

# Bioaktivni sastav i antioksidacijski kapacitet Kombucha napitaka

---

Gašpar, Darija

Master's thesis / Diplomski rad

2024

*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:159:851035>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-03-13**



*Repository / Repozitorij:*

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

# DIPLOMSKI RAD

Zagreb, studeni 2024.

Darija Gašpar

**BIOAKTIVNI SASTAV I ANTIOKSIDACIJSKI  
KAPACITET KOMBUCHA NAPITAKA**

Rad je izrađen u Laboratoriju za kemiju i tehnologiju voća, povrća i začinskog bilja na Zavodu za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo Sveučilišta u Zagrebu Prehrambeno-biotehnološkoga fakulteta pod mentorstvom prof. dr. sc. Danijele Bursać Kovačević, te uz pomoć Anice Bebek Markovinović, mag. ing.

PRIMA Projekt „From Edible Sprouts to Healthy Food – Feed“ (Prima Call 2022, Prima Section 2 – Multi Topic 2022, Topic 2.3.1 (RIA) Enabling the transition to healthy and sustainable dietary behaviour)



Voditeljica projekta: prof. dr. sc. Danijela Bursać Kovačević

## ZAHVALA

*Poštovana mentorice, prof. dr. sc. Danijela Bursać Kovačević, od srca Vam hvala na ukazanoj prilici i prihvaćenom mentorstvu, stručnom vodstvu i svim savjetima te izdvojenom vremenu. Bez Vas, ovaj korak ne bi bio moguć.*

*Veliku zahvalnost želim uputiti i doktorandici Anici Bebek Markovinović na podršci, svim savjetima, motivaciji, izdvojenom vremenu, strpljenju, nesebičnoj pomoći i ugodnoj atmosferi prilikom izrade rada.*

*Zahvaljujem i svojim dragim kolegicama, koje su svojim prijateljstvom, podrškom i nesebičnom pomoći učinile ove godine na fakultetu ljepšim i lakšim. Zajedno smo prolazile kroz brojne izazove, dijelile uspjehe, motivirale se i podržavale u teškim trenucima.*

*Veliko hvala i svim mojim prijateljima izvan fakulteta, koji su vjerovali i bili uz mene, motivirali me i podržavali.*

*Posebnu zahvalnost želim uputiti svom dečku, Gašperu, na neizmjerne ljubavi, svakom prijeđenom kilometru i podršci kroz cijeli ovaj proces. Hvala ti što uvijek vjeruješ u mene, motiviraš me i što si dio mog života i moj veliki oslonac.*

*Na kraju, najvažnije, od srca zahvaljujem svojim roditeljima, tati Ivanu i mami Eleonori. Hvala vam za sve što ste mi pružili na cijelom ovom akademskom putu – vašu bezuvjetnu ljubav, razumijevanje, motivaciju, vjeru i podršku koja me vodila prema mojim ciljevima. Hvala što ste uvijek uz mene kroz sve izazove i uspjehe, što ste mi oslonac u teškim trenucima i radujete se sa mnom u sretnim.*

*Bože, hvala Ti.*

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Zavod za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo  
Laboratorij za kemiju i tehnologiju voća, povrća i začinskog bilja

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti  
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

Diplomski sveučilišni studij: Upravljanje sigurnošću hrane

### BIOAKTIVNI SASTAV I ANTIOKSIDACIJSKI KAPACITET KOMBUCHA NAPITAKA

Darija Gašpar, univ. bacc. ing. techn. aliment.  
0125164811

**Sažetak:** Cilj ovog rada je bio ispitati utjecaj skladištenja pet Kombucha napitaka na stabilnost polifenolnih spojeva i antioksidacijski kapacitet. Kao tradicionalni supstrat korišten je crni čaj, dok su Yerba Mate, ocat, smjesa Yerba Mate i Sencha te drijenak korišteni kao alternativni supstrati. Tijekom skladištenja na 4 °C kroz 7, 14 i 21 dan, analizirane su promjene u udjelima ukupnih fenola, flavonoida, hidroksicimetnih kiselina, flavonola, monomernih antocijana i proantocijanidina te antioksidacijskom kapacitetu (ABTS i FRAP). Rezultati pokazuju da je uzorak s octom imao najviši sadržaj bioaktivnih tvari i antioksidacijski kapacitet. Skladištenje je u većini uzoraka utjecalo na povećanje udjela ukupnih fenola i hidroksicimetnih kiselina, dok su udjeli flavonoida ostali nepromijenjeni. Sadržaj ukupnih flavonola povećavao se do 14. dana skladištenja, nakon čega je došlo do pada, te je u većini uzoraka zabilježeno smanjenje udjela proantocijanidina. Utjecaj skladištenja na antioksidacijski kapacitet bio je varijabilan, ovisno o metodi analize i supstratu.

**Ključne riječi:** Kombucha napitak, bioaktivni spojevi, antioksidacijski kapacitet, skladištenje

**Rad sadrži:** 58 stranica, 10 slika, 3 tablice, 107 literaturnih navoda

**Jezik izvornika:** hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Prehrambeno-biotehnološkoga fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb.

**Mentor:** prof. dr. sc. Danijela Bursać Kovačević

**Pomoć pri izradi:** Anica Bebek Markovinović, mag. ing.

**Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:**

1. prof. dr. sc. Jadranka Frece (predsjednik)
2. prof. dr. sc. Danijela Bursać Kovačević (mentor)
3. prof. dr. sc. Tomislav Bosiljkov (član)
4. prof. dr. sc. Ksenija Markov (zamjenski član)

**Datum obrane:** 29. studenoga 2024.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

**University of Zagreb**  
**Faculty of Food Technology and Biotechnology**  
**Department of Food Engineering**  
**Laboratory for Chemistry and Technology of Fruits, Vegetables and Aromatic Herbs**

**Scientific area:** Biotechnical Sciences

**Scientific field:** Food Technology

**Graduate university study programme:** Food Safety Management

THE BIOACTIVE COMPOSITION AND ANTIOXIDANT CAPACITY OF KOMBUCHA BEVERAGES

Darija Gašpar, univ. bacc. ing. techn. aliment.  
0125164811

**Abstract:** The aim of this study was to examine the effect of storage on the stability of polyphenolic compounds and antioxidant capacity in five Kombucha beverages. Black tea was used as the traditional substrate, while Yerba Mate, vinegar, mixture of Yerba Mate and Sencha, and Cornelian cherry were used as alternative substrates. During storage at 4°C for 7, 14, and 21 days, changes in the levels of total phenols, flavonoids, hydroxycinnamic acids, flavonols, monomeric anthocyanins, proanthocyanidins, and antioxidant capacity (ABTS and FRAP) were analyzed. Results indicated that the vinegar-based sample had the highest content of bioactive compounds and antioxidant capacity. Storage generally led to an increase in total phenols and hydroxycinnamic acids in most samples, while flavonoids remained stable. Total flavonols increased until day 14 and decreased in proanthocyanidins was observed in most samples. The effect of storage on antioxidant capacity varied, depending on the analysis method and substrate used.

**Keywords:** Kombucha beverage, bioactive compounds, antioxidant capacity, storage

**Thesis contains:** 58 pages, 10 figures, 3 tables, 107 references

**Original in:** Croatian

Graduate Thesis in printed and electronic (pdf format) form is deposited in the Library of the University of Zagreb Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb.

**Mentor:** Danijela Bursać Kovačević, PhD, Full professor

**Technical support and assistance:** Anica Bebek Markovinović, mag. ing.

**Reviewers:**

1. Jadranka Frece, PhD, Full professor (president)
2. Danijela Bursać Kovačević, PhD, Full professor (mentor)
3. Tomislav Bosiljkov, PhD, Full professor (member)
4. Ksenija Markov, PhD, Full professor (substitute)

**Thesis defended:** November 29<sup>th</sup>, 2024



## Sadržaj

<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>2. TEORIJSKI DIO</b> .....	<b>2</b>
2.1. Kombucha napitak – koncept i perspektiva .....	2
2.2. Supstrati u proizvodnji kombucha napitaka.....	3
2.2.1. Crni i zeleni čaj .....	4
2.2.2. Alternativni supstrati .....	4
2.3. Metode pripreme kombucha napitaka.....	6
2.3.1. Fermentacija.....	8
2.4. Kemijski sastav kombucha napitaka .....	10
2.5. Bioaktivni potencijal kombucha napitaka .....	11
2.6. Antioksidacijska svojstva .....	13
2.7. Zakonska regulativa .....	14
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO</b> .....	<b>16</b>
3.1. Materijali.....	16
3.2. Metode rada .....	16
3.2.1. Priprema uzorka .....	16
3.2.2. Spektrofotometrijsko određivanje bioaktivnih spojeva.....	17
3.2.2.1. <i>Određivanje ukupnih fenola</i> .....	17
3.2.2.2. <i>Određivanje ukupnih flavonoida</i> .....	19
3.2.2.3. <i>Određivanje ukupnih hidroksicimetnih kiselina i flavonola</i> .....	21
3.2.2.4. <i>Određivanje polimernih proantocijanidina vanilin metodom</i> .....	23
3.2.2.5. <i>Određivanje monomernih antocijana</i> .....	25
3.2.3. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta .....	26
3.2.3.1. <i>FRAP metoda</i> .....	26
3.2.3.2. <i>ABTS metoda</i> .....	29
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA</b> .....	<b>31</b>
4.1. Utjecaj skladištenja na ukupne fenole.....	31
4.2. Utjecaj skladištenja na ukupne flavonoide .....	34
4.3. Utjecaj skladištenja na ukupne hidroksicimetne kiseline i flavonole .....	36
4.4. Utjecaj skladištenja na polimerne proantocijanidine.....	39
4.5. Utjecaj skladištenja na monomerne antocijane .....	41
4.6. Utjecaj skladištenja na antioksidacijski kapacitet .....	42
<b>5. ZAKLJUČCI</b> .....	<b>47</b>
<b>6. LITERATURA</b> .....	<b>48</b>

# 1. UVOD

U novije vrijeme potrošači sve više biraju prehrambene proizvode koji ne samo da zadovoljavaju osnovne nutritivne potrebe, već i pridonose očuvanju zdravlja. Tako se u posljednje vrijeme bilježi porast u konzumaciji funkcionalne i fermentirane hrane, budući da potrošači sve više slijede nove trendove kako bi unaprijedili svoje zdravlje (Kim i Adhikari, 2020). Kombucha je funkcionalno piće koje potječe iz Kine, a širenjem trgovačkih ruta postala je popularna u cijelom svijetu. Proizvodi se fermentacijom čaja uz dodatak šećera i simbiotske kulture bakterija i kvasaca (engl. *Symbiotic Culture of Bacteria and Yeast, SCOBY*). Tradicionalni supstrat za proizvodnju Kombuche je biljka čaja (*Camelia sinensis*), no istraživanja su pokazala da se uspješno mogu koristiti i drugi alternativni supstrati poput biljnih infuzija, voćnih sokova i mliječnih proizvoda, koji daju zadovoljavajuće rezultate.

Danas je Kombucha komercijalno dostupna diljem svijeta, a njena popularnost raste zbog niskog sadržaja kalorija i šećera te blagotvornih učinaka na zdravlje povezanih s prisustvom bioaktivnih spojeva poput polifenola i flavonoida. Polifenoli doprinose antioksidacijskim, protuupalnim i antimikrobnim svojstvima Kombuche. Proces fermentacije povećava koncentraciju tih spojeva čime se povećava njihova bioraspoloživost, što dodatno doprinosi antioksidacijskom kapacitetu napitka. Također, antioksidacijski potencijal Kombuche uvelike ovisi i o vrsti supstrata, sastavu SCOBY kulture te uvjetima fermentacije (Chakravorty i sur., 2016). Dosadašnji rezultati o zdravstvenim učincima Kombuche su obećavajući, ali većina istraživanja je provedena na životinjama i *in vitro* modelima. Potrebno je dodatno regulirati proizvodnju i kvalitetu Kombuche te potkrijepiti njene zdravstvene prednosti znanstvenim dokazima kako bi se održala i povećala njena popularnost. Osim toga, važno je i ispitati utjecaj skladištenja na sadržaj bioaktivnih spojeva i njihovu biološku aktivnost u Kombuchi. Uvjeti skladištenja poput vremena, svjetlosti i temperature mogu značajno utjecati na kvalitetu i biološku aktivnost Kombuche (Tan i sur., 2020). Stoga, cilj ovog rada je bio analizirati i pratiti utjecaj skladištenja bez prisutnosti svjetla u trajanju od 7, 14 i 21 dan pri temperaturi od 4 °C na stabilnost ukupnih fenola, ukupnih flavonoida, hidroksicimetnih kiselina, flavonola, monomernih antocijana i polimernih proantocijanidina te antioksidacijskog kapaciteta (FRAP i ABTS) u Kombucha uzorcima Yerba Mate, crni čaj, ocat, Yerba Mate i Sencha te drijenka.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. Kombucha napitak – koncept i perspektiva

Smatra se da Kombucha napitak potječe iz sjeveroistočne Kine (Mandžurija) gdje je oko 220. pr. Kr. bio tražen za vrijeme dinastije Tsing zbog ljekovitog učinka i svoje zdravstvene dobrobiti (Chakravorty i sur., 2019). Širenjem trgovačkih ruta, praksa konzumiranja Kombuche proširila se na Japan i Koreju, a zatim i Rusiju te istočnoeuropske zemlje. Pojavljuje se u Njemačkoj na prijelazu u 20. stoljeće, a 50.-ih godina prošlog stoljeća dopire u Francusku i Sjevernu Afriku. Popularnost Kombuche naglo raste tijekom 60.-ih godina prošlog stoljeća, a danas se prodaje diljem svijeta pri čemu njena popularnost i dalje raste (Jayabalan i sur., 2014).

Kombucha se može definirati kao napitak proizveden fermentacijom čaja, najčešće crnog ili zelenog, uz dodatak šećera kao supstrata uz primjenu simbiotske kulture bakterija i kvasaca (engl. *Symbiotic Culture of Bacteria and Yeast, SCOBY*). Osim šećera koji se koristi u tradicionalnoj metodi, kao supstrat se mogu koristiti i drugi izvori ugljika (Kim i Adhikari, 2020). Simbiotska kultura SCOBY poznata je i kao "čajna gljiva" (Dutta i Paul, 2019) koja se sastoji od simbioze bakterija mliječne kiseline, octenih bakterija i osmofilnih kvasaca (Cardoso i sur., 2020). Proces proizvodnje uključuje SCOBY fermentaciju 7-21 dan (Laavanya i sur., 2021). Kombucha napitak karakterizira umjerena gaziranost te blaga kiselost i slatkoća (Kim i Adhikari, 2020). Osim toga, bogat je bioaktivnim spojevima, posebice polifenolima koji su odgovorni za antioksidacijsko djelovanje te dokazane zdravstvene prednosti napitka (Cardoso i sur., 2020). Neki od učinaka predstavljeni su kako u *in vitro* istraživanjima, tako i u pokusima na životinjama, poput antimikrobne aktivnosti, antioksidacijskog, protuupalnog i antikancerogenog djelovanja, liječenja i prevencije dijabetesa te poboljšanja metabolizma jetre i gastrointestinalnih funkcija (Villarreal-Soto i sur., 2020; Villarreal-Soto i sur., 2019; Chakravorty i sur., 2016). Kombucha sadrži visok antioksidacijski potencijal, što ovisi o vrsti i sastavu čajne infuzije, SCOBY kulturi te procesu fermentacije. Tijekom fermentacije dolazi do porasta polifenolnih spojeva odgovornih za antioksidacijska svojstva Kombuche (Chakravorty i sur., 2016). Zapravo, na početku fermentacije koncentracija polifenolnih spojeva se smanjuje, a tijekom fermentacije se povećava (Abaci i sur., 2022). Polifenolnim spojevima pripisuju se i protuupalna svojstva pri čemu su rezultati *in vitro* istraživanja potvrdili veću inhibiciju enzima odgovornih za upalu tijekom konzumacije Kombuche u odnosu na nefermentirane napitke (Villarreal-Soto i sur., 2020). Antikancerogeno djelovanje povezano je s antiproliferativnim učinkom, a ovisi o protuupalnom i antioksidacijskom djelovanju (Morales, 2020; Jayabalan i sur., 2014). Villarreal-Soto i sur. (2019) proveli su istraživanje gdje su testirali ekstrakte Kombucha napitka na bazi čaja protiv raka debelog crijeva i raka dojke kod ljudi pri čemu su rezultati pokazali veću inhibiciju proliferacije stanica raka tijekom kontinuirane konzumacije Kombuche kroz određeni

period. Pregledom literature, utvrđeno je da Kombucha posjeduje antibakterijsko svojstvo protiv raznih bakterija kao što su *Escherichia Coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus epidermis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris* i *Proteus mirabilis* (Vitas i sur., 2018; Bhattacharya i sur., 2016; Sreeramulu i sur., 2001). Antimikrobna aktivnost povezana je s organskim kiselinama, naročito octenom kiselinom, koje nastaju tijekom procesa fermentacije (Bhattacharya i sur., 2016; Jayabalan i sur., 2014). Probiotici prisutni u Kombuchi mogu utjecati na funkciju i sastav crijevnog mikrobioma (Watawana i sur., 2015) što pokazuje da je Kombucha uvelike povezana s gastrointestinalnim učinkom.

Kombucha se smatra alternativnim napitkom kojeg bi potrošač izabrao umjesto tradicionalnih bezalkoholnih pića. Ima manje kilokalorija i ukupnih šećera u odnosu na obična bezalkoholna pića. Naime, Coca-cola se smatra tradicionalnim bezalkoholnim pićem te prosječno ima 39,5 kcal na 100 mL i prosječni sadržaj šećera od 10 % po masi. Komercijalni Kombucha napitak koji se trenutno nalazi na tržištu sadrži prosječno 14,12 kcal i 3,17 g šećera na 100 mL (Kim i Adhikari, 2020). Općenito, postoji porast konzumacije funkcionalne i fermentirane hrane jer su potrošači podložni praćenju novih trendova za unaprijeđenje zdravlja (Granato i sur., 2020). Upravo zbog niskog udjela kilokalorija i šećera te zbog svojih zdravstvenih blagodati i pozitivnih učinaka na zdravlje, potrošači pokazuju sve veći interes za konzumaciju Kombucha napitaka i zahtijevaju više znanstvenih dokaza o potencijalnim dobrobitima. Jasno je da na tržištu postoji značajan rast potrošnje Kombucha napitaka jer se smatraju prirodnim i zdravim proizvodom, no mnoge nutritivne tvrdnje i dalje nemaju znanstvenu potporu (McCann i sur., 2022). Neke zemlje objavile su smjernice za osiguranje kvalitete i sigurne proizvodnje Kombuche, ali nedostatak zakonodavstva i korištenje neutemeljenih zdravstvenih tvrdnji i dalje predstavljaju prepreke daljnjoj popularnosti ovog napitka među potrošačima (Boak i sur., 2016). Kako bi se održao i povećao interes potrošača i prihvatljivost Kombuche, potrebno je uspostaviti zakonodavstvo za osiguranje sigurnosti proizvoda te tvrdnje o dobrobitima za ljudsko zdravlje potkrijepiti znanstvenim dokazima (Moodi i sur., 2021).

## **2.2. Supstrati u proizvodnji kombucha napitaka**

Glavni supstrat koji se koristi za proizvodnju Kombucha napitaka je biljka čaja (*Camelia sinensis*), no postoje razna istraživanja s drugim sirovinama kao supstratima za proizvodnju koji su pokazali zadovoljavajuće rezultate. Korišteni alternativni supstrati su razne biljne infuzije (Rocha-Guzmán i sur., 2019; Vitas i sur., 2018; Vázquez-Cabral i sur., 2017; Battikh i sur., 2012; Četojević-Simin i sur., 2012), voćni sok (Zubaidah i sur., 2018; Ayed i sur., 2016; Ayed i Hamdi, 2015), mlijeko i mliječni proizvodi (Barakat i sur., 2022; Vukić i sur., 2021), pčelinja

pelud (Uţoiu i sur., 2018) te proizvodi od soje (Xia i sur., 2019).

### 2.2.1. Crni i zeleni čaj

Zeleni i/ili crni čaj tradicionalno se koriste za proizvodnju Kombucha napitaka. Dolaze od vrste biljke *Camelia sinensis* koja pripada botaničkoj porodici Treaceae, a porijeklom je iz jugoistočne Azije (Tanaka i Kouno, 2003). Od lišća *C. sinensis* se različitim proizvodnim procesima proizvode razne vrste čajeva. Glavne vrste su zeleni čaj, crni čaj i oolong čaj koji se međusobno razlikuju po stupnju fermentacije i oksidacije lišća (Dutta i Paul, 2019; Sang i sur., 2011). Zeleni čaj se dobiva od svježih listova jer se na takav način sačuva veći sadržaj polifenola i drugih spojeva s funkcionalnom aktivnošću, a glavni prisutni polifenoli su katehini (Cardoso i sur., 2020). Crni čaj se proizvodi od odležanog fermentiranog lišća biljke pri čemu pod utjecajem procesa fermentacije i oksidacije katehina dolazi do stvaranja teaflavina i tearubigina, glavnih polifenolnih spojeva prisutnih u crnom čaju (Cardoso i sur., 2020).

Povećana konzumacija čajeva dobivenih od *C. sinensis* ima pozitivan učinak na zdravlje zbog prisutnosti bioaktivnih spojeva i antioksidansa koji smanjuju rizik od raznih bolesti (Santos i sur., 2018). *C. sinensis* sadrži razne polifenole, među kojima valja izdvojiti najzastupljenije katehine i tanine (Santos i sur., 2018), flavonole, katehin galate, galotanine i galnu kiselinu, zatim alkaloida kao što su kofein, teobromin, i teofilin te adenin (Aboulwafa i sur., 2019). Osim toga, prisutni su i drugi spojevi poput aminokiselina, oksida, klorida, lipida, karotenoida i hlapljivih spojeva koji mogu igrati važnu ulogu u razvoju arome (Dutta i Paul, 2019). *C. sinensis* osim raznolikosti bioaktivnih spojeva i antioksidacijske aktivnosti posjeduje i druge zdravstvene dobrobiti kao što su antimikrobna, antineoplastična, kardioprotektivna i antidijabetička svojstva (Aboulwafa i sur., 2019; Santos i sur., 2018).

### 2.2.2. Alternativni supstrati

Kombucha napitci od majčine dušice (*Thymus vulgaris* L.), ružmarina (*Rosmarinus officinalis*), komorača (*Foeniculum vulgare*) i paprene metvice (*Mentha piperita*) pokazali su veću antimikrobnu aktivnost uglavnom protiv *Candida spp.* u usporedbi s njihovim odgovarajućim nefermentiranim napitcima (Battikh i sur., 2012). Ljekovita biljka stolisnik (*Achillea millefolium* L.) je bogata bioaktivnim spojevima i koristi se u prehrambenoj industriji kao začim ili biljna infuzija. Vitas i sur. (2018) proveli su istraživanje s ciljem proizvodnje nove vrste Kombucha napitka na bazi infuzije stolisnika. Fermentirani napitak pokazao je dobra antimikrobna i antifungalna svojstva u usporedbi s drugim ljekovitim biljkama (majčina dušica, ružmarin, komorač i paprena metvica) te dobar antioksidacijski potencijal u usporedbi s tradicionalnim Kombucha napitcima na bazi crnog i zelenog čaja. Također, navedeni autori su utvrdili povećane količine ukupnih polifenola i vitamina C u fermentiranom napitku u usporedbi

s nefermentiranim napitkom. Četojević-Simin i sur. (2012) proučavali su biološku aktivnost čaja od matičnjaka (*Melissa officinalis* L.) i njegovog Kombucha napitka te pokazali da infuzija matičnjaka fermentirana SCOBY kulturom pokazuje veće antimikrobno i antioksidacijsko djelovanje u usporedbi s nefermentiranom infuzijom. Također, otkrili su da Kombucha napitak fermentiran na čaju od matičnjaka pokazuje antimikrobno djelovanje protiv Gram-negativnih i Gram-pozitivnih bakterija. Fermentirano piće od infuzije lišća hrasta (*Quercus* sp.) sa SCOBY kulturom pokazalo je dobru antioksidacijsku aktivnost jer je bogato polifenolima. Zabilježeno je i dobro protuupalno djelovanje zbog smanjenja proizvodnje dušikovog oksida te smanjenja citokina, TNF-alfa i IL-6 (Vázquez-Cabral i sur., 2017; Rocha-Guzmán i sur., 2019).

Zubaidah i sur. (2018) su ustanovili da Salak voćni sok fermentiran sa SCOBY kulturom smanjuje razinu glukoze u plazmi i regenerira  $\beta$ -stanice gušterače kod dijabetičkih štakora. Osim toga, Ayed i Hamdi (2015) kao alternativni supstrat za razvoj novog funkcionalnog napitka su koristili sok od opuncije (*Opuntia ficus-indica*) gdje su utvrdili da tijekom fermentacije dolazi do povećanja antioksidacijske aktivnosti. Također, zabilježili su i povećano antimikrobno djelovanje protiv različitih bakterija, ponajviše *E. coli*. Kombucha fermentirani napitak od soka grožđa (*Vitis vinifera*) nakon 6 dana fermentacije imao je bolja funkcionalna svojstva i senzorsku prihvatljivost u usporedbi s istim nefermentiranim napitkom (Ayed i sur., 2016).

Poznato je da su fermentirani mliječni napitci kao što su jogurt, kefir i acidofilno mlijeko korisni za ljudsko zdravlje. Razvijeni fermentirani napitci mlijeka s Kombuchom slični su jogurtu i kefiru s obzirom na boju i okus, a od strane panelista bili su prihvatljiviji od jogurta. Napitci su zadržali kiselost, sadržaj vitamina C, antioksidacijski potencijal te inhibitornu aktivnost enzima nakon skladištenja (Barakat i sur., 2022). Vukić i sur. (2021) u svom istraživanju su proizveli Kombucha svježi sir. U prethodno pasteurizirano mlijeko 2,8 % mliječne masti dodali su 10 % Kombucha inokuluma. Fermentacija je prekinuta kada je pH dosegla standardnu vrijednost od 4,5 za svježi sir. Kombucha svježi sir pokazao je jako antimikrobno djelovanje protiv *E. coli* i *L. monocytogenes*. Zahtijevao je kraće vrijeme fermentacije u odnosu na klasično proizvedeni svježi sir, a nakon proizvodnje sadržavao je 6 puta veću koncentraciju polifenola.

Pčelinja pelud smatra se "superhranom" zbog bogatog sastava fitonutrijenata. Bioraspoloživost bioaktivnih spojeva peludi je ograničena za ljude. Uțoiu i sur. (2018) proveli su istraživanje gdje su fermentirali pčelinju pelud sa SCOBY i uočili povećanu bioraspoloživost bioaktivnih spojeva peludi. Također, zabilježili su i porast ukupnih polifenola te dobro antioksidacijsko svojstvo fermentiranog napitka. Xia i sur. (2019) su fermentirali ekstrakt soje (*Glycine max*) topljiv u vodi sa SCOBY kulturom te su rezultati istraživanja pokazali da je fermentacijom došlo do značajnog povećanja sadržaja fenolnih spojeva i vitamina C. Fermentirani napitak pokazao je dobro antioksidacijsko djelovanje i sposobnost prevencije dijabetesa. Rafinoza i stahioza su dva oligosaharida prisutna u soji koji uzrokuju crijevne

nelagode. Mikroorganizmi prisutni u fermentiranom napitku mogu proizvesti  $\alpha$ -galaktozidazu uz pomoću koje dolazi do hidrolize rafinoze i stahioze. Istraživanjem je utvrđeno da fermentacija sojinog mlijeka sa SCOBY može značajno poboljšati zdravstvena svojstva sojinog mlijeka.

### 2.3. Metode pripreme kombucha napitaka

Kombucha napitak se tradicionalno priprema fermentacijom čaja uz dodatak šećera i SCOBY kulture (Jayabalan i sur., 2014). Na proces fermentacije može utjecati nekoliko čimbenika, a to su pH, temperatura fermentacije, kisik, supstrati, koncentracija šećera, podrijetlo SCOBY kulture i vrijeme fermentacije. Svaka promjena tih čimbenika posljedično utječe na kemijska svojstva, senzorske karakteristike i biološku aktivnost Kombucha napitka (Villarreal-Soto i sur., 2018). Prema dostupnoj literaturi evidentno je kako postoje različiti uvjeti pripreme Kombuche, a kao supstrati se najčešće koriste crni i/ili zeleni čaj (tablica 1) te u manjoj mjeri i drugi alternativni supstrati (tablica 2). Supstrati se dodaju u širokom rasponu koncentracija od 1 do 100 g/L. Saharoza se koristi kao glavni izvor ugljika u udjelu 1-20 %. Kao starter kultura za fermentaciju se koristi SCOBY u udjelu 0,25-10 %, a može se koristiti i tekućina iz prethodne fermentacije u udjelu 10 %. Dodatak prethodno fermentirane tekućine ima funkciju pomaganja aktivacije octenih bakterija (Leal i sur., 2018). Fermentacija se, ovisno o SCOBY, odvija od minimalno 3 dana do maksimalno 60 dana. Najčešće vrijeme fermentacije je 7-21 dan pri temperaturi  $25 \pm 3$  °C (Watawana i sur., 2015; Jayabalan i sur., 2014).

**Tablica 1.** Različiti uvjeti pripreme Kombucha napitaka na bazi crnog i zelenog čaja (prema de Miranda i sur., 2021)

Supstrat	Konc. supstrata (g/L)	Saharoza (g/L)	SCOBY (%)	PFP (%)	t (dan)	T ( $\pm 3$ °C)	Reference
Crni i zeleni čaj	12	100	3	10	18	24	Jayabalan i sur., 2007
Crni čaj	1,5	70	/	10	14	22	Malbaša i sur., 2008
Crni čaj	5	100	/	10	21	28	Chakravorty i sur., 2016
Crni čaj	10	70	4	/	21	25	Villarreal-Soto i sur., 2019
Crni čaj	10	100	3	10	7	25	Ben Taheur i sur., 2020
Crni i zeleni čaj	12	50	3	10	10	25	Cardoso i sur., 2020
Zeleni čaj	3	10	4	/	14	28	Najafpour i sur., 2020

Konc. supstrata – koncentracija supstrata; PFP – prethodno fermentirano piće; t – vrijeme fermentacije; T – temperatura fermentacije

**Tablica 2.** Različiti uvjeti pripreme Kombucha napitka na bazi alternativnih supstrata (*prema de Miranda i sur., 2021*)

Supstrat	Konc. supstrata (g/L)	Saharoza (g/L)	SCOBY (%)	PFP (%)	t (dan)	T (±3 °C)	Reference
Infuzije: majčina dušica ( <i>Thymus vulgaris</i> L.), ružmarin ( <i>Rosmarinus officinalis</i> ), komorač ( <i>Foeniculum vulgare</i> ) i paprena metvica ( <i>Mentha-piperita</i> )	10	20	1	/	21	sobna temp.	Battikh i sur., 2012
Infuzija matičnjaka ( <i>M.officinalis</i> L.)	5	70	/	10	7	28	Velićanski i sur., 2014
Infuzija lišća hrasta ( <i>Quercus resinosa</i> , <i>Quercus arizonica</i> , <i>Quercus convallata</i> )	10	100	2,5	10	7	25	Vázquez-Cabral i sur., 2017
Infuzija cvjetova stolisnika ( <i>A. millefolium</i> L.)	1,13 g/500 mL	35 g/500 mL	/	10	7	25	Vitas i sur., 2018
Zeleni čaj + pčelinja pelud	5 g/L zeleni čaj + 50 g/L pčelinja pelud	65	4	/	16	28	Uđoiu i sur., 2018
Salak voćni sok	voće:voda, 1:1 w/w	100	10	/	14	sobna temp.	Zubaidah i sur., 2018
Sojino mlijeko	Voda:suho zrno soje, 8:1, w/w	/		5	4 3	28 37	Xia i sur., 2019

Konc. supstrata – koncentracija supstrata; PFP – prethodno fermentirano piće; t – vrijeme fermentacije; T – temperatura fermentacije

Tijekom pripreme napitka, neophodno je koristiti dezinficirano posuđe i pribor kako ne bi došlo do neželjene kontaminacije patogenim mikroorganizmima što može utjecati na proizvodnju napitka s promijenjenim svojstvima (Dufrense i Farnworth, 2000). Potrebno je tijekom procesa fermentacije pratiti i podešavati procesne parametre od kojih je najbitnija pH vrijednost. Zbog proizvodnje organskih kiselina tijekom procesa fermentacije, pH vrijednost s



vremenom pada te je potrebno zaustaviti proces kod pH vrijednosti 4,2. Na taj način sprječava se da proizvodnja octene kiseline ima kontraproduktivna svojstva (Kovacevic i sur., 2014). Nakon završenog procesa fermentacije, dobiveni napitak može se filtrirati kako bi se uklonili ostaci SCOBY kulture. Kombucha napitak može se podvrgnuti procesu pasterizacije kako bi se zaustavila pretjerana proizvodnja alkohola i ugljikovog dioksida. Također, može se dodati 0,1 %-tni kalijev sorbat ili 0,1 %-tni natrijev benzoat, koji služe kao konzervansi hrane. Kombucha napitak je potrebno čuvati u hladnjaku (Nummer, 2013).

### 2.3.1. Fermentacija

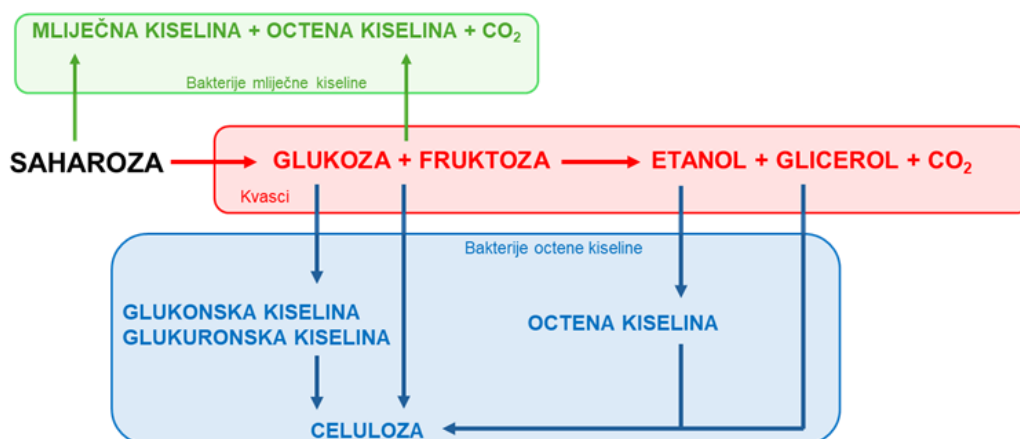
Najzastupljeniji prokarioti u Kombucha starteru su bakterije i kvasci koji čine kulturu poznatu kao SCOBY. Bakterije i kvasci koji se koriste za fermentaciju Kombuche imaju promjenjiv sastav ovisno o podrijetlu, geografskom položaju, mediju i uvjetima procesa fermentacije (Watawana i sur., 2015). SCOBY kultura se pretežito sastoji od octenih bakterija iz porodice Acetobacteraceae pri čemu prevladavaju rodovi *Acetobacter*, *Gluconobacter*, *Glucoacetobacter* i *Komagataeibacter* te kvasaca, uglavnom iz rodova *Saccharomyces*, *Brettanomyces* i *Zygosaccharomyces* (tablica 3) (Villarreal-Soto i sur., 2020; Jayabalan i sur., 2014; Marsh i sur., 2014). Bakterije iz porodice Acetobacteraceae su gram-negativni aerobni bacili (Stasiak i Blazejak, 2009). U manjoj količini mogu biti prisutne i bakterije mliječne kiseline kao što su *Lactobacillus* i *Lactococcus* (Leal i sur., 2018; Villarreal-Soto i sur., 2018; Chakravorty i sur., 2016).

**Tablica 3.** Neke bakterije i kvasci prisutni u SCOBY kulturi (prema Marsh i sur., 2014; Vīna i sur., 2013; Battikh i sur., 2011)

Bakterije	Kvasci
<i>Acetobacter xylinum</i> , <i>Acetobacter xylinoides</i> , <i>Bacterium gluconicum</i> , <i>Acetobacter aceti</i> , <i>Acetobacter pasteurianus</i> , <i>Gluconobacter oxydans</i> , <i>Glucoacetobacter xylinus</i> , <i>Komagataeibacter xylinus</i> , <i>Komagataeibacter spp.</i> , <i>Lactobacillus spp.</i> , <i>Lactococcus spp.</i> , <i>Leuconostoc spp.</i> , <i>Bifidobacterium spp.</i> , <i>Thermus spp.</i> , <i>Allobaculum spp.</i> , <i>Ruminococcaceae Incerate Sedis</i> , <i>Propionibacterium spp.</i> , <i>Enterococcus spp.</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Zygosaccharomyces bailii</i> , <i>Schizosaccharomyces pombe</i> , <i>Saccharomyces ludwigii</i> , <i>Zygosaccharomyces rouxii</i> , <i>Torulaspora delbrueckii</i> , <i>Brettanomyces bruxellensis</i> , <i>Brettanomyces lambicus</i> , <i>Brettanomyces custerii</i> , <i>Candida spp.</i> , <i>Pichia membranaefaciens</i> , <i>Kloeckera apiculata</i> , <i>Torulopsis spp.</i>

Supstrat za fermentaciju Kombuche je najčešće saharoza. Kvasci djelovanjem enzima invertaze kataliziraju hidrolizu saharoze u glukozu i fruktozu te tijekom procesa glikolize proizvode etanol, ugljični dioksid i glicerol (slika 1). Octene bakterije iz roda *Acetobacter* preko enzima alkohol dehidrogenaze i aldehid dehidrogenaze oksidacijom etanola proizvode octenu

kiselinu. Nastala octena kiselina zatim ulazi u ciklus limunske kiseline u kojem kao krajnji produkti nastaju ugljikov dioksid i voda. Međutim, bakterije iz roda *Gluconobacter* nemaju sposobnost oksidacije acetata kroz ciklus limunske kiseline zbog nedostatka enzima  $\alpha$ -ketoglutarat dehidrogenaze i sukcinat dehidrogenaze, ključnih za taj proces. Zbog toga u hranjivom mediju dolazi do nakupljanja raznih proizvoda poput glukonata. Octene bakterije rodova *Acetobacter* i *Gluconobacter* imaju sposobnost prevesti glukozu u glukonsku i glukuronsku kiselinu, dok su bakterije iz rodova *Komagataeibacter* i *Acetobacter* odgovorne za stvaranje celuloznog filma. Octena kiselina koju proizvode octene bakterije potiče kvasce na proizvodnju etanola, a etanol zauzvrat može biti koristan za rast octenih bakterija koje potom proizvode više octene kiseline (Gomes i sur., 2018; Leal i sur., 2018; Jayabalan i sur., 2014). Štoviše, proizvodnja etanola i octene kiseline može inhibirati rast patogenih bakterija u Kombuchi (Dufrense i Farnworth, 2000). Bakterije mliječne kiseline odgovorne su za nastajanje mliječne kiseline, etanola i ugljikovog dioksida tijekom procesa put pentoza fosfata ili putem Embden-Meyerhof-Parnasovog puta gdje je primarni metabolit mliječna kiselina (Antolak i sur., 2021). Fruktaza se tijekom procesa manje koristi i može se pronaći nakon fermentacije (Nummer, 2013).



**Slika 1.** Glavne metaboličke aktivnosti bakterija octene kiseline, kvasaca i bakterija mliječne kiseline tijekom fermentacije Kombuche (prema Laureys i sur., 2020)

Nakon 21. dana fermentacije, simbiotska kultura bakterija i kvasaca proizvodi 2 glavna dijela: plutajući sloj celuloznog filma koji se naziva "čajna gljiva" i tekući medij koji se naziva fermentirana juha (Diez-Ozaeta i Astiazaran, 2022). Kiseli tekući medij sadrži razne komponente, uključujući organske kiseline, etanol, vitamine, minerale, aminokiseline, enzime i bioaktivne spojeve (Kapp i Sumner, 2019; Jayabalan i sur., 2014). Octene bakterije, osobito *Komagataeibacter xylinus* i *Acetobacter xylinum* koriste saharozu kao glavni izvor ugljika za proizvodnju celulozne mreže koja predstavlja debelu membranu sa želatinoznim izgledom koja pojačava povezanost između bakterija i kvasaca (Gomes i sur., 2018; Leal i sur., 2018;

Jayabalan i sur., 2014). Sinteza celuloznog filma uključuje transport izvora ugljika, sintezu uridin difosfat-glukoze (engl. *Uridine diphosphate glucose, UDPG*) putem glukoza-6-fosfata i glukoza-1-fosfata te polimerizaciju glukoznog lanca pomoću celulozne sintaze. Ovako proizveden celulozni film omogućava da mikroorganizmi ostanu na površini tekućine kako bi dobili potreban kisik za svoj metabolizam te stvara fizičku barijeru koja štiti od UV zračenja, omogućuje zadržavanje vlage i sprječava dehidraciju. Osim toga, na ovakav način bakterije brže rastu u kontroliranim uvjetima i mogu proizvoditi glukozu, etanol i glicerol (Villarreal-Soto i sur., 2018; Cacicedo i sur., 2016).

## 2.4. Kemijski sastav kombucha napitaka

Nakon završenog procesa fermentacije, glavni spojevi nastali u Kombucha napitku su octena kiselina, etanol i glukonska kiselina. Prisutne su i druge organske kiseline poput glukuronske, mliječne, limunske, vinske, jabučne, oksalne, malonske, jantarne i pirogroždane, vitamini topljivi u vodi (B1, B2, B6, B12 i C vitamin), minerali (željezo, bakar, mangan, cink i nikal), polifenoli, šećeri (glukoza i fruktoza), aminokiseline, biogeni amini, purini, proteini, lipidi, pigmenti, ugljikov dioksid, vlakna, D-saharinska kiselina-1,4-lakton (DSL) i hidrolitički enzimi (Kapp i Sumner, 2019). Kemijski spojevi prisutni u Kombuchi potječu iz samog supstrata, a struktura spojeva se može transformirati i modificirati u nove spojeve tijekom fermentacije, no točan put biotransformacije svih identificiranih metabolita u Kombuchi iziskuje daljnja istraživanja (Dutta i Paul, 2019). Bitno je istaknuti da prisutnost navedenih spojeva ovisi o supstratu, vremenu fermentacije, koncentraciji šećera, temperaturi pri kojoj se odvija fermentacija te mikroorganizmima prisutnim u SCOBY. Svaka promjena uvjeta fermentacije može utjecati na konačni kemijski sastav Kombucha napitka (Villarreal-Soto i sur., 2018; Jayabalan i sur., 2014).

Octena kiselina je najviše prisutna organska kiselina u Kombucha napitku od zelenog ili crnog čaja (Cardoso i sur., 2020). Tijekom procesa fermentacije pH vrijednost Kombuche se smanjuje zbog proizvodnje organskih kiselina (Jayabalan i sur., 2014). Chakravorty i sur. (2016) su uočili porast koncentracije octene i glukonske kiseline u Kombucha napitku od zelenog čaja, dok su Jayabalan i sur. (2007) primijetili povećanje koncentracije octene kiseline 15. dana fermentacije u Kombucha napitku od zelenog čaja te porast koncentracija glukuronske kiseline 12. dana fermentacije u Kombucha napitku od crnog čaja. Velićanski i sur. (2014) su utvrdili da je u Kombucha napitku od infuzije matičnjaka (*M. officinalis* L.) došlo do povećane proizvodnje organskih kiselina, osobito octene kiseline. Prema istraživanju koje su proveli Chen i Liu (2000), koncentracija etanola raste s vremenom fermentacije pri čemu na 20. dan fermentacije dostiže približno maksimalnu vrijednost od 5,5 g/L, nakon čega slijedi polagano smanjivanje. Sadržaj željeza, bakra, mangana, cinka i nikla se povećao kao rezultat metaboličke aktivnosti

Kombuche (Jayabalan i sur., 2014). Vitamini B kompleksa i C vitamin koji se nalaze u Kombuchi imaju visoku antioksidacijsku aktivnost zbog svog redoks-potencijala (Vitas i sur., 2018; Malbaša i sur., 2008). Vitas i sur. (2018) su primijetili porast koncentracije vitamina C u Kombucha uzorcima dobivenih na bazi infuzije cvjetova stolisnika (*A. millefolium* L.). Međutim, uspoređujući svoje rezultate s drugim istraživanjima, otkrili su da dobiveni Kombucha uzorci na bazi listova biljke čaja imaju veću koncentraciju vitamina što potvrđuje činjenicu da različiti supstrati mogu imati utjecaj na krajnji sastav napitka.

## 2.5. Bioaktivni potencijal kombucha napitaka

Rezultati brojnih istraživanja su potvrdili da tradicionalna Kombucha, pripremljena od crnog ili zelenog čaja, može biti koristan fermentirani napitak za unapređenje zdravlja. Sastav bioaktivnih spojeva u fermentiranim proizvodima utječe na njihovu antioksidacijsku aktivnost i daljnje zdravstvene dobrobiti (Antolak i sur., 2021). Polifenoli su aktivne tvari s više od jedne fenolne strukturne jedinice po molekuli. Predstavljaju najveću skupinu fitokemikalija i najzastupljeniji su antioksidansi u prehrani (Scalbert i sur., 2005). Čaj (*C. sinensis*) je poznat kao odličan izvor antioksidansa te se smatra da posjeduje brojne biološki aktivne tvari (Anantachoke i sur., 2023). Od svih polifenolnih spojeva prisutnih u zelenom i crnom čaju, najzastupljeniji su flavonoidi od kojih prevladavaju katehini (flavan-3-oli). Ostali važni polifenolni spojevi prisutni u čaju su epikatehin (engl. *epicatechin*, EC), epigalokatehin (engl. *epigallocatechin*, EGC), epikatehin galat (engl. *epicatechin gallate*, ECG), galokatehin galat (engl. *epigallocatechin gallate* GCG), epigalokatehin galat (engl. *epigallocatechin gallate*, EGCG), teaflavini i tearubigini. Čaj sadrži i flavonole, uglavnom kvercetin, kemferol, miricetin i njihove glikozide (Dufrense i Farnworth, 2000).

Zaštitni učinak Kombuche većinom proizlazi iz aktivnosti polifenola, spojeva nastalih tijekom fermentacije, kao i iz sinergističkog djelovanja raznih tvari prisutnih u čaju (Jayabalan i sur., 2008). U napitcima od zelenog i crnog čaja fermentiranim sa SCOBY kulturom tijekom 10 dana, identificirano je oko 127 polifenolnih spojeva pri čemu se 70,2 % odnosi na flavonoide, 18,3 % na fenolne kiseline, 8,4 % na ostale polifenole, 2,3 % na lignane i 0,8 % na stilbene (Cardoso i sur., 2020). Ukupna količina polifenola u Kombucha napitku pokazuje linearni porast tijekom procesa fermentacije (Chu i Chen, 2006). Bhattacharya i sur. (2013) pokazali su da se sadržaj ukupnih polifenola i flavonoida povećao u Kombucha napitku na bazi crnog čaja nakon 21 dan fermentacije pri 28 °C u usporedbi sa zaslađenim crnim čajem. Također, Jayabalan i sur. (2007) zabilježili su, 12. dana fermentacije Kombuche na bazi zelenog čaja, porast razine epikatehina od približno 150 %. Epigalokatehin je imao porast od oko 115 % na isti dan kada je pripremljen Kombucha napitak na bazi crnog čaja. Ukupni polifenoli i pojedinačne koncentracije određenih polifenola u Kombuchi mogu varirati ovisno o vrsti čaja koji se koristi

(Jayabalan i sur., 2007). Cardoso i sur. (2020) istraživali su Kombucha napitak pripremljen na bazi zelenog i crnog čaja, pri čemu su otkrili da ukupne koncentracije polifenola variraju od 0,70 mg GAE/mL za zeleni čaj do 1,09 mg GAE/mL za crni čaj. Polifenoli prisutni u Kombucha napitku su odgovorni za antioksidacijsko djelovanje te navodne zdravstvene dobrobiti. Naprimjer, komplikacije koje se javljaju uz dijabetes i rak mogu biti povezane s povećanim oksidativnim stresom, koji se može potisnuti zbog prisutnosti bioaktivnih spojeva koji imaju antioksidacijska svojstva (Bhattacharya i sur., 2013; Srihari i sur., 2013a). Srihari i sur. (2013b) otkrili su da je došlo do smanjenja glikoziliranog hemoglobina (HbA1c) i povećanja razine inzulina u plazmi, glikogena te hemoglobina u tkivima štakora s dijabetesom induciranim streptozotocinom. Štakori su konzumirali 6 mg/kg tjelesne mase liofilizirane Kombuche od crnog čaja tijekom 45 dana liječenja. Uočeno je i značajno smanjenje enzimske aktivnosti glavnih enzima odgovornih za kontrolu glikolize i glukoneogeneze u jetri i mišićima, što ukazuje da Kombucha ima potencijal djelovati na regulacijske mehanizame glukoze (Srihari i sur., 2013b). Također, Bhattacharya i sur. (2013) su uočili potencijalni antidijabetički učinak Kombuche na bazi crnog čaja kod štakora s dijabetesom izazvanim aloksanom. Nakon 14 dana tretmana sa 150 mg/kg tjelesne težine liofiliziranog ekstrakta Kombuche, razina glukoze u krvi se smanjila za približno 56,4 %. Antiproliferativno djelovanje Kombuche dokazano je u nekoliko ljudskih tumorskih stanica kao što su HeLa stanice (epitelni karcinom vrata maternice), MCF-7 (adenokarcinom dojke), HT-29 (adenokarcinom debelog crijeva) (Četojević-Simin i sur., 2012), PC-3 (rak prostate) (Srihari i sur., 2013a), HCT8 (ljudski ileocekalni kolorektalni adenokarcinom), A549 (plućni adenokarcinom), Caco-2 (kolorektalni adenokarcinom) (Cardoso i sur., 2020), Hep2c (stanična linija izvedena iz humanog karcinoma vrata maternice HeLa) i RD (ljudski rhabdomiosarkom- izvedena stanična linija) (Vitas i sur., 2018). Osim toga, mnoga znanstvena istraživanja pokazuju da Kombucha posjeduje antimikrobno djelovanje protiv patogenih bakterija i gljivica. Spojevi prisutni u supstratima i metaboliti koje proizvode bakterije i kvasci prisutni u SCOBY kulturi inhibiraju rast mikroorganizama s potencijalnom patogenošću (Silva i sur., 2021; Battikh i sur., 2011). Bhattacharya i sur. (2016) ispitivali su antimikrobnu aktivnost Kombuche na bazi crnog čaja protiv crijevnih bakterija tijekom 7, 14 i 21 dan. Rezultati su pokazali da Kombucha ima bolje antibakterijsko djelovanje nakon 14. i 21. dana fermentacije, pokazujući bakteriostatsko i baktericidno djelovanje protiv enterohemoragične *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae*, *Shigella flexneri* i *Salmonella tifimurij*. Kombucha može imati protuupalna svojstva (Vázquez-Cabral i sur., 2017) i detoksikacijsko djelovanje (Nguyen i sur., 2015), može doprinijeti poboljšanju funkcije jetre (Wang i sur., 2013), imunološkog sustava i gastrointestinalnih funkcija (Watawana i sur., 2015; Kozyrovska i sur., 2012) te može pomoći u smanjenju razine kolesterola i krvnog tlaka (Jayabalan i sur., 2014). Prema dostupnoj literaturi, Kombuchi se pripisuju mnoge zdravstvene prednosti, no važno je naglasiti da su istraživanja

provedena pretežno na životinjama ili *in vitro* staničnim kulturama životinja ili ljudi.

## 2.6. Antioksidacijska svojstva

Poznato je da su slobodni radikali vrlo reaktivni zbog nesparenog elektrona koji se nalazi u njihovoj strukturi. Oni ometaju normalne funkcije u ljudskom organizmu uzimajući elektrone iz struktura kao što su DNA, RNA, lipidi i proteini. Različite akutne i kronične bolesti su često povezane s oksidativnim stresom izazvanim reaktivnim vrstama kisika i dušika (Neha i sur., 2019). Kako bi se zaštitile i obnovile stanice od oksidativnih oštećenja, antioksidansi poput polifenolnih spojeva, karotenoida te vitamina A, C i E mogu djelovati kao hvatači slobodnih radikala i reducirajući agensi. Ovi spojevi imaju potencijal da umanje toksičnost slobodnih radikala putem oksidacijsko-redukcijskih reakcija (Anantachoke i sur., 2023; Jakubczyk i sur., 2020).

Studije su pokazale da napitci fermentirani sa SCOBY kulturom posjeduju antioksidacijska svojstva (Silva i sur., 2021; Jayabalan i sur., 2008). Ova sposobnost učinkovite borbe protiv slobodnih radikala može se pripisati visokom sadržaju polifenolnih spojeva, posebno flavonoida, koji su prisutni u supstratima korištenim za njihovu proizvodnju (Bhattacharya i sur., 2013). Ukupni sadržaj fenola, ukupni sadržaj flavonoida te antioksidacijski potencijal Kombucha napitaka ovisi o vrsti čaja te uvjetima i trajanju fermentacije (Anantachoke i sur., 2023). Prema brojnim istraživanjima, zabilježeno je da povećanje ukupnog sadržaja fenola i ukupnog sadržaja flavonoida je povezano s antioksidacijskim i drugim biološkim aktivnostima u Kombucha napitcima pripremljenim od različitih supstrata. Rezultati istraživanja su pokazali korelaciju između povećane sposobnosti uklanjanja radikala i viših koncentracija ukupnih polifenolnih spojeva. Kvasci i bakterije prisutne u kulturama Kombuche igraju ključnu ulogu u biokonverziji kemijskih komponenti u supstratima. Tijekom mikrobne fermentacije odvijaju se razne biokemijske reakcije, među kojima neki enzimi mikroorganizama kataliziraju razgradnju polifenolnih kompleksa ili konjugiranih oblika u manje molekule fenolnih spojeva kao što su fenolne kiseline i flavonoidni aglikoni (Cardoso i sur., 2020; Jakubczyk i sur., 2020; Villarreal-Soto i sur., 2019; Bhattacharya i sur., 2013). Osim enzimskih procesa, kiseli uvjeti fermentacije također doprinose razgradnji i hidrolizi složenih molekula (Cardoso i sur., 2020). Kemijska razgradnja koja nastaje tijekom fermentacije, kao i sposobnost mikroorganizama da oslobode bioaktivne spojeve iz biljnih matrica i drugih komponenti, uzrokuju povećanje sadržaja fenolnih i drugih aktivnih spojeva (Zubaidah i sur., 2018; Bhattacharya i sur., 2013). Posljedično, u Kombucha napitku dolazi do povećanja bioraspoloživosti bioaktivnih spojeva i biološke aktivnosti, posebice antioksidacijskog kapaciteta.

Pregledom literature moguće je utvrditi da se antioksidacijski kapacitet Kombucha napitaka može procijeniti korištenjem različitih *in vitro* antioksidacijskih testova, uključujući 2,2-

difenil-1-pikrilhidrazil (engl. *2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl*, *DPPH*), 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonsku kiselinu) (engl. *2,2'-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid*, *ABTS*), aktivnosti hvatanja radikala superoksidnog aniona, hidroksila i dušikovog oksida, kao i antioksidacijske sposobnosti redukcije željeza (engl. *ferric reducing antioxidant power*, *FRAP*) i učinke bakra ( $\text{Cu}_2^+$ ) na inhibiciju peroksidacije lipida (Cardoso i sur., 2020; Jakubczyk i sur., 2020; Gaggia i sur., 2019; Villarreal-Soto i sur., 2019; Chakravorty i sur., 2016; Watawana i sur., 2015; Bhattacharya i sur., 2013). Gaggia i sur. (2019) istraživali su antioksidacijski kapacitet Kombucha napitka na bazi rooibos čaja (*Aspalathus linearis*), zelenog čaja i crnog čaja pomoću DPPH i FRAP metode. Fermentacija je trajala 14 dana, a 7. dan fermentacije je zabilježena najveća antioksidacijska aktivnost zelenog čaja. Najniža antioksidacijska aktivnost bila je u Kombuchi na bazi rooibos čaja. Fu i sur. (2014) su za pripremu Kombucha napitaka koristili jeftini zeleni čaj, crni čaj i čaj u prahu, a proces fermentacije je trajao 90 sati. Određivali su antioksidacijski kapacitet napitaka te usporedili sposobnost hvatanja slobodnih radikala s 2,2-difenil-pikrilhidrazilom (DPPH), hidroksilnim radikalima i superoksidnim radikalima. Rezultati su pokazali da Kombucha napravljena sa zelenim čajem ima najveću sposobnost hvatanja slobodnih radikala protiv DPPH, hidroksilnih radikala i superoksidnih aniona. Velićanski i sur. (2014) otkrili su da Kombucha napitak na bazi infuzije matičnjaka (*M. officinalis* L.) ima dobar antioksidacijski potencijal. U usporedbi s Kombuchom napravljenom od crnog čaja, Kombucha na bazi infuzije matičnjaka pokazala je veću antioksidacijsku aktivnost protiv DPPH. Također, Kombucha na bazi infuzije matičnjaka imala je veću antioksidacijsku aktivnost od obične infuzije matičnjaka (Velićanski i sur., 2014). La Torre i sur. (2021) su proveli *in vitro* određivanje antioksidacijskog kapaciteta metodama DPPH i ABTS te otkrili da fermentirani crni čaj ima oko 70 % veću antioksidacijsku aktivnost od nefermentiranog zaslađenog crnog čaja. Ustanovili su da vrijeme skladištenja utječe na antioksidacijsku aktivnost koja se smanjila nakon pet mjeseci skladištenja. Za razliku od drugih studija, u istraživanju koje su proveli Gamboa-Gómez i sur. (2016), antioksidacijski kapacitet se povećao unatoč smanjenju ukupne količine fenola i flavonoida. Zaključili su da polifenoli nisu jedina skupina kemijskih tvari koje posjeduju antioksidacijsko djelovanje.

## 2.7. Zakonska regulativa

Popularnost Kombuche, kao potencijalno funkcionalnog napitka, postaje sve veća na globalnom tržištu. Danas se Kombucha napitak može pronaći napravljen od različitih supstrata i u raznim okusima (Villarreal-Soto i sur., 2018). Ovaj rast na tržištu pokazuje da sve više i više ljudi konzumira Kombuchu, ali još uvijek postoje neka neriješena pitanja vezana uz kvalitetu i sigurnost proizvoda. Regulacija Kombuche, kao i općenito regulacija nutraceutika, vrlo je oskudna (Batista i sur., 2022). Nacionalna udruga za zdravlje (engl. *National Environmental*

*Health Association, NEHA*) objavila je 2013. godine u časopisu "Journal of Environmental Health" smjernice pod nazivom „Proceduralne smjernice i analiza rizika u fermentaciji Kombuche”. Ove smjernice temelje se na modelu kodeksa upravljanja hranom i lijekovima, kao što je navedeno u dokumentu Agencije za hranu i lijekove (engl. *Food and Drug Administrationrug, FDA*). Smjernice obuhvaćaju analizu rizika prema načelima kritičnih kontrolnih točaka tijekom cijelog procesa proizvodnje i plan sigurnosti hrane (FDA, 2009). U 2018. godini objavljen je nacrt standarda iz Ugande koji definira zahtjeve i metode uzorkovanja i ispitivanja Kombucha napitaka. Ovaj dokument pruža informacije o zahtjevima za kvalitetu Kombuche kao što su maksimalne granice mikrobioloških i kemijskih kontaminanata, higijena i proizvodno rukovanje te analitički parametri (sadržaj alkohola, kiselost u octenoj i mliječnoj kiselini te ukupni šećer) (UNBS, 2018). Centar za kontrolu bolesti Britanske Kolumbije (engl. *British Columbia Centre for Disease Control, BCCDC*) u Kanadi izradio je preporuke za plan sigurnosti hrane u komercijalnoj proizvodnji Kombuche. Ovaj dokument obuhvaća glavne biološke i kemijske rizike te ističe važnost praćenja pH i sadržaja etanola, postavljajući kritične granice za oba parametra. Razina alkohola ne smije prelaziti 1 % niti rasti tijekom roka trajanja proizvoda, a pH ne smije biti ispod 2,5 (BCCDC, 2020). Zapadne zemlje nemaju adekvatne zakonske okvire koji se odnose na funkcionalnu hranu ili nutraceutike jer se ti proizvodi smatraju konceptom, a ne specifičnom kategorijom hrane (Cong i sur., 2020). Budući da je Kombucha napitak koji sadrži probiotike, potrebna je određena pažnja tijekom procesa proizvodnje i čuvanja kako bi se zajamčila sigurnost i kvaliteta proizvoda. Osim pozitivnih učinaka na zdravlje, u literaturi se navode i slučajevi povezani sa zdravstvenim problemima koji su posljedica konzumacije ovog napitka, kao što su glavobolja, vrtoglavica, alergijske reakcije i gastrointestinalna toksičnost (Laavanya i sur., 2021; Villarreal-Soto i sur., 2019; Martínez Leal i sur., 2018). Ovi problemi mogu nastati zbog prekomjerne konzumacije, loših higijenskih uvjeta tijekom pripreme, nepravilne fermentacije, netočnog odabira SCOBY kulture te konzumaciju od strane imunokompromitiranih osoba. Trudnicama se savjetuje izbjegavanje Kombuche zbog mogućeg prisustva alkohola i heparina koji može povećati rizik od krvarenja (Martínez Leal i sur., 2018). Kako bi se pomoglo proizvođačima i potrošačima da bolje razumiju ključne parametre koji trebaju biti pažljivo procijenjeni u proizvodnji Kombuche, osnovana je neprofitna organizacija pod nazivom "Kombucha Brewers International". Cilj ove organizacije je uspostaviti standarde sigurnosti i kvalitete Kombucha proizvoda za proizvođače i omogućiti veću transparentnost informacija za potrošače (Kim i Adhikari, 2020). Međutim, Kombucha proizvodi trebaju bolje regulirane smjernice kako bi se spriječila kontaminacija i zdravstveni rizici uslijed procesa proizvodnje te osigurala kvaliteta tih proizvoda (Batista i sur., 2022).



### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

Cilj eksperimentalnog rada je bio analizirati i pratiti promjene bioaktivnih spojeva i antioksidacijskog kapaciteta u pet različitih uzoraka Kombucha napitaka skladištenih 7, 14 i 21 dan pri 4 °C.

#### 3.1. Materijali

U ovom eksperimentu korišteni su sljedeći materijali:

- Za pripremu uzorka Yerba Mate korišten je Mate čaj (Mate čaj Mate green, Chai, Zagreb, Hrvatska).
- Za pripremu uzorka Crni čaj korišten je Crni čaj Assam "Koomsong" TGFOP1 (Crni čaj Assam "Koomsong" TGFOP1, Chai, Zagreb, Hrvatska).
- Za pripremu uzorka Ocat korištena su sljedeća vina: Cabernet Sauvignon Select od vinarije Belje (berba 2020), G točka Galić Cabernet Sauvignon + Merlot (berba 2021) i Merlot od vinarije Medea (berba 2019).
- Za pripremu uzorka Yerba Mate i Sencha korišteni su čajevi Zeleni čaj Sencha (Zeleni čaj Sencha, Chai, Zagreb, Hrvatska) i Mate čaj (Mate čaj Mate green, Chai, Zagreb, Hrvatska).
- Za pripremu uzorka Drijenak korišten je drijenak koji je ubran u srpnju 2023. godine. Točne koordinate uzgoja su 45°49'26"N 16°03'08"E, a nakon branja plodovi su skladišteni pri -18 °C. U veljači 2024. godine plodovi drijenka su odmrznuti i korišteni za pripremu uzorka.

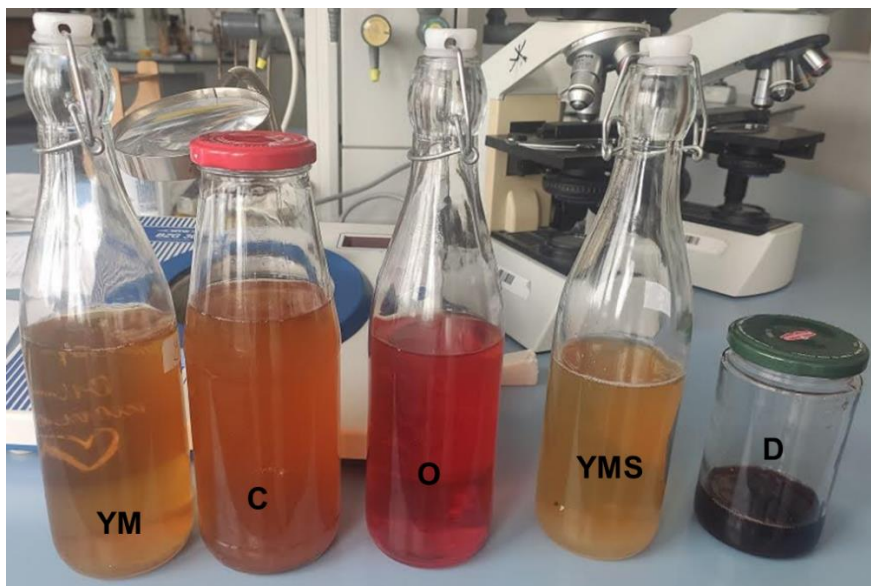
#### 3.2. Metode rada

##### 3.2.1. Priprema uzorka

Za provedbu ovog eksperimentalnog rada pripremljeni su sljedeći uzorci Kombucha napitaka kako slijedi (slika 2):

1. Uzorak YERBA MATE (Y) - u 2 L vode dodano je 16 g čaja i 160 g šećera, prekriveno gazom i fermentirano 10-ak dana.
2. Uzorak CRNI ČAJ (C) - u 2 L vode dodano je 16 g čaja i 160 g šećera, prekriveno gazom i fermentirano 10-ak dana.
3. Uzorak OCAT (O) - u malu staklenku od 400 g dodano je oko 80-100 g šećera te je triput stavljano crno vino (Merlot, Cabernet Sauvignon) tijekom dva mjeseca.
4. Uzorak YERBA MATE I SENCHA (YMS) - u 2 L vode dodano je 16 g čaja i 160 g šećera, prekriveno gazom i fermentirano 10-ak dana.

5. Uzorak DRIJENAK (D) - u 2 L vode dodano je 300 g zamrznutih bobica drijenka te je sve kratko prokuhano, a potom je dodano 130 g šećera i fermentirano 10-ak dana. Uzorci su centrifugirani i profiltrirani pomoću mikro filtera (CHROMAFIL Xtra, PA-45/25, 0,45 µm, Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Njemačka). Svaki uzorak raspodijeljen je u 4 plastične kivete. Prije samih analiza, kivete s uzorcima skladištene su u hladnjaku pri temperaturi 4 °C .



**Slika 2.** Uzorci Kombucha napitaka (*vlastita fotografija*)

Uzorci: YM – Yerba Mate; C – Crni čaj; O – Ocat; YMS – Yerba Mate i Sencha; D – Drijenak

### 3.2.2. Spektrofotometrijsko određivanje bioaktivnih spojeva

#### 3.2.2.1. Određivanje ukupnih fenola

Primjenom spektrofotometrijske metode se u fenolnom ekstraktu uzorka provodi određivanje ukupnih fenola. Spektrofotometrijska metoda se temelji na kolornoj reakciji fenola s Folin-Ciocalteu reagensom. Nastali intenzitet obojenja mjeri se pri 725 nm (Yuan i sur., 2018).

#### *Aparatura i pribor:*

- UV/Vis Spektrofotometar (LLG-uniSpec 2, Spectrophotometer, Meckenheim, Njemačka)
- Staklene kivete
- Analitička vaga Karn (ABJ220-4NM, Kern&Sohn GmbH, Balingen, Njemačka)
- Plastična lađica za vaganje, špatula
- Pipete, volumena 5 mL, 10 mL i 20 mL

- Mikropipete Eppendorf, volumena 1000 i 5000  $\mu\text{L}$
- Staklene epruvete i stalak za epruvete
- Odmjerne tikvice, volumena 25, 100 i 1000 mL
- Staklena čaša volumena 100 i 200 mL
- Vortex Grant-bio (PV-1, Cambs, Engleska)

*Otapala i reagensi:*

- Folin-Ciocalteu reagens (F.C. reagens), 5x razrijeđen (Fisher Scientific UK, Loughborough, Velika Britanija)
- Etanol 96 % (Gram-Mol d.o.o., Zagreb, Hrvatska)
- Natrijev karbonat anhidrid (Lach-ner, s.r.o., Neratovice, Češka)
- Otopina natrijevog karbonata, 7,5 % (w/v)

Priprema: Odvažuje se 75 g bezvodnog natrijeva karbonata u staklenoj čaši, kvantitativno se prenese pomoću destilirane vode u odmjernu tikvicu volumena 1000 mL te nadopuni destiliranom vodom do oznake.

- Standard galne kiseline 97,5 – 102,5 % (Sigma-Aldrich, St. Louis, Kina)
- Otopina standarda galne kiseline 5 g/L

Priprema: Odvažuje se 500 mg galne kiseline u plastičnoj ladici za vaganje, kvantitativno se prenese pomoću 10 mL 96 %-tnog etanola u odmjernu tikvicu od 100 mL i otopi u datom volumenu, a zatim se nadopuni destiliranom vodom do oznake.

Postupak određivanja: U staklene epruvete redom se otpipetira 400  $\mu\text{L}$  adekvatno razrijeđenog ekstrakta (uzorka Kombucha napitka), 400  $\mu\text{L}$  F.C. reagensa (koji je prvotno razrijeđen 5x s destiliranom vodom) i 4 mL 7,5 %-tne otopine natrijevog karbonata. Na isti način pripremi se slijepa proba, ali umjesto ekstrakta koristi se destilirana voda. Reakcijska smjesa u epruvetama se kratko homogenizira pomoću Vortex-a te stoji 20 minuta na sobnoj temperaturi. Apsorbancija se mjeri UV/Vis spektrofotometrom pri valnoj duljini od 725 nm. Mjerenja su provedena u paraleli za svaki uzorak.

Izrada baždarnog pravca: Odvažuje se 500 mg galne kiseline u odmjernoj tikvici od 100 mL, odvaga se otopi u 10 mL 96 %-tnog etanola te se odmjerna tikvica nadopuni do oznake destiliranom vodom. Od te otopine galne kiseline (5 g/L) pripreme se razrjeđenja na način da se redom otpipetira 50, 125, 250, 500, 750 i 1000  $\mu\text{L}$  alikvota standardne otopine galne kiseline u odmjerne tikvice volumena 25 mL te se nadopune destiliranom vodom do oznake. Koncentracije galne kiseline iznose 10, 25, 50, 100, 150, 250 mg/L. Iz svake tikvice otpipetira se 400  $\mu\text{L}$  otopine standarda u staklene epruvete te se redom doda 400  $\mu\text{L}$  F.C. reagensa (koji

je 5x razrijeđen) i 4 mL 7,5 %-tnog natrijeva karbonata (w/v). Slijepa proba se pripremi na isti način, ali umjesto otopine standarda uzima se destilirana voda. Uzorci stoje 20 minuta na sobnoj temperaturi, a nakon toga im se mjeri apsorbancija pri valnoj duljini 725 nm. Nacrta se baždarni pravac iz izmjerenih vrijednosti apsorbancije s vrijednostima koncentracije galne kiseline (mg/L) na apscisi i vrijednostima apsorbancije nanesenim na ordinati pri 725 nm. Koncentracija ukupnih fenola izračuna se prema dobivenoj jednadžbi pravca (1):

$$y = 0,0078x - 0,0032 \quad R^2 = 0,9983 \quad [1]$$

gdje je :

y - apsorbancija uzorka pri 725 nm

x - koncentracija galne kiseline (mg/L),

R<sup>2</sup> - koeficijent determinacije.

### 3.2.2.2. Određivanje ukupnih flavonoida

Određivanje ukupnih flavonoida provodi se primjenom spektrofotometrijske metode koja se temelji na kolornoj reakciji flavonoida s aluminijevim kloridom i kalijevim acetatom. Nastali intenzitet obojenja mjeri se pri 415 nm (Chang i sur., 2002).

#### *Aparatura i pribor*

- UV/Vis Spektrofotometar (LLG-uniSpec 2, Spectrophotometer, Meckenheim, Njemačka)
- Staklene kivete
- Analitička vaga Kern (ABJ220-4NM, Kern&Sohn GmbH, Balingen, Njemačka)
- Plastične lađice za vaganje, špatula
- Pipete, volumena 5 mL, 10 mL
- Mikropipete Eppendorf od 200, 1000 i 5000 µL
- Odmjerne tikvice, volumena 25, 100, 200 i mL
- Menzura, volumena 100 mL i 1000 mL
- Staklene epruvete i stalak za epruvete
- Vortex Grant-bio (PV-1, Cambs, Engleska)

#### *Otapala i reagensi*

- Etanol 96 % (Gram-Mol d.o.o., Zagreb, Hrvatska)
- Aluminijev klorid, 98,5 %, anhidrid (Acros Organics, Geel, Belgija)
- Aluminijev klorid, 10 % (w/v)

Priprema: Otopi se 10 g aluminijevog klorida u 10 mL destilirane vode, kvantitativno se prenese

u odmjernu tikvicu volumena 100 mL i nadopuni destiliranom vodom do oznake.

- Kalijev acetat, 99 %, anhidrid (Acros Organics, Geel, Belgija)
- Kalijev acetat, 1 M

Priprema: Otopi se 9,845 g kalijevog acetata u 10 mL destilirane vode, kvantitativno se prenese u odmjernu tikvicu volumena 100 mL i nadopuni destiliranom vodom do oznake.

- Standard kvercetin, 95 %, hidrat (Acros Organics, Kina)
- Otopina standarda kvercetina, 200 mg/L

Priprema: U plastičnoj lađici za vaganje odvaži se 20 mg standarda kvercetina te se pomoću 10 mL 100 %-tnog metanola kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu od 200 mL i otopi u datom volumenu. Odmjerna tikvice se nadopuni metanolom do oznake. Redom se iz alikvotne otopine prirede razrjeđenja od 10, 25, 50, 75, 100 i 150 mg/L.

- Mravlja kiselina 98 % p.a. (Lach-ner, s.r.o., Neratovice, Češka)
- 1 %-tna mravlja kiselina u 80 %-tnom metanolu (v/v)

Postupak određivanja: Redom se otpipetira se u staklenu epruvetu 0,5 mL ekstrakta (uzorka Kombucha napitka), 1,5 mL 96 %-tnog etanola, 0,1 mL 10 %-tnog aluminijevog klorida, 0,1 mL 1 M kalijevog acetata i 2,8 mL destilirane vode. Slijepa proba pripremi se na isti način, ali se umjesto ekstrakta koristi destilirana voda i umjesto 10 %-tnog aluminijevog klorida dodaje se isti volumen destilirane vode (0,1 mL). Reakcijska smjesa u epruvetama se kratko homogenizira na Vortex uređaju te potom stoji 30 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon toga mjeri se apsorbancija (optička gustoća otopine) pri valnoj duljini 415 nm. Određivanje se provodi u paraleli za svaki uzorak.

Izrada baždarnog pravca: Potrebno je pripremiti otopinu standarda kvercetina koncentracije 200 mg/L. Od te otopine standarda pripreme se razrjeđenja koncentracije 10, 25, 50, 75, 100 i 150 mg/L u odmjernim tikvicama od 25 mL tako da se redom otpipetira u svaku tikvicu 1,25; 3,125; 6,25; 9,375; 12,5 i 18,75 alikvota standardne otopine te nadopuni se 100 %-tnim metanolom do oznake. Za analizu se uzima i alikvotna otopina standarda koncentracije 200 mg/L. Iz svake tikvice otpipetira se redom 0,5 mL otopine standarda, 1,5 mL 96 %-tnog etanola, 0,1 mL 10 %-tnog aluminijevog klorida, 0,1 mL 1 M kalijevog acetata i 2,8 mL destilirane vode. Slijepa proba se pripremi na isti način, ali se umjesto otopine standarda uzima 100 %-tni metanol te se umjesto 10 %-tnog aluminijevog klorida dodaje isti volumen destilirane vode (0,1 mL). Apsorbancija se mjeri pri 415 nm nakon što reakcijska smjesa odstoji 30 minuta pri sobnoj temperaturi. Iz izmjerenih vrijednosti apsorbancija nacrti se baždarni pravac pri čemu su na apscisi nanosene koncentracije kvercetina (mg/L), a na ordinati izmjerene vrijednosti apsorbancije pri 415 nm. Koncentracija ukupnih flavonoida izračuna se prema dobivenoj

jednadžbi pravca (2):

$$y = 0,0064x - 0,0362 \quad R^2 = 0,9998 \quad [2]$$

gdje je:

y - apsorbancija pri 415 nm,

x - koncentracija kvercetina (mg/L),

R<sup>2</sup> - koeficijent determinacije.

### 3.2.2.3. Određivanje ukupnih hidroksicimetnih kiselina i flavonola

Određivanje ukupnih hidroksicimetnih kiselina i flavonola provodi se spektrofotometrijskom metodom pri čemu se intenzitet nastalog obojenja ekstrakta uzorka mjeri pri 320 nm i 360 nm (Howard i sur., 2003).

#### Aparatura i pribor

- UV/Vis Spektrofotometar (LLG-uniSpec 2, Spectrophotometer, Meckenheim, Njemačka)
- Staklene i kvarcne kivete
- Analitička vaga Kern (ABJ220-4NM, Kern&Sohn GmbH, Balingen, Njemačka)
- Plastična lađica za vaganje, špatula
- Pipete, volumena 1 mL, 2 mL, 5 mL, 10 mL i 25 mL
- Mikropipete Eppendorf od 200, 1000 i 5000 µL
- Odmjerne tikvice, volumena 25 mL i 100 mL
- Staklene epruvete i stalak za epruvete
- Vortex Grant-bio (PV-1, Cambs, Engleska)

#### Otapala i reagensi

- Koncentrirana klorovodična kiselina 37 % (Lach-ner, s.r.o., Neratovice, Češka)
- Etanol 96 % (Gram-Mol d.o.o., Zagreb, Hrvatska)
- Klorovodična otopina 1 g/L HCl u 96 %-tnom etanolu (v/v)

Priprema: Otpipetira se 0,227 mL 37 %-tne klorovodične kiseline u odmjernu tikvicu volumena 100 mL te nadopuni do oznake 96 %-tnim etanolom.

- Klorovodična otopina 2 g/L HCl u vodi (v/v)

Priprema: Otpipetira se 0,454 mL 37 %-tne klorovodične kiseline u odmjernu tikvicu volumena 100 mL te nadopuni do oznake destiliranom vodom.

- Standard kvercetin hidrat 95 % (Acros Organics, Kina)
- Otopina standarda kvercetina 600 mg/L

Priprema: Prvo se pripremi otopina standarda kvercetina u koncentraciji 600 mg/L. U plastičnoj lađici za vaganje odvažuje se 60 mg standarda kvercetina te se kvantitativno prenese pomoću 30 mL 100 %-tnog metanola u odmjernu tikvicu od 100 mL i otopi u datom volumenu. Odmjerna tikvica se nadopuni metanolom do oznake.

- Klorogenska kiselina, min. 95 %-tna (Alfa aesar, ThermoFisher, Kandel, Njemačka)
- Standard klorogenske kiseline koncentracije 600 mg/L

Priprema: Prvo se pripremi otopina standarda klorogenske kiseline u koncentraciji 600 mg/L. U plastičnoj lađici za vaganje odvažuje se 60 mg standarda klorogenske kiseline te se pomoću 30 mL 100 %-tnog metanola kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu od 100 mL i otopi u datom volumenu. Odmjerna tikvica se nadopuni metanolom do oznake.

Postupak određivanja: Otpipetira se u staklenu epruvetu redom 250  $\mu$ L adekvatno razrijeđenog ekstrakta (uzorka Kombucha napitka), 250  $\mu$ L 1 g/L HCl u 96 % etanolu i 4,55 mL 2 g/L HCl. Slijepa proba se pripremi na isti način, ali se umjesto ekstrakta dodaje isti volumen destilirane vode. Reakcijska smjesa u epruvetama se kratko homogenizira pomoću vortex-a. Za određivanje ukupnih hidroksicimetnih kiselina apsorbancija se mjeri na 320 nm koristeći kvarcne kivete, dok se za određivanje ukupnih flavanola apsorbancija mjeri na 360 nm koristeći staklene kivete. Određivanje se provodi u paraleli za svaki uzorak.

Izrada baždarnog pravca: Kvantifikacija ukupnih hidroksicimetnih kiselina provodi se pomoću jednadžbe baždarnog pravca za klorogensku kiselinu, a kvantifikacija ukupnih flavanola provodi se pomoću jednadžbe baždarnog pravca za kvercetin.

Iz alikvotne otopine standarda klorogenske kiseline 600 mg/L potrebno je prirediti razrjeđenja 10, 25, 50, 75, 100, 150, 200, 300 i 500 mg/L u odmjernim tikvicama od 25 mL tako da se otpipetira iz otopine alikvota redom 0,416; 1,042; 2,083; 3,125; 4,166; 6,25; 8,333; 12,5 i 20,833 mL te nadopuni 100 %-tnim metanolom do oznake. Slijepa proba se pripremi na isti način, ali se umjesto standarda uzima 100 %-tni metanol. U staklenoj epruveti pripremi se reakcijska otopina na način da se otpipetira redom 250  $\mu$ L otopine standarda, 250  $\mu$ L 1 g/L HCl u 96 % etanolu i 4,55 mL 2 g/L HCl. Apsorbancija se mjeri na 320 nm u kvarcnim kivetama. Koncentracija ukupnih hidroksicimetnih kiselina izračuna se prema dobivenoj jednadžbi pravca (3):

$$y = 0,0025x - 0,0038 \quad R^2 = 0,9996 \quad [3]$$

gdje je:

y - apsorbancija pri 320 nm,

x - koncentracija klorogenske kiseline (mg/L),

R<sup>2</sup> - koeficijent determinacije.

Iz alikvotne otopine standarda kvercetina 600 mg/L potrebno je prirediti razrjeđenja 10, 25, 50, 75, 100, 150, 200, 300, 400 i 500 mg/L u odmjernim tikvicama od 25 mL tako da se otpipetira redom 0,416; 1,042; 2,083; 3,125; 4,166; 6,25; 8,333; 12,5 i 20,833 mL te nadopuni 100 %-tnim metanolom do oznake. Na isti način se pripremi i slijepa proba, ali se umjesto standarda uzima 100 %-tni metanol. U staklenoj epruveti se pripremi reakcijska otopina na način da se otpipetira redom 250 µL otopine standarda, 250 µL 1 g/L HCl u 96 % etanolu i 4,55 mL 2 g/L HCl. Apsorbancija se mjeri na 360 nm u staklenim kivetama. Koncentracija ukupnih flavanola izračuna se prema dobivenoj jednadžbi pravca (4):

$$y = 0,0026x + 0,0083 \quad R^2 = 0,9995 \quad [4]$$

gdje je:

x - apsorbancija pri 360 nm,

y - koncentracija kvercetina (mg/L),

R<sup>2</sup> - koeficijent determinacije.

#### 3.2.2.4. Određivanje polimernih proantocijanidina vanilin metodom

Određivanje polimernih proantocijanidina vanilin metodom temelji se na specifičnosti spojeva iz skupine flavan-3-ola da reagiraju s vanilinom pri čemu nastaju obojeni spojevi. Dobiveni obojeni spojevi kvantitativno se određuju mjerenjem nastalog intenziteta obojenja pri 500 nm (Sun i sur., 1998).

#### Aparatura i pribor:

- Spektrofotometar (LLG-uniSpec 2, Spectrophotometer, Meckenheim, Njemačka)
- Staklene kivete
- Analitička vaga Kern (ABJ220-4NM, Kern&Sohn GmbH, Balingen, Njemačka)
- Plastične lađice za vaganje, špatula
- Pipete, volumena 10 mL i 25 mL
- Mikropipete Eppendorf volumena 100 µL, 1000 µL i 5000 µL
- Odmjerne tikvice, volumena 25 mL, 50 mL, 100 mL i 1000 mL
- Menzure, volumena 100 mL i 1000 mL
- Staklene epruvete i stalak za epruvete
- Staklene čaše volumena 50 mL, 100 mL i 250 mL
- Vortex Grant-bio (PV-1, Cambs, Engleska)

#### Otapala i reagensi:

- Metanol za HPLC ≤ 99,9 % (Honeywell, Riedel-de-Haën TM, Francuska)



- Vanilin, 99 % (ThermoFisher, Kandel, Njemačka)
- 1 %-tna metanolna otopina vanilina

Priprema: Odvažuje se 1 g vanilina se u odmjerne tikvici od 100 ml te nadopuni 100 %-tnim metanolom do oznake.

- Koncentrirana H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 96 % (Lach-ner, s.r.o., Neratovice, Češka)
- 25 %-tna otopina H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

Priprema: Prenese se 13,02 mL 96 %-tne H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> u odmjernu tikvicu volumena 50 mL u koju je prethodno dodano oko 20 mL 100 %-tnog metanola. Tikvica se obavezno drži u hladnoj vodenoj kupelji, a koncentracija H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> se dodaje postepeno u malim obrocima. Tikvica se nadopuni 100 %-tnim metanolom do oznake po dodatku cijelog volumena kiseline.

- Standard katehina (5 g/L)

Priprema: Odvažuje se 500 mg standarda katehina u plastičnoj ladici za vaganje te se pomoću 10 mL 100 %-tnog metanola kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu od 100 mL i otopi u datom volumenu. Odmjerna tikvica se nadopuni metanolom do oznake.

Postupak određivanja: U staklenu epruvetu otpipetira se redom 2,5 mL 1 %-tnog vanilina, 2,5 mL 25 %-tne otopine H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> i 1 mL adekvatno razrijeđenog ekstrakta (odnosno uzorka Kombucha napitka). Slijepa proba se pripremi na isti način, ali se umjesto ekstrakta uzima destilirana voda. Reakcijska smjesa u epruvetama se kratko promiješa pomoću vortex-a te potom stoji 10 minuta pri sobnoj temperaturi. Mjeri se optička gustoća otopine pri valnoj duljini 500 nm. Mjerenja su provedena u paraleli za svaki uzorak.

Izrada baždarnog pravca: Za pripremu baždarnog pravca pripremi se alikvotna otopina standarda katehina koncentracije 5 g/L. Od te otopine pripreme se razrjeđenja u koncentracijama 10, 30, 60, 90 i 120 mg/L tako da se otpipetira redom 50, 150, 300, 450 i 600 µL alikvotne otopine u odmjerne tikvice volumena 25 mL te se nadopune 100 %-tnim metanolom do oznake. U staklene epruvete otpipetira se redom 1 mL otopine standarda, 2,5 mL 1 %-tnog vanilina i 2,5 mL 25 %-tne otopine H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Slijepa proba se pripremi na isti način, ali se umjesto otopine standarda uzima 100 %-tni metanol. Nakon 10 minuta, apsorbancija se mjeri pri valnoj duljini 500 nm. Iz izmjerenih vrijednosti apsorbancija nacrtava se baždarni pravac pri čemu su na apscisi nanosene koncentracije katehina, a na ordinati izmjerene vrijednosti apsorbancije pri 500 nm. Koncentracija polimernih proantocijanidina izračuna se prema dobivenoj jednadžbi pravca (5):

$$y = 0,0053x - 0,0124 \quad R^2 = 0,9985 \quad [5]$$

gdje je:

y - apsorbancija pri 500 nm,

x - koncentracija katehina (mg/L),

R<sup>2</sup> - koeficijent determinacije.

### 3.2.2.5. Određivanje monomernih antocijana

Metoda određivanja monomernih antocijana temelji se na tome da pri promjeni pH vrijednosti monomerni antocijani reverzibilno mijenjaju svoju kemijsku strukturu što rezultira promjenom apsorpcijskog spektra. Snižanjem pH otopine dolazi do povećanja apsorpcije i obrnuto, a koncentracija antocijana proporcionalna je razlici apsorpcija u otopinama kod dvije različite pH vrijednosti pri valnoj dužini maksimalne apsorpcije za pojedine antocijane (AOAC, 1990).

#### *Aparatura i pribor*

- Spektrofotometar (LLG-uniSpec 2, Spectrophotometer, Meckenheim, Njemačka)
- Staklene kivete
- pH metar Mettler-Toledo FiveEasy F20 (Mettler-Toledo GmbH, Greifensee, Švicarska)
- Analitička vaga Kern (ABJ220-4NM, Kern&Sohn GmbH, Balingen, Njemačka)
- Plastična ladica za vaganje, špatula
- Mikropipete Eppendorf, volumena 1000 µL i 5000 µL
- Staklene epruvete i stalak za epruvete
- Staklena čaše, volumena 100 mL i 1000 mL
- Odmjerne tikvice, volumena 25 mL i 1000 mL
- Vortex Grant-bio (PV-1, Cambs, Engleska)

#### *Otapala i reagensi*

- Klorovodična kiselina 37 % (Lach-Ner, s.r.o., Neratovice, Češka)
- Kalij klorid 99,0-100,5 % (ThermoFisher GmbH, Kandel, Njemačka)
- Kalij kloridni pufer pH 1,0 (kalij klorid 0,025 M)

Priprema: Odvaži se 1,86 g kalijeva klorida (KCl) u plastičnoj ladici za vaganje i kvantitativno se prenese u staklenu čašu od 1000 mL koja se prije upotrebe dobro ispere destiliranom vodom. Doda se 960 mL destilirane vode u čašu i otopi se odvaga. Izmjeri se pH pripremljenoj otopini te se podesi pH na vrijednost 1,0 ( $\pm 0,05$ ) s 37 %-tnom klorovodičnom kiselinom čiji utrošak približno iznosi 10 mL. Otopina kad je podešena na pH 1,0 prebaci se u odmjernu tikvicu volumena 1000 mL, koja se prije upotrebe dobro ispere destiliranom vodom, te se nadopuni destiliranom vodom do oznake.

- Natrij acetat anhidrid 99 % (ThermoFisher GmbH, Kandel, Njemačka)

- Natrij acetatni pufer 4,5 (natrijev acetat, 0,4 M)

Priprema: Odvaže se 54,43 g natrijeva acetata trihidrata ( $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{Na} \times 3\text{H}_2\text{O}$ ) u staklenoj čaši od 100 mL i kvantitativno se prenese u staklenu čašu od 1000 mL koja se prije upotrebe dobro ispere destiliranom vodom. Doda se 930 mL destilirane vode u čašu i odvaga se otopi. Izmjeri se pH pripremljenoj otopini i podesi na vrijednost 4,5 ( $\pm 0,05$ ) s 37 %-tnom klorovodičnom kiselinom čiji utrošak približno iznosi 35 mL. Otopina kad je podešena na pH 4,5 prebaci se u odmjernu tikvicu volumena 1000 mL, koja se prije upotrebe dobro ispere destiliranom vodom te se nadopuni destiliranom vodom do oznake.

Postupak određivanja: U staklenim epruvetama postavlja se reakcija tako da se za mjerenje jednog uzorka pripreme po dvije epruvete i označe oznakama pufera (za isti uzorak se na jednu epruvetu napiše pH 1, a na drugu pH 4,5). U svaku epruvetu otpipetira se 1 mL uzorka, a zatim se u jednu epruvetu nadoda 4 mL pufera pH 1,0 i u drugu 4 mL pufera pH 4,5. Pripremljene reakcijske otopine se kratko promiješaju na Vortex uređaju te zatim stoje 20 minuta pri sobnoj temperaturi. Apsorbancija se mjeri pri valnim duljinama 520 nm i 700 nm, a destilirana voda se koristi za slijepu probu. Mjerenja su provedena u paraleli za svaki uzorak.

Izračunavanje monomernih antocijana: Koncentracija monomernih antocijana u uzorku izračunava se kao ekvivalent pelargonidin-3-glukozida (mg/L) prema formuli (6):

$$\frac{A * MW * DF * 10^3}{\epsilon * l} \quad [6]$$

gdje je:

$$A = (A_{520\text{nm}} - A_{700\text{nm}})_{\text{pH}=1,0} - (A_{520\text{nm}} - A_{700\text{nm}})_{\text{pH}=4,5} \text{ (nm)},$$

MW - molekulska masa (za pelargonidin-3-galaktozid  $\text{C}_{21}\text{H}_{21}\text{ClO}_{10}$  = 468,8 g/mol),

DF - faktor razrjeđenja,

$10^3$  - faktor za preračunavanje g u mg,

$\epsilon$  - molarni apsorpcijski ekstinkcijski koeficijent (za pelargonidin-3-galaktozid 22400 L/molcm u otapalu 1 % HCl/MeOH),

l - debljina kivete (1 cm).

### 3.2.3. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta

#### 3.2.3.1. FRAP metoda

Određivanje antioksidacijskog kapaciteta FRAP metodom temelji se na reakciji redukcije žuto obojenog kompleksa željezo-2,4,6-tris-2-piridil-s-triazina (TPTZ) pri čemu nastaje plavo obojeni kompleks fero-tripiridiltriazin. Plavo obojeni fero-tripiridiltriazin ima apsorpcijski maksimum pri 593 nm (Benzie, 1996).

### *Aparatura i pribor*

- UV/Vis Spektrofotometar (LLG-uniSpec 2, Spectrophotometer, Meckenheim, Njemačka)
- Staklene kivete
- Analitička vaga Kern (ABJ220-4NM, Kern&Sohn GmbH, Balingen, Njemačka)
- Tehnička vaga Kern (PCB 2500-2, Kern&Sohn GmbH, Balingen, Njemačka)
- Plastična lađica za vaganje, špatula
- Vortex Grant-bio (PV-1, Cambs, Engleska)
- Mikropipete Eppendorf od 100, 200, 1000 i 5000  $\mu$ L
- Odmjerne tikvice, volumena 10 mL, 100 mL i 1 L
- Staklene epruvete i stalak za epruvete

### *Otapala i reagensi*

- Metanol za HPLC  $\leq$  99,9 % (Honeywell, Riedel-de-Haën TM, Francuska)
- Standard Troloxa (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karbonska kiselina) (Biosynth s.r.o., Bratislava, Slovačka)
- Otopina Troloxa (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karbonska kiselina), 1 mM

Priprema: Za pripremu baždarnog pravca pripremi se 1 mM otopina Troloxa (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karbonska kiselina) tako da se odvaže 0,025 g Troloxa. Odvaga se otopi u 100 %-tnom metanolu i nadopuni metanolom u odmjernoj tikvici od 100 mL.

- Klorovodična kiselina, 37 %-tna (Lach-Ner, s.r.o., Neratovice, Češka)
- Klorovodična kiselina, 40 mM

Priprema: Otpipetira se 330  $\mu$ L 37 %-tne klorovodične kiseline i nadopuni destiliranom vodom u odmjernoj tikvici od 100 mL.

- TPTZ-a (2,4,6-tris-2-piridil-s-triazin) (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
- TPTZ-a (2,4,6-tris-2-piridil-s-triazin), 10 mM

Priprema: U plastičnoj lađici za vaganje odvaže se 0,078 g TPTZ-a i kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu volumena 25 mL te nadopuni s 40 mM klorovodičnom kiselinom do oznake.

- Željezo (III)-klorid heksahidrat ( $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$ ) (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- Željezo (III)-klorid heksahidrat ( $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$ ), 20 mM otopina

Priprema: U plastičnoj lađici za vaganje odvaže se 0,541 g željezo (III)-klorida heksahidrata u plastičnoj lađici za vaganje i kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu volumena 100 mL te nadopuni s destiliranom vodom do oznake.

- Glacijalna octena kiselina,  $\geq$  99,8 % (Honeywell, Fluka TM, Seelze, Njemačka)
- Natrijev acetat trihidrat otporan prema kalijevu permanganatu (Kemika, Zagreb,

Hrvatska)

- Acetatni pufer, 0,3 M, pH 3,6

Priprema: U plastičnoj lađici za vaganje odvažuje se 3,1 g natrij-acetat trihidrata i kvantitativno prenese pomoću destilirane vode u odmjernu tikvicu volumena 1 L, u koju se zatim otpipetira 16 mL glacijalne octene kiseline i nadopuni se destiliranom vodom do oznake.

- FRAP reagens

Priprema: U staklenoj čaši volumena 50 mL pripremi se FRAP reagens na način da se pomiješa 250 mL acetatnog pufera (0,3 M), 25 mL TPTZ reagensa i 25 mL željezo (III)-klorida u omjeru 10:1:1.

Prije početka rada sve reagense (uključujući i standarde) potrebno je inkubirati na 37 °C.

Postupak određivanja: Otpipetira se staklenu epruvetu redom 600 µL adekvatno razrijeđenog ekstrakta (odnosno Kombucha napitka) i 4500 µL FRAP reagensa. Slijepa proba sadržava sve osim uzorka umjesto kojeg se dodaje destilirana voda. Reakcijska smjesa se dobro promiješa pomoću Vortex-a te 10 minuta termostatira na temperaturi 37 °C. Zatim se mjeri apsorbancija pri 593 nm. Mjerenja su provedena u paraleli za svaki uzorak.

Izrada baždarnog pravca: Za pripremu baždarnog pravca pripremi se 1 mM otopina Troloxa (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karbonska kiselina) na način da se odvažuje 0,025 g Troloxa. Odvaga se otopi 96 %-tnim etanolom, kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu volumena 100 mL te nadopuni 96 %-tnim etanolom do oznake. Zatim, od 1 mM otopine Troloxa pripreme se razrijeđenja u koncentracijama 25, 50, 100, 200 i 300 µM tako da se redom otpipetira 0,625; 1,25; 2,5; 5 i 7,5 mL u odmjerne tikvice od 25 mL te se iste nadopune 96 %-tnim etanolom do oznake. U staklene epruvete otpipetira se redom 600 µL otopine standarda i 4500 µL FRAP reagensa, dobro se promiješa pomoću vortex-a te 10 minuta termostatira na temperaturi 37 °C u vodenoj kupelji. Slijepa proba sadrži sve osim uzorka umjesto kojeg se dodaje 100 %-tni metanol. Apsorbancija se mjeri pri 593 nm. Iz izmjerenih vrijednosti apsorbancije nacrtava se baždarni pravac s vrijednostima koncentracije Troloxa (µM) na apscisi i vrijednostima apsorbancije nanesenim na ordinati. Iz pripadajuće jednadžbe pravca izračuna se antioksidacijski kapacitet uzoraka određen FRAP metodom (7):

$$y = 0,005x - 0,0081 \quad R^2 = 0,9992 \quad [7]$$

gdje je:

y - apsorbancija pri 593 nm,

x - koncentracija Troloxa (µM),

R<sup>2</sup> - koeficijent determinacije.

### 3.2.3.2. ABTS metoda

Metoda se temelji na sposobnosti antioksidansa da reduciraju stabilni radikal kation 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina) (ABTS<sup>+</sup>). Stabilni ABTS<sup>+</sup> kation u prisutnosti antioksidansa reducira se u ABTS<sup>•</sup>, a u reakciji se ispoljava obezbojenjem plavo-zelene otopine (Re i sur., 1999).

#### Aparatura i pribor

- UV/Vis Spektrofotometar (LLG-uniSpec 2, Spectrophotometer, Meckenheim, Njemačka)
- Staklene kivete
- Analitička vaga Kern (ABJ220-4NM, Kern&Sohn GmbH, Balingen, Njemačka)
- Tehnička vaga Kern (PCB 2500-2, Kern&Sohn GmbH, Balingen, Njemačka)
- Vortex Grant-bio (PV-1, Cambs, Engleska)
- Mikropipete Eppendorf od 100, 200, 1000 i 5000  $\mu$ L
- Odmjerne tikvice, volumena 5 mL, 10 mL, 25 mL i 100 mL
- Staklene epruvete i stalak za epruvete
- Plastična lađica za vaganje, špatula

#### Reagensi i otapala

- 7 mM otopina ABTS<sup>+</sup> (m/v)

Priprema: Odvaže se 0,0192 g ABTS<sup>+</sup> te otopi u odmjernoj tikvici od 5 mL i nadopuni do oznake destiliranom vodom.

- 140 mM otopine kalijeva persulfata (m/v), K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>

Priprema: Odvaže se 0,18920 g K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> te otopi u odmjernoj tikvici od 5 ml i nadopuni do oznake destiliranom vodom.

Priprema ABTS<sup>+</sup> otopine: Prvi dan se doda 88  $\mu$ L K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> u 5 mL ABTS-a pri čemu konačna koncentracija K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> iznosi 2,45 mmol/L te ova otopina predstavlja ABTS<sup>+</sup> reagens. Zatim se tikvica obloži aluminijskom folijom i čuva u mraku od 12 do 16 sati. Drugi dan se od pripremljenog ABTS<sup>+</sup> reagensa priprema 1 %-tna ABTS otopina pri čemu se pripremljeni ABTS<sup>+</sup> reagens uzima se kao 100 %-tna otopina. Otpipetira se 1000  $\mu$ L ABTS<sup>+</sup> reagensa u odmjernu tikvicu volumena 100 mL te nadopuni do oznake 96 %-tnim etanolom. Pripremljenoj otopini mjeri se apsorbancija pri 734 nm uz 96 %-tni etanol kao slijepu probu te ona treba iznositi 0,734  $\pm$  0,02. ABTS<sup>+</sup> otopinu potrebno je razrijediti 96 %-tnim etanolom ako je apsorbancija veća od 0,734, a ako je apsorbancija manja od 0,734, potrebno je nadodati ABTS<sup>+</sup> reagensa te uzastopno ponavljati mjerenja dok se ne dostigne zadana apsorbancija.

Postupak određivanja: U staklenu epruvetu se otpipetira 240  $\mu\text{L}$  adekvatno razrijeđenog ekstrakta (odnosno uzorka Kombucha napitka) te se doda 3 mL ABTS<sup>+</sup> otopine. Sadržaj epruvete dobro se promiješa na Vortex uređaju. Etanol se koristi kao slijepa proba, a apsorbancija se mjeri pri 734 nm točno nakon 10 minuta inkubacije na sobnoj temperaturi u mraku.

Izračun: Rezultati se mogu prikazati kao % inhibicije putem formule (8) ili pomoću jednadžbe baždarnog dijagrama (8):

$$I (\%) = [(A_o - A_s) / A_o] * 100 \quad [8]$$

gdje je:

$A_o$  - apsorbancija ABTS<sup>+</sup> otopine (nm),

$A_s$  - apsorbancija uzorka (nm).

Izrada baždarnog pravca: Za pripremu baždarnog pravca pripremi se 1 mM otopina Troloxa i od nje razrijeđena kako je opisano u poglavlju 3.2.3.1.

U staklene epruvete otpipetira se redom 160  $\mu\text{L}$  otopine standarda i 2 mL ABTS<sup>+</sup> otopine. Apsorbancija se mjeri na 734 nm točno nakon 10 minuta inkubacije na sobnoj temperaturi u mraku uz etanol kao slijepu probu. Na temelju podataka dobivenih u ovom radu jednadžba baždarnog pravca glasi (9):

$$y = - 0,0015x + 0,5143 \quad R^2 = 0,9992 \quad [9]$$

gdje je:

$y$  - apsorbancija pri 734 nm (nm),

$x$  - koncentracija ABTS<sup>+</sup> otopine (mM),

$R^2$  - koeficijent determinacije.

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom radu ispitivan je utjecaj skladištenja bez pristupa svjetla tijekom 7, 14 i 21 dan pri temperaturi od 4 °C na sadržaj bioaktivnih spojeva i antioksidacijski kapacitet u pet Kombucha uzoraka (Yerba Mate, Crni čaj, Ocat, Yerba Mate i Sencha, Drijenak), te su analizirane razlike u ispitivanim svojstvima između uzoraka.

Dobiveni rezultati prikazani su grafički kao srednja vrijednost dvaju paralelnih mjerenja  $\pm$  standardna devijacija, a rezultati su iskazani u postotcima kao porast i/ili smanjenje koncentracije ukupnih fenola, ukupnih flavonoida, hidroksicimetnih kiselina, flavonola, polimernih proantocijanidina, monomernih antocijana i antioksidacijskog kapaciteta (FRAP i ABTS).

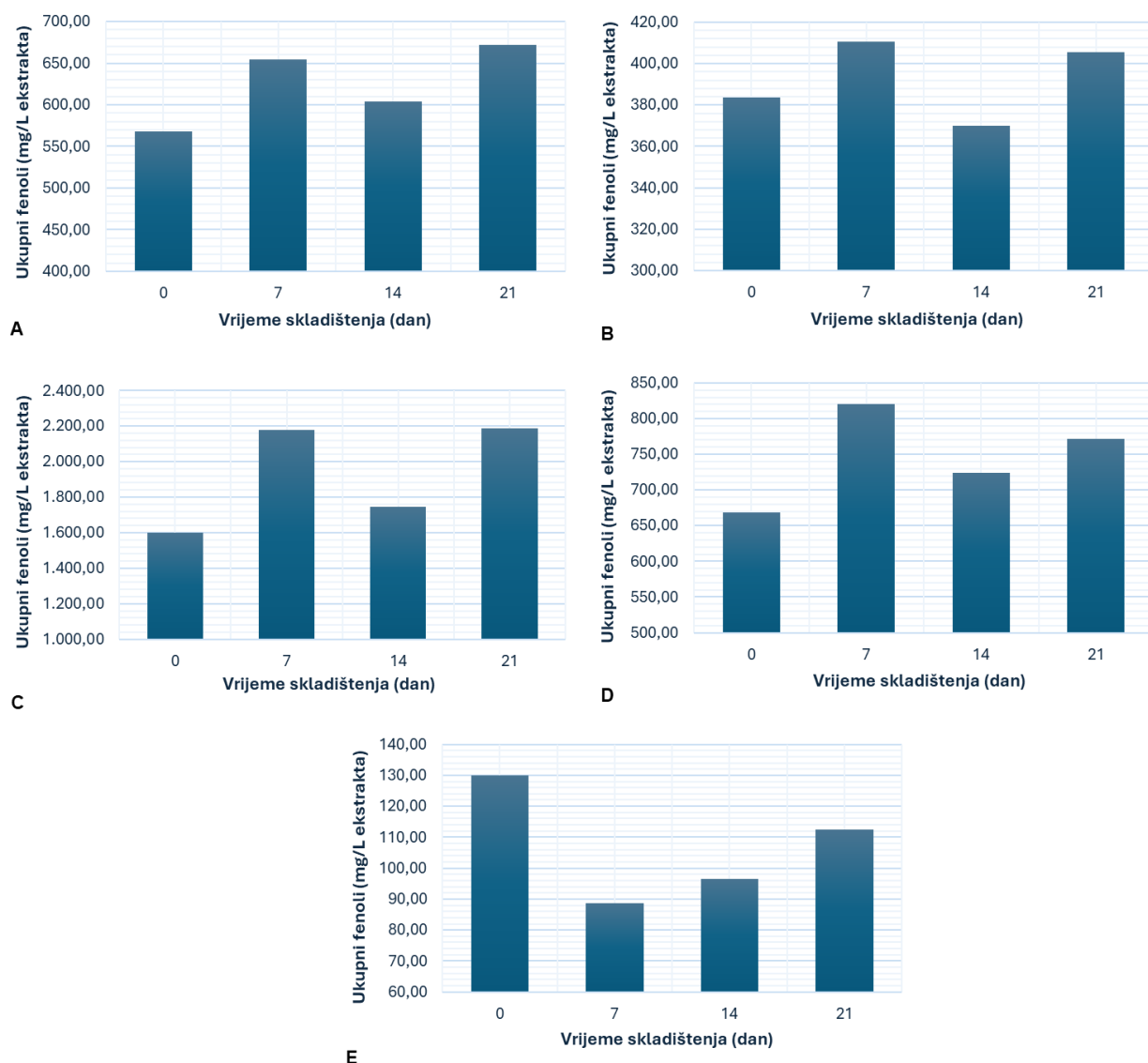
### 4.1. Utjecaj skladištenja na ukupne fenole

Na slici 3 prikazana je promjena koncentracije ukupnih fenol u uzorcima Yerba Mate (YM), crni čaj (C), ocat (O), Yerba Mate i Sencha (YMS) te drijenak (D) tijekom skladištenja u trajanju od 7, 14 i 21 dan.

Prema Vitas i sur. (2018), količina ukupnih fenola u Kombucha napitcima uglavnom ovisi o količini polifenolnih spojeva prisutnih u supstratima koji se koriste za proizvodnju Kombuche. Tijekom fermentacije, ti se spojevi transformiraju djelovanjem mikroorganizama, pridonoseći ukupnom polifenolnom sadržaju konačnog Kombucha napitka. Prema tome, što više fenolnih spojeva sadrži supstrat, to će vjerojatno veća količina ukupnih fenola biti prisutna u Kombucha napitku nakon fermentacije. Prema dobivenim rezultatima, evidentno je da na početku skladištenja od svih uzoraka najveću količinu ukupnih fenola sadrži uzorak O, zatim slijede uzorci YMS, YM i C, dok je najmanja količina zabilježena u uzorku D. Budući da uzorak O sadrži znatno više ukupnih fenola od ostalih uzoraka, može se zaključiti da je Kombucha na bazi octa visokovrijedan izvor polifenolnih spojeva te da sadrži najveću količinu biološki aktivnih tvari. La Torre i sur. (2021) su u svom radu zabilježili porast udjela ukupnih fenola tijekom fermentacije Kombuche na bazi crnog čaja pri čemu je na kraju fermentacije sadržaj ukupnih fenola iznosio  $234,1 \pm 1,4 \mu\text{g GAE/mL}$ . Ova vrijednost je nešto viša od one dobivene u ovom istraživanju, a razlike u rezultatima za uzorak Kombuche na bazi crnog čaja mogu se pripisati sastavu SCOBY kulture, varijacijama u supstratu, proizvodnim postupcima te razlikama u temperaturi i trajanju fermentacije (Tamer i sur., 2021). Lopes i sur. (2021) su zabilježili koncentracije ukupnih fenola između 444,2 i 844,8 mg GAE/L s tim da je široki raspon koncentracija zabilježen zbog korištenja različitih koncentracija infuzija Yerba Mate te upotrebe različitih temperatura tijekom procesa fermentacije. Dobiveni rezultat u ovom radu za uzorak



YM je u skladu s ovim istraživanjem.



**Slika 3.** Grafički prikaz promjene koncentracije ukupnih fenola tijekom skladištenja A – uzorak Yerba Mate (YM); B – uzorak Crni čaj (C); C – uzorak Ocat (O); D – uzorak Yerba Mate i Sencha (YMS); E – uzorak Drijenak (D)

U prvih 7 dana skladištenja porast ukupnih fenola je zabilježen u uzorcima YM, C, O i YMS (slika 3). Najveći porast od 36,06 % je zabilježen u uzorku O, dok je najmanji od svega 5,61 % prisutan u uzorku C. U uzorku D jedino je došlo do pada sadržaja ukupnih fenola za 31,72 %.

14. dan skladištenja je u svim uzorcima zabilježen pad ukupnog sadržaja fenol u odnosu na 7. dan izuzev uzorka D, gdje je došlo do povećanja za 8,74 %. Uspoređujući 14. dan skladištenja s rezultatima dobivenim početni dan, vidljiv je pad ukupnih fenol za 3,60 % u uzorku C, dok vrijednosti zabilježene u uzorcima YM, O i YMS su ostale i dalje više od početne

vrijednosti.

Na kraju skladištenja, 21. dan je zabilježen porast sadržaja ukupnih fenola u svim uzorcima u odnosu na 14. dan. Uspoređujući s početnim danom skladištenja, 21. dan je došlo do porasta sadržaja ukupnih fenola u uzorcima YM, C, O i YMS pa se može zaključiti da je skladištenje navedenih uzoraka pozitivno utjecalo na prinos ukupnih fenola. Najveći porast od 36,50 % je određen za uzorak O. Prema dostupnoj literaturi, povećani sadržaj ukupnih fenola tijekom skladištenja mogao bi biti rezultat nastavka aktivnosti SCOBY kulture u Kombucha napitcima. Tijekom procesa fermentacije, kvasci i bakterije u SCOBY kulturi proizvode enzime koji sudjeluju u pretvorbi polifenolnog kompleksa u jednostavnije fenolne komponente što dovodi do povećanja ukupnog sadržaja fenola (Jayabalan i sur., 2014; Srihari i Satyanarayana, 2012). S druge strane, u uzorku D je zabilježena manja koncentracija za 13,47 % u odnosu 0. dan skladištenja. Općenito, tijekom svih dana skladištenja uzorka D, sadržaj ukupnih fenola je bio smanjen pa možemo reći da je skladištenje u ovom slučaju negativno utjecalo na prinos ukupnih fenola. Barakat i sur. (2022) su u svom radu naveli da smanjenje ukupnih fenola nakon određenog vremena može biti uzrokovano polimerizacijom fenola u veće molekule i njihovom adsorpcijom od strane čajne gljive, ali potrebna su dodatna istraživanja kako bi se ta teorija potvrdila.

U prilog ovom radu ide istraživanje koje su proveli Ulusoy i Tamer (2019). Autori su primijetili da je kod nekih uzoraka skladištenje pri 4 °C uzrokovalo porast, a kod nekih pad ukupnih fenola. Tako je tijekom 12 dana skladištenja, povećanje udjela ukupnih fenola zabilježeno u uzorcima Kombuche na bazi zelenog čaja, crne mrkve i crnog trna, dok je u uzorku Kombuche na bazi lovorvišnje došlo do smanjenja kroz period skladištenja.

Tijekom 21 dana skladištenja, uočen je nepravilan trend postepenog rasta ukupnih fenola u uzorku YM, pri čemu je porast ukupnih fenola varirao između 6,22 % i 18,22 %. Slične rezultate su dobili i Lopes i sur. (2021) u svom istraživanju, gdje su zabilježili porast između 7,2 % i 9,6 % u Kombuchi na bazi Yerba Mate. Ovi rezultati su malo niži u usporedbi s rezultatima dobivenim u ovom radu, što bi moglo biti posljedica različitih koncentracija supstrata odnosno same infuzije Yerba Mate. Također, varijacije u porastu ukupnih fenola primijećene su i u uzorcima C, O i YMS. Sličan trend fluktuacije ukupnih fenola tijekom skladištenja Kombuche primijetili su Abuduaibifu i Tamer (2019) tijekom 11 dana te Tamer i sur. (2021) tijekom 9 dana skladištenja pri 4 °C.

Generalno, skladištenje od 21 dan pri 4 °C u mraku je pozitivno utjecalo na sadržaj ukupnih fenola. U prilog tome ide i istraživanje koje su proveli Tan i sur. (2020). Promatrali su utjecaj temperature (4 °C i 25 °C) i svjetlosti odnosno mraka na sadržaj ukupnih fenola u Kombucha napitku na bazi gravirole (*Annona muricata* L.) prilikom skladištenja od 21 dan. Zaključili su da je 7. i 21. dan skladištenja u tami pri temperaturi od 4 °C došlo do najvećeg

porasta ukupnih fenola i da takav način skladištenja pozitivno utječe na sadržaj ukupnih fenola u Kombucha napitku.

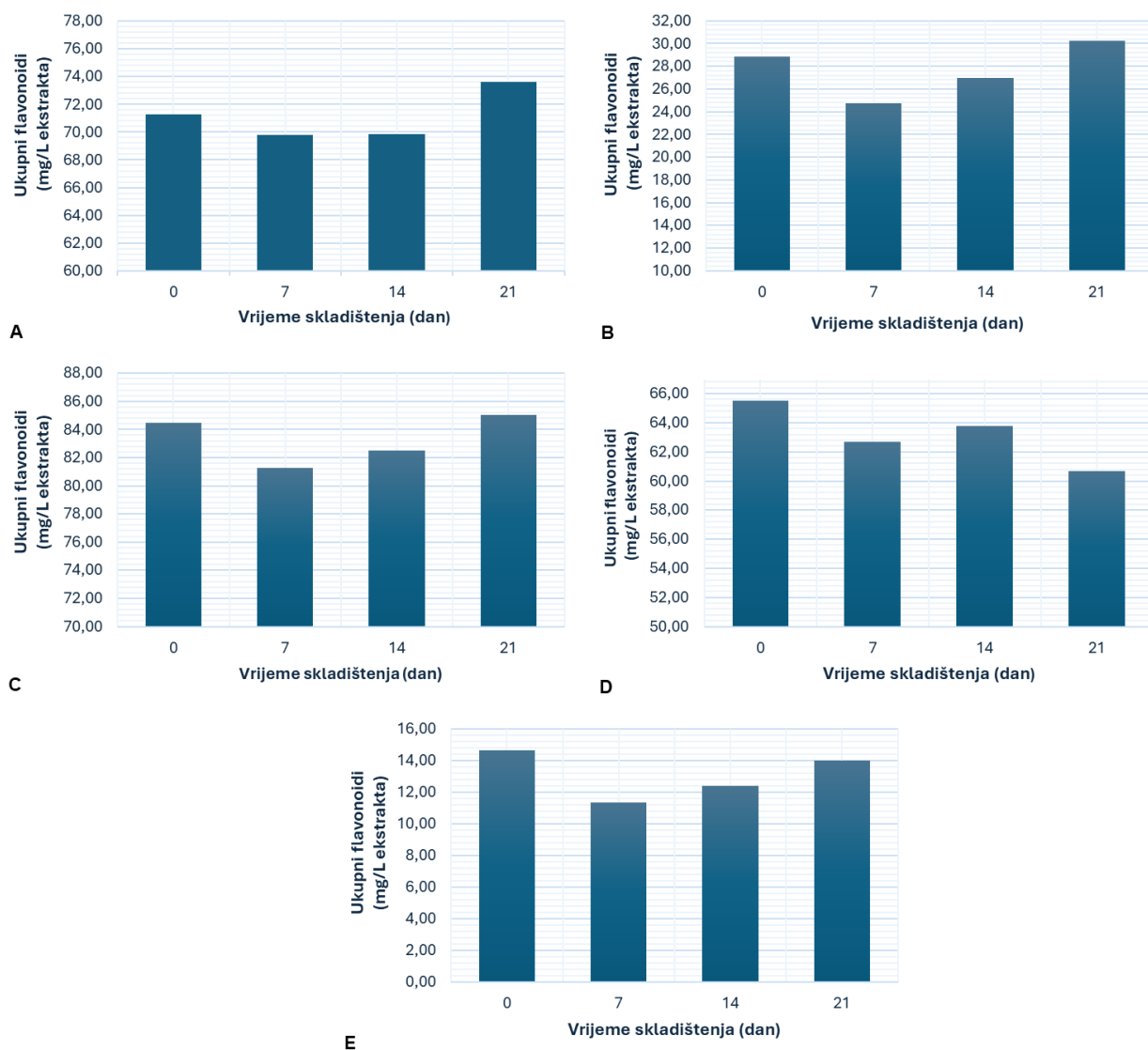
U svom istraživanju, Yıkmiş i Tuğgüm (2019) su naveli da se nakon 30 dana skladištenja, ukupna količina fenolnih spojeva smanjila u odnosu na prvi dan u uzorku crnog čaja, uzorku čaja od ljubičastog bosiljka te uzorcima koji sadrže crni čaj i čaj od ljubičastog bosiljka u omjerima 50 : 50 i 25 : 75. Rezultati ovog istraživanja su u skladu s rezultatom za uzorak D u ovom radu. Međutim, u ovom radu je zabilježen porast ukupnih fenola u uzorku C što nije u skladu s rezultatom koji su dobili autori za uzorak crnog čaja. Razlog za to može biti korištenje različite koncentracije supstrata, kao i sastava SCOBY kulture te primjene drugačijih uvjeta fermentacije.

La Torre i sur. (2021) su proveli istraživanje s ciljem utvrđivanja utjecaja dugoročnog skladištenja (9 mjeseci/4 °C) na ukupni sadržaj fenola u Kombucha napitku na bazi crnog čaja. Od prvog do trećeg mjeseca skladištenja, ukupna količina fenola se smanjila za oko 4 %, a nakon pet mjeseci za oko 13 %, dok je nakon devet mjeseci iznosilo oko 34 %. Na temelju ovog istraživanja može se zaključiti da, iako je nakon 21. dana skladištenja zabilježen porast ukupnih fenola, daljnje skladištenje može negativno utjecati i dovesti do razgradnje fenolnih spojeva, smanjujući tako učinkovitost napitka u smislu zdravstvenih dobiti.

#### **4.2. Utjecaj skladištenja na ukupne flavonoide**

Na slici 4 prikazana je promjena koncentracija ukupnih flavonoida u uzorcima Yerba Mate (YM), crni čaj (C), ocat (O), Yerba Mate i Sencha (YMS) te drijenak (D) tijekom skladištenja u trajanju od 7, 14 i 21 dan. Promatrajući sve uzorke, bilo na početku skladištenja ili nakon 21. dana, najveća količina ukupnih flavonoida zabilježena je u uzorku O, zatim slijede uzorci YM, YMS i C, dok je najmanja vrijednost zabilježena u uzorku D.

U prvih 7 dana skladištenja je došlo do pada koncentracije ukupnih flavonoida u svim uzorcima (slika 4). Blagi pad zabilježen je uzorcima YM, C i YMS, dok je veće smanjenje zabilježeno u uzorcima O (14,35 %) i D (22,42 %). Uspoređujući rezultate dobivene 14. dan sa 7. danom skladištenja, vidljiv je blagi porast koncentracije ukupnih flavonoida u svim uzorcima, osim u uzorku YM, gdje nije došlo do znatne promjene. U odnosu na početni dan skladištenja, u svim uzorcima tijekom skladištenja zabilježen je manji sadržaj ukupnih flavonoida. 21. dana skladištenja je ukupan udio flavonoida porastao za 5,37 % u uzorku YM u odnosu na 14. dan, a trend blagog rasta se nastavio u uzorcima C, O i D. Međutim, u uzorku YMS je došlo do blagog smanjenja za 4,89 % u odnosu na 14. dan te 7,40 % u odnosu na početni dan skladištenja. U usporedbi s početnim danom skladištenja, u uzorku D je zabilježen blagi pad, dok je u uzorcima YM, C i O došlo do blagog rasta ukupnih flavonoida.



**Slika 4.** Grafički prikaz promjene koncentracije ukupnih flavonoida tijekom skladištenja A – uzorak Yerba Mate (YM); B – uzorak Crni čaj (C); C – uzorak Ocat (O); D – uzorak Yerba Mate i Sencha (YMS); E – uzorak Drijenak (D)

Generalno, u uzorcima YM, C, O i D nije došlo do znatnog smanjenja ili povećanja udjela ukupnih flavonoida tijekom skladištenja, što može ukazati na stabilnost ovih spojeva u danim uvjetima. U prilog tome ide istraživanje koje su proveli La Torre i sur. (2021) gdje je ukupan sadržaj flavonoida u Kombuchi na bazi crnog čaja ostao nepromijenjen tijekom 9 mjeseci skladištenja pri 4 °C. Također, naveli su da je sadržaj EGCG ostao nepromijenjen u prva 3 mjeseca skladištenja, dok je u 4. mjesecu udio bio toliko nizak da se analitički nije mogao detektirati (La Torre i sur., 2021).

U uzorku YMS je kroz period skladištenja uočen blagi postepeni pad ukupnih flavonoida. Isti trend u svom istraživanju su zabilježili Yıkmış i Tuğgüm (2019) gdje je došlo do blagog pada ukupnih flavonoida u svim Kombucha uzorcima nakon 30 dana skladištenja pri temperaturi od 4 °C. Autori su naveli da smanjenje količine ukupnog sadržaja flavonoida može biti posljedica

promjena u polimerizaciji fenolnih tvari. Prema Wang i sur. (2000) sadržaj ukupnih flavonoida se može smanjivati tijekom dužeg skladištenja, čak i pri niskim temperaturama. U prvih nekoliko tjedana skladištenja mogu se primijetiti minimalne promjene, no duža razdoblja mogu dovesti do primjetnog smanjenja sadržaja flavonoida (Wang i sur., 2000).

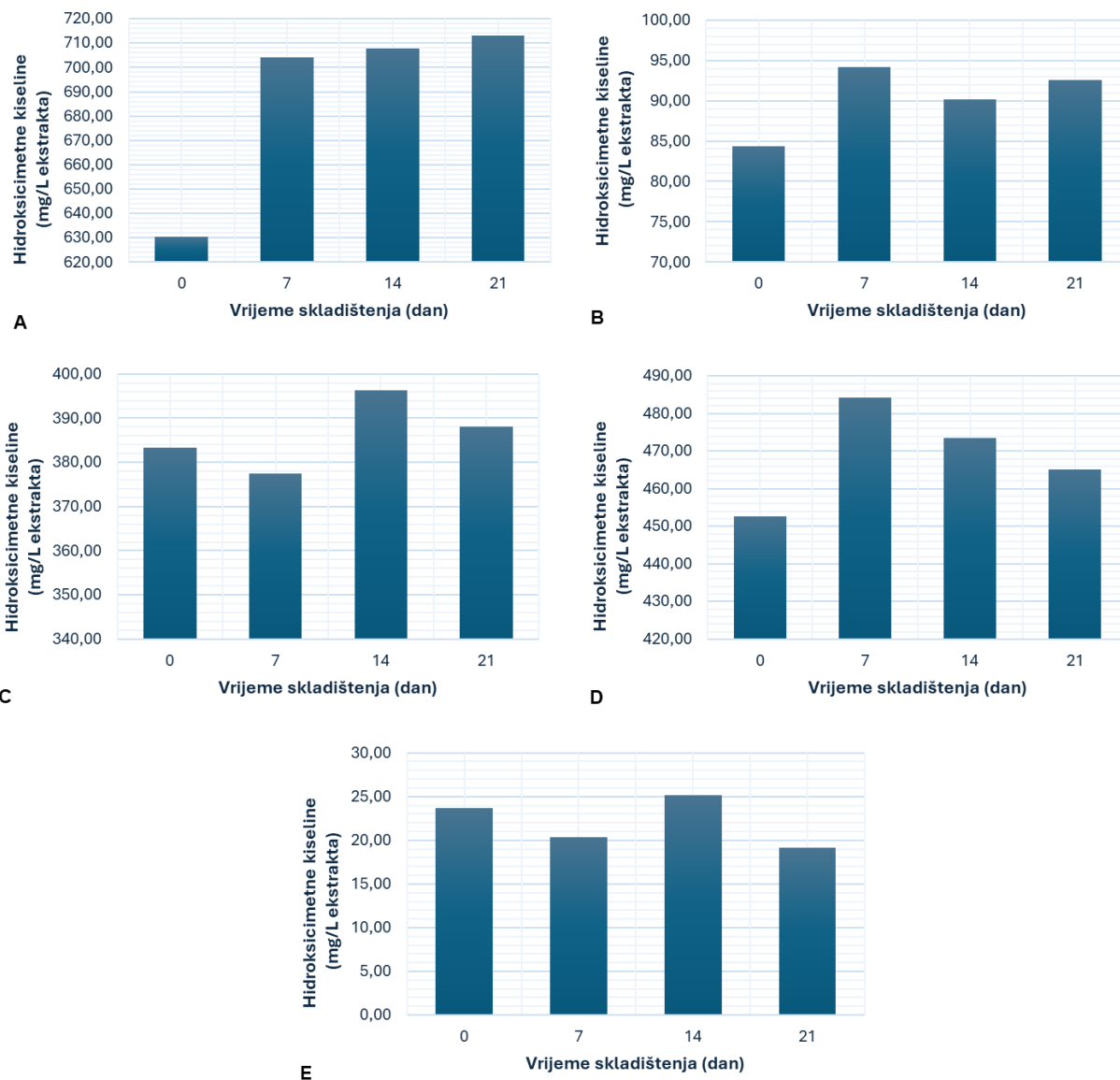
### **4.3. Utjecaj skladištenja na ukupne hidroksicimetne kiseline i flavonole**

Na slici 5 prikazana je promjena koncentracije ukupnih hidroksicimetnih kiselina u uzorcima Yerba Mate (YM), crni čaj (C), ocat (O), Yerba Mate i Sencha (YMS) te drijenak (D) tijekom skladištenja u trajanju od 7, 14 i 21 dan. Prema dobivenim rezultatima, najveću koncentraciju hidroksicimetnih kiselina na početku i na kraju skladištenja imao je uzorak YM, slijede ga redom uzorci YMS, O i C, dok je najmanja koncentracija zabilježena u uzorku D.

Tijekom razdoblja skladištenja sadržaj ukupnih hidroksicimetnih kiselina varirao je za svaki od uzoraka (slika 5). Tako je 7. dan skladištenja zabilježen porast hidroksicimetnih kiselina u uzorcima YM, C i YMS, pri čemu su veći porasti zabilježeni u uzorcima YM (11,71 %) i C (11,62 %), dok je nešto manji porast zabilježen u uzorku YMS (6,98 %). Nasuprot tome, u uzorku D je došlo do pada za 14,33 %, dok je u uzorku O zabilježen manji pad (1,51 %).

Tijekom 14. dana skladištenja, u usporedbi sa 7. danom, došlo je do blagog smanjenja ukupnih hidroksicimetnih kiselina u uzorcima C i YMS, dok je povećanje zabilježeno u uzorcima O (4,97 %) i D (23,62 %). U uzorku YM nije došlo do znatnog povećanja, a taj se trend nastavio do kraja skladištenja, što može ukazivati na to da su hidroksicimetne kiseline stabilne nakon 7. dana skladištenja u uzorku YM.

Tijekom zadnjih 7 dana skladištenja vidljiv je daljnji blagi pad udjela hidroksicimetnih kiselina u uzorku YMS. Uspoređujući rezultate 21. dana skladištenja s onima od 14. dana, zabilježen je blagi porast u uzorku C, dok je smanjenje zabilježeno u uzorcima O i D, pri čemu je najveće smanjenje od 23,86 % zabilježeno u uzorku D. Na kraju skladištenja, 21. dana u odnosu na početak skladištenja, najveći pad ukupnih hidroksicimetnih kiselina zabilježen je u uzorku D (19,39 %), dok je najveći porast zabilježen u uzorku YM (13,14 %). Manji porast vidljiv je u uzorku C, dok u uzorcima O i YMS nije zabilježena znatna promjena.

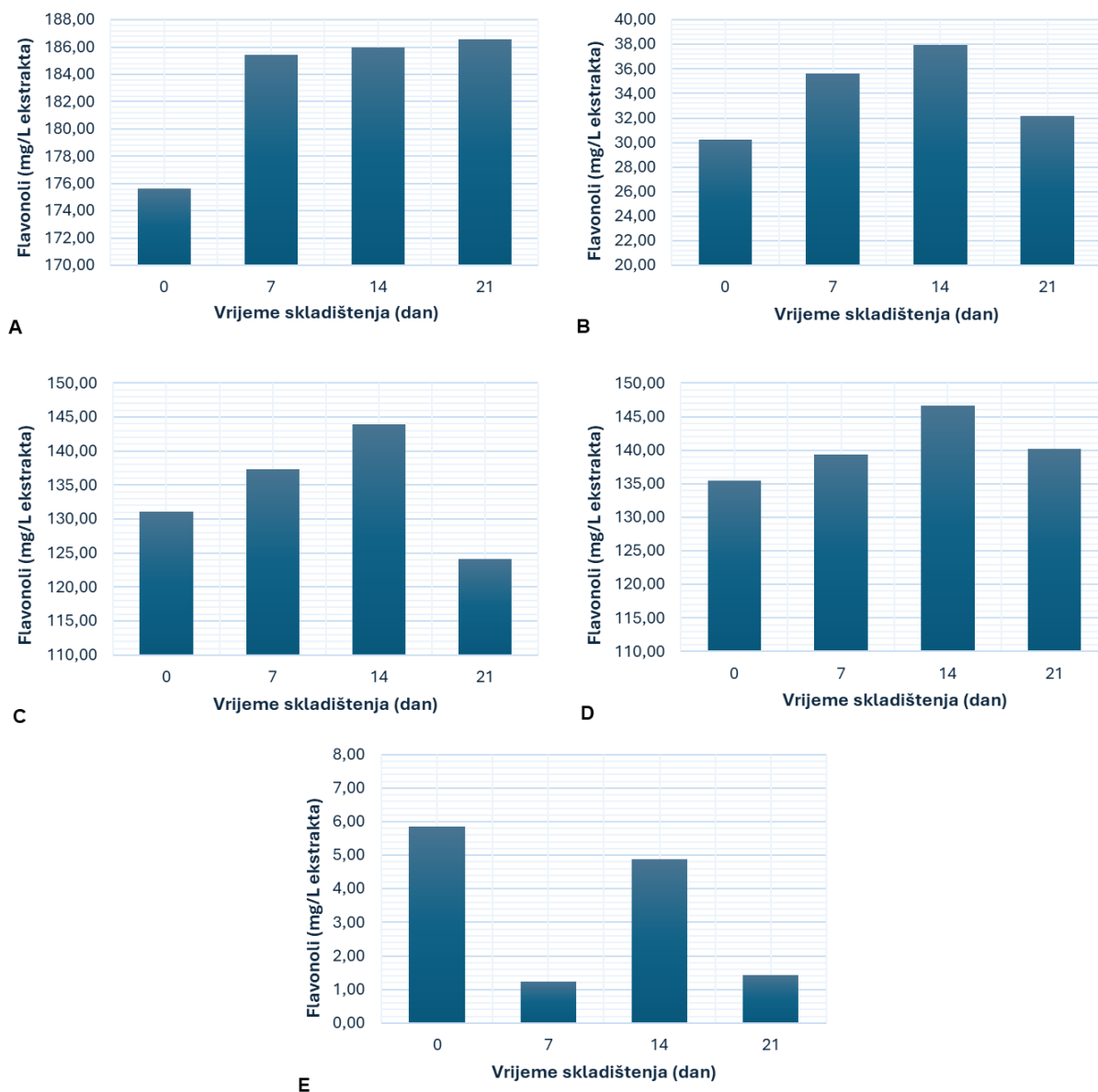


**Slika 5.** Grafički prikaz promjene koncentracije ukupnih hidroksicimetnih kiselina tijekom skladištenja

A – uzorak Yerba Mate (YM); B – uzorak Crni čaj (C); C – uzorak Ocat (O); D – uzorak Yerba Mate i Sencha (YMS); E – uzorak Drijenak (D)

La Torre i sur. (2021) naveli su u svom istraživanju da je klorogenska kiselina bila jedini spoj koji je zadržao svoj sadržaj nepromijenjenim u usporedbi s početnom vrijednošću u crnom čaju tijekom skladištenja od 9 mjeseci pri 4 °C. Također, autori su naveli da se sadržaj ferulinske kiseline postepeno smanjivao tijekom 5. mjeseci skladištenja, da bi u 6. mjesecu bio ispod razine mogućnosti analitičkog određivanja, čime se potvrđuje da duži period skladištenja negativno utječe na stabilnost sastavnica hidroksicimetnih kiselina.

Na slici 6 je prikazana promjena koncentracije ukupnih flavonola u uzorcima Yerba Mate (YM), crni čaj (C), ocat (O), Yerba Mate i Sencha (YMS) te drijenak (D) tijekom skladištenja u trajanju od 7, 14 i 21 dan. Prema dobivenim rezultatima, na početku skladištenja primijećen je isti trend stabilnosti ukupnih flavonola koji je uočen i kod hidroksicimetnih kiselina, pri čemu je najveću koncentraciju imao uzorak YM. Slijede ga uzorci YMS i O, s nešto manjom koncentracijom, dok uzorak C ima znatno nižu vrijednost. Najmanja koncentracija flavonola zabilježena je u uzorku D.



**Slika 6.** Grafički prikaz promjene koncentracije ukupnih flavonola tijekom skladištenja  
 A – uzorak Yerba Mate (YM); B – uzorak Crni čaj (C); C – uzorak Ocat (O); D – uzorak Yerba Mate i Sencha (YMS); E – uzorak Drijenak (D)

U prvih 14 dana skladištenja vidljiv je postepeni porast ukupnih flavonola u uzorcima C, O i YMS s tim da je najveći rast zabilježen u uzorku C, s povećanjem od 25,42 % (slika 6). 7. dan skladištenja, u uzorku D zabilježen je znatan pad od 78,94 %, dok je u sljedećih 7 dana uslijedio nagli rast, ali na 14. dan je vidljiv pad od 16,43 % u usporedbi s početnim danom skladištenja. U uzorku YM, u prvih 7 dana skladištenja, zabilježen je porast od 5,65 %, a do kraja skladištenja uočen je neznatan rast, što može ukazivati na stabilnost ukupnih flavonola u danim uvjetima skladištenja. Sličan trend u uzorku YM primijećen je i kod hidroksicimetnih kiselina.

U uzorcima C, O i YMS, uspoređujući rezultate dobivene 21. dana skladištenja s onima od 14. dana, došlo je do smanjenja koncentracije ukupnih flavonola, pri čemu je najveći pad od 15,2 % zabilježen u uzorku C. Ovakav trend sugerira da skladištenje duže od 14 dana može dovesti do smanjenja flavonola, vjerojatno zbog degradacije spojeva ili promjene u stabilnosti ekstrakta tijekom vremena (Ioannou i sur., 2012). S druge strane, u uzorku D je 21. dana skladištenja zabilježeno znatno smanjenje u odnosu na 14. dan (70,87 %), kao i u odnosu na 0. dan skladištenja (75,66 %). Tijekom cijelog skladištenja bilježi se pad, što može ukazivati na negativan utjecaj uvjeta skladištenja na stabilnost ukupnih flavonola u uzorku D.

S obzirom na to da u dostupnoj znanstvenoj literaturi nema studija koje ispituju utjecaj skladištenja Kombucha napitaka na ukupne flavonole, dobiveni rezultati ne mogu se usporediti s postojećim podacima iz literature.

#### **4.4. Utjecaj skladištenja na polimerne proantocijanidine**

Na slici 7 prikazani su rezultati koncentracije polimernih proantocijanidina u uzorcima Yerba Mate (YM), crni čaj (C), ocat (O), Yerba Mate i Sencha (YMS) te drijenak (D) skladištenih 7, 14 i 21 dan. Prema dobivenim rezultatima, najveća koncentracija polimernih proantocijanidina je zabilježena u uzorku O, slijede redom uzorci D, YMS i C, dok je najmanja koncentracija zabilježena u uzorku YM.

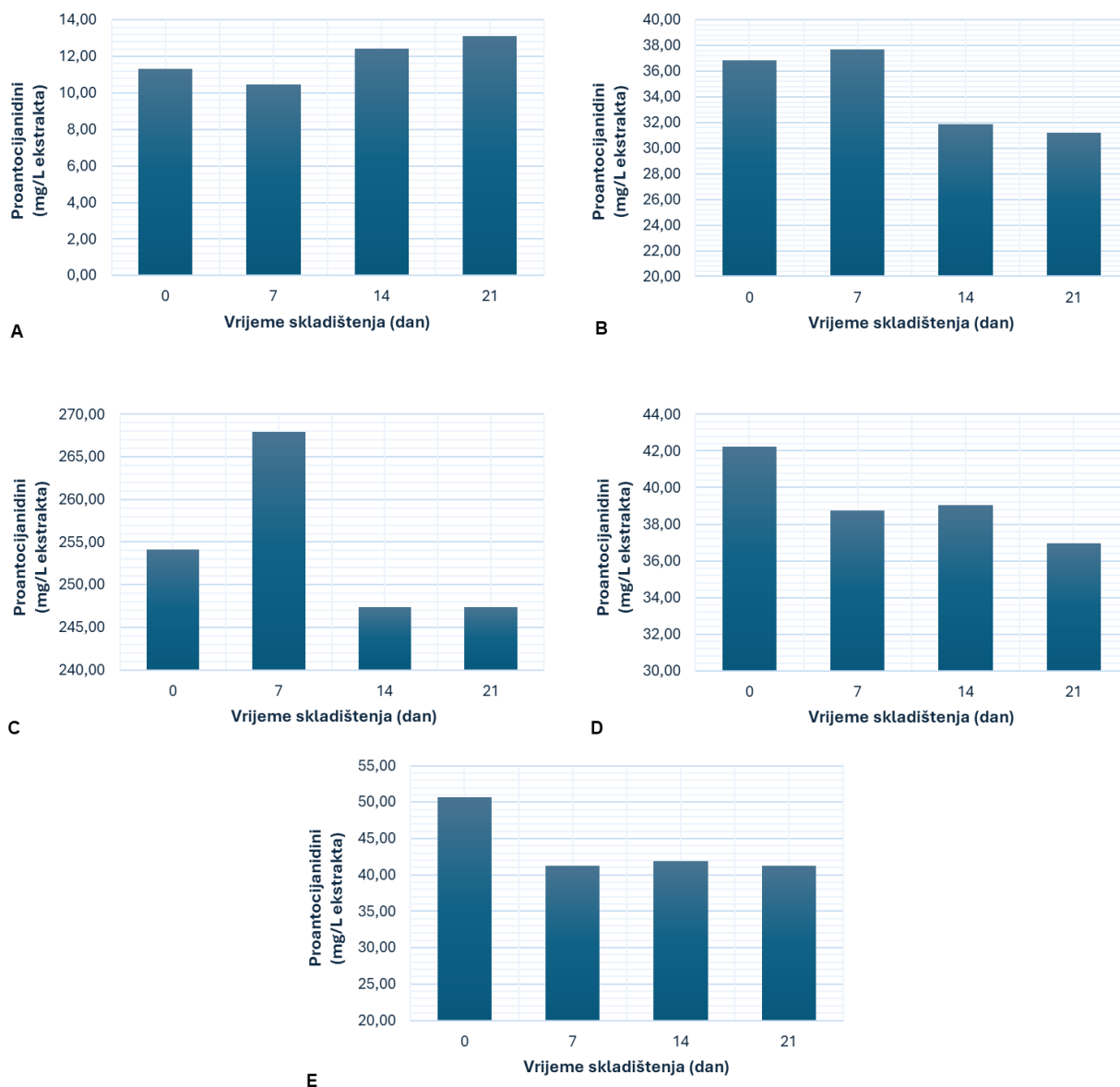
U prvih 7 dana skladištenja primijećen je pad koncentracije proantocijanidina u uzorcima YM, YMS i D, pri čemu je najveće smanjenje od 18,44 % zabilježeno u uzorku D. S druge strane, u uzorcima C i O došlo je do blagog porasta (slika 7).

Daljnijim skladištenjem, u uzorku D gotovo da nije bilo promjena u koncentraciji proantocijanidina, što može ukazivati na njihovu stabilnost nakon 7. dana skladištenja u danim uvjetima. 14. dan je uslijedio pad proantocijanidina u uzorcima C (15,51 %) i O (7,68 %), a do povećanja za 18,95 % je došlo u uzorku YM, dok u uzorku YMS nije zabilježen znatan porast u usporedbi sa 7. danom skladištenja.

Trend pozitivnog rasta u uzorku YM nastavio se i tijekom sljedećih 7 dana, dok je u uzorku O zabilježena ista vrijednost, u uzorku C došlo je do blagog pada, a u uzorku YMS do



većeg smanjenja od 12,51 %. Na kraju skladištenja, 21. dan, došlo je do smanjenja udjela ukupnih proantocijanidina u svim uzorcima osim u uzorku YM, gdje je zabilježen porast od 15,86 % u odnosu na početak skladištenja.



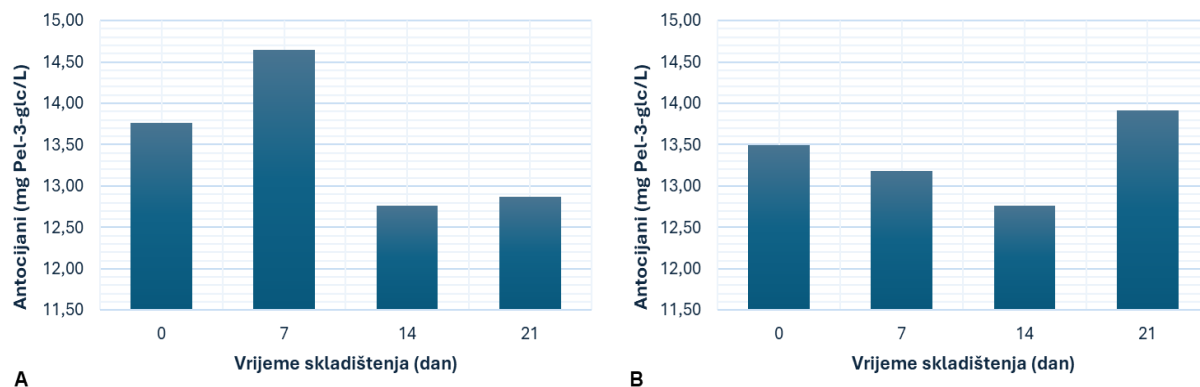
**Slika 7.** Grafički prikaz promjene koncentracije polimernih proantocijanidina tijekom skladištenja

A – uzorak Yerba Mate (YM); B – uzorak Crni čaj (C); C – uzorak Ocat (O); D – uzorak Yerba Mate i Sencha (YMS); E – uzorak Drijenak (D)

Budući da nije pronađena niti jedna znanstvena publikacija gdje se promatrao utjecaj skladištenja Kombucha napitaka na polimerne proantocijanidine, rezultate dobivene u ovom radu nije moguće usporediti s literaturnim podacima.

#### 4.5. Utjecaj skladištenja na monomerne antocijane

Određivanje monomernih antocijana provedeno je u uzorcima ocat (O) i drijenak (D) tijekom skladištenja u trajanju od 7, 14 i 21 dan (slika 8).



**Slika 8.** Grafički prikaz promjene koncentracije monomernih antocijana tijekom skladištenja A – uzorak Ocat (O); B – uzorak Drijenak (D)

Na početku skladištenja, uzorak O je imao koncentraciju monomernih antocijana koja je bila 1,94 % veća u usporedbi s uzorkom D. Međutim, nakon skladištenja od 21 dan, došlo je do obrata i koncentracija antocijana u uzorku D postala je veća za 8,13 % u odnosu na uzorak O. U uzorku O je zabilježen porast od 6,43 % u prvih 7 dana skladištenja, dok je u idućih 7 dana uslijedio nagli pad, pri čemu je 14. dan zabilježen pad za 12,86 % u odnosu na 7. dan. S druge strane, uzorak D bilježi postepeni pad koncentracije monomernih antocijana sve do 14. dana, uz ukupno smanjenje od 5,43 %. Koncentracija monomernih antocijana bila je jednaka u oba uzorka 14. dan skladištenja. U zadnjem tjednu skladištenja, u uzorku D je došlo do naglog porasta od 9,02 %, čime je vrijednost nadmašila početnu, dok u uzorku O nije došlo do znatnog povećanja.

Razlika u koncentraciji monomernih antocijana na početku i na kraju skladištenja između uzoraka može ukazivati na razlike u sastavu i sadržaju antocijana u samim ekstraktima. U vinu Cabernet Sauvignon su glavni monomerni antocijani cijanidin-3-O-glukozid, malvidin-3-O-glukozid, delphinidin-3-O-glukozid, petunidin-3-O-glukozid i peonidin-3-O-glukozid (Trouillas i sur., 2016; Castillo-Muñoz i sur., 2009). S druge strane, glavni monomerni antocijani identificirani HPLC-om u crvenom drijenu (*Cornus mas* L.) su cijanidin-3-rutinozid, cijanidin-3-glukozid i pelargonidin-3-glukozid (Dumitrașcu i sur., 2019). Prema Muche i sur. (2018), antocijani su vrlo nestabilni i podložni različitim reakcijama degradacije, a svaki antocijan ima specifičnu brzinu razgradnje i osjetljivost na temperaturu. Razlike u stabilnosti među pojedinačnim antocijanima mogu se pripisati njihovoj kemijskoj strukturi, koja značajno utječe na otpornost prema vanjskim čimbenicima (Muche i sur., 2018).

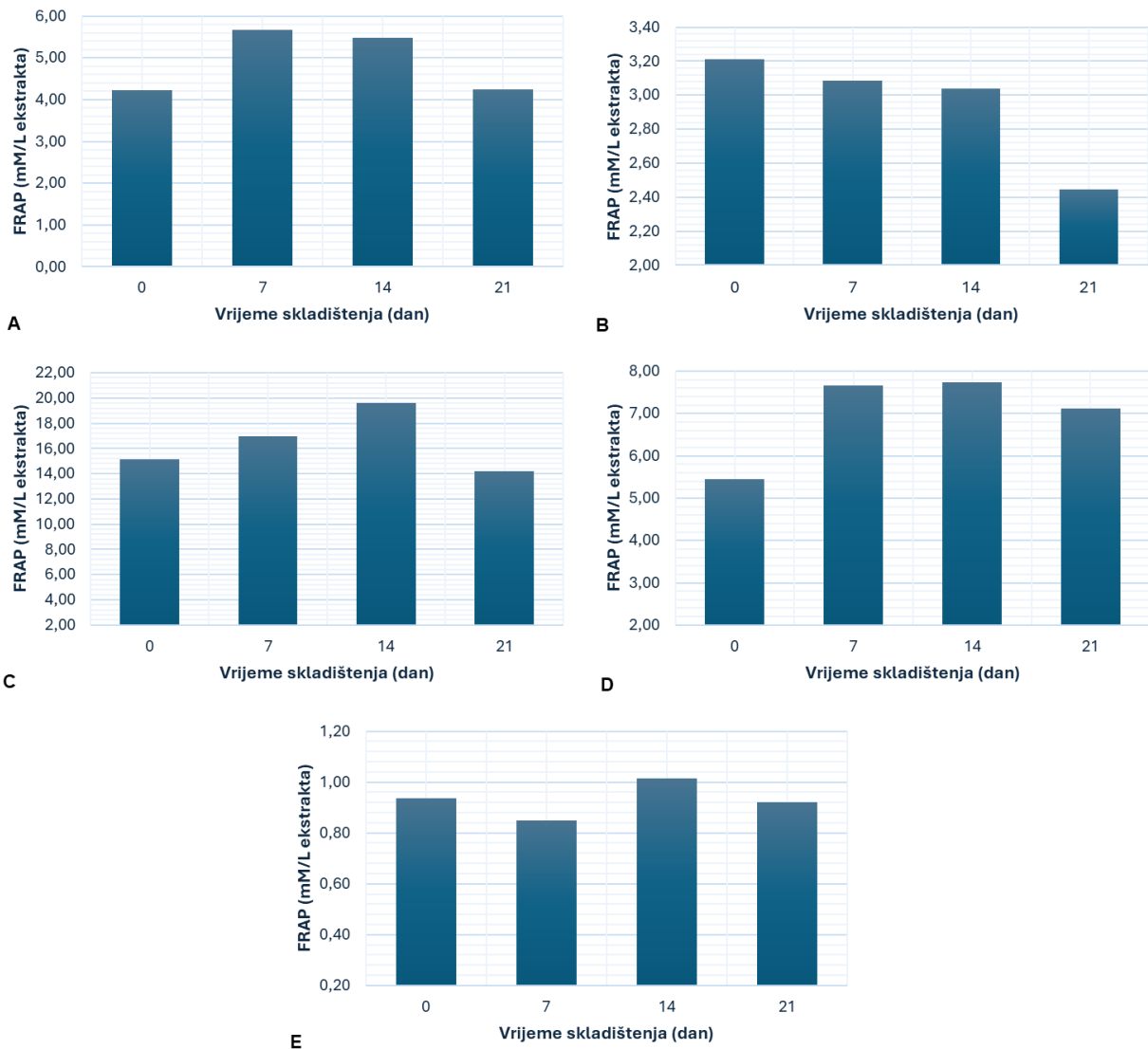
Slično istraživanje proveli su Ulusoy i Tamer (2019) gdje su promatrali promjenu

koncentracije monomernih antocijana u Kombucha napitcima tijekom fermentacije i skladištenja od 12 dana. Autori su naveli da je zbog porasta kiselosti tijekom fermentacije došlo do značajnog pada sadržaja monomernih antocijana tijekom same fermentacije, a pad se nastavio i tijekom skladištenja. Rezultati zabilježeni 14. dan skladištenja u oba uzorka su u skladu s navedenim istraživanjem jer je također uočen pad monomernih antocijana u odnosu na početni dan skladištenja.

#### **4.6. Utjecaj skladištenja na antioksidacijski kapacitet**

Iz dobivenih rezultata (slika 9 i slika 10), evidentno je da je na početku i nakon 21. dana skladištenja, najveća antioksidacijska aktivnost, određena metodama ABTS i FRAP, zabilježena u uzorku ocat (O), a najmanja u uzorku drijenak (D). Nakon uzorka O, najveću antioksidacijsku aktivnost imao je uzorak Yerba Mate i Sencha (YMS), a zatim određeno ABTS metodom slijedi uzorak crni čaj (C) pa uzorak Yerba Mate (YM), dok je određivano FRAP metodom zabilježeno da uzorak YM ima veću antioksidacijsku aktivnost od uzorka C. Prema dostupnoj literaturi, antioksidacijska aktivnost testiranih uzoraka ovisi o sastavu i kemijskoj prirodi polifenolnih spojeva prisutnih u supstratima. Sadržaj ukupnih fenola i ukupnih flavonoida (pogotovo katehina) je direktno povezan s antioksidacijskim i drugim biološkim aktivnostima u Kombucha napitcima pripremljenim od različitih supstrata (Cardoso i sur., 2020; Jakubczyk i sur., 2020). Zbog toga, razlika u početnom sadržaju polifenola u uzorcima može biti rezultat razlike u sposobnosti reduciranja stabilnog ABTS<sup>+</sup> kationa i redukcije željeza. Verzelloni i sur. (2007) su naveli da je antioksidacijski kapacitet vina i octa u velikoj korelaciji s njihovim sadržajem polifenola. U ovom radu se pokazalo da uzorak O ima najveći antioksidacijski kapacitet, što je i očekivano budući da sadrži najviše ukupnih fenola i ukupnih flavonoida od svih testiranih uzoraka.

Na slici 9 prikazani su rezultati antioksidacijske aktivnosti mjerene FRAP metodom u uzorcima Yerba Mate (YM), crni čaj (C), ocat (O), Yerba Mate i Sencha (YMS) te drijenak (D) skladištenih 7, 14 i 21 dan. U prvih 7 dana skladištenja porast antioksidacijske aktivnosti je zabilježen u uzorcima YM, O i YMS. Najveći porast od 40,77 % je zabilježen u uzorku YMS, nešto manji od 34,02 % u uzorku YM, dok je najmanji od svega 5,61 % određen u uzorku O. Nasuprot tome, u uzorcima C i D je došlo do pada antioksidacijskog kapaciteta za 3,99 % odnosno 9,5 %.



**Slika 9.** Grafički prikaz promjene antioksidacijskog kapaciteta FRAP metodom tijekom skladištenja

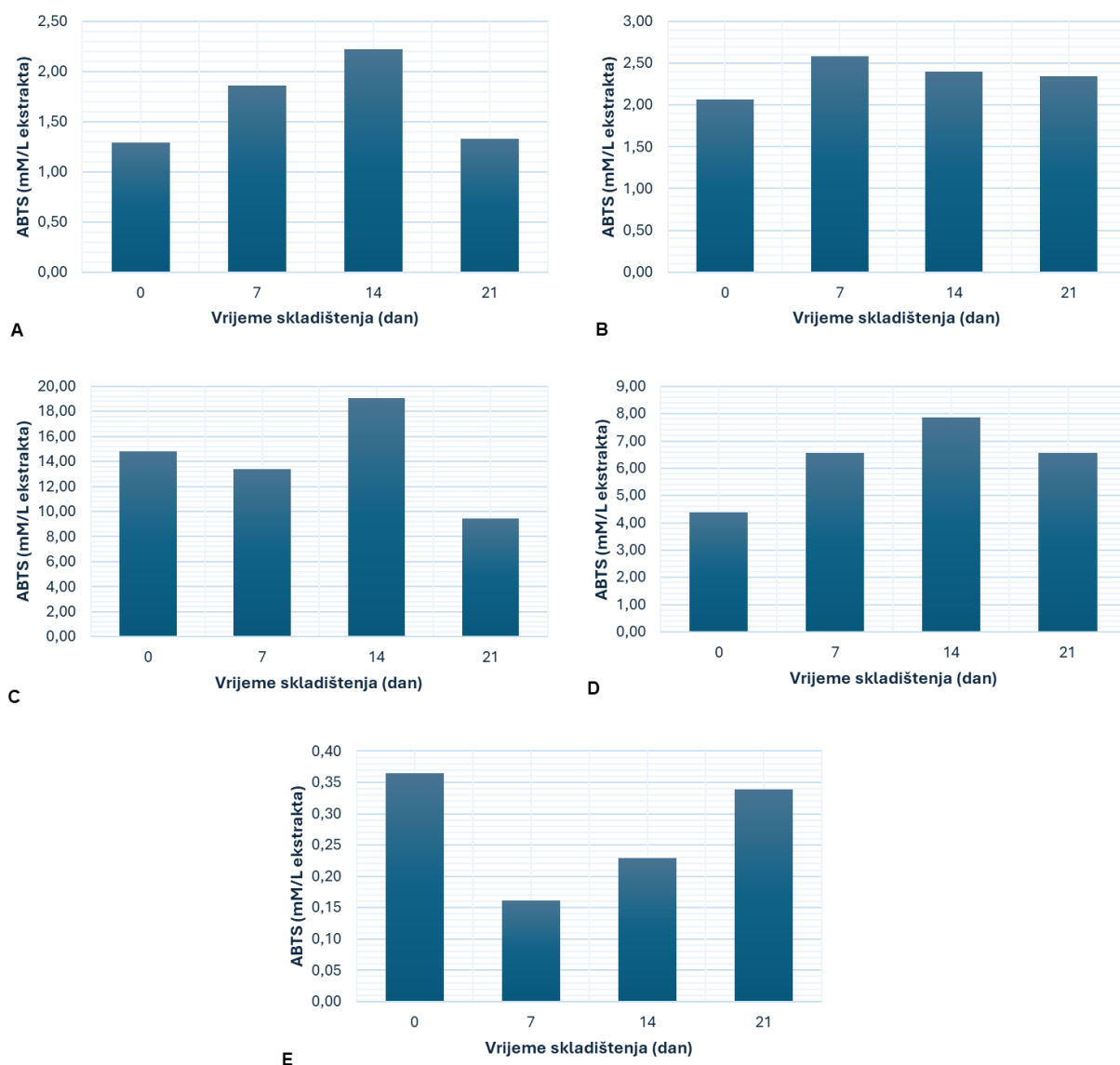
A – uzorak Yerba Mate (YM); B – uzorak Crni čaj (C); C – uzorak Ocat (O); D – uzorak Yerba Mate i Sencha (YMS); E – uzorak Drijenak (D)

Tijekom sljedećih 7 dana skladištenja postepen rast antioksidacijske aktivnosti se nastavio u uzorku O, dok je 14. dan skladištenja u uzorku D zabilježeno povećanje od 8,32 % u odnosu na 7. dan. U uzorcima YM, C i YMS nije zabilježena znatna promjena u odnosu na 7. dan.

Na kraju skladištenja, 21. dan je došlo do pada antioksidacijske aktivnosti u svim uzorcima u odnosu na 14. dan, pri čemu je najveće smanjenje od 27,67 % zabilježeno u uzorku O. Tijekom cijelog razdoblja od 21 dana, jedino je u uzorku C zabilježen postepen pad antioksidacijske aktivnosti za 23,91 %. Uspoređujući s početnim danom skladištenja, 21. dana zabilježen je porast samo u uzorku YMS, s povećanjem od 30,71 %, dok u uzorcima YM i D nije bilo znatnih promjena. Pad antioksidacijske aktivnosti zabilježen je u uzorcima C i O, pri

čemu je veći pad od 23,91 % zabilježen u uzorku C.

Na slici 10 prikazani su rezultati antioksidacijske aktivnosti određeni ABTS metodom u uzorcima Yerba Mate (YM), crni čaj (C), ocat (O), Yerba Mate i Sencha (YMS) te drijenak (D) skladištenih 7, 14 i 21 dan.



**Slika 10.** Grafički prikaz promjene antioksidacijskog kapaciteta ABTS metodom tijekom skladištenja

A – uzorak Yerba Mate (YM); B – uzorak Crni čaj (C); C – uzorak Ocat (O); D – uzorak Yerba Mate i Sencha (YMS); E – uzorak Drijenak (D)

Tijekom prvih 7 dana skladištenja zabilježeno je znatno povećanje antioksidacijske aktivnosti u uzorku YMS (49,32 %) i uzorku YM (43,82 %), dok je u uzorku C došlo do nešto manjeg povećanja (24,94 %). Suprotno tome, u uzorku D zabilježeno je znatno smanjenje za 55,65 %, dok je u uzorku O smanjenje bilo nešto manje, iznosilo je 9,45 %.

Tijekom sljedećih 7 dana skladištenja, postepeni rast antioksidacijskog kapaciteta nastavio se u uzorcima YM i YMS, dok je u uzorku O došlo do znatnog povećanja za 43,23 %, a u uzorku D za 41,17 %. Jedini pad zabilježen je u uzorku C, gdje je 14. dan antioksidacijska aktivnost pala za 7,40 % u odnosu na 7. dan skladištenja.

Nakon 14. dana skladištenja, u posljednjem tjednu došlo je do znatnog pada antioksidacijske aktivnosti u uzorcima YM, O i YMS, dok u uzorku C je zabilježen jedva primjetni pad. U uzorku D nastavljen je trend postepenog rasta, iako je 21. dan skladištenja zabilježena manja vrijednost u odnosu na početni dan.

Uspoređujući s 0. danom skladištenja, 21. dan je zabilježen porast antioksidacijske aktivnosti u uzorcima C i YMS, pri čemu je u uzorku YMS zabilježeno znatno povećanje od 49,32 %. U uzorku YM nije zabilježena znatna promjena, dok je u uzorku O primijećen znatan pad od 36,21 %.

Primjenom ABTS i FRAP metode, antioksidacijska aktivnost svih uzoraka pokazala je fluktuaciju tijekom razdoblja skladištenja, izuzev uzorka C gdje je primjenom FRAP metode tijekom cijelog skladištenja došlo do postepenog smanjivanja. U prilog tome ide istraživanje koje su proveli Şarkaya i sur. (2021) gdje su naveli da je općenito tijekom razdoblja skladištenja došlo do fluktuacija antioksidacijske aktivnosti mjerene DPPH metodom u uzorcima Kombuche na bazi mlijeka, Kombuche na bazi zelenog čaja i mlijeka te Kombuche na bazi mlijeka i borovnice, pri čemu je samo u uzorku Kombuche na bazi mlijeka i kadulje zabilježeno linearno smanjenje. Osim toga, Kilic i Sengun (2023) su u svom radu naveli da je antioksidacijska aktivnost kod Kombucha uzoraka na bazi lišća anadolskog gloja (*Crataegus orientalis*) i na bazi lišća koprive (*Urtica dioica*) oscilirala tijekom skladištenja od 120 dana, a Tamer i sur. (2021) su uočili fluktuacije antioksidacijske aktivnosti u svim Kombucha uzorcima primjenom FRAP metode tijekom skladištenja od 9 dana.

La Torre i sur. (2021) su u svom istraživanju zabilježili trend pada ukupnih fenola s padom antioksidacijske aktivnosti određene ABTS metodom. Naveli su da smanjenje antioksidacijskog kapaciteta tijekom skladištenja najvjerojatnije povezano s mikrobnom transformacijom spojeva odgovornih za maksimalnu sposobnost hvatanja slobodnih radikala u strukture s manjim potencijalom za hvatanje. Također, tijekom skladištenja može doći do promjena u sastavu antioksidacijskih spojeva, pri čemu se mogu formirati specifični spojevi koji uzrokuju smanjenje antioksidacijske aktivnosti (Jakubczyk i sur., 2020). Takva slična korelacija je u ovom radu primijećena u uzorku D, gdje je s padom ukupnih fenola i flavonoida zabilježeno i smanjenje antioksidacijske aktivnosti određeno s obje metode.

U uzorcima YM i YMS primjenom obje metode te u uzorku C primjenom ABTS metode je zabilježen porast antioksidacijske aktivnosti tijekom 21. dana skladištenja u odnosu na početni dan. Generalno, dobiveni rezultati u navedenim uzorcima su u skladu sa zabilježenim

porastom udjela ukupnih fenola u ovom radu jer brojna istraživanja pokazuju korelaciju između viših koncentracija ukupnih fenolnih spojeva i veće sposobnosti uklanjanja slobodnih radikala (Jakubczyk i sur., 2020).

Unatoč zabilježenom povećanju ukupnog sadržaja fenola, u uzorku O je došlo do smanjenja antioksidacijske aktivnosti (ABTS i FRAP rezultati), a u uzorku C samo prema ABTS vrijednostima. Istu negativnu korelaciju su zabilježili u svom radu Tamer i sur. (2021) u uzorcima Kombuche na bazi cimeta i na bazi ehinaceje, gdje je zabilježen pad antioksidacijske aktivnosti FRAP metodom iako je došlo do povećanja ukupnih fenola. Slično tome, Gamboa-Gómez i sur. (2016) su u svom istraživanju naveli kako se antioksidacijski kapacitet povećao unatoč smanjenju ukupne količine fenola i flavonoida. Autori su zaključili da polifenoli nisu jedina skupina kemijskih tvari s antioksidacijskim djelovanjem, već da i drugi metaboliti nastali tijekom fermentacije, poput askorbinske kiseline i drugih organskih kiselina, također mogu utjecati na antioksidacijski kapacitet Kombuche. Osim toga, treba uzeti u obzir da je antioksidacijska aktivnost izrazito ovisna o uvjetima fermentacije i analiziranim supstratima te da zbog toga ne daju sve analize isti odgovor (Jayabalan i sur., 2007).

## 5. ZAKLJUČCI

Na temelju provedenog istraživanja i dobivenih rezultata, može se zaključiti sljedeće:

1. Skladištenje je općenito pozitivno utjecalo na stabilnost ukupnih fenola, budući da je u većini uzoraka zabilježen njihov porast (14,71 %). Iznimka je uzorak drijenak (D) kod kojeg je sadržaj ukupnih fenola bio smanjen tijekom cijelog razdoblja skladištenja (23,65 %).
2. U uzorcima Yerba Mate (YM), crni čaj (C), ocat (O) i drijenak (D) nije bilo znatnih promjena u sadržaju ukupnih flavonoida tijekom skladištenja pa se može zaključiti da su relativno stabilni u danim uvjetima skladištenja.
3. Generalno, tijekom skladištenja su zabilježene različite varijacije u koncentraciji hidroksicimetnih kiselina, flavonola i polimernih proantocijanidina ovisno o uzorku i danu skladištenja.
4. Promjene u koncentraciji monomernih antocijana između uzoraka ocat (O) i drijenak (D) tijekom skladištenja ukazuju na različitu stabilnost i osjetljivost pojedinih antocijana na uvjete skladištenja, pri čemu je uzorak drijenak (D) na kraju imao višu koncentraciju u odnosu na uzorak ocat (O).
5. Rezultati mjereni ABTS i FRAP metodama pokazali su varijabilan utjecaj skladištenja na antioksidacijski kapacitet uzoraka, osim u uzorku crni čaj (C), gdje je FRAP metodom zabilježen kontinuirani pad. Dobiveni rezultati upućuju na to da skladištenje može različito utjecati na antioksidacijsku aktivnost ovisno o specifičnim spojevima u supstratima i korištenoj metodi analize.
6. Uzorak ocat (O) je pokazao najveći sadržaj biološki aktivnih tvari i antioksidacijski kapacitet, dok je uzorak drijenak (D) imao najmanje vrijednosti ovih parametara.
7. Sveukupno gledajući, učinak skladištenja na bioaktivne spojeve i antioksidacijski kapacitet Kombucha napitaka varira ovisno o korištenom supstratu, pri čemu je skladištenje na 4 °C najviše pogodovalo uzorku Yerba Mate (YM), u kojem su svi bioaktivni spojevi i antioksidacijski kapacitet zabilježili porast.



## 6. LITERATURA

Abaci N, Deniz FSS, Orhan IE (2022) Kombucha—An ancient fermented beverage with desired bioactivities: A narrowed review. *Food Chem* **14**, 100302. <https://doi.org/10.1016/j.fochx.2022.100302>

Aboulwafa MM, Youssef FS, Gad HA, Altyar AE, Al-Azizi MM, Ashour ML (2019) A comprehensive insight on the health benefits and phytoconstituents of *Camellia sinensis* and recent approaches for its quality control. *Antioxidants* **8**, 455. <https://doi.org/10.3390/antiox8100455>

Abuduaibifu A, Tamer CE (2019) Evaluation of physicochemical and bioaccessibility properties of goji berry kombucha. *J Food Process Pres* **43**, 1-14. <https://doi.org/10.1111/jfpp.14077>

Anantachoke N, Duangrat R, Sutthiphakul T, Ochaikul D, Mangmool S (2023) Kombucha beverages produced from fruits, vegetables, and plants: A review on their pharmacological activities and health benefits. *Foods* **12**, 1818. <https://doi.org/10.3390/foods12091818>

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/antiox1010154>

AOAC 1990 Official Methods of Analysis: Changes in Official Methods of Analysis Made at the Annual Meeting.

Ayed L, Ben Abid S, Hamdi M (2016) Development of a beverage from red grape juice fermented with the kombucha consortium. *Ann Microbiol* **67**, 111-121. <https://doi.org/10.1007/s13213-016-1242-2>

Ayed L, Hamdi M (2015) Manufacture of a beverage from cactus pear juice using “tea fungus” fermentation. *Ann Microbiol* **65**, 2293-2299. <https://doi.org/10.1007/s13213-015-1071-8>

Barakat N, Beaufort S, Rizk Z, Bouajila J, Taillandier P, El Rayess Y (2022) Kombucha analogues around the world: A review. *Crit Rev Food Sci Nut* **63**, 10105-10129. <https://doi.org/10.1080/10408398.2022.2069673>

Batista P, Penas MR, Pintado M, Oliveira-Silva P (2022) Kombucha: Perceptions and future prospects. *Foods* **11**, 1977. <https://doi.org/10.3390/foods11131977>

Battikh H, Bakhrouf A, Ammar E (2012) Antimicrobial effect of kombucha analogues. *LWT Food Sci Technol* **47**, 71-77. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2011.12.033>

Battikh H, Chaieb K, Bakhrouf A, Ammar E (2011) Antibacterial and antifungal activities of black and green kombucha teas. *J Food Biochem* **37**, 231-236. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4514.2011.00629.x>

BCCDC (2020) Food safety assessment of kombucha tea recipe and food safety plan: British Columbia. BCCDC- British Columbia Centre for Disease Control, <http://www.bccdc.ca/resource-gallery/Documents/Educational%20Materials/EH/FPS/Food/kombucha1.pdf>. Pristupljeno 29. kolovoza 2024.

Ben Taheur F, Mansour C, Ben Jeddou K, Machreki Y, Kouidhi B, Abdulhabat JA i sur. (2020) Aflatoxin B1 degradation by microorganisms isolated from kombucha culture. *Toxicon* **179**, 76-83. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2020.03.004>

Benzie IFF (1996) An automated, specific, spectrophotometric method for measuring ascorbic acid in plasma (EFTSA). *Clin Biochem* **29**, 111-116. [https://doi.org/10.1016/0009-9120\(95\)02013-6](https://doi.org/10.1016/0009-9120(95)02013-6)

Bhattacharya D, Bhattacharya S, Patra MM, Chakravorty S, Sarkar S, Chakraborty W i sur. (2016) Antibacterial Activity of Polyphenolic Fraction of Kombucha Against Enteric Bacterial Pathogens. *Curr Microbiol* **73**, 885-896. <https://doi.org/10.1007/s00284-016-1136-3>

Bhattacharya S, Gachhui R, Sil PC (2013) Effect of kombucha, a fermented black tea in attenuating oxidative stress mediated tissue damage in alloxan induced diabetic rats. *Food Chem Toxicol* **60**, 328-340. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.07.051>

Boak R, Virgo-Milton M, Hoare A, De Silva A, Gibbs L, Gold L, i sur. (2016) Choosing foods for infants: A qualitative study of the factors that influence mothers. *Child Care Hlth Dev* **42**, 359-369. <https://doi.org/10.1111/cch.12323>

Cacicedo ML, Castro MC, Servetas I, Bosnea L, Boura K, Tsafrakidou P i sur. (2016) Progress in bacterial cellulose matrices for biotechnological applications. *Bioresour Technol* **213**, 172-180. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.02.071>

Cardoso RR, Neto RO, dos Santos D'Almeida CT, do Nascimento TP, Pressete CG, Azevedo L i sur. (2020) Kombuchas from green and black teas have different phenolic profile, which

impacts their antioxidant capacities, antibacterial and antiproliferative activities. *Food Res Int* **128**,108782. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108782>

Castillo-Muñoz N, Fernandez-Gonzalez M, Gomez-Alonso S, Garcia- Romero E, Hermosin-Gutierrez I (2009) Structure elucidation of peonidin 3,7-O-b-diglycoside isolated from Garnacha Tintorera (*Vitis vinifera* L.) grapes. *J Agr Food Chem* **57**, 7883-7891. <https://doi.org/10.1021/jf102578u>

Chakravorty S, Bhattacharya S, Bhattacharya D, Sarkar S, Gachhui R (2019) Kombucha: A promising functional beverage prepared from tea. *Non-Alcoholic Beverages* **6**, 285-327. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-815270-6.00010-4>

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>

Chang CC, Yan MH, Wen HM Chern JC (2002) Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *J Food Drug Anal* **10**, 178-182.

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

Chu SC, Chen C (2006) Effects of origins and fermentation time on the antioxidant activities of kombucha. *Food Chem* **98**, 502-507. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.05.080>

Cong L, Bremer P, Miroso M (2020) Functional Beverages in Selected Countries of Asia Pacific Region: A Review. *Beverages* **6**, 21. <https://doi.org/10.3390/beverages6020021>

Četojević-Simin DD, Velićanski AS, Cvetković DD, Markov SL, Mrđanović JŽ, Bogdanović VV i sur. (2012) Bioactivity of lemon balm kombucha. *Food Bioprocess Technol* **5**,1756-1765. <https://doi.org/10.1007/s11947-010-0458-6>

de Miranda JF, Ruiz LF, Silva CB, Uekane TM, Silva KA, Gonzalez AGM i sur. (2021) Kombucha: A review of substrates, regulations, composition, and biological properties. *J Food Sci* **87**, 503-527. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.16029>

Diez-Ozaeta I, Astiazaran OJ (2022) Recent advances in Kombucha tea: Microbial consortium, chemical parameters, health implications and biocellulose production. *Int J Food Microbiol* **377**, 109783. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2022.109783>

Dufrense C, Farnworth E (2000) Tea, Kombucha, and health: A review. *Food Res Int* **33**, 409-421. [https://doi.org/10.1016/S0963-9969\(00\)00067-3](https://doi.org/10.1016/S0963-9969(00)00067-3)

Dumitrașcu L, Enachi E, Stănciuc N, Aprodu I (2019) Optimization of ultrasound assisted extraction of phenolic compounds from cornelian cherry fruits using response surface methodology. *CyTA - J Food* **17**, 814-823. <https://doi.org/10.1080/19476337.2019.1659418>

Dutta H, Paul SK (2019) Kombucha drink: Production, quality, and safety aspects. *Production and Management of Beverages* **1**, 259-288. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-815260-7.00008-0>

FDA (2009) Food code. FDA- Food and Drug Administration, <http://www.fda.gov/Food/GuidanceRegulation/RetailFoodProtection/FoodCode/UCM2019396.htm>. Pristupljeno 29. kolovoza 2024.

Fu C, Yan F, Cao Z, Xie F, Lin J (2014) Antioxidant activities of kombucha prepared from three different substrates and changes in content of probiotics during storage. *Food Sci Technol* **34**, 123-126. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612014005000012>

Gaggia F, Baffoni L, Galiano M, Nielsen DS, Jakobsen RR, Castro-Mejía JL i sur. (2019) Kombucha beverage from green, black and rooibos teas: A comparative study looking at microbiology, chemistry and antioxidant activity. *Nutrients* **11**, 1. <https://doi.org/10.3390/nu11010001>

Gamboa-Gómez CI, González-Laredo RF, Gallegos-Infante JA, Pérez MdML, Moreno-Jiménez MR, Flores-Rueda AG i sur. (2016) Antioxidant and angiotensin-converting enzyme inhibitory activity of Eucalyptus camaldulensis and Litsea glaucescens infusions fermented with kombucha consortium. *Food Technol Biotechnol* **54**, 367. <https://doi.org/10.17113/ftb.54.03.16.4622>

Gomes RJ, Borges MdeF, Rosa MdeF, Castro-Gómez RJH, Spinosa WA (2018) Acetic acid bacteria in the food industry: Systematics, characteristics and applications. *Food Technol Biotechnol* **56**, 139-151. <https://doi.org/10.17113/ftb.56.02.18.5593>

Granato D, Barba FJ, Bursać Kovačević D, Lorenzo JM, Cruz AG, Putnik P (2020) Functional Foods: Product Development, Technological Trends, Efficacy Testing, and Safety. *Annu Rev Food Sci Technol* **11**, 1-26. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-032519-051708>

Howard LR, Clark JR, Brownmiller C (2003) Antioxidant capacity and phenolic content in blueberries as affected by genotype and growing season. *J Sci Food Agric* **83**, 1238-1247. <https://doi.org/10.1002/jsfa.1532>

Ioannou I, Hafsa I, Hamdi S, Charbonnel C, Ghoul M (2012) Review of the effects of food processing and formulation on flavonol and anthocyanin behaviour. *J Food Eng* **111**, 208-217. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2012.02.006>

Jakubczyk K, Kałduńska J, Kochman J, Janda K (2020) Chemical profile and antioxidant activity of the kombucha beverage derived from white, green, black and red tea. *Antioxidants* **9**, 447. <https://doi.org/10.3390/antiox9050447>

Jayabalan R, Malbaša RV, Lončar ES, Vitas JS, Sathishkumar M (2014) A review on kombucha tea-microbiology, composition, fermentation, beneficial effects, toxicity, and tea fungus. *Compr Rev Food Sci Food Saf* **13**, 538-550. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12073>

Jayabalan R, Marimuthu S, Swaminathan K (2007) Changes in content of organic acids and tea polyphenols during kombucha tea fermentation. *Food Chem* **102**, 392-398. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.05.032>

Jayabalan R, Subathradevi P, Marimuthu S, Sathishkumar M, Swaminathan K (2008) Changes in free-radical scavenging ability of kombucha tea during fermentation. *Food Chem* **109**, 227-234. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.12.037>

Kapp JM, Sumner W (2019) Kombucha: A systematic review of the empirical evidence of human health benefit. *Ann Epidemiol* **30**, 66-70. <https://doi.org/10.1016/j.annepidem.2018.11.001>

Kilic G, Sengun IY (2023) Bioactive properties of Kombucha beverages produced with Anatolian hawthorn (*Crataegus orientalis*) and nettle (*Urtica dioica*) leaves. *Food Biosci* **53**, 102631. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2023.102631>

Kim J, Adhikari K (2020) Current trends in kombucha: Marketing perspectives and the need for improved sensory research. *Beverages* **6**, 15. <https://doi.org/10.3390/beverages6010015>

Kovacevic Z, Davidovic G, Vuckovic Filipovic J, Janicijevic-Petrovic MA, Janicijevic K, Popovic A (2014) A Toxic Hepatitis Caused the Kombucha Tea – Case Report. *Maced J Med Sci* **7**, 128-131. <http://dx.doi.org/10.3889/MJMS.1857-5773.2013.0341>

Kozyrovska NO, Reva OM, Goginyan VB, Devera JP (2012) Kombucha microbiome as a probiotic: A view from the perspective of post-genomics and synthetic ecology. *Biopolym Cell* **28**, 103-113. <https://doi.org/10.7124/bc.000034>

La Torre C, Fazio A, Caputo P, Plastina P, Caroleo M, Cannataro R i sur. (2021) Effects of long-term storage on radical scavenging properties and phenolic content of kombucha from black tea. *Molecules* **26**, 5474. <https://doi.org/10.3390/molecules26185474>

Laavanya D, Shirkole S, Balasubramanian P (2021) Current challenges, applications and future perspectives of SCOBY cellulose of kombucha fermentation. *J Clean Prod* **295**, 126454. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2021.126454>

Laureys D, Britton SJ, De Clippeleer J (2020) Kombucha Tea Fermentation: A Review. *J Am Soc Brew Chem* **78**, 165-174. <https://doi.org/10.1080/03610470.2020.1734150>

Leal JM, Suárez LV, Jayabalan R, Oros JH, Escalantr-Aburto A (2018) A review on health benefits of kombucha nutritional compounds and metabolites. *CYTA J Food* **16**, 390-399. <https://doi.org/10.1080/19476337.2017.1410499>

Lopes DR, Santos LO, Prentice-Hernández C (2021) Antioxidant and antibacterial activity of a beverage obtained by fermentation of yerba-maté (*Ilex paraguariensis*) with symbiotic kombucha culture. *J Food Process Preserv* **45**, 1-10. <https://doi.org/10.1111/jfpp.15101>

Malbaša R, Lončar E, Djurić M (2008) Comparison of the products of kombucha fermentation on sucrose and molasses. *Food Chem* **106**, 1039-1045. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.07.020>

Marsh AJ, O'Sullivan O, Hill C, Ross RP, Cotter PD (2014) Sequence-based analysis of the bacterial and fungal compositions of multiple kombucha (tea fungus) samples. *Food Microbiol* **38**, 171-178. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2013.09.003>

Martínez Leal J, Valenzuela Suárez L, Jayabalan R, Huerta Oros J, Escalante-Aburto A (2018) A review on health benefits of kombucha nutritional compounds and metabolites. *CyTA J Food* **16**, 390-399. <https://doi.org/10.1080/19476337.2017.1410499>

McCann J, Woods J, Mohebbi M, Russell CG (2022) Regulated nutrition claims increase perceived healthiness of an ultra-processed, discretionary toddler snack food and ultra-processed toddler milks: A discrete choice experiment. *Appetite* **174**, 106044. <https://doi.org/10.1016/j.appet.2022.106044>

Moodi M, Salmani F, Norozi E, Zeinali T (2021) Predictors of functional dairy product consumption among Iranian consumers. *Int Dairy J* **121**, 105061. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2021.105061>

Morales D (2020) Biological activities of kombucha beverages: The need of clinical evidence. *Trends Food Sci Technol* **105**, 323-333. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.09.025>

Muche BM, Speers RA, Rupasinghe HPV (2018) Storage Temperature Impacts on Anthocyanins Degradation, Color Changes and Haze Development in Juice of “Merlot” and “Ruby” Grapes (*Vitis vinifera*). *Front Nutr* **5**, 100. <https://doi.org/10.3389/fnut.2018.00100>

Najafpour A, Rajabi Khorrami A, Aberoomand Azar P, Saber Tehrani M (2020) Study of heavy metals biosorption by tea fungus in kombucha drink using central composite design. *J Food Compos Anal* **86**, 103359. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2019.103359>

Neha K, Haider MR, Pathak A, Yar MS (2019) Medicinal prospects of antioxidants: A review. *Eur J Med Chem* **178**, 687-704. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.06.010>

Nguyen NK, Nguyen PB, Nguyen HT, Le PH (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 Sci Technol* **64**, 1149-1155. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.07.018>

Nummer BA (2013) Special report: Kombucha brewing under the Food and Drug Administration Model Food Code: Risk analysis and processing guidance. *J Environ Health* **76**, 8-11.

Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C (1999) Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med* **26**, 1231-1237. [https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(98)00315-3)

Rocha-Guzmán NE, González-Laredo, RF, Vázquez-Cabral BD, Moreno-Jiménez MR, Gallegos-Infante JA, Gamboa-Gómez CI i sur. (2019) Oak leaves as a new potential source for functional beverages: Their antioxidant capacity and monomer flavonoid composition. *Functional and Medicinal Beverages* **11**, 381-411. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816397-9.00011-X>

Sang S, Lambert JD, Ho CT, Yang C S (2011) The chemistry and biotransformation of tea constituents. *Pharmacol Res* **64**, 87-99. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2011.02.007>

Santos JS, Deolindo CTP, Hoffmann JF, Chaves FC, Do Prado-Silva L, Sant'ana AS i sur.

(2018) Optimized *Camellia sinensis* var. *sinensis*, *Ilex paraguariensis*, and *Aspalathus linearis* blend presents high antioxidant and antiproliferative activities in a beverage model. *Food Chem* **15**, 348-358. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.02.021>

Şarkaya P, Akan E, Kinik Ö (2021) Use of kombucha culture in the production of fermented dairy beverages. *LWT Food Sci Technol* **137**, 110326. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110326>

Scalbert A, Johnson IT, Saltmarsh M (2005) Polyphenols: Antioxidants and beyond. *Am J Clin Nutr* **81**, 215S–217S. <https://doi.org/10.1093/ajcn/81.1.215S>

Silva KA, Uekane TM, de Miranda JF, Ruiz LF, Motta JCBd, Silva CB i sur. (2021) Kombucha beverage from non-conventional edible plant infusion and green tea: Characterization, toxicity, antioxidant activities and antimicrobial properties. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* **34**, 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2021.102032>

Sreeramulu G, Zhu Y, Knol W (2001) Characterization of antimicrobial activity in Kombucha fermentation. *Acta Biotechnol* **21**, 49-56. [https://doi.org/10.1002/1521-3846\(200102\)21:1<49::AID-ABIO49>3.0.CO;2-G](https://doi.org/10.1002/1521-3846(200102)21:1<49::AID-ABIO49>3.0.CO;2-G)

Srihari T, Arunkumar R, Arunakaran J, Satyanarayana U (2013a) Downregulation of signalling molecules involved in angiogenesis of prostate cancer cell line (PC-3) by kombucha (lyophilized). *Biomed Prev Nutr* **3**, 53-58. <https://doi.org/10.1016/j.bionut.2012.08.001>

Srihari T, Karthikesan K, Ashokkumar N, Satyanarayana U (2013b) Antihyperglycaemic efficacy of kombucha in streptozotocin-induced rats. *J Funct Foods* **5**, 1794-1802. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2013.08.008>

Srihari T, Satyanarayana U (2012) Changes in free radical scavenging activity of Kombucha during fermentation. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research* **4**, 1978-1981.

Stasiak L, Blazejak S (2009) Acetic Acid Bacteria, perspectives of application in biotechnology, a review. *Pol J Food Nutr Sci* **59**, 17-23.

Sun BS, Ricardo-da-Silva JM, Spranger I (1998) Critical factors of vanillin assay for catechins and proanthocyanidins. *J Agr Food Chem* **46**, 4267-4274. <https://doi.org/10.1021/jf980366j>

Tamer CE, Temel SG, Suna S, Ozkan Karabacak A, Ozcan T, Yilmaz Ersan L i sur. (2021) Evuçation of bioaccessibility and functional properties of kombucha beverages fortified with different medical plant extract. *Turk J Agric For* **45**, 13-32. <https://doi.org/10.3906/tar-2003-75>



Tan WC, Muhialdin BJ, Meor Hussin AS (2020) Influence of storage conditions on the quality, metabolites and biological activity of soursop (*Annona muricata*. L) kombucha. *Front Microbiol* **11**, 2982. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.603481>

Tanaka T, Kouno I (2003) Oxidation of tea catechins: Chemical structures and reaction mechanism. *Food Sci Technol Res* **9**, 128-133. <https://doi.org/10.3136/fstr.9.128>

Trouillas P, Sancho-Garcia JC, De Freitas V, Gierschner J, Otyepka M, Dangles O (2016) Stabilizing and modulating color by copigmentation: insights from theory and experiment. *Chem Rev* **116**, 4937-4982. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.5b00507>

Ulusoy A, Tamer CE (2019) Determination of suitability of black carrot (*Daucus carota* L. spp. *sativus* var. *atrorubens* Alef.) juice concentrate, cherry laurel (*Prunus laurocerasus*), blackthorn (*Prunus spinosa*) and red raspberry (*Rubus idaeus*) for kombucha beverage production. *J Food Meas Charact* **13**, 1524-1536. <https://doi.org/10.1007/s11694-019-00068-w>

UNBS (2018) Kombucha specification. UNBS- Uganda National Bureau of Standards, [https://ec.europa.eu/growth/toolsdatabases/tbt/en/search/?tbtaction=search.detail&Country\\_ID=UGA&num=930&dspLang=en&basdatedeb=01/10/2018&basdatefin=31/10/2018&baspays=&basnotifnum=&basnotifnum2=&bastypepays=ANY&baskeywords=](https://ec.europa.eu/growth/toolsdatabases/tbt/en/search/?tbtaction=search.detail&Country_ID=UGA&num=930&dspLang=en&basdatedeb=01/10/2018&basdatefin=31/10/2018&baspays=&basnotifnum=&basnotifnum2=&bastypepays=ANY&baskeywords=). Pristupljeno 29. kolovoza 2024.

Uțoiu E, Matei F, Toma A, Diguță C, Ștefan L, Mănoiu S i sur. (2018) Bee collected pollen with enhanced health benefits, produced by fermentation with a Kombucha consortium. *Nutrients* **10**, 1365. <https://doi.org/10.3390/nu10101365>

Vázquez-Cabral BD, Larrosa-Perez M, Gallegos-Infante JA, Moreno-Jimenez MR, Gonzalez-Laredo RF, Rutiaga-Quinones JG i sur. (2017) Oak kombucha protects against oxidative stress and inflammatory processes. *Chem Biol Interact* **272**, 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2017.05.001>

Velićanski AS, Cvetković DD, Markov SL, Šaponjac VT, Vulić JJ (2014) Antioxidant and antibacterial activity of the beverage obtained by fermentation of sweetened lemon balm (*Melissa officinalis* L.) tea with symbiotic consortium of bacteria and yeasts. *Food Technol Biotechnol* **52**, 420-429. <https://doi.org/10.17113/ftb.52.04.14.3611>

Verzelloni E, Tagliacuzzi D, Conte A (2007) Relationship between the antioxidant properties and the phenolic and flavonoid content in traditional balsamic vinegar. *Food Chem* **105**, 564-571. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.04.014>

Villarreal-Soto SA, Beaufort S, Bouajila J, Souchard JP, Taillandier P (2018) Understanding kombucha tea fermentation: A review. *J Food Sci* **83**, 580-588. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.14068>

Villarreal-Soto SA, Beaufort S, Bouajila J, Souchard JP, Renard T, Rollan S i sur. (2019) Impact of fermentation conditions on the production of bioactive compounds with anticancer, anti-inflammatory and antioxidant properties in kombucha tea extracts. *Process Biochem* **83**, 44-54. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2019.05.004>

Villarreal-Soto SA, Bouajila J, Pace M, Leech J, Cotter PD, Souchard JP i sur. (2020) Metabolome-microbiome signatures in the fermented beverage, Kombucha. *Int J Food Microbiol* **333**, 108778. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108778>

Vīna 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**, 17-25.

Vitas JS, Cvetanović AD, Mašković PZ, Švarc-Gajić JV, Malbaša RV (2018) Chemical composition and biological activity of novel types of kombucha beverages with yarrow. *J Funct Foods* **44**, 95-102. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2018.02.019>

Vukić V, Iličić M, Vukić D, Kocić-Tanackov S, Pavlić B, Bjekić M i sur. (2021) The application of kombucha inoculum as an innovative starter culture in fresh cheese production. *LWT Food Sci Technol* **151**, 112142. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112142>

Wang L, Kim D, Lee C (2000) Effects of heat processing and storage on flavanols and sensory qualities of green tea beverage. *J Agr Food Chem* **48**, 4227-4232. <https://doi.org/10.1021/jf0003597>

Wang Y, Ji B, Wu W, Wang R, Yang Z, Zhang D i sur. (2013) Hepatoprotective effects of kombucha tea: Identification of functional strains and quantification of functional components. *J Sci Food Agr* **94**, 265-272. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6245>

Watawana MI, Jayawardena N, Gunawardhana CB, Waisundara VY (2015) Health, wellness, and safety aspects of the consumption of kombucha. *J Chem* **2015**, 1-11. <https://doi.org/10.1155/2015/591869>

Xia X, Dai Y, Wu H, Liu X, Wang Y, Yin L i sur. (2019) Kombucha fermentation enhances the health-promoting properties of soymilk beverage. *J Funct Foods* **62**, 103549.

<https://doi.org/10.1016/j.jff.2019.103549>


Yıkmiş S, Tuğgüm S (2019) Evaluation of Microbiological, Physicochemical and Sensorial Properties of Purple Basil Kombucha Beverage. *Turk J Agric Food Sci Technol*. **7**, 1321-1327. <https://doi.org/10.24925/turjaf.v7i9.1321-1327.2550>

Yuan B, Danao M-GC, Stratton JE, Weier SA, Weller CL, Lu M (2018) High pressure processing (HPP) of aronia berry purée: Effects on physicochemical properties, microbial counts, bioactive compounds, and antioxidant capacities. *Innov Food Sci Emerg Technol* **47**, 249-255. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2018.03.009>

Zubaidah E, Dewantari FJ, Novitasari FR, Srianta I, Blanc PJ (2018) Potential of snake fruit (*Salacca zaluca* (Gaerth.) Voss) for the development of a beverage through fermentation with the kombucha consortium. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* **13**, 198-203. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2017.12.012>

## IZJAVA O IZVORNOSTI

Ja Darija Gašpar izjavljujem da je ovaj diplomski 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