

Fermentuoto arbatos gėrimo (kombučios) kokybės įvertinimas

Vanesa Šliažaitė,

Aurelija Paulauskienė,

Aurimas Krasauskas

Vytauto Didžiojo universitetas,
Žemės ūkio akademija,
Studentų g. 11,
53361 Akademija, Kauno r., Lietuva
El. paštas vanesa.sliazaitė@vdu.lt

2018–2019 m. Aleksandro Stulginskio universitete (nuo 2019 m. Vytauto Didžiojo universiteto Žemės ūkio akademijoje) buvo atlikti juodosios, žaliosios, ulongo ir puero arbatų kombučių fermentacijos tyrimai kambario šviesoje ir tamsoje. Buvo pagamintos kombučios, naudojant simbiotinę mielių ir bakterijų kultūrą. Kombučios šviesoje ir tamsoje fermentuotos devynias ir 22 paras. 22 paras fermentuotose arbatose nustatytas tirpių sausųjų medžiagų kiekis, aktyvusis ir titruojamasis rūgštingumas, devynias paras fermentuotose arbatose – bendrasis fenolinių junginių kiekis, antioksidacinis aktyvumas, mielių kolonijų skaičius ir atliktas arbatų kombučių juslinis vertinimas.

Tyrimų rezultatai parodė, kad fermentuotų arbatų kombučių kokybė priklausė nuo arbatos rūšies, o fermentacijos sąlygos esminės reikšmės neturėjo. Fermentacijos metu tirpių sausųjų medžiagų kiekis kombučiose sumažėjo vidutiniškai 0,60 %, o acto rūgšties kiekis padidėjo 0,34 %. Daugiausia acto rūgšties nustatyta 22-ą fermentacijos parą visų rūšių arbatų kombučiose. Fermentacijos metu visų tirtų rūšių arbatų kombučių aktyvusis rūgštingumas (pH) iš esmės sumažėjo. Bendrasis fenolinių junginių kiekis visų rūšių arbatų kombučiose padidėjo nuo 20 iki 57 %, nepriklausomai nuo fermentacijos sąlygų. Didžiausias bendrasis fenolinių junginių kiekis nustatytas devynias paras fermentuotose arbatose. Antioksidacinis arbatų kombučių aktyvumas per devynias paras pakito skirtingai, priklausomai nuo fermentavimo sąlygų: juodosios ir žaliosios arbatų kombučių, fermentuotų šviesoje, – sumažėjo; ulongo ir puero arbatų, fermentuotų tamsoje, – padidėjo. Fermentacijos metu visų arbatų mėginiuose mielių kolonijų skaičius didėjo. Geriausiomis juslinėmis savybėmis pasižymėjo puero arbatos kombučia (11,4 balų).

Raktažodžiai: *Camellia sinensis* L., cheminė sudėtis, fermentacija, juslinė analizė, mielių kolonijos

ĮVADAS

Pastaruoju metu maistu domimasi ne tik kaip energiją teikiančiu šaltiniu, bet ir kaip natūralia įvairių ligų prevencijos priemone. Pasirinkę sveikesnį gyvenimo būdą, vartotojai ieško natūralių, gydymosiomis savybėmis pasižyminčių produktų. Šiais laikais kuriami vis nauji produktai, papildyti biologiškai aktyviais junginiais, tačiau dalis žmonių iš naujo atranda tai, kas buvo vartojama anksčiau, tik tinkamai neįvertinta. Vienas tokių produktų – seniai žinoma, bet ne itin išpopuliarėjusi,

mikroorganizmais fermentuota arbata – kombučia, kuri Lietuvoje dar vadinama arbatos grybu. Tai gaivinantis, aštroko skonio gėrimas, mėgstamas dėl specifinio skonio ir naudos sveikatai. Kombučia fermentuojama naudojant specialius mikroorganizmus – kombučios bakterijų ir mielių kultūrą (grybą). Paruošiama saldi arbatžolių *Camellia sinensis* L. arbata, kuri optimaliomis sąlygomis fermentuojama specifine kombučios kultūra. Po savaitės gaunamas gėrimas, kuris yra ne tik gaivinantis ir skanus, bet taip pat gerina virškinimo sistemos darbą, saugo nuo širdies ir kraujagyslių ligų,

vėžinių susirgimų (Jayabalan et al., 2014). Nors gali atrodyti, kad gamyboje naudojamas nemažas cukraus kiekis yra žalingas ir nepriimtinas, tačiau fermentacijos metu beveik visą cukrų kombučios mikroorganizmai suskaido į organines rūgštis (didžiausią dalį sudaro acto rūgštis), taip pat į vitaminus, aktyviuosius fermentus ir daugelį kitų cheminių junginių (Reiss, 1994; Petrovska, Tozi, 2001; Malbaša et al., 2002). Tokia fermentuota arbata veikia kaip probiotikas, gerinantis žarnyno mikroflorą. Ji turi įtakos virškinimo trakto darbui, stiprina imuninę sistemą. Kombučioje aptinkami unikalūs mikroorganizmai, pavyzdžiui, *Gluconacetobacter kombuchae* ir *Zygosaccharomyces kombuchaensis*. Kartu su *Acetobacter*, *Saccharomyces* ir *Lactobacillus* mikroorganizmų rūšimis jie papildo kombučios gėrimą naudingomis medžiagomis (Wolfe, Dutton, 2016). Organinės rūgštys, kurias pagamina šie mikroorganizmai, reguliuoja skrandžio rūgštingumą, kas ypač svarbu baltymų virškinimui. Kombučioje susidaranti gliukono rūgštis susijungia su organizme esančiais toksinais ir taip padeda juos lengviau pašalinti (Jayabalan et al., 2014). Fermentuotoje arbatoje yra įvairių fenolinių junginių, kuriems įtakos turi arbatžolių paruošimo būdas. Žaliojoje arbatoje randama daugiau katechinų, juodojoje – daugiau teaflavinų ir tearubiginų, kurių pirmtakai yra katechinai (Jayasekera et al., 2011; Rains et al., 2011). Fenoliniai junginiai turi antioksidacinių, antivirusinių, priešvėžinių savybių, taip pat padeda sumažinti per didelį MTL (mažio tankio lipoproteinų) cholesterolio kiekį organizme ir apsaugoti nuo širdies ir kraujagyslių ligų, neurologinių sutrikimų, pavyzdžiui, Alzheimerio ligos (Patel et al., 2007; Boris et al., 2009; Popkin, 2010).

Kombučios gėrimų jau galima rasti įvairiose prekybos vietose, specializuotuose kombučios gėrimo baruose. Gaminant nepasterizuotą kombučios gėrimą, jo kokybę kiekvieną kartą gali skirtis. Pagrindiniai fermentacijos veiksniai yra naudojamų mikroorganizmų kokybė, arbatos rūšis ir kokybė, cukraus kiekis, fermentacijos laikas ir temperatūra (Chu, Chen, 2006; Jayabalan et al., 2007). Kokybė yra svarbi vartotojui, pasirinkusiam sveiką gėrimą. Būtina atlikti kuo daugiau kombučios kokybės tyrimų, kad būtų galima vartotojus informuoti, kas lemia gėrimo kokybę: kokia tinkama žaliava ir jos geografinė kilmė, kokia optimaliausia fermentacija.

Tyrimo tikslas – išanalizuoti kombučių, pagamintų iš skirtingų rūšių arbatų (juodosios, žaliosios, ulongo ir puero), biocheminę sudėtį, mikroorganizmų veiklos pokyčius ir atlikti juslinį kombučių vertinimą.

TYRIMŲ METODAI IR SĄLYGOS

Arbatų kombučių biocheminės sudėties tyrimai buvo atlikti 2018–2019 m. Aleksandro Stulginskio universitete (nuo 2019 m. Vytauto Didžiojo universiteto Žemės ūkio akademijoje).

Kombučios gamintos iš skirtingų rūšių *Camellia sinensis* L. arbatžolių, įsigytų specializuotose parduotuvėse: 1) juodoji arbata „Feng Qing Ye Sheng Hong Cha“ – 2018 m. pavasario derliaus laukinių arbatmedžių purpurinė juodoji arbata; 2) žalioji arbata „Purpurinis grožis“ – 2018 m. pavasario derliaus iš Junano provincijos Lancango miesto; 3) ulongo arbata „Osmanthus Oolong“ (arbatos alyvmedžio žiedlapiai); 4) puero arbata iš Junano provincijos.

Kombučios pradinė kultūra – simbiotinė mielių ir bakterijų kultūra, gauta iš pramoniniu būdu pagaminto nepasterizuoto kombučios gėrimo, kuris metus buvo laikytas aerobinėmis sąlygomis, kad susidarytų bakterinė celiuliozė.

Gėrimui buvo naudojamas baltasis cukrus, pagamintas iš ekologiškai užaugintų cukranendrių.

Kombučios arbata buvo gaminta pagal J. Reisso (1994) pateiktą metodiką: 8 g arbatos lapelių buvo užpilti 1 l verdančio distiliuoto vandens ir ekstrahuoti 10 min. Po ekstrakcijos arbata filtruota per nerūdijančio plieno sietelį, atskirtos arbatžolės ir į ekstraktą įdėta 100 g cukraus. 300 ml atvėsusios iki 25 °C temperatūros arbatos supilta į švarias, sterilizuotas 500 ml talpos kolbas. Į paruoštą arbatą įpilta 100 ml kombučios bakterijų kultūros ir įdėtas 30 g celiuliozės sluoksnis. Kolbos uždarytos vatos kamščiais. Paruošti aštuoni arbatos mėginiai fermentuoti 20 ± 3 °C temperatūroje, keturi – šviesoje (patalpoje esant natūraliam apšvietimui be tiesioginių saulės spindulių), dar keturi – tamsoje (patalpoje, spintoje).

Kombučios tradiciškai fermentuojamos 7–10 parų. Siekiant išsiaiškinti, kaip pasikeičia gėrimo rūgštingumas priklausomai nuo fermentavimo laiko, pirmą, ketvirtą, devintą ir 22 fermentacijos parą buvo nustatyta tirpios sausosios medžiagos, aktyvusis rūgštingumas ir titruojamasis rūgštingumas.

Bendrasis fenolinių junginių kiekis ir antioksidacinis aktyvumas nustatyti įprastą laiką fermentuotose arbatose, t. y. pirmą, ketvirtą ir devintą fermentacijos parą.

Cheminėms analizėms iš kiekvienos kolbos buvo paimta po tris laboratorinius mėginius.

Tirpios sausosios medžiagos nustatytos skaitmeniniu refraktometru PAL-1 (Atago, Japonija) (LST ISO 2173:2004). Aktyvusis rūgštingumas (pH) nustatytas potenciometrinio metodu pH matuokliu (Eutech Instruments, JAV), titruojamasis rūgštingumas – titruojant mėginius 0,1 N NaOH, gauti rezultatai perskaičiuoti į acto rūgštį (LST ISO 750:2000).

Bendras fenolinių junginių kiekis nustatytas Folin-Ciocalteu metodu (Waterhouse, 2002). Ekstraktui paruošti pasvertas 1 g mėginio (kombučios), atskiestas 10 ml 75 % vandeniniu etanolio tirpalu ir ekstrahuotas 1 val. Po ekstrakcijos mėginys nufiltruotas. 0,2 ml tiriamo ekstrakto skiesta 5 ml distiliuoto vandens, sumaišyta su 0,2 ml darbinio Folin-Ciocalteu reagento (skiesto ultrašvari vandeniu 1 : 9) ir po 6 min. įpilta 1 ml 20 % natrio karbonato. Gautas mišinys laikytas 30 min. kambario temperatūroje. Spektrofotometru išmatuota tiriamo mėginio absorbcija esant 765 nm bangos ilgiui. Matuota pagal paruoštą galo rūgšties kalibracinę kreivę. Bendras fenolinių junginių kiekis išreikštas galo rūgšties ekvivalentais naudojant formulę:

$$\text{GRE} = [c (V/m)] / 1000 (\mu\text{g ml}^{-1}); \quad (1)$$

c – galo rūgšties koncentracija ($\mu\text{g ml}^{-1}$) nustatyta iš kalibracinės kreivės; V – ekstrakto tūris (ml); m – tikslus pasvertos žaliavos kiekis (g).

Arbatų antioksidacinis aktyvumas nustatytas DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazilo hidrato) radikalų surišimo metodu. Paruoštas mėginys iš 0,05 ml tiriamos kombučios arbatos, sumaišytas su 7,95 ml metanolio ir 1,20 ml DPPH reagento. Tuščias mėginys paruoštas naudojant metanolį. Spektrofotometru išmatuota mėginių absorbcija esant 517 nm bangos ilgiui. Antioksidacinis aktyvumas apskaičiuotas pagal formulę:

$$\text{DPPH} = [(A_0 - A_m) / A_0] \times 100 \%; \quad (2)$$

A_0 – tuščio mėginio absorbcija; A_m – tiriamojo mėginio absorbcija (Yen, Chen, 1995).

Mikrobiologiniai tyrimai buvo atlikti pagal standartą (LST ISO 7954:1998E). Mielėms auginati naudota OGYE (Oxytetra Glucose Yeast) agar maitinamoji terpė, kuri buvo išpilstyta į Petri lėkšteles. Mielių kolonijų kiekiui nustatyti pirmiausia buvo paruoštos pradinės suspensijos, iš jų – mėginiai tyrimams: pirmą parą 1 ml suspensijos skiesta iki 10^{-2} , ketvirtą – iki 10^{-4} ir devintą – iki 10^{-5} . Paruoštas 0,1 ml mėginys adatele paskleistas ant maitinamosios terpės Petri lėkštelėje. Mielių kolonijos auginamos 28 °C temperatūroje, skaičiavimai atlikti praėjus vienai parai ir po keturių bei devynių parų.

Mikroskopinei nuotraukai paruoštas fiksuotas dažytas preparatas. Nuotrauka daryta optiniu mikroskopu DM750 (Leica Microsystems GmbH, Vokietija) su ICC50 HD kamera, didinimas – 1000x.

Juslinei analizei pateikti devynias paras tamsoje fermentuotos kombučios mėginiai (juodosios, žaliosios, ulongo, puero). Kombučių juslines savybes (skonį, kvapą ir prekinę išvaizdą) vertino septyniolika vertintojų, buvo naudojama 5 balų hedoninė skalė, rezultatai vertinti taip: 1 – visiškai nepriimtina, 2 – nepriimtina, 3 – vidutiniškai priimtina, 4 – priimtina, 5 – labai priimtina.

Tyrimų rezultatai apdoroti naudojant statistinės analizės kompiuterinę programą STATISTICA 10 ir MS Excel 2013. Apskaičiuoti duomenų aritmetiniai vidurkiai ir standartiniai nuokrypiai. Statistinis patikimumas tarp duomenų vertintas Fišerio LSD testu. Skirtumai statistiškai patikimi, kai $p \leq 0,05$ (Sakalauskas, 2003).

REZULTATAI IR DISKUSIJA

Titruojamasis rūgštingumas ir tirpios sausosios medžiagos. Kombučioje dominuoja acto rūgštis, kitos organinės rūgštys sudaro labai mažą dalį bendrojo organinių rūgščių kiekio, todėl gauti rezultatai buvo perskaičiuoti į acto rūgštį. Į arbatų kombučias prieš fermentaciją buvo įdėta papildomai cukraus, reikalingo mikroorganizmams (naudoja organinių rūgščių sintezei). Stebint cukraus ir acto rūgšties pokyčius, buvo atlikta ir tirpių sausųjų medžiagų analizė.

Atlikus tyrimus gauta, kad per devynias fermentacijos paras tirpių sausųjų medžiagų kiekis kombučiose sumažėjo vidutiniškai 0,39 proc. vieneto, o acto rūgšties kiekis padidėjo 0,09 proc. vieneto (1 lentelė). Po 22 fermentacijos parų

1 lentelė. Kombučios acto rūgšties ir tirpių sausųjų medžiagų kiekiai %

Table 1. Acetic acid and soluble solids content % of kombucha

Arbatos rūšis Tea	Fermentacijos sąlygos Conditions for fermentation	1 para / 1 day		4 paros / 4 days		9 paros / 9 days		22 paros / 22 days	
		Acto rūgštis Acetic acid	Tirpios sausios medžiagos Soluble solids	Acto rūgštis Acetic acid	Tirpios sausios medžiagos Soluble solids	Acto rūgštis Acetic acid	Tirpios sausios medžiagos Soluble solids	Acto rūgštis Acetic acid	Tirpios sausios medžiagos Soluble solids
Juodoji Black	Šviesa / Light	0,07a	9,40g	0,13b	9,40g	0,18e	8,93c	0,29f	8,63a
	Tamsa / Dark	0,07a	9,30f	0,14c	9,20e	0,16d	9,10d	0,31g	8,73b
Žalioji Green	Šviesa / Light	0,11a	8,90c	0,16c	9,20d	0,20e	9,20d	0,55g	8,73b
	Tamsa / Dark	0,11a	9,57e	0,14b	9,13d	0,17d	8,80b	0,42f	8,57a
Ulongo Oolong	Šviesa / Light	0,09a	9,40e	0,17c	9,30e	0,24f	9,10c	0,39g	8,93b
	Tamsa / Dark	0,09a	9,40e	0,15b	9,30e	0,18e	9,07c	0,40h	8,87a
Puero Pu-erh	Šviesa / Light	0,07a	9,60e	0,13d	9,40d	0,15e	9,20c	0,30f	8,83a
	Tamsa / Dark	0,07a	9,57e	0,14d	9,40d	0,12c	9,40d	0,19b	8,97b

Pastaba: esminiai skirtumai (kai $p < 0,05$) tarp tos pačios rūšies arbatų, fermentuotų įvairiomis sąlygomis (šviesa, tamsa) ir konkretų laiką (1, 4, 9 ir 22 paros), pažymėti skirtingomis abėcėlės raidėmis.

Note: Significant differences ($p < 0.05$) between the same type of tea fermented under different conditions (light, dark) and different time (1, 4, 9, 22 days) are indicated by different letters.

tirpių sausųjų medžiagų kiekis buvo mažesnis dar 0,21 proc. vieneto, o acto rūgšties – didesnis 0,17 proc. vieneto. Gauti rezultatai patvirtina R. Jayabalano ir kt. mokslininkų (2014) teiginius, kad acto rūgšties bakterijos gliukozę suskaido iki acto rūgšties per tarpinius produktus.

Daugiausia acto rūgšties visų rūšių arbatų kombučiose nustatyta 22-ą fermentacijos parą. Didžiausias acto rūgšties kiekis rastas šviesoje ir tamsoje fermentuotoje žaliojoje kombučioje, mažiausias – tiek šviesoje, tiek ir tamsoje fermentuotoje puero kombučioje.

Kombučios aktyvūs rūgštingumas (pH). Kombučios aktyvūs rūgštingumas priklauso nuo įvairių veiksnių: parinktų žaliavų savybių, mikroorganizmų kultūros ir fermentacijos laiko. Mikroorganizmai turi didelės reikšmės cheminių junginių pokyčiams, kadangi jie ne tik suskaido ir pagamina organinius junginius iš pradinių žaliavų (4, 9 ir 22 paros), tačiau skaido ir vieni kitų metabolitus (Jayabalan et al., 2014). Todėl įvairių rūšių kombučios rūgštingumo dinamika gali būti skirtinga.

Fermentacijos metu visų tirtų rūšių arbatų kombučių aktyvūs rūgštingumas kito. Nustaty-

ta, kad ilgėjant fermentacijos laikui pH reikšmės iš esmės sumažėjo (2 lentelė). Gauti rezultatai patvirtina H. Amarasinghe ir kt. (2018) rezultatus. Maža pH reikšmė, t. y. rūgštinė aplinka, sudaro tinkamas sąlygas kombučios mikroorganizmų kultūrai vystytis, nes mielių kolonijų skaičius fermentacijos metu didėja. Per devynias fermentacijos paras kombučių pH pokytis buvo esminis, išskyrus šviesoje fermentuotos žaliosios arbatos. Didžiausias pH reikšmės pokytis buvo nustatytas 22-ą fermentacijos parą. Pastebėta bendra tendencija, kad po 22 parų fermentacijos mažesnės pH reikšmės buvo šviesoje fermentuotų kombučių, išskyrus žaliosios arbatos. Didžiausi pH pokyčiai buvo 22 paras šviesoje fermentuotos puero arbatos kombučios, o mažiausi – ulongo arbatos, fermentuotos tamsoje.

Bendras fenolinių junginių kiekis ir antioksidacinis aktyvumas. *Camellia sinensis* arbatmedžio lapeliai naudojami gaminant įvairių rūšių arbatas. Jie skirtingai apdorojami ir turi įtakos fenolinių junginių kiekiui arbatose (Jayabalan et al., 2007; Rains et al., 2011; Amarasinghe et al., 2018). Didžiausią fenolinių junginių dalį arbatoje sudaro flavanoidų grupės junginiai – katechinai,

2 lentelė. Kombučios aktyvusis rūgštingumas (pH)

Table 2. Active acidity (pH) of kombucha

Arbatos rūšis Tea	Fermentacijos sąlygos Conditions for fermentation	1 para 1 day	4 paros 4 days	9 paros 9 days	22 paros 22 days
Juodoji Black	Šviesa / Light	3,34h	3,32g	3,28e	2,98a
	Tamsa / Dark	3,31f	3,23d	3,19c	3,02b
Žalioji Green	Šviesa / Light	3,27e	3,22c	3,28e	2,89b
	Tamsa / Dark	3,29f	3,26d	3,22c	2,78a
Ulongo Oolong	Šviesa / Light	3,19d	3,17c	3,08b	3,00a
	Tamsa / Dark	3,32g	3,30f	3,20e	3,30f
Puero Pu-erh	Šviesa / Light	3,42h	3,26d	3,27e	2,82a
	Tamsa / Dark	3,37g	3,22c	3,29f	3,01b

Pastaba: esminiai skirtumai (kai $p < 0,05$) tarp tos pačios rūšies arbatų, fermentuotų įvairiomis sąlygomis (šviesa, tamsa) ir konkrečių laiką (1, 4, 9 ir 22 paros), pažymėti skirtingomis abėcėlės raidėmis.

Note: Significant differences ($p < 0.05$) between the same type of tea fermented under different conditions (light, dark) and different time (1, 4, 9, 22 days) are indicated by different letters.

teافلavinai ir tearubiginai (Jayabalan et al., 2007; Srihari, Satyanarayana, 2012).

Bendrasis fenolinių junginių kiekis visų rūšių arbatų kombučiose fermentacijos metu padidėjo

nuo 20 iki 57 %, nepriklausomai nuo fermentacijos sąlygų (3 lentelė). Statistinė analizė parodė, kad fermentacijos sąlygos (šviesa, tamsa) fenolinių junginių sintezei esminės įtakos neturėjo.

3 lentelė. Kombučios bendrasis fenolinių junginių kiekis ir antioksidacinis aktyvumas

Table 3. The total amount of phenolic compounds and antioxidant activity of kombucha

Arbatos rūšis Tea	Fermentacijos sąlygos Conditions for fermentation	1 para / 1 day		4 paros / 4 days		9 paros / 9 days	
		Bendrasis fenolinių junginių kiekis Total phenolic content, GRE $\mu\text{g } 100 \text{ ml}^{-1}$	Antioksidacinis aktyvumas Antioxidant activity, %	Bendrasis fenolinių junginių kiekis Total phenolic content, GRE $\mu\text{g } 100 \text{ ml}^{-1}$	Antioksidacinis aktyvumas Antioxidant activity, %	Bendrasis fenolinių junginių kiekis Total phenolic content, GRE $\mu\text{g } 100 \text{ ml}^{-1}$	Antioksidacinis aktyvumas Antioxidant activity, %
Juodoji Black	Šviesa / Light	108,1a	31,4cd	115,5a	26,9c	133,1ab	13,5a
	Tamsa / Dark	102,1a	30,5c	116,8a	36,0d	160,1b	20,0b
Žalioji Green	Šviesa / Light	243,8a	80,3d	288,4bc	68,7b	314,4d	65,3a
	Tamsa / Dark	249,7a	69,4b	281,0b	69,8b	303,2cd	76,2c
Ulongo Oolong	Šviesa / Light	179,1a	63,9b	198,8bc	56,2a	234,8e	65,6bc
	Tamsa / Dark	183,0ab	53,5a	209,0cd	69,0c	219,9de	64,9b
Puero Pu-erh	Šviesa / Light	106,2a	29,3cd	121,8b	27,9bc	132,4bc	27,4bc
	Tamsa / Dark	105,1a	25,3ab	123,5b	23,5a	143,1c	31,7d

Pastaba: esminiai skirtumai (kai $p < 0,05$) tarp tos pačios rūšies arbatų, fermentuotų įvairiomis sąlygomis (šviesa, tamsa) ir konkrečių laiką (1, 4 ir 9 paros), pažymėti skirtingomis abėcėlės raidėmis.

Note: Significant differences ($p < 0.05$) between the same type of tea fermented under different conditions (light, dark) and different time (1, 4, 9 days) are indicated by different letters.

Didžiausi fenolinių junginių kiekiai nustatyti devynias paras fermentuotose arbatose, daugiausia šių junginių buvo žaliosios arbatos kombučioje.

Atlikus tyrimus didžiausias antioksidacinis aktyvumas nustatytas žaliosios arbatos kombučios, devynias paras fermentuotos tamsoje, – 76,2 % (3 lentelė). Juodosios ir žaliosios arbatų kombučių, fermentuotų tamsoje, antioksidacinis aktyvumas buvo didesnis, palyginti su arbatomis, fermentuotomis šviesoje. Šias arbatas fermentuojant šviesoje, jų antioksidacinis aktyvumas per devynias paras sumažėjo. Ulongo arbatos antioksidacinis aktyvumas per devynias paras padidėjo nepriklausomai nuo fermentacijos sąlygų. Puero arbatos, fermentuotos devynias paras tamsoje, antioksidacinis aktyvumas, palyginti su kitomis arbatomis, padidėjo daugiausia – apie 25 %. Mažiausia radikalų surišimo geba pasižymėjo juodosios arbatos kombučia, jos antioksidacinis aktyvumas fermentacijos metu sumažėjo.

Pagal antioksidacinį aktyvumą mažėjimo tvarka tirtas arbatų kombučias galima išdėstyti taip: žalioji > ulongo > puero > juodoji. Vartojant kombučios gėrimą kaip antioksidacinėmis savybėmis pasižymintį produktą tikslinga būtų rinktis žaliosios arbatos kombučią nepriklausomai, ar arbata buvo fermentuota šviesoje, ar tamsoje.

Mielių kolonijų skaičius. Remiantis mokslinės literatūros šaltiniais (Mayser et al., 1995;

Jayabalan et al., 2014) nustatyta, kad tirtos kombučių mielių gentys yra *Dekkera* (*Brettanomyces*) *bruxellensis*. Jos gali daugintis rūgščioje aplinkoje ir esant didelei etanolio koncentracijai. Šios mielių rūšys yra osmotolerantiškos ir puikiai pritaiko prie fermentacijos proceso (Mayser et al., 1995; Teoh et al., 2004). Mielių kolonijos Petri lėkštelėse parodytos nuotraukoje (1 pav.).

Tyrimo rezultatai atskleidė, kad fermentacijos metu visų arbatų mėginiuose mielių daugėjo (4 lentelė). Esminis mikroorganizmų skaičiaus padidėjimas nustatytas devintą parą šviesoje fermentuotose juodosios ir žaliosios arbatos kombučiose, o ulongo ir puero arbatų kombučiose – jau ketvirtą fermentacijos parą. Visose arbatose, fermentuotose šviesoje, mikroorganizmų skaičius buvo iš esmės didesnis.

Didžiausias mikroorganizmų kolonijų skaičius nustatytas juodojoje arbatoje, fermentuotoje šviesoje (2 pav., 4 lentelė). Lyginant su tamsoje fermentuota arbata, mikroorganizmų kolonijų skaičius buvo didesnis net 10 kartų.

Mokslinėje literatūroje yra minima, kad kombučios viršuje susidarantis bioceliuliozės sluoksnis apsaugo terpę ir joje esančius mikroorganizmus nuo UV spinduliuotės (Dima et al. 2017; Gomes et al., 2018). Todėl fermentuojant kombučias apšviestoje, be tiesioginių saulės spindulių, vietoje, puikiai dauginasi mielės.



1 pav. Juodosios arbatos (JT) kombučios (fermentuotos tamsoje) mielių kolonijos Petri lėkštelėse. Autorės nuotr.

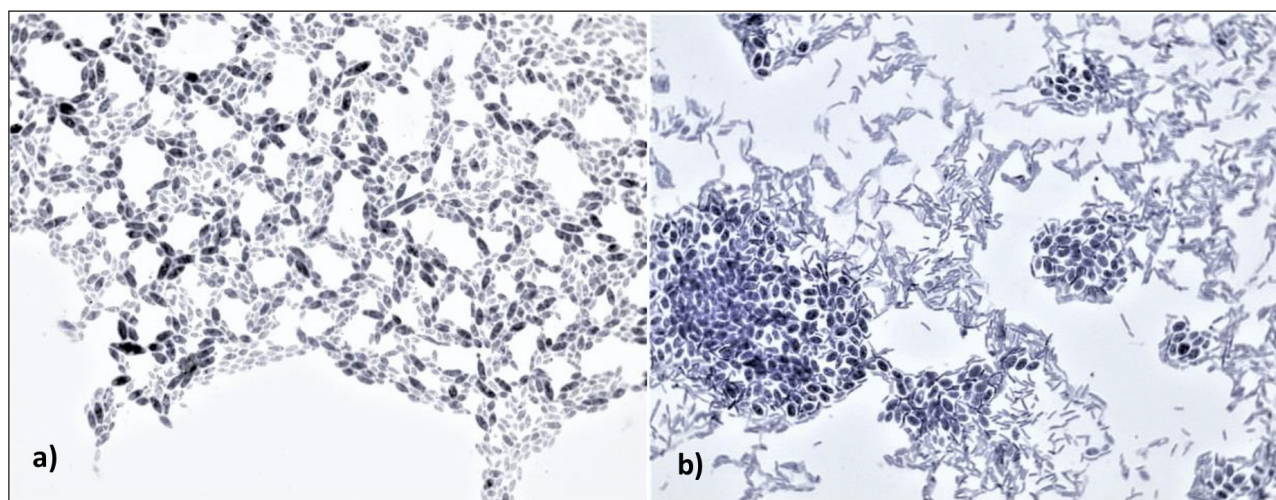
Fig. 1. Photo of the number of yeast colony forming units of black tea kombucha (fermented in the dark) on Petri dishes (author V. Šliažaitė)

4 lentelė. Kombučios mielių kolonijų skaičius KSV ml⁻¹Table 4. Number of kombucha yeast colonies, CFU ml⁻¹

Arbatos rūšis Tea	Fermentacijos sąlygos Conditions for fermentation	1 para / 1 day	4 paras / 4 days	9 paras / 9 days
Juodoji Black	Šviesa / Light	1,171 · 10 ⁶ a	6,200 · 10 ⁶ a	134,000 · 10 ⁶ b
	Tamsa / Dark	0,561 · 10 ⁶ a	1,967 · 10 ⁶ a	13,000 · 10 ⁶ a
Žalioji Green	Šviesa / Light	0,541 · 10 ⁶ a	3,567 · 10 ⁶ a	83,333 · 10 ⁶ c
	Tamsa / Dark	0,877 · 10 ⁶ a	5,833 · 10 ⁶ a	47,333 · 10 ⁶ b
Ulongo Oolong	Šviesa / Light	1,253 · 10 ⁶ a	6,200 · 10 ⁶ b	35,800 · 10 ⁶ d
	Tamsa / Dark	1,350 · 10 ⁶ a	6,100 · 10 ⁶ b	26,333 · 10 ⁶ c
Puero Pu-erh	Šviesa / Light	1,020 · 10 ⁶ ab	6,233 · 10 ⁶ c	16,333 · 10 ⁶ d
	Tamsa / Dark	0,825 · 10 ⁶ a	5,367 · 10 ⁶ bc	7,000 · 10 ⁶ c

Pastaba: esminiai skirtumai (kai $p < 0,05$) tarp tos pačios rūšies arbatų, fermentuotų įvairiomis sąlygomis (šviesa, tamsa) ir konkrečių laiką (1, 4 ir 9 paras), pažymėti skirtingomis abėcėlės raidėmis.

Note: Significant differences ($p < 0.05$) between the same type of tea fermented under different conditions (light, dark) and different time (1, 4, 9 days) are indicated by different letters.



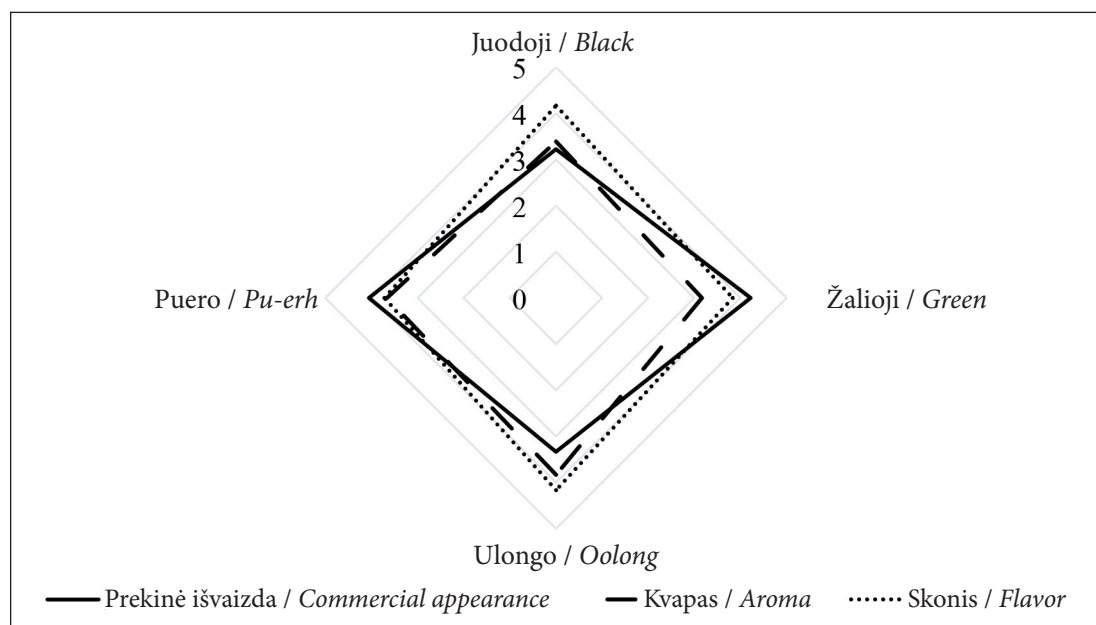
2 pav. Juodosios arbatos kombučios mikroorganizmų kiekio pokytis šviesoje: a – pirmą fermentacijos parą, b – devintą fermentacijos parą (optinio mikroskopo nuotrauka, didinimas 1000x)

Fig. 2. The change in the number of microorganisms in black tea kombucha multiplication in the light: (a) the first day of fermentation, b) the ninth day of fermentation (the optical microscope image, magnification 1000x)

Juslinė analizė. Dauguma vartotojų kombučią apibūdina kaip obuolių sidrą primenantį gėrimą, tačiau skonis, kvapas ir kiti jusliniai kriterijai labai priklauso nuo fermentacijos pradinių žaliavų ir sąlygų. Trumpa fermentacija lems, kad liks didelis cukraus kiekis ir vyraus saldus skonis. Jeigu fermentacija per ilga – pasigamins daug acto rūgšties, kuri suteiks stiprų, rūgštų ir nemalonų acto skonį bei kvapą. Fermentacijos metu

taip pat pakinta produkto spalva – arbata šviesėja, tačiau susidrumsčia, tampa mažiau skaidri (Jayabalan et al., 2007).

Geriausia buvo įvertinta žaliosios arbatos kombučios prekinė išvaizda (4,2 balo), ulongo ir puero arbatų kvapas (po 3,8), juodosios ir ulongo arbatų skonis (po 4,2) (3 pav.). Daugiausia juslinio vertinimo balų surinko puero arbatos kombučia (11,4).



3 pav. Kombučių juslinis įvertinimas balais
Fig. 3. Sensory assessment of kombucha in points

IŠVADOS

1. Tyrimų rezultatai parodė, kad fermentuotų arbatų kombučių kokybė, t. y. jų biocheminė sudėtis, priklausė nuo arbatos rūšies, o fermentacijos sąlygos esminės reikšmės neturėjo.

2. Fermentacijos metu tirpių sausųjų medžiagų kiekis kombučiose sumažėjo vidutiniškai 0,60 proc. vieneto, o acto rūgšties – padidėjo 0,26 proc. vieneto. Daugiausia acto rūgšties nustatyta 22-ą fermentacijos parą visų rūšių arbatų kombučiose.

3. Fermentuojant visų tirtų rūšių arbatų kombučių aktyvusis rūgštingumas (pH) iš esmės sumažėjo. Didžiausias pH reikšmės pokytis buvo nustatytas 22-ą fermentacijos parą.

4. Bendrasis fenolinių junginių kiekis visų rūšių arbatų kombučiose fermentacijos metu padidėjo nuo 20 iki 57 %, nepriklausomai nuo fermentacijos sąlygų. Didžiausias bendrasis fenolinių junginių kiekis nustatytas devynias paras fermentuotose arbatose.

5. Antioksidacinis arbatų kombučių aktyvumas priklausė nuo arbatos rūšies ir fermentavimo sąlygų. Didžiausias antioksidacinis aktyvumas nustatytas devynias paras tamsoje fermentuotos žaliosios arbatos kombučios – 76,2 %.

6. Fermentacijos metu visų arbatų mėginiuose mielių kolonijų padaugėjo. Visose arbatose, fer-

mentuotose šviesoje, mikroorganizmų skaičius buvo iš esmės didesnis.

7. Geriausiomis juslinėmis savybėmis pasižymėjo puero arbatos kombučia, vertinant ji surinko daugiausia balų (11,4).

Gauta 2019 11 18
 Priimta 2020 03 13

LITERATŪRA

1. Amarasinghe H., Weerakkody N. S., Waisundara V. 2018. Evaluation of physicochemical properties and antioxidant activities of kombucha 'Tea Fungus' during extended periods of fermentation. *Food Science and Nutrition*. Vol. 6. Issue 3. P. 659–665.
2. Boris K., Nir G., Amos D., Korczyn H. 2009. Smoking and tea consumption delay onset of Parkinson's disease. *Parkinsonism and Related Disorders*. Vol. 15. Issue 1. P. 41–46 [žiūrėta 2019-03-21]. Prieiga per internetą: <https://www.sciencedirect.com/>
3. Chu S.-C., Chen C. 2006. Effect of origins and fermentation time on the antioxidant activities of kombucha. *Food Chemistry*. Vol. 98. Issue 3. P. 502–507 [žiūrėta 2019-03-22]. Prieiga per internetą: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814605005364>
4. Dima S. O., Panaitescu D. M., Orban C., Ghiurea M., Doncea S. M., Fierascu R. C., Nistor C. L., Alexandrescu E., Nicolae C. A., Trică B., Moraru A., Oancea F. 2017. Bacterial nanocellulose from side-streams of kombucha beverages production: Preparation and physical-chemical properties.

- Polymers*. Vol. 9. Issue 8. P. 374 [žiūrėta 2019-02-10]. Prieiga per internetą: <https://www.mdpi.com/>
5. Gomes R. J., Borges M. F., Rosa M. F., Gómez C. R. J. H., Spinosa W. A. 2018. Acetic acid bacteria in the food industry: Systematics, characteristics and applications. *Food Technology and Biotechnology*. Vol. 56. Issue 2. P. 139–151. [žiūrėta 2019-03-18]. Prieiga per internetą: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30228790>
 6. Yen G. C., Chen H. Y. 1995. Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. Vol. 43. Issue 1. P. 27 [žiūrėta 2018-11-26]. Prieiga per internetą: <https://doi.org/10.1021/jf00049a007>
 7. Jayabalan R., Malbaša R. V., Lončar E. S., Vitas J. S., Sathishkumar M. 2014. A Review on kombucha tea – microbiology, composition, fermentation, beneficial effects, toxicity, and tea fungus. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. Vol. 13. Issue 4. P. 538–550 [žiūrėta 2019-02-20]. Prieiga per internetą: <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12073>
 8. Jayabalan R., Marimuthu S., Swaminathan K. 2007. Changes in content of organic acids and tea polyphenols during kombucha tea fermentation. *Food Chemistry*. Vol. 102. Issue 1. P. 392–398 [žiūrėta 2019-02-21]. Prieiga per internetą: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.05.032>
 9. Jayasekera S., Molan A. L., Garg M., Moughan P. J. 2011. Variation in antioxidant potential and total polyphenol content of fresh and fully fermented Sri Lankan tea. *Food Chemistry*. Vol. 125. Issue 2. P. 536 [žiūrėta 2019-03-17]. Prieiga per internetą: <https://app.dimensions.ai/details/publication/pub.1035391518>
 10. LST ISO 2173:2004. *Vaisių ir daržovių gaminiai. Tirpių sausųjų medžiagų nustatymas. Refraktometrinis metodas (tapatus ISO 2173:2003)*. Vilnius: Lietuvos standartizacijos departamentas, 2004.
 11. LST ISO 750:2000. *Vaisių ir daržovių gaminiai. Titruojamojo rūgštingumo nustatymas (tapatus ISO 750:1998 [E])*. Vilnius: Lietuvos standartizacijos departamentas, 2000.
 12. LST ISO 7954:1998E. *Mikrobiologija. Mielių ir pelėsinių grybų skaičiavimas. Bendrieji nurodymai*. Vilnius: Lietuvos standartizacijos departamentas, 1998.
 13. Mayser P., Fromme S., Leitzmann C., Gründer K. 1995. The yeast spectrum of the 'tea fungus Kombucha'. *Mycoses*. Vol. 38. Issue 7. P. 289–295 [žiūrėta 2019-03-17]. Prieiga per internetą: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1439-0507.1995.tb00410.x>
 14. Malbaša R. V., Lončas E. S., Kolarov L. J. A. 2002. L-lactic, L-ascorbic, total and volatile acids contents in dietetic kombucha beverage. *Romanian Biotechnological Letters*. Vol. 7. Issue 5. P. 891–896 [žiūrėta 2019-03-18]. Prieiga per internetą: <https://e-repository.org/rbl/vol.7/iss.5/2.pdf>
 15. Patel R., Garg R., Erande S., Maru G. B. 2007. Chemopreventive herbal anti-oxidants: Current status and future perspectives. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*. Vol. 40. Issue 2. P. 82–91 [žiūrėta 2019-03-10]. Prieiga per internetą: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2127226/pdf/jcbn2007012.pdf>
 16. Petrovska B. B., Tozi L. P. 2001. Mineral and water soluble vitamin content in the Kombucha drink. *Food Science and Technology*. Vol. 35. Issue 2. P. 201–205 [žiūrėta 2019-02-21]. Prieiga per internetą: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2621.2000.00342.x>
 17. Popkin B. M. 2010. Recent dynamics suggest selected countries catching up to US obesity. *The American Journal of Clinical Nutrition*. Vol. 91. Issue 1. P. 284–1288 [žiūrėta 2019-03-05]. Prieiga per internetą: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2793114/pdf/ajcn9110284S.pdf>
 18. Rains T. M., Agarwal S., Maki K. C. 2011. Antiobesity effects of green tea catechins: A mechanistic review. *Journal of Nutritional Biochemistry*. Vol. 22. Issue 1. P. 1–7 [žiūrėta 2019-03-21]. Prieiga per internetą: <https://www.sciencedirect.com/>
 19. Reiss J. 1994. Influence of different sugars on the metabolism of the tea fungus. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung*. Vol. 198. Issue 3. P. 258–261 [žiūrėta 2019-01-21]. Prieiga per internetą: <https://doi.org/10.1007/BF01192606>
 20. Sakalauskas V. 2003. *Duomenų analizė su STATISTICA*. Vilnius: Margi raštai. 235 p.
 21. Srihari T., Satyanarayana U. 2012. Changes in free radical scavenging activity of Kombucha during fermentation. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*. Vol. 4. Issue 11. P. 1978 – 1981 [žiūrėta 2019-03-17]. Prieiga per internetą: <https://pdfs.semanticscholar.org/be43/63872846d903c615f56e9bcc7477a0789574.pdf>
 22. Teoh A. L., Heard G., Cox J. 2004. Yeast ecology of Kombucha fermentation. *International Journal of Food Microbiology*. Vol. 95. Issue 2. P. 119–126 [žiūrėta 2019-01-17]. Prieiga per internetą: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2003.12.020>
 23. Waterhouse A. L. 2002. Determination of total phenolics. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*. Vol. 6. Issue 1 [žiūrėta 2019-04-16]. Prieiga per internetą: <https://currentprotocols.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/0471142913.fai0101s06>
 24. Wolfe B. E., Dutton R. J. 2016. Fermented foods as experimentally tractable microbial ecosystems. *Cell*. Vol. 161. Issue 1. P. 49–55 [žiūrėta 2019-02-02]. Prieiga per internetą: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.02.034>

**Vanesa Šliažaitė, Aurelija Paulauskienė,
Aurimas Krasauskas**

EVALUATION OF FERMENTED TEA (KOMBUCHA) QUALITY

S u m m a r y

The research was done at Aleksandras Stulginskis University (Vytautas Magnus University Agriculture Academy since 2019) in 2017–2018. The research object was kombucha beverage brewed from *Camellia sinensis* L. black, green, oolong, pu-erh tea and fermented for 9 and 22 days by microorganisms at different room lighting conditions.

The soluble solids content, active acidity and titratable acidity were determined in teas fermented for 22 days. The total amount of phenolics compounds, antioxidant activity, yeast colonies and sensory evaluation of tea were determined in teas fermented for 9 days.

The research results showed that the quality of fermented tea was dependent on the tea species, but fermentation conditions were not essential. During the fermentation the soluble solids content of tea decreased by an average of 0.60% and the content of acetic acid increased by 0.34%. The highest content of acetic acid was found on the 22nd day of fermentation in all species of teas. The active acidity (pH) of all investigated species of teas decreased significantly during the fermentation process. The total content of phenolic compounds in all species of teas during the fermentation increased from 20 to 57% regardless of fermentation conditions. The highest content of total phenolic compounds was established in teas fermented for 9 days. The antioxidant activity of teas fermented for 9 days varied depending on the fermentation conditions. For black and green teas fermented in the light the antioxidant activity decreased, for oolong and pu-erh teas fermented in the dark the antioxidant activity increased. The number of yeast colonies increased in all tea samples during the fermentation. The best taste was fixed for pu-erh tea, which scored the highest (11.4) in sensory evaluation.

Keywords: acetic acid, *Camellia sinensis* L., chemical composition, fermentation, sensory analysis, yeast colonies