji se koristi kao omotač bioaktivnih komponenti i kao zaštita prilikom stresnih uvjeta u gastrointestinalnom traktu.
5. Proveden je eksperiment određivanja sposobnosti uklanjanja DPPH radikala nakon prolaska mikroinkapsulata kroz simulaciju gastrointestinalnog trakta. Prilikom provedbe simulacije želuca nije utvrđena nikakva značajna promjena, dok kod provedbe simulacije crijeva nisu utvrđeni očekivani rezultati.

6. POPIS LITERATURE

- Abaci N, Senol Deniz FS, Orhan IE (2022) Kombucha – An ancient fermented beverage with desired bioactivities: A narrowed review. *Food Chem X* **14**:100302. <https://doi.org/10.1016/j.fochx.2022.100302>
- Antolak H, Piechota D, Kucharska A (2021) Kombucha Tea—A Double Power of Bioactive Compounds from Tea and Symbiotic Culture of Bacteria and Yeasts (SCOBY). *Antioxidants* **10**:1541. <https://doi.org/10.3390/antiox10101541>
- Battikh H, Bakhrouf A, Ammar E (2012) Antimicrobial effect of Kombucha analogues. *LWT - Food Sci Technol* **47**:71–77. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2011.12.033>
- Blanc PJ (1996) Characterization of the tea fungus metabolites. *Biotechnol Lett* **18**:139–142. <https://doi.org/10.1007/BF00128667>
- Boesch C, Trček J, Sievers M, Teuber M (1998) *Acetobacter intermedius*, sp. nov. *Syst Appl Microbiol* **21**:220–229. [https://doi.org/10.1016/S0723-2020\(98\)80026-X](https://doi.org/10.1016/S0723-2020(98)80026-X)
- Capela P, Hay TKC, Shah NP (2006) Effect of cryoprotectants, prebiotics and microencapsulation on survival of probiotic organisms in yoghurt and freeze-dried yoghurt. *Food Res Int* **39**:203–211. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2005.07.007>
- Cetojevic-Simin DD, Bogdanovic GM, Cvetkovic DD, Velicanski AS Antiproliferative and antimicrobial activity of traditional Kombucha and *Satureja montana* L. Kombucha
- Chakravorty S, Bhattacharya S, Chatzinotas A, Chakraborty W, Bhattacharya D, Gachhui R (2016) Kombucha tea fermentation: Microbial and biochemical dynamics. *Int J Food Microbiol* **220**:63–72. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.12.015>
- Chong AQ, Lau SW, Chin NL, Talib RA, Basha RK (2023) Fermented Beverage Benefits: A Comprehensive Review and Comparison of Kombucha and Kefir Microbiome. *Microorganisms* **11**:1344. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11051344>
- Coelho RMD, Almeida AL de, Amaral RQG do, Mota RN da, Sousa PHM de (2020) Kombucha: Review. *Int J Gastron Food Sci* **22**:100272. <https://doi.org/10.1016/j.ijgfs.2020.100272>
- Coton M, Pawtowski A, Taminiau B, Burgaud G, Deniel F, Coulloume-Labarthe L, Fall A, Daube G, Coton E (2017) Unraveling microbial ecology of industrial-scale Kombucha fermentations by metabarcoding and culture-based methods. *FEMS Microbiol Ecol* **93**:fix048. <https://doi.org/10.1093/femsec/fix048>
- Deghrigue M, Chriaa J, Battikh H, Abid K (2013) Antiproliferative and antimicrobial activities of kombucha tea. *Afr J Microbiol Res* **7**: 3466–3470. <https://doi.org/10.5897/AJMR12.1230>
- Dufresne C, Farnworth E (2000) Tea, Kombucha, and health: a review. *Food Res Int* **33**:409–421. [https://doi.org/10.1016/S0963-9969\(00\)00067-3](https://doi.org/10.1016/S0963-9969(00)00067-3)
- Dutta H, Paul SK (2019) *Kombucha* Drink: Production, Quality, and Safety Aspects. In: Grumezescu AM, Holban AM (eds) *Production and Management of Beverages*.

- Frece, J, Markov, K, Kovačević, D : Određivanje autohtone mikrobne populacije i mikotoksina te karakterizacija potencijalnih starter kultura u slavonskom kulenu // Meso : prvi hrvatski časopis o mesu, XII (2010), 2; 92-98
- Frece, J. (2007) Sinbiotički učinak bakterija: *Lactobacillus acidophilus* M92, *Lactobacillus plantarum* L4 i *Enterococcus faecium* L3. Doktorska disertacija, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb, Hrvatska.
- Frent OD, Vicas LG, Duteanu N, Morgovan CM, Jurca T, Pallag A, Muresan ME, Filip SM, Lucaciu R-L, Marian E (2022) Sodium Alginate—Natural Microencapsulation Material of Polymeric Microparticles. *Int J Mol Sci* 23:12108. <https://doi.org/10.3390/ijms232012108>
- Fu C, Yan F, Cao Z, Xie F, Lin J (2014) Antioxidant activities of kombucha prepared from three different substrates and changes in content of probiotics during storage. *Food Sci Technol* 34:123–126. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612014005000012>
- Gaggia F, Baffoni L, Galiano M, Nielsen DS, Jakobsen RR, Castro-Mejía JL, Bosi S, Truzzi F, Musumeci F, Dinelli G, Di Gioia D (2019) Kombucha Beverage from Green, Black and Rooibos Teas: A Comparative Study Looking at Microbiology, Chemistry and Antioxidant Activity. *Nutrients* 11:1. <https://doi.org/10.3390/nu11010001>
- Gomes RJ, Borges M de F, Rosa M de F, Castro-Gómez RJH, Spinosa WA (2018) Acetic Acid Bacteria in the Food Industry: Systematics, Characteristics and Applications. *Food Technol Biotechnol* 56:139–151. <https://doi.org/10.17113/ftb.56.02.18.5593>
- Greenwalt CJ, Ledford RA, Steinkraus K (1998) Determination and Characterization of the Antimicrobial Activity of the Fermented TeaKombucha. *LWT - Food Sci Technol* 31:291–296. <https://doi.org/10.1006/fstl.1997.0354>
- Hou J, Luo R, Ni H, Li K, Mgomi FC, Fan L, Yuan L (2021) Antimicrobial potential of kombucha against foodborne pathogens: a review. *Qual Assur Saf Crops Foods* 13:53–61. <https://doi.org/10.15586/qas.v13i3.920>
- Jayabalan R, Malbaša RV, Lončar ES, Vitas JS, Sathishkumar M (2014) A Review on Kombucha Tea—Microbiology, Composition, Fermentation, Beneficial Effects, Toxicity, and Tea Fungus. *Compr Rev Food Sci Food Saf* 13:538–550. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12073>
- Jayabalan R, Subathradevi P, Marimuthu S, Sathishkumar M, Swaminathan K (2008) Changes in free-radical scavenging ability of kombucha tea during fermentation. *Food Chem* 109:227–234. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.12.037>
- Júnior JC da S, Meireles Mafaldo Í, de Lima Brito I, Tribuzy de Magalhães Cordeiro AM (2022) Kombucha: Formulation, chemical composition, and therapeutic potentialities. *Curr Res Food Sci* 5:360–365. <https://doi.org/10.1016/j.crfs.2022.01.023>
- Kayisoglu S, Coskun F (2020) Determination of physical and chemical properties of kombucha teas prepared with different herbal teas. *Food Sci Technol* 41:393–397. <https://doi.org/10.1590/fst.12720>
- Kostelac, D, Gerić, M, Gajski, G, Markov, K, Domijan, A. M., Čanak, I., ... & Frece, J. (2021).

- Lactic acid bacteria isolated from equid milk and their extracellular metabolites show great probiotic properties and anti-inflammatory potential. *International Dairy Journal*, **112**, 104828. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2020.104828>
- Laureys D, Britton SJ, De Clippeleer J (2020) Kombucha Tea Fermentation: A Review. *J Am Soc Brew Chem* **78**:165–174. <https://doi.org/10.1080/03610470.2020.1734150>
- Li S, Zhang Y, Gao J, Li T, Li H, Mastroyannis A, He S, Rahaman A, Chang K (2022) Effect of Fermentation Time on Physicochemical Properties of Kombucha Produced from Different Teas and Fruits: Comparative Study. *J Food Qual* 2022:1–10. <https://doi.org/10.1155/2022/2342954>
- Liu C-H, Hsu W-H, Lee F-L, Liao C-C (1996) The isolation and identification of microbes from a fermented tea beverage, Haipao, and their interactions during Haipao fermentation. *Food Microbiol* **13**:407–415. <https://doi.org/10.1006/fmic.1996.0047>
- Malbaša RV, Lončar ES, Vitas JS, Čanadanović-Brunet JM (2011) Influence of starter cultures on the antioxidant activity of kombucha beverage. *Food Chem* **127**:1727–1731. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.02.048>
- Marques, M. R., Loebenberg, R., & Almukainzi, M. (2011). Simulated biological fluids with possible application in dissolution testing. *Dissolution Technol*, **18**: 15-28.
- Martínez Leal J, Valenzuela Suárez L, Jayabalan R, Huerta Oros J, Escalante-Aburto A (2018) A review on health benefits of kombucha nutritional compounds and metabolites. *CyTA - J Food* **16**:390–399. <https://doi.org/10.1080/19476337.2017.1410499>
- Mimica-Dukic N, Bozin B, Sokovic M, Simin N (2004) Antimicrobial and Antioxidant Activities of *Melissa officinalis* L. (Lamiaceae) Essential Oil. *J Agric Food Chem* **52**:2485–2489. <https://doi.org/10.1021/jf030698a>
- Mohsin AZ, Mat Nor NA, Muhiaddin BJ, Mohd Roby BH, Abadi MM, Marzlan AA, Hussain N, Meor Hussin AS (2022) The effects of encapsulation process involving arabic gum on the metabolites, antioxidant and antibacterial activity of kombucha (fermented sugared tea). *Food Hydrocoll Health* **2**:100072. <https://doi.org/10.1016/j.fhfh.2022.100072>
- Nazemi L, Hashemi SJ, Daie Ghazvini R, Saeedi M, Khodavaisy S, Barac A, Modiri M, Akbari Dana M, Zare shahrabadi Z, Rezaie S (2019) Investigation of *cgrA* and *cyp51A* gene alternations in *Aspergillus fumigatus* strains exposed to kombucha fermented tea. *Curr Med Mycol* **5**:36–42. <https://doi.org/10.18502/cmm.5.3.1745>
- Nyiew K-Y, Kwong PJ, Yow Y-Y (2022) An overview of antimicrobial properties of kombucha. *Compr Rev Food Sci Food Saf* **21**:1024–1053. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12892>
- Ratsep, M. (2014) Effect of *Lactobacillus plantarum* strains on clinical isolates of *Clostridium difficile* *in vitro*. *Journal of Probiotics & Health*. **2**(1), 1000119.
- Roussin, M. (1996). Analyses of kombucha ferments. *Salt Lake City: Information Resources, LC*.

- Sievers M, Lanini C, Weber A, Schuler-Schmid U, Teuber M (1995) Microbiology and Fermentation Balance in a Kombucha Beverage Obtained from a Tea Fungus Fermentation. *Syst Appl Microbiol* **18**:590–594. [https://doi.org/10.1016/S0723-2020\(11\)80420-0](https://doi.org/10.1016/S0723-2020(11)80420-0)
- Sreeramulu G, Zhu Y, Knol W (2001) Characterization of Antimicrobial Activity in Kombucha Fermentation. *Acta Biotechnol* **21**:49–56. [https://doi.org/10.1002/1521-3846\(200102\)21:1<49::AID-ABIO49>3.0.CO;2-G](https://doi.org/10.1002/1521-3846(200102)21:1<49::AID-ABIO49>3.0.CO;2-G)
- Steinkraus KH, Shapiro KB, Hotchkiss JH, Mortlock RP (1996) Investigations into the antibiotic activity of tea fungus/kombucha beverage. *Acta Biotechnol* **16**:199–205. <https://doi.org/10.1002/abio.370160219>
- Talawat, S., Ahantharik, P., Laohawiwattanakul, S., Premasuk, A., & Ratanapo, S. (2006). Efficacy of fermented teas in antibacterial activity. *Agriculture and Natural Resources*, *40*(4), 925-933.
- Tan WC, Muhiadin BJ, Meor Hussin AS (2020) Influence of Storage Conditions on the Quality, Metabolites, and Biological Activity of Soursop (*Annona muricata*. L.) Kombucha. *Front Microbiol* **11**. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.603481>
- Teoh AL, Heard G, Cox J (2004) Yeast ecology of Kombucha fermentation. *Int J Food Microbiol* **95**:119–126. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2003.12.020>
- Vicente C, Sebastián B, Fontaniella B, Márquez A, Filho LX, Legaz M-E (2001) Bioskin as an affinity matrix for the separation of glycoproteins. *J Chromatogr A* **917**:55–61. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)00691-4](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)00691-4)
- Vohra BM, Fazry S, Sairi F, Babul-Airianah O (2019) Effects of medium variation and fermentation time on the antioxidant and antimicrobial properties of Kombucha. *Malays J Fundam Appl Sci* **15**:298–302. <https://doi.org/10.11113/mjfas.v15n2-1.1536>
- Watawana MI, Jayawardena N, Gunawardhana CB, Waisundara VY (2015) Health, Wellness, and Safety Aspects of the Consumption of Kombucha. *J Chem* **2015** (1) :591869. <https://doi.org/10.1155/2015/591869>
- Yuniarto, A., Anggadiredja, K., & Aqidah, R. A. N. (2016). Antifungal activity of kombucha tea against human pathogenic fungi. *organ*, **2**, 10-22159.

Izjava o izvornosti

Ja Tena Stipić izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio/la drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Tena Stipić
Vlastoručni potpis