

Nutritivni i zdravstveni učinci sastojaka i metabolita nastalih fermentacijom kombucha napitka

Knez, Petra

Undergraduate thesis / Završni rad

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:367269>

Rights / Prava: [Attribution-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-14**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Biotehnologija

Petra Knez

7609/BT

**NUTRITIVNI I ZDRAVSTVENI UČINCI SASTOJAKA I
METABOLITA NASTALIH FERMENTACIJOM
KOMBUCHA NAPITKA**

ZAVRŠNI RAD

Predmet: Biotehnologija 2

Mentor: Izv. Prof. dr. sc. Sunčica Beluhan

Zagreb, 2020.

Ovaj rad izrađen je u Laboratoriju za biokemijsko inženjerstvo, industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju slada i piva, Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod stručnim vodstvom izv. prof. dr. sc. Sunčice Beluhan.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Biotehnologija

Zavod za biokemijsko inženjerstvo
Laboratorij za biokemijsko inženjerstvo,
Industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju slada i piva

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija

NUTRITIVNI I ZDRAVSTVENI UČINCI SAS TOJAKA I METABOLITA NASTALIH FERMENTACIJOM *KOMBUCHA* NAPITKA

Petra Knez, 7609/BT

Sažetak: *Kombucha* je napitak proizveden fermentacijom crnog, zelenog ili oolong čaja, koristeći simbiotsku kulturu bakterija i kvasaca. Kao izvor ugljika, najčešće se u infuziju čaja dodaje saharoza. Zbog simbiotskog djelovanja bakterija (*Acetobacter xylinum*, *Acetobacter xylinoides*, *Bacterium gluconicum*) i kvasaca (*Schizosaccharomyces pombe*, *Saccharomyces ludwigii*, *Saccharomyces cerevisiae*), dobiva se napitak za kojega se vjeruje da doprinosi zaštiti zdravlja. Tu se ponajprije misli na smanjenje razine kolesterola, smanjenje širenja karcinoma, uklanjanje ksenobiotika iz jetre i uklanjanje slobodnih radikala iz organizma. Ovaj se rad fokusira na otkrića o korisnim učincima *kombucha* napitka, daje uvid u kemijski sastav napitka te proučava kontraindikacije koje se mogu pojaviti nakon učestale konzumacije.

Ključne riječi: čaj, fermentacija, *kombucha*, pozitivni učinci, SCOBY

Rad sadrži: 26 stranica, 5 slika, 2 tablica, 58 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku (PDF) pohranjen u: Knjižnica
Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: izv. prof. dr. sc. Sunčica Beluhan

Rad predan: 01. rujna 2020.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

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

Department of Biochemical engineering
Laboratory for Biochemical Engineering,
Industrial Microbiology, Malting and Brewing Technology

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Biotechnology

NUTRITIONAL AND HEALTH EFFECTS OF THE INGREDIENTS AND METABOLITES MADE BY FERMENTATION OF *KOMBUCHA* DRINK

Petra Knez, 7609/BT

Abstract: *Kombucha* drink is produced by fermentation of black, green or oolong tea, using symbiotic culture of bacteria and yeast. As a substrate, into reactant mixture sucrose is added. Because of symbiotic activity of bacteria (*Acetobacter xylinum*, *Acetobacter xylinoides*, *Bacterium gluconicum*) and yeast (*Schizosaccharomyces pombe*, *Saccharomyces ludwigii*, *Saccharomyces cerevisiae*) it is believed that the drink - which is the product of that symbiosis - has beneficial effects on health protection. It mainly refers to decrease of cholesterol levels, as well as to decrease of cancer metastasis; it also refers to removal of the xenobiotics from the liver, as well as to removal of the free radicals from the body. This assignment is focused on new discoveries concerning the beneficial effect of *kombucha* tea, giving the insights into chemical structure of the drink, while studying the contraindications of consuming the drink as well.

Keywords: Tea, Fermentation, *Kombucha*, Positive effects, SCOBY

Thesis contains: 26 pages, 5 figures, 2 table, 58 references

Original in: Croatian

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

Mentor: *Sunčica Beluhan, PhD, Associate Professor*

Defence date: September 1st 2020

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. Čaj	2
2.1.1. Općenito o čaju	2
2.1.2. Povijest čaja	3
2.1.3. Vrste čaja	3
2.1.4. Ljekovita svojstva čaja.....	4
2.2. <i>Kombucha</i> napitak.....	4
2.2.1. Definicija <i>kombuche</i>	4
2.2.2. Postupak pripreme <i>kombuche</i>	4
2.2.3. Fermentacija	5
2.2.4. SCOBY kultura	6
2.3. Kemijske komponente	11
2.3.1. Kemijske komponente crnog i zelenog čaja.....	11
2.3.2. Kemijske komponente <i>kombucha</i> čaja	12
2.3.2.1. Vitamini	13
2.3.2.2. Minerali	13
2.3.2.3. Polifenoli.....	14
2.3.2.4. D-saharinska kiselina-1,4-lakton (DSL)	15
2.3.2.5. Etanol.....	15
2.3.2.6. Octena kiselina	16
2.3.2.7. Glukuronska kiselina.....	16
2.4. Učinci kombuche	18
2.4.1. Korisni učinci <i>kombuche</i>	18
2.4.2. Kontraindikacije <i>kombuche</i>	19
3. ZAKLJUČCI.....	21
4. POPIS LITERATURE	22

1. UVOD

Koncept koji je priroda dala hrani u vidu ljekovitosti nije novost. Biljni čajevi i lijekovi koristili su se stoljećima, a mnogi ih narodi i danas konzumiraju u velikim količinama. Međutim, zbog razvoja tehnologije i većih analitičkih sposobnosti na molekularnoj razini, dobiva se slika o biokemijskoj strukturi hrane. Zbog toga je moguće analizirati brojne kemijske komponente koje se prirodno javljaju u hrani te razmatrati njihov utjecaj na ljudsko tijelo. Prisutnost specifičnih biokemijskih tvari može imati pozitivan utjecaj na tjelesno i mentalno zdravlje pojedinca. Ukoliko hrana osim nutritivne vrijednosti ima i odgovarajuću ravnotežu sastojaka koji pomažu u prevenciji i liječenju bolesti te pomaže u boljem funkcioniranju u nekim aspektima života, naziva se funkcionalnom hranom (Goldberg, 2012).

Napitak pripremljen od lišća čaja (*Camellia sinensis*), dugo se smatra napitkom funkcionalnih svojstava, zahvaljujući svojim ljekovitim svojstvima promicanja zdravlja i prevencije bolesti kod ljudi. Brojna laboratorijska, klinička i epidemiološka istraživanja omogućili su dokaze koji potvrđuju višestruko djelovanje čajnih polifenola i razne zdravstvene koristi konzumiranja čaja (Wu i sur., 2009). *Kombucha* čaj također se može nazvati funkcionalnom hranom zbog sljedećih razloga: prisutnosti polifenola čaja, prisutnosti vrlo male koncentracije etanola, proizvodnje bioaktivnih spojeva koji nastaju tijekom fermentacije te prisutnosti tankih celuloznih vlakana koja mogu djelovati kao prebiotici za bakterije debelog crijeva (Kozyrovska i sur., 2012).

U radu se iznosi kratak pregled čaja: njegove povijesti, vrsta i ljekovitih svojstava te se detaljno iznose dosadašnja saznanja o *kombucha* čaju: njegov sastav, fermentacija, pozitivni učinci konzumiranja i kontraindikacije.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Čaj

2.1.1. Općenito o čaju

Čaj je bezalkoholni napitak kojega, zbog svojih ljekovitih, osvježavajućih i blagih stimulativnih učinaka, konzumira više od dvije trećine čovječanstva. Napitak se dobiva od infuzije lišća odnosno pupoljaka biljke latinskog naziva *Camellia sinensis* (Karak i Bhagat, 2010).

Rakovac (2010) govori kako u različitim predjelima jugoistočne Azije, pokrajinama Yunnan, Indokini, Burmu i u indijskoj pokrajini Assam postoje različite vrste biljke kamelije. *Camellia sinensis* ili čajevac, autor opisuje kao drvo koje ima zimzelene, nazubljene, kožaste listove s izduženim elipsastim oblikom sjajno zelene boje na gornjoj i zagasito svijetlozelene na donjoj strani. Plodovi čajevca su okrugli s tvrdim ljuskama poput lješnjaka, a mirisni cvjetovi su mu pravilni, bijeli do svijetlo ružičasti poput cvjetova jabuke (slika 1).



Slika 1. Biljka čajevac (*Camellia sinensis*) (preuzeto s <http://www.aromavita-institut.com/2018/06/19/cajevaca-ucinkovitost-u-tretiranju-infekcija/>)

2.1.2. Povijest čaja

Heršak i Adžija (2013) govore da se pradomovina čaja, kako se pretpostavlja, nalazila u visinskim krajevima na tromeđi današnje Kine, Indije i Mjanmara (Burme). Autori navode kako postoje različite priče i legende o povijesti čaja. Prema kineskoj mitologiji, Car Shen Nung prvi je otkrio čaj 2737. godine pr.Kr. (Harbowy i Balentine, 1997). Grm čaja prvi put se spominje u drevnom kineskom spisu Pent-Sao iz 2500.godine pr. n. e. te se u tim vremenima čaj smatrao prvenstveno ljekovitom biljkom (Rakovac, 2010).

2.1.3. Vrste čaja

Čajni se napitci ovisno o stupnju fermentacije uglavnom dijele na crne, zelene ili oolong čajeve.

Zeleni čaj navije konzumiraju stanovnici Kine i Japana. Njegovi listovi se obično odmah zagrijavaju valjanjem nakon žetve za inaktivaciju enzima polifenol oksidaze (PPO) koji je sposoban oksidirati katehine u čaju do njihovih oligomernih i polimernih derivata poput teaflavina i tearubigina. Listovi zelenog čaja mogu se pripremati tako da se svježi listovi prokuhaju na pari ili suše na povišenim temperaturama kako bi se izbjegla oksidacija i polimerizacija polifenolnih spojeva (Katyar i sur., 2001, prema, Sajilata i sur., 2008). Zeleni čaj sadrži nekoliko skupina polifenola od kojih su najzastupljeniji flavonoli (kvercetin, kaempferol i rutin) kofein, fenolne kiseline, teanin, spojevi okusa i leucoanthocijanini koji čine do 40% težine suhog lišća (Graham i sur. 1992).

Crni se čaj proizvodi od mladih nježnih izdanaka vrste *Camellia sinensis* te je jedno od najčešćih konzumiranih bezalkoholnih pića. Osobito je popularan u Sjevernoj Americi, Europi i Indiji. Njegova kvaliteta i okus se mijenjaju ovisno o zemljopisnim i klimatskim uvjetima (Howard 1978; Cloughley i sur., 1982; Takeo i Mahanta 1983, prema Sajilata i sur., 2008). Crni čaj se priprema drobljenjem osušenih listova čaja što omogućava enzimsku oksidaciju, koja se obično naziva fermentacijom. Na taj način dolazi do stvaranja oligomera poput teaflavina i polimera poznatih kao tearubigini (Baletine i sur., 1997).

Oolong čaj je polufermentirani čaj kojemu je ograničeno vrijeme oksidacije te je stoga manje fermentiran od crnog čaja. Djelomično fermentiran oolong ili paochong čaj sadrži i katehine zelenog čaja, teaflavine crnog čaja i ponekad tearubigine. U usporedbi sa zelenim čajem, oolong čaj sadrži polovicu EGCG, dok su polimerizirani polifenoli dvostruki (Balentine i sur., 1997; Lin i Liang 2000, prema Sajilata i sur. 2008).

2.1.4. Ljekovita svojstva čaja

Čaj se, kako u prošlosti tako i danas koristi za ublažavanje i rješavanje različitih zdravstvenih tegoba. Blagotvorni učinci čaja potaknuli su znanstvenike na brojna istraživanja, ranije provedena na životinjama, klinički ispitaju na ljudima. Tako je utvrđeno da čaj smanjuje rizik od nekoliko glavnih prijevremenih smrtnih bolesti, posebno onih vezanih uz ubrzan životni stil. Tu spadaju razni karcinomi, ateroskleroza, kardiovaskularne bolesti, dijabetes, bolesti bubrega i jetre, pretilost, plućne bolesti, gripa, SARS i mnoge druge (Jain i sur.,2006). Blagotvorni se učinci najviše pripisuju sinergijskom djelovanju polifenola i katehina u čaju u kombinaciji s kofeinom i drugim sastojcima (Yang i Landau, 2000).

2.2. *Kombucha* napitak

2.2.1. Definicija *kombuche*

Kombucha je naziv za tradicionalni napitak koji se dobiva procesom fermentacije čaja, najčešće crnog čaja uz dodatak šećera koji služi kao supstrat za fermentaciju. Isto tako, za njegovu se pripremu mogu koristiti i druge vrste čaja kao što su zeleni čaj ili pak oolong čaj, poznat kao plavi čaj. Napitak ima blago kiselkast i blago gaziran okus, što mu povećava popularnost među potrošačima, posebno onima sa zapada iako izvorno potječe iz Kine gdje se konzumira još od 220. godine prije Krista. Uvjet za proizvodnju napitka predstavlja prisutnost simbiotske kulture kvasaca i bakterija (*engl.* Symbiotic Culture of Bacteria and Yeast; SCOBY), a tijekom fermentacije nastaju brojni metaboliti kao što su organske kiseline, vitamini, minerali i mnogi drugi od kojih neki posjeduju antibakterijsko djelovanje i na taj način sprječavaju kontaminaciju pića patogenim bakterijama. Iako se *kombucha* napitak tradicionalno priprema iz čaja, danas ga je moguće proizvesti koristeći neke druge biljke poput metvice, limuna ili jasmína (Villarreal-Solo i sur., 2018; Greenwalt i sur.,2000).

2.2.2. Postupak pripreve *kombuche*

Kombucha napitak pripravlja se fermentacijom čaja uz dodatak šećera i SCOBY kulture (Jayabalan i sur. 2014). Ukoliko se *kombucha* kultura uzgaja prema standardnom receptu koji uključuje crni čaj, dobit će se osvježavajući napitak sličan gaziranom soku od jabuke sa visokim nutritivnim vrijednostima i pozitivnim medicinskim svojstvima (Watawana i sur., 2015). Zbog jednostavnosti pripreve i dostupnih sastojaka, lako ga se može proizvoditi u

svakom kućanstvu. Postoji više recepata za proizvodnju napitka, a prema jednom od njih potrebno je u jednu litru vode dodati pet grama listova čaja, oko pedeset grama šećera te SCOBY kulturu. Postupak podrazumijeva korištenje dezinficiranog pribora i posuđa kako ne bi došlo do kontaminacije patogenim organizmima te kako se ne bi dobio napitak s promijenjenim svojstvima. Isto tako nakon dodatka SCOBY kulture, napitak je potrebno inkubirati na temperaturi oko 25° C jedan do osam tjedana (Dufrense i Farnworth, 2000). Tijekom cijelog procesa prate se i podešavaju procesni parametri od kojih je najvažniji pH vrijednost. pH vrijednost vremenom pada zbog proizvodnje organskih kiselina i poželjno je proces zaustaviti kod pH vrijednosti 4,2 kako proizvodnja octene kiseline ne bi postala kontraproduktivna (Kovačević i sur., 2014). Nakon dobivanja konačnog produkta, napitak se podvrgava procesu pasterizacije kako bi se spriječila pretjerana proizvodnja ugljikovog dioksida te alkohola koji štetno djeluju na ljudski organizam. Isto tako u napitak se naposljetku mogu dodati natrijev benzoat ili kalijev sorbat, oba u koncentraciji 0,1 g/100 ml, koji služe kao konzervansi hrane. *Kombucha* napitak potrebno je čuvati u hladnjaku (Watawana i sur., 2015).

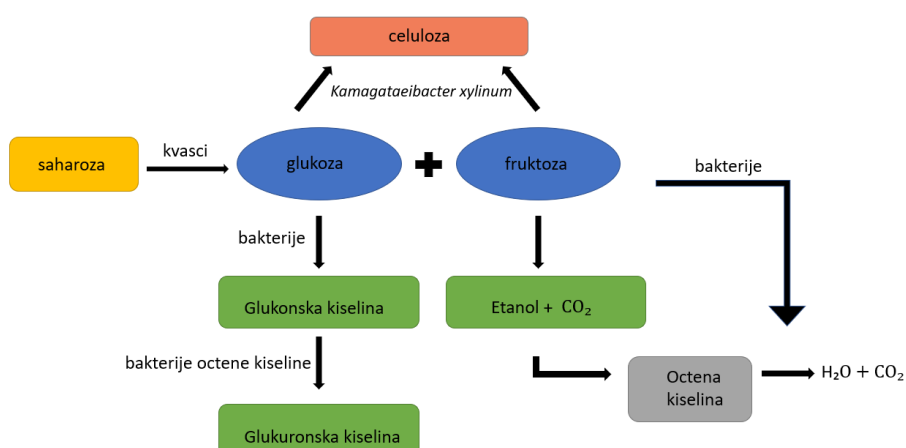
2.2.3. Fermentacija

Fermentacija je jedna od najstarijih metoda koje se koriste za čuvanje hrane. Ona također predstavlja i jeftin sustav uštede energije koji je ključan za održavanje sigurnosti hrane. Tijekom fermentacije dolazi do raznih biokemijskih promjena koje utječu na svojstva konačnog produkta (Villarreal-Soto i sur., 2018).

Fermentacija *kombuche* može trajati od svega nekoliko dana pa i do otprilike dva mjeseca i provodi se na sobnoj temperaturi. Vrijeme fermentacije ovisi o klimatskim uvjetima i prema njima ju je potrebno optimizirati. Kao glavni izvor ugljika koristi se saharoza i to u koncentraciji od 5 do 20% (tež/vol). Na taj se način osigurava hranjiva podloga i svi potrebni nutrijenti za razvoj mikroorganizama. Kao početna kultura za fermentaciju može se koristiti SCOBY kultura i tekućina koja se dobila iz prethodne fermentacije u koncentraciji od 10% (vol/vol). Koncentracija saharoze te temperatura i vrijeme fermentacije zaslužni su za konačnu koncentraciju organskih tvari i posljedično pH vrijednost. Kako tijekom fermentacije nastaju organske kiseline, one snižavaju pH vrijednost što dovodi do smanjenja koncentracije otopljenog kisika. Na taj se način smanjuje broj patogenih organizama u napitku te je on, iako je mikrobnog podrijetla, siguran za konzumaciju (Watawana i sur., 2015 ; Vīna i sur., 2013).

2.2.4. SCOBY kultura

Kultura koja se koristi za fermentaciju *kombucha* napitka ima različit mikrobiološki sastav ovisno o podrijetlu, vremenu, zemljopisnom položaju te hranjivoj podlozi koja se koristi za fermentaciju (Martinez Leal i sur., 2018). SCOBY kulturu čini simbioza bakterija vrsta *Acetobacter xylinoides*, *Komagataeibacter xylinus*, *Gluconacetobacter xylinus*, *Acetobacter aceti* i *Acetobacter pasteurianus* te kvasaca vrsta *Schizosaccharomyces pombe*, *Saccharomyces ludwigii*, *Kloeckera apiculata*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Torulaspora*, *Zygosaccharomyces bailii*, *Brettanomyces bruxellensis*, *Brettanomyces lambicus*, *Brettanomyces custersii*, i rodova *Candida* i *Pichia* (Zhang i sur., 2011; Yamada i sur., 2012). Ipak, primijećeno je da su najbrojniji prokarioti bakterije iz rodova *Acetobacter* te *Gluconobacter*, a one pripadaju porodici *Acetobacteraceae* (Reiss, 1994). Vrste iz roda *Acetobacter* imaju sposobnost proizvodnje octene kiseline iz etanola, a to je moguće zato što sadrže enzime poput alkohol dehidrogenaze te aldehyd dehidrogenaze. Nastala octena kiselina zatim ulazi u ciklus limunske kiseline u kojem kao krajnji produkti nastaju voda te ugljikov dioksid (slika 2). Vrste iz roda *Gluconobacter* nemaju sposobnost oksidacije acetata kroz ciklus limunske kiseline zbog nedostatka ključnih enzima za taj proces poput α -ketoglutarat dehidrogenaze ili sukcinat dehidrogenaze. Zbog toga u hranjivoj podlozi dolazi do nakupljanja raznih proizvoda poput glukonata (Martinez Leal i sur., 2018).



Slika 2. Metabolički put fermentacije *kombucha* čaja (Markov i sur., 2003)

U *kombucha* napitku su prisutne i razne vrste kvasaca koji su često brojniji od bakterija octene kiseline. Jedan od enzima prisutnih u kvascu je invertaza koja katalizira hidrolizu

saharoze u fruktozu i glukozu, a onda se tijekom procesa glikolize stvara etanol (Jayabalan i sur., 2010; Jayabalan i sur., 2014). Također rodovi bakterija *Acetobacter* i *Gluconobacter* imaju sposobnost konvertirati glukozu u glukonsku kiselinu i etanol. Upravo su octena kiselina i etanol odgovorni za antimikrobno djelovanje *kombucha* napitka (Dufrense i Farnworth, 1999). Tijekom fermentacije bakterije iz saharoze stvaraju sekundarni metabolit nanocelulozu koja se pojavljuje u obliku biofilma i na njega se pričvršćuju bakterijska i kvašćeva biomasa. Na taj način nastaje karakteristična pelikula (slika 3) koja pluta na površini napitka te poprima oblik posude u kojoj se nalazi, a naziva se čajna gljiva (*Medusomyces gisevii*). Ipak, simbiotski rast bakterija i kvasaca nije dovoljno proučen, uvelike zbog poteškoća koje se javljaju pri odvajanju stanične mase od celuloze u čajnoj gljivi (Sreeramuu i sur., 2000).



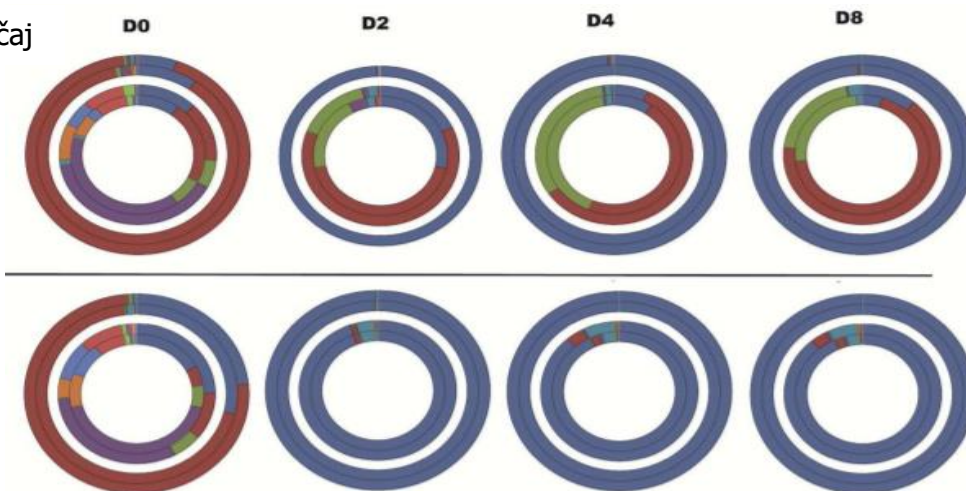
Slika 3. Čajna gljiva (Preuzeto s: <http://www.aromavita-institut.com/2018/06/19/cajevac-ucinkovitost-u-tretiranju-infekcija/> , Emma Christensen)

Coton i sur. (2017) su napravili detaljno istraživanje o mikrobnj bioraznolikosti *kombucha* napitka tijekom vremena, ovisno o tome priprema li se fermentacijom crnog ili zelenog čaja. Kao uzorke su uzimali pelikulu bakterijske nanoceluloze (BNC) i tekući *kombucha* pripravak

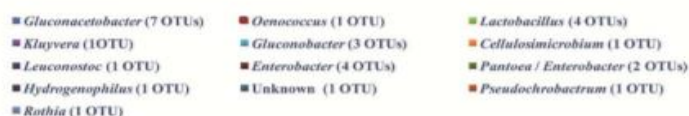
tijekom 0, 2, 4 i 8 dana. Uzorci fermentiranog čaja prikupljali su se iz spremnika volumena 1000 L na različitim dubinama kako bi se dobili reprezentativni uzorci. Uzorci pelikule prikupljali su se izrezivanjem najmanje 100 g BNC od središta pa sve do najudaljenijeg dijela. Bakterijske vrste prvo su se morfološki uspoređivale na prethodno pripremljenim selektivnim podlogama, a kasnije se koristila PCR metoda i to za umnažanje 16S rRNA regije pomoću univerzalnih početnica BSF8 i BSR1541 (Wilmotte i sur., 1993). Kvasci su identificirani pomoću FT-IR metode (*engl.* Fourier Transform Infrared). Dobiveni spektri uspoređivani su s ostalim FT-IR spektrima koji se nalaze u bazi podataka, a provedena je i molekularna analiza kvasaca PCR metodom.

Analizirane bakterije pokazale su veliku raznolikost, a uglavnom su dominirale bakterije octene kiseline iz rodova *Gluconacetobacter*, *Gluconobacter*, te bakterije mliječne kiseline iz rodova *Oenococcus* i *Lactobacillus* (slika 4). U početku fermentacije uočena je veća raznolikost bakterija i one vjerojatno potječu od sirovina. Broj promatranih operativnih taksonomskih jedinica (OTU) bio je 354 za 16S sekvencu. U usporedbi s bakterijskom populacijom, raznolikost kvasaca bila je relativno niska, svega 20 OTU jedinica (slika 5).

Zeleni čaj

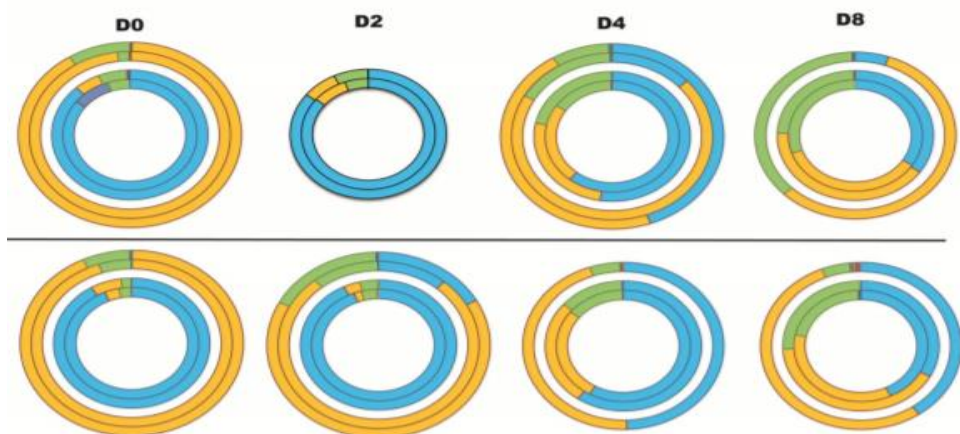


Crni čaj

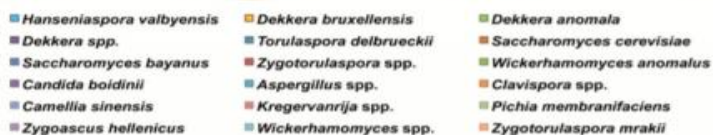


Slika 4. Relativni udio bakterijskih vrsta u zelenom i crnom *kombucha* čaju tijekom fermentacije koji se bazira na 16S rDNA metabarkodiranju. Na ovoj je slici predstavljeno 28 najzastupljenijih OTU-a (> 1% relativnog udjela) od ukupno 354 OTU-a. Uzorkovanje je provedeno na dane (D) 0, 2, 4 i 8 na uzorcima hranjive podloge (dva unutarnja kruga) i biofilma (dva vanjska kruga). Dva kruga predstavljaju ponovljene uzorke za svaku vrstu uzorka (Coton i sur.,2017).

Zeleni čaj



Crni čaj



Slika 5. Relativno udio vrsta kvasaca u zelenom i crnom *kombucha* čaju tijekom fermentacije koji se bazira na 26S rDNA metabarkodiranju. Uzorkovanje je provedeno na dane (D) 0, 2, 4 i 8 na uzorcima hranjive podloge (dva unutarnja kruga) i biofilma (dva vanjska kruga). Dva kruga predstavljaju ponovljene uzorke za svaku vrstu uzorka (Coton i sur., 2017).

Jayabalan i suradnici (2010) su proučavali kemijski i mikrobiološki sastav *kombucha* čajne gljive. Čajna su gljivu analizirala u razdobljima od 7, 14 i 21 dana te su vlakna i proteini bili glavne komponente SCOBY-a. U odnosu na proteine, određena je značajno velika količina aminokiselina, od kojih su najzastupljenije bile esencijalne aminokiseline leucin i izoleucin (tablica 1). Uz to, uočeno je povećanje svih sastojaka tijekom fermentacije. Isto tako, određeni su minerali poput natrija, kalija i magnezija.

Tablica 1. Sadržaj aminokiselina (mg/g) čajne gljive (SCOBY) na različita vremena fermentacije (Jayabalan i sur.,2010)

vrijeme fermentacije			
AMINKISELINE	7. dan	14. dan	21. dan
esencijalne aminokiseline			
izoleucin	28.1±0.51	35.2±0.40	44.2±0.36
leucin	27.2±0.75	35.9±0.64	45.1±0.60
lizin	39.5±0.50	48.0±0.36	53.1±0.40
metionin	6.3±0.55	11.3±0.80	20.2±0.50
fenilalanin	13.6±0.55	22.3±0.70	30.2±0.60
treonin	7.7±0.20	13.2±0.58	20.1±0.65
valin	15.1±0.26	22.3±0.45	30.2±0.61
triptofan	7.4±0.26	12.3±0.51	21.1±0.45
neesencijalne aminokiseline			
alanin	30.9±0.55	41.9±0.40	53.0±0.50
arginin	14.5±0.60	30.8±0.60	42.2±0.60
aspartatna kiselina	30.3±0.70	42.0±0.65	53.2±0.60
cistein	10.3±0.70	15.2±0.35	24.4±0.47
glutaminska kiselina	32.2±0.61	42.3±0.50	50.1±0.47
glicin	9.5±0.55	17.2±0.30	26.6±0.81
histidin	6.0±0.50	10.6±0.55	18.5±0.60
prolin	28.5±0.45	35.2±0.60	43.4±0.55
serin	11.2±0.36	22.2±0.51	31.7±0.61
tirozin	9.9±0.45	18.6±0.40	27.0±0.55

2.3. Kemijski sastav

2.3.1. Kemijski sastav crnog i zelenog čaja

Još od samih početaka proizvodnje i konzumacije čaja, primijećeno je da napitak ima različit sastav ovisno o sorti od koje se proizvodi, klimatskim uvjetima te postupcima koji se koriste u proizvodnji. Ukoliko se tijekom proizvodnje mladi listovi čaja drobe i izlože visokoj vlažnosti zraka, dolazi do enzimske oksidacije polifenol oksidazama i na taj se način proizvodi crni čaj. (Valenzuela, 2004). Za proizvodnju zelenog čaja potrebno je primijeniti metode zagrijavanja jer one sprječavaju fermentaciju na način da inaktiviraju enzime pomoću pare. Tijekom proizvodnje oolong čaja svježi se listovi čaja suše na suncu nakon čega dolazi do oksidacije u rasponu od 10 do 70 % (Martinez Leal i sur., 2018).

HPLC i HPCE tehnike koje su proveli Hideki i Kohata (2000), pokazale su da se u čaju nalaze različiti sastojci poput aminokiselina, katehina, alkaloida, kofeina, vitamina, klorofila, minerala i elemenata u tragovima. Prema tom istraživanju najbrojniji polifenoli bili su flavonoli, odnosno katehini koji spadaju u grupu flavonoida.

Kako navodi Valenzuela (2004) najučestaliji flavonoli u čaju su epikatehin (EC), epigalokatehin (EGC), epikatehin galat (ECG) i epigalokatehin galat (EGCG). Flavonoidi imaju karakterističnu monomernu strukturu i njihov je udio u svježim listovima čaja visok. Tijekom fermentacije koja se događa pri proizvodnji crnog čaja dolazi do promjene monomerne strukture katehina te nastaju dimerni i polimerni flavonoli poznati kao teaflavini i tearubigini. Kako zeleni čaj ne prolazi kroz proces fermentacije, udio teaflavina i tearubigina je znatno niži. Upravo zbog raznih kemijskih sastojaka prisutnih u čaju, različit je i utjecaj napitka na zdravlje čovjeka, kao i intenzitet djelovanja (Valenzuela, 2004).

Za utjecaj crnog i zelenog čaja na zdravlje čovjeka uvelike je zaslužan katehin kao derivat polifenola. On djeluje kao snažni antioksidans i štiti tijelo od razvoja bolesti. Zbog velikog redoks potencijala ima sposobnost uklanjanja slobodnih radikala te metala iz organizma. Ukoliko se metali poput željeza ili bakra u organizmu nalaze u slobodnom stanju ili nisu vezani za proteine, oni posjeduju pro-oksidacijski učinak. Tako dolazi do oksidacije i ujedno do oštećenja lipida, nukleinskih kiselina te proteina. Zbog sposobnosti vezanja slobodnih metala u stabilne kompleksne kemijske spojeve – kelate, značajno se smanjuje vjerojatnost od oštećenja vitalnih molekula koje sudjeluju u fiziološkim procesima. (Valenzuela, 2004).

Katehini u zelenom čaju pokazali su se kao djelotvorniji antioksidanti od vitamina C i E (Rice-Evans i sur., 1995.)

Sposobnost polifenola u zaštiti od razvoja bolesti očituje se u njihovoj sposobnosti inhibiranja enzima i zaustavljanja procesa zaslužnih za razvoj bolesti. To posebice dolazi do izražaja kod karcinoma, gdje dolazi do inhibicije proliferacije tumorskih stanica i molekularnih putova koji su uključeni u stanični ciklus, angiogenezu, invaziju i proliferaciju povezanu s faktorom rasta (Adhami i sur., 2003; Lambert i Yang, 2003). ECG i EGCG su sposobni inhibirati aktivnost kinaza, metilaza i acetilaza, određujući tako procese u pojavi tumora ukoliko ih ne kontroliramo u stanici s oštećenjem DNA, na primjer, djelovanjem oksidansa (Valenzuela, 2004).

Polifenoli zelenog čaja također pomažu u fazi II detoksikacije jetre ksenobiotcima. Konzumiranjem zelenog čaja dolazi do prekomjerne ekspresije gena koji kodira za enzim glutation-S-transferazu (GST) te se on veže za tripeptid glutation (GSH). GSH je endogeni antioksidans koji ima najveći potencijal za uklanjanje ksenobiotika iz tijela pa konzumacija zelenog čaja posljedično dovodi do uklanjanja, uglavnom karcinogenih, ksenobiotika iz organizma (Martinez Leal i sur., 2018).

Prema istraživanju Liu i sur. (2016) primjećeno je da EGCG, kao najznačajniji predstavnik polifenola u čaju, inhibira lipopolisaharid- posredovanu indukciju upalnih citokina i smanjuje neurotoksičnost lipopolisaharid aktiviranim makrofazima. EGCG u maloj dozi od 0,1 μM imao je izravan neuroprotektivni učinak protiv lipopolisaharida ublažavanjem proizvodnje reaktivnih vrsta kisika (ROS - Reactive Oxygen Species) u neuronima.

2.3.2. Kemijski sastav *kombucha* čaja

Kemijskom analizom *kombucha* čaja utvrđena je prisutnost raznih organskih kiselina kao što su octena, glukonska, glukuronska, limunska, L-mliječna kiselina, jabučna, vinska; šećera (saharoze, glukoze te fruktoze), vitamina topljivih u vodi (B1,B2,B6,B12 i C), aminokiselina, biogenih amina, purina, pigmenata, lipida, proteina, etanola, bakterija octene kiseline, ugljikovog dioksida, polifenola te raznih minerala (mangan, željezo, nikl, bakar, cink, kobalt, krom i kadmij) (Jayabalan i sur., 2014 ; Jayabalan i sur., 2010). Prisutnost i količina kemijskih komponenti u *kombucha* napitku su promjenjive (tablica 2), uglavnom ovisno o mikroorganizmima simbiotske kulture koja se koristi za fermentaciju, vremenu, temperaturi, količini saharoze te vrsti čaja koji se koristi. Razni su znanstvenici godinama proučavali sastav napitka mijenjajući gore navedene parametre.

Tablica 2. Prevladavajući sastojci u *kombucha* čaju na kraju fermentacije crnog čaja (Jayabalan i sur., 2014)

Sastojak	Koncentracija sastojka (g/L)	Početna konc. saharoze (%)	Crni čaj	Temperatura fermentacije (°C)	Vrijeme fermentacije (dani)	Reference
Octena kiselina	8	10	2 vrećice	24±3	60	Chen i Liu (2000) Jayabalan i sur. (2007)
	4,49	10	12 g/L	24±3	18	
Glukuronska kiselina	0,0031	5	1,5g/L	28	21	Lončar i sur. (2000)
	0,0026	7	1,5 g/L	28	21	Lončar i sur. (2000)
	0,0034	10	1,5 g/L	28	21	Lončar i sur. (2000)
	1,71	10	12 g/L	24±3	18	Lončar i sur. (2000)
Glukonska kiselina	39	10	2 vrećice	24±3	60	Chen i Liu (2000)
Glukoza	179,5	7	1,5 g/L	28	21	Malbaša i sur. (2002a)
	24,59	7	1,5 g/L	28	21	Lončar i sur. (2000)
	12	10	2 vrećice	24±3	60	Chen i Liu (2000)
Fruktoza	76,9	7	1,5 g/L	28	21	Malbaša i sur. (2002a)
	5,40	7	1,5 g/L	28	21	Lončar i sur. (2000)
	55	10	2 vrećice	24±3	60	Chen i Liu (2000)

2.3.2.1. Vitamini

Kada je riječ o udjelu vitamina u ovom napitku, Bauer Petrovska i Petrushevska-Tozi (2000) analizirale su *kombucha* napitak pripremljen sa 70 g saharoze i 5 g/L crnog čaja i pronašle sljedeće vrijednosti vitamina B skupine: 74 mg vitamina B1/100 ml napitka, 52 mg vitamina B6/100 ml napitka i 84 mg vitamina B12/100 ml napitka. U međuvremenu, Malbaša i sur. (2011) izvijestili su da je sadržaj vitamina B2 bio 8,3 mg/100 ml napitka, dok se koncentracija vitamina C stalno povećavala, doseguvši 28,98 mg/L napitka na deseti dan fermentacije.

2.3.2.2. Minerali

Bauer-Petrovska i Petrushevska-Tozi (2000) su u svom istraživanju potvrdile prisutnost mangana, željeza, bakra, nikla, cinka, kobalta, kroma, kadmija i olova u *kombucha* napitku. Koncentracija minerala bila je u rasponu 0,004 µg/mL za kobalt i 0,462 µg/mL za mangan, dok je olova bilo 0,005 µg/mL. Prisutnost teških metala, posebno olova, dovela je u pitanje

sigurnot konzumacije *kombucha* napitka. Prema The Centers for Disease Control and Prevention (CDC, 1995) toksična razina olova u krvi za odrasle iznosi 10 µg/mL, dok za djecu iznosi 5 µg/mL. Kako je koncentracija olova u *kombuchi* puno niža, ona ne predstavlja potencijalni rizik za zdravlje. Ipak, zbog izraženije osjetljivosti koja se javlja kod djece, preporučljivo je da djeca ne konzumiraju napitak redovito.

U međuvremenu, Kumar i sur. (2008) su utvrdili prisutnost fluorida, klorida, bromida, jodida, nitrata, fosfata i sulfata nakon sedam dana fermentacije *kombuche* pripremljene sa 100 g saharoze i 5 g/L crnog čaja; od svih aniona, najveću koncentraciju je imao fluoridni anion (3,2 mg/g).

2.3.2.3. Polifenoli

Godine 1951. „Centralna onkološka istraživačka jedinica“ i „Ruska akademija znanosti u Moskvi“ utvrdila je da je svakodnevna konzumacija *kombuche* povezana s izuzetno visokom otpornošću na rak (Dufresne i Farnworth, 2000). Povoljni se učinci pripisuju ponajprije prisutnosti polifenola. Budući da su polifenoli čaja važni u prevenciji karcinoma, potrebno je proučiti sadržaj polifenola čaja tijekom fermentacije *kombuche*. (Jayabalan i sur., 2007)

Jayabalan i suradnici su 2007. godine proučavali promjene u koncentraciji polifenola u *kombucha* napitku tijekom fermentacije. *Kombucha* je bila pripremljena na tri načina: od zelenog čaja, crnog čaja te od otpada pri proizvodnji crnog čaja. Ispitivanje je provedeno na derivatima polifenola koji su prisutni i najvećim količinama i koji ujedno imaju najvažnije značenje za sam napitak (ranije spomenuti epikatehin (EC), epigalokatehin (EGC), epikatehin galat (ECG), epigalokatehin galat (EGCG), teaflavina (TF) i tearubigina (TR)) Utvrđeno je da su se svi ispitivani katehini u čaju razgradili do devetog dana fermentacije, a zatim su dvanaestog dana fermentacije pokazali značajno povećanje. Autori pretpostavljaju da se to dogodilo zbog otpuštanja katehina iz mikrobnih stanica pod utjecajem kiseline. Isto tako, primijetili su da je nakon dvanaestog dana fermentacije sadržaj EGC-a i EC-a premašio početnu koncentraciju, dok se to nije dogodilo s EGCG-om i ECG-om. Smatra se da je došlo do biotransformacije EGCG-a i ECG-a u EGC i EC enzimima koje su izlučili mikroorganizmi u kombucha napitku. Što se tiče teflavina i tearubigina, njihova je razgradnja bila jednolika tijekom fermentacije.

Fu i sur. (2014) su koristili različito pripremljene *kombucha* čajeve kako bi usporedili sposobnost uklanjanja slobodnih radikala sa 2,2-difenil-piklorhidrazila (DPPH), hidroksil

radikala i superoksidnih radikala te kako bi odredili ukupnu reducirajuću snagu. U svrhu ovog istraživanja proizvedena je *kombucha* iz zelenog čaja, crnog čaja te čajnog praha i postupak fermentacije trajao je 90 sati. Utvrđeno je da *kombucha* pripremljena od zelenog čaja ima najveću sposobnost uklanjanja slobodnih radikala protiv DPPH, hidroksilnih radikala i aniona superoksida, dok je *kombucha* crnog čaja imala najveću redukcijsku snagu. Prema istraživanju koje su proveli Chu i Chen (2006) crni čaj dostiže svoju maksimalnu aktivnost protiv DPPH radikala do 15. dana fermentacije. Čaj u prahu imao je veću antioksidacijsku aktivnost od crnog čaja protiv DPPH i hidroksilnih radikala, ali ne i protiv superoksidnih radikala, na koji je crni čaj imao veću aktivnost od čajnog praha.

2.3.2.4. *D-saharinska kiselina-1,4-lakton (DSL)*

β -glukuronidaza je enzim odgovoran za hidrolizu glukuronida u lumenu crijeva. Ovom reakcijom stvaraju se toksične i kancerogene tvari. β -glukuronidaza potiče kancerogene formacije hidroliziranjem konjugiranih glukuronida u njihove kancerogene aglikonske spojeve. DSL djeluje kao inhibitor β -glukuronidaze i do potpune inhibicije može doći dodavanjem malih koncentracija DSL-a (Kan i sur., 2010) Pokazalo se da se sadržaj DSL-a u kombuchi kreće između 57,99 i 132,72 $\mu\text{g/ml}$, ovisno o podrijetlu proizvoda. (Yang i sur., 2010). DSL je općenito teško precizno detektirati te se zbog najpouzdanijih mjerenja četo se koristi HPCE kromatografska metoda (Kan i sur., 2010) Utvrđeno je da bakterije mliječne kiseline imaju pozitivan utjecaj na proizvodnju DSL-a, u simbiozi s bakterijama roda *Gluconobacter* (Yang i sur., 2010).

2.3.2.5. *Etanol*

Etanol je organski spoj prisutan u mnogim namirnicama zbog aktivnosti kvasaca u hrani koja sadrži šećer. Prema Chen i Liu (2000), koncentracija etanola u *kombuchi* povećava se s vremenom fermentacije, dostižući približno maksimalnu vrijednost od 5,5 g/L na 20. dan fermentacije, nakon čega slijedi sporo smanjivanje. Čitav kemijski sastav napitka od *kombuche*, uključujući preostalu koncentraciju šećera, ugljični dioksid i organske kiseline, konačno određuje njegov okus, a ovisno o vremenu fermentacije, dobit će se različiti okusi. Francuski paradoks je pojam koji podrazumijeva promatranje niske stope smrtnosti od koronarne bolesti (CHD) usprkos visokom unosu prehrambenih kolesterola i zasićenih masti.

Njega su 1980-ih predložili francuski epidemiolozi obzirom na veliku konzumaciju vina. Vino je bogato prehranbenim kolesterolom i zasićenim mastima, ali ipak nije zabilježena povećana stopa smrtnosti od CHD-a. Francuski paradoks kaže da umjerena konzumacija alkohola ima zaštitni učinak protiv CHD-a, jer podiže koncentracije kolesterola lipoproteina visoke gustoće (HDL) (Ferrières, 2004). Zato prema Martínez Leal i sur. (2018) svakodnevna konzumacija *kombucha* napitka može biti povezana sa sprječavanjem kardiovaskularnih bolesti jer sadrži nisku koncentraciju etanola.

2.3.2.6. Octena kiselina

Bakterije octene kiseline u *kombucha* napitku stvaraju octenu kiselinu iz etanola koji je nastao fermentacijom saharoze, prethodno hidrolizirane u glukozu i fruktozu. Prema istraživanju koje su proveli Chen i Liu (2000), octena kiselina ima tendenciju sporog porasta dostižući 11 g/L pri 30 dana fermentacije, nakon čega se postepeno smanjuje dok ne završi na 8 g/L na 60 dana fermentacije. Ovo smanjenje je posljedica njegove kasnije iskorištenosti kao izvora ugljika za bakterije kada se troše šećeri u čaju ili zbog smanjenja metabolizma etanola u kvascima zbog niskog pH.

2.3.2.7. Glukuronska kiselina

Glukuronska kiselina se dobiva metaboliziranjem glukoze pomoću bakterija octene kiseline. *Kombucha* je visoki izvor glukuronske kiseline te ona ima detoksikacijski učinak protiv lijekova, bilirubina i kemikalija, kao i zagađivača i viška steroidnih hormona (Nguyen i sur., 2015). Ona igra važnu ulogu u ksenobiotičkoj detoksikaciji jetre jer ima sposobnost vezanja s molekulama toksina čime ih eliminira iz organizma. Nadalje, odgovorna je sprječavanje toksičnih učinaka endobiotika u koje spada bilirubin. Tu je posebno važan pojam glukuronidacija, a on podrazumijeva konjugaciju metabolita s UDP- glukuronskom kiselinom. U jetri dolazi do sinteze UDP-glukuronske kiseline te se stvaraju konjugati s bilirubinom koji se na taj način izlučuje preko žuči ili mokraće. Tako je visoka razina bilirubina u urinu pokazatelj oštećenja nastalog tijekom procesa glukuronidacije (Vina i sur., 2013).

Vina i sur. (2013) izvijestili su da glukuronidacija povećava bioaktivaciju polifenola. Metabolizam polifenola nastaje zajedničkim putem - fenoli su konjugirani glukuronskom i / ili sumpornom kiselinom; koji poboljšavaju transport, bioraspoloživost i mogu utjecati na

mjesto djelovanja i interakcije polifenola s drugim antioksidansima. Dobar primjer je UGT1A u tankom crijevu koji ima širok spektar polimorfne ekspresije te može rezultirati visokom međusobnom varijabilnošću polifenolne glukuronidacije. Polifenoli se izlučuju bilijarnim putem u dvanaestopalačno crijevo, gdje su podvrgnuti djelovanju bakterijskih enzima, posebno β -glukuronidaze, koji potiče deglukuronidaciju - nakon čega se polifenoli ponovno apsorbiraju. Izmjenična glukuronidacija i deglukuronidacija mogu dovesti do duže prisutnosti polifenola u organizmu.

Neki steroli, na primjer, kolesterol i njegovi derivati te brojni steroidni hormoni i vitamini topljivi u mastima, posebno vitamin D, ključni su za zdravlje ljudi. Nedostaci, kao i višak steroidnih hormona, imaju nepoželjan utjecaj na ljudsko zdravlje (Frye, 2009). Glukuronidacija može smanjiti obje gore spomenute opasnosti za zdravlje. Ako postoji nedostatak hormona, doći će do povećanja topljivosti steroida u vodi, poboljšavajući tako transport i bioraspoloživost, a ukoliko postoji višak hormona, doći će do uklanjanja suvišnih steroida (Pasqualini i sur., 1989 ; Vina i sur., 2013).

Glukuronidacija je važan put u biotransformaciji i zaštiti masnih kiselina. One u organizmu predstavljaju izvore energije, važnih strukturnih komponenti staničnih membrana i prekursori su eikosanoida. Masne kiseline mogu također djelovati kao drugi glasnici i regulatori transdukcije signala i, pomoću tih mehanizama, igrati značajnu ulogu u kontroli rasta, diferencijacije, proliferacije i apoptoze stanica. Dokumentirano je da se u patološkim stanjima oksidirane masne kiseline, uključujući eikosanoide, izlučuju u obliku glukuronida. Glukuronidacija masnih kiselina događa se u endoplazmatskom retikulu i nuklearnim membranama ljudskog tkiva. Detoksikacija oksidiranih masnih kiselina može se koristiti kao važna terapijska strategija, poput razvoja lijekova koji djeluju na kardiovaskularne bolesti, upalne reakcije i karcinom (Radomska-Pandya, 2006)

Glukuronska kiselina sastavni je dio različitih glikozaminoglikana u organizmu. To su esencijalni spojevi koji se sastoje od amino šećera (D-glukozamin ili D-galaktozamin) i uronske kiseline (D-glukuronska kiselina ili L-iduronska kiselina) povezanih u strukturu dimera. Ovisno o sastojcima dimera mogu se dobiti različiti glikozaminoglikani. Glukuronska kiselina sastavni je dio sljedećih glikozaminoglikana: hijaluronska kiselina, hondroitin sulfat, heparin i dermatan sulfat. Svi imaju strukturne funkcije, osim heparina, koji je nestrukturni glikozaminoglikan. (Martínez Leal i sur. 2018) Hijaluronska kiselina služi kao mazivo i apsorbirer šok, a prisutna je u većim koncentracijama u staklastoj tekućini u oku, konjunktivnom tkivu te sinovijalnoj tekućini zglobova i hrskavice (Frati-Munari, 2012; Vina i sur., 2013). Kondroitin sulfat također je prisutan u kostima i hrskavici gdje se veže na

kolagen i drži vlakna u umrežena. Također pomaže u sprečavanju problema sa zglobovima, što pomaže u olakšanju osteoartritisa. Heparin je unutarstanični spoj i jak antikoagulant koji stvaraju mastociti. Dermatan sulfat prisutan je u većim koncentracijama u vaskularnom endotelu, vezivnom tkivu, hrskavici, koži, rožnici i kostima. U dermatan sulfatu prevladava L-iduronska kiselina. To je uronska kiselina koja je epimer D-glukuronske kiseline. (Frati-Munari, 2012; Vina i sur., 2013). Glukuronska kiselina je prekursor L-askorbinske kiseline (vitamina C) u *kombucha* napitku, jer se sintetizira iz L-gulonske kiseline, koja je uključena u metabolički put glukuronske kiseline. Stoga koncentracija glukuronske kiseline u *kombuchi* povećava i antioksidacijsko djelovanje napitka (Vina i sur., 2013).

2.4. Učinci kombuche

2.4.1. Korisni učinci kombuche

Aloulou i suradnici (2012) proveli su istraživanje u kojem su usporedili hipoglikemijske i andtilipidemčke učinke kombuche i crnog čaja kod dijabetičkih štakora. Dijabetes im je induciran intraperitonealnom injekcijom svježe pripremljene otopine aloksana. Štakore su podijelili u šest skupina, s po osam jedinki i svaka je skupina podvrgnuta drukčijem tretmanu. Prvu i drugu skupinu čini su kontrolni [Con] i dijabetički [Diab] štakori koji su hranjeni normalnom prehranom i vodom za piće. Treću i četvrtu skupinu čini su dijabetički štakori koji su svaki dan primali 5 ml *kombuche* [Diab + KT] ili crnog čaja [Diab + BT] po kilogramu tjelesne težine. Posljednje dvije skupine činili su normalni štakori koji su svaki dan primali 5 ml *kombuche* [Con + KT] ili crnog čaja [Con + BT] po kilogramu tjelesne težine. Eksperiment je trajao 30 dana, a 31. dana uzeti su im uzorci krvi i gušterače u svrhu istraživanja. Histopatološkom analizom utvrđeno je da kontrolni štakori imaju normalne Langerhansove otočice u gušterači dok oni koji su razvili dijabetes pod utjecajem aloksana pokazuju jasnu atrofiju β -stanica. To se događa zato što aloksan povećava koncentraciju reaktivnih vrsta kisika u gušterači i na taj način povećava toksičnost. Kod štakora s dijabetesom koji su pak primali *kombuchu* ili crni čaj gušterača je imala sličnu strukturu kao i kontrolna skupina. Isto tako primijećeno je da je kod dijabetičkih štakora izražena aktivnost enzima α -amilaze koji je odgovoran za probavu ugljikohidrata. Inhibicija tog enzima u probavnom traktu čovjeka predstavlja terapijski pristup koji se koristi za kontrolu i prevenciju hiperglikemije jer se snižava razina glukoze u krvi zbog slabije razgradnje ugljikohidrata. Uspoređujući pak aktivnost α -amilaze kod zdravih i dijabetičkih štakora koji su konzumirali *kombuchu* ili crni čaj, primijećeno je da su oni štakori koji su konzumirali *kombuchu* imali

bolji inhibicijski učinak na enzime od onih koji su konzumirali crni čaj. Nadalje, aktivnost pankreasne i plazmatske lipaze kod dijabetičnih štakora bila je u značajnom porastu. Aktivnost lipaze potiče apsorpciju lipida i dovodi do značajnog porasta triglicerida i lipoprotein-kolesterola niske gustoće što može dovesti do raznih krvožilnih bolesti. Dijabetični štakori liječeni *kombuchom* i crnim čajem imali su znatno manju koncentraciju triglicerida i lipoprotein-kolesterola niske gustoće s tim da su oni liječeni *kombuchom* dali nešto bolje rezultate.

Slično istraživanje proveli su Kabiri i sur. (2013) proučavajući korisne učinke *kombuche* i silimarina na štakorima koji su imali oštećenja jetre inducirana tioacetamidom. Štakori su kroz tri tjedna tretirani tioacetamidom, *kombuchom* i silimarinom u raznim kombinacijama, a zaključeno je da polifenolna komponenta *kombuche* i silimarina štiti jetru od stvaranja slobodnih radikala koji oštećuju hepatocite.

Iako se iz mikrobiološkog i kemijskog sastava *kombuche* da naslutiti blagotvoran učinak na ljudski organizam, potrebno je provesti *in vivo* istraživanja. Kapp i Sumner (2017) proveli su detaljno istraživanje o literaturi koja objašnjava utjecaj *kombuche* na čovjeka. Zaključili su da je *kombucha*, za razliku od drugih fermentiranih pića poput jogurta ili kefira, nedovoljno istražena. Oni su pronašli samo jedno istraživanje koje je izvijestilo o rezultatima empirijskog istraživanja *kombuche* na ljudima. Treba uzeti u obzir da se istraživanje temelji samo na literaturi na engleskom jeziku. Uglavnom su se za *in vivo* istraživanja koristili štakori i miševi što su potvrdili Watawana i sur. (2015), a istraživanja su se radila i na zečevima, patkama, svinjama, psima i kokošima. U posljednje vrijeme provedena su dva istraživanja o utjecanju *kombuche* na ljudski organizam. Bergström (2018) je proučavala utjecaj *kombuche* na crijevnu i oralnu mikrofloru čovjeka i došla je do zaključka da se mikrobne zajednice nisu značajno promijenile. Drugo istraživanje provedeno je na Georgetown University MedStar Hospital i proučavan je *kombucha* napitak kao hiperglikemijski terapeutik kod dijabetičara, ali rezultati tog istraživanja nisu dostupni, vjerojatno jer je istraživanje relativno nedavno završilo (1. 7. 2020.). Istraživanje o učinku *kombuche* na razinu šećera u krvi kod ljudi još uvijek traje.

2.4.2. Kontraindikacije *kombuche*

Iako se kombucha prikazuje kao napitak s ljekovitim svojstvima, postoje slučajevi kod kojih je došlo do razvoja toksičnosti. Četiri bolesnika su imala vrtoglavicu, mučninu i bol u vratu nakon konzumiranja napitka, a Centar za kontrolu i prevenciju bolesti izvijestio je dva slučaja

teške bolesti. Postoji jasan rizik ispijanja napitka za osobe zaražene HIV-om što u svom radu izlažu SungHee Kole i suradnici (2009). Jayabalan i suradnici (2014) opisali su slučaj akutnog zatajenja bubrega s laktacidozom i hipertermijom nakon konzumacije napitka, kao i prisutnost bakterije *Bacillus anthrax* te plijesni *Penicillium* i *Aspergillus* u *kombuchi* pripremljenoj u nehigijenskim uvjetima. Kod starijeg bračnog para koji je napitak konzumirao tijekom šest mjeseci utvrđeno je trovanje olovom koje potječe iz pigmenta glazure keramičke posude u kojoj se napitak nalazio (Phan i sur., 1998). Prijavljena su dva slučaja metaboličke acidoze koja su bila povezana s prekomjernom konzumacijom napitka (> 350 ml dnevno). Kasnije je utvrđeno da su ti slučajevi imali druge dijagnoze koje su ih učinile pogodnim na razvoj acidoze, kao što su HIV i akutno zatajenje bubrega (Sunghee Kole i sur., 2009). *Kombucha* se ne preporuča trudnicama zbog mogućeg sadržaja heparina koji bi u trećem tromjesečju trudnoće mogao inhibirati i razgraditi proteine u sustavu zgrušavanja krvi. Prisutnost heparina u analiziranim uzorcima nije dokazana, ali konzumiranje pića može pogodovati njegovoj proizvodnji. (Delgado, 2015). Centar za kontrolu i prevenciju bolesti (CDC, 1995) potrošnju od oko 120 ml dnevno karakterizira kao onu koja nema rizika za ljudsko zdravlje.

3. ZAKLJUČCI

1. *Kombucha* napitak sadrži bioaktivne sastojke poput polifenola, glukuronske kiseline, vitamina, minerala, DSL-a i brojnih aminokiselina.
2. Sinergijski učinak komponenti *kombucha* napitka čine ga potencijalno korisnim napitkom za zdravlje.
3. Okus i sastav *kombucha* napitka ovise o temperaturi, vremenu i načinu fermentacije, SCOBY kulturi, koncentraciji saharoze, sterilnim uvjetima i vrsti biljke čaja.
4. Konzumacija *kombuche* može zaštititi od razvoja kardiovaskularnih bolesti, spriječiti razvoj karcinoma, poboljšati funkciju jetre uklanjanjem ksenobiotika i regulirati metabolizam kolesterola.
5. Provedena istraživanja uglavnom su se bazirala na *in vivo* pokusima na životinjama te bi se ubuduće, za bolje razumijevanje učinaka napitka na ljudski organizam, istraživanja trebala usmjeriti prema čovjeku.
6. Kod ljudi koji već boluju od neke bolesti ili nepravilno konzumiraju napitak, mogu se javiti kontraindikacije.

4. POPIS LITERATURE:

Adhami V. M., Ahmad N., Mukhtar H. (2003) Molecular Targets for Green Tea in Prostate Cancer Prevention. *The Journal of Nutrition* **133(7)**: 2417-2424.

Aloulo, A., Hamden K., Elloumi D., Ali M. B., Hargafi K., Jaouadi B., Ammar E. (2012) Hypoglycemic and antilipidemic properties of kombucha tea in alloxan-induced diabetic rats. *BMC Complementary and Alternative Medicine* **12**: 63

Aromavita- Institut za aromaterapiju,

<<http://www.aromavitainstitut.com/2018/06/19/cajevac-ucinkovitost-u-tretiranju-infekcija/>> pristupljeno 29.kolovoza 2020.

Bauer-Petrovska B., Petrushevska-Tozi L. (2000) Mineral and water soluble vitamin contents in the kombucha drink. *International Journal Food Sciences Technical* **35(2)**: 201–205.

Bergström H. (2018) The effect of the fermented tea beverage kombucha on the gut microflora. <<https://lup.lub.lu.se/student-papers/search/publication/8954225>> pristupljeno 21.kolovoza 2020.

Centers for Disease Control and Prevention, CDC. (1995) Unexplained severe illness possibly associated with consumption of kombucha tea —Iowa. *Morbidity and Mortality Weekly Report* **44**: 892–900.

Chen C., Liu B. Y. (2000) Changes in major components of tea fungus metabolites during prolonged fermentation. *Journal of Applied Microbiology* **89(5)**: 834–839.

Christensen E., <<https://www.thekitchn.com/how-to-make-your-own-kombucha-scooby-cooking-lessons-from-the-kitchn-202596>> pristupljeno 29. kolovoza 2020.

Chu S., Chen C. (2006) Effects of origins and fermentation time on the antioxidant activities of kombucha. *Food Chemistry* **98(3)**: 502–507.

ClinicalTrials.gov. (2007)

<<https://clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=&term=kombucha&cntry=&state=&city=&dist=>> pristupljeno 25. kolovoza 2020.

Coton M., Pawtowski A., Taminau 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 Microbiology Ecology*

<<https://academic.oup.com/femsec/article/93/5/fix048/3738478>> Pristupljeno 22.kolovoza 2020.

Dufrens, C., Farnworth E. (1999) Tea, Kombucha, and health: A review. *Food Research International* **33(6)**: 409–421.

Ferrières J. (2004) The French paradox: Lessons for other countries. *Heart* **90(1)**: 107–111.

Frati-Munari A. C. (2012) Glicosaminoglicanos en las enfermedades vasculares. *Reviews Mex Angiol* **40(3)**: 89–99.

Frye, C. A. (2009) Steroids, reproductive endocrine function, and affect. A review. *Minerva Ginecol* **61(6)**: 541–562.

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 Sciences Technology-Brazil* **34(1)**: 123–126.

Goldberg I. (2012) Functional Foods: Designer Foods, Pharmafoods, Nutraceuticals, 1. izd. str. XI-XV

Graham D. Y., Lew G. M., Klein P. D. (1992) Effect of treatment of Helicobacter pylori infection on the long-term recurrence of gastric or duodenal ulcer: randomized controlled study. *Annals of Internal Medicine* **116(9)**: 705–708.

Greenwalt C. J., Steinkraus K. H., Ledford R. A. (2000) Kombucha, the fermented tea: Microbiology, composition, and claimed health effects. *Journal of Food Protection* **63(7)**: 976–981.

Harbowy M. E., Balentine D. A. (1997) Tea chemistry. *Critical Reviews in Plant Sciences* **16(5)**: 415-480.

Heršak E., Adžija M. (2013) Svijet pića- od medovine do čaja, 1. izd., str. 158.

Horie H., Kohata K. (2000) Analysis of tea components by high-performance liquid chromatography and high-performance capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A* **881(1-2)**: 425-438.

Jain N. K., Siddiqi M., Weisburger J. (2006) Protective Effects of Tea on Human Health, 1. izd., str. ix

- Jayabalan R., Malbaša R. V., Lončar E. S., Vitas J. S., Sathishkumar M. (2014) A review on kombucha tea - Microbiology, composition, fermentation, beneficial effects, toxicity, and tea fungus. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* **13(4)**: 538–550.
- Jayabalan R., Malini K., Sathishkumar M., Swaminathan K., Yun S. E. (2010) Biochemical characteristics of tea fungus produced during Kombucha fermentation. *Food Science and Biotechnology* **19(3)**: 843–847.
- Jayabalan R., Marimuthu S., Swaminathan K. (2007) Changes in content of organic acids and tea polyphenols during kombucha tea fermentation. *Food Chemistry* **102(1)**: 392–398.
- Kabiri N., Setorki M., Ahangar M. (2013) Protective Effects of kombucha tea and silimarin against thioacetamide induced hepatic injuries in wistar rats. *World Applied Sciences Journal* **27(4)**: 524–532.
- Kapp J. M., Sumner, W. (2019) Kombucha: a systematic review of the empirical evidence of human health benefit. *Annals of Epidemiology* **30**: 66-70.
- Karak T., Bhagt R. M. (2010) Trace elements in tea leaves, made tea and tea infusion: A review. *Food Research International* **43(9)**: 2234-2252.
- Kovacevic Z., Davidovic G., Vuckovic-Filipovic J., Janicijevic-Petrovic M., Janicijevic K., Popovic A. (2014) A toxic hepatitis caused the kombucha tea – Case report. *Macedonian Journal of Medical Sciences* **7(1)**: 128–131.
- Kozyrovska N.O., Reva O.M., Goginyan V. B., Vera J.P. (2012) Kombucha microbiome as a probiotic: a view from the perspective of post-genomics and synthetic ecology. *Biopolymers and Cell* **28(2)**: 103-113.
- Kumar S. D., Narayan G., Hassarajani S. (2008) Determination of anionic minerals in black and kombucha tea using ion chromatography. *Food Chemistry* **111(3)**: 784–788.
- Lambert J. D., Yang, C. S. (2003) Mechanisms of Cancer Prevention by Tea Constituents. *The Journal of Nutrition* **133(10)**: 3262-3267.
- Leal J. M., Valenzuela-Suárez L., Jayabalan R., Huerta-Oros J., Escalante-Aburto A. (2018) A review on health benefits of kombucha nutritional compounds and metabolites. *Journal of food* **16(1)**: 390-399.

- Liu J.B., Zhou L., Wang Y. Z., Wang X., Zhou Y., Ho W. Z., Li J. L. (2016) : Neuroprotective Activity of (-)-Epigallocatechin Gallate against Lipopolysaccharide-Mediated Cytotoxicity. *Journal of Immunology Research* <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27191001/>> Pristupljeno 23. kolovoza 2020.
- Malbaša R. V., Lončar E. S., Vitas J. S., Čanadanović-Brunet J. M. (2011) Influence of starter cultures on the antioxidant activity of kombucha beverage. *Food Chemistry* **127(4)**: 1727–1731.
- Markov S. L., Jerinić V. M., Cvetković D. D., Lončar E. S., Malbaša R. V. (2003) Kombucha-functional beverage: Composition, characteristics and process of biotransformation. *Hemijska industrija*, **57(10)**: 456-462.
- Nguyen N. K., Nguyen P. B., Nguyen H. T., Le P. H. (2015) Screening the optimal ratio of symbiosis between isolated yeast and acetic acid bacteria strain from traditional kombucha for high-level production of glucuronic acid. *LWT- Food Sciences Technological* **64(2)**: 1149–1155.
- Phan T. G., Estell E., Duggin G., Beer I., Smith D., Ferson M. J. (1998) Lead poisoning from drinking Kombucha tea brewed in a ceramic pot. *Medical Journal of Australia* **169(11-12)**: 664-646.
- Radomska-Pandya A. (2006) Glucuronidation of fatty acids by human ER and nuclear UGT. <<https://grantome.com/grant/NIH/R01-DK060109-01A1> > Pristupljeno 20. kolovoza 2020.
- Rakovac Ž. (2010) Poziv na čaj, 1. izd., str. 8-97.
- Reiss J. (1994) Influence of different sugars on the metabolism of the tea fungus. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung* **198(3)**: 258–261.
- Rice-Evans C. (1995) Plant polyphenols: free radical scavengers or chain-breaking antioxidants? *Biochemical Society Symposium* **61**: 103- 116.
- Rubio Delgado A. (2015) Té de Kombucha y sus beneficios para el sistema digestivo (Dissertation). <<http://www.monografias.com/trabajos-pdf4/te-kombucha-y-salud/te-kombucha-y-salud.pdf>> pristupljeno 22. kolovoza 2020.
- Sajilata M. G., Bajaj P. R., Singhal R.S. (2008) Tea Polyphenols as Nutraceuticals. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* **7(3)**: 229-254.
- Sreeramulu G., Zhu Y., Knol W. (2000) Kombucha fermentation and its antimicrobial activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **48(6)**: 2589–2594.

- Sunghee Kole A., Jones H. D., Christensen R., Gladstein J. (2009) A case of Kombucha tea toxicity. *Journal of Intensive Care Medicine* **24(3)**: 205–207.
- Valenzuela A. (2004) El consumo de té y la salud: Características y propiedades benéficas de esta bebida milenaria. *Revista Chilena De Nutrición* **31(2)**: 72–82.
- Villarreal-Soto S. A., Beaufort S., Bouajila J., Souchard J. P., Taillandier P. (2018) Understanding Kombucha Tea Fermentation: A Review. *Journal of Food Science* **83(3)**: 580-588.
- Vina I., Linde R., Patetko A., Semjonovs P. (2013) Glucuronic acid from fermented beverages: Biochemical functions in humans and its role in health protection. *International Journal of Recent Research and Applied Studies* **14(2)**: 17–25.
- Wang K., Gan X., Tang X., Wang S., Tan H. (2010) Determination of d-saccharic acid-1,4-lactone from brewed kombucha broth by high-performance capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography B* **878(3-4)**: 371-374.
- Watawana M. I., Jayawardena N., Gunawardhana C. B., Waisundara V. Y. (2015) Health, wellness, and safety aspects of the consumption of kombucha. *Journal of Chemistry-NY* **1**: 1–11.
- Wu C. D., Wei G. (2009) Tea as a functional food for oral health, *Food Constituents and Oral Health* **19**: 396-417.
- Yamada Y., Yukphan P., Vu H.T.L., Muramatsu Y., Ochaikul D., Tanasupawat S., Nakagawa Y. (2012) Description of *Komagataeibacter* gen. nov., with proposals of new combinations (Acetobacteraceae). *Journal of General and Applied Microbiology* **58(5)**: 397–404.
- Yang C. S., Landau J. M. (2000) Effects of Tea Consumption on Nutrition and Health. *The Journal of Nutrition* **130(10)**: 2409-2412.
- Yang Z., Zhou F., Ji B., Luo Y., Yang L., Li T. (2008) Symbiosis between microorganisms from kombucha and kefir: Potential significance to the enhancement of kombucha function. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **160(2)**: 446–455.
- Zhang Y., Li S., Wang X., Zhang L., Cheung P.C. (2011) Advances in lentinan: isolation, structure, chain conformation and bioactivities. *Food Hydrocolloids* **25(2)**: 196–206.

Izjava o izvornosti

Izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mogeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Petra Knez

ime i prezime studenta