

KATARZYNA MODRZEJEWSKA, ELŻBIETA BOGUSŁAWSKA-WĄS

PORÓWNANIE WYBRANYCH PARAMETRÓW MIKROBIOLOGICZNYCH I BIOCHEMICZNYCH NAPOJÓW KOMBUCHA

Streszczenie

Celem niniejszej pracy było określenie poziomu wybranych mikroorganizmów, porównanie zawartości polifenoli i antocyjanów oraz zdolności przeciwutleniającej napojów kombucha dostępnych w handlu detalicznym z napojem wytworzonym doświadczalnie metodą tradycyjną. Badania objęły 12 napojów komercyjnych oraz jeden uzyskany doświadczalnie, którego bazą była zielona herbata z 10-procentowym dodatkiem sacharozy. W badanych produktach oznaczono: liczbę bakterii *Acetobacter* sp., *Gluconobacter* sp., LAB i drożdży, pH, ogólną zawartość antocyjanów, ogólną zawartość polifenoli oraz aktywność przeciwutleniającą. Aktywność przeciwdrobnoustrojową napojów kombucha oceniono metodą dyfuzyjną, z zastosowaniem kolumnienek, w stosunku do szczepów wzorcowych: *Escherichia coli* ATCC 35218, *Listeria monocytogenes* serotyp 1/2a (KMSiFZC), *Yersinia enterocolitica* (PCM 1919), *Salmonella enteritidis* (ATCC 130764), *Bacillus cereus* (PCM 2019), *Enterococcus faecalis* (ATTC 29212), *Staphylococcus aureus* (ATTC 25923), *Saccharomyces cerevisiae* (ŁOCK 14), *Candida albicans* (KMSiFZC). Stwierdzono, że napoje deklarowane jako pasteryzowane (K7 - K12) były pozbawione mikroorganizmów z analizowanych grup. W pozostałych produktach komercyjnych dominującym mikroorganizmem były bakterie *Acetobacter* sp., których liczba zawierała się w przedziale $6 \times 10^6 \div 1,1 \times 10^7$ jtk/ml. W napoju doświadczalnym wykazano drożdże w ilości $6,5 \times 10^5$ jtk/ml. Odczyn pH produktów był charakterystyczny i nie przekraczał 4,3. Zawartość antocyjanów we wszystkich napojach pochodzących z handlu wahała się między $0,2 \div 0,3$ mg/dl, natomiast w próbie doświadczalnej było ich ponad dwa razy więcej. Zawartość polifenoli oraz zdolność przeciwutleniająca prób były zróżnicowane i nie stwierdzono ich korelacji z pochodzeniem produktu. Głównym czynnikiem warunkującym zdolność napojów kombucha do inhibicji bakterii potencjalnie chorobotwórczych dla człowieka jest obecność kwasów organicznych. Żaden z badanych napojów nie wykazywał antagonizmu w stosunku do testowanych drożdży.

Słowa kluczowe: kombucha, fermentacja, kultura SCOBY, właściwości przeciwutleniające

Mgr inż. K. Modrzejewska, dr hab. E. Bogusławska-Wąs, prof. ZUT, Katedra Mikrobiologii Stosowanej i Fizjologii Żywienia Człowieka, Wydz. Nauk o Żywności i Rybactwa, Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny, ul. Papieża Pawła VI 3, 71-459 Szczecin.

Kontakt: katarzyna_modrzejewska@zut.edu.pl

Wprowadzenie

Tradycyjna kombucha jest przefermentowanym przez SCOBY (ang. *Symbiotic Culture of Bacteria and Yeast*) napojem powstałym na bazie słodzonej czarnej lub zielonej herbaty. Znana jest od dawna, ale dopiero w 2016 r. na rynku detalicznym pojawił się pierwszy napój – KeVita, wyprodukowany przez PepsiCo, Inc. [13]. We wrześniu 2018 r. Coca-Cola wykupiła firmę Mojo i poszerzyła swój asortyment o produkty wytwarzane przy udziale grzyba herbacianego. Wzrasta zainteresowanie fermentowaną herbatą. Szacuje się, że w 2020 r. na produkty powstałe na bazie SCOBY konsumenci wydadzą ponad 1,8 miliarda dolarów [1]. Ze względu na specyficzne walory produkty te na rynku spożywczym zaczynają konkurować z piwami bezalkoholowymi. Kombucha jako finalny produkt charakteryzuje się smakiem porównywalnym z cydrem, lekkim nagazowaniem i pH mieszczącym się w zakresie 2 ÷ 5. Jej naturalny smak często jest regulowany przez wprowadzenie octu jabłkowego, fruktozy lub koncentratów smakowych [10].

W mikrobiologicznym składzie SCOBY znajdują się przede wszystkim bakterie kwasu octowego (w tym przede wszystkim *Acetobacter* sp., *Komagataeibacter* sp. i *Gluconobacter* sp.), bakterie fermentacji mlekowej (*Lactobacillus* sp. i *Lactococcus* sp.) oraz drożdże (*Zygosaccharomyces* sp., *Pichia* sp., *Saccharomyces* sp., *Kloeckera* sp., *Candida* sp., *Leucosporidiell* sp. i *Torulopsis* sp.). Właściwy skład kombuchy nie jest stały i zależy od wielu czynników, w tym przede wszystkim od struktury mikrobiologicznej SCOBY, substratów czy jakości wody [6, 7, 18, 19].

Kombucha jest cenionym produktem bogatym w kwasy organiczne (przede wszystkim octowy, glukuronowy, glukonowy, mlekowy), witaminy (B₁, B₂, B₆, B₁₂ i C), związki mineralne (Cu, Fr, Mn, Ni i Zn), substancje biologicznie aktywne pochodzące z herbaty, enzymy hydrolityczne i związki polifenolowe. Z tego też względu przypisuje się jej wiele prozdrowotnych cech, takich jak: obniżanie ciśnienia krwi, redukcję poziomu cholesterolu LDL, właściwości bioimmunostymulacyjne czy hepatochronne [11].

Celem pracy było określenie poziomu wybranych mikroorganizmów, porównanie zawartości polifenoli i antocyjanów oraz zdolności przeciwutleniającej napojów kombucha dostępnych w handlu detalicznym z napojem wytworzonym doświadczalnie metodą tradycyjną.

Material i metody badań

Materiałem doświadczalnym było 12 napojów kombucha zakupionych w handlu detalicznym oraz jeden wytworzony w warunkach laboratoryjnych (tab. 1). Według deklaracji producentów napoje K1 - K6 zawierały żywe kultury SCOBY, natomiast napoje K7 - K12 zostały poddane pasteryzacji. Surowcem do produkcji napoju

Tabela 1. Charakterystyka badanych napojów kombucha

Table 1. Profile of kombucha drinks studied

Próba Sample	Pasteryzacja Pasteurisation	Rodzaj herbaty Type of tea	Status EKO ECO status	Dodatki smakowe Flavoring additives	Środek słodzący Sweetener
K1	-	zielona green	+	naturalny aromat z ananasa natural pineapple flavour	cukier, stevia, erytrytol / sugar, stevia, erythritol
K2	-	zielona green	+	naturalny aromat z wiśni, hibiskus natural aroma of cherry, hibiscus	cukier, stevia, erytrytol / sugar, stevia, erythritol
K3	-	zielona green	+	brak / absent	cukier, stevia, erytrytol / sugar, stevia, erythritol
K4	-	czarna black	+	brak / absent	cukier trzcinowy cane sugar
K5	-	Bencha	+	brak / absent	cukier trzcinowy cane sugar
K6	-	zielona green	+	brak / absent	cukier trzcinowy cane sugar
K7	+	zielona green	+	pokrzywa / nettle	cukier trzcinowy cane sugar
K8	+	zielona green	+	mięta / mint	cukier trzcinowy cane sugar
K9	+	zielona green	+	chmiel / hop	cukier trzcinowy cane sugar
K10	+	czarna black	-	kwas organiczny / organic acid	cukier / sugar
K11	+	ziołowa herbal	-	ocet jabłkowy, koncentraty krokosza barwierskiego i soku czarnej marchwi, dodatek witamin B ₃ , B ₆ , B ₇ , B ₁₂ apple cider vinegar, concentrates of safflower and black carrot juice, the addition of vitamins B ₃ , B ₆ , B ₇ , B ₁₂	fruktoza fructose
K12	+	ziołowa herbal	-	ekstrakt owocowy, ocet jabłkowy, kwas mlekowy, karmel, estry glicerolu, dodatek witamin B ₃ , B ₆ , B ₇ , B ₁₂ fruit extract, apple cider vinegar, lactic acid, caramel, glycerol esters, the addition of vitamins B ₃ , B ₆ , B ₇ , B ₁₂	fruktoza fructose
D	-	zielona green	-	brak / absent	sacharoza saccharose

Objaśnienia / Explanatory notes:

K1 - K12 – symbole badanych prób / symbols of samples analysed; (+) – tak / yes; (-) – nie / no; D – kombucha doświadczalna / experimental kombucha.

doświadczalnego (D) był napar z zielonej herbaty (Ahmad Green Tea) z 10-procentowym dodatkiem sacharozy, zaszczerpiony kulturą SCOBY uzyskaną z małej manufaktury. Zgodnie z metodą Ayeda i wsp. [1] fermentację prowadzono przez 12 dni w temp. 23 °C.

Jakość mikrobiologiczną badanych napojów oznaczano metodą standardową w dwóch powtórzeniach, z użyciem podłoża mikrobiologicznych modyfikujących metodę Cailego i wsp. [5] – tab. 2. Inkubację posiewów prowadzono w temp. 30 °C przez 48 h.

Tabela 2. Podłoża mikrobiologiczne zastosowane do oznaczania mikroorganizmów w napojach kombucha

Table 2. Used culture media for the determination of microorganisms in kombucha beverages

Podłoże Culture medium	Producent/skład Manufacturer/composition	Oznaczana grupa mikroorganizmów / Group of microorganisms being determined
Sabuardo Agar z chloramfenikolem / Sabuardo Agar with chloramphenicol	BTL, Polska	drożdże i pleśnie yeast and molds
Acetobacter Agar	ekstrakt drożdżowy – 10 g, glukoza – 10 g, etanol 96 % – 30 ml, CaCO ₃ – 20 g, agar – 15 g, actidion 0,1 % – 10 ml, woda dejonizowana – 1000 ml yeast extract – 10 g, glucose – 10 g, ethanol 96 % – 30 ml, CaCO ₃ – 20 g, agar – 15 g, actidion 0.1 % – 10 ml, deionized water – 1000 ml	<i>Acetobacter</i> spp. AAB (Acetic Acid Bacteria)
Gluconobacter Agar	ekstrakt drożdżowy – 5 g, trypton – 10 g, CaCO ₃ – 1 g, glukoza – 20 g, K ₂ HPO ₄ – 1 g, agar – 15 g, actidion 0,1 % – 10 ml, woda dejonizowana – 1000 ml / yeast extract – 5 g, tryptone – 10 g, CaCO ₃ – 1 g, glucose – 20 g, K ₂ HPO ₄ – 1 g, agar – 15 g, actidion 0.1 % – 10 ml, deionized water – 1000 ml	<i>Gluconobacter</i> spp.
MRS Agar	DeMan, Rogosa and Sharpe, Merck, Niemcy	Bakterie fermentacji mlekowej LAB (Lactic Acid Bacteria)

Kwasowość czynną napojów oznaczano metodą potencjometryczną za pomocą pH-metru (Adwa AD 1000, Polska).

Całkowitą zawartość polifenoli oznaczano metodą Singletona i wsp. [20] z modyfikacją własną – stosowano kwas galusowy (GEA) jako standard. Przygotowywano mieszaninę reakcyjną (0,1 ml każdego z napojów, 6 ml wody destylowanej oraz 0,5 ml odczynnika Folina-Ciocalteu'a), którą pozostawiano na 1 min w temp. 20 ± 2 °C. Następnie dodawano po 1,5 ml 20-procentowego roztworu Na_2CO_3 i 1,9 ml wody destylowanej. Próbki mieszano, a następnie ogrzewano w temp. 25 °C przez 30 min (do uzyskania trwałej, niebieskiej barwy). Absorbancję mierzono w spektrofotometrze Lambda 25 (Perkinelmer, Wielka Brytania) przy długości fali $\lambda = 760$ nm w trzech powtórzeniach. Całkowitą zawartość polifenoli wyrażano w mg/dl próbki w przeliczeniu na kwas galusowy.

Całkowitą zawartość antocyjanów oznaczano metodą spektrofotometryczną z różnicy absorbancji (metoda Fuleki i Francis, zgodnie z Walkowiak-Tomczak [29]). Pomiaru absorbancji dokonywano w 1 ml badanej próbki wobec 4 ml buforu HCl o pH 1 (jako próby odniesienia) oraz 4 ml buforu HCl o pH 4,5 w trzech powtórzeniach. Wartość absorbancji (A) przy długości fali $\lambda = 526$ nm oraz $\lambda = 700$ nm odczytywano w spektrofotometrze Lambda 25 (Perkinelmer, Wielka Brytania). Zawartość antocyjanów wyrażano w mg cyjanidyno-3-glukozydu, zgodnie z równaniem:

$$C = (A/EL) \times MW \times N$$

gdzie : $A = (A_{\lambda = 526 \text{ pH } 1,0} - A_{\lambda = 700 \text{ pH } 1,0}) - (A_{\lambda = 526 \text{ pH } 4,5} - A_{\lambda = 700 \text{ pH } 4,5})$,

E – absorbancja molarna (29 600 dla cyjanidyno-3glukozydu),

L – grubość kuwety (1 cm),

MW – masa molekularna (445,2 dla cyjanidyno-3glukozydu),

N – współczynnik rozcieńczenia.

Aktywność przeciwutleniającą oznaczano na podstawie redukcji 1,1-diphenylo-2-picrylhydazyli (DPPH^{*}) metodą, którą opisali Zafra-Rojas i wsp. [31]. Przygotowano etanolowy roztwór stabilnego DPPH^{*} (7,4 mg/100 ml) i mieszaninę reakcyjną badanej próbki z wodą dejonizowaną w proporcji 1 : 50. Do 500 μl alkoholowego roztworu DPPH^{*} dodawano 100 μl mieszaniny, a następnie pozostawiano bez dostępu światła w temp. 20 ± 2 °C na 1 h. Próbki odwirowywano (3000 rpm/10 min), po czym mierzono absorbancję przy długości fali $\lambda = 520$ nm w trzech powtórzeniach. Wynik podawano jako % aktywności przeciwutleniającej.

Aktywność przeciwdrobnoustrojową napojów kombucha oznaczano metodą dyfuzyjno-cylinderkowo-płytkową [1] w stosunku do szczepów wzorcowych: *Escherichia coli* (ATCC 35218), *Listeria monocytogenes* serotyp 1/2a (KMSiFŻC), *Yersinia enterocolitica* (PCM 1919), *Salmonella enteritidis* (ATCC 130764), *Bacillus cereus* (PCM 2019), *Enterococcus faecalis* (ATTC 29212), *Staphylococcus aureus* (ATTC 25923), *Saccharomyces cerevisiae* (ŁOCK 14), *Candida albicans* (KMSiFŻC). Z 24-godzinnych hodowli szczepów wzorcowych wykonywano zawiesiny o gęstości 1

w skali McFarlanda. Z każdej z nich pobierano po 100 µl i wykonywano posiew mura-
rawowy na podłoże z agaru odżywczego (Oxoid Ltd. Wielka Brytania) oraz Sabourau-
da (BTL, Polska) w przypadku odpowiednio: bakterii i drożdży. Do cylinderków
wprowadzano po 100 µl jednego z dwóch wariantów uprzednio przygotowanych pró-
bek kombuchy – nieneutralizowanej oraz neutralizowanej do pH 7 (0,1 M NaOH).
Przygotowywano również próby referencyjne (R), aby określić podatność badanych
szczepów na wybrane antybiotyki (w cylinderkach znajdowało się 100 µl 0,003-
procentowego chloramfenikolu lub 0,001-procentowego actidionu). Płytki inkubowano
przez 48 h w temp. 37 °C (bakterie) oraz 30 °C (drożdże i *Bacillus* sp.), a następnie
mierzone strefy zahamowania wzrostu mikroorganizmów.

Statystyczne opracowanie wyników wykonano w programie StatSoft – Statistica
v 12. W celu sprawdzenia wpływu czasu przechowywania na badane parametry prze-
prowadzono analizę wariancji (ANOVA). Istotność różnic między wartościami śred-
nimi weryfikowano testem Duncana ($p \leq 0,05$).

Wyniki i dyskusja

Kompozycja mikrobiologiczna napoju kombucha jest jednym z kluczowych
czynników wpływających na jej skład chemiczny, a ten warunkuje właściwości poten-
cjalnie prozdrowotne. Zróznicowanie mikrobiologiczne zależy od wielu czynników,
w tym od rodzaju wykorzystanego substratu [5, 6]. Wyniki oceny mikrobiologicznej
napojów komercyjnych przedstawiono w tab. 3. Liczba drobnoustrojów w próbach
K7 - K12 (deklarowanych przez producentów jako pasteryzowane) była poniżej progu
wykrywalności ($< 10^1$ jtk/ml), co świadczy o poprawnie wykonanym utrwaleniu napo-
jów.

W produktach handlowych niepoddanych obróbce termicznej (K1 - K6 i D) do-
minowały bakterie *Acetobacter* sp. (AAB) w liczbie $4,5 \times 10^5 \div 1,1 \times 10^6$ jtk/ml.
W produktach tych stwierdzono również bakterie fermentacji mlekowej. Jak podają
Santos i wsp. [17] oraz Vohra i wsp. [28], stanowią one ok. 30 % populacji mikrobi-
ologicznej napojów kombucha. Oznaczona ogólna liczba mikroorganizmów w napojach
kombucha jest zbieżna z wynikami Cailego i wsp. [5]. W odróżnieniu od napojów
pochodzących z handlu detalicznego kombucha doświadczalna po 12 dniach fermenta-
cji zawierała tylko drożdże w liczbie 7×10^5 jtk/ml. Może to świadczyć o całkowitym
zużyciu tlenu niezbędnego do rozwoju AAB podczas fermentacji. Mogło też być spo-
wodowane nadmiernym rozwojem w napoju D naturalnie występujących drożdży kwa-
szących, np. *Bretanomyces* spp., które w warunkach dużej zawartości cukrów w śro-
dowisku, w pierwszej kolejności produkują etanol, chroniąc się przed wzrostem
konkurencyjnych mikroorganizmów, a następnie z powstałych biokomponentów
w warunkach beztlenowych syntetyzują kwas octowy i jego estry [25].

Tabela 3. Charakterystyka badanych napojów kombucha pod względem liczby mikroorganizmów

Table 3. Profile of kombucha drinks analysed in terms of count of microorganisms

Próba Sample	Drożdże Yeast [jtk/g]	<i>Acetobacter</i> sp. [jtk/g]	<i>Gluconobacter</i> sp. [jtk/g]	LAB [jtk/g]
K1	$2,40 \times 10^3$	1×10^6	$1,3 \times 10^5$	6×10^2
K2	3×10^3	1×10^6	$< 10^1$	2×10^3
K3	$2,50 \times 10^4$	$1,1 \times 10^6$	$1,65 \times 10^4$	3×10^4
K4	$1,64 \times 10^5$	$8,7 \times 10^5$	$< 10^1$	3×10^5
K5	2×10^3	$7,7 \times 10^5$	$4,6 \times 10^4$	2×10^4
K6	$6,5 \times 10^3$	6×10^5	$4,5 \times 10^5$	$2,7 \times 10^6$
K7	$< 10^1$	$< 10^1$	$< 10^1$	$< 10^1$
K8	$< 10^1$	$< 10^1$	$< 10^1$	$< 10^1$
K9	$< 10^1$	$< 10^1$	$< 10^1$	$< 10^1$
K10	$< 10^1$	$< 10^1$	$< 10^1$	$< 10^1$
K11	$< 10^1$	$< 10^1$	$< 10^1$	$< 10^1$
K12	$< 10^1$	$< 10^1$	$< 10^1$	$< 10^1$
D	$6,5 \times 10^5$	$< 10^1$	$< 10^1$	$< 10^1$

Objaśnienia / Explanatory notes:

Objaśnienia symboli jak pod tab. 1. / Meanings of symbols as in Tab. 1. W tabeli przedstawiono wartości średnie / Table shows mean values.

Podstawowym parametrem określającym jakość napoju kombucha jest jego pH. Korzystne dla zdrowia właściwości wynikające z jej spożywania przypisuje się dużej zawartości kwasów organicznych. Niskie pH zapobiega degradacji polifenoli oraz wpływa korzystnie na stabilność chemiczną antocyjanów. Wszystkie badane próby charakteryzowały się pH w zakresie $1,95 \div 4,3$ (tab. 4).

Zawartość polifenoli w napojach jest zależna głównie od jakości i rodzaju herbaty, której użyto do ich przygotowania. Wyniki były zróżnicowane, w napojach rynkowych zawartość polifenoli zawierała się w przedziale $11,36 \div 107$ mg GEA/dl, a w napoju doświadczalnym wynosiła 78 mg GEA/dl. Otrzymane rezultaty były charakterystyczne dla fermentowanej herbaty [15, 16, 26].

Antocyjany zaliczane do flawonoidów również wykazują zdolność neutralizowania wolnych rodników. Największą ich zawartość oznaczono w napoju wyprodukowanym metodą tradycyjną. Ich ilość w tym produkcie była ponad dwa razy większa niż w napojach rynkowych i wynosiła 0,78 mg/dl. Zawartość antocyjanów w produktach komercyjnych była zbliżona i oscylowała między 0,2 a 0,3 mg/dl. Dla porównania – zawartość antocyjanów w naparze z zielonej herbaty niepoddanej fermentacji wynosi 0,4 mg/dl [14].

Tabela 4. Wartość pH, zawartość polifenoli i antocyjanów oraz aktywność przeciwutleniająca napojów kombucha
 Table 4. pH value, contents of polyphenols and anthocyanins in, and antioxidant activity of kombucha drinks

Parametr Parameter	K1	K2	K3	K4	K5	K6	K7	K8	K9	K10	K11	K12	D
pH	3,05 ^a ± 0,02	1,95 ^a ± 0,01	3,43 ^a ± 0,02	3,45 ^a ± 0,00	3,38 ^a ± 0,02	4 ^a ± 0,01	3,9 ^b ± 0,04	4,39 ^b ± 0,01	2,88 ^a ± 0,02	3,0 ^a ± 0,02	3,1 ^a ± 0,04	2,92 ^b ± 0,01	2,94 ^b ± 0,0
Zawartość polifenoli Content of polyphenols [mg GEA/dl]	19,8 ^a ± 0,34	107 ^a ± 1,65	12,47 ^b ± 0,72	11,36 ^b ± 0,82	18,03 ^a ± 0,42	107 ^a ± 1,36	55,10 ^a ± 0,28	99,58 ^b ± 0,67	19,51 ^a ± 1,34	19,88 ^a ± 1,42	40,2 ^a ± 0,32	20,25 ^a ± 0,76	78,7 ^a ± 1,65
Zawartość antocyjanów Content of anthocyanins [mg/dl]	0,21 ^b ± 0,01	0,22 ^a ± 0,02	0,3 ^a ± 0,01	0,32 ^a ± 0,04	0,25 ^a ± 0,01	0,3 ^a ± 0,01	0,26 ^a ± 0,03	0,29 ^a ± 0,02	0,25 ^a ± 0,04	0,19 ^b ± 0,01	0,3 ^a ± 0,01	0,2 ^b ± 0,05	0,78 ^a ± 0,02
Aktywność przeciwutleniająca Antioxidant activity [% inhibicji / of inhibitor]	65 ^a ± 0,42	65 ^a ± 1,13	76 ^a ± 2,48	58 ^b ± 0,5	72 ^a ± 1,74	62 ^a ± 1,19	73 ^a ± 2,61	22 ^b ± 2,44	65 ^b ± 3,12	70 ^a ± 0,98	73 ^b ± 1,1	70 ^a ± 2,12	78 ^b ± 1,27

Objaśnienia / Explanatory notes:

Objaśnienia symboli jak pod tab. 1. / Meanings of symbols as in Tab 1. W tabeli przedstawiono wartości średnie ± odchylenia standardowe / Table shows mean values ± standard deviation; a, b – wartości średnie w wierszach oznaczone różnymi literami różnią się statystycznie istotnie przy p < 0,05 / mean values in rows denoted by different letters differ statistically significantly at p < 0.05.

Przeciwutleniacze są związkami chemicznymi chroniącymi organizm przed wolnymi rodnikami. Wraz z pożywieniem dostarczane są przeciwutleniacze egzogenne, do których zalicza się polifenole. Najmniejszą efektywność neutralizacji wolnych rodników stwierdzono w próbie K8 (22 %). W pozostałych napojach wartość aktywności przeciwutleniającej wahała się w przedziale 58,33 ÷ 76,4 % w stosunku do DPPH'. Napojem najbardziej efektywnym w inhibitowaniu wolnych rodników była kombucha doświadczalna (78,7 %). Oznaczona zdolność utleniająca napojów komercyjnych (poza K8) była porównywalna z wynikami opublikowanymi przez Cailego i wsp. [5].

Tabela 5. Antagonistyczne działanie napojów kombucha na wybrane patogeny
Table 5. Antagonistic activity of kombucha drinks against selected pathogens

Mikroorganizm Microorganism		K1	K2	K3	K4	K5	K6	K7	K8	K9	K10	K11	K12	D	W
		Strefa zahamowania wzrostu / Growth inhibition zone [mm]													
<i>B. cereus</i> PCM 2019	NN	10	10	10	10	14	16	10	10	10	14	10	10	10	30
	N	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
<i>E. faecalis</i> ATTC 29212	NN	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	25
	N	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
<i>L. monocytogenes</i> KMSiFZC	NN	10	10	13	0	12	15	11	17	10	16	22	20	20	30
	N	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
<i>S. aureus</i> ATTC 25923	NN	10	0	0	0	10	10	10	10	16	10	15	10	11	25
	N	0	0	0	0	0	0	0	0	16	0	0	0	0	
<i>S. enteritidis</i> ATCC 130764	NN	10	10	10	10	10	10	0	0	10	0	0	0	20	23
	N	10	10	10	10	0	0	0	0	0	0	0	0	11	
<i>Y. enterocolitica</i> PCM 1919	NN	0	0	0	0	10	10	0	0	16	0	10	0	25	23
	N	0	0	0	0	0	0	0	0	10	0	0	0	25	
<i>E. coli</i> ATCC 35218	NN	0	0	0	0	16	17	21	17	27	10	10	10	20	24
	N	0	0	0	0	0	0	0	0	23	0	0	0	11	
<i>S. cerevisiae</i> ŁOCK 14	N	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	27
	NN	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
<i>C. albicans</i> KMSiFZC	N	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	NN	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

Objaśnienia / Explanatory notes:

Objaśnienia symboli jak pod tab. 1. / Meanings of symbols as in Tab 1. NN – próba nieneutralizowana / non-neutralised sample; N – próba neutralizowana / neutralised sample; W – wzorzec z antybiotyku / antibiotic pattern.

W badaniach użyto dziewięciu mikroorganizmów, aby określić ich wrażliwość na składniki zawarte w napojach kombucha powstałych na bazie prefermentowanej herbaty. Badane napoje hamowały wzrost zarówno bakterii Gram-dodatnich (z wyjątkiem *E. faecalis*), jak i Gram-ujemnych (tab. 5). Czynnikiem determinującym antagonizm

kombuchy wobec wybranych patogenów przewodu człowieka są obecne w nich kwasy organiczne. Pełnią one kluczową funkcję w hamowaniu rozwoju bakterii Gram-dodatnich. Zasadniczymi czynnikami determinującymi antagonizm przefermentowanych napojów jest ilość i jakość herbaty użytej do jego produkcji, czas trwania fermentacji czy rodzaj użytego substratu [23, 28].

Po neutralizacji (pH 7) wszystkie próby (z wyjątkiem K9) utraciły zdolność do hamowania wzrostu bakterii Gram-dodatnich, natomiast w przypadku bakterii Gram-ujemnych część napojów zachowało swój biobójczy charakter. Uzyskane wyniki mogą być związane z występowaniem bakteriocyn stabilnych w środowisku neutralnym (np. bakteriocyna SL610 produkowana przez *L. plantarum*) w testowanych napojach [3, 12]. Podobnie Greenwalt i wsp. [7] stwierdzili, że żaden z testowanych napojów nie hamował wzrostu drożdży. Przeciwwgrzybicze właściwości napoju kombucha są kwestią sporną, a uzyskiwane wyniki są skrajne [3, 9]. Można stwierdzić, że czynnikiem warunkującym przeciwdrobnoustrojowe właściwości kombuchy jest jej niskie pH związane z występowaniem kwasów organicznych, mające znaczący wpływ na stabilność bakteriocyn. Tradycyjna kombucha doświadczalna hamowała wzrost 7 z 9 testowanych mikroorganizmów. W części przypadków zahamowanie wzrostu przy użyciu napoju doświadczalnego było nawet porównywalne z wielkością stref otrzymanych przy użyciu antybiotyków, co świadczy o dobrej skuteczności jego działania.

Wnioski

1. Zawartość wybranych, potencjalnie prozdrowotnych frakcji (polifenoli i antocyjanów) w napojach kombucha dostępnych w handlu detalicznym była zróżnicowana. Nie stwierdzono powiązania między procesem pasteryzacji a zmianami aktywności przeciwutleniającej tych napojów.
2. Większość handlowych napojów kombucha charakteryzowała się mniejszą zawartością polifenoli niż kombucha doświadczalna. Produkt tradycyjny wyróżniał się najwyższą inhibicją wolnych rodników ze wszystkich przebadanych produktów.
3. Zawartość antocyjanów w napojach komercyjnych była porównywalna z ich ilością w zielonej herbacie. Zawartość tych związków była ponad dwa razy większa w napoju doświadczalnym niż w produktach dostępnych w handlu detalicznym.
4. Czynnikiem warunkującym działanie przeciwdrobnoustrojowe napojów kombucha wobec innych mikroorganizmów było niskie pH. Jedynie nieliczne produkty zahamowały wzrost drobnoustrojów po poddaniu ich procesowi neutralizacji. Napoje kombucha poddane badaniom nie wykazywały antagonizmu w stosunku do grzybów drożdżowych.
5. Większy potencjał prozdrowotny przejawiała kombucha doświadczalna niż napoje tego typu dostępne w handlu detalicznym.

Literatura

- [1] Rohan: Kombucha Market Worth USD 1.8 Billion by 2020. [on line]. Markets and Markets. Dostęp w Internecie [06.02.2020]: <http://www.marketsandmarkets.com/PressReleases/kombucha.asp>
- [2] Ayed L., Ben Abid S., Hamdi M.: Development of a beverage from red grape juice fermented with the Kombucha consortium. *Ann. Microbiol.*, 2017, 67, 111-121.
- [3] Battikh H., Chaieb K., Bakhrouf A., Ammar E.: Antibacterial and antifungal activities of black and green kombucha teas. *J. Food Biochem.*, 2013, 37, 231-236.
- [4] Bogacz A.: Napoje funkcjonalne. *Przem. Ferm. Owoc.-Warzyw.*, 2020, 1-2, 43.
- [5] Caili F., Fen Y., Zeli C., Fanying X., Juan L.: Antioxidant activities of kombucha prepared from three different substrates and changes in content of probiotics during storage. *Food Sci. Technol.*, 2014, 34 (1), 123-126.
- [6] Coton M., Pawtowski A., Taminiau B., Burgaud G., Deniel F., Coulloumme-Labarthe L., Fall A., Daube G., Coton E.: Unraveling microbial ecology of industrial-scale Kombucha fermentations by metabarcoding and culture-based methods. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 2017, 93 (5), #fix048.
- [7] De Roos J., De Vuyst L.: Acetic acid bacteria in fermented foods and beverages. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 2018, 49, 115-119.
- [8] Greenwalt C.J., Ledford R.A., Steinkraus K.H.: Determination and characterization of the antimicrobial activity of the fermented tea kombucha. *Lebensm. Wiss. Technol.*, 1998, 31, 291-296.
- [9] Guttapadu S., Yang Z., Wiegner K.: Kombucha fermentation and its antimicrobial activity. *J. Agric. Food Chem.*, 2000, 48, 2589-2594.
- [10] Jakubowski R.: Kombucha – aspekty praktyczne i rynkowe. *Przem. Ferm. Owoc.-Warzyw.*, 2019, 1-2, 33-34.
- [11] Jayabalan R., Subathradevi P., Marimuthu S., Sathishkumar M., Swaminathan K.: Changes in free-radical scavenging ability of kombucha tea during fermentation. *Food Chem.*, 2008, 109 (1), 227-234.
- [12] Jinjin P., Wengang J., Abd El-Aty D., Xiaoying G., Hongxia Z., Jingzhang G., Lei J., Dejing C., Tianli Y.: Isolation, purification, and structural identification of a new bacteriocin made by *Lactobacillus plantarum* found in conventional kombucha. *Food Control*, 2020, 110, #106923.
- [13] Kapp M., Walton S.: Kombucha: A systematic review of the empirical evidence of human health benefit. *Annals of Epidemiology*, 2019, 30, 66-70.
- [14] Kerio L.C., Wachira F.N., Wanyoko J., Rotich M.: Total polyphenols, catechin profiles and antioxidant activity of tea products from purple leaf coloured tea cultivars. *Food Chem.*, 2013, 136 (3-4), 1405-1413.
- [15] Khosravi S., Safari M., Zahra E., Golmakani M.: Development of fermented date syrup using Kombucha starter culture. *J. Food Proc. Preserv.*, 2019, 43, #13872.
- [16] Lobo R.O., Dias F.O., Shenoy C.K.: Kombucha for healthy living: Evaluation of antioxidant potential and bioactive compounds. *Int. Food Res. J.*, 2017, 24 (2), 541-546.
- [17] Malbaša R., Lončar E., Vitas J.S., Čanadanović-Brunet J.: Influence of starter cultures on the antioxidant activity of Kombucha beverage. *Food Chem.*, 2011, 127, 1727-1731.
- [18] Marsh A., O'Sullivan O., Hill C., Ross P., Cotter D.: Sequence-based analysis of the bacterial and fungal compositions of multiple kombucha (tea fungus) samples. *Food Microbiology*, 2014, 38, 171-178.
- [19] Santos R.J., Batista R.A., Rodrigues S.A.: Antimicrobial activity of broth fermented with Kombucha colonies. *J. Microbial Biochem. Technol.*, 2009, 1(1), 072-078.
- [20] Saxe L.: Fermented Foods Are Up 149% - As Long As They're Unfamiliar. [on line]. *Forbes*, 2019. Dostęp w Internecie [06.02.2020]: <https://www.forbes.com/sites/lizzysaxe/2019/02/06/fermented-foods-are-up-149-percent-as-long-as-theyre-unfamiliar>

- [21] Singleton V., Orthofer R., Lamuela-Raventós R.: Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, 1999, 299, 152-178.
- [22] Steensels J., Daenen L., Malcorps P., Derdelinckx H., Verachtert H., Verstrepen K.: *Brettanomyces* yeasts – from spoilage organisms to valuable contributors to industrial fermentations. *Int. J. Food Microbiol.*, 2015, 206, 24-38.
- [23] Talawat S., Ahantharik P., Laohawiwattanukul S., Preamsuk A., Ratanapo S.: Efficacy of fermented teas in antibacterial activity. *Kasetsart J. Nat. Sci.*, 2006, 40, 925-933.
- [24] Teoh A.L., Heard G., Cox J.: Yeast ecology of Kombucha fermentation. *Int. J. Food Microbiol.*, 2004, 95 (2), 119-126.
- [25] Troitino C.: Kombucha 101: Demystifying the past, present and future of the fermented tea drink. [on line]. Forbes, 2017. Dostęp w Internecie [06.02.2020]: <https://www.forbes.com/sites/christinatroitino/2017/02/01/kombucha-101-demystifying-the-past-present-and-future-of-the-fermented-tea-drink/?sh=1247b07c4ae2>
- [26] Utoiu E., Matei F., Toma A., Diguta C., Ștefan L.M., Manoiu S., Vrajmasu V.V., Moraru I., Oancea A., Israel-Roming F., Cornea C.P., Constantinescu-Aruxandei D., Moraru A., Oancea F.: Bee collected pollen with enhanced health benefits, produced by fermentation with a kombucha consortium. *Nutrients*, 2018, 10 (10), #1365.
- [27] Villarreal-Soto S., Beaufort S., Bouajila J., Souchard J., Taillandier P.: Understanding Kombucha tea fermentation: A review. *J. Food Sci*, 2018, 83 (3), 580-588.
- [28] Vohra B., Fazry S., Sairi F., Babul-Airianah O.: Effects of medium variation and fermentation time on the antioxidant and antimicrobial properties of Kombucha. *Malaysian J. Fundam. Appl. Sci.*, 2019, 298-302.
- [29] Walkowiak-Tomczak D.: Wpływ dostępności tlenu i światła na stabilność antocyjanów w modelowych napojach aroniowych. *Nauka Przyr. Technol.* 2012, 6, 1-7.
- [30] Yongsheng C., Xiang M., Xiong F., Rian Y.: Phytochemical content, cellular antioxidant activity and antiproliferative activity of *Adinandra nitida* tea (Shiyacha) infusion subjected to *in vitro* gastrointestinal digestion. *RSC Adv.*, 2017, 7, 50430-50440.
- [31] Zafra-Rojas Q., Cruz-Cansino N., Ramírez-Moreno E., Delgado-Olivares L., Villanueva-Sánchez J., Alanís-García E.: Effects of ultrasound treatment in purple cactus pear (*Opuntia ficus-indica*) juice. *Ultrasonics Sonochemistry*, 2013, 20 (5), 1283-1288.

COMPARISON OF SELECTED MICROBIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL PARAMETERS OF KOMBUCHA DRINKS

S u m m a r y

The objective of the research study was to determine the level of some selected microorganisms in kombucha drinks available in retail trade and to compare the contents of polyphenols and anthocyanins in those drinks and their antioxidant potentials with a drink produced experimentally with the use of a traditional method. The research included 12 commercial drinks and one drink produced experimentally on the basis of green tea with 10 % of sucrose added. In the products studied, the following was determined: number of *Acetobacter* sp. bacteria, *Gluconobacter* sp., LAB and yeast, pH, total content of anthocyanins, total content of polyphenols and antioxidant activity. A diffusion method with small columns was applied to assess the antimicrobial activity of kombucha drinks in comparison to the reference strains: *E. coli* ATCC 35218, *Listeria monocytogenes* serotype 1/2a (KMSiFZC), *Yersinia enterocolitica* (PCM 1919),

Salmonella enteritidis (ATCC 130764), *Bacillus cereus* (PCM 2019), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Saccharomyces cerevisiae* (LOCK 14) and *Candida albicans* (KMSiFŽC). It was found that the beverages declared to be pasteurized (K7 - K12) were free of the microorganisms from the groups under analysis. In other commercial products the predominant microorganism was *Acetobacter* sp. bacteria and its number ranged $6 \times 10^6 \div 1.1 \times 10^7$ cfu/ml. In the experimentally produced drink the reported count of yeast cells was 6.5×10^5 cfu/g. The pH value of the products was specific and did not exceed 4.3. The content of anthocyanins in all the commercial drinks ranged $0.2 \div 0.3$ mg/dl, while in the experimental sample this value was more than twice as high. The content of polyphenols in and the antioxidant capacity of the samples varied and no correlation was found between them and the origin of the product. The presence of organic acids is the main factor to determine the capability of kombucha beverages to inhibit bacteria potentially pathogenic to humans. None of the tested beverages showed antagonism against the tested yeast.

Key words: kombucha, fermentation, SCOBY, antioxidant properties ☒