

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŽIVILSKA TEHNOLOGIJA

BIOTEHNOLOŠKA PROIZVODNJA KOMBUČE

Antonija ZAJC, Janja ZORKO, Špela ZORMAN

(študentke tretjega letnika študija Živilske tehnologije)

prof. dr. Peter Raspor in asist. dr. Maja Paš (mentorja)

Ljubljana, 2003

*Seminarska naloga pri predmetu Biotehnologija

POVZETEK

V tem seminarju bomo predstavili kombučo, za katero veliko ljudi misli, da je goba, a se v resnici motijo. Preučili bomo njen način rasti in pogoje, pri katerih uspeva ter odkrili tudi negativne učinke, ki zavirajo njeno rast, predvsem iz mikrobiološkega stališča. Predstavili bomo njeno delovanje v fermentacijskih posodah, ki so večinoma kar steklene, saj jo veliko ljudi vzgaja doma in iz nje pripravlja fermentacijski napitek, ki osvežuje in blagodejno učinkuje na telo in duha. In ker že omenjamo fermentacijske posode in fermentacijski napitek, se bomo podrobneje lotili tudi vprašanja o fermentacijskih procesih, pri katerih kombuča dodajamo saharozo, kot hrano za različne mikroorganizme. Če kombučo pustimo fermentirati dlje časa, nastane kis. Omenili bomo fermentacijske produkte in uporabo le - teh v prehrani in za druge namene, ki so splošni javnosti malo poznani. Predvsem se bomo osredotočili na alternativno medicino, v kateri kombuča zaseda kar precejšnji delež. Zazrli se bomo tudi v zgodovino kambuče in poskušali raziskati njene začetke in prve poskuse fermentacije ter njenih učinkov.

SUMMARY

In this seminar we will introduce kombucha for which a lot of people think that is a fungus but they are mistaken. We will discover where kombucha grows and in what conditions and we will try to detect which microorganisms affect its growth. Because of its nature kombucha is good for fermentation and as a result of this we will look closer at the fermentative jars, how they work and what do we need to know for growing kombucha in them. Usually these jars are glasses of mayonnaise because a lot of people make kombucha elixir at home. If we are now mentioning fermentative jars and fermentative kombucha tea we should also mention fermentation processes which are essential for making kombucha tea. But kombucha tea is not the only product of fermentation. There are plenty of them like kombucha shampoo, kombucha pills and lots of others. And we will show some interesting uses of this product in the alternative medicine which is not so well-known. In the end we will discover from where kombucha comes from and how it grew in the past centuries.

KAZALO VSEBINE

1.UVOD.....	5
1.1 Poimenovanje kombuče.....	5
1.2 Kisova matica ali kombuča?.....	5
2.ZGODOVINA BIOPROCESA.....	6
2.1 Pretekle raziskave na kombučih.....	6
2.2 Raziskave od leta 1944 do leta 1987.....	6
2.3 Oboleli za rakom in mlečna kislina.....	7
2.4 Rezultati študije magico kombucha® in kombuchion® na pacientih okuženimi z virusom HIV.....	7
3.MIKROBIOLOŠKE OSNOVE BIOPROCESA.....	8
3.1 Kvasovke v kislem.....	8
3.1.1 Metabolizem ogljika.....	8
3.1.2 Metabolizem dušika.....	8
3.2 Kvasovke.....	8
3.2.1 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	8
3.3 Simbiozna zveza med bakterijami in kvasovkami.....	9
3.4 Fermentacija kombuče.....	9
3.4.1 Fermentacijski proces.....	9
3.4.2 Mikrobiologija kolonije in fermentantov kombuče.....	10
Mikrobiološka sestava čajne glive	10
3.5 Koristni učinki kombuče.....	10
3.6 Raziskava FDA (food and drug administration).....	11
3.7 Analize patogenih bakterij.....	12
3.8 Faktorji, ki vplivajo na mikrobiologijo fermenta kombuče.....	12
3.8.1 Čistoča, pogoj fermentacijskega procesa.....	12
3.9 Izolanti kombuče.....	13
3.9.1 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	13
3.9.2 <i>Zygosaccharomyces</i>	13
3.9.3 <i>Saccharomyces</i>	13
3.9.4 <i>Acetobacter xylinum</i>	13
3.10 Preiskava fermentantov.....	13
3.11 Drugi organizmi sposobni preživet v kombučih.....	14
3.11.1 <i>Bacillus licheniformis</i>	14
3.11.2 <i>Rothia dentrocariosa</i>	14
3.11.3 <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	14
3.11.4 <i>Bacillus coagulans</i>	14
3.12.4 Esencialni mikroorganizmi.....	14
4.BIOKEMIJSKE OSNOVE BIOPROCESA.....	15
4.1 Biokemijske osnove poteka bioprocesa.....	15
4.2 Alkoholna fermentacija.....	18
4.3 Očetno kislinška fermentacija.....	18
4.3.1 Povzročitelji očetno kislinške fermentacije.....	19
4.3.1.1 Razlike med bakterijami rodov <i>Acetobacter</i> in <i>Gluconobacter</i>	19

4.3.1.2 <i>Acetobacter xylinum</i>	19
4.3.2 Esencialni mikroorganizmi	20
4.4 Biokemijske spremembe	20
4.5 Vpliv substrata na končne koncentracije snovi v produktu	20
5.BIOINŽENIRSKÉ OSNOVE BIOPROCESA	22
5.1 Pripravljalni postopki	22
5.2 Potek bioprocesa	23
5.3 Zaključni postopki	24
6.EKOLOŠKI ASPEKT BIOPROCESA	25
7.UPORABA BIOPROIZVODOV	26
7.1 Uporaba bioproizvodov v prehrani	26
7.2 Uporaba bioproizvodov v alternativni medicini	26
7.3 Ostala uporaba kombuče	27
8.REFERENCE	28

1. UVOD

1.1 Poimenovanja kombuče

Kombuša, kombuča, kombu čaj so izvedenke izvornega imena fermentiranega oslajenega čaja, ki mu na Daljnem vzhodu, od koder izvira, pravijo kombu-cha, dobesedno prevedeno torej kombu-čaj. Z njim je korejski zdravnik Kombu pred dva tisoč leti ozdravil japonskega cesarja, tako se menda pijača imenuje po njem, vendar je kombu tudi japonsko ime za užitno vrsto morske alge.

Kombu čaj nastane s sočasno alkoholno in očetnokislinsko fermentacijo, ter je poživiljajoč in za telo osvežilni napitek. Kadar fermentira dalj časa, se spremeni v kis. Za pripravo kombu čaja potrebujemo kulturo, ki je na pogled podobna kisovi matici, torej ploščat klobuk, ki plava na vrhu tekočine. Kulturo sestavlja združba kvasovk in očetno-kislinskih bakterij v celulozni membrani, vendar je sestava vrst drugačna, prav tako pijača, ki jo naredijo, kultura pa je veliko bolj vitalna in se enkrat poveča že v tednu dni. Čaj, pripravljen s sladkorjem, je učinkovitejši, ker se mikroorganizmi hranijo s sladkorjem in s čajem, ter ga skoraj ali povsem predelajo. Medtem pa nastanejo številne snovi z zdravilnim in razstrupljevalnim delovanjem (Carr, 1985).

1.2 Kisova matica ali kombuča?

Goba kisa se večkrat zamenjuje s kombučino, ker izgleda podobno. Vendar pa ima nekatere esencialne pomanjkljivosti v primerjavi s kombučo, ki zato ne dajejo enakih rezultatov pri proizvodnji kombučinega čaja.

Gladek, usnjen, sivkast in kiselkast film, ki se tvori na površini tekočin nepasteriziranega kisa, se imenuje »kisova goba«, ki se uporablja izključno za pridelavo kisa.

Če to gobo pustimo predolgo na miru, postane težka in debela ter se posede na dno, vendar pa jo na površini zamenja nova nastala goba.

Ko proizvajamo nov sveženj kisa, ni potrebno dodati »kisle kolonije«, ampak samo nekaj tekočine, v kateri je rasla »kisova goba«. Ta tekočina vsebuje žive mlečnokislinske bakterije (*Acetobacter*) in opravlja enako funkcijo, kot »originalna kisova goba«.

Pri tem nastaja na površini nova kolonija gobe, ki jo uporabljamo pri tvorbi kisa.

Zaradi podobnosti med obema gobama je bolje, da za kombučin napitek uporabljamo pasteriziran kis, ki pospeši fermentacijo in se pri tem ne tvori »kisova goba«. Vendar pa se pasteriziran kis uporablja le v primeru, ko imamo potrebnih 10% fermentiranega kombučinega čaja kot dodatka. Drugače pa je vedno bolje, da nekaj tega napitka shranimo in uporabimo za nadaljne fermentacije.

Nova kolonija bo vedno nastala na površini fermentirane tekočine, tudi ko bomo dodali samo kombučin napitek brez kombuča gobe oziroma kolonije. Vendar se pri tej metodi lahko zgodi, da se bodo nekatere unikatne lastnosti izgubile (w3.trib.com/~kombu/FAQ/indexorig.shtml).

2. ZGODOVINA BIOPROCESA

Kombuča čaj, poznan tudi kot manchurijski, ruski in kargasokski čaj, je fermentirana, na čajni osnovi pridelana pijača, ki ob zmernem uživanju podaljšuje življenjsko dobo, saj zavira procese staranja.

Po nekaterih izjavah je bila, dandanes zelo popularna domača fermentirana pijača, prisotna v Aziji že pred dvema tisočletjema. Že takrat so ji na Kitajskem pripisovali detoksifikacijske in energijske lastnosti. Leta 414 je doktor Kombu prinesel čajno glivo iz Koreje na Japonsko, da bi pozdravil prebavne težave Imperiorja. Nato je bila kombuča prenesena v Rusijo in šele za tem so jo spoznali tudi v Evropi, ob koncu prejšnjega stoletja (w3.trib.com/~kombu/FAQ/part06.html).

2.1 Pretekle raziskave kombuče

Leta 1915, je profesor S. Bazarewski izjavil za Correspondence for the Association of Nature Researches iz Rige, da med latvijsko populacijo kroži ljudsko ime Brinum-Ssene, kar pomeni Čudežna goba. Latvijci so tej gobi pripisovali čudovito moč zdravljenja za mnoge bolezni. Pomagala naj bi v primeru glavobola, nekateri pa so zagotavljali, da je uporabna za vse bolezni.

Tudi H. Waldeck je zatrjeval, da zaradi naravno tvornih kislin, pripravek uspešno upočasnjuje težave, ki se pojavijo s starostjo. To pa prispeva k podaljševanju življenjske dobe.

Eno leto kasneje, 1916, je profesor dr. Lakowitz podprl Waldeckovo izjavo o vseozdravljivi gobi in njenem učinku na prebavne motnje. Odkril je tudi, da hitro lajša glavobole nevrološkega izvora.

V času med 1917 in 1918 je prof. Rudolf Kobert poudaril, da fermentirani čaj ne pomaga samo pri črevesnih težavah, ampak tudi pri zdravljenju hemoroidov in sklepnemu revmatizmu.

Dr. Madaus je leta 1927 odkril, da ima goba zmožnost regenerirati celično steno in zaradi tega je še posebej učinkovita pri arteriosklerozi.

Tudi 1928 so zabeležili ugodne vplive na detoksifikacijo sistema, očiščenje krvi in hitro izboljšanje pri obrazno-kožnih izpuščajih. Znano je, da je metabolični stimulant in pomaga telesu pri izločanju strupov.

Sveže pripravljena kultura gobe naj bi izboljšala simptome krvnega pritiska, straha, razdražljivosti, bolečine, glavobola in vrtoglavice. Učinkovito naj bi delovala pri zdravljenju ledvičnih kamnov in tudi pozitivno vplivala na možganske kapilare. Artritis naj bi bil posledica akumulacije toksinov v telesu. Po rednem dnevnem pitju čaja se ti toksini izločijo preko ledvic. To temelji na dejstvu, da se toksini povežejo z glukoronsko kislino in tvorijo topne glukoronide ali sparjeno glukoronsko kislino.

Kljub temu, da je pijača kislega značaja, ne povzroča nobenih kislinskih posledic v želodcu (w3.trib.com/~kombu/FAQ/part06.html).

2.2 Raziskave od leta 1944 do leta 1987

Pri nadaljnjem hormoniziranju in uravnoveženju metabolizma, se nezaželene maščobne osnove v telesu odstranijo ali pa se prepreči nastajanje novih. Škodljive zaloge urične kisline in holesterola se pretvorijo v bolj topne oblike, ki jih telo z lahkoto odstrani preko ledvic in črevesja.

Leta 1950 so v bakteriološkem inštitutu v Moskvi ugotovili, da gliva ni en organizem, ampak simbiotska kolonija nekaterih bakterij in kvasovk s kompleksnimi metaboličnimi potmi. Izolirali so sledeče mikroorganizme: *Bacterium xylinum*, *Bacterium xylinoides*, *Bacterium gluconicum*, *Saccharomyces ludwigii*, *S. apiculatus varieties*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Acetobacter ketogenum*, *Torula varieties*, *Pichia fermentans* in druge kvasovke. Ta skupina organizmov kaže razločen antibiotični efekt s prisotnostjo usnične kisline, ki je prisotna v nekaterih lišajih. Tu je tudi dokaz, da lahko usnična kislina inaktivira posamezne skupine virusov (w3.trib.com/~kombu/FAQ/part06.html).

2.3 Oboleli za rakom in mlečna kislina

Bolniki z rakom slabo razgrajujejo mlečno kislinske komponente v tkivih. Če so prisotne v zadostnih količinah, se rak naj ne bi pojavil. Ko je mlečne kisline v pomanjkljivih količinah, celično dihanje upade in posledično nastane višek D-laktoze v tkivu. Če oba tipa mlečne kisline obstajata v ravnovesnih delih v tkivu, se kot rezultat lahko razvije rak (w3.trib.com/~kombu/FAQ/part06.html).

2.4 Rezultati študije magico kombucha® in kombuchion® na pacientih okuženimi z virusom HIV

Novembra, 1998, so v Guadalajara Jalisco v Mehiki zasedali tretji kongres alternativne medicine in akupunkturo, kjer so prikazali rezultate delovanja dveh proizvodov na virus HIV. Izid študije je bil presenetljiv, upoštevajoč, da se je v obdobju šestih mesecev, pacientom povečalo število CD4 celic (med 200-500 celic/ μL). Kljub temu, da je število CD8 celic ostalo visoko, je bilo izboljšanje klinične kondicije zelo vidno, nanašajoč se na: povečanje telesne teže, povečanje fizične kondicije (20-30%), povečanje apetita in ublažitev sledečih simptomov: depresija, diareja, nespečnost, vročina. Med zdravljenjem z enim gramom Magico Kombucha® ali Kombuchion®, se oportunistične infekcije niso pojavile. Oba proizvoda vsebujeta sveže zmrznjen posušen Kombucha čaj, kapsuliran v pravih zelenjavnih kapsulah, Vcaps® (www.elsevier.com: Tea, Kombucha, and health: a review).

3. MIKROBIOLOŠKE OSNOVE BIOPROCESA

3.1 Kvasovke v kislem

Glavna naloga kvasovk je proizvesti CO₂, ki je nujen za hajanje kvasa. Poleg tega, kvasovke proizvajajo fermentacijske stranske produkte, kot so glicerol, očetna kislina, ki prispevajo k izboljšanju kakovost končnega produkta ([www.analyses of kombucha ferments report on growers.htm](http://www.analysesofkombuchafermentsreportongrowers.htm))

3.1.1 Metabolizem ogljika

Večina kvasovk ima kot vir ogljika in energije najraje sladkor. Celična stena je permeabilna preko sladkorjev in vstop iz celične membrane gre z olajšano difuzijo preko permeaz, ki so konstitutivne ali inducirane. Po vstopu sladkorjev in preko glikolitične poti, so producirani energija, prekursorske molekule in reducirajoča energija. Med alkoholno fermentacijo, je piruvična kislina dekarboksilirana v acetaldehid, ta pa je reduciran v etanol. Tu se tudi nadomesti NAD⁺. Obstaja tudi druga možnost za nadomestiti NAD⁺; preko redukcije dididroksiaceton fosfata v glicerol 3-fosfat in nato v glicerol. Ta pot se uporabi, ko acetaldehid ne more nastopiti kot akceptor elektronov. Glicerol je pomemben stranski produkt alkoholne (etanolne) fermentacije. Njegova akumulacija poteka v osmotskih stresnih pogojih ([www.analyses of kombucha ferments report on growers.htm](http://www.analysesofkombuchafermentsreportongrowers.htm)).

3.1.2 Metabolizem dušika

Kvasovke so sposobne izkoriščati rang različnih anorganskih in organskih virov dušika, za vključitev v strukturne in funkcionalne dušikove komponente celice. V mešanici amoniakalnih soli in aminokislin, raje izkoriščajo soli, ki so nato aktivno transportirane v celico. Rod *Saccharomyces cerevisiae*, najprej uporabi aminokislino: asparaginska kislina, glutamin, lizin, glutaminska kislina ([www.analyses of kombucha ferments report on growers.htm](http://www.analysesofkombuchafermentsreportongrowers.htm)).

3.2 Kvasovke

So glive, ki rastejo kot proste celice, proizvajajo hčerinske celice s cepitvijo ali z dvojno delitvijo. Se razlikujejo od večina gliv, ki rastejo kot nitaste hife. Ta razlika ni osnovna, ker se nekatere glive izmenjujejo med kvasno in hifno fazo, odvisno od okoljskih dejavnikov. Takšne glive so dimorfne.

Kvasovke rastejo tipično v vsakem okolju, kjer je dovolj zaloge enostavnih, topljivih hranil, kot so sladkorji in aminokislino. Zaradi tega razloga so pogoste na listnih in sadnih površinah, v različnih vrstah hrane. Z nekaj izjemami so nesposobne razgraditi polimere, kot so škrob in celuloza, ki so porabljene z veliko drugimi hifnimi glivami ([www.analyses of kombucha ferments report on growers.htm](http://www.analysesofkombuchafermentsreportongrowers.htm))

3.2.1 *Saccharomyces cerevisiae*

Je cepitvena kvasovka, ki se uporablja za peko kruha, kjer CO₂ povzroča hajanje kruha. Esencialno podobne kvasovke, se uporabljajo za produkcijo piva, vina in drugih alkoholnih pijač. Potek cepitve: celice so sprva zelo majhne, vendar se potencialno povečujejo in končno ločijo od materinske celice s formacijo septuma (prečne stene). Kvasovka spada h

glivni skupini *Ascomycota*, ki tvorijo askuse (www.analyses.org/kombucha/ferments/report/on_growers.htm).

3.3 Simbiozna zveza med bakterijami in kvasovkami

Kombučino kolonijo predstavlja simbiozna zveza med bakterijami in kvasovkami. *Acetobacter xylinum* je bil dokazan kot primarna bakterija v koloniji. Hesseltine je objavil prisotnost rodu *Acetobacter* in dveh kvasovk; *Pichia in Zygosaccharomyces* (NRRL Y-4810 in 4882). Mayser je temu nasprotoval, da je vsebnost kvasne kompozicije variabilna, ampak da se rodovi *Brettanomyces*, *Zygosaccharomyces* in *Saccharomyces* pogosto pojavljajo v nemških raziskovalnih vzorcih. Mayser je tudi dodal, da obstaja nizka vsebnost škodljivih mikroorganizmov (kvarljivci in patogeni), zato je lahko kombuča varno pripravljena doma, brez bojazni patogenega vpliva na zdravje.

Kislost produkta, ki je okrog 33g/L vseh kislin, je relativno kislja, kar onemogoča zmožnost rasti ostalih organizmov, možnih kontaminantov (www.fems-microbiology.org :

Zygosaccharomyces kombuchaensis, a new ascosporegenus yeast from Kombucha tea).

3.4 Fermentacija kombuče

Med fermentacijo kvasovke razgradijo sladkor v glukozo in fruktozo. Glukoza je nato pretvorjena v etanol in CO₂. Primarna kombučina bakterija *Acetobacter*, najprej pretvori etanol v acetaldehid in nato v očetno kislino. Sekundarna biokemična aktivnost kvasovke *Acetobacter* je oksidacija glukoze do glukonske kisline. Glukoza se tudi uporablja za očetnokislinske bakterije, ki sintetizirajo mikrobnjo celulozo. Fruktoza ostane del fermentirane brozge in se preko mikroorganizmov izkoristi do nižje stopnje. Koncentracija očetne kisline se lahko povzpne vse do 30g/L (3%), če čaj pustimo fermentirati do 30 dni. Običajna koncentracija očetne kisline, vsebovana v kombučni, je 10 g/L (1%). Glukonska kislina je tudi prisotna v zmernih količinah, okrog 20 g/L (2%) (www.elsevier.com/locate/foodres).

3.4.1 Fermentacijski proces

Črni čaj in beli sladkor sta najboljša substrata za pripravo kombuče.

Čajni listi so dodani vreli vodi. Saharozo (50g/L) raztopimo v vročem čaju in pustimo, da se ohladi. Čaj prelijemo v široko posodo in zakisamo s kisom ali z že pripravljeno kombučo. Na čajno površino položimo čajno glivo kombučo in kozarec pokrijemo s čisto krpo, zatesnimo. Tako pripravljeno inokuliramo pri sobni temperaturi (med 20 in 30 °C) za 1-8 tednov. Med fermentacijo se hčerinske čajne glive formirajo na površini čaja. Gliva se odstrani od površine in se shrani v manjši količini fermentiranega čaja. Pijačo prefiltriramo skozi krpo s porami in shranimo v steklenicah pri 4 °C.

Fermentirane substance so: saharoza, glukozo in fruktozo. Ta pijača vsebuje manj kot 1% etanola, vendar je fermentacija čajne gobe esencialno očetno kislinska fermentacija. Ko kvasovke producirajo etanol, je nato oksidiran v očetno kislino s kvasovko *Acetobacter*. Končni pH pijače je tako okrog 4,8. Nadalje so tudi ugotovili, da pH pijače zelo hitro pade na 3,0 in pri nadaljnji inkubaciji celo na 2,5. To lahko vpliva na spremembe v inokulumu čajne gobe, ki jo uporabimo. Producirani so tudi vitamini B₁, B₂, B₃, B₆, B₁₂ in folna kislina (www.elsevier.com/locate/foodres).

3.4.2 Mikrobiologija kolonije in fermentantov kombuče

V zadnjem desetletju je bilo največ raziskav narejenih na prisotnost kvasovk v kombuči. Najbolj izdaten zapis na to temo je bil "Spekter kvasovk v čajni gobi kombuča". Odkrili so, da ni bilo nič manj kot sedem možnih kvasnih rodovnih kombinacij. Preiskali so 34 kolonij iz Nemčije in dokazali 9 prostih, samostojnih kvasnih izolatov, vključujoč *Candida albicans*, 19 dvojnih kvasnih izolatov, 4 trojnih in 1 štirikratnega kvasnega izolata. Izolirali in identificirali so *Brettanomyces*, *Zygosaccharomyces*, *Saccharomyces*, *Apiculatus*, *Candida krusei*, *Candida kifizir*, *Candida albicans*.

Drugi pomemben zapis je bil o histokemičnem in anatomskem opazovanju čajne gobe. Odkrili so, da imajo kvasovke in bakterije vsak svojo plast znotraj kolonije. Medtem ko so simbiozne v fermentu, se vsaka zase izolirajo v konstrukcijo kolonije. Na splošno lahko rečemo, da je namen kolonije zagotoviti vlago in zmožnost transporta različnim mikroorganizmom. Ugotovili so formacijo polimernih sestavin v vzorcih testnih standardov. Tako je formacija kolonije stvar kemije in mikrobiologije (www.elsevier.com/locate/foodres).

3.4.2.1 Mikrobiološka sestava čajne glive

Bakterije in glive, prisotne v kombuči, formirajo močno simbiozo, ki ima sposobnost inhibirati rast potencialnih kontaminacijskih bakterij. Glavne očetno kislinske bakterije so: *Acetobacter xylinum*, *A. xylinoides*, *A. aceti*, *A. pasteurianus*, *Bacterium gluconicum*. In kvasovke: *Schizosaccharomyces pombe*, *Saccharomyces ludwigii*, *S. cerevisiae*, *Kloeckera apiculata*, *Zygosaccharomyces bailii*, *Brettanomyces bruxellensis*, *B. lambicus*, *B. custersii*, *Candida* in *Pichia* vrste.

Acetobacter xylinum ima zmožnost sintetizirati plavajočo celulozno mrežo, ki povečuje asociacijo formirano med bakterijami in glivami. Kvasne celice pretvorijo saharozo v fruktozo in glukozo ter produktirajo etanol. Očetno kislinske bakterije pretvorijo glukozo v glukonsko kislino in fruktozo v očetno kislino. Kofein in podobni ksantini čajne infuzije, pomagajo bakterijam pri sintezi celuloze. Očetna kislina pomaga kvasovkam da produktirajo etanol in tako etanol pomaga očetno kislinskim bakterijam, da proizvajajo in povečujejo koncentracijo očetne kisline. Tako etanol, kot tudi očetna kislina, imata antimikrobni učinek proti patogenim bakterijam, kar zagotavlja zaščito pred kontaminacijo čajne glive (www.elsevier.com/locate/foodres).

3.5 Koristni učinki kombuče

Kemična sestava: Glavni metaboliti identificirani v fermentirani pijači so: očetna, mlečna, glukonska in glukoronska kislina, etanol in glicerol. Prisotnost uznične kisline v kombuči v preteklih raziskavah, v zadnjem času ni bila potrjena. Uznična kislina je bila v preteklosti najdena v lišajih. Lahko deaktivira nekaj skupin virusov. Sestava in koncentracija metabolitov sta odvisna od vira čajne glive, koncentracije sladkorja in časovnega obdobja fermentacije. S 50g/L saharoze, je koncentracija etanola in mlečne kisline optimalna. Kvasne celice hidrolizirajo saharozo v glukozo, fruktozo in tvorijo etanol, substrat je fruktoza. Očetnokislinske bakterije izkoriščajo glukozo za pridobivanje glukonske kisline in etanol za očetno kislino. Sinteza mlečne kisline je odvisna od aktivnosti mlečnih bakterij

do etanola in očetne kisline. Fermentacijski proces inducira sintezo vitaminov B kompleksa in folne kisline. pH vrednost kombuče se med fermentacijskim procesom zniža, poveča pa se vsebnost organskih kislin.

Biološka aktivnost: Znana je antibiotska aktivnost kombuče proti *Helicobacter pylori*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Agrobacterium tumefaciens*. Antimikrobna aktivnost nekaterih organskih kislin: očetna kislina inhibira glivno rast in predstavlja šibko aktivnost pri nizkem pH proti mlečno kislinskim bakterijam. D in L-mlečna kislina inhibirata mlečnokislinske bakterije, ne predstavljata pa nobene aktivnosti proti glivam, medtem ko glukonska kislina predstavlja samo šibko aktivnost proti obema tipoma mikroorganizmov. Detoksifikacijske lastnosti so odvisne od kapacitete glukuronske kisline, ki se veže na toksične molekule, kar povzroča povečanje njenega izločanja iz organizma preko ledvic ali prebavnega trakta.

Prisotnost glukuronske kisline in formacija glukoronidnega kompleksa:

Zadnje raziskave so pokazale, da substance v kombuči, identificirane kot glukuronska kislina, so bolj verjetno 2-keto glukonske kisline. V urinu ljudi, ki so pili kombučo, so našli visoke koncentracije glukoronidov. Prva predpostavka razlaga, da je povečana koncentracija glukoronidov povezana s povečanjem same glukuronske kisline. Druga pa razlaga povezavo na prisotnost močnih beta- glukoronidaznih inhibitorjev, ki bi lahko bila saharozna kislina 1,4-lakton, ki je tudi najdena v kombuči. V bistvu glukuronska kislina ne igra glavne vloge v detoksifikacijskem procesu, ampak UDP-glukuronska kislina, aktivna oblika, najdena v jetrih. UDP-glukuronska kislina ni bila najdena v kombuči, ampak drugi številni intermediatni produkti glukuronsko-kislinske poti, kot sta askorbinska kislina in saharolakton.

Celulozna plast je najpogosteje formirana z *Acetobacter xylinum*, med fermentacijo čaja.

Za veliko antioksidativno aktivnost so odgovorni katehini. Njihova aktivnost je lahko modificirana s kemijskim okoljem v fermentirani pijači. Tokoferol in askorbinska kislina uporabljata močan sinergistični učinek na antioksidativno aktivnost čajnih katehinov v linolensko kislinskem sistemu. V vitro pa je bila predstavljena sinergistična antimikrobna aktivnost etanola in očetne kisline.

Ker je fermentacija vodena v aseptičnih pogojih in kultura razmnožena iz ene hiše v drugo, je potencial kontaminacije zelo velik. V domači kultivirani čajni gobi sta bila identificirana *Penicillium spp.* in *Candida albicans*, vendar patogenih bakterij ni bilo najti. Kontaminanti so bili odgovorni za toksične reakcije. Kombuča mora biti pripravljena in shranjena v steklenih kozarcih, da se izogne izluženju toksičnih elementov (Blanc, 1996).

3.6 Raziskava FDA (food and drug administration)

Neka ženska je v Iowa umrla za vnetjem trebušne mrene, kar je bilo povezano s kontaminacijo odprte steklenice. Ker je ženska tudi sama imela ferment kombuče, je FDA sprožil raziskavo o njeni kombuči. Ko so opravili raziskave, so v fermentu izolirali 4 kvasovke. Identificirali so jih kot *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia fermentans*, *Candida lambia*, *Candida valida*. Vse so znani nepatogeni mikroorganizmi človeškemu organizmu. Ker pa niso naredili nobene raziskave o izolaciji patogenih bakterij, tudi niso

uspeli povezati smrti ženske iz Iowe s fermentom kombuče (www.analyses.com/kombucha/ferments-report-on-growers.htm).

3.7 Analize patogenih bakterij

Izolanti iz vidnega sloja nekakšne plesni, ki rastejo na površini fermenta:

Aspergillus niger. Črno siva plesen, s tipično plesno karakteristiko puhastega videza in rastnim micelijem. Micelijji so dežnički na površini fermenta, z biserno mrežo spor, ki se raztezajo v ferment.

Penicillium notatum. Zelena plesen, tipično najdena rastoča na kruhu ali gnilem sadju.

Mucor spp. Rumeno pojavljajoča plesen, izolirana le iz fruktoznih fermentov, brez kakršnihkoli čajnih ali organskih dodatkov, razen za normalno kombuča kolonijo.

Analizirali so vsako kolonijo, ki so jo prejeli, zaradi prisotnosti *Candida albicans*, vendar je niso nikoli našli. Vodili so izolacijo za *Staphylococcus aureus*, *Salmonella spp.*, *Shigella spp.*, *Pseudomonas*, *Escherichia coli* (vse koliformne skupine) in fekalne *Streptococcus*. Nobeden ni bil izoliran iz kulture ali kolonije, ki so jo analizirali. Opazovalni čas je bil le 3-4 dni, pri katerem je pH padla od 6,8 na 3,5 ali nižje. V teh nizkih pH območjih je veliko patogenih bakterij nesposobnih preživeti med procesom fermentacije (Dufresne in Farnworth, 2000).

3.8 Faktorji, ki vplivajo na mikrobiologijo fermentacije kombuče

Ti faktorji so:

- starost kolonije in kulture
- čas pred začetkom analize (ko se ferment shranjuje pri sobni T)
- razlike v primarni izolaciji
- temperatura
- kultura medija
- biokemične testne metode

Število kombinacij mikroorganizmov lahko podobno vpliva na videz kolonij in na podoben okus fermentiranega produkta (z večimi, kot tudi samo z dvema mikroorganizmoma). Kombuča lahko s takšno vsebnostjo zelo močno varira (Dufresne in Farnworth, 2000).

3.8.1 Čistoča, pogoj fermentacijskega procesa

Glavna skrb vsakogar, ki proizvaja neodvisne analize te fermentirane pijače, je potencialna kontaminacija, ki je posledica nečistega ali neprimerne ravnanja s kolonijo mikroorganizmov ali pa s fermentirano pijačo.

Če je število spor zelo visoko in če sladkor ter čajna raztopina stojita več kot 8 ur, je kontaminacija zelo verjetna. *Aspergillus* in *Penicillium* sta bila najdena, da rasteta pri koncentraciji sladkorja vse do 67,5%. Kislost do pH-ja 3,0 prepreči rast vsake plesni. Ti dve plesni in *Mucor*, rastejo na stenah, posodah, pripomočkih, površinah za fermentacijo in se jih obdrži na minimumu s primernim čiščenjem površin in pripomočkov za fermentacijo. Te plesni proizvajajo glukozidazo, ki napada glukozni konec saharozne molekule med procesom fermentacije (Dufresne in Farnworth, 2000).

3.9 Izolati kombuče

3.9.1 *Saccharomyces cerevisiae*

- nadkraljestvo: evkariot
- kraljestvo: gliva
- rod: askomikota
- red: *Saccharomycetales*
- družina: *Saccharomycetaceae*

Je vodilna vrsta v svojem rodu, najdena v kombuči. Razmnoževanje z multi-polarnim brstenjem ali tvorbo askospor. Zaslužena je v številnih živilskih industrijah, pri hajanju kruha, je glavna kvasovka pri pivu in pri produkciji alkohola, glicerola, invertaze. Produkcija invertaze je še posebej pomembna pri fermentiranju kombuče, saj invertaza katalizira hidrolizo saharoze v glukozo in fruktozo. Invertaza spada med fruktozidazo, ki napade fruktozni konec saharozne molekule, v nasprotju z glukozidazo plesni, ki napade glukozni konec (www.analyses of Kombucha ferments report on growers.html).

3.9.2 *Zygosaccharomyces*

Zanj nekateri še vedno mislijo, da je podrod od *Saccharomyces*. Te kvasovke so zmožne rasti pri visoki koncentraciji sladkorja. Prisotne so pri kvaru medu, sirupov in melas (vrsta sirupa). Uporabljajo se pri fermentaciji sojine mase (www.analyses of Kombucha ferments report on growers.html).

3.9.3 *Saccharomycodes*

Rastejo na površju limone, objektivno so prisotne v fermentiranih pijačah vina, saj dajejo negativen priokus, tvorijo nizke vsebnosti alkohola in visoke vsebnosti hlapnih kislin (www.analyses of Kombucha ferments report on growers.html).

3.9.4 *Acetobacter xylinum*

Je očetno kislinska bakterija, ki oksidira etilni alkohol v očetno kislino in druge produkte oksidacije. Ni primeren za širšo komercialno uporabo zaradi prekomerne sluzavosti, kar upočasni proizvodnjo kisa (www.analyses of Kombucha ferments report on growers.html).

3.10 Preiskava brozge po končani fermentaciji

Med preiskavo so analizirali dve brozgi. Prva brozga je imela zelo visoko vsebnost očetne kisline, druga brozga pa je imela nizko vsebnost očetne kisline, ampak visoko vsebnost glukonske kisline.

Kolonije so bile spravljene in zapečaten v »Ziplock« škatlah, pri sobni temperaturi za 30 dni. Opazovali so, kateri mikroorganizmi se lahko izolirajo v takšnih okoliščinah. Organizmi so bili identificirani z Biolog Microsation tm System in potrjeni z biokemičnim testiranjem. Vrste organizmov so bile določene s primerjavo njihovih biokemičnih profilov lastnosti, s tistimi znanimi vejami bakterij. Organizmi, testirani iz brozge z visoko vsebnostjo očetne kisline, so bili morfološko in biokemično podobni naslednjim: *Bacillus licheniformis*, *B. megaterium*, *B. amyloliquefaciens*, *Rothia dentocariosa*. Pri nizki vsebnosti očetne kisline, pa je bil izoliran *Bacillus coagulans* (www.analyses of Kombucha ferments report on growers.html).

3.11 Drugi organizmi sposobni preživetja v kombuč

3.11.1 *Bacillus licheniformis*

Predstavlja šibek kvar živila in je pogosto povezan s kuhanim mesom in zelenjavo, ki sta bila izpostavljena pri sobni temperaturi. Sprejet je bil za uporabo pri komercialnih fermentacijskih procesih za encime, antibiotike in druge specialne kemikalije. V fermentacijski industriji se že več kot desetletje uporablja pri produkciji proteaz, amilaz in antibiotikov ([www.analyses of Kombucha ferments report on growers.html](http://www.analysesofkombuchafermentsreportongrowers.html)).

3.11.2 *Rothia dentocariosa*

Predstavlja glavno komponento pri zobnem kariesu. Prvič je bila opisana kot rod, leta 1967 pa kot patogena z nizko virulenco. Ta aerobni organizem je gram + bakterija in varira v obliki od koka, filameta, do krožne oblike. Razvejitev je včasih vidna v filamentni / nitasti obliki, kar kaže podobnost z *Actinomyces*, *Corynebacterium*, *Nocardia* vrstami ([www.analyses of Kombucha ferments report on growers.html](http://www.analysesofkombuchafermentsreportongrowers.html)).

3.11.3 *Bacillus amyloliquefaciens*

Je predstavnik pri komercialnih procesih fermentacije. Zato njegova prisotnost v kombuč ni presenetljiva ([www.analyses of Kombucha ferments report on growers.html](http://www.analysesofkombuchafermentsreportongrowers.html)).

3.11.4 *Bacillus coagulans*

Je kislinska bakterija in proizvaja nizek pH od 4,0 do 5,0 v mediju, ki vsebuje izkoristljive ogljikove hidrate. Je ploska kislina bakterija, ki proizvaja zmerne količine mlečne kisline in sladkorja. Vendar v večini fermentiranih pijač kombuč, niso našli nič ali pa le malo mlečne kisline. Razen pri nekaterih ustekleničenih komercialnih fermentiranih pijačah kombuč ([www.analyses of Kombucha ferments report on growers.html](http://www.analysesofkombuchafermentsreportongrowers.html)).

3.12.4 Esencialni mikroorganizmi

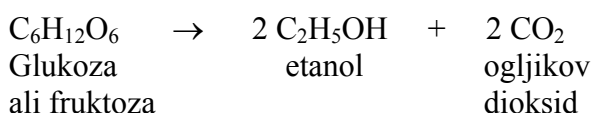
Leta 1965 je Hesseltine objavil, da so esencialni organizmi *Acetobacter spp.* (NRRL B-2357) in dve kvasovki (NRRL Y-4810 in NRRL-4882). Leta 1972 pa je Kozaki objavil, da so glavni organizmi: *Acetobacter xylinum*, *A. aceti*.

Film na površju fermentirane pijače se tvori le takrat, kadar so prisotni skupaj trije organizmi. Ko je bil uporabljen *Acetobacter* v čisti kulturi, se je tvoril plin, ampak ni prišlo do tvorbe filma. Ko pa so bili trije organizmi uporabljeni skupaj, pa se ni tvoril plin, ampak film. Leta 1994 je Steinkraus izjavil, da je proizvedeno dovolj plina za lahko karbonizacijo produkta, kar omogoča čajni gobi cepitev inokuluma. Leta 1972 so bile izolirane številne kvasovke: *Saccharomyces spp.*, *Torulopsis famata*, *Pichia membranaefaciens*, *Candida guilliermondii* iz japonske čajne gobe. In tudi *Candida obture*, *Kloeckera apiculata*. Leta 1994 je Reiss izjavil, da je čajna goba simbioza ozmofilnih kvasovk, v glavnem *Schizosaccharomyces pombe*, *Saccharomyces ludwigii*, *Pichia spp.* in *Acetobacter xylinum*, ter drugih *Acetobacter spp.* (Adams, 1985).

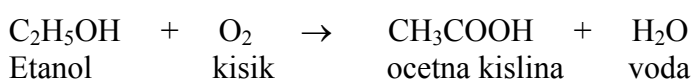
4. BIOKEMIJSKE OSNOVE BIOPROCESA

V prvi fazi se fermentirajoči sladkorji spremenijo v alkohol ob delovanju kvasovk *Saccharomyces cerevisiae*, medtem ko v drugi fazi bakterije iz rodu *Acetobacter* oksidirajo etanol do očetne kisline (Adams, 1985).

ALKOHOLNA FERMENTACIJA; kvasovke in anaerobni pogoji



OCETNO KISLINSKA FERMENTACIJA; očetno kisl. bakterije in aerobni pogoji



Med alkoholno fermentacijo se ustvarjajo anaerobne razmere, pH pade in koncentracija etanola se dvigne. Na koncu alkoholne fermentacije, ko so kvasovke porabile ves sladkor, se aerobne razmere ponovno vzpostavijo in na površini tekočine dovoljujejo rast očetno kislinskih bakterij, ki uporabljajo etanol. Te bakterije proizvajajo očetno kislino, ki dalje znižuje pH do vrednosti 3 ali manj (Adams, 1985).

4.1 Biokemijske osnove poteka bioprocasa

Fermentacija je anaeroben proces oz. zaporedje reakcij oksidacije in redukcije, pri čemer sta substrat in končni prejemnik elektronov organski spojini. Ni zunanega prejemnika elektronov, ki bi omogočil regeneracijo NAD^+ iz NADH . To vlogo opravlja ključni intermediat same fermentacije - piruvat (Raspor in Smole-Možina, 1992).

Aerobni procesi potekajo v prisotnosti kisika, ki je tudi končni prejemnik elektronov. Izkoristek aerobne fermentacije je veliko večji kot pa anaerobne.

Fermentacija je proces biološkega vrenja, ki poteka tudi v živilih, in pri katerem mikroorganizmi s svojimi encimi pretvarjajo sestavine živil v nižje spojine ter tako spremenijo lastnosti živila (Veliki splošni leksikon, 1998).

Vsi tradicionalni procesi fermentirane hrane so vezani na aktivnost več populacij mikroorganizmov, ki so avtohtoni v teh surovinah. Po določenem času pa nato ena ali več populacij prevzame dominantno vlogo in oblikuje značilnosti proizvoda (Raspor, 1992).

Fermentacija kombuče poteka v dveh stopnjah. Najprej poteče fermentacija, ko kvasovke prevrevajo sladkor in sestavine čaja v alkohol (etanol), vitamine B kompleksa in ogljikov dioksid. Bakterija, ki je aerobna in sodeluje v aerobni asimilaciji, pa porablja alkohol in sladkor in ga pretvarja v celulozo, ki daje skelet in oporo, na katerega se vežejo še ostale sestavine, ki tvorijo rumeno kompaktno strukturo, kombučo. Iz ogljikovega dioksida pa nastaja očetna kislina. Čeprav se večina sladkorja, predvsem glukoze, porabi pri fermentaciji, ga okoli 5% še vedno ostane v čaju in je zato energijsko bogat.

Aerobni in anaerobni bioproces se začneta z glikolizo glukoze do 2 piruvatov. Glikoliza je regulirana na treh mestih in sicer s tremi ireverzibilnimi reakcijami, ki jih katalizirajo HEKSOKINAZA, FOSFOFRUKTOKINAZA in PIRUVATKINAZA, ima pa tudi alosterično regulacijo z ATP, ADP in AMP.

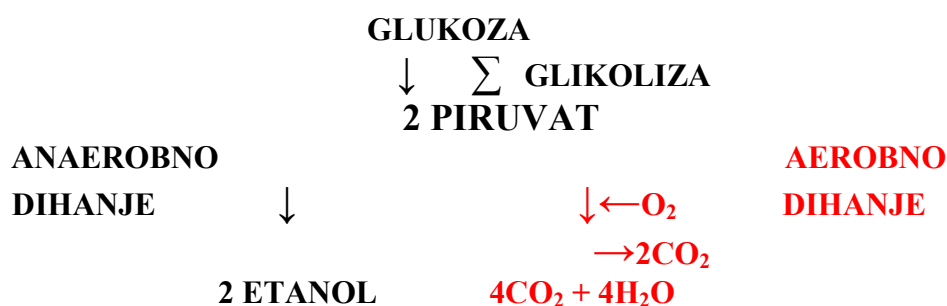
Ko nastane piruvat pa se razdeli na aerobno pot, ki se nadaljuje v cikel trikarboksilnih kislin, ki ima naslednje stopnje:

1. Preden se cikel trikarboksilnih kislin začne, mora nastati acetil-koencimA iz pirivata, sledi
 2. Kondenzacija oksalacetata acetil-koencimomA (encim: citratna sintaza)
 3. Izomerizacija citrata v izocitrat (encim: akonitaza)
 4. Oksidativna dekarboksilacija (encim: izocitratdehidrogenaza)
 5. Oksidativna dekarboksilacija α -ketoglutarata (encim: α -ketoglutarat dehidrogenaza)
 6. Substratna fosforilacija (encim: sukcinattiokinaza)
 7. Dehidrogeniranje sukcinata v fumarat (encim: sukcinatdehidrogenaza)
 8. Hidratacija (encim: fumaraza)
 9. Dehidrogenizacija malata v oksalacetat (encim: malat dehidrogenaza)
- (Lehninger, 1994).

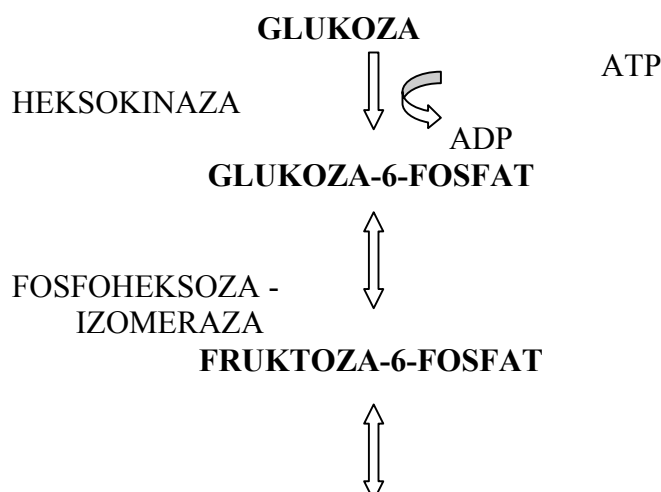
Lahko pa gre piruvat v anaerobno pot, ki je lahko alkoholna fermentacija ali mlečnokislinska fermentacija. Alkoholna fermentacija je značilna predvsem za kvasovke.

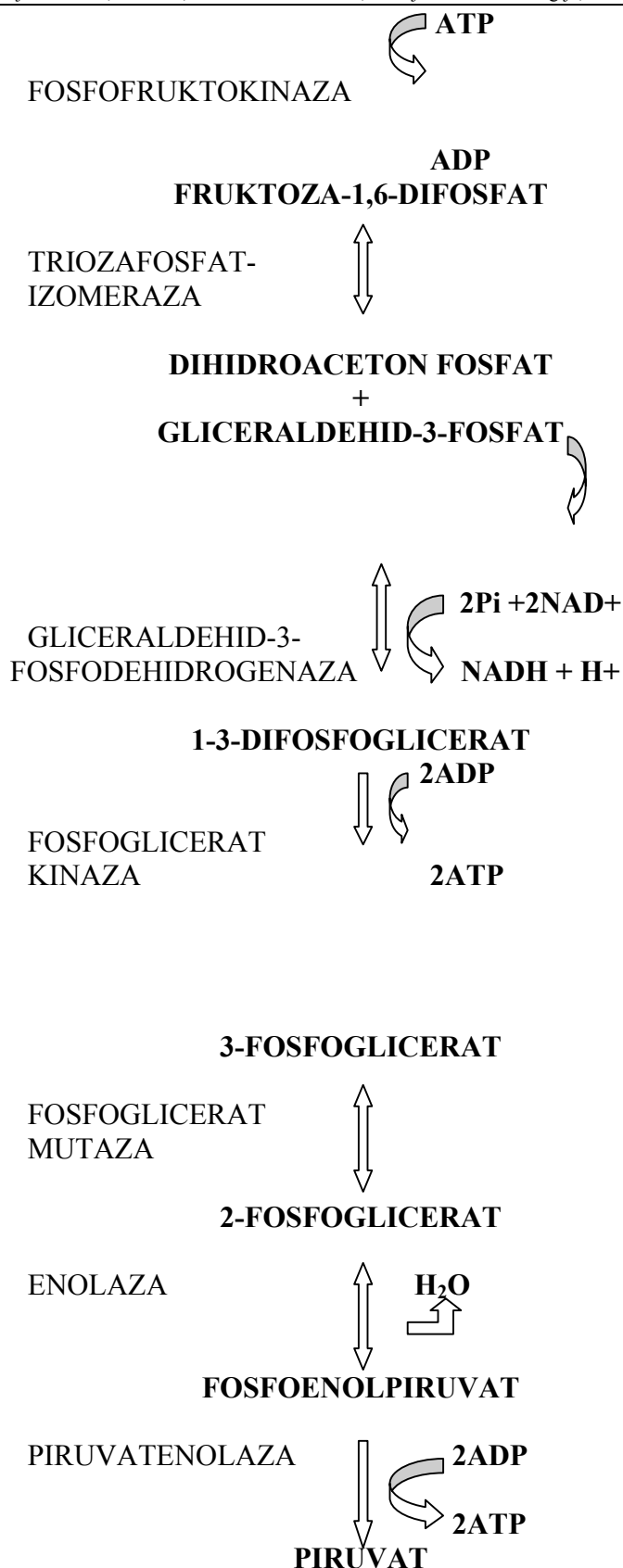
1. Najprej se izloči ogljikov dioksid iz piruvata in nastane acetaldehid
2. Redukcija acetaldehida v etanol

Mlečnokislinsko vrenje pa je značilen za bakterije, kjer z redukcijo nastane iz piruvata laktat.



SLIKA 1: Anaerobna in aerobna pot razgradnje glukoze (Lehninger, 1994).





SLIKA 2: Glikoliza (Lehninger, 1994).

Po končani fermentaciji dobimo zelo kakovosten izdelek, ki je poleg vsega še zdravilen. Čaj je sestavljen iz očetne kisline, glukonske kisline, laktonske kisline, etanola, glukoze, fruktoze, proteinov, vitaminov (B₁, B₂, B₃, B₅, B₆, B₁₂, B₁₅, biotin, vitamin C), ogljikov dioksid, kofein, esencialne aminokisline (lizin, metionin, fenilalanin, treonin, valin), antibiotike, encime, minerale, ... (www.kombucha-tea.50megs.com).

4.2 Alkoholna fermentacija

Alkoholna fermentacija je anaeroben proces, kjer potekajo velike biokemijske spremembe. Anaerobnost se vzpostavi postopno, ko CO₂ izpodrine zrak in kvasovke porabijo preostali kisik s svojo metabolno aktivnostjo. Sladkor se razgradi v etanol in CO₂, ter druge sekundarne produkte. Najpomembnejši sekundarni produkti so: glicerol, očetna kislina, jantarna kislina, acetilmetilkarbinol, butilenglikol.

Kvasovke, ki se uporabljajo v alkoholni fermentaciji, so največkrat *Saccharomyces cerevisiae*.

Etanol ne nastane direktno iz glukoze, temveč iz piruvata. Tega kvasovke tvorijo iz glukoze v zaporedju več reakcij, ki jim skupno pravimo Embden-Majerhoff-Parsova pot razgradnje glukoze. Proces je anaeroben, med njegovim potekom pa se sproščajo tudi večje količine energije, zaradi česar se tudi povečuje temperatura fermentacijske drozge. Čas trajanja alkoholne fermentacije je odvisen od več dejavnikov, večinoma pa je zaključena v 48 do 72 urah (Cor, 1997).

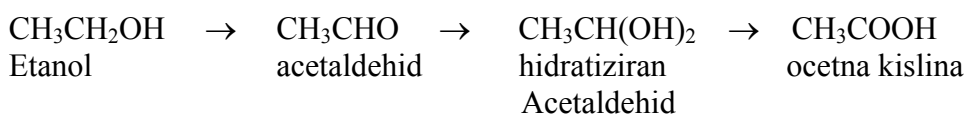
4.3 Očetno kislinska fermentacija

Očetno kislino, dobljeno s fermentacijo na etanolnih substratih, povsod po svetu imenujemo kis. Fermentacija očetne kisline je močno oksidativna, pri čemer očetnokislinske bakterije oksidirajo razredčeno raztopino etanola s kisikom iz zraka v očetno kislino in vodo (Jernejc in Legiša, 1992).

Pretvorbo etanola do očetne kisline sestavljata dve zaporedni oksidaciji.

Prva stopnja je nastanek acetaldehida, ki reagira z vodo, da dobimo hidriran acetaldehid.

V drugi stopnji se ta aldehid oksidira, pravzaprav dehidrogenira in dobimo očetno kislino.



4.3.1 Povzročitelji očetno kislinske fermentacije

Očetno kislinsko fermentacijo povzročajo očetnokislinske bakterije, ki se od vseh ostalih bakterij ločijo po tem, da prenesejo nizke pH vrednosti substrata. Očetnokislinske bakterije uvrščajo v rod *Acetobacter* in rod *Gluconobacter*. Fermentacijski substrati morajo vsebovati etanol, vodo in hranilne snovi.

Očetne bakterije so obligatno aerobne, nahajajo se v zraku, v alkoholnih tekočinah. Pri oksidaciji alkohola v očetno kislino se sprošča toplota, ki služi za vzdrževanje temperature, pri katerih očetnokislinska fermentacija poteka. Najnižje temperature, pri katerih očetno kislinske bakterije še lahko živijo so med 6-10°C, optimalne temperature za njihovo delovanje so 19-34 °C, odvisno od vrste bakterij.

Pri vseh vrstah očetnih kisanj nastane tanka kožica. *Acetobacter xylinum* pa tvori tudi do 2 cm debelo, težko, sluzasto kožico in zasluzi špirale. Povzroča tudi oksidacijo očetne kisline

v CO₂ in vodo. Zato pustimo v drozgi vsaj 0,2% volumski delež alkohola, da imajo bakterije še nekaj hrane, da ne bi začele z oksidacijo. Je pa *Acetobacter xylinum* občutljiva na višje koncentracije in ne prenese več kot 4% očetne kisline (Cor, 1997).

4.3.1.1 Razlike med bakterijami rodov *Acetobacter* in *Gluconobacter*

Očetno kislinske bakterije, ki pripadajo rodu *Acetobacter* in *Gluconobacter*, so sorodne in pripadajo isti družini *Acetobacteraceae*. Razlike med njima so v tipu flagelacije (bakterije rodu *Gluconobacter* imajo polarne multitrihe bičke, so gibljive ali negibljive) in v sposobnosti superoksidacije, ki jo bakterije rodu *Gluconobacter* ne zmorejo. Le-te raje koristijo kot vir energije glukozo kot pa etanol. Bakterije rodu *Acetobacter* prenesejo višje koncentracije etanola, tudi nad 10% (v/v), v primerjavi z bakterijami rodu *Gluconobacter*.

Pri bakterijah, ki pripadajo rodu *Gluconobacter*, so našli ubikinon –10, pri bakterijah rodu *Acetobacter* pa ubikinon –8 in –9. Izjema so bile bakterije *A. liquefaciens* in tiste, ki producirajo celulozo, ker so pri njih našli ubikinon –10. Pri bakterijah rodu *Acetobacter* so našli citohrome (a₁, a₂, a₄, b, c, c₁, d), vendar ni nujno, da so vsi zastopani v določeni vrsti bakterij. Zdi se, da je citohrom a₁ tipičen za bakterije rodu *Acetobacter*, ker ga niso našli pri bakterijah rodu *Gluconobacter* (www.fems-microbiology.org).

4.3.1.2 *Acetobacter xylinum*

Tvori 5-ketoglukonsko kislino iz D-glukoze. Poteka ketogeneza iz glicerola. Ne izkorišča etanola niti Na-acetata. Ne fiksira dušika in ne koristi L-AK. V svojem genomu poseduje plazmide 16, 44 in 64 kb parov, kateri so lahko odgovorni za formiranje celuloze. Na gojišču tvori kolonije kot debela čvrsta celulozna opna, podobno kot *A. europaeus*. Nekaj časa nazaj so to vrsto pričeli izkoriščati za pridobivanje bakterijske celuloze kot nov industrijski material (www.fems-microbiology.org).

4.4 Biokemijske spremembe

Čajna goba proizvaja celulozni film, oksidira etanol, proizvaja očetno kislino, L+ mlečno, glukonsko in glukoronsko kislino.

Glukoronska kislina je pomembna pri detoksifikaciji strupenih hidroksilov, vsebujočih komponent v jetrih. Če jetra ne proizvajajo dovolj glukoronske kisline, lahko čajna goba zagotovi dodatno glukoronsko kislino za pomoč pri detoksifikaciji strupenih substanc, če le ti preživijo (nespremenjeni) v prebavnem sistemu (www.fems-microbiology.org).

4.5 Vpliv substrata na končne koncentracije snovi v produktu

Kot substrat oz. medij za rast kombuče uporabimo najpogosteje sladek črni čaj, lahko uporabimo tudi zeleni čaj, mešanico črnega in zelenega čaja, čaj brez kofeina, mešanico sadnih čajev, raztopino rjavega in belega sladkorja, raztopino glukoze in celo med. V naslednjih tabelah so podani deleži posameznih sestavin glede na medij, ki je bil uporabljen. Najboljšo kakovost izdelka da črni čaj, zato se tudi največ uporablja.

TABELA 1: Kemijska sestava kambuče, če je medij zeleni čaj (www.h2olily.com/~insect/kombuch2.html)

Kemijske komponente	Vsebnost(mg/ml)
Etilglukonat	0,00
Oksalna kislina	0,55
Glukoronska kislina	0,00
2-keto-glukonska kislina	0,90
5-keto-glukonska kislina	0,00
Glukonska kislina	2,80
Fruktoza	30,00
Sukcinat	0,56
Ocetna kislina	2,70

TABELA 2: Kemijska sestava kambuče, če je medij črni čaj (www.h2olily.com/~insect/kombuch2.html)

Kemijske komponente	Vsebnost(mg/ml)
Etilglukonat	0,00
Oksalna kislina	0,47
Glukoronska kislina	0,00
2-keto-glukonska kislina	1,10
5-keto-glukonska kislina	1,10
Glukonska kislina	3,10
Fruktoza	12,31
Sukcinat	0,56
Ocetna kislina	4,67

TABELA 3: Kemijska sestava kambuče, če je medij zeleni in črni čaj (www.h2olily.com/~insect/kombuch2.html)

Kemijske komponente	Vsebnost(mg/ml)
Etilglukonat	0,12
Oksalna kislina	0,14
Glukoronska kislina	0,00
2-keto-glukonska kislina	0,00
5-keto-glukonska kislina	1,30
Glukonska kislina	1,20
Fruktoza	13,00
Sukcinat	0,32
Ocetna kislina	3,70

TABELA 4: Kemijska sestava kambuče, če je medij med
(www.h2olily.com/~insect/kombuch2.html)

Kemijske komponente	Vsebnost(mg/ml)
Etilglukonat	1,10
Oksalna kislina	0,28
Glukoronska kislina	0,00
2-keto-glukonska kislina	0,00
5-keto-glukonska kislina	1,32
Glukonska kislina	5,24
Fruktoza	25,07
Sukcinat	1,59
Ocetna kislina	9,36

5. BIOINŽENIRSKÉ OSNOVE BIOPROCESA

Bioinženirski proces priprave kambuče ni zelo zahteven, saj nanj ne moremo veliko vplivati.

5.1 Pripravljalni postopki

Najbolj preprosta navodila za domačo pripravo čaja za dve osebi lahko opišemo na naslednji način. Najprej moramo dobiti kombučo, ki nam jo lahko podari prijatelj ali jo naročimo po elektronski pošti ali pa kupimo v trgovini, ki se ukvarja s prodajo teh izdelkov. Če jo dobimo po pošti, je bolj primerno, da jo naročimo pozimi, ko so nižje temperature in se ne pokvari tako hitro. Včasih se je prenašala iz roda v rod in vsaka družina je imela kakšno skrivnost o pripravi tega čudežnega napitka, imenovanega tudi eliksir življenja, zato se je marsikatera pomembna informacija tudi izgubila. Kombuča mora biti v plastični vrečki, skupaj z eno skodelico črnega čaja, da jo ohranimo vlažno. Vse skupaj mora biti še v kartonski škatli, da se ne poškoduje.

Kombuča je simbiotska združba kvasovk in bakterije, ki jo lahko imenujemo starter kultura. Starter kultura je del že fermentiranega kakovostnega proizvoda, ki se prenese v novo šaržo kot inkulum s selekcionirano pozitivno mikrofloro.



SLIKA 3: Kolonija kambuče (<http://kombucha-tea.50megs.com/>)

Ko imamo kombučo lahko začnemo pripravljati čaj. Pet minut vremo tri litre destilirane ali filtrirane vode, s tem se izognemo morebitnim kontaminacijam, v emajlirani ali stekleni posodi in dodamo eno skodelico sladkorja. Po petih minutah vrenja dodamo štiri vrečke črnega čaja pokrijemo posodo in pustimo stati 30 minut ali vse dokler se čaj ne ohladi. Nato odstranimo vrečke čaja in ohladimo čaj na sobno temperaturo.

Čaj je rastlinski substrat, za katerega je značilna nizka vsebnost proteinov in maščob, prevladujejo pa saharidi in polisaharidi. Substrat določa kvaliteto in tip proizvoda, saharidne zaloge (v našem primeru sladkor) predstavljajo energijski potencial za mikroorganizme, ki spreminjajo osnovne gradbene enote sladkorjev v določene metabolite, ki opravljajo konzerviranje in obenem oblikujejo senzorične lastnosti proizvodov (Raspor, 1992).

Čaj prelijemo v 3 ali 4 litersko posodo, ki bo naš bioreaktor. Uporabimo lahko stekleno posodo z razširjemim zgornjim delom; oblika je podobna kozarcu za majonezo. Lahko bi uporabljali tudi plastične posode, vendar se na plastiki lahko nahajajo različni mikroorganizmi. Posoda, ki jo uporabljamo pa mora biti široka, da lahko gobo po potrebi jemljemo ven ali jo dajemo noter.

Posoda mora biti prekrita s čisto krpo, ki se dobro oprijema posode in skozi njo ne more prah. Zaželeno je tudi, da je krpa dolga in tako prepušča spore plesni, ki so ves čas v zraku. Dobro je, če se uporabljajo robčki (za ljudi) ali kuhinjska krpa. Krpo pritrdimo na posodo z elastično gumico.

Dobro je, da je premer posode čim večji, da je stik čaja s kisikom čim boljši in zato kombuča bolje dela. Najbolje je, da je bioreaktorska posoda pri fermentaciji kombuča steklen kozarec oz. posoda, ker je prosojen lahko vidimo spreminjanje barve in morebitne spremembe v strukturi substrata. Kozarec mora biti pred uporabo očiščen in po možnosti tudi steriliziran, saj lahko že z umazanim kozarcem doprinesemo k napakam ali celo nepravilnemu poteku bioprocesa.

Preprečiti moramo, da bi kombuča prišla v stik s kovinami, zato ne smemo uporabljati kovinskih pripomočkov, prav tako pa ne smemo nositi prstanov, ko prihajamo v stik s kombučo.

Kombuča ima rada toploto. Sobna temperatura ($12^{\circ}\text{C} = 70$ do 75°F) je dovolj za rast kombučine kulture. Najboljše pa raste pri 80 do 85°F (24 do 25°C).

Če ni take temperature, je dober tudi segret, nizek pladenj – krožnik. Dober je tudi električno segrevan pladenj, izdelan v Angliji. To je nizkonapetostni električni pladenj s segrevanjem, ki ustvarja prijetno toploto, potrebno za dobro fermentacijo.

Na ta pladenj se postavi plastičen ali steklen kozarec, katerega mere so 37×37 cm, 35 W. Narejen je iz dveh plastičnih polovic in na vrhu je element za segrevanje, tako da je ogrevana samo površina. Grelec je za Evropo narejen za 120V in evropsko vtičnico. Zelo dober je v zimski sezoni (www.kombu.de/heatray.htm).

5.2 Potek bioprocesa

Bioproces začnemo tako, da kombučo iztisnemo iz plastične vrečke v čaj, ponavadi plava na vrhu, lahko pa se tudi posede na dno. Površina kombuča ni nujno, da je ves čas vlažna. Posodo nato postavimo na mirno, temno mesto in pokrijemo z gazo. Hraniti jo moramo pri temperaturi 22°C in to temperaturo tudi vzdrževati, pH čaja je od 2 do 3,5 in se spreminja s časom trajanja bioprocesa.

Imamo šaržno gojenje oz. bioproces, zato ničesar ne dodajamo ali ne odvezem, temveč pustimo, da bioproces prosto teče. Volumen je ves čas konstanten, spreminja pa se sestava snovi, ki se med bioprosesom bodisi porabljajo ali nastajajo.

Med bioprosesom niti ne kontroliramo parametrov niti jih ne spremljamo. Po končanem bioprosesom lahko preverimo vsebnost nekaterih snovi z različnimi analznimi metodami, kot so HPLC (visokotlačna tekočinska kromatografija), LC (tekočinska kromatografija), masna spektrometrija,... Seveda pa teh analiz ne moremo narediti doma, saj potrebujemo drago opremo, ki je na voljo le v za to postavljenih laboratorijih, kjer so strokovnjaki, ki lahko takšno analizo naredijo (www.kombu.de/heatray.htm).



SLIKA 4: Fermentacija kombuče v kozarcu (<http://www.kombucha.org/products.htm>)

5.3 Zaključni postopki

Čez en teden (6 do 10 dni) vzamemo kombučo iz čaja in jo damo na krožnik in odstranimo novonastalo kombučo od primarne, ki smo jo dali v čaj na začetku. Nova kombuča je lahko ravno tako velika kot primarna, ponavadi pa je nekoliko manjša, lahko plava na vrhu ali pa je potopljena na dnu čaja. Obe lahko uporabimo naprej za novo šaržo. Ponavadi pa primarno uporabimo naprej, novonastalo pa shranimo v »ZIPBAG« skupaj z eno skodelico čaja za prijatelje. Kombučo lahko hranimo dva tedna v hladilniku, ali pa jo zavržemo.

Čaj nato prelijemo v steklen ali plastičen vrč in ga hranimo na hladnem. Vrč pokrijemo z nepredušnim zamaškom. Če poteka fermentacija dlje kot en teden lahko postane čaj močnejši -šibek kis-, ki ga lahko pred pitjem razredčimo z vodo. Lahko ga shranimo tudi v zamrzovalniku, vendar pa je najbolj učinkovit in zdravilen prav sveže pripravljene čaj.

Zavedati se moramo, da je kombuča čaj proizvod, ki nastane pri fermentaciji, ki poteka doma v nekontroliranih pogojih in v nesterilnem okolju. Zato je možnost mikrobiološke okužbe zelo velika, najpogosteje se pojavi plesen. Znana sta dva rodova, ki se zelo pogosto pojavljata *Penicillium notatum*, ki je zelenkaste barve, in *Aspergillus niger*, ki je črne ali sive barve. Če se nam pojavi plesen, je najbolje, da kombučo in čaj zavržemo, saj plesni ne moremo nikoli popolnoma odstraniti. Pojavljajo se podatki, da jo lahko odstranimo z limoninim sokom, vinskim kisom in kombuča kisom, vendar pa nam 10% plesni še vedno ostane in slej ko prej se bo zopet pojavila. Včasih pa plesen ni takoj vidna, ker lahko raste skupaj s kombučo v koloniji. Pojav plesni je posledica nizkih temperatur in nečistega okolja. Zagotoviti moramo, da je vsa oprema, s katero prihaja kombuča v stik čista, če imamo možnost, jo pomivamo v pomivalnem stroju. Površine, ki prihajajo v stik s kombučo morajo biti čiste. Ne smemo se dotikati drugih živil ali opreme istočasno kot kombučo. Priporočeno je temeljito umivanje rok in uporaba gumijastih rokavic. Če upoštevamo vse te faktorje, skoraj ne more iti nič narobe, če pa že gre, je najbolje, da vse skupaj zavržemo ali pa se posvetujemo s strokovnjakom (www.kombu.de/heatray.htm).



SLIKA 5: Kombuča v plastični vrečki (<http://www.kombucha.org/products.htm>)

6. EKOLOŠKI ASPEKTI BIOPROCESA

Stranskih produktov pri proizvodnji kambuče ni, saj napitek, ki ga dobimo pri fermentaciji, porabimo v prehrabene namene. Tekočine, v kateri kombuča fermentira, ne zavržemo. V njej shranjujemo ostanek kombučine gobe za nadaljnjo uporabo.

Tudi stara goba kambuče ni velik odpadek in je biološkega izvora, zato jo lahko zavržemo v okolju ali iz nje in ostalih sestavin naredimo humus (<http://www.kombucha.org/products.htm>).

7. UPORABA BIOPROIZVODOV

7.1 Uporaba bioproizvodov v prehrani

Kombuča se največ uporablja kot čaj ali kis. Ponavadi čaj uživamo kot pijačo, vendar pa z njim ne smemo pretiravati. Pijemo ga ponavadi trikrat dnevno. Začeti moramo z manjšo količino in jo postopoma zviševati na 150ml, če se pojavijo kakšne težave, moramo terapijo takoj prekiniti. Zjutraj ga uživamo na tešče, nato pa še dvakrat po jedi.

Poznani pa so še drugi proizvodi, saj lahko kombučo uživamo kot kapsule ali šumeče tablete, dodatek h kosmičem in ostalim žitaricam (w3.trib.com).

7.2 Uporaba bioproizvodov v alternativni medicini

Kombuča čaj uživamo predvsem zaradi njegovih zdravilnih učinkov. Ima močno antioksidativno in antitoksično moč in ga lahko uporabljamo za blažitev številnih težav.

Akne: Kombuča čaj pomaga telesu pri razstrupljanju in izločanju škodljivih snovi. Uporabimo pa ga lahko tudi kot tonik za čiščenje obraza ali pa si ga dodamo v kopel.

Težave s prebavo: Kombinacija kisline in encimov v kombuču pomaga pri prebavnih procesih, uravnava želodčni pH in pozitivno deluje na intestinalno črevesno floro.

Predmenstrualni sidrom (PMS): Kombuča zmanjšuje nivo estrogena, saj vsebuje veliko vitaminov B kompleksa.

Glukoronsko kislino sintetizirajo jetra in je močan detoksifikant. Poznano je, da lahko razgradi toksine kot so herbicidi in pesticidi, ureonsko kislino in holesterol, ki se izločijo preko urina. Poleg tega pa je tudi prekurzor številnih spojin, kot so heparin, mukoin-sulfonska kislina, glukozamin,...

Ocetna kislina, ki jo je več predvsem v kislu, je znana kot inhibitor rasti *Salmonelle*, *Stapylococcus aureus*,...

Vitaminski B kompleks, kot so tiamin, riboflavin, niacin, pantotenska kislina, pirodoksini in biotin so pomembni pri preprečevanju težav povezanih s srcem, pri povečanem stresu in pomagajo pri depresijah.

Esencialne aminokisliline so pomembne sestavine, ki jih človeško telo ne more samo sintetizirati.

Encimi predvsem laktaza in invertaza pomagajo pri kemičnih in metabolnih procesih v telesu.

Minerali so zelo pomembni koencimi in sodelujejo v številnih reakcijah, kjer so nujno potrebni za delovanje.

Zaradi kisline v kombuču je pH vedno na koncu lestvice – med 2,5 in 6,00 (pH krvi pa je med 7,35 in 7,45, pH želodca je od 0,9 do 2,0).

Ker je kombuča produkt živih organizmov, njena sestava ni standardizirana, temveč se spreminja.

Znano je, da kombuča pomaga uravnati telesni pH, če le-ta postane preveč bazičen ali kisel. Mlečna kislina in ostale kisline pripomorejo k temu, da se iz telesa izločajo toksini, ki lahko spremenijo pH.

Razstrupljanje, pravilno delovanje prebavnega trakta in uravnotežen pH so ključni faktorji, ki preprečujejo bolezni in skrbijo za kvaliteto življenja. Kombuča vpliva na vse te bioparametre in tako pripomore k našemu dobremu počutju in zdravju bolezni

(www.kombucha.org/products.htm) .

7.3 Ostala uporaba kombuče

- Kombuča je vsestransko uporabna za izdelavo različnih izdelkov. Še posebej jo veliko uporabljajo v kozmetiki, kjer je sestavni del raznih proizvodov – n.pr. gel za lase, tonik za obraz, krema za obraz, krema za roke, mila...
- Kombučina goba, ki je osnovna sestavina za pripravo različnih napitkov, je primerna predvsem za tisto vrsto ljudi, ki si radi sami in doma pripravljajo svoje pijače.

- Zelo priljubljena pijača je kombučin čaj. 100% kombučin čaj – napitek je osvežilna pijača in dober nadomestek za preprečevanje bolezni. Kombučin čaj je še posebno priljubljen pri tistih ljudeh, ki imajo radi pijače, ki so pripravljene v steklenicah in jih je mogoče piti takoj, obenem pa so tudi fermentirane.
- Kombučo dodajajo tudi zelenemu čaju obenem s kitajskimi zelišči. Blagodejni učinki zelenega čaja, kombučine kulture in izbrana zelišča, raztopljeni v vroči vodi, predstavljajo enkratno kombinacijo zdravju prijaznih sestavin.
- Za tiste, ki doma sami gojijo kombučo in ne vedo, kdaj naj končajo s fermentacijskim procesom, so uporabni kombučini pH testi. Testi pokažejo stopnjo kislosti (www.kombucha-lm.com/pricelist.htm).
- Kot eden izmed produktov se omenja tudi kombučin šampon za lase (www.pronaturoinc.com/kombucha.htm).
- Kot dodatek odraslim pri hrani, se uporablja kombučin ekstrakt. Jemati ga je treba trikrat dnevno.
- Iz kombuče izdelujejo tudi posebne kapsule – kombučine kapsule, ki so dietetični dodatek – nadomestek in jih jemljejo odrasli ljudje trikrat dnevno po dve kapsuli (www.kombucha.org/products.htm).

8. REFERENCE

Adams M.R., Wood B. J. B. 1985. Vinegar in microbiology of fermented foods. London, Elsevier Applied Science Publisher

Blanc P. J. 1996. Characterization of the tea fungus metabolites, Vol 18: 139-142 str.

Blanc Philippe J. February 1996. Biotechnology letters: Volume 18 No. 2 0 : 146-158 str.

Boscarol M. 2000. Sekundarni metaboliti in proizvodnja jabolčnega kisa. Diplomski naloga

Carr J. G. 1985. Tea, coffee and cocoa: 253 str.

Cor S. 1997. Vpliv sestave jabolčnika na kakovost jabolčnega kisa, Dipl. nal. Ljubljana, BF, Odd. Za živilstvo, 14-18 str.

Dufresne. C., Farnworth E. 2000. Food research international 33, 409-421 str.

Lehninger A. 1994. Principi di biochimica. Zanichelli: 435-436,489 str.

Ramuš J. Delna fenotipizacija in analiza prisotnosti IS1380 v očetnokislinskih bakterijah: 6-8, 16-17 str.

Raspor P. (ur.), Smole-Mozina S. 1992. Bakterije. V: Biotehnologija. Ljubljana, BIA d.o.o.: 33-34, 508-510 str.

Stušek P. 2000. Biologija celica. 3.izdaja. Ljubljana, DZS

Veliki splošni leksikon. 1998. Ljubljana, DZS: druga knjiga: 1080 str.

Wood B. J. 1987. Microbiology of fermented food. Vol. 2. London, Elsevier Applied Science: 133-154 str.

<http://www.analyses> of kombucha ferments report on growers.htm

<http://www.elsevier.com>: Tea, Kombucha, and health: a review

<http://www.elsevier.com/locate/foodres>

<http://www.fems-microbiology.org>

<http://www.fems-microbiology.org> : *Zygosaccharomyces kombuchaensis*, a new ascosporogenous yeast from Kombucha tea

<http://www.kombu.de/auleit-e.htm>

<http://www.kombu.de/heatray.htm>)

<http://www.kombucha.org/products.htm>

<http://kombucha-tea.50megs.com>

<http://www.pronaturoinc.com/kombucha.htm>)

<http://www.h2olily.com/~insect/kombuch2.html>

<http://w3.trib.com/~kombu/FAQ/index.html>

<http://w3.trib.com/~kombu/FAQ/mroussin2disc.html>

<http://w3.trib.com/~kombu/huntoon.html>

<http://w3.trib.com/~kombu/konnection/mold.html>

<http://w3.trib.com/~kombu/FAQ/indexorig.shtml>

<http://w3.trib.com/~kombu/FAQ/part06.html>