

# **SZAKDOLGOZAT**

**Kelemen Zita Júlia**

**2025**



Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem

Budai Campus

Élelmiszertudományi és Technológiai Intézet

Élelmiszermérnök alapképzési szak

KÜLÖNBÖZŐ KOMBUCHA TEÁK  
MIKROBAKÖZÖSSÉGÉNEK VIZSGÁLATA

Belső konzulens: Dr. Pomázi Andrea

egyetemi docens

Belső konzulens  
tanszéke:

Élelmiszer-mikrobiológiai, -  
higiéniai és biztonsági Tanszék

Készítette:

Kelemen Zita Júlia

Budapest

2025

# Tartalomjegyzék

<b>1</b>	<b>Bevezetés és célkitűzések</b>	1
<b>2</b>	<b>Szakirodalmi áttekintés</b>	2
2.1	A kombucha eredete, kultúrtörténete	2
2.2	Kombucha készítés	2
2.3	A kombucha alapanyagai	5
2.3.1	Tea	5
2.3.2	Cukor	5
2.3.3	Víz	6
2.3.4	SCOBY	7
2.4	Mikrobiális diverzitás	7
2.4.1	Baktériumok	9
2.4.2	Élesztőgombák	9
2.5	Fermentációs termékek, bioaktív vegyületek és egészségre gyakorolt hatásuk	9
2.5.1	Szerves savak	10
2.5.2	Etanol	11
2.5.3	Polifenolok	11
2.5.4	Vitaminok	11
2.5.5	Potenciális veszélyforrások, toxicitás	12
2.6	Kombucha-hulladék újrahasznosítása	12
2.7	Ipari és otthoni kombucha előállítás összehasonlítása	13
<b>3</b>	<b>Alkalmazott anyagok és módszerek</b>	16
3.1	Használt alapanyagok	16
3.2	Alkalmazott oldatok és tápközegek	16
3.3	Vizsgálatokhoz használt anyagok	17
3.4	Módszerek	17
3.4.1	Törzsgyűjtemény létrehozása kereskedelemben kapható kombuchákból	17
3.4.2	Törzsgyűjtemény létrehozása közvetlenül starterkultúrából	18
3.4.3	Kombucha készítése és a fermentáció nyomon követése	18
3.4.4	Telepmorfológia szerinti differenciálás WL agaron	20
3.4.5	Gram-festés	20
3.4.6	Kálium-hidroxid próba	21
3.4.7	Kataláz próba	21
3.4.8	Fajmeghatározás Bruker MALDI Biotyperrel	21

<b>4</b>	<b>Eredmények és értékelésük</b> .....	22
4.1	Kereskedelmi termékekről alkotott kép.....	22
4.2	Kombucha fermentálása starterkultúra alkalmazásával .....	22
4.2.1	Mikrobaszámok alakulása a fermentáció során .....	24
4.3	Az izolált mikrobák elsődleges azonosítása gyorstesztetekkel .....	26
4.4	Izolátumok fajszerű meghatározása .....	28
<b>5</b>	<b>Következtetések és javaslatok</b> .....	32
5.1	Következtetések.....	32
5.2	Javaslatok.....	32
<b>6</b>	<b>Összefoglalás</b> .....	34
<b>7</b>	<b>Irodalmi hivatkozás</b> .....	36
8	Táblázatok és ábrák jegyzéke .....	42
8.1	Ábrajegyzék.....	42
8.2	Táblázatjegyzék.....	42
<b>9</b>	<b>Nyilatkozatok</b> .....	43

# 1 Bevezetés és célkitűzések

A fermentált élelmiszerek és italok fogyasztása az emberi táplálkozás egyik legrégebbi formája, ugyanakkor napjainkban ez a terület dinamikusan fejlődik, újragondolják a hagyományos recepteket és elkészítési módokat. A mikrobiális erjesztéssel előállított termékek, mint például a kefir, a kovászos kenyér, a joghurt vagy a kombucha, nemcsak hosszabb eltarthatóságot biztosítanak, hanem a képződő bioaktív komponenseknek és probiotikus tulajdonságuknak köszönhetően kedvezően hatnak az emberi egészségre.

Napjainkban a kombucha iránti érdeklődés jelentősen megnőtt. Jótékony hatásairól kutatások születtek, az egészségtudatos vásárlók pedig előszeretettel vásárolják és fogyasztják. Világszerte számos új márka jelent meg, Magyarországon többféle kombucha is megtalálható a kereskedelemben.

A kombucha cukrozott teából készül, melyet szimbiotikus mikrobiális közösség erjeszt meg. A fermentáció során az élesztők a cukrot etanollá alakítják, majd az ecetsav baktériumok az alkoholt savakká oxidálják, így alakul ki a jellegzetes savanykás, enyhén pezsgő üdítőital. A folyamat eredményeként számos bioaktív anyag, például polifenolok, szerves savak, vitaminok és antioxidánsok keletkeznek. Ezeknek a fermentáció során keletkező komponenseknek kedvező élettani hatást tulajdonítanak.

A kombucha mikrobiális összetétele nem egységes és állandó, függ a felhasznált tea típusától, a fermentációs körülményektől, a starterkultúra eredetétől, valamint a fermentáció időtartamától. A kereskedelmi forgalomban elérhető kombuchák esetében sokszor nincs pontos információ az erjesztést végző mikroorganizmusokról, holott ez meghatározza a termék minőségét, stabilitását, és biztonságosságát is. A mikroorganizmusok faji összetétele, mennyisége és aktivitása nagyban befolyásolja a fermentáció kinetikáját, illetve az ital tulajdonságait, mint a savasságot, az ízprofilt és a bioaktív komponenseket. Ebből következik, hogy a kombucha mikrobiális közösségének vizsgálata nemcsak tudományos, de gyakorlati jelentőséggel is bír az élelmiszeriparban. A fajok azonosítása és a fermentáció során bekövetkező változások megismerése információt nyújt a fermentációs folyamatok megértéséhez, valamint optimalizálásához.

A szakdolgozatom célja egyrészt a kereskedelemben kapható különböző kombuchák mikrobiális közösségének összehasonlítása volt, másrészt a hagyományos technológia alapján fermentált saját készítésű kombucha mikrobaközösségének összevetése a kereskedelemben elérhető italokéval.

## 2 Szakirodalmi áttekintés

### 2.1 A kombucha eredete, kultúrtörténete

A kombucha elnevezés a japán enyhén erjesztett ital nemzetközileg használt, germanizált formája. Elsőként Kelet-Ázsiában alkalmazták gyógyhatásai miatt. Az ital Északkelet-Kínából (Mandzsúria) származik, ahol a Csin-dinasztia („Ling Chi”, Krisztus előtt körülbelül 220-ban) idején energizáló és méregtelenítő tulajdonságai miatt értékelték nagyra. Krisztus után 414-ben a teagombát egy Kombu nevű orvos Japánba szállította, ahol Inkyo császár emésztési problémáit orvosolta az itallal. A kereskedelmi vonalak bővülésével a kombucha, akkori nevén „Mo-Gu”, először Oroszországba juthatott el, ahol sokféle néven ismerték. Ilyen nevek például a *Cainigrib*, a *Japonskigrib* vagy a *Kambucha*. Ezt követően más kelet-európai régiókba, majd Németországba is eljutott a fermentált innivaló, ahol a 20. század idején *Heldenpilz* és *Kombuchaschwamm* néven vált elterjedté. Az erjesztett tea fogyasztása egészen a második világháborúig elfogadott volt, ekkor azonban hiánycikké vált a tealevél és a cukor is. A háború után Olaszországban az 50' években tetőzött fogyasztásának népszerűsége. Az 1950-es években Franciaországban is ismertté vált. Svájci kutatók pedig arról számoltak be a 60' években, hogy fogyasztása hasonlóan kedvező hatással van az egészségre, mint a joghurt fogyasztása. Manapság a kombucha már világszinten elterjed. Sok üzletben különböző ízesítésű kombucha tea is megtalálható (Jayabalan és *mtsai.*, 2014).

### 2.2 Kombucha készítés

A kombucha általában szacharózzal édesített fekete vagy zöld teából készül, melyhez 10-20 v/v% -ban adnak az előző fermentációból kombucha levet, vagy SCOBY (Symbiotic Culture Of Bacteria and Yeast) darabkát inokulumként. A szubsztrátot aerob körülmények között 7-14 napig 20-30 °C-on inkubálják. A folyamat végterméke kissé szénsavas, enyhén savanyú üdítőital. A fermentációt élesztőgombák és baktériumok végzik szimbiózisban. A folyamat első lépéseként az élesztőgombák a szacharózt glükózzá és fruktózzá hidrolizálják, közben széndioxidot és etanolt termelnek. A tejsavbaktériumok a glükózt és a fruktózt hasznosítják, hogy tejsavat termeljenek. Az ecetsav baktériumok pedig glükóz, valamint etanol felhasználásával ecetsavat és glükonsavat állítanak elő (Jayabalan és *mtsai.*, 2014).

Az általános receptúra a következő. Egy liter desztillált vizet 100 gramm cukorral felforralunk, majd hozzáadunk 5,4 gramm teafüvet, és 15 percig állni hagyjuk, hogy kiázzon a tea. Ezután leszűrjük a főzetet egy steril üvegbe. Mikor a tea szobahőmérsékletűre hűlt, körülbelül 20-22 °C-ra, beoltjuk a kombucha kultúrával. A kultúra származhat az előző fermentációból, de

beszerezhető boltból, webshopból is. Ha az előző fermentációból végezzük a beoltást, akkor a fermentáció során kialakult cellulózfilmet és körülbelül 100 ml fermentált italt hozzáadunk a főzethez. Az üveget, melyben a fermentáció végbemegy, papírtörlővel vagy gézzel fedjük le, amit befőttes gumival rögzítünk (Teoh és *mtsai.*, 2004).

Végezhetünk csupán elsődleges fermentációt, de a másodlagos fermentációval ízletesebb italt érhetünk el. Az elsődleges fermentáció körülbelül 5-7 napig tart. Ezután el kell távolítani a SCOBY-t, és hűtve tárolni a fermentált lé 20%-ával, hogy a későbbiekben újra felhasználható legyen. Az elkészült kombuchát ezt követően több módon is kezelhetjük. Egyszerűen palackozhatjuk, és hűtőben tárolhatjuk fogyasztásig. A következő lehetőség a fermentált kombuchát 1:1 arányban cukrozott teával hígítani, mely így szobahőmérsékleten másodlagos fermentációnak indul, gázképződés mellett. Másodlagos fermentációnak úgy is indítható az ital, hogy gyümölcslével, kávéval vagy kókuszvízzel ízesítjük, majd szobahőmérsékleten tároljuk további 2-3 napig. Így különlegesebb ízű, szénsavasabb üdítőhöz juthatunk (Coelho és *mtsai.*, 2020)

A készítés folyamán ügyelni kell a használt eszközök csíramentesítésére, mivel ezzel megelőzhetjük a nemkívánatos mikroorganizmusok elszaporodását. Ha elérjük a fermentáció azon szakaszát, ahol elégedettek vagyunk a kombucha ízprofiljával és tulajdonságaival, célszerű pasztörözni, vagy pedig hűtőbe helyezni. Ezzel megakadályozhatjuk a túlzott alkohol és a szén-dioxid termelődést (Watawana és *mtsai.*, 2015). Mind a pasztörözés, mind a hűtés csökkenti vagy megszünteti a mikrobák élettevékenységét. Egy újabb kutatás kimutatta, hogy az inaktivált mikroorganizmusok, valamint anyagcseretermékeik is hozzájárulhatnak a fogyasztók egészségéhez (Barros és *mtsai.*, 2020).

Az évek során sokféle definíciót alkalmaztak a probiotikumokra, de a hivatalosan használt formát 2001-ben a FAO és a WHO állapította meg, melyet 2014-ben kis mértékben az ISAPP munkatársai módosítottak. A definíció értelmében a probiotikumok „olyan élő mikroorganizmusok, melyek megfelelő mennyiségben fogyasztva egészségügyi előnyt biztosítanak a gazdaszervezet számára” (Hill és *mtsai.*, 2014). Tehát a pasztörözött kombucha nem tekinthető probiotikumnak, még ha tartalmazott is élő probiotikus törzseket.

Mivel az erjedés során nagymértékben keletkeznek szerves savak, fontos, hogy megfelelő anyagú eszközben fermentáljuk, majd tároljuk az italt. A Food Safety Information Council honlapján található cikk szerint erre megfelelő lehet rozsdamentes acél tároló vagy üvegpalack, mivel így megakadályozható, hogy toxikus anyagok jussanak az üdítőbe, mint például ólom vagy mikroműanyag.

A hőmérséklet és a fermentációs időtartam tekintetében a szakirodalmak számos lehetséges megoldásról számolnak be (Coelho és *mtsai.*, 2020). Jayablan és *mtsai.* (2014) szerint a hőmérsékletet 20 és 22 °C között érdemes tartani, és 7-10 napig, vagy akár tovább folytatható a fermentáció a kívánt eredmény eléréséig. Watawana és *mtsai.* a hőmérsékletet szobahőmérsékletűnek állították be, az erjedési folyamat pedig 3 naptól 60 napig terjedőnek állapították meg. Két tanulmányban is 20 és 30 °C közötti hőmérsékletet állapították meg optimálisnak (De Filippis és *mtsai.*, 2018, Skocinska és *mtsai.*, 2017). A 30 °C-on vezetett fermentáció esetében diverzebb mikrobiális összetételt figyeltek meg, valamint többféle ecetsav baktérium fajt izoláltak, melyek hozzájárulnak a szerves sav termeléshez. Azt is megállapították, hogy a *Gluconacetobacter* fajok koncentrációja egy hét után emelkedett meg, és a fermentáció végéig stabilnak volt mondható (De Filippis és *mtsai.*, 2018). Minél tovább tart a fermentáció, annál magasabb lesz a savtartalma az itálnak, mely potenciálisan veszélyes lehet egyes fogyasztók számára, ezért a fermentációs időt standardizálni kell (Jayablan és *mtsai.*, 2014).

## 2.3 A kombucha alapanyagai

### 2.3.1 Tea

A kombucha készítésének egyik alapja a *Camellia sinensis* leveléből készült főzet. A tea típusa (zöld, fekete, oolong, fehér) nagyban befolyásolja a végtermék bioaktív vegyülettartalmát. A teában található polifenolok és szerves savakat tartják a kombucha aktív összetevőinek, melyek védelmet nyújtanak a rákos megbetegedésekkel szemben és számos jótékony hatással rendelkeznek. A zöld teában található polifenol a gallokatekin, a katekin-gallát, az epikatekin és az epigallokatekin (Dwyer és Peterson, 2013). A fekete teában találhatók polifenolok, flavonoidok a theaflavinok (TF) és a thearubiginek (TR) (Butt és *mtsai.*, 2014). Jayabalan és Swaminathan tanulmányából kiderül, hogy a TF és a TR stabilabbnak bizonyul a kombucha fermentációja során az epikatekin-izomereknél (Jayabalan, Marimuthu és Swaminathan, 2007). A fekete teában fellelhető polifenolok antimikrobiális hatással is bírnak például a patogén *Vibrio* törzsekkel szemben (Talawat és *mtsai.*, 2006). A szárított tealevelek jelentős mennyiségben, körülbelül 21-28%-ban, tartalmaznak fehérjét, aminosavakat, melyek elengedhetetlenek a mikroorganizmusok számára, mint nitrogénforrás (Banerjee és Chatterjee, 2015). A fekete és zöld tea funkcionális összetevőiről sok feljegyzés elérhető, ennek ellenére napjainkban sok figyelem irányul az alternatív teák és nitrogénforrások irányába. Ez azért van, mert a fehér (nem oxidált) és az oolong (részben oxidált) tea antioxidáns-tartalma sokkal magasabb (Nyhan és *mtsai.*, 2022). Összehasonlító analízissel vizsgálták a különböző teákból készült kombuchákat, és azt találták, hogy a tea fajtája befolyásolja a belőle készült kombucha anyagainak biológiai hozzáférhetőségét, valamint antioxidáns-tartalmát (Değirmencioğlu és *mtsai.*, 2021). Egyes kutatások próbálkoztak más, gyógynövényből készült teából kombuchát készíteni, például borsmentából, kamillából vagy rozmaringból, de ezek a kísérletek sikertelennek bizonyultak, mert a bennük található illóolajok gátolják a mikrobák szaporodását (Reiss és *mtsai.*, 1987). Velićanski és munkatársai 2013-ban azonban bebizonyították, hogy kis bioreaktorban lehetséges borsmentateából, citromfű teából és kakukkfűből is kombuchát készíteni. A folyamatot kontrollált körülmények között végezték, rövidebb fermentációs idővel, mintha fekete teát alkalmaztak volna (Velićanski és *mtsai.*, 2013).

### 2.3.2 Cukor

Az édesítéshez általában szacharózt használnak, mivel ez a diszacharid glükózt és fruktózt szolgáltat szénforrásként a mikrobák metabolizmusához, valamint olcsó és sokak számára elérhető. A szacharózt a kombucha élesztőgombái invertáz enzim segítségével hidrolizálják. Az általánosan elfogadott szacharóz koncentráció 5 és 10 m/V%, tehát egy liter teához 50-100

g cukrot szükséges adni (Nyhan és *mtsai.*, 2022). Malbaša és munkatársai (2008) azt találták a kísérletükben, hogy 70 g/L szacharóz adja a legjobb eredményeket, ennél magasabb koncentrációban a cukor gátló hatást fejtett ki a mikrobák szaporodására. 70 g/L cukorkoncentráció mellett viszonylag magas pH-val rendelkező metabolitok jöttek létre, alacsonyabb ecetsav és magasabb tejsav koncentrációval, melyek optimális ízprofilt alakítottak ki (Malbaša és *mtsai.*, 2008). A cukor típusa is jelentős szerepet játszik a fermentáció során. Reiss a kísérleteiben szacharóz, glükóz, fruktóz és laktóz használatát hasonlította össze kombucha készítéshez. Azt találta, hogy a különböző cukrok eltérő fermentációs profilokat eredményeznek. A szacharóz és a fruktóz használata magasabb etanol koncentrációt eredményezett a többi cukorral szemben. Csak a szacharóz fokozta a tejsav szintézist. Összességében arra a következtetésre jutott, hogy a szacharózzal készített kombuchának legmagasabb az etanol és tejsav tartalma, megjegyezvén, hogy ezt a cukrot alkalmazzák tradicionálisan is (Reiss, 1994). Alternatív cukorforrások is alkalmazhatóak a kutatások alapján. Kókuszpálmacukorral például rövidebb fermentációval magasabb fenol- és antioxidáns-tartalom érhető el (Muhialdin és *mtsai.*, 2019). Innovatív megközelítés a csíráztatott kukorica alkalmazása cukormentes kombucha létrehozásának céljával. A fermentáció sikeres volt, az elkészült kombucha hasonló pH-val és savtartalommal bírt a hagyományosan, cukorral készült változathoz képest (Francisco és *mtsai.*, 2021).

### 2.3.3 Víz

Mivel a kombucha nagyrészt vízből áll, így alapvetően befolyásolja a vízminőség a végterméket. A víz nem tartalmazhat mikrobaölő tulajdonságú anyagokat, hiszen ez a fermentáció sikertelenségét okozhatja (Tran és *mtsai.*, 2020). Egy kutatásból kiderült, hogy a víz ionösszetételének módosítása (bikarbonát, klorid, kalcium, magnézium, szulfát) befolyásolja a fermentáció menetét. Hatással van a pH-ra, a titrálható savtartalomra, a hozzáférhető aminosavakra, a képződött etanol mennyiségére, valamint az antioxidáns-tartalomra is (Thompson-Witrick és *mtsai.*, 2024). Kombucha készítéshez általában csapvizet használnak, ami klórral, fluoriddal és egyéb anyagokkal van kezelve, amitől ugyan biztonságosan fogyasztható, a SCOBY mikrobaközösségének fermentációs képességét azonban negatívan befolyásolja (Crum és LaGory, 2016). Ha ipari körülmények között mégis csapvizet használnak alapanyagként, szénszűrőt kell alkalmazni a klór kiszűréséhez. UV lámpát is érdemes lehet telepíteni a szűrő elé, ilyen módon a vizet a szűrés előtt fertőtleníteni. Összefoglalva leginkább klórmentes, tiszta és mérsékelt ásványtartalmú vízzel érdemes kombuchát készíteni (Palmer és Kaminski, 2013).

### 2.3.4 SCOBY

A SCOBY (Symbiotic Culture Of Bacteria and Yeast) lényegét tekintve bakteriális cellulózból álló biofilm, ami ökoszisztémaként működik (May és mtsai., 2019). A mikrobiális cellulóz egy természetes polimer, ami szerkezetében és kémia tulajdonságaiban is eltér a növényi eredetű cellulóztól (Mohite és Patil, 2014). A cellulóz  $(C_6H_{10}O_5)_n$   $\beta$ -D-glükózból felépülő homopolimer, melyben a cukormolekulák  $\beta$ -1,4-glikozidos kötésekkel kapcsolódnak egymáshoz (Lahiri és mtsai., 2021). A legismertebb cellulóz termelő fajok a *Gluconacetobacter* nemzetségbe tartoznak, de más, például *Rhizobium* *Aerobacter*, *Sarcinia*, nemzetségben is megtalálhatók olyan fajok, melyek cellulózt termelnek (Makoto Shoda és Yasushi Sugano, 2005). A kombucha esetében azonban legtöbbször a *Komagataeibacter* (régii nevén *Gluconobacter*) *xylinum* fajt említik meg, mint cellulóztermelő (Villareal-Soto és mtsai., 2018). A fermentáció elején a baktériumok által szintetizált cellulóz szálak a tea tetején csoportosulnak, hártyszerű képződményként lebegve. Az erjedés előrehaladtával egyre több cellulózzréteg halmozódik fel, vastagabb biofilmet létrehozva (May és mtsai., 2019). Ez a biofilm ad élőhelyet a kombucha erjesztését végző mikroorganizmusoknak. A cellulóz szerkezetéből és viszkozitásából adódóan gátat képez az antibiotikumokkal és a környezetben előforduló nemkívánatos mikrobákkal szemben, tehát védelemül szolgál, valamint tápanyagraktárként is funkcionál (Stewart, 1996). A cellulózmembrán hozzájárul a mikrobák megfelelő oxigénellátottságához, mivel a felszínen tartja azokat, emellett védelmet biztosít az UV sugarakkal szemben. (Martínez Leal és mtsai., 2018) Az állaga kissé zselés, illata pedig enyhén ecetes. Az ecetes szag az egészséges SCOBY indikátora, a kellemetlen, penészes szag a romlását jelzi (Crum és mtsai., 2016).

### 2.4 Mikrobiális diverzitás

A SCOBY-ban számos mikroorganizmus megtalálható, melyet újra és újra kimutatnak, de elsődlegesen ecetsav baktériumokból és élesztőgombákból áll a mikrobiális közösség (Watawana és mtsai., 2015). A közösség összetétele széles skálán mozog, meghatározza a starterkultúra minősége, továbbá a környezeti feltételek is befolyásolják (Villarreal-Soto és mtsai., 2018). Kutatásokban különböző kombucha teákat vizsgáltak. Az eredmények rávilágítottak arra, hogy vannak domináns élesztők és baktériumok az ital fermentációjában. Gyakori élesztőgombák a teljesség igénye nélkül, például a *Saccharomyces cerevisiae*, a *Zygosaccharomyces bailii*, a *Zygosaccharomyces kombuchaensis*, a *Kloeckera apiculata*, és a *Pichia membranaefaciens* (Villarreal-Soto és mtsai., 2018, Watawana és mtsai., 2015). A szakvélemények beszámolnak még ecetsavtermelő baktériumokról, mint például az

*Acetobacter aceti*, a *Gluconobacter oxydans*, *Komagataeibacter xylinum* és az *Acetobacter pasteurianus* (Jayabalan és mtsai., 2014, Teoh és mtsai., 2004, Villarreal-Soto és mtsai., 2018.). Érdekes, hogy az Írországból származó kombucha mikrobaközösségében jelentős számú tejsavbaktériumot is találtak (Marsh és mtsai., 2014). Ennek ellenére a tejsavbaktériumok valószínűleg nem esszenciálisak a kombucha mikrobiális összetételéhez, hiszen nem minden esetben találtak ebbe a csoportba tartozó mikroorganizmust a SCOBY-ban (Laureys és mtsai., 2020).

A kombucha fermentációja közben a fermentációban résztvevő mikrobák összetett kölcsönhatásban állnak egymással, a különböző populációk segíthetik, de eltérő módokon gátolhatják is egymást (1. táblázat).

*1. táblázat: Versengés és együttműködés a kombucha mikrobiológiai közösségében (Forrás: May és mtsai., 2019. alapján)*

<b>Fermentáció szakasza</b>	<b>Versengés</b>	<b>Kooperáció</b>
Az élesztők invertáz enzimet termelnek	Esetleges versengés az invertáz enzimért	Az élesztők a szacharóz hidrolízisével szubsztrátot biztosítanak a baktériumok számára
Az élesztők a cukrot etanollá fermentálják	Az élesztők etanollal gátolják versenytársaikat	A baktériumok tápanyagként hasznosítják az etanolt
A baktériumok az etanolt ecetsavvá oxidálják	A közeg savanyításával a baktériumok gátolják versenytársaikat	A baktériumok metabolizálják az etanolt
A baktériumok biofilmet szintetizálnak	A baktériumok fizikailag gátolják versenytársaikat cellulóz biofilm szintetizálásával	Élőhely, patogénektől való védelem, lehetséges tápanyagraktár

A fermentáció indulásakor az élesztők extracellulárisan invertáz enzimet termelnek, mely a szacharózt monomerjeire (glükóz, fruktóz) hasítja szét. Ennek következtében a többi mikroorganizmus számára is szabadon elérhető monoszacharidok jönnek létre, amelyeket szénforrás gyanánt képesek hasznosítani (Gore, Youk és van Oudenaarden, 2009). Következő lépésben az élesztők a monoszacharidok metabolizációja során etanolt termelnek. Az etanol magas koncentrációban káros a baktériumokra és az élesztőgombákra nézve is, mivel sejtmembrán-károsító hatása van (Liu és Qureshi, 2009). Mielőtt az alkoholkoncentráció potenciálisan káros szintet érne el, az ecetsav baktériumok oxidálják szerves savvá, ezzel a pH-

t is csökkentik. Ezek a baktériumok obligát aerob mikroorganizmusok, tehát oxigénre van szükségük a fermentációhoz (Saichana és mtsai., 2015).

#### 2.4.1 Baktériumok

A baktériumok közül az ecetsav baktériumok vannak jelen dominánsan a kombuchában, melyek az *Acetobacter* és *Gluconobacter* nemzetségekhez tartoznak (Jayablan és mtsai., 2014). Jayablan és mtsai. szerint a Kanadából, Írországból, Egyesült Államokból és az Egyesült Királyságból származó kombucha mintákban a túlsúlyban lévő baktériumok a *Gluconacetobacter* és *Lactobacillus* fajok voltak, míg az *Acetobacter* fajok kevésbé voltak megfigyelhetőek. De Filippis és mtsai. (2018) hasonló eredményekre jutottak. Különböző hőmérsékleten végzett fermentációk esetén is a *Gluconacetobacter* fajok domináltak olyan mértékben, hogy a hetedik napra a baktériumpopuláció 90%-át ezek a mikrobák tették ki. Az *Acetobacter* fajok a 21 nap fermentáció után a populációban már csak 3-5%-ban voltak jelen.

#### 2.4.2 Élesztőgombák

Számos élesztő fajt izoláltak a kombuchából, mint például a *Candida*, *Koleckera*, *Mycotorula*, *Mycoderma*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Torulospora* és *Zygosaccharomyces* nemzetségekhez tartozó fajokat (Coelho és mtsai., 2020). Watawana és mtsai. (2016) a *Zygosaccharomyces* fajokat írták le domináns élesztőkként, 84,1%-os relatív előfordulási arányban voltak jelen a vizsgált italokban, míg a *Dekkera* és *Pichia* fajok csak 6% illetve 5%-ban fordultak elő. A vizsgálatok szerint az ozmotoleráns élesztőfajok, mint a *Saccharomyces cerevisiae*, a *Schizosaccharomyces pombe* és a *Torulaspota delbrueckii* a fermentáció kezdetétől fellelhetőek, míg az savtűrő fajok, mint a *Brettanomyces* fajok vagy a *Candida stellata* a fermentáció végén jelennek meg (Teof és mtsai., 2004). A *Saccharomyces* fajok és a többi faj közötti kölcsönhatások előnyösen hatnak a fermentációs folyamatokra a kombuchában, mivel csökkentik a nemkívánatos mikrobák szaporodásának kockázatát, valamint hozzájárulnak a kombucha jellegzetes aromájának és ízének kialakításához (Villareal-Soto és mtsai., 2018).

### 2.5 Fermentációs termékek, bioaktív vegyületek és egészségre gyakorolt hatásuk

A kombucha összetétele kvantitatív és kvalitatív szempontból is számos tényezőtől függ. Ilyen tényező a fermentáció ideje, a készített kiindulási tea anyagai, valamint az inokulumban jelenlévő mikrobák. Ennek ellenére van pár összetevő, mint például a szerves savak, vitaminok, ásványi anyagok, polifenolok és aminosavak, amelyek bizonyítottan megtalálhatóak a

kombuchák többségében (Fu és mtsai., 2014). A 2. táblázat a kombucha mikrobaközössége által termelt fermentációs termékeket, bioaktív vegyületeket mutatja be.

2. táblázat: Fermentációs termékek (Forrás: Antolak, Piechota és Kucharska, 2021 nyomán)

Ecetsav baktériumok	Élesztőgombák	Tejsavbaktériumok
<ul style="list-style-type: none"> <li>• C-vitamin szintézis</li> <li>• Glükuronsav szintézis</li> <li>• Ecetsav szintézis</li> <li>• D-szacharinsav-1,4-lakton (DSL) szintézis</li> <li>• Valószínűleg részt vesznek a fenolos komponensek átalakításában</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• B-vitamin bioszintézis</li> <li>• Etanol szintézis</li> <li>• Aminosav előállítás</li> <li>• Fenolos vegyületek átalakítása</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Tejsav termelés</li> <li>• B-vitamin bioszintézis</li> <li>• Bakteriocinek előállítása</li> <li>• Bioaktív peptidek előállítása</li> <li>• Fenolos vegyületek átalakítása</li> </ul>

### 2.5.1 Szerves savak

A szerves savak közül a legfontosabbak az ecetsav, a glükuronsav, a glükonsav, a tejsav, az almasav, a citromsav, a borkősav, a folsav, a malonsav, az oxálsav, a piroszőlősav és a huminsav (Jayabalan és mtsai., 2014).

Az ecetsav ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ) felelős elsősorban a kombucha aromájáért és ízéért. Koncentrációja általában a fermentációs idő előrehaladtával nő. A végtermékben található ecetsav mennyisége függ a kezdeti cukorkoncentrációtól és a fermentáció idejétől. Blanc 1996-os kísérletében a fermentáció 15. napjára a kezdeti 70 g/l szacharózból átlagosan 5,6 g/l ecetsav képződött.

Tejsav ( $\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_3$ ) általában magasabb koncentrációban van jelen a zöld teából készült kombuchákban (Costa és mtsai., 2022). Egy kutatásban kimutatták, hogy a tejsav kulcsszerepet játszik az agy működésének szabályozásában, például a tanulásban és az agyi vérrellátás optimalizálásában. Serkenti az idegsejtek energiaellátását, továbbá neuroprotektív hatással is bír (Cai és mtsai., 2022). A tejsav csökkenti az ital pH-ját, ezáltal antimikrobiális hatással bír, csakúgy mint az ecetsav (Ibrahim és mtsai., 2021).

A mikroorganizmusok a glükóz oxidációjakor glükuronsavat termelnek, mely az emberi szervezetre nézve méregtelenítő hatással bír. Részt vesz a glükuronizációban, vagyis a májban hozzákötődik a toxikus vegyületekhez, ezáltal biztosítva a vesén keresztüli kiválasztódásukat.

A glükuronsav emellett a C-vitamin bioszintézis előanyaga (Nguyen és *mtsai.*, 2015). A glükuronsav növeli a polifenolok biológiai hozzáférhetőségét, mivel a fenolok konjugálnak a glükuronsavval, ily módon javul a transzportjuk és hozzáférhetőségük. A polifenolok az epén keresztül a patkóbélbe kerülnek, ahol a  $\beta$ -glükuronidáz enzim hidrolízissel felbontja a két vegyület közti glikozidos kötést. A folyamat révén a polifenolok hosszabb ideig vannak jelen a szervezetben, antioxidáns hatásukkal pedig megelőzhetik az oxidatív stresszhez köthető betegségeket (Vina és *mtsai.*, 2013).

### 2.5.2 Etanol

Az etanol képződés a kombucha fermentációs folyamatának természetes velejárója (Bishop és *mtsai.*, 2022). Az aerob erjedés során képződő etanolt az ecetsav baktériumok ecetsavvá alakítják, ezáltal a végtermék nem bír magas alkoholtartalommal (Chakravorty és *mtsai.*, 2016). Azonban az ital szűrés után is tartalmaz élő mikroorganizmusokat, a palackozás után anaerob fermentáció következtében valamelyest nőhet az alkoholtartalom, ha nem hűtjük (Coelho és *mtsai.*, 2020). Ez az etanol-koncentráció emelkedés azt eredményezi, hogy a kombucha nem minden esetben alkoholmentes, ami számos jogi vitát vethet fel a címkézéssel és a gyártási módszerrel kapcsolatban. A kombucha etanoltartalma általában nem haladja meg az 1%-ot, a fogyasztók nem érzékelik az etanol ízét fogyasztás közben. Ha azonban a koncentráció meghaladja az érzékelési küszöböt, keserű ízt kölcsönöz az italnak. Ez csökkenti az üdítő vonzerejét, valamint negatívan befolyásolja az italról kialakult képet, miszerint egészséges fogyasztani.

### 2.5.3 Polifenolok

A kombuchában legtöbbször megtalálható polifenolok közé az epikatekin (EC), az epigallokatekin (EGC), az epikatekin-gallát (ECG) és az epigallokaekin-gallát tartozik (Lorenzo és Munekata, 2016). Jayablan és munkatársai 2007-es kutatásukkal bebizonyították, hogy az epikatekin izomerek mennyisége a fermentáció során a kilencedik napig csökken, majd a tizenkettedik napon újra megemelkedik. Ez a változás arra engedett következtetni, hogy a mikrobiális aktivitásnak köszönhetően ezek a vegyületek felszabadulhatnak.

### 2.5.4 Vitaminok

A teában alacsony mennyiségben megtalálható B-, E-, K- és A-vitamin. C-vitamint kizárólag a zöld tea tartalmaz (Dufresne és Farnworth, 2000). A vitaminok a polifenolokhoz hasonlóan erős antioxidáns tulajdonsággal bírnak. Az E-vitamin megelőzi a szívkoszorúér-betegségek kialakulását, a C-vitamin növeli a vas hasznosulását, valamint támogatja az immunrendszert. A

B-vitaminok az általános fáradtságot, koncentrációs- és memóriazavarokat csökkentik (Ivanišová és mtsai., 2020). A kombucha fermentációjának során a mikrobiális aktivitás következtében szignifikánsan növekszik a vitamintartalom. A B-komplex vitaminok tejsavbaktériumok és élesztőgombák által is szintetizált vitaminok. A riboflavin (B<sub>2</sub>-vitamin) például előanyaga a flavin mononukleotidnak, mely kulcsfontosságú a biológiai redox reakciók során. Ezt a vitamint képes szintetizálni például a *Lactococcus lactis* és a *Limosilactobacillus fermentum* (Burgess és mtsai., 2006). A tiamin (B<sub>1</sub>-vitamin) főként az energiatermelésben vesz részt. A *Levilactobacillus brevis* és *Lactiplatibacillus plantarium* képes előállítani extra- és intracellulárisan is (Teran és mtsai., 2021). Az élesztőgombák általánosságban B-komplex (B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>5</sub>, B<sub>6</sub>, B<sub>7</sub>, B<sub>9</sub>, B<sub>12</sub>) vitamin források, továbbá ergosterol tartalmúak, mely a D<sub>2</sub>-vitamin prekursora (Villareal-Soto és mtsai., 2018).

### 2.5.5 Potenciális veszélyforrások, toxicitás

Egyes esetekben a kombucha fogyasztása negatív hatással lehet a fogyasztó egészségére, mint például szédülés, allergiás reakció, fejfájás vagy hipertermia (Jayablan és mtsai., 2014). Ezek a tünetek azonban általában olyan fogyasztóknál lépnek fel, akik túlfogyasztják az italt, rossz higiéniai körülmények között készült kombuchát fogyasztottak, immunbetegséggel élnek (HIV) vagy nehézfémekkel szennyezett terméket ittak. A hosszú fermentációs idő következtében túl magas savtartalommal bíró kombucha fogyasztása is potenciális veszélyforrás lehet (Leal és mtsai., 2018). Terhes nők számára nem javasolt az ital fogyasztása, mivel túlzott bevétel esetén a heparin szint megemelkedhet a szervezetben, mely a harmadik trimeszterben veszélyes lehet, mivel ez az anyag véralvadásgátló hatással bír (Leal és mtsai., 2018). Az otthon készített kombucha könnyebben befertőződik, például *Bacillus anthracis* fajjal (Sadjadi, 1998), vagy egyéb patogén baktériummal, mint *Salmonella spp.*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus spp.*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium botulinum* (Ojo és de Smidt, 2023).

A *Penicillium* és *Aspergillus* nemzetségbe tartozó penészek előfordulását szintén dokumentálták kombuchában., Az ide tartozó penészfajok mikotoxinokat termelhetnek, amelyek karcinogén és citotoxikus hatással bírhatnak (SungHee Kole és mtsai., 2009).

## 2.6 Kombucha-hulladék újrahasznosítása

Az utóbbi években nagy hangsúlyt fektetnek a fenntarthatóságra és az újrahasznosíthatóságra. A kombucha SCOBY ilyen szempontból rendkívül kedvező anyag, sokféleképpen felhasználható. Alkalmazták már ipari hulladékokból ritkaföldfémek kivonására, illetve energiatakarékos izzókból származó fluoreszcens foszfor újrahasznosítására is (Hopfe és

*mtsai.*, 2017). Élelmiszercsomagolásként is megfelelő alternatíva lehet, a kiszárított biofilmet zöldségek fóliázására használták. Az így csomagolt zöldségek tápértéke hosszú távú tárolás mellett sem romlott (Aduri és *mtsai.*, 2019). A textilipar is hasznosítani tudja a SCOBY-t bioszorpciós anyagként fémek eltávolítására. Állati takarmányhoz is adható kiegészítő összetevőként, rostot, fehérjét, aminosavakat és ásványi anyagokat biztosít az állatok, például brojlercsirkék számára (Murugesan és *mtsai.*, 2005). A kombucha SCOBY kiváló alapanyag lehet tudományos kutatásokhoz, mivel olcsó, nem patogén és könnyen tenyészthető. Alkalmazható még a felsorolt példák mellet probiotikumok előállításához, valamint szennyvíztisztításhoz meghatározott pórusméretű cellulóz szűrők gyártásához. Az élelmiszeriparban ízesítőként, fermentációs és sörfőző alapanyagként is felhasználható. Ehető szívósálag, környezetbarát evőeszközök és tányérok is készíthetők belőle. (Ojo és de Smidt, 2023)

## 2.7 Ipari és otthoni kombucha előállítás összehasonlítása

A kombucha előállítása alapvetően két módon zajlik, otthoni és ipari léptékben. A két módszer között nem csak technológiai, hanem mikrobiológiai és élelmiszerbiztonsági különbségek is vannak (3. táblázat).

3. táblázat: Otthoni és ipari kombucha előállítás (Forrás: Saját munka)

	<b>Otthoni előállítás</b>	<b>Ipari előállítás</b>
Erjesztő edény	Üvegedény 1-5 liter	Rozsdamentes acéltartály 10-1000 liter
Oxigénellátás	Gézzel lefedett, természetes diffúzió	Szabályozott levegőztetés, specifikus felület-térfogat arány
Fermentáció időtartama	Változó	Standardizált
Higiénia	Korlátozott	Ipari sterilitás, HACCP
Mikrobiális közösség	Diverz, instabil	Standardizált
Szabályozhatóság	Nehezen szabályozható	Szabályozott fermentációs paraméterek

Az otthoni előállítás jellemzően üvegedényben történik, melynek űrtartalma általában 1-5 liter. Az erjesztés nyitott edényben megy végbe, mely csak gézzel van lefedve, így az oxigén szabadon diffundálhat a mikroorganizmusokhoz. Ezzel szemben az ipari fermentáció rozsdamentes acéltartályban vagy bioreaktorban történik, melynek kapacitása 10 és 1000 liter között lehet. Ebben az esetben az oxigén szabályozott mennyiségben áll rendelkezésre, ezzel is biztosítva a reprodukálhatóságot (Sanwal és *mtsai.*, 2023).

A fermentáció időtartama otthoni körülmények között általában 7-14 napot vesz igénybe, de ez rendkívül változékony, kombuchánként eltérhet a kontrollálatlan környezeti feltételek következtében. Ipari környezetben a fermentációs időt 7-10 napban standardizálják, ezzel biztosítva a végtermék konzisztens minőségét és ízvilágát (Alves és *mtsai.*, 2025).

A mikrobiális közösség összetétele szintén módszerenként eltérő. Míg az otthoni környezet általában diverzebb de instabil közösséget mutat, addig az iparban a stabil összetétel fenntartása a cél, melynek segítségével megismételhetővé válnak a fermentációs folyamatok (Coton és *mtsai.*, 2017). Ennek kialakításában meghatározó szerepet tölt be a fermentációs paraméterek pontos szabályozása, mely a pH, a hőmérséklet, az oxigénellátás, az inokulum mennyisége és a fermentációs időtartam kontrollálását jelenti.

Élelmiszerbiztonsági szempontból igencsak nagy különbség mutatkozik a módszerek között. Otthon a megfelelő higiéniai körülmények korlátozottak, általában kimerül a kézmosás és az eszközök csírámentesítésében, így nagyobb a kontamináció veszélye. Az ipari előállítás során szigorú élelmiszerbiztonsági előírásoknak kell megfelelni, a GMP (Good Manufacturing Practices) és HACCP (Hazard Analysis Critical Control Points) rendszerek üzemeltetése garantálja a termék biztonságosságát (4. táblázat) (Andrade és *mtsai.*, 2025).

Összességében elmondható, hogy az otthoni előállítás különleges, egyedi, és általában nem megismételhető ízű kombuchát eredményez, viszont élelmiszerbiztonsági kockázatokat hordoz magában. Az ipari előállítású kombucha ezzel szemben reprodukálható, standardizált és biztonságos termék, ugyanakkor ezek biztosítása nagy kihívást jelenthet.

4. táblázat: HACCP-alapú kockázatelemzés a kombucha előállításában (Forrás: Nyhan és mtsai., 2022. nyomán)

Lépés	Veszély típusa	Lehetséges veszély	Megelőző intézkedés
1. Vízforralás	Biológiai	Kórokozók jelenléte a vízben	Kórokozók elpusztítása forralással
2. Cukor feloldás és tea infúzió	Biológiai	Szennyeződés bejutása fermentáció előtt	Tiszta, fertőtlenített eszközök és környezet, a teát 20 °C-ra hűteni 2 órán belül, és mielőbb erjeszteni
3. Beoltás SCOBY-val és folyékony kombuchával	Biológiai / Kémiai	Szennyezett SCOBY használata, kontamináció erjedés közben, kémiai szennyeződés a fermentációs edényből	Csak egészséges kultúra használata, erjesztés 4,2-es pH-ig, megfelelő edények használata (üveg, rozsdamentes acél)
4. Erjesztés 7–10 napig	Kémiai	Túlzott szerves sav vagy etanol termelés a túl hosszú erjedés miatt	Az erjesztés leállítása túlzott savtermelés előtt, a végtermék pH $\geq 2,5$
5. SCOBY eltávolítása, kombucha szűrése (opcionális)	Biológiai	Kombucha vagy SCOBY szennyeződése, nem megfelelő tárolás esetén	Tiszta eszközök használata, SCOBY tárolása édesített teában, hűtve
6. Hűtés	Biológiai	Folytatódó fermentáció, túlzott alkohol- és savtermelés	4 °C-ra hűteni a fermentáció leállítására
7A. Fogyasztás otthon	Kémiai	Túlzott fogyasztás toxicitást okozhat	A pH $\geq 2,5$ biztosítása, nem túllépni a napi ajánlott fogyasztási mennyiséget
7B. Csomagolás kiskereskedelmi értékesítésre	Kémiai / Biológiai	Vegyí anyagok kioldódása az edényből, csomagolóanyagból	Megfelelő csomagolóanyagok használata

### 3 Alkalmazott anyagok és módszerek

Vizsgálataimat 2024 októbere és 2025 júniusa között az Élelmiszermikrobiológiai, -higiéniai és –biztonsági Tanszéken végeztem.

#### 3.1 Használt alapanyagok

Kereskedelemben kapható kombuchák: Jakob Kombucha koncentrátum ananással (A termék), VIGO Kombucha Mango + Maracuja (B termék), THE GUTSy CAPTAIN Kombucha Original (C termék) Az általam választott és vizsgált termékek az 1. ábrán láthatók.

1. ábra: Kereskedelemben kapható kombucha italok (Forrás: Saját kép)



Starter kultúra: Viva Natura Kombucha gombakultúra internetről rendelve, szavatossági időn belül felhasználva (Beszerezve: 2024.11.14.)

2 x 500 ml kombucha készítése: 2 x 3 g English Breakfast fekete tea (Oxalis Trade Kft.), 2 x 50 ml 8%-os steril szacharóz oldat, 2 x 450 ml csapvíz

#### 3.2 Alkalmazott oldatok és tápközegek

Hígító folyadék: 1 g pepton, 8,5 g NaCl, 1000 ml desztillált víz. A hígító folyadékot 9 ml-enként osztottam szét kémcsövekbe.

TSA (Trypton szója) tápagar: (Biolab Zrt.), 38 g/l desztillált víz

RBC (Bengálrózsa Chloramphenocol) tápagar: (VWR International Kft.), 32 g/l desztillált víz

MRS tápagar: (VWR International Kft.) 55,2 g/l desztillált víz, 1,5% agar

MRS tápleves: (VWR International Kft.) 55,2 g/l desztillált víz

M17 tápagar: 57,2 g/l desztillált víz

YEPD tápagar: 0,5 % pepton, 0,5% élesztőkivonat, 1% glükóz, 1,5 % agar, 0,5 % CaCO<sub>3</sub>

YEPD ferdeagar: YEPD tápagar kémcsövekben autoklávozva, majd ferdítve dermesztve

WL agar: 4 g/l élesztőkivonat, 5 g/l pepton, 50 g/l glükóz, 0,55 g/l  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,425 g/l KCl, 0,127 g/l  $\text{CaCl}_2$ , 0,127 g/l  $\text{MgSO}_4$ , 0,0025 g/l  $\text{FeCl}_3$ , 0,0025 g/l  $\text{MnSO}_4$ , 0,022 g/l brómkrezolzöld indikátor

Autoklávbán 122 °C-on 15 percen keresztül steriliztem az oldatokat és tápközegeket.

### 3.3 Vizsgálatokhoz használt anyagok

Gram festés: kristályibolya festékoldat, Lugol-oldat, 95%-os etanol oldat, szafranin festékoldat, desztillált víz

Mikroszkópos vizsgálathoz immerziós olaj

Kálium-hidroxid próba: 3%-os KOH oldat

Kataláz próba: 3%-os  $\text{H}_2\text{O}_2$  oldat

MALDI készülékhez preparátum készítés: 70%-os hangyasav-oldat, HCCA ( $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid) mátrix

### 3.4 Módszerek

#### 3.4.1 Törzsgyűjtemény létrehozása kereskedelembe kapható kombuchákból

Első lépésben a termékekből felrázás után pipettával egy cseppet juttattam tárgylemezre, majd mikroszkóppal megvizsgáltam, hogy meg tudjam becsülni a mikrobaszámot. Ezt követően a termékekből hígítási sort készítettem. 1 ml kombuchát pipettáztam 9 ml hígítóhoz, vortexeltem, majd ebből az oldatból pipettáztam 1 ml-t a második taghoz a 9 ml hígítóba. Ezt ismételtam a megfelelő hígítási tag eléréséig. Munkám során ügyeltem az aszeptikus munkavégzésre, fülke alatt dolgoztam, Bunsen-égő mellett.

A hígítási sor első tagjaiból RBC tápagarra oltottam szélesztéssel, valamint MRS és YEPD tápagarra a hígítási sor minden tagjából (az 5-6. tagig) kioltottam. Felületi szélesztést végeztem, tehát 100  $\mu\text{l}$ -t pipettáztam az adott tagból a Petri-csészébe előre kiöntött tápagar felszínére, majd denaturált szesszel lelángolt szélesztő pálcával szétoszlattam az agar felületén. Az elkészült lemezeket 30 °C-os termosztát szekrényben lefordítva inkubáltam, körülbelül 3-4 napig. Az MRS táptalajra oltott mikrobákat anaerob jar-ban, oxigéntől elzártan inkubáltam. Az oxigénmentes környezet kialakításának érdekében az anaerob tenyészedénybe teamécsest helyeztem, majd meggyújtottam és az edényt lezártam.

A fent leírt folyamatot elvégeztem úgy is, hogy a hígítási sor készítése előtt a termékekből 50-50 ml-t steril centrifugacsövekbe pipettáztam, és lecentrifugáltam (4000 rpm, 10 perc) majd a 0. és 1. taghoz a centrifugacső aljából vettem 100 µl mintát. Tehát ezúttal ötvenszer töményebb termékkel dolgoztam, a módszerek és az inkubálás ugyanaz maradt.

A formálódott telepek morfológiájának szemrevételezése után a különbözőnek vélt telepekből tiszta tenyészeteket készítettem. A telepből lelángolt oltókaccsal vettem mintát, és kihúztam olyan táptalajra, amilyenről a telep származott. A tenyészeteket szintén 30 °C-on inkubáltam, lefordítva. TSA táptalajt abban az esetben használtam, mikor a karbonátos YEED táptalajon nem látszódott megfelelően a telep.

Miután a tiszta tenyészetek is szemmel látható telepeket formáztak, kiválasztottam egy különálló telepet, lelángolt oltókaccsal mintát vettem belőle, és ferdeagarra szélesztettem. Az inkubálás az előző folyamatoknak megfelelően zajlott ez esetben is. Miután a mikrobák megjelentek a ferdeagar felületén, hűtve tároltam őket, hogy lelassuljanak az életfolyamataik.

A későbbiekben a vizsgálatokhoz a csőre oltott mikrobákból vettem mintát, és húztam ki megfelelő táptalajra, így friss telepekkel tudtam dolgozni.

### 3.4.2 Törzsgyűjtemény létrehozása közvetlenül starterkultúrából

Az internetről beszerzett starter kultúra két fázisból állt, egyrészt a szilárd cellulóz biofilmből, másrészt a hozzáadott folyékony kombuchából. Én a folyékony fázisból vettem mintát a leoltáshoz. A starter kultúrából 1 ml-t pipettáztam 9 ml hígítóhoz, így tízszeres hígítást értem el. MRS táptalajra csak közvetlenül a starterkultúrából szélesztettem 100 µl-t. RBC és YEED táptalajra a 0. és 1. tagból is szélesztettem. Az inkubálás ezúttal 25 °C-on zajlott, mivel a starterkultúrához tartozó leírásban 20-25 °C szerepelt.

A képződött telepekkel a termékekből vett mintákból izolált telepekhez hasonlóan jártam el. Tiszta tenyészetet készítettem a különbözőnek vélt telepekből, majd kémcsőre oltottam a mikrobákat, végül hűtve tároltam őket.

### 3.4.3 Kombucha készítése és a fermentáció nyomon követése

Kísérletemhez párhuzamosan 500-500 ml kombucha teát készítettem starterkultúra segítségével, melyeket I. és II. mintának neveztem el. Munkámat oltófülke alatt, Bunsen-égő mellett végeztem. Az tea elkészítéséhez mintánként 450 ml csapvizet forraltam fel, majd hozzáadtam 3-3 g fekete teafüvet, melyet négy percig áztattam. Az áztatást követően steril Erlenmeyer-lombikokba szűrtem át a teákat, sterilizett szűrő segítségével. A teákhoz

előzetesen kétszer 50 ml 8%-os szacharóz oldatot készítettem, majd autoklávban steriliztem. Ezt a steril cukoroldatot adtam a teákhoz az áztatást követően.

A kombucha starterkulturából steril csipesszel kiemeltem a cellulóz biofilmet, majd steril Petri-csészébe helyeztem. A biofilmet szesszel lelángolt szikével megfelezttem, majd egyesével lemértem. Az I. mintába 32, 18 g cellulóz biofilm, a II. mintába 29, 69 g biofilm került. Ezután a starterkultúra folyékony fázisából 50-50 ml-t mértem ki steril mérőhengerrel, majd a teákhoz adtam, majd steril gézdugóval zártam le a lombikokat. Az így elkészült teákat steril üvegbottal megkeverttem, és belőlük 100-100 µl-t pipettáztam MRS, karbonátos YEPD és M17 táptalajra, majd szesszel lelángolt szélesztő pálcával szétoszlattam azt. Az elkészült kombucha mintákat, valamint lemezeket 25 °C-on inkubáltam a leírásnak megfelelően.

A fermentációt 12 napig kísértem figyelemmel, minden második napon mintát vettem a kombucha teákból, majd szélesztettem megfelelő táptalajra. Összesen hatszor vettem mintát a kombuchákból, az előző mintavételekből képződött telepeket pedig minden alkalommal leszámoltam. A sejtszám alapján meghatároztam a fermentálódó tea sejtszámát, az eredményeket TKE/ml-ben adtam meg.

A második mintavétel (fermentáció 2. napja) esetén egytagú hígítási sort készítettem. A 0. tagokból, tehát közvetlenül a kombuchákból, szélesztéssel és lemezöntéssel is készítettem lemezeket. Erre azért volt szükség, mert a beoltás után vett mintákat tartalmazó Petri-csészékben még nem jelentek meg telepek, ezért kevésbé híg mintával is próbálkoztam. A lemezöntést mindhárom táptalaj (MSR, YEPD, M17) esetében elvégeztem. A steril Petri-csészébe 1 ml mintát pipettáztam, majd ráöntöttem az 50 °C-os sterilizett tápágot a csésze egyharmadáig. Lassú mozdulatokkal elkeverttem a lezárt Petri-csészében a mintát, majd hagytam megdermedni. Az 1. tagokból ezúttal is csak szélesztettem.

A további mintavételek (4. nap, 7. nap, 9. nap, 11. nap) során szükség szerint növeltem a hígítási tagok számát, a kioltásokat szélesztéssel végeztem.

A hatodik mintavételezés során az inkubált lemezekon képződött különböző telepeket is izoláltam. A különböző morfológiájú telepekből tiszta tenyészeteket készítettem, inkubálás után pedig csőre oltottam, majd hűtve tároltam őket.

A steril gézdugóval lezárt Erlenmeyer-lombikokat 25°C-on tovább tároltam. Másfél hónap elteltével új cellulóz biofilm jött létre az I. minta felszínén. Ezt steril körülmények között kiemeltem az italból, majd steril stomacher zsákba helyeztem. A kiemelt cellulózfilm 70,4 g

volt, ehhez hozzáadtam 140 ml hígítót, tehát háromszorosára hígítottam a biofilmet. Ezt követően taposó homogenizátorban homogenizáltam a biofilmet. A homogenizált anyagból háromtagú hígítási sort készítettem, majd a nulladik, első és harmadik tagból szélesztettem MRS és YEPD táptalajra. Ezután a kinőtt telepekből az előzőekben leírtakhoz hasonlóan tiszta tenyészeteket hoztam létre.

Így teljessé vált a törzsgyűjteményem, megkezdtem az izolált törzsek vizsgálatát.

#### 3.4.4 Telepmorfológia szerinti differenciálás WL agaron

A WL agart tartalmazó Petri-csészéket négy részre osztottam, és minden negyedre más-más mikrobát szélesztettem lelángolt oltókacccsal a csőre oltott, hűtve tárolt törzsgyűjteményemből. Miután az összes mikrobát felvittem WL agarra, lefordítva inkubáltam őket 25 °C-on. A telepek megjelenése után makromorfológia alapján jellemeztem őket, és csoportokat alkottam a hasonló morfológiájú és színű telepekből.

#### 3.4.5 Gram-festés

A Gram-pozitív és Gram-negatív baktériumok differenciálásához alkalmaztam ezt a festést.

24 órával a Gram-festést megelőzően a csőre oltott, hűtve tárolt tenyészetekből vett mintákat olyan tápagart tartalmazó Petri-csészébe szélesztettem, amilyeneken tárolva volt az adott mikroba törzs, ezáltal friss tenyészettel végeztem a vizsgálatot. A festéshez a tárgylemezt zsirtalanítottam, a Bunsen-égő lángja felett párszor áthúztam. A telepekből lelángolt oltókacccsal vettem kismennyiségű mintát, majd a tárgylemezen szétkentem. Ezt követően fixáltam a kenetet.

A fixálást követően 1 csepp krisályibolya festéket cseppenttem a kenetre, majd 1 percig hagytam állni. Ezután desztillált vízzel leöblítettem a festéket, és hagytam megszáradni.

Száradás után Lugol-oldatot juttattam a preparátumra, amit szintén 1 percig hagytam rajta, majd leöblítettem. Ezt követően fél percig 95%-os alkohollal végeztem a differenciálást. Az alkoholt is lemostam desztillált vízzel. Száradás után a kontraszt festést szafraninnal végeztem 1 percig. Ezt a festéket is lemostam a behatási idő után.

Miután megszáradt a preparátum, egy csepp immerziós olajat cseppenttem a felületére, majd százszoros nagyítású objektívvel vizsgáltam.

### 3.4.6 Kálium-hidroxid próba

A kálium-hidroxid próbához szintén 24 órás tenyészeteket használtam. A tárgylemezt zsírtalanítottam, majd egy csepp 3%-os kálium-hidroxid oldatot cseppentettem rá. Az inokulumból egyszer használatos steril műanyag kaccsal mintát vettem, és alaposan a KOH cseppbe kevertem 5-10 másodpercig. Ezután a kacsot lassan elemeltem a tárgylemeztől, és megfigyeltem, hogy képződött-e az adott mikrobák esetében nyúlós szál, avagy sem, majd az eredményt feljegyeztem.

### 3.4.7 Kataláz próba

A kataláz próbát is fiatal, 24 órás tenyészeteken végeztem. A tárgylemez zsírtalanítása után steril műanyag oltókaccsal inokulumot vittem fel rá. Ezután az inokulumra cseppentettem egy csepp 3%-os hidrogén-peroxidot. Megfigyeltem, hogy tapasztalható-e azonnali pezsgés, buborékképződés. Pezsgés esetén a kataláz próba pozitív.

### 3.4.8 Fajmeghatározás Bruker MALDI Biotyperrel

A Bruker MALDI Biotyperrel végzett fajazonosításhoz fülke alatt, Bunsen-égő mellett készítettem el a preparátumot. Friss (24 órás) tenyészetből steril fogpiszkálóval kismennyiségű kenetet vittem fel a rozsdamentes lemez kijelölt pontjára. Törekedtem arra, hogy a kenet minél vékonyabb legyen. Ezt követően egy csepp 70%-os hangyasavat juttattam rá, majd megvártam, míg ez elpárolog. Miután ez megtörtént, HCCA ( $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid) mátrixot csöppentettem a preparátumra, és hagytam kristályosodni. Ezután a lemezt behelyeztem a MALDI-TOF MS készülékbe, és elindítottam a vizsgálatot. A készülék lézer segítségével ionizálja a kolónia fehérjéit, majd a repülési időből megállapítja a spektrumot. A spektrumot MBT Compass szoftver összehasonlítja a Bruker Main Spectrum Profile könyvtárával, és megállapítja az adott fajt.

A  $\geq 2,000$  score érték azt jelenti, hogy az adott mikrobát faj szinten sikerül beazonosítani a készüléknek. Az 1,700-1,999 közötti érték csak nemzetség szintű beazonosítást jelent, az 1,700 alatti érték pedig nem tekinthető megbízhatónak, alacsony hasonlóságot mutat (Li és *mtsai.*, 2017).

## 4 Eredmények és értékelésük

### 4.1 Kereskedelmi termékekről alkotott kép

A vizsgálataim kezdetén negyvenszeres nagyítású objektívvel felmértem, hogy termékenként körülbelül milyen mikrobaszámra számíthatok, ennek megfelelően készítettem el a hígítási sorokat is. Az A és C termék esetén csak néhány mikroba volt látható látóterenként, B termék esetén viszont nagyon sok mikroorganizmust láttam egy látóteren belül, többségük baktériumnak látszott. Az első leoltást követően azt a következtetést vontam le, hogy kevés élő sejt volt jelen az italokban, mivel nem tapasztaltam telepnövekedést. A centrifugálásra ezért volt szükség. Ezután a töményebb italokból izoláltam a mikroorganizmusokat, melyeket az 5. táblázat foglal össze. Az A termékből származó mikrobákat ZA előtaggal, a B termékből származókat ZB előtaggal, a C termékből származó mikroorganizmusokat pedig ZC előtaggal láttam el, majd az előtag után a megfelelő sorszámot illesztettem.

5. táblázat: Kereskedelmi termékekből izolált mikroorganizmusok (Forrás: Saját szerkesztés)

Mikroorganizmus forrása	Mikroorganizmus jelölése
A termék	ZA1
A termék	ZA2
B termék	ZB1
B termék	ZB2
B termék	ZB3
B termék	ZB4
B termék	ZB5
B termék	ZB6
C termék	ZC1
C termék	ZC2
C termék	ZC3
C termék	ZC4

A későbbiekben a ZB2 mikroorganizmust nem tudtam vizsgálni, mivel az ismételt kioltások során ez a mikroba már nem képzett telepeket, valószínűleg elpusztult a tárolás során.

### 4.2 Kombucha fermentálása starterkultúra alkalmazásával

A starterkultúrából, majd a saját készítésű kombuchából összesen 21 mikroorganizmust különítettem el, melyeket az 6. táblázatban gyűjtöttem össze. A starterkultúrából származó mikroorganizmusok elnevezése KZ előtagból és sorszámból tevődött össze, a saját kombuchából izolált mikrobákat KZM előtaggal láttam el.

6. táblázat: Starterkultúrából és saját fermentálású kombuchából izolált mikrobák (Forrás: Saját szerkesztés)

Mikroorganizmus forrása	Mikroorganizmus jelölése
Starterkultúra	ZK1
Starterkultúra	ZK2
Starterkultúra	ZK3
Starterkultúra	ZK4
Starterkultúra	ZK5
Starterkultúra	ZK6
Starterkultúra	ZK7
Starterkultúra	ZK8
Saját készítésű kombucha	KZM1
Saját készítésű kombucha	KZM2
Saját készítésű kombucha	KZM3
Saját készítésű kombucha	KZM4
Saját készítésű kombucha	KZM5
Saját készítésű kombucha	KZM6
Saját készítésű kombucha	KZM7
Saját készítésű kombucha	KZM8
Saját készítésű kombucha	KZM9
Saját készítésű kombucha	KZM10
Saját készítésű kombucha	KZM11
Saját készítésű kombucha	KZM12
Saját készítésű kombucha	KZM13

A fermentáció végeztével az I. és II. mintákat 25°C-on tároltam. A II. minta a tárolás során befertőződött penésszel, viszont a I. minta felszínén új cellulóz biofilm jött létre (2. ábra), ami a kombucha fermentációjának sikerességét jelezte.

2. ábra: Képződött mikrobiális cellulóz biofilm (Forrás: Saját kép)



A ZP elnevezésű mikroorganizmusok ebből a cellulóz biofilmből származnak (7. táblázat).

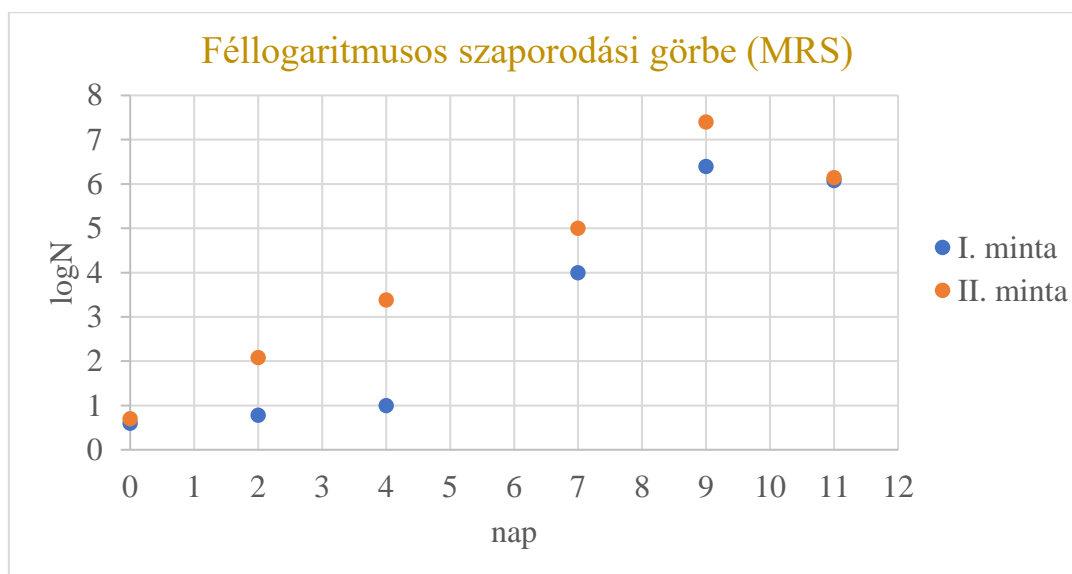
7. táblázat: Cellulóz biofilmből izolált mikroorganizmusok (Forrás: Saját szerkesztés)

Mikroorganizmus forrása	Mikroorganizmus jelölése
Cellulózfilm	ZP1
Cellulózfilm	ZP2
Cellulózfilm	ZP3

#### 4.2.1 Mikrobaszámok alakulása a fermentáció során

A saját kombucha készítésének során a fermentációt mintavételezésekkel a sejtszám alakulása révén követtem nyomon. Az I. és a II. minta fermentációját 11 napig kísértem figyelemmel. Az MRS (3. ábra) és YEPD (4. ábra) táptalajokon leszámolt telepek száma alapján következtettem a sejtszámokra (TKE/ml), majd ezek logaritmizált értékei alapján féllogaritmusos szaporodási görbéket készítettem.

3. ábra: Féllogaritmusos szaporodási görbe a fermentációt MRS táptalajon vizsgálva (Forrás: Saját szerkesztés)

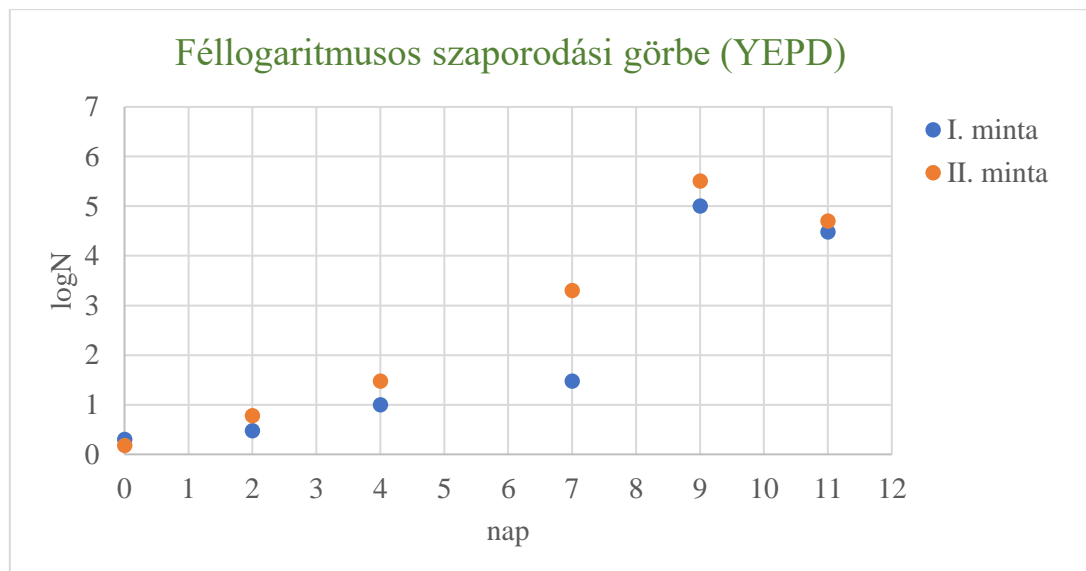


A két párhuzamos minta esetében másképp alakult a fermentáció. Az I. minta esetében a mikrobák szaporodása lassabban indult, a 0-4. napig csak csekély sejtszám növekedés volt megfigyelhető. Ez a lag fázisnak felel meg, ahol a mikroorganizmusok alkalmazkodnak környezetükhöz, felkészülnek az aktív osztódásra. Az exponenciális szakasz a 4-9. napig tartott. A 3. ábrán is megfigyelhető a meredek, lineáris növekedés. A 9. napot követően a stacioner fázis következett, sőt kissé csökkent a mikrobák száma.

A II. mintában a mikroorganizmusok ezzel szemben gyorsabban reagáltak a környezeti változásokra, a lag fázis rövidebb volt ebben az esetben, szinte rögtön szaporodásnak indultak a mikrobák. A mintavételezés alapján ez a minta is a 9. napon érhetette el a maximális sejtszámot, ezután a stacioner fázis következhetett.

Összességében a két minta növekedési dinamikája MRS táptalajon vizsgálva hasonló lefutást mutatott. A fermentáció végén  $10^6$ , illetve  $10^7$  nagyságrendben voltak jelen a mikrobák. II. mintában kissé magasabb sejtszámot figyeltem meg az I. mintához képest, annak ellenére, hogy a II. minta beoltása némileg kisebb tömegű SCOBY-val történt (3.4.3 fejezet). Ez magyarázható azzal, hogy a cellulóz biofilmben nem egyenletesen oszlottak el a mikroorganizmusok, így a felezésénél az egyik mintába több mikroba juthatott a másiknál.

4. ábra: Féllogaritmusos szaporodási görbe YEPD táptalajon vizsgálva (Forrás: Saját szerkesztés)



YEPD táptalajon az I. és a II. minta esetében is hasonló dinamikát mutatott a mikroorganizmusok szaporodása (4. ábra), annyi különbséggel, hogy a II. mintában ezen a táptalajon is az MRS-hez hasonlóan magasabb sejtszámot figyeltem meg ugyanazon a napon az I. mintához képest. A kezdeti sejtszám mindkét mintánál alacsony volt. A második napon történ mintavételezéskor már megfigyelhető volt a mikrobák szaporodása. A hetedik napig viszonylag egyenletesen növekedett a sejtszám mindkét esetben, ezután a kilencedik napon meredekebb ugrást figyeltem meg, itt érhatték el a mikrobák a maximális sejtszámot ( $10^5$  nagyságrend), hasonlóan az MRS táptalajon megfigyeltekhez. A kilencedik napot követően szintén csökkent a mikrobaszám, ez már a stacioner fázishoz tartozhatott mindkét minta esetében.

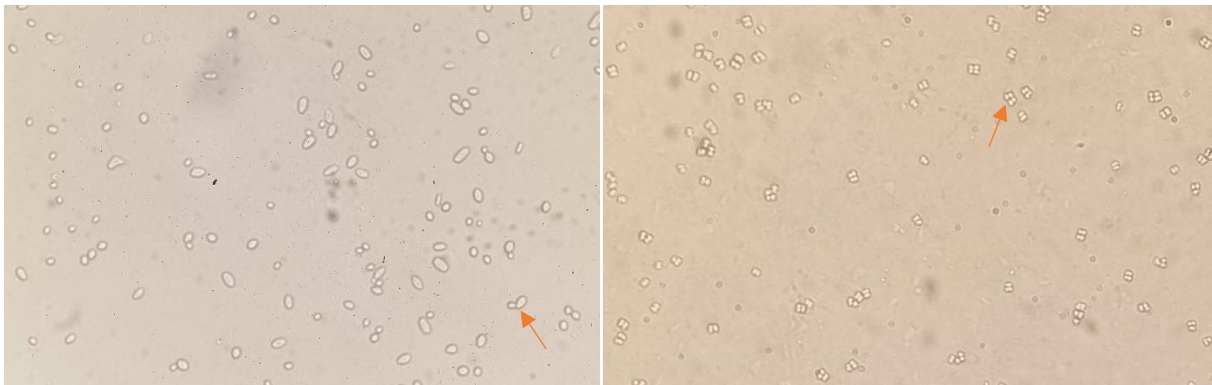
Az MRS és YEPD táptalajokon növekedő mikrobák hasonlóképpen fejlődtek, azonban MRS táptalajon körülbelül egy nagyságrenddel magasabb sejtszámot mutattak a minták, mint YEPD táptalajon. Az eredmények alapján megállapítható volt, hogy a fermentáció az alkalmazott körülmények között kilenc napig tartott, ami megfelel az irodalmi adatoknak, amelyek 7-14 napos fermentációs időről számolnak be (Wang és *mtsai.*, 2022).

#### 4.3 Az izolált mikrobák elsődleges azonosítása gyorstesztekkel

Az izolálás során a szabad szemmel megkülönböztethető morfológiájú teleptípusokat különítettem el, ezekből állt össze a törzsgyűjteményem. Összesen 36 mikrobát gyűjtöttem, majd különböző vizsgálatokkal azonosítottam a fajokat.

Az izolálás után mindegyik mikrobát mikroszkóp alatt negyvenszeres nagyítás mellett vizsgáltam, hogy megállapítsam baktérium vagy élesztőgomba-e az adott mikroorganizmus. Az 5. ábra baloldalán az izolált törzsek közül élesztőgomba, a jobboldalán pedig baktérium látszik. Az 5. ábrán a nyilak a jellegzetes morfológiájú sejteket mutatják. Az ellipszoid élesztő esetén jól látható sarjadzásokat figyeltem meg. A baktériumnál tetrádba rendeződött coccusokat állapítottam meg ez esetben.

*5. ábra: Mikroszkópos kép KZM4 (bal) és KZM1 (jobb) mikrobákról (Forrás: Saját képek)*



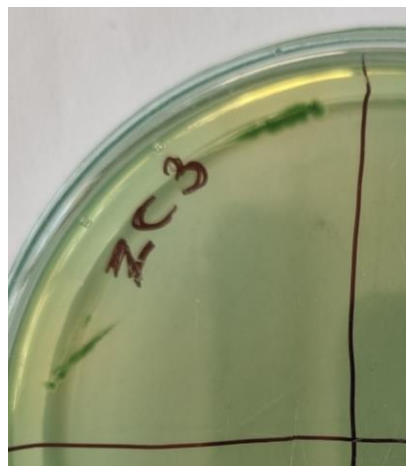
Ezt követően a pontosabb differenciálás céljából WL agarlemezre oltottam a gyűjteményem tagjait. Az élesztő izolátumok többsége a WL agaron világoszöld színű telepeket képzett, a környezetükben a táptalaj pedig sárga színűre változott. Néhány élesztőtörzs esetében a telepek sötétebb zöld színűek voltak, ám a környezetük szintén sárga volt (6. ábra). A WL agar sárgulása a brómkrezolzöld indikátor savérzékenységének tudható be, mivel pH 5 alatt kékeszöld színe sárgára változik. Az élesztőgombák anyagcsere aktivitása során szerves savak is képződnek, melyek csökkentik a táptalaj pH-ját.

6. ábra: Élesztőgombák (KZM6 (bal alsó), KZM7 (jobb alsó), KZM8 (jobb felső), KZM9 (bal felső)) WL agaron (Forrás: Saját kép)



A baktériumok nagy része nem hozott létre telepeket WL agaron, amelyik viszont kismértékű növekedést mutatott, sötétzöld telepeket képzett, valamint a háttére zöld maradt (7. ábra).

7. ábra: Baktérium (ZC3) WL agaron (Forrás: Saját kép)



A kereskedelmi termékekből kizárólag baktériumokat sikerült izolálnom (ZA1, ZA2, ZB1, ZB3, ZB4, ZB5, ZB6, ZC1, ZC2, ZC3, ZC4). A starterkulturából egyedül élesztőgombákat izoláltam (ZK1, ZK2, ZK3, ZK4, ZK5, ZK6), a belőle készült kombuchából viszont két baktériumot is elkülönítettem (KZM1 és KZM3). A kombuchából szintén izoláltam élesztőgombákat (KZM3, KZM4-KZM13)

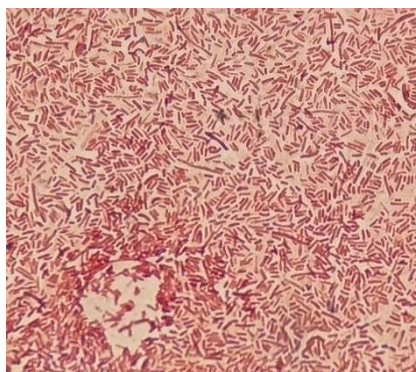
A baktériumok további vizsgálatánál a szakirodalmak alapján főként ecetsav baktériumokra számítottam, ugyanakkor azt is vizsgálni kívántam, hogy tejsavbaktériumok jelen lehetnek-e a termékekben a potenciális probiotikus tulajdonságok igazolására. Ennek vizsgálatára Gram-festést, kálium-hidroxid próbát és kataláz próbát alkalmaztam. A vizsgálatok eredményeit az 8. táblázat foglalja össze.

8. táblázat: Baktériumok vizsgálatának eredményei (Forrás: Saját szerkesztés)

Baktériumfaj	Gram-festés	KOH próba	Kataláz próba
KZM1	+	-	+
KZM3	+	-	+
ZA1	-	+	-
ZA2	-	+	+
ZB1	+	-	+
ZB3	-	+	+
ZB4	+	-	+
ZB5	+	-	+
ZB6	-	+	+
ZC1	+	-	+
ZC2	+	-	+
ZC3	+	-	+
ZC4	+	-	+

A Gram-festés és a KOH próba eredményei egybehangzóak voltak, megállapítottam, hogy mely izolátumok a Gram-pozitív (+), és melyek a Gram-negatív (-) mikroorganizmusok.

8. ábra: ZA2 (Gram-negatív) baktérium Gram-festés (Forrás: Saját kép)



Pozitív KOH próbát (+) Gram-negatív mikrobák adnak, mivel külső membránjukat a lúg feloldja, így a sejtalkotók és a DNS kiáramlik, nyálkás szál húzható a műanyag hurokkal. A vizsgált baktériumok közül majdnem az összes kataláz pozitív lett (+), kivéve a ZA1 baktériumot, ami arra utal, hogy ez a baktérium anaerob, fermentatív anyagcserét folytat.

#### 4.4 Izolátumok fajszerű meghatározása

A végső, fajszerű azonosítást Bruker MALDI-TOF-MS Biotyper készülékkel végeztem. Összevettem az eddigi vizsgálataim eredményeit, és csoportokat alkottam a hasonló tulajdonságú mikroorganizmusokból, majd ezekből választottam ki egy-egy fajt a meghatározáshoz. A kiválasztás során fontos szempont volt, hogy minden termékből minimum egy mikroorganizmus szerepeljen az azonosítani kívánt minták között. Azokat a

mikroorganizmusokat, melyeket nem tudtam csoportosítani, illetve valamilyen szempontból kirívóak voltak, szintén kiválasztottam az azonosításhoz. Összesen 19 izolátumot választottam ki a beazonosításhoz. Az azonosított fajokat a 6. táblázat foglalja össze.

9. táblázat: MALDI-TOF-MS módszerrel azonosított mikroorganizmus fajok (Forrás: Saját szerkesztés)

Mikroba kódja	Azonosított faj	Score érték
KZM1 (I. minta)	<i>Micrococcus luteus</i>	2,30
KZM2 (I. minta)	<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	2,22
KZM3 (II. minta)	<i>Bacillus circulans</i>	2,03
KZM4 (II. minta)	<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	2,06
KZM7 (II. minta)	<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	2,07
KZM10 (I. minta)	<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	1,81
KZM12 (I. minta)	<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	1,94
ZK2	<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	2,15
ZK4	<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	2,01
ZK7	<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	1,96
ZB1	<i>Paenibacillus tylopili</i>	2,13
ZB4	<i>Paenibacillus pabuli</i>	2,03
ZB5	<i>Bacillus cereus</i>	1,82
ZC3	<i>Bacillus coagulans</i>	1,71
ZP1	<i>Bacillus pumilus</i>	1,99
ZP2	<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	2,09
ZP3	<i>Staphylococcus warneri</i>	2,12

Az általam készített kombuchából kizárólag *Zygosaccharomyces bailii* élesztőgombát sikerült faj szinten beazonosítani. A starterkultúrából is csak ezt a fajt sikerült azonosítani, így ez az eredmény nem meglepő. Ugyanakkor feltételeztem, hogy a starterkultúra baktériumokat, elsősorban ecetsav baktériumokat is tartalmazni fog. Annak, hogy nem tudtam izolálni oka lehet, hogy a vásárolt starterkultúrában már nem voltak élő baktériumok.

A *Zygosaccharomyces bailii* a szakirodamak alapján gyakran említésre kerül a kombucha fermentációjának kapcsán (Villarreal-Soto és mtsai., 2018, Watawana és mtsai., 2015). Ez az élesztőfaj ozmotoleráns, savtűrő és alkohol rezisztens (Mira és mtsai., 2014). A kombucha mintákból (I. és II. minta) a fermentáció végén vettem mintát, az izolátumok a folyamat végső állapotát tükrözik. A *Zygosaccharomyces bailii* kizárólagos jelenléte a fermentáció előrehaladott, savas szakaszára utal, ahol már csak savtűrő mikroorganizmus marad életképes. Megjegyzendő, hogy néhány izolátum esetében a score érték 2,00 alatti volt, így felvetődik annak a lehetősége is, hogy más, a *Zygosaccharomyces* nemzetségbe tartozó faj is jelen volt.

Az I. mintából *Micrococcus luteus* fajt is izoláltam. Ez a Gram-pozitív, aerob, coccus alakú baktérium általában megtalálható talajban, vízben és emlősök bőrén is (Li és mtsai., 2021). Kontamináció következtében juthatott a kombuchába, a fermentációban nem vett részt.

A II. mintában szintén kontaminációt jelez a *Bacillus circulans* jelenléte. Ez a Gram-pozitív pálcá alakú baktérium sem vesz részt a kombucha fermentációjában.

A fermentációs mintákból nem sikerült a fermentációban résztvevő baktériumok izolálása. A starterkultúrából kontamináló fajt nem azonosítottam, tehát valószínűleg nem belőle származott a két azonosított baktérium, hanem a készítés során kerülhetett a mintákba. A baktériumok forrása lehetett a tealevél, amely gyakran szennyezett a *Bacillus* nemzetségbe tartozó mikroorganizmokkal (Zhang és mtsai., 2016).

A homogenizált biofilmből izolált törzseket faj szinten is beazonosítottam. *Zygosaccharomyces bailii* ebben az esetben is jelen volt. A két baktériumtörzs (ZP1, ZP3), amit azonosítottam, szintén nem a kombucha fermentációjának résztvevői, kontamináló fajokról van szó.

Az A termékből sajnos nem tudtam faj szinten azonosítani az általam izolált két mikroorganizmust, mivel alacsony, 1,67-es score értékeket kaptam. A ZA1-t coccus alakú, Gram-negatív és kataláz negatív mikroorganizmusként azonosítottam. A ZA2 (6. ábra) pálcá alakú mikroba Gram-negatív, kataláz pozitív volt a vizsgálataim alapján. Ezen tulajdonságok és a mikroszkópos kép alapján (8. ábra) lehetséges, hogy ZA2 esetében ecetsav baktériumról van szó, amely részt vehetett a kombucha fermentálásában.

A B termék esetén két izolátumot azonosítottam faj szinten, a *Paenibacillus tylopili*-t és a *Paenibacillus pabuli*-t. Ezen kívül alacsony score érték mellett a *Bacillus cereus*-t kaptam eredményül, amely alapján az izolátum a *Bacillus* nemzetséghez tartozó faj lehet. A *Paenibacillus* nemzetség tagjai Gram-pozitívak, amit a vizsgálataim is alátámasztottak. Főként a talajban és növényi gyökérzetben találhatóak meg (Grady és mtsai., 2016). Nem patogén mikroorganizmusok, viszont a kombucha fermentációjában nincs szerepük. A *Bacillus spp*-ként azonosított izolátum esetében amennyiben a további vizsgálatok igazolják, hogy *Bacillus cereus*, ami egy opportunistá patogén mikroba (Messelhäußer és Ehling-Schulz, 2018), és ételmiszerromlást indikál (Bottone, 2010), akkor ez ételmiszerbiztonsági kockázatot jelenthet, amennyiben az is igazolódik, hogy valóban a termékből származik.

A C termékből izolált mikroorganizmusok morfológiailag, és a vizsgálatok eredményei alapján egy csoportot képeztek. A ZC3-as izolátumot választottam fajszerű beazonosításra. Az

azonosítás eredménye *Bacillus coagulans* lett. Jayablan és munkatársai (2014) szerint a *Bacillus* fajok nem fő alkotóelemei a kombucha mikrobiális közösségének, azonban időszakos jelenlétük hozzájárulhat a pH csökkenéséhez savtermelésük révén, valamint a bioaktív vegyületek kialakulásában is szerepük lehet. A termék weboldalán az összetevők között szerepel a *Bacillus coagulans*, tehát a kísérletem a kapott alacsony score érték ellenére alátámasztja, hogy a termékben az élő baktérium található.

Összességében diverzebb mikrobaközösségre számítottam a kereskedelmi termékeknél, mivel a vizsgálatok megkezdése előtt mintát vettem az italokból, és a mikroszkópos vizsgálat során sok mikroorganizmust láttam. Az eredményem oka az lehet, hogy a kereskedelmi kombuchák némelyikét valamilyen eljárással stabilizálták, hiszen ha nem állítják le a fermentációt, a termék további erjedésen megy keresztül, ami a kombucha nem megfelelő ízéhez, szélsőséges esetben a tároló üveg felrobbanásához vezethet. A stabilizálás következtében valószínűleg elpusztulhattak a mikroorganizmusok.

Tejsavbaktériumok valószínűleg nem voltak jelen a saját fermentálású kombuchában, mivel M17 táptalajon semmilyen mikroorganizmus nem nőtt egyik alkalommal sem, illetve az izolált mikroorganizmusok között sem volt erre utaló tulajdonságú. A tejsavbaktériumok azonban nem minden esetben elemei a kombucha fermentációját végző mikroorganizmusoknak.

## 5 Következtetések és javaslatok

### 5.1 Következtetések

A kísérleteim általánosságban alátámasztják a szakirodalmi adatokat. Az áttekintésben leírtak alapján a házi készítésű kombuchákban inkább az élesztők dominálnak, míg a kereskedelemben olyan starterkultúrákkal dolgoznak, amikben a baktériumok vannak túlsúlyban. Vizsgálataim ezt megerősítették, mivel a kereskedelmi forgalomban kapható termékekből csak baktériumokat izoláltam, míg a készített kombuchából túlnyomórészt élesztőket tudtam kimutatni. A *Zygosaccharomyces bailii* élesztőgomba széleskörűen említésre kerül a kombucha fermentációjának kapcsán. Vizsgálataim megerősítik, hogy ez a faj dominánsan előfordul, mivel mind a starterként használt kultúrából, mind pedig a saját készítésű kombuchából izoláltam. Azt, hogy nem izoláltam baktériumokat a fermentált saját készítésű kombuchából, magyarázhatja, hogy a starter kultúrában is csak élesztőgomba (*Zygosaccharomyces bailii*) volt jelen.

A kereskedelmi termékek vizsgálata során a vártnál kevésbé diverz, és kisebb számú mikrobaközösséget tudtam kimutatni, mivel az izolátumok között nem voltak élesztők és ecetsav baktériumok sem. Ebből azt a következtetést vontam le, hogy a termékek valamilyen módon stabilizálva lehetnek, a kereskedelembé kerülve már nem, vagy csak minimálisan tartalmaztak élő mikroorganizmust.

A GUTsy Captain Original kombucha (C termék) esetében a termékcímkén az az információ szerepel, hogy tartalmaz élőflórát (*Bacillus coagulans*) az italuk, ezt sikerült is izolálnom és beazonosítanom.

Tejsavbaktériumokat, illetve más probiotikus törzseket a C termékből izolált *Bacillus coagulans* kivételével nem sikerült izolálnom (Cao és mtsai., 2020). Ebből arra következtetek, hogy az általam vizsgált kombuchák többsége nem bír probiotikus tulajdonsággal, ám ez nem zárja ki az egészségre gyakorolt pozitív hatásukat a bioaktív vegyületek révén.

### 5.2 Javaslatok

Érdeemes lenne a kombucha teljes fermentációs folyamatának vizsgálata, beleértve a mikrobák izolálását, valamint a pH nyomon követését. A bioaktív anyagok azonosítása, és koncentrációjuk változását a fermentáció folyamán szintén célszerű lenne vizsgálni. Így pontosabb képet lehetne alkotni a fermentációról és a mikrobaközösség változásairól.

A fermentációt más paraméterek mellett is érdemes lehet megvizsgálni, például 30°C-on végezni az erjesztést, mivel ezt szakirodalom alapján jobbnak találták mikrobiadiverzitás szempontjából (De Filippis és *mtsai.*, 2018).

A kereskedelmi termékek esetén érdemes lenne nagyobb mintaszámot, valamint különböző ízesített, vagy gyógynövényekből készült kombuchákat vizsgálni.

## 6 Összefoglalás

A szakdolgozatom és kutatásom célja a különböző kombucha teák mikrobaközösségének vizsgálata és azonosítása volt. Munkám során kereskedelemben kapható kombuchák mikrobiológiai összetételét vizsgáltam, illetve a fermentációt laboratóriumi körülmények között modelleztem párhuzamos mintákkal. Az izolátumokat főként MRS és YEPD táptalajon tenyésztettem, mivel élesztőgombákra, ecetsav és tejsav baktériumokra számítottam elsősorban.

A kutatásom első szakaszában izoláltam a kereskedelmi termékekből és starterkultúrából származó mikroorganizmusokat. Ezt követően a starterkultúra segítségével elkészítettem a saját kombuchámat is, melynek sejtszám alakulását tizenegy napig követtem nyomon. A tizenegyedik napon vett mintákból szintén izoláltam mikrobákat.

Mikor a törzsgyűjteményem tejessé vált (36 izolátumot gyűjtöttem), mikroszkópos és mikrobiológiai vizsgálatoknak vettem alá a mikrobákat. Kutatásom során mikroszkópos vizsgálattal megállapítottam a mikrobák morfológiáját, WL agaron telepmorfológia alapján differenciáltam a mikroorganizmusokat. A baktériumokon Gram-festést, KOH próbát és kataláz próbát is végeztem a beazonosíthatóság érdekében. Vizsgálataim eredményeként a kereskedelemben kapható termékekből baktériumokat, a sajátkészítésű kombuchákból pedig főként élesztőket sikerül beazonosítanom. A hasonló mikrobákból csoportokat alkottam, majd kiválasztottam azokat, amelyeket faj szinten szerettem volna meghatározni. Az azonosításhoz Bruker MALDI Biotyper készüléket használtam.

Az azonosított fajok részben egyeztek a szakirodalomban leírtakkal, a saját kombuchából izolált *Zygosaccharomyces bailii*-t sokszor említik a SCOBY résztvevőjeként. Az A termékből nem sikerült faj szinten beazonosítani az izolátumokat, azonban a vizsgálatok során megállapított tulajdonságok alapján az egyiket lehetséges ecetsav baktériumként azonosítottam. A B termékekből olyan baktériumokat izoláltam, amelyek nem vesznek részt a fermentációban, ami arra enged következtetni, hogy a fermentációt végző mikroorganizmusok elpusztultak ebben az italban, valamint hogy az azonosított izolátumok esetleg utólagos kontamináció révén kerültek a termékekbe. A C termékből kizárólag *Bacillus coagulans* baktériumot azonosítottam, ami összhangban van a gyártó által a termék címkéjén deklarált mikrobával. Ez a mikroorganizmus ismert probiotikus tulajdonságairól (Cao és *mtsai.*, 2020).

A mikrobák szaporodásának nyomon követéséhez az általam készített kombuchából kétnaponta vett mintákat MRS és YEPD táptalajon tenyésztettem, majd inkubálást követően leszámoltam a

telepeket, amiből következtettem a sejtszámokra. A szaporodási dinamika kiértékeléséhez féllogaritmusos szaporodási görbéket készítettem táptalajonként, amik megmutatták a kombuchára jellemző mikrobaszaporodást, és elkülöníthetővé váltak a szaporodás egyes fázisai. A fermentáció végén a kombuchák elérték a  $10^6$  sejt/ml koncentrációt.

Összességében dolgozatomban átfogó képet nyújt a kereskedelmi és a saját készítésű kombuchák mikrobiológiai közösségének laboratóriumi vizsgálatáról, illetve a mikrobák szaporodásának dinamikájáról. Munkám eredménye alapot adhat további, részletesebb mikrobiológiai és biokémiai vizsgálatokhoz, valamint a fermentációs folyamatok optimalizálásának vizsgálatához.

## 7 Irodalmi hivatkozás

Aduri, P., Rao, K. A., Fatima, A., Kaul, P. és Shalini, A. (2019): Study of Biodegradable Packaging Material Produced from SCOBY. *Life Science Informatics Publications*, 5, 389–404.

Alves, R. O., de Oliveira, R. L., de Moraes, M. M., Santos, W. W. V., Gomes da Câmara, C. A., da Silva, S. P., Porto, C. S. és Porto, T. S. (2025): Evaluation of the Impact of Fermentation Conditions, Scale Up and Stirring on Physicochemical Parameters, Antioxidant Capacity and Volatile Compounds of Green Tea Kombucha. *Fermentation*, 11(4), 201. <https://doi.org/10.3390/fermentation11040201>

Andrade, D. K. A., Wang, B., Lima, E. M. F., Shebeko, S. K., Ermakov, A. M., Khramova, V. N., Ivanova, I. V., Rocha, R. da S., Vaz-Velho, M., Mutukumira, A. N. és Todorov, S. D. (2025): Kombucha: An Old Tradition into a New Concept of a Beneficial, Health-Promoting Beverage. *Foods*, 14(9), 1547. <https://doi.org/10.3390/foods14091547>

Antolak, H., Piechota, D. és Kucharska, A. (2021): Kombucha Tea — A Double Power of Bioactive Compounds from Tea and Symbiotic Culture of Bacteria and Yeasts (SCOBY). *Antioxidants*, 10(10), 1541. <https://doi.org/10.3390/antiox10101541>

Banerjee, S. és Chatterjee, J. (2015): Efficient extraction strategies of tea (*Camellia sinensis*) biomolecules. *Journal of Food Science and Technology*, 52(6), 3158–3168. <https://doi.org/10.1007/s13197-014-1487-3>

Barros, C. P., Dias, M., Guimarães, R., Gomes, D., Faria, J., és Saad, S. M. (2020): Paraprobiotics and postbiotics: concepts and potential applications in dairy products. *Current Opinion in Food Science*, 32, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2019.12.003>

Bishop, P., Pitts, E. R., Budner, D., és Thompson-Witrick, K. A. (2022): Kombucha: Biochemical and microbiological impacts on the chemical and flavor profile. *Food Chemistry Advances*, 1, 100025. <https://doi.org/10.1016/j.focha.2022.100025>

Blanc, P. J. (1996): Characterization of the tea fungus metabolites. *Biotechnol. Lett.* 18(2):139-142.

Bottone, E. J. (2010): *Bacillus cereus*, a Volatile Human Pathogen. *Clinical Microbiology Reviews*, 23(2), 382–398. <https://doi.org/10.1128/CMR.00073-09>

Burgess, C. M., Irvine, K., and Griffiths, M. (2006): A general method for selection of riboflavin-overproducing food grade micro-organisms. *Microbial Cell Factories*, 5(1), 24. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-5-24>

Butt, M. S., Tahir-Nadeem, M., Khan, M. K., Shabir, R., és Butt, M. (2014): Black tea polyphenols: a mechanistic treatise. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 54(8), 1002–1011. <https://doi.org/10.1080/10408398.2011.623198>

Cai, M., Yang, Y., Yu, J., és Xu, L. (2022): Lactate Is Answerable for Brain Function and Treating Brain Diseases: Energy Substrates and Signal Molecule. *Frontiers in Nutrition*, 9, 800901. <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.800901>

Cao, J., Yu, Z., Liu, W., Zhao, J., Zhang, H., és Chen, W. (2020): Probiotic characteristics of *Bacillus coagulans* and associated implications for human health and diseases. *Journal of Functional Foods*, 64, 103643. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2019.103643>

Chakravorty, S., Bhattacharya, S., Chatzinotas, A., Chakraborty, W., Bhattacharya, D., és Gachhui, R. (2016): Kombucha tea fermentation: Microbial and biochemical dynamics. *International Journal of Food Microbiology*, 220, 63–72. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.12.015>

Coelho, R. M. D., da Silva, L. V., Gomes, F. S., és Pinto, M. S. (2020): Kombucha: Review. *International Journal of Gastronomy and Food Science*, 22, 100272. <https://doi.org/10.1016/j.ijgfs.2020.100272>

Costa, M. A. de C., Magalhães-Guedes, K. T., Souza, A. P. S., Cardoso, V. M., Dias, D. R., és Schwan, R. F. (2022): Kombuchas from Green and Black Tea Modulate the Gut Microbiota and Improve the Intestinal Health of Wistar Rats Fed a High-Fat High-Fructose Diet. *Nutrients*, 14(24), 5234. <https://doi.org/10.3390/nu14245234>

Coton, M., Pawtowski, A., Tissier, A., és Roguet, A. (2017): Unraveling microbial ecology of industrial-scale Kombucha fermentations by metabarcoding and culture-based methods. *FEMS Microbiology Ecology*, 93(5), fix048. <https://doi.org/10.1093/femsec/fix048>

De Filippis, F., Valentino, V., Ercolini, D., és Tufariello, M. (2018): Different temperatures select distinctive acetic acid bacteria species and promotes organic acids production during Kombucha tea fermentation. *Food Microbiology*, 73, 11–16. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.01.008>

Değirmencioglu, N., Altun, S., Deveci, H., és Demirci, M. (2021): Impact of tea leaves types on antioxidant properties and bioaccessibility of kombucha. *Journal of Food Science and Technology*, 58(6), 2304–2312. <https://doi.org/10.1007/s13197-020-04741-7>

Dufresne, C. és Farnworth, E. (2000): Tea, Kombucha, and health: a review. *Food Research International*, 33(6), 409–421. [https://doi.org/10.1016/S0963-9969\(00\)00067-3](https://doi.org/10.1016/S0963-9969(00)00067-3)

Dwyer, J. T. és Peterson, J. (2013): Tea and flavonoids: where we are, where to go next. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 98(6 Suppl), 1611S–1618S. <https://doi.org/10.3945/ajcn.113.059584>

Fu, C., Yan, F., Cao, Z., Xie, F., Lin, J., és Wang, Y. (2014): Antioxidant activities of kombucha prepared from three different substrates and changes in content of probiotics during storage. *Food Science and Technology*, 34, 123–126. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612014005000012>

Gore, J., Youk, H., és van Oudenaarden, A. (2009): Snowdrift game dynamics and facultative cheating in yeast. *Nature*, 459(7244), 253–256. <https://doi.org/10.1038/nature07921>

Grady, E. N., MacDonald, J., Liu, L., Richman, A., és Yuan, Z. C. (2016): Current knowledge and perspectives of *Paenibacillus*: a review. *Microbial Cell Factories*, 15(1), 203. <https://doi.org/10.1186/s12934-016-0603-7>

Crum, H. és LaGory, A. (2016): *The Big Book of Kombucha: Brewing, Flavoring, and Enjoying the Health Benefits of Fermented Tea*. North Adams: Storey Publishing.

Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G. R., Merenstein, D. J., Pot, B., Morelli, L., Canani, R. B., Flint, H. J., Salminen, S., Calder, P. C., és Sanders, M. E. (2014): The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 11(8), 506–514. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2014.66>

Hopfe, S., Flemming, K., Harnisch, F., és Neu, T. R. (2017): Leaching of rare earth elements from fluorescent powder using the tea fungus *Kombucha*. *Waste Management*, 62, 211–221. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2017.02.005>

Ibrahim, S. A., Ayivi, R. D., Zimmerman, T., Siddiqui, S. A., Altemimi, A. B., Fidan, H., és Esatbeyoglu, T. (2021): Lactic Acid Bacteria as Antimicrobial Agents: Food Safety and Microbial Food Spoilage Prevention. *Foods*, 10(12), 3131. <https://doi.org/10.3390/foods10123131>

Ivanišová, E., Šturdík, E., Kleinová, T., Mendelová, A., és Mikušová, L. (2020): The evaluation of chemical, antioxidant, antimicrobial and sensory properties of kombucha tea beverage. *Journal of Food Science and Technology*, 57(5), 1840–1846. <https://doi.org/10.1007/s13197-019-04217-3>

Jayabalan, R., Malbaša, R. V., Lončar, E. S., Vitas, J. S., és Sathishkumar, M. (2014): A Review on Kombucha Tea—Microbiology, Composition, Fermentation, Beneficial Effects, Toxicity, and Tea Fungus. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13(4), 538–550. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12073>

Jayabalan, R., Marimuthu, S., és Swaminathan, K. (2007): Changes in content of organic acids and tea polyphenols during kombucha tea fermentation. *Food Chemistry*, 102(1), 392–398. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.05.032>

Lahiri, D., Nag, M., Dutta, B., Dey, A., Ray, R. R., és Rajendran, R. (2021): Bacterial Cellulose: Production, Characterization, and Application as Antimicrobial Agent. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(23), 12984. <https://doi.org/10.3390/ijms222312984>

Laureys, D., Britton, S. J., és De Clippeleer, J. (2020): Kombucha Tea Fermentation: A Review. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 78(3), 165–174. <https://doi.org/10.1080/03610470.2020.1734150>

Li, Y., Li, X., Li, B., Wang, L., Li, Y., Wang, Q., és Zhao, X. (2017): Evaluation of the Bruker Biotyper Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry System for Identification of *Aspergillus* Species Directly from Growth on Solid Agar Media. *Frontiers in Microbiology*, 8, 1209. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01209>

Li, Y., Wu, L., Guo, Y., Zeng, Q., Yang, X., és Wang, Y. (2021): Comparative genomics reveals broad genetic diversity, extensive recombination and nascent ecological adaptation in *Micrococcus luteus*. *BMC Genomics*, 22, 124. <https://doi.org/10.1186/s12864-021-07432-5>

- Liu, S., és Qureshi, N. (2009): How microbes tolerate ethanol and butanol. *New Biotechnology*, 26(3), 117–121. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2009.06.984>
- Lorenzo, J. M., és Munekata, P. E. S. (2016): Phenolic compounds of green tea: Health benefits and technological application in food. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 6(8), 709–719. <https://doi.org/10.1016/j.apjtb.2016.06.010>
- Shoda, M. és Sugano, Y. (2005): *Recent advances in bacterial cellulose production*. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 10(1), 1–8. <https://doi.org/10.1007/BF02931175>
- Malbaša, R. V., Lončar, E. S., Đurić, M. S. és Došenović, I. (2008): Effect of sucrose concentration on the products of Kombucha fermentation on molasses. *Food Chemistry*, 108(3), 926–932. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.11.069>
- Marsh, A. J., O’Sullivan, O., Hill, C., Ross, R. P. és Cotter, P. D. (2014): Sequence-based analysis of the bacterial and fungal compositions of multiple kombucha (tea fungus) samples. *Food Microbiology*, 38, 171–178. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2013.09.003>
- Martínez Leal, J., Valenzuela Suárez, L., Jayabalan, R., Huerta Oros, J. és Escalante-Aburto, A. (2018): A review on health benefits of kombucha nutritional compounds and metabolites. *CyTA – Journal of Food*, 16(1), 390–399. <https://doi.org/10.1080/19476337.2017.1410499>
- May, A., Narayanan, S., Alcock, J., Varsani, A., Maley, C. és Aktipis, A. (2019): Kombucha: a novel model system for cooperation and conflict in a complex multi-species microbial ecosystem. *PeerJ*, 7, e7565. <https://doi.org/10.7717/peerj.7565>
- Messelhäußer, U. és Ehling-Schulz, M. (2018): *Bacillus cereus* – a multifaceted opportunistic pathogen. *Current Clinical Microbiology Reports*, 5(2), 120–125. <https://doi.org/10.1007/s40588-018-0095-9>
- Mira, N. P., Palma, M., Guerreiro, J. F., Sá-Correia, I. és Pais, C. (2014): The genome sequence of the highly acetic acid-tolerant *Zygosaccharomyces bailii*-derived interspecies hybrid strain ISA1307, isolated from a sparkling wine plant. *DNA Research*, 21(3), 299–313. <https://doi.org/10.1093/dnares/dst058>
- Mohite, B. V. és Patil, S. V. (2014): A novel biomaterial: bacterial cellulose and its new era applications. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 61(2), 101–110. <https://doi.org/10.1002/bab.1148>
- Murugesan, G. S., Sathishkumar, M. és Swaminathan, K. (2005): Supplementation of waste tea fungal biomass as a dietary ingredient for broiler chicks. *Bioresource Technology*, 96(16), 1743–1748. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2005.01.006>
- Nguyen, N. K., Nguyen, P. B., Nguyen, H. T. és Le, P. H. (2015): Screening the optimal ratio of symbiosis between isolated yeast and acetic acid bacteria strain from traditional kombucha for high-level production of glucuronic acid. *LWT – Food Science and Technology*, 64(2), 1149–1155. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.07.018>

- Nyhan, L. M., Tierney, N., O'Connor, P. M., Stanton, C., Ross, R. P. és Hill, C. (2022a): Advances in Kombucha Tea Fermentation: A Review. *Applied Microbiology*, 2(1), 73–103. <https://doi.org/10.3390/applmicrobiol2010005>
- Nyhan, L. M., Tierney, N., O'Connor, P. M., Stanton, C., Ross, R. P. és Hill, C. (2022b): Advances in Kombucha Tea Fermentation: A Review. *Applied Microbiology*, 2(1), 73–103. <https://doi.org/10.3390/applmicrobiol2010005>
- Ojo, A. O. és de Smidt, O. (2023): Microbial Composition, Bioactive Compounds, Potential Benefits and Risks Associated with Kombucha: A Concise Review. *Fermentation*, 9(5), 472. <https://doi.org/10.3390/fermentation9050472>
- Palmer, J. J. és Kaminski, C. (2013): *Water: A Comprehensive Guide for Brewers*. Boulder, Colorado: Brewers Publications.
- Reiss, J. (1994): Influence of different sugars on the metabolism of the tea fungus. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung*, 198(3), 258–261. <https://doi.org/10.1007/BF01192606>
- Sadjadi, J. (1998): Cutaneous Anthrax Associated With the Kombucha »Mushroom« in Iran. *JAMA*, 280(18), 1567–1568. <https://doi.org/10.1001/jama.280.18.1567>
- Saichana, N., Matsushita, K., Adachi, O., Frébort, I. és Frebortova, J. (2015): Acetic acid bacteria: A group of bacteria with versatile biotechnological applications. *Biotechnology Advances*, 33(6, Part 2), 1260–1271. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2014.12.001>
- Sanwal, N., Thakur, K., Tomar, S. K. és Singh, A. K. (2023): Kombucha fermentation: Recent trends in process dynamics, functional bioactivities, toxicity management, and potential applications. *Food Chemistry Advances*, 3, 100421. <https://doi.org/10.1016/j.focha.2023.100421>
- Kole, A. S., Jones, H. D. és Christensen, J. M. (2009): A Case of Kombucha Tea Toxicity. *Journal of Intensive Care Medicine*, 24(3), 205–207. <https://doi.org/10.1177/0885066609332963>
- Talawat, S., Tammarate, P., Nakphaichit, M., Nitisinprasert, S. és Phianphak, W. (2006): Efficacy of fermented teas in antibacterial activity. *Agriculture and Natural Resources*, 40(4), 925–933.
- Teoh, A. L., Heard, G. és Cox, J. (2004a): Yeast ecology of Kombucha fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 95(2), 119–126. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2003.12.020>
- Teoh, A. L., Heard, G. és Cox, J. (2004b): Yeast ecology of Kombucha fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 95(2), 119–126. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2003.12.020>
- Teran, M. del M., García-Cano, I., López, P., Requena, T. és Peláez, C. (2021): Thiamine-producing lactic acid bacteria and their potential use in the prevention of neurodegenerative

diseases. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 105(5), 2097–2107. <https://doi.org/10.1007/s00253-021-11148-7>

Thompson-Witrick, K. A., Pitts, E. R., Budner, D., Bishop, P. és Petersen, M. A. (2024): Impact of Water Ionic Chemistry on Kombucha Fermentation. *Beverages*, 10(4), 108. <https://doi.org/10.3390/beverages10040108>

Tran, T., Grandvalet, C., Verdier, F., Martin, A., Alexandre, H. és Tourdot-Maréchal, R. (2020): Microbiological and technological parameters impacting the chemical composition and sensory quality of kombucha. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 19(4), 2050–2070. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12574>

Velicanski, A., Cvetković, D. és Markov, S. (évszám nélkül): Characteristics of Kombucha fermentation on medicinal herbs from Lamiaceae family. *Kéziratban megjelenő forrás (év nélkül)*.

Villarreal-Soto, S. A., Beaufort, S., Bouajila, J., Souchard, J. P. és Taillandier, P. (2018): Understanding Kombucha Tea Fermentation: A Review. *Journal of Food Science*, 83(3), 580–588. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.14068>

Vīna, I., Semjonovs, P., Linde, R. és Deniņa, I. (2014): Current evidence on physiological activity and expected health effects of Kombucha fermented beverage. *Journal of Medicinal Food*, 17(2), 179–188. <https://doi.org/10.1089/jmf.2013.0031>

Wang, B., Lim, S. M., Zhang, P., Rouse, I., Johnson, S. K., Shinde, S., Zhao, J., Mutukumira, A. N. és Todorov, S. D. (2022): Kombucha: Production and Microbiological Research. *Foods*, 11(21), 3456. <https://doi.org/10.3390/foods11213456>

Watawana, M. I., Jayawardena, N., Gunawardhana, C. B. és Waisundara, V. Y. (2015): Health, Wellness, and Safety Aspects of the Consumption of Kombucha. *Journal of Chemistry*, 2015(1), 591869. <https://doi.org/10.1155/2015/591869>

Zhang, Y., Zhang, L., Zhou, Y., Zhao, L., Zhu, M. és Wei, Y. (2016): The Microbiome and Metabolites in Fermented Pu-erh Tea as Revealed by High-Throughput Sequencing and Quantitative Multiplex Metabolite Analysis. *PLOS ONE*, 11(6), e0157847. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0157847>

## 8 Táblázatok és ábrák jegyzéke

### 8.1 Ábrajegyzék

1. ábra: Kereskedelemben kapható kombucha italok.....	16
2. ábra: Képződött mikrobiális cellulóz biofilm.....	23
3. ábra: Féllogaritmusos szaporodási görbe a fermentációt MRS táptalajon vizsgálva.....	24
4. ábra: Féllogaritmusos szaporodási görbe YEPD táptalajon.....	25
5. ábra: Mikroszkópos kép KZM4 és KZM1 mikrobákról.....	26
6. ábra: Élesztőgombák (KZM6, KZM7, KZM8, KZM9) WL agaron.....	27
7. ábra: Baktérium (ZC3) WL agaron.....	27
8. ábra: ZA2 baktérium Gram-festés.....	28

### 8.2 Táblázatjegyzék

1. táblázat: Versengés és együttműködés a kombucha mikrobiológiai közösségében.....	8
2. táblázat: Fermentációs termékek.....	10
3. táblázat: Otthoni és ipari kombucha előállítás.....	13
4. táblázat: HACCP-alapú kockázatelemzés a kombucha előállításában.....	15
5. táblázat: Kereskedelmi termékekből izolált mikroorganizmusok.....	22
6. táblázat: Starterkultúrából és saját fermentálású kombuchából izolált mikrobák.....	23
7. táblázat: Cellulóz biofilmből izolált mikroorganizmusok.....	24
8. táblázat: Baktériumok vizsgálatának eredményei.....	28
9. táblázat: MALDI-TOF-MS módszerrel azonosított mikroorganizmus fajok.....	29

## 9 Nyilatkozatok

### NYILATKOZAT

a szakdolgozat nyilvános hozzáféréséről és  
eredetiségéről

A hallgató neve: Kelemen Zita Júlia  
A Hallgató Neptun kódja: I04WR6  
A dolgozat címe: Különböző kombucha teák mikrobaközösségének vizsgálata  
A megjelenés éve: 2025  
A konzulens intézetének neve: Élelmiszertudományi és Technológiai Intézet  
A konzulens tanszékének a neve: Élelmiszer-mikrobiológia, -higiéna és biztonság Tanszék

Kijelentem, hogy az általam benyújtott szakdolgozat egyéni, eredeti jellegű, saját szellemi alkotásom. Azon részeket, melyeket más szerzők munkájából vettem át, egyértelműen megjelöltem, és az irodalomjegyzékben szerepeltettem. Továbbá kijelentem, hogy a dolgozat elkészítése során alkalmazott mesterséges intelligencia-eszközök (pl. szöveggenerálás, nyelvi javítás, fordítás, adatelemzés) használata nem helyettesítette a saját kutatási és alkotói munkámat, azok alkalmazását a források között vagy a módszertani részben feltüntettem, és a szakmai-etikai elvárásoknak megfelelően jártam el.

Ha a fenti nyilatkozattal valótlan állítottam, tudomásul veszem, hogy a záróvizsga-bizottság a záróvizsgából kizár és a záróvizsgát csak új dolgozat készítése után tehetek.

A leadott dolgozat, mely PDF dokumentum, szerkesztését nem, megtekintését és nyomtatását engedélyezem.

Tudomásul veszem, hogy az általam készített dolgozatra, mint szellemi alkotás felhasználására, hasznosítására a Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem mindenkor szellemi tulajdon-kezelési szabályzatában megfogalmazottak érvényesek.

Tudomásul veszem, hogy dolgozatom elektronikus változata feltöltésre kerül a Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem könyvtári repozitori rendszerébe. Tudomásul veszem, hogy a megvédett és

- nem titkosított dolgozat a védést követően
- titkosításra engedélyezett dolgozat a benyújtásától számított 5 év eltelte után

nyilvánosan elérhető és kereshető lesz az Egyetem könyvtári repozitori rendszerében.

Kelt: 2025 év 10. hó 30. nap

Kelemen Zita  
Hallgató aláírása

## NYILATKOZAT

Keleny Zita (név) (hallgató Neptun azonosítója: 104WR6)  
konzulenseként nyilatkozom arról, hogy a  
záródolgozatot/szakdolgozatot/diplomadolgozatot/portfóliót<sup>1</sup> áttekintettem, a hallgatót az  
irodalmi források korrekt kezelésének követelményeiről, jogi és etikai szabályairól  
tájékoztattam.

A záródolgozatot/szakdolgozatot/diplomadolgozatot/portfóliót a záróvizsgán történő  
védésre javaslom / nem javaslom<sup>2</sup>.

A dolgozat állam- vagy szolgálati titkot tartalmaz: igen nem<sup>3</sup>

Kelt: Budapest, 2025 év október hó \_30. nap

Pavani Anca  
belső konzulens

## Hallgatók, doktoranduszok nyilatkozata mesterséges intelligencia (MI) alkalmazásáról

### 1. Általános adatok

<b>Hallgató neve:</b>	Kelemen Zita Júlia
<b>Neptun-kódja:</b>	I04WR6
<b>Képzési szint (a megfelelőt jelölje X-szel):</b>	<input checked="" type="checkbox"/> BSc/BA <input type="checkbox"/> MSc/MA <input type="checkbox"/> Doktori (PhD) <input type="checkbox"/> Egyéb: .....
<b>Tantárgy neve/kódja*:</b>	Szakdolgozat
<b>A munka címe:</b>	Különböző kombucha teák mikrobaközösségének vizsgálata

\* doktori értekezés esetén nem kitöltendő

### 2. Nyilatkozat az MI használatáról

Alulírott, etikai felelősségem teljes tudatában az alábbi nyilatkozatot teszem:

(Kérjük, válasszon egyet az alábbi lehetőségek közül!)

A) Nem alkalmaztam mesterséges intelligencia rendszert vagy szolgáltatást.

(Amennyiben ezt jelölte, a további táblázatok kitöltése nem szükséges.)

B) Alkalmaztam mesterséges intelligencia rendszert vagy szolgáltatást.

(Kérjük, töltsse ki a vonatkozó táblázatokat!)

### 3. A mesterséges intelligencia használatának részletezése

#### I. TÁBLÁZAT: Asszisztensi vagy kisebb mértékű felhasználás (pl. fordítás, nyelvi korrektúra, ötletelés stb.)

(Ezen felhasználások esetében a konkrét promptok és válaszok csatolása nem szükséges.)

A felhasználás célja	Alkalmazott MI-eszköz neve és verziója	Érintett rész (ha nem a szöveg egészére vonatkozik)
nyelvi korrektúra, fordítás	ChatGPT 4.0 Turbo	Irodalmi áttekintés

#### II. TÁBLÁZAT: Jelentős tartalmi hozzájárulás (pl. egy teljes ábra vagy egy hosszabb szövegrész generálása)

(Ezekben az esetekben a felhasznált kulcsfontosságú promptok és az MI által adott nyers válaszok dokumentálása és a munka mellékletében való csatolása szükséges.)

A felhasználás célja	Alkalmazott MI-eszköz neve, verziója, elérhetősége	Az érintett fejezet / ábra / táblázat pontos sorszáma	A prompt-naplót tartalmazó melléklet bejegyzésének sorszáma
----------------------	--	---	---

--	--	--	--

**3/A. Oktató által előírt kiegészítő szabályok (ha vannak)**

Amennyiben az adott tantárgy oktatója vagy témavezetője az MI-eszközök használatára vonatkozóan külön szabályokat vagy elvárásokat határozott meg, kérjük, az alábbi mezőben foglalja össze ezeket:

*Pl. az MI használatának tilalma bizonyos feladattípusokra; csak konkrét eszköz használata engedélyezett; eltérő hivatkozási elvárások; dokumentációs forma stb.*

Oktató vagy témavezető által előírt szabályok:

.....

.....

.....

.....

**4. Minden hallgatóra vonatkozó nyilatkozat:**

Kijelentem, hogy az MI által esetlegesen generált tartalmakat minden esetben kritikailag felülvizsgáltam, szerkesztettem és a munkába illesztettem. A leadott munka minden eleméért, annak eredetiségéért és tudományos helyállóságáért teljes körű felelősséget vállalok. Tudomásul veszem, hogy a Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem a benyújtott munkát mesterséges intelligencia detektorral ellenőrizheti, és eljárást kezdeményezhet, amennyiben a nyilatkozatom valótlan vagy hiányos.

**Kelt:** Budapest, 2025.10.30.

.....  
*Kelenen Zita*

**Hallgató aláírása**

.....  
*Pavani*

**Konzulens/Témavezető aláírása**