

Izolacija i karakterizacija mikrobiote tijekom fermentacije kombucha zelenog čaja

Zelić, Nensi

Undergraduate thesis / Završni rad

2023

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:159:698434>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-13**



Repository / Repozitorij:

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



**Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Prijeđiplomski studij Biotehnologija**

Nensi Zelić

0058219471

**IZOLACIJA I KARAKTERIZACIJA MIKROBIOTE
TIJEKOM FERMENTACIJE *KOMBUCHA* ZELENOG
ČAJA**

ZAVRŠNI RAD

Predmet: Biotehnologija 2

Mentor: prof. dr. sc. Sunčica Beluhan

Zagreb, 2023.

Ovim putem se zahvaljujem svojoj obitelji i prijateljima na bezuvjetnoj potpori koju mi pružaju i olakšavaju studiranje.

Zahvaljujem se prof. dr. sc. Sunčici Beluhan na susretljivosti i razumijevanju, te velikoj pomoći pri izvedbi eksperimentalnog i izradi pismenog dijela završnog rada.

Zahvaljujem i ostalim djelatnicima Laboratorija za biokemijsko inženjerstvo, industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju slada i piva koji su mi pomogli u izvedbi eksperimentalnog dijela.

Također zahvaljujem dr. sc. Snježani Kazazić, znanstvenoj suradnici Instituta Ruđer Bošković na suradnji oko analize mikrobnog sastava SCOPY kulture koja je provedena pomoću Microflex LTTM MALDI-TOF instrumenta.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Prijediplomski sveučilišni studij Biotehnologija

Zavod za Biokemijsko inženjerstvo
Laboratorij za biokemijsko inženjerstvo, industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju slada i piva

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija

Izolacija i karakterizacija mikrobiote tijekom fermentacije *kombucha* zelenog čaja

Nensi Zelić, 0058219471

Sažetak: *Kombucha* čaj, funkcionalni napitak koji se priprema pomoću simbiotske kulture bakterija i kvasca (SCOBY), privlači značajan interes zbog svojih blagotvornih svojstava. Mikrobiota *kombucha* čaja sastoji se od bakterija i osmofilnih kvasaca, prisutnih u dva međusobno neisključiva dijela: tekućoj fazi ili napitku i biofilmu (bakterijska nanoceluloza, BNC) koji pluta po njoj. U ovom je radu istraživana struktura i dinamika mikrobne zajednice i biokemijska svojstva *kombucha* čaja tijekom 14 dana fermentacije zelenog čaja. Tijekom fermentacije u zelenom čaju zaslađenom saharozom (80 g/L) praćene su promjene pH vrijednosti, stvaranje organskih kiselina (octene i glukonske), etanola i prinos sintetizirane BNC. Rodovi bakterija koji se izolirani iz SCOBY kulture su *Acetobacter*, *Gluconacetobacter*, *Micrococcus* i *Serratia*, dok su *Rhodotorula*, *Schizosaccharomyces* i *Candida* glavni izolirani rodovi kvasaca. Kombinirane mikrobiološke i biokemijske analize dale su vrijedne uvide u bolje razumijevanje uloge mikrobiote u korisnim svojstvima *kombucha* zelenog čaja.

Ključne riječi: *kombucha*, mikrobiota, SCOBY, bakterijska nanoceluloza

Rad sadrži: 44 stranica, 19 slika, 6 tablica, 38 literaturnih 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: prof. dr. sc. Sunčica Beluhan

Pomoć pri izradi: dr. sc. Snježana Kazazaić, znan. sur., IRB

Datum obrane: 8. rujna 2023.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Undergraduate thesis

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

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

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Biotechnology

Isolation and characterization of microbiota during green tea *kombucha* fermentation

Nensi Zelić, 0058219471

Abstract: Kombucha tea, a functional beverage brewed through a symbiotic culture of bacteria and yeast (SCOBY), is acquiring significant interest due to its claimed beneficial properties. The microbiota of *kombucha* tea consists of bacteria and osmophilic yeasts, which thrive in two mutually non-exclusive parts: the liquid phase or the beverage and the biofilm (bacterial nanocellulose, BNC) floating on it. In this study, we explored the structure and dynamics of the microbial community and the biochemical properties of *kombucha* tea at different time points up to 14 days of green tea fermentation. Changes in pH value, the formation of organic acids (acetic and gluconic), ethanol, and synthesized bacterial nanocellulose (BNC) yield were observed over fermentation in sucrose-sweetened green tea (80 g/L). Genera of bacteria majorly found in the SCOBY are *Acetobacter*, *Gluconacetobacter*, *Micrococcus*, and *Serratia*, while *Rhodotorula*, *Schizosaccharomyces*, and *Candida* were the major yeasts genera isolated. A combined microbiological and biochemical analyses were provide valuable insights to understand better the microbiota's role in the *kombucha* green tea beneficial properties.

Keywords: *kombucha*, microbiota, SCOBY, bacterial nanocellulose

Thesis contains: 44 pages, 19 figures, 6 tables, 38 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: Sunčica Beluhan, PhD, Full Professor

Technical support and assistance: Snježana Kazazaić, PhD, research associate, IRB

Thesis defended: September 8, 2023

Sadržaj

1. UVOD.....	2
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. <i>KOMBUCHA</i>	2
2.2. MIKROBNI SASTAV <i>KOMBUCHE</i>	3
2.3. KEMIJSKI SASTAV <i>KOMBUCHA</i> NAPITAKA	7
2.4. METABOLIZAM SUPSTRATA I SINTEZA BNC	9
3. EKSPERIMENTALNI DIO.....	11
3.1. MATERIJALI.....	11
3.1.1. SCOPY <i>KOMBUCHE</i>	11
3.1.2. ČAJ	11
3.1.3. UPORABLJENE KEMIJSKE UREĐAJE.....	11
3.1.4. PODLOGE ZA UZGOJ I SELEKCIJU MIKROORGANIZAMA	12
3.2. METODE	17
3.2.1. PRIPRAVA KULTURE <i>KOMBUCHE</i>	18
3.2.2. PRIPRAVA KOMPLEKSNE PODLOGE (FERMENTIRANI ČAJ).....	18
3.2.3. PRIPRAVA KEMIJSKI DEFINIRANIH PODLOGA	18
3.2.4. PRIMARNO ODREĐIVANJE MIKROBIOTE <i>KOMBUCHE</i>	18
3.2.5. IZOLACIJA BAKTERIJA I KVASACA IZ UZORAKA <i>KOMBUCHE</i>	19
3.2.6. DIFERENCIJACIJA BAKTERIJA	19
3.2.7. IDENTIFIKACIJA PROIZVODNIH VRSTA MIKROBIOTE <i>KOMBUCHE</i>	19
3.2.8. MALDI-TOF TEHNIKA IDENTIFIKACIJE AEROBNO MEZOFILNIH BAKTERIJA	19
3.2.9. KARAKTERIZACIJA PROIZVODNIH VRSTA MIKROBIOTE <i>KOMBUCHE</i>	20
3.2.10. ODREĐIVANJE pH VRIJEDNOSTI <i>KOMBUCHE</i>	21
3.2.11. ODREĐIVANJE UKUPNIH KISELINA.....	22
3.2.12. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE OCTENE KISELINE	22
3.2.13. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE GLUKONSKE KISELINE	22
3.2.14. ODREĐIVANJE ETANOLA KEMIJSKOM METODOM.....	22
3.2.15. PROČIŠĆAVANJE I KVANTITATIVNO ODREĐIVANJE PRINOSA BAKTERIJSKE NANOCELULOZE	23
3.2.16. STATISTIČKE ANALIZE	24
4. REZULTATI I RASPRAVA	25
4.1. BIOKEMIJSKE PROMJENE I SINTEZA BNC	25

4.1. MIKROBIOTA <i>KOMBUCHE</i>	29
4.1.1. IZOLACIJA I PURIFIKACIJA MIKROORGANIZAMA	29
4.1.2. MORFOLOŠKA I MIKROSKOPSKA KARAKTERIZACIJA KVASACA.....	30
4.1.3. MORFOLOŠKA I MIKROSKOPSKA KARAKTERIZACIJA BAKTERIJA	32
4.2.RAST I BIOKEMIJSKA IDENTIFIKACIJA MIKROBIOTE <i>KOMBUCHE</i>	35
4.2.1.IDENTIFIKACIJA MALDI-TOF TEHNIKOM	37
5. ZAKLJUČCI.....	38
6. POPIS LITERATURE	39

1. UVOD

Fermentirana hrana često predstavlja prikladan model za proučavanje mikrobnih zajednica i interakcija (Wolfe i Dutton, 2015). *Kombucha* se sve više uporablja kao primjer fermentiranog napitka dobiven međudjelovanjem metabolizma mikrobnog konzorcija koji čine bakterije octene kiseline, kvasci i često (ali ne uvijek) bakterije mliječne kiseline u zašećerenom čaju (Villarreal-Soto i sur., 2018). Infuzija osigurava dušične tvari ekstrahirane iz čaja nužne za rast mikroorganizama. Saharozu se hidrolizira do glukoze i fruktoze pomoću periplazmne invertaze kvasca, a etanol nastaje kao rezultat alkoholnog vrenja. Bakterije octene kiseline oksidiraju glukozu u glukonsku kiselinu i etanol u octenu kiselinu putem oksidativnog metabolizma. Ova metabolička shema postavlja pitanje moguće trofičke ovisnosti bakterija octene kiseline o kvascima (Lynch i sur., 2019). Glukoza i fruktoza također se koriste za proizvodnju bakterijske nanoceluloze (BNC), što dovodi do stvaranja pelikule, također poznate kao "majka", "čajna gljiva", ili simbiotska kultura kvasca i bakterija (SCOBY), jer se može koristiti kao inokulum za novu fermentaciju, zajedno ili umjesto tekuće kulture (Laavanya i sur., 2021).

Ne postoji jedna poznata autohtona kultura ili mikrobn konzorcij za proizvodnju *kombuche*, nego se radi o mnoštvu u pelikuli vezanih i prilagođenih konzorcija čije je podrijetlo nepoznato. Ova matrica se sastoji od dva različita okruženja ili faze: tekuće, gdje su mikroorganizmi u planktonskom stanju, i pelikule, u kojoj su vezani. Poznato je da su biofilmovi izvorište brojnih interakcija među mikrobnim zajednicama i BNC ovojnica koju sintetiziraju bakterije octene kiseline u *kombuchi* nije iznimka (Gullo i sur., 2018). Izvan ove trofičke interakcije, malo se zna o drugim vrstama interakcija koje se mogu dogoditi tijekom fermentacije *kombuche* na razini prisutne mikrobiote, te su, unatoč brojnim znanstvenim istraživanjima, mehanizmi djelovanja unutar konzorcija i dalje slabo dokumentirani (May i sur., 2019).

U ovom radu je proučavana autohtona mikrobiota *kombuche* te interakcije između kvasaca i bakterija koje se događaju tijekom fermentacije u pogledu mikrobioloških razina i sastava glavnih proizvedenih metabolita. Različite vrste kvasaca i bakterija izolirane su iz tradicionalno uzgojene kulture *kombuche* zelenog čaja. Izolirane kulture su identificirane mikroskopski, pomoću biokemijskih testova i MALDI-TOF analizom. Kao rezultat metaboličkih aktivnosti mikrobiote, istraživane su kinetika nastajanja organskih kiselina (octena i glukonska) i etanola, te kinetika sinteze i prinos BNC u kompleksnoj podlozi.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. KOMBUCHA

Kombucha je fermentirani napitak koji ima dugu povijest, a prvi zapisi koji spominju konzumiranje *kombuche* potječu iz sjeveroistočne Kine iz 220. godine prije nove ere, gdje ju nazivaju lijekom za besmrtnost. Popularnost *kombuche* je postupno rasla te se iz Kine počela širiti u susjedne zemlje. Vjeruje se da je do Rusije i istočne Europe došla trgovačkim putovima koji su se protezali izvan Dalekog istoka. Korištena je kao učinkoviti narodni lijek u Rusiji 1800-ih. Tijekom Prvog svjetskog rata *kombucha* se proširila i u druge europske zemlje preko ruskih i njemačkih zarobljenika. Postala je popularni narodni lijek u Njemačkoj 1920-ih (Jayabalan i sur., 2014).

Sve veći interes potrošača za *kombuchu* se pripisuje prisutnosti antioksidativnih, antimikrobnih i hepatoprotektivnih spojeva, iako čvrsti dokazi njenih učinaka na promicanje zdravlja još uvijek znanstveno nisu potvrđeni (Diez-Ozaeta i Astiazaran, 2022). Uspjeh *kombuche* ogleda se u njezinoj prisutnosti na tržištu koje je 2019. godine iznosilo 1,85 milijardi USD i prema projekciji veličine globalnog tržišta doseći će 10,45 milijardi USD do 2027. godine (Kim i Adhikari, 2020). Trenutno je broj registriranih međunarodnih tvrtki koje komercijalno proizvode *kombuchu* u SAD-u 150, a u Europi 35, što predstavlja 69,8 % odnosno 16,3 % ukupnog udjela diljem svijeta (Nyhan i sur., 2022).

Trenutno veliki broj ljudi tradicionalno proizvodi *kombuchu* u malim količinama za vlastite potrebe fermentacijom zaslađenog čaja. Iako se za proizvodnju tradicionalno koristi crni čaj, druge vrste čaja kao zeleni, oolong i bijeli čaj se također upotrebljavaju. U rod *Camellia* (čajevac) ubrajamo oko 50 vrsta trajno zelenog tropskog i subtropskog grmlja, odnosno nižeg drveća, od kojeg su najznačajniji kineski čajevac (*Camellia sinensis* var. *sinensis*) i indijski čajevac (*Camellia sinensis* var. *assamica*). *Camellia sinensis* raste u brojnim krajevima svijeta i uzgaja se u 52 države, no podrijetlo joj je u jugoistočnoj Aziji, oko granice Indije, Burme i Kine. Kinezi, konkretno stanovnici provincije Junan, smatraju čajevac svojom biljkom te sebi pripisuju izum čajnog napitka, odnosno otkriće da je vruća voda s lišćem čaja dobra za piće. Iako se uzgaja u tropskim predjelima cijelog svijeta, najznačajniji proizvođači čaja i dalje ostaju Kina, Indija, Šri Lanka i Japan (Chakravorty i sur., 2019).

Biljka čaja se bere i obrađuje na različite načine diljem svijeta. Razlike između vrsta čaja određene su fazom rasta u kojoj se listovi beru i kako se obrađuju (tablica 1). Svi čajevi se djelomično osuše, a zatim se dopušta da odstoje na zraku što dovodi do oksidacije. Različite

razine oksidacije, poznate kao fermentacija, daju čaju prepoznatljiv okus. (Crum i sur., 2016).

Tablica 1. Metode obrade različitih vrsta čaja koji se koriste za pripremu *kombuche*

Tip čaja	Proces
Crni	Sušenje na suncu, valjanje, potpuna oksidacija (fermentacija), sušenje
Zeleni	Sušenje (na pari ili vrućim zrakom), valjanje/oblikovanje, bez oksidacije, sušenje
Oolong	Djelomično sušenje na suncu, valjanje/ lomljenje listova, djelomična oksidacija, sušenje
Bijeli	Minimalna obrada, sušenje na niskim temperaturama

Upotreba zelenog čaja dobiva sve veću važnost u proizvodnji, vjerojatno zbog blagog okusa i niže cijene. Zeleni čaj se prvenstveno povezuje s inaktivacijom polifenol oksidaze zagrijavanjem ili primjenom pare na listove kako bi se osiguralo da katehini ostanu neoksidirani (Senanayake, 2013). Zeleni čaj ima blaži okus i boju od crnog čaja. Zbog delikatnosti zelenog čaja pri pripremi se koriste niže temperature (66-85 °C) kako bi se spriječila pretjerana ekstrakcija tanina iz listova. Glavnu komponentu zelenog čaja čine polifenoli, na koje otpada otprilike 25-35 % mase suhe tvari. Zeleni čaj bogat je katehinima, uključujući epigalokatehin galat (EGCG), koji dokazano ima antibakterijska svojstva, sposobnost snižavanja razine lipoproteina niske gustoće (LDL) i jačanja imuniteta (Crum i sur., 2016).

2.2. MIKROBNI SASTAV *KOMBUCHE*

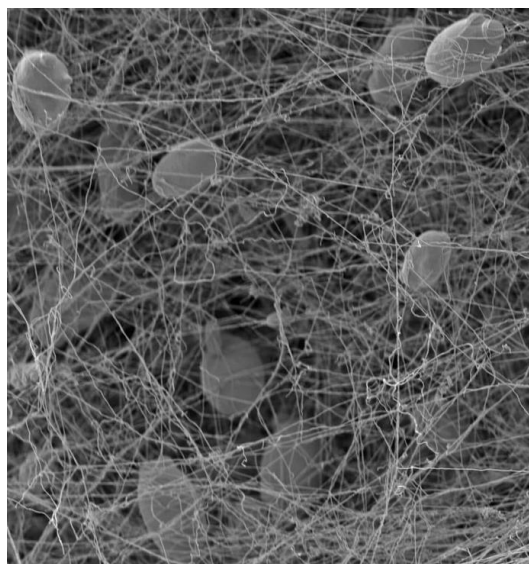
Mikrobni sastav *kombuche* može varirati od kulture do kulture, zbog geografskog položaja, klime, te lokalnih vrsta kvasaca i bakterija (Jayabalan i sur., 2014). Prethodna istraživanja bavile su se asortimanom kvasaca i bakterija koje čine SCOBY i koristi se za fermentaciju *kombuche* (Coton i sur., 2017). Tablica 2 prikazuje mikrobni sastav različitih kvasaca i bakterija koje predstavljaju mikrobni konzorcij SCOBY kulture.

Tablica 2. Mikrobni sastav *kombuche* (Bishop i sur., 2022)

Bakterije	Kvasci
<i>Acetobacter aceti</i>	<i>Brettanomyces</i> sp.
<i>A. pasteurianus</i>	<i>B. bruxellemsis</i>
<i>A. xylinoides</i>	<i>B. intermedius</i>
<i>A. xylinum</i> (<i>Komagataeibacter xylinus</i>)	<i>B. lambicus</i>
<i>Allbacillum</i> sp.	<i>Candida</i> sp.
<i>Bacterium glutamicum</i>	<i>Candida stellimallicola</i>
<i>Bifidobacterium</i> sp.	<i>Candida tropicalis</i>
<i>Enterococcus</i> sp.	<i>Kloeckera apiculata</i>
<i>Gluconacetobacter</i> sp.	<i>Kloeckera</i> sp.
<i>Gluconobacter oxydans</i>	<i>Klyveromyces</i> sp.
<i>Komagataeibacter</i> sp.	<i>Pichia</i> sp.
<i>K. europaeus</i>	<i>P. membranaefaciens</i>
<i>K. intermedius</i>	<i>Rhodotorula</i> sp.
<i>K. oboediens</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> var. <i>aceti</i>
<i>Lactobacillus</i> sp.	<i>S. cerevisiae</i> var. <i>cerevisiae</i>
<i>Lactococcus</i> sp.	<i>S. ludwigii</i>
<i>Leuconostoc</i> sp.	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>
<i>Mocrococcus</i> sp.	<i>Torula</i>
<i>Propionibacterium</i> sp.	<i>T. delbrueckii</i>
<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Torulopsis</i> sp.
<i>Rhizobium</i> sp.	<i>Zygosaccharomyces baillii</i>
<i>Sarcina</i> sp.	<i>Z. kombuchaensis</i>
<i>Serratia</i> sp.	<i>Z. rouxii</i>

Nabrojani mikroorganizmi pojavljuju se zajedno u frakciji čaja ili su sastavni dio plutajuće nanocelulozne ovojnice (pelikule, BNC) koja se regenerira svakom novom fermentacijom (slika 1). *Acetobacter xylinum* sada reklasificiran kao *Komagataeibacter xylinus* je vrsta odgovorna za biosintezu celulozne ovojnice. Mikrobiološki sastav ovojnice ovisi o korištenom inokulumu za početak fermentacije. Stabilnost i održavanje mikrobiote biofilma tijekom

vremena tek treba okarakterizirati unatoč njegovoj intenzivnoj upotrebi kao starter kulture.



Slika 1. SEM prikaz bakterija i kvasaca u mreži fibrila BNC (povećanje 10 000x)
(Chimileski i Kolter, 2017)

2.2.1. SCOBY

SCOBY je celulozni biofilm sintetiziran u prethodnoj fermentaciji (May i sur., 2019). Na početku fermentacije, biofilm se može uočiti kao tanki sloj koji pluta na vrhu napitka. Tijekom fermentacije, minijaturni celulozni filamenti koje ekstracelularno sintetiziraju bakterije octene kiseline dižu se do vrha tekućine i tvore nakupinu. Nakupljanje niti stvara nekoliko naslaganih slojeva koji plutaju na vrhu napitka i čine sve veći i jači biofilm tijekom fermentacije (May i sur., 2019). Smatra se da bakterije koje žive u debelom biofilmu osigurava prvi obrambeni mehanizam od štetnih utjecaja iz okoliša. Biofilm predstavlja prepreku za difuziju antibiotika zbog prirodnog sastava nanoceluloznog tkiva, što u konačnici pridonosi zaštiti *kombuche* od vanjskih bakterija. SCOBY je "majka" metaboličkih procesa koja stvara gotov proizvod. Tijekom procesa fermentacije, SCOBY poprima očitiji oblik, poput vrha gljive, guste i želatinozne teksture, mirisa po octu, što objašnjava kiselkasti miris i okus *kombuche*. Miris nalik octu dobar je pokazatelj da je SCOBY zdrav, dok svaki neugodan ili pljesniv miris može značiti da SCOBY kultura odumire ili je kontaminirana (Crum i sur., 2016).

2.2.2. Kvasci

Konzorcij kvasaca u *kombuchi* uglavnom predstavljaju *Dekkera/Brettanomyces bruxellensis*,

Dekkera anomala/Brettanomyces anomalus, *Candida* spp., *Kloeckera* spp., *Pichia* spp., *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomycodes ludwigii*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Torula* spp., *Torulaspora* spp., *Torulopsis* spp., *Zygosaccharomyces bailii* i *Z. rouxii*, Varijacije u sastavu mikrobne zajednice mogu se pripisati značajkama *kombucha* pića proizvedenih diljem svijeta, a ovisno o podrijetlu inokuluma, biljnim supstratima i različitim geografskim, klimatskim i okolišnim uvjetima koji se javljaju tijekom fermentacije i proizvodnih procesa (Nyhan i sur., 2022.; Wang i sur., 2022; Harrison i Curtin, 2021; Jafari i sur., 2021). Zabilježeni su zanimljivi pomaci u strukturi i dinamici mikrobiote tijekom razdoblja fermentacije, koje općenito traje 8-14 dana na sobnoj temperaturi (18–28 °C). Na primjer, ovisno o ekologiji kvasca u *kombuchi*, fermentaciju su pokrenule osmotolerantne vrste, poput *Schizosaccharomyces pombe*, *Torulaspora delbrueckii* i *Zygosaccharomyces bailii*, čiji broj se smanjuje s povećanjem kiselosti, da bi ga zatim naslijedile vrste otporne na kiseline (Bishop i sur., 2022; Nyhan i sur., 2022).

2.2.3. Bakterije

Među bakterijskim rodovima prisutnim u SCOBY kulturi, većinu predstavljaju bakterije octene kiseline koje su uključene u pretvorbu etanola proizvedenog fermentacijom u acetaldehid, koji se djelovanjem enzima acetaldehid dehidrogenaze pretvara u octenu kiselinu, dok su bakterije mliječne kiseline (LAB) povremeno prisutne u *kombuchi* (Bishop i sur., 2022; Nyhan i sur., 2022). Adrian John Brown je 1886. godine identificirao bakteriju odgovornu za fermentaciju i nazvao ju *Bacterium xylinum*. Nakon toga se taksonomski naziv do danas višekratno mijenjao, te je poznata po nekoliko drugih naziva, poput *Acetobacter xylinum* i *Gluconacetobacter xylinus*. Gram-negativna je, pokretna i štapičasta bakterija, 2012. godine dobila je novo ime roda *Komagataeibacter*. Među vrstama ovog roda koje sintetiziraju BNC su *Komagataeibacter swingsii*, *Komagataeibacter rhaeticus* i *Komagataeibacter medellinensis*. *Komagataeibacter xylinus* je poznata kao glavni proizvođač nanoceluloze u SCOBY-ju *kombuche*, dok je druga dominantna bakterija *Gluconobacter oxydans* (St-Pierre, 2019). Bakterije mliječne kiseline (LAB) kao što su *Lactobacillus* i *Lactococcus* predstavljaju također dio mikrobiote u BNC. Uočeno je da *Lactobacillus* prevladava u višim koncentracijama u kasnijim fazama fermentacije. Kada su kultivirani *Lactobacillus* sp. s bakterijama octene kiseline poput *Gluconacetobacter* vidjela se veća proizvodnja celuloze pa je zaključio da *Lactobacillus* podržava rast bakterija (Sengun i Kirmizigul, 2020).

2.3.KEMIJSKI SASTAV *KOMBUCHA* NAPITAKA

Kombucha se sastoji od niza organskih kiselina, šećera, vitamina, aminokiselina, purina, pigmenta, lipida, proteina, etanola, kofeina, ugljikovog dioksida, polifenola i minerala. Kemijski sastav čaja koji se koristi za proizvodnju *kombuche* utječe na koncentraciju pojedinih spojeva u dobivenom napitku zbog čega je dobro proučen. Prisutnost i količina određenih kemijskih spojeva ovisi o sastavu simbiotske kulture, parametrima fermentacije, koncentraciji saharoze, vrsti čaja i analitičkim metodama korištenima za kvantifikaciju. Iako nedostaje kliničkih dokaza o dobrobiti *kombuche* na zdravlje, znanstvenici su istraživanjima potvrdili da se *kombucha* sastoji od širokog spektra kemijskih komponenti koje potječu iz zelenog i crnog čaja. Neke od tih komponenti su poznate po pozitivnom učinku koji imaju na ljudski imunološki sustav i metaboličke procese u organizmu. *Kombucha* fermentirana sa zelenim ili crnim čajem sadrži visoke razine vitamina C ili askorbinske kiseline i tragove vitamina B skupine. Vitamini su nužni za brojne biokemijske i fiziološke procese koji se odvijaju u ljudskom tijelu. Vitamin C promovira ljudsko zdravlje stvaranjem kolagena za potporu vezivnog tkiva i sudjelovanjem u imunosnom odgovoru (Watawana i sur., 2015).

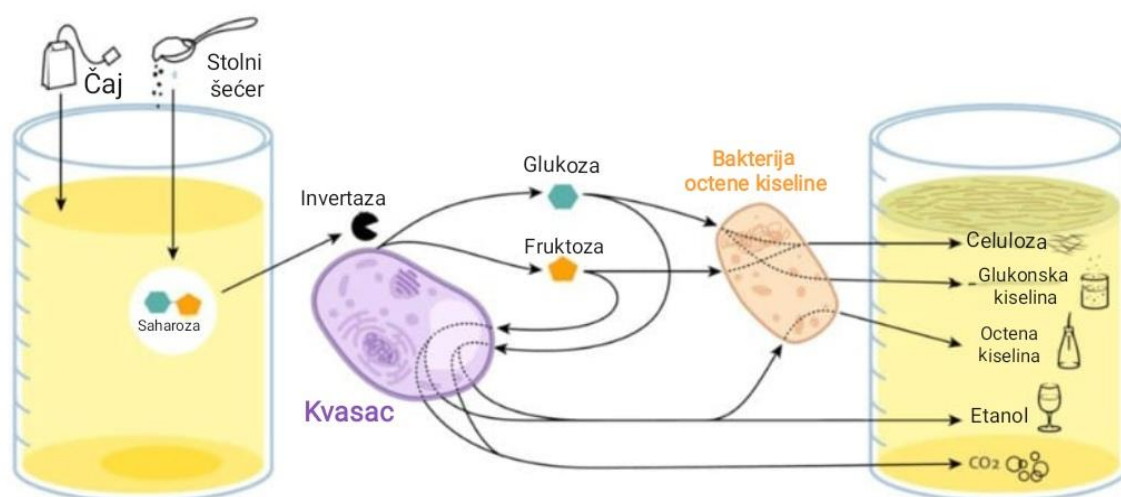
Minerali su anorganske supstance koje igraju važnu ulogu u ljudskom tijelu. Male količine su potrebne za normalnu funkcioniranje i rast organizma. Esencijalni minerali kao što su kalij, kobalt, mangan, bakar, željezo, magnezij i fluoridni ioni mogu se pronaći u fermentiranoj *kombuchi* (Jakubczyk i sur., 2020).

Polifenoli su bioaktivne tvari koje sadrže više od jedne fenolne strukture po molekuli. Predstavljaju najveću grupu fitokemikalija i najzastupljeniji su antioksidansi u ljudskoj prehrani. Zeleni, crni i mnogi drugi čajevi su bogati polifenolima topivim u vodi, ove komponente su odgovorne za okus i aromu čaja. Antioksidativna svojstva polifenola odgovorna su za pozitivne zdravstvene učinke povezane s čajem i *kombuchom* kao što su prevencija tumora, podizanje imuniteta, smanjenje upalnih procesa i artritisa. Ukupna količina polifenola pronađenih u *kombuchi* ovisi o vrsti korištenog čaja (Zyurt, 2020).

Etanol, produkt fermentacije kvasca također se može naći u *kombuchi*. Koncentracija etanola raste kako fermentacija napreduje. Zahvaljujući metaboličkim aktivnostima octenih bakterija koncentracija etanola kasnije se smanjuje ispod 1,2 % volumnog alkohola, što je u skladu s oznakom „bez alkohola“, propisana europskom regulativom. (EU N° 1169/2011). Međutim, iako tradicionalna *kombucha* ne sadrži alkohol, u posljednje vrijeme mali proizvođači počinju proizvoditi „jaku ili tvrdu *kombuchu*“, koja sadrži 3,5-5,5 % volumnog alkohola (Bishop i sur.,

2022).

Kombucha se sastoji od niza organskih kiselina kao što su octena, glukonska, glukuronska, mliječna, limunska, jabučna i oksalna (slika 2). Octena kiselina je komponenta odgovorna za okus i aromu octa koja se obično povezuje s *kombuchom*. Etanol i octena kiselina pronađeni u *kombuchi* osiguravaju antiseptička svojstva, inhibirajući rast patogenih mikroorganizama. Mliječna kiselina se prvenstveno nalazi u *kombuchi* pripremljenoj od zelenog čaja, za razliku od drugih čajeva gdje su zabilježene neznatne količine. Oksidacijom glukoze tijekom procesa fermentacije nastaje glukuronska kiselina, koja se zbog svoje sposobnosti vezanja toksičnih spojeva u jetri smatra najznačajnijim detoksifikatorom u ljudskom organizmu. Glukuronska kiselina je također prekursor za biosintezu vitamina C (Villarreal-Soto i sur., 2018).



Slika 2. Proizvodnja organskih kiselina tijekom fermentacije *kombucha* čaja (prema Tran i sur., 2020)

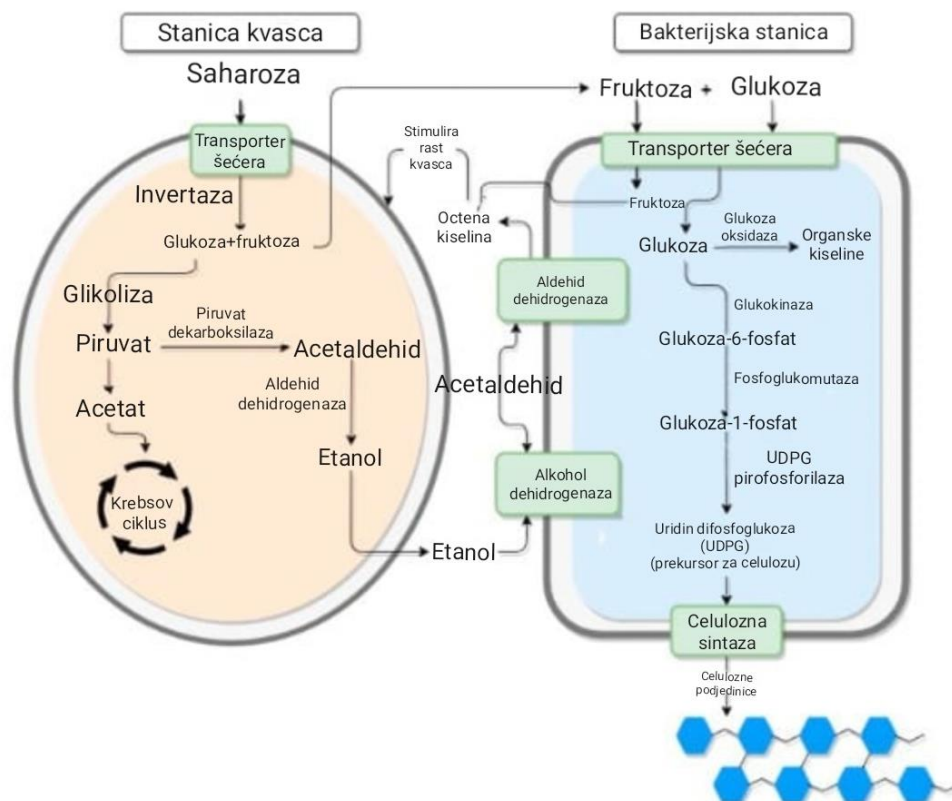
Kofein je prirodni ksantinski alkaloid koji se nalazi u brojnim biljkama kao što su kava, čaj i kakaovac. Ljudi konzumiraju proizvode koji sadrže kofein zbog stimulirajućeg učinka na živčani sustav koji pružaju zajedno s povećanjem energije. Kad je u pitanju *kombucha*, kofein ima važnu ulogu tijekom fermentacije, osiguravajući kvascima i bakterijama dušik nužan za metaboličke procese i izgradnju novih stanica. Također omogućuje energiju za kvasce i bakterije kako bi mogli provesti proces fermentacije (Crum i sur., 2016).

Okus *kombuche* se mijenja iz slatkog do voćnog, kiselkastog i blago pjenušavog pa sve do okusa sličnog octu kako fermentacija napreduje. Slatkoća *kombuche* se smanjuje dok kiselost

raste zbog metabolizma simbiotske kulture, koji koristi šećer kao supstrat za proizvodnju organskih kiselina. Ne postoji krajnja točka fermentacije *kombuche*, međutim kiselost može porasti do potencijalno štetne razine za konzumaciju nakon 10 dana. Za sigurnu konzumaciju *kombuche* preporučuje se krajnja pH vrijednost veća od 2,8. Nakon završene fermentacije celulozni biofilm se uklanja iz posude za fermentaciju, a tekućina se filtrira i pohranjuje u zatvorene boce, spremna za konzumaciju.

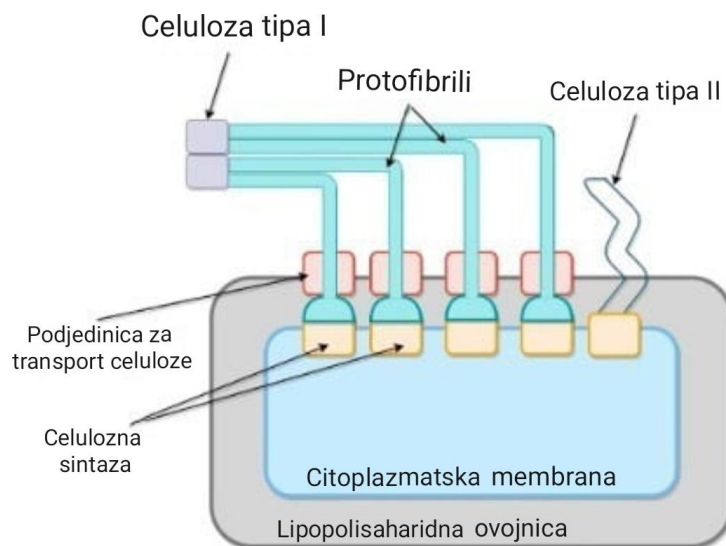
2.4. METABOLIZAM SUPSTRATA I SINTEZA BNC

Prisutnost goleme i raznolike mikrobne populacije u SCOBY kulturi čini složenijim razumijevanje kinetike fermentacije i proizvodnje BNC zajedno s raznim drugim proizvodima metabolizma (nusproizvodima) prisutnim u fermentacijskoj podlozi. Mikrobne vrste koje međusobno djeluju jedna na drugu mogu djelovati korisno ili inhibicijski. Ovakvo mikrobnom ponašanje je detaljno proučeno kako bi se znala funkcija svake vrste prisutne u združenoj kulturi (slika 3). Ulogu nekih od dominantnih skupina bakterija i kvasaca tijekom fermentacije *kombuche* i proizvodnje BNC proučavali su detaljno Chakravorty i suradnici (2016).



Slika 3. Metabolizam supstrata pomoću SCOBY kulture (prema Laavanya i sur., 2021)

Konzorcij kvasaca metabolizira prisutnu saharozu na glukozu i fruktozu i proizvodi etanol iz glukoze (Tran i sur., 2020). Molekule glukoze postaju supstrat bakterijama octene kiseline za proizvodnju organskih kiselina poput octene, glukonske, glukuronske i drugih kiselina kao rezultat oksidacije glukoza-oksidadom, a molekule fruktoze se pretvaraju u octenu kiselinu. Proizvedena octena kiselina djeluje kao stimulans za kvasac da proizvodi više etanola i ovaj etanol zatim iste bakterije pretvaraju u octenu kiselinu. Ovaj proces dovodi do nakupljanja etanola i octene kiseline u mediju i djeluje kao antimikrobno sredstvo koje sprječava kontaminaciju patogenim mikroorganizmima. Kofein i spojevi poput teofilina i teobromina prisutnih u infuziji čaja također stimuliraju proizvodnju BNC aktiviranjem celuloznih kompleksa. Bakterijske stanice stimuliraju i vitamini i druge hranjive tvari koje se oslobađaju kao posljedica smrti i autolize stanica kvasca (Chakravorty i sur., 2016). Vlaknasta mreža bakterijske celuloze se sastoji od trodimenzionalnih, strukturno vrlo uređenih nanovlakana, što rezultira stvaranjem hidrogela velike površine i poroznosti. *G. xylinus* proizvodi celulozu I (vrpcama sličan polimer) i celulozu II (termodinamički stabilan polimer) kao što je prikazano na slici 4 (Laavanya i sur., 2021).



Slika 4. Sinteza celuloznih mikrofibriila (prema Laavanya i sur., 2021)

Tijekom procesa sinteze, protovlakna glukoznog lanca se izlučuju kroz bakterijsku staničnu stijenkku i međusobno formiraju nanovlaknaste celulozne vrpce. Ove vrpce grade mrežno oblikovanu strukturu BNC koju čini vrlo porozni matriks. Ovako sintetizirana celuloza ima vrlo veliki broj hidroksilnih grupa čime se objašnjava njena hidrofilnost, razgradljivost i veliki kapacitet za kemijske modifikacije (Gullo i sur., 2016).

1. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. SCOBY *kombuche*

U radu je uporabljena SCOBY *kombuche* iz kućnog uzgoja (slika 5). Uvjeti fermentacije zelenog čaja i sinteze SCOBY kulture opisani su u poglavlju 3.2.1.



Slika 5. Prikaz pelikule BNC uporabljene u istraživanju kao starter kultura (osebna fotografija, Nensi Zelić)

3.1.2. Čaj

Za uzgoj *kombuche* uporabljen je Lord Nelson zeleni čaj s okusom jasmína. Proizvedeno za Lidl Stiftung & Co. KG, Stiftsbergstr. 1, DE-74167 Neckarsulm, Njemačka.

Sastav čaja: zeleni čaj (100,0 %), cvjetovi jasmína (< 1 %).

3.1.3. Uporabljene kemikalije i uređaji

U radu su uporabljene slijedeće kemikalije (proizvođači): glukoza (GRAM MOL, Zagreb, Hrvatska), kvašćev ekstrakt (Biolife, Milano, Italija), pepton (Biolife, Milano, Italija), CaCO₃ (Kemika, Zagreb, Hrvatska), agar (Merck, Darmstadt, Njemačka), EtOH (GRAM MOL, Zagreb, Hrvatska), Na₂HPO₄ (Merck, Darmstadt, Njemačka), limunska kiselina (Merck, Darmstadt, Njemačka), tripton (Merck, Darmstadt, Njemačka), sojin pepton (Merck, Darmstadt, Njemačka), NaCl (kemika, Zagreb, Hrvatska), laktoza (GRAM MOL, Zagreb, Hrvatska), maltoza (GRAM MOL, Zagreb, Hrvatska), bromkrezol zeleno (Kemika, Zagreb, Hrvatska), bromkrezol plavo (Kemika, Zagreb, Hrvatska), bromkrezol ljubičasto (Kemika, Zagreb, Hrvatska), CaCl₂ (Kemika, Zagreb, Hrvatska), FeCl₃ (Kemika, Zagreb, Hrvatska), MgSO₄ (Kemika, Zagreb, Hrvatska), MnSO₄ (Kemika, Zagreb, Hrvatska), KH₂PO₄ (Kemika, Zagreb, Hrvatska), KCl (Kemika, Zagreb, Hrvatska), cikloheksimid (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD), ampicilin (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD).

U radu su korišteni slijedeći uređaji (proizvođači): analitička vaga Sartorius ENTRIS 153-1S (Sartorius, SAD), termostati Memmert IF40 na 25 °C, 28 °C, 30 °C i 37 °C (Mettler, Long Island City, SAD), laboratorijska tresilica inkubator IKA@KS 4000i control (SMITA Chemical Lab, New Delhi, Indija), svjetlosni mikroskop OLYMPUS CH20 (Olympus, Nizozemska).

3.1.4. Podloge za uzgoj i selekciju mikroorganizama

3.1.4.1. Tekuće hranjive podloge

3.1.4.1.1. Krumpirov bujon (eng. *Potato Dextrose Broth*; PDB)

Sastav/L

glukoza	20,0 g
krumpirova infuzija	200,0 mL

Priprava krumpirove infuzije: Staviti 200 g krumpira izrezanih na kockice u 1,0 L demineralizirane vode. Zagrijati do vrenja i kuhati 30 minuta, profiltrirati kroz gazu i sačuvati filtrat.

Priprava podloge: Sve sastojke otopiti/dodati u 1,0 L demineralizirane vode. Sterilizirati i preliterati u tikvice ili epruvete.

pH $5,6 \pm 0,2$ pri 25°C

3.1.4.1.2. Hranjivi bujon (eng. *Nutrient Broth*; NB)

Sastav/L

glukoza	50,0 g
kvašćev ekstrakt	5,0 g

Priprava podloge: Sve sastojke otopiti/dodati u 1,0 L demineralizirane vode. Sterilizirati i preliterati u tikvice ili epruvete.

pH $6,9 \pm 0,2$ pri 25°C

Primjena: za uzgoj *Gluconacetobacter xylinus*

3.1.4.1.3. Puferirana Hestrin-Schram tekuća podloga (HS)

Sastav/L

glukoza	20,0 g
kvašćev ekstrakt	5,0 g
pepton	5,0 g

Na ₂ HPO ₄	2,7 g
limunska kiselina·H ₂ O	1,15 g

Priprava podloge: Dodati/otopiti sve sastojke u 1,0 L demineralizirane vode. Lagano zagrijati do vrenja. Podesiti pH na 5,0 s HCl. Sterilizirati u autoklavu i ohladiti na 50°C. Aseptično dodati 40 mL sterilne otopine glukoze u steriliziranu podlogu, razliti na ploče ili u epruvete. pH 6,0 ± 0.2 pri 25°C

Primjena: za uzgoj *Acetobacter xylinum*.

3.1.4.1.4. YPM (eng. *Yeast Peptone Medium*)

Sastav/100 mL

kvašćev ekstrakt	3,0 g
pepton	3,0 g
EtOH	0; 5; 10; 15; 20; 25 mL

Priprava podloge: Dodati pepton i kvašćev ekstrakt u 1,0 L demineralizirane vode. Dobro promiješati i lagano zagrijavati do vrenja. Sterilizirati, dodati EtOH i razliti u Erlenmeyer tikvice od 300 mL.

pH 6,5 ± 0.2 pri 25°C

Primjena: za test otpornosti na EtOH.

3.1.4.2. Čvrste hranjive podloge

3.1.4.2.1. Krumpirov agar (eng. *Potato Dextrose Agar*; PDA)

Sastav/L

glukoza	20,0 g
krumpirova infuzija	200,0 mL
agar	20,0 g

Priprava podloge: Sve sastojke otopiti/dodati u 1,0 L demineralizirane vode. Sterilizirati i prelići na ploče ili u epruvete.

pH 5,6 ± 0.2 pri 25°C

Primjena : za uzgoj i brojanje kvasaca i plijesni iz hrane.

3.1.4.2.2. GYPM (eng. *Glucose Yeast Peptone Medium*; GYPM)

Sastav/L

glukoza	5,0 g
kvašćev ekstrakt	3,0 g
pepton	5,0 g
agar	20,0 g

Priprava podloge: Dodati sve sastojke u 1,0 L demineralizirane vode. Dobro promiješati i lagano zagrijavati do vrenja. Sterilizirati i razliti na ploče.

pH $6,8 \pm 0,2$ pri 25°C

Primjena: za uzgoj i održavanje različitih vrsta kvasaca: *Candida* sp., *Rhodotorula matritensis*, *Saccharomyces bayanus*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces douglasii*, *Saccharomyces paradoxus*, *Schizosaccharomyces pombe* i *Zygosaccharomyces rouxii*.

3.1.4.2.3. GYC agar (eng. *Glucose Yeast Extract Calcium Carbonate Agar*)

Sastav/L

glukoza	20,0 g
CaCO ₃	20,0 g
kvašćev ekstrakt	10,0 g
agar	20,0 g

Priprava podloge: Dodati sve sastojke u 1,0 L demineralizirane vode. Dobro promiješati i lagano zagrijavati do vrenja. Sterilizirati i razliti na ploče.

pH $6,8 \pm 0,2$ pri 25°C

Primjena: za uzgoj i održavanje *Acetobacter* spp. *Acetobacter pasteurianus*, *Acetobacter xylinum*, i *Gluconobacter oxydans*.

3.1.4.2.4. GEM agar (eng. *Glucose Ethanol Medium*)

Sastav/L

glukoza	15,0 g
pepton	3,0 g
kvašćev ekstrakt	3,0 g
EtOH	5 mL
agar	20,0 g

Priprava podloge: Dodati sve sastojke u 1,0 L demineralizirane vode. Dobro promiješati i

lagano zagrijavati do vrenja. Sterilizirati i razliti na ploče.

pH $5,6 \pm 0,2$ pri 25°C

3.1.4.2.5. GACE agar (eng. *Glucose Acetic Acid Citric Acid Ethanol Agar*)

Sastav/L

glukoza	10,0 g
pepton	7,0 g
kvašćev ekstrakt	10,0 g
octena kiselina	0,1 mL
limunska kiselina	0,2 g
EtOH	10,0 mL
agar	20,0 g

Priprava podloge: Dodati sve sastojke u 1,0 L demineralizirane vode. Dobro promiješati i lagano zagrijavati do vrenja. Sterilizirati i razliti na ploče.

pH $5,5 \pm 0,2$ pri 25°C

3.1.4.2.6. WL agar (eng. *Wallerstein Laboratory Differential Agar*)

Sastav/L

glukoza	50,0 g
kvašćev ekstrakt	4,0 g
CaCl ₂	0,125 g
FeCl ₃	0,0025 g
MgSO ₄	0,125 g
MnSO ₄	0,0025 g
KH ₂ PO ₄	0,55 g
KCl	0,425 g
Kazein hidrolizat	5,0 g
Bromkrezol zeleno	0,022 g
Aktidion (cikoheksimid)	4,0 mg
agar	20,0 g

Priprava podloge: Dodati sve sastojke u 1,0 L demineralizirane vode. Dobro promiješati i lagano zagrijavati do vrenja. Sterilizirati i razliti na ploče.

pH $5,5 \pm 0,2$ pri 25°C

Primjena: za diferencijalni uzgoj bakterija iz industrijskih fermentacijskih procesa. Dodatkom cikloheksimida je inhibiran rast kvasaca i plijesni.

3.1.4.2.7. Carr agar

Sastav/L

glukoza	3,0 g
kvašćev ekstrakt	10,0 g
CaCO ₃	10,0 g
EtOH	17,5 mL
Bromkrezol plavo	0,04 g
agar	20,0 g

Priprava podloge: Dodati sve sastojke u 1,0 L demineralizirane vode. Dobro promiješati i lagano zagrijavati do vrenja. Sterilizirati i razliti na ploče.

pH $5,5 \pm 0,2$ pri 25°C

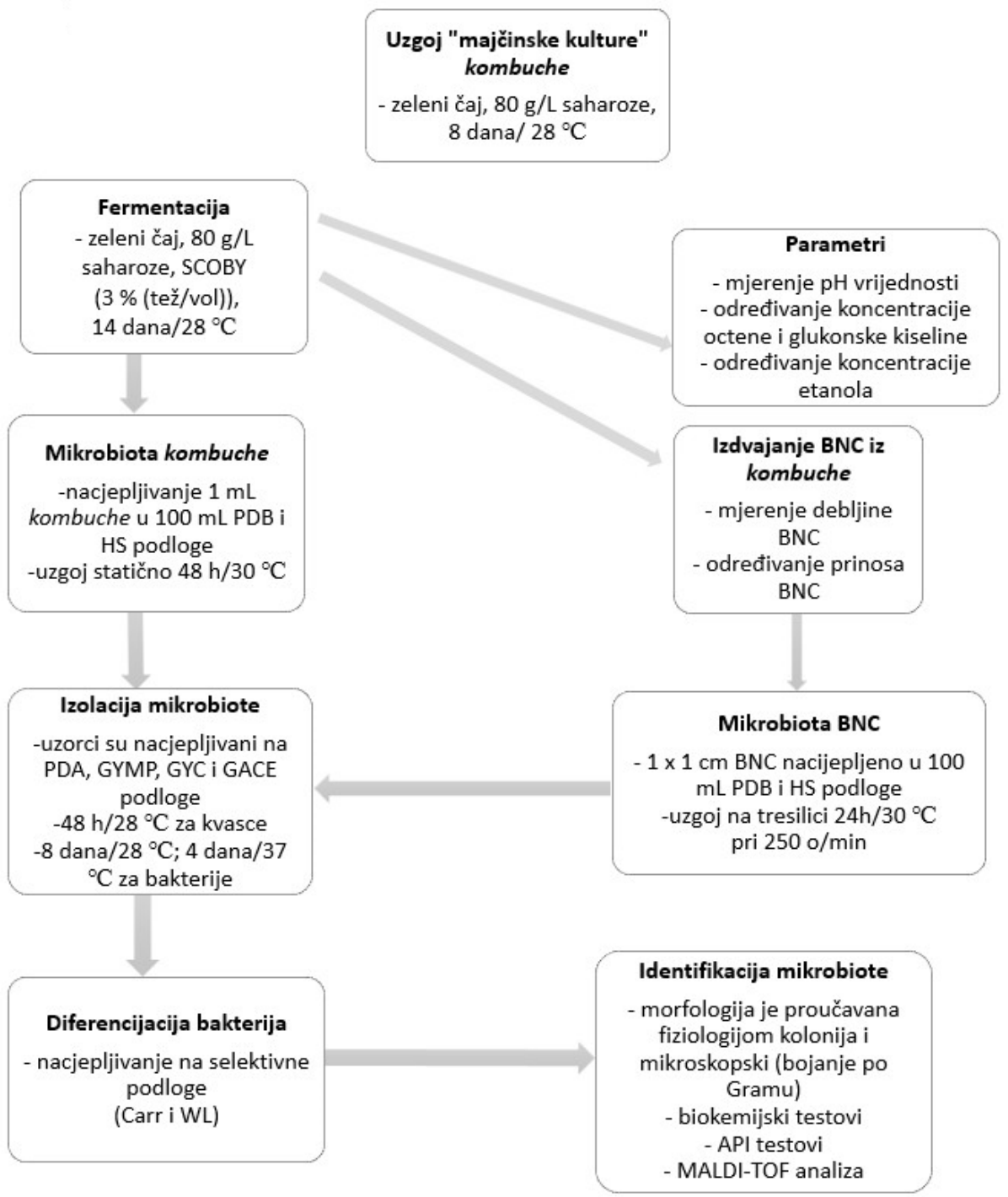
Primjena: promjena boje agara iz plave u žutu ukazuje na oksidaciju EtOH do octene kiseline i dodatnu oksidaciju octene kiseline do CO₂ i H₂O.

Tablica 3. Osnovne, selektivne, diferencijalne i obogaćene podloge uporabljene u radu

Hranjiva podloga	Primjena
PDB	osnovna
NB	osnovna
HS	osnovna
PDA	selektivna
GYPM	selektivna
GYC	selektivna
GACE	selektivna
GEM	selektivna
YPM	obogaćena
WL	obogaćena
Carr	diferencijalna

3.2. Metode

Cjelokupan tijek istraživanja koji je obuhvatio fermentaciju zelenog čaja s jasminom SCOBY kulturom, te izolaciju i identifikaciju mikrobiote *kombuche* prikazan je na slici 6.



Slika 6. Shematski dijagram tijeka istraživanja

3.2.1. Priprava kulture *kombuche*

Kultura *kombuche* je pripravljena s „majčinskom kulturom“ u zelenom čaju uz dodatak 80 g/L saharoze. Infuzija zelenog čaja pripravljena dodatkom 50 g čaja u 1 L kipuće vode u koju je dodano 80 g/L saharoze (bijeli konzumni šećer). Nakon ekstrakcije koja je trajala 8 minuta (prema napatku proizvođača), čaj je ohlađen na sobnu temperaturu. Infuzija čaja (500 mL) je prelivena u sterilnu staklenu posudu (1000 mL), te pokrivena sterilnom kompresom. Uzgoj je trajao 8 dana u aseptičnim uvjetima pri 28 °C u termostatu (slika 7).



Slika 7. Prikaz *kombuche* nakon 8 dana fermentacije pri 28 °C (osobna fotografija, Nensi Zelić)

3.2.2. Priprava kompleksne podloge (fermentirani čaj)

Infuzija zelenog čaja s okusom jasmina pripravljena je dodatkom 50 g čaja u 1 L kipuće vode u koju je dodano 80 g/L saharoze (bijeli konzumni šećer), kao i „majčinska kultura“. Nakon ekstrakcije, infuzija ohlađenog čaja na sobnu temperaturu (500 mL) je prelivena u 2 sterilne staklene posude (1000 mL), nakon čega su uzorci inokulirani sa svježe uzgojenom *kombucha* kulturom (3 % tež/vol) i prekriveni sterilnim kompresama. Nacijepljeni uzorci su inkubirani pri 25 °C (sobna temperatura) tijekom 14 dana, nakon čega je prevrela tekućina centrifugirana pri 2500 okr/min tijekom 10 minuta, a supernatant i sintetizirana BNC su uporabljeni za daljnja određivanja. Kontrolni uzorak je bila neprevrela infuzija zelenog čaja s okusom jasmina.

3.2.3. Priprava kemijski definiranih podloga

Priprava kemijski definiranih hranjivih podloga za uzgoj i selekciju istraživanih mikroorganizama objašnjena je u poglavlju 3.1.4.

3.2.4. Primarno određivanje mikrobiote *kombuche*

a) tekuća faza: 1 mL *kombucha* čaja je nacijepljen u aseptičnim uvjetima u 100 mL krumpirovog bujona (1 tikvica), hranjivog bujona (1 tikvica) i puferirane HS podloge (1

tikvica) u Erlenmeyer tikvicama od 250 mL. Uzorci su inkubirani statično u termostatu pri 30 °C tijekom 14 dana.

b) pelikula bakterijske nanoceluloze: 1 x 1 cm pelikule bakterijske nanoceluloze sintetizirane tijekom 8 dana pripreve kulture *kombuche* je aseptično preneseno u 100 mL krumpirovog bujona (1 tikvica), hranjivog bujona (1 tikvica) i puferirane HS podloge u Erlenmeyer tikvici od 250 mL. Uzorci su inkubirani na tresilici 24 h pri 30 °C i 250 o/min.

3.2.5. Izolacija bakterija i kvasaca iz uzoraka *kombuche*

Za naciepljivanje na čvrste hranjive podloge su pripremljena razrjeđenja uzoraka do 10^{-5} . Uzorci su u prvom koraku naciepljeni na PDA, GYPM i GYC hranjive podloge i inkubirani 48 h u termostatu pri 28 °C za uzgoj kvasaca (PDA) i 8 dana pri 37 °C za uzgoj bakterija (GYPM i GYC).

Odabrane kolonije bakterija su dodatno naciepljene na WL podlogu uz dodatak 4 g/L cikloheksimida (aktidiona) za inhibiciju rasta kvasaca i plijesni te na PDA podlogu uz dodatak 1 mg/L ampicilina za inhibiciju rasta bakterija.

3.2.6. Diferencijacija bakterija

Za razlikovanje bakterija iz rodova *Acetobacter* i *Gluconacetobacter* uporabljena je Carr podloga kojoj je dodan bromkrezol plavo. Hranjiva podloga je inkubirana 4 dana pri 30 °C do pojave kolonija, odnosno promjene boje hranjive podloge iz plave u žutu boju.

3.2.7. Identifikacija proizvodnih vrsta mikrobiote *kombuche*

Morfologija stanica kvasaca i bakterija je proučavana bojanjem po Gramu (bakterije i kvasci) i safraninom (kvasci), te mikroskopiranjem svjetlosnim mikroskopom (Olympus CH20).

3.2.8. MALDI-TOF tehnika identifikacije aerobno mezofilnih bakterija

MALDI-TOF tehnika; matricom potpomognuta ionizacija desorpcijom laserskog zračenja (MALDI) s vremenom proleta (TOF), razvijena je 1987. godine i omogućila je analizu termički nestabilnih biomolekula velikih masa. Postupak identifikacije MALDI-TOF tehnikom počinje nanošenjem kolonije mikroorganizma kojeg želimo identificirati na MALDI pločicu, slijedi dodavanje matrice i unos u instrument gdje snimanje rezultira karakterističnim spektrima masa proteina za svaki mikroorganizam (eng. *fingerprint*). Identifikacija i klasifikacija mikroorganizama provodi se usporedbom spektra uzorka s referentnim spektrom

iz biblioteke mikroorganizama i obradom pomoću MALDI Biotyper računalnog programa. Računalni program uspoređuje pikove (eng. *peak*) neidentificiranog uzorka s referentnim spektrom. Ovisno o podudarnosti dvaju spektara, rezultati su prikazani ocjenama 2.300 do 3.000 što ukazuje na pouzdanu i vrlo vjerojatnu identifikaciju na razini vrste, 2.000 do 2.299 što ukazuje na sigurnu identifikaciju roda s mogućom identifikacijom vrste, 1.700 do 1.999 ukazuje na vjerojatnu identifikaciju na razini roda i rezultat manji od 1.700 ukazuje na nepouzdanu identifikaciju (Nacefab i sur., 2017). Instrument na kraju analize rezultate na ekranu računala prikazuje u 3 boje: zelena boja označava savršeno preklapanje između spektra mase uzorka i referentnog spektra. Žuta boja označava djelomično preklapanje, a kada postoje razlike između spektra uzorka i referentnog spektra to je označeno crvenom bojom.

3.2.9. Karakterizacija proizvodnih vrsta mikrobiote *kombuche*

Karakterizacija izoliranih vrsta bakterija provedena je putem fizioloških i biokemijskih testova: katalaznog testa, oksidaznog testa, tvorbe indola, oksidacije etanola, testa tolerancije na etanol, te API 20E i 20C AUX testova.

3.2.9.1. Katalazni test

Pomoću sterilne i ohlađene mikrobiološke ušice je prenesen uzorak bakterijske kulture s čvrste hranjive podloge na predmetnicu i dodana je jedna kap 3%-tnog H₂O₂. Ako bakterija posjeduje katalaznu aktivnost, dolazi do burne reakcije koja se očituje pojavom mjehurića plina, odnosno pojavom pjene. Ako bakterija ne sintetizira katalazu, pjenjenje će izostati.

3.2.9.2. Oksidazni test

Oksidazni test je proveden prenošenjem uzorka bakterijske kulture s čvrste hranjive podloge pomoću sterilne i ohlađene mikrobiološke ušice na trakicu za testiranje oksidazne aktivnosti (Bactident Oxidase, Millipore, SAD). Ako bakterija posjeduje oksidaznu aktivnost, dolazi do promjene boje nanesenog uzorka tijekom 30 sekundi i test se smatra pozitivnim. Ako bakterija nema oksidaznu aktivnost, promjena boje će izostati.

3.2.9.3. Tvorba indola

U epruvetu s triptofan bujonom nacijepljena je bakterijska kultura i inkubirana pri 37 °C tijekom 24 ili 48 sati. Nakon inkubacije je u podlogu dodan Kovaczev reagens, koji uz amilni alkohol može ekstrahirati indol iz vodenog medija. Indol će isplivati na površinu u obliku sloja koje će se u reakciji s aldehidnom skupinom *p*-dimetilaminobenzaldehida obojati crveno

(pozitivna reakcija). Ukoliko se sloj ne oboji, test je negativan.

3.2.9.4. Oksidacija etanola

Oksidacija etanola do octene kiseline i oksidacija acetata do CO₂ i H₂O bakterijama octenog vrenja je određivano naciepljivanjem na Carr podlogu, uz bromkrezol plavo kao indikator. Promjena boje podloge (plave) do žute boje inkubacijom pri 28 °C tijekom 24 ili 48 h, ukazala je na oksidaciju alkohola bakterijama octenog vrenja. Produženom inkubacijom dodatnih 24 h, ponovna promjena boje u početnu, iz žute u plavu, ukazala je na oksidaciju acetata do CO₂ i H₂O.

3.2.9.5. Test tolerancije na etanol

Test tolerancije na etanol proveden je uzgojem SCOBY kulture *kombuche* u YPM hranjivoj podlozi s različitim koncentracijama EtOH (5; 10; 15 i 20 % (vol/vol) kao jedinog izvora ugljika. Uzgoj je trajao 14 dana pri 28 °C inkubacijom u termostatu.

3.2.9.6. API testovi

API testovi (eng. *Analytical Profile Index*) su standardizirani komercijalni sustavi koji se primjenjuju za identifikaciju velikog broja G⁺, G⁻ bakterija i kvasaca, a njihovom uporabom se može istodobno odrediti i nekoliko desetaka njihovih fizioloških osobina. API testovi se sastoje od plastičnih traka koje sadrže niz malih epruveta (testova) ispunjenih određenim dehidriranim hranjivim podlogama. Uz plastične trake s epruvetama, dolazi i pripadajući tekući medij od 2 ili 5 mL, u kojem se pripremaju suspenzije bakterija ili kvasaca. Pripremljena suspenzija se zatim ukapa u niz epruveta na traci i na taj način se nacijepi hranjiva podloga. Trake se pokriju plastičnim poklopcem i inkubiraju pri 28 °C (kvasci) tijekom 48-72 h ili 37 °C (bakterije) tijekom 18-24 h u vlažnoj komori. Rezultati se očitaju nakon inkubacije na osnovi boje reakcije, jer neki testovi pokazuju promjenu boje zbog promjene pH vrijednosti podloge, a neki od testova nakon dodatka reagensa za dokazivanje metaboličkih proizvoda. Svi očitani rezultati se prevode u numerički profil (kod), a identifikacija mikroorganizama na razini roda ili vrste se provodi očitavanjem iz baze podataka (kodna knjiga) putem APIWEBTM aplikacije.

3.2.10. Određivanje pH vrijednosti *kombuche*

Uzorcima je pH vrijednost mjerena svaki dan tijekom 14 dana fermentacije. Mjerenja su provedena nakon pažljivog izuzimanja 5 mL uzorka pipetiranjem uz rub posuda, kako ne bi došlo do oštećenja nanocelulozne pelikule koja pluta na površini uzorka. Mjerenja su provedena pomoću pH metra Hanna Industrial model HI 98103.

3.2.11. Određivanje ukupnih kiselina

U Erlenmeyer tikvicu od 200 mL stavljeno je 1 mL uzorka fermentiranog čaja, 20 mL vode i dodano nekoliko kapi fenolftaleina. Ovako pripremljeni uzorak je titriran otopinom 0,1 M NaOH do pH 7,0.

$$\text{Ukupne kiseline} = 100 \cdot V(\text{NaOH}) \cdot f(\text{NaOH}) \cdot V(\text{podloge}) \quad [1]$$

gdje je:

$V(\text{NaOH})$ = utrošeni volumen otopine 0,1 M NaOH (mL)

$f(\text{NaOH})$ = faktor 0,1 M NaOH (1,000)

V_{uzorka} = volumen uzorka (1 mL)

3.2.12. Određivanje koncentracije octene kiseline

U Erlenmeyer tikvicu od 200 mL stavljeno je 1 mL uzorka fermentiranog čaja, 20 mL vode i dodano nekoliko kapi fenolftaleina. Ovako pripremljeni uzorak je titriran otopinom 0,1 M NaOH do prve pojave ljubičaste boje. Koncentracija octene kiseline (g/L) izračunata je prema izrazu:

$$m(\text{CH}_3\text{COOH}) = V(\text{NaOH}) \cdot f(\text{NaOH}) \cdot V(\text{podloge}) \cdot 6 \quad [2]$$

gdje je:

$V(\text{NaOH})$ = utrošeni volumen 0,1 M NaOH (mL)

$f(\text{NaOH})$ = faktor 0,1 M NaOH (1,000)

V_{uzorka} = volumen uzorka (1 mL)

3.2.13. Određivanje koncentracije glukonske kiseline

U Erlenmeyer tikvicu od 200 mL stavljeno je 25 mL uzorka i dodano nekoliko kapi fenolftaleina. Ovako pripremljeni uzorak je titriran otopinom 0,1 M NaOH do prve pojave ljubičaste boje. Masena koncentracija glukonske kiseline (g/L) izračunata je prema jednadžbi:

$$\gamma(\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_7) = (V(\text{NaOH}) \cdot M(\text{NaOH}) \cdot 1,97) / V_{\text{uzorka}} \quad [3]$$

gdje je:

$V(\text{NaOH})$ = utrošeni volumen 0,1 M NaOH (mL)

$M(\text{NaOH})$ = molaritet NaOH (0,1 M)

V_{uzorka} = volumen uzorka (mL)

3.2.14. Određivanje etanola kemijskom metodom

Udjel etanola u fermentiranim uzorcima čaja tijekom previranja šećera do etanola i biooksidacije etanola do octene kiseline je određivan kemijskom metodom koja se zasniva na

oksidaciji alkohola s kalijevim bikromatom ($K_2Cr_2O_7$) u kiselom okolišu.

Postupak:

U odmjernu tikvicu od 50 mL je stavljeno 5 mL uzorka čaja koji je razrijeđen s demineraliziranom vodom do 50 mL (odnos čaja i vode je 1:10). Uzorak je prebačen u tikvicu kruškastog oblika od 50 mL i neutraliziran s 0.1 M NaOH.

U Erlenmeyer tikvicu od 100 ml, u koju će se hvatati destilat, stavljeno je 10 mL otopine kalijevog bikromata i 5 ml koncentrirane H_2SO_4 . Destilat se preko hladila i lule uvodi u otopinu kalijevog bikromata u Erlenmeyer tikvicu od 100 mL, koja mora biti u rashlađenoj vodi. Destilacija mora biti polagana i postupna i trajala je dok se sadržaj u tikvici za destilaciju nije smanjio na približno 3 mL (za to vrijeme je alkohol predestilirao). Po završetku destilacije lula je isprana s nekoliko mlazova destilirane vode u istu Erlenmeyer tikvicu u koju je uzorak predestilirao. Sadržaj tikvice je promućkan, začepljen gumenim čepom i ostavljen stajati 5 minuta radi potpune oksidacije alkohola. Tijekom oksidacije alkohola utrošen je jedan dio bikromata, dok je drugi dio ostao u suvišku. Zatim je sadržaj kvantitativno prebačen u Erlenmeyer tikvicu od 500 mL uz ispiranje, dodano mu je oko 200 mL destilirane vode radi razrjeđenja i 10 mL 20%-tne otopine KI (radi određivanja preostale količine kalijevog bikromata) i ostavljeno začepljeno 5 minuta. Nakon 5 minuta, uzorci su titrirani s 0,1 M otopinom natrijevog tiosulfata ($Na_2S_2O_3$), pri čemu dolazi do oksido-redukcije između joda i natrijevog tiosulfata, u kojoj se jod reducira, a tiosulfat oksidira. Kad je boja postala svjetlija, dodano je 5 mL 1%-tne otopine škroba i titrirano do pojave tirkizno-zelene boje.

Koncentracija (vol %) alkohola je izračunata prema jednadžbi:

$$\text{alkohol (vol \%)} = \left(10 - \frac{a}{6,9}\right) \cdot 2 \quad [4]$$

a = utrošak 0.1 M otopine $Na_2S_2O_3$ (mL)

3.2.15. Pročišćavanje i kvantitativno određivanje prinosa bakterijske nanoceluloze

Nakon 14 dana fermentacije, plutajući gelovi nanocelulozne biomase, koji su formirani na površini hranjivih podloga, pažljivo su izvađeni iz staklenih posuda, oprani demineraliziranom vodom i ostavljeni preko noći u 1 M NaOH na sobnoj temperaturi kako bi se uklonile stanice mikroorganizama i sastojci podloga. Nakon toga su gelovi bakterijske nanoceluloze ispirani demineraliziranom vodom sve dok pH vode za ispiranje nije dostigao početnu vrijednost vode (Toda i sur., 1991). Oprani gelovi su uronjeni u 96 %-tni EtOH tijekom 2 sata, izvagani da bi se izmjerila masa vlažne celulozne biomase te nakon toga stavljani na sušenje u suhi sterilizator pri 50 °C/4 sata. Izmjerena je masa celulozne biomase (g) prema sljedećoj formuli:

$$m_{cb} \text{ (g)} = m_{bt} - m_i \quad [5]$$

gdje je:

m_{cb} = masa (vlažne/suhe) celulozne biomase (g)

m_{bt} = masa (vlažne/suhe) biomase na kraju fermentacije (g)

m_i = masa inokuluma (g)

V = volumen hranjive podloge (L)

Prinos celulozne biomase (Y_{cb}) izračunat je prema formuli:

$$Y_{cb} \text{ (g/L)} = \frac{(\gamma \text{ vlažne biomase nakon fermentacije} - \gamma \text{ vlažnog inokuluma})}{\gamma \text{ izvora C na početku fermentacije} \cdot V \text{ podloge}} \quad [6]$$

3.2.16. Statističke analize

Podaci su statistički analizirani pomoću ANOVA testova pomoću softvera Origin 2022. Razlika se smatra značajno različitom pri $p \leq 0,05$.

4. REZULTATI I RASPRAVA

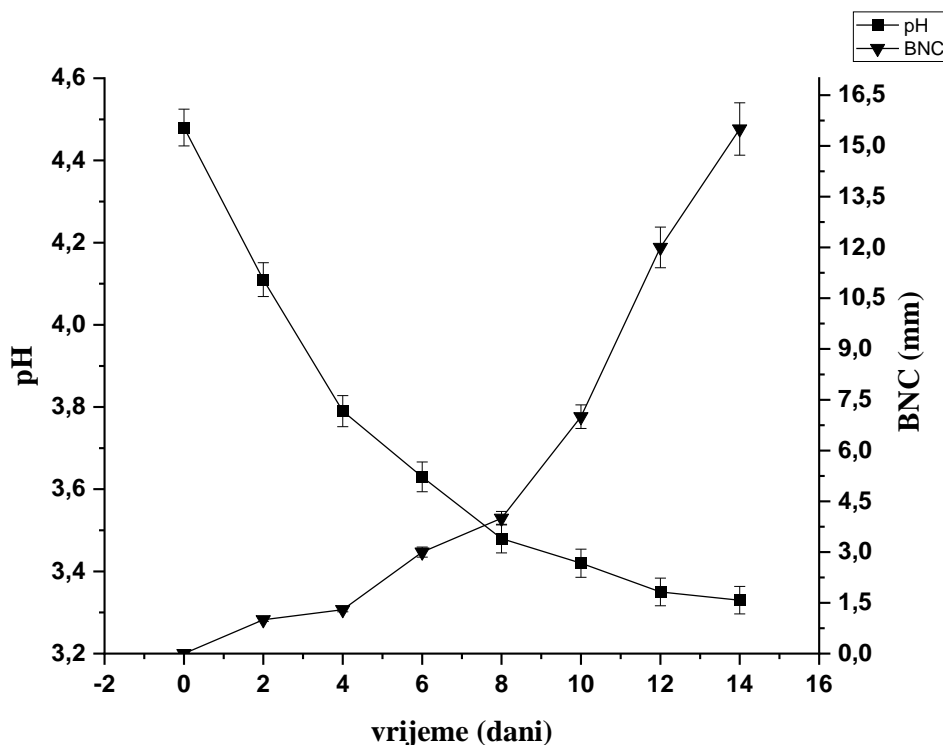
Kombucha je jedno od najpopularnijih fermentiranih tradicionalnih napitaka koji se konzumira zbog unaprjeđenja zdravlja. Potvrđeno je da se konzumacijom *kombuche* liječe ili umanjuju simptomi bolesti poput artritisa, loše probave, različitih tipova karcinoma, hepatotoksičnost i dr. (Bishop i sur., 2022). Fermentaciju *kombuche* provode simbiotski povezane vrste osmofilnih kvasaca i bakterija octene kiseline, koje je, kao starter kulture, proglasio sigurnima US Food and Drug Administration (CDC, 1996). Tijekom procesa fermentacije zaslađene infuzije čaja, disaharidi podliježu hidrolizi do monosaharida pod utjecajem enzima i kiselina. Uloga kvasaca tijekom fermentacije je da previru šećere do alkohola i CO₂. Za razliku od kvasaca, bakterije octene kiseline nastanjuju celulozni dio *kombucha* starter kulture. One imaju vitalnu ulogu u procesu fermentacije zbog toga što su odgovorne za stvaranje novog sloja celulozne pelikule i metaboliziraju alkohol koji je kvasac proizveo, do organskih kiselina (Jayabalan i sur., 2014).

4.1. BIOKEMIJSKE PROMJENE I SINTEZA BNC

Jedan od najvažnijih parametara kojima se prati tijek i određuje završetak procesa fermentacije *kombuche* je pH vrijednost infuzije čaja. Nadalje, koncentracija vodikovih iona je čimbenik koji može aktivirati ili inhibirati rast, razmnožavanje i metaboličku aktivnost mikrobiote *kombuche*. Bakterije octene kiseline podnose aktivnu kiselost hranjive podloge u pH području od 3,6 do 6,3, a vrijednosti koje su niže od 5,4 smanjuju brzinu njihovog razmnožavanja. Optimalna pH vrijednost za kvasce ovisi o vrsti i soju, no prosječno se kreće u području od 4,5 do 6,5 (Antolak i sur., 2012). Početni pH nakon inokulacije je bio 4,48. Tijekom analiziranog procesa fermentacije, pH u *kombucha* napitku smanjio se za 1,15 jedinica, što nije utjecalo na smanjenje opće senzoričke kakvoće napitka (slika 8), jer je zadržalo blago kiselo-slatki okus. Izmjerene pH vrijednosti bile su usporedive s vrijednostima koje su zabilježili Kallel i sur. (2012). U njihovom istraživanju na zaslađenom čaju, uočeno je smanjenje pH vrijednosti čaja s 5,5 na 3,8 odmah nakon inokulacije *kombuche* u čaj.

Biotransformacijom zaslađenog zelenog čaja tijekom fermentacije s *kombuchom* nastala je celulozna pelikula (opna), odnosno BNC, koja se u tankom sloju oblikovala na površini tekućine. Debljina sintetizirane pelikule na kraju fermentacije bila je 15,6 mm (slika 8). BNC na površini održava CO₂ koji nastaje kao posljedica fermentativne aktivnosti kvasaca (Sievers i sur., 1995). Na površini te celulozne pelikule nalazi se veliki broj bakterija octene kiseline,

striktnih aeroba, kojima je za rast i razmnožavanje nužan atmosferski kisik, dok su s donje strane nakupine kvasaca, koji pripadaju fakultativno anaerobnim mikroorganizmima (Malbaša i sur., 2008).

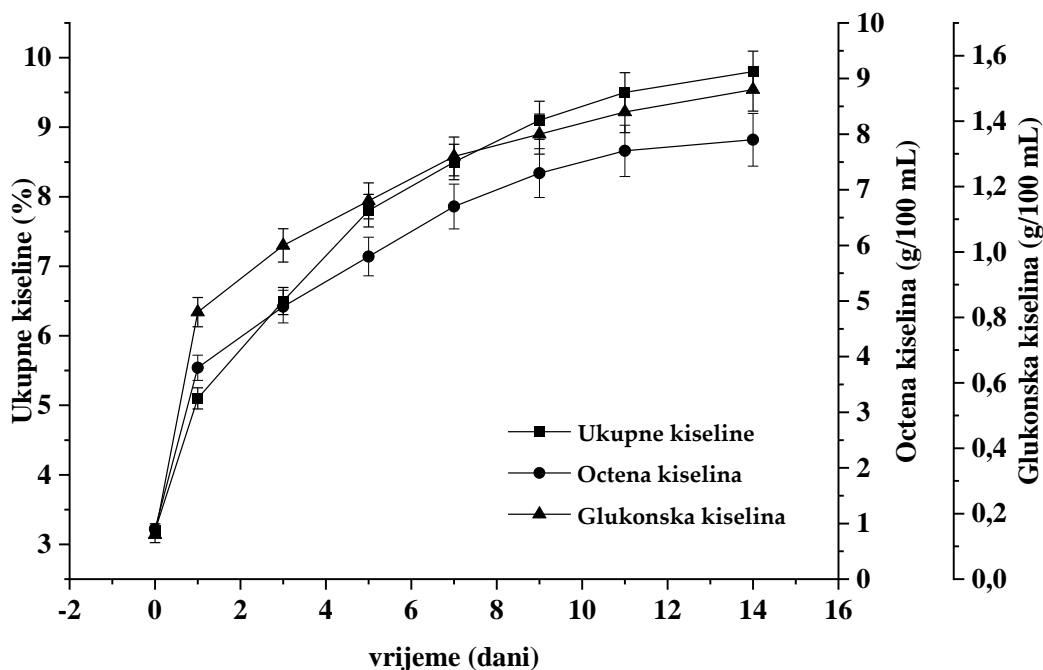


Slika 8. Kinetika promjene pH vrijednosti i sinteze BNC u *kombucha* zelenom čaju tijekom 14 dana fermentacije

Iako nije povezana samo s pH vrijednošću, koncentracija ukupnih kiselina (kao funkcija vremena fermentacije) je važna značajka metabolita (slika 9). Kako je fermentacija tekla, koncentracija ukupnih kiselina povećavala se blago eksponencijalno, od 2. dana, kad je iznosila 5,1 g/L do 8, g/L na kraju fermentacije. Glavna organska kiselina u fermentiranom zelenom čaju bila je octena kiselina, čija se koncentracija u svim uzorcima, već od početka fermentacije povećavala (slika 9). Početna vrijednosti uzoraka (0,91 g/L) nakon inokulacije matičnim *kombucha* fermentiranim zelenim čajem koji je sadržavao određenu koncentraciju octene kiseline, tako da je već u 2. danu fermentacije izmjerena vrijednosti octene kiseline bila 3,82 g/L. Nakon toga su vrijednosti počele, prvo eksponencijalno (do 10. dana), pa linearno rasti sve do kraja fermentacije, kada je izmjereno 7,91 g/L. Dobiveni rezultati su u suglasju s rezultatima koje su objavili Kallel i sur. (2012), a koji su izmjerili 8,0 g L⁻¹ octene kiseline nakon 14 dana fermentacije infuzije zelenog čaja. Glukonska kiselina je uz octenu kiselinu, u

kombucha napitcima, druga glavna organska kiselina koja nastaje u većim koncentracijama kao posljedica metabolizma združene kulture mikroorganizama. Kao što je vidljivo na slici 9, koncentracija glukonske kiseline tijekom fermentacije zelenog čaja linearno se povećavala do kraja fermentacije, kada je izmjereno 1,6 g/L. Koncentracija glukonske kiseline je izravno povezana sa sintezom BNC jer se njenim nastajanjem snižava pH vrijednost hranjive podloge, a to utječe na produktivnost sinteze BNC. Kako su masa ukupno sintetizirane BNC i nastajanje glukonske kiseline jednake količini utrošene glukoze, povećanje koncentracije glukonske kiseline odgovorno je za smanjenu produktivnost sinteze BNC (Chen i Liu, 2000).

Uz sposobnost sinteze relativno visokih koncentracija octene kiseline, bakterije octene kiseline su pokazale i toleranciju na kiselost, koja je rijetka među aerobnim homotrofima i heterotrofima. Ovo im svojstvo omogućava rast na hranjivoj podlozi koja već na početku uzgoja ima pH vrijednost nižu od 4,5 (Malbaša i sur., 2008), a u ovom radu je početna pH vrijednost uzoraka bila 4,48 (slika 8).

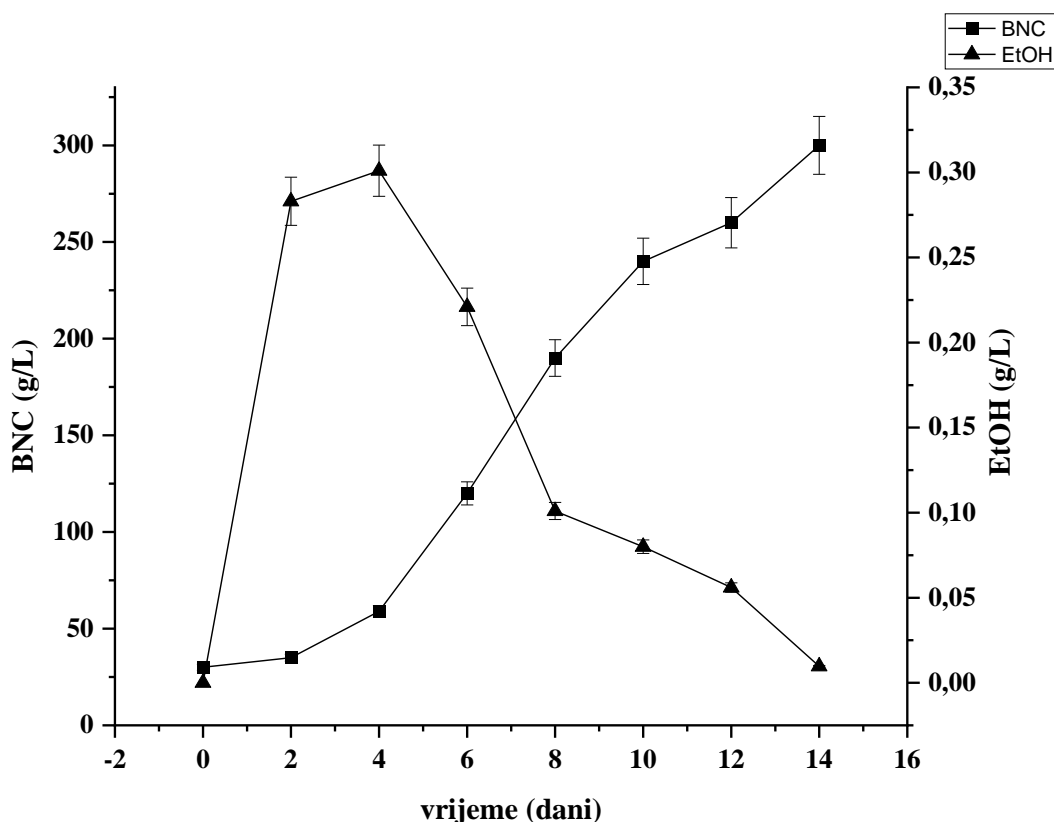


Slika 9. Kinetika nastajanja octene i glukonske kiseline u *kombucha* zelenom čaju tijekom 14 dana fermentacije

Etanol se u *kombucha* napitcima, kao nepoželjna supstancija u koncentraciji većoj od 0,5

(vol/vol), može pojaviti u nekoliko slučajeva: kada su prisutni aktivni kvasci i šećeri; kod nepotpune fermentacije zaostalih šećera i etanola; kada se arome koje sadrže šećere dodaju čaju nakon faze fermentacije; ako se u gotovi proizvod ne dodaju konzervansi koji bi spriječili pojavu naknadne kvaščeve aktivnosti; te kad se ne provodi pasterizacija konačnog fermentiranog proizvoda i time se omogućuje preživljavanje kvasca (Murphy i sur., 2018).

Kombucha čaj je nefiltriran i sadrži žive mikrobne kulture koja mogu ometati refrakciju svjetla, te su moguće pogreške pri mjerenju koncentracije alkohola metodama koje se oslanjaju na korištenje refrakcijskih metoda. Iako je to normalno i očekivano u ovom proizvodu, SCOBY čestice prisutne u napitku nisu umanjile pouzdanost metode primijenjene u ovom radu. Kao što se moglo i očekivati, koncentracija EtOH je naglo rasla do 2. dana fermentacije (0,28 g/L), do 4. dana je blago povećana njena vrijednost (0,30 g/L), da bi nakon toga naglo linearno padala do kraja fermentacije i na kraju iznosila manje od 0,01 g/L (slika 10). Takav proizvod apsolutno može zadovoljiti kriterij potpuno bezalkoholnog probiotičkog napitka.



Slika 10. Promjena koncentracije etanola u *kombucha* zelenom čaju tijekom 14 dana fermentacije

Biosinteza BNC je precizan proces reguliran mnogobrojnim enzimima i regulatornim proteinima (Tal i sur., 1998). Vešana je uz kataboličke reakcije i ne ometa anaboličke reakcije u stanici, uključujući sintezu proteina. Sinteza BNC u statičnim uvjetima, kao što je provedeno u ovom radu, ovisi o opskrbi atmosferskim kisikom na površini, a prinos o koncentraciji izvora ugljika. Produženim vremenom uzgoja, povećava se prinos BNC, a sinteza doseže svoju krajnju granicu kada pelikula pada na dno hranjive podloge, pri čemu bakterije octene kiseline postaju inaktivne zbog nedovoljne opskrbe kisikom (Sheykhnazari i sur., 2011). Praćenjem kinetike sinteze BNC tijekom 14 dana uzgoja, vidljivo je linearno povećanje debljine sintetiziranr BNC. Prema dobivenim rezultatima, dodatkom 80 g/L saharoze, prinos vlažne BNC bio je 299 g/L (slika 10).

4.1. MIKROBIOTA *KOMBU* *CHE*

Uz vrlo malo iznimaka (npr. pivo), većina fermentirane hrane i pića rezultat je djelovanja združene kulture kvasaca, bakterija i filamentoznih gljiva. Posljedično, u taj su postupak uključene složene mikrobne interakcije (Fleet, 2006). Krajnji cilj je razumijevanje vrsta važnih za kakvoću proizvoda i učinkovitost procesa te razvijanje operativnih parametara koji u najvećoj mjeri utječu na njihov pozitivan doprinos.

4.1.1. Izolacija i purifikacija mikroorganizama

Izolacija mikroorganizama iz SCOBY kulture provedena je naciepljivanjem na različite hranjive podloge. U prvom koraku je kultura (razrjeđenje 10^{-4}) naciepljena na PDA podlogu za uzgoj kvasaca i plijesni, te GYPM podlogu za uzgoj bakterija. Petrijeve ploče su inkubirane 48 h pri 28 °C za uzgoj kvasaca i 37 °C za uzgoj bakterija. Tri različite kolonije kvasaca (K1-K3) su porasle na PDA podlozi i 4 kolonije bakterija (B1-B4) na GYPM podlozi. Morfološka identifikacija ovih kolonija je provedena uočavanjem morfoloških karakteristika, a odnosile su se na oblik, teksturu, boju, površinu, ispupčenost i rubove kolonija (tablica 4).

Tablica 4. Morfološke karakteristike SCOBY izoliranih kolonija

Kolonije	Oblik	Tekstura	Boja	Površina	Ispupčenost	Rub
K1	okrugla	naborana	crvena	sjajna	ispupčena	valovit
K2	okrugla	glatka	krem	izrazito sjajna	glatka	gladak
K3	okrugla	glatka	bijela	sjajna	ispupčena	gladak

B1	okrugla	glatka	bijela	sjajna	glatka	gladak
B2	okrugla	glatka	krem	izrazito sjajna	glatka	gladak
B3	okrugla	glatka	žuta	mat	glatka	gladak
B4	okrugla	glatka	bijela	sjajna	glatka	gladak

Daljnja izolacija pojedinačnih kultura provedena je naciepljivanjem na različite selektivne hranjive podloge, ovisno o tome koju se kulturu željelo izolirati. Pojedine kulture kvasaca su i dalje naciepljivane na PDA hranjivu podlogu, dok su se za izolaciju pojedinih rodova bakterija uporabljane selektivne hranjive podloge (tablica 2).

4.1.2. Morfološka i mikroskopska karakterizacija kvasaca

Sastav kvasaca prisutnih u SCOBY kulturi je vrlo varijabilan, a neke od prevladavajućih vrsta su: *Schizosaccharomyces pombe*, *Brettanomyces bruxellensis*, *Saccharomyces cerevisiae* i *Zygosaccharomyces rouxii* (Villarreal-Sota et al., 2018). U novije vrijeme, spektar vrsta kvasca u *kombucha* kulturi se povećao, te su potvrđeni rodovi *Candida*, *Kloeckera/Hanseniaspora*, *Torulaspora*, *Pichia*, *Brettanomyces/Dekkera*, *Saccharomycoides* i *Kluyveromyces* (Villarreal-Sota et al., 2018). U usporedbi s ranijim studijama ovaj popis identificira više rodova kvasaca, pokazujući varijabilnu prirodu SCOBY kultura.

U ovom radu su iz SCOBY kulture *kombuche* izolirana tri roda kvasaca: *Rhodotorula*, *Schizosaccharomyces* i *Candida* (slike 11 - 13). Morfološki su kolonije bile različite, te su bile lako uočljive, posebice kvasci roda *Rhodotorula*, čije kolonije su specifične losos-crvene boje, blago valovite na rubovima, ovisno o starosti kulture (slika 11A).

A



B



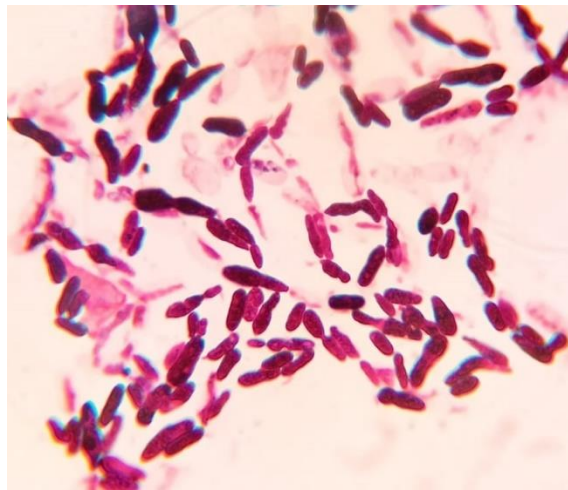
Slika 11. Kolonije kvasca *Rhodotorula* sp. (K1) na GYPM podlozi (A); mikroskopski prikaz, bojanje po Gramu, povećanje 400 x (B)

Kolonije kvasca iz roda *Schizosaccharomyces* bile su krem boje, sjajne i glatke površine (slika 12A), a mikroskopiranjem i pregledom preparata na svjetlosnom mikroskopu, uočeno je specifično bipolarno dijeljenje (slika 12B).

A



B



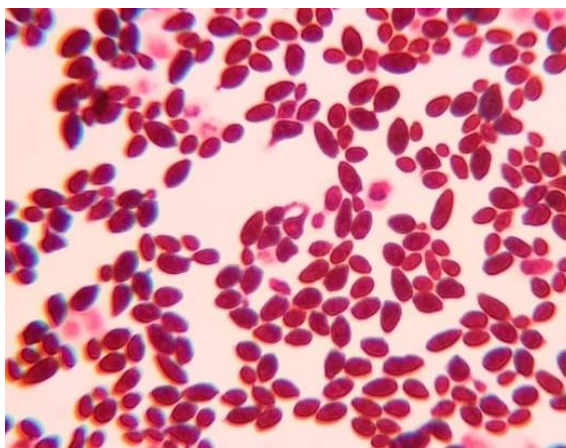
Slika 12. Kolonije kvasca *Schizosaccharomyces* sp. (K2) na GYPM podlozi (A); mikroskopski prikaz, bojanje po Gramu, povećanje 400 x (B)

Karakteristične kolonije kvasaca iz roda *Candida* su bile okrugle, ispupčene, bijele i sjajne (slika 13A). Stanice su bile ovalnog oblika, te su primijećene stanice koje se dijele pupanjem (slika 13B). Kvasci iz roda *Candida* ne pripadaju fermentativnim vrstama kvasaca, nego otpornima na kiseline, te su prisutni u kasnijim fazama fermentacije *kombuche* (Tran i sur., 2020).

A



B



Slika 13. Kolonije kvasca *Candida* sp. (K3) na GYPM podlozi (A); mikroskopski prikaz, bojanje po Gramu, povećanje 400 x (B)

4.1.3. Morfološka i mikroskopska karakterizacija bakterija

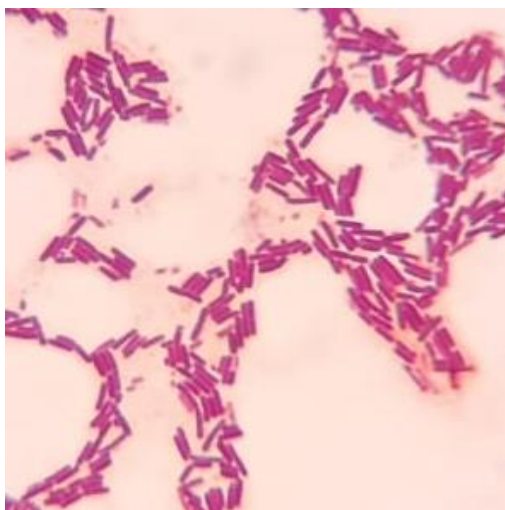
Za fermentaciju *kombucha* napitka, osim kvasaca, nužno je prisustvo bakterija octene kiseline. Bakterije octene kiseline su skupina gram-negativnih ili gram-varijabilnih bakterija, obligatno aerobnih, elipsoidnih do štapićastih, nesporogenih i peritrihno ili polarno flageliranih mikroorganizama koji pripadaju obitelji *Acetobacteraceae*. Stanice se pojavljuju pojedinačno, u parovima ili lancima, a veličine im variraju između 0,4 i 1 μm širine i 0,8 i 4,5 μm duljine (Sengun i Karabiyikli, 2011).

Najvažniji rod bakterija za proizvodnju BNC tijekom fermentacije *kombucha* napitka je rod *Acetobacter*. U ovom su radu, nacjepljivanjem na GYPM podlogu, izolirane bakterije tog roda, te su morfološki i mikroskopski identificirane. Kolonije bakterija *Acetobacter* sp. bile su sitne, bijele, sjajne i glatke površine, s jasnim glatkim rubom (slika 14A). Na mikroskopskom prikazu su uočljivi dugi, tanki štapići, povezani u lance (slika 14B).

A



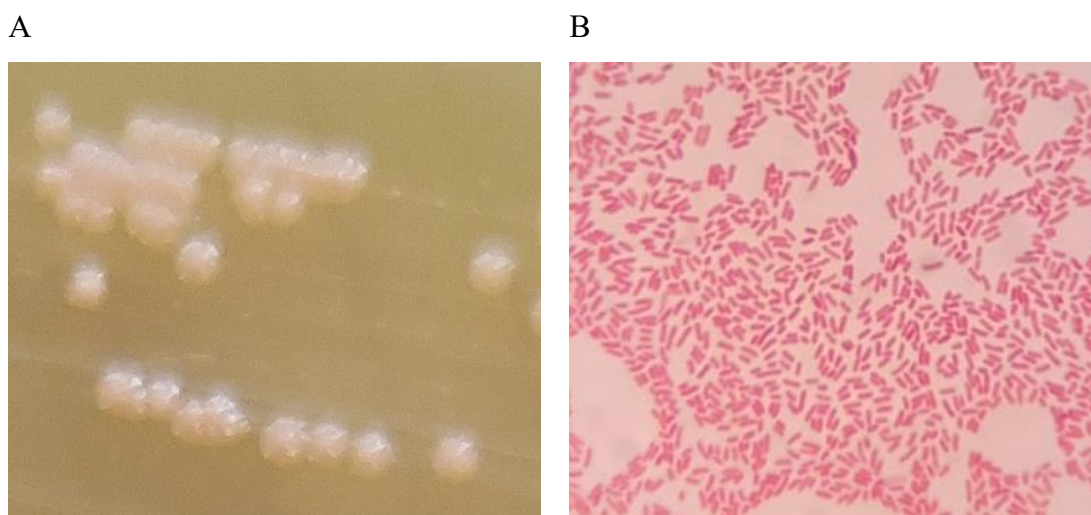
B



Slika 14. Kolonije bakterije *Acetobacter* sp. (B1) na GEM hranjivoj podlozi (A); mikroskopski prikaz, bojanje po Gramu, povećanje 1000 x (B)

Primarne bakterije u *kombucha* kulturi su aerobne i mogu koristiti alkohol kao supstrat za proizvodnju octene kiseline. Ova vrsta bakterija zahtijeva velike količine kisika za rast i obavljanje metaboličkih aktivnosti. Prethodna istraživanja su pokazala da je glavni rod bakterija prisutan u SCOBY kulturi *Gluconacetobacter*, koji je prisutan u >85% ukupne bakterijske populacije za većinu uzoraka (Jayabalan i sur., 2014).

Na slici 15A prikazane su kolonije bakterija iz roda *Gluconacetobacter* izolirane iz SCOBY *kombucha* kulture. Uzgoj je proveden na A/G selektivnoj hranjivoj čvrstoj podlozi, koja je specifična za izolaciju i uzgoj bakterija iz rodova *Acetobacter*, *Gluconobacter* i *Gluconacetobacter*. Morfološki su kolonije bile okrugle, ispupčene i izrazito sjajne, s glatkim rubovima. Mikroskopski prikaz ukazao je na kraće i deblje štapiće (slika 15B) od bakterija iz roda *Acetobacter*, što je sukladno literaturnim navodima (Gomes i sur., 2018).



Slika 15. Kolonije bakterije *Gluconacetobacter* sp. (B2) na NB hranjivoj podlozi (A); mikroskopski prikaz, bojanje po Gramu, povećanje 1000 x (B)

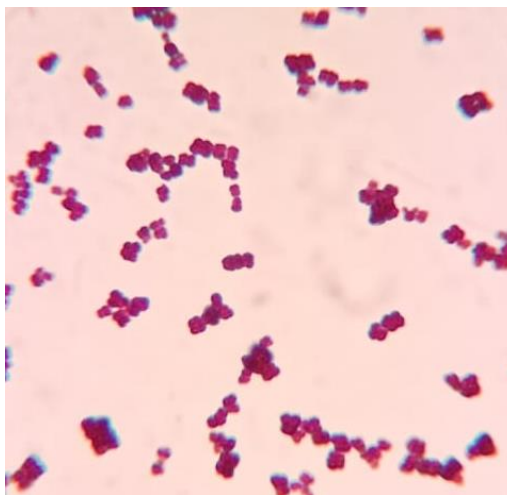
Potencijalna opasnost tijekom fermentacije kombuche je mogućnost kontaminacije patogenim mikroorganizmima iz okruženja, čemu je posebno izložena kultura uzgojena u kućnim uvjetima. Činjenica je da se *kombucha* ne priprema u aseptičnim uvjetima i da se SCOBY prenosi iz jednog domaćinstva u drugo, što objektivno povećava rizik kontaminacije radne kulture i napitka. Potencijalni kontaminanti *kombuche* su plijesni (od posebnog značaja su mikotoksigene plijesni rodova *Penicillium* i *Aspergillus*), patogene bakterije (npr. bakterije fekalnog porijekla) i nefermentativni kvasci (Crum i sur., 2016).

Precjepljivanjem nepoznate žute kolonije s GYPM hranjive podloge na GEM hranjivu podlogu, izrasle su kolonije jasno žute mat boje, okruglog, izdignutog, ali ne u potpunosti pravilnog oblika (slika 16A). Nakon bojanja po Gramu, uočeno je da kulturu bakterije čine gram-negativni koki (slika 16B). Pretraživanjem literature i kasnijom potvrdom testiranjem MALDI-TOF analizom, potvrđeno je da nepoznate bakterije pripadaju vrsti *Micrococcus luteus*.

A



B



Slika 16. Kolonije bakterije *Micrococcus luteus* (B3) na GEM hranjivoj podlozi (A); mikroskopski prikaz, bojanje po Gramu, povećanje 1000 x (B)

Mikrobna kontaminacija jedan je od vodećih uzroka kvarenja hrane, a do kontaminacije može doći u bilo kojem dijelu proizvodnog lanca. Bakterije iz roda *Serratia* su jedan od češće izoliranih uzročnika kvarenja, a pripadaju porodici *Enterobacteriaceae* (Cuamatzin-García i sur., 2022).

Kolonije izrasle na GEM hranjivoj podlozi su bile okrugle, sjajno-bijele i sitne, glatkog ruba (Slika 17A). Mikroskopski su tanki, gram-varijabilni štapići (slika 17B).

A



B



Slika 17. Kolonije bakterije *Serratia* sp. (B4) na WL hranjivoj podlozi (A); mikroskopski prikaz, bojanje po Gramu, povećanje 1000 x (B)

4.2. RAST I BIOKEMIJSKA IDENTIFIKACIJA MIKROBIOTE *KOMBUCHE*

Nakon morfoloških i mikroskopskih analiza, provedena su testiranja rasta i biokemijskih svojstava rodova mikroorganizama izoliranih iz SCOBY kulture *kombucha* zelenog čaja. Rezultati su prikazani u tablici 5.

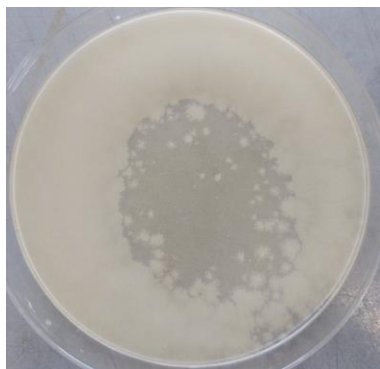
Tablica 5. Rast i biokemijska svojstva kvasaca i bakterija izoliranih iz *kombucha* zelenog čaja

Rast i biokemijska svojstva	K1	K2	K3	B1	B2	B3	B4
Gram priroda	+	+	+	-	-	+	-/+
Katalazni test	-	+	+	+	+	+	+
Oksidazni test	-	-	+	-	-	-	-
Indolni test	-	-	-	-	-	-	-
Oksidacija EtOH do HAc	-	-	-	+	+	-	-
Oksidacija EtOH do vode	-	-	-	-	+	-	-
Test tolerancije na alkohol (v/v):							
2 % EtOH	+	+	+	+	+	+	+
YPM: 5 % EtOH	+	+	+	+	+	-	-
YPM:10 %; 15 %; 20 % EtOH	+	+	+	-	-	-	-
Rast na hranjivim podlogama:							
HS	+	+	+	+	+	+	+
PDA	+	+	+	-	-	+	+
GYPM	+	+	+	-	-	-	+
GEM	-	-	-	+	+	+	+
GYC	-	-	-	+	+	-	-
GACE	-	-	-	+	+	-	-
WL	-	-	-	+	+	+	+
Carr	-	-	-	+	+	-	-
Sinteza BNC	-	-	-	+	+	+	-

(+) – pozitivna reakcija; (-) – negativna reakcija; (-/+) – varijabilna reakcija

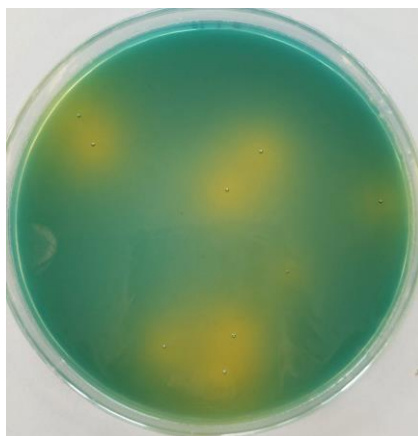
Učinkovitost bakterija octene kiseline izoliranih iz SCOBY kulture *kombuche* je ispitivana

prema njihovoj sposobnost da proizvode kiselinu na GYC mediju, gdje su kolonije bile okružene jasnom halo zonom koja ukazuje na hidrolizu CaCO_3 kao rezultat proizvodnje kiseline (slika 18).



Slika 18. Halo zone na GYC podlozi za uzgoj bakterija octene kiseline

Ovaj rezultat je potvrdio promjene boje Carr hranjive podloge koji sadrži bromokrezol plavo kao indikator. Rezultati su pokazali da je boja se promijenila iz plave u žutu nakon 24 sata i zatim ponovno u zelenu (unutar 48 h) što pokazuje da je izolirane bakterije pripadaju rodu *Acetobacter* (slika 19). Ovaj rezultat ovisio je o prethodnoj studiji koja je izvijestila da sposobnost iz roda *Acetobacter* za oksidaciju acetata u CO_2 i H_2O korišten je za njihovo razlikovanje od bakterija roda *Gluconobacter* koje nemaju tu sposobnost (Carr, 1968).



Slika 19. Oksidacija EtOH do octene kiseline (Carr podloga)

Jedan od preliminarnih i najbržih testova za identifikaciju G+, G- bakterija i kvasaca su API testovi. U ovom radu su primijenjeni API 20 E test za određivanje prisutnosti enterobakterija i API 20C AUX za određivanje kvasaca. Rezultati API testiranja prisutnosti bakterija i kvasaca prikazani su u tablici 6.

Tablica 6. Rezultati API testova

Test	Potvrđene vrste
API 20 E	<i>Serratia liquefaciens</i> , <i>S. marcescens</i> , <i>Proteus mirabilis</i> , <i>P. vulgaris</i>
API 20C AUX	<i>Candida tropicalis</i> , <i>C. zeylanoides</i> , <i>Cryptococcus laurentii</i>

4.2.1. Identifikacija MALDI-TOF tehnikom

Identifikacijom izolirane kulture MALDI-TOF tehnikom otkriveno je da su izolirane bakterije pripadale vrstama *Micrococcus luteus*, *Pantoea agglomerans* i *Acinetobacter lowffii*.

MALDI-TOF instrument uspoređuje rezultate kolonija s referentnim spektrom pohranjenim u biblioteci mikroorganizama. Ovisno o podudarnosti s referentnim spektrom instrument je pokazao sljedeće rezultate:

1. *Micrococcus luteus* 2.236 (+++)

2. *Acinetobacter lowffii* 1.95 (+)

3. *Pantoea agglomerans* 2.04 (+++)

Rezultat označeni jednim plusom (+) označavaju nepouzdanu identifikaciju. Do toga može doći uslijed uzimanja previše ili premalo uzorka za premazivanje na MALDI pločicu ili zbog izostanka referentnog spektra u biblioteci mikroorganizama za uzorkovanu bakterijsku koloniju.

Dobiveni rezultati nisu bili očekivani jer identificirane vrste nisu, osim bakterija iz roda *Acinetobacter*; uobičajeni dio mikrobiote *kombucha* napitaka. *Acinetobacter* je Gram negativna, polimorfna, striktno aerobna bakterija, rasprostranjena u prirodi kao saprofit ili predstavlja dio fiziološke flore čovjeka (koža, dišni putevi i genitalni trakt), pa je pretpostavka da je putem kože postala dio mikrobiote. *Pantoes agglomerans* (prije *Enterobacter agglomerans*) je gram-negativna, aerobna bakterija, izolirana iz biljnih izvora, pa je mogući izvor ove nepoželjne bakterije bio zeleni čaj. Uz *M. luteus*, niti jedna od ove dvije vrste izoliranih bakterija nije patogena za ljude, osim za one s imunokompromitiranim zdravstvenim statusom.

MALDI-TOF tehnika zahtijeva pripremu 24 h stare kulture mikroorganizama da bi se dobili pouzdani rezultati. Uzgoj bakterija octene kiseline na hranjivim podlogama najčešće traje od 8 do 10 dana, pri čemu su prve kolonije vidljive tek oko 6. dana uzgoja. Time bi se moglo objasniti kako su mikroskopski i morfološki potvrđene prisutnosti bakterija iz roda *Acetobacter* i *Gluconacetobacter* u SCOBY kulturi *kombuche*, a nisu identificirane MALDI-TOF tehnikom.

5. ZAKLJUČCI

Na temelju provedenog istraživanja i dobivenih rezultata mogu se izvesti sljedeći zaključci:

1. *Kombucha* je napitak vrlo složenog sastava i visoke nutritivne vrijednosti, nastao kao rezultat fermentacije zaslađenog zelenog čaja simbiotskom kulturom bakterija octene kiseline i osmofilnih kvasaca (SCOBY). Fermentacija je provedena u statičnim uvjetima pri 25 °C, dodatkom 80 g/L saharoze i 30 g/L SCOBY kulture iz prijašnjeg uzgoja.

2. Glavni proizvodi, nastali biotransformacijom zašećerenog zelenog čaja su bile octena (7,91 g/L) i glukonska (1,6 g/L) kiselina i zanemarivi udjel etanola (0,01 g/L), te bakterijska nanoceluloza (299 g/L BNC), koja se u obliku tanke opne svakodnevno sintetizirala na površini napitka.

3. Tijekom procesa fermentacije zabilježen je pad pH vrijednosti i koncentracije etanola dok se koncentracija octene i glukonske kiseline povećavala.

4. Mikrobiota simbiotske kulture bakterija i kvasaca (SCOBY) *kombuche* ključna je za nutritivna i organoleptička svojstva gotovog proizvoda. Rodovi bakterija koji se izolirani iz SCOBY kulture, te morfološki i fiziološki karakterizirani bili su *Acetobacter*, *Gluconacetobacter*, *Micrococcus* i *Serratia*, dok su *Rhodotorula*, *Schizosaccharomyces* i *Candida* glavni izolirani rodovi kvasaca.

5. Priroda SCOBY kulture je dosta varijabilna te ovisi o geografskom položaju, klimi, lokalnoj vrsti kvasaca i bakterija, te korištenom inokulumu. U novije vrijeme zabilježen je sve veći broj vrsta kvasaca i bakterija uključenih u mikrobiotu SCOBY kulture.

6. Poznavanje aktivnosti pojedinih mikroorganizama tijekom procesa fermentacije i njihovih metaboličkih uloga, ključno je za proizvodnju *kombuche* poželjnih organoleptičkih svojstava. Prisutnost i/ili dominacija određenih mikroorganizama tijekom prirodnih *kombucha* fermentacija ne znači da su oni najoptimalniji mikroorganizmi za željeni krajnji proizvod.

6. POPIS LITERATURE

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>

Bishop P, Pitts ER, Budner D, Thompson-Witrick KA (2022) Kombucha: Biochemical and microbiological impacts on the chemical and flavor profile. *Food Chem Adv* **1**, 100025. <https://doi.org/10.1016/j.focha.2022.100025>

Carr JG (1968) Identification methods for microbiologists, Academic Press, London, UK, str. 1–8.

CDC (1996) CDC Editorial Note. *J Amer Med Assoc* **275**, 97-98.

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>

Chen C, Liu BY (2000). Changes in major components of tea fungus metabolites during prolonged fermentation. *J Appl Microbiol* **89**(5), 834–839. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2000.01188.x>

Coton M, Pawtowski A, Taminiau B, Burgaud G, Deniel F, Coulloume- Labarthe L, Coton E (2017) Unraveling microbial ecology of industrial-scale kombucha fermentations by metabarcoding and culture-based methods. *FEMS Microbiol Ecol* **93**, 1–16. <https://doi.org/10.1093/femsec/fix048>.

Crum H, LaGory A, Katz SE (2016) The Big Book of Kombucha: Brewing, Flavoring, and Enjoying the Health Benefits of Fermented Tea, Storey Publishing: North Adams, MA, USA, str. 400.

Cuamatzin-García L, Rodríguez-Rugarcía P, El-Kassis, EG, Galicia G, Meza-Jiménez MDL, Baños-Lara MDR, Zaragoza-Maldonado DS Pérez-Armendáriz B (2022) Traditional Fermented Foods and Beverages from around the World and Their Health Benefits. *Microorganisms* **10**, 1151. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10061151>

- Diez-Ozaeta I, Astiazaran OJ (2022) Recent advances in kombucha tea: microbial consortium, chemical parameters, health implications and biocellulose production. *Int J Food Microbiol* 109783. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2022.109783>
- Fleet GH (2006) Yeasts in Food and Beverages. *The Yeast Handbook Vol. 2* Springer, str. 1-12.
- Gomes RJ, de Borges MF, de Rosa MF (2018) Acetic acid bacteria in the food industry systematics, characteristics and applications. *Food Tech Biotech* 56139–151. <https://doi.org/10.17113/ftb.56.02.18.5593>
- Gullo M, La China S, Falcone PM (2018) Biotechnological production of cellulose by acetic acid bacteria: current state and perspectives. *Appl Microbiol Biotechnol* 102, 6885–6898. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9164-5>
- Harrison K, Curtin C (2021) Microbial composition of SCOBY starter cultures used by commercial kombucha brewers in North America. *Microorganisms* 9, 1060. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9051060>
- Jafari R, Naghavi NS, Khosravi-Darani K, Doudi M, Shahanipour K (2021) Isolation, molecular and phylogenetic identification of microorganisms from kombucha solution and evaluation of their viability using flow cytometry. *Food Sci. Technol. Campinas* 42, e63220. <https://doi.org/10.1590/fst.63220>
- Jakubczyk K, Gutowska I, Antoniewicz J, Janda K (2020) Evaluation of Fluoride and Selected Chemical Parameters in Kombucha Derived from White, Green, Black and Red Tea. *Biol Trace Element Res* 199, 3547–3552. <https://doi.org/10.1007/s12011-020-02445-9>
- 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 F* 13(4), 538–550. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12073>
- Kallel L, Desseaux V, Hamdi M, Stocker P, Ajandouz EH (2012). Insights into the fermentation biochemistry of Kombucha teas and potential impacts of Kombucha drinking on starch digestion. *Food Res Int* 49(1), 226–232. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.08.018>
- Kim, J.; Adhikari, K. Current Trends in Kombucha: Marketing Perspectives and the Need for Improved Sensory Research. *Beverages* 2020, 6, 15, <https://doi.org/10.3390/beverages6010015>

- Laavanya D, Shirkole S, Balasubramanian P (2021) Current challenges, applications and future perspectives of SCOBY cellulose of Kombucha fermentation. *J Cleaner Prod* **295**, 126454. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2021.126454>
- Lynch KM, Zannini E, Wilkinson S, Daenen L, Arendt EK (2019). Physiology of acetic acid bacteria and their role in vinegar and fermented beverages. *Compr Rev Food Sci F* **18**(3), 587–625. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12440>
- Malbaša R, Lončar E, Djurić M (2008) Comparison of the products of Kombucha fermentation on sucrose and molasses. *Food Chem* **106**(3), 1039–1045. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.07.020>
- May A, Narayanan S, Alcock J, Varsani A, Maley C, Aktipis, A (2019) Kombucha: A novel model system for cooperation and conflict in a complex multi-species microbial ecosystem. *PeerJ*, **7**, e7565. <https://doi.org/10.7717/peerj.7565>
- Nacefab M, Chevalierb M, Cholleta S, Driderb D, Flahaut C (2017) MALDI-TOF mass spectrometry for the identification of lactic acid bacteria isolated from a French cheese: The Maroilles. *Int J Food Microbiol* **247**: 2-8. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.07.005>
- Nyhan LM, Lynch KM, Sahin AW, Arendt EK (2022) Advances in kombucha tea fermentation: a review. *Appl Microbiol* **2**, 73–103. <https://doi.org/10.3390/applmicrobiol2010005>
- Ozyurt H (2020) Changes in the content of total polyphenols and the antioxidant activity of different beverages obtained by Kombucha ‘tea fungus’. *Int J Agric Environ Food Sci* **4**, 255–261. <https://doi.org/10.31015/jaefs.2020.3.3>
- Sengun IY, Karabiyikli S (2011) Importance of Acetic Acid Bacteria in Food Industry. *Food Control* **22**, 647-656. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2010.11.008>
- Sengun IY, Kirmizigul A (2020) Probiotic potential of kombucha. *J Funct Foods* **54**, <https://doi.org/10.1016/j.jff.2020.104284>
- Senanayake SPJN. (2013) Green tea extract: Chemistry, antioxidant properties and food applications – A review. *J Funct Foods* **5**, 1529–1541. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2013.08.011>
- Sheykhnazari S, Tabarsaa T, Ashorib A, Shakeric A, Golalipourd M (2011) Bacterial synthesized cellulose nanofibers; effects of growth times and culture mediums on the structural characteristics. *Carbohydr Polym* **86**, 1187–1191. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.06.011>

- 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**(4), 590–594.
- St-Pierre D (2019) Microbial Diversity of the Symbiotic Colony of Bacteria and Yeast (SCOBY) and Its Impact on the Organoleptic Properties of Kombucha. Electronic Theses and Dissertations. 3063. <https://digitalcommons.library.umaine.edu/etd>
- <https://digitalcommons.library.umaine.edu/etd/3063>Tal R, Wong HC, Calhoon R (1998) Three *cdg* operons control cellular turnover of cyclic di-GMP in *Acetobacter xylinum*: genetic organization and occurrence of conserved domains in isoenzymes. *J Bacteriol* **180**, 4416–4425.
- Tran T, Grandvalet C, Verdier F, Martin A, Alexandre H, Tourdot-Mar'échal R (2020) Microbial dynamics between yeasts and acetic acid bacteria in kombucha: impacts on the chemical composition of the beverage. *Foods* **9**, 963. <https://doi.org/10.3390/foods9070963>
- Villarreal-Soto SA, Beaufort S, Bouajila J, Souchard J-P, Taillandier P (2018) Understanding kombucha tea fermentation: A review. *J Food Sci* **83**(3), 580–588. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.14068>
- Wang B, Rutherford-Markwick K, Zhang XX, Mutukumira AN (2022) Isolation and characterisation of dominant acetic acid bacteria and yeast isolated from kombucha samples at point of sale in New Zealand. *Curr Res Food Sci* **5**, 835–844. <https://doi.org/10.1016/j.crfs.2022.04.013>
- Watawana M, Jayawardena N, Gunawardhana C, Waisundara V (2015) Health, wellness, and safety aspects of the consumption of kombucha. *J Chem* 1–11 <https://doi.org/10.1155/2015/591869>
- Wolfe BE, Dutton R (2015) Fermented Foods as Experimentally Tractable Microbial Ecosystems. *Cell* **161**(1), 49-55. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.02.034>

Izjava o izvornosti

Ja _____ 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.

Vlastoručni potpis