

Investigation of Physicochemical Properties and Bioactive Compounds of Fermented Ganoderma (*Ganoderma lucidum*) Based Kombucha Compared to Green Tea and Coffee Kombucha

Pages
37-51

R. Biglari Farash^{1*} and A. Khairy²

1 & 2) Department of Horticultural Science and Engineering, University of Zanjan, Zanjan, Iran.

*Corresponding author : razibiglari1365@gmail.com

Received date: 2025.07.20

Accepted date: 2025.10.14

Abstract

Kombucha is a fermented tea beverage produced by the symbiosis of bacterial cultures and yeasts. Kombucha contains organic acids, minerals, and vitamins that mainly originate from the tea used in it. The type of tea has a significant effect on parameters related to antioxidant potential, pH, and also acetic acid, alcohol, or sugar content. Therefore, this experiment was designed and conducted as a factorial experiment in a completely randomized design in the tissue culture laboratory of the Horticulture Department of the University of Zanjan to compare three types of kombucha obtained from Ganoderma, green tea, and coffee. After preparing the three types of kombucha, the polyphenol, antioxidant, alcohol, sucrose, and acidity content indices were measured at time periods of 0, 5, 10, and 15 days. The results showed that fermentation time and tea type had a significant effect on the anti-radical property of kombucha at the 5% level. In terms of tea type, kombucha prepared from green tea had the highest antioxidant potential (94.61%) and phenolic content (320.1 mg/L) and flavonoids (254.1 mg/L), reaching its highest value on the first day of fermentation. Ganoderma ranked second and coffee ranked third. However, the stability of these compounds in Ganoderma was higher than others. The Ganoderma-containing beverage performed better in maintaining antioxidant capacity and increasing total phenols compared to coffee, although it was lower than that of green tea. However, due to the innovation and specific medicinal benefits of Ganoderma, it has great potential for the development of functional beverages.

Keywords: Antioxidant, Fermentation, Probiotic, Kombucha and Medicinal Mushrooms.

بررسی ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی و ترکیبات زیست‌فعال کامبوجای تخمیری مبتنی بر گانودرما (*Ganoderma lucidum*) در مقایسه با کامبوجای چای سبز و قهوه

شماره صفحات

۳۷-۵۱

راضیه بیگلری فراش^{۱*} و عزیزاله خیری^۲

۱ و ۲) گروه علوم و مهندسی باغبانی، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران.

* نویسنده مسئول: mahtab.salehi@basu.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۷/۲۲

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۰۴/۲۹

چکیده

کامبوجا یک نوشیدنی چای تخمیر شده است که در نتیجه همزیستی کشت های باکتریایی و مخمرها تهیه می‌شود. کامبوجا حاوی اسیدهای آلی، مواد معدنی و ویتامین‌هایی است که عمدتاً از چای مورد استفاده در آن سرچشمه می‌گیرند. نوع چای تأثیر قابل توجهی بر پارامترهای مرتبط با پتانسیل آنتی‌اکسیدانی، pH و همچنین محتوای اسید استیک، الکل یا قند دارد. لذا این آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در آزمایشگاه کشت بافت گروه باغبانی دانشگاه زنجان جهت مقایسه سه نوع کامبوجای حاصل از گانودرما چای سبز و قهوه طراحی و اجرا شد. پس از تهیه سه نوع چای کامبوجا شاخص های محتوای پلی فنولی، آنتی اکسیدان، الکل، ساکارز و اسیددیده در دوره های زمانی 0، 5، 10 و 15 روز اندازه گیری شد. نتایج نشان داد که زمان تخمیر و نوع چای روی خاصیت ضد رادیکال کامبوجا در سطح ۵ درصد اثر معنی دار داشت. از نظر نوع چای، کامبوجای تهیه شده از چای سبز دارای بالاترین پتانسیل آنتی‌اکسیدانی (94/61٪) و محتوای فنول (320/1 mg/L) و فلاونوئید (254/1 mg/L) بود و در روز اول تخمیر به بالاترین مقدار خود رسید. گانودرما در رتبه دوم و قهوه در مقام سوم قرار دارد. با این وجود پایداری این ترکیبات در گانودرما از سایرین بیشتر بود. نوشیدنی حاوی گانودرما در مقایسه با قهوه عملکرد بهتری در حفظ ظرفیت آنتی‌اکسیدانی و افزایش فنول کل داشت، هرچند نسبت به چای سبز پایین تر بود. اما به دلیل نوآوری و فواید دارویی خاص گانودرما، پتانسیل بالایی برای توسعه نوشیدنی‌های کاربردی دارد.

واژه‌های کلیدی: آنتی‌اکسیدان، تخمیر، پروبیوتیک، کامبوجا و قارچ دارویی.

مقدمه

تخمیر یکی از قدیمی‌ترین تکنیک‌های نگهداری غذا است که توسط بشر استفاده می‌شود و منجر به ایجاد نوشیدنی‌هایی از جمله کامبوجا شده است. کامبوجا از تخمیر چای سیاه یا سبز شیرین شده با استفاده از کشت مخلوط مخمر و باکتری اسید استیک به مدت ۷ تا ۲۰ روز در شرایط هوازی تهیه می‌شود (Marco *et al.*, 2023). کامبوجا به خاطر طعم قوی و فواید سلامتی‌اش شناخته شده است و تاریخچه ای طولانی از مصرف در سراسر جهان دارد (Jayabalan *et al.*, 2014). مصرف کامبوجا سبب بازیابی سلامت از طریق سم زدایی، آنتی اکسیدان‌ها، انرژی زایی و تحریک سیستم ایمنی می‌شود (Vina *et al.*, 2014). مطالعات بر روی کامبوجا خواص ضد باکتریایی، آنتی اکسیدانی، ضد دیابتی و همچنین توانایی آن در کاهش غلظت کلسترول، حمایت از سیستم ایمنی و تحریک سم زدایی از کبد را ثابت کرده است (Bellassoued *et al.*, 2014). نوشیدنی‌های کامبوجا همچنین دارای مواد معدنی هستند که عمدتاً از پتاسیم، منگنز، یون‌های فلوراید، ویتامین E، B، K، اسیدهای آمینه (به‌ویژه تیانین و مشتقات گلوتامین) تشکیل می‌شوند. واکنش‌های متعددی در طول تخمیر چای رخ می‌دهد و در طی اکسیداسیون، ترکیبات پلی فنلی، کاتچین‌ها، فلاونوئیدها و سایر ترکیبات با فواید سلامتی تشکیل می‌شوند (Kaashyap *et al.*, 2021). پارامترهای مختلفی از جمله نوع چای، زمان تخمیر، محتوای کنسرسيوم میکروبی اسکوبی (SCOBY) Symbiotic Culture of Bacteria and Yeast و دما بر خواص و محتوای کامبوجا تأثیر می‌گذارند. علیرغم افزایش محبوبیت مصرف این نوشیدنی، اطلاعاتی در مورد چگونگی تأثیر انواع چای بر خواص و محتوای آن هنوز به طور کامل در دسترس نیست. گیاهانی که تا کنون به عنوان بسترهای کامبوجا آزمایش شده اند شامل زنجبیل (*Zingiber officinalis*) (Salafzoon *et al.*, 2018)، بادرنجبویه (*Melissa Officinalis*) (Cetojevic-Simin *et al.*, 2012)، بلوط (*Quercus ilex*) (Velicanski *et al.*, 2014) (Vazquez-Cabral *et al.*, 2014) و برگ گزنه (*Urtica dioica L*) بوده اند. میوه‌ها و سبزیجات نیز به عنوان سوبسترهای بالقوه کامبوجا ظاهر شده اند و محققان بر روی انواعی که از نظر ترکیبات فعال زیستی برای سلامتی مشخص می‌شوند، تمرکز کرده اند. چنین مطالعاتی استفاده از مواد خام مانند اسفناج (Aspiyanto *et al.*, 2017)، آب انگور (Yavari *et al.*, 2011) (Ayed *et al.*, 2017)، آب آلبالو (Yavari *et al.*, 2010)، پوست موز (Pure and Pure, 2016) و آب انار (Yavari *et al.*, 2017) را مورد بررسی قرار داده است. این سوبسترها نه تنها از نظر ترکیبات عملکردی مفید هستند، بلکه می‌توانند افزایش تشکیل اسیدهای آلی مانند اسید گلوکورونیک را در شرایط تخمیر مطلوب تحریک کنند (Yavari *et al.*, 2017). از این رو، هدف از این تحقیق تجزیه و تحلیل خواص آنتی اکسیدانی و محتوای نوشیدنی تهیه شده از چای سبز، قهوه و گانودرما در مقاطع زمانی مختلف تخمیر بود.

مواد و روش‌ها

مواد اولیه و آماده سازی نمونه‌ها

جهت تهیه مواد اولیه گیاهی، برگ خشک چای سبز (*Camellia sinensis*) و دانه های گیاه قهوه (*Coffea arabica*) از بازار و کلاهدک خشک قارچ گانودرما (*Ganoderma lucidum*) از شرکت ایران گانودرما خریداری و آسیاب شدند. مقادیر ۱۰ گرمی از پودر هر یک از مواد به طور جداگانه به ۱ لیتر آب جوش (نسبت ۰.۱٪ وزنی/حجمی) اضافه شد. با توجه به تفاوت در ساختار بافت و حساسیت ترکیبات زیست‌فعال هر گیاه، زمان بهینه دم کردن مطابق با روش‌های استاندارد برای قهوه به مدت ۱۵ دقیقه (Lopez & Li, 2021)، چای سبز به مدت ۵ دقیقه (Gorgen *et al.*, 2020) و گانودرما به مدت ۳۰ دقیقه (Wachtel-Galor *et al.*, 2011) تعیین شد. این شرایط بر اساس مطالعات پیشین برای دستیابی به حداکثر استخراج ترکیبات مطلوب از هر ماده، بدون تخریب گسترده آنها، انتخاب گردید. سپس ۱۰۰ گرم در لیتر شکر اضافه شد (Kim and Adhikari, 2020). پس از خنک شدن مخلوط چای و شکر در دمای اتاق (۳۰ درجه سانتیگراد)، جوشانده چای بوسیله یک صافی فلزی چای پالایش و در بطری های شیشه ای تمیز نگهداری شد. برای تلقیح، از مایه کشت کامبوجا (کشت آغازگر) استفاده شد که خود حاصل یک فرآیند تخمیر اولیه با استفاده از کلنی اسکوبی (SCOBY) بود. این مایه کشت در شرایط استریل و از چای سیاه و شکر تهیه و برای چندین نسل تکثیر شده بود (Greenwalt *et al.*, 2000). مخلوط کامبوجا پس از پوشاندن با پارچه تمیز، در دمای بهینه 1 ± 28 درجه سانتی‌گراد (مطابق با پروتکل استاندارد تخمیر کامبوجا) به مدت ۵ تا ۲۰ روز و در شرایط استریل نگهداری و تخمیر گردید (Jayabalan *et al.*, 2014). تکرارها به گونه ای تهیه شد که هر تکرار پس از دوره تخمیر تعیین شده به طور کامل جمع آوری شد. به منظور حذف سلول‌های باکتریایی و مخمیری و به دست آوردن یک محلول شفاف برای آنالیزهای شیمیایی، نمونه‌های کامبوجا با استفاده از فیلترهای نایلونی (۰/۴۵ میکرومتر، قطر ۲۵ میلی‌متر، سیگما-آلدريج) فیلتر شدند.

روش‌های آنالیز و اندازه‌گیری

جهت بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی با روش DPPH از روش ساها و همکاران (۲۰۰۴) استفاده شد (Saha *et al.*, 2004). تعیین محتوای کل پلی‌فنول‌ها (TPC) با روش سینگلتن و روسی (Singleton and Rossi, 1965) و طبق استاندارد ISO 14502-1 انجام شد. جهت سنجش محتوای کل فلاونوئیدها، از غلظت‌های مختلف فلاونوئید در رسم منحنی کالیبراسیون استاندارد و از معادل روتین به عنوان استاندارد مرجع (۰-۱۲۰ میلی‌گرم در لیتر معادل روتین) استفاده شد. میزان جذب در طول موج ۵۱۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتوفتومتر (8453UV AGILENT TECHNOLOGIES) اندازه‌گیری شد. تمام آزمایش‌ها در سه تکرار انجام شد (Pełkal and Pyrzyńska, 2014). pH هر دو نوشیدنی تخمیر شده و کنترل (تخمیر نشده) توسط pH متر مدل (SCHOTT (Instruments SI Analytics Mainz)، اندازه‌گیری شد. جهت تعیین اسید استیک

نمونه‌هایی از چای‌های تخمیری در روزهای ۰، ۵، ۱۰ و ۱۵ روز، از طریق فیلترهای نایلونی (۰/۴۵ میکرومتر، قطر ۲۵ میلی‌متر، سیگما-آلدريج) فیلتر شدند و اسید استیک (AA) با استفاده از کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) با استفاده از دستگاه HPLC سری ۱۲۰۰ متصل به یک آشکارساز RI سری ۱۱۰۰ (Agilent Technologies) با یک ستون (Phenomenex) ROA-Organic Acid H+ (8%) (Rezex)، تجزیه و تحلیل شد. ستون با یک فاز متحرک گاززدایی شده حاوی ۵ میلی‌مولار H_2SO_4 و pH ۲/۲۵ در دمای ۶۰ درجه سانتیگراد با سرعت جریان ۰/۵ میلی‌لیتر در دقیقه به مدت ۳۰ دقیقه در هر نمونه شسته شد. نتایج بر حسب میلی‌گرم اسید استیک در لیتر نشان داده شد (Gaggia *et al.*, 2018). میزان الکل با استفاده از یک الکل سنج مدل (Browin Lodz) اندازه‌گیری شد. الکل سنج در مایع غوطه‌ور شد و نتیجه از روی مقیاس خوانده شد. مقدار قند کل با استفاده از رفاکتومتر آزمایشگاهی (RL3 شرکت اپتیکال) از مقیاس بریکس اندازه‌گیری شد.



شکل ۱- طرحواره آزمایش: مواد اولیه، دوره تخمیر و صفات سنجش شده در چای‌های تخمیری

Figure 1- Experimental scheme: raw materials, fermentation period, and measured traits in fermented teas

تحلیل آماری

آزمایش بصورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی طراحی شد. در تمام آزمایش‌ها، سه نمونه چای مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و تمام سنجش‌ها حداقل در سه تکرار انجام شد. تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از (Stat Soft Statistica 13.0) و Microsoft Excel 2017 (StatSoft Polska) و نتایج به صورت مقادیر میانگین و انحراف معیار (SD) بیان شده است. برای ارزیابی تفاوت بین پارامترهای مورد بررسی، از آزمون تعقیبی Tukey استفاده شد. محاسبات با استفاده از برنامه R انجام شد.

نتایج و بحث

تغییرات بیوشیمیایی در طول زمان تخمیر

جدول ۱. تغییرات محتوای ترکیبات زیست‌فعال و فعالیت آنتی‌اکسیدانی در سه نوع نوشیدنی کامبوچا طی دوره تخمیر

Table 1. Changes in the content of bioactive compounds and antioxidant activity in three types of kombucha drinks during fermentation

| نوع نوشیدنی Beverage Type | زمان (روز) Time (day) | فلاونوئید کل Total Flavonoid (mgQ/100gDW) | خاصیت آنتی‌اکسیدانی Antioxidant Activity (%) | فنول کل Total Phenol (mgGA/100gDW) |
|--|-----------------------------|---|--|--|
| کامبوچای چای سبز Green Tea Kamboja (GTK) | 0 | 254.1 ± 8.6 a | 80.33 ± 2.00 d | 269.0 ± 0.9 e |
| | 5 | 196.2 ± 2.6 b | 94.61 ± 1.29 a | 277.6 ± 0.4 d |
| | 10 | 146.8 ± 3.4 d | 91.40 ± 0.57 b | 299.6 ± 3.1 c |
| | 15 | 181.3 ± 4.8 c | 88.23 ± 0.83 c | 320.1 ± 3.5 a |
| کامبوچای قهوه Coffee Kamboja (CK) | 0 | 231.7 ± 11.0 a | 70.40 ± 0.78 b | 183.1 ± 2.3 e |
| | 5 | 149.1 ± 0.6 b | 78.62 ± 0.63 a | 201.0 ± 5.7 d |
| | 10 | 90.5 ± 0.7 d | 70.63 ± 0.53 b | 219.5 ± 2.1 b |
| | 15 | 126.7 ± 5.2 c | 61.04 ± 1.99 c | 206.0 ± 1.2 c |
| کامبوچای گانودرما Ganoderma Kamboja (GK) | 0 | 209.3 ± 3.1 a | 78.55 ± 0.35 c | 184.6 ± 2.0 d |
| | 5 | 132.6 ± 4.8 b | 89.01 ± 0.99 a | 200.8 ± 7.6 c |
| | 10 | 83.8 ± 3.3 d | 79.13 ± 0.93 b | 205.6 ± 3.0 b |
| | 15 | 111.6 ± 2.2 c | 70.42 ± 1.38 d | 228.1 ± 0.5 a |

اعداد به صورت میانگین ± انحراف معیار گزارش شده‌اند. در هر ستون، میانگین‌هایی که حداقل دارای یک حرف مشترک هستند، فاقد تفاوت آماری معنی‌دار در سطح ۵٪ بر اساس آزمون توکی می‌باشند

In each column, means that share at least one letter are not statistically significantly different at the %5 level based on Tukey's test

محتوای فنول کل (TPC)

در هر سه نوع کامبوچا، مقدار TPC با گذشت زمان در سطح ۵ درصد معناداری، افزایش یافته است (جدول ۱). این افزایش در کامبوچای چای سبز (GTK) بسیار چشمگیرتر است. بطوری که کامبوچای چای سبز بیشترین مقدار TPC را در تمام زمان‌ها دارد و از ۲۶۹ mg/L در روز اول به ۳۲۰ mg/L در روز پانزدهم رسیده است. این نشان‌دهنده پتانسیل بالای چای سبز در تولید ترکیبات فنولی طی تخمیر است. کامبوچای قهوه و گانودرما مقادیر کم‌تری دارند و روند افزایشی کندتری را نشان می‌دهند. افزایش TPC طی تخمیر می‌تواند ناشی از فعالیت آنزیم‌های میکروبی خارج سلولی مانند β -گلوکوزیداز و پکتیناز باشد که ترکیبات فنولی پیچیده و نامحلول موجود در بافت گیاهی را به مولکول‌های ساده‌تر و با زیست‌دسترسی بالاتر تجزیه می‌کنند (Zhou et al., 2022). علاوه بر این، میکروارگانیسم‌هایی مانند *Candida tropicalis* قادر به تجزیه پلی‌فنل‌های مختلف هستند (Ettayebi et al., 2003).

این فرآیند نه تنها منجر به افزایش مقدار TPC اندازه‌گیری شده می‌شود، بلکه به دلیل افزایش تعداد گروه‌های هیدروکسیل آزاد، محتوای آنتی‌اکسیدانی نوشیدنی را نیز به طور قابل توجهی تقویت می‌کند (Tu et al., 2019). نتایج این مطالعه حاکی از افزایش مداوم TPC تا روز ۱۵ است، که با یافته‌های (Zhou et al., 2022) بر روی تخمیر چای سیاه کامبوچا همسو می‌باشد.

در کل بسته به هدف، زمان بهینه تخمیر متفاوت است. زمان تخمیر کوتاه‌تر (حدود ۵ روز) برای همه انواع کامبوجا بهتر است. برای دستیابی به حداکثر محتوای فنولی، زمان تخمیر طولانی‌تر (۱۵ روز) نتیجه بهتری دارد.

فعالیت آنتی‌اکسیدانی (AA)

طبق نتایج بدست آمده در روند تغییرات آنتی‌اکسیدانی برای هر سه نوع کامبوجا غیریکنواخت است (جدول ۱). کامبوجای چای سبز (GTK) در روز ۵ به اوج خود (۹۴/۶۱٪) می‌رسد و سپس به تدریج کاهش می‌یابد. کامبوجای قهوه (CK) در روز ۵ به اوج (۷۸/۶۲٪) می‌رسد و سپس کاهش چشمگیری دارد. کامبوجای گانودرما (GK) در روز ۵ به اوج (۸۹/۰۱٪) می‌رسد و سپس کاهش می‌یابد. این الگو نشان می‌دهد که ترکیبات آنتی‌اکسیدانی در مراحل اولیه تخمیر تولید یا آزاد می‌شوند، اما با تداوم تخمیر، ممکن است این ترکیبات تجزیه شده یا توسط میکروارگانیسم‌ها مصرف شوند و از قدرت آنتی‌اکسیدانی نوشیدنی کاسته شود. کاتچین موجود در چای سبز می‌تواند از طریق فعالیت باکتری‌ها و مخمرها به ذرات ساده‌تر تجزیه شود و آنتی‌اکسیدان‌ها را افزایش دهد (Tanaka et al., 2009). فرایند تخمیر به عنوان یک روش بهینه‌سازی طبیعی، نقش بسزایی در افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی مواد گیاهی ایفا می‌کند. این فرایند از طریق چندین مکانیسم اصلی عمل می‌کند. اولین مکانیسم، تجزیه دیواره سلولی گیاهان توسط آنزیم‌های تولید شده توسط میکروارگانیسم‌های تخمیر است که منجر به آزادسازی ترکیبات فنولی و آنتی‌اکسیدانی موجود در ساختار سلولی می‌گردد (Hur et al., 2014). دومین مکانیسم، تبدیل اشکال گلیکوزیده آنتی‌اکسیدان‌ها به اشکال آزاد (آگلیکون) از طریق فعالیت آنزیم‌های میکروبی مانند- β گلوکوزیداز است که جذب پذیری و فعالیت بیولوژیکی این ترکیبات را به طور قابل توجهی افزایش می‌دهد (Zhao et al., 2021). سومین مکانیسم، سنتز ترکیبات آنتی‌اکسیدانی جدید از قبیل پپتیدهای آنتی‌اکسیدانی و متابولیت‌های ثانویه توسط خود میکروارگانیسم‌ها در طول فرایند تخمیر است که به غنای ترکیبات مفید در محصول نهایی می‌افزاید (Ooi et al., 2020). این سه مکانیسم در مجموع، تخمیر را به یک فناوری مؤثر در بهبود خواص آنتی‌اکسیدانی مواد گیاهی تبدیل کرده است.

محتوای فلاونوئید کل (TFC)

بر اساس نتایج بدست آمده، مقدار TFC در تمامی سه نوع کامبوجا با گذشت زمان کاهش یافته است (جدول ۱). کامبوجای چای سبز با وجود کاهش فلاونوئید در طی زمان، همچنان مقادیر بالاتری را در مقایسه با کامبوجای قهوه و گانودرما حفظ می‌کند. کاهش TFC می‌تواند به دلیل تجزیه فلاونوئیدهای پیچیده به متابولیت‌های ساده‌تر دیگر در طی فرایند تخمیر باشد. این متابولیت‌ها ممکن است در آزمون TFC اندازه‌گیری نشوند اما در آزمون TPC یا فعالیت آنتی‌اکسیدانی نقش داشته باشند. کاهش فلاونوئیدها همزمان با افزایش فنول‌های کل، می‌تواند نشان‌دهنده تبدیل فلاونوئیدها به سایر مشتقات فنولی باشد. افزایش محتوای ترکیبات پلی فنلی می‌تواند با واکنش‌های متعددی همراه باشد که در طی تخمیر چای رخ می‌دهد، به عنوان مثال، اکسیداسیون ترکیبات پلی فنلی توسط برخی آنزیم‌ها منجر به تشکیل کاتچین‌ها، فلاونوئیدها و سایر ترکیبات با خواص سالم

از جمله خواص آنتی‌اکسیدانی می‌شود که نتیجه یک واکنش هیدرولیز میکروبی است (Jayabalan *et al.*, 2010).

جدول ۲. تغییرات پارامترهای فیزیوشیمیایی در سه نوع کامبوجا طی دوره تخمیر

Table 2. Changes in physicochemical parameters in three types of kombucha during fermentation

| نوع نوشیدنی Beverage Type | زمان (روز) Time (day) | الکل Alcohol (%) | pH | ساکارز Sucrose (° Brix-g/100mL) | اسیدیته Acidity (mg acetic acid /L) |
|---|--------------------------------|------------------------|---------------|---------------------------------------|---|
| کامبوجای چای سبز Green Tea Kamboja (GTK) | 0 | 0.0 ± 0.00 d | 5.54 ± 0.01 a | 10.75 ± 0.00 a | 20.12 ± 0.01 e |
| | 5 | 0.2 ± 0.00 c | 3.50 ± 0.04 b | 9.75 ± 0.35 b | 610.34 ± 0.02 d |
| | 10 | 3.0 ± 0.00 a | 2.61 ± 0.03 c | 10.0 ± 0.00 ab | 7039.21 ± 0.12 c |
| | 15 | 2.75 ± 0.50 b | 2.49 ± 0.04 d | 8.75 ± 0.00 c | 9147.40 ± 0.31 a |
| کامبوجای قهوه Coffee Kamboja (CK) | 0 | 0.0 ± 0.00 d | 5.34 ± 0.03 a | 11.0 ± 0.00 a | 23.50 ± 0.01 e |
| | 5 | 0.3 ± 0.00 c | 3.54 ± 0.04 b | 10.88 ± 0.18 a | 501.02 ± 0.11 d |
| | 10 | 3.25 ± 0.50 a | 2.62 ± 0.03 c | 9.5 ± 0.00 b | 7039.08 ± 0.23 c |
| | 15 | 2.0 ± 0.00 b | 2.53 ± 0.03 c | 7.5 ± 0.00 d | 9083.03 ± 0.36 b |
| کامبوجای گانودرما Ganoderma Kamboja (GK) | 0 | 0.0 ± 0.00 e | 6.53 ± 0.05 a | 10.75 ± 0.00 a | 21.09 ± 0.01 e |
| | 5 | 0.4 ± 0.00 d | 3.56 ± 0.06 b | 10.13 ± 0.18 a | 620.13 ± 0.09 d |
| | 10 | 3.5 ± 0.50 b | 2.53 ± 0.05 d | 10.13 ± 0.00 a | 7048.06 ± 0.17 c |
| | 15 | 3.0 ± 0.00 c | 2.37 ± 0.05 c | 9.5 ± 0.00 b | 9132.20 ± 0.43 a |

اعداد به صورت میانگین ± انحراف معیار گزارش شده‌اند. در هر ستون، میانگین‌هایی که حداقل دارای یک حرف مشترک هستند، فاقد تفاوت آماری معنی‌دار در سطح ۵٪ بر اساس آزمون توکی می‌باشند.

Numbers are reported as mean ± standard deviation. In each column, means that share at least one letter are not statistically significantly different at the %5 level based on Tukey's test.

تغییرات pH

در تمامی نمونه‌ها، pH با پیشرفت فرآیند تخمیر به طور پیوسته کاهش یافته است (جدول ۲). کامبوجای گانودرما (GK) در روز صفر بالاترین pH (۶/۵۳) را داشت که احتمالاً به دلیل ویژگی‌های قلیایی اولیه عصاره گانودرما است، اما در پایان دوره (۱۵ روز) به کمترین pH (۲/۳۷) در بین تمام نمونه‌ها رسید. کامبوجای گانودرما (GK) کمترین pH نهایی را نشان داد که ممکن است ناشی از وجود ترکیبات تقویت‌کننده در گانودرما باشد که فعالیت میکروبی را تحریک می‌کند. افزودن کامبوجا یا سرکه تخمیر شده باعث کاهش pH اولیه محلول چای می‌شود و از رشد میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا و فساد جلوگیری می‌کند به طور کلی پذیرفته شده است که pH یک کامبوجای بهینه تخمیر شده (از نظر طعم) باید بین ۲/۵ تا ۳/۵ باشد (Jayabalan *et al.*, 2014). در فرآیند تخمیر کامبوجا، ردیابی تغییرات pH به عنوان شاخصی کلیدی برای ارزیابی فعالیت متابولیک میکروارگانیسم‌ها و تضمین پیشبرد موفقیت‌آمیز تخمیر ضروری است. این کاهش تدریجی عمدتاً ناشی از تولید اسیدهای آلی مختلف، به ویژه اسید استیک، اسید گلوکونیک و اسید لاکتیک توسط کنسرسیوم میکروبی (SCOBY) است. این اسیدها نه تنها مسئول ایجاد طعم ترش و تیز مطلوب در نوشیدنی هستند، بلکه با ایجاد محیطی اسیدی، رشد میکروارگانیسم‌های فاسد و بیماری‌زا را مهار کرده و ماندگاری محصول را به طور قابل توجهی افزایش می‌دهند (Jayabalan *et al.*, 2014). مکانیسم اصلی کاهش pH را می‌توان در فعالیت متابولیک پیچیده میکروارگانیسم‌ها جستجو کرد. در این

همزیستی، مخمرها ابتدا ساکارز موجود در بستر تخمیر را به گلوکز و فروکتوز هیدرولیز کرده و سپس این مونوساکاریدها را به اتانول و دی‌اکسیدکربن تخمیر می‌کنند. در گام بعدی، باکتری‌های اسید استیک از جنس استوباکتر (*Acetobacter*)، اتانول تولید شده را به اسید استیک اکسید می‌کنند. همزمان، باکتری‌های اسید لاکتیک نیز با تولید اسید لاکتیک سهم قابل توجهی در کاهش pH دارند. از سوی دیگر، فعالیت آنزیم‌های میکروبی از جمله گلوکونواسیداز که در تولید اسید گلوکونیک از گلوکز نقش دارد، نیز در این فرآیند مؤثر است. جالب توجه آنکه این آنزیم‌ها خود در محدوده pH بهینه‌ترین کارایی را دارند و بنابراین تغییرات pH می‌تواند به طور مستقیم بر سرعت تولید اسید تأثیر بگذارد (Heidari *et al.*, 2018). در تحلیل رفتار کامبوجای گانودرما (GK) شاهد الگوی غیرمعمولی در تغییرات pH هستیم که با عوامل متعددی قابل توجیه است. از یک سو وجود ترکیبات زیست‌فعال در قارچ گانودرما از قبیل پلی‌ساکاریدهای پیچیده (مانند بتا-گلوکان) و سایر متابولیت‌های ثانویه، نقش پری‌بیوتیکی ایفا کرده و رشد و فعالیت متابولیکی باکتری‌های اسیدساز در SCOBY را به طور قابل توجهی تقویت می‌کنند. از سوی دیگر، pH اولیه بالاتر در این نمونه که احتمالاً ناشی از وجود ترکیبات قلیایی طبیعی در عصاره گانودرما است، در کنار خاصیت بافرینگ این ترکیبات، شرایطی را فراهم می‌آورد که با فعال‌شدن میکروارگانسیم‌ها و تشدید تولید اسید، در نهایت منجر به کاهش pH شدیدتری در مراحل پایانی تخمیر می‌شود. این پدیده مشابه کاربرد سیستم‌های بافر (مانند فسفات یا سیترات) در کنترل pH در فرآیندهای تخمیر صنعتی است (Kim and Adhikari, 2020).

تغییرات اسیددیده (اسید استیک)

محتوای اسید استیک در تمام نمونه‌ها به طور نمایی افزایش یافته است. نتایج آنالیز واریانس (جدول ۲) نشان داد که اثر عامل زمان تخمیر بر غلظت اسید استیک در سطح ۱٪ بسیار معنادار بود. به طوری که محتوای اسید استیک در تمام تیمارها روند افزایشی داشت و از مقادیر اولیه ۲۳-۲۰ میلی‌گرم در لیتر در روز صفر، به بیش از ۹۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر در روز پانزدهم رسید. داده‌های تخمیر کامبوجا نشان می‌دهند که ابتدا مخمرها قندها را به اتانول تبدیل می‌کنند (افزایش الکل تا روز دهم) و سپس باکتری‌ها اتانول را به اسید استیک اکسید می‌کنند. افزایش چشمگیر اسیددیده نشان‌دهنده فعالیت شدید باکتری‌های استیک‌اسید است که اتانول تولید شده توسط مخمرها را به اسید استیک اکسید می‌کنند (Villarreal-Soto *et al.*, 2020). داده‌ها نشان می‌دهد که بین غلظت اسید استیک و سایر پارامترها ارتباط مستقیم وجود دارد بطوری که با افزایش اسید استیک، pH به طور پیوسته کاهش می‌یابد. پس از روز دهم، با کاهش الکل، اسید استیک افزایش می‌یابد که نشان‌دهنده تغییر مسیر متابولیک است. همچنین اسید استیک پیش‌ساز ترکیبات معطر مهمی مانند استات اتیل است که در غلظت‌های پایین طعم میوه‌ای ایجاد می‌کند (Kaewkod *et al.*, 2019). برای تخمیرهای خانگی، پس از رسیدن به سطح ترشی مطلوب، فرآیند کامل در نظر گرفته می‌شود، در حالی که برای تحقیقات تجربی یا صنعتی، نقطه پایان تخمیر با اندازه‌گیری pH، اسیددیده قابل

تیتراسیون کل (TTA)، محتوای الکل و غلظت قند تعیین شود. در حالی که $4 \sim$ TTA گرم در لیتر یک نوشیدنی سنتی کامبوجا با ارزش حسی بالا تولید می‌کند (Greenwalt *et al.*, 2000).

تغییرات محتوای الکل

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثر زمان تخمیر بر محتوای الکل در سطح احتمال ۱٪ معنی‌دار بود (جدول ۲). محتوای الکل در تمام تیمارها روند تغییرات مشخصی را دنبال کرد به طوری که در روزهای اولیه (۵ روز) در پایین‌ترین سطح بود، در روز دهم به اوج خود رسید و سپس در روز پانزدهم کاهش معنی‌داری یافت. این الگوی تغییرات را می‌توان به مراحل مختلف تخمیر نسبت داد. در مرحله اول، مخمرها قندها را به اتانول تبدیل می‌کنند و در مراحل بعدی، باکتری‌های استیک اسید، اتانول را به اسید استیک اکسید می‌کنند که منجر به کاهش نسبی محتوای الکل در پایان دوره تخمیر می‌شود. در بین تیمارهای مورد مطالعه، کامبوجای گانودرما (GK) در روز دهم با تولید ۳/۵٪ الکل، به طور معنی‌داری بالاترین محتوای الکل را نشان داد ($p < 0.05$). برتری کامبوجای گانودرما (GK) در تولید الکل می‌تواند به جمعیت غالب مخمرهای مختلف در این تیمار مرتبط باشد. گزارش شده است که بسترهای غنی از پلی‌ساکاریدهای پیچیده (مانند گانودرما) می‌توانند جمعیت‌های مخمری متفاوتی را انتخاب کنند که کارایی بالاتری در تولید اتانول دارند (Bell *et al.*, 2022). برتری تیمار کامبوجای گانودرما (GK) در تولید اتانول را می‌توان بر اساس چندین مکانیسم زیست‌شناختی تبیین نمود. نخست، نقش غنی‌سازی سوبسترا قابل توجه است. پلی‌ساکاریدهای پیچیده موجود در قارچ گانودرما، از جمله β -گلوکان‌ها، توسط آنزیم‌های برون‌سلولی مخمرها به الیگوساکاریدها و مونوساکاریدهای ساده‌تر هیدرولیز می‌شوند. این فرآیند سوبسترای اضافی برای تخمیر الکی فراهم می‌کند و در نهایت منجر به افزایش تولید اتانول می‌شود (Karimi *et al.*, 2023). بعلاوه انتخاب جمعیت مخمری تخصص‌یافته نقش تعیین‌کننده‌ای دارد. شواهد نشان می‌دهند که ترکیبات زیست‌فعال موجود در گانودرما به عنوان فاکتورهای انتخابی برای گونه‌های خاص مخمر عمل می‌کنند. به عنوان مثال، مخمرهای متعلق به جنس *Saccharomyces* که از کارایی بالایی در تخمیر قندهای پیچیده برخوردارند، ممکن است در حضور این ترکیبات از مزیت رقابتی برخوردار شده و غالبیت یابند. ترکیبات تری‌ترپنوئیدی موجود در گانودرما با افزایش نفوذپذیری غشای سلولی مخمرها، انتقال مواد مغذی را تسهیل نموده و در نتیجه بازده فرآیند تخمیر را افزایش می‌دهند (Paul, 2025). این مکانیسم‌ها در مجموع سینرژیسم ایجاد کرده و تیمار GK را به یک بستر تخمیر مطلوب برای تولید اتانول تبدیل می‌کنند.

تغییرات ساکارز

کاهش معنی‌دار محتوای ساکارز در طول دوره تخمیر در تمام تیمارها در آنالیز واریانس مشاهده شد (جدول ۲). این کاهش به طور مستقیم ناشی از مصرف قند توسط کنسرسیون میکروبی کامبوجا است. در بین تیمارها، کامبوجای قهوه (CK) با کاهش از ۱۱ به ۷/۵ واحد، بیشترین کاهش در محتوای ساکارز را داشت که احتمالاً نشان‌دهنده دسترسی بهتر و متابولیسم سریع‌تر منابع قندی در این محیط است. این امر می‌تواند ناشی از وجود قندهای ساده‌تر و محتوای کافئین بالاتر در بستر قهوه باشد که

به عنوان یک محرک متابولیک برای میکروارگانیسم‌ها عمل کرده و منجر به مصرف سریع‌تر قند می‌شود (Saito et al., 2024). کاهش مداوم محتوای ساکارز در تمام تیمارها، که با روش سنجش بریکس اندازه‌گیری شد، تاییدکننده فعالیت شدید متابولیک مخمرها و باکتری‌ها در طول تخمیر است. در مرحله اول تخمیر، مخمرها ساکارز را به گلوکز و فروکتوز هیدرولیز کرده و سپس آنها را به اتانول و دی‌اکسیدکربن تبدیل می‌کنند (De Filippis et al., 2018). در مرحله بعد، باکتری‌های استیک اسید (AAB) از جمله *Komagataeibacter* spp. این اتانول را به اسید استیک اکسید می‌کنند که منجر به کاهش pH و افزایش اسیدیته می‌شود (Villarreal-Soto et al., 2020). الگوی مشاهده‌شده در این مطالعه (افزایش اولیه اتانول تا روز دهم و سپس کاهش نسبی آن همزمان با افزایش اسید استیک) به خوبی از این توالی متابولیک پشتیبانی می‌کند. بریکس به عنوان یک شاخص معتبر برای سنجش کل مواد جامد محلول، عمدتاً متشکل از قندها، به شمار می‌رود. بنابراین، همبستگی مستقیم بین کاهش مقادیر بریکس و مصرف ساکارز توسط میکروارگانیسم‌ها کاملاً منطقی و مورد انتظار است. همسویی روند نزولی این دو پارامتر، صحت نتایج به دست آمده را تقویت می‌کند.

نتیجه‌گیری

این نتایج نشان داد که بستر اولیه (چای سبز، قهوه یا گانودرما) و زمان تخمیر می‌تواند به طور قابل توجهی بر خواص عملکردی و سلامت‌بخش نوشیدنی کامبوجا تأثیر بگذارد. داده‌ها به وضوح نشان می‌دهند که فرآیند تخمیر یک فرآیند پویا و پیچیده است که در آن برخی ترکیبات تولید و برخی دیگر تجزیه می‌شوند. تفاوت‌های معنی‌دار در پارامترهای شیمیایی بین تیمارهای مختلف را می‌توان به ترکیب شیمیایی اولیه بستر تخمیر نسبت داد. این نتایج به وضوح نشان می‌دهد که طبیعت بستر اولیه بر ترکیب و متابولیسم کنسرسیون میکروبی کامبوجا تأثیر مستقیم می‌گذارد و در نهایت ویژگی‌های نهایی نوشیدنی را تعیین می‌کند. تمام سه نوع کامبوجا از الگوی تخمیر استاندارد پیروی کردند، اما کامبوجای گانودرما (GK) از نظر تولید الکل و کاهش pH کارایی بالاتری نشان داد. کامبوجای تولیدشده از چای سبز از نظر محتوای ترکیبات زیست‌فعال (پلی‌فنول‌ها و فلاونوئیدها) و فعالیت آنتی‌اکسیدانی برتر بود و در کوتاه‌ترین زمان تخمیر (۵ روز) به اوج خود رسید. با این حال، کامبوجای گانودرما به دلیل پایداری بالاتر ترکیبات موثره در طول دوره تخمیر و همچنین دارا بودن خواص دارویی ذاتی قارچ گانودرما، به عنوان یک گزینه نوآورانه و امیدبخش برای تولید نوشیدنی‌های عملکردی با خواص سلامت‌بخش منحصربه‌فرد مطرح می‌باشد. در نهایت انتخاب نوع کامبوجا و زمان تخمیر باید بر اساس سلیقه مصرف‌کننده (ترجیح طعم ترش یا شیرین) و هدف نهایی (محتوای الکل یا خواص پروبیوتیکی) انجام شود.

منابع

Aspiyanto, A. S., Iskandar, J. M., Melanie, H., Maryati, Y., & Lotulung, P. D. (2017). Characteristic of fermented spinach (*Amaranthus* spp.) polyphenol by kombucha culture for antioxidant compound. *AIP Conference Proceedings*, 1803(1), 020018. <https://doi.org/10.1063/1.4973140>

- Ayed, L., & Hamdi, M. (2015).** Manufacture of a beverage from cactus pear juice using “tea fungus” fermentation. *Annals of Microbiology*, 65(4), 2293–2299. <https://doi.org/10.1007/s13213-015-1071-1>
- Ayed, L., Abid, S. B., & Hamdi, M. (2017).** Development of a beverage from red grape juice fermented with the kombucha consortium. *Annals of Microbiology*, 67(1), 111–121. <https://doi.org/10.1007/s13213-016-1242-2>
- Bell, V., Silva, C. R. P. G., Guina, J., & Fernandes, T. H. (2022).** Mushrooms as future generation healthy foods. *Frontiers in Nutrition*, 9, 1050099. <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.1050099>
- Bellassoued, K., Ghrab, F., Makni-Ayadi, F., Van Pelt, J., Elfeki, A., & Ammar, E. (2015).** Protective effect of Kombucha on rats fed a hypercholesterolemic diet is mediated by its antioxidant activity. *Pharmaceutical Biology*, 53(11), 1699–1709. <https://doi.org/10.3109/13880209.2014.1001408>
- Četojević-Simin, D. D., Velićanski, A. S., Cvetković, D. D., Markov, S. L., Mrdanović, J. Ž., Bogdanović, V. V., & Šolajić, S. V. (2012).** Bioactivity of lemon balm kombucha. *Food and Bioprocess Technology*, 5(5), 1756–1765. <https://doi.org/10.1007/s11947-011-0618-3>
- De Filippis, F., Troise, A. D., Vitaglione, P., & Ercolini, D. (2018).** Different temperatures select distinctive acetic acid bacteria species and promotes organic acids production during Kombucha tea fermentation. *Food Microbiology*, 73, 275–283.
- Ettayebi, K., Errachidi, F., Jamai, L., Tahri-Jouti, M. A., Sendide, K., & Ettayebi, M. (2003).** Biodegradation of polyphenols with immobilized *Candida tropicalis* under metabolic induction. *FEMS Microbiology Letters*, 223(2), 215–219. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(03\)00380-4](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(03)00380-4)
- Gaggia, F., Baffoni, L., Galiano, M., Nielsen, D. S., Jakobsen, R. R., Castro-Mejía, J. L., Bosi, S., Truzzi, F., Musumeci, F., & Dinelli, G. (2018).** Kombucha beverage from green, black and rooibos teas: A comparative study looking at microbiology, chemistry and antioxidant activity. *Nutrients*, 11(1), 1. <https://doi.org/10.3390/nu11010001>
- Greenwalt, C. J., Steinkraus, K. H., & Ledford, R. A. (2000).** Kombucha, the fermented tea: Microbiology, composition, and claimed health effects. *Journal of Food Protection*, 63(7), 976–981. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-63.7.976>
- Heidari, A., Rezazad Bari, M., & Amiri, S. (2018).** Production of functional fermented Kombucha drink using white tea and date syrup contains apple vinegar and ginger. *Food Microbiology*, 1, 27–38.
- Hur, S. J., Lee, S. Y., Kim, Y.-C., Choi, I., & Kim, G.-B. (2014).** Effect of fermentation on the antioxidant activity in plant-based foods. *Food Chemistry*, 160, 346–356. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.03.112>
- Jarrell, J., Cal, T., & Bennett, J. W. (2000).** The Kombucha consortia of yeasts and bacteria. *Mycologist*, 14(4), 166–170. [https://doi.org/10.1016/S0269-915X\(00\)80034-8](https://doi.org/10.1016/S0269-915X(00)80034-8)
- Jayabalan, R., Malbaša, R. V., Lončar, E. S., Vitas, J. S., & Sathishkumar, M. (2014).** A review on kombucha tea—Microbiology, composition, fermentation, beneficial effects, toxicity, and tea fungus. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13(4), 538–550. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12073>
- Kaashyap, M., Cohen, M., & Mantri, N. (2021).** Microbial diversity and characteristics of kombucha as revealed by metagenomic and physicochemical analysis. *Nutrients*, 13(12), 4446. <https://doi.org/10.3390/nu13124446>
- Kaewkod, T., Yingchaipreecha, K., & Aumprapha, W. (2019).** Control of methanol during fermentation of Kombucha for bacterial cellulose production. *Foods*, 8 (10), 451. <https://doi.org/10.3390/foods8100451>
- Karimi, R., Homayoonfal, M., Malekjani, N., Kharazmi, M. S., & Jafari, S. M. (2023).** Interaction between β -glucans and gut microbiota: a comprehensive review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 63 (25), 7804–7835. <https://doi.org/10.1080/10408398.2023.2192281>
- Kim, J., & Adhikari, K. (2020).** Current trends in kombucha: Marketing perspectives and the need for improved sensory research. *Beverages*, 6(1), 15. <https://doi.org/10.3390/beverages6010015>
- Kim, J., & Adhikari, K. (2020).** Current trends in kombucha: Marketing perspectives and the need for improved sensory research. *Beverages*, 6 (1), 15. <https://doi.org/10.3390/beverages6010015>
- Marco, M. L., Sanders, M. E., Gänzle, M., Arrieta, M. C., Cotter, P. D., De Vuyst, L., Hill, C., Holzappel, W., Lebeer, S., Merenstein, D., Reid, G., Wolfe, B. E., & Hutkins, R. (2021).** The

International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on fermented foods. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 18(3), 196–208. <https://doi.org/10.1038/s41575-020-00390-5>

Ooi, T. S., Ting, A. S. Y., & Siow, L. F. (2020). Influence of selected native yeast starter cultures on the antioxidant activities, fermentation index and total soluble solids of Malaysia cocoa beans: A simulation study. *LWT - Food Science and Technology*, 122, 108977. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108977>

Paul, N. (2025). Significant role of bioactive compounds of *Ganoderma lucidum* in the aging process. *Open Access Research Journal of Biology and Pharmacy*, 14(2), 035-044. <https://doi.org/10.53022/oarjbp.2025.14.2.0033>

Pełal, A., & Pyrzynska, K. (2014). Evaluation of aluminium complexation reaction for flavonoid content assay. *Food Analytical Methods*, 7(9), 1776–1782. <https://doi.org/10.1007/s12161-014-9814>

Pure, A. E., & Pure, M. E. (2016). Antioxidant and antibacterial activity of kombucha beverages prepared using banana peel, common nettles and black tea infusions. *Applied Food Biotechnology*, 3(2), 125–130. <https://doi.org/10.22037/afb.v3i2.11094>

Saha, K., Lajis, N. H., Israif, D. A., Hamzah, A. S., Khozirah, S., Khamis, S., & Syahida, A. (2004). Evaluation of antioxidant and nitric oxide inhibitory activities of selected Malaysian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 92(2-3), 263-267

Saito, M. S., dos Santos, W. A., & Mamede, M. E. d. O. (2024). Coffee-Flavoured Kombucha: Development, Physicochemical Characterisation, and Sensory Analysis. *Fermentation*, 10(7), 334. <https://doi.org/10.3390/fermentation10070334>

Salafzoon, S., Mahmoodzadeh Hosseini, H., & Halabian, R. (2018). Evaluation of the antioxidant impact of ginger-based kombucha on the murine breast cancer model. *Journal of Complementary and Integrative Medicine*, 15(4), 1–8. <https://doi.org/10.1515/jcim-2017-0071>

Singleton V.L., Rossi J.A. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. Am. J. Enol. Vitic. 1965;16:144–158

Tanaka, T., Matsuo, Y., & Kouno, I. (2009). Chemistry of secondary polyphenols produced during processing of tea and selected foods. *International Journal of Molecular Sciences*, 11(1), 14–40. <https://doi.org/10.3390/ijms11010014>

Tu, C., Tang, S., Azi, F., Hu, W., & Dong, M. (2019). Use of kombucha consortium to transform soy whey into a novel functional beverage. *Journal of Functional Foods*, 52, 81-89.

Vázquez-Cabral, B. D., Rocha-Guzmán, N. E., Gallegos-Infante, J. A., González-Herrera, S. M., González-Laredo, R. F., Moreno-Jiménez, M. R., & Córdova-Moreno, I. T. S. (2014). Chemical and sensory evaluation of a functional beverage obtained from infusions of oak leaves (*Quercus resinosa*) inoculated with the kombucha consortium under different processing conditions. *Nutrafoods*, 13(4), 169–178. <https://doi.org/10.1007/s13749-014-0044>

Velićanski, A. S., Cvetković, D. D., Markov, S. L., Tumbas Šaponjac, V. T., & Vulić, J. J. (2014). Antioxidant and antibacterial activity of the beverage obtained by fermentation of sweetened lemon balm (*Melissa officinalis* L.) tea with symbiotic consortium of bacteria and yeasts. *Food Technology and Biotechnology*, 52(4), 420–429. <https://hrcak.srce.hr/123664>

Villarreal-Soto, S. A., Beaufort, S., Bouajila, J., Souchard, J. P., Renard, T., Rollan, S., & Taillandier, P. (2020). Impact of fermentation conditions on the production of bioactive compounds with anticancer, anti-inflammatory and antioxidant properties in kombucha tea extracts. *Process Biochemistry*, 89, 110-120.

Vina, I., Semjonovs, P., Linde, R., & 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>

Yavari, N., Assadi, M. M., Moghadam, M. B., & Larijani, K. (2011). Optimizing glucuronic acid production using tea fungus on grape juice by response surface methodology. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 5(9), 1788–1794.

Yavari, N., Mazaheri-Assadi, M., Mazhari, Z. H., Moghadam, M. B., & Larijani, K. (2017). Glucuronic acid rich kombucha-fermented pomegranate juice. *Journal of Food Research*, 7(1), 61. <https://doi.org/10.5539/jfr.v7n1p61>

Yavari, N., Mazaheri-Assadi, M., Moghadam, M. B., & Larijani, K. (2010). Response surface methodology for optimization of glucuronic acid production using kombucha layer on sour cherry juice. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 4(8), 3250–3256.

Zhao, Y. S., Eweys, A. S., Zhang, J. Y., Zhu, Y., Bai, J., Darwesh, O. M., Zhang, H. B., & Xiao, X. (2021). Fermentation affects the antioxidant activity of plant-based food material through the release and production of bioactive components. *Antioxidants*, 10 (12), 2004. <https://doi.org/10.3390/antiox10122004>

Zhou, D. D., Li, J., Xiong, R. G., Saimaiti, A., Huang, S. Y., Wu, S. X., & Li, H. B. (2022). Bioactive compounds, health benefits and food applications of kombucha tea: A comprehensive review. *Foods*, 11(19), 2976.