

# Utjecaj čajne baze na tijek fermentacije te na animikrobnu i antioksidativnu aktivnost kombuche

---

**Mađer, Tamara**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2021**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University North / Sveučilište Sjever**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:122:463747>

*Rights / Prava:* [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-11-29**



*Repository / Repozitorij:*

[University North Digital Repository](#)





**Sveučilište  
Sjever**

**Završni rad br. 10/PREH/2021**

**Utjecaj čajne baze na tijek fermentacije te na antimikrobnu  
i antioksidativnu aktivnost kombuche**

**Tamara Mađer, 033603194**

Koprivnica, rujan 2021. godine





# Sveučilište Sjever

Odjel za Prehrambenu tehnologiju

Završni rad br. 10/PREH/2021

## **Utjecaj čajne baze na tijek fermentacije te na antimikrobnu i antioksidativnu aktivnost kombuche**

**Student**

Tamara Mađer, 033603194

**Mentor**

prof. dr. sc. Jasna Mrvčić

## Prijava završnog rada

### Definiranje teme završnog rada i povjerenstva

ODJEL	Odjel za prehrambenu tehnologiju		
STUDIJSKI PROGRAM	prediplomski stručni studij Prehrambena tehnologija		
PREDSJEDNIK	Tamara Mađer	IBRAG	0330030194
DATA	11.6.2021.	KOLJEVO	Pekarski i prehrambeni kvasac
NASLOJ RADA	Utjecaj čajne baze na tijek fermentacije te na antimikrobnu i antioksidativnu aktivnost kombucha		
NASLOJ RADA NA ENGL. JEZIKU	The influence of Tea Base on the Course of Fermentation and on Antimicrobial and Antioxidant Activity of kombucha		
MENTOR	Jasna Mrvčić	STANJE	prof. dr. sc.
ČLANOVI POVJERENSTVA	1. izv. prof. dr. sc. Bojan Sarkanj, predsjednik 2. doc. dr. sc. Dunja Šamec, članica 3. prof. dr. sc. Jasna Mrvčić, mentor 4. prof. dr. sc. Damir Stanžar, zamjena člana 5.		

### Zadatak završnog rada

BR	10/PREH/2021
OPIS	Od svojih dalekih povijesnih korijena do danas, kombucha se proizvodi koristeći kao bazu uglavnom crni čaj. No, u posljednjih par godina, kako u svijetu, tako i u Republici Hrvatskoj, na krilima craft zanatstva, kreativnosti i inovativnosti malih poduzetnika, kombucha doživljava svoju reneransu pa se na tržištu pojavljuju brojne inačice kombuche pri čemu se koriste različite početne čajne baze te <i>Saccharomyces cerevisiae</i> različitog podrijetla. Zadatak ovog rada je istražiti utjecaja čajne baze na tijek fermentacije kombucha napitaka te na njihovu antimikrobnu i antioksidativnu aktivnost. Primjena stečenog znanja u području fermentirane hrane samostalno pripremiti različite hranjive podloge, odnosno čajne baze. Pripremiti "čajnu gljivu", Provesti i pratiti tijek fermentacije te analizu dobivenih uzoraka kombuche: odrediti najvažnije fermentacijske produkte te antimikrobnu i antioksidativnu aktivnost dobivenih uzoraka. Dodatno odrediti mikrobni sastav "čajne gljive".

DATA ZAŠTITA 11.6.2021. POTPIŠ MENTORA



## **Predgovor**

Ovim putem zahvaljujem se svojoj obitelji i kolegama na strpljenju, potpori i pomoći koja mi je olakšala završetak studija.

Zahvaljujem se mentorici prof. dr. sc. Jasni Mrvčić, što mi je bila od neizmjerne pomoći oko pisanja rada i izvođenja praktičnog dijela, što me je svojim savjetima i iskustvom usmjeravala. Hvala Vam na dostupnosti i trudu, hvala za svu potrebnu opremu koju ste mi omogućili i na praćenju tijeka pisanja završnog rada.

Također se zahvaljujem Prehrambeno – biotehnološkom fakultetu u Zagrebu na suradnji i pomoći oko praktičnog dijela rada.

Zahvaljujem se Snježani Kazazić, znanstvenoj suradnici Instituta Ruđer Bošković na suradnji oko analize mikrobnog sastava SCOBY kulture koja je provedena pomoću Microflex LTTM MALDI-TOF instrumenta.

Zahvaljujem se svim profesorima i predavačima na prenesenom znanju, savjetima i podršci tijekom studija na Sveučilištu Sjever.

Zahvaljujem se pročelniku doc. dr. sc. Bojanu Šarkanj na trudu oko usavršavanja studija Prehrambene tehnologije, na trudu koji je uložio za nas studente i na svom prenesenom znanju i iskustvu.

## Sažetak

Kombucha je napitak proizveden fermentacijom zaslađenog crnog čaja, pomoću „kombucha gljive“, simbiotske kulture bakterija i kvasaca koje obitavaju u celuloznom biofilmu na površini čaja. Blago slatki, gazirani i kiseli čajni napitak, karakteristike su koje opisuju kombuchu. U radu je praćen utjecaj sastava hranjive podloge na fermentacijsku aktivnost SCOBY kulture (*engl.* Symbiotic Colony of Bacteria and Yeast) pri čemu su korištene različite vrste čaja: crni čaj, čaj aronije, majčine dušice te čaj od đumbira. Na kraju fermentacije analiziran je sastav kombuche te njena antimikrobna aktivnost. Rezultati su pokazali da se kombucha napitak može pripremati i od raznih drugih biljaka, kao što su majčina dušica, aronija i đumbir te one nude odgovarajuću alternativu crnom čaju za fermentaciju kombuche.

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

## **Summary**

Kombucha is a beverage produced by fermentation of sweetened black tea, using "kombucha mushroom", a symbiotic culture of bacteria and yeasts that live in the cellulose biofilm on the surface of tea. Slightly sweet, carbonated and sour tea drink, are the characteristics that describe kombucha. This study monitors the influence of nutrient medium composition on the fermentation activity of SCOBY culture (Symbiotic Colony of Bacteria and Yeast) using different types of tea: black tea, chokeberry tea, thyme and ginger tea. At the end of fermentation, the composition of kombucha and its antimicrobial activity were analyzed. The results showed that kombucha drink can also be prepared from various other herbs, such as thyme, chokeberry and ginger, and they offer a suitable alternative to black tea for fermenting kombucha.

**Keywords:** kombucha, tea, SCOBY, fermentation



## Popis korištenih kratica

<b>SCOPY</b>	Simbioza kolonija bakterija i kvasaca ( <i>engl. Symbiotic colony of bacteria and yeast</i> )
<b>HPLC</b>	visoko djelotvorna tekućinska kromatografija ( <i>engl. High Pressure Liquid Chromatography</i> )
<b>RI</b>	refraktni indeks ( <i>engl. Refractive Index</i> )
<b>TPC</b>	ukupni fenoli ( <i>engl. Total phenolics content</i> )
<b>GAE</b>	ekvivalent galne kiseline ( <i>engl. gallic acid equivalent</i> )
<b>CČ</b>	crni čaj ( <i>engl. Black Tea</i> )
<b>AR</b>	aronija ( <i>engl. Chokeberry</i> )
<b>MD</b>	majčina dušica ( <i>engl. Thyme</i> )
<b>ĐR</b>	đumbir ( <i>engl. Ginger</i> )

# Sadržaj

1.	Uvod.....	1
2.	Teorijski dio .....	3
2.1.	Aromatično i ljekovito bilje u kombucha napitku.....	3
2.2.	Kombucha .....	6
2.2.1.	<i>Mikroorganizmi kombuche</i> .....	6
2.2.2.	<i>Proces fermentacije kombuche</i> .....	8
2.2.3.	<i>Funkcionalna svojstva kombucha napitka</i> .....	9
3.	Praktični dio .....	11
3.1.	Tijek istraživanja .....	11
3.2.	Materijali i metode rada .....	11
3.2.1.	<i>Regeneracija komercijalne kulture kombuche</i> .....	11
3.2.2.	<i>Priprema hranjive podloge – čaja</i> .....	12
3.2.3.	<i>Fermentacija kombuche</i> .....	13
3.2.4.	<i>Određivanje pH vrijednosti</i> .....	13
3.2.5.	<i>Određivanje koncentracije fermentacijskih produkata</i> .....	14
3.2.6.	<i>Određivanje ukupnih fenolnih spojeva (TPC)</i> .....	17
3.2.7.	<i>Određivanje antibakterijske aktivnosti kombucha napitaka</i> .....	19
3.2.8.	<i>Analiza mikrobnog sastava SCOBY kulture</i> .....	19
4.	Analiza rezultata .....	22
4.1.	Utjecaj sastava hranjive podloge na tijek fermentacije .....	22
4.2.	Utjecaj sastava hranjive podloge na koncentraciju biološki aktivnih spojeva .....	31
4.3.	Utjecaj sastava hranjive podloge na antibakterijsku aktivnost kombucha napitaka ...	33
4.4.	Mikrobni sastav SCOBY kulture .....	35
5.	Zaključak.....	37
6.	Literatura.....	38
	Popis slika .....	41



# 1. Uvod

Riječ „kombucha“ izvedena je od japanskih riječi „morske alge“ (kombu) i „čaj“ (cha). Kombucha je tradicionalni fermentirani napitak, star nekoliko tisuća godina, gdje se s Istoka proširio na Zapad [1]. Dobiva se fermentacijom ekstrakta lista čaja i simbiotske kulture bakterija i kvasca koji tvore „čajnu gljivu“. Sloj plutajuće bakterijske celuloze i tekući, kiselkasti napitak, dva su dijela kombucha čaja. Okus je blago kiselkasto – slatki, pomalo podsjeća na jabukovaču [2].

Priprema ovog napitka nije zahtjevna te se može proizvesti kod kuće. Iako se zeleni čaj, kao i druge vrste čajeva, mogu koristiti za pripremu kombuche, crni čaj u kombinaciji s bijelim konzumnim šećerom, smatraju se najpogodnijom podlogom [2]. Još od samih početaka proizvodnje i konzumacije čaja, primijećeno je da napitak ima različit sastav ovisno o sorti od koje se proizvodi, klimatskim uvjetima te postupcima koji se koriste u proizvodnji. U čaju se nalaze različiti sastojci poput aminokiselina, katehina, alkaloida, kofeina, vitamina, klorofila, minerala i elemenata u tragovima. Najzastupljeniji polifenoli su flavonoli, odnosno katehini koji spadaju u grupu flavonoida. Za utjecaj crnog i zelenog čaja na zdravlje čovjeka uvelike je zaslužan katehin kao derivat polifenola. On djeluje kao snažni antioksidans. Ovi spojevi prisutni su i u kombuchi [2].

Kombucha nakon fermentacije sadrži i druge spojeve. Kemijskom analizom kombucha čaja utvrđena je prisutnost raznih organskih kiselina kao što su octena, glukonska, glukuronska, limunska, L-mliječna kiselina, jabučna, vinska; šećera, vitamina, aminokiselina, pigmenata, lipida, proteina, etanola, polifenola te raznih minerala. Prisutnost i količina kemijskih spojeva u kombucha napitku su promjenjive i uglavnom ovise o mikroorganizmima simbiotske kulture koja se koristi za fermentaciju, vremenu, temperaturi, količini saharoze te vrsti čaja koji se koristi. Neki od njih potječu od korištenog čaja dok drugi nastaju tijekom fermentacije.

Fermentacija je jedna od najstarijih metoda koje se koriste za čuvanje odnosno konzerviranje hrane. Tijekom fermentacije dolazi do biokemijskih promjena hrane tj. hranjive podloge koja utječe na svojstva konačnog proizvoda. Kultura koja se koristi za fermentaciju kombucha napitka ima različit mikrobiološki sastav ovisno o podrijetlu, vremenu, zemljopisnom položaju te hranjivoj podlozi koja se koristi za fermentaciju, a čine ju bakterije octene kiseline te kvasci. Kvasci pomoću enzima invertaze kataliziraju hidrolizu saharoze u fruktozu i glukozu, te tijekom procesa glikolize sintetiziraju etanol i druge metabolite. Bakterije octene kiseline imaju sposobnost proizvodnje octene kiseline iz etanola kao i sposobnost konvertirati glukozu u glukonsku kiselinu. Također, tijekom fermentacije bakterije iz saharoze stvaraju sekundarni metabolit nanocelulozu koja se pojavljuje u obliku biofilma i u koju se inkorporira bakterijska i

kvaščeva biomasa. Tako nastaje karakteristična čajna gljiva koja pluta na površini napitka te poprima oblik posude u kojoj se nalazi.

Brojni su navodi o možebitnom zdravstvenom i terapijskom djelovanju kombuche na ljudsko zdravlje. Navodi se da kombucha pozitivno djeluje na dijabetes, smanjuje koncentraciju triglicerida i lipoprotein – kolesterola niske gustoće, štiti jetru od stvaranja slobodnih radikala koji utječu na oštećenje hepatocita. No radi se o laboratorijskim istraživanjima na stanicama ili životinjama, dok ove tvrdnje nisu potvrđene na istraživanjima na ljudima. Unatoč tome, prisustvo žive kulture, biološki aktivnih spojeva koji potječu iz čaja kao i laboratorijskih *in vitro* istraživanja potiču istraživače da proučavaju ovu fermentiranu namirnicu [3].

Cilj rada je praćenje utjecaja sastava hranjive podloge na fermentacijsku aktivnost SCOBY kulture (*engl.* Symbiotic Colony of Bacteria and Yeast) pri čemu su korištene različite vrste čaja: crni čaj, čaj aronije, majčine dušice te čaj od đumbira. Na kraju fermentacije analiziran je sastav kombuche te njena antimikrobna aktivnost.

## 2. Teorijski dio

### 2.1. Aromatično i ljekovito bilje u kombucha napitku

Kombucha se tradicionalno priprema fermentacijom zaslađenog crnog ili zelenog čaja (*Camellia sinensis*) simbiozom bakterija i kvasca (SCOBY). *Camellia sinensis* ili čajevac je drvo s nazubljenim, kožnatim i zimzelenim listovima. Plodovi su mu okrugli s tvrdim ljuskama, a cvjetovi bijelo do svijetlo ružičasti (slika 1.) [3].



Slika 1. Biljka čajevac (*Camellia sinensis*)

Crni čaj, dobiven fermentacijom listova čajevca, oksidira i sadrži uglavnom polifenole. Glavne komponente koje sadrži crni čaj su: katehini, flavonoli, fenolne kiseline, aminokiseline, metilksantine, ugljikohidrate, proteine i mineralne tvari. Razna provedena istraživanja pružaju dokaze da crni čaj ima snažna antioksidativna svojstva [4]. Velićanski i sur. (2014.) u svojem su istraživanju koristili matičnjak (*Melissa officinalis*) koji je korišten kao jedini izvor dušika za fermentaciju kombuche. Rezultati su pokazali da se matičnjak može uspješno koristiti kao alternativa *C. sinensis* za fermentaciju kombuche. Ukupni sadržaj fenola i antioksidativno djelovanje na DPPH (2,2-difenil-1-piklorhidrazil) radikale fermentacijskog napitka matičnjaka bili su veći od sadržaja tradicionalne kombuche [5]. Savić i sur. ispitivali su antibakterijsko djelovanje na različite mikroorganizme pomoću kombucha napitaka napravljenih od stolisnika (*Achillea millefolium*), gospine trave (*Hypericum perforatum*), majčine dušice (*Thymus serpyllum*) i lipe (*Tilia cordata*), dok je kao kontrolni uzorak korišten crni čaj (*Thea sinensis*). Iz tog istraživanja saznajemo da napitak napravljen od stolisnika ima najizraženije antibakterijsko djelovanje [6]. Navedena istraživanja pokazala su da se kombucha napitak može pripremati i od raznih aromatičnih i ljekovitih biljaka, koja nude odgovarajuću alternativu crnom čaju za fermentaciju kombuche.

Aronija (*Aronia melanocarpa*) je ljekovita i autohtona biljka sjeverne Amerike, a danas je rasprostranjena po raznim zemljama u svijetu. Močvarna područja i šume s dovoljnim izvorom svjetlosti, njena su prirodna staništa. Njen rast omogućen je na kiselom, neutralnom ili bazičnom tlu. Može narasti 1 – 6 m u visinu. Listovi su joj jednostavni, ovalni do obrnuto jajasti s pilastim rubom, zelena boje. Cvjetovi su joj dvospolni, bijeli do blijedo ružičasti s 5 okruglastih latica i 5 lapova. Biljka cvate tijekom srpnja i kolovoza. U svakoj bobici se nalazi 1-5 malih sjemenki. Izrazito je otporna na niske temperature, sušu, kukce i različita zagađenja [7]. Plod aronije jedan je od najbogatijih biljnih izvora fenolnih tvari, uglavnom antocijanina – glikozida cijanidina. Proizvodi tamne purpurne bobice okruglastog oblika (slika 2.). Vrlo su trpkog okusa zbog čega se ne koriste kao stolno voće, već za industrijsku preradu. Tamno obojenje dolazi od antocijana koji su zastupljeni u vrlo visokim koncentracijama. Zahvaljujući njihovom učinku, aronija ima visoku antioksidativnu aktivnost [8]. Uz bogatstvo antioksidansa, aronija sadrži i mnogo vitamina, minerala, i prehranbenim vlaknima te ima izrazita ljekovita svojstva i djeluje učinkovito u podizanju imuniteta [9].



Slika 2. *Aronia melanocarpa*

Majčina dušica (*Thymus serpyllum*) (slika 3.) je aromatska i ljekovita biljka malog rasta i oblika grma. Raste na kamenju, livadama, pašnjacima, pretežito na suhim i sunčanim područjima [10]. Najviše je rasprostranjena na Mediteranu, a karakteristična je i za dijelove sjeverne Azije i južne Afrike [6]. Ljekoviti sastojci u majčinoj dušici nalaze se isključivo u listu i cvijetu majčine dušice [10]. Majčina dušica sadrži visoke koncentracije fenolnih spojeva zbog čega joj se pripisuje antimikrobno i antioksidativno djelovanje [11]. Ona obiluje željezom i kalcijem, a djeluje kao diuretik, antiseptik, analgetik. Važno je naglasiti da ljekoviti sastojci u biljci lako isparavaju. Pri samom mljevenju već se gubi najveći dio, a ostatak nakon proizvodnje čaja. Uz to, ljekoviti sastojci ispare kuhanjem u otvorenoj posudi te čaj koji je pripremljen na takav način

gubi sva ljekovita svojstva. Čaj koji je pripremljen s nedovoljnom količinom biljke također nema ljekovita svojstva [10].



*Slika 3. Thymus serpyllum*

Đumbir (*Zingiber officinale*) je trajna gomoljasta biljka s vitkim, uspravnim listovima, promjera 0,6 cm, naraste 50 – 100 cm u visinu [12]. Koristio se kao začin više od 2000 godina. Potječe iz jugoistočne Azije, a danas se komercijalno uzgaja u južnoj i jugoistočnoj Aziji (Indija, Kina, Nepal), dijelovima Srednje Amerike i Kariba, tropskoj Africi i u Australiji. Od sadnje do branja plodova potreban je vremenski period od 8 – 10 mjeseci [13]. Njegov korijen i dobiveni ekstrakti sadrže polifenolne spojeve (6 – gingerol i njegove derivate), koji imaju visoko antioksidativno djelovanje (Slika 4.) [14].



*Slika 4. Đumbir*





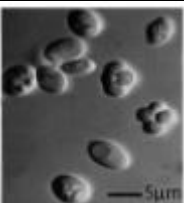
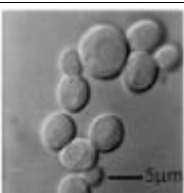
## 2.2. Kombucha

Kombucha je čajni napitak koji se konzumira širom svijeta [15]. Smatra se da je ovaj napitak nastao u Kini prije više od 2000 godina, dok postoje brojna povijesna izvješća o tome da se ovaj napitak konzumirao u zemljama kao što su Rusija, Njemačka i Bliski Istok [16].

Kombucha čaj dobiva se fermentacijom zaslađenog čaja pri čemu nastaje „čajna gljiva“ koja predstavlja simbiotsku zajednicu bakterija i kvasaca [17]. Najčešće se priprema kod kuće gdje obično fermentira 8 – 10 dana, ovisno o temperaturi prostora, istovremeno proizvodeći octenu kiselinu, male količine etanola i CO<sub>2</sub> [18]. Kako fermentacija napreduje, okus kombucha čaja mijenja se iz ugodno voćnog, kiselkastog, laganog i pjenušavog okusa u blagi okus nalik octu, povećavajući tako prihvatljivost okusa i druge osjetne aspekte pića za potrošače [16].

### 2.2.1. Mikroorganizmi kombuche

Fermentirani čaj nastaje djelovanjem plutajuće mikrobne strukture koja se sastoji od aerobnih bakterija i kvasaca. Izgled te strukture često podsjeća na površinsku plijesan ili gljivu, ali to je zapravo celulozna nakupina proizvedena tijekom rasta mikroba [15]. Poznato je da se mikrobni sastav kombuche razlikuje od jedne do druge kulture, ovisno o čimbenicima kao što su zemljopisni položaj, klima, lokalne vrste bakterija i kvasca te izvor inokuluma. Sukladno tome, u nekim istraživanjima je dokazano da upotreba različitih starter kultura kombuche može uzrokovati razvoj različitih rezultata antioksidativne aktivnosti, iako je korišten isti supstrat [16]. U kulturi kombuche postoje mnogi rodovi i vrste kvasaca, zabilježen je širok spektar različitih vrsta kao što su *Zygosac-charomyces*, *Candida*, *Kloeckera* / *Hanseniaspora*, *Torulasporea*, *Pichia*, *Brettanomyces* / *Dekkera*, *Saccharomyces*, *Lachancea*, *Saccharomycoides*, *Schizosaccharomyces* i *Kluyveromyces* [19]. Unatoč svojoj varijabilnosti, u tablici 1. prikazane su neke od dominantnih vrsta kvasca prisutnih u kombuchi.

VRSTA	MORFOLOGIJA
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	
<i>Brettanomyces bruxellensis</i>	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	

Tablica 1. Dominantne vrste kvasaca prisutnih u kombuchi

U kombuchi se nalaze i razne vrste bakterija octene kiseline. Bakterije octene kiseline, važne su i raznolike skupine bakterija koje su uključene u proizvodnju fermentirane hrane i pića [20]. Te bakterije, za razliku od kvasaca, zahtijevaju velike količine kisika za svoj rast i aktivnost [19]. Pronađene vrste bakterija octene kiseline povezane s fermentacijom u kombuchi su: *K. xylinus*, *A. pasteurianus*, *K. hansenii*, *A. aceti*, *Gluconacetobacter saccharivorans*, uz njih, pronađeni su i sljedeći rodovi: *Acetobacter*, *Gluconobacter*, i *Gluconacetobacter spp* [20]. Od navedenih, glavne vrste bakterija su: *Acetobacter xylinum*, *A. xylinodes*, *Bacterium gluconicum*, *A. aceti*, *A. Pasteurianus* [21].

Glavni metaboliti koji se mogu pronaći u kombuchi su: mliječna, octena, glukuronska i glukonska kiselina, glicerol i etanol [21].

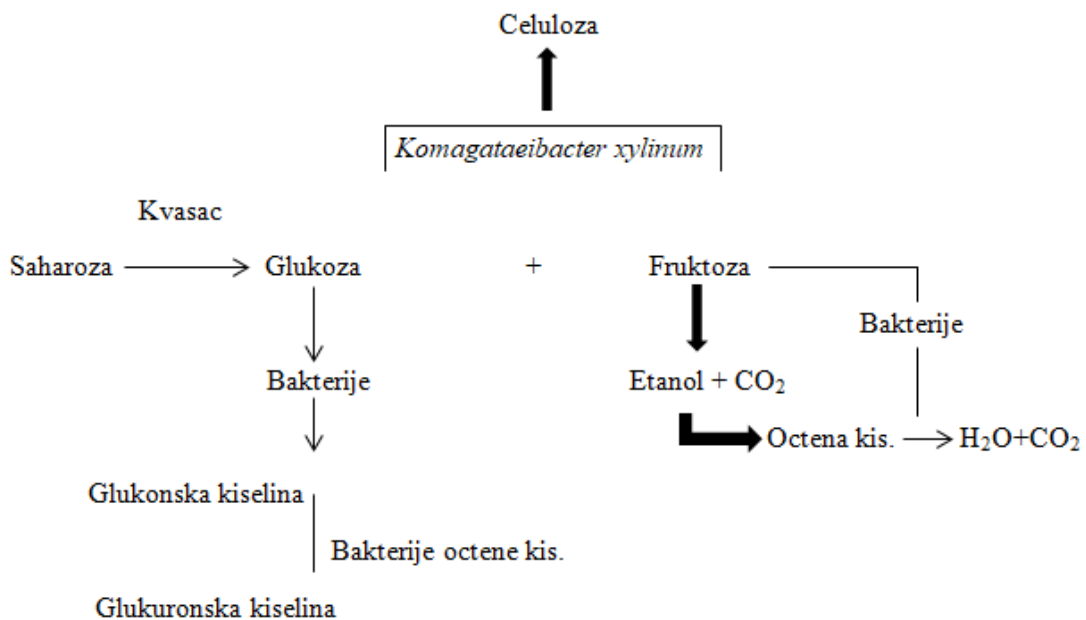
### 2.2.2. Proces fermentacije kombuche

Za pripremu tradicionalnog kombucha napitka, potrebna je starter kultura te najčešće korišteni supstrati crni čaj i konzumni šećer, iako se, za pripremu napitka, u posljednje vrijeme sve više koriste i druge vrste čajeva [21]. Fermentacija se obično odvija od 3 do 12 dana na sobnoj temperaturi [16]. Međutim, najbolji rezultati postignuti su u prosjeku od 15 dana [19]. Duža fermentacija često rezultira proizvodnjom previsokih razina kiselina koje mogu predstavljati potencijalne rizike kod konzumiranja [22]. U kućnim uvjetima pripreme, količina čaja koja se koristi za proces fermentacije i način pripreme razlikuju se prema osobnim željama. Okus i koncentracija spojeva koji se nalaze u ovom napitku također se razlikuju od sastava starter kulture, korištene količine starter kulture, vrste čaja i do vrste šećera. Kao što je spomenuto, tradicionalno se koristi crni čaj kao supstrat, međutim jednako su dostupni i zeleni i oolong čaj. Pokazalo se da zeleni čaj ima bolji stimulativni učinak na fermentaciju kombuche u usporedbi s fermentacijom crnog čaja, što dovodi do stvaranja proizvoda u kraćem vremenskom periodu [16].

Na fermentaciju utječu mnogi čimbenici kao što su temperatura, pH, količina kisika, otopljeni CO<sub>2</sub>, operativni sustav, opskrba prekursora, brzina smicanja u fermentatoru, kao i priroda i sastav medija. Svaka varijacija ovih čimbenika može utjecati na brzinu fermentacije, spektar, performanse, organoleptička svojstva, hranjivu kvalitetu i druga fizikalno-kemijska svojstva proizvoda. Različite biljne sorte, koncentracija šećera, vrijeme fermentacije i sastav čajne gljive mogu utjecati na razlike u sastavu, a time i na biološku aktivnost [19].

Čajna gljiva koja se u početku dodaje u čaj naziva se "matična čajna gljiva", gdje se tijekom fermentacije odvija razvoj novog sloja čajne gljive nastale iz matične. Čajna gljiva koristi šećer kao svoj izvor ugljika i stvara novi sloj gljive. Nova „gljiva kćerka“ nastaje u svakom uspješnom koraku fermentacije i koristi se za ponovnu inokulaciju nove serije čaja. Na početku fermentacije, mali dio prethodno pripremljenog kombucha napitka može se dodati novom čaju kako bi se smanjio pH te se tako zaustavio rast neželjenih mikroorganizama. Kako fermentacija napreduje, pojavit će se mjehurići plina zbog ugljične kiseline koja se stvara tijekom fermentacije [16]. Mikrobi u ovoj kulturi sposobni su fermentirati zaslađeni crni čaj i proizvesti složeni koktel molekula. Na kraju procesa fermentacije, dobiveni napitak sastojao bi se od šećera, polifenola kao što su katehini, organske prehrambene kiseline, lizin, vlakna, etanol, aminokiseline, esencijalni elementi poput Na, K, Ca, Cu, Fe, Mn, Ni i Zn, vitamini topivi u vodi poput vitamina C, vitamina B i vitamina B<sub>2</sub>, katalaze, ugljičnog dioksida, tvari koje djeluju kao antibiotske tvari i neki hidrolitički enzimi.

Kako fermentacija odmiče, kvasci ove mješovite kulture mogu razgraditi saharozu dajući glukozu, fruktozu i ugljični dioksid koji daju pjenušav i svjetlucav izgled. Bakterije octene kiseline imaju sposobnost metabolizirati glukozu u glukonsku kiselinu, a fruktozu u octenu kiselinu. Također, kvasci mogu sintetizirati etanol koji se zatim oksidira u acetaldehid pomoću bakterija. Kvasac preferira fruktozu kao supstrat pri proizvodnji etanola. Octena kiselina koju proizvode bakterije octene kiseline ima sposobnost stimuliranja proizvodnje etanola pomoću kvasaca, a etanol zauzvrat može olakšati bakterijama octene kiseline rast i proizvodnju octene kiseline [16]. Saharozu kao izvor ugljika u uzgojnom mediju hidrolizira enzim invertaza iz kvasca u SCOBY-u. Kvasci fermentiraju glukozu i fruktozu u etanol, koji zatim octeno - kiselinske bakterije oksidiraju u octenu kiselinu. Ovo je glavni metabolički put fermentacije kombuche, a octena kiselina, etanol i glukonska kiselina glavni su SCOBY proizvodi (Slika 5.) [5].



Slika 5. Glavni metabolički putevi fermentacije kombucha napitka

Istraživanja su pokazala da su etanol i octena kiselina prisutni u kombucha napitku uključeni u antimikrobno djelovanje protiv patogenih bakterija, pružajući tako zaštitu od onečišćenja čajne gljive [16].

### 2.2.3. Funkcionalna svojstva kombucha napitka

Kako bi se mogla dokazati blagotvorni učinak kombuche na ljudski organizam, potrebno je provesti *in vivo* istraživanja. *In vivo* istraživanja vezana uz funkcionalna svojstva kombucha napitka uglavnom su provedena na štakorima i miševima, dok su u nekim istraživanja radili i na

ostalim životinjama, kao što su zečevi, patke, svinje, psi i kokoši. Kabiri i sur. (2013) u svojem su istraživanju proučavali korisne učinke kombuche i silimarina na štakorima koji su imali oštećenja jetre inducirana tioacetamidom. Kroz tri tjedna štakori su bili tretirani tioacetamidom, kombuchom i silimarinom u raznim kombinacijama. Na kraju istraživanja zaključeno je da polifenolna komponenta kombuche i silimarina štiti jetru od stvaranja slobodnih radikala koji oštećuju hepatocite [3].

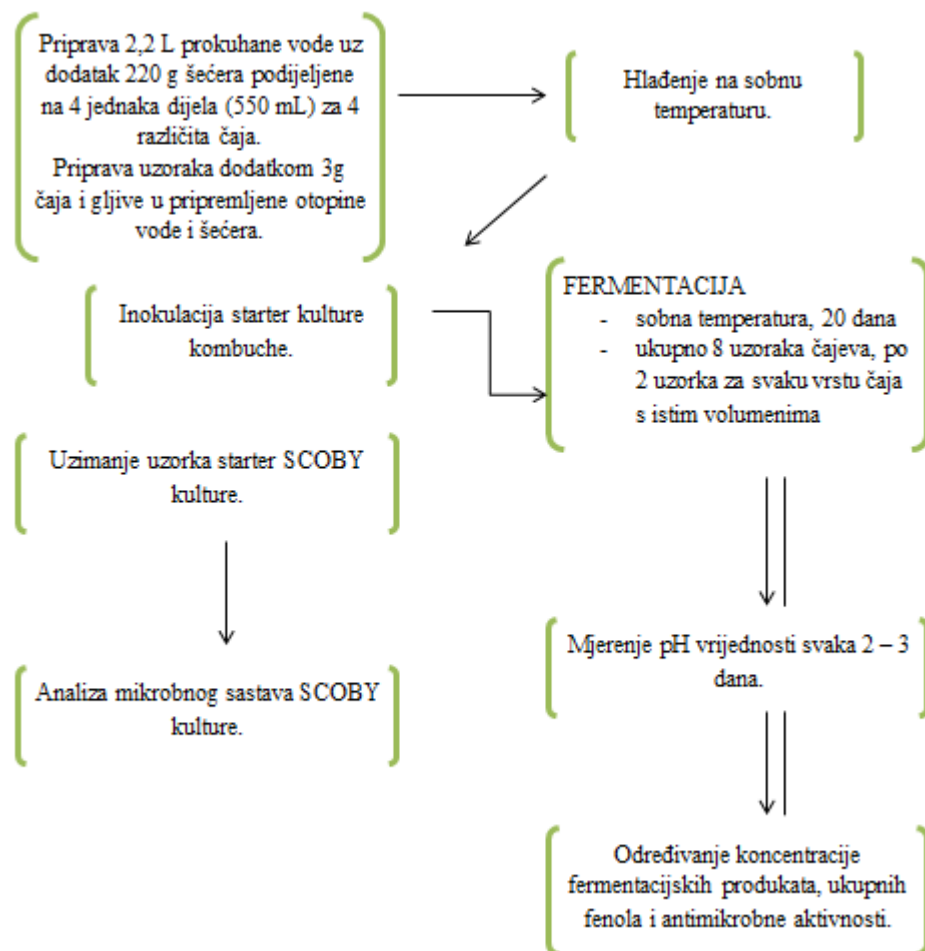
Kombucha napitak sadrži minerale koji uglavnom potječu iz čaja (kalij, mangan, fluoridni ioni), vitamine (E, K, B), aminokiseline (posebno teanin, derivat glutamina), kao i druge spojeve koji nastaju kao rezultat brojnih reakcija tijekom fermentacije čaja [23].

Kombucha napitak sadrži probiotike. Poznato je da su probiotici živi mikroorganizmi te oni u određenoj količini mogu rezultirati raznim zdravstvenim dobrobitima. Najčešće bakterijska komponenta probiotičke smjese dolazi iz *Lactobacillus* ili *Bifidobacterium* ili mješavine ova dva roda. U toj smjesi može biti nekoliko uobičajenih vrsta kvasca kao što su *S. boulardii* i *S. cerevisiae*. Poznato je da probiotički mikrobi imaju vitalnu ulogu u održavanju ljudskog zdravlja. Probiotički mikroorganizmi pružaju ravnotežu u crijevnoj mikroflori, normaliziraju procese u crijevima i jačaju imunološki sustav [16].

### 3. Praktični dio

#### 3.1. Tijek istraživanja

U nastavku je prikazan shematski dijagram tijeka istraživanja (slika 6.).



Slika 6. Shematski dijagram tijeka istraživanja

Svaki postupak prikazan u shematskom dijagramu tijeka istraživanja, detaljnije je objašnjen u nastavku.

#### 3.2. Materijali i metode rada

##### 3.2.1. Regeneracija komercijalne kulture kombuche

Infuzija crnog čaja pripremljena je dodatkom 3 vrećice crnog čaja po 1,5 g u 1 L vode u koju je dodano  $100 \text{ g L}^{-1}$  saharoze (bijeli konzumni šećer). Prema uputama proizvođača, vrećice su

izvađene nakon 5 minuta, nakon čega je čaj ohlađen na sobnoj temperaturi. U čistu staklenku dodano je 300 mL čaja (hranjive podloge) i komercijalna starter kultura kombuche, zajedno s „majčinskom tekućinom“. Fermentacija je trajala 12 dana na sobnoj temperaturi (slika 7.).



*Slika 7. Regenerirana starter kultura kombuche*

### **3.2.2. Priprema hranjive podloge – čaja**

Prokuhano je 2,2 L vode, nakon čega je dodano 220 g bijelog konzumnog šećera. Količina od 2,2 L prokuhane vode razdijeljena je u 4 oprane i sterilizirane teglice po 550 mL. U svaku teglicu stavljeno je po 3g različitih vrsta čaja: crni čaj, čaj od aronije, đumbira i majčine dušice. Vrećica crnog čaja stajala je u tekućini 5 minuta prema uputama proizvođača, dok su ostale tri vrste čaja držane 8 minuta kako proizvođač navodi u uputama. Nakon toga, čajevi su ohlađeni na sobnoj temperaturi oko 10 minuta. Ohlađeni čajevi raspoređeni su u 8 teglica po 250 mL, gdje su po dvije teglice za svaku vrstu čaja. Regenerirana kultura kombuche razrezana je na 8 približno jednakih dijelova. Svaki dio usitnjen je uz 20 mL „njezinog“ čaja i dodan u jednu teglicu s istim čajem.

### 3.2.3. Fermentacija kombuche

Za proces fermentacije bili su pripremljeni uzorci (crni čaj, aronija, majčina dušice i đumbir) (slika 8.). Fermentacija se odvijala na tamnom mjestu pri sobnoj temperaturi. Fermentacija đumbira, majčine dušice, aronije i crnog čaja trajala je 20 dana. U tijeku fermentacije kontrolirala se pH vrijednost uzoraka i rast nove gljive.



*Slika 8. Početni uzorci čajeve prije procesa fermentacije (1 – crni čaj, 2 – aronija, 3 – majčina dušica, 4 – đumbir)*

### 3.2.4. Određivanje pH vrijednosti

Uzorcima je pH vrijednost mjerena svaki drugi do treći dan tijekom fermentacije. pH vrijednosti uzoraka kombuche određivana je pomoću pH metra Schott CG 842 (Mainz, Njemačka) uranjanjem elektrode u uzorak. Prije početka provedbe analize, elektroda pH metra kalibrirana je amonijačnim puferom pH=4.



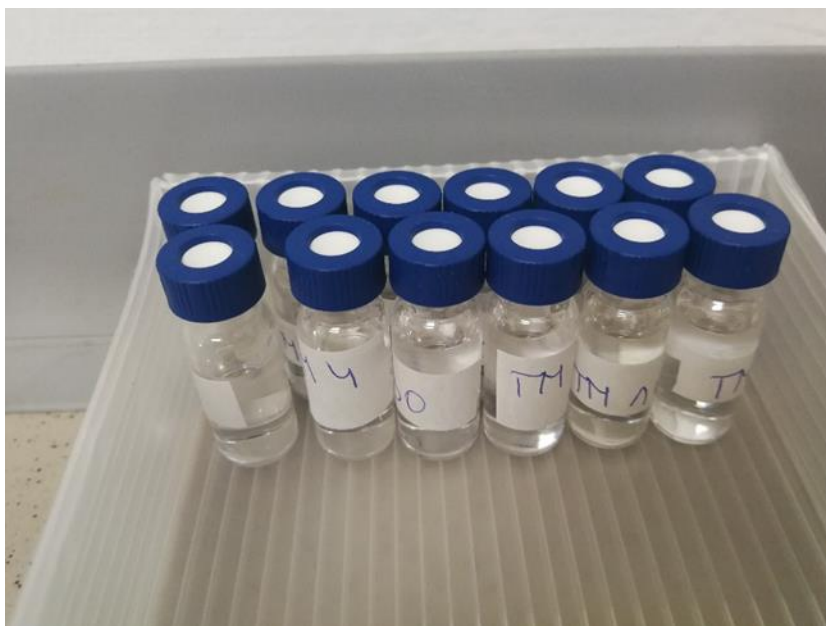
### 3.2.5. Određivanje koncentracije fermentacijskih produkata

Koncentracija fermentacijskih produkata odrađena je u suradnji s Prehrambeno-bioteknološkim fakultetom u Zagrebu pri čemu je korištena visoko djelotvorna tekućinska kromatografija. High pressure liquid chromatography (visoko djelotvorna tekućinska kromatografija, HPLC) je jedna od najzastupljenijih instrumentalnih metoda u laboratorijima. Svrha HPLC-a je detektiranje i kvantifikacija različitih spojeva u hrani te u drugim sustavima. Osnovne komponente uređaja čine: mobilna faza, pumpa, injektor, stacionarna faza (kolona), detektor i sustav za obradu podataka (računalo). Preko računala podaci se ispisuju u obliku kromatograma. Kromatogram je grafički prikaz ovisnosti koncentracija komponenata o vremenu njihovog izlaska iz kolone. Koncentracije fermentacijskih produkata određivane su na HPLC uređaju CLASS-VP LC-10A VP (Shimadzu, Kyoto, Japan). Za određivanje koncentracije fermentacijskih produkata korištene su postojeće baždarne krivulje. Identifikacija supstrata i produkata fermentacije provedena je na temelju retencijskih vremena razdvojenih spojeva i standarda (tablica 2.). Kvantitativne vrijednosti pojedinačnih spojeva izračunate su iz jednadžbe baždarnih pravaca. Koncentracije su izražene u  $\text{mg L}^{-1}$ .

Prije analize bila je neophodna prethodna obrada uzoraka da bi se postigla ekstrakcija produkata fermentacije te da bi se iz uzoraka uklonili proteini. Taloženje proteina provedeno je pomoću Carrez 1 i Carrez 2 otopine [24]. Ukratko, 5 mL uzorka kombuche dodano je u odmjernu tikvicu od 50 mL, dodano je oko 30 mL destilirane vode te po 5 mL Carrez 1 i Carrez 2 otopine. Nakon korekcije pH vrijednosti i volumena sadržaj je profiltriran preko filter papira i dodatno prije nanošenja na kolonu kroz 0,45  $\mu\text{m}$  PTFE filter (slika 9.). Uzorci su prebačeni u vialu (slika 10.).



Slika 9. PTFE filteri za filtriranje uzorka prije HPLC analize

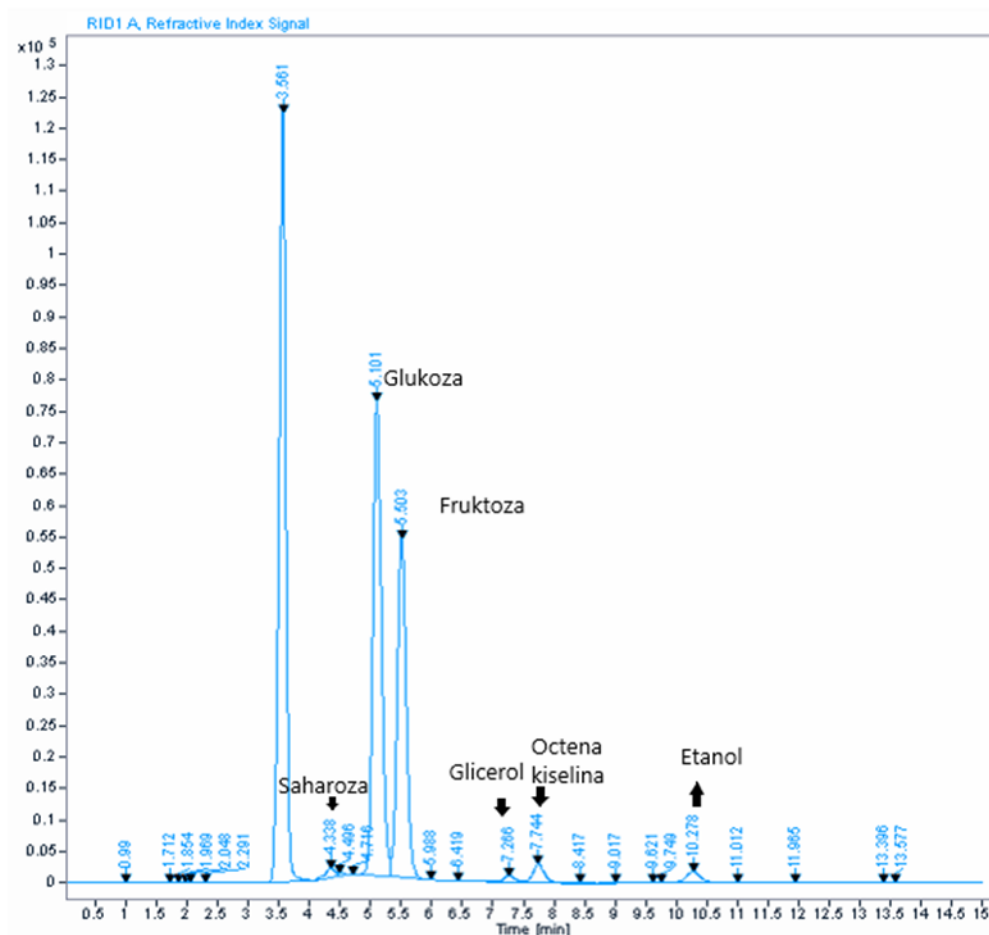


*Slika 10. Uzorci spremni za HPLC analizu*

Kromatografski uvjeti za određivanje supstrata i produkata alkoholne fermentacije:

Kolona:	Supelcogel <sup>TM</sup> C-610 H, 300 × 6,5 mm, 9 μm
Pretkolona:	Supelguard <sup>TM</sup> H
Pokretna faza:	0,1 % (vol vol <sup>-1</sup> ) H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> (protok 0,5 mL min <sup>-1</sup> )
Eluiranje:	izokratno
Detektor:	RI (detektor refraktivnog indeksa)
Temperatura kolone:	30 °C
Vrijeme trajanja:	30 min
Injektirani volumen:	20 μL

U nastavku je prikazan slika 11. koja prikazuje podatke o uzorku ispisane u obliku kromatograma.



Slika 11. Principijelni HPLC kromatogram uzorka (vlastita fotografija)

Standard	Retencijsko vrijeme (min)	Jednadžba baždarnog pravca
Saharoza	4,3	$y = 135\ 868\ x + 30\ 686$
Glukoza	5,1	$y = 135\ 278\ x - 3\ 377$
Fruктоza	5,5	$y = 125\ 211\ x + 3\ 746$
Glicerol	7,2	$y = 107\ 908\ x + 956$
Octena kiselina	7,7	$y = 57\ 358\ x + 697$
Etanol	10,2	$y = 55\ 421\ x + 1\ 343$

Tablica 2. Retencijska vremena standarada i pripadajuće jednadžbe baždarnih pravaca na navedenoj koloni i pri navedenim uvjetima kromatografije

### 3.2.6. Određivanje ukupnih fenolnih spojeva (TPC)

#### Princip metode:

Ukupni sadržaj fenola (TPC) u uzorcima određen je kolorimetrijskom metodom pomoću Folin - Ciocalteu reagensa tj. smjese fosfovolframove i fosfomolibdene kiseline [25]. U reakciji s fenolnim tvarima dolazi do redukcije fosfovolframove i fosfomolibdene kiseline u Wolframov oksid i molibdenov oksid, pri čemu fenolne tvari oksidiraju i dolazi do pojave plavog obojenja (slika 12.). Nakon toga se spektrofotometrijski određuje intenzitet nastalog plavog obojenja na 760 nm.

Uporabom standardnih otopina galne kiseline izrađen je baždarni pravac, iz kojeg se pomoću dobivene jednadžbe izračunala koncentracija ukupnih fenola u svakom uzorku. Rezultat se izražava kao  $\text{mg L}^{-1}$  ekvivalenta galne kiseline (GAE).



*Slika 12. Pojava plavog obojenja kao posljedica oksidacije fenolnih spojeva*

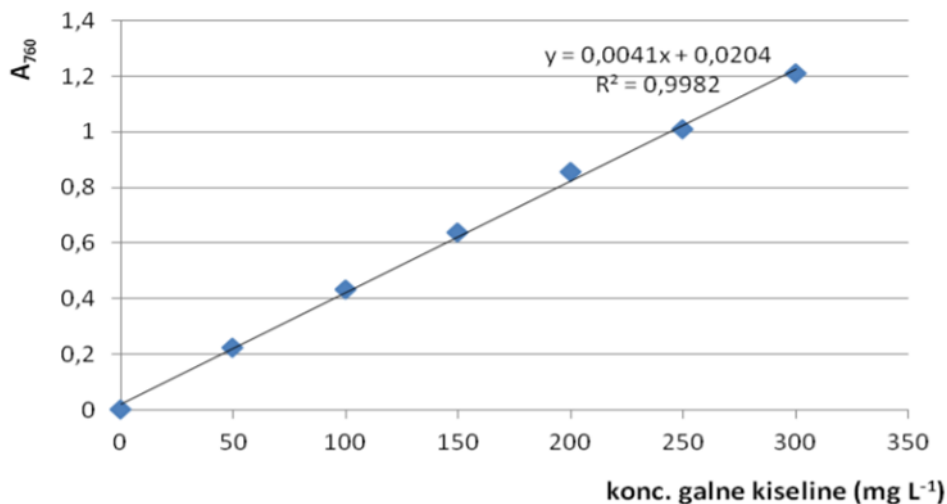
#### Postupak rada:

U odmjernoj tikvici od 10 mL otpipetirano je 300  $\mu\text{L}$  uzorka, 500  $\mu\text{L}$  Folin - Ciocalteu reagensa i 6 mL destilirane vode. Sastojci u tikvici su promiješani i nakon 5 minuta dodano je 1,5 mL natrijevog karbonata, nakon čega se tikvicu do oznake nadopunilo destiliranom vodom. Odmjerna tikvica je stavljena na tamno mjesto pri sobnoj temperaturi. Nakon 2 sata spektrofotometrijski se mjerila apsorbancija na 760 nm na spektrofotometru Helios Gamma UV-

Vis Spectrophotometer (Thermo Electron Corporation). Slijepa proba pripremljena je na jednak način kao i uzorak, ali je umjesto uzorka stavljeno 300  $\mu\text{L}$  destilirane vode. Svaki uzorak mjeren je u 3 paralele.

#### Izrada baždarnog pravca:

Baždarni pravac izrađen je korištenjem standardnih otopina galne kiseline koncentracija 100, 150, 200, 250 i 300  $\text{mg L}^{-1}$ . Standardne otopine tretiraju se kao i uzorak na gore opisani način. Nakon mjerenja apsorbance za standardne otopine moguće je nacrtati pravac ovisnosti apsorbancije o koncentraciji standardnih otopina galne kiseline. Baždarni pravac se dalje koristi kako bi se iz izmjerene apsorbance mogla izračunati nepoznata koncentracija fenolnih spojeva u uzorcima kombuche napitka.



Slika 13. Baždarni pravac za određivanje ukupnih fenolnih spojeva

#### Račun:

Iz pravca ovisnosti apsorbancije standardnih otopina galne kiseline o njihovoj koncentraciji, dobiven je baždarni pravac (slika 13.) s pripadajućom jednačinom pravca pomoću koje se izračunava koncentracija ukupnih fenola u uzorku:

$$y = 0,0041x + 0,0204 \quad (1)$$

pri čemu je  $y$  apsorbancija pri 760 nm, a  $x$  je masena koncentracija ukupnih fenola izraženih u  $\text{mg L}^{-1}$ .

### 3.2.7. Određivanje antibakterijske aktivnosti kombucha napitaka

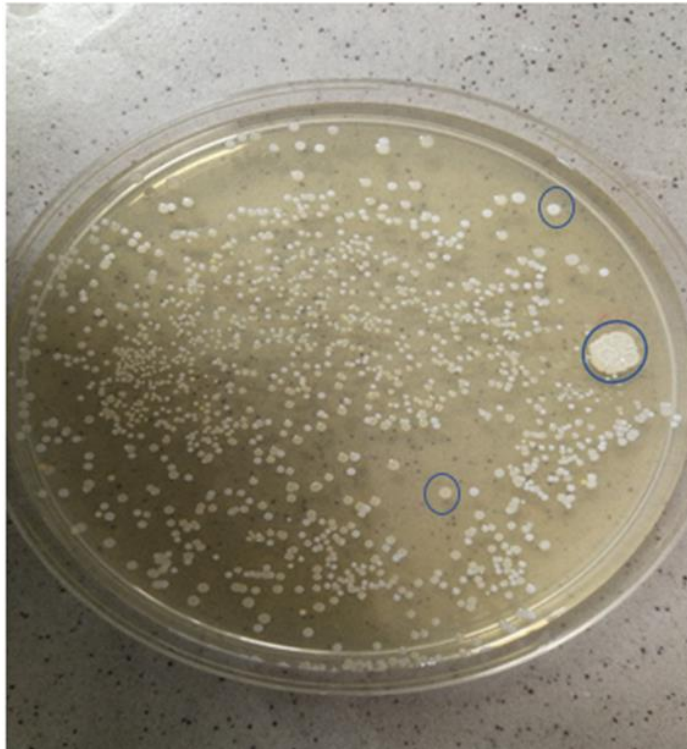
Antibakterijska aktivnost kombucha čaja određivana je klasičnom mikrobiološkom metodom radialne difuzije, mjerenjem zona inhibicije rasta test mikroorganizama: bakterija *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Lactobacillus kimchii* te *Lactobacillus plantarum*. Test mikroorganizmi su uzeti iz zbirke mikroorganizama Prehrambeno – biotehnološkog fakulteta u Zagrebu. Za uzgoj bakterija mliječne kiseline (bakterije roda *Lactobacillus*) korištena je MRS podloga (Man – Rogosa – Sharpe). Za uzgoj ostalih bakterijskih vrsta korišten je nutrient agar. Prekonoćne suspenzije stanica bakterija (100  $\mu$ L, McFarland 0,5 (A550 nm =0,125)  $\approx 1,5 \cdot 10^8$  stanica/mL) nacijepljene su na hranjive podloge te je u izbušene rupice u podlozi („bunariće“, visina 3 mm, promjer 4 mm) dodano 100  $\mu$ L fermentiranog čaja. Antibiotik kanamicin (Sigma) korišten je kao pozitivna kontrola i dodavan je u bunariće u količini od 20  $\mu$ L. Petrijeve ploče su stavljene u hladnjak oko 2 sata, kako bi se poboljšala difuzija uzorka u agar, a nakon toga na inkubaciju pri 37 °C. Nakon 24 h očitani su rezultati pokusa, pri čemu je zamjećivano postoji li zona inhibicije, je li područje zamućeno ili čisto, te su mjereni promjeri nastalih zona ravnalom. Svi pokusi su provedeni u duplikatu te je izračunata srednja vrijednost dobivenih zona inhibicije.

### 3.2.8. Analiza mikrobnog sastava SCOBY kulture

Analiza mikrobnog sastava SCOBY kulture provedena je pomoću Microflex LT™ MALDI-TOF instrumenta u suradnji s Institutom Ruđer Bošković. Ovaj specijalizirani uređaj služi za identifikaciju gram-pozitivnih i gram-negativnih bakterija, kvasaca i višestaničnih gljiva. Ima primjenu u kliničkoj mikrobiologiji, analizi hrane i u industrijskoj kontroli kvalitete proizvoda. Počevši od bakterijske kolonije, rezultati se dobivaju u nekoliko minuta. Sustav se temelji na spektrometriji masa. Dobiveni spektri nepoznatog mikroorganizma uspoređuju se sa spektrima u bazi podataka. Algoritam izračunava korelaciju između eksperimentalno dobivenih spektra i referentnih spektra u bazi podataka i rezultate prikazuje u obliku logaritamskih vrijednosti (engl. score) koje mogu biti u rasponu od 0 do 3. Prema uputama proizvođača vrijednosti od 2.0 i više pokazuju sigurnu identifikaciju vrste, vrijednosti od 1.7 do 1.9 identifikaciju na razini roda, a za vrijednosti ispod 1.7 identifikacija je nemoguća.

Mali dio SCOBY kulture je homogeniziran u sterilnoj destiliranoj vodi te je suspenzija nacijepljena na nutrient agar. Petrijeve ploče su stavljene na inkubaciju pri 37 °C, 48 sati. Nakon toga ploče su ostavljene na sobnu temperaturu još 72 sata kako bi kolonije pigmentirale i kako bi

se lakše mogle izdvojiti morfološki različite mikrobne vrste (slika 14). Izdvojeno je 12 kolonija čistih kultura koje su identificirane (slika 15.).



*Slika 14. Mješovite mikrobne vrste u SCOBY kulturi za identifikaciju*

## Result Overview

Result overview table--start						
Sample ID	Target Pos.	Organism (best match)	log(score) (Conf.)	Organism (second-best match)	log(score) (Conf.)	Consistency
1	F1	Bacillus pumilus	2.24 (+++)	Bacillus pumilus	1.97 (+)	(A)
2	F2	Bacillus pumilus	2.38 (+++)	Bacillus pumilus	2.11 (+++)	(A)
3	F3	Staphylococcus pasteurii	2.18 (+++)	Staphylococcus pasteurii	1.92 (+)	(A)
4	F4	Staphylococcus warneri	1.90 (+)	Staphylococcus warneri	1.85 (+)	(B)
5	F5	Micrococcus luteus	2.17 (+++)	Micrococcus luteus	2.14 (+++)	(A)
6	F6	Staphylococcus pasteurii	1.93 (+)	Staphylococcus pasteurii	1.70 (+)	(B)
7	F7	Staphylococcus pasteurii	2.02 (+++)	Staphylococcus pasteurii	1.91 (+)	(A)
8	F8	Microbacterium lacticum	1.59 (-)	Microbacterium dextranolyticum	1.39 (-)	(C)
9	F9	Staphylococcus warneri	2.12 (+++)	Staphylococcus warneri	2.07 (+++)	(A)
10	F10	Micrococcus luteus	2.39 (+++)	Micrococcus luteus	2.23 (+++)	(A)
12	F12	Methylobacterium rhodesianum	1.01 (-)	Methylobacterium rhodesianum	1.01 (-)	(C)

Result overview table--end

Slika 15. Primjer rezultata mikrobne identifikacije



## 4. Analiza rezultata

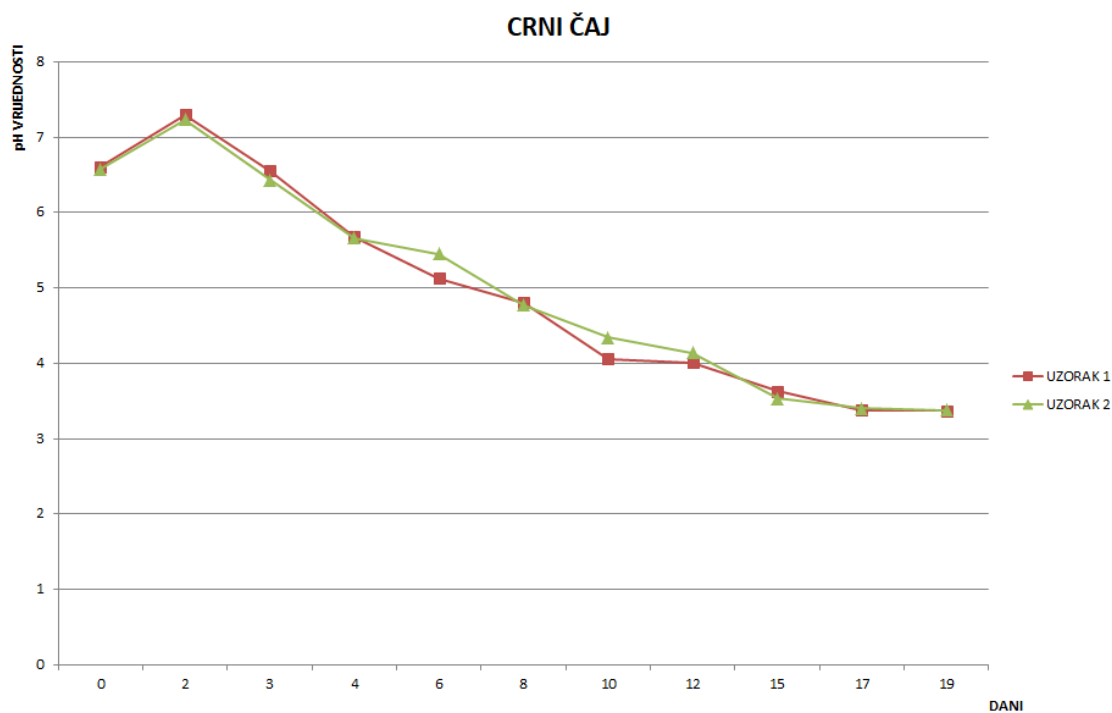
### 4.1. Utjecaj sastava hranjive podloge na tijek fermentacije

Od svojih dalekih povijesnih korijena do danas, kombucha se proizvodi koristeći kao bazu uglavnom crni čaj. No, u posljednjih par godina, kako u svijetu tako i u Republici Hrvatskoj, na krilima craft zanatstva, kreativnosti i inovativnosti malih poduzetnika, kombucha doživljava svoju renesansu pa se na tržištu pojavljuju brojne inačice kombuche pri čemu se koriste različite početne čajne baze. Tako je i u ovom radu ispitan utjecaj čajne baze na fermentacijsku aktivnost kombucha gljive. Na samom početku procesa fermentacije, uzorcima je izmjerena početna pH vrijednost. U svakom uzorku volumena 250 mL bilo je otopljeno 100 g L<sup>-1</sup> saharoze, odnosno 25 g 250 mL<sup>-1</sup> saharoze (bijeli konzumni šećer) (tablica 3.).

VRSTA ČAJA	UZORAK	POČETNA VRIJEDNOST	pH	KOLIČINA ŠEĆERA U UZORKU ( g 250 mL <sup>-1</sup> )
CRNI ČAJ	CC1	6,61		25
	CC2	6,58		25
ARONIJA	AR1	4,24		25
	AR2	4,19		25
MAJČINA DUŠICA	MD1	6,36		25
	MD2	6,27		25
ĐUMBIR	ĐR1	5,52		25
	ĐR2	5,53		25

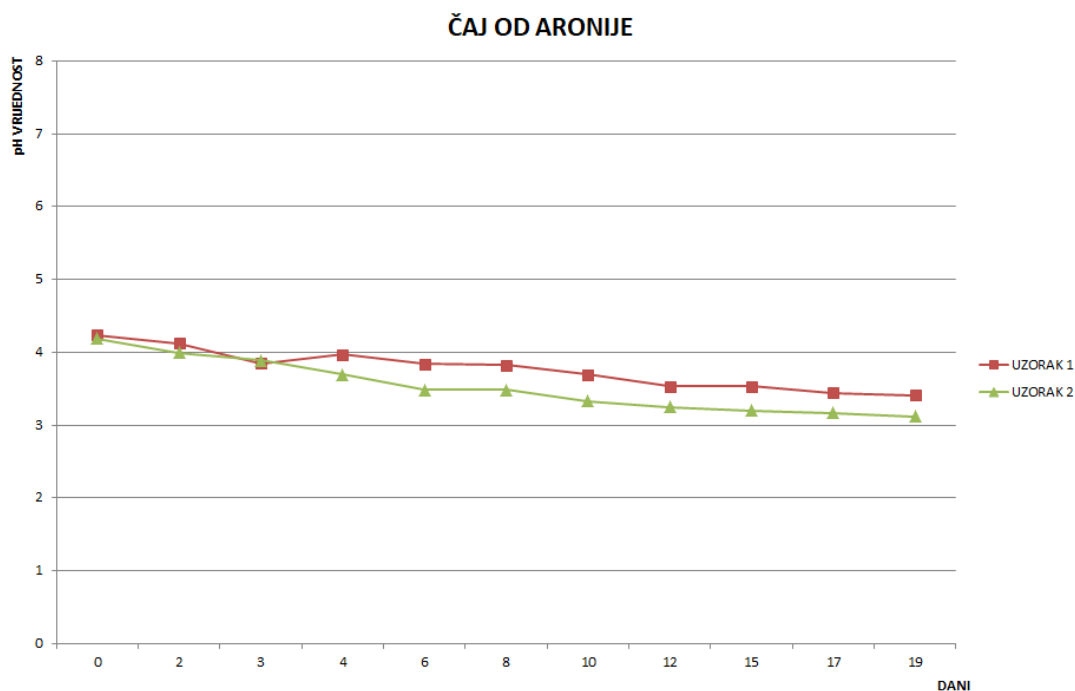
Tablica 3. Početne vrijednost pH i šećera u uzorcima

Tijekom fermentacije pratila se promjena pH vrijednosti. Slike 16. – 19. prikazuju rezultate pH vrijednosti po danima za svaki uzorak.



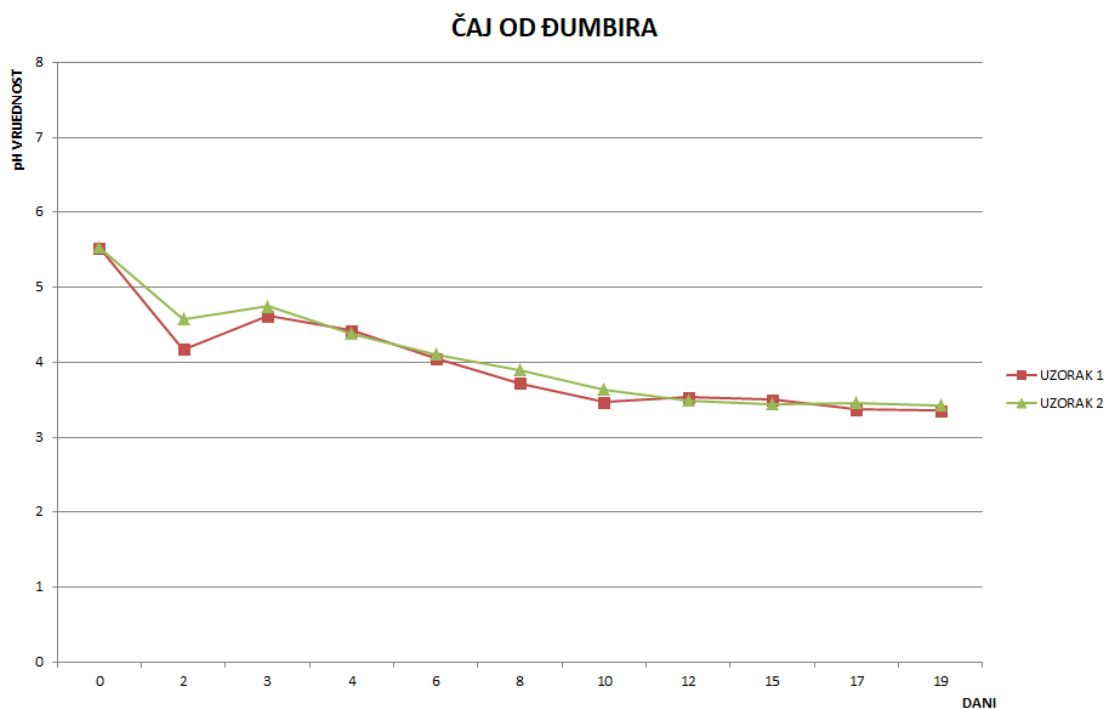
Slika 16. Promjene pH vrijednosti tijekom fermentacije kombuche u uzorcima s crnim čajem

Početna pH vrijednost crnog čaja bila je 6,61 (uzorak 1) i 6,58 (uzorak 2). Usred fermentacije pH vrijednost se smanjivala i 10. dan iznosila je oko 4 za oba uzorka. U nastavku fermentacije smanjenje pH vrijednosti je bilo manje izraženo. Nakon 15. dana fermentacije postignuta je konačna pH vrijednost od 3,63 (uzorak 1) i 3,53 (uzorak 2) i nakon toga se pH vrijednost nije mjenjala te je fermentacija prekinuta.



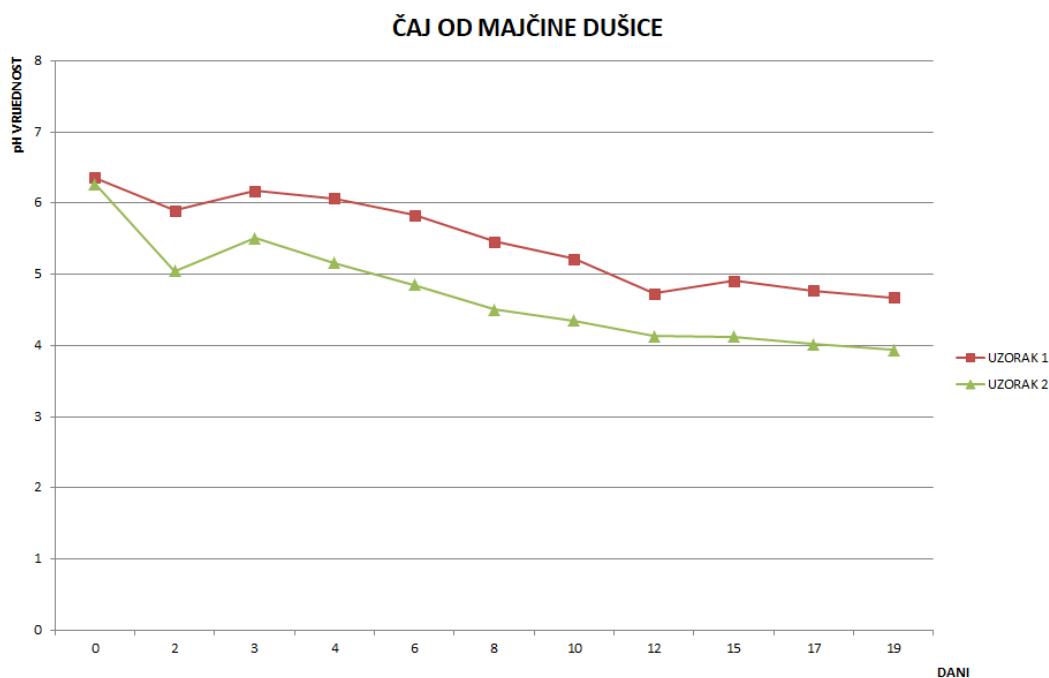
Slika 17. Promjene pH vrijednosti tijekom fermentacije kombuche u uzorcima s čajem od aronije

Početna pH vrijednost čaja od aronije bila je znatno niža u odnosu na ostale uzorke i iznosila je 4,24 (uzorak 1) i 4,19 (uzorak 2). Kod ovih uzoraka nije zabilježen značajniji pad pH vrijednosti kao što je zabilježeno kod crnog čaja. pH vrijednost se tijekom 20 dana snizila za jednu pH jedinicu te je nakon 20 dana fermentacija prekinuta.



Slika 18. Promjene pH vrijednosti tijekom fermentacije kombuche u uzorcima s čajem od đumbira

Početna pH vrijednost čaja od đumbira bila je 5,52 (uzorak 1) i 5,53 (uzorak 2). Promjene pH vrijednosti slijede trend promjene pH vrijednosti crnog čaja. Tako se pH vrijednost također značajnije smanjivala do 10. dana fermentacije, a nakon toga nije bilo promjene pH vrijednosti. Konačna pH vrijednost iznosila je 3,35 (uzorak 1) i 3,43 (uzorak 2).

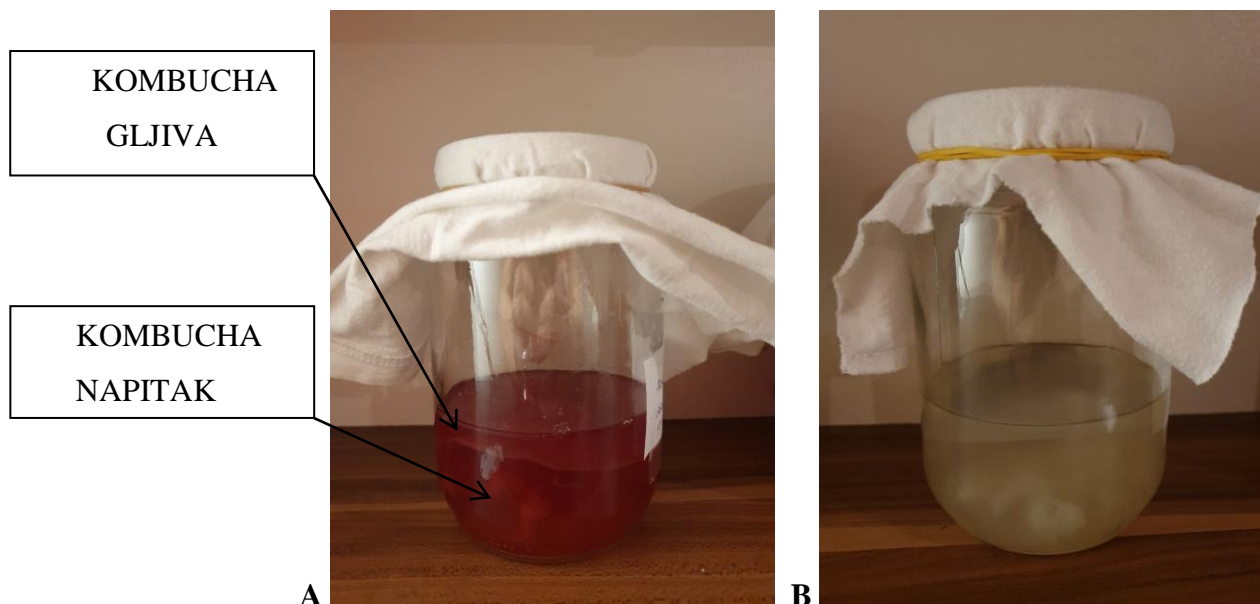


*Slika 19. Promjene pH vrijednosti tijekom fermentacije u uzorcima s čajem od majčine dušice*

Početna pH vrijednost čaja od majčine dušice iznosila je 6,36 (uzorak 1) i 6,27 (uzorak 2). Nakon 12. dana fermentacije nije bilo značajnije promjene pH vrijednosti. Iako su početne pH vrijednosti oba uzorka bile podjednake, krajnje pH vrijednosti razlikuju se za jednu pH jedinicu. Tako je pri kraju fermentacije konačna pH vrijednost iznosila 4,67 (uzorak 1) i 3,94 (uzorak 2).

#### Razvoj nove gljive:

Šestog dana fermentacije, u uzorcima crnog čaja, čaja od aronije i đumbira počeo se stvarati tanak sloj nove gljive, dok u uzorcima čaja majčine dušice nije bilo vidljivih promjena. 12. dan fermentacije u uzorcima (crni čaj, aronija i đumbir) počeo se stvarati drugi tanak sloj gljive (slika 20.). U čaju od majčine dušice, novi sloj gljive razvio se znatno kasnije od ostalih uzoraka, tek 15. dan fermentacije (tada se počela uočavati), u uzorku 2, dok u 1. uzorku nije bilo vidljivog sloja nove gljive te se ona nije razvila. U tablici 4. prikazano je koliko je grama imala nova razvijena gljiva u svakom uzorku.

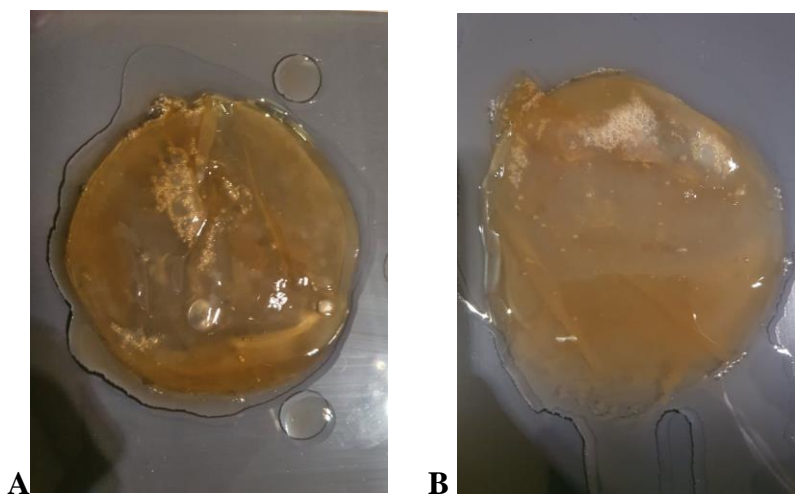


Slika 20. Rast nove gljive nakon 12. dana fermentacije (aronija (A) i đumbir (B))

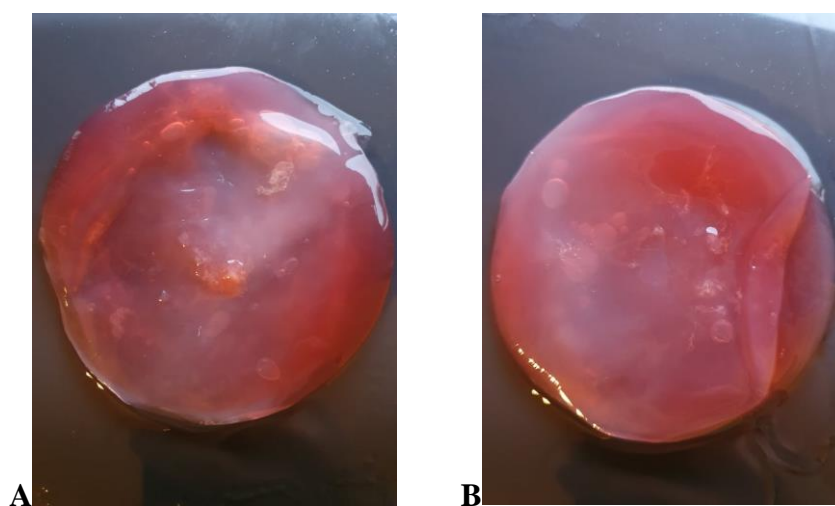
VRSTA ČAJA	UZORAK	NOVA RAZVIJENA GLJIVA (g)
CRNI ČAJ	CC1	15
	CC2	18
ARONIJA	AR1	40
	AR2	37
MAJČINA DUŠICA	MD1	-
	MD2	32
ĐUMBIR	ĐR1	21
	ĐR2	31

Tablica 4. Prikaz mase nove razvijene gljive u uzorcima kombuche

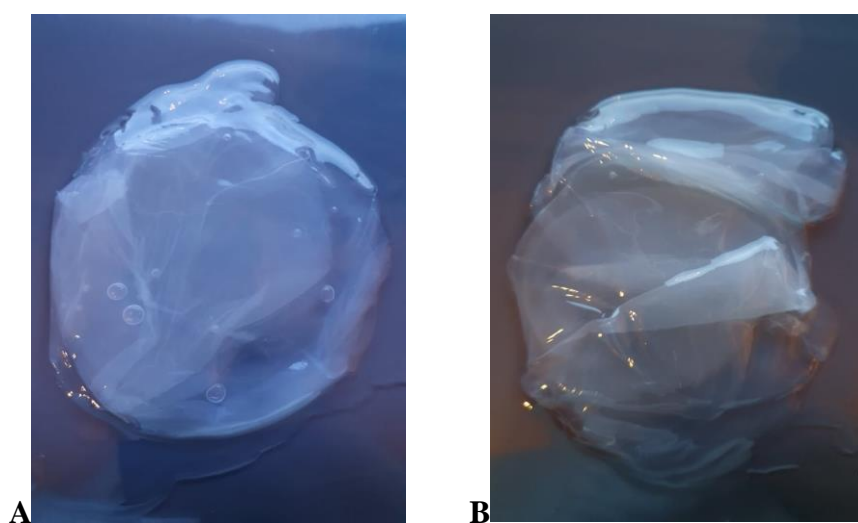
U nastavku su prikazane slike novih razvijenih gljiva u uzorcima kombuche nakon završetka procesa fermentacije.



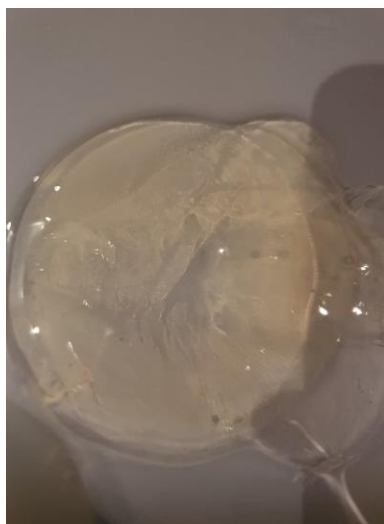
*Slika 21. Gljive razvijene u crnom čaju (uzorak 1 (A) i uzorak 2 (B))*



*Slika 22. Gljive razvijene u čaju od aronije (uzorak 1 (A) i uzorak 2 (B))*

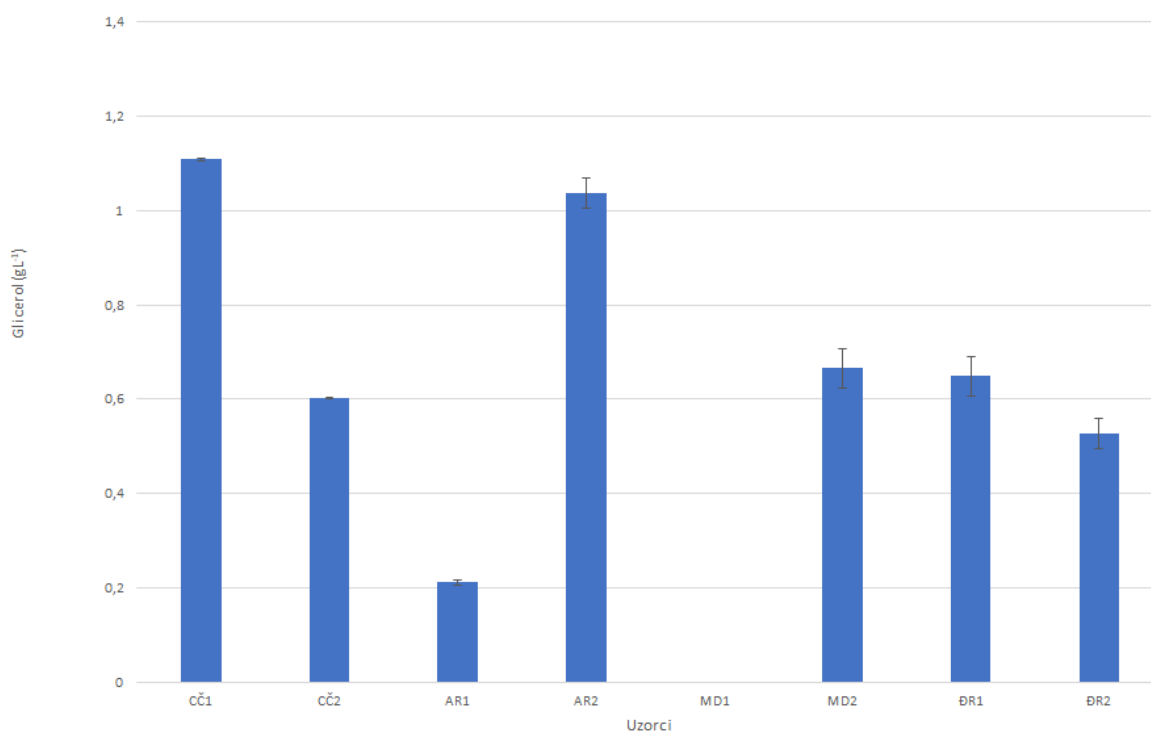


*Slika 23. Gljive razvijene u čaju od đumbira (uzorak 1 (A) i uzorak 2 (B))*



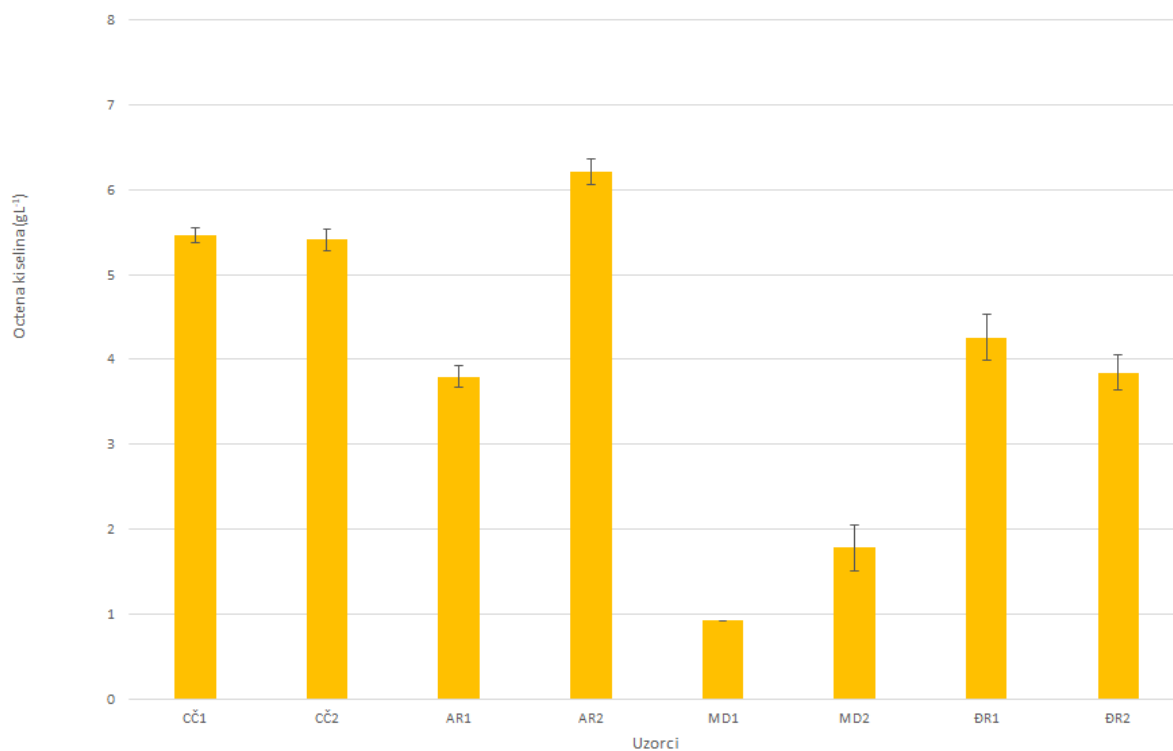
Slika 24. Gljiva razvijena u čaju od majčine dušice (uzorak 2)

Nadalje, u nastavku su prikazane koncentracije fermentacijskih produkata u uzorcima kombuche dobivenih HPLC analizom. (Slika 25., 26., 27.) Na grafu su prikazani sljedeći fermentacijski produkti: glicerol, octena kiselina i etanol.

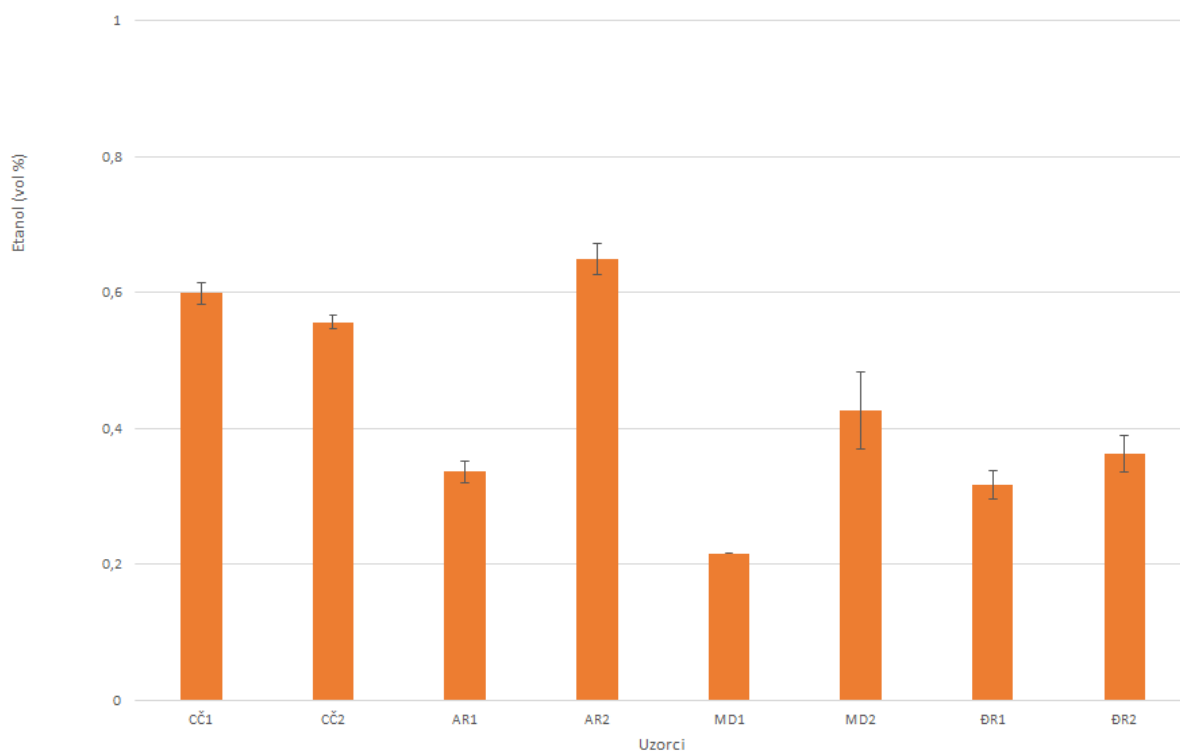


Slika 25. Koncentracija glicerola u ispitivanim uzorcima kombuche na kraju fermentacije

I - standardna devijacija



Slika 26. Koncentracija octene kiseline u ispitivanim uzorcima kombuche na kraju fermentacije  
I - standardna devijacija



Slika 27. Koncentracija etanola u ispitivanim uzorcima kombuche na kraju fermentacije  
I - standardna devijacija



Za svaku vrstu čaja, fermentacije su provedene u paraleli. Analiza fermentacijskih produkata dobivenih kombucha napitaka pokazala je da se paralele uzoraka crnog čaja i đumbira ne razlikuju značajno, dok je značajnija razlika u paralelama uzoraka aronije i majčine dušice. Ako se uzme srednja vrijednost dobivenih vrijednosti za octenu kiseline te glicerol i etanol može se zaključiti da uzorci kombuche s crnim čajem imaju najveću koncentraciju octene kiseline, glicerola i etanola.

Uz navedene rezultate, analizom su dobivene i koncentracije prisutnih šećera u uzorcima, a to su: saharoza, glukoza i fruktoza (tablica 5.).

UZORCI	SAHAROZA (g L <sup>-1</sup> )	GLUKOZA (g L <sup>-1</sup> )	FRUKTOZA (g L <sup>-1</sup> )	UKUPNI ŠEĆERI (g L <sup>-1</sup> )	PREFERMENTIRANI ŠEĆERI (%)
ČČ1	50,11±0,57	23,25±0,12	3,21±0,12	76,57	23,43
ČČ2	52,58±0,39	22,10±0,15	8,06±0,11	82,74	17,26
AR1	23,65±0,02	26,83±0,06	22,29±0,04	72,77	27,23
AR2	0	55,06±0,01	43,75±0,01	98,81	1,19
MD1	46,07	-	0,10	46,17	53,83
MD2	22,76±0,44	32,33±0,10	18,62±0,06	73,71	26,29
ĐR1	6,43±0,76	48,60±0,25	23,80±27,87	78,83	21,17
ĐR2	9,27±0,68	39,70±0,01	35,41±0,01	84,38	15,62

Tablica 5. Koncentracija šećera u ispitivanim uzorcima kombuche na kraju fermentacije

Crni čaj ima najveću koncentraciju saharoze, aronija ima najviše glukoze i fruktoze. Iako aronija predvodi u koncentraciji glukoze i fruktoze, ona im najmanju koncentraciju saharoze. Glukozu uglavnom imaju svi uzorci u sličnim koncentracijama, dok ostali šećeri variraju od uzorka do uzorka. Najmanje fruktoze pronalazimo u uzorku s čajem od majčine dušice. Najveći postotak prefermentiranih šećera, točnije 53,83% ima u uzorku kombuche s majčinom dušicom (uzorak 1), to je ujedno i onaj uzorak u kojem se gljiva nije razvila, a uspoređujući s ostalim uzorcima, i onaj koji nema najviše metabolita.

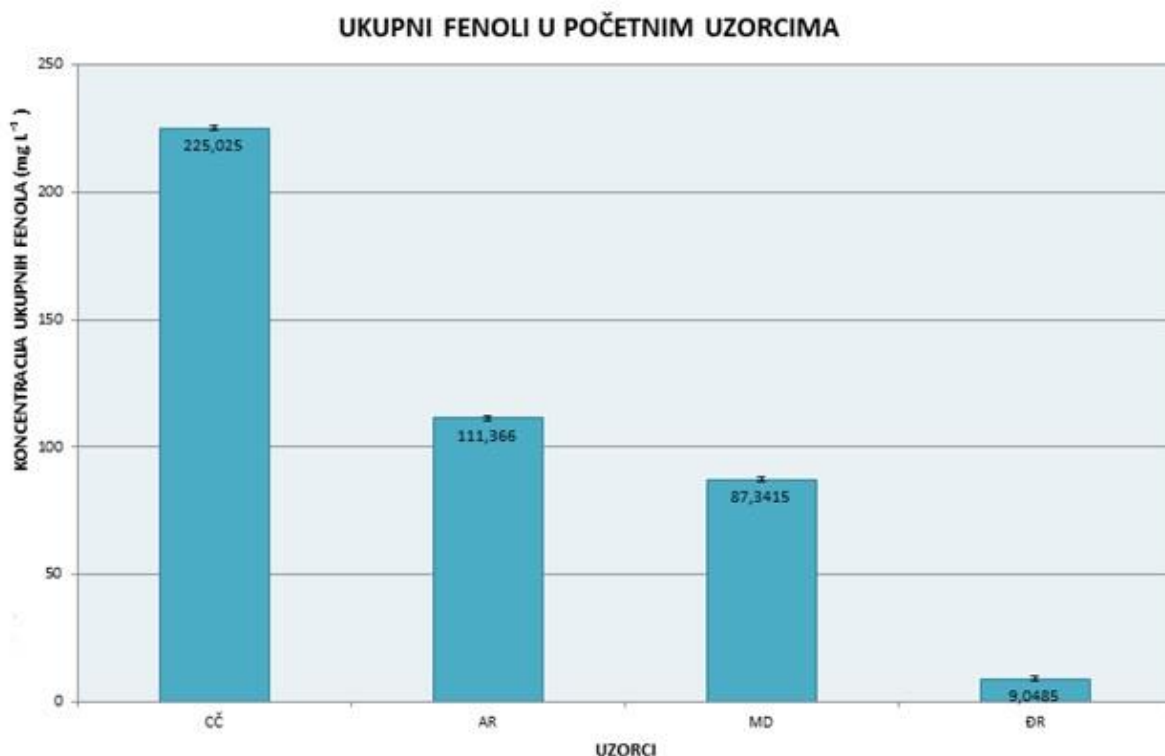
Markov i sur. (2003.) u svojem su istraživanju prije fermentacije dodali 70 g L<sup>-1</sup> saharoze, te su nakon 10 dana fermentacije dobili rezultate da je u kombucha napitku zaostalo 18,2 g L<sup>-1</sup> saharoze, 28,8 g L<sup>-1</sup> glukoze i 16,4 g L<sup>-1</sup> fruktoze. U radu se također spominju i analize drugih autora gdje nakon 10 dana fermentacije kombucha napitka koncentracija nehidroliziranih šećera

iznosi između 0,25% i 0,30%. U ovom radu rezultati su zapisani nakon 19 dana fermentacije te je sa početnom koncentracijom saharoze od  $100 \text{ g L}^{-1}$ , primjerice, u uzorku CČ1 izostalo  $50,11 \text{ g L}^{-1}$  saharoze,  $23,25 \text{ g L}^{-1}$  glukoze i  $3,21 \text{ g L}^{-1}$  fruktoze. U ostalim uzorcima koncentracija nehidroliziranih šećera također je veća od rezultata pronađenih u navedenoj literaturi [26].

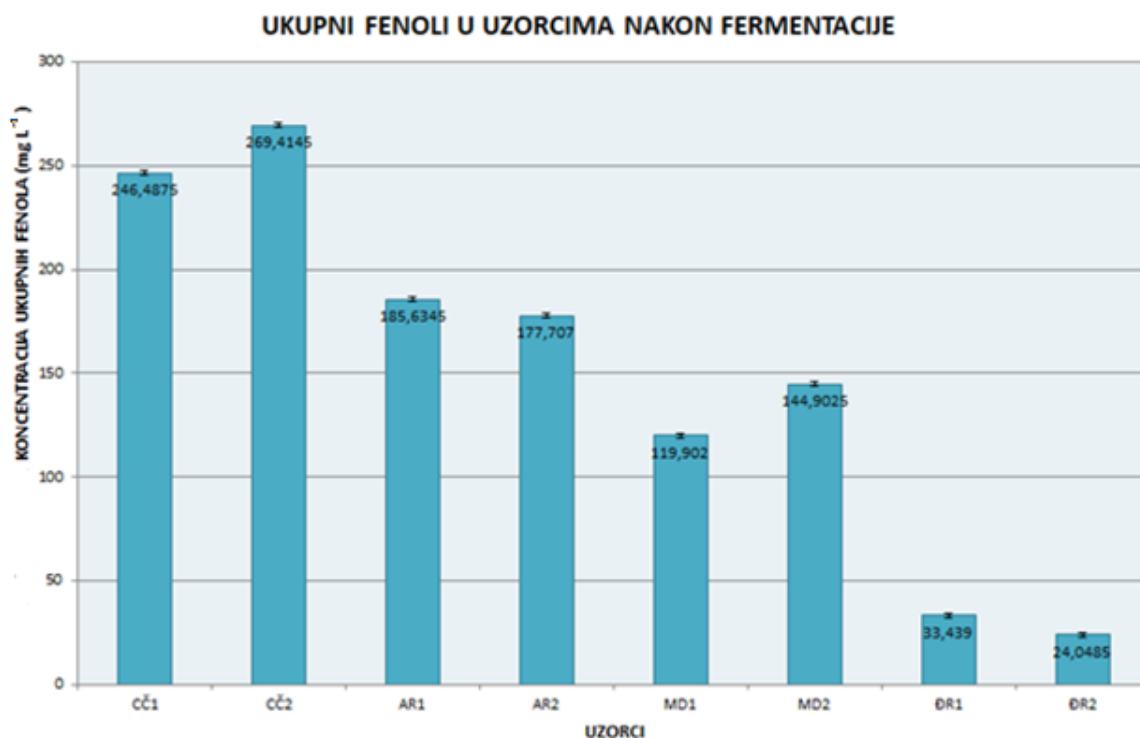
Sadržaj etanola u kombuchi prema literaturnim navodima ne prelazi 1% [26]. Sievers i sur. u svojem istraživanju dobili su rezultate da je nakon deset dana fermentacije, sadržaj etanola iznosio 0,36%, dok je nakon trideset dana fermentacije iznosio 0,7%. [27]. Rezultati dobiveni u ovom istraživanju, a prikazani su na slici 27. prikazuju da koncentracija etanola u ispitivanim uzorcima kombuche na kraju fermentacije nije prelazila 1%, što je u skladu s podacima navedenim u literaturi [26].

## 4.2. Utjecaj sastava hranjive podloge na koncentraciju biološki aktivnih spojeva

U nastavku su navedena dva grafa koja prikazuju masenu koncentraciju ukupnih fenola u početnim uzorcima (slika 28.) i u fermentiranim uzorcima, izraženih u  $\text{mg L}^{-1}$  (slika 29.).



Slika 28. Masena koncentracija ukupnih fenola u početnim uzorcima hranjive podloge



Slika 29. Masena koncentracija ukupnih fenola u uzorcima kombuche nakon fermentacije

Iz prikazanih rezultata može se vidjeti da uzorci kombuche s crnim čajem imaju najviše fenolnih spojeva. Isto tako i da đumbir ima najmanje fenolnih spojeva. Redoslijed aronije i majčine dušice također je ostao isti. Crni čaj u početnom je uzorku imao 225 mg L<sup>-1</sup> fenolnih spojeva, čime se može uočiti povećanje koncentracije fenolnih spojeva nakon fermentacije. Isto je i s ostalim vrstama čaja. Ipak najveći porast ukupnih fenolnih spojeva, s obzirom na početnu vrijednost, bio je u uzorku s čajem od aronije. U uzorku 1 rezultat je 185,6 mg L<sup>-1</sup>, u uzorku 2 iznosi 177,7 mg L<sup>-1</sup>, dok je u početnom uzorku masena koncentracija ukupnih fenola u čaju od aronije iznosila 111,4 mg L<sup>-1</sup>.

Ali i Monir Ebrahimi Pure (2016.) u svojem su istraživanju dobili rezultate da je u uzorku crnog čaja bilo 530,5 mg L<sup>-1</sup> ukupnih fenolnih spojeva. Rezultati su dobiveni nakon 21 dana fermentacije, dok su u ovom istraživanju, nakon 19 dana fermentacije, uzorci crnog čaja imali 246,9 mg L<sup>-1</sup> za uzorak CČ1 i 269,4 mg L<sup>-1</sup> za uzorak CČ2. Rezultati su niži nego što oni iznose u navedenoj literaturi, međutim u oba rada, uzorak crnog čaja, koji je ujedno bio i kontrolni uzorak, ima najviše ukupnih fenolih spojeva [28].

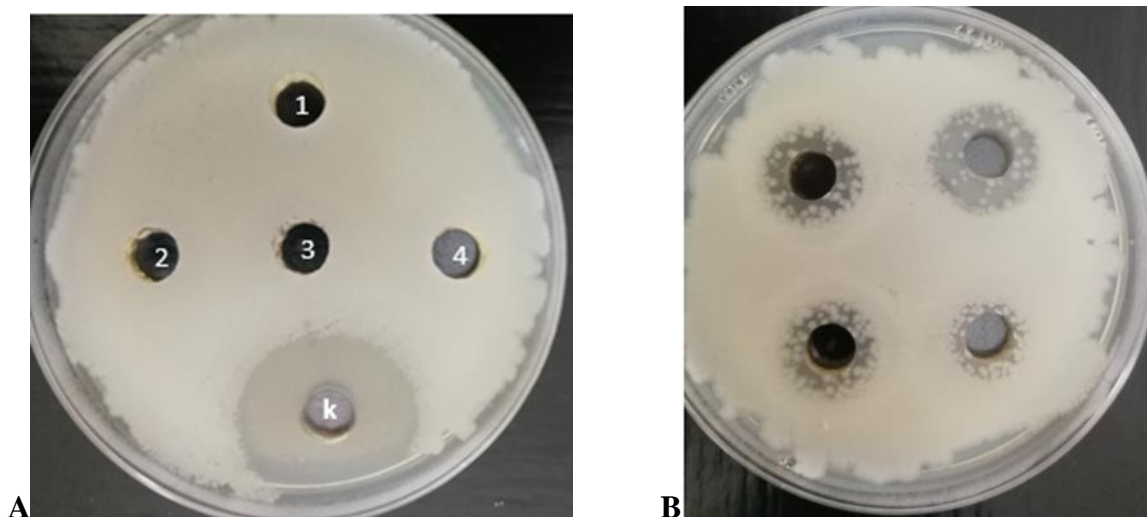
### 4.3. Utjecaj sastava hranjive podloge na antibakterijsku aktivnost kombucha napitaka

U ovom dijelu rada ispitana je antibakterijska aktivnost kombucha napitaka. Antibakterijska aktivnost kombucha napitka određivana je klasičnom mikrobiološkom metodom radijalne difuzije, mjerenjem zona inhibicije rasta test mikroorganizama: bakterija *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Lactobacillus kimchii* te *Lactobacillus plantarum*. Kako bi se ispitalo da li sastav hranjive podloge tj. vrsta odabranog čaja utječe na antibakterijsku aktivnost, testiran je i početni supstrat tj. čaj prije fermentacije. Rezultati su prikazani u tablici 6. te na slici 30.

Testni mikroorganizam	kanamicin	Uzorci/(promjer zone inhibicije, mm)							
		1	2	3	4	5	6	7	8
<i>Bacillus subtilis</i> *	32±1	14±1	13,5±0,5	nd	nd	12	19±1	14±1	15±0
<i>Staphylococcus aureus</i>	30±0,5	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
<i>Escherichia coli</i>	30±1	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
<i>Lactobacillus kimchii</i>	24±0	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
<i>Lactobacillus plantarum</i>	25±0,5	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd

Tablica 6. Promjeri zone inhibicije rasta test bakterijskih vrsta uzrokovanih antibakterijskom aktivnošću uzoraka kombucha napitka ( 1, 2 – crni čaj, 3, 4 – aronija, 5, 6 – majčina dušica, 7, 8 - đumbir)

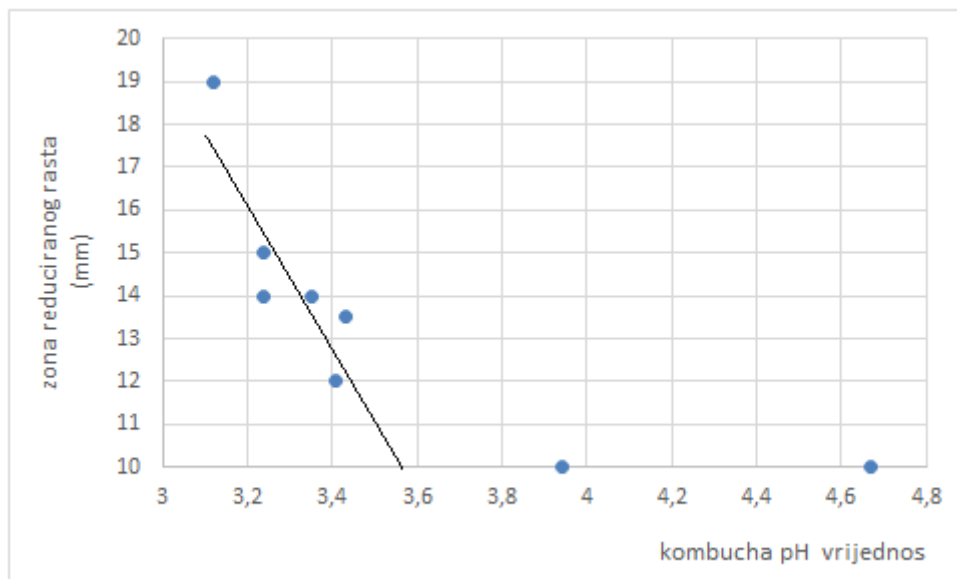
\*zone reduciranog rasta



Slika 30. Zone reduciranog rasta bakterije *Bacillus subtilis* dodatkom početnog supstrata (1-4, k – kanamicin, (A) te uzorka kombuche s čajem od majčine dušice (B))

Iz prikazanih rezultata može se vidjeti da su uzorci kombucha čaja pokazali inhibiciju prema mikroorganizmu *Bacillus subtilis*, dok s ostalim mikroorganizmima zone inhibicije nije bilo. Najveći promjer zone inhibicije pokazao je čaj od majčine dušice, čime on, u usporedbi s ostalim ispitanim uzorcima, ima najveću antibakterijsku aktivnost. Iz raznih provedenih istraživanja dokazano je da se inhibitorni učinak kombucha napitka povećava s porastom koncentracije čaja u mediju za uzgoj [6]. Na antibakterijsku aktivnost kombuche vjerojatno utječu i ugljikohidrati koji se koriste u podlozi za kultivaciju. Tako je kombucha s jačim antibakterijskim učinkom dobivena na podlogama sa saharozom i glukozom nego na podlogama s istim sadržajem fruktoze [6]. Dobiveni rezultati pokazali su da je kombucha napitak s čajem od majčine dušice imao nisku koncentraciju fruktoze, no što je točno djelovalo na antimikrobnu aktivnost majčine dušice ne može se sa sigurnošću zaključiti. Ovakvi rezultati ispitivanja su kontradiktorni, pošto u dostupnoj literaturi nema nikakvih podataka o kombucha napitku od majčine dušice [6].

U nastavku je prikazan graf (slika 31.) koji pokazuje da je zona inhibicije *B. subtilis* ovisna o pH vrijednosti, odnosno koncentraciji kiselina u kombucha napitku. Pri čemu pri pH vrijednosti nižim od pH 3.6, kombucha u opisanim uvjetima reducira rast bakterije *B. subtilis*, dok pri višim pH vrijednostima, unatoč prisutnosti kiselina, rast bakterije nije reducirana.



Slika 31. Graf ovisnosti pH vrijednosti uzoraka i zona inhibicije *Bacillus subtilis*

#### 4.4. Mikrobni sastav SCOBY kulture

U napitku kombucha, najzastupljeniji rodovi bakterija i kvasaca se uglavnom nalaze u SCOBY-u su *Gluconobacter*, *Acetobacter*, *Zygosaccharomyces*, *Saccharomyces* i *Schizosaccharomyces*. Kultura koja se koristi za fermentaciju kombuche ima promjenjiv mikrobiološki sastav prema svom podrijetlu, vremenu, zemljopisnom položaju i mediju koji se koristi za proces fermentacije. Stoga je u ovom radu napravljena identifikacija mikrobnih vrsta koje su porasle na hranjivoj podlozi na koju je nacijepljena suspenzija mikroorganizama dobivena homogenizacijom SCOBY kulture u sterilnoj vodi. Rezultati su prikazani u tablici 7.

Kolonija	Identificirana mikrobnna vrsta	Score*
1	<i>Bacillus pumilus</i>	2,24
2	<i>Bacillus pumilus</i>	2,38
3	<i>Staphylococcus pasteuri</i>	2,18
4	<i>Staphylococcus warneri</i>	1,90
5	<i>Micrococcus luteus</i>	2,17
6	<i>Staphylococcus pasteuri</i>	1,93
7	<i>Staphylococcus pasteuri</i>	2,02
8	<i>Staphylococcus pasteuri</i>	1,76
9	<i>Staphylococcus warner</i>	2,12
10	<i>Micrococcus luteus</i>	2,39
11	<i>Brettanomyces bruxellensis</i>	1,83
12	<i>Methylobacterium rhodesianum</i>	1,51

Tablica 7. Identificirane mikrobnne vrste u SCOPY kulturi

Score\*: > 2.0 sigurna identifikacija vrste; 1.7 - 1.9 identifikacija na razini roda; < 1.7 identifikacija je nemoguća

Pregledom ploča i morfološkim razlikama u kolonijama izdvojeno je 12 mikrobnih kolonija koje su pročišćene (razmazivanjem po hranjivom agaru) i kao čiste pojedinačne kulture poslone na identifikaciju. Pri tome su kulture 3, 4 i 11 bile dominantne, dok su neke, npr. 5 i 12 bile zastupljene samo po jedna kolonija na ploči. Rezultati pokazuju da je identificirano 6 mikrobnih vrsta i to kvasac *Brettanomyces bruxellensis* te bakterije *Bacillus pumilus*, *Staphylococcus pasteuri*, *Staphylococcus warneri*, *Micrococcus luteus*, *Methylobacterium rhodesianum*.

Uspoređujući teorijski dio, s dobivenim rezultatima, može se uočiti da je očekivana jedna od dominantnih vrsta kvasaca, a to je *Brettanomyces bruxellensis*, dok dobivene bakterije, kao što su *Staphylococcus pasteuri*, *Staphylococcus warneri*, nisu očekivane, zbog svojih patogenih svojstva [29]. U prijašnjim istraživanjima, neke od glavnih vrsta bakterija octene kiseline koje su bile pronađene u kombuchi su: *Acetobacter xylinum*, *A. xylinodes*, *Bacterium gluconicum*, *A. aceti*, *A. pasteurianus*, dok se u kombuchi korištenoj u ovom istraživanju, nisu pronašle ni jedne od navedenih [20].

## 5. Zaključak

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

1. Uzorci kombuche od crnog čaja, đumbira i majčine dušice pokazali su karakterističnu krivulju fermentacije i pad pH vrijednosti tijekom 10-15 dana fermentacije dok kod kombuche od aronije nije zabilježen značajniji pad pH vrijednosti.
2. Šestog dana fermentacije, u uzorcima crnog čaja, čaja od aronije i đumbira, počeo se stvarati tanak sloj nove gljive, dok se u čaju od majčine dušice novi sloj gljive razvio tek 15. dan fermentacije, i to samo u uzorku 2. Budući da su uzorci s čajem majčine dušice imali i najmanju koncentraciju octene kiseline može se zaključiti da ovaj čaj inhibira rast bakterija octene kiseline odgovornih i za sintezu biofilma nanoceluloze.
3. Uzorci kombuche s crnim čajem imali su najveću koncentraciju octene kiseline, glicerola i etanola pri čemu su koncentracije iznosile 5,5 g L<sup>-1</sup> (octena kiselina), 0,85 g L<sup>-1</sup> (glicerol) i 6 g L<sup>-1</sup> (etanol), što je u skladu s literaturnim podacima.
4. U usporedbi s ostalim uzorcima, uzorak kombuche s crnim čajem imao je i prije i nakon fermentacije najviše fenolnih spojeva, dok je uzorak kombuche s đumbirom bio onaj s najmanje fenolnih spojeva. Može se pretpostaviti da bi uzorci s crnim čajem imali i najveću antioksidativnu aktivnost.
5. Uzorci kombucha čaja reducirali su rast *Bacillus subtilis*, dok s ostalim mikroorganizmima zone inhibicije nije bilo. Najveći promjer zone inhibicije pokazao je čaj od majčine dušice, čime on, u usporedbi s ostalim ispitanim uzorcima, ima najveću antibakterijsku aktivnost.
6. Zona reduciranog rasta bakterije *B. subtilis* je ovisna o pH vrijednosti, odnosno koncentraciji kiselina u kombucha napitku.
7. Rezultati mikrobnog sastava kombucha SCOBY kulture korištene za praktični dio, pokazali su da je u sastavu jedna od očekivanih dominantnih vrsta kvasaca *Brettanomyces bruxellensis*, dok očekivane bakterijske vrste iz rodova *Acetobacter* i *Gluconobacter* nisu izolirane najvjerojatnije zbog njihove striktnosti aerobnosti i prelasku u nepovoljnim uvjetima u vijabilno ali ne kulturabilno stanje (engl. *Viable But Not Culturable*).



## 6. Literatura

- [1] A.L. Teoh, G. Heard, J. Cox: Yeast ecology of Kombucha fermentation, *International Journal of Food Microbiology*, 2003., str. 119 – 126.
- [2] R. Jayabalan, K. Malini, M. Sathishkumar, K. Swaminathan, S.L. Yun: Biochemical Characteristics of Tea Fungus Produced During Kombucha Fermentation, *Food Sci.Biotechnol.*, 2010., str. 843 – 847.
- [3] P. Knez: Nutritivni i zdravstveni učinci sastojaka i metabolita nastalih fermentacijom kombucha napitka, *Završni rad*, PBF, Zagreb, 2020.
- [4] W. Luczaj, E. Skrzydlewska: Antioksidative properties of black tea, *Elsevier*, 2005., 910 – 918.
- [5] A.S. Velićanski, D.D. Cvetković, S.L. Markov, V.T. Tumbas Šaponjac, J.J. Vulić: Antioxidant and Antibacterial Activity of the Beverage Obtained by Fermentation of Sweetened Lemon Balm (*Melissa officinalis L.*) Tea With Symbiotic Consortium of Bacteria and Yeast, *Food Technology and Biotechnology*, Vol 52, No.4, 2014., str. 420 – 429.
- [6] A. Savić, A. Davidović, Lj. Topalić – Trivunović: Antibakterijsko dejstvo kombuha napitaka na bazi ljekovitog bilja, *Univerzitet u Banjoj Luci, Tehnološki fakultet Banja Luka*, str. 131 – 136.
- [7] A. Zeko: Aronija – ljekovita svojstva i primjena, *Završni rad*, Sveučilište J.J. Strossmayera u Osijeku, Osijek, 2016.
- [8] Valcheva – Kuzmanova sv., Belcheva: Current knowledge of *Aronia melanocarpa* as a medicinal plant, *Europe PMC*, 2006., str. 11 – 17.
- [9] K. Zeba: Prednosti i nedostaci uzgoja aronije na primjeru OPG –a Remenar, *Diplomski rad*, Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet, Zagreb, 2017.
- [10] I. Bendelja: Utjecaj veličine čestica na fizikalna i kemijska svojstva vodenih ekstrakata biljke iz porodice usnača (Lamiaceae), *Diplomski rad*, PBF, Zagreb, 2017.
- [11] E. Šćulac: Antioksidativno i antimikrobno djelovanje kadulje i majčine dušice, *Diplomski rad*, PBF, Zagreb, 2009.
- [12] T.K. Lim: *Zingiber officinale*, *Edible Medicinal and Non – Medicinal Plants*, 2016., str. 469 – 560.
- [13] Z. Miškić: Đumbir - ljekovitost, uzgoj i korištenje, *Seminarski rad*, Veleučilište u Slavanskom Brodu, Slavonski Brod, 2020.
- [14] I. Stoilova, A. Krastanov, A. Stoyanova, P. Denev, S. Gargova: Antioxidant activity of a ginger extract (*Zingiber officinale*), *Elsevier*, 2007., str. 764 – 770.

- [15] C.J. Greenwalt, K.H. Steinkrams, R.A. Ledford: Kombucha, the Fermented Tea: Microbiology, Composition, and Claimed Health Effects, *Journal of Food Protection*, Vol.63, No.7, 2000., str. 976 – 981.
- [16] M.I. Watawana, N. Jayawardena, C.B. Gunardhana, V.Y. Waisundara: Health, Wellness, and Safety Aspects of the Consumption of Kombucha, *Journal of Chemistry*, 2015.
- [17] M. Trčak: Uzgoj kokulture kefirnih zrnaca i kombuche u crnom čaju, *Završni rad*, PBF, Zagreb, 2017.
- [18] E. Ivanišová, K. Meňhartová, M. Terentjeva, L. Harangozo, A. Kántor, M. Kačániová: The evaluation of chemical, antioxidant, antimicrobial and sensory properties of kombucha tea beverage, *Association of Food Scientists & Technologists (India)*, 2019.
- [19] S.A. Villarreal – Soto, S.Beaufort, J.Bonajila, J.P.Souchard, P.Taillandier: Understanding Kombucha Tea Fermentation: A review, *Journal of Food Science*, 2018., str. 580 – 588.
- [20] K.M. Lynch, E. Zannini, S. Wilkinson, L. Daenen, E.K. Arendt: Pshysiology of Acetic Acid Bacteria and Their Role in Vinegar and Fermented Beverages, *Institute of FoodTechnologists*, Vol.18, 2019., str. 587 – 625.
- [21] I. Jukić: Učinak izvora ugljika na biotransformaciju kombuche, nastajanje organskih kiselina i sintezu bakterijske celuloze, *Diplomski rad*, PBF, Zagreb, 2016.
- [22] G. Sreeramulu, Yang Zhu, W. Knol: Kombucha Fermentation and It's Antimicrobial Activity, *J.Agric. Food Chem.*, 2000., str. 2589 – 2594.
- [23] K. Jakubczyk, J. Kaldunska, J. Kochman, K. Janda: Chemical Profile and Antioxidant Activity of the Kombucha Beverage Derived from White, Green, Black and Red Tea, *Antioxidants*, 2000.
- [24] Lefebvre, D., Gabriel, V., Vayssier, Y., & Fontagne-Faucher, C.: Simultaneous HPLC determination of sugars, organic acid and ethanol in sourdough process. *LWT-Food Science and Technology*, 35, 407–414, 2002.
- [25] Singleton, V. L., & Rossi Junior, J. A.: Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16, 144–158, 1965.
- [26] S.L. Markov, V.M. Jerinić, D.D. Cvetković, E. Lončar, R. Malbaša: Kombuha – funkcionalni napitak: sastav, karakteristike i proces biotransformacije, *Novi Sad, hem.ind*, 2003.
- [27] M. Sievers, C. Lanini, A. Weber, U. Schuler – Schmid, M. Teuber: *Syst. Appl. Microbiol.*, 1995.
- [28] A. Ebrahimi Pure, M. Ebrahimi Pure: Antioxidant and Antibacterial Activity of Kombucha Beverages Prepared using Banana peel, Common Nettles and Black Tea Infusions, *Applied Food Biotechnology*, 2016.

[29] V.V. Ebani: *Biology and Pathogenesis of Staphylococcus Infection*, Microorganisms, 2020.

## Popis slika

Slika 1. Biljka čajevac ( <i>Camellia sinensis</i> L.); Izvor: <a href="https://wellness.hr/prirodna-rjesenja-afte-upale-bolove-gljivice/">https://wellness.hr/prirodna-rjesenja-afte-upale-bolove-gljivice/</a> .....	3
Slika 2. <i>Aronia melanocarpa</i> ; Izvor: <a href="http://vocarskisavjeti.blogspot.com/2011/10/aronija.html">http://vocarskisavjeti.blogspot.com/2011/10/aronija.html</a> ....	4
Slika 3. <i>Thymus serpyllum</i> ; Izvor: <a href="https://agrosavjet.com/majcina-dusica-biljka-koja-svima-prija/">https://agrosavjet.com/majcina-dusica-biljka-koja-svima-prija/</a> .....	5
Slika 4. Đumbir; Izvor: <a href="https://narodni.net/dumbir-ljekovita-svojstva-primjena-dumbira/">https://narodni.net/dumbir-ljekovita-svojstva-primjena-dumbira/</a> .....	5
Slika 5. Glavni metabolički putevi fermentacije kombucha napitka; Izvor: <a href="https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/1750-3841.14068">https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/1750-3841.14068</a> .....	9
Slika 6. Shematski dijagram tijekom istraživanja (vlastita fotografija).....	11
Slika 7. Regenerirana starter kultura kombuche (vlastita fotografija).....	12
Slika 8. Početni uzorci čajeva prije procesa fermentacije (1 – crni čaj, 2 – aronija, 3 – majčina dušica, 4 – đumbir) (vlastita fotografija).....	13
Slika 9. PTFE filteri za filtriranje uzorka prije HPLC analize; Izvor: <a href="https://www.sigmaaldrich.com/CZ/en/product/mm/slcr033">https://www.sigmaaldrich.com/CZ/en/product/mm/slcr033</a> .....	14
Slika 10. Uzorci spremni za HPLC analizu (vlastita fotografija).....	15
Slika 11. Principijelni HPLC kromatogram uzorka (vlastita fotografija).....	16
Slika 12. Pojava plavog obojenja kao posljedica oksidacije fenolnih spojeva (vlastita fotografija).....	17
Slika 13. Baždarni pravac za određivanje ukupnih fenolnih spojeva (vlastita fotografija).....	18
Slika 14. Mješovite mikrobne vrste u SCOBY kulturi za identifikaciju (vlastita fotografija).....	20
Slika 15. Primjer rezultata mikrobne identifikacije.....	21
Slika 16. Graf pH vrijednosti crnog čaja po danima (vlastita fotografija).....	23
Slika 17. Graf pH vrijednosti čaja od aronije po danima (vlastita fotografija).....	23
Slika 18. Graf pH vrijednosti čaja od đumbira po danima (vlastita fotografija).....	24
Slika 19. Graf pH vrijednosti čaja od majčine dušice po danima (vlastita fotografija).....	25
Slika 20. Rast nove gljive nakon 12.dana fermentacije (aronija (A) i đumbir (B)) (vlastita fotografija).....	26
Slika 21. Gljive razvijene u crnom čaju (Uzorak 1 (A) i uzorak 2 (B)) (vlastita fotografija).....	27
Slika 22. Gljive razvijene u čaju od aronije (Uzorak 1 (A) i uzorak 2 (B)) (vlastita fotografija).....	27
Slika 23. Gljive razvijene u čaju od đumbira (Uzorak 1 (A) i uzorak 2 (B)) (vlastita fotografija).....	27
Slika 24. Gljiva razvijena u čaju od majčine dušice (Uzorak 2) (vlastita fotografija).....	28
Slika 25. Koncentracija glicerola u ispitanim uzorcima (vlastita fotografija).....	28

Slika 26. Koncentracija octene kiseline u ispitanim uzorcima (vlastita fotografija).....	29
Slika 27. Koncentracija etanola u ispitanim uzorcima (vlastita fotografija) .....	29
Slika 28. Masena koncentracija ukupnih fenola u početnim uzorcima izražena u mg L <sup>-1</sup> (vlastita fotografija).....	31
Slika 29. Masena koncentracija ukupnih fenola u uzorcima nakon fermentacije izražena u mg L <sup>-1</sup> (vlastita fotografija) .....	32
Slika 30. Zone reduciranog rasta bakterije <i>Bacillus subtilis</i> dodatkom početnog supstrata (1-4, k –kanamicin, (A) te uzorka kombuche s čajem od majčine dušice (B)) (vlastita fotografija) .....	34
Slika 31. Graf ovisnosti pH vrijednosti uzoraka i zona inhibicije <i>Bacillus subtilis</i> (vlastita fotografija).....	35

Sveučilište  
Sjever

HEBON  
ALLENBAIRD



SVEUČILIŠTE  
SIEVER

IZJAVA O AUTORSTVU  
I  
SUGLASNOST ZA JAVNU OBJAVU

Završni/diplomski rad isključivo je autorsko djelo studenta koji je isti izradio te student odgovara za istinitost, izvornost i ispravnost teksta rada. U radu se ne smiju koristiti dijelovi tuđih radova (knjiga, članka, doktorskih disertacija, magistarskih radova, izvora s interneta, i drugih izvora) bez navođenja izvora i autora navedenih radova. Svi dijelovi tuđih radova moraju biti pravilno navedeni i citirani. Dijelovi tuđih radova koji nisu pravilno citirani, smatraju se plagijatom, odnosno nezakonitim prisvajanjem tuđeg znanstvenog ili stručnoga rada. Sukladno navedenom studenti su dužni potpisati izjavu o autorstvu rada.

Ja, TAMARA MAĐER (ime i prezime) pod punom moralnom, materijalnom i kaznenom odgovornošću, izjavljujem da sam isključivi autor/ica završnog/diplomskog (obrisati nepotrebno) rada pod naslovom UTJECAJ ČAJNE BAZE NA DOK FERMENTACIJE (upisati naslov) te da u navedenom radu nisu na nedozvoljeni način (bez pravilnog citiranja) korišteni dijelovi tuđih radova.

Student/ica:

(upisati ime i prezime)

TAMARA MAĐER  
Tamara Mađer

(vlastoručni potpis)

Sukladno Zakonu o znanstvenoj djelatnosti i visokom obrazovanju završne/diplomske radove sveučilišta su dužna trajno objaviti na javnoj internetskoj bazi sveučilišne knjižnice u sastavu sveučilišta te kopirati u javnu internetsku bazu završnih/diplomskih radova Nacionalne i sveučilišne knjižnice. Završni radovi istovrsnih umjetničkih studija koji se realiziraju kroz umjetnička ostvarenja objavljuju se na odgovarajući način.

Ja, TAMARA MAĐER (ime i prezime) neopozivo izjavljujem da sam suglasan/na s javnom objavom završnog/diplomskog (obrisati nepotrebno) rada pod naslovom UTJECAJ ČAJNE BAZE NA DOK FERMENTACIJE (upisati naslov) čiji sam autor/ica. TE NA ANTIBIOTIKUM I ANTIOKSIDANTNI AKTIVNOST KOMBUČE

Student/ica:

(upisati ime i prezime)

TAMARA MAĐER  
Tamara Mađer

(vlastoručni potpis)

18.2%

Flagged by Original. Results of plagiarism analysis from 2021-09-09 19:32 UTC  
Ujwal Rajas has no direct connections to an author known to antilibrary.com  
kumbha.docx



Date: 2021-09-09 19:32 UTC

All sources 44 Internet sources 44 Organization archive 1 Plagiarism Prevention Pool 1

- [10] [4.2%](#) 25 matches  
 1 document with identical matches

---

- [2] [0.3%](#) 23 matches  
 2 documents with identical matches

---

- [5] [0.3%](#) 23 matches  
 2 documents with identical matches

---

- [8] [0.4%](#) 14 matches  
 1 document with identical matches

---

- [10] [0.4%](#) 9 matches

---

- [11] [0.4%](#) 9 matches

---

- [12] [0.4%](#) 10 matches

---

- [13] [0.4%](#) 10 matches  
 1 document with identical matches

---

- [15] [0.4%](#) 8 matches

---

- [16] [0.4%](#) 9 matches  
 1 document with identical matches

---

- [18] [0.7%](#) 8 matches

---

- [19] [0.4%](#) 7 matches  
 1 document with identical matches

---

- [21] [0.7%](#) 7 matches

---

- [22] [0.4%](#) 7 matches

---

- [23] [0.4%](#) 6 matches  
 1 document with identical matches

---

- [25] [0.4%](#) 4 matches

---

- [26] [0.4%](#) 5 matches

---

- [27] [0.4%](#) 5 matches  
 1 document with identical matches

---

- [28] [0.4%](#) 4 matches

---

- [30] [0.4%](#) 6 matches

---

- [31] [0.4%](#) 5 matches

---

- [kumbha.docx](#) 5 matches

✓ [32] [www.researchgate.net/publication/34017636\\_Microbial\\_Diversity\\_of\\_the\\_Symbiotic\\_Colony\\_of\\_Bacteria\\_and\\_Yeast\\_SCOBY\\_and\\_its\\_Impact\\_on](#)  
 4 matches

---

✓ [33] [www.researchgate.net/publication/34017636\\_Microbial\\_Diversity\\_of\\_the\\_Symbiotic\\_Colony\\_of\\_Bacteria\\_and\\_Yeast\\_SCOBY\\_and\\_its\\_Impact\\_on](#)  
 4 matches

---

✓ [34] [arxiv.org/abs/1408.0001v1/pdf/1408.0001v1.pdf](#)  
 4 matches

---

✓ [35] [link.springer.com/article/10.1007/s1191-019-04211-1](#)  
 3 matches

---

✓ [36] [online.library.wiley.com/doi/full/10.1111/1365-3113.14668](#)  
 4 matches

---

✓ [37] [repository.pdf/using/handle/object/pdf/114/datastream/PDF/view](#)  
 2 matches

---

✓ [38] [mhl.org/handle/document/1416-abstract-aviv](#)  
 2 matches

---

✓ [39] [www.mhl.sls.sls.gov.au/articles/PAC0700111](#)  
 3 matches

---

✓ [40] [mhl.org/handle/document/1413-abstract-aviv](#)  
 2 matches

---

✓ [41] [arxiv.org/abs/1408.0001v1/pdf/1408.0001v1.pdf](#)  
 3 matches

---

✓ [42] [www.scribd.com/document/425494123/34761-1-136219471461141417671139%20725941342596019.pdf](#)  
 3 matches

---

✓ [43] [online.library.wiley.com/doi/full/10.1111/1365-3113.12660](#)  
 2 matches

---

✓ [44] [repository.pdf/using/handle/object/pdf/226](#)  
 1 matches  
 1 document with identical matches

---

✓ [45] [com.ac.uk/download/pdf/19016406.pdf](#)  
 2 matches

---

✓ [47] [mh.sls.gov.au/handle/project/018-000000-1483](#)  
 2 matches

---

✓ [48] [Screenshot of a document dated 2018-07-02 13:58](#)  
 2 matches

---

✓ [49] [repository.pdf/using/handle/object/pdf/373](#)  
 1 matches

---

✓ [50] [www.medrxiv.org/content/10.1101/2018.07.02.18113215v1](#)  
 1 matches

---

✓ [51] [repository.pdf/using/handle/object/pdf/2418](#)  
 1 matches

---

✓ [52] [arxiv.org/abs/1408.0001v1/pdf/1408.0001v1.pdf](#)  
 1 matches

---

✓ [53] [link.springer.com/article/10.1007/s1191-019-04211-1](#)  
 1 matches

---

✓ [54] [www.mh.sls.gov.au/handle/project/018-000000-1483?page=4](#)  
 1 matches

---

✓ [55] [www.researchgate.net/publication/34017636\\_Microbial\\_Diversity\\_of\\_the\\_Symbiotic\\_Colony\\_of\\_Bacteria\\_and\\_Yeast\\_SCOBY\\_and\\_its\\_Impact\\_on](#)  
 1 matches

---

✓ [56] [com.ac.uk/download/pdf/19016406.pdf](#)  
 1 matches

---

✓ [57] [www.researchgate.net/publication/34017636\\_Microbial\\_Diversity\\_of\\_the\\_Symbiotic\\_Colony\\_of\\_Bacteria\\_and\\_Yeast\\_SCOBY\\_and\\_its\\_Impact\\_on](#)  
 1 matches

53 pages, 635 words



 A very light text-color was detected that might conceal letters used to merge words.

FlagLevel: 18.1% selected / 18.1% overall

135 matches from 55 sources, of which 55 are online sources.

**Settings**

Data policy: Compare with web sources, Check against organization repository, Check against the Plagiarism Prevention Pool

Sensitivity: Medium

Bibliography: Consider text

Citation detection: Reduce FlagLevel

Whitelist: --