



UNIVERZITET U NOVOM SADU

TEHNOLOŠKI FAKULTET NOVI SAD



Valorizacija proizvoda fermentacije kombuhe na otpadnom toku iz proizvodnje vina

DOKTORSKA DISERTACIJA

Mentor:

dr Jasmina Vitas, vanr. prof.

Kandidat:

Stefan Vukmanović, mast. inž. tehnol.

Novi Sad, 2022. godine

UNIVERZITET U NOVOM SADU
TEHNOLOŠKI FAKULTET NOVI SAD

OBRAZAC – 5a

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA¹

Vrsta rada:	Doktorska disertacija
Ime i prezime autora:	Stefan Vukmanović
Mentor (titula, ime, prezime, zvanje, institucija)	Dr Jasmina Vitas, vanredni profesor, Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet Novi Sad
Naslov rada:	Valorizacija proizvoda fermentacije kombuhe na otpadnom toku iz proizvodnje vina
Jezik publikacije (pismo):	Srpski (latinica)
Fizički opis rada:	Uneti broj: Stranica: 139 Poglavlja: 6 Referenci: 227 Tabela: 32 Slika: 40
Naučna oblast:	Tehnološko inženjerstvo
Uža naučna oblast (naučna disciplina):	Biotehnologija
Ključne reči / predmetna odrednica:	Kombuha, antimikrobna aktivnost, antioksidativna aktivnost, cirkularna ekonomija, efluent vinarije, modelovanje
Rezime na jeziku rada:	U poslednjoj deceniji, uočava se rast popularnosti proizvodnje i konzumacije hrane isključivo prirodnog porekla. Jedan od pravaca ovog razvoja je funkcionalna hrana, koja zahvaljujući svojim osobinama smanjuje rizik od pojave različitih negativnih uticaja na zdravlje potrošača. Razvoj funkcionalnih, probiotskih napitaka koji nisu na mlečnoj osnovi je sve interesantniji i može se očekivati da će ovaj segment tržišta u budućnosti značajno rasti. U ovu grupu namirnica spada i kombuha napitak.

¹ Autor doktorske disertacije potpisao je i priložio sledeće Obrasce:

5b – Izjava o autorstvu;

5v – Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije i o ličnim podacima;

5g – Izjava o korišćenju.

Ove Izjave se čuvaju na fakultetu u štampanom i elektronskom obliku i ne koriče se sa tezom.

	<p>U okviru ove doktorske disertacije ispitivana je mogućnost primene efluenta dobijenog nakon bistrenja šire metodom flotacije u procesu proizvodnje belog vina sorte Rizling kao sirovine za dobijanje kombuha napitka. Početnim ispitivanjima utvrđena je sposobnost kombuha kulture da fermentiše korišćeni supstrat, nakon čega su optimizovani uslovi kultivacije variranjem početnog sadržaja šećera (30, 50 i 70 g/L), temperature (20, 25 i 30 °C) i trajanja (3, 6 i 9 dana) bioprocesa. Takođe, rađena je hemijska, mikrobiološka i antioksidativna karakterizacija dobijenog proizvoda. Kao najpogodnije vreme trajanja fermentacije, senzornom analizom, određeno je tri dana. Analizom antimikrobne aktivnosti utvrđen je značajan potencijal inhibicija rasta i Gram pozitivnih i Gram negativnih bakterija. Antioksidativni potencijal novog tipa kombuha napitka bio je veoma izražen, a utvrđeno je prisustvo različitih organskih i fenolnih kiselina, pored visokog sadržaja ukupnih fenola. Prisustvo vitamina C je utvrđeno u svim konzuminim uzorcima. Proizvodnja biomase bila je značajno uvećana u odnosu na uobičajene vrednosti za kombuha fermentaciju.</p>
Datum prihvatanja teme od strane nadležnog veća:	23. 12. 2021.
Datum odbrane: (Popunjavanje odgovarajuća služba)	
Članovi komisije: (titula, ime, prezime, zvanje, institucija)	<p>Predsednik: dr Radomir Malbaša, redovni profesor, Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet Novi Sad</p> <p>Član: dr Jasmina Vitas, vanredni profesor, Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet Novi Sad</p> <p>Član: dr Aleksandra Ranitović, docent, Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet Novi Sad</p> <p>Član: dr Biljana Cvetković, viši naučni saradnik, Univerzitet u Novom Sadu, Naučni institut za prehrambene tehnologije Novi Sad</p>
Napomena:	

UNIVERSITY OF NOVI SAD

FACULTY OF TECHNOLOGY NOVI SAD

KEY WORD DOCUMENTATION²

Document type:	Doctoral dissertation
Author:	Stefan Vukmanović
Supervisor (title, first name, last name, position, institution)	Jasmina Vitas, PhD, associate professor, University of Novi Sad, Faculty of Technology Novi Sad
Thesis title:	Valorisation of kombucha products obtained by winery effluent fermentation
Language of text (script):	Serbian language (latin script)
Physical description:	Number of: Pages: 139 Chapters: 6 References: 227 Tables: 32 Illustrations: 40
Scientific field:	Technological engineering
Scientific subfield (scientific discipline):	Biotechnology
Subject, Key words:	Kombucha, antimicrobial activity, antioxidative activity, circular economy, winery effluent, modelling
Abstract in English language:	Last decade has brought a noticeable increase in production and consumption popularity of the food of purely natural origins. One of the development directions is the new functional food, which reduces risk of the various hazardous health effects, thanks to its properties. Development of functional probiotic beverages, other than milk-based is becoming more popular, and this market niche

² The author of doctoral dissertation has signed the following Statements:

5b – Statement on the authority,

5v – Statement that the printed and e-version of doctoral dissertation are identical and about personal data,

5g – Statement on copyright licenses.

The paper and e-versions of Statements are held at the faculty and are not included into the printed thesis.

	<p>is expected to grow further. Kombucha beverage belongs to this group of the food products.</p> <p>This thesis investigates possible usage of the Riesling white wine production effluent as the raw material for kombucha fermentation. The effluent is obtained after grape must clarification performed by flotation. Initial experiments confirmed kombucha's ability to ferment this substrate. Further, fermentation conditions were optimized by varying initial sugar level (30, 50, and 70 g/L) and temperature (20, 25, and 30 °C), as well as duration of the fermentation (3, 6, and 9 days).</p> <p>Chemical, microbiological, and antioxidative characterisation of the novel product was performed. By sensory analysis, most suitable fermentation time was set at three days. By antimicrobial analysis, inhibitory potential towards Gram-positive and Gram-negative bacteria is determined. Antioxidative potential of the new kombucha product was very pronounced. Also, various organic and phenolic acids were found to be present, along with high phenolic content. Vitamin C was detected in all consumable samples. Biomass production was significantly higher compared to typical kombucha fermentation.</p>
Accepted on Scientific Board on:	23/12/2021
Defended: (Filled by the faculty service)	
Thesis Defend Board: (title, first name, last name, position, institution)	<p>President: Radomir Malbaša, PhD, Full Professor, University of Novi Sad, Faculty of Technology Novi Sad</p> <p>Member: Jasmina Vitas, PhD, Associate Professor, University of Novi Sad, Faculty of Technology Novi Sad</p> <p>Member: Aleksandra Ranitović, PhD, Assistant Professor, University of Novi Sad, Faculty of Technology Novi Sad</p> <p>Member: Biljana Cvetković, Senior Research Associate, University of Novi Sad, Institute of Food Technology Novi Sad</p>
Note:	

Sadržaj

Spisak oznaka, simbola i skraćenica	I
Spisak tabela.....	II
Spisak slika.....	IV
1. Uvod.....	2
2. Opšti deo	6
2.1. Kombuha.....	6
2.1.1. Poreklo kombuhe	6
2.1.2. Proizvodnja kombuha napitka	7
2.1.3. Mikrobiološki sastav kombuha napitka.....	9
2.1.3.1. Kvasci kombuha kulture	10
2.1.3.2. Bakterije kombuha kulture	11
2.1.4. Hemijski sastav kombuha napitka	12
2.1.4.1. Šećeri u kombuha napitku	13
2.1.4.2. Kiseline u kombuha napitku	14
2.1.4.3. Vitamini u kombuha napitku	15
2.1.5. Celulozna navlaka.....	16
2.1.6. Zdravstvena korist konzumacije kombuha napitka	18
2.1.6.1. Antimikrobno dejstvo kombuhe	20
2.1.6.2. Antioksidativna aktivnost kombuhe	21
2.1.6.3. Toksičnost kombuha napitka	23
2.2. Grožđe i vino.....	24
2.2.1. Vinova loza.....	24
2.2.1.1. Rizling	25
2.2.2. Vino.....	26
2.2.3. Otpadni tok vinarije	27
3. Materijal i metode	31
3.1. Sirovina za proizvodnju	31
3.2. Inokulum i uslovi kultivacije	31
3.2.1. Priprema inokuluma	31
3.2.2. Početno ispitivanje mogućnosti korišćenja novog supstrata	31

3.2.3.	Optimizacija uslova proizvodnje	32
3.3.	Analize za praćenje toka kultivacije	32
3.3.1.	Određivanje vrednosti pH.....	32
3.3.2.	Određivanje ukupne kiselosti	32
3.3.3.	Određivanje prinosa biomase	33
3.4.	HPLC analize	33
3.4.1.	Određivanje sadržaja organskih kiselina	33
3.4.2.	Određivanje sadržaja vitamina C.....	33
3.4.3.	Određivanje sadržaja fenolnih kiselina.....	33
3.5.	Spektrofotometrijske metode	34
3.5.1.	Određivanje sadržaja ukupnih redukujućih šećera	34
3.5.2.	Određivanje sadržaja ukupnih fenola	34
3.5.3.	Određivanje antioksidativne aktivnosti	34
3.5.3.1.	Određivanje antioksidativne aktivnosti na DPPH radikal	34
3.5.3.2.	Određivanje antioksidativne aktivnosti na hidroksi radikal	35
3.5.3.3.	Određivanje redukcione moći.....	35
3.6.	Volumetrijske metode	35
3.6.1.	Određivanje sadržaja etanola.....	35
3.6.2.	Određivanje sadržaja ukupnog azota.....	36
3.7.	Kontrolni uzorci	37
3.8.	Mikrobiološka ispitivanja	37
3.8.1.	Određivanje ukupnog broja kvasaca.....	37
3.8.2.	Određivanje ukupnog broja bakterija sirćetnog vrenja.....	37
3.8.3.	Određivanje antimikrobne aktivnosti	38
3.9.	Senzorna analiza	38
3.10.	Statistička obrada podataka.....	39
3.10.1.	Primarna obrada rezultata.....	39
3.10.2.	Modelovanje primenom metode odzivne površine	39
4.	Rezultati i diskusija	42
4.1.	Početno ispitivanje mogućnosti korišćenja efluenta vinarije nastalog tokom flotacije šire u proizvodnji kombuha napitka	42
4.1.1.	Vrednost pH, ukupna kiselost i prinos biomase	43

4.1.2. Organske kiseline	44
4.1.3. Vitamin C	48
4.1.4. Ukupni fenoli	49
4.1.5. Antioksidativna aktivnost	50
4.1.5.1. Antioksidativna aktivnost na DPPH radikal	50
4.1.5.2. Antioksidativna aktivnost na hidroksi radikal	50
4.1.5.3. Redukciona moć	51
4.1.6. Senzorna analiza	52
4.2. Mogućnost korišćenja efluenta vinarije nastalog tokom flotacije šire u proizvodnji kombuha napitka analizirana nakon početnog ispitivanja	53
4.2.1. Vrednost pH	53
4.2.2. Ukupna kiselost	53
4.2.2.1. Modelovanje ukupne kiselosti kombuha napitaka na efluentu vinarije nakon tri dana fermentacije	55
4.2.3. Proizvodnja biomase	56
4.3. Mikrobiološke analize – broj mikroorganizama i antimikrobna aktivnost	59
4.3.1. Ukupan broj bakterija sirćetnog vrenja i kvasaca	59
4.3.2. Antimikrobna aktivnost kombuha napitaka na efluentu vinarije nakon tri dana fermentacije i kontrolnih uzoraka	63
4.3.3. Modelovanje antimikrobne aktivnosti kombuha napitaka na efluentu vinarije nakon tri dana fermentacije	65
4.4. Sadržaj ukupnih redukujućih šećera u kombuha proizvodima na efluentu vinarije	67
4.4.1. Modelovanje ukupnog rezidualnog sadržaja redukujućih šećera u kombuha napicima na efluentu vinarije nakon tri dana fermentacije	69
4.5. Sadržaj organskih kiselina u kombuha proizvodima na efluentu vinarije ..	71
4.5.1. Modelovanje sadržaja sirćetne, vinske i oksalne kiseline u kombuha napicima na efluentu vinarije nakon tri dana fermentacije	79
4.6. Sadržaj vitamina C u kombuha proizvodima na efluentu vinarije	82
4.6.1. Modelovanje sadržaja vitamina C u kombuha napicima na efluentu vinarije nakon tri dana fermentacije	84
4.7. Sadržaj etanola u kombuha proizvodima na efluentu vinarije	85
4.8. Sadržaj ukupnog azota u kombuha proizvodima na efluentu vinarije	88

4.8.1. Modelovanje rezidualnog sadržaja azota u kombuha napicima na efluentu vinarije nakon tri dana fermentacije	89
4.9. Sadržaj fenolnih materija u kombuha proizvodima na efluentu vinarije	92
4.9.1. Sadržaj ukupnih fenola u kombuha proizvodima na efluentu vinarije	92
4.9.1.1. Modelovanje sadržaja ukupnih fenola u kombuha napicima na efluentu vinarije nakon tri dana fermentacije.....	95
4.9.2. Sadržaj fenolnih kiselina u kombuha proizvodima na efluentu vinarije .	96
4.9.2.1. Modelovanje sadržaja galne kiseline u kombuha napicima na efluentu vinarije nakon tri dana kultivacije	103
4.10. Antioksidativna aktivnost kombuha proizvoda na efluentu vinarije	104
4.10.1. Antioksidativna aktivnost na DPPH'	104
4.10.2. Antioksidativna aktivnost na hidroksi radikal	105
4.10.3. Redukciona moć	107
4.10.4. Modelovanje antioksidativne aktivnosti kombuha napitaka na efluentu vinarije nakon tri dana fermentacije	108
5. Zaključak	113
6. Literatura	116
Plan tretmana podataka	133

Spisak oznaka, simbola i skraćenica

1FPk	Fruktoza-1-fosfat-kinaza
AP	Alkalitet pepela
BSV	Bakterije sirćetnog vrenja
CS	Celuloza-sintaza
CUPRAC	Engl. <i>CUPric Reducing Antioxidant Capacity</i>
DPPH	2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikal
EGK	Ekvivalent galne kiseline
FBP	Fruktoza-1,6-difosfat-fosfataza
FDA	Agencija za hranu i lekove (engl. <i>Food and Drug Administration</i>)
FK	Fruktokinaza
FRAP	Engl. <i>fluorescence recovery after photobleaching</i>
G6PDH	Glukoza-6-fosfat-dehidrogenaza
GK	Glukokinaza
IS	Inicijalni supstrat
NAD	Nikotinamid-adenin-dinukleotid
NADP	Nikotinamid-adenin-dinukleotid-fosfat
ND	Nije detektovano
·OH	Hidroksi radikal
PGI	Fosfoglukoizomeraza
PMG	Fosfoglukomutaza
PTS	Sistem fosfotransferaza
RNS	engl. <i>reactive nitrogen species</i>
ROS	engl. <i>reactive oxygen species</i>
t	Temperatura [°C]
UDPGlc	Uridin-difosfoglukoza
UGP	Uridin-difosfoglukoza-pirofosforilaza
UK	Ukupna kiselost
τ	Vreme
ω	Procentni sadržaj

Spisak tabela

Tabela 2.1. Najznačajnija jedinjenja prisutna u kombuha napitku	13
Tabela 2.2. Sadržaj sirćetne kiseline u različitim kombuha proizvodima.....	15
Tabela 2.3. Sadržaj vitamina C u različitim kombuha proizvodima.....	16
Tabela 2.4. Granične vrednosti emisije na mestu ispuštanja u površinske vode (Uredba o graničnim vrednostima emisije zagađujućih materija u vode i rokovima za njihovo dostizanje “Sl. glasnik RS” 1/2016, 2016).....	29
Tabela 3.1 Plan eksperimenata s kodiranim vrednostima	32
Tabela 4.1. Sadržaj organskih kiselina tokom kombuha fermentacije na efluentu vinarije.....	46
Tabela 4.2. Rezultati jednofaktorijske analize varijansi modelovanog odziva ukupne kiselosti kombuha napitaka na efluentu vinarije nakon tri dana fermentacije	55
Tabela 4.3. Koeficijenti regresione jednačine i njihove <i>p</i> -vrednosti modelovanog odziva ukupne kiselosti kombuha napitaka na efluentu vinarije nakon tri dana fermentacije	55
Tabela 4.4. Antimikrobna aktivnost kombuha napitaka na efluentu vinarije nakon tri dana fermentacije i kontrolnih uzoraka prema različitim mikroorganizmima	64
Tabela 4.5. Rezultati jednofaktorijske analize varijansi modelovanih odziva antimikrobne aktivnosti kombuha napitaka na efluentu vinarije nakon tri dana fermentacije prema <i>S.</i> <i>aureus</i> , <i>Salmonella</i> Typhimurium, <i>E. faecalis</i> i <i>E. coli</i>	65
Tabela 4.6. Koeficijenti regresione jednačine i njihove <i>p</i> -vrednosti modelovanih odziva antimikrobne aktivnosti kombuha napitaka na efluentu vinarije nakon tri dana fermentacije prema <i>S. aureus</i> , <i>Salmonella</i> Typhimurium, <i>E. faecalis</i> i <i>E. coli</i>	66
Tabela 4.7. Sadržaj redukujućih šećera u uzorcima kombuha proizvoda na efluentu vinarije i nefermentisanoj podlozi	69
Tabela 4.8. Rezultati jednofaktorijske analize varijansi modelovanog odziva rezidualnog sadržaja šećera u kombuha napicima na efluentu vinarije nakon tri dana fermentacije ..	70
Tabela 4.9. Koeficijenti regresione jednačine i njihove <i>p</i> -vrednosti modelovanog odziva rezidualnog sadržaja šećera u kombuha napicima na efluentu vinarije nakon tri dana fermentacije.....	70
Tabela 4.10. Sadržaj organskih kiselina u kombuha proizvodima na efluentu vinarije i kontrolnim uzorcima	76
Tabela 4.11. Rezultati jednofaktorijske analize varijansi modelovanih odziva sadržaja sirćetne, vinske i oksalne kiseline u kombuha napicima na efluentu vinarije nakon tri dana fermentacije.....	79
Tabela 4.12. Koeficijenti regresione jednačine i njihove <i>p</i> -vrednosti modelovanih odziva sadržaja sirćetne, vinske i oksalne kiseline u kombuha napicima na efluentu vinarije nakon tri dana fermentacije.....	80
Tabela 4.13. Rezultati jednofaktorijske analize varijansi modelovanog odziva sadržaja vitamina C u kombuha napicima na efluentu vinarije nakon tri dana fermentacije.....	84
Tabela 4.14. Koeficijenti regresione jednačine i njihove <i>p</i> -vrednosti modelovanog odziva sadržaja vitamina C u kombuha napicima na efluentu vinarije nakon tri dana fermentacije	84
Tabela 4.15 Sadržaj ukupnog azota u uzorcima kombuha proizvoda na efluentu vinarije i nefermentisanoj podlozi	89

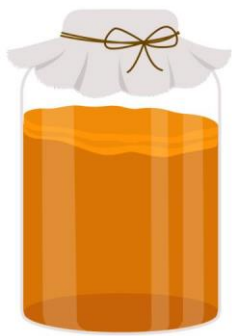
Tabela 4.16. Rezultati jednofaktorijalne analize varijansi modelovanog odziva rezidualnog sadržaja azota u kombuha napicima na efluentu vinarije nakon tri dana fermentacije....	90
Tabela 4.17. Koeficijenti regresione jednačine i njihove p -vrednosti modelovanog odziva rezidualnog sadržaja azota u kombuha napicima na efluentu vinarije nakon tri dana fermentacije.....	90
Tabela 4.18. Rezultati jednofaktorijalne analize varijansi modelovanog odziva sadržaja ukupnih fenola u kombuha napicima na efluentu vinarije nakon tri dana fermentacije	95
Tabela 4.19. Koeficijenti regresione jednačine i njihove p -vrednosti modelovanog odziva sadržaja ukupnih fenola u kombuha napicima na efluentu vinarije nakon tri dana fermentacije.....	95
Tabela 4.20 Sadržaj fenolnih kiselina u kombuha proizvodima na efluentu vinarije i kontrolnim uzorcima	100
Tabela 4.21. Rezultati jednofaktorijalne analize varijansi modelovanog odziva sadržaja galne kiseline u kombuha napicima na efluentu vinarije nakon tri dana fermentacije.....	103
Tabela 4.22. Koeficijenti regresione jednačine i njihove p -vrednosti modelovanog odziva sadržaja galne kiseline u kombuha napicima na efluentu vinarije nakon tri dana fermentacije.....	103
Tabela 4.23. Antioksidativna aktivnost na DPPH' uzoraka kombuha proizvoda na efluentu vinarije i nefermentisane podloge	105
Tabela 4.24. Antioksidativna aktivnost na hidrokso radikal uzoraka kombuha proizvoda na efluentu vinarije i nefermentisane podloge	107
Tabela 4.25. Redukciona moć uzoraka kombuha proizvoda na efluentu vinarije i nefermentisane podloge.....	108
Tabela 4.26. Rezultati jednofaktorijalne analize varijansi modelovanih odziva antioksidativne aktivnosti kombuha napitaka na efluentu vinarije nakon tri dana fermentacije.....	109
Tabela 4.27. Koeficijenti regresione jednačine i njihove p -vrednosti modelovanih odziva antioksidativne aktivnosti kombuha napitaka na efluentu vinarije nakon tri dana fermentacije.....	110

Spisak slika

Slika 2.1. Poreklo kombuhe A) iz Mandžurije; B) preko Japana; C) Rusije; D) Nemačke; E) do Francuske (da Silva Júnior i sar., 2022)	7
Slika 2.2. Normalizovana popularnost pretrage pojma „kombucha“ na Guglu od 2004. godine (https://trends.google.com/trends/explore?date=alliq=kombucha)	7
Slika 2.3. Shema proizvodnje tradicionalnog kombuha napitka: A) zagrevanje vode do ključanja; B) dodatak šećera; C) dodavanje odabranog čaja; D) preuzimanje razvijene opne sa površine završene fermentacije; E) inokulacija postojećom opnom i fermentisanim kombuha napitkom; F) statička kultivacija; G) flaširanje fermentisanog kombuha napitka (da Silva Júnior i sar., 2022)	8
Slika 2.4. Alternativni supstrati za proizvodnju kombuha napitka (da Silva Júnior i sar., 2022)	9
Slika 2.5. Shema osnovne metaboličke aktivnosti kombuhe (Sievers i sar., 1995).....	10
Slika 2.6. Biohemijski put za sintezu bakterijske celuloze (Chawla i sar., 2009).....	17
Slika 2.7. Konfokalni skenirajući laserski snimak pelikule od mikrobiološke celuloze na: a) tradicionalnoj podlozi; b) i c) s viškom anortozita u medijumu. Proteini su obojeni tiazinom (žuto), celuloza je bojena kalkofluorom (plavo). Skala je 10 µm (Podolich i sar., 2017).....	18
Slika 2.8. Zdravstvena korist konzumacije kombuha napitka (da Silva Júnior i sar., 2022) ...	19
Slika 2.9. Vinova loza (<i>Vitis vinifera</i> L.) (https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/2/24/Illustration_Vitis_vinifera0.jpg)	25
Slika 2.10. Grožđe sorte Rizling (https://www.thewinesociety.com/4a6cce/globalassets/discovery/thumbs/riesling_735x790.jp)	26
Slika 2.11. Shema proizvodnje belog vina (https://www.tehnologijahrane.com/wp-content/uploads/2013/06/Šema-Razlike-belo-i-crno.jpg)	27
Slika 2.12. Maseni i energetski bilans proizvodnje vina (Brito i sar., 2007)	28
Slika 4.1. Kombuha proizvod kultivisan na vodi od flotacije šire grožđa sorte Rizling nakon 10 dana	42
Slika 4.2. Vrednost pH i ukupna kiselost (UK) kombuha proizvoda tokom fermentacije na efluentu vinarije (IS – inicijalni supstrat).....	43
Slika 4.3. Celulozna navlaka nakon 10 dana kombuha fermentacije na efluentu vinarije.....	44
Slika 4.4 Promena sadržaja biomase tokom trajanja fermentacije kombuha proizvoda na efluentu vinarije.....	44
Slika 4.5. Sadržaj vitamina C tokom kombuha fermentacije na efluentu vinarije (IS – inicijalni supstrat, različita slova označavaju statistički značajne razlike među uzorcima (p<0,05))	49
Slika 4.6. Sadržaj ukupnih fenola tokom kultivacije kombuha proizvoda na efluentu vinarije (IS – inicijalni supstrat, različita slova označavaju statistički značajne razlike među uzorcima (p<0,05)).....	49

Slika 4.7. Antioksidativna aktivnost na DPPH' i 'OH kombuha proizvoda i efluenta vinarije (različita slova označavaju statistički značajne razlike među uzorcima ($p < 0,05$), ♦ - AA _{DPPH'} , ■ - AA _{DPPH'} - IS, ▲ - AA'OH, ● - AA'OH - IS)	51
Slika 4.8. Redukciona moć kombuha proizvoda i efluenta vinarije, različita slova označavaju statistički značajne razlike među uzorcima ($p < 0,05$)	51
Slika 4.9. Senzorna ocena kombuha proizvoda na efluentu vinarije	52
Slika 4.10. Ukupna kiselost kombuha proizvoda na efluentu vinarije tokom trajanja kultivacije a) na 30 °C, b) na 25 °C, c) na 20 °C, na 3, 5 i 7% polaznog sadržaja šećera	54
Slika 4.11. Odzivna površina koja opisuje uticaj temperature fermentacije i početnog sadržaja šećera na ukupnu kiselost kombuha napitaka na efluentu vinarije nakon tri dana kultivacije	56
Slika 4.12. Celulozna opna na površini kombuha proizvoda na efluentu vinarije u fermentacionoj posudi, nakon devet dana kultivacije	57
Slika 4.13. Primena bakterijske celuloze za a) pravljenje odeće i b) lečenje opekotina (slika desno prikazuje brzinu zarastanja netretirane (prvi red), tretirane čistim hidrogelom (srednji red) i tretirane hidrogelom i ćelijama (donji red) opekotine kroz dane) (Gregory i sar., 2021).....	57
Slika 4.14. Celulozne opne nakon devet dana kombuha fermentacije na 30 °C na efluentu vinarije podešenom na 7%, 5% i 3% polaznog sadržaja šećera u podlozi.....	58
Slika 4.15. Prinos biomase tokom kultivacije kombuha proizvoda na efluentu vinarije na 3, 5 i 7% polaznog sadržaja šećera.....	59
Slika 4.16. Ukupan broj bakterija sirćetnog vrenja tečne faze kombuha proizvoda na efluentu vinarije na a) 30 °C, b) 25 °C i c) 20°C, na 3, 5 i 7% polaznog sadržaja šećera (K – kombuha proizvod na crnom čaju).....	61
Slika 4.17. Ukupan broj kvasaca tečne faze kombuha proizvoda na efluentu vinarije na a) 30 °C, b) 25 °C i c) 20°C, na 3, 5 i 7% polaznog sadržaja šećera (K – kombuha proizvod na crnom čaju).....	62
Slika 4.18. Odzivne površine koje opisuju uticaj temperature fermentacije i početnog sadržaja šećera na antimikrobne aktivnosti kombuha napitaka na efluentu vinarije nakon tri dana fermentacije prema: a) <i>S. aureus</i> , b) <i>Salmonella Typhimurium</i> , c) <i>E. faecalis</i> i d) <i>E. coli</i>	67
Slika 4.19. Odzivna površina koja opisuje uticaj temperature fermentacije i početnog sadržaja šećera na rezidualni sadržaj ukupnih redukujućih šećera u kombuha napicima na efluentu vinarije nakon tri dana kultivacije.....	71
Slika 4.20. Odzivne površine koje opisuju uticaj temperature fermentacije i početnog sadržaja šećera na sadržaj organskih kiselina nakon tri dana fermentacije kombuha napitaka na efluentu vinarije za sadržaj: a) sirćetne, b) vinske i c) oksalne kiseline	81
Slika 4.21. Sadržaj vitamina C u kombuha proizvodima na efluentu vinarije fermentisanim na a) 30 °C, b) 25 °C i c) 20 °C, na 3, 5 i 7% polaznog sadržaja šećera	83
Slika 4.22. Odzivna površina koja opisuje uticaj temperature fermentacije i početnog sadržaja šećera na sadržaj vitamina C u kombuha napicima na efluentu vinarije nakon tri dana fermentacije.....	85
Slika 4.23. Sadržaj etanola u kombuha proizvodima na efluentu vinarije fermentisanim na a) 30 °C, b) 25 °C i c) 20 °C s 3, 5 i 7% polaznog sadržaja šećera.....	87

Slika 4.24. Odzivna površina koja opisuje uticaj temperature fermentacije i početnog sadržaja šećera na sadržaj rezidualnog azota u kombuha napicima na efluentu vinarije nakon tri dana kultivacije	91
Slika 4.25. Sadržaj ukupnih fenola u kombuha proizvodima na efluentu vinarije fermentisanim na a) 30 °C, b) 25 °C i c) 20 °C, s 3, 5 i 7% polaznog sadržaja šećera	94
Slika 4.26. Odzivna površina koja opisuje uticaj temperature fermentacije i početnog sadržaja šećera na sadržaj ukupnih fenola u kombuha napicima na efluentu vinarije nakon tri dana kultivacije	96
Slika 4.27. Odzivna površina koja opisuje uticaj temperature fermentacije i početnog sadržaja šećera na sadržaj galne kiseline u kombuha napicima na efluentu vinarije nakon tri dana kultivacije	104
Slika 4.28. Odzivne površine koje opisuju uticaj temperature fermentacije i početnog sadržaja šećera na antioksidativne aktivnosti kombuha napitaka na efluentu vinarije nakon tri dana fermentacije: a) na DPPH [•] , b) na hidroksi radikal i c) za redukcionu moć	111



Uvod

1. Uvod

U poslednjoj deceniji, uočava se rast popularnosti proizvodnje i konzumacije hrane isključivo prirodnog porekla. Savremeno potrošačko društvo stavlja sve veći akcenat na potrebu za informisanjem o potencijalnim rizicima i prednostima namirnica dostupnih na tržištu. Jedan od pravaca ovog razvoja je funkcionalna hrana, koja zahvaljujući svojim osobinama smanjuje rizik od pojave različitih negativnih uticaja na zdravlje potrošača. U ovu grupu namirnica spadaju različiti tipovi mlečnih proizvoda. Međutim, kako poremećaji ishrane, poput intolerancije na laktozu, postaju sve učestaliji problem, razvoj funkcionalnih, probiotskih napitaka koji nisu na mlečnoj osnovi je sve interesantniji i može se očekivati da će ovaj segment tržišta u budućnosti značajno rasti. Za kombuha napitak se smatra da pokazuje veliki broj korisnih dejstava na ljudsko zdravlje, te predstavlja vredan dodatak ljudskoj ishrani jer ima antimikrobna, antioksidativna, hepatoprotektivna i antikancerogena svojstva. Iako se napitak tradicionalno proizvodi na crnom ili zelenom čaju, kombuha kultura može da fermentiše veliki broj supstrata, obezbeđujući na taj način napitke različitih karakteristika.

Kombuha je fermentisani napitak koji proizvodi združena kultura kvasaca i bakterija (engl. *Symbiotic Colony of Bacteria and Yeast, SCOBY*) na nutritivno bogatoj podlozi. Tradicionalni način proizvodnje podrazumeva medijum na bazi crnog ili zelenog čaja (*Camellia sinensis*), koji predstavlja izvor azota i mikronutrijenata, uz dodatak saharoze kao izvora ugljenika. Osvežavajući, blago gaziran ukus napitka zasniva se na činjenici da kvasci fermentišu šećere do etanola i ugljenik(IV)-oksida, a sirćetne bakterije oksidišu etanol do sirćetne kiseline (Jayabalan i sar., 2014, 2016; Malbaša, 2009).

Kombuha napitak proizveden po tradicionalnoj recepturi ima manje od 0,50% (v/v) etanola, čime je ispunjen kriterijum za klasifikaciju u kategoriju bezalkoholnih napitaka, prema odredbama, kako Republike Srbije, tako i Evropske unije i SAD-a (Blanc, 1996; Zhang, 2019).

Časopis Forbs (engl. *Forbes*) je kombuhu proglasio napitkom godine za 2020. godinu (<https://www.forbes.com/sites/bridgetshirvell/2020/08/13/how-hard-kombucha-became-the-drink-of-2020/?sh=2e7e9780550c>), dok je Vol Strit Džurnal (engl. *The Wall Street Journal*) 2018. godinu prozvao godinom luksuzne vode i kombuhe (engl. *The Year of Fancy Water and Kombucha*), pošto je prodaja kombuhe u 2018. godini porasla za 43% (<https://www.wsj.com/articles/the-year-of-fancy-water-and-kombucha-11546269901>). Tokom trajanja pandemije COVID-19 u nekoliko zemalja primećen je porast konzumacije fermentisane hrane, naročito napitaka, među kojima se posebno izdvajaju kombuha i kefir (La Torre i sar., 2021).

Mikrobiološki sastav kombuha kulture varira i zavisi od geografske lokacije gde se ona uzgaja. Najčešće su prisutne sirćetne bakterije rodova *Komagataeibacter*, *Gluconobacter* i *Acetobacter*, mlečnokisele bakterije rodova *Lactobacillus* i *Lactococcus* (Villarreal-Soto i sar., 2020), kao i kvasci vrsta *Schizosaccharomyces pombe*, *Saccharomycodes ludwigii*, *Kloeckera apiculata*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Zygosaccharomyces bailii*, *Torulaspora delbrueckii* i *Brettanomyces bruxellensis* (Coton i sar., 2017). Bakterije vrste *Komagataeibacter xylinus* proizvode celuloznu navlaku, sačinjenu od celuloznih nanofibrila debljine od 2 do 4 nm koje

formiraju biofilm. Karakteristična celulozna navlaka pluta po površini i obezbeđuje podlogu za rast sirćetnih bakterija (Villarreal-Soto i sar., 2018; Yamada, Yukphan, Vu, Muramatsu, Ochaikul, Tanasupawat, i sar., 2012). Bakterijska celuloza se ceni zbog svoje visoke čistoće i stepena kristalichnosti i navodi kao značajna s aspekta primene u ulozi bioadsorbenta, materijala za pakovanje ili materijala biološkog porekla koji se može koristiti u medicini (Bertsch i sar., 2021). U današnjoj praksi, celuloza se još uvek najčešće dobija upotrebom biljaka. Ipak, negativni ekološki uticaj navedenog postupka, što se pre svega odnosi na veliku potrošnju drveta kao sirovine, podstiče deforestaciju i navodi na potrebu za razmatranjem alternativnih metoda. Jedan od mogućih načina dobijanja celuloze je korišćenje mikroorganizama. Na ovaj način omogućava se dobijanje celuloze kao obnovljive sirovine, uzimajući u obzir njeno poreklo i biodegradabilnost (Costa i sar., 2017; Galdino da Silva i sar., 2021).

Istraživanja poslednjih decenija su pokazala da je kombuha kultura sposobna da fermentiše veliki broj različitih supstrata, dokle god su ispunjeni osnovni nutritivni zahtevi (Sinir i sar., 2019). Vrednost pH napitka se brzo spušta i na taj način se smanjuje rizik od kontaminacije. Takođe, moguće je dodati i tečni inokulum, a ne samo celuloznu navlaku, i na taj način obezbediti nižu vrednost pH od samog početka fermentacije. Dominantne kiseline prisutne u kombuha proizvodima su sirćetna, glukonska, vinska, jabučna i oksalna (Jayabalan i sar., 2007; Laureys i sar., 2020).

Tradicionalni kombuha napitak ispoljava izraženu antioksidativnu aktivnost i sadrži značajnu količinu ukupnih fenola i flavonoida. Međutim, istraživanja koja podrazumevaju upotrebu alternativnih supstrata su pokazala da ovako proizvedeni napici, često, pokazuju više vrednosti antioksidativne aktivnosti nego tradicionalni kombuha napitak (Battikh i sar., 2012; Jakubczyk i sar., 2020; Pure i Pure, 2016; Sinir i sar., 2019; Vitas i sar., 2020; Zhang i sar., 2021).

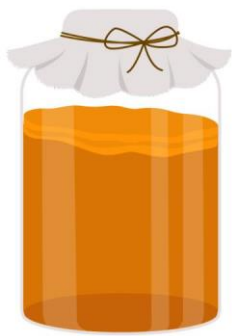
Kako tradicionalni kombuha napitak, dobijen fermentacijom crnog ili zelenog čaja, tako i alternativni, proizveden na različitom lekovitom bilju, pokazuje antimikrobnu aktivnost i prema Gram pozitivnim i prema Gram negativnim bakterijama (*Cryptococcus neoformans*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermis*, *Micrococcus luteus*, *Listeria monocytognes*, *Escherichia coli*, *Salmonella Typhimurium*, *Shigella sonnei*, *Campylobacter jejuni* i *Pseudomonas aeruginosa*), kao i prema nekoliko vrsta kvasaca iz roda *Candida* (Battikh i sar., 2012; Silva i sar., 2021; Sreeramulu i sar., 2000).

Održivost treba posmatrati kao način da se očuva priroda, bez potreba za odustajanjem od ekonomskog rasta. Principi održive proizvodnje podrazumevaju odgovornije korišćenje resursa i usmerenost ka minimizaciji negativnih uticaja na okolinu, što posledično vodi ka stvaranju boljih uslova za život budućih generacija (Brenot i sar., 2019). Za postizanje zadatog cilja, neophodno je korišćenje novih tehnologija koje bi koristile alternativne sirovine, proizvodne procese, pakovanja i lokalnu distribuciju (Galdino da Silva i sar., 2021).

U tehnologiji proizvodnje belih vina, nakon branja, muljanja i ceđenja grožđa sledi operacija bistrenja dobijene šire, što se najčešće izvodi taloženjem ili flotacijom (Jackson, 2014f). U oba slučaja se generiše otpadni tok koji se, uobičajeno, ispušta u komunalnu kanalizaciju i na taj način opterećuje trenutne recipijente, a u budućnosti i postrojenja za preradu

otpadnih voda, velikim količinama organskih materija. Odlaganje i prerada otpadnih voda je jedan od najvećih ekoloških problema u Republici Srbiji, te je stoga svaki doprinos rešavanju ovog problema značajan. Predviđeni postupak u potpunosti uklanja deo otpadnog toka vinarije i iskorištava ih kao polaznu sirovinu u dobijanju novog kombuha proizvoda, na taj način smanjujući ekološki otisak vinarije i cenu proizvodnje kombuha napitaka. U okviru istraživanja obuhvaćenih ovom doktorskom disertacijom, u potpunosti je implementiran princip cirkularne ekonomije, u smislu iskorišćavanja efluenta jedne industrije kao polazne sirovine u drugoj, gde je pomenuti otpadni tok valorizovan kao polazna sirovina za proizvodnju kombuha napitka. Predtretman je podrazumevao prečišćavanje od fizičkih nečistoća i sterilizaciju, dok dodavanje šećera nije bilo potrebno, već razblaživanje, radi podešavanja sadržaja odgovarajućeg za kultivaciju kombuhe. Dalje ispitivanje podrazumevalo je procenu mogućnosti dodatnog smanjenja sadržaja šećera, u cilju dobijanja, kako veće količine proizvoda od polazne sirovine tako i proizvodnje napitka niže energetske vrednosti.

Varirani su uslovi proizvodnje, početni sadržaj šećera, temperatura kultivacije, kao i njeno trajanje, a praćeni su različiti parametri kvaliteta novodobijenog funkcionalnog napitka, njegova hemijska, fizička, antioksidativna i mikrobiološka svojstva.



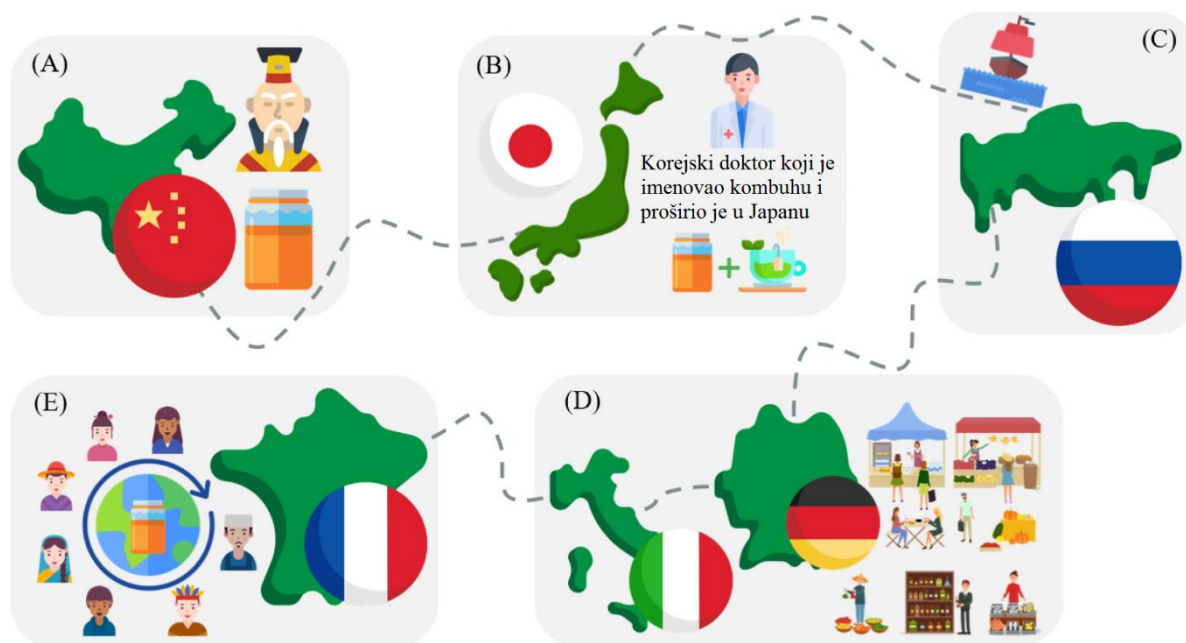
2. Opšti deo

2.1. Kombuha

2.1.1. Poreklo kombuhe

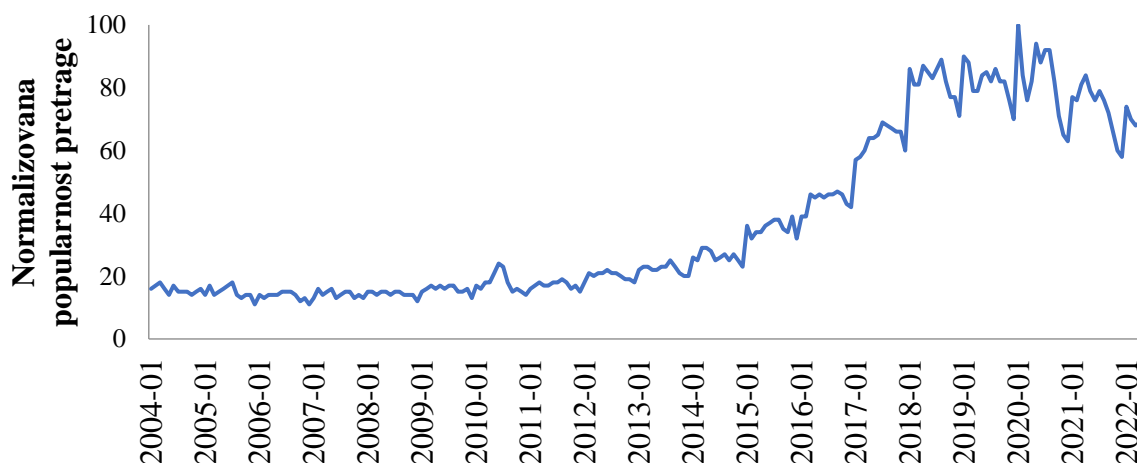
Kombuha napitak vodi poreklo s Dalekog istoka, gde se konzumira već vekovima, a prvo pominjanje u istorijskim spisima vezuje se za 220. godinu p. n. e. tokom vladavine dinastije Ćin (kineski 秦朝) u Mandžuriji (slika 2.1.A). Kombuha je prepoznata kao napitak za koji se verovalo da poseduje detoksikacijska svojstva, kao i da daje energiju organizmu, u tolikoj meri da u narodu dobija nadimak „božanski“ napitak. Još jedno objašnjenje korišćenja ovakvog opisa kombuhe je što je često čuvana u prostorijama namenjenim molitvi, više iz praktičnog razloga budući da su to bile najbolje čišćene i održavane prostorije u domaćinstvu, te je u njima mogućnost kontaminacije bila najmanja. Ovo je bila praksa i u Evropi, pa su tako monasi iz Moravske odlagali kombuhu na pažljivo čuvanom mestu. Korejski doktor Kombu (slika 2.1B) koristio je kombuhu za lečenje oboljenja digestivnog trakta oko 414. godine n. e, donevši tako kombuhu u Japan, gde je i dobila današnje ime. O popularnosti ovog napitka svedoči i činjenica da su japanski ratnici nosili na bojno polje čuture s kombuhom, kao napitak za vraćanje snage. Istorijski podaci sugerišu da su imali običaj da dosipaju svež čaj u čuture s kombuhom, što je interesantan začetak polukontinualne, ciklično-šaržne kultivacije. Latinski naziv kombuha kulture je *Medusomyces gisevii*, dok su širom sveta prisutni različiti lokalni, alternativni nazivi za kombuhu: *Eastern tea*, *Fungus japonicus*, *Olinca*, *Pichia fermentans*, *Cembuya orientalist*, *Combuchu*, *Tschambucco*, *Volga spring*, *Mo-Gu*, *Champignon de longue vie*, *Teekwass*, *Kwassan* i *Kargasok tea*. Zbog svojih nutritivnih i prehrambenih svojstava, kombuha se proširila preko Rusije, gde se smatra da je stigla trgovačkim brodovima iz Japana (slika 2.1.C), odakle je na prelazu iz XIX u XX vek stigla u Zapadnu Evropu, prvo u Nemačku i Italiju (slika 2.1.D), a kasnije do Francuske i Severne Afrike (slika 2.1.E). Iako je pre II svetskog rata bila popularna u Srednjoj i Istočnoj Evropi, racionisanje namirnica tokom rata, pre svega šećera i čaja, drastično je umanjilo rasprostranjenost kombuha napitka. U italijanskom visokom društvu je bila veoma popularna 50-ih godina XX veka, dok se nisu pojavile neosnovane glasine da izaziva kancer, što je, verovatno iniciralo švajcarska istraživanja iz 60-ih godina koja su ove tvrdnje opovrgnula i utvrdila da konzumacija kombuhe ima slične blagotvorne efekte kao i konzumiranje jogurta (Blanc, 1996; da Silva Júnior i sar., 2022; Dutta i Paul, 2019; Jayabalan i sar., 2015, 2016; Lindau, 1913; Roche, 1998).

Interesantno je da je kombuha prisutna na Dalekom istoku od samih početaka kulture ispijanja čaja. Smatra se da je uzgajanje čaja dobilo šire razmere pred kraj vladavine dinastije Tang (618–907. godine), kao i tokom vladavine dinastije Song (960–1276. godine). Prvu knjigu o čaju napisao je Lu Ju (kineski 陸羽) između 760. i 780. godine, u engleskom prevodu *Classic of Tea* (kineski 茶經) (na srpski nije prevedena), u periodu kada je kombuha napitak već uveliko poznat (Nishimura i sar., 2010).



Slika 2.1. Poreklo kombuhe A) iz Mandžurije; B) preko Japana; C) Rusije; D) Nemačke; E) do Francuske (da Silva Júnior i sar., 2022)

Na osnovu podataka o učestanosti pojmova na Guglu (*Google Trends*), može se uočiti da je popularnost kombuha napitka u porastu u poslednje dve decenije (slika 2.2), uz izraženo interesovanje u periodu od 2018. godine, dok su zemlje u kojima se pojam „kombucha“ najčešće pretražuje, Novi Zeland, Australija, Kanada, SAD i Singapur, redom (<https://trends.google.com/trends/explore?date=alliq=kombucha>).



Slika 2.2. Normalizovana popularnost pretrage pojma „kombucha“ na Guglu od 2004. godine (<https://trends.google.com/trends/explore?date=alliq=kombucha>)

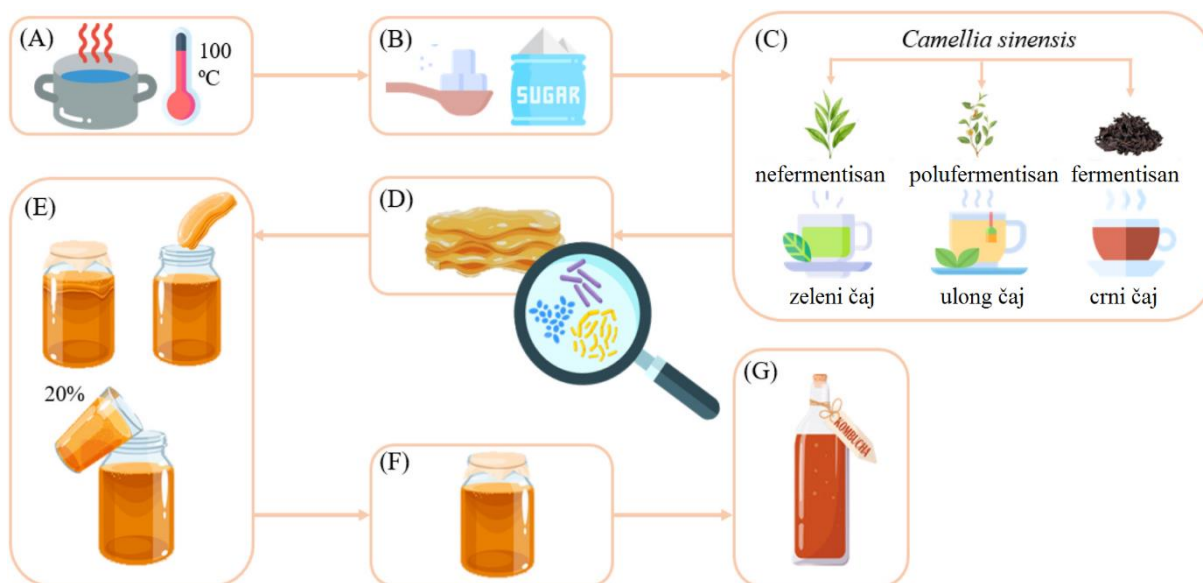
2.1.2. Proizvodnja kombuha napitka

Tradicionalna podloga za proizvodnju kombuha napitka je dekokt crnog ili zelenog čaja zaslađen saharozom (slika 2.3). Čaj važi za najkonzumiraniji napitak na svetu, nakon vode. Na osnovu stepena fermentisanosti listova biljke *Camellia sinensis* razlikuje se šest glavnih tipova,

uz crni i zeleni, kao primere potpuno fermentisanog i gotovo nefermentisanog, koji su daleko najrasprostranjeniji. Biljka čaja ima vrlo specifične agroklimatske zahteve koji su zadovoljeni samo u tropskim i subtropskim oblastima, odakle potiče i, kako kultura ispijanja čaja, tako i kombuha napitak. Danas su najveći proizvođači čaja Kina i Indija s 1,9 i 1,2 miliona tona 2013. godine, dok nijedna druga zemlja ne proizvodi više od 0,5 miliona tona (Chang, 2015).

U saharozom zaslađenu vodu dodaje se odgovarajući čaj i, nakon ključanja i hlađenja, inokulum. Uobičajeni sadržaj saharoze je od 5 do 8%, dok se čaja dodaje 1,5 do 4,5 g/L. Kao inokulum može se koristiti navlaka u kojoj su inkorporirane fiziološki aktivne ćelije kvasaca i sirćetnih bakterija, i već fermentisani kombuha napitak. Fermentacija je statička, uz spontanu aeraciju, a bioreaktor se pokriva sterilnom gazom, da bi se sprečila kontaminacija, odnosno ulazak sirćetnih mušica u sud. Ovako pripremljena, kombuha se ostavlja da fermentiše na mračnom mestu, zaštićena od UV zraka koji štetno deluju na nju, 7 do 14 dana, nakon čega se napitak odvaja od celulozne navlake, cedi i flašira (Frank, 1995; Greenwalt i sar., 1998; Jayabalan i sar., 2016; Reiss, 1987; Sievers i sar., 1995).

Preporuka je da se za kultivaciju kombuhe ne koriste metalni i plastični sudovi zbog moguće interakcije sa organskim kiselinama nastalim metaboličkom aktivnošću mikroorganizama i potencijalnog izluživanja teških metala i škodljivih organskih jedinjenja. Usled izražene kiselosti i značajnog prisustva sirćetne kiseline u fermentacionoj tečnosti (efekat samokonzerziranja), rizik od kontaminacije je mali, zbog čega se kombuha može proizvoditi i u kućnim uslovima bez bojazni da će naškoditi zdravlju konzumenta.



Slika 2.3. Shema proizvodnje tradicionalnog kombuha napitka: A) zagrevanje vode do ključanja; B) dodatak šećera; C) dodavanje odabranog čaja; D) preuzimanje razvijene opne sa površine završene fermentacije; E) inokulacija postojećom opnom i fermentisanim kombuha napitkom; F) statička kultivacija; G) flaširanje fermentisanog kombuha napitka (da Silva Júnior i sar., 2022)

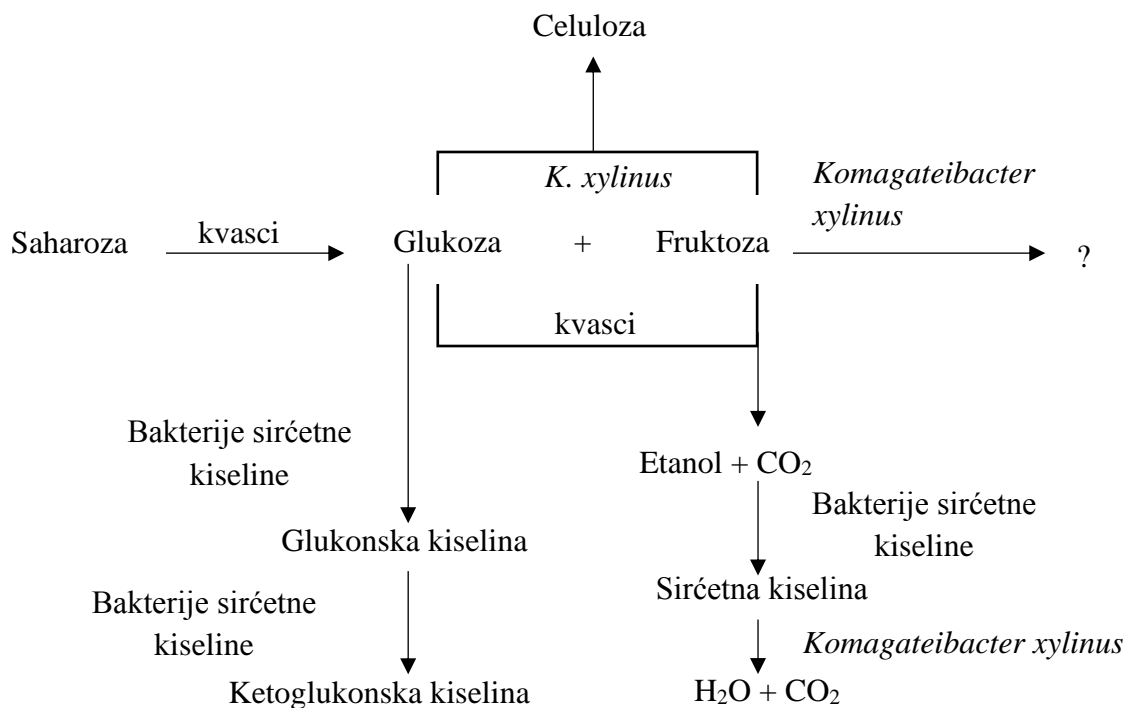
Osim tradicionalne podloge, kombuha se uspješno može kultivirati na većem broju različitih supstrata (slika 2.4): soji (Tu i sar., 2019; Xia i sar., 2019), kori od banane (Pure i Pure, 2016), soku od grožđa (Ayed i sar., 2017), zmijskom voću (Zubaidah i sar., 2018), godži bobicama (Abuduaibifu i Tamer, 2019), bobičastom voću (Barbosa i sar., 2022; Ulusoy i Tamer, 2019), lekovitom bilju (Velićanski i sar., 2013; Vitas i sar., 2013, 2018, 2020) i biljnom otpadu (Leonarski i sar., 2021).



Slika 2.4. Alternativni supstrati za proizvodnju kombuha napitka (da Silva Júnior i sar., 2022)

2.1.3. Mikrobiološki sastav kombuha napitka

Kombuhu čini združena kultura različitih osmofilnih kvasaca i bakterija sirćetne kiseline. Kvasci sintetišu enzim invertazu i hidrolizuju saharozu na glukozu i fruktozu u podlozi i na taj način ih čine dostupnim bakterijama sirćetne kiseline. Tokom trajanja kultivacije, kvasci metabolišu glukozu i fruktozu i proizvode etanol koji bakterije dalje oksiduju u sirćetnu kiselinu (slika 2.5). Osim toga, bakterije sintetišu celulozu koja je glavni konstituent opne koja se formira na površini kultivacione tečnosti, na kojoj je održava sintetisani ugljen-dioksid. Kako su štapičaste bakterije, koje se uočavaju na plutajućoj opni pod mikroskopom, obligatni aerobi, oni se postavljaju prema vazдушnom kiseoniku, dok se sa donje strane opne mogu uočiti nakupine ćelija kvasca. Roussin je 1996. godine testirao oko 900 uzoraka kombuhe i ni u jednom nije utvrdio prisustvo patogenog kvasca *Candida albicans*, mada su neki uzorci sadržali plesni *Aspergillus niger* i *Penicillium notatum* (Cvetković, 2008; Sievers i sar., 1995; Teoh i sar., 2004).



Slika 2.5. Shema osnovne metaboličke aktivnosti kombuhe (Sievers i sar., 1995)

2.1.3.1. Kvasci kombuha kulture

Kvasci su jednoćelijske, fakultativno anaerobne, gljive široko rasprostranjene u prirodi, koje ne stvaraju pravu miceliju, a razmnožavaju se pupljenjem, stvaranjem blastospora ili deljenjem. Industrijski značaj ove grupe mikroorganizama u najvećoj meri proističe iz sposobnosti proizvodnje etanola i ugljen-dioksida. Optimalna temperatura rasta im je, najčešće, u opsegu od 15 do 30 °C, a većini pogoduje blago kisela sredina. Pod aerobnim uslovima, rast ćelija kvasca je minimalan, dok je fermentativna aktivnost tada najizraženija, što je razlog zašto se kombuha ne aeriše prinudno; potrebno je da uslovi kultivacije budu takvi da kvasci mogu preći u anaerobiozu. Kvasci koji su identifikovani u kombuha kulturi obuhvataju rodove *Brettanomyces*, među kojima su *Brettanomyces intermedius*, *B. Bruxellensis* i *B. Claussenii*; *Candida*, gde su identifikovani *Candida famata*, *C. guilliermondii*, *C. obutsa*, *C. famata*, *C. stellate*, *C. guilliermondi*, *C. colleculosa*, *C. kefir* i *C. krusei*; *Saccharomyces* od kojih su identifikovani *Saccharomyces cerevisiae*, *S. bisporus* i *S. uvarum*; *Schizosaccharomyces* s predstavnikom *Schizosaccharomyces pombe*; *Torulasporea* s predstavnikom *Torulasporea delbrueckii*. Osim njih, u kombuhi su identifikovani i kvasci roda *Zygosaccharomyces*, i to *Zygosaccharomyces rouxii*, *Z. bailii* i *Z. kombuchaensis*; *Torula*; *Torulopsis* i *Mycoderma*, kao i vrste *Pichia membranefaciens*, *Kloeckera apiculata* i *Kluyveromyces africanus*. Nije pronađen nijedan kvasac koji bi se mogao smatrati dominantnim niti da je obavezno prisutan u kombuha kulturi. Široki spektar kvasaca koji proizvode kiseline, kao što su *Brettanomyces (Dekkera)*, su dobro adaptirani rastu i razvoju u uslovima niske vrednosti pH, kao što je kombuha napitak (Dufresne i Farnworth, 2000; Jayabalan i sar., 2015; Laureys i sar., 2020; Markov, 2012; V. Nguyen i sar., 2010; Teoh i sar., 2004).

Broj ćelija kvasca pet različitih vrsta (*Brettanomyces bruxellensis*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Zygosaccharomyces bailii*, *Torulasporea delbrueckii* i *Candida Stellata*) meren je u tečnoj fazi nakon kultivacije u trajanju od dve nedelje i kretao se u rasponu od 10^4 do 10^6 CFU/mL, dok je u navlaci broj kvasaca bio konstantan tokom fermentacije, za odgovarajući uzorak, u opsegu od 10^6 do 10^8 CFU/mL. Bioproces započinju osmotolerantni kvasci, čiji broj se kroz fermentaciju smanjuje, dok su, u kasnijim fazama, dominantni acidotolerantni kvasci (Teoh i sar., 2004). Drugo istraživanje ispitivalo je relativnu zastupljenost pojedinih kvasaca i utvrdilo je da su tri najzastupljenija i kod kombuhe kultivisane na crnom i na zelenom čaju *Dekkera bruxellensis*, *Dekkera anomala* i *Saccharomyces uvarum* s tim da je kod kombuhe na crnom čaju najzastupljenija *Dekkera bruxellensis*, dok je na zelenom čaju dominantna *Dekkera anomala* (Coton i sar., 2017).

Ćelije kvasca metabolišu D-glukozu i D-fruktozu Embden-Majerhov-Parnasovim metaboličkim putem (nem. *Embden, Meyerhof*, rus. Парнас) pri čemu je, u aerobnim uslovima terminalni akceptor elektrona kiseonik. Razlaganje ugljenih hidrata se odvija kao respiracija, a nastala pirogroždana kiselina se preko acetil-koenzima A uvodi u Krebsov (nem. Krebs) ciklus. U slučaju anaerobnog metaboličkog puta pirodroždana kiselina se transformiše u etanol i ugljen-dioksid, uz nastanak svega dva molekula ATP-a, čime se postiže ubrzano usvajanje glukoze, kako bi se dobila potrebna količina energije. Pri povećanim koncentracijama glukoze javlja se Krebtrijev (engl. Crabtree) efekat, odnosno fermentativni metabolizam glukoze pri aerobnim uslovima. Kod kvasca *Saccharomyces cerevisiae* Krebtrijev efekat se javlja pri koncentracijama glukoze većim od 9 g/L, što znači da su u bioprocesu dobijanja kombuha napitka kvasci sve vreme u fermentativnom metabolizmu, proizvodeći etanol i ugljen-dioksid. Međutim, prisustvo kiseonika u podlozi dodatno stimuliše alkoholnu fermentaciju jer pospešuje sintezu masnih kiselina i sterola povećavanjem permeabilnosti ćelijske membrane i time olakšavajući transport šećera u unutrašnjost ćelije (Barnett, 1976; Crabtree, 1929; De Deken, 1966; Karlson, 1988; Moreno i Peinado, 2012b).

2.1.3.2. Bakterije kombuha kulture

Sirćetne bakterije, uobičajeno predstavljene skraćenicom AAB (engl. *Acetic acid bacteria*), imaju sposobnost da etanol delimično oksiduju u sirćetnu kiselinu i predstavljaju karakteristične mikroorganizme kombuha fermentacije koji čine gotovo 80% prisutnih mikroorganizama (Markov, 2012; Villarreal-Soto i sar., 2020).

Sirćetne bakterije čini 17 rodova, ali se u kombuhi nalaze pripadnici rodova *Acetobacter*, *Gluconobacter*, *Gluconacetobacter* i *Komagataeibacter*. Od predstavnika roda *Acetobacter*, pronađene su *A. pasteurianus*, *A. aceti*, *A. intermedium* sp. nov. i *A. nitrogenifigens* sp. nov. Među predstavnicima roda *Gluconobacter*, u kombuha kulturi pronađene su vrste *Gluconobacter oxydans*, *Gluconoacetobacter* sp. A4 i *Gluconoacetobacter kombuchae* sp. nov. *Komagataeibacter xylinus* se smatra karakterističnim predstavnikom mikrobiološke populacije kombuhe, kao i da je to mikroorganizam odgovoran za biosintezu celulozne navlake na površini tečne faze. Ova bakterija je ranije bila klasifikovana kao *A. xylinus*, *A. xylinum*, *A. aceti* subsp. *xylinus*, *Gluconobacter xylinus* i *Gluconacetobacter xylinus*, ali je od 2012. godine reklasifikovana u zasebni rod *Komagataeibacter*. Vrste roda *Komagataeibacter* mogu proizvesti od 10 do 20% sirćetne kiseline, dok bakterije roda *Acetobacter* proizvode najviše do 8% sirćetne kiseline u

podlozi. Istraživanjima je utvrđeno da bakterija *Komagataeibacter rhaeticus* čini između 16 i 49% ukupne mikrobne populacije, nakon 15 dana fermentacije. U celuloznoj navlaci, sledeće po zastupljenosti bile su vrste *Gluconobacter* sp., koje čine do 26% mikrobne populacije. Priпадnici roda *Lactobacillus* su u kombuha kulturi otkriveni tek nedavno i ne čine deo obavezno prisutne populacije, već su sporadično prisutni (Coton i sar., 2017; Jayabalan i sar., 2015; Laureys i sar., 2020; Villarreal-Soto i sar., 2020; Yamada, Yukphan, Vu, Muramatsu, Ochaikul, i Nakagawa, 2012; Yamada, Yukphan, Vu, Muramatsu, Ochaikul, Tanasupawat, i sar., 2012).

2.1.4. Hemijski sastav kombuha napitka

Hemijski sastav kombuha napitka je veoma raznovrstan i sadrži šećere, kiseline, enzime, alkohol, vitamine, mikroelemente itd. (tabela 2.1).

Tabela 2.1. Najznačajnija jedinjenja prisutna u kombuha napitku

Komponenta		Reference
Šećeri	• Glukoza	Greenwalt i sar., 2000; Malbaša, Lončar, Djurić, i sar., 2008; Reiss, 1994
	• Fruktaza	
	• Saharoza	
Kiseline	• Sirćetna	Blanc, 1996; Jayabalan i sar., 2007; Vitas i sar., 2018
	• D-glukuronska	
	• Mlečna	
	• Limunska	
	• Oksalna	
	• Glukonska	
	• Vinska	
	• Jabučna	
Enzimi	• Hidrolitički (invertaza i katalaza)	Jayabalan i sar., 2015; Malbaša, 2009; Tran i sar., 2020
	• Oksidativni (katalaza i citohrom-oksidaza)	
Alkohol	• Etanol	Blanc, 1996; Reiss, 1987, 1994; Vitas i sar., 2019
Vitamini	• B ₁	Bauer-Petrovska i Petrushevska-Tozi, 2000; V. Kumar i Joshi, 2016
	• B ₂	
	• B ₆	
	• B ₁₂	
	• C	
Mikroelementi	• Mn	Bauer-Petrovska i Petrushevska-Tozi, 2000
	• Ni	
	• Cu	
	• Fe	
	• Zn	

2.1.4.1. Šećeri u kombuha napitku

Saharoza se u podlogu tradicionalnog kombuha napitka dodaje kao primarni izvor ugljenika za rast i razvoj mikroorganizama, tako da se njen sadržaj najčešće podešava na 70 g/L. Korišćenje saharoze predstavlja okosnicu simbioze kombuha kulture, gde je invertaza, koju sintetišu kvasci, neophodna za dalji tok bioprocesa. Iako izvor šećera utiče na dinamiku bioprocesa, ne menja značajno konačni ukus fermentisanog napitka. Uz početnih 70 g/L saharoze,

nakon 21 dan fermentacije u kombuha napitku mereno je 25 i 5 g/L glukoze i fruktoze, redom (Jayabalan i sar., 2014; Lončar i sar., 2000; Malbaša, Lončar, i Djurić, 2008; May i sar., 2019).

2.1.4.2. Kiseline u kombuha napitku

Kiseline su značajni konstituenti i glavni nosioci ukusa kombuha napitka. Prisutne organske kiseline su pretežno rezultat metaboličke aktivnosti sirćetnih bakterija, uz manju količinu koju sintetišu kvasci i mlečno-kisele bakterije. Pored kiselog, organske kiseline doprinose i oštrom i gorkom ukusu kombuhe (Siebert, 1999; Tran i sar., 2020).

Najzastupljenija kiselina u kombuha napitku je sirćetna i njen sadržaj se kontinuirano povećava tokom trajanja bioprocesa, te se i sadržaj ukupnih kiselina, po pravilu, računa na nju. Dat je pregled određenih sadržaja sirćetne kiseline na različitim supstratima i za različito vreme trajanja bioprocesa (tabela 2.2). Iako vinska kiselina nije uobičajeno prisutna u kombuha napitku u značajnijoj meri, kada je proizvedena na efluentu vinarije njen sadržaj je uporediv sa sadržajem sirćetne kiseline (Vukmanović i sar., 2022). S druge strane, kombuha napici proizvedeni na lekovitom bilju imaju značajno manji sadržaj sirćetne kiseline u poređenju s tradicionalnim kombuha napitkom (Vitas i sar., 2020).

Tabela 2.2. Sadržaj sirćetne kiseline u različitim kombuha proizvodima

Supstrat	Vreme [dan]	Sadržaj [g/L]	Referenca
Crni čaj	2	2,3	Abuduaibifu i Tamer, 2019
	18	4,7	Jayabalan i sar., 2007
	14	0,5	Malbaša, Lončar, i Djurić, 2008
	30	11	Chen i Liu, 2000
Crni čaj s melasom	14	0,2–0,3	Malbaša, Lončar, i Djurić, 2008
Zeleni čaj	18	8,4	Jayabalan i sar., 2007
Crvene godži bobice	2	2,3	Abuduaibifu i Tamer, 2019
Crne godži bobice	2	2,2	Abuduaibifu i Tamer, 2019
Zijuan čaj (<i>C. sinensis</i> var. <i>assamica</i> cv. <i>Zijuan</i>)	14	2,3	Zou i sar., 2021
Morska trava (<i>Porphyra dentata</i>)	14	5,7	Aung i Eun, 2021
Dunja (<i>Cydonia oblonga</i>)	7	0,1	
Kopriva (<i>Urtica dioica</i>)	7	2	
Rtanjski čaj (<i>Satureja montana</i>)	7	0,4	
Nana (<i>Mentha piperita</i>)	7	1,6	Vitas i sar., 2020
Zova (<i>Sambucus nigra</i>)	7	4,8	
Majčina dušica (<i>Thymus serpyllum</i>)	7	0,5	

2.1.4.3. Vitamini u kombuha napitku

Efekti vitamina C su poznati daleko duže nego sam vitamin. Još je 1747. godine britanski pomorski fizičar Džejms Lind (engl. *James Lind*) pisao o značaju citrusnog voća u prevenciji skorbuta kod mornara, a nakon toga je 1917. godine, u studiji sa zamorčićima, zvanično potvrđen antiskorbutski faktor. Ranih 1930-ih je istraživačka grupa Sent-Đerđa (mađ. *Szent-*

Györgyi) utvrdila tačnu strukturu, za šta je kasnije nagrađena Nobelovom nagradom. Vitamin C je *in vivo* antioksidans čija hipovitaminoza izaziva umor, malaksalost, skorbut, depresiju, Sjergenov sindrom (švedski *Sjögren*) i niz drugih poremećaja. Preporučeni dnevni unos je, za starije od 19 godina 75 mg/dan za žene, odnosno 90 mg/dan za muškarce, s tim što se za pušače oba pola preporučuje dodatnih 35 mg dnevno. Tržište vitamina C je 2019. godine vredelo 976,4 miliona dolara, a očekuje se da poraste na čak 1,42 milijarde do kraja 2026, uz stopu rasta od 3,2% od 2021. do 2026. U nastavku je prikazan sadržaj vitamina C u kombuha napitku na različitim supstratima (tabela 2.3) (Eitenmiller i sar., 2008; <https://ods.od.nih.gov/factsheets/VitaminC-Consumer/>; <https://www.industryresearch.biz/global-vitamin-c-market-17317933>).

Tabela 2.3. Sadržaj vitamina C u različitim kombuha proizvodima

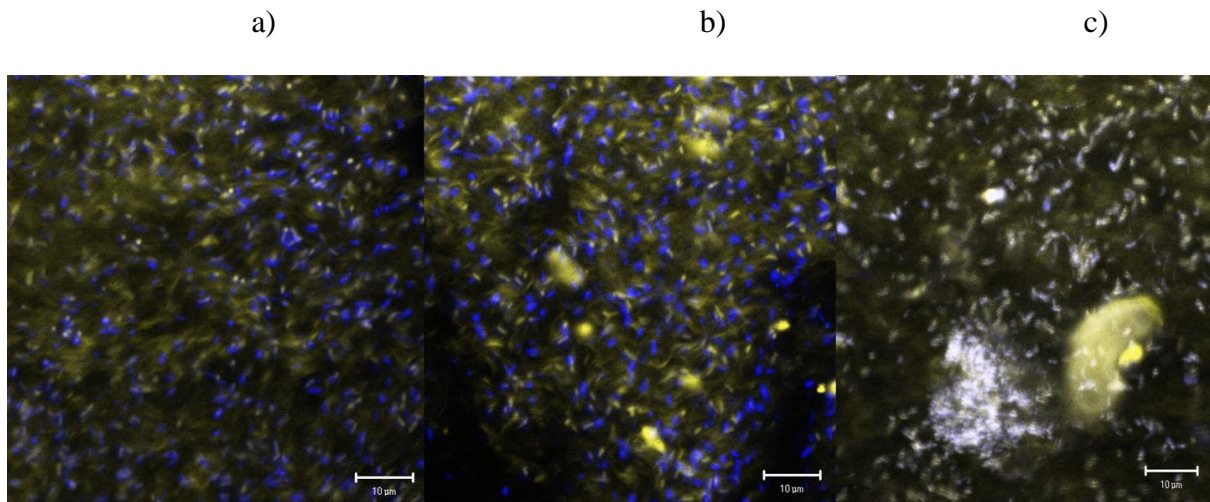
Supstrat	Vreme [dan]	Sadržaj [g/L]	Referenca
Crni čaj	6–15	1,51	Bauer-Petrovska i Petrushevska-Tozi, 2000
	10	0,1	Malbaša i sar., 2002
Crni čaj s topinamburom	10	0,6	
Hajdučka trava	7	10 ⁻³	Vitas i sar., 2018
5%-ni ekstrakt pulpe soka acerola višnje (<i>Malpighia emarginata</i>)	6	1,2	Leonarski i sar., 2021
1,5%-ni ekstrakt gravirole (<i>Annona muricata</i> L.)	14	33,1	Candra i sar., 2021
Sojino mleko	4	1,6 g/g _{sm}	Xia i sar., 2019

Osim vitamina C, u kombuhi proizvedenoj na podlozi od crnog čaja su još detektovani i vitamini B grupe, tiamin (B₁), čiji je sadržaj iznosio 0,74 g/L, piridoksin (B₆) 0,52 g/L i B₁₂ 0,84 g/L (Bauer-Petrovska i Petrushevska-Tozi, 2000). U kombuhi na podlozi od sojinog mleka je, nakon 3 dana, meren sadržaj vitamina B₁ od 31 µg/g_{sm}, dok je sadržaj riboflavina (B₂) iznosio 66 µg/g_{sm}, pri uslovima izvođenja bioprocesa na uobičajenih 28 °C, dok je na povišenoj temperaturi od 37 °C sadržaj vitamina B₁ i B₂ bio 52 i 146 µg/g_{sm}, redom (Xia i sar., 2019).

2.1.5. Celulozna navlaka

Na površini tečne faze kombuhe pojavljuje se, i vremenom zadebljava, sluzava prozirna opna. Pretežno se sastoji od celuloze koju proizvodi bakterija *Komagataeibacter xylinus*,

stene, na ponašanje celulozne navlake (slika 2.7). Pronađeno je da kombuha kultura izlužuje mikroelemente iz stena i akumulira ih u celuloznoj opni (Podolich i sar., 2017).



Slika 2.7. Konfokalni skenirajući laserski snimak pelikule od mikrobiološke celuloze na: a) tradicionalnoj podlozi; b) i c) s viškom anortozita u medijumu. Proteini su obojeni tiazinom (žuto), celuloza je bojena kalkofluorom (plavo). Skala je 10 µm (Podolich i sar., 2017)

2.1.6. Zdravstvena korist konzumacije kombuha napitka

Kombuhi se pripisuje široki dijapazon potencijalnih blagotvornih efekata na ljudsko zdravlje (slika 2.8) koji potiče od velikog broja različitih bioaktivnih molekula (Ghosh i Sil, 2015).

Lekovita svojstva kombuhe se istražuju već više od jednog veka. U nastavku je dat pregled najstarijih istraživanja (Allen, 2000; Malbaša, 2009):

- Batiskaja je 1914. objavila pozitivno delovanje kombuhe na digestivni trakt,
- Bazarevski je 1915. uočio da u Letoniji koriste kombuhu kao lek za glavobolju,
- Valdek je 1915. pisao o hemičaru koga je sreo tokom I svetskog rata koji mu je spremao „čudotvorni napitak“ protiv ozbiljne konstipacije,
- Indner je 1917/1918. objavio kako se kombuha može koristiti za lečenje hemoroida, kao i za regulaciju probave,
- Kobert je 1917/1918. tvrdio da se kombuha može koristiti za lečenje reumatizma i hemoroida,
- Heneberg je 1926. objavio kako se kombuha koristi u Rusiji protiv konstipacije, ali i kao lek za mnoge bolesti i
- Irion je 1944. objavio kako je kombuha odlično lekovito sredstvo protiv gihta, reumatizma, hipertenzije i lenjosti creva.



Slika 2.8. Zdravstvena korist konzumacije kombuha napitka (da Silva Júnior i sar., 2022)

Centar za onkološka istraživanja i Ruska akademija nauka su 1951. godine objavili rezultate opsežnog istraživanja incidence kancera u različitim gradovima i regionima Sovjetskog Saveza. Naročito su pažljivo istraživane navike stanovništva u oblastima niske incidence. U oblastima Solikamsk i Berezniki, severno od Perma, na zapadu Urala nije zabeležen gotovo nijedan slučaj kancera, iako je to bila rastuća industrijska zona gde su se obrađivali toksični metali poput kalijuma, olova i žive, kao i azbest, što je stvaralo vrlo zagađeno okruženje gde su ribe u reci Kami izumirale, a drveće se sušilo. Utvrdili su da svako domaćinstvo u regionu fermentiše kombuhu i svakodnevno je pije u velikim količinama, te su joj pripisali detoksikacijska i antikancerogena svojstva (Allen, 2000). Nakon nesreće u nuklearnoj elektrani u Černobilju, analiza oštećenja je ukazala da su ljudi koji su redovno konzumirali kombuhu bili otporniji na efekte nuklearnog zračenja (Dutta i Paul, 2019). Novije *in vitro* istraživanje je pokazalo antikancerogeno dejstvo protiv humanog kancera dojke (MCF-7) i debelog creva (HCT-116) (Villarreal-Soto i sar., 2019). Poređenje antikancerogenih aktivnosti kombuha napitaka pripremljenih na podlozi od crnog i zelenog čaja u trajanju od 12 dana prema A549 ćelijskoj liniji karcinoma pluća i Hep-2 ćelijama karcinoma kože je pokazalo značajno veću citotoksičnu aktivnost kod kombuhe na zelenom čaju (Deghrigue i sar., 2013).

Istraživanja sprovedena tokom 60-ih godina XX veka potvrdila su antikancerogeno delovanje kombuhe, što je pripisano stimulaciji proizvodnje interferona, koji deluju na viruse, parazite i kancerogene ćelije (Dufresne i Farnworth, 2000). Miševi koji su redovno hranjeni kombuhom pokazali su značajno poboljšanje zdravstvenog stanja i produženje životnog veka, u poređenju s kontrolnom grupom (Hartmann i sar., 2000).

Većina lekovitih svojstava kombuhe se pripisuje kiselosti napitka, dok su detoksikacijska svojstva pripisana glukuronskoj kiselini i njenoj sposobnosti da vezuje toksine i poveća njihovu ekskreciju iz organizma preko bubrega i creva. Simptomi gihta, reumatizma, artritisa i kamena u bubregu su, najverovatnije, uzrokovani nakupljanjem toksina u telu i mogu biti olakšani konzumiranjem kombuha napitka. Teški metali, takođe, mogu biti ekskretovani preko bubrega glukoronidacijom (Dufresne i Farnworth, 2000). Međutim, postoje naznake da je supstanca koja je u kombuhi detektovana kao glukuronska kiselina zapravo 2-keto-glukonska kiselina. U urinu redovnih konzumenata kombuhe pronađene su visoke koncentracije glukoronida. Jedno objašnjenje za ovo je da potiče od povećanog unosa glukuronske kiseline, a drugo je da je posledica snažnog inhibitora beta-glukuronidaze što može biti 1,4-lakton saharinske kiseline (Roussin, 1996).

Istraživanje inhibicije enzima 5-LOX je pokazalo porast kod fermentisanog kombuha napitka, u poređenju s čajem, nakon 21 dan kultivacije, čime se otvara put za razvoj alternativnog nesteroidnog antiinflamatornog leka (Villarreal-Soto i sar., 2019).

Vitamini B grupe koji su prisutni u kombuhi imaju široki spektar pozitivnih dejstava na organizam. Poznato je da jačaju nervni i imunološki sistem, poboljšavaju kognitivne funkcije, ublažavaju anksioznost i depresiju (Mahdaviifar i sar., 2021; Nguyen i Kim, 2022). Potencijalno pomažu da se ublaže simptomi dijabetske periferne neuropatije (Khalil i sar., 2021).

Mlečna kiselina se u kombuhi nalazi sporadično i u malim količinama, ali ona u značajnoj meri doprinosi terapeutskim efektima napitka. Nedostatak mlečne kiseline u vezivnom tkivu je uočen kod pacijenata obolelih od kancera i zato joj neki istraživači pripisuju značajan uticaj na antikancerogena svojstva kombuhe, kao potencijalni izvor nedostajuće mlečne kiseline (Roche, 1998). Mlečna kiselina se još od 1943. godine koristi za tretiranje suve kože, a sastojak je proizvoda za lečenje svraba i psorijaze (Baumann i Weisberg, 2017).

2.1.6.1. Antimikrobno dejstvo kombuhe

Organske kiseline pokazuju antimikrobno dejstvo, što se koristi za konzervisanje različitih prehrambenih proizvoda. U vodenim rastvorima slabe kiseline uspostavljaju dinamičku ravnotežu između nenaelektrisanog, nedisosovanog molekula kiseline i svog naelektrisanog, anjona, koja je određena konstantom kiselosti. Klasičnom teorijom o konzervisanju slabim kiselinama objašnjava se da nenaelektrisani molekuli prodiru u ćeliju difuzijom kroz ćelijsku membranu, dok su naelektrisani anjoni nerastvorni u lipidima. Kako je uklonjen disosovani oblik, a vrednost pH u ćelijskoj citoplazmi je oko 7, ravnoteža reakcije se pomera u smeru nastanka proizvoda disocijacije, što uzrokuje zakišeljavanje citoplazme, time inhibirajući ćelijski metabolizam (Steels i sar., 2002).

Ispitivanjem antimikrobne aktivnosti tradicionalne kombuhe, kao i proizvedene na podlozi od rtanjskog čaja (*Satureja montana* L.) fermentisane do titrabilne kiselosti od 3,5 do 4,5 g/L pokazalo se da oba kombuha napitka pokazuju aktivnost prema predstavnicima Gram negativnih bakterija *Salmonella enteritidis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* i *Proteus mirabilis*, kao i prema predstavnicima Gram pozitivnih bakterija *Staphylococcus aureus* i *Bacillus cereus*, dok je prema plesnima *Aspergillus flavus* i *Penicillium aurantiogriseum* uočena minimalna antimikrobna aktivnost (Četojević-Simin i sar., 2008).

Antimikrobna aktivnost kombuha napitka pripremljenog fermentacijom vodenih ekstrakata timijana (*Thymus vulgaris* L.), citrinovca (*Lippia citriodora*), ruzmarina (*Rosmarinus officinalis*), komorača (*Foeniculum vulgare*) i nane (*Mentha piperita*) testirana je prema patogenim bakterijama i kvascima roda *Candida*. Napici dobijeni na *L. citriodora* i na *F. vulgare* su pokazali antimikrobno dejstvo i prema vrstama iz roda *Candida*: *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. sake*, *C. dubliniensis* i *C. albicans*, kao i prema nizu patogenih bakterija. Neutralizacijom kombuhe, dodavanjem natrijum-hidroksida do pH 7, antimikrobno dejstvo smanjeno je značajno (Battikh i sar., 2012). Drugo istraživanje nije utvrdilo antimikrobnu aktivnost kombuhe na kvasac *Candida albicans*, dok je antimikrobna aktivnost prema *Agrobacterium tumefaciens*, *B. cereus*, *S. aureus*, *E. coli* i *Salmonella Typhimurium* bila prisutna. Takođe, primećeno je da se inhibitorski efekat kombuhe povećava s porastom koncentracije čaja u podlozi, dok kod samog čaja, u koncentraciji za piće, nikakva antimikrobna aktivnost nije uočena. Kombuha napici pripremljeni na crnom i zelenom čaju nisu pokazali razlike u inhibiciji mikroorganizama (Greenwalt i sar., 1998).

Fermentativna tečnost kombuhe na zelenom čaju, posle 7 i 14 dana fermentacije pokazala je antimikrobno dejstvo prema bakterijama roda *Alicyclobacillus*, čestim uzrocima kvarenja namirnica koje sadrže citrusne. Minimalna inhibitorska koncentracija bila je 0,195%, a najizraženija aktivnost bila je prema bakteriji *A. herbarius* (Mizuta i sar., 2020).

Kombuha napitak zagrejan do 80 °C pokazao je antimikrobnu aktivnost prema *Campylobacter jejuni*, *Shigella sonnei*, *Escherichia coli*, *Salmonella Typhimurium* i *Salmonella Enteridis*, što je sugerisalo da su u fermentisanoj kombuhi prisutne i druge antimikrobne komponente, osim sirćetne kiseline i velikih molekula proteina koji bi na toj temperaturi isparili, odnosno denaturisali se (Sreeramulu i sar., 2000).

Jedan od potencijalnih nosilaca antimikrobne aktivnosti kombuhe može biti i usninska kiselina, poznati antivirusni, antiprotozoalni i antibakterijski agens najzastupljeniji u lišajevima. Osim toga, kombuha napitak pokazuje i antiproliferativnu i antiinflamatornu aktivnost (Ingólfssdóttir, 2002; Teoh i sar., 2004).

2.1.6.2. Antioksidativna aktivnost kombuhe

Slobodni radikali su atomi, molekuli i joni koji sadrže nesparene elektrone, dok je antioksidant molekul koji štiti ćeliju od oksidativnog oštećenja. Nastanak slobodnih radikala počinje fazom inicijacije, nakon čega slobodni radikal reaguje lančano sa drugim, slabije reaktivnim, molekulskim vrstama u fazi propagacije, dok je faza terminacije završetak reakcije. Ljudski organizam ima balansiran sistem slobodnih radikala i antioksidanata što omogućava pojedinim slobodnim radikalima da obavljaju značajne biološke funkcije, dok se oksidativni stres održava minimalnim. Kod aerobnih organizama slobodni radikali mogu nastati slučajno, samooksidacijom nestabilnih biomolekula poput dopamina i ciljano, aktiviranim neutrofilima ili azot-oksidsintazom (Halliwell, 2011, 2012).

Najznačajniji izvor slobodnih radikala u ljudskom telu je imuni sistem koji ih koristi za neutralizaciju pojedinih infektivnih agenasa. Imuni sistem je sposoban da generiše slobodne radikale brzo i u velikoj količini, sprečavajući na taj način prekomerni imuni odgovor (posebno T-limfocita) i produžavajući inflamaciju kada je pretnja uklonjena iz organizma. Hronične

upale su veoma značajni činioci bolesti koje se javljaju u starosti, u čijoj patologiji slobodni radikali imaju značajnu ulogu, pri čemu se naročito izdvajaju kancer i neurodegenerativni poremećaji (Chakravorty i sar., 2019; Halliwell, 2011). Glavni mehanizmi antikancerogenog i antiproliferativnog delovanja kombuha napitka pripisuju se polifenolima i njihovoj sposobnosti „hvatanja“ slobodnih radikala (Đuračková, 2010).

Smatra se da antioksidativna sposobnost tradicionalnog kombuha napitka potiče iz dva izvora. Prvi su flavonoidni antioksidanti iz crnog i zelenog čaja, među kojima su dominantni teaflavin i tearubigin u crnom i katehini u zelenom. Drugi izvor su produkti metabolizma kombuha kulture koji ispoljavaju antioksidativna svojstva, samostalno ili u simbiozi s drugim jedinjenjima. Kao najvažniji metaboliti nosioci antioksidativne aktivnosti izdvajaju se vitamini B₂, B₆, C, purini, pirimidini i neke organske kiseline (Vitas, 2013). U kombuha napicima na crnom i zelenom čaju identifikovano je 127 fenolnih jedinjenja, od čega flavonoidima pripada 70,2%, fenolnim kiselinama 18,3%, drugim polifenolima 8,4%, lignanima 2,3% i stilbenima 0,8%. Među 10 najzastupljenijih jedinjenja šest je pronađeno u kombuha napitku na crnom i na zelenom čaju, iako je redosled zastupljenosti jedinjenja bio različit: galokatehin 3-O-galat/epigalokatehin 3-O-galat, galokatehin izomer 2/epigalokatehin, katehin, 5-O-galoilhinska kiselina, kvercetin 3-O-glikozilramnozil-galaktozim izomer 2 (Cardoso i sar., 2020). Antioksidativna aktivnost flavonoida, kao glavnih fenolnih jedinjenja, dobro je potvrđena u *in vitro* eksperimentima, dok njihova *in vivo* funkcija još treba biti razjašnjena. Dokazano je da deluju kao antioksidanti tako što „hvataju“ reaktivne kiseonikove i azotove vrste (engl. *reactive oxygen species, ROS*; *reactive nitrogen species, RNS*), a u nekim oblicima heliraju jone prelaznih metala (Rice-Evans, 2012). ROS nastaju tokom oksidativnog mitohondrijskog metabolizma, kao i u sklopu ćelijskog odgovora na ksenobiotike, citokine i bakterijske napade, a u njih spadaju hidroksi radikal ($\cdot\text{OH}$), superoksid anjon radikal ($\text{O}_2^{\cdot-}$) i vodonik-peroksid (H_2O_2). RNS obuhvata različita jedinjenja izvedena iz oksida azota: nitroksil anjon (NO^-), nitrozonijum katjon (NO^+), viši oksidi azota, S-nitrozotoli (ONSR) i dinitrozil kompleksi s gvožđem ($[\text{Fe}(\text{NO})_2(\text{SR})_2]^-$) (Martínez i Andriantsitohaina, 2009; Ray i sar., 2012).

Kombuha proizvedena na tradicionalnoj podlozi pokazuje snažnu antioksidativnu aktivnost koja zavisi od korišćene vrste čaja, kao i od dužine trajanja fermentacije, pri čemu je utvrđeno da najveću aktivnost prema DPPH radikalima ima kombuha pripremljena na podlozi od zelenog čaja, dok je, kada je korišćena FRAP metoda, najveću antioksidativnu aktivnost pokazala kombuha na podlozi od crnog čaja (Hsieh i sar., 2021). Druga studija daje više vrednosti i za antioksidativnu aktivnost na DPPH radikal i za FRAP metodu za kombuhu pripremljenu na zelenom čaju, nego na crnom čaju (Jakubczyk i sar., 2020). Merenje antioksidativne aktivnosti prema ABTS⁺ radikalima (2,2'-azinobis-3-etil-benzotiazolin-6-sulfonska kiselina) tradicionalnih kombuha napitaka pokazalo je da je antioksidativna aktivnost kombuha napitka na crnom čaju gotovo dvostruko veća nego na zelenom čaju što se objašnjava višim sadržajem ukupnih fenola i većim brojem različitih fenolnih jedinjenja u kombuha napitku na crnom čaju (Cardoso i sar., 2020).

Poređenjem antioksidativne aktivnosti na DPPH radikal, kombuha napitka na soku od jabuke, nara i ananasa tokom osam dana kultivacije nije uočena gotovo nikakva razlika, kako među uzorcima, tako ni kroz vreme (Osiripun i Apisittiwong, 2021). Ispitivanjem uticaja

vremena čuvanja, tokom 11 dana, na antioksidativnu aktivnost na DPPH radikal kombuha napitka proizvedenog na crnom, zelenom, belom i žutom čaju utvrđeno je da napici proizvedeni na belom, crnom i zelenom čaju pokazuju pad antioksidativne aktivnosti prva četiri dana skladištenja, nakon čega se vrednost ustaljuje, dok kombuha napitak na belom čaju pokazuje pad antioksidativne aktivnosti prema DPPH radikalu u prva četiri dana skladištenja, nakon čega vrednost počinje da raste i nakon 11 dana skladištenja je veća nego na završetku fermentacije (Gramza-Michalowska i sar., 2016).

2.1.6.3. Toksičnost kombuha napitka

Iako se kod proizvoda alternativne medicine često dovode u pitanje ne samo njihova lekovitost, već i potencijalna škodljivost, kombuha je, zbog svog sastava, vrlo otporna na kontaminaciju, naročito u uznapređenoj fazi kultivacije, iako se ona, u domaćinstvu, nikada ne priprema u aseptičnim uslovima. Odsustvo patogenih mikroorganizama u kombuhi se pripisuje niskoj vrednosti pH, pre svega usled visoke koncentracije sirćetne kiseline, koja deluje konzervirajuće na fermentisani napitak, čineći sredinu nepovoljnom za sve organizme, osim za acidofilne. Ispunjavanjem minimalnih higijenskih uslova tokom kultivacije se mogućnost kontaminacije patogenim i toksigenim mikroorganizmima gotovo u potpunosti uklanja i omogućava se dobijanje proizvoda koji ispunjava sanitarne zahteve (Cvetković, 2008).

Opisan je slučaj para koji se otrovao olovom nakon konzumiranja kombuha napitka pripremljenog u keramičkoj posudi. Kako se olovo nalazi u značajnoj količini u glazuri keramike, a jako kisela sredina kombuhe pogoduje izluživanju teških metala, za šta se kombuha i može koristiti (Hopfe i sar., 2017), trovanje nije bilo neočekivano i posledica je nepridržavanja uputstava o pripremi napitka (Phan i sar., 1998).

Metabolička acidoza je opisana kod dve pacijentkinje u aprilu 1995. godine u ruralnoj Ajovi u SAD-u, koje su pile kombuhu svakodnevno dva meseca, od kojih je jedna preminula. Obe pacijentkinje su pile kombuhu koja potiče od iste kulture, međutim još 115 osoba je pripremalo kombuha napitak koristeći kulturu istog porekla, bez ikakvih zdravstvenih poteškoća. Američka Agencija za hranu i lekove (engl. *Food and Drug Administration, FDA*) je testirala ovu kombuha kulturu i utvrdila njen mikrobiološki sastav, pri čemu nije pronađen nijedan patogeni mikroorganizam. Analize su pokazale da je nivo etanola bio od 0,7 do 1,3%, a metanol nije detektovan. Druga pacijentkinja je kombuhu fermentisala 14 dana, što, obično, daje preki-seli napitak (Currier i sar., 1995).

U kombuha napitku pripremljenom u krajnje nehigijenskim uslovima, odnosno u stočnom dvorištu, utvrđeno je prisustvo bakterije *Bacillus anthrax*, što se, takođe, ne može smatrati dokazom o opasnosti konzumiranja kombuhe koja je pripremljena u skladu s dobrom proizvođačkom praksom (Sadjadi, 1998).

Gastrointestinalne tegobe su prijavljene kod četiri pacijenta koji su pili kombuhu pripremljenu u kućnim uslovima, ali nije utvrđena jasna veza između kombuhe i tegoba (Srinivasan i sar., 1997).

Sve ove studije opisuju samo izolovane slučajeve koji obuhvataju veoma mali broj osoba. Ni u jednom od njih nema jasnih dokaza da je kombuha uzrok trovanja, odnosno smrti, a u više njih je jasno da nisu poštovana osnovna higijenska pravila (Sai Ram i sar., 2000).

Trudnoća je kontraindikacija za konzumiranje kombuha napitka zbog mogućeg prisustva heparina u čaju, koji inhibira pravilnu koagulaciju krvi i razređuje je, što može biti opasno u trećem trimestru trudnoće. Iako autori nisu dokazali heparin ni u jednom uzorku, smatraju da konzumacija kombuhe može podstaći njegovu sintezu u organizmu (Leal i sar., 2018).

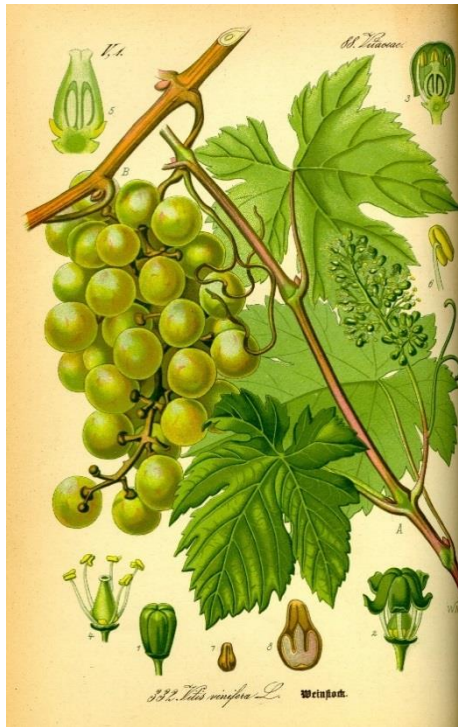
2.2. Grožđe i vino

2.2.1. Vinova loza

Vinova loza pripada porodici Vitaceae, koja uključuje više rodova. Tu spadaju *Ampelopsis* i *Parthenocissus*, koje obuhvataju divlje loze i rod *Vitis*, u koji spadaju svi varijeteti stonog i vinskog grožđa. Rod *Vitis* obuhvata oko 40 vrsta, od kojih je najznačajnija *Vitis vinifera* L. (slika 2.9), ili evropske vrste, koje se koriste za proizvodnju visokokvalitetnih vina i američke vrste *Vitis rupestris*, *riparia*, *berlandieri*, *labrusca* itd, koje se koriste kao koren ili kao direktni hibridi za proizvodnju. Unutar svake vrste postoje varijeteti koji zadržavaju svoje osobine isključivo vegetativnim razmnožavanjem, te stoga mogu biti smatrani klonovima. Poznato je 6800 varijeteta vrste *V. vinifera*, mada se manje od 100 koristi za proizvodnju najprepoznatljivijih vina (Moreno i Peinado, 2012a).

Grožđe se, prema koncentraciji monoterpena, deli na četiri grupe (Moreno i Peinado, 2012d):

- varijeti intenzivne arome, kao što je Muskat, imaju ukupni sadržaj slobodnih i vezanih terpena između 4 i 6 mg/L. U ovu kategoriju spadaju Muskat, Aleksandrija, Muskat blan a peti gran (fr. *Muscat Blanc à Petits Grains*),
- visokoaromatični nemuskatni varijeteti imaju ukupni sadržaj monoterpena između 1 i 4 mg/L. Ova kategorija obuhvata Rizling, Silvaner, Mirisni traminac (nem. *Gewürztraminer*),
- aromatični varijeteti imaju sadržaj terpena manji od 1 mg/L, a obuhvataju Kaberne sovinjon, Šardone, Merlo i Verdeho (šp. *Verdejo*) i
- neutralni varijeteti imaju sadržaj monoterpena značajno ispod 1 mg/mL i njihove mirisne note ne zavise od sadržaja monoterpena. U ovu grupu spadaju Airen (šp. *Airén*), Palomino, Garnaca (šp. *Garnacha*) i Pedro Simenez (šp. *Pedro Ximénez*).



Slika 2.9. Vinova loza (*Vitis vinifera* L.)

(https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/2/24/Illustration_Vitis_vinifera0.jpg)

Vrednost pH mesa bobice je od 3 do 4,5 i sadrži od 14 do 26% šećera. Većina šećera se kroz biljku transportuje, od organa u kojima se vrši fotosinteza do ostalih, u formi saharoze. Pre šarka¹ udeo šećera nikada ne prelazi 20 g/kg svežeg grožđa, dok neposredno uoči šarka naglo raste sadržaj šećera u bobici. Osim dominantne glukoze i fruktoze, u grožđu se nalaze i male količine arabinoze, ksiloze i galaktoze nefermentabilnih šećera. Osim njih, u grožđu oksidacijom C6 hidroksilne grupe aldoza nastaju D-glukuronska i D-galakturonska kiselina, koje se u vinima obično nalaze u koncentraciji od 0 do 60 mg/L i od 40 do 400 mg/L, redom. Vino napravljeno od grožđa zaraženog plesni *Bortytis cinera* ima značajno veće koncentracije ovih kiselina, do nekoliko grama po litru (Moreno i Peinado, 2012a, 2012e).

2.2.1.1. Rizling

Rizling (slika 2.10) je, bez sumnje, najcenjenija nemačka sorta grožđa. Smatra se da je u pitanju drevna sorta (prvo pominjanje 1435. godine) koja ima Traminac u svojoj lozi i daje sveža aromatična vina koja mogu ići od suvih do slatkih, u zavisnosti od zrelosti grožđa u trenutku berbe. Vina dobijena od varijeteta Rizling imaju kompleksnu i prepoznatljivu aromu, koja obično podseća na ruže i borove. Van Nemačke, najveće površine pod Rizlingom su u Kaliforniji i Australiji (Jackson, 2014c, 2016; Schüttler i sar., 2014).

Tačna aroma Rizlinga varira u zavisnosti od geografskog porekla grožđa, ali osnovna nota se nikada ne menja i čine je linalol, citronelol i geraniol. Osim njih, Rizling sadrži i karotenoide koji su nearomatični C₄₀ terpeni (tetraterpeni), dok trimetildihidronaftalen daje note koje podsećaju na benzin ili borovinu koje se javljaju u odležalom Rizlingu, a aktinidol i

¹ Šarak – faza dozrevanja grožđa u kojoj bobice menjaju boju, belo grožđe dobija žute pigmente, a crveno crno modre

vitispiran doprinose notama kamfora i eukaliptusa. Osim njih, u vinu proizvedenom od sorte Rizling se još pronalaze i pirazini i ketoni, dok je sadržaj flavonoida nizak, iako glikozid naringin može dati gorak ukus (Jackson, 2014e, 2014g; Moreno i Peinado, 2012d). Ceđenjem kljuka², sadržaj terpena u širi³ može biti dva do pet puta veći nego u samotoku⁴ (Marais i van Wyk, 1986). Korišćenjem soka od ovako složenog prirodnog supstrata nužno se mora dobiti i kombuha napitak specifičnog ukusa, značajno kompleksnijeg nego kada se proizvodi na tradicionalnoj podlozi.



Slika 2.10. Grožđe sorte Rizling

(https://www.thewinesociety.com/4a6cce/globalassets/discovery/thumbs/riesling_735x790.jp)

2.2.2. Vino

Vinogradarsko geografsko proizvodno područje u kojem su uslovi za uzgajanje vinove loze povoljni obuhvata čitavu teritoriju Srbije i deli se na tri regiona: vinogradarski region Centralna Srbija, vinogradarski region Vojvodina i vinogradarski region Kosovo i Metohija, koji se dalje dele na 22 rejonu sa 77 vinogorja i više vinogradarskih oaza. Vinogradarski region Vojvodina se sastoji od sedam rejonu od kojih je najznačajniji Sremski, sa samo jednim vinogorjem, Fruškogorskim, odakle i potiče efluent korišćen za potrebe ove doktorske disertacije. Ovo je jedan od vodećih rejonu u Srbiji, sa više od 50 registrovanih vinarija (Rončević, 2016).

Proizvodnja vina u bivšim jugoslovenskim republikama je 2003. godine iznosila 3,5 miliona hL, dok je u vreme SFRJ proizvodnja dostizala 5 miliona hL. U Srbiji je iste godine

² Kljuk – smeša šire i delova bobice grožđa koja nastaje muljanjem

³ Šira – sok koji se oslobađa iz bobice grožđa

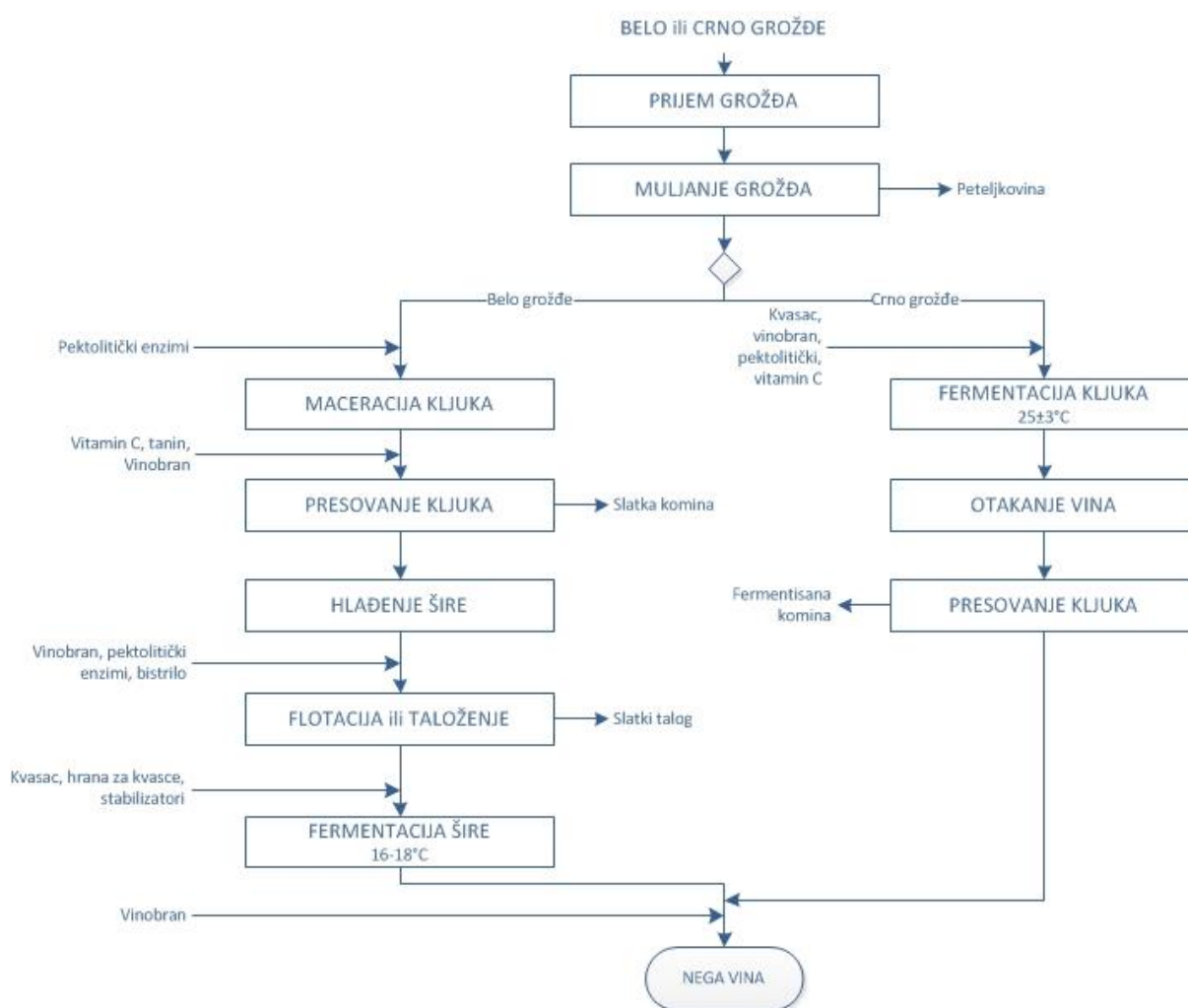
⁴ Samotok – prva frakcija šire koja se dobija, bez primene mehaničke sile

godišnja proizvodnja vina bila 1,7 miliona hL (Jackson, 2014b), što otvara prostor za veliku količinu potencijalne sirovine za proizvodnju kombuhe.

Grožđe inficirano plesni *Botrytis cinerea* sadrži naročito veliki broj sirćetnih bakterija, koje rastu na širi i izazivaju nakupljanje glukonske i sirćetne kiseline. Ovo može dovesti do nepotpune alkoholne fermentacije vina, usled interakcije između AAB i kvasaca (González i sar., 2005).

2.2.3. Otpadni tok vinarije

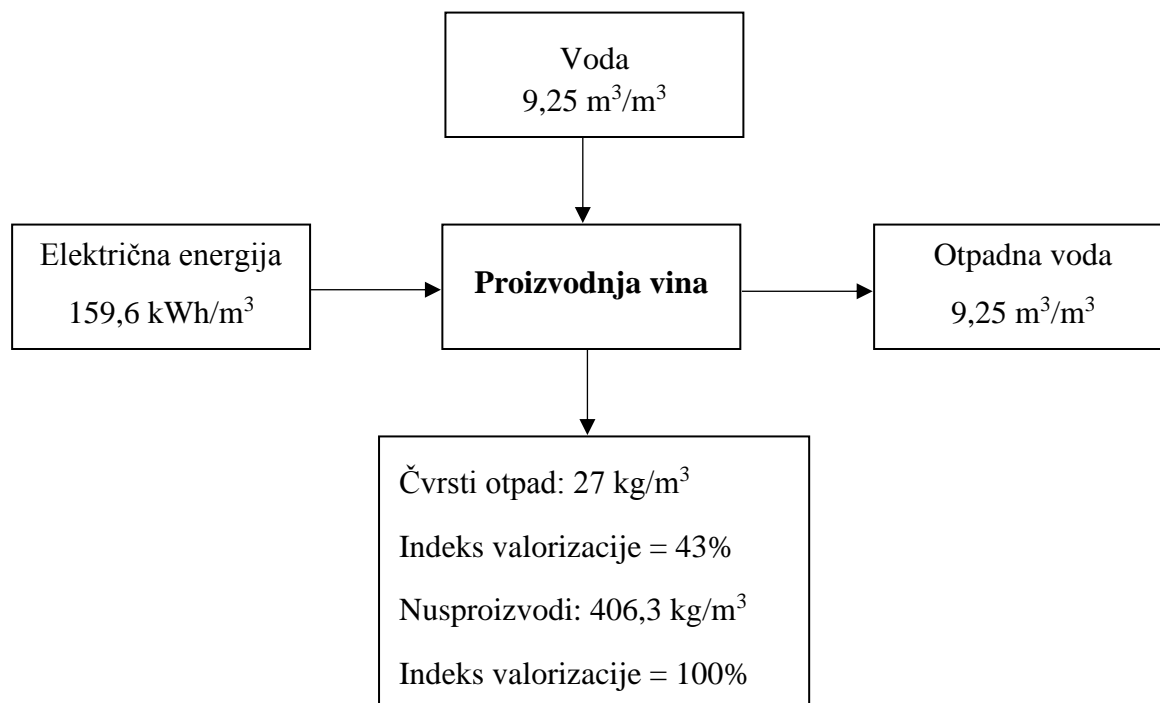
Otpadni tok korišćen u istraživanjima obuhvaćenim ovom doktorskom disertacijom je iz faze bistenja šire od grožđa varijeteta Rajnski Rizling, koje je rađeno flotacijom (slika 2.11) pri čemu je pomoćni agens bio želatin.



Slika 2.11. Shema proizvodnje belog vina (<https://www.tehnologijahrane.com/wp-content/uploads/2013/06/Šema-Razlike-belo-i-crno.jpg>)

Proizvodnja vina je značajna grana prehrambene industrije koja stvara veliku dodatnu vrednost. Iako vinarstvo ne spada u industrije koje se smatraju velikim zagađivačima, tokom prerade grožđa javljaju se značajne količine otpada poreklom od gubitaka i pranja opreme, koji nosi veliko organsko i neorgansko opterećenje. Slika 2.12 prikazuje maseni i energetski bilans proizvodnje vina. Kako je ispuštanje neprečišćenih efluenata u okolinu ekološki neprihvatljivo

i uskoro će postati zakonski nedozvoljeno, potrebno je imati pripremljenu strategiju za zbrinjavanje otpada. U zemljama gde se odlaganje otpadnih tokova naplaćuje, ono predstavlja značajno finansijsko opterećenje za vinarije (Mosse i sar., 2011; Oliveira i Duarte, 2016).



Slika 2.12. Maseni i energetska bilans proizvodnje vina (Brito i sar., 2007)

Otpadni tok vinarije se sastoji od vina, šire, suspendovanih materija i sredstava za pranje. Studije su pokazale izuzetno visok sadržaj organskih materija u efluentima koje ispuštaju vinarije, pre svega šećera, zatim i organskih kiselina, estara i polifenolnih jedinjenja. Procenjeno je da velike vinarije u Južnoafričkoj Republici (kapaciteta 5–10 miliona litara) imaju gubitke kroz otpadnu vodu u visini od 2,4 do 3,4 miliona dolara. Količina otpada veoma varira od zemlje do zemlje, tako da španske vinarije generišu šest puta više efluenta u odnosu na francuske i italijanske (Malandra i sar., 2003; Mosse i sar., 2011).

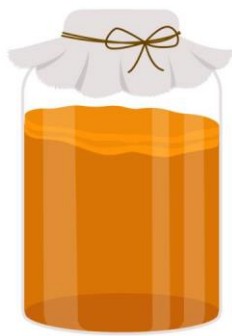
Prema poreklu generisanja, otpadne vode vinarija se dele na sledeće frakcije (Brito i sar., 2007):

- otpadne vode nastale u pripremnoj fazi (pranje i dezinfekcija opreme i posuđa),
- otpadne vode nastale u fazi prijema grožđa (pranje muljače, prese, pokretnih traka, crpki, prihvatnih sudova itd.),
- otpadne vode nastale tokom vinifikacije (ispiranje sudova za fermentaciju i bistrenje šire, pranje podova, sa ili bez sredstava za čišćenje),
- otpadne vode nastale tokom pretakanja vina (ispiranje sudova nakon pretakanja, pranje crpki i creva, pranje podova sa ili bez sredstava za čišćenje) i
- otpadne vode nastale tokom filtriranja vina (ispiranje kiselgura i drugog filtracionog medijuma).

U Srbiji sastav otpadne vode propisuje Uredba o graničnim vrednostima emisije zagađujućih materija u vode i rokovima za njihovo dostizanje „Sl. glasnik RS“ br. 1/2016 (tabela 2.4) koja definiše vrednosti značajnih parametara otpadne vode iz postrojenja za proizvodnju alkohola i alkoholnih pića na mestu ispuštanja u površinske vode ili javnu komunalnu kanalizaciju.

Tabela 2.4. Granične vrednosti emisije na mestu ispuštanja u površinske vode (Uredba o graničnim vrednostima emisije zagađujućih materija u vode i rokovima za njihovo dostizanje “Sl. glasnik RS” 1/2016, 2016)

Parametar	Granična vrednost emisije
Temperatura	30 °C
pH	6,5–9
Suspendovane materije	35 mg/L
Biohemijska potrošnja kiseonika (BPK ₅)	25 mgO ₂ /L
Hemijska potrošnja kiseonika (HPK)	110 mgO ₂ /L
Amonijak (kao NH ₄ -N)	10 mg/L
Ukupni fosfor	2 mg/L
Ukupni organski azot (NH ₄ -N, NO ₃ -N, NO ₂ -N)	18 mg/L



Materijal i metode

3. Materijal i metode

3.1. Sirovina za proizvodnju

Sirovina za proizvodnju za istraživanja obuhvaćena ovom doktorskom disertacijom prikupljena je iz vinarije „Šijački“ u Banoštoru, Fruškogorsko vinogorje. Za istraživanja prikazana u potpoglavlju 4.1 efluent je prikupljen u septembru 2016. godine, a za sva ostala istraživanja u septembru 2018. godine. Grožđe je pripadalo sorti Rajnski rizling. Nakon berbe i muljanja šira je bistrena postupkom flotacije korišćenjem želatina. Po odvajanju izbistrene šire, tečni otpadni tok koji sadrži čvrste komponente, komadiće ljuske, peteljke i semenke grožđa, sakupljen je u odgovarajuću ambalažu.

Efluent je odmah profiltriran na laboratorijskoj komornoj filter presi i, do dalje obrade, čuvan na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Nakon odmrzavanja, otpadni tok je profiltriran na nuč levku kroz laboratorijski filter-papir. Zatim, sterilisan je u autoklavu ($121\text{ }^{\circ}\text{C}$, 20 min) i razblažen na odgovarajući sadržaj ukupnih redukujućih šećera prokuvanom česmenskom vodom.

3.2. Inokulum i uslovi kultivacije

3.2.1. Priprema inokuluma

Korišćena kombuha kultura uzgajana je na saharozom zaslađenom dekoktu crnog čaja. U cilju pripreme za proizvodnju, najpre je izvedena adaptacija kulture uslovima gajenja na alternativnom supstratu. Kombuha napitak dva puta je proizveden primenom medijuma na bazi otpadnog toka vinarije (za ispitivanja opisana u potpoglavlju 4.1 prilagođavanje je rađeno samo jednom), čiji je sadržaj ukupnih redukujućih šećera podešen na 70 g/L razblaživanjem prokuvanom česmenskom vodom, da bi se uklonio sav hlor. Pripremne kultivacije izvođene su na $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ u trajanju od 7 dana, za fermentacije opisane u potpoglavlju 4.1 i 6 dana za ostale fermentacije, što je odabrano na osnovu početnog ispitivanja. Nakon toga, ovako dobijeni napitak korišćen je kao inokulum za nove kultivacije.

Ovako pripremljeni inokulum korišćen je za inokulaciju podloge, pripremljene na način opisan u potpoglavlju 3.1, i 400 mL sveže inokulisane podloge razliveno je u sterilne staklene laboratorijske čaše zapremine 600 mL , pokriveno sterilnom gazom i kultivisano u inkubatoru na odgovarajućoj temperaturi.

3.2.2. Početno ispitivanje mogućnosti korišćenja novog supstrata

Mogućnost primene otpadnog toka vinarije kao jedinog supstrata za proizvodnju kombuha napitka ispitivana je na $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ u trajanju od 10 dana, uz svakodnevno uzorkovanje. Nakon sterilizacije u autoklavu na $121\text{ }^{\circ}\text{C}$, pri pritisku $2,1\text{ bar}$, u trajanju od 20 min, otpadni tok je razblažen prokuvanom česmenskom vodom, do finalne koncentracije koja odgovara 70 g/L ukupnih redukujućih šećera. Zatim je dodato 10% (v/v) inokuluma kombuha napitka, homogenizovano je i 300 mL kultivacionog medijuma razliveno je u sterilne staklene laboratorijske čaše od 600 mL , pokriveno sterilnom pamučnom gazom i inkubirano bez mešanja i prinudne

aeracije. Svaki dan je, za analizu, uzimana po jedna čaša, da bi se u ostalima neometano formirala celulozna navlaka, odnosno da bi se obezbedio nesmetan fermentacioni proces. Uzorci su, do analiziranja, čuvani na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. U ovoj fazi ispitivanja, rađene su analize opisane u potpoglavljima 3.3, 3.4.1, 3.4.2, 3.5.2, 3.5.3, 3.9. i 3.10.1.

3.2.3. Optimizacija uslova proizvodnje

Za modelovanje i optimizaciju uslova proizvodnje kombuha napitka na otpadnom toku od proizvodnje vina korišćen je pun faktorijalni eksperimentalni dizajn sa tri parametra na tri nivoa, 3^3 . Varirani su temperatura proizvodnje, početni sadržaj ukupnih redukujućih šećera i vreme trajanja kultivacije prema prikazanom planu ogleda (tabela 3.1).

Tabela 3.1 Plan eksperimenata s kodiranim vrednostima

<i>Kôd</i>	-1	0	+1
<i>Početni sadržaj ukupnih šećera [g/L]</i>	30	50	70
<i>Temperatura kultivacije [$^{\circ}\text{C}$]</i>	20	25	30
<i>Trajanje kultivacije [dan]</i>	3	6	9

Na osnovu senzorne ocene, treći dan je određen kao trajanje fermentacije nakon koga je kombuha napitak pogodan za konzumaciju. Takođe, modelovanje opisano u potpoglavljju 3.10.2 rađeno je samo za uzorke prikupljene nakon tri dana fermentacije, jer se smatra da su oni bitni za proizvodnju kombuha napitka na industrijskom nivou.

Sve kultivacije su izvođene u tri ponavljanja.

3.3. Analize za praćenje toka kultivacije

Analizirani su kombuha proizvodi nakon tri, šest i devet dana fermentacije na 20, 25 i $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ sa 30, 50 i 70 g/L početnog sadržaja šećera, kao i incijalni supstrat, neinokulisane podloge i sveže inokulisane (nulti dan fermentacije).

3.3.1. Određivanje vrednosti pH

Vrednost pH merena je pH-metrom (ADWA AD 1000 pH/mV i Temperature Meter).

3.3.2. Određivanje ukupne kiselosti

Ukupna kiselost (UK) merena je po metodi koju su opisali Malbaša, Lončar, Djurić, i sar., 2008. Uzorak je titrisan standardnim rastvorom natrijum-hidroksida koncentracije 0,1 mol/L uz indikator fenolftalein. Rezultati su izraženi u gramima sirćetne kiseline po litri uzorka.

3.3.3. Određivanje prinosa biomase

Biomasa je merena na tehničkoj vagi. Celulozna navlaka je prenetna iz fermentacione posude na Petri posudu. Višak tečnosti je pokupljen papirnim ubrusom (<https://research.qut.edu.au/textiler/research/growing-vegan-leather/>; Malbaša, Lončar, Djurić, i sar., 2008). Rezultati su izraženima u gramima.

3.4. HPLC analize

Za analize tečnom hromatografijom pod visokim pritiskom (engl. *High Pressure Liquid Chromatography, HPLC*) korišćena je hromatografija na obrnutim fazama na uređaju Agilent 1100 serije (Agilent Technologies, Santa Klara, SAD). Sistem je sastavljen od degazera, binarne pumpe, ZORBAX® SB-C18 kolone (4,6 x 150 mm, veličina čestica 5 µm) i detektora umreženih dioda (engl. *Diode-Array Detector, UV-DAD*). Pre injektovanja, uzorci su filtrirani kroz membranski filter od regenerisane celuloze prečnika pora 0,45 µm i 20 µL uzorka injektovano je direktno u HPLC sistem. Pre analize, mobilna faza je profiltrirana kroz filter od regenerisane celuloze prečnika pora 0,45 µm. Za izračunavanje je korišćena eksterna kalibracija, a sve analize su rađene u tri ponavljanja.

3.4.1. Određivanje sadržaja organskih kiselina

Određivane su sirćetna, vinska, oksalna, mravlja, mlečna, malonska, jabučna, limunska i ćilibarna kiselina (Vitas i sar., 2018). Hromatografija je izvođena u izokratskom režimu. Kao mobilna faza korišćen je rastvor fosforne kiseline u bidestilovanoj vodi, koncentracije 6 mmol/L, čija je vrednost pH podešena na 2,1 pri protoku od 1,0 mL/min, na temperaturi od 28 °C uz talasnu dužinu detekcije 220 nm, a rezultati su iskazani u gramima odgovarajuće organske kiseline po litru uzorka.

3.4.2. Određivanje sadržaja vitamina C

Vitamin C je određen prema metodi koju su opisali Vitas i sar., 2013. Mobilna faza je bio rastvor amonijum-acetata u bidestilovanoj vodi koncentracije 0,1 mol/L, vrednosti pH podešene na 5,1, a hromatografija je izvođena u izokratskom režimu. Protok mobilne faze je bio 0,4 mL/min, talasna dužina detekcije 254 nm, a temperatura kolone 40 °C. Rezultati su iskazani u miligramima vitamina C po litru uzorka.

3.4.3. Određivanje sadržaja fenolnih kiselina

Mobilna faza se sastojala od dve komponente: A (2%-ni rastvor sirćetne kiseline u bidestilovanoj vodi) i B (smeša metanola i acetonitrila u odnosu 1:1 (v/v)). Pre analize, mobilna faza je profiltrirana kroz filter od regenerisane celuloze prečnika pora 0,45 µm. Hromatografija je izvođena u gradijentnom režimu (linearni gradijent od 0 do 25 min, od 95 do 70% A; od 25 do 35 min, od 70 do 60% A; od 35 do 40 min, od 60 do 52% A; od 40 do 50 min, od 52 do 30% A; od 50 do 55 min, od 30 do 0% A; od 65 do 70 min, od 0 do 95% A, radi vraćanja kolone na početne uslove), pri protoku od 0,5 mL/min, na temperaturi od 25 °C pri čemu je talasna dužina za detekciju bila 280 nm. Određivane su galna, *p*-hidroksibenzoeva, kafena, siringinska, *p*-kumarinska, ferulna i sinapinska kiselina koje su identifikovane poređenjem s retencionim

vremenima i UV-VIS spektrima standarda analiziranim pod istim uslovima (Bendini i sar., 2003). Sadržaj fenolnih kiselina iskazan je u miligramima po litri uzorka.

3.5. Spektrofotometrijske metode

3.5.1. Određivanje sadržaja ukupnih redukujućih šećera

Sadržaj ukupnih redukujućih šećera određen je metodom koju je opisao Miller, 1959. Slobodna aldehidna grupa redukujućih šećera oksiduje se 3,5-dinitrosalicilnom kiselinom (DNS) u karboksilnu, pri čemu se ona redukuje u 3-amino-5-nitrosalicilnu kiselinu. U kivetu je odmereno 0,5 mL uzorka u koji je dodato 0,75 mL reagensa i zagrevano začepljeno u ključalom vodenom kupatilu tačno 5 min. Nakon hlađenja uzorka na sobnu temperaturu dodato je 3,75 mL destilovane vode. Smeša je homogenizovana i merena je apsorbancija na 540 nm. Za pripremu slepe probe, umesto uzorka, korišćena je destilovana voda. DNS reagens je pripremljen od 7,45 g/L 3,5-dinitrosalicilne kiseline, 5,8 g/L natrijum-metabisulfit, 13 g/L natrijum-hidroksida, 214,9 g/L kalijum-natrijum-tartarata i 5,3 g/L sveže predestilisanog fenola (Dodić i Grahovac, 2013).

U mladom grožđu sadržaj glukoze je viši nego fruktoze, međutim, tokom berbe odnos glukoze i fruktoze opada tako da su u zreloom grožđu količine glukoze i fruktoze gotovo jednake. Kako oba šećera reaguju u istom molskom odnosu u DNS reakciji, kao model sistem za kalibraciju korišćena je serija rastvora glukoze (Jackson, 2014e, 2014d).

3.5.2. Određivanje sadržaja ukupnih fenola

Sadržaj ukupnih fenola određen je metodom po Folin-Čiokalteu (švedski Folin; rum. Ciocâlteu) (Singleton i Rossi, 1965), uz manje modifikacije. Pipetom je odmereno 0,5 mL uzorka, 0,5 mL Folin-Čiokalteu reagensa i 1,5 mL natrijum-karbonata (20% m/m), redom, u normalni sud zapremine 10 mL koji je, zatim, dopunjen destilovanom vodom do marke, dobro promućkan i inkubiran 120 min u mraku, na sobnoj temperaturi (25 °C). Apsorbancija je merena na 750 nm koristeći UV/VIS spektrofotometar (LLG-uniSPEC2 Spectrophotometer, Mekenhajm, Nemačka). Slepa proba je bila pripremljena na isti način, ali s destilovanom vodom umesto uzorka. Standard za kalibraciju je bila galna kiselina i rezultati su izraženi u ekvivalentima galne kiseline po litru uzorka (mg EGK/L).

3.5.3. Određivanje antioksidativne aktivnosti

3.5.3.1. Određivanje antioksidativne aktivnosti na DPPH radikal

Određivanje antioksidativne aktivnosti prema 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikal (engl. *2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl*, DPPH) rađeno je prema metodi koju su opisali Morales i Jiménez-Pérez, 2001, uz manje modifikacije. Korišćeni standardni rastvor je bio etanolni rastvor DPPH koncentracije 80 µmol/L. Reakciona smeša je pripremljena mešanjem 4,80 mL rastvora DPPH i 1,00 mL uzorka i inkubirana na sobnoj temperaturi 1 h. Apsorbancija je merena na 515 nm koristeći UV/VIS spektrofotometar (LLG-uniSPEC2 Spectrophotometer, Mekenhajm, Nemačka). Slepa proba je bila smeša 4,80 mL rastvora DPPH i 1,00 mL destilovane vode, a za podešavanje nule aparata korišćen je etanol. Antioksidativna aktivnost na DPPH radikal izražena je u procentima (AA_{DPPH}) (Jayabalan i sar., 2008; Tu i sar., 2019).

3.5.3.2. Određivanje antioksidativne aktivnosti na hidroksi radikal

Antioksidativna aktivnost na hidroksi radikal merena je prema metodi koju su opisali Deeseenthum i Pejovic, 2010, s manjim modifikacijama. Zapremina od 100 μL uzorka pomešana je s 450 μL natrijum-fosfatnog pufera (koncentracije 0,2 mol/L, vrednosti pH 7,00), 150 μL rastvora 2-dezoksiriboze koncentracije 10 mmol/L, 150 μL rastvora dihidrata dinatrijumove soli EDTA koncentracije 10 mmol/L, 150 μL rastvora gvožđe(II)-sulfata heptahidrata koncentracije 10 mmol/L, 150 μL rastvora vodonik-peroksida koncentracije 10 mmol/L i 525 μL destilovane vode. Reakciona smeša inkubirana je 120 min na 37 °C, nakon čega je dodato 750 μL trihlorsirćetne kiseline koncentracije 2,8% i 750 μL tiobarbiturne kiseline koncentracije 0,1%. Nakon toga, epruvete s reakcionom smešom zagrevane su 10 min u ključalom vodenom kupatilu. Apsorbancija je merena na 520 nm koristeći UV/VIS spektrofotometer (LLG-uniSPEC2 Spectrophotometer, Mekenhajm, Nemačka). Slepa proba pripremljena je na isti način, uz korišćenje destilovane vode umesto uzorka. Antioksidativna aktivnost na hidroksi radikal izražena je u procentima (AA_{OH}).

3.5.3.3. Određivanje redukcionne moći

Redukciona moć merena je prema metodi koju su opisali Yildirim i sar., 2001, uz manje modifikacije. Zapremina od 300 μL uzorka pomešana je s 2,50 mL fosfatnog pufera (koncentracije 0,2 mol/L, vrednosti pH 6,60) i 2,5 mL rastvora kalijum-fericijanida koncentracije 1%. Reakciona smeša je inkubirana 30 min na 50 °C. Nakon toga, dodato je 2,5 mL rastvora trihlorsirćetne kiseline koncentracije 10%. Zapremina od 2,50 mL reakcione smeše pomešana je s 2,50 mL destilovane vode i 0,50 mL rastvora gvožđe(III)-hlorida heksahidrata masenog udela 0,1%. Apsorbancija je merena na 700 nm koristeći UV/VIS spektrofotometer (LLG-uniSPEC2 Spectrophotometer, Mekenhajm, Nemačka). Viša apsorbancija ukazuje na višu redukcionnu moć.

3.6. Volumetrijske metode

3.6.1. Određivanje sadržaja etanola

Sadržaj etanola određen je volumetrijski, bihromatnom metodom (Pravilnik o metodama uzimanja uzoraka i vršenja hemijskih i fizičkih analiza radi kontrole kvaliteta proizvoda od voća i povrća, službeni list SFRJ 29/83). Zapremina od 25 mL uzorka preneti je u stakleni balon, dodata je destilovana voda i neutralisano je suspenzijom kalcijum-hidroksida (111 g u 1 L destilovane vode) do alkalne reakcije. Destilacija je vršena dok nije sakupljeno oko 75 mL destilata, koji je hvatan u normalni sud od 100 mL. Kondenzator i nastavak su isprani s nekoliko kapi destilovane vode, nakon čega je odmerna tikvica dopunjena do marke i homogenizovana. Zapremina od 20 mL razblaženog destilata preneti je u erlenmajer sa šlifovanim čepom u kome se nalazilo po 20 mL sumporne kiseline (1:1) i kalijum-dihromata (42,572 g u 1 L destilovane vode). Pri dodavanju destilata, smeša nije smela da dobije zelenu boju, tj. u njoj je morao biti višak dihromata. Ako se smeša oboji u zeleno, potrebno je ponoviti oksidaciju s manjom količinom destilata, a ako je potrebno, destilacija se mora ponoviti s manjom zapreminom uzorka. Nakon 30 min na sobnoj temperaturi, u zapašenom erlenmajeru, rastvor je titrisan rastvorom amonijum fero-sulfata uz gvožđe(II)-*o*-fenantrolin kao indikator, do promene

boje u crveno-smeđu. Kao slepa proba titrisana je smeša sastavljena od po 20 mL rastvora kalijum-dihromata i sumporne kiseline (1:1), uz isti indikator. Sadržaj etanola računat je prema jednačini (3.1)

$$\omega_{etanol} = \frac{(V_{SP} - V_{UZ}) \cdot 100}{V_{SP} \cdot V_a \cdot V_0} \cdot 1000 [\%] \quad (3.1)$$

gde su:

- ω_{etanol} – procentni sadržaj etanola,
- V_{SP} – zapremina rastvora amonijum-fero-sultata utrošena za titraciju slepe probe [mL],
- V_{UZ} – zapremina rastvora amonijum-fero-sultata utrošena za titraciju uzorka [mL],
- V_a – zapremina razblaženog destilata uzeta za analizu [mL] i
- V_0 – zapremina uzorka odmerena za analizu [mL].

Rezultati su izraženi u zapreminskim procentima etanola.

3.6.2. Određivanje sadržaja ukupnog azota

Sadržaj ukupnog azota određen je metodom po Kjeldalu (dan. *Kjeldahl*) (Kravić i Stojanović, 2016; Trajković i sar., 1983). Odgovarajuća zapremina uzorka (1 ili 2 mL, zavisno od uzorka) uneta je u Kjeldal tikvicu, dodato je 2 mL koncentrovane sumporne kiseline i 1 g smeše katalizatora (smeša bakar(II)-sulfata i kalijum-sulfata u odnosu 1:9 (m/m)). Zagrevano je u digestoru dok rastvor ne pređe u blago zelenu boju. Razoren uzorak prenet je u balon za destilaciju korišćenjem male zapremine destilovane vode.

U erlenmajer je pipetom odmereno 10 mL rastvora hlorovodonične kiseline koncentracije 0,01 mol/L i dodato je tri kapi mešanog indikatora (bromkrezolzeleno i metilcrveno u etanolu). Nastavak za destilaciju je bio uronjen u tečnost. U balon za destilaciju je preko levka, postepeno, dodavan 33% natrijum-hidroksid do alkalne reakcije, pri čemu se sadržaj balona boji u tamnoplavo, da bi istisnuo azot u vidu amonijaka. Nakon 5 min destilacije (indikator nije smeo promeniti boju), erlenmajer je spušten niže, da nastavak za destilaciju bude iznad nivoa tečnosti i destilacija nastavljena još minut. Nakon toga, neizreagovali višak hlorovodonične kiseline je retitrisan rastvorom natrijum-hidroksida koncentracije 0,0100 mol/L do promene boje u zeleno, uz mešani indikator (smeša 0,1%-nog rastvora bromkrezolzelenog u etanolu i 0,1%-nog rastvora metilcrvenog u etanolu u odnosu 3:2; pokazuje izrazitu promenu boje na pH 5,1, iz crvene (u kiseljoj sredini) u zelenu (u baznoj sredini) boju). Radi određivanja tačne koncentracije hlorovodonične kiseline u koju je hvatan predestilisani amonijak, rađena je titracija slepe probe, 10 mL hlorovodonične kiseline natrijum hidroksidom, uz 3 kapi mešanog indikatora, do promene boje u blago zelenu. Masa azota po litru uzorka se računa prema jednačini (3.2).

$$N = \frac{(c_{HCl} \cdot V_{HCl} - c_{NaOH} \cdot V_{NaOH})}{V_u} \cdot M_N \left[\frac{mg}{L} \right] \quad (3.2)$$

gde su:

- c_{HCl} – koncentracija hlorovodonične kiseline određena na osnovu titracije slepe probe [mol/L],
- V_{HCl} – zapremina hlorovodonične kiseline u kojoj je hvatan amonijak [mL],
- c_{NaOH} – koncentracija standardnog rastvora natrijum-hidroksida [mol/L],
- V_{NaOH} – zapremina natrijum-hidroksida utrošena za titraciju viška hlorovodonične kiseline [mL],
- V_u – zapremina uzorka odmerena za analizu [L] i
- M_N – molarna masa azota [14,0067 g/mol].

Rezultati su izraženi u miligramima azota po litru uzorka.

3.7. Kontrolni uzorci

Kontrolni uzorci za analize opisane od potpoglavlja 3.3. do 3.6 bili su otpadni tok i neinokulisane podloge, osim za analizu iz potpoglavlja 3.6.1, kod koje ovi uzorci nisu analizirani, jer nije očekivano da sadrže etanol.

Sve analize su rađene u tri ponavljanja i rezultati su iskazani kao srednja vrednost \pm standardna devijacija.

3.8. Mikrobiološka ispitivanja

3.8.1. Određivanje ukupnog broja kvasaca

Ukupan broj kvasaca određen je metodom poseva (Vrbaški i Markov, 1992). Korišćena je hranljiva podloga Saburo-4% maltozni agar (engl. *Sabouraud-4% Maltose Agar*) (Merck, Darmštat, Nemačka) sa dodatkom 50 mg/L hloramfenikola (Sigma-Aldrich, Sent Luis, SAD), da bi se inhibirao rast bakterija. Zasejane Petri ploče inkubirane su 72 h na 28 °C, nakon čega je određen broj vijabilnih ćelija po mililitru ispitivanog uzorka. Rezultat je izražen u jedinicama log CFU/mL (engl. *Colony Forming Unit, CFU*), a sve analize rađene su u tri ponavljanja. Ukupan broj kvasaca određivan je tokom celog trajanja bioprocasa, a kontrolni uzorak bio je kombuha napitak proizveden na podlozi od crnog čaja (1,5 g/L) zaslađen saharozom (70 g/L), inkubiran na 25 °C.

3.8.2. Određivanje ukupnog broja bakterija sirćetnog vrenja

Ukupan broj bakterija sirćetnog vrenja (BSV) određen je metodom poseva (Vrbaški i Markov, 1992), a kao podloga za kultivaciju korišćen je kvasni ekstrakt pepton manitol agar (engl. *Yeast Peptone Mannitol Agar*) (Difco, Detroit, SAD) u koji je prethodno dodato 500 mg/L cikloheksimida (aktidion; Sigma-Aldrich, Sent Luis, SAD) da bi se inhibirao rast kvasaca. Inkubacija na 28 °C trajala je pet do sedam dana, zatim je izračunat broj vijabilnih ćelija po mililitru. Krajnji rezultat izražen je kao log CFU/mL, a analize su rađene u tri ponavljanja. Ukupan broj bakterija sirćetnog vrenja određivan je tokom celog trajanja bioprocasa. Kontrolni uzorak je bio kombuha napitak proizveden na podlozi od crnog čaja (1,5 g/L) zaslađen saharozom (70 g/L), inkubiran na 25 °C.

3.8.3. Određivanje antimikrobne aktivnosti

Antimikrobna aktivnost kombuha napitaka ispitivana je prema predstavnicima Gram negativnih bakterija (*Escherichia coli* (ATCC 25922) i *Salmonella* Typhimurium (ATCC 14028)), Gram pozitivnih bakterija (*Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) i *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212)) i kvascu (*Candida albicans* (ATCC 10231)).

Antimikrobna aktivnost određivanja je agar difuzionom metodom sa bunarčićima. Sojevi bakterija su uzgajani na Miler-Hintonovom (engl. *Mueller-Hinton*), a kvasac na Saburo dekstroznom (engl. *Sabouraud Dextrose*) agaru 24 h na 37 °C, odnosno 25 °C redom. Nakon inkubacije, ćelije su sprane s površine agara i suspendovane u sterilnom fiziološkom rastvoru. Broj ćelija u mililitru suspenzije za inokulaciju, procenjen na Mak Farlandovom nefelometru je bio $1 \cdot 10^8$ CFU/mL i razblažen je 10 puta do $1 \cdot 10^7$ CFU/mL. Nakon toga, 1 mL ove suspenzije unet je u 19 mL otopljenog (45 °C) Miler-Hintonovog ili Saburo dekstroznog agara, smeša je homogenizovana i izlivena na Petri ploče. Nakon očvršćavanja, bunarčići prečnika 9 mm su napravljeni sterilnom metalnom cevčicom, pomoću vakuum pumpe. Zatim su ispitivani uzorci, zapremine 100 µL, preneti u bunarčiće Petri ploča, prethodno inokulisane test mikroorganizmima. Ploče s bakterijama su inkubirane 24 h na 37 °C, a sa ispitivanim kvascem 48 h na 25 °C. Nakon inkubacije, mereni su prečnici zona inhibicije. Sve analize rađene su u tri ponavljanja, a rezultati su iskazani kao prečnik zone inhibicije u milimetrima ± standardna devijacija.

Ispitivani uzorci su kombuha napici dobijeni na otpadnom toku iz vinarije nakon tri dana kultivacije proizvedeni na podlozi s 30, 50 i 70 g/L početnog sadržaja šećera i kultivisani na tri različite temperature, 20, 25 i 30 °C, kao i kontrolni uzorci:

- neinokulisana kultivaciona podloga (otpadni tok vinarije razblažen na tri ispitivane koncentracije šećera, 30, 50 i 70 g/L),
- rastvori sirćetne kiseline koji odgovaraju ukupnoj kiselosti proizvedenih kombuha napitaka (slika 4.10) (7,5 g/L (UK = 7,5 g/L); 8,5 g/L (UK = 8,5 g/L); 10,5 g/L (UK = 10,5 g/L); i 12,0 g/L (UK = 12 g/L)),
- dekokt crnog čaja (CČ), koncentracije 5 g/L, 5 min ključanja,
- kombuha napitak proizveden na crnom čaju (K, 70 g/L saharoze, 1,5 g/L crnog čaja, 7 dana kultivacije na 25 °C, inokulum 10% v/v),
- kombuha napitak proizveden na crnom čaju neutralisan do pH 7 koristeći 0,1 mol/L natrijum-hidroksid (KN) i
- kombuha napitak proizveden na crnom čaju zagrevan do ključanja 10 min, da bi se denaturisali proteini (KZ).

Svi uzorci su profiltrirani kroz sterilni membranski mikrofilter, prečnika pora 0,22 µm.

3.9. Senzorna analiza

Senzorne osobine kombuha napitaka ocenjene su prema metodi koju su opisali Zou i sar., 2021, uz modifikacije. Četiri neobučena ocenjivača probala su svaki uzorak i ocenila ga na skali od 1 do 5 (5 – vrlo dobro, 4 – dobro, 3 – prosečno, 2 – loše i 1 – veoma loše), za svaki od parametara. Ocenjivani su miris, ukus, boja i ukupni utisak. Rezultati su prikazani radarskim

grafikonom. Da bi svežina napitaka bila očuvana, svi uzorci su probani na dan uzorkovanja i probani su iz providnih staklenih čaša.

3.10. Statistička obrada podataka

3.10.1. Primarna obrada rezultata

Eksperimentalni podaci obrađeni su korišćenjem jednofaktorijalne analize varijanse (engl. *One-Way ANOVA*), kao statističkom alatu za ispitivanje uticaja jednog faktora, odnosno nezavisne promenljive na zavisnu promenljivu. Nakon toga, urađena je *post-hoc* analiza Taki-jevim testom značajnih razlika (engl. *Tukey's honest significance test*) radi definisanja homogenih grupa srednjih vrednosti i nivoa značajnosti ispitivanih faktora. Statističke analize vršene su primenom softverskog paketa Statistica 13.1 (Dell Inc., Raund Rok, Teksas, SAD), pri nivou značajnosti od 0,05. Srednje vrednosti i standardne devijacije ispitivanih parametara izračunate su korišćenjem softverskog paketa Microsoft Office 2016 (Microsoft Corporation, Redmong, Vašington, SAD).

3.10.2. Modelovanje primenom metode odzivne površine

Modelovanje eksperimentalnih podataka dobijenih za treći (konzumni) dan proizvodnje kombuha napitaka vršeno je primenom metode odzivne površine (engl. *Response Surface Methodology, RSM*).

Dobijeni podaci modelovani su polinomom drugog reda koji opisuje uticaj dve nezavisne promenljive (početnog sadržaja šećera i temperature kultivacije) na ispitivane zavisne promenljive (Y). U definisanoj jednačini (3.3) b_0 je odsečak, b_i su linearni koeficijenti, a b_{ii} kvadratni koeficijenti, dok je b_{ij} koeficijent interakcije regresionog modela.

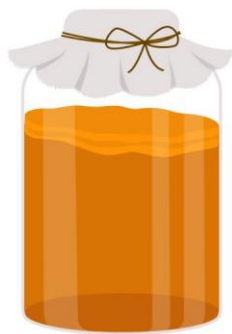
$$Y(X) = b_0 + \sum_{i=1}^n b_i X_i + \sum_{i=1}^n b_{ii} X_i^2 + \sum_{i < j}^n b_{ij} X_i X_j \quad (3.3)$$

Statistička značajnost koeficijenata regresionih modela procenjena je korišćenjem p -vrednosti. Da bi se procenio kvalitet fitovanja eksperimentalnih podataka dobijenim matematičkim jednačinama (na osnovu koeficijenta determinacije, R^2), kao i statističke značajnosti dobijenih modela primenom p -vrednosti i F -vrednosti urađena je analiza varijanse. Statističke analize vršene su pri nivou značajnosti 0,05, a za obradu podataka korišćen je softverski paket Statistica 13.1 (Dell Inc., Raund Rok, Teksas, SAD). U tabelama koje predstavljaju koeficijente regresione jednačine i njihove p -vrednosti masnim slovima i zvezdicom su označeni parametri koji imaju statističku značajnost, pri intervalu poverenja od 95%. Konstruisanjem grafičkog prikaza odzivnih površina omogućeno je sagledavanje uticaja interakcije nezavisnih promenljivih na definisani odziv.

Modelovani su uzorci kombuha napitaka, dobijenih nakon tri dana fermentacije i to za sledeće analize:

- antioksidativnu aktivnost (na DPPH radikal, na hidroksi radikal i redukciona moć),

- antimikrobnu aktivnost prema bakterijama (*Escherichia coli*, *Salmonella Typhimurium*, *Staphylococcus aureus* i *Enterococcus faecalis*),
- sadržaj organskih kiselina (sirćetne, vinske i oksalne),
- sadržaj vitamina C,
- sadržaj ukupnih fenola,
- sadržaj galne kiseline,
- sadržaj redukujućih šećera i
- sadržaj ukupnog azota.

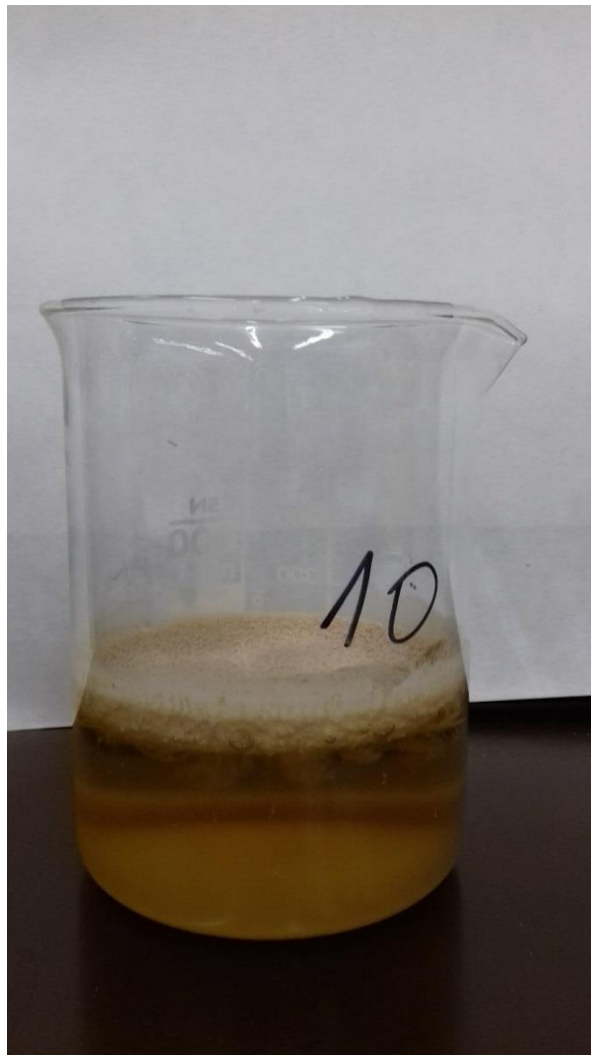


Rezultati i diskusija

4. Rezultati i diskusija

4.1. Početno ispitivanje mogućnosti korišćenja efluenta vinarije nastalog tokom flotacije šire u proizvodnji kombuha napitka

Preliminarno ispitivanje mogućnosti primene nove podloge za proizvodnju kombuha napitka (slika 4.1.) izvedeno je na vodi od flotacije šire prikupljenoj tokom berbe grožđa sorte Rizling 2016. godine. Sadržaj ukupnih šećera određen je metodom po Mileru i utvrđeno je da prikupljeni efluent ima 170,22 g/L ukupnih redukujućih šećera. Nakon sterilizacije i filtracije, efluent je razblažen do 70 g/L ukupnih redukujućih šećera i kultivisan na 25 °C u trajanju od 10 dana uz uzorkovanje u razmacima od po 24 h.

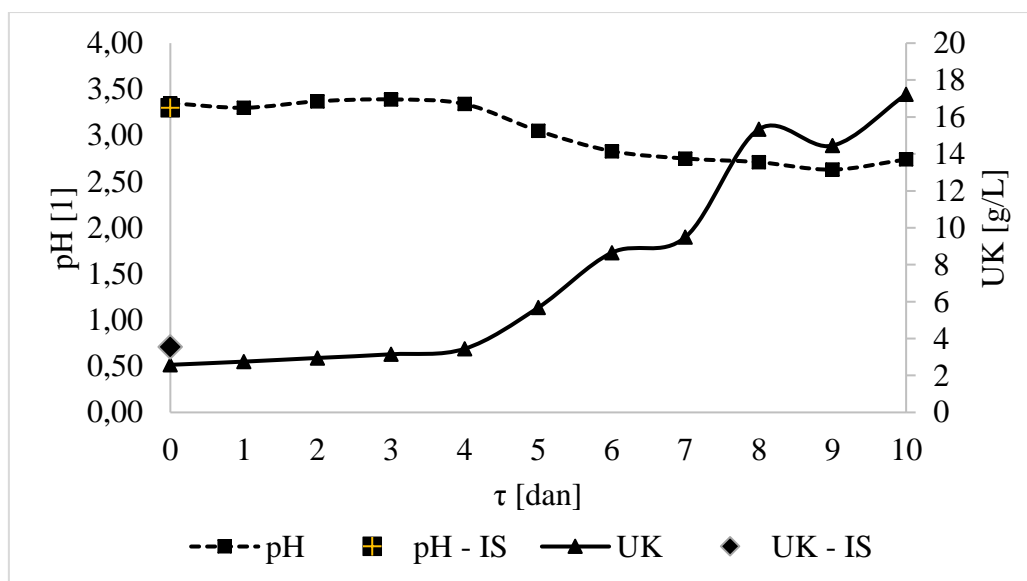


Slika 4.1. Kombuha proizvod kultivisan na vodi od flotacije šire grožđa sorte Rizling nakon 10 dana

4.1.1. Vrednost pH, ukupna kiselost i prinos biomase

Vrednost pH uzorka posle inokulacije iznosila je 3,35. Nakon izostanka značajnijih varijacija tokom prva četiri dana fermentacije, trend je podrazumevao osetniji pad, uz napomenu da je početna vrednost pH korišćenog inicijalnog supstrata (IS) već bila prilično niska (3,30). Najniža vrednost pH izmerena je devetog dana fermentacije (2,63) (slika 4.2). Poređenjem s rezultatima eksperimenata koji podrazumevaju fermentaciju zaslađenog crnog ili zelenog čaja nakon jednakog vremenskog perioda (Jayabalan i sar., 2007; Kallel i sar., 2012), u konkretnom slučaju, dobija se niža vrednost pH, uporediva s onima dobijenim fermentacijom soka od grožđa kombuha kulturom (Yavari i sar., 2011).

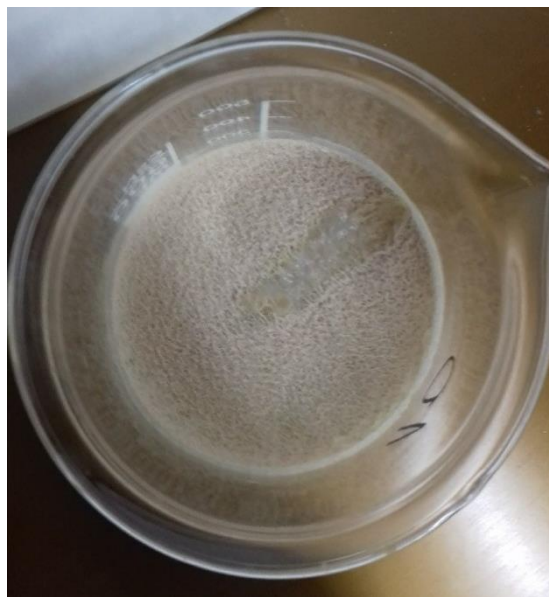
Ukupna kiselost (UK) inicijalnog supstrata bila je 3,56 g/L uz blaži pad nakon inokulacije. Prva četiri dana fermentacije nije uočena značajna promena, dok se od petog dana beleži linearni porast ukupne kiselosti (slika 4.2), uz dobru korelaciju sa snižavanjem vrednosti pH. Najviša vrednost zabeležena je deseti dan i iznosila je 17,23 g/L. Ukupna kiselost izmerena na efluentu značajno je viša nego na tradicionalnom supstratu (Jayabalan i sar., 2007; Kallel i sar., 2012), dok su vrednosti ukupne kiselosti značajno niže nego kod kombuha proizvoda dobijenih na uporedivom supstratu, soku od grožđa (Yavari i sar., 2011).



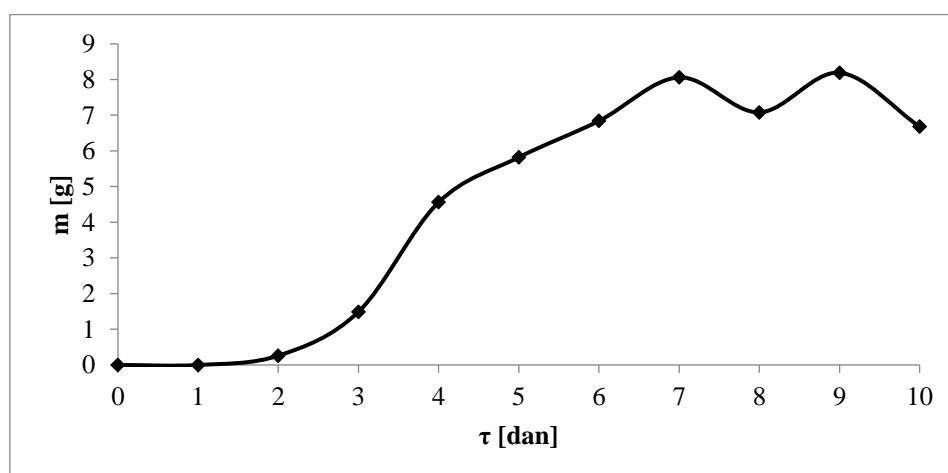
Slika 4.2. Vrednost pH i ukupna kiselost (UK) kombuha proizvoda tokom fermentacije na efluentu vinarije (IS – inicijalni supstrat)

Celuloznu navlaku (slika 4.3) proizvodi bakterija *Komagataeibacter xylinus* (Gregory i sar., 2021). Kako je za inokulaciju korišćen samo tečni deo kombuhe, pratio se nastanak celulozne opne koji je bio primetan od drugog dana fermentacije. Masa nastale opne je linearno rasla do sedmog dana bioprocasa (slika 4.4), uz blage oscilacije uočene od sedmog do desetog dana fermentacije, što ukazuje da se nakon sedam dana bioprocasa masa biomase ustalila. Najverovatniji uzrok ove oscilacije je blago različito odvijanje procesa u svakoj od čaša u kojoj je kombuha kultivisana, upravo da bi se celulozna navlaka mogla nesmetano formirati. Kombuha na efluentu vinarije je, nakon šest dana fermentacije, produkovala, približno, dva puta više biomase nego kada je kao podloga korišćena hajdučka trava (Vitas i sar., 2018), dok je masa

upola manja nego kod kombuhe koja je fermentisala tradicionalnu podlogu (Malbaša, Lončar, Djurić, i sar., 2008).



Slika 4.3. Celulozna navlaka nakon 10 dana kombuha fermentacije na efluentu vinarije



Slika 4.4 Promena sadržaja biomase tokom trajanja fermentacije kombuha proizvoda na efluentu vinarije

4.1.2. Organske kiseline

Organske kiseline su prirodno prisutne u mnogim prehrambenim proizvodima biljnog porekla, a osim toga, proizvode se i tokom fermentacije hrane, kao u slučaju kombuhe. Često se dodaju u namirnice kao acidulanti, pojačivači ukusa, konzervansi ili radi inaktiviranja ili inhibicije rasta mikroorganizama koji izazivaju kvarenje hrane. Oni su glavni uzrok dugog roka trajanja kombuha napitka, čak i kada se u njega ne dodaju nikakvi konzervansi (Gurtler i Mai, 2014).

Dominantna organska kiselina u kombuha napitku je sirćetna, koja nastaje oksidacijom etanola od strane bakterija sirćetnog vrenja (Jayabalan i sar., 2007). Sadržaj sirćetne kiseline je, za inicijalni supstrat, pa do drugog dana fermentacije, varirao u relativno uskom opsegu, od

0,25 do 0,37 g/L (tabela 4.1). Izmereni sadržaj sirćetne kiseline trećeg i četvrtog dana bio je 0,51 i 0,60 g/L, redom, dok je od petog do sedmog dana sadržaj povećan dva puta. Od osmog do desetog dana sadržaj sirćetne kiseline porastao je dva do tri puta, u odnosu na šesti, konzumni dan. Drugi autori su kod kombuha napitka proizvedenog na podlozi od crnog čaja izmerili nešto niže vrednosti sadržaja sirćetne kiseline (Jayabalan i sar., 2007; Malbaša i sar., 2011), dok je Blanc, 1996 zabeležio slične vrednosti. Kombuha kulturi treba nekoliko dana da se prilagodi novom supstratu, što se jasno vidi i kroz statistički značajne razlike između uzoraka. Počevši od četvrtog dana svaki naredni dan fermentacije je bio, statistički značajno, različit od prethodnog. Sadržaj sirćetne kiseline je devetog dana bio nešto niži u odnosu na osmi i deseti dan, iako je vrednost pH bila najniža devetog dana. Ovo neslaganje, najverovatnije, potiče od prisustva drugih organskih kiselina u uzorku, pre svega vinske i oksalne, koje takođe doprinose snižavanju vrednosti pH. Takođe, razlike u sadržaju sirćetne kiseline od sedmog do desetog dana su minimalne, najverovatnije jer je kultivacioni medijum do tada snažno puferisan.

Tabela 4.1. Sadržaj organskih kiselina tokom kombuha fermentacije na efluentu vinarije

	Sadržaj kiseline [g/L]									
	Limunska	Mlečna	Malonska	Jabučna	Mravlja	Oksalna	Vinska	Sirćetna		
IS	0,29±0,03 ^e	ND ^a	0,34±0,02 ^d	1,43±0,06 ^f	0,68±0,16 ^e	ND ^a	4,52±0,36 ^b	0,26±0,01 ^a		
Dan 0	0,11±0,00 ^d	0,11±0,01 ^{b,c}	0,15±0,02 ^{a,b}	0,59±0,05 ^{c,d,e}	0,48±0,18 ^{c,d,e}	0,24±0,01 ^{a,b}	1,99±0,14 ^a	0,25±0,01 ^a		
Dan 1	ND ^a	0,12±0,01 ^{b,c}	0,13±0,02 ^{a,b}	0,46±0,12 ^{b,c,d,e}	0,43±0,16 ^{b,c,d,e}	0,27±0,05 ^{a,b,c}	2,12±0,10 ^a	0,30±0,01 ^a		
Dan 2	ND ^a	0,11±0,01 ^{b,c}	0,16±0,05 ^{b,c}	0,52±0,18 ^{c,d,e}	0,33±0,03 ^{b,c,d}	0,20±0,01 ^{a,b}	1,87±0,07 ^a	0,37±0,02 ^{a,b}		
Dan 3	0,01±0,00 ^a	0,14±0,00 ^c	0,10±0,00 ^{a,b}	0,34±0,00 ^{a,b,c,d}	0,27±0,00 ^{a,b,c}	0,02±0,23 ^{a,b}	2,44±0,01 ^a	0,51±0,01 ^{a,b}		
Dan 4	0,02±0,00 ^{a,b}	0,10±0,03 ^b	ND ^a	0,54±0,01 ^{c,d,e}	ND ^a	0,25±0,01 ^{a,b,c}	3,11±0,25 ^{a,b}	0,60±0,02 ^b		
Dan 5	0,04±0,00 ^{b,c}	ND ^a	0,10±0,01 ^{a,b}	0,14±0,01 ^{a,b}	0,24±0,01 ^{a,b}	0,82±0,14 ^{b,c,d}	4,42±0,18 ^c	1,10±0,00 ^c		
Dan 6	0,05±0,00 ^c	0,01±0,00 ^a	ND ^a	ND ^a	0,29±0,06 ^{b,c}	0,98±0,00 ^{c,d}	2,38±0,01 ^a	1,44±0,00 ^d		
Dan 7	ND ^a	ND ^a	0,13±0,01 ^{a,b}	0,57±0,06 ^{c,d,e}	0,32±0,01 ^{b,c,d}	1,43±0,00 ^{d,e}	2,72±0,00 ^a	1,95±0,02 ^e		
Dan 8	ND ^a	ND ^a	0,28±0,01 ^{c,d}	0,67±0,01 ^{d,e}	0,43±0,01 ^{b,c,d,e}	1,52±0,03 ^{d,e}	2,69±0,06 ^a	3,48±0,11 ^f		
Dan 9	ND ^a	ND ^a	0,18±0,09 ^{b,c}	0,30±0,03 ^{a,b,c}	0,49±0,03 ^{c,d,e}	2,39±0,61 ^f	2,78±0,19 ^a	2,18±0,24 ^e		
Dan 10	ND ^a	ND ^a	0,34±0,04 ^d	0,70±0,04 ^e	0,59±0,02 ^{d,e}	2,12±0,59 ^{e,f}	2,80±0,01 ^a	4,36±0,21 ^g		

Slova u tabeli označavaju statistički značajne razlike među uzorcima (p<0,05).

Najviši sadržaj vinske kiseline zabeležen je kod inicijalnog supstrata (4,52 g/L), dok je za sve uzorke kombuha proizvoda, osim petog dana (4,42 g/L), bio značajno niži (tabela 4.1). Sadržaj u ostalim uzorcima bio je u opsegu od 1,87 g/L drugog dana, do 3,11 g/L četvrtog dana. Očekivano je da supstrat koji je korišćen za ovu fermentaciju sadrži vinsku kiselinu, s obzirom da su biljke iz porodice Vitaceae najistaknutiji biljni producenti vinske kiseline i ona je

najzastupljenija kiselina i u grožđu i u vinu sa sadržajem između 3,5 i 11 g/L tokom berbe, što zavisi od varijeteta grožđa i dostupnosti vode (Jackson, 2014e; Moreno i Peinado, 2012f). Dodatak tečnog inokuluma je, približno, prepolovio sadržaj vinske kiseline u kultivacionom medijumu. Porast koncentracije se može uočiti od drugog do petog dana, što ukazuje na sposobnost kombuha kulture da proizvodi manje količine vinske kiseline, međutim nakon šestog dana sadržaj se smanjio i zatim je ostao stabilan do kraja bioprocasa. Nakon što je prekinuta sinteza vinske, inicirano je generisanje sirćetne kiseline. U uzorku kombuhe proizvedene fermentacijom zelenog čaja izmerena je značajno manja količina vinske kiseline (Hopfe i sar., 2017). Statistička analiza potvrđuje da se kombuha kultura ne karakteriše kao značajni producent vinske kiseline. Ni između koja dva uzorka iz bioprocasa ne postoji statistički značajna razlika, dok se izdvaja inicijalni supstrat i uzorak uzet nakon petog dana kultivacije, za čiji rezultat je razumno pretpostaviti da je posledica merne nesigurnosti.

Oksalna kiselina nije određena u inicijalnom supstratu, dok je njen sadržaj u uzorcima do četvrtog dana fermentacije bio u opsegu od 0,20 do 0,27 g/L (tabela 4.1). Dužim trajanjem bioprocasa, sadržaj oksalne kiseline je dalje rastao, tako da je najveća vrednost zabeležena nakon devet dana (2,39 g/L). Promena koncentracije u prva četiri dana nije bila statistički značajna, dok nakon toga jeste.

Tokom čitavog trajanja bioprocasa, sadržaj mravlje kiseline je bio gotovo nepromenjen, što ukazuje da je kombuha kultura niti proizvodi, niti razgrađuje (tabela 4.1). Najviši sadržaj izmeren je u inicijalnom supstratu (0,68 g/L), dok četvrtog dana nije detektovana. U kombuha proizvodima dobijenih svih ostalih dana sadržaj mravlje kiseline bio je u rasponu od 0,27 do 0,59 g/L. Sadržaji koje su, kod kombuha proizvoda dobijenog na sojinoj surutki i hajdučkoj travi, izmerili drugi autori bili su nekoliko puta viši (Tu i sar., 2019; Vitas i sar., 2018). Statistička analiza pokazuje da postoje značajna preklapanja u nivoima statističke značajnosti među uzorcima, što potvrđuje pretpostavku da kombuha kultura ne utiče na sadržaj mravlje kiseline.

Jabučna kiselina je, uz vinsku, jedna od dominantnih kiselina u grožđu i ona može činiti polovinu njegove kiselosti. Nastaje na tri načina: fiksacijom ugljen-dioksida piruvinskom kiselinom u reakciji koju katalizuje NAD; fiksacijom ugljen-dioksida u reakciji koju katalizuje ribuloza-1,5-bisfosfat u seriji reakcija gde nastaju fosfoenolpiruvat i enzim fosfoenolpiruvat karboksilaza, nakon čega nastaje oksalosirćetna kiselina koju malat dehidrogenaza transformiše u jabučnu kiselinu; transformacijom limunske kiseline, nastale u korenju, u Krebsovom ciklusu u lišću i grožđu (Jackson, 2014e; Moreno i Peinado, 2012f). Na osnovu dobijenih rezultata (tabela 4.1), može se zaključiti da ova kultura kombuhe ne proizvodi jabučnu kiselinu, ali je, moguće, razgrađuje. Najviši sadržaj izmeren je u inicijalnom supstratu (1,43 g/L), dok je u većini uzoraka prikupljenih tokom fermentacije sadržaj jabučne kiseline iznosio, približno, polovinu one u korišćenom efluentu. Šestog dana kultivacije jabučnu kiselinu nije bilo moguće odrediti. Statistički, samo se inicijalni supstrat razlikuje od svih ostalih uzoraka, dok među njima nema statistički značajne razlike.

Malonska kiselina se biosintetiše u značajnim količinama u grožđu i predstavlja značajan konstituent ili intermedijer u proizvodnji mnogih materijala. Navodi se i kao prekursor u sintezi masnih kiselina, a kondenzuje se i s ureom u proizvodnji barbiturne kiseline (Apelblat i Manzurola, 2016). Svi prikupljeni uzorci su imali niži sadržaj malonske kiseline od inicijalnog

supstrata (tabela 4.1), dok u uzorcima četvrtog i šestog dana malonska kiselina uopšte nije detektovana. Jedino je uzorak 10. dana imao sadržaj malonske kiseline jednak inicijalnom supstratu. Osim uzorka 10. dana i inicijalnog supstrata, među ostalim uzorcima nema statistički značajne razlike.

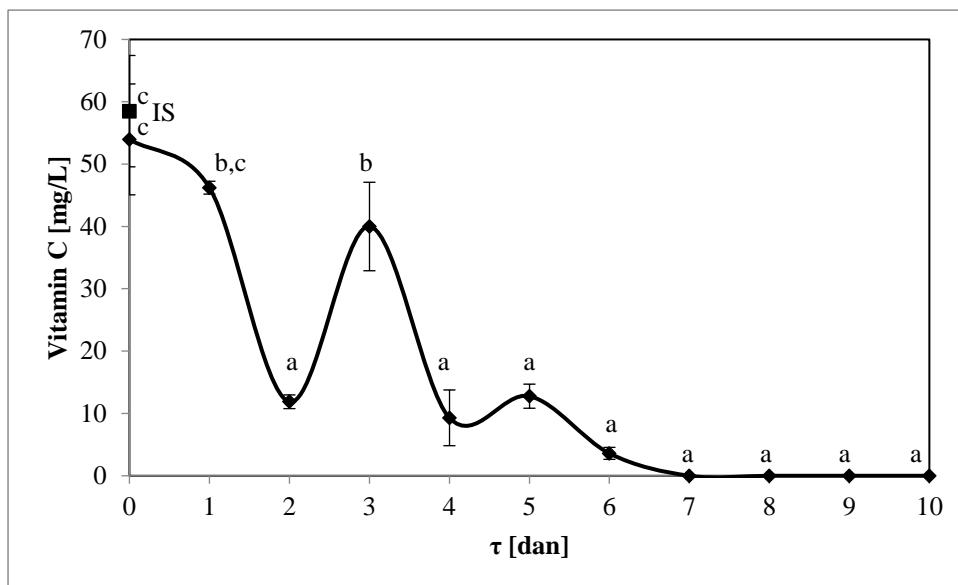
Mlečna kiselina je krajnji proizvod glikolize i nastaje redukcijom piruvinske kiseline ili transformacijom jabučne kiseline. Mlečna kiselina utiče na smanjenje nivoa holesterola, deluje kao inhibitor štetnih enzima i ima blagodetno dejstvo na imuni sistem (Jafari i Amini, 2019; Ye i sar., 2014). Mlečna kiselina nije detektovana u inicijalnom supstratu, kao i u uzorcima prikupljenim petog, sedmog, osmog, devetog i desetog dana (tabela 4.1). Najviši sadržaj izmeren je u uzorku od trećeg dana (0,14 g/L), dok je najniži bio u uzorku od šestog dana (0,01 g/L). Pošto mlečna kiselina nije zabeležena u inicijalnom supstratu, može se zaključiti da je kombuha kultura proizvodi na početku proizvodnog procesa, u maloj količini, ali i da je, ubrzo, razgrađuje, ili njen sadržaj pada ispod granice kvantitativnog određivanja primenjene metode.

Limunska kiselina je normalni metabolit i intermedijer u Krebsovom ciklusu. Smatra se netoksičnom i ukupna količina limunske kiseline u serumu čoveka je 1 mg/kg telesne mase. U vinu je prisutna primarno kao proizvod Krebsovog ciklusa metabolizma kvasaca (Jackson, 2014e; Karlson, 1988; Poerwono i sar., 2001). Najviši sadržaj limunske kiseline izmeren je u inicijalnom supstratu, 0,29 g/L (tabela 4.1), dok je tokom kultivacije detektovan veoma nizak sadržaj u uzorcima nultog, trećeg, četvrtog, petog i šestog dana, u rasponu od 0,01 do 0,11 g/L. Nakon toga, limunska kiselina je, najverovatnije, razgrađena kao deo oksidativnog metabolizma prisutnih mikroorganizama, jer je, nakon sedmog dana, koncentracija limunske kiseline bila ispod granice detekcije.

Ćilibarna kiselina je sporedni proizvod transformacije šećera u alkohol kvascem *Saccharomyces cerevisiae* (Ye i sar., 2014) i u konkretnom eksperimentalnom setu nije detektovana ni u jednom uzorku.

4.1.3. Vitamin C

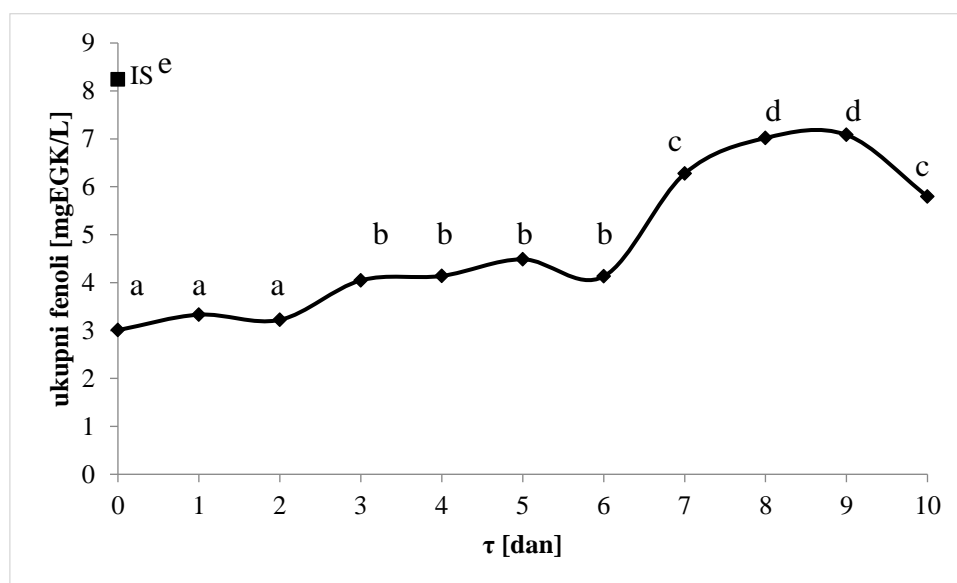
Vitamin C (askorbinska kiselina) je esencijalna, kao dodatak ishrani i sastojak kozmetičkih i farmaceutskih proizvoda. Iako je otpadna voda sterilisana u autoklavu, na povišenoj temperaturi, to nije bilo dovoljno da izazove termičku degradaciju vitamina C (Jingyan i sar., 2013; Juhász i sar., 2012). Najviša koncentracija askorbinske kiseline izmerena je u inicijalnom supstratu, pre inokulacije (58,46 mg/L) (slika 4.5). Tokom trajanja bioprocasa, sadržaj vitamina C je kontinuirano smanjivan, i od sedmog do desetog dana bio je ispod granice detekcije. Drugi autori (Malbaša i sar., 2011; Vitas i sar., 2018) su zabeležili sintezu vitamina C tokom bioprocasa, dok pri fermentaciji ovde ispitivanog supstrata, to nije bio slučaj. Inicijalni supstrat je imao visok sadržaj askorbinske kiseline, dok je u proizvodu pogodnom za konzumaciju, šestog dana, zabeležen sadržaj od 3,60 mg/L. Metabolički putevi kombuha konzorcijuma su kompleksni i nisu u potpunosti poznati zbog velikog broja različitih bakterija i kvasaca i njihove međusobne interakcije.



Slika 4.5. Sadržaj vitamina C tokom kombuha fermentacije na efluentu vinarije (IS – inicijalni supstrat, različita slova označavaju statistički značajne razlike među uzorcima ($p < 0,05$))

4.1.4. Ukupni fenoli

Čaj, voće i povrće tipično imaju visok sadržaj fenolnih jedinjenja. Mikroba populacija koja čini kombuha kulturu sintetiše enzime koji poseduju sposobnost razgradnje polifenola do manjih molekula (Sun i sar., 2015). Kombuha napitak sadrži veći broj različitih polifenolnih jedinjenja koji ispoljavaju antiinflamatorno, antioksidativno, antikancerogeno i antimikrobno dejstvo (Bhattacharya i sar., 2016). Smatra se da polifenoli doprinose antimikrobnim svojstvima kombuha napitka (Tu i sar., 2019). Za sve uzorke kombuha proizvoda, izmereni sadržaj ukupnih fenola je bio niži nego kod inicijalnog supstrata i tokom fermentacije je rastao (slika 4.6).



Slika 4.6. Sadržaj ukupnih fenola tokom kultivacije kombuha proizvoda na efluentu vinarije (IS – inicijalni supstrat, različita slova označavaju statistički značajne razlike među uzorcima ($p < 0,05$))

Vrednost na početku fermentacije je bila 3,01 mg EGK/L, dok je najviša izmerena vrednost među uzorcima kombuha proizvoda (7,08 mg EGK/L) bila nakon devet dana, a inicijalni supstrat je, pre inokulacije imao ukupni sadržaj fenola od 8,24 mg EGK/L. Sadržaj ukupnih fenola je porastao prvog dana, a neznatno opao drugog, da bi od trećeg do petog dana vrednost linearno rasla. Nakon blagog smanjenja šestog dana, sadržaj ukupnih fenola je nastavio da raste linearno do devetog dana fermentacije, dok je na kraju fermentacije, 10. dana sadržaj smanjen na 5,80 mg EGK/L. Ovako određene vrednosti su od oko 100 do 1000 puta niže u poređenju i sa tradicionalnim (Kallel i sar., 2012) i s alternativnim supstratima, zmijskim voćem (Zubaidah i sar., 2018) i sokom od stabljike mlade pšenice (engl. *wheatgrass*) (Sun i sar., 2015).

4.1.5. Antioksidativna aktivnost

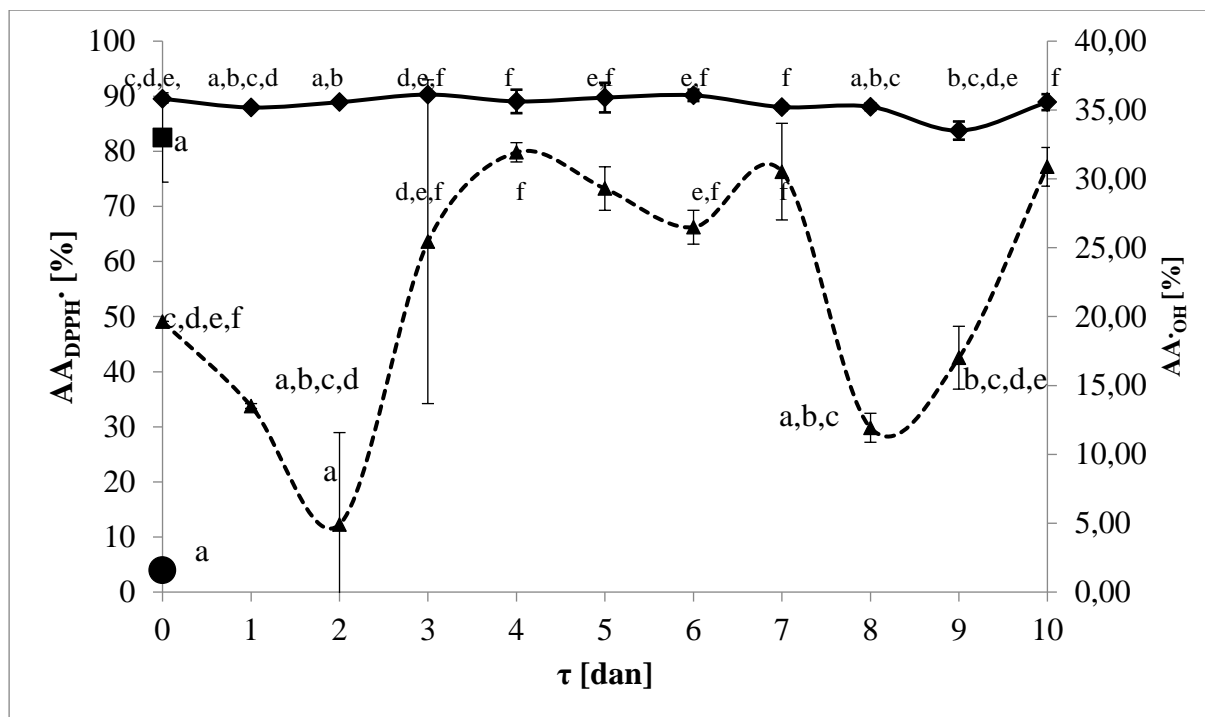
Antioksidativna aktivnost je određivana *in vitro*, korišćenjem tri uobičajena testa za merenje biološkog potencijala. DPPH test se zasniva na reakciji uzorka s DPPH[•] i njegove redukcije do DPPH-H. Hidroksi radikal je poznat visokoreaktivan radikal karakterističan za biološke sisteme. Test redukcione moći pruža uvid u sposobnost prenosa elektrona kombuha proizvoda.

4.1.5.1. Antioksidativna aktivnost na DPPH radikal

Antioksidativna aktivnost na DPPH radikal ($AA_{DPPH^{\bullet}}$) je bila veoma visoka i približno konstantna tokom celog trajanja bioprocasa, s vrednošću od oko 89% (slika 4.7). Najviše vrednosti su izmerene trećeg i šestog dana (90,30% i 90,17%, redom). Sve vrednosti izmerene kod fermentisanih uzoraka imale su višu vrednost nego inicijalni supstrat, koji je imao $AA_{DPPH^{\bullet}}$ od 82,53%. Izmerene vrednosti su bile više u odnosu na literaturne podatke dobijene u slučaju proizvodnje kombuhe na tradicionalnoj i na alternativnoj podlozi (Malbaša i sar., 2011; Vitas i sar., 2018). Ipak, neki autori zabeležili su još više vrednosti antioksidativne aktivnosti na DPPH[•], konkretno kod kombuha proizvoda na soku od stabljike mlade pšenice (Sun i sar., 2015).

4.1.5.2. Antioksidativna aktivnost na hidroksi radikal

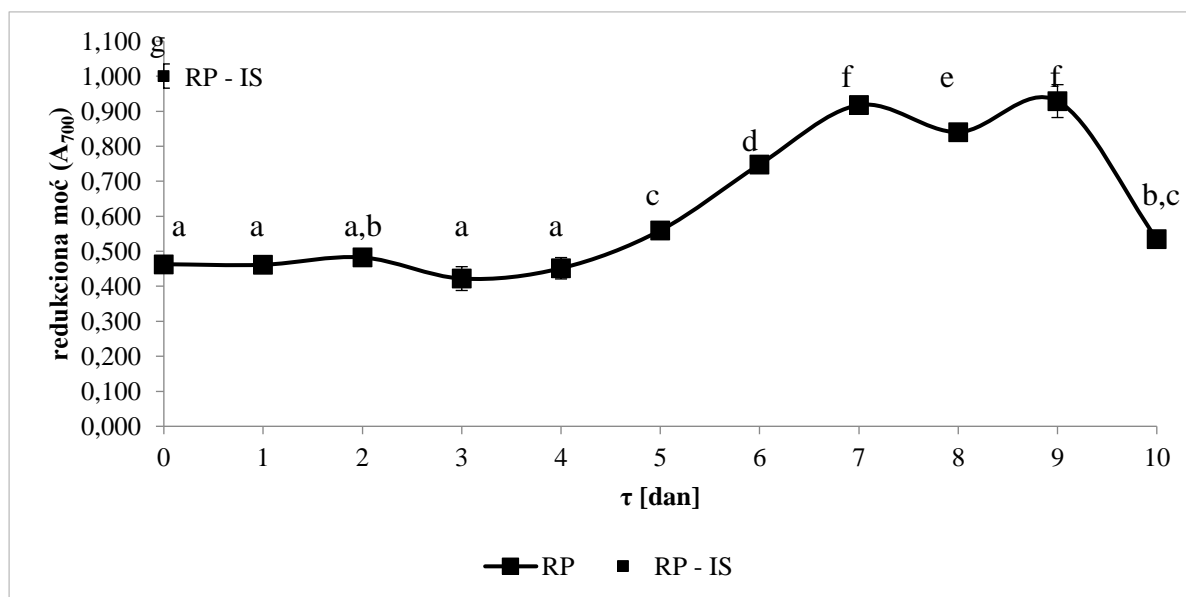
Hidroksi radikal ima snažnu oksidacionu sposobnost i izuzetno kratak životni vek (Yin i sar., 2019). Antioksidativna aktivnost na hidroksi radikal ($AA_{\bullet OH}$) je bila tokom celog trajanja fermentacije značajno viša u poređenju s inicijalnim supstratom (slika 4.7), što ukazuje na to da se antioksidativna aktivnost prema hidroksi radikal pripisuje primenjenoj kombuha kulturi, a ne grožđu korišćenom kao polazna sirovina. $AA_{\bullet OH}$ je opadala tokom prva dva dana kultivacije, zatim je porasla na 25,44% i između trećeg i sedmog dana je imala vrednosti u rasponu od 25,44 (treći dan) do 30,53% (sedmi dan). Ovaj parametar je snižen tokom osmog i devetog dana fermentacije i, zatim je ponovo porastao desetog dana. Tradicionalni kombuha napitak, na podlozi od crnog čaja je pokazao sposobnost hvatanja hidroksi radikala oko 40%, dok je na podlozi od zelenog čaja ova vrednost iznosila oko 55% (Malbaša i sar., 2011).



Slika 4.7. Antioksidativna aktivnost na DPPH i ·OH kombuha proizvoda i efluenta vinarije (različita slova označavaju statistički značajne razlike među uzorcima ($p < 0,05$), \blacklozenge - AA_{DPPH}·, \blacksquare - AA_{DPPH}· - IS, \blacktriangle - AA·OH, \bullet - AA·OH - IS)

4.1.5.3. Redukciona moć

Redukciona moć je uobičajeni test za merenje antioksidativne aktivnosti (Canabady-Rochelle i sar., 2015). Svi kombuha proizvodi imali su nižu redukcionu moć u odnosu na inicijalni supstrat (slika 4.8).



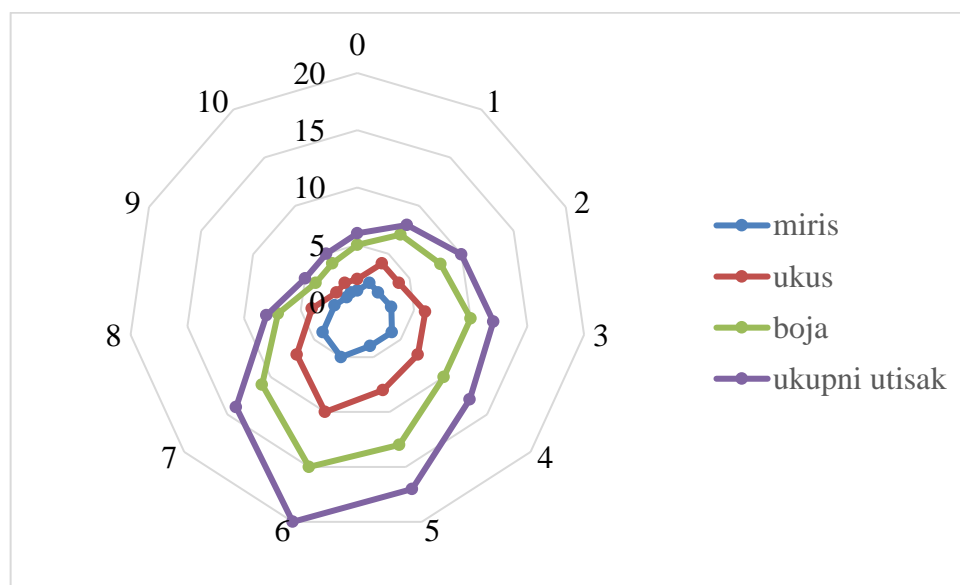
Slika 4.8. Redukciona moć kombuha proizvoda i efluenta vinarije, različita slova označavaju statistički značajne razlike među uzorcima ($p < 0,05$)

Tokom prvih četiri dana vrednost je bila stabilna, u rasponu od 0,422 (treći dan) do 0,483 (drugi dan). Od petog do sedmog dana, redukciona moć je linearno rasla, a zatim je, do devetog dana zadržala približno konstantnu vrednost, da bi desetog dana fermentacije značajno opala. Najveća vrednost redukcionne moći zabeležena je nakon devet dana fermentacije (0,929) i ovo je bila vrednost najbliža zabeleženoj kod inicijalnog supstrata. Kombuha napici proizvedeni na crnom i zelenom čaju, kao i na otpadu od čaja nije imao više vrednosti redukcionne moći od 0,2, nakon šest dana fermentacije (Jayabalan i sar., 2008).

4.1.6. Senzorna analiza

Senzorne osobine kombuha proizvoda ocenjivane su svaki dan (slika 4.9). Svi uzorci su imali žuto-narandžastu boju i bili su, tokom celog trajanja bioprocasa, opalescentni. Formirana celulozna navlaka je, počevši od sedmog dana kultivacije, bila kompaktna. Miris kombuha napitaka je okarakterisan kao blago kiselkast do četvrtog dana, kiseo od petog do osmog dana, a nakon toga, do kraja fermentacije rezak i veoma kiseo. Slično kao i miris, ukus je do četvrtog dana bio blago kiseo, od petog do osmog dana kiseo, a nakon toga neprijatan, izuzetno kiseo.

Prva četiri dana napitak je bio nepitak, nakon toga je dobio prijatan ukus uz aromu koja je podsećala na vino. Optimalno vreme za konzumaciju je bilo posle šest dana fermentacije, a nakon toga je napitak bio suviše kiseo.



Slika 4.9. Senzorna ocena kombuha proizvoda na efluentu vinarije

4.2. Mogućnost korišćenja efluenta vinarije nastalog tokom flotacije šire u proizvodnji kombuha napitka analizirana nakon početnog ispitivanja

4.2.1. Vrednost pH

Tokom trajanja svih kultivacija vrednost pH se kretala u veoma uskom opsegu. Najviša vrednost zabeležena je kod neinokulisanog supstrata s 3% polaznog sadržaja šećera (3,85), što je bilo očekivano, jer je u taj uzorak dodata najveća zapremina vode radi razblaživanja. Generalno posmatrano, vrednost pH je imala opadajući trend, tokom trajanja bioprocasa, s najnižom izmerenom vrednošću devetog dana na 25 °C u uzorku s 5% polaznog sadržaja šećera (2,83). Svi ostali uzorci imali su vrednost pH između 2,83 i 3,85. Korišćeni supstrat potiče od grožđa, što objašnjava snažna puferišuća svojstva. Puferski kapacitet vina se računa prema jednačini (4.1) (Moreno i Peinado, 2012c):

$$\frac{dB}{dpH} = 2,303 \frac{UK \cdot AP}{UK + AP} \quad (4.1)$$

gde su:

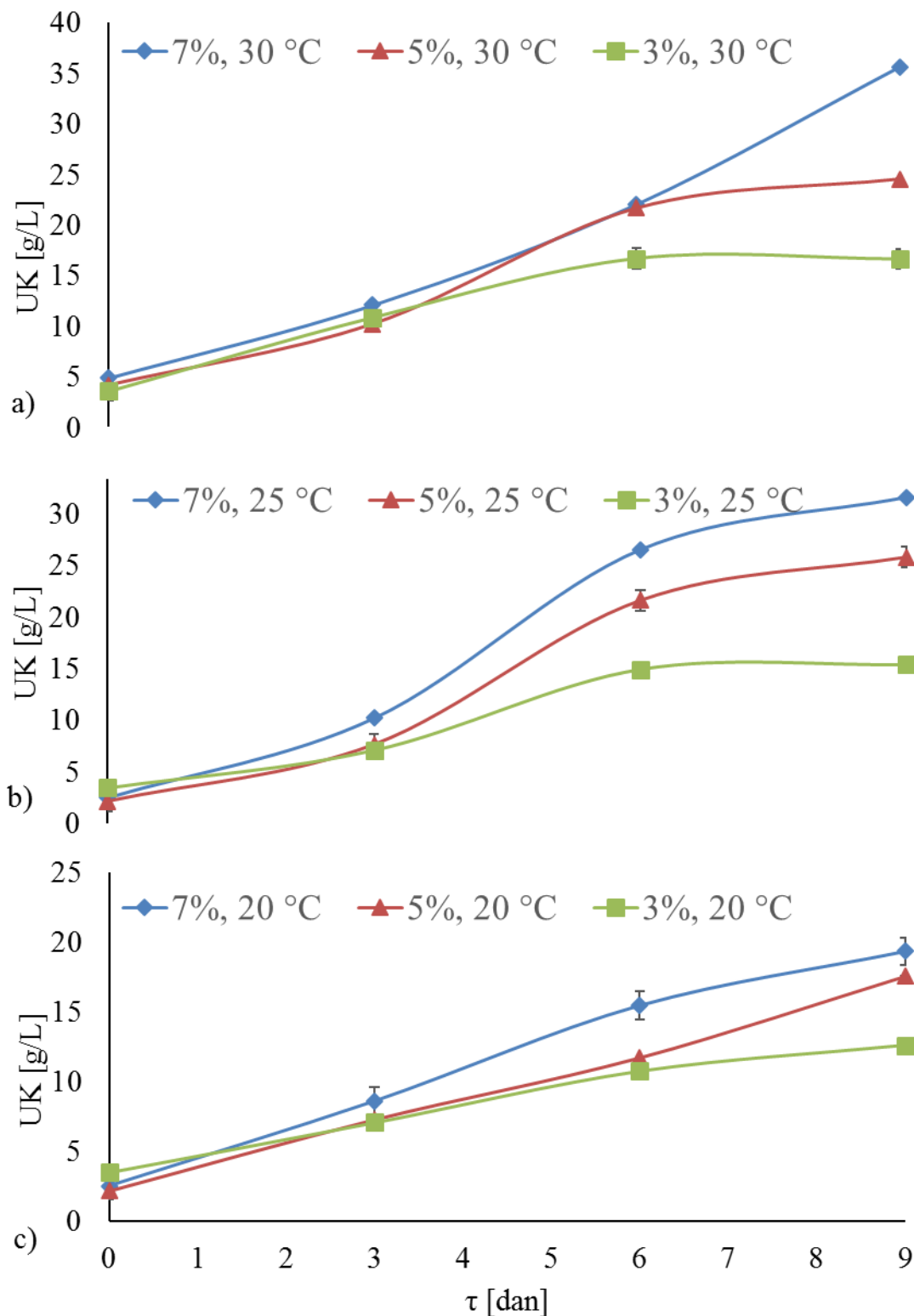
- B – potrebna količina baze da bi se vrednost pH smanjila za 1, [meq],
- UK – ukupna titrabilna kiselost vina, [meq/L] i
- AP – alkalitet pepela, [meq/L].

Kombuha napitak koji se proizvodi na podlozi od crnog čaja, obično, ima značajno višu vrednost pH na početku fermentacije, između 5 i 5,5, dok je, nakon devetog dana fermentacije, kombuha napitak proizveden na efluentu vinarije bio uporedive vrednosti pH kao kombuha napici na crnom i pu-er čaju (Jayabalan i sar., 2007; Kallel i sar., 2012; Zhao i sar., 2018). S obzirom da je početna vrednost pH bila niska, nije se mogla koristiti kao parametar završetka fermentacije, nego je smanjenje vrednosti pH potvrdilo da je došlo do odvijanja bioprocasa.

4.2.2. Ukupna kiselost

Za ukupnu kiselost, može se uočiti uticaj i temperature i trajanja kultivacije (slika 4.10). Najviša vrednost izmerena je nakon devetog dana bioprocasa na 30 °C, kod uzorka sa 7% polaznog šećera (35,65 g/L), dok je najniža vrednost bila na početku fermentacije s 5% polaznog šećera, za uzorak spreman za fermentaciju na 25 °C (2,13 g/L). Inicijalni supstrat imao je nižu ukupnu kiselost (5,39 g/L) nego svi fermentisani uzorci, što potvrđuje da kombuha kultura proizvodi značajne količine različitih kiselina (Dufresne i Farnworth, 2000; Jayabalan i sar., 2007), dok je očekivano da uzorci pre fermentacije imaju nižu ukupnu kiselost od inicijalnog supstrata, jer su pripremljeni njegovim razblaživanjem. Nakon devet dana fermentacije, na sve tri ispitivane temperature, može se jasno uočiti da s porastom početnog sadržaja šećera raste i ukupna kiselost dobijenog proizvoda. Isti trend se uočava i kod povišenja temperature fermentacije, uz izuzetak da je, nakon devet dana fermentacije, uzorak s 5% polaznog šećera, fermentisan na 25 °C imao malo veću ukupnu kiselost nego na 30 °C. Početni sadržaj šećera je bio značajniji faktor pri fermentaciji na višoj temperaturi, dok je na 20 °C razlika bila bitno manja. Ukupna

kiselost je uporediva s onom merenom kod kombuha napitka proizvedenog na pu-er čaju, nakon tri dana fermentacije (Zhao i sar., 2018), dok je vrednost bila značajno viša nego kod kombuha napitka proizvedenog na melasi (Malbaša, Lončar, i Djurić, 2008), kao i u početnim istraživanjima opisanim u potpoglavlju 4.1.1.



Slika 4.10. Ukupna kiselost kombuha proizvoda na efluentu vinarije tokom trajanja kultivacije a) na 30 °C, b) na 25 °C, c) na 20 °C, na 3, 5 i 7% polaznog sadržaja šećera

4.2.2.1. Modelovanje ukupne kiselosti kombuha napitaka na efluentu vinarije nakon tri dana fermentacije

U cilju odabira optimalnih uslova proizvodnje modelovan je i grafički prikazan uticaj temperature fermentacije i početnog sadržaja šećera na ukupnu kiselost kombuha napitaka, nakon tri dana kultivacije. Rezultate ANOVA jednofaktorijalne analize varijansi prikazuje tabela 4.2, dok koeficijente regresione jednačine i njihov pojedinačni značaj prikazuje tabela 4.3. Model je značajan pri intervalu poverenja od 95% uz F-vrednost od 99,506. Visoka vrednost koeficijenta determinacije ukazuje na odličnu pouzdanost modela. Rezultati su fitovani polinomom drugog reda, dok je model prikazan odzivnom površinom (slika 4.11). Svi pojedinačni faktori, osim interakcije sadržaja šećera i temperature fermentacije, bili su statistički značajni. Rezultati su očekivani, jer sadržaj šećera direktno utiče na dostupnu količinu ugljenika za biosintezu kiselina, dok temperatura bioprocasa utiče na dinamiku odvijanja metaboličkih funkcija ćelije. Takođe, može se uočiti da je uticaj temperature značajno veći nego uticaj sadržaja šećera, verovatno jer se u podlozi, i pri najnižem ispitivanom sadržaju šećera, nalazi dovoljno ugljenika za pravilan ćelijski metabolizam.

Tabela 4.2. Rezultati jednofaktorijalne analize varijansi modelovanog odziva ukupne kiselosti kombuha napitaka na efluentu vinarije nakon tri dana fermentacije

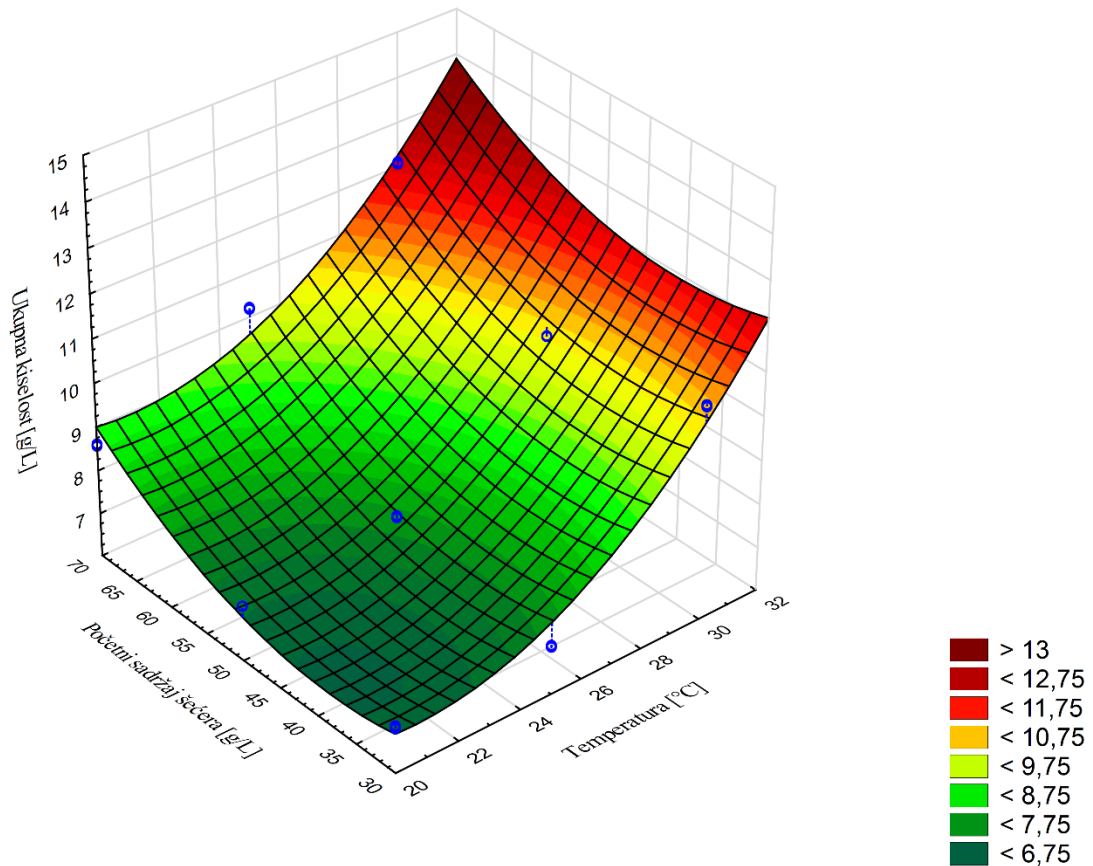
Odziv	Rezidual			Model			F- vrednost	p- vrednost	R ²
	DF	SS	MS	DF	SS	MS			
Ukupna kiselost	21	3,442	0,164	5	81,55	16,31	99,506	0,000	0,959

DF – broj stepeni slobode, SS – suma kvadrata, MS – suma srednjih kvadrata

Tabela 4.3. Koeficijenti regresione jednačine i njihove p-vrednosti modelovanog odziva ukupne kiselosti kombuha napitaka na efluentu vinarije nakon tri dana fermentacije

Članovi		odse- čak	linearni		kvadratni	interak- cija	
		b ₀	b ₁	b ₂	b ₁₁	b ₂₂	b ₁₂
Ukupna kiselost	vrednost	27,261*	-1,673*	0,041*	-0,166*	0,002*	-0,001
	p-vrednost	0,000*	0,000*	0,000*	0,004*	0,000*	0,493

*Efekti su statistički značajni, $p < 0,05$; 1 – temperatura; 2 – početni sadržaj šećera



Slika 4.11. Odzivna površina koja opisuje uticaj temperature fermentacije i početnog sadržaja šećera na ukupnu kiselost kombuha napitaka na efluentu vinarije nakon tri dana kultivacije

4.2.3. Proizvodnja biomase

Celulozna opna (slika 4.12) ima širok dijapazon potencijalne primene, kao adsorbent, u izluživanju metala, kao dodatak ishrani kod brojlerskih pilića, kao biodegradabilno pakovanje za čuvanje povrća i kao kompozitni film s hitozanom, za pakovanje mlevenog mesa. Primenu pronalazi i u modnoj industriji gde se ciljanim uzgajanjem u plitkim tavama dobijaju filmovi velike površine pogodni za proizvodnju različitih odevnih predmeta (slika 4.13.a). Može se bojiti, šiti i krojiti poput kože (<https://research.qut.edu.au/textiler/research/growing-vegan-leather/>). Osim toga može se koristiti u medicini kao pomoćno sredstvo, impregnirano medikamentima, za tretiranje rana (slika 4.13.b). (Laavanya i sar., 2021).



Slika 4.12. Celulozna opna na površini kombuha proizvoda na efluentu vinarije u fermentacionoj posudi, nakon devet dana kultivacije



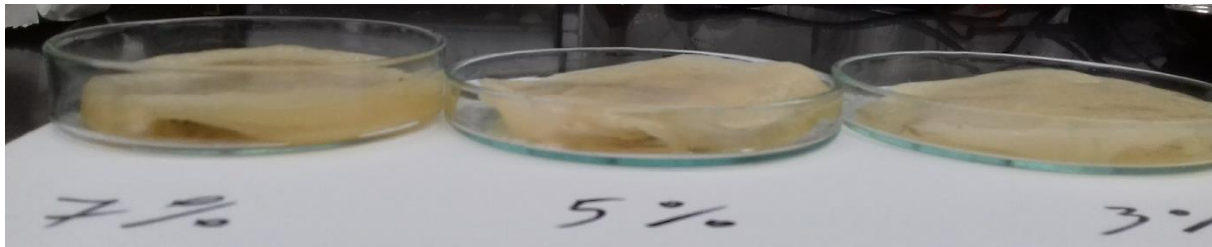
a)



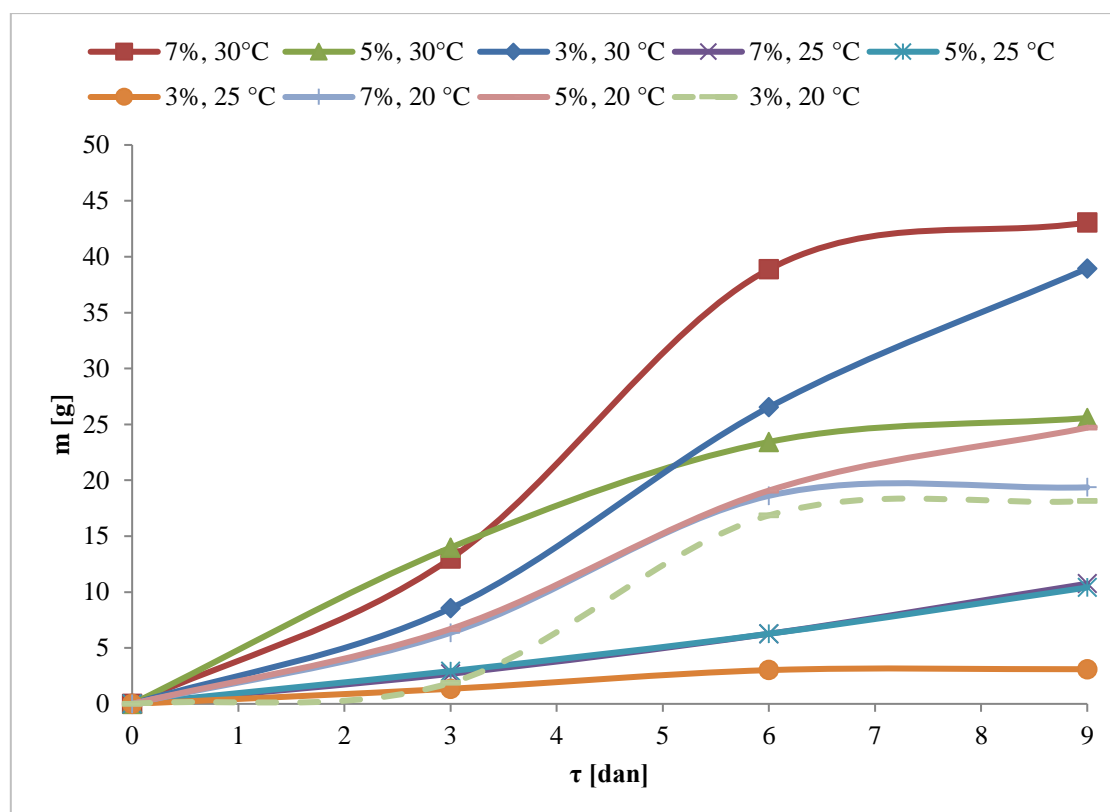
b)

Slika 4.13. Primena bakterijske celuloze za a) pravljenje odeće i b) lečenje opekotina (slika desno prikazuje brzinu zarastanja netretirane (prvi red), tretirane čistim hidrogelom (srednji red) i tretirane hidrogelom i ćelijama (donji red) opekotine kroz dane) (Gregory i sar., 2021)

Vizuelno se može uočiti da se, s porastom početnog sadržaja šećera, povećava i debljina sintetisane opne (slika 4.14). Praćenje proizvodnje biomase je pokazalo da je temperatura fermentacije faktor koji više utiče na masu sintetisane navlake, u odnosu na početni sadržaj šećera u podlozi (slika 4.15). Sve tri eksperimentalne postavke koje su dale s najviše mase celulozne navlake kultivisane su na 30 °C, nakon devet dana (43 g sa 7%, 39 g s 3% i 25 g s 5% početnog sadržaja šećera u podlozi). Porast dinamike sinteze biomase zabeležen je između trećeg i šestog dana fermentacije, dok se nakon šestog dana uočava početak stacionarne faze. Najmanje biomase produkovano je na 25 °C (3 g nakon devet dana s 3% početnog sadržaja šećera). Primećuje se blagi porast dinamike sinteze biomase, ali nema jasno izraženih faza mikrobiološkog procesa. Na 20 °C postojala je eksponencijalna faza između trećeg i šestog dana, a nakon toga je započela stacionarna faza. Ako bi proizvodnja biomase bila glavni cilj bioprocesa, on ne bi trebalo da traje duže od šest dana. Mase sintetisane celulozne navlake bile su uporedive sa zabeleženim vrednostima na podlozi od crnog čaja (Amarasekara i sar., 2020), dok su u početnom eksperimentu izmereni znatno manji prinosi biomase (potpoglavlje 4.1.1).



Slika 4.14. Celulozne opne nakon devet dana kombuha fermentacije na 30 °C na efluentu vinarije podešenom na 7%, 5% i 3% polaznog sadržaja šećera u podlozi



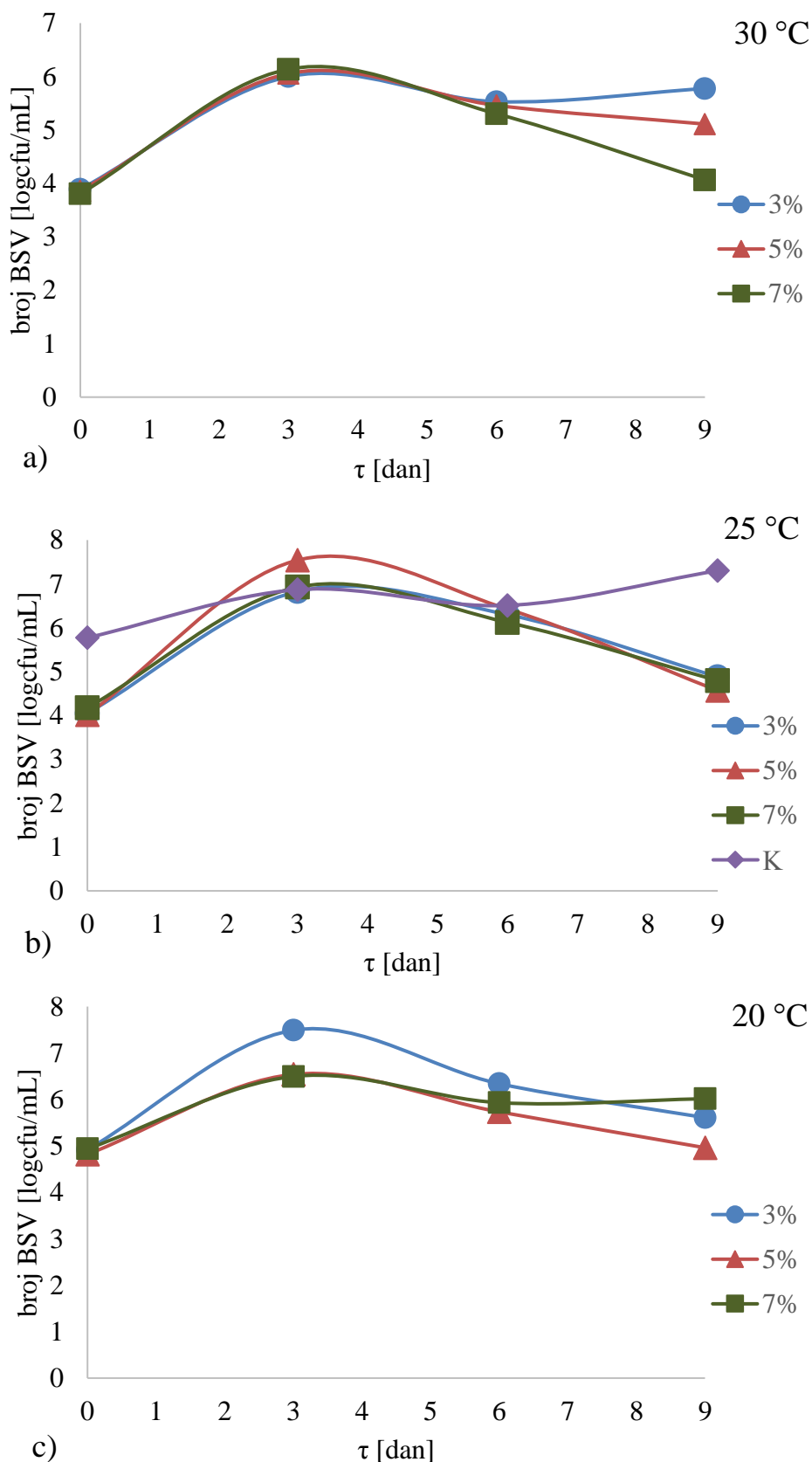
Slika 4.15. Prinos biomase tokom kultivacije kombuha proizvoda na efluentu vinarije na 3, 5 i 7% polaznog sadržaja šećera

4.3. Mikrobiološke analize – broj mikroorganizama i anti-mikrobna aktivnost

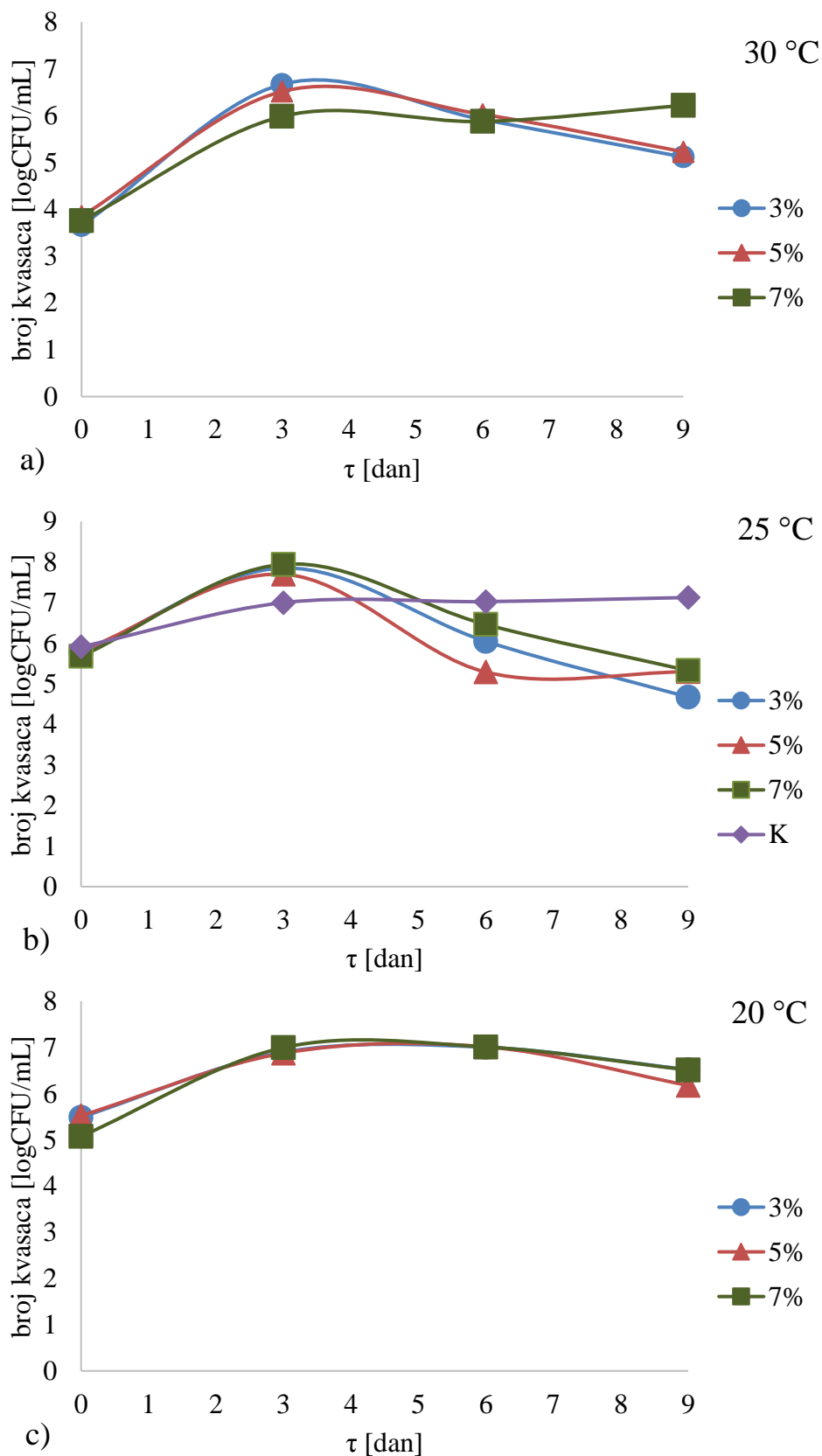
4.3.1. Ukupan broj bakterija sirćetnog vrenja i kvasaca

Broj bakterija sirćetnog vrenja (slika 4.16) kombuha napitka proizvedenog primenom medijuma na bazi efluenta iz proizvodnje vina veći je za tri logaritamske jedinice u odnosu na napitak dobijen na tradicionalnoj podlozi, od crnog i zelenog čaja (Jayabalan i sar., 2007). Kombuha napitak proizveden na pu-er čaju sadržao je manju koncentraciju bakterijskih ćelija u odnosu na napitak dobijen primenom efluenta vinarije, za približno tri logaritamske jedinice (Zhao i sar., 2018). Najveći broj sirćetnih bakterija određen je trećeg dana, za sve eksperimentalne postavke (osim za kombuhu na crnom čaju), pri čemu je najveća vrednost bila na 25 °C u uzorku s 5% šećera (7,5 logCFU/mL). Smanjenje broja sirćetnih bakterija se može objasniti promenom uslova sredine, odnosno kiselinskim šokom, kao posledicom porasta sadržaja produkovanih kiselina, što je u direktnoj vezi s fiziološkim karakteristikama i brojem sirćetnih bakterija, kako je njihov optimum rasta između pH 5,5 i 6,0, dok je fermentacija značajno inhibirana na vrednostima pH nižim od 4,5 (Cvetković i sar., 2019). Broj bakterija u kontrolnom uzorku (kombuha na crnom čaju) bio je za približno 1 logCFU/mL veći nego u kombuha napicima na ispitivanom alternativnom supstratu, nakon tri i šest dana fermentacije, dok je nakon devet dana ova razlika bila značajno veća.

U svim eksperimentalnim postavkama, najveći broj kvasaca (slika 4.17) određen je trećeg dana kultivacije, nakon čega je uočen trend opadanja, osim na 20 °C, gde je smanjenje broja kvasaca započelo nakon šestog dana fermentacije. Ovakav ishod je očekivan, jer je brzina odvijanja celokupnog bioprocesa manja na nižim temperaturama, tako da mikroorganizmi kasnije ulaze u stacionarnu fazu. Najveći izmeren broj bio je 7,95 logCFU/mL, trećeg dana fermentacije na 25 °C i 70 g/L ukupnih šećera, dok je najniža vrednost bila 4,67 logCFU/mL, što je određeno nakon devet dana fermentacije na 25 °C sa 30 g/L početnog sadržaja šećera. Temperatura se izdvaja kao značajniji faktor, pošto na jednoj temperaturi, sve tri koncentracije šećera prate isti trend rasta, izuzev uzorka sa 70 g/L na 30 °C, koji u ispitivanom trajanju procesa ne ulazi u fazu odumiranja. Uočene krive rasta su tipične za kombuha fermentaciju, u kojoj, nakon dostizanja maksimuma, broj kvasaca opada usled iscrpljivanja podloge ključnim nutrijentima (Cvetković i sar., 2019; Teoh i sar., 2004). Broj kvasaca nakon tri dana fermentacije je viši u poređenju s kombuha napitkom na afričkoj gorušici (*Brassica tournefortii*), ali je sličan s kombuha napicima na crnom i zelenom čaju. Istovremeno je oko jednu logaritamsku jedinicu niži, za eksperimente izvedene na 25 °C, dok je kombuha napitak na pu-er čaju sadržao manji broj ćelija kvasaca, od 1,5 do 3,5 logaritamskih jedinica (Jayabalan i sar., 2007; Rahmani i sar., 2019; Zhao i sar., 2018).



Slika 4.16. Ukupan broj bakterija sirćetnog vrenja tečne faze kombuha proizvoda na efluentu vinarije na a) 30 °C, b) 25 °C i c) 20°C, na 3, 5 i 7% polaznog sadržaja šećera (K – kombuha proizvod na crnom čaju)



Slika 4.17. Ukupan broj kvasaca tečne faze kombuha proizvoda na efluentu vinarije na a) 30 °C, b) 25 °C i c) 20°C, na 3, 5 i 7% polaznog sadržaja šećera (K – kombuha proizvod na crnom čaju)

4.3.2. Antimikrobna aktivnost kombuha napitaka na efluentu vinarije nakon tri dana fermentacije i kontrolnih uzoraka

Antimikrobna aktivnost kombuha napitaka testirana je samo za uzorke prikupljene trećeg dana fermentacije kao i za kontrolne uzorke (razblažene neinokulisane podloge; dekokt crnog čaja (CČ); kombuha na crnom čaju (K), kombuha na crnom čaju zagrevana da se denaturišu proteini (KZ), kombuha na crnom čaju neutralisana do pH 7 (KN); rastvori sirćetne kiseline ukupne kiselosti 7,5 (UK=7,5 g/L), 8,5 (UK=8,5 g/L), 10,5 (UK=10,5 g/L) i 12 (UK=12 g/L) g/L (tabela 4.4)).

Antimikrobna aktivnost ispitivanih kombuha napitaka potvrđena je, kako prema predstavnicima Gram pozitivnih (*Staphylococcus aureus* i *Enterococcus faecalis*), tako i prema predstavnicima Gram negativnih (*Salmonella Typhimurium* i *Escherichia coli*) bakterija. Poređenjem dobijenih rezultata, uočljiva je nešto izraženija antimikrobna aktivnost prema Gram pozitivnim bakterijama (srednje vrednosti prečnika zona inhibicije uzoraka kombuha napitaka na efluentu vinarije su 20,6, 18,4, 17,3 i 17,6 mm za *S. aureus*, *E. faecalis*, *Salmonella Typhimurium* i *E. coli*, redom). Uzorci kultivisani na 30 °C pokazali su veću inhibitornu aktivnost nego čisti rastvori sirćetne kiseline, ekvivalentne ukupne kiselosti, iz čega se može zaključiti da antimikrobnoj aktivnosti kombuha napitaka doprinosi i prisustvo drugih jedinjenja, osim organskih kiselina. Međutim, slični rezultati testiranih uzoraka kombuha napitaka i rastvora sirćetne kiseline upućuju na zaključak da dominantni nosilac antimikrobne aktivnosti kod kombuhe jesu organske kiseline, iz kojih se izdvaja sirćetna, kao ključna, što je u saglasnosti s prethodno objavljenim rezultatima (Četojević-Simin i sar., 2008; Velićanski i sar., 2014).

Testirani uzorci kombuha napitaka, kao i kontrolni uzorci, s izuzetkom rastvora sirćetne kiseline koncentracije 12 g/L, pokazali su potpuno odsustvo inhibitorne aktivnosti prema jedinom testiranom eukariotskom mikroorganizmu, *C. albicans*, što se objašnjava činjenicom da se radi o acidotolerantnom kvascu. Od ispitivanih kontrolnih uzoraka, neinokulisani kultivacioni medijum, neutralisana kombuha i dekokt crnog čaja nisu pokazali nikakvu aktivnost prema ispitivanim mikroorganizmima, što potvrđuje da antimikrobna svojstva napitka potiču od kombuha kulture korišćene za fermentaciju. Nasuprot njima, kombuha u kojoj su proteini denaturisani toplotom je pokazala određenu antimikrobnu aktivnost, što upućuje na zaključak da su komponente koje su nosioci antimikrobne aktivnosti termostabilna jedinjenja. Kombuha pripremljena na crnom čaju pokazala je sličnu inhibitornu aktivnost prema ispitivanim mikroorganizmima kao i kombuha napici na efluentu iz vinarije. Odsustvo antimikrobne aktivnosti kod gotovo svih kontrolnih uzoraka potvrđuje da su dokazana antimikrobna svojstva napitaka rezultat metaboličke aktivnosti kombuha kulture, a ne sirovine korišćene za proizvodnju.

Tabela 4.4. Antimikrobna aktivnost kombuha napitaka na efluentu vinarije nakon tri dana fermentacije i kontrolnih uzoraka prema različitim mikroorganizmima

t [°C]	Sadržaj šećera [g/L]	<i>S. aureus</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>Salmonella</i> Typhimu- rium	<i>E. coli</i>	<i>Candida</i> <i>albicans</i>
podloga	30	0,00±0,00 ^a	0,00±0,00 ^a	0,00±0,00 ^a	0,00±0,00 ^a	0,00±0,00 ^a
	50	0,00±0,00 ^a	0,00±0,00 ^a	0,00±0,00 ^a	0,00±0,00 ^a	0,00±0,00 ^a
	70	0,00±0,00 ^a	0,00±0,00 ^a	0,00±0,00 ^a	0,00±0,00 ^a	0,00±0,00 ^a
20	30	20,33±0,47 ^{b,c} ,d	16,67±0,47 ^b	15,33±0,47 ^b	16,67±0,94 ^{b,c}	0,00±0,00 ^a
20	50	20,00±0,00 ^{b,c}	17,00±0,00 ^b	15,67±0,94 ^b	16,67±0,47 ^{b,c}	0,00±0,00 ^a
20	70	20,00±0,00 ^{b,c}	19,67±0,47 ^{c,d}	17,33±0,47 ^{b,c}	17,00±0,00 ^{b,c}	0,00±0,00 ^a
25	30	19,67±0,47 ^b	17,33±0,47 ^b	15,33±0,47 ^b	16,33±0,47 ^b	0,00±0,00 ^a
25	50	20,00±0,00 ^{b,c}	17,00±0,00 ^b	15,67±0,47 ^b	16,67±0,47 ^{b,c}	0,00±0,00 ^a
25	70	20,67±0,47 ^{b,c} ,d	20,33±1,25 ^{c,d} ,e	18,33±0,47 ^{c,d}	18,33±0,47 ^{c,d}	0,00±0,00 ^a
30	30	22,33±0,47 ^e	19,67±0,47 ^{c,d}	19,67±0,47 ^{d,e}	19,00±0,00 ^{d,e}	0,00±0,00 ^a
30	50	21,00±0,82 ^{b,c} ,d,e	19,33±0,47 ^c	19,67±0,47 ^{d,e}	19,00±0,00 ^{d,e}	0,00±0,00 ^a
30	70	21,67±0,47 ^{d,e}	21,33±0,47 ^{d,e}	20,33±0,47 ^{d,e}	20,00±0,00 ^{d,e} ,f	0,00±0,00 ^a
KZ		20,33±0,47 ^{b,c,d}	15,67±0,47 ^b	15,33±1,25 ^b	16,00±0,00 ^b	0,00±0,00 ^a
KN		0,00±0,00 ^a	0,00±0,00 ^a	0,00±0,00 ^a	0,00±0,00 ^a	0,00±0,00 ^a
CC		0,00±0,00 ^a	0,00±0,00 ^a	0,00±0,00 ^a	0,00±0,00 ^a	0,00±0,00 ^a
K		21,33±0,58 ^{c,d,e}	21,33±0,58 ^{d,e}	19,33±0,58 ^{c,d} ,e	19,67±0,58 ^d ,e,f	0,00±0,00 ^a
UK=7,5 g/L		20,33±0,47 ^{b,c,d}	20,33±0,47 ^{c,d} ,e	19,00±0,82 ^{c,d}	19,33±0,47 ^d ,e	0,00±0,00 ^a
UK=8,5 g/L		21,00±0,00 ^{b,c,d,e}	19,67±0,47 ^{c,d}	19,67±0,47 ^{d,e}	19,33±0,94 ^{d,e}	0,00±0,00 ^a
UK=10,5 g/L		20,00±0,00 ^{b,c}	19,67±0,47 ^{c,d}	20,33±0,47 ^{d,e}	20,33±0,47 ^{e,f}	0,00±0,00 ^a
UK=12,0 g/L		22,33±0,47 ^e	21,67±0,47 ^{d,e}	21,33±0,47 ^e	21,33±0,94 ^f	12,33±0,47 ^b

Broj u tabeli predstavlja prečnik zone inhibicije [mm] ± standardna devijacija. Različita slova označavaju statistički značajne razlike među uzorcima u jednoj koloni (KZ – kombuha napitak na crnom čaju zagrevan do ključanja, KN – kombuha napitak na crnom čaju neutralisan do pH 7, CC – dekokt crnog čaja, K – kombuha napitak na crnom čaju (1,5 g/L čaja i 70 g/L saharoze), UK=7,5, 8,5, 10,5 i 12,5 g/L sadržaj sirćetne kiseline u rastvoru)

4.3.3. Modelovanje antimikrobne aktivnosti kombuha napitaka na efluentu vinarije nakon tri dana fermentacije

Svi modeli su bili značajni s F-vrednošću 7,792; 28,896; 18,423 i 18,500 za antimikrobnu aktivnost prema *S. aureus*, *Salmonella* Typhimurium, *E. faecalis* i *E. coli*, redom (tabela 4.5). Model za aktivnost prema *S. aureus* je imao koeficijent determinacije 0,65, što ukazuje da model nije veoma pouzdan, pošto 35% odstupanja ne može njime biti objašnjeno. Model za antimikrobnu aktivnost prema *Salmonella* Typhimurium je imao visok koeficijent determinacije, 0,928. Značajni parametri, na nivou od 0,05 bili su linearni efekat temperature fermentacije i kvadratni efekat temperature i sadržaja šećera. Model antimikrobne aktivnosti prema *E. faecalis* je imao koeficijent determinacije 0,891, pri čemu su značajni efekti, na nivou od 0,05 bili linearni efekat početnog sadržaja šećera i kvadratni efekti, kako početnog sadržaja šećera, tako i temperature. Za antimikrobnu aktivnost prema *E. coli*, model je imao koeficijent determinacije od 0,892, što pokazuje dobru pouzdanost predloženog modela. S intervalom poverenja od 95%, statistički značajni su bili linearni i kvadratni efekat temperature.

Tabela 4.5. Rezultati jednofaktorijalne analize varijansi modelovanih odziva antimikrobne aktivnosti kombuha napitaka na efluentu vinarije nakon tri dana fermentacije prema *S. aureus*, *Salmonella* Typhimurium, *E. faecalis* i *E. coli*

Odzivi	Rezidual			Model			F-vrednost	p-vrednost	R ²
	DF	SS	MS	DF	SS	MS			
<i>S. aureus</i>	21	8,509	0,405	5	15,787	3,157	7,792	0,0003	0,650
<i>Salmonella</i> Typhimurium	18	8,000	0,444	8	102,74	12,843	28,896	0,0000	0,928
<i>E. faecalis</i>	18	8,667	8,870	8	70,963	8,870	18,423	0,0000	0,891
<i>E. coli</i>	18	5,333	0,296	8	43,852	5,481	18,500	0,0000	0,892

DF – broj stepeni slobode, SS – suma kvadrata, MS – suma srednjih kvadrata

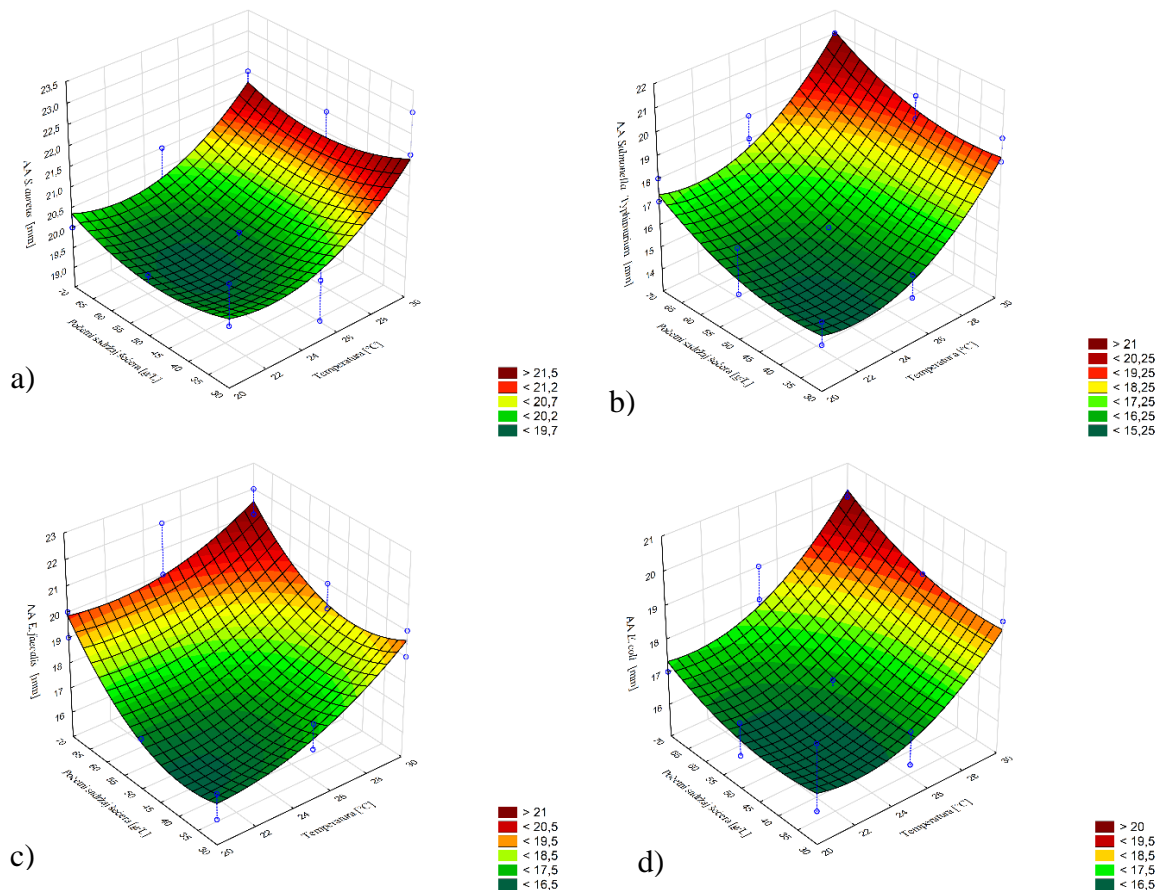
Uočava se da je linearni koeficijent uticaja temperature statistički značajan za sve ispitivane bakterije (tabela 4.6), osim za *E. faecalis*, a kvadratni za sve četiri bakterije. Nasuprot tome, linearni član uticaja šećera značajan je samo kod antimikrobne aktivnosti prema *E. faecalis*, a kvadratni prema *E. faecalis* i *Salmonella* Typhimurium, ukazujući da je početni sadržaj šećera jedino kod *E. faecalis* značajniji od temperature fermentacije. Međusobna interakcija ispitivanih parametara ne pokazuje statističku značajnost ni kod jednog modela. Za aktivnost prema *S. aureus*, temperatura je značajniji parametar nego sadržaj šećera pri čemu porast temperature jasno utiče na porast antimikrobne aktivnosti. Posmatrajući uticaj početnog sadržaja šećera, ekstremne vrednosti bile su bolje od srednje, mada su razlike zanemarljive. Posmatrajući uticaj ispitivanih parametara na antimikrobnu aktivnost kombuha napitaka prema bakterijama

Salmonella Typhimurium, *E. faecalis* i *E. coli* može se zaključiti da i viša temperatura fermentacije i viši početni sadržaj šećera povećavaju aktivnost prema sve četiri bakterije. Uzorak koji sadrži 70 g/L šećera fermentisan na 30 °C pokazuje najveću antimikrobnu aktivnost i prema Gram pozitivnim i prema Gram negativnim bakterijama. Na nižim temperaturama, uticaj sadržaja šećera je manje izražen. Antimikrobna aktivnost prema testiranim Gram negativnim bakterijama je međusobno imala veoma slične odzive na ispitivane nezavisne promenljive. Modeli antimikrobne aktivnosti su grafički predstavljeni odzivnim površinama, a antimikrobne aktivnosti prema odgovarajućim bakterijama su označene kao: AA_{S. aureus}, AA_{Salmonella Typhimurium}, AA_{E. faecalis} i AA_{E. coli} (slika 4.18).

Tabela 4.6. Koeficijenti regresione jednačine i njihove *p*-vrednosti modelovanih odziva antimikrobne aktivnosti kombuha napitaka na efluentu vinarije nakon tri dana fermentacije prema *S. aureus*, *Salmonella* Typhimurium, *E. faecalis* i *E. coli*

Članovi		odse- čak	linearni		kvadratni		interak- cija
		b ₀	b ₁	b ₂	b ₁₁	b ₂₂	b ₁₂
<i>S. aureus</i>	vrednost	37,106	-1,358	-0,090	0,031	0,001	-0,001
	<i>p</i> -vrednost	0,000*	0,018*	0,271	0,007*	0,102	0,655
<i>Salmonella</i> Typhimurium	vrednost	43,394	-2,567	-0,050	0,062	0,002	-0,003
	<i>p</i> -vrednost	0,000*	0,000*	0,596	0,000*	0,026*	0,133
<i>E. faecalis</i>	vrednost	30,838	-1,044	-0,200	0,029	0,003	-0,003
	<i>p</i> -vrednost	0,000*	0,078	0,029*	0,017*	0,000*	0,104
<i>E. coli</i>	vrednost	37,509	-1,717	-0,125	0,038	0,001	0,002
	<i>p</i> -vrednost	0,000*	0,002*	0,108	0,001*	0,080	0,341

*Efekti su statistički značajni, $p < 0,05$; 1 – temperatura; 2 – početni sadržaj šećera



Slika 4.18. Odzivne površine koje opisuju uticaj temperature fermentacije i početnog sadržaja šećera na antimikrobne aktivnosti kombuha napitaka na efluentu vinarije nakon tri dana fermentacije prema: a) *S. aureus*, b) *Salmonella Typhimurium*, c) *E. faecalis* i d) *E. coli*

4.4. Sadržaj ukupnih redukujućih šećera u kombuha proizvoda na efluentu vinarije

Dostupnost ugljenika je esencijalna za rast bilo koje mikrobiološke kulture. U slučaju korišćenja efluenta vinarije, osnovni izvori ugljenika su prosti šećeri, glukoza i fruktoza. Iako se u vrlo ranom stadijumu razvoja bobice u njoj nalazi nešto saharoze, u kasnijim stadijumima razvoja ona je gotovo u potpunosti hidrolizovana na glukozu i fruktozu, mada taj odnos nikada nije 1:1. Početno veći sadržaj glukoze opada tokom berbe, dok je sadržaj fruktoze konstantan, tako da, na kraju u grožđu ima zanemarljivo više fruktoze nego glukoze (Kliwer, 1967). Ispitivanjima je utvrđeno da izbor izvora šećera ima uticaj na aktiviranje različitih metaboličkih puteva u mikroorganizmima koji čine kombuha kulturu. Tako fruktoza i saharoza podstiču sintezu etanola, dok je glukoza smanjuje, a saharoza podstiče biosintezu mlečne kiseline (Reiss, 1994). Međutim, iako se odabirom šećera za polusintetičku podlogu može, u manjoj meri, uticati na ponašanje kombuha kulture i sintezu željenih jedinjenja, ušteda koju donosi korišćenje efluenta vinarije je značajno veća od dobijanja kombuha napitka u kome je podstaknuta biosinteza određene komponente, pošto se uklanja potreba za dodavanjem šećera na početku procesa. U inicijalnom supstratu izmeren je sadržaj redukujućih šećera od 163,55 g/L i prokuvanom

ohlađenom česmenskom vodom razblažen do odgovarajućeg sadržaja (70, 50 i 30 g/L), te je tako dobijena podloga korišćena za proizvodnju. Rezultate sadržaja šećera u kombuha proizvodima i neinokulisanim podlogama prikazuje tabela 4.7.

Neinokulisana podloga je samo kod fermentacija sa 70 g/L početnog šećera, imala nešto viši sadržaj od očekivanog (75,73 g/L), potencijalno usled nedovoljno dobre homogenizacije nakon razblaživanja inicijalnog supstrata vodom. Druga homogenizacija sledila je nakon inokulacije, na šta ukazuje pad od oko 10% nakon inokulacije, u odnosu na očekivanih 70 g/L početnog sadržaja, što je u skladu s očekivanjima. Posmatrano tokom celog toka fermentacije, sadržaj šećera je kontinuirano opadao, ali različito, u zavisnosti od početnog sadržaja. Pad je bio najizraženiji nakon tri dana fermentacije, na 30 °C, kada je početni sadržaj šećera bio najmanji, s 29 g/L nultog dana, na svega 4 g/L, dok je kod srednjeg početnog sadržaja šećera, on smanjen za preko 40% u prva tri dana fermentacije. Nasuprot tome, kada je sadržaj šećera bio najviši, pad je bio svega sa 63 na 61 g/L. Ovo upućuje na mogućnost inhibicije supstratom, kada je početni sadržaj 70 g/L i ukazuje da je za proizvodnju kombuha napitka bolje koristiti nešto niži početni sadržaj šećera, jer to povećava dinamiku bioproces, smanjuje početne troškove i daje napitak manjeg sadržaja šećera na kraju, uprkos tome što su pojedini autori uspešno proizvodili kombuha napitak s čak 100 g/L početnog šećera (Blanc, 1996). Pri temperaturi fermentacije od 25 °C, posmatrano prema brzini smanjivanja sadržaja ukupnih šećera, dinamika odvijanja bioprocesa bila je najveća. Nakon svega tri dana fermentacije, s početnih 63 g/L, sadržaj šećera je smanjen gotovo na jednu trećinu, kao i kada je početna koncentracija bila 29 g/L, dok je za 47 g/L početnog šećera sadržaj više nego prepolovljen. Na 20 °C, ponašanje mikrobiološke kulture bilo je slično, sadržaj šećera se s 30 g/L, nakon tri dana fermentacije, gotovo prepolovio, dok je s 50 g/L smanjen za 40%, a početni sadržaj od 70 g/L šećera smanjen je svega za četvrtinu. Posmatrano do kraja fermentacije, nakon devet dana, na dve više temperature, s 50 i 30 g/L šećera, rezidualni sadržaj šećera je padao ispod 10 g/L. Čak i nakon tri dana fermentacije, kada se posmatra po čaši napitka, uočava se raspon od svega 0,84 do 12,22 g/200 mL, što je sve značajno manje od komercijalno dostupnih bezalkoholnih napitaka, gde ovaj sadržaj često prelazi 20 g/200 mL. Eksperimenti drugih autora s kombuha napicima proizvedenim na različitim biljnim čajevima pokazali su značajno manju promenu sadržaja ukupnih šećera. Od početnih 100 g/L, sadržaj ukupnih šećera se samo za kombuha napitak na jednoj vrsti čaja (jerba mate), nakon 30 dana, prepolovio, dok je kod svih drugih izmeren viši sadržaj šećera, čak i do 75% početne koncentracije (Ramírez Tapias i sar., 2022). Kod kombuha napitka proizvedenog na morskoj travi (*Porphyra dentata*) sadržaj ukupnih šećera određivan je dnevno, pri fermentaciji na 25 i 30 °C, pri čemu je na 25 °C uočen blagi rast u odnosu na početni sadržaj, sve do 16. dana, nakon čega se sadržaj redukujućih šećera smanjivao, ali je i posle 22 dana bio viši nego na početku fermentacije. S druge strane, na 30 °C, uz manje oscilacije, pad je bio konstantan i nakon 20. dana sadržaj se smanjio na, približno, petinu početnog (Aung i Eun, 2022).

Tabela 4.7. Sadržaj redukujućih šećera u uzorcima kombuha proizvoda na efluentu vinarije i nefermentisanoj podlozi

		Sadržaj redukujućih šećera [g/L]		
		Početni sadržaj redukujućih šećera [g/L]		
t [°C]	τ [dan]	70	50	30
	podloga	75,73±0,31	50,23±0,56	29,89±0,41
	dan 0	63,08±0,62	46,93±0,56	29,17±0,06
30	3	61,09±0,37	28,43±0,50	4,19±0,08
	6	33,47±0,12	11,73±0,04	2,07±0,05
	9	12,39±0,05	9,37±0,02	1,68±0,01
25	3	22,29±0,34	21,17±0,41	10,82±0,34
	6	14,28±0,06	8,10±0,01	3,82±0,02
	9	10,35±0,10	4,05±0,07	3,24±0,03
20	3	54,07±0,65	30,11±0,62	16,80±0,16
	6	45,12±0,12	28,71±0,34	13,14±0,23
	9	36,31±0,78	15,29±0,55	5,99±0,14

4.4.1. Modelovanje ukupnog rezidualnog sadržaja redukujućih šećera u kombuha napicima na efluentu vinarije nakon tri dana fermentacije

Rezultati izmereni za sadržaj redukujućih šećera trećeg dana fermentacije modelovani su metodom odzivne površine (slika 4.19), dok rezultate ANOVA jednofaktorijalne analize varijanse prikazuje tabela 4.8. Koeficijenti regresione jednačine i njihov pojedinačni značaj su takođe prikazani (tabela 4.9). Model je bio značajan, uz interval poverenja od 95%, s F-vrednošću 5890,123. Vrednost koeficijenta determinacije je bila 0,999, što ukazuje na odličnu pouzdanost modela. Statistički značajni uticaj na model imali su linearni članovi početnog sadržaja šećera i temperature fermentacije, kao i njihova međusobna interakcija. Oba su očekivana, pošto je rezidualni sadržaj šećera morao biti korelisan s početnim, a temperatura odvijanja bioprocasa značajno utiče na dinamiku odvijanja svih metaboličkih funkcija. Viši početni sadržaj šećera očekivano daje viši rezidualni sadržaj, dok kod temperature zavisnost nije tako jasna. Posmatrano za iste početne sadržaje šećera, najmanji rezidualni sadržaj šećera imali su uzorci fermentisani na 25 °C (tabela 4.7), 11 g/L za uzorak koji je sadržao 30 g/L početnog šećera, a gotovo jednake sadržaje za uzorke koji su na početku fermentacije sadržali 70 i 50 g/L šećera

– 22, odnosno 21 g/L ukupnih šećera, dok su najviši imali oni kod kojih je temperatura odvijanja bioprocasa bila najviša (najveća vrednost 61 g/L, kod uzorka koji je sadržao 70 g/L na početku), što ukazuje da je 30 °C iznad optimalne temperature za rast i razvoj kombuha konzorcijuma, u kombinaciji s visokim početnim sadržajem šećera. Za najmanji početni sadržaj, brzina usvajanja šećera bila je najveća na najvišoj temperaturi, tako da je kombuha napitak sadržao svega 4 g/L rezidualnog šećera. Kako je sadržaj šećera u napitku izuzetno značajan za konzumenta, može se zaključiti da je temperatura od 25 °C najpogodnija, pošto se može očekivati da većina populacije želi da što više smanji, kako neselektivni unos kalorija, tako i unos kalorija iz prostih šećera koji imaju visok glikemijski indeks.

Tabela 4.8. Rezultati jednofaktorijalne analize varijansi modelovanog odziva rezidualnog sadržaja šećera u kombuha napicima na efluentu vinarije nakon tri dana fermentacije

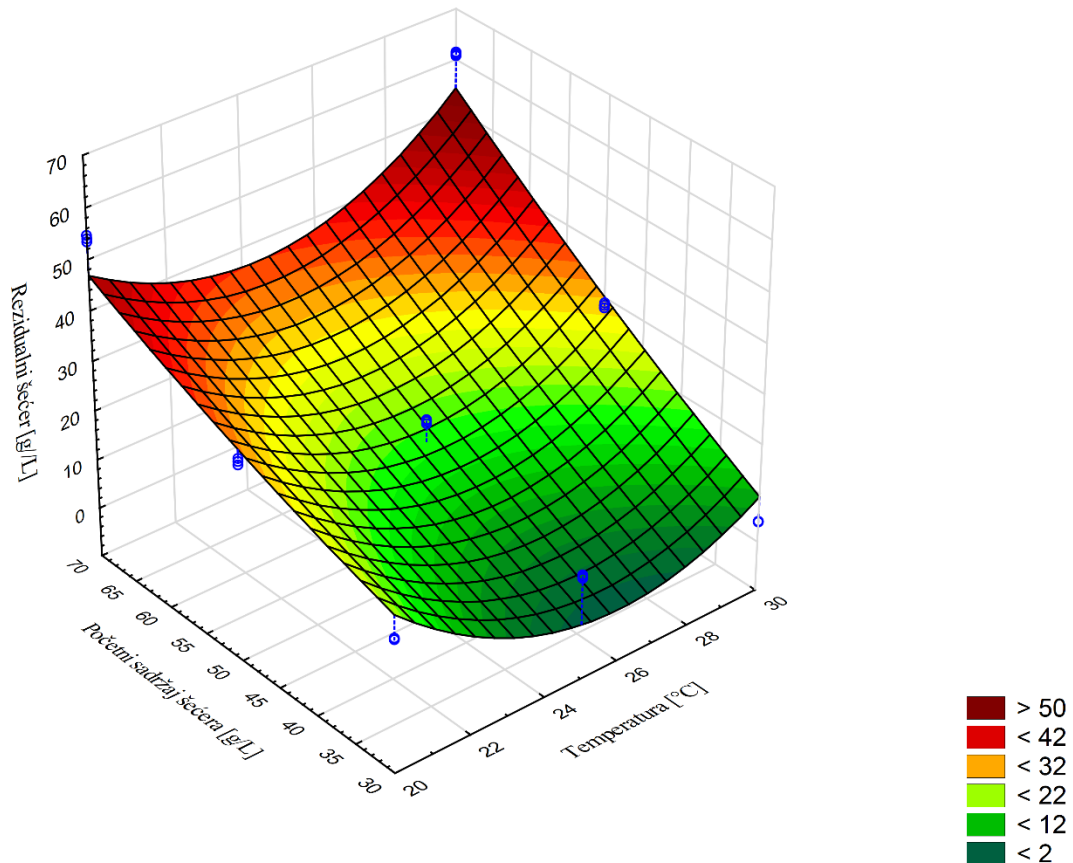
Odziv	Rezidual			Model			F- vrednost	p- vrednost	R ²
	DF	SS	MS	DF	SS	MS			
Rezidualni sadržaj šećera	18	3,230	0,181	8	8534,342	1066,793	5890,123	0,000	0,999

DF – broj stepeni slobode, SS – suma kvadrata, MS – suma srednjih kvadrata

Tabela 4.9. Koeficijenti regresione jednačine i njihove p-vrednosti modelovanog odziva rezidualnog sadržaja šećera u kombuha napicima na efluentu vinarije nakon tri dana fermentacije

Članovi		odse- čak	linearni		kvadratni		interak- cija
		b ₀	b ₁	b ₂	b ₁₁	b ₂₂	b ₁₂
Rezidualni sadržaj šećera	vrednost	409,510	-31,405	0,574	-0,757	0,004	0,049
	p-vrednost	0,000*	0,000*	0,000*	0,466838	0,626327	0,049*

*Efekti su statistički značajni, p < 0,05; 1 – temperatura; 2 – početni sadržaj šećera



Slika 4.19. Odzivna površina koja opisuje uticaj temperature fermentacije i početnog sadržaja šećera na rezidualni sadržaj ukupnih redukujućih šećera u kombuha napicima na efluentu vinarije nakon tri dana kultivacije

4.5. Sadržaj organskih kiselina u kombuha proizvodima na efluentu vinarije

Organske kiseline spadaju u glavne proizvode metabolizma kombuhe (Villarreal-Soto i sar., 2018). Najzastupljenije organske kiseline u tradicionalnom kombuha napitku su sirćetna i glukonska, kao značajni nosioci ukusa fermentisanog napitka (Leal i sar., 2018; Sknepnek i sar., 2021). Glavni proizvođači organskih kiselina su sirćetne bakterije, iako se ne bi smeo zanemariti uticaj kvasaca i mlečno-kiselih bakterija. U ranim fazama fermentacije, kvasci konvertuju šećere u etanol i ugljenik(IV)-oksid, a zatim sirćetne bakterije prevode glukozu i etanol u nekoliko organskih kiselina, uključujući glukonsku, sirćetnu, limunsku, ćilibarnu i malonsku (Li i sar., 2022; Sknepnek i sar., 2021; Tran i sar., 2020). Osim kiselom, organske kiseline, u manjoj meri, doprinose gorkom i oštrom ukusu napitka, mada se ipak ne navode kao glavni činiooci gorke note kombuha napitka (Rubico i McDaniel, 1992; Siebert, 1999).

U svim uzorcima kombuha proizvoda, kao i u razblaženim, neinokulisanim podlogama i u inicijalnom supstratu meren je sadržaj oksalne, vinske, mravlje, jabučne, malonske, mlečne, sirćetne, limunske i ćilibarne kiseline (tabela 4.10).

Sadržaj sirćetne kiseline je primetno rastao s trajanjem procesa i višim sadržajem početnog šećera, posmatrano nakon devet dana fermentacije, dok je nakon tri i šest dana uticaj početnog sadržaja šećera značajno manje izražen. Temperature od 30 i 25 °C su slično uticale na sintezu sirćetne kiseline, tako su uzorci koji su imali jednak sadržaj šećera, nakon devet dana fermentacije, sadržali približne koncentracije sirćetne kiseline, dok su odgovarajući kombuha proizvodi fermentisani na 20 °C sadržali 3–8 g/L manje sirćetne kiseline. Međutim, ovaj uticaj temperature je izraženiji s dužim trajanjem procesa. Do trećeg dana, sadržaji kiseline izmereni na 20 i 25 °C su slični, dok je na 30 °C izmeren približno dvostruko veći sadržaj sirćetne kiseline. S dužim trajanjem fermentacije, rastao je sadržaj sirćetne kiseline preko granice ugodnosti za konzumaciju. Najviši sadržaj zabeležen je nakon devet dana fermentacije na 30 °C kod uzorka sa 70 g/L početnog sadržaja šećera i iznosio je 14,63 g/L. Na temperaturi od 20 °C, proizvodnja sirćetne kiseline bila je, približno, dva puta manja nego na višim temperaturama. Nakon devet dana fermentacije na 20 °C izmereno je 6,33, 5,79 i 5,35 g/L sirćetne kiseline kod uzoraka sa 70, 50 i 30 g/L početnog šećera, redom; dok je za iste sadržaje šećera na 25 °C mereno 14,31, 11,80 i 7,18 g/L, redom, a na 30 °C 14,63, 12,63 i 8,71 g/L sirćetne kiseline, redom.

Oksalna kiselina se u prirodi javlja u mnogim biljkama (spanaću, đumbiru, čokoladi, rabarbari, difembahiji, itd.). Nastaje oksidacijom glikolata i glioksilata enzimima glikolat-oksidaza ili izocitrat-liaza. S kalcijumom, natrijumom, kalijumom, gvožđem i magnezijumom gradi teško rastvorne oksalate. Smatra se da je značajni deo metaboličkog puta detoksikacije od metala kod biljaka. Povećani unos oksalne kiseline pospešuje nastanak kamena u bubregu, dok se povećanom konzumiranju lišća rabarbare u Britaniji tokom I svetskog rata (kao zamena za spanać) pripisuje nekoliko smrti, usled oštećenja želuca. Letalna doza oksalne kiseline za odraslu osobu je 15–30 g, mada postoje podaci da je unos i svega 5 g izazvao smrt. Industrijski se koristi u proizvodnji boja, mastila, izbeljivača, sredstava za čišćenje metala i drveta, prečišćenog metanola, glicerola i stabilnog cijanida, u farmaceutskoj, metalurškoj, keramičkoj i fotografskoj industriji, a smatra se prirodnom komponentom u medu, te je dozvoljena za upotrebu u biopčelarstvu (Einaga, 2014; García-Fernández i sar., 2014; Naudé i Naidoo, 2007; Silberhorn, 2005). Oksalna kiselina se uobičajeno javlja u kombuha proizvodima (Emiljanowicz i Malinowska-Pańczyk, 2020; Jayabalan i sar., 2014; D. Morales, 2020). Sadržaj u inicijalnom supstratu bio je 0,26 g/L, a najviši sadržaj izmeren je nakon devet dana fermentacije na 20 °C pri početnom sadržaju šećera od 70 g/L (0,97 g/L). Na 30 °C, za sva tri početna sadržaja šećera, sadržaj oksalne kiseline rastao je do šestog dana fermentacije, da bi se devetog smanjio. Na 25 °C je porast sadržaja oksalne kiseline kontinuiran, za proizvode sa 70 g/L početnog šećera, kod proizvoda koji su sadržali 50 g/L početnog šećera se uočava stagnacija sadržaja oksalne kiseline između šestog i devetog dana, dok je kod proizvoda s 30 g/L početnog šećera uočen blagi pad sadržaja oksalne kiseline između šestog i devetog dana fermentacije. Na 20 °C, samo je proizvod sa 70 g/L početnog šećera pokazao kontinuirani porast sadržaja oksalne kiseline, dok su proizvodi s nižim sadržajem šećera pokazali maksimalnu vrednost šestog dana, nakon čega je sadržaj oksalne kiseline opao, do devetog dana fermentacije.

Kada je početna koncentracija šećera bila 30 g/L, sadržaj vinske kiseline je, za tri dana, porastao na sve tri temperature kultivacije, iako razlika nije bila značajna, dok je maksimalni sadržaj od 1,77 g/L izmeren nakon šest i devet dana na 30 °C. S produžetkom fermentacije, do

devetog dana, sadržaj vinske kiseline nije značajnije varirao, pri čemu je najveći sadržaj među fermentisanim uzorcima, određena šestog dana na 30 °C, kod uzorka sa 70 g/L početnog sadržaja šećera (3,28 g/L). Najveći sadržaj među analiziranim uzorcima imao je inicijalni supstrat, 4,95 g/L. Ove vrednosti su značajno više nego kod kombuha napitka proizvedenog na zelenom čaju, kao i kardamonom i širaskim timijanom (*Zataria multiflora*) aromatiziranom kombuhom (Hopfe i sar., 2017; Shahbazi i sar., 2018), ali je uporedivo s prethodnim ispitivanjima na sličnom supstratu (Vukmanović i sar., 2020).

Mravlja kiselina nastaje redukcijom ugljen-dioksida katalizovanom format-dehidrogenazom (Maia i sar., 2021). Kombuha uobičajeno ne proizvodi značajnu količinu mravlje kiseline, međutim u pojedinim uzorcima su izmerene više nego dvostruko veće vrednosti nego kod inicijalnog supstrata (najviše posle tri dana fermentacije na 20 °C s 50 g/L početnog sadržaja šećera 0,62 g/L; inicijalni supstrat 0,26 g/L). Viša temperatura pospešuje razgradnju mravlje kiseline. Prosečni sadržaji mravlje kiseline u uzorcima kombuha proizvođa fermentisanih na 20, 25 i 30 °C bile su 0,33, 0,23 i 0,20 g/L, redom. Na 30 °C sadržaj mravlje kiseline, kod uzoraka sa 70 g/L početnog šećera ostaje u uskim granicama (od 0,26 do 0,34 g/L), dok za manje početne sadržaje šećera opada značajno više (do 0,01 g/L devetog dana s 30 g/L i 0,07 g/L s 50 g/L početnog sadržaja šećera). Kada je fermentacija izvođena na 25 °C, kombuha proizvod sa 70 g/L početnog sadržaja šećera je pokazao kontinuiran porast sadržaja mravlje kiseline, dok su proizvodi s 50 i 30 g/L početnog sadržaja šećera pokazali porast do šestog dana, a zatim opadanje, odnosno stagnaciju. Na 20 °C, u uzorku sa 70 g/L početnog šećera je do trećeg dana fermentacije sintetisano 0,42 g/L mravlje kiseline i sadržaj je ostao isti do kraja fermentacije. Kombuha proizvod kultivisan s 50 g/L početnog šećera pokazao je najviši zabeležen sadržaj mravlje kiseline nakon tri dana fermentacije, a zatim je sadržaj smanjivan do devetog dana. Nasuprot tome, kada je početni sadržaj šećera bio najmanji, najniži izmeren sadržaj bio je trećeg dana fermentacije.

Jabučna kiselina je značajan konstituent grožđa, međutim njen sadržaj često opada odmah nakon berbe. Sa druge strane, prisustvo jabučne kiseline u kombuha napitku se pripisuje metaboličkoj funkciji kvasaca (Jackson, 2014a, 2014e; Ye i sar., 2014). Sadržaj jabučne kiseline u inicijalnom supstratu iznosio je 4,95 g/L, što je više nego u fermentisanim uzorcima, u kojima je detektovan višestruko niži sadržaj (od 0,77 g/L nakon šest dana fermentacije na 30 °C sa 70 g/L početnog sadržaja šećera, dok kod uzoraka sa sva tri početna sadržaja šećera nakon tri dana fermentacije na 30 °C uopšte nije detektovana). Na 25 °C sve izmerene vrednosti su bile manje od 0,25 g/L, dok su nakon šestog dana fermentacije sve vrednosti bile niže od 0,10 g/L jabučne kiseline. Sadržaj jabučne kiseline u uzorcima fermentisanim na 20 °C kretao se između 0,13 g/L, nakon tri dana fermentacije s 30 g/L početnog šećera i 0,58, takođe nakon tri dana, ali s 50 g/L početnog sadržaja šećera. Kod uzoraka koji su na početku sadržali 70 i 50 g/L šećera, sadržaj jabučne kiseline je tokom fermentacije na 20 °C kontinuirano smanjivan, dok je kod uzoraka s 30 g/L početnog šećera sadržaj jabučne kiseline blago porastao do šestog dana, nakon čega se smanjio devetog. Drugi autori su zabeležili slične vrednosti sadržaja u kombuha napicima na podlogama čaja od hrizanteme i hajdučke trave, dok su na čaju od nane, belom čaju i čaju od kozokrvine (*Lonicera japonica*) zabeleženi nešto niži sadržaji, a na kombuha napitku na crnom čaju nije ni detektovana (Vitas i sar., 2018; Zhang i sar., 2021).

Malonska kiselina se, kao i jabučna, proizvodi u grožđu, a u organizmu ima funkciju prekursora u sintezi masnih kiselina. Koristi se u proizvodnji poliamida, parfema, adheziva, lubrikanata, poliestera i biodegradabilne termoplastike. U farmaceutskoj i prehrambenoj industriji ima značajnu ulogu u kontroli kiselosti lekova i hrane (Apelblat i Manzurola, 2016). Najviši sadržaj malonske kiseline izmeren je u inicijalnom supstratu (0,81 g/L). Iako su sadržaji bili niski, uočava se da, u odnosu na nulti dan fermentacije, kombuha kultura sintetiše male količine malonske kiseline. Nultog dana je izmereno 0,65, 0,42 i 0,29 g/L mravlje kiseline u uzorcima sa 70, 50 i 30 g/L početnog šećera, redom, dok su svi fermentisani uzorci imali sadržaj malonske kiseline u opsegu od 0,29 do 0,77 g/L, pri čemu su veći sadržaji zabeleženi kod uzoraka koji su imali veći početni sadržaj šećera. Najveći porast, od 0,42 g/L, izmeren je kod uzorka s 30 g/L početnog šećera, fermentisanog na 30 °C, između nultog i trećeg dana fermentacije. U prethodnim ispitivanjima proizvodnje kombuha napitaka na efluentu vinarije izmeren je niži sadržaj, dok je kod kombuha napitaka proizvedenih na crnom i zelenom čaju, kao i na čaju od nane, koprive, zove i dunje detektovan izuzetno nizak sadržaj, ili je bio ispod granice detekcije (Vitas i sar., 2020; Vukmanović i sar., 2020).

Mlečna kiselina ima širok spektar korisnih dejstava na ljudsko zdravlje, što se prvenstveno odnosi na funkciju osnaživanja imunog sistema, uz značajan doprinos regulaciji nivoa holesterola. Osim toga, ispoljava antikancerogeno dejstvo, a nedostatak mlečne kiseline otežava ćelijsko disanje (Jafari i Amini, 2019; Malbaša i sar., 2002; Ye i sar., 2014). U inicijalnom supstratu, izmeren je sadržaj mlečne kiseline od 1,76 g/L, što je značajno više nego u svim ostalim uzorcima. Već u razblaženoj podlozi određen je značajno niži sadržaj (od 0,02 do 0,07 g/L), verovatno usled sterilizacije. Nakon dodatka inokuluma mlečnu kiselinu nije bilo moguće odrediti u uzorku. Veća temperatura fermentacije ne pogoduje biosintezi mlečne kiseline, pošto na 25 i 30 °C, osim u jednom uzorku, nije detektovana (nakon tri dana fermentacije na 25 °C sa 70 g/L početnog šećera izmereno je 0,01 g/L mlečne kiseline), dok je na 20 °C u svim uzorcima, osim u jednom, nakon devet dana s 30 g/L početnog sadržaja šećera, detektovana. Sadržaji su bili veoma mali, od 0,01 do 0,07 g/L, ali se, nesumnjivo, pri fermentaciji na 20 °C biosintetiše određena količina mlečne kiseline. Drugi autori su, na podlozi od crnog čaja merili sličan sadržaj mlečne kiseline, dok je na zelenom čaju zabeleženo dvostruko više, a na ulong čaju četverostruko više nego na efluentu vinarije, nakon sedam dana fermentacije na 25 °C (Osiripun i Apisitwong, 2021). U sojinom mleku fermentisanom kombuha kulturom zabeleženo je 10 do 20 puta više mlečne kiseline, uz kraće vreme fermentacije, i primetan porast tokom bioprocasa (Xia i sar., 2019).

Limunska kiselina se javlja u oksidativnom metabolizmu skoro svih organizama i predstavlja krajnji korak u razgradnji ugljenih hidrata, masti i proteina do ugljenik(IV)-oksida i vode, uz oslobađanje energije potrebne za rast i razvoj. U vinu je prisutna primarno kao proizvod Krebsovog ciklusa metabolizma kvasaca. U napicima, želeima i pekmezima limunska kiselina se ponaša kao konzervans istovremeno dajući oštar i kiseo ukus, dok u proizvodnji tofua sprečava rast mikroorganizama (Hesseltine, 1965; Jackson, 2014e; Karlson, 1988; Poerwono i sar., 2001). U inicijalnom supstratu, limunska kiselina je bila prisutna u maloj količini (0,11 g/L). Nakon fermentacije, detektovana je sporadično, bez uočljive pravilnosti, vezano za temperaturu ili trajanje fermentacije. U svim slučajevima sadržaji su bili mali, ne prelazeći 0,45 g/L, mada je većina uzoraka imala sadržaj limunske kiseline manji od 0,1 g/L. Drugi autori su

je kod kombuha napitaka na crnom i zelenom čaju detektovali samo posle tri dana fermentacije, i to u veoma malim količinama, do 0,1 g/L (Jayabalan i sar., 2007).

Ćilibarna kiselina je jedan od sporednih proizvoda pri transformaciji šećera u alkohol (Ye i sar., 2014). Napicima daje gorak ukus (Rubico i McDaniel, 1992). Pri fermentaciji na 20 °C nije uopšte određena, dok je na 30 °C određena nakon tri dana fermentacije u svim uzorcima, a nakon šest i devet dana, samo u uzorku sa 70 g/L početnog šećera. Na 25 °C je prisustvo ćilibarne kiseline određeno sporadično, nakon šest i devet dana u uzorcima sa 70 i 30 g/L početnog šećera, pri čemu je u uzorcima s višim sadržajem šećera mereno oko 0,20 g/L, a na nižem ispod 0,05 g/L ćilibarne kiseline. Kod drugih autora je, čak i pri veoma dugoj fermentaciji, izmerena u malim količinama u kombuha napitku sa zelenim čajem zaslađenim smeđim šećerom (Savary i sar., 2021).

Tabela 4.10. Sadržaj organskih kiselina u kombuha proizvodima na efluentu vinarije i kontrolnim uzorcima

τ [dan]	Početni sadržaj šećera [g/L]	t [°C]	Kiselina [g/L]																	
			Ćilibarna	Limunska	Sirćetna	Mlečna	Malonska	Jabučna	Mravlja	Vinska	Oksalna									
Inicijalni supstrat																				
Podloga	70		0,17±0,02	0,11±0,04	1,42±0,08	1,76±0,04	0,81±0,01	4,95±0,31	0,26±0,08	4,95±0,31	0,26±0,08	4,95±0,31	0,26±0,08	0,81±0,01	4,95±0,31	0,26±0,08	4,95±0,31	0,26±0,08	4,95±0,31	0,26±0,08
Podloga	50		0,08±0,07	ND	0,06±0,00	0,07±0,00	0,72±0,03	0,73±0,03	ND±ND	2,64±0,10	0,21±0,01	2,64±0,10	0,21±0,01	0,72±0,03	2,64±0,10	0,21±0,01	2,64±0,10	0,21±0,01	2,64±0,10	0,21±0,01
Podloga	30		0,03±0,00	ND	0,07±0,00	0,02±0,00	0,38±0,00	0,63±0,00	0,50±0,00	2,03±0,02	0,16±0,01	2,03±0,02	0,16±0,01	0,38±0,00	2,03±0,02	0,16±0,01	2,03±0,02	0,16±0,01	2,03±0,02	0,16±0,01
0	70		0,01±0,00	ND	0,02±0,00	0,03±0,00	0,31±0,02	0,33±0,01	ND	1,17±0,05	0,10±0,01	1,17±0,05	0,10±0,01	0,31±0,02	1,17±0,05	0,10±0,01	1,17±0,05	0,10±0,01	1,17±0,05	0,10±0,01
0	50		0,49±0,05	0,03±0,02	1,51±0,05	ND	0,65±0,00	0,96±0,00	0,34±0,00	2,56±0,00	0,22±0,00	2,56±0,00	0,22±0,00	0,65±0,00	2,56±0,00	0,22±0,00	2,56±0,00	0,22±0,00	2,56±0,00	0,22±0,00
0	30		0,32±0,09	0,01±0,01	1,76±0,99	ND	0,42±0,17	0,38±0,03	0,23±0,00	1,18±0,00	0,08±0,00	1,18±0,00	0,08±0,00	0,42±0,17	1,18±0,00	0,08±0,00	1,18±0,00	0,08±0,00	1,18±0,00	0,08±0,00
3	70	30	0,28±0,08	0,03±0,00	1,62±0,11	ND	0,29±0,00	0,42±0,00	0,30±0,02	1,31±0,01	0,12±0,00	1,31±0,01	0,12±0,00	0,29±0,00	1,31±0,01	0,12±0,00	1,31±0,01	0,12±0,00	1,31±0,01	0,12±0,00
3	50	30	0,39±0,39	0,09±0,04	5,08±0,01	ND	0,68±0,00	ND	0,28±0,00	2,85±0,05	0,34±0,03	2,85±0,05	0,34±0,03	0,68±0,00	2,85±0,05	0,34±0,03	2,85±0,05	0,34±0,03	2,85±0,05	0,34±0,03
3	30	30	0,14±0,14	0,23±0,01	4,58±0,00	ND	0,51±0,01	ND	0,30±0,11	2,36±0,11	0,24±0,01	2,36±0,11	0,24±0,01	0,51±0,01	2,36±0,11	0,24±0,01	2,36±0,11	0,24±0,01	2,36±0,11	0,24±0,01
6	30	30	0,96±0,76	ND	4,91±0,16	ND	0,73±0,06	ND	0,24±0,03	1,40±0,02	0,14±0,00	1,40±0,02	0,14±0,00	0,73±0,06	1,40±0,02	0,14±0,00	1,40±0,02	0,14±0,00	1,40±0,02	0,14±0,00
6	70	30	0,55±0,09	ND	10,12±0,07	ND	0,74±0,02	0,77±0,01	0,26±0,00	3,28±0,01	0,59±0,00	3,28±0,01	0,59±0,00	0,74±0,02	3,28±0,01	0,59±0,00	3,28±0,01	0,59±0,00	3,28±0,01	0,59±0,00
6	50	30	ND	ND	10,98±0,12	ND	0,51±0,02	0,58±0,01	0,14±0,00	2,32±0,03	0,24±0,02	2,32±0,03	0,24±0,02	0,51±0,02	2,32±0,03	0,24±0,02	2,32±0,03	0,24±0,02	2,32±0,03	0,24±0,02
6	30	30	ND	ND	8,76±0,06	ND	0,34±0,01	0,33±0,01	0,19±0,01	1,77±0,04	0,10±0,01	1,77±0,04	0,10±0,01	0,34±0,01	1,77±0,04	0,10±0,01	1,77±0,04	0,10±0,01	1,77±0,04	0,10±0,01

tabela 4.10. Nastavak

τ [dan]	Početni sadržaj šećera [g/L]	t [°C]	Kiselina [g/L]									
			Čilibarna	Limunska	Sirćetna	Mlečna	Malonska	Jabučna	Mravlja	Vinska	Oksalna	
9	70	30	0,41±0,41	ND	14,63±0,02	ND	0,77±0,00	0,56±0,01	0,28±0,00	1,86±0,02	0,41±0,02	
9	50	30	ND	0,45±0,02	12,63±0,01	ND	0,64±0,05	0,72±0,02	0,07±0,00	2,69±0,00	0,17±0,00	
9	30	30	ND	0,05±0,05	8,71±0,03	ND	0,41±0,01	0,32±0,01	0,01±0,00	1,77±0,01	0,11±0,01	
3	70	25	ND	0,31±0,01	2,46±0,02	0,01±0,01	0,61±0,01	0,24±0,00	0,17±0,01	2,56±0,19	0,83±0,12	
3	50	25	ND	0,12±0,12	1,64±0,02	ND	0,56±0,09	0,20±0,00	0,12±0,01	2,05±0,01	0,56±0,00	
3	30	25	ND	0,15±0,02	2,27±0,05	ND	0,29±0,00	0,10±0,00	0,10±0,00	1,22±0,09	0,36±0,04	
6	70	25	0,22±0,01	ND	11,96±0,05	ND	0,69±0,03	0,09±0,00	0,40±0,00	2,75±0,00	0,89±0,00	
6	50	25	ND	0,21±0,07	9,61±0,01	ND	0,38±0,01	0,09±0,00	0,30±0,00	2,03±0,02	0,58±0,00	
6	30	25	0,04±0,04	ND	7,03±0,21	ND	0,33±0,01	0,06±0,00	0,19±0,00	1,25±0,01	0,27±0,00	
9	70	25	0,20±0,20	ND	14,31±0,01	ND	0,71±0,00	0,04±0,00	0,49±0,00	2,86±0,00	0,94±0,00	
9	50	25	ND	0,11±0,01	11,80±0,04	ND	0,40±0,11	0,08±0,09	0,13±0,13	2,77±0,68	0,58±0,08	
9	30	25	0,01±0,01	ND	7,18±0,00	ND	0,30±0,01	0,04±0,00	0,19±0,00	1,34±0,00	0,25±0,00	

tabela 4.10. Nastavak

τ [dan]	Početni sadržaj še- ćera [g/L]	t [°C]	Ćilbarna	Limunska	Sirćetna	Mlečna	Kiselina [g/L]						Oksalna
							Malonska	Jabučna	Mravlja	Vinska			
3	70	20	ND	0,06±0,04	2,59±0,02	0,02±0,00	0,62±0,03	0,57±0,04	0,42±0,03	2,98±0,01	0,55±0,00		
3	50	20	ND	0,11±0,05	2,28±0,03	0,03±0,02	0,29±0,16	0,58±0,58	0,62±0,33	1,19±1,00	0,45±0,03		
3	30	20	ND	ND	2,69±0,09	0,03±0,02	0,33±0,04	0,13±0,00	0,09±0,00	1,26±0,04	0,54±0,04		
6	70	20	ND	ND	5,01±0,00	0,03±0,00	0,69±0,02	0,50±0,01	0,42±0,00	2,85±0,01	0,73±0,00		
6	50	20	ND	0,04±0,04	3,51±0,01	0,03±0,00	0,39±0,01	0,38±0,02	0,27±0,00	1,88±0,06	0,53±0,06		
6	30	20	ND	ND	4,09±0,01	0,01±0,00	0,32±0,00	0,19±0,00	0,24±0,00	1,41±0,03	0,57±0,01		
9	70	20	ND	0,09±0,00	6,33±0,11	0,07±0,04	0,66±0,14	0,46±0,04	0,42±0,00	2,65±0,01	0,97±0,00		
9	50	20	ND	0,04±0,04	5,79±0,00	0,02±0,00	0,40±0,02	0,31±0,00	0,27±0,00	1,82±0,05	0,45±0,04		
9	30	20	ND	0,03±0,00	5,35±0,07	ND	0,31±0,01	0,17±0,00	0,22±0,00	1,50±0,00	0,46±0,00		

4.5.1. Modelovanje sadržaja sirćetne, vinske i oksalne kiseline u kombuha napicima na efluentu vinarije nakon tri dana fermentacije

Vrednosti sadržaja tri najzastupljenije kiseline, sirćetne, vinske i oksalne modelovane su i modeli su grafički prikazani odzivnim površinama (slika 4.20). Iako vinska kiselina nije karakteristični proizvod kombuha fermentacije, ovde je, zbog korišćene sirovine, prisutna u značajnoj meri, pa je njen sadržaj, takođe modelovan, u cilju provere kako njen povećani sadržaj utiče na metabolizam kombuha kulture i eventualnu indukovanu sintezu dalje količine ili dekompoziciju prisutne vinske kiseline.

Rezultate jednofaktorijalne analize varijansi prikazuje tabela 4.11, dok koeficijente regresione jednačine modelovanih odziva prikazuje tabela 4.12. Svi modeli su značajni pri intervalu poverenja od 95%, uz F-vrednosti 1243,413; 13,620 i 58,596 za model sadržaja sirćetne, vinske i oksalne kiseline, redom.

Tabela 4.11. Rezultati jednofaktorijalne analize varijansi modelovanih odziva sadržaja sirćetne, vinske i oksalne kiseline u kombuha napicima na efluentu vinarije nakon tri dana fermentacije

Odzivi	Rezidual			Model			F- vrednost	p- vrednost	R ²
	DF	SS	MS	DF	SS	MS			
Sirćetna kiselina	18	0,074	0,004	8	41,138	5,142	1243,413	0,000	0,963
Vinska kiselina	18	2,129	0,118	8	12,887	1,611	13,620	0,000	0,795
Oksalna kiselina	18	0,039	0,002	8	1,007	0,126	58,596	0,0000	0,975

DF – broj stepeni slobode, SS – suma kvadrata, MS – suma srednjih kvadrata

Model za sadržaj sirćetne kiseline je imao veoma dobru pouzdanost uz koeficijent determinacije od 0,963 pri čemu su svi faktori bili statistički značajni, na nivou od 0,05. Rezultati su u skladu s očekivanjem jer je sirćetna kiselina dominantni proizvod metabolizma kombuha kulture, dok je u neinokulisanom supstratu izmeren zanemarljivo mali sadržaj od 0,02 do 0,07 g/L. Model ukazuje da viša temperatura povećava dinamiku bioproces, a veći sadržaj šećera daje veću količinu osnovnog nutrijenta i gradivnog materijala za biosintezu kiseline (slika 4.20a). Sadržaj šećera je mnogo manje značajan za obim sinteze sirćetne kiseline u prva tri dana fermentacije od temperature na kojoj se odvija bioproces. Uzorci fermentisani na 30 °C imali su sadržaj sirćetne kiseline između 4,58 i 5,08 g/L, dok je najniži sadržaj izmeren u uzorku s 5% šećera inkubiranom na 25 °C (1,64 g/L). Sve ove vrednosti su značajano više od zabeleženih kod kombuha napitka na tradicionalnom supstratu i na melasi kao izvoru ugljenika (Jayabalan i sar., 2007; Malbaša, Lončar, Djurić, i sar., 2008), dok se kombuha proizvedena na afričkoj gorušici (*Brassica tournefortii*) ponašala slično (Rahmani i sar., 2019).

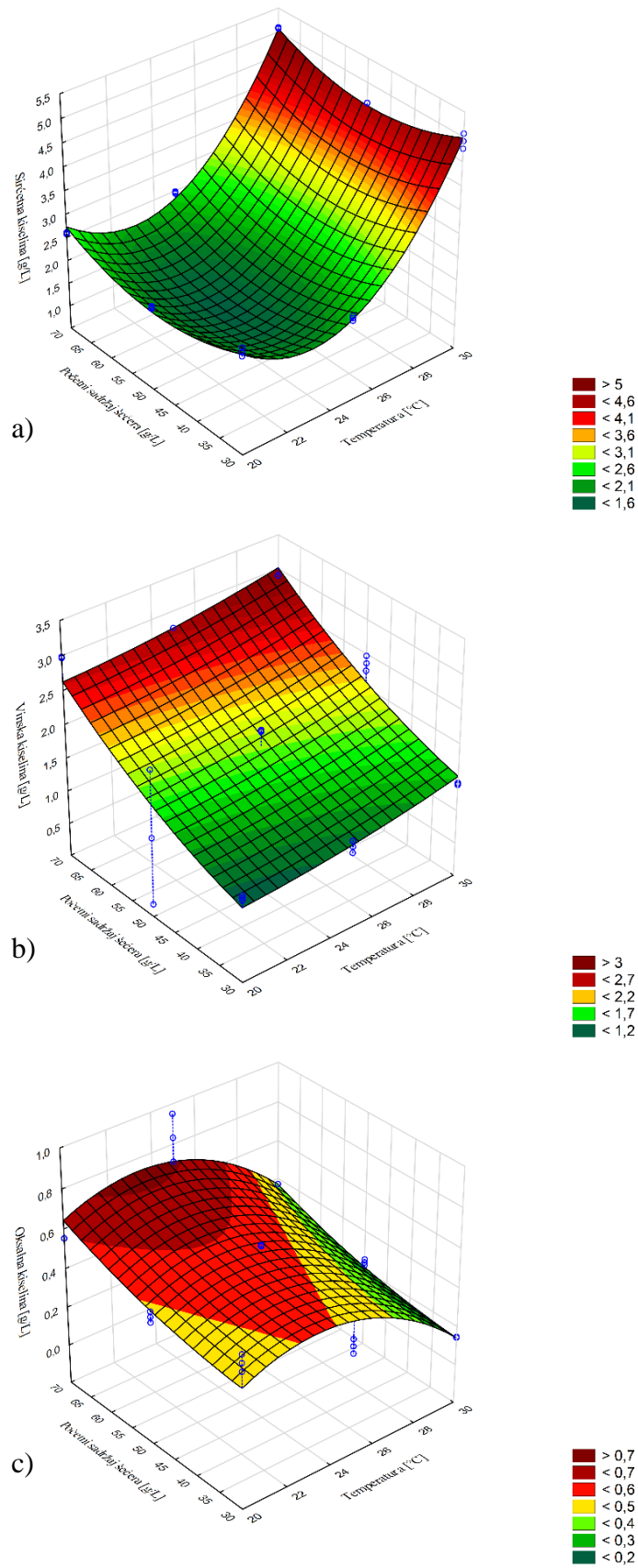
Model sadržaja vinske kiseline bio je manje pouzdanosti, s preko 20% varijacija koje ne može da objasni pri čemu nijedan parametar ne pokazuje statističku značajnost na nivou od 0,05 što je očekivano pošto vinska kiselina nije tipičan proizvod metabolizma kombuha kulture, već potiče iz korišćene sirovine. Kako je podloga pripremana razblaživanjem inicijalnog supstrata čistom vodom, to objašnjava krajnje linearni uticaj sadržaja šećera na sadržaj vinske kiseline (slika 4.20b), odnosno, s većim razblaženjem inicijalnog supstrata, opadao je sadržaj vinske kiseline. Za razliku od sinteze sirćetne kiseline, temperatura ne pokazuje značajan uticaj na sadržaj vinske kiseline, mada se može zaključiti da je kombuha kultura proizvodila određenu količinu vinske kiseline, pošto je većina uzoraka, nakon tri dana kultivacije, imala viši sadržaj nego na početku fermentacije. Trećeg dana, uzorak sa 70 g/L je na 25 °C imao neznatno manji sadržaj vinske kiseline nego pre inokulacije, dok je na 20 i 30 °C sadržaj vinske kiseline povećan. Pri 50 g/L šećera, porast je uočen na 25 i 30 °C, dok je na 20 °C sadržaj gotovo prepolovljen.

Model sadržaja oksalne kiseline u kombuha napicima je, takođe, imao visok koeficijent determinacije (0,975) pri čemu su linearni i kvadratni efekti temperature bili značajni na nivou od 0,05, dok početni sadržaj šećera ne pokazuje statistički značajan uticaj. Niži sadržaji oksalne kiseline izmereni su kod uzoraka fermentisanih na 30 °C (slika 4.20c), što ukazuje da bi kombuha napitak trebalo proizvoditi na višoj temperaturi, ukoliko se želi smanjiti sadržaj nepoželjne oksalne kiseline.

Tabela 4.12. Koeficijenti regresione jednačine i njihove *p*-vrednosti modelovanih odziva sadržaja sirćetne, vinske i oksalne kiseline u kombuha napicima na efluentu vinarije nakon tri dana fermentacije

Članovi		odsečak	linearni		kvadratni	interakcija	
		b₀	b₁	b₂	b₁₁	b₂₂	b₁₂
Sirćetna kiselina	vrednost	38,913	-2,928	-0,140	0,063	0,001	0,001
	<i>p</i> -vrednost	0,000*	0,000*	0,000*	0,000*	0,000*	0,000*
Vinska kiselina	vrednost	0,848	-0,055	0,002	0,009	0,0004	-0,0007
	<i>p</i> -vrednost	0,857	0,877	0,717	0,860	0,318	0,595
Oksalna kiselina	vrednost	-3,386	0,364	-0,016	-0,008	0,000	0,000
	<i>p</i> -vrednost	0,003*	0,000*	0,177	0,000*	0,272	0,105

*Efekti su statistički značajni, $p < 0,05$; 1 – temperatura; 2 – početni sadržaj šećera

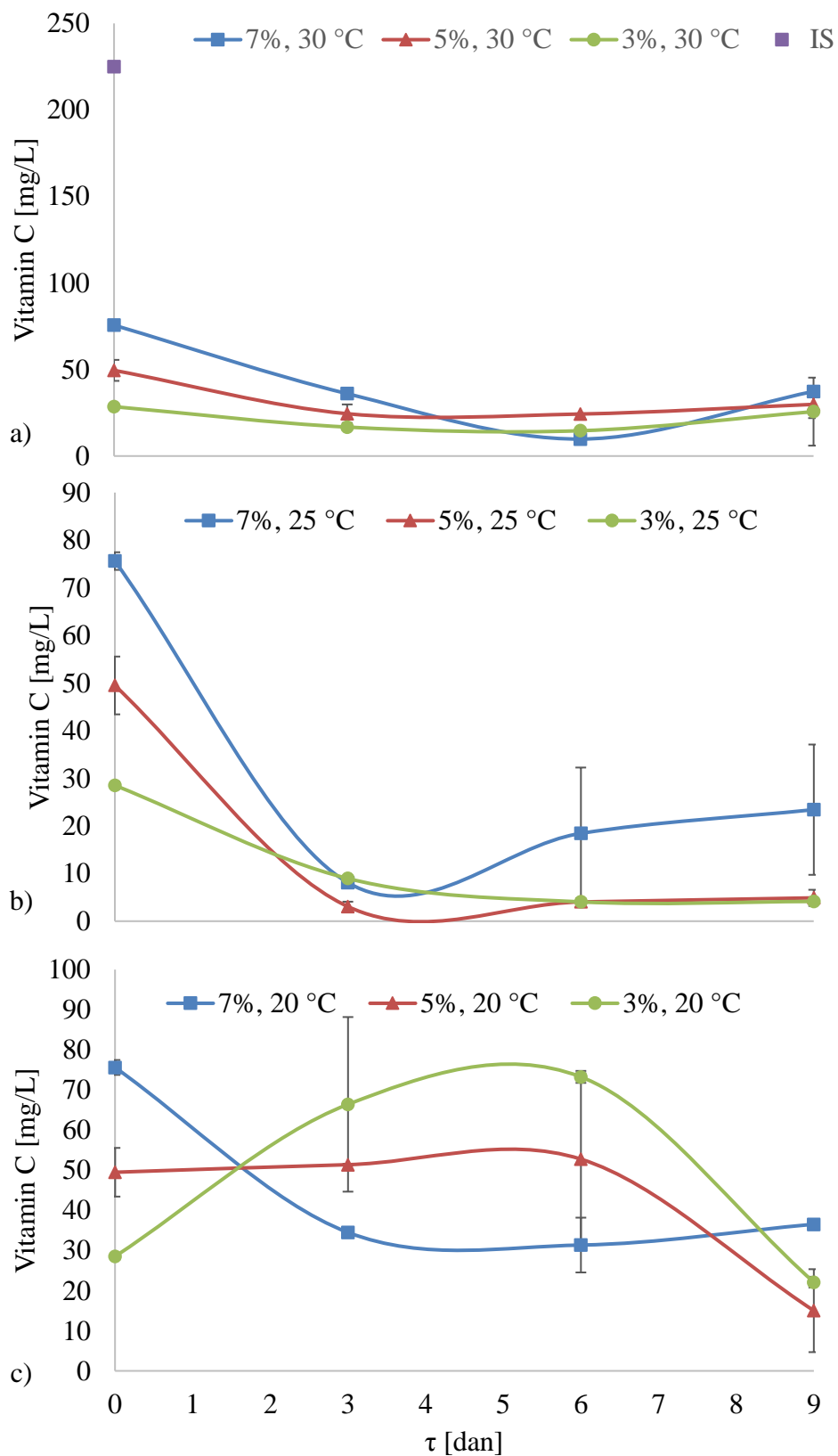


Slika 4.20. Odzivne površine koje opisuju uticaj temperature fermentacije i početnog sadržaja šećera na sadržaj organskih kiselina nakon tri dana fermentacije kombucha napitaka na efluentu vinarije za sadržaj: a) sirćetne, b) vinske i c) oksalne kiseline

4.6. Sadržaj vitamina C u kombuha proizvodima na efluentu vinarije

Vitamin C (askorbinska kiselina) se kod viših biljaka pretvara u vinsku kiselinu, a u grožđu je podložna brzom oksidaciji nakon pucanja bobice. Oksidacijom prelazi u dehidroaskorbinsku kiselinu, a zatim u oksalnu i treonsku, dok neoksidativnom degradacijom nastaje furfural (DeBolt i sar., 2006; Jackson, 2014e; Kurata i Sakurai, 1967).

Najveći sadržaj vitamina C izmeren je u inicijalnom supstratu, što je očekivano, jer ga Vitaceae sintetišu i koriste u kataboličkoj transformaciji u vinsku kiselinu. U neinokulisanim podlogama sa 70, 50 i 30 g/L početnog šećera mereno je 118, 72 i 37 mg/L vitamina C, redom. Na 30 i 25 °C je u prva tri dana uočen pad u odnosu na početak fermentacije, dok je na 20 °C sadržaj vitamina C smanjen samo kod uzorka sa 70 g/L ukupnih šećera (slika 4.21). Na 30 °C blagi porast sadržaja vitamina C se može uočiti između šestog i devetog dana, na 25 °C rast se uočava između trećeg i šestog dana (sem za uzorak koji je sadržao 30 g/L početnog šećera, kod koga je sadržaj vitamina C kontinuirano opadao), dok na 20 °C uzorci s 50 i 30 g/L ukupnih šećera imaju porast sadržaja vitamina C već u prva tri dana fermentacije. Međutim, uzorci s 50 i 30 g/L fermentisani na 20 °C imali su oštar pad sadržaja vitamina C između šestog i devetog dana fermentacije, dok je kod uzorka sa 70 g/L početnog šećera tek tada zabeležena sinteza vitamina C. Među uzorcima kombuha napitaka nakon tri dana fermentacije, najveći sadržaj vitamina C (66 mg/L) određen je kod uzorka s 30 g/L početnog šećera fermentisanog na 20 °C, do su sva tri uzorka fermentisana na 25 °C sadržala manje od 10 mg/L vitamina C. Na 30 °C je sa porastom početnog sadržaja šećera rastao sadržaj vitamina C, dok se na 20 °C smanjivao. Pojedini autori su u kombuha napitku proizvedenom na zaslađenom crnom čaju izmerili značajno veći sadržaj vitamina C (1510 mg/L) (Bauer-Petrovska i Petrushevska-Tozi, 2000), nego u napitku na efluentu vinarije. Drugi autori su merili niže sadržaje (oko 3 mg/L) (Malbaša i sar., 2002), nego na efluentu vinarije, u rasponu od 0 mg/L na samom početku do 29 mg/L, nakon 10 dana fermentacije (Malbaša i sar., 2011), dok kod kombuha napitka na morskoj travi (*Porphyra dentata*) nije određen uopšte, izuzev na samom početku fermentacije (Aung i Eun, 2021). Kod kombuha napitka proizvedenog na gravioli (*Annona muricata* L.) uz galaktomanan kao izvor ugljenika izmereno je najviše 33 mg/L vitamina C, nakon 14 dana fermentacije (Candra i sar., 2021).



Slika 4.21. Sadržaj vitamina C u kombuha proizvodima na efluentu vinarije fermentisanim na a) 30 °C, b) 25 °C i c) 20 °C, na 3, 5 i 7% polaznog sadržaja šećera

4.6.1. Modelovanje sadržaja vitamina C u kombuha napicima na efluentu vinarije nakon tri dana fermentacije

Rezultate ANOVA jednofaktorijalne analize varijansi prikazuje tabela 4.13, dok su koeficijenti regresione jednačine i njihov pojedinačni značaj takođe prikazani (tabela 4.14). Model je značajan pri intervalu poverenja od 95% uz F-vrednost od 60,936. Visoka vrednost koeficijenta determinacije ukazuje da model sa zadovoljavajućom preciznošću opisuje ponašanje sistema u blizu 95% ispitivanih slučajeva. Model je grafički prikazan odzivnom površinom (slika 4.22). Statistički značajni parametri bili su svi osim kvadratnog uticaja početnog sadržaja šećera, s tim što je temperatura fermentacije imala izražen negativan uticaj, i kao linearni i kao kvadratni član, dok je uticaj početnog sadržaja šećera pozitivan. Kao statistički značajan, izdvaja se i uticaj interakcije dva ispitivana parametra. Posmatrajući grafički prikaz modela, može se uočiti da se viši sadržaj vitamina C dobija pri ekstremnim uslovima temperature i sadržaja šećera, pri čemu je najviši sadržaj predviđen za najviše vrednosti ispitivanih procesnih parametara. Nasuprot tome, funkcija modela ima minimum na srednjoj temperaturi i najmanjem sadržaju šećera. Interesantno je da je na 20 °C porast sadržaja šećera uticao na smanjenje sadržaja vitamina C, dok je na 30 °C porast sadržaja šećera istovremeno značio i porast sadržaja vitamina C.

Tabela 4.13. Rezultati jednofaktorijalne analize varijansi modelovanog odziva sadržaja vitamina C u kombuha napicima na efluentu vinarije nakon tri dana fermentacije

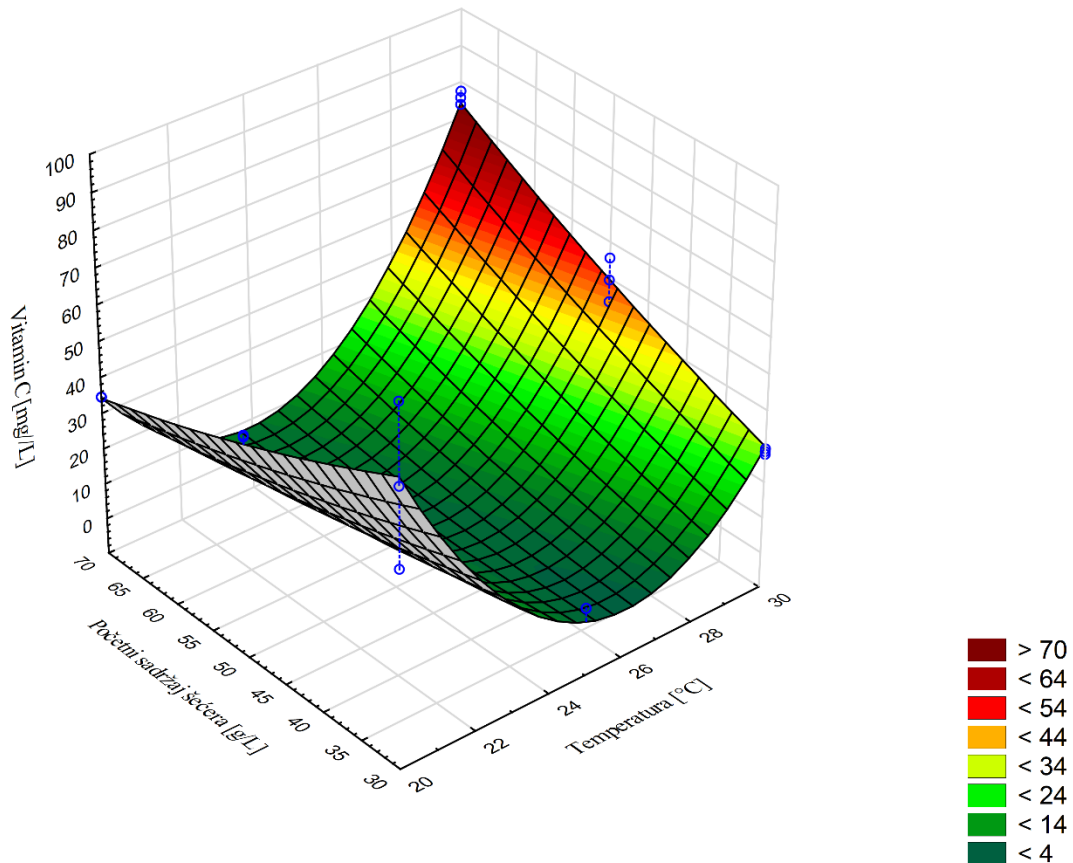
Odziv	Rezidual			Model			F- vrednost	p- vrednost	R ²
	DF	SS	MS	DF	SS	MS			
Vitamin C	21	1143	54,43	5	16583	3316	60,936	0,000	0,936

DF – broj stepeni slobode, SS – suma kvadrata, MS – suma srednjih kvadrata

Tabela 4.14. Koeficijenti regresione jednačine i njihove p-vrednosti modelovanog odziva sadržaja vitamina C u kombuha napicima na efluentu vinarije nakon tri dana fermentacije

Članovi		odsečak	linearni		kvadratni	interakcija	
		b ₀	b ₁	b ₂	b ₁₁	b ₂₂	b ₁₂
Vitamin C	vrednost	1366,81*	-98,39*	1,771*	-5,410*	0,006	0,198*
	p-vrednost	0,000*	0,000*	0,000*	0,000*	0,441	0,000*

*Efekti su statistički značajni, $p < 0,05$; 1 – temperatura; 2 – početni sadržaj šećera



Slika 4.22. Odzivna površina koja opisuje uticaj temperature fermentacije i početnog sadržaja šećera na sadržaj vitamina C u kombuha napicima na efluentu vinarije nakon tri dana fermentacije

4.7. Sadržaj etanola u kombuha proizvodima na efluentu vinarije

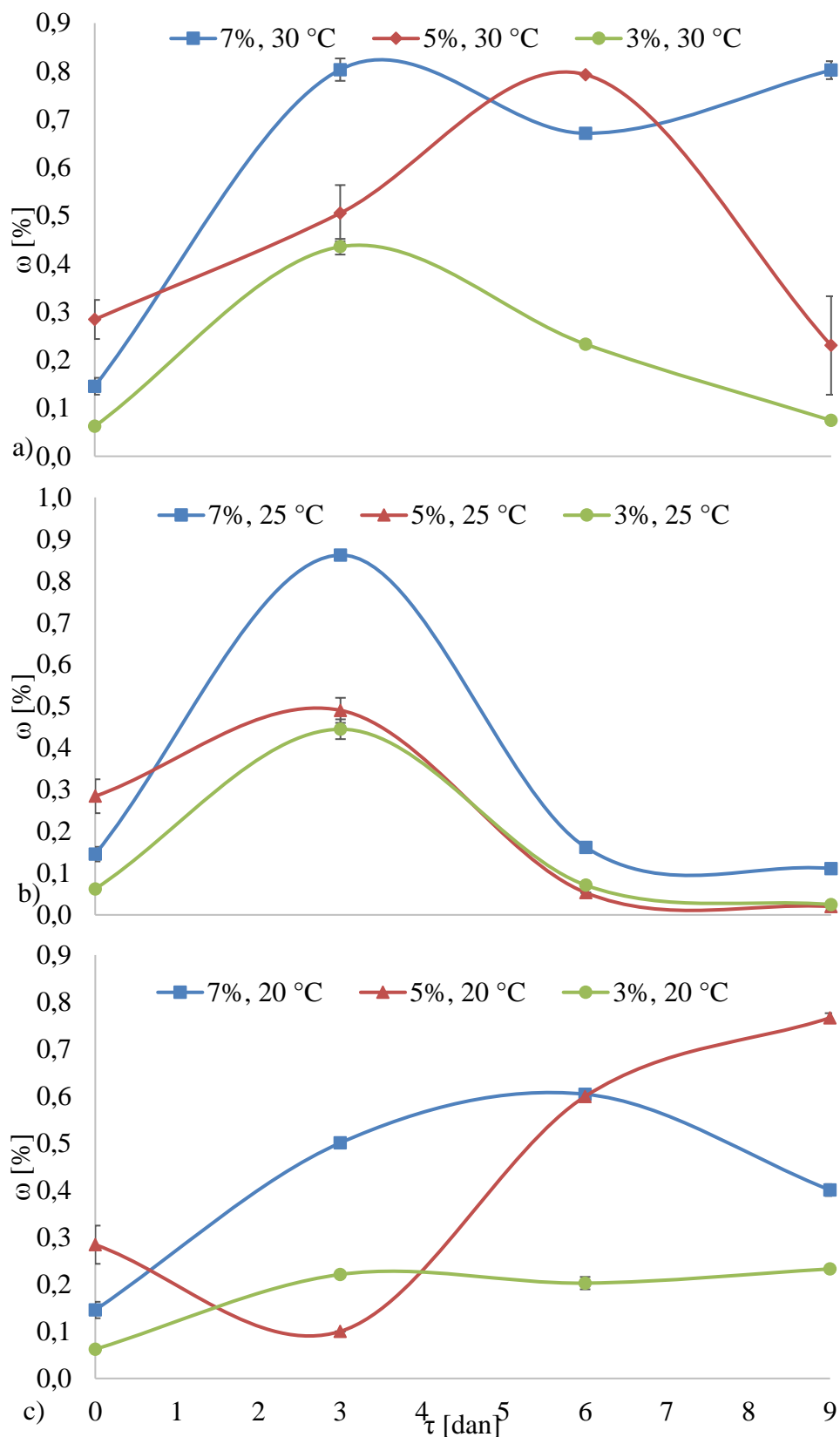
Etanol nastaje kao proizvod metaboličke aktivnosti kvasaca prisutnih u kombuha kulturi, uz nastanak ugljenik (IV)-oksida kao nusproizvoda reakcije, koji daje kombuha napitku blagu gaziranost. Sirćetne bakterije dalje oksiduju etanol do sirćetne kiseline (Jayabalan i sar., 2014).

Može se uočiti da je, kada je fermentacija izvođena na 20 °C sadržaj etanola rastao do šestog dana fermentacije, nakon čega je opadao, osim za uzorak s 50 g/L početnog sadržaja šećera, gde je opadao u prva tri dana, a zatim rastao do kraja fermentacije (slika 4.23). Nasuprot tome, kako viša temperatura znači i brže odvijanje bioprocesa (ranije iscrpljivanje podloge šećerima i prestanak sinteze etanola, a ubrzanje njegove oksidacije do sirćetne kiseline), na 25 °C kod sva tri ispitivana sadržaja šećera uočen pad sadržaja etanola nakon trećeg dana fermentacije. Na najvišoj ispitivanoj temperaturi pad je započeo nakon trećeg dana za uzorak s 30 g/L početnog šećera, nakon šest dana za uzorak s 50 g/L početnog šećera, dok je uzorak sa 70 g/L početnog šećera nakon tri dana dostigao maksimalni sadržaj etanola, koji se, približno, zadržao do kraja fermentacije. Verovatni uzrok sporijeg opadanja sadržaja etanola na 30 °C je povećana

metabolička aktivnost kvasca na višoj temperaturi i nemogućnost bakterija da oksiduju etanol brzinom kojom se produkuje.

Među uzorcima kombuha napitaka, nakon tri dana fermentacije, samo dva uzorka na podlozi sa 70 g/L početnog šećera, fermentisani na 30 i 25 °C imaju više od 0,5% etanola (0,80 i 0,86% etanola u napicima fermentisanim na 30 i 25 °C, redom), što znači da oni ne mogu biti klasifikovani kao bezalkoholni napici.

U studijama na tradicionalnom supstratu izmeren je sadržaj etanola od 0,17 do 0,55% (Kallel i sar., 2012), što ukazuje da se ovaj kombuha napitak može klasifikovati kao bezalkoholni napitak. U istraživanju koje je imalo za cilj da odredi sadržaj etanola u komercijalnim kombuha proizvodima u Sjedinjenim Američkim Državama, utvrđeno je da oni ne ispunjavaju zahteve za klasifikaciju kao bezalkoholni napitak. Među analiziranim uzorcima bilo je kako kombuha napitaka na tradicionalnom, tako i onih proizvedenih upotrebom alternativnih supstrata. Svi ispitivani uzorci su imali sadržaj etanola viši od 0,5% (v/v) (Talebi i sar., 2017).



Slika 4.23. Sadržaj etanola u kombuha proizvodima na efluentu vinarije fermentisanim na a) 30 °C, b) 25 °C i c) 20 °C s 3, 5 i 7% polaznog sadržaja šećera

4.8. Sadržaj ukupnog azota u kombuha proizvodima na efluentu vinarije

Nakon ugljenika, azot je najznačajniji makroelement, neophodan za sintezu proteina u svim ćelijama. Njegov sadržaj prikazuje tabela 4.15. U efluentu vinarije meren je sadržaj ukupnog azota od 163,55 mg/L. Suprotno očekivanjima, sadržaj ukupnog azota u podlogama je obrnuto proporcionalan sadržaju šećera. Trećeg dana fermentacije najveći sadržaj azota imali su uzorci sa 70 g/L početnog sadržaja šećera, kada je kultivacija izvođena na 30 i na 20 °C, dok je u slučaju kada je temperatura bila 25 °C najviši sadržaj izmeren kod uzorka s 50 g/L početnog šećera. Tokom fermentacije, sadržaj azota menjao se nepravilno, bez ispoljavanja jasnog trenda vezanog za temperaturu fermentacije ili početni sadržaj šećera. Najveća vrednost izmerena je za uzorak fermentisan na 25 °C koji je sadržao 50 g/L početnog šećera, nakon devet dana (480 mg/L), dok je najmanja vrednost bila izmerena nakon šest dana kultivacije na 30 °C s 30 g/L početnog sadržaja šećera (40,79 mg/L).

Tabela 4.15 Sadržaj ukupnog azota u uzorcima kombuha proizvoda na efluentu vinarije i ne-fermentisanoj podlozi

		Sadržaj ukupnog azota [mg/L]		
		Početni sadržaj šećera [g/L]		
t [°C]	τ [dan]	70	50	30
	podloga	106,68±3,14	166,29±1,57	261,98±1,57
	dan 0	106,68±0,00	144,33±3,14	109,81±3,14
	3	269,83±3,14	203,94±3,14	166,29±0,00
30	6	294,93±3,14	156,88±0,00	40,79±1,57
	9	288,65±0,00	200,80±0,00	47,06±1,57
	3	109,81±3,14	288,65±0,00	164,72±4,71
25	6	149,03±1,57	181,98±1,57	100,40±6,28
	9	194,53±1,57	480,04±3,14	323,16±1,57
	3	225,90±3,14	181,98±3,14	87,85±3,14
20	6	247,86±3,14	214,92±3,14	47,06±3,14
	9	228,25±0,78	181,98±1,57	144,33±3,14

4.8.1. Modelovanje rezidualnog sadržaja azota u kombuha napicima na efluentu vinarije nakon tri dana fermentacije

Rezultate ANOVA jednofaktorijske analize varijansi prikazuje tabela 4.16, dok su koeficijenti regresione jednačine i njihov pojedinačni značaj takođe prikazani (tabela 4.17). Model je grafički prikazan odzivnom površinom (slika 4.24) i imao je odličnu pouzdanost, tako da se može smatrati da model u potpunosti opisuje sistem, uz interval poverenja od 95% i veoma visoku F-vrednost od 1483,773. Statistički značajni parametri modela bili su samo kvadratni članovi oba ispitivana parametra, pri čemu se temperatura ističe kao uticajniji. Sa grafičkog prikaza modela se uočava da je najviši sadržaj azota meren pri temperaturi fermentacije od 25 °C, što se može objasniti nižom produkcijom biomase na toj temperaturi, te je količina azota koja je ugrađena u celuloznu opnu manja, a više je zaostalo u samom kombuha napitku.

Tabela 4.16. Rezultati jednofaktorijalne analize varijansi modelovanog odziva rezidualnog sadržaja azota u kombuha napicima na efluentu vinarije nakon tri dana fermentacije

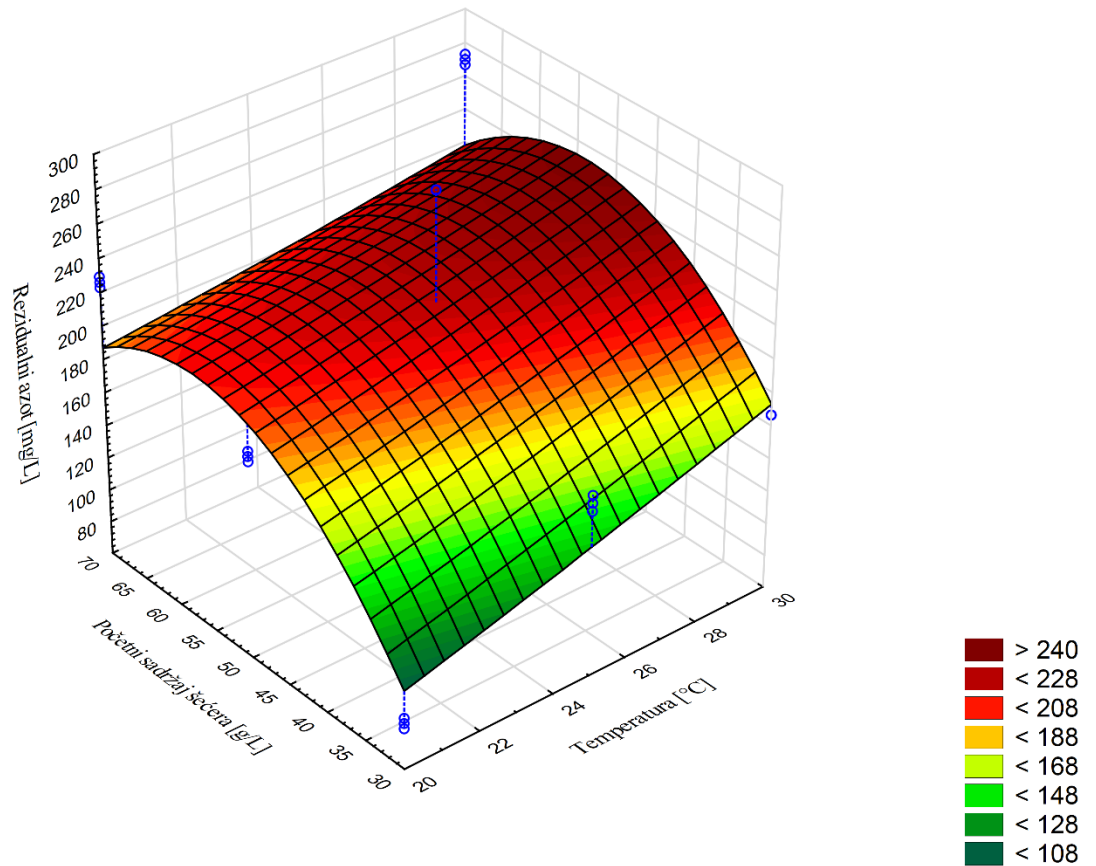
Odziv	Rezidual			Model			F-vrednost	p-vrednost	R ²
	DF	SS	MS	DF	SS	MS			
Rezidualni sadržaj azota	8	162,424	9,024	8	107111	13388	1483,773	0,000	0,998

DF – broj stepeni slobode, SS – suma kvadrata, MS – suma srednjih kvadrata

Tabela 4.17. Koeficijenti regresione jednačine i njihove *p*-vrednosti modelovanog odziva rezidualnog sadržaja azota u kombuha napicima na efluentu vinarije nakon tri dana fermentacije

Članovi		odse- čak	linearni		kvadratni	interak- cija	
		b₀	b₁	b₂	b₁₁	b₂₂	b₁₂
Rezidualni sadržaj azota	vrednost	-381,14	5,987	0,063	17,243	-0,135	-0,086
	<i>p</i> -vrednost	0,523	0,894	0,943	0,018*	0,022*	0,584

*Efekti su statistički značajni, $p < 0,05$; 1 – temperatura; 2 – početni sadržaj šećera



Slika 4.24. Odzivna površina koja opisuje uticaj temperature fermentacije i početnog sadržaja šećera na sadržaj rezidualnog azota u kombuha napicima na efluentu vinarije nakon tri dana kultivacije

4.9. Sadržaj fenolnih materija u kombuha proizvodima na efluentu vinarije

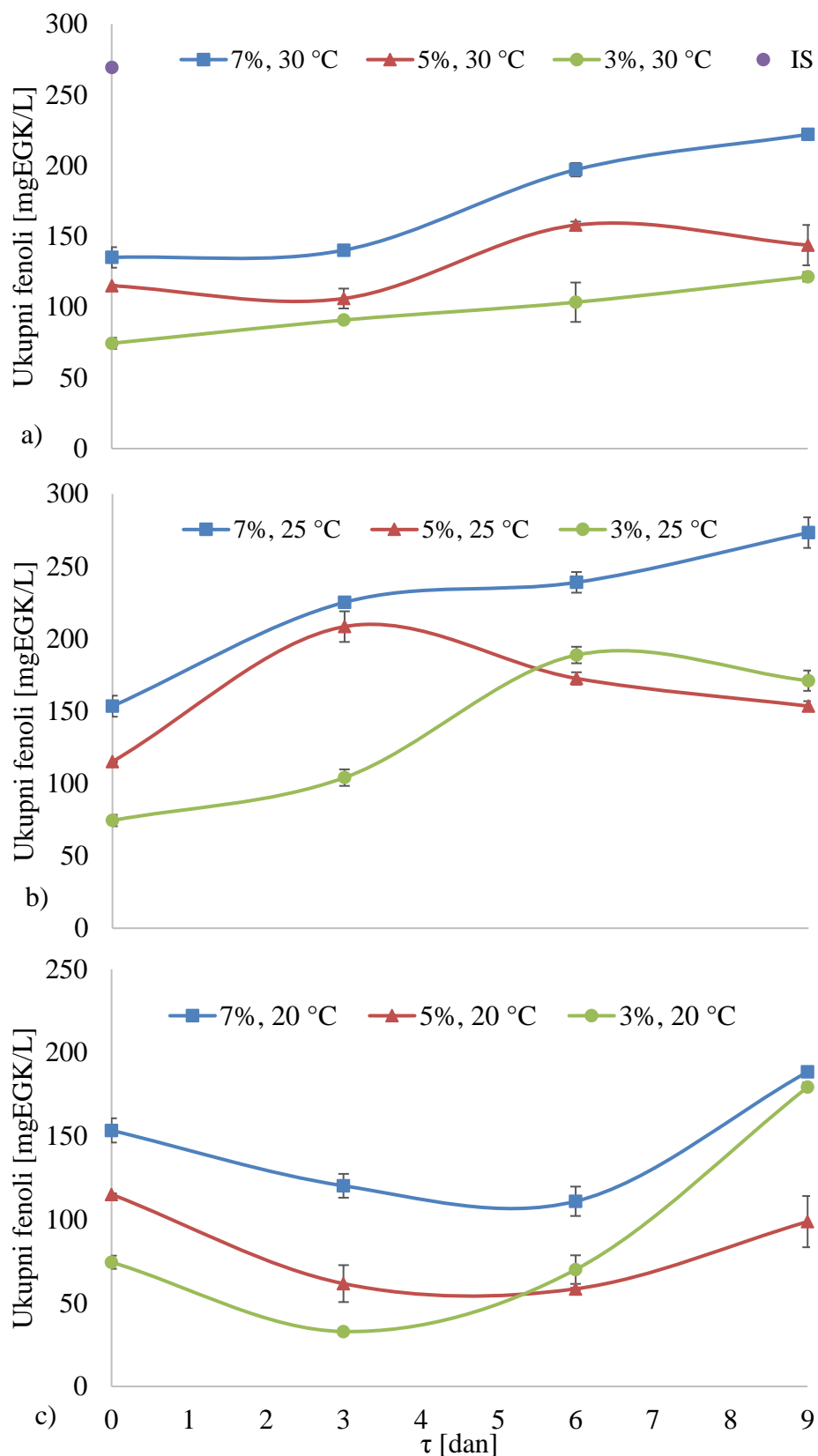
4.9.1. Sadržaj ukupnih fenola u kombuha proizvodima na efluentu vinarije

Polifenoli su jedan od najznačajnijih konstituenata senzornih svojstava, naročito boje i gorčine čiji balans doprinosi ukupnoj prijatnosti kombuha napitka (Ye i sar., 2014). Polifenoli u tradicionalnom kombuha napitku, u velikoj meri, potiču iz čaja, gde, zavisno od vrste čaja, čine 30–42% suve materije (Emiljanowicz i Malinowska-Pańczyk, 2020). Poznato je da polifenoli doprinose sprečavanju hroničnih bolesti, usled svojih antioksidativnih i antiinflamatornih svojstava. Neka od ovih jedinjenja mogu inhibirati DNK metiltransferazu I, što može uzrokovati demetilaciju promotorskog regiona tumor supresorskog gena, koji je obično hipermetilovan u tumorskim ćelijama, te mogu pomoći usporavanje progresije bolesti (Mahalanobish i sar., 2019; Saldívar-González i sar., 2018; Zhong i sar., 2016). Kod autentifikacije geografskog porekla vina, određeni polifenoli se koriste kao potvrda varijeteta grožđa (Jackson, 2014b). Kompleksna fenolna jedinjenja se mogu razlagati u kiseloj sredini kombuha napitka, zbog enzima koje proizvode bakterije i kvasci kombuha kulture, što može uzrokovati povećanje ukupnog sadržaja fenola, usled razgradnje složenih polifenola u male molekule (Jayabalan i sar., 2015). Sadržaj ukupnih fenola meren je u svim uzorcima i iskazan je kao masa ekvivalentna galnoj kiselini (slika 4.25).

Inicijalni supstrat imao je visoku vrednost sadržaja ukupnih fenola (269,29 mgEGK/L), od čega je više izmereno samo kod uzorka sa 7% šećera, kultivisanog na 25 °C nakon devet dana fermentacije (273,33 mgEGK/L). Tokom trajanja fermentacije, uzorci koji sadrže 7% početnog šećera imaju najveći sadržaj ukupnih fenola, što potkrepljuje tvrdnju da je, kod ove vrste kombuha proizvoda, korišćena sirovina glavni izvor fenolnih jedinjenja. Međutim, na 30 °C se kod svih uzoraka uočava blagi porast sadržaja tokom bioprocesa, osim uzorka sa 50 g/L početnog šećera kod koga je izmeren pad sadržaja ukupnih fenola između šestog i devetog dana. Na 25 °C, uzorak sa 7% šećera pokazuje kontinuirani porast, dok uzorci s 5% i 3% šećera imaju pad posle trećeg, odnosno, posle šestog dana fermentacije. Nasuprot tome, kada se fermentacija odvija na 20 °C, kombuha kultura prvo razgrađuje fenolne materije, nevezano za prisutne šećere, a zatim počinje njihova sinteza. Na osnovu dobijenih rezultata može se izvesti zaključak da se sinteza fenolnih materija dešava značajno brže kada je sadržaj šećera niži. Posmatrajući vrednosti za treći dan, najviši sadržaj ukupnih fenola imali su uzorci kultivisani na 25 °C, dok je na sve tri temperature najveća vrednost sadržaja ukupnih fenola izmerena kod uzoraka sa 70 g/L početnog sadržaja šećera, zatim s 50 g/L, a najmanja vrednost bila je kod uzoraka koji su na početku fermentacije sadržali 30 g/L ukupnog šećera. Najsporija sinteza ukupnih fenola se dešava na 20 °C.

Nefermentisani sok od borovnice imao je 963,31 mgEGK/L, što je oko četiri puta više nego inicijalni supstrat u ovom istraživanju (Barbosa i sar., 2022). Prilikom fermentacije jerba mate ekstrakta kombuha kulturom nađeno je da je najviši nivo ukupnih fenola posle 21 dan fermentacije, ali je daljim produžetkom, do 35 dana, sadržaj ukupnih fenola značajno smanjen (Ziemlewska i sar., 2021). Sadržaj ukupnih fenola se za soju, fermentisanu različitim plesnima, kretao od 2000 do 2500 mg/kg (Cheng i sar., 2013), dok su za sok od grožđa, fermentisan

kombuha kulturom, vrednosti bile u rasponu od 2000, nultog dana, do skoro 3500 mgEGK/L, šestog dana fermentacije (Ayed i sar., 2017). Rezultati ukupnog sadržaja fenola u kombuha napitku na čaju pripremljenom od biljke veoma zastupljene u vegetaciji mangrove, *Rhizophora mucronata* Lam. bili su neuporedivo veći, od skoro 100 000 mgEGK/kg u uzorku s 30% šećera, do skoro 200 000 mgEGK/L u uzorku s 10% saharoze (Hardoko i sar., 2020).



Slika 4.25. Sadržaj ukupnih fenola u kombuha proizvodima na efluentu vinarije fermentisanim na a) 30 °C, b) 25 °C i c) 20 °C, s 3, 5 i 7% polaznog sadržaja šećera

4.9.1.1. Modelovanje sadržaja ukupnih fenola u kombuha napicima na efluentu vinarije nakon tri dana fermentacije

Rezultate ANOVA jednofaktorijalne analize varijansi prikazuje tabela 4.18, dok su koeficijenti regresione jednačine i njihov pojedinačni značaj takođe prikazani (tabela 4.19). Model je značajan pri intervalu poverenja od 95% uz F-vrednost od 50,954. Visoka vrednost koeficijenta determinacije ukazuje da model dobro opisuje dinamiku kojom kombuha kultura metaboliše fenolne materije u okviru ispitivanih parametara procesa. Statistički značajni parametri bili su linerani i kvadratni uticaj temperature fermentacije, kao i linerani uticaj početnog sadržaja šećera, pri čemu je uticaj temperature značajno veći, što pokazuje i značajno manja vrednost koeficijenta uz članove nezavisne promenljive sadržaja šećera u jednačini modela. Posmatrajući grafički prikaz modela (slika 4.26), može se uočiti da je najveći sadržaj ukupnih fenola na srednjoj ispitivanoj temperaturi fermentacije, dok su povišene vrednosti temperature usporavale biosintezu ovih jedinjenja. Nasuprot tome, porast početnog sadržaja šećera u podlozi je direktno proporcionalan porastu ukupnih fenola u kombuha napicima.

Tabela 4.18. Rezultati jednofaktorijalne analize varijansi modelovanog odziva sadržaja ukupnih fenola u kombuha napicima na efluentu vinarije nakon tri dana fermentacije

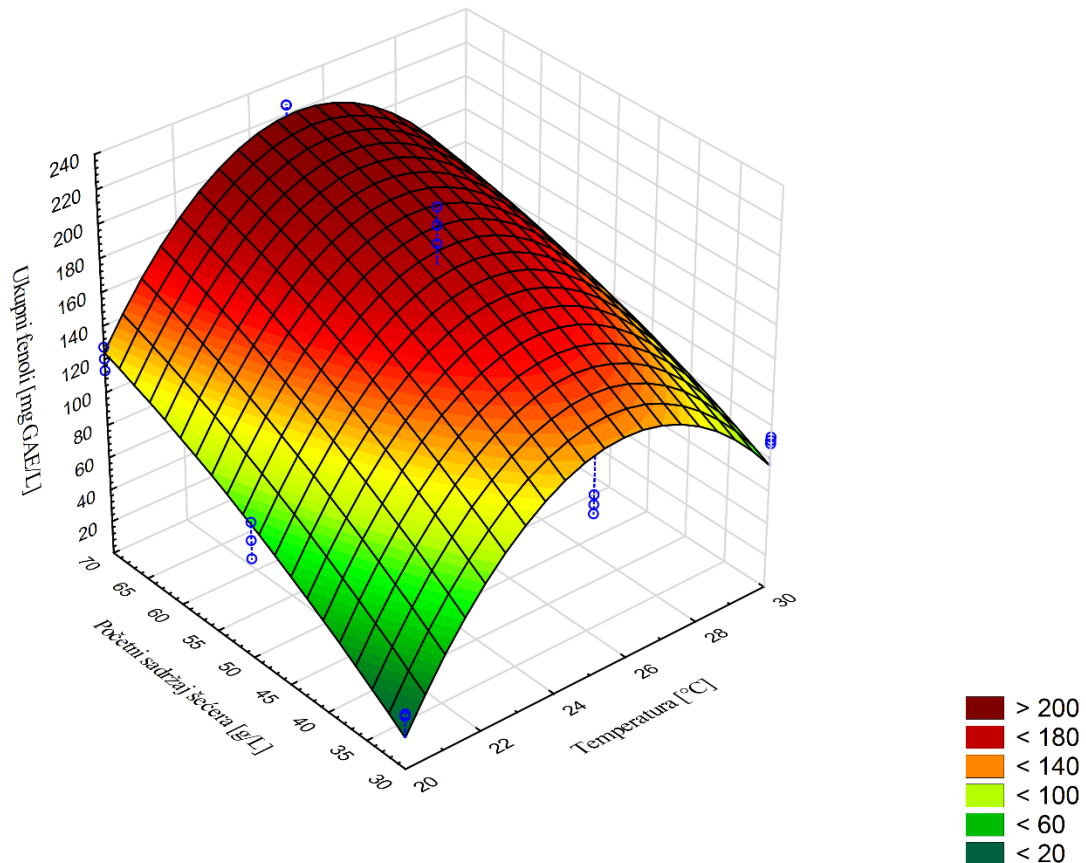
Odziv	Rezidual			Model			F- vrednost	p- vrednost	R ²
	DF	SS	MS	DF	SS	MS			
Ukupni fenoli	21	7011	333	5	85061	17012	50,954	0,000	0,961

DF – broj stepeni slobode, SS – suma kvadrata, MS – suma srednjih kvadrata

Tabela 4.19. Koeficijenti regresione jednačine i njihove *p*-vrednosti modelovanog odziva sadržaja ukupnih fenola u kombuha napicima na efluentu vinarije nakon tri dana fermentacije

Članovi		odse- čak	linearni		kvadratni	interak- cija	
		b ₀	b ₁	b ₂	b ₁₁	b ₂₂	b ₁₂
Ukupni fenoli	vrednost	-2333*	179,514*	-3,421*	6,984*	-0,025	-0,095
	<i>p</i> -vrednost	0,000*	0,000*	0,000*	0,006*	0,201	0,086

*Efekti su statistički značajni, $p < 0,05$; 1 – temperatura; 2 – početni sadržaj šećera



Slika 4.26. Odzivna površina koja opisuje uticaj temperature fermentacije i početnog sadržaja šećera na sadržaj ukupnih fenola u kombuha napicima na efluentu vinarije nakon tri dana kultivacije

4.9.2. Sadržaj fenolnih kiselina u kombuha proizvodima na efluentu vinarije

U tradicionalnom kombuha napitku fenolne kiseline potiču iz crnog čaja, biotransformišu se u različite metabolite i značajno doprinose antimikrobnoj aktivnosti (Soares i sar., 2021). Kvasac *Candida tropicalis* je uspešno korišćen za razgradnju polifenola pri čemu je indukovana biosinteza enzima peroksizoma, među kojima je katalaza bila dominantna. Kako je i kod kombuha kulture utvrđena aktivnost katalaze, može se pretpostaviti da se na sličan način odvija razgradnja polifenolnih jedinjenja (Ettayebi i sar., 2003; Vitas i sar., 2020). Osim toga, razgradnja polifenola u debelom crevu je značajan metabolički put u koji su uključene bakterije rodova *Clostridium*, *Bacteroides* i *Eubacterium*, koje karakteriše sposobnost da cepaju C prsten flavonoida i oslobađaju fenolne kiseline, kao što je 3-(4-hidroksi fenil)-propionska kiselina i 3-hidroksi fenil-sirćetna kiselina (Rechner i sar., 2004). Moguće je i da bakterije kombuha kulture ekskretuju enzime koji mogu razlagati složene biološke molekule iz grožđa.

Ispitivano je prisustvo galne, *p*-hidroksibenzoeve, kafene, siringinske, *p*-kumarinske, ferulne i sinapinske kiseline (tabela 4.20). Jedini uzorak u kome su detektovane sve ispitivane fenolne kiseline, osim sinapinske, bio je inicijalni supstrat, što potvrđuje da je grožđe odličan izvor fenolnih jedinjenja.

Galna kiselina (3,4,5-trihidroksibenzojeva kiselina) je jedinjenje koje se prirodno nalazi u čaju, crnom luku, crvenom voću i crnoj rotkvi, a ima je i u semenkama grožđa (Liu i sar., 2013; Nowak i sar., 2013). Posедуje izražena antikancerogena svojstva, indukuje apoptozu ćelija tumora pluća, štiti od raka prostate pri oralnoj konzumaciji (dokazano u *in vivo* studiji) i inhibira WEHI-3⁵ ćelije i podstiče fagocitozu makrofaga (Ho i sar., 2009; Ohno i sar., 1999; Raina i sar., 2008). Osim toga, predstavlja antiagregativno jedinjenje koje može inhibirati akumulaciju humanog insulina i ispoljava antifungalno i antiviralno dejstvo (Jayamani i Shanmugam, 2014; Konar i sar., 2017). Galna kiselina je jedina koja je određena u svim ispitivanim uzorcima. Najviši sadržaj izmeren je kod uzorka fermentisanog na 20 °C, sa 7% početnog sadržaja šećera, nakon devet dana fermentacije (0,85 g/L). Kada je kombuha proizvod fermentisan na 30 °C, uzorci koji su sadržali 70 g/L početnog šećera pokazali su blagi pad u prva tri dana fermentacije, a zatim porast devetog dana, dok su uzorci s 50 g/L početnog šećera pokazali porast sadržaja galne kiseline do šestog dana, nakon čega je sadržaj smanjen devetog dana, a uzorci s 30 g/L početnog šećera imali su prvih šest dana gotovo nepromenjen sadržaj galne kiseline uz porast devetog dana. Svakog dana najviši sadržaj meren je kod uzoraka sa 70 g/L početnog sadržaja šećera, osim šestog, kada je uzorak s 50 g/L pokazao najviši sadržaj galne kiseline. Za sva tri sadržaja šećera, kod uzoraka fermentisanih na 25 °C uočen je pad šestog, pa porast sadržaja galne kiseline devetog dana, dok je među njima, najveći sadržaj imao uzorak s 70 g/L početnog šećera, a sva tri uzorka devetog dana su sadržala više galne kiseline nego na početku fermentacije, tako da se može zaključiti da galna kiselina jeste proizvod metabolizma kombuha kulture. Trend promene sadržaja galne kiseline na 20 °C bio je drugačiji. Uzorci sa 70 i 50 g/L početnog šećera pokazali su kontinuiran porast sadržaja galne kiseline, dok su uzorci s 30 g/L početnog šećera pokazali obrnut trend nego na višim temperaturama – sadržaj je od nultog do šestog dana opadao, a zatim je devetog povećan.

Ferulna kiselina je antioksidant i inhibitor enzima koji industrijski proizvodi plesan *Aspergillus oryzae* na čvrstoj hranljivoj podlozi (engl. *solid state*) od rižinih mekinja. Karakteristična je po ulozi inhibitora enzima odgovornih za pigmentaciju tela (tirozinaze) i starenje (elastaze), stoga joj je očekivana potencijalna oblast primene proizvodnja kozmetičkih proizvoda za negu kože. Osim toga, ima sposobnost da „hvata“ slobodne radikale i inhibira rast ćelija kancera debelog creva i oralnih kancera kod pacova, u koje spadaju kancer jezika i prekancerозна stanja i lezije (Abd Razak i sar., 2017; Islam i sar., 2014; Kumar i Naraiian, 2019). U ovom ispitivanju, ferulna kiselina određena je jedino u inicijalnom supstratu, pri čemu joj je sadržaj bio 7,80 mg/L.

Studije ukazuju da kafena kiselina, kao i kofein, smanjuje gustinu kostiju, međutim fenetil ester kafeine kiseline pokazuje širok spektar bioloških i farmakoloških aktivnosti, među kojima se izdvajaju antiinflamatorna, antiviralna, antibakterijska, antifungalna, antiproliferativna i antioksidativna. Kafena kiselina inhibira nastanak radikala u reakciji vodonik-peroksida s jonima gvožđa, tako što vezuje gvožđe u kompleksno jedinjenje. Inhibira nastanak radikala kada se ksanton izloži UVA zračenju tako što relaksira ekscitovani ksanton (Iwahashi, 2015; Sakai i Tsukuba, 2015). Određena je u inicijalnom supstratu i u uzorcima sa 7% šećera nakon devet dana fermentacije na 20 i 25 °C, pri čemu je izmereni sadržaj, nakon fermentacije na 20

⁵ WEHI-3 –ćelijska linija ćelija leukemije miša (*Mus musculus*), ATCC TIB-68

°C, bio gotovo dvostruko veći nego u inicijalnom supstratu što ukazuje na mogućnost da je kombuha kultura sintetiše, na nižim temperaturama, kao sekundarni metabolit, u slučaju produžene fermentacije.

p-kumarinska kiselina je polifenolno jedinjenje koje se prirodno nalazi u paradajzu, šargarepi, bosiljku i belom luku. Ispoljava raznoliko zdravstveno korisno dejstvo, pokazuje antiinflamatorno dejstvo, smanjuje oštećenja hrskavice i pospešuje osteoklastogenezu (Mahalanobish i sar., 2019). Određena je u inicijalnom supstratu, kao i u uzorcima sa 70 g/L početnog šećera nakon šest dana na 20 °C i nakon devet dana na 25 i 30 °C, pri čemu je samo sadržaj izmeren nakon šest dana fermentacije na 20 °C bio viši nego kod inicijalnog supstrata (0,77 g/L u odnosu na 0,73 g/L izmerenih kod IS).

p-hidroksibenzoeva kiselina izolovana iz manga pokazuje inhibitornu aktivnost prema duktalnom *in situ* karcinomu dojke (Luna-Guevara i sar., 2018). U inicijalnom supstratu određen je sadržaj od 0,89 mg/L. Kako je podloga s 30 g/L najrazblaženija, u njoj nije detektovana *p*-hidroksibenzoeva kiselina, dok ju je u podlogama s 50 i 70 g/L početnog šećera bilo moguće izmeriti, mada je sadržaj bio mali. Trećeg dana, određena je kod uzoraka fermentisanih na 30 °C sa 50 i 70 g/L početnog šećera, kao i na 20 °C sa 70 g/L početnog šećera. Temperatura izvođenja bioprocasa od 30 °C se pokazala kao najpogodnija za sintezu *p*-hidroksibenzoeve kiseline. Najviši sadržaj izmeren je nakon šest dana fermentacije na 30 °C sa 70 g/L početnog šećera i iznosio je 2,49 mg/L, koji je do devetog dana smanjen na 1,34 g/L, što je i dalje značajno više nego u inicijalnom supstratu. Nasuprot tome, kada je temperatura fermentacije bila 25 °C, *p*-hidroksibenzoevu kiselinu bilo je moguće odrediti samo u uzorku sa 70 g/L početnog sadržaja šećera, nakon šest dana fermentacije. Na 20 °C, kod uzoraka s 30 g/L početnog sadržaja šećera, bilo ju je moguće izmeriti samo nakon devet dana fermentacije i to 0,55 g/L, dok je sadržaj u svim ostalim uzorcima na ovoj temperaturi, u kojima je određena *p*-hidroksibenzoeva kiselina, bio oko 0,30 g/L.

Siringinska kiselina ispoljava mnoga značajna farmakološka svojstva, kao što su antioksidativno, antimikrobno, antiinflamatorno, antikancerogeno i antidijabetsko. Osim toga, štiti srce, jetru i mozak i deluje kao „hvatač“ slobodnih radikala. Takođe, ima potencijal da reguliše enzimsku aktivnost, faktore rasta i transkripcije. U toksikološkim studijama nisu uočena štetna dejstva (Ferah Okkay i sar., 2022). Određena je u inicijalnom supstratu, pri čemu je sadržaj iznosio 0,81 mg/L, dok je u razblaženim, neinokulisanim podlogama nije bilo moguće detektovati. Kod uzoraka trećeg dana, siringinska kiselina je bila prisutna u uzorcima sa 70 g/L početnog šećera fermentisanim na 20 °C, kao i kod napitaka fermentisanih na 30 °C sa sva tri početna sadržaja šećera. Siringinska kiselina je određena samo kod dva uzorka fermentisana na 25 °C, nakon šest i devet dana sa 70 g/L početnog šećera, dok je na 20 °C određena nakon sva tri analizirana dana kada je početni sadržaj šećera bio 70 g/L i nakon šestog i devetog dana, kada je početni sadržaj šećera bio 50 g/L, dok u uzorcima kod kojih je početni sadržaj šećera bio 30 g/L, a temperatura fermentacije 20 °C nije detektovana. Nasuprot tome, određena je kod svih uzoraka kultivisanih na 30 °C, tako da se jasno može uočiti da viša temperatura fermentacije pospešuje sintezu siringinske kiseline. Najviši sadržaj bio je izmeren nakon devet dana fermentacije na 30 °C sa 70 g/L početnog sadržaja šećera i iznosio je 3,54 mg/L, što je značajno više

od sadržaja izmerenog kod inicijalnog supstrata, tako da je jasno da kombuha kultura proizvodi siringinsku kiselinu.

Sinapinska kiselina se koristi kao matriks za analizu kratkolančanih C-terminalnih peptida, kao i za profilisanje tkiva i imidžing eksperimente (Redeker, 2010; Schwartz i Caprioli, 2008). U ovom radu nije određena ni u jednom uzorku.

Tabela 4.20 Sadržaj fenolnih kiselina u kombuha proizvodima na efluentu vinarije i kontrolnim uzorcima

τ [dan]	Početni sadržaj šćecera [g/L]	t [°C]	Kiselina [mg/L]							Galna
			sinapinska	ferulna	p-kumarin- ska	siringinska	kafena	p-hidroksi- benzoeva	Galna	
Inicijalni supstrat			ND	7,80±0,32	0,73±0,01	0,81±0,00	0,45±0,01	0,89±0,03	0,69±0,01	
Podloga	70		ND	ND	ND	ND	ND	ND	0,31±0,01	
Podloga	50		ND	ND	ND	ND	ND	0,23±0,00	0,31±0,07	
Podloga	30		ND	ND	ND	ND	ND	ND	0,30±0,00	
0	70		ND	ND	ND	ND	ND	0,31±0,01	0,48±0,00	
0	50		ND	ND	ND	ND	ND	ND	0,29±0,01	
0	30		ND	ND	ND	ND	ND	ND	0,22±0,01	
3	70	30	ND	ND	ND	0,94±0,02	ND	0,44±0,01	0,46±0,01	
3	50	30	ND	ND	ND	0,67±0,02	ND	0,28±0,01	0,32±0,01	
3	30	30	ND	ND	ND	0,60±0,04	ND	ND	0,25±0,00	
6	70	30	ND	ND	ND	1,63±0,04	ND	2,49±1,27	0,46±0,06	
6	50	30	ND	ND	ND	1,44±0,02	ND	0,42±0,0	0,56±0,00	
6	30	30	ND	ND	ND	0,73±0,00	ND	0,97±0,01	0,22±0,00	

tabela 4.20. Nastavak

τ [dan]	Početni sadržaj šećera [g/L]	t [°C]	Kiselina [mg/L]							Galna
			sinapinska	ferulna	<i>p</i> -kumarinska	siringinska	kafena	<i>p</i> -hidroksi-benzoeva		
9	70	30	ND	ND	0,29±0,00	3,54±0,03	ND	1,34±0,01	0,58±0,00	
9	50	30	ND	ND	ND	1,55±0,00	ND	0,91±0,36	0,37±0,00	
9	30	30	ND	ND	ND	0,69±0,01	ND	0,44±0,01	0,39±0,00	
3	70	25	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0,57±0,00	
3	50	25	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0,45±0,01	
3	30	25	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0,49±0,01	
6	70	25	ND	ND	ND	0,50±0,03	ND	2,48±0,10	0,53±0,02	
6	50	25	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0,33±0,00	
6	30	25	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0,18±0,00	
9	70	25	ND	ND	0,54±0,12	0,66±0,03	0,31±0,00	ND	0,69±0,00	
9	50	25	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0,52±0,01	
9	30	25	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0,35±0,03	

tabela 4.20. Nastavak

τ [dan]	Početni sadržaj šećera [g/L]	t [°C]	Kiselina [mg/L]						
			sinapinska	ferulna	p-kumarinska	siringinska	kafena	p-hidroksi- benzoeva	Galna
3	70	20	ND	ND	ND	0,36±0,01	ND	0,29±0,02	0,49±0,05
3	50	20	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0,31±0,00
3	30	20	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0,26±0,04
6	70	20	ND	ND	0,77±0,00	0,74±0,00	ND	0,31±0,03	0,55±0,03
6	50	20	ND	ND	ND	0,50±0,00	ND	0,24±0,00	0,38±0,01
6	30	20	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0,19±0,00
9	70	20	ND	ND	ND	0,87±0,03	0,80±0,02	ND	0,85±0,22
9	50	20	ND	ND	ND	0,63±0,01	ND	0,29±0,01	0,49±0,00
9	30	20	ND	ND	ND	ND	ND	0,55±0,01	0,22±0,01

4.9.2.1. Modelovanje sadržaja galne kiseline u kombuha napicima na efluentu vinarije nakon tri dana kultivacije

Rezultate ANOVA jednofaktorijske analize varijansi prikazuje tabela 4.21, dok su koeficijenti regresione jednačine i njihov pojedinačni značaj takođe prikazani (tabela 4.22). Model je značajan pri intervalu poverenja od 95% uz F-vrednost od 39,415. Visoka vrednost koeficijenta determinacije ukazuje da model sa zadovoljavajućom preciznošću opisuje ponašanje sistema u 90% ispitivanih slučajeva. Statistički značajni parametri bili su linerani i kvadratni uticaj početnog sadržaja šećera, i linearni uticaj temperature fermentacije, iako je vrednost uticaja temperature brojno značajno veća nego sadržaja šećera. Posmatrajući grafički prikaz modela (slika 4.27), može se uočiti da visok početni sadržaj šećera i srednja ispitivana temperatura fermentacije predstavljaju optimalne uslove za sintezu galne kiseline, dok ekstremne temperature i niži početni sadržaji šećera daju minimalne vrednosti sadržaja galne kiseline.

Tabela 4.21. Rezultati jednofaktorijske analize varijansi modelovanog odziva sadržaja galne kiseline u kombuha napicima na efluentu vinarije nakon tri dana fermentacije

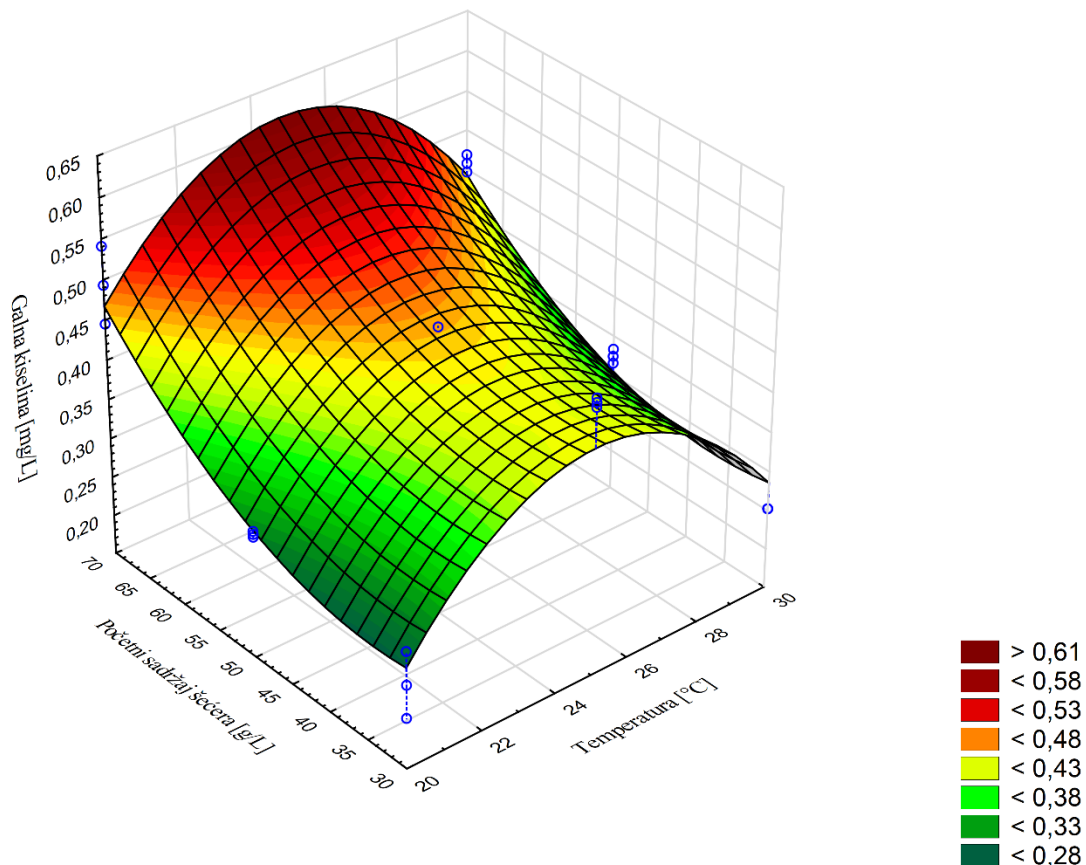
Odziv	Rezidual			Model			F- vrednost	p- vrednost	R ²
	DF	SS	MS	DF	SS	MS			
Galna kiselina	21	0,032	0,002	5	0,300	0,060	39,415	0,000	0,904

DF – broj stepeni slobode, SS – suma kvadrata, MS – suma srednjih kvadrata

Tabela 4.22. Koeficijenti regresione jednačine i njihove p-vrednosti modelovanog odziva sadržaja galne kiseline u kombuha napicima na efluentu vinarije nakon tri dana fermentacije

Članovi		odse- čak	linearni		kvadratni	interak- cija	
		b ₀	b ₁	b ₂	b ₁₁	b ₂₂	b ₁₂
Galna kiselina	vrednost	-3,333*	0,313*	-0,006*	-0,009	0,0002*	0,000
	p-vrednost	0,000*	0,000*	0,000*	0,093	0,001*	0,482

*Efekti su statistički značajni, $p < 0,05$; 1 – temperatura; 2 – početni sadržaj šećera



Slika 4.27. Odzivna površina koja opisuje uticaj temperature fermentacije i početnog sadržaja šećera na sadržaj galne kiseline u kombuha napicima na efluentu vinarije nakon tri dana kulti-
vacije

4.10. Antioksidativna aktivnost kombuha proizvoda na efluentu vinarije

Kao parametri antioksidativne aktivnosti kombuha proizvoda merene su aktivnosti na DPPH i hidroksi radikal, kao i redukciona moć.

4.10.1. Antioksidativna aktivnost na DPPH

Različiti faktori, među kojima i metaboliti koji se sintetišu tokom kombuha fermentacije, u koje spadaju polifenoli, glukonska i glukuronska kiselina, doprinose antioksidativnoj aktivnosti (Mizuta i sar., 2020). Vrednosti su, za sve uzorke, izuzetno visoke (preko 80% za sve kombuha proizvode, a za proizvode s 5 i 7% početnog sadržaja šećera preko 90%), uključujući inicijalni supstrat (94,28%) i uporedivo je s početnim istraživanjima, potpoglavlje 4.1.5.1, dok su za kombuha proizvod vrednosti uporedive s etanolnim ekstraktom kombuha napitka proizvedenog na crnom čaju, a značajno su veće od nativnog kombuha napitka (tabela 4.23) (Villarreal-Soto i sar., 2019). Drugi autori su za kombuha napitak na zelenom čaju dobili slične vrednosti, preko 90%, a na crnom čaju je zabeležena vrednost od 38,7% (Fu i sar., 2014). Uporedivo visoka vrednost je zabeležena kod kombuha napitka na infuzu od kora banana (Pure i Pure, 2016) dok su kombuha napici na različitom lekovitom bilju pokazivali nešto niže

vrednosti, za odgovarajuće dane fermentacije, dostižući, uglavnom, između 70 i 80% nakon 10 dana (Vitas i sar., 2020). Antioksidativna aktivnost na DPPH[•] je za kombuha kulturom fermentisani napitak od borovnice bila veoma mala (Barbosa i sar., 2022). Delovi grožđa, pokožica, semenke i meso pokazuju izraženu antioksidativnu aktivnost na DPPH[•] (Sridhar i Charles, 2019). Osim toga, potvrđena je i antioksidativna aktivnost belog vina na DPPH[•] (Romanet i sar., 2019).

Tabela 4.23. Antioksidativna aktivnost na DPPH[•] uzoraka kombuha proizvoda na efluentu vinarije i nefermentisane podloge

		AA _{DPPH[•]} [%]		
		Početni sadržaj šećera [g/L]		
t [°C]	τ [dan]	70	50	30
	podloga	82,94±8,65	80,96±4,20	59,09±0,37
	dan 0	94,28±0,07	93,84±0,22	84,49±0,43
	3	93,91±0,00	93,77±0,14	82,83±0,07
30	6	93,91±0,14	94,06±0,00	88,48±1,67
	9	94,06±0,00	94,49±0,00	93,62±0,00
	3	94,57±0,22	94,86±0,07	94,93±0,00
25	6	95,00±0,07	94,86±0,07	95,00±0,22
	9	94,28±0,07	94,13±0,07	94,93±0,14
	3	93,77±0,29	93,62±0,00	85,36±0,87
20	6	94,06±0,29	94,28±0,22	94,42±0,07
	9	93,77±0,14	94,28±0,07	95,00±0,07

4.10.2. Antioksidativna aktivnost na hidroksi radikal

Kod neinokulisane podloge uočena je veća antioksidativna aktivnost na hidroksi radikal (AA[•]OH) nego kod inicijalnog supstrata (tabela 4.24). Može se pretpostaviti da je prilikom zagrevanja, koje se dešava tokom sterilizacije, došlo do razgradnje složenih molekula i da se time, za reakciju oslobodilo više funkcionalnih grupa sposobnih da vežu hidroksi radikal, pošto je vrednost izmerena za inicijalni supstrat (18,21%) niža nego za neinokulisane podloge. Kako je vrednost nakon inokulacije (dan 0) bila nešto veća nego za uzorke podloge, dodati inokulum je sadržao jedinjenja koja doprinose antioksidativnoj aktivnosti. Ovi rezultati su suprotni u odnosu na antioksidativnu aktivnost na DPPH[•], što se može objasniti različitom prirodom ova dva

radikala. DPPH je stabilan, veštački generisan radikal, dok je hidroksi radikal značajno manji, nestabilni molekul koji se prirodno javlja u ljudskom organizmu (Malbaša i sar., 2014).

Rezultati za treći dan za sve temperature i sadržaje šećera, pokazali su nižu vrednost antioksidativne aktivnosti na hidroksi radikal u odnosu na neinokulisane podloge, osim kod uzoraka fermentisanih na 20 i 25 °C sa 70 g/L početnog šećera. Najmanje vrednosti izmerene su na 30 °C, dok su rezultati dobijeni nakon fermentacije na 25 i 20 °C uporedivi. Najveći pad antioksidativne aktivnosti tokom trajanja bioprocasa, u odnosu na nulti dan fermentacije, uočen je kod uzoraka koji su imali najniži sadržaj šećera, što ukazuje da sinteza jedinjenja koja doprinose aktivnosti prema hidroksi radikal u može biti uzrokovana većim sadržajem šećera u podlozi. Kod uzoraka fermentisanih na 25 °C s 30 i 50 g/L početnog šećera i fermentisanih na 30 °C s 30 g/L šećera uočen je pad antioksidativne aktivnosti na hidroksi radikal do šestog dana, a zatim porast devetog dana, tako da je moguće da jedinjenja koja joj doprinose spadaju u sekundarni metabolizam ćelija. Ukupno posmatrano, najveće vrednosti antioksidativne aktivnosti prema hidroksi radikal uočene su na 20 °C, posle šest dana fermentacije, no i to je bilo malo povećanje u odnosu na vrednosti izmerene nultog dana bioprocasa, tako da se može zaključiti da primenjena kombuha kultura, u datim proizvodnim uslovima ne doprinosi značajno sposobnosti hvatanja hidroksi radikala.

Vrednosti izmerene za kombuha napitke proizvedene na tradicionalnoj podlozi od crnog čaja i zelenog čaja bile su, nakon devet dana fermentacije za crni, a nakon četiri dana za zeleni, oko 60%, što je, u proseku, dvostruko više nego kod napitaka dobijenih na efluentu vinarije. Kod kombuha napitka na crnom čaju je nakon četiri dana fermentacije izmerena antioksidativna aktivnost na hidroksi radikal od oko 40% (Fu i sar., 2014; Jayabalan i sar., 2008). Utvrđena je zavisnost između sadržaja ukupnih fenola u belom vinu i koncentracije hidroksi radikala (Márquez i sar., 2019). Poređenjem IC₅₀ vrednosti za kombuha napitak proizveden na crnom čaju i tradicionalno pripremljen napitak crnog čaja, dobija se oko 10 puta manja vrednost za fermentisani proizvod (Velićanski i sar., 2014), dok je IC₅₀ vrednost za bela vina bila uporediva s vrednostima dobijenim za crni čaj (Tekos i sar., 2021).

Tabela 4.24. Antioksidativna aktivnost na hidroksi radikal uzoraka kombuha proizvoda na efluentu vinarije i nefermentisane podloge

		AA·OH [%]		
		Početni sadržaj šećera [g/L]		
t [°C]	τ [dan]	70	50	30
podloga		24,76±0,48	28,93±0,83	30,71±2,62
dan 0		28,75±1,96	34,53±4,50	30,72±1,62
30	3	18,24±0,00	13,51±0,35	7,97±1,50
	6	13,16±0,92	14,32±0,69	6,12±0,12
	9	12,93±2,54	16,63±2,54	9,47±1,85
25	3	30,83±4,64	27,74±3,93	17,26±0,60
	6	33,19±0,43	20,90±1,96	9,01±1,15
	9	35,97±0,43	27,94±0,54	17,34±0,64
20	3	28,69±1,28	26,10±0,69	25,87±1,15
	6	36,51±6,53	31,48±1,07	35,97±13,06
	9	26,12±1,07	24,63±2,14	21,84±1,07

4.10.3. Redukciona moć

Najvišu vrednost redukcionu moći pokazao je uzorak efluenta vinarije (1,000), dok su podloge pripremljene za inokulaciju imale, usled razblaživanja, umanjene vrednosti redukcionu moći, što korelira s dodatkom vodom (tabela 4.25). Uzorci su, na početku fermentacije, pokazivali redukcionu moć u opsegu od 0,284 do 0,501. Svi uzorci trećeg dana imali su veću redukcionu moć, u poređenju s početkom fermentacije, što jasno ukazuje da kombuha kultura proizvodi jedinjenja koja doprinose povećanju redukcionu moći napitka. Najveću vrednost, posmatrano za iste početne sadržaje ukupnih šećera, imali su uzorci na 20 °C (za 70 g/L) i na 25 °C (za 50 i 30 g/L), uz veoma malu razliku na dve niže temperature, dok je porast redukcionu moći bio najmanji na 30 °C, što ukazuje da sintezi, za redukcionu moć značajnih jedinjenja, pogoduju niže temperature fermentacije. Dalje trajanje bioprocasa je, kod uzoraka s 30 g/L početnog šećera, na svim temperaturama, uzrokovalo rast redukcionu moći, dok je kod uzoraka s 50 g/L uočena stagnacija na 30 °C, opadanje na 25 °C i rast na najnižoj temperaturi. Najviša vrednost, kod fermentisanih uzoraka, izmerena je na 20 °C, kod uzorka s 30 g/L početnog šećera (0,775).

Kod kombuha napitka na crnom čaju je, posle devet dana fermentacije na sobnoj temperaturi, merena redukciona moć od oko 0,15 (Jayabalan i sar., 2008), dok su drugi autori merili 0,61 nakon gotovo četiri dana na 30 °C (Fu i sar., 2014). Kod belih vina utvrđena je redukciona moć u rasponu od 0,14 do 0,17 (Ishimoto i sar., 2006).

Tabela 4.25. Redukciona moć uzoraka kombuha proizvoda na efluentu vinarije i nefermentisane podloge

Redukciona moć [A_{700}]				
Početni sadržaj šećera [g/L]				
t [°C]	τ [dan]	70	50	30
podloga		0,587±0,005	0,428±0,008	0,284±0,024
	dan 0	0,501±0,005	0,334±0,051	0,277±0,001
	3	0,515±0,004	0,436±0,001	0,323±0,003
30	6	0,544±0,009	0,397±0,002	0,354±0,036
	9	0,490±0,010	0,445±0,001	0,388±0,001
	3	0,599±0,001	0,524±0,004	0,405±0,003
25	6	0,543±0,024	0,489±0,009	0,615±0,002
	9	0,545±0,015	0,421±0,007	0,697±0,003
	3	0,648±0,013	0,508±0,017	0,378±0,000
20	6	0,575±0,020	0,538±0,001	0,499±0,014
	9	0,773±0,008	0,640±0,008	0,775±0,186

4.10.4. Modelovanje antioksidativne aktivnosti kombuha napitaka na efluentu vinarije nakon tri dana fermentacije

U cilju dobijanja grafičkog prikaza uticaja fermentacionih parametara na antioksidativnu aktivnost kombuha napitaka, rađena je dalja statistička obrada. Rezultate jednofaktorijske ANOVA analize prikazuje tabela 4.26. Model antioksidativnu aktivnost na DPPH' ne opisuje valjano gotovo 30% ispitivanih slučajeva, uz F-vrednost od svega 11,252, dok model antioksidativne aktivnosti na hidroksi radikal opisuje ponašanje sistema u gotovo 90% slučajeva, uz F-vrednost od 36,777. Od modelovanih antioksidativnih aktivnosti, redukciona moć je najbolje opisana modelom, uz F-vrednost od 359,470, dok je R^2 vrednost izuzetno visoka (0,986), što ukazuje da model veoma pouzdano opisuje posmatrani sistem.

Tabela 4.26. Rezultati jednofaktorijske analize varijansi modelovanih odziva antioksidativne aktivnosti kombuha napitaka na efluentu vinarije nakon tri dana fermentacije

Odzivi	Rezidual			Model			F-vrednost	p-vrednost	R ²
	DF	SS	MS	DF	SS	MS			
AA _{DPPH} •	21	134,27	6,394	5	359,72	71,940	11,252	0,000	0,728
AA•OH	21	160,34	7,635	5	1404,0	280,81	36,777	0,000	0,898
Redukciona moć	21	0,003	0,000	5	0,260	0,050	359,470	0,000	0,986

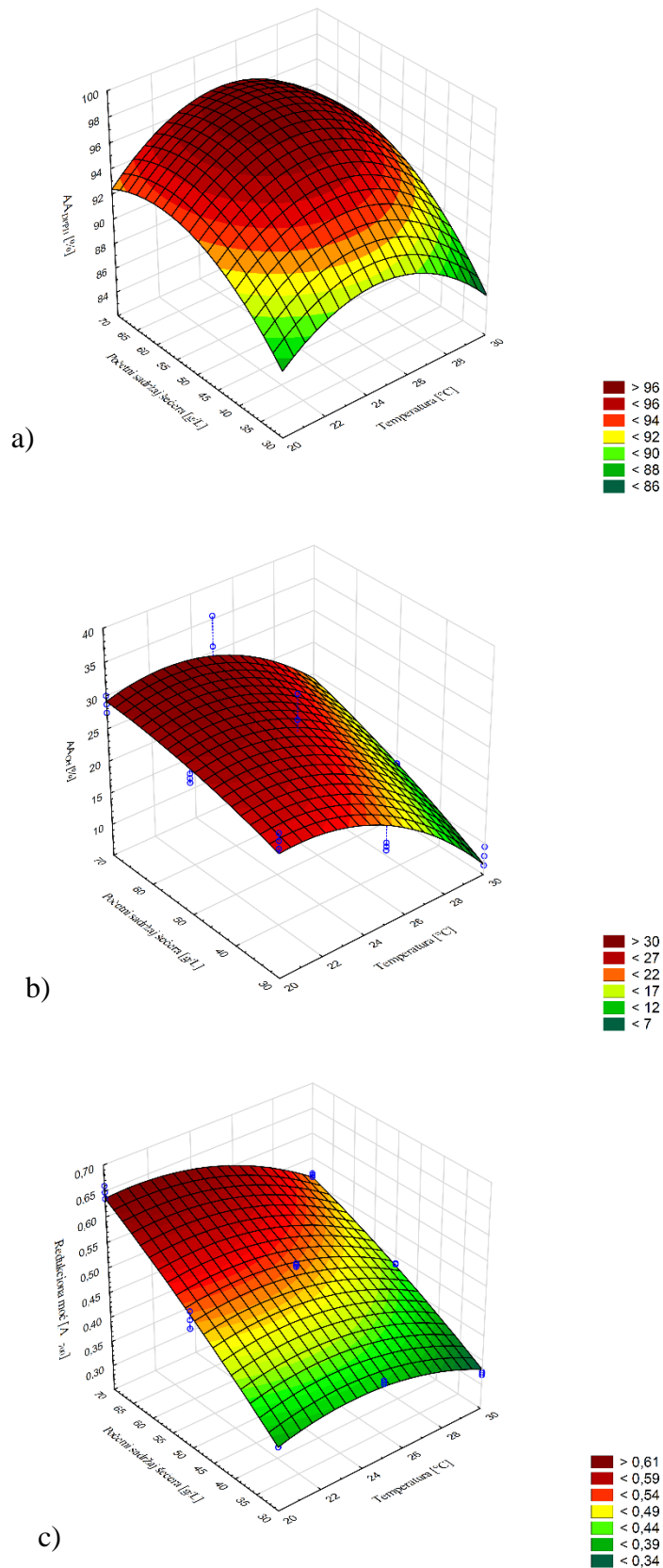
DF – broj stepeni slobode, SS – suma kvadrata, MS – suma srednjih kvadrata

Modeli antioksidativne aktivnosti prikazani su grafički odzivnim površinama (slika 4.28), dok koeficijente regresione jednačine modela prikazuje tabela 4.27. Na antioksidativnu aktivnost prema DPPH• statistički značajan pozitivan uticaj ima temperatura fermentacije, dok je uticaj početnog sadržaja šećera negativan, a interakcija ispitivanih parametara nema značajan uticaj. Sa grafičkog prikaza modela se uočava da su više vrednosti zabeležene pri višim početnim sadržajima šećera, dok je srednja ispitivana temperatura fermentacije najpogodnija. Na antioksidativnu aktivnost prema hidroksi radikalima uticaj imaju linearni članovi oba ispitivana faktora, kao i njihova interakcija, pri čemu je brojna vrednost uticaja temperature značajno viša. Na grafičkom prikazu modela se uočava da se više vrednosti beleže na najnižoj ispitivanoj temperaturi, dok je uticaj šećera manje izražen. Na redukcionu moć kombuha napitaka statistički značajan uticaj imaju svi testirani parametri modela, a sa grafičkog prikaza se vidi da su najviše vrednosti redukcionu moć na najnižoj ispitivanoj temperaturi i najvišem sadržaju šećera, uz kontinuiran pad ka drugom ekstremu ispitivanih procesnih parametara, najvišoj temperaturi i najnižem sadržaju šećera.

Tabela 4.27. Koeficijenti regresione jednačine i njihove *p*-vrednosti modelovanih odziva anti-oksidativne aktivnosti kombuha napitaka na efluentu vinarije nakon tri dana fermentacije

Članovi		odsečak	linearni		kvadratni	interakcija	
		b ₀	b ₁	b ₂	b ₁₁	b ₂₂	b ₁₂
AA _{DPFH} •	vrednost	-26,718	8,068*	-0,170*	0,789*	-0,008*	0,007
	<i>p</i> -vrednost	0,343	0,001*	0,001*	0,021*	0,006*	0,369
AA•OH	vrednost	-64,228*	8,133*	-0,209*	-0,001	-0,002	0,019*
	<i>p</i> -vrednost	0,045*	0,002*	0,000*	0,999	0,399	0,030*
Redukciona moć	vrednost	-0,884*	0,083*	-0,002*	0,013*	0,000*	0,000*
	<i>p</i> -vrednost	0,000*	0,000*	0,000*	0,000*	0,031*	0,000*

*Efekti su statistički značajni, $p < 0,05$; 1 – temperatura; 2 – početni sadržaj šećera



Slika 4.28. Odzivne površine koje opisuju uticaj temperature fermentacije i početnog sadržaja šećera na antioksidativne aktivnosti kombuha napitaka na efluentu vinarije nakon tri dana fermentacije: a) na DPPH, b) na hidroksi radikal i c) za redukcionu moć



Zaključak

5. Zaključak

Cilj ove doktorske disertacije bilo je ispitivanje mogućnosti korišćenja efluenta vinarije za proizvodnju novog tipa kombuha napitka, kao i fizička, hemijska, antioksidativna i mikrobiološka karakterizacija dobijenog proizvoda, uz testiranje njegovog antimikrobnog potencijala.

Novi kombuha proizvod je moguće proizvesti na efluentu vinarije, uz minimalne troškove oko sirovine. Potrebna je samo voda za razblaživanje efluenta u procesu pripreme podloge za kultivaciju, dok dodatak nutrijenata nije nužan. Najveći energetski ulaz je energija potrebna za sterilizaciju efluenta, dok se ovakvom primenom otpadni tok u potpunosti iskoriscava i koristi za proizvodnju kombuha napitka, bez generisanja novog otpada. Ovaj zaključak potvrđuju sledeće činjenice:

- Sadržaj rezidualnog šećera se, očekivano, smanjivao s trajanjem bioprocasa, s tim što je na 30 °C, u prva tri dana, dinamika usvajanja šećera značajno viša kada je njegovo početni sadržaj manji. Nakon tri dana dobijaju se napici čiji je sadržaj šećera, za sve ispitivane uslove fermentacije u rasponu od 0,84 do 12,22 g/200 mL.
- Vrednost pH se kod svi uzoraka kretala u veoma uskom opsegu, od 2,83 do 3,85, dok je ukupna kiselost brzo rasla i dostizala preko 35 g/L nakon devet dana fermentacije na 30 °C.
- Rast biomase je, u poređenju s tradicionalnim kombuha napitkom, značajno uvećan, što otvara prostor za primenu ovog supstrata za proizvodnju bakterijske celuloze koja ima niz potencijalnih primena i prednosti u poređenju s celulozom biljnog porekla. Ovaj fenomen je bio naročito izražen kada je bioprocas vođen na maksimalnim vrednostima temperature i početnog sadržaja šećera (30 °C i 70 g/L početni sadržaj šećera).
- Sirćetna kiselina je, i u ovom istraživanju, potvrđena kao dominantna organska kiselina u kombuha proizvodima. Proizvodnja sirćetne kiseline je direktno proporcionalna temperaturi fermentacije, dok je uticaj početnog sadržaja šećera značajno manji. Nakon nje, najzastupljenije su bile oksalna, koja se uobičajeno javlja u kombuha napitku i vinska kiselina, koja nije tipični proizvod metabolizma kombuha kulture; međutim, ovde potiče od sirovine korišćene za proizvodnju i na njen sadržaj ne utiče značajno temperatura fermentacije, samo početno razblaživanje efluenta vinarije. Mlečna kiselina je određena na efluentu vinarije i podlozi za proizvodnju, međutim nije je bilo moguće odrediti ni u jednom proizvodu dobijenom fermentacijom na 30 i 25 °C, osim nakon tri dana fermentacije sa 70 g/L početnog šećera, dok je kod proizvoda fermentisanih na najnižoj ispitivanoj temperaturi bila prisutna u svim, osim kod uzorka s 30 g/L početnog šećera, nakon devet dana fermentacije.
- Vrednosti antioksidativne aktivnosti prema DPPH i redukciona moć, novog kombuha proizvoda su izuzetne, značajno više u poređenju s tradicionalnim napitkom, naročito antioksidativna aktivnost na DPPH, mada je i redukciona moć

bila viša nego kod kombuha napitka na tradicionalnom supstratu, dok je antioksidativna aktivnost na hidroksi radikal značajno niža nego što je to uobičajeno za tradicionalni kombuha napitak.

- Vitamin C određen je u svim uzorcima kombuha napitaka, mada je njegov sadržaj bio niži nego u efluentu vinarije. Dinamika promene sadržaja vitamina C je takva da je on u svim uzorcima smanjivan na početku kultivacije, da bi, kod većine uzoraka, rastao između šestog i devetog dana. Razgradnja vitamina C bila je bitno manje izražena na nižoj temperaturi, tako je ona poželjnija, ukoliko se želi dobiti kombuha napitak s većim sadržajem vitamina C.
- Početno visoki sadržaj ukupnih fenola smanjen je razblaživanjem, ali je primenjena kombuha kultura sintetisala fenolne materije, tako da su svi kombuha proizvodi nakon devet dana fermentacije imali viši sadržaj ukupnih fenola nego na početku fermentacije. Dinamika promene sadržaja ukupnih fenola zavisila je od konkretnih procesnih parametara, tako je na najvišoj temperaturi porast bio kontinuiran, dok je na najnižoj temperaturi prvo uočen pad, a zatim rast sadržaja ukupnih fenola, a na srednjoj je trend zavisio i od početnog sadržaja šećera u podlozi.
- Od ispitivanih fenolnih kiselina, jedino je galna bila prisutna u svim uzorcima, dok sinapinska nije detektovana ni u jednom uzorku, a ferulna jedino u inicijalnom supstratu. Sve ostale fenolne kiseline su detektovane samo u pojedinim uzorcima.
- Svi uzorci koji su ispitivani pokazali su značajnu antimikrobnu aktivnost prema predstavnicima i Gram pozitivnih i Gram negativnih bakterija, dok prema kvascu nije uočena nikakva antimikrobna aktivnost. Ukupan broj bakterija bio je, trećeg dana, sličan kao u kombuha napitku na crnom čaju, dok je ukupan broj kvasaca na 20 i 30 °C bio sličan, a na 25 °C za oko jednu logaritamsku jedinicu veći.
- Posmatrajući uzorke koji su senzorno odabrani kao pogodni za konzumaciju, utvrđeno je da sadržaj etanola u njima odgovara zahtevima za bezalkoholne napitke, osim za dva: sa najvišim sadržajem šećera na dve više temperature.
- Matematičko modelovanje odabranih pokazatelja fermentacije kombuhe na efluentu vinarije pokazalo je veoma dobru korelaciju s eksperimentalnim vrednostima dobijenim u ovom istraživanju.



Literatura

6. Literatura

- Abd Razak, D. L. i Abd Rashid, N. Y., Jamaluddin, A., Sharifudin, S. A., Abd Kahar, A. i Long, K. (2017). Cosmeceutical potentials and bioactive compounds of rice bran fermented with single and mix culture of *Aspergillus oryzae* and *Rhizopus oryzae*. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, 16(2), 127–134. <https://doi.org/10.1016/j.jssas.2015.04.001>
- Abuduaibifu, A. i Tamer, C. E. (2019). Evaluation of physicochemical and bioaccessibility properties of goji berry kombucha. *Journal of Food Processing and Preservation*, 43(9), 1–14. <https://doi.org/10.1111/jfpp.14077>
- Allen, C. M. (2000). *Kombucha unveiled. part six - research and test results*. <http://users.bestweb.net/~om/~kombu/FAQ/part06.html#BMallen> (pristupljeno 2. 7. 2022.)
- Amarasekara, A. S., Wang, D. i Grady, T. L. (2020). A comparison of kombucha SCOBY bacterial cellulose purification methods. *SN Applied Sciences*, 2(2), 1–7. <https://doi.org/10.1007/s42452-020-1982-2>
- Apelblat, A. i Manzurola, E. (2016). Volumetric properties of aqueous solutions of malonic acid. *Journal of Chemical Thermodynamics*, 102, 63–67. <https://doi.org/10.1016/j.jct.2016.06.023>
- Aung, T. i Eun, J. B. (2021). Production and characterization of a novel beverage from laver (*Porphyra dentata*) through fermentation with kombucha consortium. *Food Chemistry*, 350, 129274. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129274>
- Aung, T. i Eun, J. B. (2022). Impact of time and temperature on the physicochemical, microbiological, and nutraceutical properties of laver kombucha (*Porphyra dentata*) during fermentation. *Lwt*, 154, 112643. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112643>
- Ayed, L., Ben Abid, S. i Hamdi, M. (2017). Development of a beverage from red grape juice fermented with the Kombucha consortium. *Annals of Microbiology*, 67(1), 111–121. <https://doi.org/10.1007/s13213-016-1242-2>
- Barbosa, E. L., Netto, M. C., Junior, L. B., de Moura, L. F., Brasil, G. A., Bertolazi, A. A., de Lima, E. M. i Vasconcelos, C. M. (2022). Kombucha fermentation in blueberry (*Vaccinium myrtillus*) beverage and its *in vivo* gastroprotective effect: Preliminary study. *Future Foods*, 100129. <https://doi.org/10.1016/j.fufo.2022.100129>
- Barnett, J. A. (1976). The utilization of sugars by yeasts. In S. R. Tipson (Ur.), *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry* (Vol. 32, Izdanje C, str. 125–234). Academic Press. [https://doi.org/10.1016/S0065-2318\(08\)60337-6](https://doi.org/10.1016/S0065-2318(08)60337-6)
- Battikh, H., Bakhrouf, A. i Ammar, E. (2012). Antimicrobial effect of Kombucha analogues. *LWT - Food Science and Technology*, 47(1), 71–77. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2011.12.033>
- Bauer-Petrovska, B. i Petrushevska-Tozi, L. (2000). Mineral and water soluble vitamin content in the Kombucha drink. *International Journal of Food Science and Technology*, 35(2), 201–205. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2621.2000.00342.x>
- Baumann, L. i Weisberg, E. (2017). Skincare and nonsurgical skin rejuvenation. In R. J. Peter i P. Neligan (Ur.), *Plastic Surgery: Volume 2: Aesthetic Surgery, Fourth Edition* (str. 23–

- 37). Elsevier.
- Bendini, A., Bonoli, M., Cerretani, L., Biguzzi, B., Lercker, G. i Gallina Toschi, T. (2003). Liquid-liquid and solid-phase extractions of phenols from virgin olive oil and their separation by chromatographic and electrophoretic methods. *Journal of Chromatography A*, 985(1–2), 425–433. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(02\)01460-7](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(02)01460-7)
- Bertsch, P., Etter, D. i Fischer, P. (2021). Transient: In situ measurement of kombucha biofilm growth and mechanical properties. *Food and Function*, 12(9), 4015–4020. <https://doi.org/10.1039/d1fo00630d>
- Bhattacharya, D., Bhattacharya, S., Manti Patra, M., Chakravorty, S., Sarkar, S., Chakraborty, W., Koley, H. i Gachhui, R. (2016). Antibacterial Activity of Polyphenolic Fraction of Kombucha Against Enteric Bacterial Pathogens. *Current Microbiology*, 73(6), 885–896. <https://doi.org/10.1007/s00284-016-1136-3>
- Blanc, P. (1996). Characterization of the tea fungus metabolites. *Biotechnology Letters*, 18(No.2), 139–142. <https://doi.org/10.1007/BF00128667>
- Brenot, A., Chuffart, C., Coste-Manière, I., Deroche, M., Godat, E., Lemoine, L., Ramchandani, M., Sette, E. i Tornaire, C. (2019). 6 - Water footprint in fashion and luxury industry☆. In S. S. Muthu (Ur.), *Water in Textiles and Fashion* (str. 95–113). Woodhead Publishing. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102633-5.00006-3>
- Brito, A. G., Peixoto, J., Oliveira, J. M., Oliveira, J. A., Costa, C., Nogueira, R. i Rodrigues, A. (2007). Chapter 7 - Brewery and Winery Wastewater Treatment: Some Focal Points of Design and Operation. In V. Oreopoulou i W. Russ (Ur.), *Utilization of By-Products and Treatment of Waste in the Food Industry* (str. 109–131). Springer International Publishing.
- Canabady-Rochelle, L. L. S., Harscoat-Schiavo, C., Kessler, V., Aymes, A., Fournier, F. i Girardet, J.-M. (2015). Determination of reducing power and metal chelating ability of antioxidant peptides: Revisited methods. *Food Chemistry*, 183, 129–135. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.02.147>
- Candra, A., Prasetyo, B. E. i Tarigan, J. B. (2021). Study of vitamin C level of soursop leaves (*Annona muricata* L.) and galactomannan utilization in kombucha during fermentation. *AIP Conference Proceedings*, 2342(April). <https://doi.org/10.1063/5.0045669>
- Cardoso, R. R., Neto, R. O., dos Santos D’Almeida, C. T., do Nascimento, T. P., Pressete, C. G., Azevedo, L., Martino, H. S. D., Cameron, L. C., Ferreira, M. S. L. i Barros, F. A. R. de. (2020). Kombuchas from green and black teas have different phenolic profile, which impacts their antioxidant capacities, antibacterial and antiproliferative activities. *Food Research International*, 128 (November 2019), 108782. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108782>
- Chakravorty, S., Bhattacharya, S., Bhattacharya, D., Sarkar, S. i Gachhui, R. (2019). 10 - Kombucha: A Promising Functional Beverage Prepared From Tea. In A. M. Grumezescu i M. A. Holban (Ur.), *Non-Alcoholic Beverages* (str. 285–327). Woodhead Publishing. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815270-6.00010-4>
- Chang, K. (2015). *World tea production and trade. Current and future development*.
- Chawla, P. R., Bajaj, I. B., Survase, S. A. i Singhal, R. S. (2009). Microbial cellulose: Fermentative production and applications. *Food Technology and Biotechnology*, 47(2), 107–124.

- Chen, C. i Liu, B. Y. (2000). Changes in major components of tea fungus metabolites during prolonged fermentation. *Journal of Applied Microbiology*, 89(5), 834–839. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2000.01188.x>
- Cheng, K.-C., Wu, J.-Y., Lin, J.-T. i Liu, W.-H. (2013). Enhancements of isoflavone aglycones, total phenolic content, and antioxidant activity of black soybean by solid-state fermentation with *Rhizopus* spp. *European Food Research and Technology*, 236(6), 1107–1113. <https://doi.org/10.1007/s00217-013-1936-7>
- Costa, A. F. D. S., Maria Alice Vasconcelos Rocha i Sarubbo, L. A. (2017). Review -Bacterial Cellulose: an Ecofriendly Biotextile. *International Journal of Textile and Fashion Technology (IJTFT)*, 7(1), 11–26.
- Coton, M., Pawtowski, A., Taminiau, B., Burgaud, G., Deniel, F., Coulloume-Labarthe, L., Fall, A., Daube, G. i Coton, E. (2017). Unraveling microbial ecology of industrial-scale Kombucha fermentations by metabarcoding and culture-based methods. *FEMS Microbiology Ecology*, 93(5), 1–16. <https://doi.org/10.1093/femsec/fix048>
- Crabtree, H. G. (1929). Observations on the carbohydrate metabolism of tumours. *Biochemical Journal*, 23(3), 536–545. <https://doi.org/10.1042/bj0230536>
- Currier, R. W., Goddard, J. D. V. M., Buechler, K., Quinslink, M. P., Wolfe, S. L., Carroll, T. J., Bennett, T. i Stokes, J. (1995). Unexplained severe illness possibly associated with consumption of Kombucha tea--Iowa. *Morbidity and Mortality Weekly Report, (CDC), Centers for Disease Control and Prevention*, 44(48), 892–900.
- Cvetković, D. (2008). *Kombuha od lekovitog bilja - biološka aktivnost i parametri fermentacije*. Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet Novi Sad.
- Cvetković, D., Ranitović, A., Savić, D., Joković, N., Vidaković, A., Pezo, L. i Markov, S. (2019). Survival of wild strains of lactobacilli during Kombucha fermentation and their contribution to functional characteristics of beverage. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 69(4), 407–415. <https://doi.org/10.31883/pjfn/112276>
- Četojević-Simin, D., Bogdanovic, G. M., Cvetković, D. i Velićanski, A. (2008). Antiproliferative and antimicrobial activity of traditional Kombucha and Satureja montana L. Kombucha. *Journal of B.U.ON.*, 13(3), 395–401.
- da Silva Júnior, J. C., Meireles Mafaldo, Í., de Lima Brito, I. i Tribuzy de Magalhães Cordeiro, A. M. (2022). Kombucha: Formulation, chemical composition, and therapeutic potentialities. *Current Research in Food Science*, 5(February), 360–365. <https://doi.org/10.1016/j.crfs.2022.01.023>
- De Deken, R. H. (1966). The Crabtree Effect: A Regulatory System in Yeast. *Journal of General Microbiology*, 44(1), 149–156. <https://doi.org/10.1099/00221287-44-2-149>
- DeBolt, S., Cook, D. R. i Ford, C. M. (2006). L-tartaric acid synthesis from vitamin C in higher plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(14), 5608–5613. <https://doi.org/10.1073/pnas.0510864103>
- Deeseenthum, S. i Pejovic, J. (2010). Bacterial Inhibition and Antioxidant Activity of Kefir Produced from Thai Jasmine Rice Milk. *Biotechnology(Faisalabad)*, 9(3), 332–337. <https://doi.org/10.3923/biotech.2010.332.337>
- Deghrigue, M., Chriaa, J., Battikh, H., Abid, K. i Bakhrouf, A. (2013). Antiproliferative and antimicrobial activities of kombucha tea. *African Journal of Microbiology Research*,

- 7(27), 3466–3470. <https://doi.org/10.5897/AJMR12.1230>
- Dodić, J. i Grahovac, J. (2013). *Industrijska mikrobiologija: praktikum*. Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet Novi Sad.
- Dufresne, C. i Farnworth, E. (2000). Tea, Kombucha, and health: a review. *Food Research International*, 33, 409–421.
- Dutta, H. i Paul, S. K. (2019). 8 - Kombucha Drink: Production, Quality, and Safety Aspects. In A. M. Grumezescu i A. M. Holban (Ur.), *Production and Management of Beverages* (str. 259–288). Woodhead Publishing. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-815260-7.00008-0>
- Đuračková, Z. (2010). Some current insights into oxidative stress. *Physiological Research*, 8408, 459–469. <https://doi.org/10.33549/physiolres.931844>
- Einaga, Y. (2014). Electrochemical Application of Diamond Electrodes. In V. K. Sarin (Ur.), *Comprehensive Hard Materials* (Vol. 3, str. 493–512). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-096527-7.00056-8>
- Eitenmiller, R., Ye, L. i Landen, W. O. J. (2008). Vitamin Analysis for the Health and Food Sciences. In *Vitamin Analysis for the Health and Food Sciences* (2. izdanje). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781420050165>
- Emiljanowicz, K. E. i Malinowska-Pańczyk, E. (2020). Kombucha from alternative raw materials—The review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 60(19), 3185–3194. <https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1679714>
- Ettayebi, K., Errachidi, F., Jamai, L., Tahri-Jouti, M. A., Sendide, K. i Ettayebi, M. (2003). Biodegradation of polyphenols with immobilized *Candida tropicalis* under metabolic induction. *FEMS Microbiology Letters*, 223(2), 215–219. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(03\)00380-X](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(03)00380-X)
- Ferah Okay, I., Okay, U., Gundogdu, O. L., Bayram, C., Mendil, A. S., Ertugrul, M. S. i Hacimuftuoglu, A. (2022). Syringic acid protects against thioacetamide-induced hepatic encephalopathy: Behavioral, biochemical, and molecular evidence. *Neuroscience Letters*, 769(December 2021), 136385. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2021.136385>
- Frank, G. W. (1995). *Das Teepliz-Getränk*. Ennsthaler Verlag.
- Fu, C., Yan, F., Cao, Z., Xie, F. i Lin, J. (2014). Antioxidant activities of kombucha prepared from three different substrates and changes in content of probiotics during storage. *Food Science and Technology*, 34(1), 123–126. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612014005000012>
- Galdino da Silva, C. J., de Medeiros, A. D. M., de Amorim, J. D. P., do Nascimento, H. A., Converti, A., Costa, A. F. S. i Sarubbo, L. A. (2021). Bacterial cellulose biotextiles for the future of sustainable fashion: a review. *Environmental Chemistry Letters*, 19(4), 2967–2980. <https://doi.org/10.1007/s10311-021-01214-x>
- García-Fernández, A. J., Espín, S., Gómez-Ramírez, P. i Martínez-López, E. (2014). Oxalates. In P. Wexler (Ur.), *Encyclopedia of Toxicology: Third Edition* (Vol. 3, str. 730–734). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386454-3.00526-1>
- Ghosh, J. i Sil, P. C. (2015). Chapter 11 - Natural bioactive molecules: Mechanism of actions and perspectives in organ pathophysiology. In R. Atta-ur (Ur.), *Studies in Natural*

- Products Chemistry* (Vol. 45). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63473-3.00011-3>
- González, Á., Hierro, N., Poblet, M., Mas, A. i Guillamón, J. M. (2005). Application of molecular methods to demonstrate species and strain evolution of acetic acid bacteria population during wine production. *International Journal of Food Microbiology*, 102(3), 295–304. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.11.020>
- Gramza-Michalowska, A., Kulczynski, B., Xindi, Y. i Gumienna, M. (2016). Research on the effect of culture time on the kombucha tea beverage's antiradical capacity and sensory value. *Acta Scientiarum Polonorum, Technologia Alimentaria*, 15(4), 447–457. <https://doi.org/10.17306/J.AFS.2016.4.43>
- Greenwalt, C. J., Ledford, R. A. i Steinkraus, K. H. (1998). Determination and characterization of the antimicrobial activity of the fermented tea Kombucha. *LWT - Food Science and Technology*, 31(3), 291–296. <https://doi.org/10.1006/fstl.1997.0354>
- Greenwalt, C. J., Steinkraus, K. H. i Ledford, R. A. (2000). Kombucha, the fermented tea: Microbiology, composition, and claimed health effects. *Journal of Food Protection*, 63(7), 976–981. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-63.7.976>
- Gregory, D. A., Tripathi, L., Fricker, A. T. R., Asare, E., Orlando, I., Raghavendran, V. i Roy, I. (2021). Bacterial cellulose: A smart biomaterial with diverse applications. *Materials Science and Engineering R: Reports*, 145(March), 100623. <https://doi.org/10.1016/j.mser.2021.100623>
- Gurtler, J. B. i Mai, T. L. (2014). PRESERVATIVES | Traditional Preservatives – Organic Acids. In C. A. Batt i M. Lou Tortorello (Ur.), *Encyclopedia of Food Microbiology* (2. izdanje., str. 119–130). Academic Press.
- Halliwell, B. (2011). Free radicals and antioxidants - Quo vadis? *Trends in Pharmacological Sciences*, 32(3), 125–130. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2010.12.002>
- Halliwell, B. (2012). Free radicals and antioxidants: Updating a personal view. *Nutrition Reviews*, 70(5), 257–265. <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.2012.00476.x>
- Hardoko, Harisman, E. K. i Puspitasari, Y. E. (2020). The kombucha from *Rhizophora mucronata* Lam. herbal tea: Characteristics and the potential as an antidiabetic beverage. *Journal of Pharmacy and Pharmacognosy Research*, 8(5), 410–421.
- Hartmann, A. M., Burlison, L. E., Holmes, A. K. i Geist, C. R. (2000). Effects of chronic kombucha ingestion on open-field behaviors, longevity, appetitive behaviors, and organs in C57-BL/6 mice: A pilot study. *Nutrition*, 16(9), 755–761. [https://doi.org/10.1016/S0899-9007\(00\)00380-4](https://doi.org/10.1016/S0899-9007(00)00380-4)
- Hesseltine, C. W. (1965). A Millennium of Fungi, Food, and Fermentation. *Mycologia*, 57(2), 149–197. <https://doi.org/10.1080/00275514.1965.12018201>
- Ho, C. C., Lin, S. Y., Yang, J. S., Liu, K. C., Tang, Y. J., Yang, M. D., Chiang, J. H., Lu, C. C., Wu, C. L., Chiu, T. H. i Chung, J. G. (2009). Gallic acid inhibits murine leukemia WEHI-3 cells in vivo and promotes macrophage phagocytosis. *In Vivo*, 23(3), 409–414.
- Hopfe, S., Flemming, K., Lehmann, F., Möckel, R., Kutschke, S. i Pollmann, K. (2017). Leaching of rare earth elements from fluorescent powder using the tea fungus Kombucha. *Waste Management*, 62, 211–221. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2017.02.005>

- Hsieh, Y., Chiu, M. C. i Chou, J. Y. (2021). Efficacy of the Kombucha Beverage Derived from Green, Black, and Pu'er Teas on Chemical Profile and Antioxidant Activity. *Journal of Food Quality*, 2021. <https://doi.org/10.1155/2021/1735959>
- <https://ods.od.nih.gov/factsheets/VitaminC-Consumer/> (pristupljeno 1. 7. 2022.).
- <https://research.qut.edu.au/textiler/research/growing-vegan-leather/> (pristupljeno 14. 12. 2022.)
- <https://trends.google.com/trends/explore?date=all&q=kombucha> (pristupljeno 1. 7. 2022.).
- https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/2/24/Illustration_Vitis_vinifera0.jpg (pristupljeno 3. 7. 2022.).
- <https://www.forbes.com/sites/bridgetshirvell/2020/08/13/how-hard-kombucha-became-the-drink-of-2020/?sh=2e7e9780550c> (pristupljeno 19. 4. 2022.).
- <https://www.industryresearch.biz/global-vitamin-c-market-17317933> (pristupljeno 1. 7. 2022.).
- <https://www.tehnologijahrane.com/wp-content/uploads/2013/06/Šema-Razlike-belo-i-crno.jpg> (pristupljeno 3. 7. 2022.).
- https://www.thewinesociety.com/4a6cce/globalassets/discovery/thumbs/riesling_735x790.jpg (pristupljeno 2. 7. 2022.).
- <https://www.wsj.com/articles/the-year-of-fancy-water-and-kombucha-11546269901> (pristupljeno 26. 7. 2022.).
- Ingólfssdóttir, K. (2002). Usnic acid. *Phytochemistry*, 61(7), 729–736. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(02\)00383-7](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(02)00383-7)
- Ishimoto, E. Y., Ferrari, C. K. B., Bastos, D. H. M. i Torres, E. A. F. S. (2006). In vitro antioxidant activity of Brazilian wines and grape juices. *Journal of Wine Research*, 17(2), 107–115. <https://doi.org/10.1080/09571260601004203>
- Islam, M. S., Matsuki, N., Nagasaka, R., Ohara, K., Takamitsu Hosoya, Ozaki, H., Ushio, H. i Hori, M. (2014). Chapter 34 - Rice Bran Antioxidants in Health and Wellness. In R. R. Watson, V. R. Preedy, i S. Zibadi (Ur.), *Wheat and Rice in Disease Prevention and Health* (str. 443–451). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-401716-0.00034-9>
- Iwahashi, H. (2015). Chapter 88 - Inhibitory Effects of Caffeic Acid on Free-Radical Formation. In V. R. Preedy (Ur.), *Coffee in Health and Disease Prevention* (str. 803–811). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409517-5.00088-7>
- Jackson, R. S. (2014a). 1 - Introduction. In R. S. Jackson (Ur.), *Wine Science (Fourth Edition)* (Fourth Edi, str. 1–19). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-381468-5.00001-4>
- Jackson, R. S. (2014b). 10 - Wine Laws, Authentication and Geography. In R. S. Jackson (Ur.), *Wine Science (Fourth Edition)* (Fourth Edi, str. 761–829). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-381468-5.00010-5>
- Jackson, R. S. (2014c). 2 - Grape Species and Varieties. In *Wine Science (Fourth Edition)* (str. 21–67). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-381468-5.00002-6>
- Jackson, R. S. (2014d). 3 - Grapevine Structure and Function. In R. S. Jackson (Ur.), *Wine*

- Science (Fourth Edition)* (Fourth Edi, str. 69–141). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-381468-5.00003-8>
- Jackson, R. S. (2014e). 6 - Chemical Constituents of Grapes and Wine. In R. S. Jackson (Ur.), *Wine Science (Fourth Edition)* (Fourth Edi, str. 347–426). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-381468-5.00006-3>
- Jackson, R. S. (2014f). 7 - Fermentation. In R. S. Jackson (Ur.), *Wine Science (Fourth Edition)* (Fourth Edi, str. 427–534). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-381468-5.00007-5>
- Jackson, R. S. (2014g). 8 - Post-Fermentation Treatments and Related Topics. In R. S. Jackson (Ur.), *Wine Science (Fourth Edition)* (Fourth Edi, str. 535–676). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-381468-5.00008-7>
- Jackson, R. S. (2016). Wines: Types of Table Wines. In *Encyclopedia of Food and Health* (1. izdanje). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384947-2.00753-4>
- Jafari, A. i Amini, A. (2019). Lactic acid gas sensor based on polypyrrole thin film. *Materials Letters*, 236, 175–178. <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2018.10.066>
- Jakubczyk, K., Kałduńska, J., Kochman, J. i Janda, K. (2020). Chemical profile and antioxidant activity of the kombucha beverage derived from white, green, black and red tea. *Antioxidants*, 9(5). <https://doi.org/10.3390/antiox9050447>
- Jayabalan, R., Malbaša, R. V. i Sathishkumar, M. (2015). Kombucha Tea: Metabolites. In J.-M. Mérillon i K. G. Ramawat (Ur.), *Fungal Metabolites. Reference Series in Phytochemistry* (str. 965–978). Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-19456-1_12-1
- Jayabalan, R., Malbaša, R. V. i Sathishkumar, M. (2016). Kombucha. In *Reference Module in Food Science* (str. 1–8). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-100596-5.03032-8>
- Jayabalan, R., Malbaša, R. V, Lončar, E. S., Vitas, J. S. i Sathishkumar, M. (2014). A Review on Kombucha Tea—Microbiology, Composition, Fermentation, Beneficial Effects, Toxicity, and Tea Fungus. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13(4), 538–550. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12073>
- Jayabalan, R., Marimuthu, S. i Swaminathan, K. (2007). Changes in content of organic acids and tea polyphenols during kombucha tea fermentation. *Food Chemistry*, 102, 392–398. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.05.032>
- Jayabalan, R., Subathradevi, P., Marimuthu, S., Sathishkumar, M. i Swaminathan, K. (2008). Changes in free radical scavenging activity of Kombucha during fermentation. *Food Chemistry*, 109, 227–234. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.12.037>
- Jayamani, J. i Shanmugam, G. (2014). Gallic acid, one of the components in many plant tissues, is a potential inhibitor for insulin amyloid fibril formation. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 85, 352–358. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.07.111>
- Jingyan, S., Yuwen, L., Zhiyong, W. i Cunxin, W. (2013). Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis Investigation of thermal decomposition of ascorbic acid by TG-FTIR and thermal kinetics analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 77, 116–119. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2013.01.018>
- Juhász, M., Kitahara, Y., Takahashi, S. i Fujii, T. (2012). Thermal stability of vitamin C :

- Thermogravimetric analysis and use of total ion monitoring chromatograms. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 59, 190–193. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2011.10.011>
- Kallel, L., Desseaux, V., Hamdi, M., Stocker, P. i Ajandouz, E. H. (2012). Insights into the fermentation biochemistry of Kombucha teas and potential impacts of Kombucha drinking on starch digestion. *Food Research International*, 49(1), 226–232. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.08.018>
- Karlson, P. (1988). *Kurzer Lehrbuch der Biochemie für Mediziner und Naturwissenschaftler* (13. Auflag). Georg Thieme Verlag.
- Khalil, H., Ang, C. D. i Khalil, V. (2021). Vitamin B for treating diabetic peripheral neuropathy – A systematic review. *Diabetes and Metabolic Syndrome: Clinical Research and Reviews*, 15(5), 102213. <https://doi.org/10.1016/j.dsx.2021.102213>
- Kliewer, W. M. (1967). The Glucose-Fructose Ratio of Vitis Vinifera Grapes. *American Journal of Enology and Viticulture*, 18(1), 33.
- Konar, M., Bag, S., Roy, P. i Dasgupta, S. (2017). Gallic acid induced dose dependent inhibition of lysozyme fibrillation. *International Journal of Biological Macromolecules*, 103, 1224–1231. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.05.158>
- Kravić, S. i Stojanović, Z. (2016). *Analiza hrane, vode, zemljišta, vazduha u predmeta opšte upotrebe - praktikum* - (R. Malbaša (Ur.)). Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet Novi Sad.
- Kumar, A. i Naraian, R. (2019). Chapter 16 - Producers of bioactive compounds. In V. Kumar Gupta i A. Pandey (Ur.), *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering: Microbial Secondary Metabolites Biochemistry and Applications* (str. 205–221). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63504-4.00016-5>
- Kumar, V. i Joshi, V. K. (2016). Kombucha: Technology, Microbiology, Production, Composition and Therapeutic Value. *International Journal of Food and Fermentation Technology*, 6(1), 13–24. <https://doi.org/10.5958/2277-9396.2016.00022.2>
- Kurata, T. i Sakurai, Y. (1967). Degradation of L-Ascorbic Nonenzymic Acid and Mechanism of Browning Reaction. *Agricultural and Biological Chemistry*, 31(2), 170–176. <https://doi.org/10.1271/bbb1961.31.170>
- La Torre, C., Fazio, A., Caputo, P., Plastina, P., Caroleo, M. C., Cannataro, R. i Cione, E. (2021). Effects of long-term storage on radical scavenging properties and phenolic content of kombucha from black tea. *Molecules*, 26(18), 1–14. <https://doi.org/10.3390/molecules26185474>
- Laavanya, D., Shirkole, S. i Balasubramanian, P. (2021). Current challenges, applications and future perspectives of SCOBY cellulose of Kombucha fermentation. *Journal of Cleaner Production*, 295, 126454. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2021.126454>
- Laureys, D., Britton, S. J. i Clippeleer, J. De. (2020). Kombucha Tea Fermentation : A Review. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 78(3), 165–174. <https://doi.org/10.1080/03610470.2020.1734150>
- Leal, J. M., Suárez, L. V., Jayabalan, R., Oros, J. H. i Escalante-Aburto, A. (2018). A review on health benefits of kombucha nutritional compounds and metabolites. *CYTA - Journal of Food*, 16(1), 390–399. <https://doi.org/10.1080/19476337.2017.1410499>

- Leonarski, E., Cesca, K., Zanella, E., Stambuk, B. U., de Oliveira, D. i Poletto, P. (2021). Production of kombucha-like beverage and bacterial cellulose by acerola byproduct as raw material. *Lwt*, 135(August 2020), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110075>
- Li, R., Xu, Y., Chen, J., Wang, F., Zou, C. i Yin, J. (2022). Enhancing the proportion of gluconic acid with a microbial community reconstruction method to improve the taste quality of Kombucha. *Lwt*, 155, 112937. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112937>
- Lindau, G. (1913). Über *Medusomyces Gisevil*, eine neue Gattung und Art der Hefepilze. *Berichte Der Deutschen Botanischen Gesellschaft*, 31(5), 243–248. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1438-8677.1913.tb05418.x>
- Liu, Y., Pukala, T. L., Musgrave, I. F., Williams, D. M., Dehle, F. C. i Carver, J. A. (2013). Gallic acid is the major component of grape seed extract that inhibits amyloid fibril formation. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 23(23), 6336–6340. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2013.09.071>
- Lončar, E. S., Petrović, S. E., Malbaša, R. V. i Verac, R. M. (2000). Biosynthesis of glucuronic acid by means of tea fungus. *Nahrung - Food*, 44(2), 138–139. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1521-3803\(20000301\)44:2<138::aid-food138>3.0.co;2-%23](https://doi.org/10.1002/(sici)1521-3803(20000301)44:2<138::aid-food138>3.0.co;2-%23)
- Luna-Guevara, M. L., Luna-Guevara, J. J., Hernández-Carranza, P., Ruíz-Espinosa, H. i Ochoa-Velasco, C. E. (2018). Chapter 3 - Phenolic Compounds: A Good Choice Against Chronic Degenerative Diseases. In A. Rahman (Ur.), *Studies in Natural Products Chemistry* (Vol. 59, str. 79–108). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64179-3.00003-7>
- Mahalanobish, S., Saha, S., Dutta, S., Ghosh, S. i Sil, P. C. (2019). Chapter 3 - Anti-inflammatory efficacy of some potentially bioactive natural products against rheumatoid arthritis. In G. Brahmachari (Ur.), *Discovery and Development of Anti-inflammatory Agents from Natural Products* (str. 61–100). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816992-6.00003-6>
- Mahdavifar, B., Hosseinzadeh, M., Salehi-Abargouei, A., Mirzaei, M. i Vafa, M. (2021). Dietary intake of B vitamins and their association with depression, anxiety, and stress symptoms: A cross-sectional, population-based survey. *Journal of Affective Disorders*, 288(March), 92–98. <https://doi.org/10.1016/j.jad.2021.03.055>
- Maia, L. B., Moura, I. i Moura, J. J. G. (2021). Carbon Dioxide Utilisation—The Formate. In L. B. Maia, I. Moura, i J. J. G. Moura (Ur.), *Enzymes for Solving Humankind's Problems* (1. izdanje, str 29–81). Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-58315-6>
- Malandra, L., Wolfaardt, G., Zietsman, A. i Viljoen-Bloom, M. (2003). Microbiology of a biological contactor for winery wastewater treatment. *Water Research*, 37(17), 4125–4134. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(03\)00339-7](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(03)00339-7)
- Malbaša, R. (2009). *Hemijska karakterizacija proizvoda od kombuhe*. Tehnološki fakultet Novi Sad.
- Malbaša, R. V., Lončar, E. i Djurić, M. (2008). Comparison of the products of Kombucha fermentation on sucrose and molasses. *Food Chemistry*, 106(3), 1039–1045. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.07.020>
- Malbaša, R. V., Lončar, E., Djurić, M. i Došenović, I. (2008). Effect of sucrose concentration on the products of Kombucha fermentation on molasses. *Food Chemistry*, 108, 926–932.

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.11.069>

- Malbaša, R. V., Lončar, E. S. i Kolarov, L. A. (2002). L-lactic, L-ascorbic, total and volatile acids contents in dietetic kombucha beverage. *Roumanian Biotechnological Letters*, 7, 891–895.
- Malbaša, R. V., Lončar, E. S., Vitas, J. S. i Čanadanović-Brunet, J. M. (2011). Influence of starter cultures on the antioxidant activity of kombucha beverage. *Food Chemistry*, 127, 1727–1731. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.02.048>
- Malbaša, R. V., Vitas, J., Lončar, E., Grahovac, J. i Milanović, S. (2014). Optimisation of the antioxidant activity of kombucha fermented milk products. *Czech Journal of Food Sciences*, 32(5), 477–484. <https://doi.org/10.17221/447/2013-CJFS>
- Marais, J. i van Wyk, C. J. (1986). Effect of Grape Maturity and Juice Treatments on Terpene Concentrations and Wine Quality of *Vitis vinifera* L. cv. Weisser Riesling and Buketraube. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 7(1), 26–35. <https://doi.org/10.21548/7-1-2343>
- Markov, S. (2012). *Mikrobiologija*. Tehnološki fakultet Novi Sad.
- Márquez, K., Contreras, D., Salgado, P. i Mardones, C. (2019). Production of hydroxyl radicals and their relationship with phenolic compounds in white wines. *Food Chemistry*, 271(2018), 80–86. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.07.165>
- Martínez, M. C. i Andriantsitohaina, R. (2009). Reactive nitrogen species: Molecular mechanisms and potential significance in health and disease. *Antioxidants and Redox Signaling*, 11(3), 669–702. <https://doi.org/10.1089/ars.2007.1993>
- May, A., Narayanan, S., Alcock, J., Varsani, A., Maley, C. i Aktipis, A. (2019). Kombucha: A novel model system for cooperation and conflict in a complex multi-species microbial ecosystem. *PeerJ*, 7:e7565. <https://doi.org/10.7717/peerj.7565>
- Mayser, P., Fromme, S., Leitzmann, G. i Gründer, K. (1995). The yeast spectrum of the ‘tea fungus Kombucha’: Das Hefespektrum des ‘Teepilzes Kombucha.’ *Mycoses*, 38(7–8), 289–295. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0507.1995.tb00410.x>
- Miller, G. L. (1959). Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry*, 31, 426–428. <https://doi.org/10.1021/ac60147a030>
- Mizuta, A. G., de Menezes, J. L., Dutra, T. V., Ferreira, T. V., Castro, J. C., da Silva, C. A. J., Pilau, E. J., Machinski Junior, M. i Abreu Filho, B. A. de. (2020). Evaluation of antimicrobial activity of green tea kombucha at two fermentation time points against *Alicyclobacillus* spp. *Lwt*, 130(May), 109641. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109641>
- Morales, D. (2020). Biological activities of kombucha beverages: The need of clinical evidence. *Trends in Food Science and Technology*, 105(September), 323–333. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.09.025>
- Morales, F. J. i Jiménez-Pérez, S. (2001). Analytical, Nutritional and Clinical Methods Section Free radical scavenging capacity of Maillard reaction products as related to colour and fluorescence. *Food Chemistry*, 72, 119–125. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(00\)00239-9](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(00)00239-9)
- Moreno, J. i Peinado, R. (2012a). Chapter 1 - The Vine. In *Enological Chemistry* (str. 1–11). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-388438-1.00001-7>

- Moreno, J. i Peinado, R. (2012b). Chapter 11 - The Transformation of Must into Wine. In *Enological Chemistry* (str. 157–182). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-388438-1.00011-x>
- Moreno, J. i Peinado, R. (2012c). Chapter 14 - Buffering Capacity of Wines. In *Enological Chemistry* (str. 223–251). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-388438-1.00014-5>
- Moreno, J. i Peinado, R. (2012d). Chapter 3 - Must Aromas. In *Enological Chemistry* (str. 23–39). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-388438-1.00003-0>
- Moreno, J. i Peinado, R. (2012e). Chapter 7 - Sugars in Must. In *Enological Chemistry* (str. 95–107). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-388438-1.00007-8>
- Moreno, J. i Peinado, R. (2012f). Chapter 9 - Grape Acids. In *Enological Chemistry* (str. 121–135). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-388438-1.00009-1>
- Mosse, K. P. M., Patti, A. F., Christen, E. W. i Cavagnaro, T. R. (2011). Review: Winery wastewater quality and treatment options in Australia. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 17(2), 111–122. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2011.00132.x>
- Naudé, T. W. i Naidoo, V. (2007). Oxalates-containing plants. In R. C. Gupta (Ur.), *Veterinary Toxicology* (str. 880–891). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-012370467-2/50166-8>
- Nguyen, H. D. i Kim, M. (2022). The role of mixed B vitamin intakes on cognitive performance : Modeling , genes and miRNAs involved. *Journal of Psychiatric Research*, 152(March), 38–56. <https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2022.06.006>
- Nguyen, V. T., Flanagan, B., Mikkelsen, D., Ramirez, S., Rivas, L., Gidley, M. J. i Dykes, G. A. (2010). Spontaneous mutation results in lower cellulose production by a *Gluconacetobacter xylinus* strain from Kombucha. *Carbohydrate Polymers*, 80(2), 337–343. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.11.019>
- Nishimura, M., Otsuki, Y., Shinohara, H., Okamoto, H., Miyake, M., Miyajima, J., Kumano, H., Hino, Y. i Sato, M. (2010). Tea in the Historical Context of East Asia: Cultural Interactions across Borders. *Cultural Reproduction on Its Interface: From the Perspectives of Text, Diplomacy, Otherness, and Tea in East Asia*, 195–226.
- Nowak, R., Olech, M. i Nowacka, N. (2013). Plant Polyphenols as Chemopreventive Agents. *Polyphenols in Human Health and Disease*, 2, 1289–1307. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-398456-2.00086-4>
- Ohno, Y., Fukuda, K., Takemura, G., Toyota, M., Watanabe, M., Yasuda, N., Xinbin, Q., Maruyama, R., Akao, S., Gotou, K., Fujiwara, T. i Fujiwara, H. (1999). Induction of apoptosis by gallic acid in lung cancer cells. In *Anti-Cancer Drugs* (Vol. 10, Izdanje 9, str. 845–851). <https://doi.org/10.1097/00001813-199910000-00008>
- Oliveira, M. i Duarte, E. (2016). Integrated approach to winery waste: waste generation and data consolidation. *Frontiers of Environmental Science and Engineering*, 10(1), 168–176. <https://doi.org/10.1007/s11783-014-0693-6>
- Osiripun, V. i Apisittiwong, T. (2021). Polyphenol and antioxidant activities of Kombucha fermented from different teas and fruit juices. *Journal of Current Science and Technology*, 11(2), 188–196. <https://doi.org/10.14456/jcst.2021.20>

- Phan, T. G., Estell, J., Duggin, G., Beer, I., Smith, D. i Ferson, M. J. (1998). Lead poisoning from drinking Kombucha tea brewed in a ceramic pot. *Medical Journal of Australia*, 169(11–12), 644–646. <https://doi.org/10.5694/j.1326-5377.1998.tb123448.x>
- Podolich, O., Zaets, I., Kukharenko, O., Orlovska, I., Reva, O., Khiruneneko, L., Sosnin, M., Haidak, A., Shpylova, S., Rohutskyy, I., Kharina, A., Skoryk, Kremensky, M., Klymchuk, D., Demets, R., de Vera, J. P. i Kozyrovska, N. (2017). The First Space-Related Study of a Kombucha Multimicrobial Cellulose-Forming Community: Preparatory Laboratory Experiments. *Origins of Life and Evolution of Biospheres*, 47(2), 169–185. <https://doi.org/10.1007/s11084-016-9483-4>
- Poerwono, H., Higashiyama, K., Kubo, H., Poernomo, A. T., Suharjono, Ketut Sudiana, I. indrayanto, G. i Brittain, H. G. (2001). Citric Acid. In A. A. Al-Badr, A. K. Dash, K. Florey, G. Indrayanto, D. P. Ip, K. Kuma, D. J. Mazzo, L. Shervington, i T. J. Wozniak (Ur.), *Analytical Profiles of Drug Substances and Excipients* (Volume 28, str. 1–76). Academic Press. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1075-6280\(01\)28002-1](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1075-6280(01)28002-1)
- Pravilnik o metodama uzimanja uzoraka i vršenja hemijskih i fizičkih analiza radi kontrole kvaliteta proizvoda od voća i povrća, službeni list SFRJ 29/83.
- Pure, A. E. i Pure, M. E. (2016). Antioxidant and antibacterial activity of kombucha beverages prepared using banana peel, common nettles and black tea infusions. *Applied Food Biotechnology*, 3(2), 125–130. <https://doi.org/10.22037/afb.v3i2.11138>
- Rahmani, R., Beaufort, S., Villarreal-Soto, S. A., Taillandier, P., Bouajila, J. i Debouba, M. (2019). Kombucha fermentation of African mustard (*Brassica tournefortii*)leaves: Chemical composition and bioactivity. *Food Bioscience*, 30(April), 100414. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2019.100414>
- Raina, K., Rajamanickam, S., Deep, G., Singh, M., Agarwal, R. i Agarwal, C. (2008). Chemopreventive effects of oral gallic acid feeding on tumor growth and progression in TRAMP mice. *Molecular Cancer Therapeutics*, 7(5), 1258–1267. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-07-2220>
- Ramírez Tapias, Y. A., Di Monte, M. V., Peltzer, M. A. i Salvay, A. G. (2022). Bacterial cellulose films production by Kombucha symbiotic community cultured on different herbal infusions. *Food Chemistry*, 372(October 2021). <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.131346>
- Ray, P. D., Huang, B. W. i Tsuji, Y. (2012). Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cellular Signalling*, 24(5), 981–990. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2012.01.008>
- Rechner, A. R., Smith, M. A., Kuhnle, G., Gibson, G. R., Debnam, E. S., Srail, S. K. S., Moore, K. P. i Rice-Evans, C. A. (2004). Colonic metabolism of dietary polyphenols: Influence of structure on microbial fermentation products. *Free Radical Biology and Medicine*, 36(2), 212–225. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2003.09.022>
- Redeker, V. (2010). Chapter 6 - Mass spectrometry analysis of C-terminal posttranslational modifications of tubulins. In L. Wilson i J. J. Correia (Ur.), *Methods in Cell Biology* (Prvo izdanje, Vol. 95, Izdanje C). Academic Press. [https://doi.org/10.1016/S0091-679X\(10\)95006-1](https://doi.org/10.1016/S0091-679X(10)95006-1)
- Reiss, J. (1987). Der Teepiltz und sein Stoffwechselprodukte. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau*, 83(9), 286–290.

- Reiss, J. (1994). Influence of different sugars on the metabolism of the tea fungus. *Zeitschrift Für Lebensmittel-Untersuchung Und -Forschung*, 198(3), 258–261. <https://doi.org/10.1007/BF01192606>
- Rice-Evans, C. (2012). Flavonoid Antioxidants. *Current Medicinal Chemistry*, 8(7), 797–807. <https://doi.org/10.2174/0929867013373011>
- Roche, J. (1998). *The History and Spread of Kombucha*. <http://users.bestweb.net/~om/~kombu/roche.html>
- Romanet, R., Coelho, C., Liu, Y., Bahut, F., Ballester, J., Nikolantonaki, M. i Gougeon, R. D. (2019). The antioxidant potential of white wines relies on the chemistry of sulfur-containing compounds: An optimized DPPH assay. *Molecules*, 24(7). <https://doi.org/10.3390/molecules24071353>
- Rončević, Z. (2016). *Optimizacija proizvodnje ksantana u laboratorijskom bioreaktoru na otpadnim vodama vinarija*. Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet Novi Sad.
- Roussin, M. R. (1996). *Analyses of Kombucha Ferments*. Information Resources, LC.
- Rubico, S. M. i McDaniel, M. R. (1992). Sensory evaluation of acids by free-choice profiling. *Chemical Senses*, 17(3), 273–289. <https://doi.org/10.1093/chemse/17.3.273>
- Sadjadi, J. (1998). Cutaneous Anthrax Associated With the Kombucha “Mushroom” in Iran. *JAMA*, 280(18), 1567–1568. <https://doi.org/10-1001/pubs.JAMA-ISSN-0098-7484-280-18-jbk1111>
- Sai Ram, M., Anju, B., Pauline, T., Prasad, D., Kain, A. K., Mongia, S. S., Sharma, S. K., Singh, B., Singh, R. ilavazhagan, G., Kumar, D. i Selvamurthy, W. (2000). Effect of Kombucha tea on chromate(VI)-induced oxidative stress in albino rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 71(1–2), 235–240. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(00\)00161-6](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(00)00161-6)
- Sakai, E. i Tsukuba, T. (2015). Chapter 96 - Coffee and Bone Metabolism: Kahweol and Osteoclastogenesis. In V. R. Preedy (Ur.), *Coffee in Health and Disease Prevention* (Vol. 1, str. 869–875). Academic PRes. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409517-5.00096-6>
- Saldívar-González, F. I., Gómez-García, A., Chávez-Ponce De León, D. E., Sánchez-Cruz, N., Ruiz-Rios, J., Pilón-Jiménez, B. A. i Medina-Franco, J. L. (2018). Inhibitors of DNA methyltransferases from natural sources: A computational perspective. *Frontiers in Pharmacology*, 9(OCT), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.01144>
- Savary, O., Mounier, J., Thierry, A., Poirier, E., Jourden, J., Maillard, M. B., Penland, M., Decamps, C., Coton, E. i Coton, M. (2021). Tailor-made microbial consortium for Kombucha fermentation: Microbiota-induced biochemical changes and biofilm formation. *Food Research International*, 147(June). <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110549>
- Schüttler, A., Fritsch, S., Jung, R., Rauhut, D. i Darriet, P. (2014). Characterizing Dry Riesling Wines’ Aromatic Typicality with Sensory and Instrumental Analytical Methods – A Comparative Approach. In *Flavour Science*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-398549-1.00059-3>
- Schwartz, S. A. i Caprioli, R. M. (2008). Chapter 23 - Molecular imaging by mass spectrometry. In K. Vékey, A. Telekes, i A. Vertes (Ur.), *Medical Applications of Mass Spectrometry* (str. 533–554). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/B978-044451980-1.50025-2>
- Shahbazi, H., Gahrue, H. H., Golmakani, M. T., Eskandari, M. H. i Movahedi, M. (2018).

- Effect of medicinal plant type and concentration on physicochemical, antioxidant, antimicrobial, and sensorial properties of kombucha. *Food Science and Nutrition*, 6, 2568–2577. <https://doi.org/10.1002/fsn3.873>
- Siebert, K. J. (1999). Modeling the flavor thresholds of organic acids in beer as a function of their molecular properties. *Food Quality and Preference*, 10(2), 129–137. [https://doi.org/10.1016/s0950-3293\(98\)00059-7](https://doi.org/10.1016/s0950-3293(98)00059-7)
- Sievers, M., Lanini, C., Weber, A., Schuler-Schmid, U. i Teuber, M. (1995). Microbiology and Fermentation Balance in a Kombucha Beverage Obtained from a Tea Fungus Fermentation. *Systematic and Applied Microbiology*, 18(4), 590–594. [https://doi.org/10.1016/S0723-2020\(11\)80420-0](https://doi.org/10.1016/S0723-2020(11)80420-0)
- Silberhorn, E. M. (2005). Oxalates. In P. Wexler (Ur.), *Encyclopedia of Toxicology: Second Edition* (str. 320–322). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B0-12-369400-0/01058-9>
- Silva, K. A., Uekane, T. M., Miranda, J. F. de, Ruiz, L. F., Motta, J. C. B. da, Silva, C. B., Pitanguí, N. de S., Gonzalez, A. G. M., Fernandes, F. F. i Lima, A. R. (2021). Kombucha beverage from non-conventional edible plant infusion and green tea: Characterization, toxicity, antioxidant activities and antimicrobial properties. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 34, 102032. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2021.102032>
- Singleton, V. L. i Rossi, J. A. J. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16, 144–158.
- Sinir, G. Ö., Tamer, C. E. i Suna, S. (2019). 10 - Kombucha Tea: A Promising Fermented Functional Beverage. In A. M. Grumezescu i A. M. Holban (Ur.), *Fermented Beverages* (str. 401–432). Woodhead Publishing. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815271-3.00010-5>
- Sknepnek, A., Tomić, S., Miletić, D., Lević, S., Čolić, M., Nedović, V. i Nikšić, M. (2021). Fermentation characteristics of novel *Coriolus versicolor* and *Lentinus edodes* kombucha beverages and immunomodulatory potential of their polysaccharide extracts. *Food Chemistry*, 342(June 2020), 128344. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128344>
- Soares, M. G., de Lima, M. i Reolon Schmidt, V. C. (2021). Technological aspects of kombucha, its applications and the symbiotic culture (SCOBY), and extraction of compounds of interest: A literature review. *Trends in Food Science and Technology*, 110, 539–550. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.02.017>
- Sreeramulu, G., Zhu, Y. i Knol, W. (2000). Kombucha fermentation and its antimicrobial activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(6), 2589–2594. <https://doi.org/10.1021/jf991333m>
- Sridhar, K. i Charles, A. L. (2019). In vitro antioxidant activity of Kyoho grape extracts in DPPH and ABTS assays: Estimation methods for EC50 using advanced statistical programs. *Food Chemistry*, 275, 41–49. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.09.040>
- Srinivasan, R., Smolinske, S. i Greenbaum, D. (1997). Probable gastrointestinal toxicity of Kombucha tea: Is this beverage healthy or harmful? *Journal of General Internal Medicine*, 12(10), 643–645. <https://doi.org/10.1046/j.1525-1497.1997.07127.x>
- Steels, H., James, S. A., Bond, C. J., Roberts, I. N. i Stratford, M. (2002). *Zygosaccharomyces kombuchaensis*: The physiology of a new species related to the spoilage yeasts

- Zygosaccharomyces lentus and Zygosaccharomyces bailii. *FEMS Yeast Research*, 2(2), 113–121. [https://doi.org/10.1016/S1567-1356\(02\)00080-6](https://doi.org/10.1016/S1567-1356(02)00080-6)
- Sun, T., Li, J. i Chen, C. (2015). Effects of blending wheatgrass juice on enhancing phenolic compounds and antioxidant activities of traditional kombucha beverage. *Journal of Food and Drug Analysis*, 23(4), 709–718. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2015.01.009>
- Talebi, M., Frink, L. A., Patil, R. A. i Armstrong, D. W. (2017). Examination of the Varied and Changing Ethanol Content of Commercial Kombucha Products. *Food Analytical Methods*, 10(12), 4062–4067. <https://doi.org/10.1007/s12161-017-0980-5>
- Tekos, F., Makri, S., Skaperda, Z. V., Patouna, A., Terizi, K., Kyriazis, I. D., Kotseridis, Y., Mikropoulou, E. V., Papaefstathiou, G., Halabalaki, M. i Demetrios, K. (2021). Assessment of antioxidant and antimutagenic properties of red and white wine extracts in vitro. *Metabolites*, 11(7). <https://doi.org/10.3390/metabo11070436>
- Teoh, A. L., Heard, G. i Cox, J. (2004). Yeast ecology of Kombucha fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 95(2), 119–126. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2003.12.020>
- Trajković, J., Baras, J., Mirić, M. i Šiler, S. (1983). *Analize životnih namirnica* (O. Stojanović (Ur.)). Univerzitet u Beogradu, Tehnološko-metalurški fakultet.
- Tran, T., Grandvalet, C., Verdier, F., Martin, A., Alexandre, H. i Tourdot-Maréchal, R. (2020). Microbiological and technological parameters impacting the chemical composition and sensory quality of kombucha. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 19(4), 2050–2070. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12574>
- Tu, C., Tang, S., Azi, F., Hu, W. i Dong, M. (2019). Use of kombucha consortium to transform soy whey into a novel functional beverage. *Journal of Functional Foods*, 52, 81–89. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2018.10.024>
- Ulusoy, A. i Tamer, C. E. (2019). Determination of suitability of black carrot (*Daucus carota* L. spp sativus var. atropurpureus Alef.) juice concentrate, cherry laurel (*Prunus laurocerasus*), blackthorn (*Prunus spinosa*) and red raspberry (*Rubus ideaus*) for kombucha beverage production. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 13(2), 1524–1536. <https://doi.org/10.1007/s11694-019-00068-w>
- Uredba o graničnim vrednostima emisije zagađujućih materija u vode i rokovima za njihovo dostizanje "Sl. glasnik RS" 1/2016*, (2016).
- Velićanski, A., Cvetković, D. i Markov, S. (2013). Characteristics of Kombucha fermentation on medicinal herbs from Lamiaceae family. *Romanian Biotechnological Letters*, 18(1), 8034–8042.
- Velićanski, A., Cvetković, D., Markov, S., Tumbas Šaponjac, V. i Vulić, J. (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 Technology and Biotechnology*, 52(4), 420–429. <https://doi.org/10.17113/b.52.04.14.3611> original
- Villarreal-Soto, S. A., Beaufort, S., Bouajila, J., Souchard, J. P., Renard, T., Rollan, S. i Taillandier, P. (2019). Impact of fermentation conditions on the production of bioactive compounds with anticancer, anti-inflammatory and antioxidant properties in kombucha tea extracts. *Process Biochemistry*, 83(May), 44–54.

<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2019.05.004>

- Villarreal-Soto, S. A., Beaufort, S., Bouajila, J., Souchard, J. P. i Taillandier, P. (2018). Understanding Kombucha Tea Fermentation: A Review. *Journal of Food Science*, 83(3), 580–588. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.14068>
- Villarreal-Soto, S. A., Bouajila, J., Pace, M., Leech, J., Cotter, P. D., Souchard, J. P., Taillandier, P. i Beaufort, S. (2020). Metabolome-microbiome signatures in the fermented beverage, Kombucha. *International Journal of Food Microbiology*, 333(July), 108778. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108778>
- Vitas, J. S. (2013). *Antioksidativna aktivnost fermentisanih mlečnih proizvoda dobijenih pomoću kombuhe*. University of Novi Sad, Faculty of Tehnology Novi Sad.
- Vitas, J. S., Cvetanović, A. D., Mašković, P. Z., Švarc-Gajić, J. V, i Malbaša, R. V. (2018). Chemical composition and biological activity of novel types of kombucha beverages with yarrow. *Journal of Functional Foods*, 44, 95–102. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2018.02.019>
- Vitas, J. S., Malbaša, R. V, Grahovac, J. A. i Lončar, E. S. (2013). The antioxidant activity of kombucha fermented milk product with stinging nettle and winter savory. *Chemical Industry and Chemical Engineering Quarterly*, 19(1), 129–139. <https://doi.org/10.2298/CICEQ120205048V>
- Vitas, J. S., Vukmanović, S., Čakarević, J., Popović, L. i Malbaša, R. (2020). Kombucha fermentation of six medicinal herbs: Chemical profile and biological activity. *Chemical Industry and Chemical Engineering Quarterly*, 26(2), 157–170. <https://doi.org/10.2298/ciceq190708034v>
- Vitas, J. S., Vukmanović, S. Z., Malbaša, R. V, i Tepić Horecki, A. N. (2019). Influence of process temperature on ethanol content in Kombucha products obtained by fermentation of flotated must effluent. *Acta Periodica Technologica*, 50, 311–315. <https://doi.org/10.2298/APT1950331V>
- Vrbaški, Lj. i Markov, S. (1992). *Praktikum iz mikrobiologije*. Tehnološki fakultet Novi Sad.
- Vukmanović, S., Vitas, J. i Malbaša, R. (2020). Valorization of winery effluent using kombucha culture. *Journal of Food Processing and Preservation*, 44, e14627. <https://doi.org/10.1111/jfpp.14627>
- Vukmanović, S., Vitas, J., Ranitović, A., Cvetković, D., Tomić, A. i Malbaša, R. (2022). Certain production variables and antimicrobial activity of novel winery effluent based kombucha. *LWT - Food Science and Technology*, 154, 112726. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112726>
- Xia, X., Dai, Y., Wu, H., Liu, X., Wang, Y., Yin, L., Wang, Z., Li, X. i Zhou, J. (2019). Kombucha fermentation enhances the health-promoting properties of soymilk beverage. *Journal of Functional Foods*, 62(June), 103549. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2019.103549>
- Yamada, Y., Yukphan, P., Vu, H. T. L., Muramatsu, Y., Ochaikul, D. i Nakagawa, Y. (2012). Subdivision of the genus *Gluconacetobacter* Yamada, Hoshino and Ishikawa 1998: The proposal of *Komagatabacter* gen. nov., for strains accommodated to the *Gluconacetobacter xylinus* group in the α -Proteobacteria. *Annals of Microbiology*, 62(2), 849–859. <https://doi.org/10.1007/s13213-011-0288-4>
- Yamada, Y., Yukphan, P., Vu, H. T. L., Muramatsu, Y., Ochaikul, D., Tanasupawat, S. i

- Nakagawa, Y. (2012). Description of *Komagataeibacter* gen. nov., with proposals of new combinations (Acetobacteraceae). *Journal of General and Applied Microbiology*, 58(5), 397–404. <https://doi.org/10.2323/jgam.58.397>
- Yavari, N., Assadi, M. M., Larijani, K. i Moghadam, M. B. (2011). Optimizing Glucuronic Acid Production Using Tea Fungus on Sour Cherry Juice by Response Surface Methodology. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 4(8), 1788–1794.
- Ye, M., Yue, T. i Yuan, Y. (2014). Evolution of polyphenols and organic acids during the fermentation of apple cider. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94, 2951–2957. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6639>
- Yildirim, A., Mavi, A. i Kara, A. A. (2001). Determination of antioxidant and antimicrobial activities of *Rumex crispus* L. extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 4083–4089. <https://doi.org/10.1021/jf0103572>
- Yin, C., Ye, T., Yu, Y., Li, W. i Ren, Q. (2019). Detection of hydroxyl radicals in sonoelectrochemical system. *Microchemical Journal*, 144(August 2018), 369–376. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2018.09.025>
- Zhang, J. (2019). *A Comprehensive Study on Kombucha and Its Analogues*. The Federal University of Lavras.
- Zhang, J., Van Mullem, J., Dias, D. R. i Schwan, R. F. (2021). The chemistry and sensory characteristics of new herbal tea-based kombuchas. *Journal of Food Science*, 86(3), 740–748. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.15613>
- Zhao, Z. J., Sui, Y. C., Wu, H. W., Zhou, C. B., Hu, X. C. i Zhang, J. (2018). Flavour chemical dynamics during fermentation of kombucha tea. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 30(9), 732–741. <https://doi.org/10.9755/ejfa.2018.v30.i9.1794>
- Zhong, J., Xu, C., Reece, E. A. i Yang, P. (2016). The green tea polyphenol EGCG alleviates maternal diabetes-induced neural tube defects by inhibiting DNA hypermethylation. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 215(3), 368.e1-368.e10. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2016.03.009>
- Ziemlewska, A., Nizioł-Łukaszewska, Z., Bujak, T., Zagórska-Dziok, M., Wójciak, M. i Sowa, I. (2021). Effect of fermentation time on the content of bioactive compounds with cosmetic and dermatological properties in Kombucha Yerba Mate extracts. *Scientific Reports*, 11(1), 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-98191-6>
- Zou, C., Li, R. Y., Chen, J. X., Wang, F., Gao, Y., Fu, Y. Q., Xu, Y. Q. i Yin, J. F. (2021). Zijuan tea- based kombucha: Physicochemical, sensorial, and antioxidant profile. *Food Chemistry*, 363. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130322>
- Zubaidah, E., Dewantari, J. F., Novitasari, R. F., Srianta, I. i Blanc, P. J. (2018). Biocatalysis and Agricultural Biotechnology Potential of snake fruit (*Salacca zalacca* (Gaerth.) Voss) for the development of a beverage through fermentation with the Kombucha consortium. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 13(September 2017), 198–203. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2017.12.012>

Ovaj Obrazac čini sastavni deo doktorske disertacije, odnosno dokorskog umetničkog projekta koji se brani na Univerzitetu u Novom Sadu. Popunjen Obrazac ukoričiti iza teksta doktorske disertacije, odnosno dokorskog umetničkog projekta.

Plan tretmana podataka

Naziv projekta/istraživanja
Valorizacija proizvoda fermentacije kombuhe na otpadnom toku iz proizvodnje vina
Naziv institucije/institucija u okviru kojih se sprovodi istraživanje
Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet Novi Sad
Naziv programa u okviru kog se realizuje istraživanje
Istraživanje se sprovodi u okviru nacionalnog programa 451-03-68/2022-14/200134
1. Opis podataka
<p>1.1 Vrsta studije</p> <p><i>Ukratko opisati tip studije u okviru koje se podaci prikupljaju</i></p> <p><u>Doktorska disertacija</u></p>
<p>1.2 Vrste podataka</p> <p><input checked="" type="radio"/> a) kvantitativni</p> <p>b) kvalitativni</p>
<p>1.3. Način prikupljanja podataka</p> <p>a) ankete, upitnici, testovi</p> <p>b) kliničke procene, medicinski zapisi, elektronski zdravstveni zapisi</p> <p>v) genotipovi: navesti vrstu _____</p> <p>g) administrativni podaci: navesti vrstu _____</p> <p>d) uzorci tkiva: navesti vrstu _____</p> <p><input checked="" type="radio"/> đ) snimci, fotografije: navesti vrstu <u>fotografije uzoraka</u></p> <p><input checked="" type="radio"/> e) tekst, navesti vrstu <u>literatura</u></p> <p>ž) mapa, navesti vrstu _____</p>

z) ostalo: opisati web sadržaj

1.3 Format podataka, upotrebljene skale, količina podataka

1.3.1 Upotrebljeni softver i format datoteke:

a) Excel fajl, datoteka xlxs

b) SPSS fajl, datoteka _____

c) PDF fajl, datoteka _____

d) Tekst fajl, datoteka docx

e) JPG fajl, datoteka png. jpeg. tif.

f) Ostalo, datoteka statistički softver Statistica 13, Design-Expert 8.1

1.3.2. Broj zapisa (kod kvantitativnih podataka)

a) broj varijabli veliki broj

b) broj merenja (ispitanika, procena, snimaka i sl.) _____

1.3.3. Ponovljena merenja

a) da

b) ne

Ukoliko je odgovor da, odgovoriti na sledeća pitanja:

a) vremenski razmak između ponovljenih mera je uzastopno

b) varijable koje se više puta mere odnose se na sve eksperimentalne analize

v) nove verzije fajlova koji sadrže ponovljena merenja su imenovane kao _____

Napomene: _____

Da li formati i softver omogućavaju deljenje i dugoročnu validnost podataka?

a) Da

b) Ne

Ako je odgovor ne, obrazložiti _____

2. Prikupljanje podataka

2.1 Metodologija za prikupljanje/generisanje podataka

2.1.1. U okviru kog istraživačkog nacrta su podaci prikupljeni?

- a) eksperiment, navesti tip biološka analiza, hemijska analiza, statistička analiza
- b) korelaciono istraživanje, navesti tip obrađa podataka AOVA, RSM
- c) analiza teksta, navesti tip _____
- d) ostalo, navesti šta pregled dostupne literature iz oblasti, definisanje načina izvođenja istraživanja, diskusija rezultata i poređenje sa literaturnim podacima, izvođenje zaključaka.

2.1.2 Navesti vrste mernih instrumenata ili standarde podataka specifičnih za određenu naučnu disciplinu (ako postoje).

HPLC sistem Agilent 1100 serije (Santa Klara, Kalifornija, SAD), pH-metar ADWA AD 1000 pH/mV i Temperature Meter (Segedin, Mađarska), inkubator s hlađenjem Domel Cool Incubator 23 (Železniki, Slovenija), spektrofotometar LLG-uniSPEC2 Spectrophotometer (Mekenhajm, Nemačka), centrifuga Tehnica LC-320 (Železniki, Slovenija), analitička vaga Shimadzu AX200 (Kjoto, Japan), tehnička vaga Shimadzu BL-2200H (Kjoto, Japan).

2.2 Kvalitet podataka i standardi

2.2.1. Tretman nedostajućih podataka

- a) Da li matrica sadrži nedostajuće podatke? Da Ne

Ako je odgovor da, odgovoriti na sledeća pitanja

:

- a) Koliki je broj nedostajućih podataka? _____
- b) Da li se korisniku matrice preporučuje zamena nedostajućih podataka? Da Ne
- v) Ako je odgovor da, navesti sugestije za tretman zamene nedostajućih podataka

2.2.2. Na koji način je kontrolisan kvalitet podataka? Opisati

Kvalitet podataka je kontrolisan izvođenjem višestrukih merenja i primenom statističkih alata za evaluaciju njihovog kvaliteta.

2.2.3. Na koji način je izvršena kontrola unosa podataka u matricu?

Kontrola unosa podataka je izvršena upoređivanjem dobijenih podataka sa literaturnim podacima.

3. Tretman podataka i prateća dokumentacija

3.1. Tretman i čuvanje podataka

3.1.1. *Podaci će biti deponovani u Nacionalnom repozitorijumu disertacija u Srbiji i u repozitorijumu Informacionog sistema naučne delatnosti Univerziteta u Novom Sadu..*

3.1.2. URL adresa <https://nardus.mpn.gov.rs>, <http://www.uns.ac.rs/index.php/univerzitet/javnos-trada-2/javni-uvod-doktorske>

3.1.3. DOI _____

3.1.4. *Da li će podaci biti u otvorenom pristupu?*

a) *Da*

b) *Da, ali posle embarga koji će trajati do* _____

v) *Ne*

Ako je odgovor ne, navesti razlog _____

3.1.5. *Podaci neće biti deponovani u repozitorijum, ali će biti čuvani.*

Obrazloženje

3.2 Metapodaci i dokumentacija podataka

3.2.1. Koji standard za metapodatke će biti primenjen? _____

3.2.1. Navesti metapodatke na osnovu kojih su podaci deponovani u repozitorijum.

Ako je potrebno, navesti metode koje se koriste za preuzimanje podataka, analitičke i proceduralne informacije, njihovo kodiranje, detaljne opise varijabli, zapisa itd.

3.3 Strategija i standardi za čuvanje podataka

3.3.1. Do kog perioda će podaci biti čuvani u repozitorijumu? _____

3.3.2. Da li će podaci biti deponovani pod šifrom? Da Ne

3.3.3. Da li će šifra biti dostupna određenom krugu istraživača? Da Ne

3.3.4. Da li se podaci moraju ukloniti iz otvorenog pristupa posle izvesnog vremena?

Da Ne

Objasni

4. Bezbednost podataka i zaštita poverljivih informacija

Ovaj odeljak MORA biti popunjen ako vaši podaci uključuju lične podatke koji se odnose na učesnike u istraživanju. Za druga istraživanja treba takođe razmotriti zaštitu i sigurnost podataka.

4.1 Formalni standardi za sigurnost informacija/podataka

Istraživači koji sprovode ispitivanja s ljudima moraju da se pridržavaju Zakona o zaštiti podataka o ličnosti (https://www.paragraf.rs/propisi/zakon_o_zastiti_podataka_o_licnosti.html) i odgovarajućeg institucionalnog kodeksa o akademskom integritetu.

4.1.2. Da li je istraživanje odobreno od strane etičke komisije? Da Ne

Ako je odgovor Da, navesti datum i naziv etičke komisije koja je odobrila istraživanje

4.1.2. Da li podaci uključuju lične podatke učesnika u istraživanju? Da Ne

Ako je odgovor da, navedite na koji način ste osigurali poverljivost i sigurnost informacija vezanih za ispitanike:

- a) Podaci nisu u otvorenom pristupu
 - b) Podaci su anonimizirani
 - c) Ostalo, navesti šta
-
-

5. Dostupnost podataka

5.1. Podaci će biti

- a) javno dostupni
- b) dostupni samo uskom krugu istraživača u određenoj naučnoj oblasti
- c) zatvoreni

Ako su podaci dostupni samo uskom krugu istraživača, navesti pod kojim uslovima mogu da ih koriste:

Ako su podaci dostupni samo uskom krugu istraživača, navesti na koji način mogu pristupiti podacima:

5.4. Navesti licencu pod kojom će prikupljeni podaci biti arhivirani.

Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade

6. Uloge i odgovornost

6.1. Navesti ime i prezime i mejl adresu vlasnika (autora) podataka

Stefan Vukmanović, s.vukmanovic@uns.ac.rs

6.2. Navesti ime i prezime i mejl adresu osobe koja održava matricu s podacima

Stefan Vukmanović, s.vukmanovic@uns.ac.rs

6.3. Navesti ime i prezime i mejl adresu osobe koja omogućuje pristup podacima drugim istraživačima

Stefan Vukmanović, s.vukmanovic@uns.ac.rs