

UNIVERZITET U NOVOM SADU
TEHNOLOŠKI FAKULTET

mr Aleksandra S. Velićanski

**KARAKTERIZACIJA FUNKCIONALNOG NAPITKA
OD MELISE (*Melissa officinalis* L.) DOBIJENOG
FIZIOLOŠKOM AKTIVNOŠĆU ČAJNE GLJIVE**

-doktorska disertacija-

Mentor:
dr Dragoljub D. Cvetković

Novi Sad, 2012. godine

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. PREGLED LITERATURE	3
2.1. MIKROORGANIZMI ČAJNE GLJIVE	3
2.1.1. Kvasci čajne gljive.....	4
2.1.2. Bakterije sirćetnog vrenja.....	7
2.2. KULTIVACIJA ČAJNE GLJIVE.....	16
2.2.1. Sastav podloge za kultivaciju čajne gljive.....	16
2.2.2. Uslovi za kultivaciju čajne gljive.....	19
2.2.3. Zaslađen čaj melise kao podloga za kultivaciju čajne gljive.....	20
2.2.3.1. Hemijski sastav melise i biološka aktivnost.....	21
2.3. HEMIJSKI SASTAV KOMBUHA NAPITKA	23
2.4. FUNKCIONALNE KARAKTERISTIKE KOMBUHA NAPITKA	25
2.4.1. Antimikrobno delovanje kombuhe	28
2.4.2. Antioksidativno delovanje kombuhe.....	32
2.4.3. Antikancerogeno delovanje kombuhe	37
2.5. BAKTERIJE MLEČNE KISELINE KAO FUNKCIONALNI DODATAK KOMBUHI	40
2.5.1. Mlečno-kiselinska fermentacija.....	41
2.5.2. Probiotske bakterije	43
3. MATERIJAL I METODE.....	46
3.1. KARAKTERISTIKE RADNE KULTURE I IDENTIFIKACIJA IZOLOVANIH SOJEVA BSV	46
3.2. KOMBUHA FERMENTACIJE.....	47
3.2.1. Tradicionalni postupak	47
3.2.2. Suplementna inokulacija bakterijama mlečne kiseline	48
3.2.2.1. Priprema suspenzije komercijalnih starter kultura	48
3.2.2.2. Priprema suspenzije izolata bakterija mlečne kiseline	48
3.3. FIZIČKO-HEMIJSKE ANALIZE FERMENTACIONE TEČNOSTI.....	49
3.4. MIKROBIOLOŠKE ANALIZE FERMENTACIONE TEČNOSTI.....	50
3.5. ISPITIVANJE ANTIBAKTERIJSKE AKTIVNOSTI KOMBUHA NAPITAKA OD MELISE	50
3.6. ISPITIVANJE ANTIOKSIDATIVNE AKTIVNOSTI.....	52
3.6.1. ESR spektralna analiza uticaja čajnih napitaka, fermentacionih tečnosti i kombuha napitaka na transformaciju DPPH radikala	52
3.6.2. ESR spektralna analiza uticaja čajnih napitaka, fermentacionih tečnosti i kombuha napitaka na transformaciju hidrosil radikala	53
3.7. ISPITIVANJE ANTIPROLIFERATIVNE AKTIVNOSTI KOMBUHA NAPITKA OD MELISE	53
4. REZULTATI I DISKUSIJA.....	56
4.1. PRISUSTVO STRANIH MIKROORGANIZAMA U RADNOJ KULTURI.....	56
4.2. IDENTIFIKACIJA BAKTERIJA SIRĆETNOG VRENJA POREKLOM IZ ČAJNE GLJIVE PCR METODOM	57
4.3. PARAMETRI PROCESA KOMBUHA FERMENTACIJE MELISE.....	63
4.4. FUNKCIONALNE KARAKTERISTIKE KOMBUHA NAPITAKA	68

4.4.1. Antibakterijska aktivnost kombuhe od melise.....	68
4.4.2. Antioksidativna ativnost čajnih napitaka, fermentacionih tečnosti i kombuha napitaka ESR spektralnom analizom.....	77
4.4.2.1. Sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja i HPLC analiza fenolnih komponenata u čajnim napicima, fermentacionim tečnostima i kombuha napicima od melise i crnog čaja	79
4.4.2.2. Antioksidativna aktivnost čajnih napitaka, fermentacionih tečnosti i kombuha napitaka od melise i crnog čaja.....	86
4.4.3. Antiproliferativna aktivnost čajnog i kombuha napitka od melise.....	93
4.5. VIJABILNOST I FIZIOLOŠKA AKTIVNOST BMK TOKOM KOMBUHA FERMENTACIJE.....	96
4.5.1. Inokulacija fermentacione tečnosti komercijalnim starter kulturama	96
4.5.2. Inokulacija fermentacione tečnosti izolatima BMK.....	100
5. ZAKLJUČAK.....	109
6. LITERATURA.....	111

1. UVOD

Kombuha je tradicionalni napitak koji se dobija fermentacijom zaslađenog crnog ili zelenog čaja. Na Dalekom istoku se ovaj napitak konzumira već nekoliko hiljada godina. Smatra se da je poreklom iz severoistočne Kine (Mandžurije), gde su se ovom napitku pridavale magične moći. Odatle je prenet u Rusiju i istočnu Evropu, a sredinom XIX veka i u centralnu Evropu. Tokom II svetskog rata konzumiranje kombuhe prošireno je i na zapadnu Evropu i severnu Afriku. U Americi je ovaj napitak dostigao veliku popularnost u poslednjih tridesetak godina.

Po jednoj od teorija, naziv kombuha potiče od japanske reči „kombu“, što znači alga i „cha“, što znači čaj, dok se u savremenom Japanu kombuhom nazivaju razni tonici koji se prave od mešavine zelenog čaja i alge (*Laminaria japonica*). Postojanje preko 70 sinonima za kombuha napitak govori o njegovoj širokoj rasprostranjenosti. Neki od njih su: „Kocha kinoko“, „Suancha“, „Takezutsu-sancha“, „Reishi“, u Japanu, na Tajvanu „Haipao“, u Nemačkoj „Hongo“, u centralnoj Evropi „Wolga jellyfish“, „Olinka“, „Tea kwass“, u Rusiji „Japonski grib“, „Sakvasska“ itd.

Popularnost kombuhe širom sveta pre svega je povezana sa brojnim lekovitim svojstvima koja joj se pripisuju, kao i zbog prijatnog, osvežavajućeg ukusa. Smatra se da kombuha ima blagotvorna dejstva na digestivni sistem, reumatizam, hemoroide, psorijazu, nervni sistem, kancerogena oboljenja, povišen krvni pritisak, artritis, imunološki sistem itd. Većina pobrojanih svojstava nije naučno dokazana, već je izvedena na osnovu iskustava dugogodišnjih konzumenata kombuhe.

Dosadašnje proučavanje čajne gljive i kombuhe se najvećim delom odnosilo na mikrobiologiju čajne gljive i hemijski sastav napitka. Poznato je da čajna gljiva predstavlja zajednicu autohtonih vrsta kvasaca i bakterija sirćetnog vrenja (BSV), čiji je sastav određen klimatskim i geografskim uslovima kultivacije. Prisustvo bakterija mlečne kiseline (BMK) u kombuha kulturi i napitku je bio predmet samo malog broja istraživanja. Takođe, u literaturi nema podataka o inokulisanju fermentacione tečnosti ili gotovog kombuha napitka bakterijama mlečne kiseline i simultanoj mlečno-kiselinskoj i kombuha fermentaciji, u cilju dobijanja napitka poboljšanih funkcionalnih karakteristika.

Tradicionalna podloga za kultivaciju čajne gljive je saharozom zaslađen crni ili zeleni čaj (*Camelia sinensis* L.). Navedeni čajevi predstavljaju bogat izvor purinskih jedinjenja neophodnih mikroorganizmima čajne gljive za rast i razmnožavanje. Iako postoje podaci da se biljni čajevi (od nane, lipe, šipka i dr.) ne mogu samostalno koristiti kao izvor azotnih jedinjenja u podlozi za kultivaciju čajne gljive jer ne sadrže dovoljne količine purinskih jedinjenja, čajna gljiva je uspešno kultivisana na čaju ehinacee, rtanjskom čaju, menti, majčinoj dušici i melisi.

Cilj istraživanja u okviru ove doktorske disertacije je bio „*in vitro*“ ispitivanje i karakterizacija antimikrobne, antioksidativne i antiproliferativne aktivnosti kombuhe od melise (*Melissa officinalis* L.), kao napitka poboljšanih bioloških karakteristika u odnosu na kombuhu od crnog čaja. Antimikrobna aktivnost kombuhe od melise ispitana je prema Gram-pozitivnim i Gram-negativnim bakterijama izolovanim iz vode za piće i namirnica (tzv. Divlji sojevi) i odabranim sojevima BMK. U svim dosadašnjim istraživanjima antimikrobne aktivnosti kombuha napitaka su kao test mikroorganizmi uglavnom korišćeni referentni sojevi mikroorganizama, tako da je otvoreno pitanje o inhibitornom delovanju kombuhe na sojeve mikroorganizama koji su kao kontaminanti izolovani iz okruženja i koji su kao takvi otporniji na ekološke faktore (među njima i na antimikrobne agense). Takođe, ne postoje podaci o

antimikrobnom delovanju kombuhe na bakterije mlečne kiseline koje su kao deo intestinalne bakterijske populacije vrlo značajne za opšte zdravstveno stanje ljudskog organizma.

U cilju daljeg ispitivanja funkcionalnih karakteristika kombuhe od melise ispitana je antioksidativna aktivnost fermentacione tečnosti i kombuha napitaka od melise i crnog čaja, kao i čajnih napitaka, na hidrosil i 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) radikale, a antiproliferativna aktivnost gotovog kombuha napitka od melise i čajnog napitka ispitana je na rast odabranih ćelijskih linija (epitelni karcinom grlića materice, adenokarcinom dojke i adenokarcinom debelog creva). Da bi se definisale aktivne komponente napitka, nosioci biološke aktivnosti, u uzorcima fermentacione tečnosti od melise i crnog čaja određen je sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja, kao i njihov kvalitativni i kvantitativni sastav.

U cilju ispitivanja mogućnosti inkorporiranja bakterija mlečne kiseline u kombuha kulturu, fermentaciona tečnost je tokom fermentacije inokulisana komercijalnim starter kulturama i sojevima *Lactobacillus* spp. izolovanim iz sira, kajmaka i kiselog testa. Tokom simultane mlečno-kiselinske i kombuha fermentacije je određen stepen preživljavanja BMK, kao i stepen produkcije mlečne kiseline (L- i D- oblika).

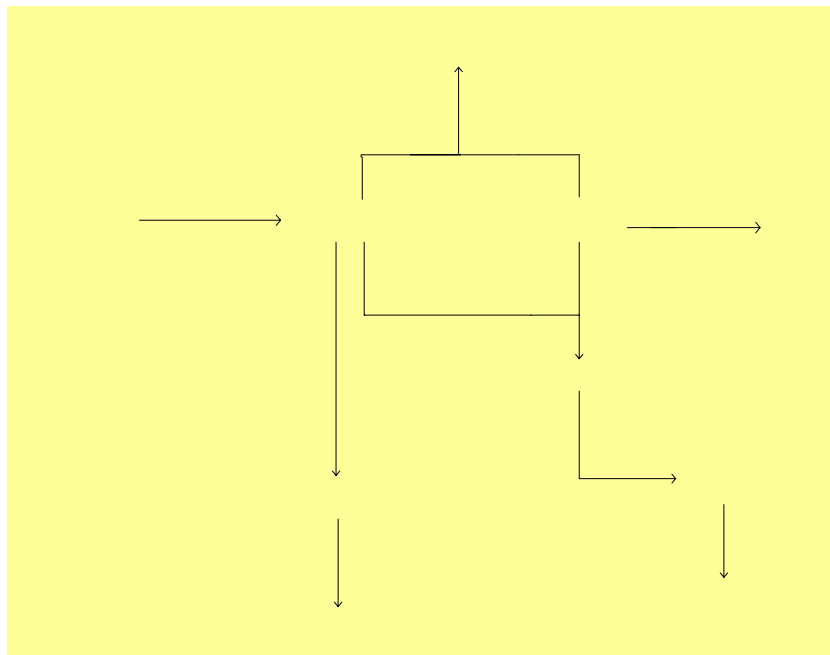
Čajna gljiva koja je kao radna kultura upotrebljena u ovoj doktorskoj disertaciji je prvobitno ispitana na eventualno prisustvo stranih mikroorganizama/kontaminanata, pored kvasaca i bakterija sirćetnog vrenja. Tom prilikom su iz radne kulture izolovana dva soja bakterija sirćetnog vrenja čija je identifikacija izvedena Polimerase Chain Reaction (PCR) metodom.

2. PREGLED LITERATURE

2.1. MIKROORGANIZMI ČAJNE GLJIVE

Čajna gljiva predstavlja zajednicu (konzorcijum) bakterija sirćetnog vrenja i autohtonih vrsta kvasaca. Za ovu zajednicu u literaturi se najčešće koristi termin simbioza. Ruski naučnici su čak čajnu gljivu nazivali lišaj uprkos odsustva algi i filamentoznih gljiva. Iako nema dokaza da mikroorganizmi čajne gljive međusobno zavise jedni od drugih, kao što je slučaj u simbiozi, oni ipak žive u združenoj kulturi. Sličan konzorcijum javlja se i u slučaju biofilmova (Jarrell i sar., 2000).

U podlogama za kultivaciju čajne gljive kao ugljeni hidrat i izvor ugljenika najčešće se koristi saharoza. BSV ne mogu direktno da usvoje saharozu jer nemaju mogućnost da je transportuju u ćeliju, niti mogu u nedostatku enzima invertaze ekstracelularno da hidrolizuju ovaj disaharid. Mogućnost hidrolize saharoze imaju kvasci čajne gljive koji enzimom invertazom (saharaza, β -fruktozidaza) hidrolizuju saharozu do glukoze i fruktoze koje dalje usvajaju bakterije sirćetnog vrenja. BSV deo glukoze oksiduju do glukonske i ketoglukonskih kiselina, a etanol nastao fermentativnom aktivnošću kvasaca oksiduju u sirćetnu kiselinu. Pojedine vrste bakterija sirćetnog vrenja od glukoze i fruktoze stvaraju celulozu (Slika 1). Celuloza se u vidu pelikule formira na površini tečnosti, na kojoj je održava CO_2 nastao fermentativnom aktivnošću kvasaca (Sievers i sar., 1995; Stojanović i Janković, 1996). Ovako stvorena pelikula izgledom podseća na pileus (šešir) viših gljiva, zbog čega se najverovatnije do danas zadržao i opšte je prihvaćen naziv „čajna gljiva“, iako nije adekvatan. Metabolički procesi koji se odigravaju u konzorcijumu čajne gljive tokom višednevne kultivacije u literaturi su poznati kao „kombuha fermentacija“ (Sreeramulu i sar., 2000; Teoh i sar., 2004).



Slika 1. Šema osnovne metaboličke aktivnosti čajne gljive (Sievers i sar., 1995)

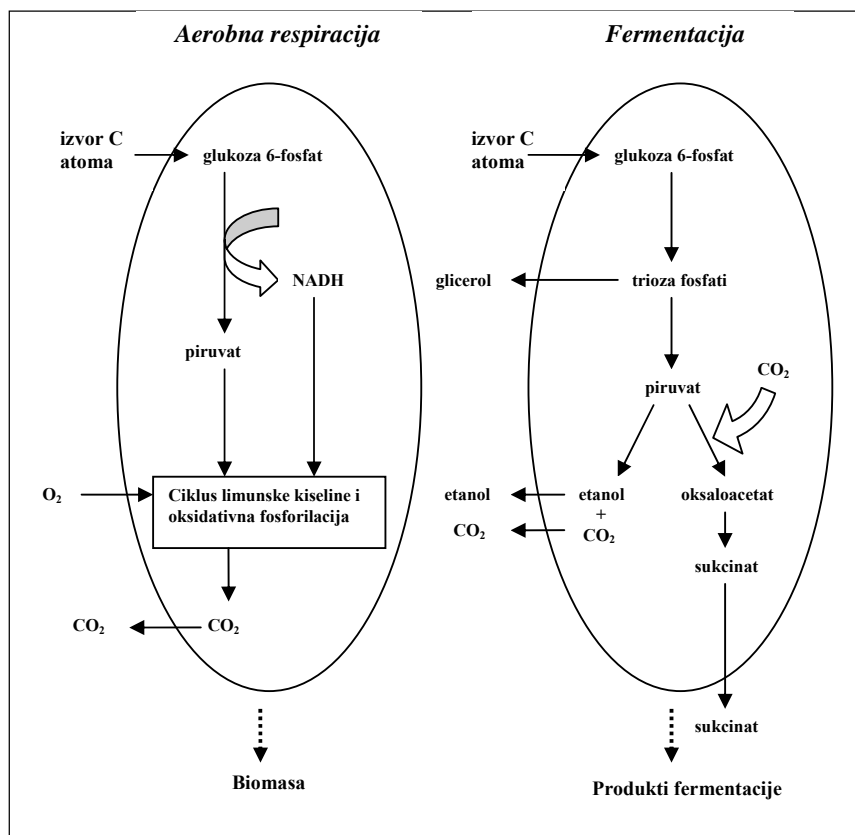
2.1.1. Kvasci čajne gljive

Kvasci su eukariotski mikroorganizmi klasifikovani u carstvo gljiva (Fungi). Postoji oko 1500 vrsta kvasaca što čini svega 1% od ukupnog broja vrsta iz carstva gljiva. Kvasci su nefilamentozni, jednoćelijski mikroorganizmi široko rasprostranjeni u prirodi (ubikvitarni mikroorganizmi), koji zbog fermentativne sposobnosti i produkcije etanola i ugljendioksida, imaju izuzetan industrijski značaj. Optimalna \square etabolite \square za rast većine kvasaca je u opsegu od 15-30°C. Ipak, ona se razlikuje od vrste do vrste, pa tako *Leucosporidium frigidum* raste od -2 do 20°C, *Saccharomyces telluris* od 5 do 35°C, *Candida slooffi* od 28 do 45°C (Arthur i Watson, 1976). Razvoju kvasaca pogoduje blago kisela sredina (vrednosti pH između 4 i 6). Iako su same ćelije kvasaca indiferentne na vrednosti pH sredine u opsegu od 3,5-8, njihov rast je ograničen zbog osetljivosti enzimskih sistema (Walker, 1998).

Po tipu metabolizma, odnosno svojim fiziološkim karakteristikama, kvasci su fakultativno anaerobni mikroorganizmi. Pod anaerobnim uslovima javlja se fermentativni tip metabolizma, pri čemu je rast ćelija minimalan, a reprodukcija ograničena na nekoliko generacija (Slika 2). S druge strane, prisustvo kiseonika u znatnoj meri stimuliše umnožavanje ćelija (Walker, 1998). Pojava da se fermentacija ugljenih hidrata odvija pod anaerobnim uslovima i da se aerisanjem kulture najpre usporava, a zatim i potpuno zaustavlja definiše se kao „Pasteurov efekat“. Međutim, fermentacija je moguća i pod aerobnim uslovima. „Custers efekat“ se javlja kod određenih vrsta kvasaca kod kojih je fermentacija inhibirana odsustvom kiseonika. Kvasci koji pripadaju rodovima *Dekkera*, *Brettanomyces* i *Eeniella* glukozu fermentišu brže pod aerobnim nego pod anaerobnim uslovima što za posledicu ima sintezu veće količine sirćetne kiseline. „Crabtree efekat“ je pojava fermentativnog metabolizma pri aerobnim uslovima u prisustvu visoke koncentracije ugljenih hidrata, npr. više od 9 g/l D-glukoze u podlozi. Pri navedenoj koncentraciji glukoze dolazi do represije formiranja mitohondrijskih elemenata i respiratornih enzima. „Kluyver efekat“ je pojava da određeni kvasci pod aerobnim uslovima mogu da fermentišu glukozu, a ne mogu neke druge šećere. Npr. *Candida utilis* fermentišu glukozu, a na maltozi raste pod aerobnim uslovima i ne može da je fermentišu. Ovi fenomeni su poznati pod zajedničkim nazivom „negativan Pasteur-ov efekat“ i zavise od vrste kvasca i supstrata koga fermentišu (Weusthuis, 1994).

Prvi korak u metabolizmu disaharida može da se odvija intracelularno ili ekstracelularno. U slučaju usvajanja saharoze od strane *Saccharomyces cerevisiae* i većine drugih kvasaca dolazi do ekstracelularne hidrolize pomoću enzima invertaze do glukoze i fruktoze. Potvrđeno je da invertazu neki kvasci izlučuju u podlogu, a da se kod većine ona nalazi sa spoljašnje strane osnovne ćelijske membrane (Lampen, 1968). Zatim se u ćelijama kvasaca D-glukoza i D-fruktoza metabolišu nizom biohemijskih reakcija koje su poznate pod nazivom glikoliza (Emben-Meyerhof-Parnasov put) (Slika 3). U aerobnim uslovima, kada je krajnji akceptor elektrona kiseonik, razlaganje ugljenih hidrata se odvija kao respiracija, a nastala pirogroždana kiselina preko acetil-CoA, kao intermedijera, ulazi u ciklus trikarbonskih kiselina (Krebs-ov ciklus). S druge strane, tokom fermentativnog tipa metabolizma, pirogroždana kiselina se transformiše u etanol i ugljendioksid (Barnett, 1976; Fugelsang i Edwards, 2007).

Kvasci tokom metabolizma kao sporedne produkte sintetišu veliki broj biološki vrednih jedinjenja kao što su vitamini B grupe: tiamin (B₁), riboflavin (B₂), niacin (B₃), pantotenska kiselina (B₅), piridoksin (B₆), p-aminobenzoeva kiselina, vitamin B₁₂, zatim folna kiselina, nikotinska kiselina, biotin, inozitol i drugi (Van der Walt i Yarrow, 1984; Barnet i sar., 2000).

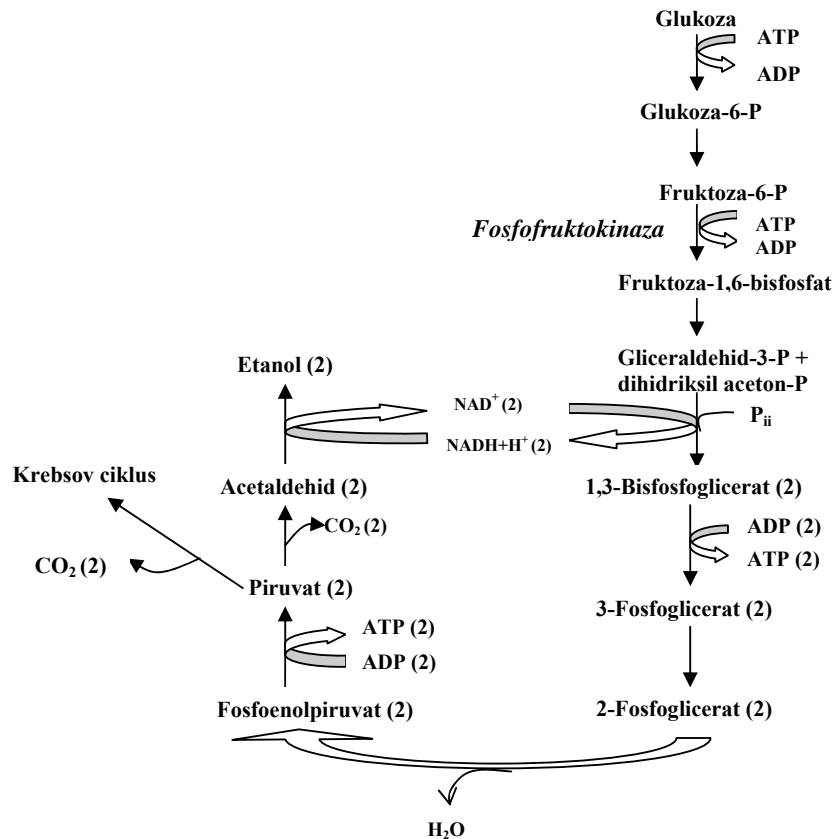


Slika 2. Šema glavnih kataboličkih puteva u ćeliji kvasca (Walker, 1998)

Kvasci izolovani iz čajne gljive. Kvasci su u zajednici čajne gljive zastupljeni sa velikim brojem rodova i vrsta. Hesseltine (1965) je utvrdio prisustvo kvasaca koji pripadaju rodovima *Pichia* i *Zygosaccharomyces*. Iz uzoraka kombuhe iz Meksika, Herrera i Calderon-Villagomez su izolovali *Brettanomyces intermedius*, *Candida famata*, *Pichia membranefaciens*, *Saccharomyces cerevisiae* subsp. *aceti*, *Saccharomyces cerevisiae* subsp. *cerevisiae*, *Torulasporea delbrueckii*, *Zygosaccharomyces bailii*, *Zygosaccharomyces rouxii* (Malbaša, 2000). U čajnoj gljivi sa našeg podneblja identifikovane su sledeće vrste i rodovi kvasaca: *Shizosaccharomyces pombe*, *Saccharomyces bisporus*, *Kloeckera apiculata*, *Candida* sp. i *Torulopsis* sp. (Janković, 1995).

Nazivi vrsta kvasaca koji su izolovani iz kombuha napitaka, a koji se i danas navode, se preuzimaju bez obzira što se neke od tih vrsta ne javljaju u aktuelnim taksonomskim priručnicima za kvasce poput *Yeast: Characteristics and identification* (Barnet i sar., 2000).

Mayser i sar. (1995) su sprovedi istraživanje o kvascima iz 32 uzorka kombuhe prikupljena iz domaćinstava i dva komercijalna napitka sa teritorije Nemačke. Najdominantniji kvasci su bili oni iz roda *Brettanomyces*, pre svih *Brettanomyces lambicus* (izolovan iz 56% uzoraka), koji se tad prvi put navodi kao izolat iz kombuha napitka. Ostali rodovi po zastupljenosti su bili *Saccharomyces* (u 26% uzoraka) i *Zygosaccharomyces* (u 29% uzoraka). Vrste *Saccharomyces ludwigii* i *Candida kefir* identifikovane su u samo jednom uzorku. Ostale identifikovane vrste su kvasci sposobni da formiraju pelikulu, *Candida crusei* i *Issatchenkia occidentalis/orientalis*, kao i pripadnici rodova *Kloeckera* i *Hanseniaspora*. Mayser i sar. (1995) navode da je postojala velika raznovrsnost u vrstama izolovanih kvasaca ne samo među čajnim gljivama iz domaćinstava, već i kod komercijalnih uzoraka.



Slika 3. Usvajanje glukoze kod *Saccharomyces* sp. (Embden-Meyerhof-Parnasov put-glikoliza)

Liu i sar. (1996) su izolovali 52 kvasca iz tri tajvanske čajne gljive (lokalni naziv Haipao) koji su identifikovani kao: *Saccharomyces cerevisiae*, *Zygosaccharomyces bailii* i *Brettanomyces bruxelensis*. Isti autori navode da su u čajnoj gljivi poreklom iz Japana izolovane sledeće vrste kvasaca: *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces inoconspicuis*, *Candida tropicalis*, *Candida guilliermondii*, *Debaryomyces hansenii*, *Torulopsis famata* i *Pichia membranefaciens*, što potvrđuje navode o raznovrsnosti kvasaca u čajnim gljivama različitog porekla.

Kurtzman i sar. (2001) su iz kombuhe poreklom iz Rusije i SAD izolovali novu vrstu askosporogenog kvasca nazvavši je *Zygosaccharomyces kombuchaensis*. Fiziološke osobine ovog kvasca ispitali su Steels i sar. (2002) koji su utvrdili razlike u fiziološkim osobinama u odnosu na vrste *Zygosaccharomyces lentus* i *Zygosaccharomyces bailii*. Glavna razlika između ovih vrsta je osetljivost/otpornost prema konzervansima (sirćetnoj, benzojevoj i sorbinskoj kiselini). *Zygosaccharomyces lentus* i *Zygosaccharomyces bailli* otporni su prema sirćetnoj i sorbinskoj kiselini, dok *Zygosaccharomyces kombuchaensis* pokazuje otpornost samo prema sirćetnoj kiselini, a osetljivost prema sorbinskoj i benzojevoj kiselini. Ovo ukazuje da su mehanizmi otpornosti kvasaca na pomenute kiseline različiti i da one inhibiraju rast kvasaca na različite načine. *Zygosaccharomyces lentus* se od *Zygosaccharomyces bailli* (i od drugih *Zygosaccharomyces* vrsta) razlikuje po odsustvu rasta u kulturi koja se meša na temperaturama preko 25°C, i sposobnosti da raste na 4°C. Za četiri ispitana soja *Zygosaccharomyces kombuchaensis* je utvrđeno da su sposobni da rastu

u kulturi bez mešanja na temperaturama preko 30°C, dok je rast ovog kvasca u kulturi koja se meša na temperaturama iznad 25°C veoma slab (Steels i sar., 2002).

Dominantne vrste kvasaca izolovane iz kombuhe karakteristične za podneblje Ankare su: *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida krusei*, *Kloeckera apiculata* i *Kluyveromyces africanus* (Safak i sar., 2002).

Teoh i sar. (2004) su izolovali sledeće vrste kvasaca iz četiri komercijalna uzorka čajne gljive sa područja Australije: *Schizosaccharomyces pombe*, *Zygosaccharomyces bailii*, *Torulasporea delbrueckii*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Candida stellata* i *Brettanomyces bruxelensis*. Za svaki ispitaní uzorak, iste vrste kvasaca nađene su u fermentacionoj tečnosti i celuloznoj pelikuli. Osim identifikacije, odredili su i broj svake od izolovanih vrsta. Ukupan broj kvasaca u fermentacionoj tečnosti tokom dvonedeljne fermentacije je bio od 4 do 6 log cfu/ml, a u pelikuli 6-8 log cfu/g. Kod većine uzoraka dominantna vrsta kvasca dostiže maksimalan broj u fermentacionoj tečnosti između šestog i osmog dana fermentacije, dok je broj u pelikuli skoro konstantan. Isti autori su pokazali da fermentaciju podloge za kultivaciju čajne gljive započinju osmotolerantni kvasci: *Schizosaccharomyces pombe*, *Torulasporea delbrueckii* i *Zygosaccharomyces bailii*. Tokom fermentacije, sa porastom koncentracije kiseline, smanjuje se broj ćelija vrsta kvasaca koje su osetljivije na kiseline, a dominaciju preuzimaju acidotolerantni kvasci poput *Zygosaccharomyces bailii*. Ovaj kvasac se često izoluje i iz drugih napitaka i namirnica, posebno onih sa niskom vrednošću pH i visokom koncentracijom šećera. Jedna od karakteristika ovog kvasca je sposobnost da produkuje veće količine sirćetne kiseline, pri čemu ispoljava i značajnu tolerantnost prema njoj (Liu i sar., 1996). Po navodima Barnett i sar. (2000) *Zygosaccharomyces bailii* je sposoban da toleriše koncentraciju sirćetne kiseline i od 20 g/l.

Vrste kvasaca izolovane iz čajnih gljiva različitog porekla pripadaju osmotolerantnim i fermentativnim vrstama sposobnim da produkuju veće količine kiseline, što objašnjava njihovo prisustvo u fermentacionoj tečnosti. Kvasci iz roda *Brettanomyces* spp. sposobni su da produkuju sirćetnu kiselinu i njene estre pod anaerobnim uslovima, zbog čega imaju ulogu u fermentacionoj industriji. Oni su odgovorni za spontanu fermentaciju belgijskog piva čiji karakterističan ukus potiče od sirćetne kiseline i njenih estara, ali su označeni i kao kontaminanti često izolovani tokom fermentacije drugih vrsta piva (Teoh i sar., 2004; Mayser i sar., 2005). Vrste roda *Kloeckera* javljaju se kao divlji kvasci na voću, a zbog produkcije velike količine isparljivih estara i kiseline, dolazi do stvaranja sirćetne arome (Mayser i sar., 1995; Liu i sar., 1996). *Candida stellata*, kvasac koji se obično izoluje tokom rane ili središnje faze fermentacije vina takođe je sposoban da produkuje veću količinu sirćetne kiseline (Teoh i sar., 2004). Kvasci roda *Saccharomyces* spp. Se u prirodi nalaze na voću i njihovim razvojem i aktivnošću dolazi do spontane alkoholne fermentacije (Weusthuis, 1994).

2.1.2. Bakterije sirćetnog vrenja

Bakterije sirćetnog vrenja su Gram-negativne ili Gram-varijabilne, aerobne, asporogene, štapićaste ili elipsoidne bakterije. Mogu se javljati kao pojedinačne ćelije, u paru ili lancima. Veličina im varira od 0,4-1 µm širine i 0,8-4,5 µm dužine. Katalaza su pozitivne i oksidaza negativne. Optimalni pH za njihov rast je od 5-6,5, mada mogu da rastu i na nižim pH vrednostima, između 3 i 4, dok je optimalna temperatura za rast između 25-30°C. Ćelije su nepokretne ili pokretne sa peritrihnim ili polarnim flagelama (Sengun i Karabiyikli, 2011). Široko su rasprostranjene u prirodi i mogu se izolovati iz različitih izvora. Najčešći izvori BSV su zrna kafe, kakao, tropsko voće, trule jabuke, suvo voće, cvet crvenog đumbira, polen, pirinač itd. Zahvaljujući sposobnosti sinteze sirćetne kiseline, BSV su proizvodni mikroorganizmi u industrijskoj proizvodnji sirćeta (jabukovog, vinskog, sirćeta od meda itd.),

a zbog sposobnosti stvaranja celulozne pelikule koriste se za proizvodnju celuloze specijalnih namena. S druge strane, BSV se javljaju kao kontaminanti alkoholnih pića (npr. vina ili jabukovog vina (cider), piva) gde dovode do njihovog kvarenja usled oksidacije etanola u sirćetnu kiselinu (Bartowski i Henschke, 2008; Sengun i Karabiyikli, 2011; Raspor i Goranovič, 2008).

Taksonomija bakterija sirćetnog vrenja. Taksonomija BSV nije u potpunosti uspostavljena i do danas se još uvek obavlja taksonomsko pregrupisanje ovih bakterija. Razlog tome su nepoznanice u vezi njihove filogeneze, izolovanja, identifikacije i teškoća u njihovom čuvanju (De Vero i Giudici, 2008).

Pre više od 100 godina (1864. godine) Pastuer je opisao prvu kulturu BSV i svrstao je u rod *Acetobacter* sa jednom vrstom *Acetobacter aceti* (*Mycoderma aceti*). Rod *Gluconobacter* opisan je 1935. godine i pripadale su mu vrste koje intenzivno oksiduju glukozu (do glukonske kiseline) pre nego etanol (do sirćetne kiseline), a nemaju mogućnost oksidacije acetata. Ipak, naziv novog roda jedva da je bio poznat u zapadnim zemljama, jer su publikacije o njegovoj identifikaciji objavljene na japanskom jeziku. Zbog toga je 20 godina kasnije (1954. godine) opisan rod *Acetomonas* kome pripadaju vrste sa polarnim flagelama koje ne oksiduju acetat. Nasuprot tome, vrste roda *Acetobacter* imaju peritrihne flagele i sposobnost oksidacije sirćetne kiseline. Tako je došlo do zabune oko naziva roda *Gluconobacter*, odnosno *Acetomonas* koju je rešio De Ley, 1961. godine, davši ime rodu *Gluconobacter* (Yamada i Yukphan, 2008).

Prema Yamada i Yukphan (2008) i Sengun i Karabiyikli (2011), danas u okviru familije Acetobacteriaceae postoji 12 rodova. Među njima je osam monotipskih rodova: *Acidomonas*, *Kozakia*, *Swaminanthania*, *Saccharibacter*, *Neosasaia*, *Granulibacter*, *Tanticharoenia* i *Ameyamaea*. Vrste ovih rodova se retko javljaju u najčešćim izvorima bakterija sirćetnog vrenja, a to su: sirće, vino i voće. *Kozakia* i *Neosasaia* vrste još uvek nisu izolovane iz ovih izvora, dok je *Acidomonas* uglavnom izolovan iz mulja. Preostala četiri roda su: *Acetobacter*, *Gluconobacter*, *Gluconacetobacter* i *Asaia*.

Vrste rodova *Acetobacter* i *Gluconobacter* su najčešće izolovane BSV iz čajne gljive (Konovalov i Semenova, 1955; Liu i sar., 1996; Sievers i sar., 1995). Rod *Acetobacter* ima oko 16 vrsta, ali se u poslednjih deset godina njihov broj ali i neke već postojeće vrste menjaju. Izuzetak su tri vrste ovog roda: *A. aceti*, *A. pasterianus* i *A. peroxydans* koje su opisane još 1916. i 1925.-te godine, i do danas ostale nepromenjene. Vrste ovog roda filogenetski su podeljene u dve grupe. Prvoj grupi (*A. aceti* grupa) pored tipičnog predstavnika ovog roda, *A. aceti*, pripadaju i *A. orleanensis*, *A. indonensiensis*, *A. tropicalis*, *A. cibinongensis*, *A. orientalis*, *A. cerevisiae*, *A. malorum*, *A. oeni* i *A. nitrogenifigens*. Drugoj grupi (*A. pasterianus* grupa) pripadaju: *A. pasterianus*, *A. peroxidans*, *A. pomorum*, *A. lovaniensis* i *A. syzygii*. Osnovna fenotipska razlika između ove dve grupe je u sposobnosti predstavnika prve grupe da produkuju 2-ketoglukonske kiseline (osim kod *A. oenii* koji produkuje 5-ketoglukonsku kiselinu). Kod vrsta *A. aceti*, *A. pomorum* i *A. nitrogenifigens* javlja se i produkcija dihidroksiacetona iz glicerola. Nasuprot toga, predstavnici druge grupe ne produkuju ni ketoglukonate ni dihidroksiacetone (Yamada i Yukphan, 2008).

Rod *Gluconobacter* je do 1980. godine imao samo jednu vrstu, *G. oxydans*. Danas ovaj rod čine i *G. cerinus*, *G. frateurii*, *G. asaii*, *G. albidus* i *G. thailandicus*. U poslednjih nekoliko godina otkrivene su još i *G. albidus* i *G. thailandicus*. I vrste ovog roda su filogenetski podeljene u dve grupe. Prva je *G. oxydans* grupa u koju spadaju *G. oxydans* i *G. albidus*. Druga je *G. cerinus* grupa u koju spadaju *G. cerinus*, *G. frateurii* i *G. thailandicus*. Ove dve grupe razlikuju se fenotipski i genotipski po sposobnosti rasta na D-arabitolu i u odsustvu nikotinske kiseline, i sastavu DNK azotnih baza. Vrste iz prve grupe ne rastu na D-arabitolu i u odsustvu nikotinske kiseline i imaju veći sadržaj DNK G+C parova, za razliku od druge grupe (Yamada i Yukphan, 2008). Osim pobrojanih šest vrsta roda *Gluconobacter*,

Sengun i Karabiyikli (2011) navode i vrste *G. japonicus*, *G. kondonii*, *G. roseus* i *G. sphaericus*.

Kriterijumi za razlikovanje rodova *Acetobacter* i *Gluconobacter* prikazani su u Tabeli 1. Osnovni kriterijum za njihovo razlikovanje je sposobnost bakterija roda *Acetobacter* da oksiduju acetat ili laktat do ugljendioksida i vode.

Tabela 1. Osnove za razvrstavanje rodova *Acetobacter* i *Gluconobacter* (Cleenwerck i De Vos, 2008; Sengun i Karabiyikli, 2011)

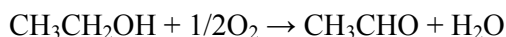
Karakteristika	<i>Acetobacter</i>	<i>Gluconobacter</i>
Flagelacija	Pe/n	Po/n
Oksidacija etanola do sirćetne kiseline	+	+
Oksidacija acetata do CO ₂ i H ₂ O	+	-
Oksidacija laktata do CO ₂ i H ₂ O	+	-
Oksidacija glukoze u glukonat	+/-	+
Rast u medijumu sa 0,35% sirćetne kiseline (pH = 3,5)	+	+
Produkcija 2-keto-D-glukonske kiseline	+/-	+
Produkcija 5-keto-D-glukonske kiseline	+/-	+
Produkcija 2,5-diketo-D-glukonske kiseline	-	+/-
Aktivnost ciklusa trikarbonskih kiselina	+	-
Ketogeneza (dihidriksilaceton) iz glicerola	+/-	+
Produkcija celuloze	-	-
Vezivanje molekuskog azota	-	+/-
Produkcija kiseline iz glukoze	+/-	+
Produkcija kiseline iz fruktoze	-	+
Produkcija kiseline iz d-manitola	+/-	+
Produkcija kiseline iz glicerola	+/-	+
Produkcija kiseline iz rafinoze	-	-

+: 90% ili više vrsta je pozitivno; -: 90% ili više vrsta je negativno; Pe: peritrihna; Po: polarna; n: nepokretne; +/-: različito od vrste do vrste

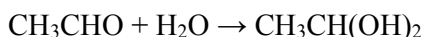
Iako se klasični testovi često koriste za fenotipsku karakterizaciju BSV, smatra se da oni nisu dovoljni niti potpuno pouzdani, jer su teški za izvođenje, vremenski zahtevni, a njihovi rezultati često nedovoljno jasni za tumačenje. Korišćenje fenotipskih testova za identifikaciju i diferencijaciju rodova BSV relativno je lako, ali su fenotipske razlike na nivou vrsta vrlo male i teško ih je razdvojiti primenom klasičnih testova. Smatra se da čak i male razlike u primenjenim procedurama i podlogama utiču na dobijene rezultate i njihovo tumačenje (Yamashita i sar., 2004; Trcek, 2005). Međutim, brži, pouzdaniji i standardizovani testovi (npr. API 20 NE i RapID NH) su razvijeni za neke druge grupe bakterija (npr. Enterobacteriaceae i druge), što ograničava njihovu primenu u identifikaciji BSV (Cleenwerck i De Vos, 2008). Kod BSV česte su i spontane mutacije koje mogu dovesti do promene nekih od fenotipskih karakteristika, kao što su: gubitak rezistencije na sirćetnu kiselinu, sposobnosti oksidacije etanola, produkcije celuloze itd. (Cleenwerck i De Vos, 2008). Nguyen i sar. (2010) su ispitali pojavu mutacija kod *Gluconacetobacter xylinus* vrste izolovane iz kombuhe. Oni su pokazali da u slučaju nedostatka hranljivih komponenata u medijumu dolazi do spontanih mutacija kod ove vrste, što rezultira u značajnom smanjenju

sinteze celuloze. Uzrok ovoj pojavi se još ispituje, ali autori smatraju da je za smanjenje sinteze celuloze odgovoran enzim difosfat-4-dehidroramnoza 3,5-epimeraza koga nema izolat, već samo mutant. Ovaj enzim uključen je u sintezu acetana (polisaharida rastvorljivog u vodi), jedinjenja koje može da utiče na redukciju sinteze celuloze.

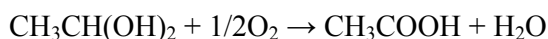
Fiziološke karakteristike bakterija sirćetnog vrenja. Tipična fiziološka karakteristika BSV je njihova sposobnost enzimске oksidacije etanola pri čemu kao glavni produkt nastaje sirćetna kiselina. Proces oksidacije etanola u sirćetnu kiselinu se odvija u dve faze. U prvoj fazi sirćetne fermentacije odvija se oksidacija etanola u acetaldehid u prisustvu enzima etanol dehidrogenaze:



da bi zatim iz acetaldehida nastao hidrat acetaldehida:



Dehidrogenacijom hidratisanog acetaldehida u prisustvu acetaldehid dehidrogenaze nastaje sirćetna kiselina:



Enzimi koji učestvuju u ovim reakcijama smešteni su na spoljašnjoj strani citoplazmatske membrane. Kod većine BSV prvu fazu oksidacije obavljaju dehidrogenaze zavisne od koenzima NAD(P)^+ stabilnog u prisustvu kiselina. Mada postoje i dehidrogenaze sa pirolahinolinom kao koenzimom nezavisne od NAD(P)^+ , optimum njihovog delovanja je pri pH 6-8. Ovo je limitirajući faktor za učešće u oksidaciji etanola jer je aktivnost alkohol dehidrogenaze kod BSV izraženija u prisustvu kiselina. Čak je kod vrsta roda *Acetobacter* aktivnost mnogo veća u prisustvu kiselina nego što je to slučaj sa *Gluconobacter* vrstama. To objašnjava zašto *Acetobacter* vrste proizvode više sirćetne kiseline (Sengun i Karabiyikli, 2011). Ipak, rezistentnost BSV prema kiselinama je karakteristika vrste. Tako je kod *A. europaeus* rezistentnost prema kiselinama (pH = 2,5-3,5), kao i potreba za kiselinama za rast, varijabilna fenotipska karakteristika. Acetaldehid dehidrogenaza nezavisna je od koenzima NAD(P)^+ i optimum njenog delovanja je pri pH 4-5, ali može da učestvuje u drugoj fazi oksidacije i pri nižim vrednostima pH (Raspor i Goranovič, 2008).

Da bi oksidacija etanola tekla optimalno, sojevi bakterija sirćetnog vrenja zahtevaju dovoljne količine kiseonika u podlozi. Ukoliko na raspolaganju nemaju dovoljne količine kiseonika, ćelije u uslovima velike koncentracije sirćetne kiseline i etanola ne mogu da prežive. Ako je ukupna koncentracija sirćetne kiseline i etanola tokom sirćetne fermentacije 5% (g sirćetne kiseline/100 ml + vol.% etanola) tada prilikom prekida aeracije u trajanju od 5 minuta odumire 34% prisutnih bakterija, a ako je ukupna koncentracija 12%, isti udeo bakterija odumire već za 10-12 sekundi (Crueger i Crueger, 1984). Pored kiseonika, za optimalan rast *Acetobacter* vrsta neophodno je prisustvo sirćetne kiseline i etanola pri čemu je sadržaj etanola kritičan. Ukoliko je sadržaj etanola u podlozi manji od 0,2% (vol.), broj odumrlih ćelija značajno raste (Crueger i Crueger, 1984).

Za razliku od većine mikroorganizama kod kojih je kritična koncentracija sirćetne kiseline za rast 0,5%, BSV su veoma otporne na povišene koncentracije kiselina, što zavisi i od samog soja. Optimalan pH za njihov rast je 5-6,5, mada mogu da prežive i na nižim pH (3-4) (Stanier i sar., 1971; Raspor i Goranovič, 2008). Du Toit i Pretorius (2002) su izolovali sojeve koji rastu na pH 2,0-2,2. U kiseljoj sredini citoplazma *A. Aceti* postaje takođe kiselina (pH pada ispod 3,7), ali bez obzira na to ćelija nastavlja sa rastom i oksidacijom etanola. Po tome se BSV razlikuju od ostalih acidotolerantnih bakterija koje tolerišu samo kiseline za koje

je ćelijska membrana nepropusna (npr. HCl), zbog čega kod ovih bakterija ne može doći do zakišeljavanja citoplazme. Postoji nekoliko pretpostavki koje objašnjavaju acidofilnost ovih bakterija. Po jednoj od pretpostavki njihova ćelijska membrana je bogata zasićenim masnim kiselinama, što je čini relativno nepropustljivom za sirćetnu kiselinu (Entani i sar., 1985). Prema Francois et al. (2006), detoksikaciju sirćetne kiseline obavlja enzim citrat sintaza koji uključuje sirćetnu kiselinu u ciklus trikarbonskih kiselina i ciklus glioksalne kiseline. Najprihvatljivije je objašnjenje da se u citoplazmatskoj membrani stvara tzv. „efluks pumpa“, tj. Da se pomoću membranskih proteina sirćetna kiselina transportuje iz ćelije (Raspor i Goranović, 2008).

Kao izvore ugljenikovih atoma BSV mogu da iskoriste veći broj organskih jedinjenja: ugljene hidrate (manji procenat sojeva BSV usvaja saharozu, rafinozu i dekstrin; uglavnom usvajaju glukozu, galaktozu, manozu, fruktozu itd.), primarne i sekundarne alkohole (etanol, n-propanol, D-manitol, d-sorbitol, glicerol, ali ne i metanol), organske kiseline (sirćetnu, limunsku, fumarnu, mlečnu, jabučnu, ćilibarnu itd), poliole i dr. (De Ley i sar., 1984; Divies i Cachon, 1998; Cleenwerck i De Vos, 2008). Na Slici 4 je prikazana sinoptička šema metabolizma jedinjenja koja su izvori ugljenika za bakterije sirćetnog vrenja.

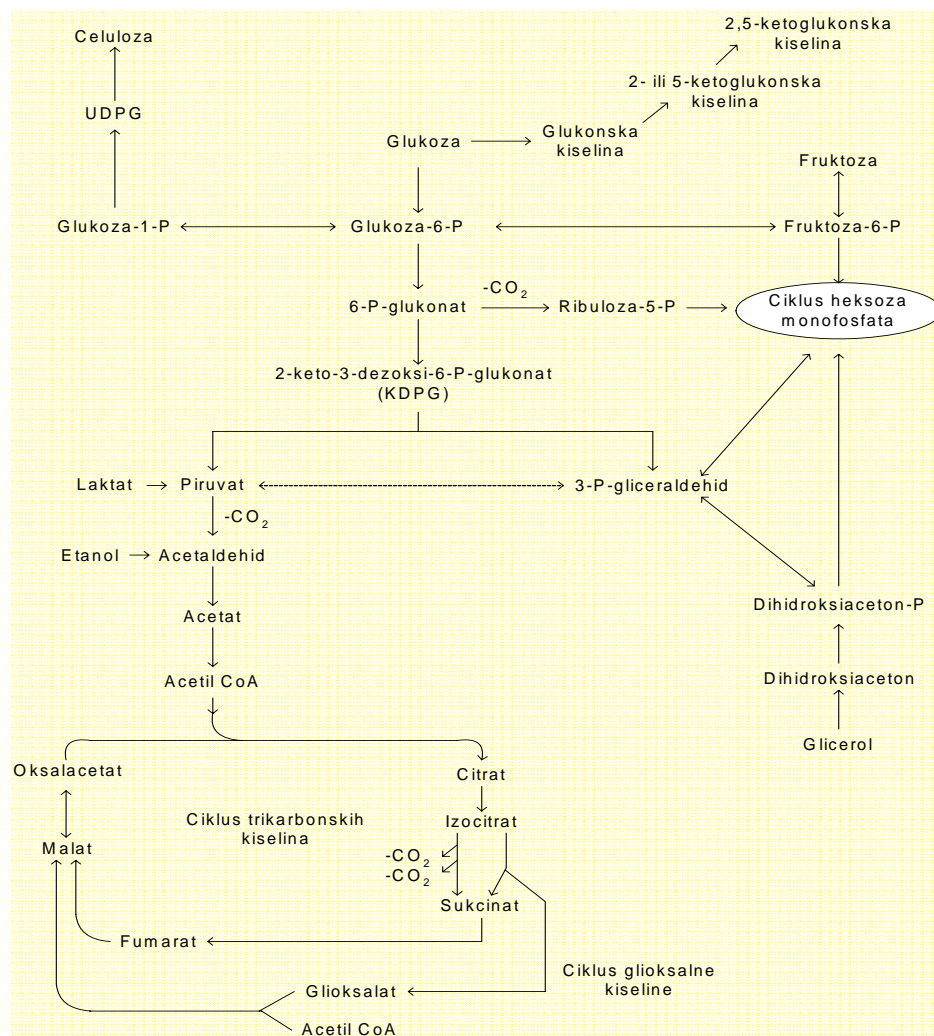
BSV oksiduju glukozu na dva načina: jedan način je glikoliza i odvija se unutar ćelije, a drugi se odvija izvan ćelije i uključuje sintezu glukonske i ketoglukonskih kiselina, koje su posle sirćetne kiseline dominantni metabolički produkti bakterija sirćetnog vrenja. Glikoliza se odvija pomoću NADP⁺ zavisne glukoza dehidrogenaze, a sinteza glukonske i ketoglukonskih kiselina pomoću NADP⁺ nezavisne glukoza dehidrogenaze i naziva se „direktna oksidacija glukoze“ (Divies i Cachon, 1998; Sengun i Karabiyikli, 2011).

Bakterije roda *Acetobacter* su sposobne da potpuno oksiduju \square etabol ciklusom trikarbonskih kiselina, do čega dolazi nakon što je utrošen celokupan etanol iz sredine. U prisustvu etanola, a putem inhibicije enzima, onemogućena je dalja oksidacija sirćetne kiseline. Uz to, sama sirćetna kiselina pri višim koncentracijama, odnosno vrednosti pH od 3 inhibira sopstvenu oksidaciju (Divies i Cachon, 1998; Raspor i Goranović, 2008). Za razliku od bakterija roda *Acetobacter*, vrste roda *Gluconobacter*, iako striktni aerobi, nemaju kompletiran ciklus trikarbonskih kiselina, kome nedostaju α -ketoglutarat dehidrogenaza i sukcinat dehidrogenaza (Divies i Cachon, 1998). Ovo je razlog zašto bakterije roda *Gluconobacter* ne mogu u potpunosti da oksiduju \square etabol. Posledica ovog metaboličkog nedostatka je stehiometrijska oksidacija etanola u sirćetnu kiselinu. Naime, supstrati (npr. laktat) koji se oksiduju preko piruvata bivaju stehiometrijski konvertovani u sirćetnu kiselinu (Stanier i sar., 1971). Zato je za metabolizam ovih bakterije od ključnog značaja put heksozamonofosfata.

Specifična karakteristika bakterija sirćetnog vrenja je sposobnost sinteze ekstracelularnih polisaharida. Sintaza celuloze je dokazana za *Acetobacter pasteurianus* (vrstu koja je ranije klasifikovana kao *A. Aceti* subsp. *Xylinum*) i *Gluconobacter oxydans*, dok drugi sojevi sintetišu levane i dekstrane (Divies and Cachon, 1998). Dugo vremena se smatralo da su bakterije roda *Acetobacter* jedine sposobne za ekstracelularnu sintezu celuloze, da bi Deinema i Zevenhuizen pokazali da određeni sojevi roda *Pseudomonas* to takođe mogu činiti (De Ley i sar., 1984). Mehanizam biosinteze celuloze kod bakterija sirćetnog vrenja, njeni prekursori, intermedijeri i polimerizacija još uvek su nerazjašnjeni. Po jednoj od teorija, u početnoj fazi sinteze celuloze glukoza se intracelularno transformiše u poliglukane koji se oslobađaju iz ćelije. U drugoj fazi ovi se polimeri progresivno povezuju i kristalizuju u čvrstu mikrofibrilnu celulozu (De Ley i sar., 1984).

Celulozna pelikula koju stvara *Acetobacter xylinum* tokom kultivacije čajne gljive je debela i kožasta, laminarne strukture, sa dijametrom fibrila od oko 25 nm. Količina sintetisane celuloze tokom kultivacije čajne gljive može da dostigne i 40% od početne količine supstrata (Stojanović i Janković, 1996). Ustanovljeno je da izvor ugljenikovih atoma

u podlozi za kultivaciju direktno utiče na sintezu celuloze tokom kombuha fermentacije. Glukoza, fruktoza, etaboli, manitol i etanol u podlozi za kultivaciju stimulišu produkciju celulozne pelikule. Pored toga, Balentine i sar. (1997) su izneli podatak da i azotna jedinjenja ekstrahovana iz čaja (poput kofeina) takođe aktiviraju biosintezu celuloze.



Slika 4. Sinoptička šema metabolizma izvora ugljenika kod bakterije sirćetnog vrenja (Divies i Cachon, 1998)

Molekularna identifikacija bakterija sirćetnog vrenja izolovanih iz čajne gljive.

Na osnovu literaturnih podataka poznato je da bakterije sirćetnog vrenja izolovane iz čajne gljive pripadaju vrstama: *A. Xylinum*, *A. Aceti*, *A. Pasteurianus* i *G. Oxydans* (Konovalov i Semenova, 1955; Liu i sar., 1996; Sievers i sar., 1995; Chen i Liu, 2000; Greenwalt i sar., 2000). Ranijih godina BSV su identifikovane ispitivanjem njihovih biohemijskih i fizioloških osobina. Tako su Sievers i sar. (1995) izolovali iz čajne gljive Gram-negativne bakterije sposobne da potpuno oksiduju laktat i acetat do CO_2 i proizvode sirćetnu kiselinu iz etanola i determinisali ih kao *Acetobacter* spp. Klaster analizom proteinskog profila 12 izolata i poređenjem sa referentnim bakterijama, dokazano je da izolati pripadaju vrsti *A. Xylinum*, koja je i odgovorna za formiranje celulozne pelikule. Na osnovu istih kriterijuma određena je pripadnost rodu *Acetobacter* za 2 od 12 izolata iz tri tajvanske čajne gljive (lokalni naziv Haipao; Liu i sar., 1996). Daljim ispitivanjem njihovih biohemijskih karakteristika i

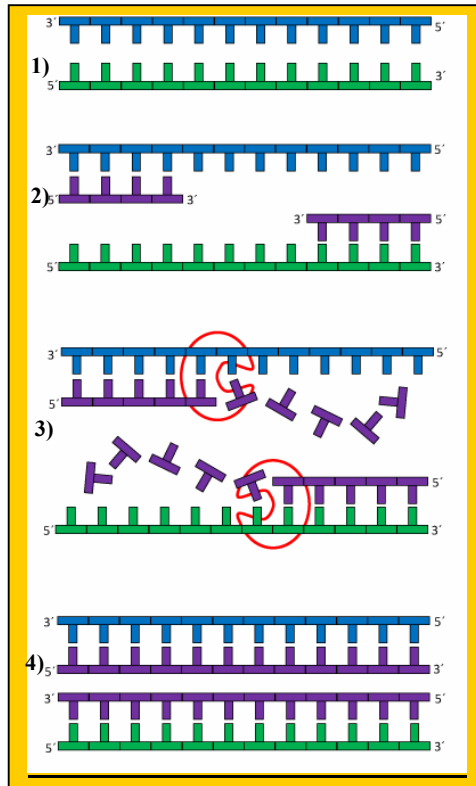
poređenjem dobijenih rezultata sa rezultatima dobijenim za referentne sojeve bakterija sirćetnog vrenja (roda *Acetobacter*), izolovani sojevi bakterija iz čajne gljive su identifikovani kao *Acetobacter aceti* i *Acetobacter pasteurianus*. Autori smatraju da je *Acetobacter pasteurianus*, izolovan iz svih uzoraka čajne gljive, odgovoran za produkciju celulozne pelikule.

Za diferencijaciju vrsta rodova *Acetobacter* i *Gluconobacter* u poslednjih desetak godina sve više se koriste različite savremene molekularne tehnike. Najčešće korišćena molekularna metoda za identifikaciju mikroorganizama je lančana reakcija polimeraze (Polymerase Chain Reaction – PCR), metoda koja omogućava selektivno umnožavanje (amplifikaciju) određenog segmenta molekula DNK (Mullis i sar., 1986). Preduslov za izvođenje reakcije je poznavanje \square etabolit (sekvence) graničnih regiona željenog segmenta i posedovanje sintetskih jednonančanih oligonukleotida tzv. Prajmera, koji su komplementarni ovim regionima.

Tipičan ciklus PCR amplifikacije sastoji se od nekoliko faza (Romac i sar., 1999; Jošić i sar., 2011; Slika 5):

1. Denaturacija DNK na temperaturi od 94-96°C.
2. Vezivanje prajmera (aniling ili hibridizacija). U ovoj fazi par prajmera specifično se vezuje za komplementarne regione DNK, ograničavajući segment koji treba da bude amplifikovan. Povezivanje prajmera odvija se na temperaturi koja zavisi od sekvence prajmera (redosleda nukleotida u njemu) i najčešće se kreće od 50-70°C. Izbor optimalne temperature u ovoj fazi je od ključnog značaja za specifičnost PCR reakcije. Ukoliko je temperatura suviše visoka do vezivanja prajmera uopšte neće doći, a u slučaju suviše niske temperature dolazi do nespecifične hibridizacije prajmera sa samo parcijalno komplementarnim sekvencama DNK.
3. Izduživanje (ekstenzija) prajmera duž matične DNK. Enzim Taq DNK polimeraza vrši sintezu novih (komplementarnih) lanaca nukleotida koji se nastavljaju na prajmere u 5'3' pravcu. Prekusorski molekuli za sintezu su slobodni nukleotidi u obliku dezoksiribonukleozid-trifosfata (dNTP), a reakciju katalizuju Mg^{2+} joni. Elongacija prajmera, tj. Ugradnja nukleotida na 3' krajeve prajmera katalizovana je DNK polimerazom koja ostvaruje optimalno dejstvo na 72°C, te je ova temperatura uobičajena za fazu ekstenzije. Vreme trajanja ove faze određeno je dužinom regiona koji se umnožava. Na kraju faze ekstenzije dobijaju se dve kopije segmenta DNK koji je ovičen prajmerima. Reakcija se zatim ciklično ponavlja, a u svakom novom ciklusu kao matrice služe i novosintetisani molekuli DNK. Količina umnoženog fragmenta se eksponencijalno povećava za 2^n , gde je n broj ciklusa reakcije. Broj ciklusa u PCR metodi kreće se od 25-40 i ne bi trebao da bude veći od 45. Povećanje broja ciklusa reakcije može dovesti do amplifikacije nespecifičnih fragmenata, a količina željenog produkta se može smanjiti. Ukoliko je broj ciklusa suviše mali očekuje se i manji prinos PCR produkata. Nakon 30 ciklusa željeni segment je umnožen 10^6 puta, što omogućuje njegovu vizuelizaciju i analizu nakon elektroforeze i bojenja.

Ključni korak u razvoju ove metode označila je izolacija termostabilne DNK polimeraze, koja može da sačuva efikasnost tokom cikličnih temperaturnih promena. Prvi predstavnik stabilne polimeraze izolovan je iz termofilnog bakterijskog soja *Thermus aquaticus*, bakterije koja živi u toplim izvorima gde \square etabolite \square dostiže i preko 70°C. Ovaj enzim naziva se Taq polimeraza. Pored Taq polimeraze u PCR-u mogu se koristiti i druge termostabilne DNK polimeraze izolovane iz bakterija koje žive u toplim izvorima (Romac i sar., 1999).



Slika 5. Ciklus PCR amplifikacije

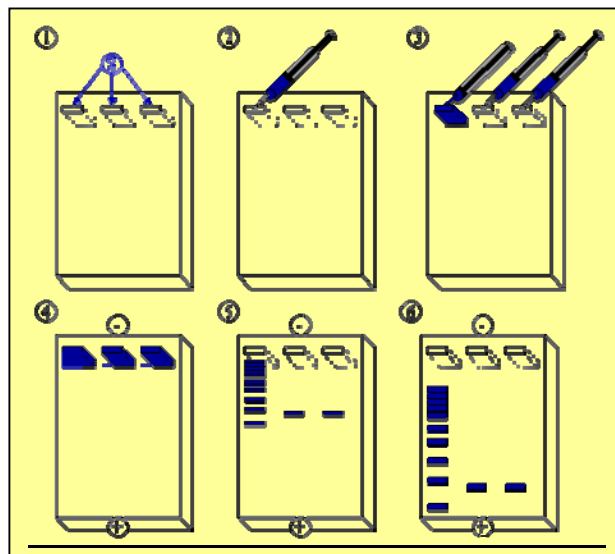
(1-denaturacija dvostrukog lanca DNK; 2-aniling (vezivanje prajmera); 3-ekstenzija prajmera pomoću Taq DNK polimeraze; 4- dve kopije segmenta DNK oivičene prajmerima)

Molekulska masa umnoženih DNK fragmenata u PCR-u određuje se pomoću gel elektroforeze. Gel elektroforeza je metoda za razdvajanje molekula na osnovu njihove veličine i naelektrisanja. Molekuli se razdvajaju pod dejstvom električnog polja u inertnim medijumima. Negativno naelektrisani molekuli se kreću ka pozitivnoj elektrodi, anodi (kao što je slučaj sa DNK molekulom), a pozitivno naelektrisani molekuli ka negativnoj elektrodi, katodi (Jošić i sar., 2011). Medijumi za razdvajanje biraju se na osnovu veličine pora i sposobnosti da razdvoje fragmente sličnih veličina. Najčešće korišćeni materijali za gel elektroforezu DNK molekula su agarozna i akrilamid. Agarozna je visoko prečišćeni agar koji se zagreva i rastvara u određenom puferu. Molekuli agarozne formiraju matriks sa porama između molekula. Koncentrovaniji rastvor agarozne formira gušći matriks i manje pore. Agarozni gelovi razdvajaju DNK fragmente od 100 i više baznih parova, dok su akrilamidni gelovi pogodni za razdvajanje malih DNK fragmenata (oligonukleotida manjih od 100 baznih parova) (Jošić i sar., 2011).

Za procenu veličine umnoženih DNK fragmenata koriste se standardi molekulske masa koji sadrže mešavinu fragmenata DNK poznatih veličina (molekulske masa). Postoje brojni komercijalni markeri pogodni za agarozne ili akrilamidne gelove, a njihov izbor zavisi od očekivane veličine fragmenata. Marker se uobičajeno nanosi na početku i/ili na kraju gela. Molekulska masa ispitivanog fragmenta dobija se upoređivanjem njegove relativne mobilnosti (migracionog rastojanja) sa relativnom mobilnošću fragmenata DNK poznatih molekulske masa (Jošić i sar., 2011).

Za vizuelizaciju DNK fragmenata na gelu nakon elektroforeze vrši se bojenje etidijum bromidom. Boja se može dodati gelu ili se gel može naknadno bojiti potapanjem u rastvor

boje. Nakon elektroforeze i bojenja amplifikovani fragmenti se vizuelizuju izlaganjem UV svetlosti na transiluminatoru i rezultati dokumentuju fotografisanjem (Slika 6).



Slika 6. Postupak izvođenja gel elektroforeze

(1-gel sa bunarčićima (slots, S); 2-unošenje markera molekularnih masa u prvi bunarčić; 3-unošenje uzoraka u drugi i treći bunarčić; 4-uzorci su naneti i počinje migriranje ka anodi; 5-migriranje molekula kroz gel; 6-izgled gela po završenoj elektroforezi

Restrikciona analiza PCR proizvoda je dalji korak u identifikaciji mikroorganizama PCR metodom, a izvodi se pomoću brojnih modifikacionih enzima kao što su metilaze, polimeraze, nukleaze, ligaze, kinaze, fosfataze i drugi (Jošić i sar., 2011). Među njima su i restriktione endonukleaze (restriktioni enzimi), enzimi koji prepoznaju kratke redoslede nukleotida i „seku“ DNK u okviru prepoznatih regiona. Svaki od ovih enzima prepoznaje specifično mesto, sekvence koje se obično sastoje od 4-6 nukleotida, koje se nazivaju sekvence prepoznavanja ili restrikciona mesta. Svaki enzim je dobio ime na osnovu prvog slova roda i prva dva slova vrste mikroorganizama iz koga je prvi put izolovan. Tako npr. oznaka HhaI predstavlja enzim koji je izolovan iz bakterije *Haemophilus haemolyticus*, AluI iz bakterije *Acetobacter luteus*, dok rimski broj I znači da je to prvi enzim izolovan iz datog bakterijskog soja. Restriktioni enzimi postoje kao komercijalni proizvodi u različitim koncentracijama. Enzimska digestija sa restrikcionim enzimima traje 1-2h na određenoj temperaturi specifičnoj za svaki enzim (najveći broj enzima ostvaruje optimalno dejstvo na 37°C). Fragmenti dobijeni nakon digestije sa restrikcionim enzimima razdvajaju se gel elektroforezom po već opisanom postupku.

Primena molekularnih metoda u identifikaciji BSV izolovanih iz kombuhe aktuelna je u poslednjih petnaestak godina. Sievers i sar. (1995) su kod izolovanog soja *A. Xylinum* klaster analizom proteiskog profila, dobili nivo poklapanja sa referentnim sojem od svega 38%, što je navelo Boesch i sar. (1998) da iz istog napitka izoluju soj BSV i identifikuju ga molekularnom metodom (DNA-DNA hibridizacijom). Rezultati su pokazali da dati soj pripada novoj vrsti *Acetobacter intermedius* (sp. nov.). Pod datim imenom ovaj soj je deponovan u nemačkoj kolekciji kultura (broj DSM 11804) kao izolat iz komercijalno dostupnog napitka iz Švajcarske. Dutta i Gachhui (2006) su PCR tehnikom iz kombuhe izolovali novu vrstu BSV koja je sposobna da vezuje atmosferski azot i nazvali je *Acetobacter nitrogenifigens* sp. nov. Soj je deponovan u indijskoj kolekciji mikroorganizama (broj MTCC 6912) kao soj izolovan iz kombuha napitka. Isti autori su naredne godine iz

kombuha napitka izolovali i deponovali još jedan novi soj iz kombuha napitka (označen kao MTCC 6913), *Gluconobacter kombuchae* sp. nov. (Dutta i Gachhui, 2007).

2.2. KULTIVACIJA ČAJNE GLJIVE

2.2.1. Sastav podloge za kultivaciju čajne gljive

Izvori ugljenika. Tradicionalni supstrat za kultivaciju čajne gljive najčešće je saharozom zaslađen crni ili zeleni čaj. Količina saharoze u podlozi kreće se od 5-10%. Reiss (1994) je ispitujući uticaj saharoze, laktoze, glukoze i fruktoze na sintezu metabolita čajne gljive utvrdio da vrsta šećera ima uticaj na sadržaj određenih produkata fermentacije (mlečnu kiselinu i etanol), dok je uticaj koncentracije šećera minimalan. Najveći prinos mlečne kiseline i etanola dobija se pri upotrebi 5% saharoze u podlozi. Slično istraživanje o uticaju različitih koncentracija saharoze na sadržaj metabolita (saharoze, sirćetne kiseline, etanola i glukonske kiseline) tokom kombuha fermentacije sproveo je Blanc (1996). Rezultati su pokazali da je najpovoljniji sadržaj saharoze 7% i 10% (nema značajne razlike u sadržaju metabolita), dok su u podlozi sa 5% šećera manje koncentracije metabolita, pre svih glukonske kiseline. Podloga bez saharoze nije pogodna za fermentaciju jer se nakon 10 dana dobija manje od 1 g/l kiseline. Prema Roussin-u (1996) korišćenjem glukoze u podlozi za kultivaciju proizvodi se vrlo mala količina sirćetne, glukonske i α -keto glukonske kiseline, dok se u podlozi sa žutim šećerom dobija veći sadržaj sirćetne kiseline, nego korišćenjem običnog šećera. Prema rezultatima Hermann-a, upotrebom fruktoze kao osnovnog izvora ugljenikovih atoma za mikroorganizme čajne gljive dobija se napitak koji sadrži isključivo sirćetnu kiselinu, dok u rastvorima maltoze, laktoze i dekstrina čajna gljiva dobro raste, ali ne stvara ili stvara vrlo male količine kiseline (Janković, 1995).

Osim uobičajenih izvora ugljenikovih atoma, kao što su pomenuti monosaharidi i disaharidi, ispitana je i mogućnost korišćenja nekih drugih potencijalnih izvora ugljenika. Janković (1995) je ispitala korišćenje belog i crnog vina sa i bez dodatka šećera kao alternativnog izvora ugljenikovih atoma. Rezultati pokazuju da uzorci sa dodatim šećerom stvaraju znatno veće količine kiseline (oko 40 g/l) za 17 dana fermentacije nego uzorci bez dodatog šećera (oko 5 g/l). Korišćenje meda u podlogama za kultivaciju čajne gljive sa namerom dobijanja napitka povećane biološke vrednosti, nije pokazalo željene rezultate, jer njegove aktivne komponente dovode do mikrobioloških promena čajne gljive delujući antibiotski (Frank, 1994).

Zbog zaostalih šećera (saharoze i glukoze) kombuha napitak je neprihvatljiv za dijabetičare. Zbog toga je Malbaša (2000) ispitao primenu polifruktozana inulina kao alternativnog izvora ugljenikovih atoma koji se dobija iz biljke topinambur. U poređenju sa podlogom sa saharozom stvaraju se isti proizvodi metabolizma u približno istim količinama (L-mlečna kiselina, sirćetna kiselina, fruktoza, vitamini grupe B, vitamin C). Razlika u primeni ovih izvora je u sadržaju glukuronske kiseline i glukoze koji su detektovani u napitku dobijenom na podlozi od saharoze, dok izostaju ili se javljaju u vrlo maloj količini u napitku na podlozi sa topinamburom. S druge strane, triptofan, fruktooligosaharidi i nerazgrađeni inulin postoje u napitku dobijenom na podlozi sa topinamburom, dok u napitku na podlozi od saharoze nisu detektovani. Autor zaključuje da se ekstrakt topinambura uspešno može koristiti kao izvor ugljenika umesto saharoze za kultivaciju čajne gljive.

Upotrebom ekstrakta slada, kombuha napitak prihvatljivih senzornih svojstava dobijen je za kraće vreme i sa većim sadržajem ukupnih i isparljivih kiseline u poređenju sa napitkom dobijenim tradicionalnim postupkom (Cvetković, 2003). Brža kombuha fermentacija

omogućena je zbog prisustva lako usvojivih ugljenih hidrata (glukoze, fruktoze, maltoze i maltotrioze) u ekstraktu slada. Pored toga, ekstrakt slada sadrži i brojne nutritivno vredne sastojke kao što su: belančevine, minerali (Na, K, P, Ca, Mg, Fe), vitamini (kompleks B vitamina, vitamin E, provitamin vitamina A) i dr. (Kunze, 1998).

Malbaša i sar. (2008) su ispitali melasu (sporedni produkt industrije šećera) kao alternativni izvor ugljenikovih atoma. Melasa se zbog visoke koncentracije saharoze (oko 50%) i nutritivnih elmenata (prisustva mineralnih materija, vitamina, mlečne kiseline i drugih organskih komponenti) koristi u industrijskoj proizvodnji mlečne kiseline. Sadržaj sirćetne kiseline je veći u tradicionalnom napitku nego u napitku sa melasom, dok je sadržak ukupnih kiselina i L-mlečne kiseline veći u napitku dobijenom na podlozi sa melasom.

Iličić i sar. (2012) su ispitali mogućnost korišćenja laktoze u količini koja odgovara sadržaju laktoze u kravljem mleku (46 g/l) u podlozi za kombuha fermentaciju. Promene vrednosti pH tokom četvorodnevog trajanja procesa su bile tipične za kombuha fermentaciju, ali sadržaj ukupnih kiselina nije prelazio vrednost od 1 g/l. Razlog smanjene produkcije kiselina je verovatno u primenjenoj temperaturi kultivacije čajne gljive od 42°C, koja ne pogoduje mikroorganizmima čajne gljive (De Ley i sar., 1984; Barnet i sar., 2000).

Izvori azota. Čaj (*Camellia sinensis* L.) u podlozi za kultivaciju obezbeđuje neophodne mikroelemente kulturi čajne gljive, ali i azotna jedinjenja, ugljene hidrate, enzime i vitamine (vitamine E, K A, B) (Cabrera i sar., 2003). Purinske komponente čaja, kofein i teofilin, bivaju iskorišćene u sintezi nukleinskih kiselina, predstavljajući zato značajne nutritivne faktore za rast mikroorganizama čajne gljive (Frank, 1994; Dufresne i Farnworth, 2000). Kako je sadržaj kofeina u zelenom čaju (oko 5%) viši nego u crnom (2%), to se upotrebom zelenog čaja u podlogama za čajnu gljivu obezbeđuje više od dvostruko veće količine azota (Hoffman, 1998). I pored toga se crni čaj danas dominantno koristi kao izvor azotnih jedinjenja za kombuha kulturu, a u podlogu za kultivaciju dodaje u različitim količinama: 0,15% (Lončar i sar., 2006), 0,25% (Goicochea i sar., 2000), 0,3% (Chen i Liu, 2000), 0,4% (Steinkraus i sar., 1996; Chu i Chen, 2006), 0,44% (Greenwalt i sar., 1998) 0,5% (Blanc, 1996; Bauer-Petrovska i Petrushevska-Tozi, 2000; Sreeramulu i sar., 2000; Teoh i sar., 2004), 1,2% (Jayabalan i sar., 2008), dok su količine zelenog čaja: 0,44% (Greenwalt i sar., 1998), 0,5% (Reiss, 1994) i 1,2% (Jayabalan i sar., 2008).

Prema Hoffmann-u (1998) biljni čajevi (nana, lipa, šipak, kamilica i dr.) ne mogu da se koriste kao jedini izvor azotnih jedinjenja u podlozi za kultivaciju, jer ne sadrže kofein i druga purinska jedinjenja, zbog čega se moraju kombinovati sa crnim čajem. Bez obzira na ovu činjenicu, neki autori su kombuha napitak dobili upravo na biljnim čajevima. Janković (1995) je kao izvor azotovih atoma koristila čaj od šipurka i nane, i za osam dana u napicima dobila oko 10 g/l ukupnih kiselina, dok je za isto vreme u tradicionalnom napitku bilo svega 2 g/l. Roussin (1996) je kao alternativne izvore azotnih jedinjenja koristio voćne čajeve (malinu i kupinu), i u napitku dobio veće koncentracije glukonske kiseline u odnosu na tradicionalnu podlogu.

Cvetković (2003) je za kultivaciju čajne gljive koristio podlogu sa zaslađenim čajem korena i herbe ehinacee (*Echinacea purpurea* L.) i rtanjskim čajem (*Satureja montana* L.). Napitak sa većim sadržajem ukupnih kiselina dobijen je za kraće vreme u odnosu na tradicionalni postupak. Zaključeno je da ove dve biljke uspešno mogu zameniti crni čaj kao izvor azotovih atoma u podlozi za kultivaciju. Velićanski (2008) je ispitala mogućnost korišćenja lekovitih biljaka iz familije Lamiaceae kao izvora azotovih atoma i utvrdila da je melisa (*Melissa officinalis* L.) najpogodnija alternativna podloga jer daje napitak optimalne konzumne kiselosti za isto ili čak kraće vreme u odnosu na tradicionalnu podlogu. Majčina dušica (*Thymus serpyllum* L.) i menta (*Mentha piperita* L.) takođe se mogu upotrebiti umesto crnog čaja i tada proces kombuha fermentacije traje isto ili kraće vreme (za 1-2 dana) u odnosu na tradicionalni. Zaslađeni čaj od žalfije (*Salvia officinalis* L.) nije pogodan kao

supstrat za čajnu gljivu jer se napitak optimalne kiselosti dobija tek nakon devet dana, a uzrok su verovatno antiseptična svojstva biljke koja utiču na mikroorganizme čajne gljive.

Kao alternativne podloge za kombuha fermentaciju Battikh et al. (2011) su koristili saharozom (20%) zaslađene čajeve u količini od 10 g/l: *Thymus vulgaris* L. (timijan), *Lippia citriodora* L. (citronovac, četrina), *Rosmarinus officinalis* L. (ruzmarin), *Foeniculum vulgare* L. (komorač) i *Mentha piperita* L. (menta). Fermentacija je trajala 21 dan, kada su pH vrednosti dobijenih napitaka iznosile između 2,4 i 3,1. Kao kontrola korišćen je tradicionalni napitak čiji je krajnji pH iznosio 2,59, što navodi na zaključak da se primenom navedenih biljaka (osim timijana) napitak dobija za kraće vreme u poređenju sa tradicionalnim napitkom.

Kompleksni izvori ugljenika i azota. U poslednjoj deceniji izvedeno je nekoliko istraživanja sa kompleksnim podlogama za kombuha fermentaciju koje bi u isto vreme mogle da zamene i izvore ugljenika i izvore azota. Beloso Morales i Hernández Sánchez (2003) su ispitali upotrebu surutke kao kompleksnog supstrata. Glavni izvor ugljenika u surutki je laktoza (početni sadržaj laktoze je 45-55 g/l zavisno od korišćene surutke), a izvori azota su proteini. U poređenju sa tradicionalnim postupkom (fermentacija na zaslađenom crnom čaju), gajenjem čajne gljive na surutkama, pH tokom fermentacije opada sporije, verovatno zbog puferskog kapaciteta fermentacione tečnosti usled prisustva zaostalih proteina. Ukupna kiselost ima isti rastući trend promene za podloge sa surutkama i crnim čajem, bez značajne razlike u koncentraciji. Nasuprot tome, sadržaj sirćetne kiseline u napicima sa surutkom značajno je niži u poređenju sa tradicionalnim. Sadržaj mlečne kiseline povećava se tokom fermentacije, dok sadržaj šećera (laktoze, glukoze i galaktoze) opada, a među uzorcima se ne opažaju značajne razlike. Autori smatraju da surutka može da se koristi kao alternativni supstrat za kombuha fermentaciju, ali je u tom slučaju potrebna korekcija senzornih karakteristika napitka, koji nije gaziran, jako je kiseo i blago slanog ukusa.

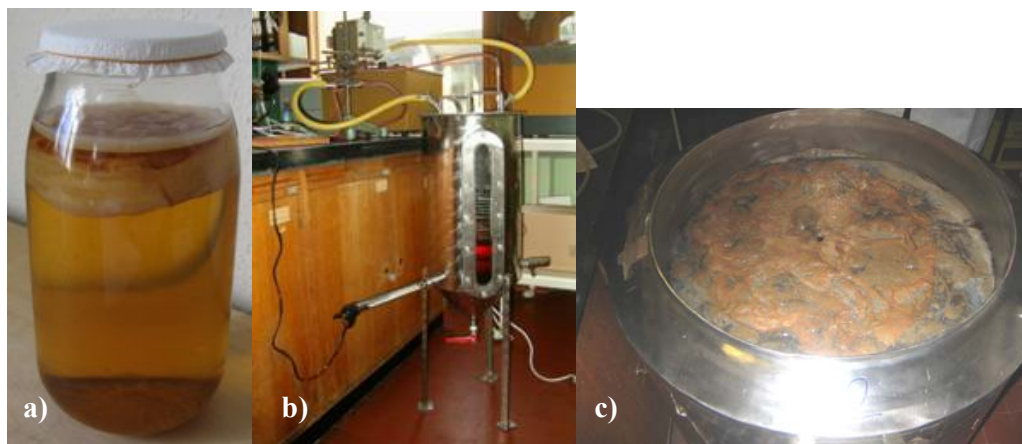
Malbaša i sar. (2009) su za kultivaciju čajne gljive koristili pasterizovano kravlje mleko sa 4,64% laktoze u cilju dobijanja novog mlečno kiselog napitka. Za inokulaciju mleka korišćeni su upareni kombuha napici od crnog i zelenog čaja, kao i napitak sa topinamburom. Količine inokuluma iznosile su 10% i 15%. Fermentacija na 42°C trajala je šest sati do postizanja pH karakterističnog za jogurt (4,4). Na trajanje fermentacije nisu uticali količina ni vrsta inokuluma, dok su sve fermentacije bile sporije od kontrolne izvedene na mleku sa komercijalnom jogurtnom kulturom. Najveći sadržaj mlečne kiseline imao je proizvod inokulisan napitkom sa topinamburom (0,58%), mada se i kod drugih proizvoda ovaj sadržaj kreće u opsegu 0,4-0,5%. Svi proizvodi imali su prihvatljive senzorne karakteristike.

Slična istraživanja sprovedli su Iličić i sar. (2012) koji su za kultivaciju čajne gljive koristili pasterizovano kravlje mleko sa različitim sadržajem mlečne masti (0,9% w/w i 2,2% w/w) i laktoze (4,74% w/w i 4,54% w/w). Mleko je inokulisano sa kombuha napitkom dobijenom u šestodnevnoj fermentaciji (pH = 3,21), a fermentacija na mleku izvedena je na 42°C. U oba uzorka mleka u prvih 6-7 h fermentacije pH stagnira na vrednosti 6,2, da bi do desetog sata naglo pala i dostigla željenu vrednost od 4,5. Tokom fermentacije utrošeno je 85-90% glukoze koja nastaje hidrolizom laktoze i to verovatno u procesu nastajanja mlečne kiseline, dok je galaktoze utrošeno svega 10-25%. Sadržaj mlečne kiseline u dobijenim proizvodima veći je i do deset puta od sadržaja sirćetne kiseline. Sadržaj sirćetne kiseline je 7-12 puta veći u odnosu na sadržaj koji nastaje u fermentaciji sa crnim čajem gde je izvor uljenika laktoza (Iličić i sar., 2012).

2.2.2. Uslovi za kultivaciju čajne gljive

Kombuha fermentacija se odvija bez mešanja u staklenim ili porcelanskim sudovima sa širokim otvorom kako bi se obezbedila dovoljna aeracija. Otvori sudova se prekrivaju gazom da bi se sprečila kontaminacija mikroorganizama iz okoline i prodiranje sirćetne mušice. Treba izbegavati upotrebu plastičnih i metalnih sudova zbog moguće interakcije sa kiselinama kombuhe. Optimalna temperatura kultivacije je od 25-30°C, a vreme trajanja procesa od 5-8 dana (Reiss, 1994; Blanc, 1996; Sreeramulu et al., 2000; Belloso Morales i Hernández Sánchez, 2003; Jayabalan et al., 2007). Postoje podaci o produženoj kombuha fermentaciji do čak 60 dana (Sievers et al., 1995; Chen i Liu, 2000). Međutim, tako dobijeni napitak ima izuzetno kiseo ukus na sirće i označava se terminom „kombuha sirće“. Ukoliko je temperatura kultivacije suviše niska, metabolički procesi bakterija se usporavaju i podloga postaje pogodnija za rast plesni usled nedovoljno brzog pada pH podloge. Ukoliko je temperatura kultivacije suviše visoka, sadržaj isparljivih aromatičnih komponenti se smanjuje, pa je time i napitak manje prijatnog ukusa. Ultravioletni zraci nepovoljno deluju na kombuha kulturu, koju je zato tokom inkubacije potrebno zaštititi od direktne izloženosti sunčevoj svetlosti (Malbaša, 2000).

Prema literaturnim podacima, fermentacija se najčešće odvija u sudovima zapremine 250 ml – 3 l sa zapreminom podloga od: 150 ml (Chen i Liu, 2000; Chu i Chen, 2006), 200 ml (Jayabalan i sar., 2007), 400 ml (Sreeramulu i sar., 2000), 1 litar (Reiss, 1994; Sievers i sar., 1995; Bauer-Petrovska i Petrushevska-Tozi, 2000; Teoh i sar., 2004) i 2 litre (Goicochea i sar., 2000). Malbaša i sar. (2006) su koristili sudove većih zapremina (5 i 10 l) sa 4 i 8 l podloge, a Cvetković i sar. (2008) su pored staklenih sudova većih zapremina od 5, 10 i 13 l (sa 4,18 l do 11 l podloge), koristili i laboratorijske bioreaktore zapremine 25 l (sa 13,8 l, 16,5 l i 19,25 l podloge) i 110 l (sa 90 l podloge) (Slika 7).



Slika 7. Sudovi za kombuha fermentaciju:
a) stakleni sud zapremine 5 l; b) bioreaktor zapremine 25 l; c) bioreaktor zapremine 110 l

2.2.3. Zasladen čaj melise kao podloga za kultivaciju čajne gljive

Melisa (*Melissa officinalis* L.), poznata pod narodnim imenima: limunka, pitoma metvica, limun trava, pčelinja trava, matičnjak, je višegodišnja, zeljasta biljka s četvorouglastom i jako razgranatom stabiljkom visine 30-120 cm koja raste kao žbun i bokori se. Listovi su joj naspramni sa dugačkom peteljkom, svetlo zeleni, jajastog oblika i nazubljeni. Gornja površina listova je tamno zelena, malo dlakava i hrapava, a naličje lista je bleđe, posuto sitnim žlezdama i išarano istaknutim nervima. Cvetovi su beli, žućkasto beli, plavičasto beli ili bledo ružičasti, a nalaze se u pršljenastim cvatovima u pazuhu listova (Slika 8).



Slika 8. *Melissa officinalis* L. (<http://www.biolib.de>)

Melisa se gaji kao lekovita i začinska biljka, istovremeno je i ukrasna, medonosna i industrijska. Cela biljka, a posebno kada se list nagneči, odaje jak, veoma prijatan i osvežavajući miris, koji podseća na limun (Grlić, 1986). Tradicionalno se upotrebljava kao blag i veoma prijatan lek protiv nadimanja u organima za varenje (karminativ), protiv neuralgije, histerije, neurastenije, mučnine, povraćanja, proliva i za jačanje organizma (Grlić, 1986). Čaj od melise se ne sme kuvati, dovoljno je jednu kašiku osušenog lista preliti sa 2 dl ključale vode. Pije se protiv raznih grčeva (spazmolitik), bolesti srca (jača srce i smiruje lupanje), vraća raspoloženje, otklanja glavobolju, živčanu napetost, ublažava bolove, pomaže kod nesаницe i slabokrvnosti i deluje kao antibakterijski agens. Etarsko ulje od melise je prijatnog mirisa i koristi se u farmaceutskoj i industriji parfema i kozmetike (Grlić, 1986; Bahtiyarca Bağdat, 2006). Kreme koje sadrže vodeni ekstrakt melise imaju antivirusno delovanje koje je povezano sa sadržajem kafene i ruzmarinske kiseline, a koriste se u lečenju herpesa (Dimitrova i sar., 1993). Takođe, listovi melise se koriste kao začinsko bilje, jer daju prijatan ukus likerima, voćnim salatama i hladnim napicima (Bahtiyarca Bağdat, 2006).

2.2.3.1. Hemijski sastav melise i biološka aktivnost

Drogu čini osušeno razvijeno lišće (*Melissae folium*) i nadzemni deo biljke (*Melissae herba*), sakupljeno pre cvetanja biljke, jer je u to vreme lišće najkrupnije i ima najviše etarskog ulja. Lišće se bere pažljivo i suši na jakoj promaji ili u sušnici do 40°C, jer se na višim temperaturama uništavaju aktivne materije. Glavni sastojak je skupoceno i vrlo lako isparljivo etarsko ulje (*Aetheroleum Melissae*), koje se nalazi spolja, na listu u mikroskopski sitnim bradavičastim žlezdanim dlakama i koga ima svega 0,01-0,1%. To je bistra, bezbojna ili žućkasta tečnost, prijatnog, osvežavajućeg mirisa na limun i prijatnog ukusa. Etarsko ulje se sastoji iz: monoterpenkih aldehida, alkohola, ketona i estara (geranial, neral, citral, citronelal, od koga potiče prijatan miris na limun, geraniol, nerol, citronelol, linalol, β -ocimen, metilheptenon, eugenolacetat, geranilacetat, metilcitronelat, δ -kadinen, α -humulen, α -kadinol), seskviterpenkih ugljovodonika (β -kariofilen, germakren D, germakredien-4-ol), flavonoida (kvercitrin, ramnocitrin, glikozidi luteolina, apigenina i kamferola), triterpena (ursolna i oleanolna kiselina), monoterpenkih fenilpropanoidnih glikozida (glikozidi nerola, geraniola, eugenola i benzil alkohola), fenolnih kiselina (ruzmarinska, kafena, protokatehinska i hlorogenska kiselina) i sterola (Kišgeci, 2002). Carnat i sar. (1998) su određivali sastav etarskog ulja lista melise, čajnog napitka i lišća nakon potapanja. Etarsko ulje lista sadrži: 48% citrala (neral i geranial), 40% citronelala i 2% β -kariofilena. Čajni napitak sadrži: 74% citrala i 16% citronelala, a lišće nakon potapanja (infuzum): 36% citrala i 42% citronelala.

Poznato je da su za biološku aktivnost biljnih ekstrakata zaslužna fenolna jedinjenja, zbog čega je u većini naučnih radova njihov kvalitativni i kvantitativni sastav najčešće bio predmet istraživanja. Tako su Zgórka i Glowniak (2001) odredili ruzmarinsku kiselinu kao glavnu fenolnu komponentu u metanolnom ekstraktu melise (10 mg/g suvog ekstrakta), dok su ostale komponente: kafena kiselina (0,5 mg/g), gentisinska (0,1 mg/g), p-hidroksibenzoeva i protokatehinska kiselina (<50 μ g/g). Sličan poredak uz mnogo veći sadržaj ovih jedinjenja dobili su i Dastmalchi i sar. (2008). Oni su u etanolnom ekstraktu melise dobili čak 96,45 mg/g ruzmarinske kiseline, a hesperidina, hesperetina, kafene kiseline, kumarne kiseline i drugih u količinama deset puta manjim od ruzmarinske kiseline. Razlike u sastavu biljnog ekstrakta dobijene od različitih istraživača pripisuju se klimatskim i geografskim razlikama i specifičnostima u procesima ekstrakcije (Dastmalchi i sar., 2008).

Biološka aktivnost melise pripisuje se pre svega ruzmarinskoj kiselini, za koju se zna da poseduje antivirusno, antibakterijsko, fungicidno, antioksidativno, antitumorno, antiinflamatorno i imunostimulativno delovanje (Zgórka i Glowniak, 2001). Dokazano je da vodeni ekstrakt melise pokazuje anti-HIV aktivnost za razliku od etarskog ulja koja ne poseduje takav efekat (Yamasaki i sar., 1998), ali poseduje anti-Herpes simplex aktivnost (Allahverdiyev i sar., 2004). Pretpostavlja se da melisa poseduje i antikancerogeno delovanje jer njen list sadrži supstance (kafenu kiselinu i njen glikozid) koje inhibiraju biosintezu proteina u kancerogenim ćelijama (Galasinski i sar., 1996). Antikancerogena aktivnost i prevencija kardiovaskularnih oboljenja povezuje se i sa flavonoidima detektovanim u vodenom ekstraktu melise, za koje je poznato da poseduju i antioksidativnu aktivnost veću od aktivnosti vitamina C i E (Pereira i sar., 2009).

Dastmalchi i sar. (2008) su ispitali antioksidativnu aktivnost etanolnog ekstrakta melise i pokazali da u poređenju sa galnom kiselinom, kafenom kiselinom i kvercetinom, etanolni ekstrakt melise ima manju antioksidativnu aktivnost prema DPPH radikalima. Ekstrakt melise ima veću antioksidativnu aktivnost prema superoksid anjon radikalima u odnosu na galnu i kafenu kiselinu. Dokazanu sposobnost heliranja Fe^{2+} jona koja je takođe veća u poređenju sa askorbinskom i galnom kiselinom, autori povezuju i sa mogućnošću

prevencije Alchajmerove i Parkinsonove bolesti (neurodegenerativnih oboljenja) kod kojih su upravo joni prelaznih metala uzročnici oksidativnog stresa. Zbog antioksidativnog potencijala ekstrakti melise mogu se koristiti i za konzervisanje hrane (sprečavaju lipidnu peroksidaciju), kozmetičkih i farmaceutskih preparata (Dastmalchi i sar., 2008). Metanolni ekstrakti melise (ekstrakti svežih i suvih listova) imaju sposobnost hvatanja DPPH radikala veću od 90%, što se pripisuje visokom sadržaju fenolnih jedinjenja, pre svega ruzmarinskoj, ali i ostalim fenolnim kiselinama (kafenoj, ferulnoj, hlorogenskoj) koje učestvuju u neutralizaciji slobodnih radikala (Capecka i sar., 2003). U sušenim listovima melise sadržaj L-askorbinske kiseline i karotenoida je znatno niži nego u svežim listovima, što ipak nije uticalo na smanjenje antioksidativne aktivnosti suvih listova. Ovo se objašnjava činjenicom da na antioksidativnu aktivnost ne utiče samo sadržaj pojedinih aktivnih komponenata, nego je ona rezultat sinergističkog efekta između ovih i ostalih biljnih komponenata (Capecka i sar., 2003). Vrednost polovine maksimalne efektivne koncentracije (EC_{50}) etarskog ulja od melise prema DPPH radikalima je 7,58 $\mu\text{g/ml}$, što je samo malo više u odnosu na pozitivnu kontrolu BHT (butilhidrotoluen, sintetički antioksidans) čiji je EC_{50} 5,37 $\mu\text{g/ml}$, dok je antioksidativna aktivnost prema hidroksil radikalima veća (iznosi 60%) u odnosu na BHT (18%). Rezultati ukazuju da etarsko ulje ne treba koristiti samo zbog arome već i kao antioksidativni i antiseptički dodatak namirnicama i farmaceutskim preparatima (Mimica-Dukić i sar., 2004).

Etarsko ulje melise (20% i 50% rastvori) pokazuje i antibakterijsku aktivnost prema većem broju Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija. Značajnu osetljivost pokazale su patogene i oportunističke patogene bakterije: *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhi*, a naročito multirezistentan soj *Shigella sonnei* (zona inhibicije čak 37,4 mm). Etarsko ulje melise poseduje antifungalnu aktivnost prema svim ispitanim dermatomicetama, ali su minimalne fungicidne koncentracije 1-6 puta veće u odnosu na sintetički antimikotik bifonazol (Mimica-Dukić i sar., 2004). Etarsko ulje melise u koncentraciji od 500 $\mu\text{g/ml}$ potpuno inhibira rast kvasaca: *Torulaspora delbrueckii*, *Zygosaccharomyces bailii*, *Pichia membranifaciens*, *Dekkera anomala*, *Yarrowia lipolytica* i *Saccharomyces cerevisiae* (Araujo i sar., 2003).

Pereira i sar. (2009) su izveli oglede na eksperimentalnim životinjama u kojima su poredili antioksidativnu aktivnost ekstrakata melise i čistih supstanci, tj. fenolnih jedinjenja: kvercetin, galne kiseline i rutina koji su najčešći konstituenti biljnih ekstrakata i koji utiču na antioksidativnu aktivnost. Pokazali su da ekstrakti melise (inhibitorni potencijal: vodeni > metanolni > etanolni) značajno inhibiraju proces lipidne peroksidacije u moždanim ćelijama pacova (smanjuju sadržaj produkata lipidne peroksidacije) i da je ova aktivnost u korelaciji sa sadržajem fenolnih jedinjenja. Ispitana fenolna jedinjenja imaju veću aktivnost od ekstrakata melise, što se objašnjava nižom koncentracijom pojedinih aktivnih komponenata u biljnim ekstraktima. Ipak, ne treba zanemariti farmakološki značaj biljnih ekstrakata, zbog njihove lake dostupnosti, ali i prisustva različitih komponenata koja u *in vivo* delovanju imaju sinergistički efekat. Dobijeni rezultati ukazuju da se ekstrakti melise mogu primenjivati kao potencijalni agensi u prevenciji neuroloških oboljenja koja su izazvana oksidativnim stresom. Važno je istaći da su najveću aktivnost pokazali vodeni ekstrakti (tj. čajni napici) koje široka populacija baš u takvom obliku najčešće konzumira (Pereira i sar., 2009).

2.3. HEMIJSKI SASTAV KOMBUHA NAPITKA

Hemijski sastav kombuha napitka čine pored preostalih ugljenih hidrata, supstance ekstrahirane iz čaja, kao i one nastale metaboličkom aktivnošću mikroorganizama čajne gljive. Prema Roussin-u (1996) dominantne komponente kombuha napitka su fruktoza (25 g/l), sirćetna kiselina (2 g/l) i glukonska kiselina (3,1 g/l). Ostale komponente kombuha napitka, prisutne u količini manjoj od 1 g/l su: etil glukonat, oksalna kiselina, glukarna kiselina, ketoglukonske kiseline, pirogroždana kiselina i druge organske kiseline. Sadržaj osnovnih metabolita pratili su Sievers i sar. (1995) tokom produžene fermentacije od 60 dana. Sadržaj saharoze je sa startnih 70 g/l, opao na 18,2 g/l u desetom danu, a posle 20 dana saharoza je bila potpuno utrošena. Maksimalni sadržaj glukoze detektovan je nakon 20 dana i iznosi 36,4 g/l, a zatim opada do kraja procesa na 10 g/l. Isti trend javlja se za fruktozu čiji je sadržaj u desetom danu 16,4 g/l, a na kraju fermentacije potpuno je utrošena. U istraživanju Sreeramulu i sar. (2000) sadržaj saharoze sa startnih 100 g/l nakon 8 dana fermentacije opada ispod 10 g/l, dok se sadržaj glukoze povećava do šestog dana (oko 70 g/l), nakon čega ostaje približno konstantan do kraja procesa. Veći sadržaj fruktoze tokom fermentacije u odnosu na glukozu može se objasniti različitim metaboličkim putevima usvajanja ovih šećera od strane *Acetobacter xylinum* (Chen i Liu, 2000). Naime, većina *Acetobacter* vrsta deo glukoze koristi za sintezu organskih kiselina (npr. glukonske), glukonata i celulozne pelikule. S druge strane, *Acetobacter xylinum* slabije metaboliše fruktozu, pa se zbog toga fruktoza više zadržava u fermentacionoj tečnosti (Chen i Liu, 2000). Nasuprot toga, Sievers i sar. (1995) navode da se u fermentacionoj tečnosti nakuplja više glukoze, jer kvasci čajne gljive (pre svih *Zygosaccharomyces* sp.) brže usvajaju fruktozu nego glukozu. Nakon 28 dana fermentacije, fruktoza je potpuno utrošena, a sadržaj glukoze je 30 g/l (Sievers i sar., 1995).

Dominantna organska kiselina u fermentacionoj tečnosti je sirćetna, koja je pored etanola najčešće određivan metabolit u kombuhi. Njen sadržaj se uglavnom kontinuirano povećava tokom kultivacije čajne gljive. Sadržaj ove kiseline u gotovom napitku se razlikuje kod različitih autora. Tako je prema Sievers-u i sar. (1995) sadržaj sirćetne kiseline nakon deset dana iznosio 2,1 g/l, nakon dvadeset dana 5,8 g/l, nakon trideset 13,1 g/l a nakon četrdeset dana čak 28,4 g/l. Blanc (1996) je u podlozi sa 7% saharoze petnaestog dana dobio maksimalnih 6 g/l sirćetne kiseline. Sreeramulu i sar. (2000) nakon pada za 0,3 g/l (između osmog i desetog dana) beleže porast u sadržaju sirćetne kiseline, tako da četrnaestog dana napitak ima 7,66 g/l sirćetne kiseline. Nešto niži sadržaj u podlozi sa 10% saharoze posle petnaest dana (6,17 g/l) dobijaju Jayabalan i sar. (2007). U šestodnevnom procesu Liu i sar. (1996) dobijaju 3,75 g/l ove kiseline, a za isto vreme Chen i Liu (2000) (u podlozi sa 10% saharoze) 2,9 g/l, dok se sadržaj sirćetne kiseline od 3,75 g/l dobija tek četrnaestog dana.

Glukonska kiselina, koja nastaje oksidacijom glukoze na ćelijskoj membrani bakterija sirćetnog vrenja je po zastupljenosti druga organska kiselina u kombuhi. Sadržaj glukonske kiseline kontinuirano se povećava tokom celog procesa i dostiže 13,5 g/l nakon 40 dana fermentacije (Sievers i sar., 1995). Moguće je da u produženoj (višenedeljnoj) kultivaciji sadržaj glukonske kiseline u fermentacionoj tečnosti bude i veći od sadržaja sirćetne kiseline (Blanc, 1996; Chen i Liu, 2000; Sreeramulu i sar., 2000).

Često se navodi da su pored sirćetne i glukonske, u kombuha napitku prisutne i druge organske kiseline: mlečna, vinska, ćilibarna, limunska, jabučna (Roussin, 1996; Teoh i sar., 2004). Prema nekim autorima, prisutna je i glukuronska kiselina, koja je jedan od terapijski najvažnijih metabolita jer je nosilac detoksikacione aktivnosti kombuhe (Blanc, 1996; Lončar i sar., 2000; Jayabalan i sar., 2007). Blanc (1994) je u kombuha napitku nakon 25 dana kultivacije detektovao glukuronsku kiselinu (HPLC metodom) u količini manjoj od 10 mg/l, dok su Lončar i saradnici (2000) tokom kultivacije najveću količinu glukuronske kiseline od

0,0175 mmol/l odredili (spektrofotometrijskom metodom) nakon sedam dana fermentacije. Jayabalan i sar. (2007) su nakon 18 dana fermentacije na crnom i zelenom čaju detektovali oko 1,70 g/l D-glukuronske kiseline. Ipak, Rousin (1996) iz velikog broja ispitanih uzoraka kombuhe nije identifikovao ovu kiselinu i smatra da se derivati glukonske kiseline često pogrešno identifikuju kao glukuronska kiselina zbog identičnih retencionih vremena prilikom hromatografskog određivanja.

Osim zaostalih ugljenih hidrata i organskih kiselina, u kombuha napitku prisutan je i etanol, čiji sadržaj uglavnom nije veći od 1%. Sievers i sar. (1995) su nakon deset dana fermentacije detektovali količinu etanola u fermentacionoj tečnosti od 0,36%, a nakon trideset dana 0,7%. Liu i sar. (1996) u šestodnevnom procesu određuju 0,7% etanola, a Chen i Liu (2000) u produženoj fermentaciji maksimalnih 0,5% dvadesetog dana, a zatim do šezdesetog dana sadržaj etanola opada. Reiss (1994) je utvrdio da sadržaj etanola u kombuha napitku zavisi od upotrebljenog šećera u podlozi i najveći sadržaj etanola (6,3 g/l) detektovao je u podlozi sa 5% saharoze nakon deset dana fermentacije. Međutim, veći sadržaj etanola (7 g/l), a za dvostruko kraće vreme dobili su Liu i sar. (1996), dok je Blanc (1996) maksimalnih 1,34 g/l etanola dobio nakon pet dana kultivacije čajne gljive u podlozi sa 10% saharoze, posle čega sadržaj etanola opada. Cvetković (2003) je u fermentacionoj tečnosti odredio sadržaj etanola manji od 0,5%: 3,34 g/l nakon četiri dana fermentacije, 4 g/l nakon pet dana i 4,67 g/l nakon šest dana, čime se kombuha napitak prema nacionalnim propisima (Pravilnik o kvalitetu i drugim zahtevima za osvežavajuća bezalkoholna pića, 2006) svrstava u bezalkoholni napitak. Osim etanola u napitku je određivan i sadržaj glicerola (Liu i sar., 1996) koga na kraju fermentacije (šestog dana) ima oko 1 g/l. Autori navode da biosintetisani glicerol ne utiče na aromu kombuha napitka, ali doprinosi njegovoj viskoznosti.

Metaboličkom aktivnošću kvasaca čajne gljive nastaju biološki vredna jedinjenja kao što su vitamini B grupe: tiamin (B₁), riboflavin (B₂), niacin (B₃), pantotenska kiselina (B₅), piridoksin (B₆), p-aminobenzoeva kiselina, vitamin B₁₂, folna kiselina, nikotinska kiselina, biotin, inozitol i dr. (Pyke, 1958; Petrović i Lončar, 1996). Vitamin C nastaje metaboličkom aktivnošću baterija sirćetnog vrenja, a sintetisana količina u velikoj meri zavisi od izvora ugljenika u supstratu za kultivaciju, pri čemu saharoza u odnosu na glukozu i fruktozu stimulatивно deluje na sintezu vitamina C (Petrović i sar., 1995/96). Bauer-Petrovska i Petruševska-Tozi (2000) su u kombuhi kvantifikovale sledeće vitamine: B₁ (0,74 mg/ml), B₆ (0,52 mg/ml), B₁₂ (0,84 mg/ml) i vitamin C (1,51 mg/ml). Njihov sadržaj je veći u odnosu na sadržaj u crnom čaju i to u slučaju vitamina B₁ za 1,61 put, a za vitamin B₁₂ za 2,31 put. Povećan sadržaj vitamina B grupe i vitamina C daje kombuhi odličan potencijal za poboljšanje zdravstvenog stanja organizma. Malbaša i sar. (2011) su detektovali kontinualni porast sadržaja vitamina C tokom desetodnevne fermentacije na crnom i zelenom čaju. U gotovom kombuha napitku od crnog čaja (kiselosti oko 7 g/l) dobija se oko 30 mg/l vitamina C, dok u napitku od zelenog čaja (kiselosti oko 8 g/l) ima tri puta manje ovog vitamina. Sadržaj vitamina B₂ u gotovim napicima na obe podloge je oko 8 mg/100ml.

Posledica metaboličke aktivnosti mikroorganizama čajne gljive i liziranja ćelija je prisustvo invertaza, amilaza, katalaza i drugih enzima u fermentisanoj tečnosti (Greenwalt i sar., 2000).

Bauer-Petrovska i Petrushevska-Tozi (2000) su u kombuha napitku (dobijenom nakon osmodnevne fermentacije) određivale sadržaj mineralnih elemenata od kojih su neki bitni za normalno funkcionisanje fizioloških procesa u organizmu (Mn, Fe, Ni, Cu, Zn, Co), a neki toksični (Pb, Cr i Cd). Dobijene vrednosti su bile u granicama od 0,001 µg/ml za Cr do 0,462 µg/ml za Mn, pri čemu u kombuha napitku nije detektovan Cd. Sadržaj većine mineralnih elemenata u kombuha napitku veći je u odnosu na sadržaj u crnom čaju, kao posledica unosa ovih minerala sa inokulumom. Sadržaj Co je jednak u kombuhi i čaju jer se on verovatno troši na ugradnju u vitamin B₁₂. Autori navode da se konzumiranjem 0,3 l kombuhe dnevno mogu

zadovoljiti dnevne potrebe za Ni i Co, delimično za Fe i Cu, ali ne i za Zn i Mn. Istraživanje Petrović i sar. (1995/96) je pokazalo da tokom fermentacije dolazi do usvajanja Cu i Zn od strane ćelija čajne gljive, tako da se početna količina Cu (428,9 µg/l) nakon tri dana smanjuje za oko 70%, a nakon 14 dana za preko 85%, dok se količina Zn naglo smanjuje tokom sedam dana (sa 146,5 na 88,3 µg/l) i do kraja procesa ostaje gotovo nepromenjena.

Kumar i sar. (2008) su u crnom čaju i kombuha napitku ispitali sadržaj anjonskih minerala metodom jonske hromatografije kojom su identifikovani fluoridi, hloridi, bromidi, jodidi, nitrati, fosfati i sulfati. Detektovan je sledeći sadržaj minerala: fluorida (3,2 mg/g), sulfata i jodida (oko 1 mg/g), hlorida (0,96 mg/g), nitrata (0,18 mg/g), bromida i fosfata (oko 0,04 mg/g). U crnom čaju najveći je bio sadržaj sulfata (4,2 mg/g) i hlorida (3,12 mg/g), zatim fluorida (1,2 mg/g), a ostalih minerala ima manje od 0,4 mg/g.

2.4. FUNKCIONALNE KARAKTERISTIKE KOMBUHA NAPITKA

Koncept funkcionalne hrane predstavljen je 80-ih godina prošlog veka u Japanu kao posebna hrana koja pored svojih uobičajenih nutritivnih funkcija utiče na poboljšanje zdravstvenog stanja organizma i smanjuje rizik od bolesti. Ova hrana sadrži biološki aktivne komponente (kao što su specifični minerali, vitamini, masne kiseline, dijetetska vlakna, probiotske kulture itd.) koje utiču na fizičko i mentalno zdravlje (na digestivni sistem, imunološki sistem, deluju antioksidativno i antimikrobno itd.) (Diplock i sar., 1999; Obe, 2001; Kwak i Jukes, 2001; Roberfroid, 2002).

Funkcionalna hrana može biti: prirodna hrana, hrana kojoj su dodate neke komponente u cilju poboljšanja njenih svojstava (npr. vitamini, minerali), hrana iz koje su uklonjene neke komponente (npr. zasićena mast, šećer, so), hrana u kojoj jedna ili više komponenti može biti modifikovana ili bilo koja njihova kombinacija (Roberfroid, 2002). U prirodnu funkcionalnu hranu, koja potiče iz biljnih izvora, spadaju: sveže voće (brusnica, ribizle, citrusi, crno grožđe, jabuke itd.), povrće (brokoli, beli luk, paradajz itd.), koštunjavo voće (lešnik, badem), integralni, obogaćeni hleb, laneno seme, ovas itd. U funkcionalnu hranu koja potiče iz životinjskih izvora spadaju mlečni proizvodi (jogurt, kefir), riba i govedina. Funkcionalnom hranom se smatraju i napici kao što su čaj i crno vino, a od masti maslinovo ulje. Osim ove prirodne hrane, neki proizvodi su napravljeni tako da dobiju funkcionalne karakteristike: npr. voćni jogurti gde je voće bogato vitaminima i dijetetskim vlaknima pomešano sa žitaricama i probioticima, margarin od soje itd. (<http://www.wellness-institute.eu>; <http://www.studpol.rs>).

Zbog raznovrsnosti postojećih i proizvoda koji će se sigurno sve više pojavljivati kao funkcionalna hrana, mnoštva bioaktivnih komponenata koje ova hrana sadrži (od kojih neke jesu, a neke nisu svrstane u nutrijente), kao i raznovrsnosti njihovih korisnih svojstava, ne postoji jedinstvena definicija funkcionalne hrane. Smatra se da definicija ima onoliko koliko je istraživača koji se ovom temom bave, od onih veoma jednostavnih do složenijih. Neke od definicija su (Kwak i Jukes, 2001; Roberfroid, 2002):

- Hrana koja može povoljno da utiče na zdravlje više od konvencionalne hrane;
- Namirnice ili proizvodi sa jasnom oznakom o korisnom delovanju na zdravlje;
- Hrana i piće koji su dobijeni od prirodnih supstanci, a koje se konzumiraju u svakodnevnoj ishrani, utiču na poboljšanje zdravstvenog stanja i nakon unosa utiču na regulaciju određenih procesa u organizmu;
- Hrana koja izgledom podseća na konvencionalnu hranu, koristi se u svakodnevnoj ishrani, utiče na zdravlje, može da smanji rizik od hroničnih bolesti;
- Hrana koja obuhvata potencijalno korisne proizvode, uključuje i modifikovanu hranu ili sastojke hrane koji obezbeđuju zdravstvene efekte.

Poslednjih nekoliko decenija u zemljama zapadne Evrope i severne Amerike postoji veliko interesovanje za kombuhom kao funkcionalnim napitkom, zbog njenog poznatog hemijskog sastava i potencijalnih terapijskih svojstava. Kombuha napitku se pripisuju brojna terapijska svojstva koja su uglavnom zasnovana na opservacijama i svedočanstvima njenih dugogodišnjih konzumenata. Ipak, poslednjih nekoliko decenija urađena su klinička istraživanja koja dokazuju neke od blagotvornih svojstava ovog napitka. Allen (1998) navodi da je na osnovu istraživanja sprovedenih u Rusiji početkom prošlog veka utvrđeno da kombuha napitak pomaže kod glavobolja, gastričnih oboljenja i regulisanja intestinalne aktivnosti. U periodu između 1925. i 1950. godine nekoliko medicinskih studija je potvrdilo antibiotska svojstva kombuhe, njenu sposobnost regulacije gastrične, intestinalne i glandularne aktivnosti, olakšavanje tegoba osobama obolelih od artritisa i hemoroida, pozitivno delovanje na nivo holesterola u krvi i arteriosklerozu. Takođe je utvrđeno da kombuha ima detoksikaciona svojstva, da blagotvorno deluje na nervni sistem i usporava proces starenja (Allen, 1998).

Smatra se da kombuha blagotvorno deluje kod astme, katarakte, dijareje, gihta, herpesa, nesanice, hemoroida, hipertenzije i reumatizma. Veruje se da ovaj napitak može da povrati boju sedoj kosi i ispravi bore, da utiče na izbacivanje viška vode iz organizma, utiče na rad bubrega, pomaže kod bolesti prostate, psorijaze, multipla skleroze, angine itd. (Kaufmann, 1995; Greenwalt i sar., 2000). Greenwalt i sar. (2000) navode i delovanje kombuhe na rad digestivnog trakta, glavobolje, arterioskleroze, metaboličkih poremećaja, artritisa, iscrpljenosti organizma, stresa, prevencije kancera itd. Ipak, neki lekari smatraju da, s obzirom da je većina korisnih svojstava kombuhe zasnovana na iskustvima konzumenata, napitku, pre svega treba pripisati nutritivna, a ne terapijska svojstva (Greenwalt i sar., 2000).

Istraživanja na pacovima, kojima je u periodu od dve nedelje uključen u ishranu kombuha napitak, pokazala su da konzumiranje napitka dovodi do smanjivanja bola, kao i da pomaže u uspavlivanju. Neki su ova svojstva pripisali sadržaju alkohola u napitku, iako ispitivanja sa alkoholom kao kontrolom nisu sprovedena (Greenwalt i sar., 2000). Hartmann i sar. (2000) su objavili rezultate istraživanja tokom koga je eksperimentalnoj grupi miševa kao dodatak ishrani davana kombuha i koji su pokazali značajno poboljšanje zdravstvenog stanja i produženje životnog veka eksperimentalnih životinja.

Većina terapijskih svojstava kombuhe pripisuje se organskim kiselinama prisutnim u napitku (sirćetnoj, mlečnoj, glukonskoj i moguće usninskoj kiselini), ali pre svega glukuronskoj kiselini. Detoksikaciona svojstva napitka vezana su za ovu kiselinu i njenu sposobnost da veže molekule toksina, obezbeđujući njihovu ekskreciju putem bubrega ili creva. Mnoge bolesti kao što su kostobolja, reumatizam, artritis i kamen u bubregu, upravo su posledica akumulacije toksina u organizmu (Dufresne i Farnworth, 2000). Ipak, o prisustvu glukuronske kiseline u kombuhi još uvek ima oprečnih mišljenja. Roussin (1999) smatra da je supstanca koja je u kombuhi identifikovana kao glukuronska kiselina zapravo 2-ketoglukonska kiselina. Nesporno je da se u urinu i fecesu osoba koje konzumiraju kombuhu nalazi visok nivo glukuronida, koji jedni objašnjavaju prisustvom glukuronske kiseline, a drugi prisustvom 1,4-saharolaktone u napitku. Značaj 1,4-saharolaktone je u tome što blokira delovanje bakterijske β -glukuronidaze, enzima koji je indirektno povezan sa kancerom. Naime, β -glukuronidaza je enzim koji hidrolizuje glukuronide u lumenu creva, čime se stvaraju toksične i kancerogene supstance. Ovaj enzim prevodi konjugovani oblik glukuronida u kancerogenu aglikonsku komponentu. Uobičajeno, ove kancerogene komponente se mogu detoksikovati stvaranjem glukuronida u jetri koji se zatim unose u creva putem žuči. Dokazano je da je aktivnost β -glukuronidaze u fecesu osoba obolelih od raka debelog creva veća nego kod zdravih osoba, što ukazuje na značajnu ulogu ovog enzima u kancerogenezi. Primenom 1,4-saharolaktone u koncentraciji 0,03 to 0,15 mg/ml značajno se smanjuje aktivnost β -glukuronidaze (Wang i sar., 2010).

U kombuha napicima 1,4-saharolakton je detektovan u različitim koncentracijama i smatra se aktivnom komponentom napitka koja je od značaja za objašnjenje korisnih svojstava kombuhe (Roussin, 1999; Yang i sar., 2009; Wang i sar., 2010). Prema Yang i sar. (2009) sadržaj 1,4-saharolaktona u tradicionalnom kombuha napitku nakon osmodnevne fermentacije (inokulisanom napitkom iz prethodne kultivacije) iznosi 2,30 mg/ml, a u modifikovanom napitku (inokulisanom suspenzijom izolata *Gluconobacter* sp.) 3,51 mg/ml, zbog čega autori navode da je izolat *Gluconobacter* sp. glavni funkcionalni soj u kombuha napitku. Nešto manje količine detektovane su u četiri kombuha napitka prikupljenih iz različitih izvora (od 57 do 132 µg/ml), a u jednom nije detektovana ova komponenta (Wang i sar., 2010). U istraživanju Bhattacharya i sar. (2011), nakon 14 dana fermentacije kombuha sadrži 1,32 mg/ml 1,4-saharolaktona.

Roche (1998) objašnjava da su vitamini B kompleksa odgovorni za delovanje kombuhe na nervni system, a mlečna kiselina za laksativnu aktivnost kombuhe (Reiss, 1994).

Osim kombuha napitka, i sama celulozna pelikula može imati terapeutska svojstva. Fontana i sar. (1991) su pelikulu nastalu tokom kultivacije čajne gljive koristili za izradu celuloznog biofilma, koji su upotrebili u terapiji rana na koži. Za razliku od celuloze koja se dobija iz drugih izvora, a koju je potrebno prečistiti kako bi se kompletno uklonili lignin i hemiceluloza, celuloza koju stvaraju bakterije roda *Acetobacter* ne sadrži pirogene materije (Fontana i sar., 1990). Fontana i sar. (1991) su utvrdili da kofein i ksantini iz biljnih ekstrakata stimulišu produkciju celuloze kod *Acetobacter xylinum*. Zato zaslađeni crni čaj, kao podloga za kultivaciju čajne gljive, predstavlja dobru podlogu za produkciju celuloze i pelikula dobijena tokom kultivacije može biti iskorišćena za izradu biofilma sa terapeutskim svojstvima. S obzirom na dokazanu antimikrobnu aktivnost kombuhe prema patogenim mikroorganizmima, Greenwalt i sar. (2000) smatraju da se čajna gljiva može koristiti u lečenje kožnih oboljenja i opekotina.

Navodi o primeni kombuha napitka u veterini datiraju iz perioda posle II svetskog rata. Ispitivanja na jagnjadima i teladima koji su bolovali od dizenterije, a lečeni preparatima od kombuhe, pokazala su da je oporavak bio u 100% slučajeva. Primena kombuhe u lečenju ovaca i teladi koje boluju od dijareje takođe daje uspešnost od 100%. I rast zdravih životinja povećava se za 15% ukoliko se daje kombuha uz hranu. Postoje navodi da se kombuha uključuje u ishranu pasa i mačaka radi poboljšanja opšteg zdravstvenog stanja (Kaufmann, 1995).

Štetna svojstva kombuha napitka. Ispitivanja na životinjama sprovedena 1993. godine ukazala su na moguća štetna svojstva kombuhe. Nakon 12 nedelja konzumiranja kombuhe kod pacova su se pojavile intestinalne lezije na organima, dok kod miševa nije bilo poremećaja. Istraživači su zaključili da osetljivost na toksične sastojke kombuhe varira od vrste do vrste eksperimentalnih životinja (Greenwalt i sar., 2000).

Veće interesovanje za moguća toksična svojstva kombuhe usled prekomernog konzumiranja javilo se nakon događaja u Americi 1995. godine. Jedna osoba je umrla od perforacija na crevima i ozbiljnih acidoza, što je na osnovu svedočenja ostalih konzumenata, povezano sa prekomernim konzumiranjem kombuha napitka dobijenog u produženoj fermentaciji (14 dana) koji je bio izuzetno kiselog ukusa. Ovaj slučaj je pokrenuo pitanje o ulozi kombuhe u stvaranju metaboličke acidoze i postojanju toksičnih svojstava. Međutim, zaključeno je da su moguća štetna svojstva povezana sa preteranim konzumiranjem i zdravstvenim problemima pojedinaca (Greenwalt i sar., 2000). Phan i sar. (1998) govore o trovanju dvoje ljudi koji su konzumirali kombuha napitak pripremljen u keramičkim posudama. Sadržaj olova u ovom materijalu bio je mnogo veći (198 mg/l rastvora ekstrakta) od dozvoljenog (4 mg/l) za posuđe u kojima se priprema hrana, te ovakav sud nije smeo biti upotrebljen u ove svrhe. Verovatno je došlo do otpuštanja olova u fermentacionu tečnost i kontaminacije napitka, što je rezultiralo u sadržaju olova u kombuhi od 329 mg/kg suve mase

(maksimalno dozvoljen sadržaj olova u hrani je 0,5 mg/ml) (Phan i sar., 1998). Ipak, ovi pojedinačni slučajevi nemaju naučnu potvrdu da je konzumiranje kombuhe direktno odgovorno za nastale poremećaje.

Američka agencija za hranu i lekove (Food and Drug Administration) je ispitivanjem komercijalnih kombuha napitaka konstatovala odsustvo patogenih bakterija i njihovu zdravstvenu ispravnost, na osnovu čega je zaključeno da kombuha nema štetnih efekata i da je bezbedna po zdravlje konzumenata (Srinivasan i sar., 1997). Preporučena dnevna doza kombuhe je jedna do dve čaše (Centers for disease control, USA, 1995), uz koju bi trebalo da se unese i određena količina vode, kako bi se potpomogla eliminacija toksina i izbegla eventualna neželjena reakcija organizma (Dufresne i Farnworth, 2000). Ovi podaci su u skladu sa podacima iz 1928. godine, po kojima je preporučena dnevna doza kombuhe 1/2-3/4 litre, pri čemu se uzima nekoliko puta u toku dana posle obroka (Frank, 1994). Neki preporučuju uzimanje kombuhe na prazan stomak zbog većeg iskorišćenja korisnih sastojaka. Ipak, ovo su samo sugestije, a ne obavezujuće preporuke jer je svaki organizam različit i svako treba da nađe za sebe najpovoljniji način uzimanja kombuhe (Frank, 1994).

Zbog pripreme kombuhe u kućnim uslovima postoji mogućnost kontaminacije čajne gljive mikroorganizmima iz okruženja. Zbog niske Ph vrednosti napitka (obično oko 2,5) i dokazanog antimikrobnog efekta kombuhe, većina mikroorganizama uzročnika kvarenja hrane ne raste u ovim uslovima (ne raste ispod Ph 4). Međutim, mikotoksigene plesni mogu da prežive u kombuhi, a njihovi sekundarni metaboliti imaju toksične i kancerogene efekte. Mayser i sar. (1995) su zabeležili tri slučaja kontaminacije radne kulture (od 34 ispitanih) patogenim i uslovno patogenim kvascima (*Candida albicans* i *Candida krusei*) i potencijalno mikotoksigenim plesnima (*Penicilium* spp.), ali nisu registrovani slučajevi intoksikacija ili infekcija usled konzumiranja kombuhe.

2.4.1. Antimikrobno delovanje kombuhe

Istraživanja antimikrobnih svojstava kombuha napitaka u poslednje dve decenije potvrđuju antimikrobnu aktivnost prema velikom broju bakterija, ali se o nosiocima aktivnosti još uvek polemise, te su istraživanja u ovoj oblasti i dalje aktuelna.

Steinkraus i sar. (1996) su ispitali antimikrobnu aktivnost kombuhe od crnog čaja (koncentracija čaja 4,36 g/l) prema sledećim mikroorganizmima: *Helicobacter (He.) pylori*, *Agrobacterium (Ag.) tumefaciens*, *Escherichia (E.) coli* i *Staphylococcus (St.) aureus*. Kombuha napitak nakon 10 dana fermentacije sadržao je 10,5 g/l sirćetne kiseline, a kao kontrolni uzorci pripremljeni su: nefermentisani čaj sa šećerom, kombuha zagrejana na 120°C u trajanju od 5 minuta, kombuha neutralisana do Ph 7,5, rastvor sirćetne kiseline koncentracije kao u kombuhi (10,5 g/l) i komercijalno sirće sa 5% kiseline. Kombuha je pokazala antimikrobno delovanje prema svim test mikroorganizmima, približno isto kao i sirćetna kiselina i komercijalno sirće. Termički tretirana kombuha imala je slabiju antimikrobnu aktivnost, dok nefermentisani čaj i neutralisana kombuha nisu pokazali nikakvo delovanje.

Antimikrobnom delovanju kombuhe ne doprinosi čaj ukoliko se primenjuje u uobičajenim koncentracijama za pripremu kombuhe 0,3-0,5% (Chen i Liu, 1996; Steinkraus i sar., 1996; Greenwalt i sar., 1998; Chu i Chen, 2006). U istraživanju Hesseltine-a (1965) čaj u koncentraciji 34 g/l je delovao antimikrobno prema *Ag. tumefaciens*, a prema Dikera i Haselika (1994) crni čaj koncentracije 200 g/l pripremljen u fosfatnom puferu inhibitorno je delovao na *He. Pylori* i na uzročnike dijareje: *St. Aureus*, *Vibrio (V.) parahaemolyticus* i *V. cholerae* (Steinkraus i sar., 1996). Infuzum crnog čaja u pet puta većoj koncentraciji (15 g/l) nego pri uobičajenoj za pripremu kombuhe delovao je na: *Bacillus (B.) cereus*, *Micrococcus*

(*Mi.*) *luteus*, *Pseudomonas (P.) aeruginosa* i *Candida (C.) albicans*, minimalno je delovao na *E. Coli*, a nije ispoljio inhibitornu aktivnost prema *Lactobacillus (L.) acidophilus* (Almajano i sar., 2008). Smatra se da je ovakvo delovanje čaja uzrokovano visokom koncentracijom fenolnih jedinjenja. Poznato je da flavonoidi izolovani iz različitih biljaka koje se koriste u narodnoj medicini poseduju antifungalnu aktivnost prema *C. Albicans*, *Candida spp.*, *Aspergillus (Asp.) flavus*, *Cladosporium sphaerospermum*, *Penicillium digitatum* i *Penicillium italicum*, kao i antibakterijsku aktivnost (Cushnie i Lamb, 2005). Iako neki naučnici smatraju da je delovanje flavonoida baktericidno, drugi smatraju da oni ne ubijaju bakterijske ćelije već samo doprinose stvaranju agregata ćelija (grupacija) i time prividno smanjuju broj kolonija (Cushnie i Lamb, 2005). Za katehine iz čaja je dokazano da je antibakterijska aktivnost izazvana inhibicijom funkcije citoplazmatske membrane. Po jednoj teoriji katehini narušavaju dvoslojnu lipoproteinsku strukturu ćelijske membrane direktno se inkorporirajući u membranu, čime remete njenu barijernu funkciju. Po drugoj teoriji katehini uzrokuju membransku fuziju, praćenu agregacijom membrane i isticanjem ćelijskog sadržaja (Cushnie i Lamb, 2005). Almajano i sar. (2008) navode da od katehina najveću antimikrobnu aktivnost imaju epigalokatehin galat (EGCG) i epigalokatehin (EGC), kao i da antimikrobna aktivnost čaja zavisi od načina dobijanja. Naime, antimikrobna aktivnost je veća kod nefermentisanog (zeleni) i polu-fermentisanog čaja (oolong) nego kod fermentisanog (crni).

Greenwalt I sar. (1998) su ispitali antimikrobnu aktivnost kombuhe od crnog i zelenog čaja (sa uobičajenom koncentracijom čaja za piće: 4,4 g/l čaja, I većim: 8,7, 17, 35 i 70 g/l) dobijene nakon 9 dana fermentacije (koncentracija sirćetne kiseline u napicima oko 7 g/l). Kao kontrolni uzorci pripremljeni su crni i zeleni čaj, kombuha neutralisana do Ph 7 i komercijalno sirće sa 5% kiseline. Antimikrobna aktivnost ispitana je prema sledećim test mikroorganizmima: *St. Aureus*, *E. Coli*, *Salmonella (Salm.) choleraesuis*, *B. Cereus*, *C. Albicans* i *Ag. tumefaciens*, koji su izabrani kao najčešći patogeni mikroorganizmi i uzročnici kvarenja hrane. Rezultati su pokazali da nefermentisani čaj ne pokazuje antimikrobnu aktivnost čak ni pri koncentraciji od 70 g/l na većinu mikroorganizama osim *St. Aureus* koji je minimalno inhibiran pri koncentraciji čaja 35 g/l i većoj. Kombuha napici od crnog i zelenog čaja su ispoljili antimikrobnu aktivnost prema svim test mikroorganizmima osim *C. Albicans* koju je inhibiralo jedino komercijalno sirće. Veći sadržaj katehina u zelenom čaju u odnosu na crni (Dufresne i Farnworth, 2000) nije uticao na antimikrobnu aktivnost koja je za oba napitka bila gotovo identična.

Sreeramulu i sar. (2000) su ispitali antimikrobnu aktivnost kombuhe pripremljene od crnog čaja (koncentracije čaja 5 g/l), nakon 14 dana fermentacije (koncentracija sirćetne kiseline 8,5 g/l) prema brojnim patogenim mikroorganizmima. Kao kontrolni uzorci korišćeni su nefermentisani čaj i rastvor sirćetne kiseline iste koncentracije kao u kombuhi, neutralisana i termički tretirana kombuha (80°C, 30 minuta) da bi se utvrdilo da li su nosioci antimikrobne aktivnosti termostabilne supstance. Uzorci nefermentisanog čaja jedva da su pokazali bilo kakvo antimikrobno delovanje na test mikroorganizme izuzev *Campylobacter (Camp.) jejuni*. Sirćetna kiselina je inhibirala rast svih ispitanih bakterija, ali ne i kvasaca. Ova kiselina je pokazala gotovo isti inhibitorni efekat kao i kombuha na deset od četrnaest ispitanih sojeva bakterija (*Enterobacter (Ent.) cloaceae*, *Pseudomonas (P.) aeruginosa*, *B. Cereus*, *He. Pylori*, *Listeria (List.) monocytogenes*, *Aeromonas hydrophila*, *Yersinia enterocolitica*, *St. Epidermis*, *Camp. Jejuni* i *St. Aureus*). Prema preostala četiri test organizma (*E. Coli*, *Salm. Enteritidis*, *Salm. Typhimurium* i *Shigella (S.) sonnei*) kombuha je pokazala snažniji antimikrobni efekat od sirćetne kiseline, a aktivnost su ispoljile i neutralisana i termički tretirana kombuha, zbog čijeg delovanja se smatra da nosioci aktivnosti nisu supstance proteinske prirode. Kombuha je za razliku od sirćetne kiseline inhibirala rast *C. Albicans*.

Sreeramulu i sar. (2001) su ispitali antimikrobnu aktivnost kombuhe od crnog čaja (0,5%) nakon 14 dana fermentacije (8,5 g/l sirćetne i 5 g/l glukonske kiseline). Kombuha,

toplotno denaturisana i neutralisana kombuha su pokazale izrazitu antimikrobnu aktivnost prema *E. Coli*, *S. Sonneri*, *Salm. Typhimurium* i *Salm. Enteritidis*. S obzirom da Sreeramulu i sar. (2000) navode da sirćetna kiselina nije jedini nosilac antimikrobne aktivnosti, u ovom istraživanju autori su ispitali sinergističko delovanje organskih kiselina (glukonske i sirćetne) istih koncentracija kao u kombuhi, pre i nakon neutralisanja. Sirćetna kiselina pre neutralisanja delovala je samo prema *Salm. Enteritidis*, dok glukonska nije pokazala delovanje ni pre ni nakon neutralisanja. Nasuprot tome, smeša ovih kiselina pri Ph 3,71 inhibirala je rast *E. Coli*, *Salm. Typhimurium* i *Salm. Enteritidis*, kao rezultat sinergističkog efekta, dok neutralisana smeša nije pokazala antimikrobnu aktivnost.

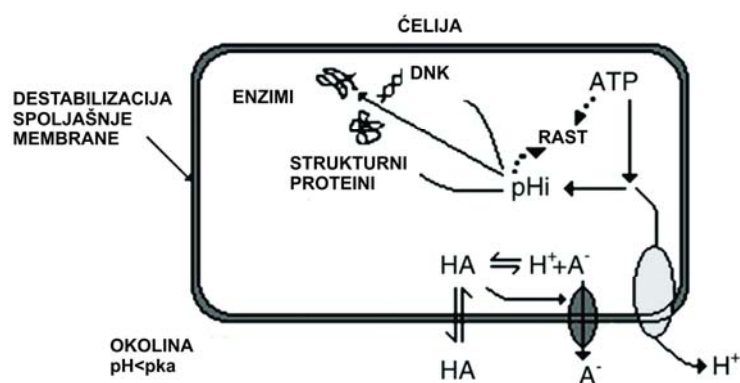
Battikh i sar. (2012) su ispitali antimikrobnu aktivnost kombuha analoga dobijenih od zaslađenih čajeva (količina čaja 10 g/l): *Thymus vulgaris* L. (timijan), *Lippia citriodora* (citronovac, četrina), *Rosmarinus officinalis* (ružmarin), *Foeniculum vulgare* (komorač) i *Mentha piperita* (menta) i poredili je sa aktivnošću tradicionalnog napitka. Fermentacija je trajala 21 dan, a dobijeni napici dostigli su Ph od 2,4-3,1. Kao kontrolni uzorci korišćeni su: neutralisana kombuha, termički tretirana kombuha (na 120°C, 20 minuta), nefermentisani čaj i nefermentisan čaj zakišljen sirćetnom kiselinom do Ph 2,6. Test mikroorganizmi bili su referentni sojevi: *St. Aureus*, *St. Epidermidis*, *Mi. Luteus*, *E. Coli*, *Salm. Typhimurium*, *P. Aeruginosa* i *List. Monocytogenes* i 7 kliničkih izolata roda *Candida*: *C. Albicans*, *C. Krusei*, *C. Tropicalis*, *C. Parapsilosis*, *C. Glabrata*, *C. Dublinensis* i *C. Sake*. Kombuha napici od crnog čaja, četrine i mente pokazali su antimikrobnu aktivnost prema svim ispitanim bakterijama, dok kombuha od ružmarina nije delovala na *Salm. Typhimurium*, a kombuha od komorača na *St. Aureus* i *E. Coli*. Najslabiju antibakterijsku aktivnost pokazala je kombuha od timijana koja, kao i njoj odgovarajući kontrolni uzorci, nije imala nikakvo delovanje. Prema većini bakterija, kombuha od alternativnih podloga pokazala je veću aktivnost u odnosu na tradicionalnu kombuhu. Najveću aktivnost ima kombuha od četrine, a zatim od mente. Kod neutralisane i toplotno denaturisane kombuhe aktivnosti ili nema ili je redukovana, dok se za toplotno denaturisanu negde i povećala. Povećanje aktivnosti kod toplotno denaturisane kombuhe pripisuje se preraspodeli (epimerizaciji) katehina iz čaja pri povišenoj temperaturi, što su za zeleni čaj dokazali Kim i sar. (2007). Nefermentisani čaj pokazao je antimikrobnu aktivnost samo u slučaju četrine prema *P. Aeruginosa*. Tradicionalna kombuha pokazala je antifungalnu aktivnost prema četiri vrste *Candida*. Kombuha od ružmarina i timijana nije pokazala antifungalnu aktivnost, a ostali napici imali su veću aktivnost u odnosu na tradicionalni napitak. Antifungalno delovanje kombuha napitaka dobijeno u ovom istraživanju, za razliku od većine drugih istraživanja u kojima ono izostaje, objašnjava se produženom fermentacijom, tj. Većim sadržajem kiselina u napicima.

Janković (1995) i Stojanović i Janković (1996) navode da uslovi kultivacije kao npr. veličina dodirne površine sa vazduhom, aeracija i mešanje utiču na metabolizam mikroroganizama, a samim tim i na antimikrobnu aktivnost. Smanjenje dodirne površine fermentacione tečnosti i vazduha doprinosi smanjenju antimikrobne aktivnosti napitka kao posledica sinteze manjih količina antimikrobnih supstanci. Isti efekat na antimikrobnu aktivnost čajne gljive imaju pojačana aeracija i mešanje, što potvrđuje mišljenja da je za antimikrobnu aktivnost čajne gljive od značaja i stvaranje celulozne pelikule. Od značaja za antimikrobnu aktivnost kombuhe je i ugljeni hidrat upotrebljen u podlozi za kultivaciju. Tako se kombuha snažnijeg antimikrobnog dejstva dobija na podlogama sa saharozom i glukozom u koncentraciji 5-10%, u odnosu na sredine sa istim sadržajem fruktoze.

Glavni nosioci antimikrobne aktivnosti u kombuhi su organske kiseline, pre svih sirćetna (Steinkraus i sar., 1996; Greenwalt i sar., 1998; Sreeramulu i sar., 2000). Međutim, antimikrobna aktivnost ne može biti rezultat delovanja samo jedne komponente, već je to sinergistički efekat više različitih komponenata: organskih kiselina, komponenata iz čaja,

drugih metabolita čajne gljive, a zavisi i od Ph vrednosti (Sreeramulu i sar., 2001; Battikh i sar., 2012).

Mehanizmi delovanja antimikrobne aktivnosti organskih kiselina dobro su poznati. U vodenim rastvorima slabe kiseline formiraju dinamičku ravnotežu između nedisosovanog molekula i jona. Konzervirajuće delovanje slabih kiselina objašnjava se time da nedisosovani deo molekula kiseline, za razliku od anjona koji nemaju afinitet prema lipidima, prodire u ćeliju difuzijom kroz ćelijsku membranu. Postoji težnja da se izjednače osmotski pritisci, jer je u većini slučajeva Ph u ćeliji veći od Ph u okruženju (nekoj hrani, u ovom slučaju kombuhi). Molekul kiseline u ćelijskoj citoplazmi, koja je približno neutralnog Ph, disocijacijom oslobađa protone (H^+ jone), što izaziva acidifikaciju citoplazme, oštećuje enzime, strukturne proteine i DNK, i time dovodi do smrti ćelije. Antimikrobna aktivnost organskih kiselina povećava se ukoliko je Ph vrednost sredine u kojoj se nalazi niža, jer je tada i veća koncentracija nedisosovane kiseline, smanjuje se polarost molekula i raste difuzija molekula kroz membranu u citoplazmu. Drugi mogući mehanizam je nakupljanje anjona kiseline u citoplazmi do koncentracija toksičnih za ćeliju i sprečavanje re-alkalinizacije ćelije (Slika 9) (Mani-López I sar., 2011).



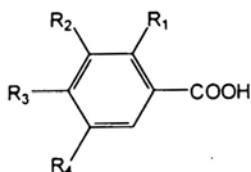
Slika 9. Mehanizam delovanja organskih kiselina (Mani-López I sar., 2011)

Iako je antibakterijska aktivnost kombuhe mnogo izraženija od antifungalne aktivnosti, u nekoliko istraživanja dokazano je delovanje prema kvascima i plesnima, što se takođe pripisuje sirćetnoj kiselini. Naime, u istraživanju delovanja sirćetne kiseline na *Zygosaccharomyces rouxii*, dokazano je da sirćetna kiselina (dodata u fosfatni pufer za resuspendovanje ćelija u koncentraciji 0,1-0,5% (w/v)) značajno smanjuje respiratornu aktivnost ćelije u poređenju sa kontrolnim uzorkom (bez dodatka sirćetne kiseline). Osim toga, prisustvo sirćetne kiseline u podlozi (0,5% (w/v)) značajno smanjuje i rast ćelija. Međutim, inhibitorni efekat nije funkcija samo dodatka sirćetne kiseline, već se radi o združenom delovanju više faktora, zbog čega ne čudi rezistentnost kvasaca prema kombuhi. Naime, na efekat smanjenja respiracije uticali su i prisustvo povećane koncentracije glukoze i NaCl u puferu, a na smanjenje rasta ćelija rastuće koncentracije NaCl u podlozi (Kusumegi i sar., 1998). Slično, León Peláez i sar. (2012) su dokazali antifungalnu aktivnost sirćetne i mlečne kiseline na toksikogene i netoksikogene sojeve plesni *Aspergillus flavus*, pri čemu je minimalna inhibitorna koncentracija najniža u slučaju smeše ovih kiselina u poređenju sa delovanjem pojedinačnih kiselina, što opet govori o sinergističkom efektu.

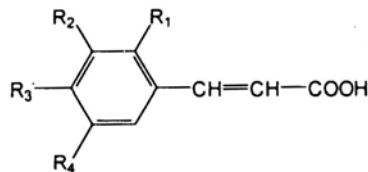
2.4.2. Antioksidativno delovanje kombuhe

Patološka stanja organizma (kao npr. starenje, kancerogeneza, kardiovaskularna, neurološka oboljenja, dijabetes, neplodnost itd.) povezana su sa načinom ishrane, sastojcima hrane i životnim navikama, a uzrokuju ih nekontrolisana produkcija slobodnih radikala u humanom organizmu i toksični oblici kiseonika (reaktivne kiseonične vrste) koji izazivaju oštećenja i inaktivaciju biomolekula: lipida, proteina, DNK, ugljenih hidrata (Chance i sar., 1979). Toksični oblici kiseonika spadaju u 2-5% molekulskog kiseonika koji nije u potpunosti redukovan u respiratornom lancu ili transformisan enzimskim reakcijama u ćelijama. U normalnim uslovima, nastajanje toksičnih oblika kiseonika je u ravnoteži sa odbrambenim sistemom organizma, a debalans ove ravnoteže naziva se oksidativni stres. Reaktivne kiseonične vrste značajne za oksidativni stres su: superoksid anjon radikal ($O_2^{\bullet-}$), perhidroksil radikal (HOO^{\bullet}), vodonik peroksid (H_2O_2), hidroksil radikal ($^{\bullet}OH$), alkoksil radikal (RO^{\bullet}) i peroksil radikal (ROO^{\bullet}). Slobodni radikali ubrajaju se u najreaktivnije hemijske vrste, a uzrok njihove visoke i neselektivne reaktivnosti jesu nespareni elektroni koji mogu da se nalaze na C-atomu, kao kod alkil radikala ($^{\bullet}CH_3$, $CH_3CH_2^{\bullet}$), na O-atomu, kao kod alkoksil, hidroksil, peroksil i superoksid anjon radikala (RO^{\bullet} , $^{\bullet}OH$, ROO^{\bullet} , $O_2^{\bullet-}$), na N-atomu, kao kod azotmonoksidnog radikala (NO^{\bullet}) ili na S-atomu, kao kod tiil radikala ($n-C_6H_9S^{\bullet}$) i dr. Nespareni elektron mogu imati i atom vodonika (H^{\bullet}) i halogena (npr. Cl^{\bullet}), alkalnih metala (Na^{\bullet}) ili nekih jona metala (Cu^{2+} , Fe^{3+}) (Piletić i sar., 1992).

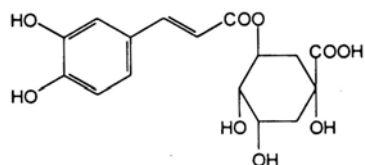
Odbrana ljudskog organizma od oštećenja koja izazivaju slobodni radikali je putem intracelularnih enzima koji su sposobni da neutrališu reaktivne kiseonične vrste. Primarna reakcija u tom smislu je dismutacija superoksid anjon radikala u vodonik peroksid i kiseonik, enzimom superoksid dismutazom, koju prati i uklanjanje vodonik peroksida u prisustvu glutation peroksidaze (Čanadanović-Brunet, 1997). Pored endogenih enzimskih sistema koji nisu u potpunosti efikasni u prevenciji oksidativnih oštećenja, kao „hvatači“ slobodnih radikala deluju i različiti antioksidanti koji su najvažniji faktori stabilizacije oksidativnih procesa. U prehrambenoj i kozmetičkoj industriji u velikoj meri se koriste sintetički antioksidanti zbog visoke efikasnosti i stabilnosti i niske cene. Međutim, njihova upotreba u prehrambenoj industriji je limitirana zbog sumnje da pokazuju toksikološke efekte, tj. deluju kao promotori u kancerogenezi. Zbog toga, u poslednje vreme postoji tendencija zamene sintetičkih antioksidanata prirodnim, koji se izoluju iz biljaka, mikroorganizama, gljiva i životinjskog tkiva (Tsuda i sar., 1994; Tumbas, 2005). Najpoznatiji biljni antioksidanti su sekundarni metaboliti biljaka poput fenolnih jedinjenja. Oni se koriste od davnina kao lekovi, fine hemikalije, konzervansi, pigmenti, arome, a mogu delovati kao mišićni relaksansi, analgetici, opijati i kao „hvatači“ reaktivnih kiseoničnih radikala, čime učestvuju u prevenciji mutagenih i kancerogenih pojava (Tumbas, 2005). Dve najznačajnije grupe fenolnih jedinjenja su fenolne kiseline i flavonoidi (Robards i sar., 2000). Fenolne kiseline obuhvataju hidroksi i druge funkcionalne derivate benzoeve i cimetine kiseline (Slika 10).



$R_1=R_2=R_4=H$, $R_3=OH$ p-Hidroksibenzoeva kiselina
 $R_1=R_4=H$, $R_2=R_3=OH$ Protokatehinska kiselina
 $R_1=R_4=H$, $R_2=OCH_3$, $R_3=OH$ Vanilinska kiselina
 $R_1=H$, $R_2=R_3=R_4=OH$ Galna kiselina
 $R_1=R_4=OH$, $R_2=R_3=H$ Gentisinska kiselina



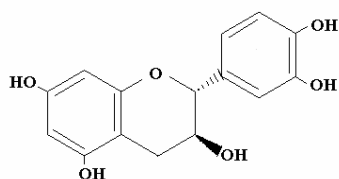
$R_1=R_2=R_4=H$, $R_3=OH$ p-Kumarinska kiselina
 $R_1=R_4=H$, $R_2=R_3=OH$ Kafena kiselina
 $R_1=R_4=H$, $R_2=OCH_3$, $R_3=OH$ Ferulna kiselina



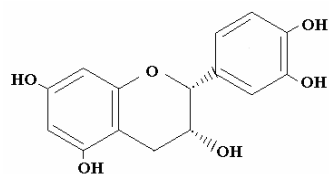
Hlorogenska kiselina (kafeoilhinat)

Slika 10. Strukturne formule fenolnih kiselina

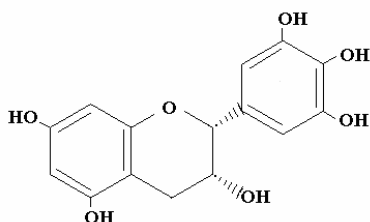
U flavonoide spadaju: flavoni, flavonoli, flavonol glikozidi, flavanoli, flavanoni, flavanon glikozidi, antocijanini, flavanoli ili katehini i halkoni (Slika 11).



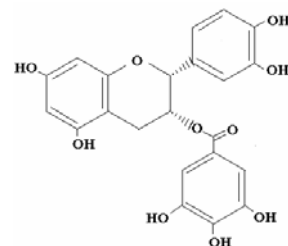
Katechin



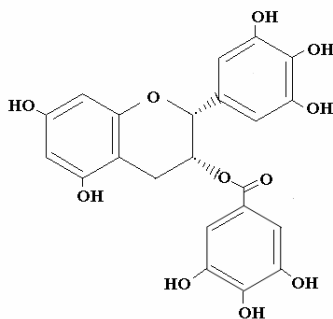
Epikatechin



Epigalokatehin



Epikatehin galat



Epigalokatehin galat

Slika 11. Strukturne formule nekih katehina

Antioksidativna aktivnost čaja. Čaj tj. Vodeni ekstrakt listova biljke *Camellia sinensis* L. je poreklom iz Kine, gde se gaji i konzumira već nekoliko hiljada godina, odakle je prvo prenet u Japan i Indiju a u XVII veku u Evropu i Rusiju. U Americi se čaj konzumira od 1650. godine (Gonzales de Mejia i sar., 2009; Sharangi, 2009).

U zavisnosti od načina pripreme, postoji nekoliko proizvoda koji se dobijaju od biljke *Camellia sinensis* L.: crni (fermentisan), zeleni (nefermentisan), oolong (semifermentisan), beli (nefermentisan ili semifermentisan) i pu-erch (crveni) čaj (Gonzales de Mejia i sar., 2009).

Crni čaj se dobija sušenjem listova biljke *Camellia sinensis* L. na vazduhu. Nakon toga listovi se uvijaju specijalnim mašinama prilikom čega se otpuštaju enzimi (polifenoloksidaze) i sokovi (ćelijski sadržaj određenih tkiva) iz lišća koji su zaslužni za specijalnu aromu i ukus čaja. Listovi se potom fermentišu delovanjem prirodne mikroflore u posebnoj prostoriji pri kontrolisanoj temperaturi i vlazi i na kraju suše u pećima. Procesom sušenja se fermentisani sokovi bogati aromom sasuse na površini listića čaja i daju mu crvenkastu ili braon boju. Zeleni čaj dobija se sušenjem i tretiranjem listova biljke parom, pri čemu ne dolazi do oksidacije fenolnih jedinjenja (para inhibira aktivnost enzima), zbog čega zeleni čaj sadrži visoke koncentracije monomernih fenolnih jedinjenja iz grupe katehina i zadržava prirodnu zelenu boju. Za proizvodnju oolong čaja često se koriste stariji listovi koji sadrže manje tanina i kofeina. Listovi se delimično fermentišu pre sušenja (fermentacija se prekida tokom procesa). Beli čaj je vrlo redak i prevashodno se koristi samo u nekim područjima Kine. Za njega se biraju samo najfiniji, najmlađi listići i pupoljci pre otvaranja. Napitak je blago zelenkaste boje, skoro bezbojan i osvežavajućeg ukusa, a dobija se tretiranjem parom i sušenjem listića i pupoljaka. Sadrži najviše antioksidanata i najmanje kofeina od svih ostalih vrsta. Pu-erh čaj dobija se od listova koji se mogu brati u bilo kom periodu tokom godine, a postupak dobijanja sličan je kao za crni čaj (Cabrera i sar., 2003; Gonzales de Mejia i sar., 2009; Sharangi, 2009).

Sveži listovi *Camellia sinensis* L. računato na suhu masu sadrže: 36% fenolnih jedinjenja, 25% ugljenih hidrata, 15% proteina, 6,5% lignina, 5% pepela, 4% amino kiselina, 2% lipida, 1,5% organskih kiselina, 0,5% hlorofila i karotenoida i manje od 0,1% isparljivih supstanci (Łuczaj i Skrzydlewska, 2005). Najzastupljenija fenolna jedinjenja u čaju su katehini, i to: epigalokatehin galat (EGCG), epigalokatehin (EGC), epikatehin galat (ECG) i epikatehin (EC). U manjim količinama zastupljeni su i ostali katehini: galokatehin, epigalokatehin digalat, 3-metilepikatehin galat, katehin galat i galokatehin galat (Yang i sar., 2007; Gonzales i sar., 2009; Sharangi, 2009).

Fermentacijom se smanjuje sadržaj fenolnih jedinjenja u čaju, a povećava sadržaj kofeina. Poredak čajeva prema sadržaju katehina je sledeći: crni>oolong>zeleni>sveži listovi čaja, a za sadržaj epigalokatehin galata i ukupnih katehina: zeleni>oolong>sveži listovi čaja>crni (Sharangi, 2009).

Tokom proizvodnje crnog čaja, zbog intenzivne enzimske oksidacije, dolazi do transformacije katehina. Tako hinoni iz katehina ili njihovih galata mogu da reaguju sa hinonima iz galokatehina ili njihovih galata i formiraju dimere, tj. Teaflavine: teaflavin (TF₁), teaflavin-3-galat (TF_{2A}), teaflavin-3'-galat (TF_{2B}) i teaflavin-3,3'-digalat (TF₃) i polimere tearubigine. Teaflavini i tearubigini su odgovorni za opor ukus čaja i njegovu tamnu boju. U reakciji hinona galne kiseline i katehina može nastati i teaflavna kiselina čiji je sadržaj u crnom čaju veoma mali, a podleže i daljoj transformaciji u oksidacionom procesu (Gonzales i sar., 2009).

Od fenolnih kiselina crni čaj sadrži: kafenu, galnu, hininsku i kumarnu kiselinu. Crni čaj sadrži još i flavonole, od kojih je najviše miricetina (0,24-0,52 g/kg), kvercetina (1,04-3,03 g/kg), kempferola (1,72-2,31 g/kg) i rutina, i njihove glikozide, kao i metilksantine, uglavnom u formi kofeina. Jedini flavon u čaju je apigenin koji se nalazi u vrlo maloj koncentraciji (Łuczaj i Skrzydlewska, 2005).

Zdravstveni efekti čaja pripisuju se antioksidativnoj aktivnosti za koju su odgovorna fenolna jedinjenja, pre svih katehini (poredak antioksidativne aktivnost katehina: EGC~EGCG>ECG>EC>C), zatim teaflavini (TF₃>TF_{2B}> TF_{1B}>TF₁) i tearubigini.

Antioksidativna aktivnost zelenog čaja veća je nego crnog, zbog većeg sadržaja monomernih fenolnih jedinjenja. Ipak, katehini iz crnog čaja su jači antioksidanti od vitamina C i E, tokoferola, karotena i ksantofila. Katehini imaju 2,4-4,9 puta veću aktivnost, a teaflavini 2,9-6,2 puta od antioksidativne aktivnosti Troloxa (rastvorljivi oblik vitamina E). Njihova aktivnost ne ogleda se samo u mogućnosti „hvatanja“ slobodnih radikala (hidroksil, superoksid i lipidnih radikala: alkoksil, peroksid, alkil radikala), već i u povećanju aktivnosti nekih detoksikacionih enzima (glutation peroksidaze, glutation reduktaze, glutation-S-transferaze, katalaze itd.). Takođe, katehini sprečavaju nastanak slobodnih radikala inhibirajući aktivnosti enzima, npr. ksantin oksidaze, koji učestvuju u stvaranju slobodnih radikala. Antioksidativna aktivnost katehina ogleda se i u sposobnosti heliranja jona prelaznih metala (Fe i Cu) koji katalizuju reakcije slobodnih radikala (Wiseman i sar., 1997; Łuczaj i Skrzydlewska, 2005; Sharangi, 2009). *In vivo* istraživanja su pokazala da se teaflavini i tearubigini iz crnog i zelenog čaja brzo apsorbuju u organizmu i doprinose povećanju antioksidativnog potencijala. Takođe oni inhibiraju procese lipidne peroksidacije i štite fosfolipidne membrane od oksidacije (Łuczaj i Skrzydlewska, 2005).

Osim fenolnih jedinjenja značajne antioksidativne komponente u čaju su i polisaharidi ekstrahovani iz listova čaja (Xiao i sar., 2011). Utvrđeno je da se ovi polisaharidi sastoje iz ramnoze, arabinoze, galaktoze, glukoze, ksiloze, manoze i galakturonske kiseline, dok fruktoza i glukuronska kiselina nisu detektovane. U odnosu na vitamin C, aktivnost polisaharida prema DPPH radikalima bila je znatno niža u opsegu koncentracija ekstrakata 25-200 µg/ml, da bi se njihove aktivnosti u opsegu koncentracija 200-400 µg/ml gotovo izjednačile (iznose više od 90%). Sposobnost neutralisanja hidroksil radikala je takođe koncentracijski zavisna, ali je aktivnost manja nego prema DPPH radikalima, a opseg primenjenih koncentracija ekstrakata je 0,75-2,5 mg/ml. Aktivnost ekstrakata polisaharida prema hidroksil radikalima je slabija (maksimalna aktivnost 65%) u odnosu na vitamin C (maksimalna aktivnost 75%). Polisaharidi su pokazali sličnu antioksidativnu aktivnost prema superoksid anjon radikalima kao i galna kiselina (Xiao i sar., 2011).

Katehini zelenog čaja su veoma nestabilni u alkalnim rastvorima u kojima se razgrađuju za nekoliko minuta, dok su u kiselim rastvorima mnogo stabilniji. Oni pokazuju dobru stabilnost i u ključaloj vodi (pri $\text{pH} = 4,9$) tokom 7 sati, jer im se sadržaj smanjuje za svega 15% (Zhu i sar., 1997). Su i saradnici (2003) su utvrdili da stabilnost EGCG i EGC mnogo više zavisi od vrednosti pH rastvora, nego što je to slučaj sa EC i ECG, ali i da su katehini mnogo stabilniji od teaflavina. Zagrevanjem na 100°C degradira se 25% katehina, dok se teaflavini potpuno degradiraju. Stabilnost i katehina i teaflavina je veća pri nižim pH vrednostima. Ispitana je i njihova stabilnost u čajnim napicima nakon dodatka saharoze, limunske i askorbinske kiseline (Su i sar., 2003). Saharoza ne utiče na njihovu stabilnost, dok dodatak ovih kiselina destabilizuje i katehine i teaflavine u značajnoj meri. Tokom skladištenja komercijalnih čajnih napitaka dolazi do degradacije katehina od najmanje 50% tokom prvih mesec dana. Degradacijom katehina, verovatno dolazi do njihove konverzije u ogovarajuće epimere za koje se ne zna da li imaju biološke funkcije kao njihovi prekursori (Su i sar., 2003). Kim i sar. (2007) dokazali su epimerizaciju katehina (EGCG, EGC, EC, ECG) prilikom izlaganja termičkim tretmanima i utvrdili da dolazi do njihove preraspodele, jer se sadržaj nekih katehina smanjuje, a nekih povećava, dok je ukupan sadržaj skoro nepromenjen.

Kombuha kao antioksidant. Mnogi terapijski efekti kombuhe, kao što su olakšavanje tegoba kod inflamatornih procesa i artritisa, prevencija kancera i jačanje imunološkog sistema, dovode se u vezu sa njenom antioksidativnom aktivnošću (Allen, 1998). Proučavanje antioksidativnog delovanja kombuhe, kao i potencijalnih mehanizama delovanja aktuelno je u poslednjih desetak godina. Istraživanja su usmerena na komparaciju aktivnosti napitka u odnosu na sam čaj. Tako su Chu i Chen (2006) spektrofotometrijski

određivali antioksidativnu aktivnost kombuhe od crnog čaja prema stabilnim DPPH radikalima u 8 uzoraka kombuhe prikupljenih iz tajvanskih domaćinstava. Za 4 uzorka aktivnost je rasla tokom 15-odnevne fermentacije i dostigla 1,7 puta veću vrednost (oko 65%) nego kontrolni uzorak (dekokt crnog čaja). Za ostale uzorke u prvih šest dana procesa efekat „hvatanja“ slobodnih radikala se smanjuje, a potom raste do kraja procesa. Važno je da, bez obzira na delovanje tokom kombuha fermentacije, gotov napitak kod svih uzoraka ima veću aktivnost od samog čaja. Tokom istog istraživanja kombuha je pokazala veću sposobnost inhibicije peroksidacije linoleinske kiseline (90%) u odnosu na odgovarajući dekokt crnog čaja (65%). Istovremeno, sposobnost heliranja jona gvožđa u prva tri dana fermentacije naglo opada i zadržava se na 3-6% do kraja procesa, što je manje u odnosu na crni čaj (16%). Autori su zaključili da su za povećanu antioksidativnu aktivnost kombuhe u odnosu na crni čaj odgovorni metaboliti koji se stvaraju enzimskom transformacijom fenolnih jedinjenja tokom fermentacije.

Jayabalan i sar. (2008) su ispitali antioksidativnu aktivnost tokom 18-odnevne kombuha fermentacije na crnom i zelenom čaju. Efekat „hvatanja“ DPPH radikala određen spektrofotometrijski, ne pokazuje kontinuirani porast kao u istraživanju Chu i Chen (2006), ali porast u odnosu na start fermentacije iznosi 8% za napitak od zelenog čaja i 15% za napitak od crnog čaja. Na kraju procesa efekat „hvatanja“ DPPH radikala je oko 80% za kombuhu od crnog i oko 90% za kombuhu od zelenog čaja. Oba kombuha napitka imaju veću antioksidativnu aktivnost u odnosu na čajne napitke. U slučaju sposobnosti „hvatanja“ hidroksil radikala, ova korelacija ne postoji, i gotovi napici nakon 18 dana imaju manju antioksidativnu aktivnost od samih čajeva.

Yang i sar. (2009) su ispitali antioksidativnu aktivnost tradicionalne kombuhe (od crnog čaja) i kombuhe sa starter kulturom *Gluconobacter* sp. Nakon osmodnevnog procesa. Efekat „hvatanja“ slobodnih radikala, kao i efekat „hvatanja“ hidroksil radikala za kombuhu je oko 30%, što je bilo za oko 20% više u odnosu na sam crni čaj. Antioksidativni efekat kombuhe prema superoksid anjon radikalima takođe je veći (iznosi oko 50%) u odnosu na efekat crnog čaja (oko 20%). Antioksidativnu aktivnost kombuhe autori su pripisali fenolnim jedinjenjima, čiji je sadržaj u kombuhi veći za oko 20 mg/100 ml nego u samom čaju, a način inokulacije nije uticao na antioksidativni potencijal.

In vivo istraživanje antioksidativne aktivnosti kombuhe sprovedi su Dipti i sar. (2003) koji su izazivali oksidativni stres u organizmu pacova davanjem rastvora olovo acetata tokom 45 dana. Dodatak olovo acetata dovodi do povećanja lipidne peroksidacije, smanjenja nivoa redukovano glutathiona i antioksidativnih enzima: superoksid dismutaze i glutathion peroksidaze. Rezultati su pokazali da primenom kombuhe u ishrani ovih životinja dolazi do smanjenja lipidne peroksidacije i oštećenja DNK, uz istovremeno povećanje nivoa redukovano glutathiona. Autori smatraju da je kombuha potencijalni antioksidativni agens i da može da zaustavi imunosupresiju izazvanu dodatkom olova.

Bhattacharya i sar. (2011) su ispitali uticaj kombuhe na miševu u čijim je izolovanim hepatocitima (ćelijama jetre) izazivan oksidativni stres, tako što su ćelije tretirane organskim jedinjenjem: tercijarnim butil hidroperoksidom (TBHP). TBHP uzrokuje stvaranje reaktivnih kiseoničnih vrsta, oksidativni stres, smanjuje vijabilnost ćelija i uzrokuje smrt ćelija apoptozom. Dodatkom TBHP smanjuje se ćelijska vijabilnost za 50%, dok je vijabilnost ćelija istovremeno tretiranih i sa kombuhom (60µg u trajanju od 2h) oko 90%. Produkcija reaktivnih kiseoničnih vrsta u ćelijama tretiranim sa TBHP se udvostručuje, dok je kod onih istovremeno tretiranih kombuhom samo nešto veća nego kod netretiranih ćelija. Kombuha je uticala i na povećanje sadržaja glutathiona u ćelijama tretiranim sa TBHP. Zaključeno je da kombuha u kombinaciji sa toksičnim TBHP održava antioksidativni status približno kao u netretiranim ćelijama, a kao detoksikacioni i hepatoprotektivni agens navodi se D-saharolakton (Bhattacharya i sar., 2011).

Iz navedenih istraživanja se vidi, da bez obzira na poreklo čajne gljive, antioksidativna aktivnost kombuhe zavisi od produkata metabolizma i sastojaka čaja koji se tokom fermentacije biotransformišu, pa im se i aktivnost shodno tome može menjati. U obzir treba uzeti i primenjenu metodu za ispitivanje antioksidativne aktivnosti, koja zavisi od primenjenih uslova rada, supstrata i produkata, pa dobijeni rezultati mogu da se razlikuju. Da bi se ove razlike umanjile, preporučuje se izvođenje više od jedne metode, kao i ispitivanje specifičnih supstrata i produkata, odnosno, standardnih antioksidativnih supstanci (Franker, 1993).

2.4.3. Antikancerogeno delovanje kombuhe

Smatra se da jedna trećina kancera kod ljudi nastaje zbog loših navika u ishrani, te da su pravilna ishrana i promena načina života glavna strategija u borbi protiv ovih bolesti. Koncept hemoprevencije podrazumeva korišćenje prirodnih ili sintetičkih antikancerogenih (hemopreventivnih) agenasa koji treba da su pogodni za ljudsku upotrebu, da nisu toksični, da imaju minimalne negativne efekte, visoku efikasnost, poznat mehanizam delovanja, da su ekonomski isplativi i da se mogu jednostavno primenjivati oralnim putem (Gonzales i sar., 2009).

Brojna *in vitro* i *in vivo* istraživanja potvrđuju antikancerogeno delovanje čaja i njegovih komponenti u različitim fazama razvoja malignih ćelija, čemu doprinose oštećenja ćelijskih konstituenata izazvana reaktivnim kiseoničnim vrstama. U slučaju kada reaktivne kiseonične vrste reaguju sa DNK dolazi do razvoja kancerogenih ćelija i kancerogeneze koju čini nekoliko faza: inicijacija, razvoj i progresija. Kancer takođe može nastati i narušavanjem imunološkog stanja organizma delovanjem prostaglandina što je praćeno konstantnim inflamatornim procesima, a inicirano takođe reaktivnim kiseoničnim vrstama (Dufresne i Farnworth, 2000).

Poznato je da čaj, zbog fenolnih komponentata ima antimitagena i antiinflamatorna dejstva i da deluje kao antikancerogeni agens smanjujući oštećenja izazvana reaktivnim kiseoničnim vrstama, odnosno, eliminacijom slobodnih radikala. Katehini iz čaja deluju tako što: štite ćelijske membrane od oksidacije, ograničavaju delovanje reaktivnih kiseoničnih vrsta i verovatno blokiraju receptore na ćelijskoj membrani koji su odgovorni za rast kancerogenih ćelija. Takođe, polifenoli crnog i zelenog čaja sprečavaju prelazak benignih u maligne tumore, što je izazvano slobodnim radikalima, štite veze u molekulu DNK od raskidanja izazvanih γ zracima koji utiču na pojavu mutacija i kancerogeneze (Dufresne i Farnworth, 2000).

Brojne studije na životinjama su pokazale da čaj deluje antiproliferativno prema ćelijama tumora pluća miševa, da izaziva apoptozu malignih i ne-malignih tumora na koži miševa koji su nastali izlaganjem kože UVB zracima. Fenolna jedinjenja izolovana iz zelenog čaja deluju protektivno kod hemijski izazvane karcinogeneze kod miševa i to na plućima, jetri, jednjaku, pankreasu, debelom crevu, grudima, metabolima, želucu, bešici itd. (Ahmad i Mukhtar, 1999; Dufresne i Farnworth, 2000; Yang i sar., 2007). Dokazano je da je u crnom čaju kofein glavni hemopreventivni agens koji deluje na tumor pluća kod pacova (Gonzales i sar., 2009). To je i potvrđeno uporednim ispitivanjem crnog i zelenog čaja i istih napitaka bez kofeina koji su znatno manje redukovali progresiju kancera kože kod miševa izazvanog UVB zračenjem (Gonzales i sar., 2009). Crni i zeleni čaj, kao i njihovi konstituenti (EGCG i teaflavini) pokazali su značajno smanjenje izazivača tumora pluća u inicijalnoj i razvojnoj fazi (Yang i sar., 2007).

Nekoliko studija na ljudima su potvrdile pozitivne efekte prilikom konzumiranja čaja kod ljudi obolelih od različitih oblika karcinoma. Studije sprovedene na pacijentkinjama koje boluju od karcinoma dojke pokazale su da se konzumiranjem više od 5 šoljica zelenog čaja

dnevno smanjuje ponovna pojava bolesti (16,7%) i produžava period bez oboljenja (3,6 godina), za razliku od onih koji su konzumirali manje od 4 šoljice dnevno. Ponovna pojava istog kancera ređe se javlja i uzimanjem 1850 mg ekstrakta zelenog čaja tokom 6 meseci. Smatra se da katehini iz zelenog čaja povećavaju efikasnost lečenja hemoterapijom. Utvrđeno je i da redovno konzumiranje zelenog čaja (tri šoljice dnevno) smanjuje rizik od kancera prostate, kao i da visok unos crnog i zelenog čaja može da smanji rizik od kancera pluća kod pušača. Yokoyama i sar. (2008) su pokazali da EGCG preventivno deluje na genezu kancera grlića materice i to mehanizmom indukcije apoptoze i inhibicije aktivnosti enzima metabolite, ali i da efikasnost EGCG opada sa progresijom karcinogeneze. Autori su dokazali da pojedinačni polifenoli iz čaja (EGCG i retinolska kiselina) imaju slabiji efekat na adenokarcinom cerviksa nego pri zajedničkom delovanju. Pokazano je i da EGCG poseduje i antikancerogeno delovanje kod adenokarcinoma, uključujući kancer stomaka, debelog creva i grudi (Yokoyama i sar., 2008). Ahmad i Mukhtar (1999) ukazuju da redovnim konzumiranjem zelenog čaja dolazi do nakupljanja EGCG u različitim organima, te da on ima zaštitnu ulogu od kancera u brojnim organima.

Gonzales i sar. (2009) navode da do sada izvedene studije na ljudima pružaju nedovoljno dokaza za izvođenje zaključaka koji bi doveli u vezu konzumiranje zelenog čaja i prevenciju kancera. Takođe, na vrstu i koncentraciju polifenola u čaju utiče i vrsta čaja, način pripreme (trajanje ekstrakcije, temperatura vode), a njegovo delovanje povezano je i sa starošću, navikama u ishrani, pušenjem, socioekonomskim statusom bolesnika, te da su za bilo kakve zaključke neophodne dobro osmišljene opsežne epidemiološke studije koje bi sve ove faktore uzele u obzir. Istraživanja na ovom polju i dalje su aktuelna, a posebno se odnose na mehanizme delovanja (Gonzales i sar., 2009).

Razumevanje mehanizma biološke aktivnosti čaja je od ključne važnosti u prevenciji kancera. U tom smislu veruje se da polifenoli zelenog čaja deluju sledećim mehanizmima (Ahmad i Mukhtar, 1999):

- prevencijom mutagenosti i genotoksičnosti hemikalija,
- redukcijom biohemijskih markera koji iniciraju formiranje tumora,
- redukcijom biohemijskih markera koji utiču na razvoj tumora,
- regulacijom detoksikacionih enzima,
- uklanjanjem aktivnih kancerogenih metabolite i
- antioksidativnom aktivnošću.

Ispitivanja antikancerogenog delovanja kombuhe datiraju iz 60-tih godina prošlog veka, kada je na osnovu rezultata Centra za onkološka istraživanja iz Moskve i Ruske akademije nauka utvrđeno da dnevno konzumiranje kombuhe obezbeđuje visoku rezistenciju na kancer, što je posledica detoksikacije organizma i jačanja imunološkog sistema (Allen, 1998). Kao objašnjenje antikancerogenog dejstva, Roche (1998) navodi sposobnost kombuha napitka da koriguje vrednost Ph krvi i nadoknadi nedostatak mlečne kiseline. Kod pacijenata obolelih od kancera primećen je nedostatak L-mlečne kiseline u vezivnom tkivu i vrednost Ph krvi veća od 7,56 (Roche, 1998). Dalja ispitivanja su ukazala da je antikancerogeno delovanje kombuhe posledica stimulacije produkcije interferona, proteina koga stvaraju ćelije imunostistema, a koji deluju na viruse, parazite i kancerogene ćelije (Dufresne i Farnworth, 2000).

Četojević-Simin i sar. (2008) su ispitali antiproliferativnu aktivnost kombuhe od crnog i rtanjskog čaja na rast tri histološki različite ćelijske linije humanog kancera: HeLa (epitelni karcinom grlića materice), HT-29 (adeno-karcinom debelog creva) i MCF-7 (adenokarcinom dojke). Kombuha napici su pokazali najveći efekat inhibicije prema HeLa ćelijskoj liniji (oko 20%), dok je rast HT-29, odnosno MCF-7 ćelija smanjen za 15%, odnosno 10%. Nije bilo

značajne razlike u delovanju kombuhe od crnog i od rtanjskog čaja na iste ćelijske linije. U istraživanju antiproliferativne aktivnosti vodenog ekstrakta rtanjskog čaja, takođe je najosetljivija bila HeLa ćelijska linija (EC_{20} za vodeni ekstrakt je 400 $\mu\text{g/ml}$), u odnosu na kombuhu (EC_{20} je 250 $\mu\text{g/ml}$) (Četojević-Simin i sar., 2004). Ovo bi moglo da sugeriše na postojanje aktivnijih antiproliferativnih komponenti u kombuhi dobijenoj od rtanjskog čaja u poređenju sa samim čajnim napitkom.

Kada je u pitanju genotoksični, odnosno antigenotoksični potencijal kombuhe, pregledom literature se može uočiti da on nije u dovoljnoj meri istražen. U svega nekoliko naučnih radova, utvrđeno je da kombuha ne pokazuje genotoksičan efekat. Na različitim modelima *in vitro*, koji su prethodno oštećeni poznatim genotoksičnim agensima, kombuha deluje antigenotoksično. Tako su, Četojević Simin i sar. (2012) ispitali uticaj konzumne kombuhe od melise (titrabilne kiselosti 4,56 g/l) i čaja od melise (5 g/l) na učestalost hromozomskih aberacija na ćelijskoj liniji ovarijuma kineskog hrčka CHO-K1. Utvrđeno je da čaj i kombuha od melise indukuju smanjenje učestalosti hromozomskih aberacija u zavisnosti od koncentracije. To ukazuje na odsustvo genotoksičnosti čaja i kombuhe od melise. Isto tako, čaj od melise i kombuha od melise dovode do smanjenja učestalosti hromozomskih aberacija na CHO-K1 ćelijskoj liniji koja je prethodno oštećena poznatim citostatskim lekom mitomicinom C (MMC), što ukazuje na njihov antigenotoksičan potencijal pri koncentracijama 0,045-0,73 $\mu\text{g/ml}$ za čaj od melise i 0,295-4,75 $\mu\text{g/ml}$ za kombuhu. Antigenotoksičan efekat se može objasniti antioksidativnim potencijalom čaja i kombuhe koji se pripisuje fenolnim jedinjenjima i njihovom preraspodelom tokom fermentacije (Capecka i sar., 2003; Dastmalchi i sar., 2008; Chu i Chen, 2006).

Antigenotoksični efekat kombuha napitka uočen je i na modelu humanih limfocita prethodno oštećenih γ zračenjem (Cavusoglu i Guler, 2010). Naime, kod oštećenih limfocita koji su tretirani kombuhom od crnog čaja znatno se smanjuje broj i učestalost hromozomskih aberacija u odnosu na limfocite koji nisu tretirani kombuhom. Antigenotoksični potencijal kombuhe autori takođe povezuju sa njenim antioksidativnim svojstvima, čemu doprinose ne samo fenolna jedinjenja već i glukonska, glukuronska, mlečna kiselina, tanini itd. (Cavusoglu i Guler, 2010).

U daljim ispitivanjima *in vitro*, pokazano je da konzumni kombuha napitak od rtanjskog čaja, za razliku od kombuha napitka od crnog čaja, indukuje smanjenje učestalosti mikronukleusa na humanim limfocitima sa i bez MMC. Takođe, kombuha od crnog i rtanjskog čaja, na istom modelu uzrokuje povećanje učestalosti izmena sestrinskih hromatida, što implicira na mogućnost da ovi kombuha napici indukuju reparaciju oštećene DNK. Pretpostavlja se da fenolna jedinjenja, koja čine sastavni deo kombuha napitka, deluju prema sledećim mehanizmima: indukovanjem DNK reparacije, inhibicijom promotagenih aktivnosti, inaktivacijom ili detoksikacijom reaktivnih oblika mutagena kao i inhibicijom razvijanja, invazije i metastaze tumorskih ćelija. Različita sposobnost kombuhe od crnog i rtanjskog čaja da umanje oštećenje DNK može se pripisati upravo različitom sastavu fenolnih jedinjenja, koja u crnom čaju podležu oksidaciji, što je verovatno uzrok odsustva smanjenja učestalosti mikronukleusa (Mrđanović i sar., 2007).

Konačno je *in vivo* istraživanjima oralne primene kombuhe na eksperimentalnim životinjama potvrđeno da kombuha napitak aktivira antioksidativni sistem odbrane organizma, što dovodi do smanjenja oštećenja DNK, čime se kombuha napitak može deklarirati kao prirodni antioksidant (Dipti i sar., 2003; Yogesh i sar., 2003).

2.5. BAKTERIJE MLEČNE KISELINE KAO FUNKCIONALNI DODATAK KOMBUHI

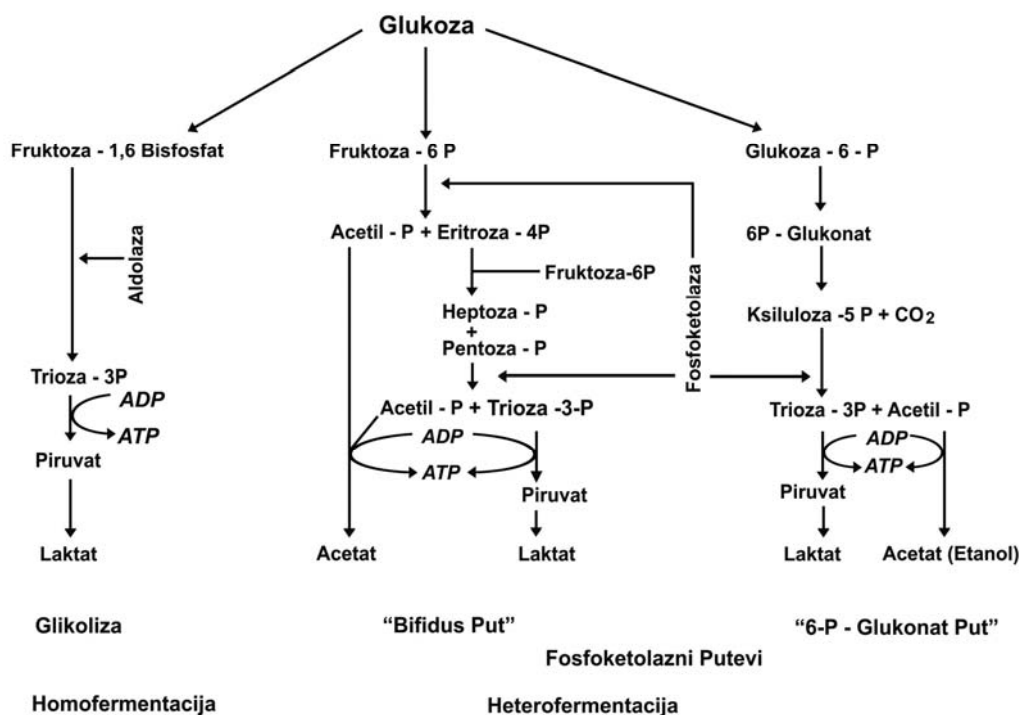
Bakterije mlečne kiseline su Gram-pozitivne, fakultativno anaerobne, katalaza negativne, nepokretne ili pokretne, asporogene bakterija koje se tradicionalno primenjuju za konzervisanje raznih fermentisanih prehrambenih proizvoda (De Vries i sar., 2006). Imaju velike zahteve za nutrijentima, kao što su: fermentabilni ugljeni hidrati, aminokiseline, vitamini (posebno B kompleks), nukleinske kiseline, minerali, kao i specifični nutrijenti za pojedine sojeve. Zato se BMK prirodno nalaze u kompleksnim organskim supstratima, kao što su biljni materijal (kelj, kukuruz, ječam itd.), mleko i mlečni proizvodi, vino i pivo. Normalna su mikroflora u ustima i intestinalnom traktu ljudi i životinja i retko su patogeni (Kandler i Weiss, 1986; Hofvendal i Hahn-Hägerdal, 2000). BMK su generalno mezofilne bakterije (optimalna T kreće se od 28°C do 35°C), ali one mogu da rastu i na temperaturama nižim od 5°C ili višim od 45°C. Imaju zajedničku osobinu da iz ugljenih hidrata produkuju mlečnu kiselinu, a ostali produkti su CO₂, sirćetna kiselina, propionska kiselina itd. Mlečna kiselina oslobođena tokom fermentacije snižava Ph sredine i time sprečava razviće nepoželjnih, patogenih mikroorganizama. Mlečna kiselina je prijatnog ukusa, povoljno utiče na lučenje želučanih sokova i odstranjivanje toksičnih materija iz organizma (Kandler, 1983; Kandler i Weiss, 1986; Panesar i sar., 2007).

Prvu kulturu BMK izolovao je J. Lister 1873. godine i nazvao je „*Bacterium lactis*“ (po današnjoj taksonomiji najverovatnije je to *Lactococcus lactis*). Najpre su ove bakterije prepoznate kao bakterije koje ukišeljavaju mleko, da bi se kasnije uočila njihova sličnost sa bakterijama izolovanim iz drugih izvora (Axelsson, 2004). Danas najzastupljeniji rodovi BMK sa tehnološkog stanovišta obuhvataju štapičaste bakterije *Lactobacillus* (*L.*) i *Bifidobacterium* (*Bi.*) i koki bakterije: *Streptococcus* (*S.*), *Enterococcus* (*En.*), *Pediococcus* (*Ped.*), *Leuconostoc* (*Ln.*), *Lactococcus* (*Lc.*), kao i manje zastupljene rodove: *Aerococcus* (*Ae.*), *Carnobacterium* (*Ca.*), *Oenococcus* (*Oe.*), *Tetragenococcus* (*Te.*), *Vagococcus* (*Va.*) i *Weissella* (*We.*). Klasifikacija BMK je zasnovana na njihovoj morfologiji, tipovima fermentacije glukoze, rastu na različitim temperaturama, odnosu dobijenih produkata, sposobnošću rasta pri visokoj koncentraciji soli i toleranciji na kiseline i baze. Najveća grupa BMK pripada rodu *Lactobacillus* koji obuhvata više od 125 različitih vrsta. *Lactobacillus* vrste koriste se kao starter kulture u industrijskoj proizvodnji i domaćinstvu za fermentaciju prehrambenih proizvoda jer doprinose konzervisanju, ukusu i teksturi fermentisanih proizvoda. Dok je osnovna funkcija BMK fermentaciona konverzija šećera iz različitih sirovina u mlečnu kiselinu, njihove druge, ne manje važne osobine su proizvodnja antimikrobnih peptida, egzopolisaharida i raznih drugih metabolita. Pored toga, *Lactobacillus* vrste se nalaze u crevima ljudi i životinja, a njihov broj može da varira u zavisnosti od životinjske vrste, starosti domaćina ili lokacije unutar creva. Međutim, samo nekoliko *Lactobacillus* vrsta koje su stanovnici digestivnog trakta koriste se i za industrijsku proizvodnju fermentisanih prehrambenih proizvoda, a to su: *L. crispatus*, *L. gasseri* i *L. plantarum* (Axelsson, 2004; De Vries i sar. 2006; Panesar i sar., 2007).

2.5.1. Mlečno-kiselinska fermentacija

Glavni metabolički put ugljenih hidrata u ćelijama BMK je njihova konverzija u mlečnu kiselinu. Fermentacija glukoze od strane BMK može biti homofermentativna ili heterofermentativna. Homofermentativne BMK razgrađuju glukozeu po Embden-Meyerhof-Parnas putu (glikoliza) preko brojnih međuprodukata do pirogroždane kiseline (Slika 12). Redukcijom pirogroždane kiseline (piruvata), delovanjem enzima laktat-dehidrogenaze, nastaje mlečna kiselina (laktat) koja je glavni proizvod njihovog metabolizma (najmanje 90%), a proizvode vrlo malu količinu ostalih međuprodukata: diacetila, acetoina, acetona, acetaldehida, etanola, kao i sirćetnu, buternu, propionsku, mravlju kiselinu i druge, koje utiču na svojstvenu aromu fermentisanih proizvoda. U homofermentaciji iz jednog molekula glukoze nastaju 2 molekula mlečne kiseline i 2 molekula ATP-a. Ovaj tip mlečno kisele fermentacije karakterističan je za rodove *Streptococcus*, *Pediococcus* i različite vrste iz roda *Lactobacillus*, označeni kao homofermentativni laktobacili (*L. acidophilus*, *L. helveticus*, *L. delbrueckii* subsp. *Delbrueckii*, *L. delbrueckii* subsp. *Lactis*, *L. delbrueckii* subsp. *Bulgaricus*). Ove vrste ne fermentišu pentoze ni glukonat (Kandler, 1983; Panesar i sar., 2007).

Fakultativnom heterofermentacijom BMK razgrađuju heksoze putem glikolize, a pentoze fosfoketolaznim putem do mlečne kiseline i drugih produkata (obično sirćetne i etanola). Obligatna heterolaktička fermentacija odvija se isključivo fosfoketolaznim putem a proizvodi metabolizma su manja količina mlečne kiseline (najmanje 50%) i značajan udeo ostalih proizvoda, kao što su sirćetna kiselina i/ili etanol uz stvaranje CO₂ (Slika 12). Taj put fermentacije karakterističan je za bakterije iz roda *Leuconostoc* i *Weissella* i neke vrste iz roda *Lactobacillus* (*L. brevis*, *L. buchneri*, *L. fermentum*, *L. kefir*, *L. reuteri*) (Kandler, 1983; Panesar i sar., 2007).



Slika 12. Šematski prikaz puteva fermentacije glukoze od strane BMK (Kandler, 1983)

Postoje dva tipa heterofermentacije (Slika 12). Jedna je inicirana oksidacijom glukoza-6-fosfata do glukonat-6-fosfata, koja se nastavlja dekarboksilacijom i cepanjem nastalog pentoza-5-fosfata (pomoću enzima fosfoketolaze) u C-2 i C-3 jedinjenja. Na taj način se iz heksoza stvaraju jednake količine CO₂, mlečne kiseline i acetata ili etanola. Količina acetata/etanola zavisi od oksidoredukcionog potencijala sistema. Ako je prisutan dodatni akceptor vodonika, npr. kiseonik, ili je dostupna i fruktoza, neće se stvarati etanol, ali će se kiseonik redukovati do H₂O₂ ili H₂O, a fruktoza će se redukovati do manitola (Kandler, 1983). Drugi tip heterofermentacije karakterističan je za bifidobakterije i počinje cepanjem fruktoza-6-fosfata fosfoketolazom na C-2 i C-4 polovine. Dok se C-2 polovina konvertuje u acetat, krajnji produkti konverzije C-4 polovine su acetat i laktat u odnosu 3:2 (Kandler, 1983).

Na osnovu navedenih mehanizama, homo- i heterofermentacija lako se mogu razlikovati po krajnjim produktima i tipičnim enzimima koji katalizuju reakcije. Međutim, rezultati nisu uvek predvidivi, naročito ukoliko se fermentišu kompleksni supstrati koji ne sadrže samo fermentabilne heksoze, nego i pentoze, organske kiseline, acetat i CO₂ u različitim odnosima. To je čest slučaj sa prirodnim supstratima, kao što su voćni sokovi, povrće i sl. Može se desiti da se piruvat redukuje ne samo do laktata, već i da se konvertuje u nekoliko drugih proizvoda putem alternativnih mehanizama u zavisnosti od uslova rasta i svojstva određenog mikroorganizma. Tako mogu da nastanu acetoin i diacetil (daju aromu putera) što se retko produkuje kada su heksoze jedini izvor C atoma, a u značajnim količinama kada su dostupne i neke organske kiseline, kao i kada je u supstratu nizak nivo šećera i niska Ph vrednost. Piruvat može biti konvertovan u acetat od strane *Lactobacillus casei* i *Leuconostoc* vrsta, što zavisi od primenjenog soja i koncentracije glukoze u supstratu (Kandler, 1983; Axelsson, 2004).

Bilo da se radi o homo- ili heterofermentaciji od strane BMK, glavni produkt metabolizma ugljenih hidrata je mlečna kiselina. Ovu kiselinu otkrila je švedska naučnica C.W. Scheele 1780. godine u kiselom mleku (Reddy i sar., 2008). Na produkciju mlečne kiseline utiče temperatura fermentacije, tako da su pogodni uslovi za fermentaciju a samim tim i produkciju mlečne kiseline za *L. delbrueckii* i *L. bulgaricus* temperatura od 45°C i više, za *L. helveticus* i *L. acidophilus* 37°C do 45°C, dok je za većinu BMK optimalna temperatura u rasponu od 28°C do 35°C. Na produkciju mlečne kiseline utiče i Ph vrednost. Optimalan Ph za brzu i kompletnu fermentaciju je 5,5-6, a u nekim slučajevima 6-6,5 što zavisi od upotrebljenog soja. Fermentacija je značajno inhibirana na Ph nižim od 4,5, ali i u neutralnim i startno alkalnim sredinama (Kandler i Weiss, 1986; Panesar i sar., 2007).

Postoje dva optička izomera mlečne kiseline: L(+) i D(-) oblik, koji su posledica stereospecifičnosti laktat dehidrogenaze prisutne u ćelijama. Ukoliko su u istoj ćeliji prisutne i L- i D- laktat dehidrogenaze nastaje racemska smeša DL(±) mlečne kiseline koja sadrži istu količinu L- i D- izomera mlečne kiseline (Kandler i Weiss, 1986). L(+) oblik mlečne kiseline je dominantan u ranoj fazi rasta, dok se D(-) oblik stvara u stacionarnoj fazi rasta (Axelsson, 2004). Tokom fermentacije šećera, neke vrste BMK produkuju isključivo L-mlečnu kiselinu, neke isključivo D-mlečnu kiselinu, neke približno jednake količine oba izomera ili dominantno jedan od njih i merljive količine drugog, što zavisi od prisustva specifične NAD⁺-zavisne laktat dehidrogenaze (Axelsson, 2004). D(-) mlečna kiselina ili DL(±) smeša uglavnom se unosi hranom, što dovodi do obogaćenja krvi D(-) mlečnom kiselinom i može dovesti do pojave većeg sadržaja kiselina u urinu. Ovaj oblik mlečne kiseline može se naći i u kancerogenim ćelijama i nekim bakterijama. L(+) mlečna kiselina pomaže cirkulaciju krvi, pospešuje peristaltiku creva, održava kiselo-baznu ravnotežu, stimuliše sekreciju želudačnih sokova i detoksikaciju organizma. Rastvorljiva je u vodi, neisparljiva i prijatnog ukusa. U fermentisanoj hrani uglavnom se nalaze oba oblika, ali je sadržaj L(+) mlečne kiseline obično veći (Kaufmann, 1995; Panesar i sar., 2007; Reddy i sar., 2008). Izomeri mlečne kiseline koje produkuju najčešće korišćene vrste BMK dati su u Tabeli 2.

Tabela 2. Izomeri mlečne kiseline produkovani od nekih vrsta BMK (Panesar i sar., 2007)

Vrsta	D(-) mlečna kiselina	L(+) mlečna kiselina	DL(±) smeša
<i>L. acidophilus</i>	-	-	+
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>Lactis</i>	+	-	-
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>Bulgaricus</i>	+	-	-
<i>L. helveticus</i>	-	-	+
<i>L. casei</i>	-	+	-
<i>L. paracasei</i> subsp. <i>Tolerans</i>	-	+	-
<i>L. paracasei</i> subsp. <i>Paracasei</i>	-	+	-
<i>L. rhamnosus</i>	-	+	-
<i>L. plantarum</i>	-	-	+
<i>Lc. Lactis</i>	-	+	-
<i>S. thermophilus</i>	-	+	-
<i>Leuconostoc</i> sp.	+	-	-

Američka agencija za hranu i lekove (FDA) označila je mlečnu kiselinu kao bezbednu supstancu za humanu upotrebu (GRAS – eng. *Generally recognized as safe*), zbog čega se ona u značajnim količinama proizvodi i koristi za prehrambene svrhe. Nalazi primenu kao konzervans i u proizvodnji mlečno-kiselinskih fermentisanih proizvoda, na primer sokova na bazi voća ili povrća, koji spadaju u funkcionalnu hranu, ali i u farmaceutskoj, kožnoj i tekstilnoj industriji (Panesar i sar., 2007; Reddy i sar., 2008). Naročito je veliko interesovanje za produkciju mlečne kiseline poslednjih godina zbog mogućnosti njenog korišćenja kao sirovog materijala za proizvodnju polimlečne kiseline, biodegradabilnog polimera neškodljivog za okolinu. Godišnje se proizvede oko 80.000 tona mlečne kiseline, od čega je oko 90% proizvedeno fermentacijom pomoću BMK, a ostatak sintetičkim putem hidrolizom laktonitrila. Značajna prednost fermentativne proizvodnje je u dobijanju čistog optičkog izomera, dok se sintetičkim putem dobija racemska smeša DL(±) mlečne kiseline (Hofvendal i Hahn-Hägerdal, 2000; Panesar i sar., 2007).

2.5.2. Probiotske bakterije

Prema definiciji Svetske zdravstvene organizacije probiotici su živi mikroorganizmi koji kada se u adekvatnoj količini unesu u organizam deluju blagotvorno na zdravlje domaćina i održavaju ravnotežu autohtonih mikrobnih populacija u gastrointestinalnom traktu. Gastrointestinalni sistem čija je površina 150-200 m² (što je mnogo više u poređenju sa 2 m² površine kože našeg tela) naseljava oko 400 vrsta bakterija koje čine autohtonu mikrobiotu. Njihov broj je oko 10¹⁴, a dominantne vrste su Gram-pozitivne, anaerobne bakterije iz rodova *Bifidobacterium*, *Bacteroides*, *Eubacterium*, a ostale bakterije kao npr. streptokoke, klostridije i laktobacili imaju značajnu ulogu u održavanju stabilnosti crevne mukoze (Holzapfel i Schillinger, 2002; Salminen i sar., 2004; De Vries i sar., 2006). Prema ILSI (International Life Sciences Institute) probiotska hrana definiše se kao funkcionalna hrana ukoliko ima blagotvorno dejstvo na jednu ili više ispitanih funkcija u organizmu, kao i određena nutritivna svojstva, pa može da utiče na poboljšanje zdravstvenog stanja i/ili na smanjenje rizika od bolesti, kao i na održanje balansa crevne mikrobiote. Zdravstveni efekti potencijalnih probiotskih bakterija kao i tako označene hrane, zahtevaju istraživanja mehanizama delovanja i ozbiljne kliničke studije (Holzapfel i Schillinger, 2002; Salminen i sar., 2004).

Po literaturnim navodima probiotski mikroorganizmi treba da poseduju sledeće osobine: mogućnost opstanka u crevima, odnosno održanje unutar domaćina i dokazanu neškodljivost za ljudsku upotrebu. To podrazumeva toleranciju na visok sadržaj hlorovodonične kiseline (Ph oko 2) u želucu, kao i na visoke koncentracije žučnih soli (Shah, 2000; De Vries i sar., 2006). Ove osobine su dokazane za neke sojeve *L. plantarum*, izolovane iz digestivnog trakta ali i iz fermentisane hrane. Od ukupno unetih ćelija *L. plantarum*, 0,003-10% preživljava ovakve uslove što je mnogo više u poređenju sa *L. sakei* i *L. paracasei* kod kojih je preživljavanje svega 0-0,001% (De Vries i sar., 2006).

Bez obzira na poznate korisne efekte probiotskih bakterija na zdravlje ljudi, ipak je mali broj kliničkih studija dokumentovao njihovo korisno dejstvo. Dokazana je njihova efikasnost kod akutne dijareje kod dece, kao i efekti lečenja dijareje izazvane primenom antibiotika i izazvane rotavirusima, ublažavanje simptoma netolerancije na laktozu, ublažavanje simptoma alergijskih reakcija na hranu kod beba. Izvedene su i studije o upotrebi probiotika u lečenju Kronove bolesti, ali bez jasnih zaključaka. Ispitivanje uticaja probiotika na smanjenje nivoa holesterola u krvi pokazalo je da jogurtne kulture smanjuju ukupni holesterol za 4%, a LDL holesterol za 5% (Salminen i sar., 2004). Veće snižavanje LDL holesterola (9,6%) i fibrinogena (13,5%), koji predstavljaju faktore rizika za koronarna arterijska oboljenja, dobija se unošenjem ćelija izolata *L. plantarum*. Kod pušača unošenjem duple doze ovih ćelija efekat je veći (11,7% za holesterol i 21% za fibrinogen). Utvrđeno je da se konzumiranjem ćelija *L. plantarum* u fecesu zdravih osoba značajno povećava sadržaj propionske kiseline koja deluje protiv zapaljenskih procesa (De Vries i sar., 2006). Ispitivanja na životinjama pokazala su da neki probiotici (kao što su *L. acidophilus* i *L. casei*) mogu da utiču na inhibiciju hemijskim putem izazvanog kancera, kao i da utiču na aktivnost nekih enzima. Samim tim, može da se inhibira aktivnost enzima koji utiču na kancerogenezu, što će dovesti do korisnih efekata na creva, urinarni trakt i bešiku. Takođe, probiotici doprinose poboljšanju pokretljivosti creva, održanju prirodne sluzavosti creva, proizvodnji važnih digestivnih enzima (npr. β -galaktozidaze), vitamina, dostupnost minerala i ostalih elemenata u tragovima, jačanje imunološkog sistema (Holzapfel i Schillinger, 2002; Salminen i sar., 2004; Vasiljević i Shah, 2008).

Neki probiotici nastanjuju gastrointestinalni trakt ljudi, a neki se dodaju u hranu i imaju korisne efekte na zdravlje ljudi. U crevnom traktu nalaze se uglavnom homofermentativni laktobacili (*L. acidophilus*, *L. gasseri*, *L. criptasus*, *L. johnsonii*, *L. casei*, *L. paracasei*, *L. zaeae*, *L. rhamnosus*), a od heterofermentativnih *L. reuteri* i *L. fermentum*. Žive probiotske ćelije mogu se naći u fermentisanoj hrani ili u liofilizovanom obliku, kao dodaci hrani ili kao farmaceutski preparati. Tradicionalno se kao probiotske kulture za fermentaciju mlečnih i ostalih proizvoda koriste pripadnici rodova *Lactobacillus* i *Bifidobacterium*, odnosno vrste: *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. paracasei*, *L. rhamnosus*, *L. criptasus*, *L. johnsonii*, *L. reuteri*, *L. plantarum*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Bi. Bifidum*, *Bi. Longum*, *Bi. Breve*, *Bi. Infantis*, *Bi. Animalis*, *Bi. Lactis*, kao i *En.faecium* (Salminen i sar., 2004). Više od 40 godina u Japanu i više od 20 godina u Nemačkoj se za proizvodnju fermentisanih mlečnih proizvoda koriste sojevi BMK humanog porekla (npr. u Nemačkoj se koriste *L. acidophilus* i *Bi. Bifidum* zbog dobre adaptacije u crevima i blago kiselog jogurta koji se dobija njihovom upotrebom) (Holzapfel i Schillinger, 2002). Danas širom sveta postoji više od 90 probiotskih proizvoda sa zajedničim nazivom AB proizvodi, jer sadrže *L. acidophilus* i *Bifidobacterium* vrste. Da bi se obezbedio blagotvoran uticaj na zdravlje ljudi, preporučeni broj probiotskih bakterija je najmanje 6 log cfu/g proizvoda. Tako visok broj postavljen je zbog eventualanog smanjenja broja pri prolasku ovih bakterija kroz želudac i creva. Međutim, studije su pokazale nizak nivo održivosti probiotika u komercijalnim proizvodima. Potreba da se ispita opstanak *L. Acidophilus* i *Bifidobacterium* spp. U fermentisanim proizvodima se često zanemaruje, što ima za rezultat da veliki broj proizvoda

stigne na tržište sa niskim sadržajem živih bakterija, posebno bifidobakterija. Da bi se procenio broj fiziološki aktivnih ćelija probiotskih bakterija, važno je imati metodu za selektivno brojanje različitih vrsta probiotskih bakterija, odnosno BMK. Postoje hranljive podloge za *Lactobacillus* vrste i *Bifidobacterium* vrste, ali je njihova kvantifikacija u mešanoj kulturi otežana. Slično, određivanje broja *L. Casei* je otežano u prisustvu drugih probiotskih bakterija i jogurtnih bakterija (*S. Thermophilus* i *L. Delbrueckii* spp. *Bulgaricus*). Zato je kod procene kvaliteta probiotskih proizvoda važno imati mogućnost zasebnog određivanja broja *Streptococcus* spp., *L. Acidophilus*, *Bifidobacterium* spp. i *L. Casei* (Shah, 2000).

Veliki broj faktora utiče na održivost probiotskih bakterija u fermentisanim proizvodima: interakcija između sojeva, kiselost gotovog proizvoda, sadržaj sirćetne i mlečne kiseline, sadržaj vodonik peroksida koji je produkt metabolizma nekih probiotskih bakterija, sadržaj kiseonika u proizvodu, kao i mogućnost prolaza kiseonika kroz ambalažu. Takođe, važna je i dostupnost nutrijenata, prisustvo inhibitora, sadržaj šećera (zbog osmotskog pritiska), nivo inokulacije, temperatura inkubacije, trajanje fermentacije i temperatura čuvanja (Shah, 2000).

Iako su *L. acidophilus* i *Bifidobacterium* vrste tolerantni na kiselinu, primećeno je da njihov broj u jogurtu brzo opada tokom vremena čuvanja. Bifidobakterije su osetljivije na kiseline od *L. acidophilus*, pa razmnožavanje *L. acidophilus* prestaje ispod Ph 4,0, dok se kod *Bifidobacterium* spp. zaustavlja ispod Ph 5,0. Nizak Ph i akumulacija organskih kiselina su glavni faktori za smanjenje broja probiotskih bakterija, ali i mogućnost produkcije antimikrobnih supstanci (bakteriocina) koji će smanjiti broj osetljivih bakterija. *L. acidophilus* i *Bifidobacterium* spp. se sporo razmnožavaju u mleku tokom proizvodnog procesa. Stoga je uobičajena proizvodna praksa da se koriste jogurtne kulture (*S. Thermophilus* i *L. delbrueckii* spp. *bulgaricus*) zajedno sa probiotskim kulturama. Međutim, jogurtna kultura *L. delbrueckii* spp. *bulgaricus* proizvodi mlečnu kiselinu tokom fermentacije i tokom čuvanja u rashladnom uređaju. Ovakav proces je u industriji poznat kao „post-acidifikacija“, zbog čega dolazi do smanjenja viabilnosti probiotskih bakterija koje su osetljivije na povećan sadržaj kiselina. Zato je važno izvršiti dobar odabir sojeva probiotskih bakterija da bi ćelije ostale žive tokom perioda čuvanja i da se konzumiranjem probiotskih proizvoda unese dovoljan broj živih ćelija (Shah, 2000). Postoji nekoliko kriterijuma koji se moraju uzeti u obzir kod selekcije odgovarajućeg soja za komercijalnu primenu (Vasiljević i Shah, 2008):

- Opšti kriterijumi: poreklo, identifikacija, zdravstvena bezbednost (ne-patogenost), metabolička aktivnost, otpornost (npr. na mutacije, spoljašnje uticaje i antimikrobne agense);
- Tehnološki kriterijumi: genetička stabilnost soja, željena vijabilnost tokom procesa proizvodnje, transporta i skladištenja, dobre senzorne karakteristike i mogućnost primene u „scale-up“ procesima;
- Funkcionalni kriterijumi: tolerancija na visok sadržaj kiselina i žučne soli, adhezija na površinu crevne mukoze, validni i dokumentovani zdravstveni efekti;
- Željeni fiziološki kriterijumi: jačanje imunološkog sistema, antagonistička aktivnost prema gastrointestinalnim patogenima (npr. *Helicobacter pylori*, *Candida albicans*), antimutagene, antikancerogene osobine.

3. MATERIJAL I METODE

3.1. KARAKTERISTIKE RADNE KULTURE I IDENTIFIKACIJA IZOLOVANIH SOJEVA BSV

Radna kultura korišćena za kombuha fermentacije u ovom radu bila je fermentaciona tečnost koja je dobijena kroz uzastopne fermentacije u Mikrobiološkoj laboratoriji Katedre za biotehnologiju i farmaceutsko inženjerstvo Tehnološkog fakulteta u Novom Sadu. Iz ove kulture izolovani su sledeći kvasci: *Saccharomyces ludwigii*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces bisporus*, *Torulopsis* sp. I *Zygosaccharomyces* sp. (Markov i sar., 2001). Iz kombuha napitka koji je dobijen istom kulturom izolovana su dva soja BSV, čije su laboratorijske oznake N 3/1 i V/3. Soj A 3/2 je izolovan iz čajne gljive istog geografskog porekla. Izolovanje BSV izvedeno je iz kombuha napitaka na kraju procesa fermentacije metodom iscrpljenja (Vrbaški i Markov, 1992). Korišćena je podloga po Carru sa dodatkom aktidiona, a za proveru čistoće kulture YMP agar (Kerstens i sar., 2006). Na osnovu makromorfoloških i mikromorfoloških karakteristika, kao i na osnovu fiziološkog testa oksidacije sirćetne kiseline izdvojeni su dominantni izolati. Za poređenje dobijenih rezultata korišćen je referentni soj *Acetobacter aceti* ATCC 15973. Sojevi se čuvaju u kolekciji kultura Laboratorije za mikrobiologiju Tehnološkog fakulteta u Novom Sadu, u kontejneru sa tečnim azotom (Chart BioMedical Division) na -96 °C u YMP bujonu (Sievers i sar., 1995) kome je dodat glicerol do koncentracije 20% (v/v).

Pre izvođenja postupka identifikacije PCR metodom izolovani sojevi BSV su dvostruko pasażirani na YMP agaru. Ekstrakcija DNK je izvršena prema Dneasy plant mini protocol (QIAGEN®, Hilden, Germany). Za umnožavanje fragmenata DNK u PCR-u korišćena su dva prajmera, 16S i *its1* (Metabion, Martinsried, Germany) čije su sekvence prikazane u Tabeli 3.

Tabela 3. Sekvence prajmera koji su korišćeni za amplifikaciju fragmenata DNK

	(5'-3') sekvenca	Prajmer
Forward	GCTGGCGGCATGCTTAAACACAT	16S
Reverse	GGAGGTGATCCAGCCGCAGGT	
Forward	ACCTGCGGCTGGATCACCTCC	<i>its1</i>
Reverse	CCGAATGCCCTTATCGCGCTC	

U slučaju 16S prajmera PCR amplifikacija je izvršena sa ~50 ng genomske DNK, u prisustvu 0,2 Mm Dntp, 2,5U Taq DNK polimeraze (Fermentas, Vilnius, Litvanija), 1X Taq pufera, 0,3 Mμ prajmera (Forward i Reverse), 3 Mm MgCl₂. PCR je urađen u Mastercycler gradient aparatu (Eppendorf, Hamburg, German) u sledećim uslovima:

- 1 ciklus: inicijalna denaturacija DNK, 5min na 94°C,
- 30 ciklusa koji obuhvataju sledeće korake:
 - Denaturacija na 94°C u trajanju od 10s;
 - Aniling na 58°C u trajanju od 30s;
 - Ekstenzija na 67°C u trajanju od 1min;
 - Finalna ekstenzija na 67°C u trajanju od 5min.

Kod prajmera *its1* rađeno je sa istom količinom genomske DNK po istom postupku, pri čemu je jedina razlika bila temperatura anilinga prajmera koja je iznosila 65°C.

Produkti PCR reakcije su razdvojeni elektroforezom na aparatu (Serva electrophoresis, GmbH, Heidelberg, Germany) na 1% TBE agaroznom gelu (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). Za određivanje veličine fragmentata korišćeni su markeri molekulskih masa (Standard Gene Ruler 100 bp Plus DNA Ladder, Fermentas, Vilnius, Litvanija).

U cilju otkrivanja razlika među izolatima BSV, korišćena su četiri restrikciona enzima. Produkti PCR reakcije dobijeni sa prajmerima 16S i its1 su inkubirani 2h na 37°C sa restrikcionim enzimima: AluI, RsaI, HhaI i HaeIII (Fermentas, Vilnius, Litvanija) prema uputstvu proizvođača. Restrikciona mesta enzima koji su korišćeni za digestiju PCR proizvoda u ovom istraživanju prikazani su u Tabeli 4.

Tabela 4. Mesta prepoznavanja specifičnog redosleda nukleotida (restrikciona mesta)

Restrikcioni enzim	Restrikciono mesto
HhaI	5'-G C G↓C-3' 3'-C↑G C G-5'
RsaI	5'-G T↓A C-3' 3'-C A↑T G-5'
AluI	5'-A G↓C T-3' 3'-T C↑G A-5'
HaeIII	5'-G G↓C C-3' 3'-C C↑G -5'

Nakon digestije sa restrikcionim enzimima proizvodi digestije razdvojeni su elektroforezom na 3% TBE agaroznom gelu (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). Za određivanje veličine fragmentata korišćeni su markeri molekulskih masa (Standard Gene Ruler 100 bp Plus DNA Ladder, Fermentas, Vilnius, Litvanija).

3.2. KOMBUHA FERMENTACIJE

3.2.1. Tradicionalni postupak

Podloga za kultivaciju čajne gljive pripremljena je dodavanjem 70 g/l komercijalne saharoze u česmensku vodu. Rastvor je zagrevan do ključanja, nakon čega mu je dodata odgovarajuća količina čaja: 5 g/L melise (*Melissa officinalis* L., Fructus, Bačka Palanka) ili 3 g/l crnog čaja (*Camellia sinensis* L., Fructus, Bačka Palanka). Dekokcija sastojaka čaja je trajala 15 minuta nakon čega je podloga profiltrirana kroz sterilnu kvalitativnu filter hartiju u sterilan sud i ohlađena na sobnu temperaturu.

Pripremljena podloga od crnog čaja inokulisana je kombuha napitkom iz prethodne kultivacije (dobijenog pri istim uslovima kultivacije sa podlogom od crnog čaja) u količini 10% v/v. Pripremljena podloga od melise inokulisana je napitkom dobijenim nakon dve sukcesivne fermentacije na melisi u količini 10% v/v.

Nakon homogenizovanja, 0,33 l zasejane podloge razliveno je u male sterilne bioreaktore, staklene sudove za fermentaciju (V = 0,72 l, Ø = 80 mm, H = 145 mm). Kultivacija bez mešanja u sudovima prekrivenim gazom izvedena je na temperaturi 28°C, a trajala je 7 dana. U predviđeno vreme uzorkovanja (1, 2, 3, 5 i 7. dan fermentacije) iz oglada je izuziman po jedan bioreaktor, kako bi se sprečila eventualna kontaminacija i omogućilo da

uzorci predstavljaju fermentacione tečnosti iste zapremine (0,33 l). Uzorci za ispitivanje fizičko-hemijskih i mikrobioloških parametara uzimani su nakon uklanjanja navlake i homogenizacije fermentacione tečnosti u bioreaktorima (bez filtriranja).

Kombuha fermentacije na crnom čaju i melisi izvedene su u dva vremenski nezavisna ogleđa, a svaki parametar određivan je u tri ponavljanja. Dobijeni rezultati izraženi su kao srednja vrednost sa standardnom devijacijom (sd).

3.2.2. Suplementna inokulacija bakterijama mlečne kiseline

U istraživanjima mogućnosti preživljavanja bakterija mlečne kiseline tokom kombuha fermentacije, fermentaciona tečnost inokulisana je suspenzijama komercijalnih starter kultura i izolata BMK iz fermentisanih proizvoda sa teritorije Srbije. Uporedo su izvedene kontrolne fermentacije na podlozi sa crnim čajem (70 g/l, 3 g/l čaja) radi upoređivanja rezultata.

3.2.2.1. Priprema suspenzije komercijalnih starter kultura

Prilikom ispitivanja mogućnosti preživljavanja komercijalnih starter kultura tokom kombuha fermentacije, korišćene su dve starter kulture: DELVO-YOG MY-721 (*Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus* LAFTI®L10, *Bifidobacterium* sp. LAFTI®B94) (DSM Food Specialties, Australia) i DELVO-YOG MY-1821 (koja uz BMK kao prethodna starter kultura sadrži *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *Bulgaricus* i *Lactobacillus casei* LAFTI®L26) (DSM Food Specialties, Australia). Starter kulture su prvo suspendovane u Puferisanoj peptonskoj vodi (Biokar diagnostics, Beauvais, France), u odnosu 1:10, homogenizovane 20 minuta na tresilici (THYS-2, MLW), a zatim je sa 10% (v/v) ove suspenzije inokulisan MRS bujon (Himedia, Mumbai, India) i inkubiran 24 h na 30°C. Nakon inkubiranja, bujon je centrifugiran 15 minuta na 5000 obrtaja/minutu. Talog je zatim resuspendovan dva puta u 0,85% NaCl i centrifugiran pod istim uslovima, a broj ćelija BMK u suspenziji procenjen je aparatom Densicheck (bioMérieux, Durham, USA). Suspenzije BMK dodate su u fermentacionu tečnost u količini 10% (v/v) 48h nakon starta kombuha fermentacije.

Broj BMK u fermentacionim tečnostima određen je jedan sat nakon inokulacije, a nakon toga svakog dana do kraja procesa koji je trajao 4 dana izuziman je po jedan bioreaktor za praćenje fizičko-hemijskih i mikrobioloških parametara.

Za obe starter kulture izvedene su zasebne kombuha fermentacije, a svaki parametar određivan je u tri ponavljanja. Rezultati su izraženi kao srednja vrednost sa standardnom devijacijom (sd).

3.2.2.2. Priprema suspenzije izolata bakterija mlečne kiseline

Za ispitivanje mogućnosti preživljavanja izolata BMK tokom fermentacije i čuvanja gotovog napitka korišćeno je pet izolata roda *Lactobacillus* iz tradicionalnih fermentisanih proizvoda. Njihovo poreklo i laboratorijske oznake dati su u Tabeli 5. Izolati L-1, L-3, L-4 i L-5 dobijeni su ljubaznošću Laboratorije za mikrobiologiju Tehnološkog fakulteta iz Lekovca, a identifikovani su PCR metodom korišćenjem (GTG)₅ prajmera i sekvencionom analizom na 16S Rdnk regionu. Izolat L-2 dobijen je ljubaznošću Katedre za biohemijsko inženjerstvo i biotehnologiju Tehnološko-metalurškog fakulteta iz Beograda, koji je identifikovan biohemijskim testovima. Sojevi se čuvaju u kolekciji kultura Laboratorije za

mikrobiologiju Tehnološkog fakulteta u Novom Sadu, u kontejneru sa tečnim azotom (Chart BioMedical Division) na -96°C u MRS bujonu kome je dodat glicerol do koncentracije 20% (v/v). Pre pripreme suspenzije sojevi su dvostruko pasażirani u MRS bujonu. Dalja procedura pripreme suspenzije sojeva, kao i dodatak u fermentacionu tečnost (u količini 10% (v/v)) identična je kao i za komercijalne starter kulture. Nakon završetka fermentacije, kombuha napici su flaširani i čuvani na $+4^{\circ}\text{C}$. Tokom čuvanja, nakon homogenizovanja uzimani su uzorci za određivanje Ph, titrabilne kiselosti i broja BMK.

Tabela 5. Poreklo izolata *Lactobacillus*

Oznaka soja	Vrsta	Poreklo
L-1	<i>L. hilgardii</i>	Kiselo testo
L-2	<i>L. fermentum</i>	Više od mesec dana star sir
L-3	<i>L. plantarum</i>	2 meseca star sir
L-4	<i>L. plantarum</i>	40 dana star kajmak
L-5	<i>L. plantarum</i>	7 meseci star kajmak

3.3. FIZIČKO-HEMIJSKE ANALIZE FERMENTACIONE TEČNOSTI

pH vrednost. Ph vrednost uzoraka fermentacione tečnosti i kombuha napitaka određena je elektronskim Ph-metrom (HI 9321, HANNA Instruments) uz dvostruku kalibraciju na Ph 4 i 7. Merenje je obavljeno nakon što je iz uzorka uklonjen ugljendioksid na ultrazvučnom kupatilu (B-220, Branson Company, Shelton, USA) za 30 sekundi.

Titribilna kiselost (TA). Titribilna kiselost (ukupan sadržaj kiselina) u uzorcima fermentacione tečnosti i kombuha napicima određena je konduktometrijskom titracijom sa 0,1 mol/l NaOH do $\text{Ph} = 7$ (Jacobson, 2006) i izražena u g/l sirćetne kiseline.

Sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja. Sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja u čajnim napicima, fermentacionim tečnostima i kombuha napicima određen je spektrofotometrijski metodom po Folin-Ciocalteu (Singleton i sar., 1999). Za uzorke sa crnim čajem, rezultati su izraženi u μg ekvivalenta galne kiseline i katehina/ml čajnog napitka, fermentacione tečnosti i kombuha napitka. Za uzorke sa melisom rezultati su izraženi u μg ekvivalenta galne i ruzmarinske kiseline/ml čajnog napitka, fermentacione tečnosti i kombuha napitka.

Identifikacija i kvantifikacija fenolnih jedinjenja. Sadržaj fenolnih komponenata u čajnim napicima, fermentacionim tečnostima i kombuha napicima je urađen reverzno faznom HPLC metodom (High Performance Liquid Chromatography). Uzorci su injektovani u Waters Breeze (Waters, Milford, MA, USA) HPLC sistem koji se sastoji od 1525 binarnih pumpi, termostata i 717+ autosemplera koji je povezan sa 2996 diode array detektorom (DAD). Razdvajanje fenola je izvršeno pomoću Symmetry C-18 RP kolone, 125x4 mm veličine i dijametra čestice od $5\ \mu\text{m}$ (Waters, Milford, MA, USA) koja je povezana sa odgovarajućom pretkolonom. Mobilne faze, A (0,1% fosforna kiselina, H_3PO_4) i B (acetonitril, CH_3CN) su korišćene sa protokom od 1 ml/min uz sledeći gradijentni profil: u prvih 20 min od 10-22% B, zatim 20 min linearnog povećanja do 40% B, zatim 5 min vraćanja na 10% B uz konačnih 5 min za ekvibraciju. Pikovi detektovanih jedinjenja su lokalizovani i identifikovani u HPLC-UV hromatogramima upoređujući analize standarda sa dobijenim zapisima upoređujući kako njihovo retenciono vreme, tako i UV spektar dobijen pomoću DAD. Kalibraciona kriva je dobijena ubrizgavanjem različitih zapremina smeše standarda uz korišćenje relacije linearne regresije za prikazivanje odnosa dobijene površine pika i poznate koncentracije standarda. Svaka komponenta je analizirana kvantitativno pomoću metode spoljašnjeg standarda

koristeći čiste supstance kao reference za koncentraciju, retenciono vreme i karakteristike UV spektra. Za analizu hromatograma je korišćen Empower 2 programski paket (Waters, Milford, MA, USA). Rezultati su izraženi u $\mu\text{g/ml}$ čajnog napitka, fermentacione tečnosti i kombuha napitka.

Sadržaj mlečne kiseline. U uzorcima fermentacione tečnosti i gotovim kombuha napicima sadržaj mlečne kiseline određen je komercijalnim enzimskim testovima (Megazyme, CO, Wicklow, Ireland). Priprema uzoraka i postupak analiza obavljen je u skladu sa preporukama proizvođača.

Uzorci za određivanje sadržaja mlečne kiseline, ukupnih fenolnih jedinjenja i uzorci za HPLC analizu su profiltrirani kroz membranske filtere prečnika pora $0,2 \mu\text{m}$ (Chromafil[®] CA-20/25S).

3.4. MIKROBIOLOŠKE ANALIZE FERMENTACIONE TEČNOSTI

Ukupan broj ćelija kvasaca, bakterija sirćetnog vrenja i bakterija mlečne kiseline u fermentacionim tečnostima tokom kultivacije i gotovim napicima određen je indirektnom metodom, odnosno metodom poseva (Vrbaški i Markov, 1992). Za određivanje ukupnog broja ćelija kvasaca korišćena je podloga Novi sladni agar (Vrbaški i Markov, 1992) u koju je neposredno pre razlivanja dodato 100 mg/l hloramfenikola (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). Zasejane podloge inkubirane su 2-3 dana na 28°C .

Za određivanje broja ćelija bakterija sirćetnog vrenja korišćena je YMP (Sievers i sar., 1995) podloga u koju je pre razlivanja dodat aktidion (cikloheksimid; Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) u količini 300 mg/l . Zasejane podloge inkubirane su 4-5 dana na 28°C .

Broj laktobacila određen je na podlozi MRS agar (Himedia, Mumbai, India), broj bifidobakterija na podlozi Wilkins Chalgren Anaerobic agar sa dodacima po preporuci proizvođača (Himedia, Mumbai, India) i TOS MUP agar (Merck, Darmstadt, Germany). Podloge su inkubirane pod anaerobnim uslovima uz korišćenje Anaerocult A[®] (Merck, Darmstadt, Germany) na 28°C tokom 72 sata. Broj streptokoka određen je na M17 agaru (Himedia, Mumbai, India) pri aerobnim uslovima na 28°C tokom 72 sata. U sve podloge dodato je 300 mg/l aktidiona.

Prisustvo stranih bakterija i plesni u kombuha napitku ispitano je metodom iscrpljenja (Vrbaški i Markov, 1992). Za ispitivanje prisustva stranih bakterija korišćena je podloga Nutrient agar (Himedia, Mumbai, India) uz dodatak 300 mg/l aktidiona. Inkubacija je trajala 2-3 dana na 28°C . Za ispitivanje prisustva plesni korišćena je podloga Dichloran Rose Bengale Chloramphenicol agar (DRBC) (Biokar diagnostics, Beauvais, France). Inkubacija je trajala 5-7 dana na 25°C .

3.5. ISPITIVANJE ANTIBAKTERIJSKE AKTIVNOSTI KOMBUHA NAPITAKA OD MELISE

Priprema kombuha napitaka. Kombuha napici za ispitivanje antibakterijske aktivnosti pripremljeni su fermentacijom zaslađenog čaja melise (70 g/l šećera, 5 g/l čaja). Inokulacija je obavljena napitkom od melise iz dve prethodne sukcesivne kultivacije u količini 10% (v/v). Za vreme šestodnevne fermentacije prikupljani su uzorci kombuha napitaka za ispitivanje antibakterijske aktivnosti.

Priprema kontrolnih uzoraka. Kontrolni uzorci pri ispitivanju antibakterijske aktivnosti kombuha napitaka bili su:

- rastvori sirćetne kiseline koncentracija jednakih titrabilnoj kiselosti kombuha napitaka;

- neutralisani kombuha napici pripremljeni neutralisanjem odgovarajućih napitaka sa 0,1 M NaOH do pH = 7;
- čaj pripremljen dekokcijom 5 g/l melise;
- toplotno denaturisani kombuha napici pripremljeni zagrevanjem kombuhe u ključalom vodenom kupatilu 5 minuta.

Uzorci kombuha napitaka, kontrolnih uzoraka na bazi kombuhe i čaja profiltrirani su kroz membranske filtre prečnika pora 0,2 µm (Chromafil® CA-20/25S).

Priprema test organizama. Za ispitivanje antibakterijske aktivnosti kombuha napitaka od melise upotrebljeni su izolati bakterija (iz hrane i vode za piće) čija je identifikacija obavljena u Laboratoriji za mikrobiologiju Tehnološkog fakulteta u Novom Sadu pomoću VITEK® 2 COMPACT SYSTEM-a (bioMérieux, USA). Takođe su ispitana i dva izolata BMK, kao i jedna komercijalna starter kultura. Test mikroorganizmi i njihovo poreklo dati su u Tabeli 6.

Tabela 6. Test mikroorganizmi za ispitivanje antibakterijske aktivnosti kombuhe od melise

Grupa bakterija	Test mikroorganizam	Poreklo
Gram-negativne	<i>Escherichia coli</i>	Salatni majonez
	<i>Salmonella</i> sp.	Melanž
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Voda
	<i>Citrobacter (Cit.) freundii</i>	Melanž
	<i>Enterobacter cloacae</i>	Industrijski kolač preliven kakao prelivom
	<i>Proteus (Pr.)</i> sp.	Industrijski kolač preliven kakao prelivom
Gram-pozitivne	<i>Bacillus</i> sp.	Paprika
	<i>Listeria monocytogenes</i>	Mleveno meso
	<i>Listeria innocua</i>	Mleveno meso
	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	Mlečni krem
	<i>Staphylococcus equorum</i>	Testo
	<i>Lactobacillus hilgardii</i>	Kiselo testo
	<i>Lactobacillus fermentum</i>	Sir
	DELVO-YOG MY-1821	Komercijalna starter kultura

Bakterijski sojevi se čuvaju u kolekciji kultura Laboratorije za mikrobiologiju Tehnološkog fakulteta u kontejneru sa tečnim azotom (Chart BioMedical Division) na -96°C u Trypton Soja bujonu (Himedia, Mumbai, India), odnosno u MRS bujonu (sojevi BMK), kojima je dodat glicerol do koncentracije 20% (v/v). Priprema test sojeva bakterija za ispitivanja podrazumevala je dvostruko pasažiranje presejavanjem kultura na kosi Miler Hinton agar (MHA) (Difco, Laboratories, Detroit, Michigan, USA), odnosno MRS agar (za *Lactobacillus fermentum* i *Lactobacillus hilgardii*) uz inkubiranje 24h na 37°C, odnosno 30°C za *Bacillus* sp. Od fiziološki aktivnih kultura pripremljena je osnovna suspenzija prenošenjem biomase sa kosog agara u epruvetu sa sterilnim fiziološkim rastvorom. Od kulture DELVO-YOG MY-1821 pripremljena je osnovna suspenzija u pufersanoj peptonskoj vodi (1:10) i homogenizovana 20 minuta na tresilici. Od osnovnih suspenzija (za sve bakterije i starter

kulturu) pripremljena je serija razređenja tako da je u poslednjoj epruveti serije broj ćelija bio reda veličine 10^6 cfu/ml, što je procenjeno aparatom Densichek (bioMérieux, Durham, USA).

Antibakterijska aktivnost kombuha napitka. Po 2 ml suspenzija test bakterija homogenizovano je sa 18 ml otopljene i na 45°C ohlađene podloge (MRS za laktobacile, M17 za streptokoke i MHA za sve ostale bakterije), a potom razliveno u Petri ploče. Nakon želiranja podloge i isušivanja vlage (oko 2h na sobnoj temperaturi), u podlogama su izbušeni »bunarčići« prečnika 9 mm, pomoću sterilne staklene cevčice i vakuum pumpe. U njih je mikropipetom uneto po 100 µl pripremljenih kombuha napitaka i kontrolnih uzoraka. Petri ploče su inkubirane na odgovarajućoj temperaturi (30°C za *Bacillus* sp., laktobacile i streptokoke, a za sve ostale bakterije 37°C) pod aerobnim uslovima, a jedino su laktobacili gajeni pod anaerobnim uslovima. Prvo očitavanje zona inhibicije obavljeno je nakon 24h, a konačni rezultati su očitani nakon 48 h.

Statistička analiza. Ogledi su urađeni u tri ponavljanja, a rezultati su izraženi kao srednja vrednost prečnika zone inhibicije rasta (u mm) sa standardnom devijacijom (sd). Statistička analiza izvedena je korišćenjem Origin 7.0 SRO softverskog paketa (OriginLab Corporation, USA, 1991-2002) i Microsoft Office Excel 2003. Signifikantne razlike između vrednosti računata su pomoću ANOVA testa, a nivo značajnosti bio je 95% ($p \leq 0,05$).

3.6. ISPITIVANJE ANTIOKSIDATIVNE AKTIVNOSTI

3.6.1. ESR spektralna analiza uticaja čajnih napitaka, fermentacionih tečnosti i kombuha napitaka na transformaciju DPPH radikala

Stabilni DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) slobodni radikali ispitani su u reakcionoj smeši koja se dobija mešanjem 0,2 ml vode i 0,4 ml 0,4 mM metanolnog rastvora DPPH radikala (slepa proba). Uticaj čajnih napitaka, fermentacionih tečnosti i kombuha napitaka na transformaciju DPPH radikala analiziran je u rastvoru koji se dobija mešanjem: X ml fermentacionih tečnosti i gotovih kombuha napitaka dobijenih na crnom čaju i melisi ili samih čajnih napitaka (od crnog čaja i melise) sa (0,2-X) ml vode i 0,4 ml 0,4 mM metanolnog rastvora DPPH. Opseg očekivanih koncentracija je 0,5-20% v/v.

Smeša je intenzivno mešana u toku 2 minuta i prenetu u Bruker ER-160FC kvarcnu kivetu za vodene rastvore. ESR (elektron-spin rezonantni) spektri su snimani na ESR spektrometru (model 300E, Bruker, Rheinstetten, Germany) pri sledećim uslovima: frekvencija modulacije: 100 kHz; amplituda modulacije 0,256 G; vremenska konstanta 40,96 ms; vremenski opseg merenja: 335,544 ms; centar polja 3440,00 G; ukupan opseg merenja: 100,00 G; frekvencija mikrotalasnog područja: 9,64 GHz; snaga mikrotalasnog područja: 7,96 mW; temperatura merenja: 23°C.

Antioksidativna aktivnost (AA_{DPPH}) uzoraka definisana je izrazom:

$$AA_{DPPH} = (h_0 - h_x) / h_0 \times 100 (\%)$$

gde je h_0 – visina drugog pika ESR signala slepe probe, a h_x – visina drugog pika ESR signala uzorka.

Antioksidativna aktivnost uzoraka izražena je i kao EC_{50} vrednost, a predstavlja koncentraciju ekstrakta, u ovom slučaju, količinu uzorka (izraženu u µl/ml reakcione smeše) koja je potrebna efekat “hvatanja” DPPH radikala od 50% (Cuvelier i sar., 1992).

3.6.2. ESR spektralna analiza uticaja čajnih napitaka, fermentacionih tečnosti i kombuha napitaka na transformaciju hidrosil radikala

Hidrosil radikali ispitani su u Fentonovom model sistemu, koji je dobijen mešanjem 0,2 ml H₂O₂ (2 mM), 0,2 ml FeCl₂ (0,3 mM), 0,2 ml of N,N-dimethyl formamide (DMF) and 0,2 ml of 5,5-dimethyl-1-pyrroline N-oxide (DMPO) (112 mM) kao spin trapa (kontrolni uzorak). Da bi se ispitao uticaj čajnih napitaka, fermentacionih tečnosti i kombuha napitaka na stvaranje i transformaciju hidrosil radikala u Fentonov model sistem su dodati uzorci u opsegu koncentracija 0,5-33,33% v/v.

ESR spektri snimani su 2,5 minuta nakon homogenizovanja na pomenutom ESR spektrometru pri sledećim radnim karakteristikama: amplituda modulacije: 0,512 G; vremenska konstanta: 81,92 ms; vremenski opseg merenja: 163,84 ms; centar polja: 3440,00 G; ukupan opseg merenja: 100,00 G; frekvencija mikrotalasnog područja: 9,64 GHz; snaga mikrotalasnog područja: 20 mW; temperature merenja: 23°C, jačina struje 1×10^4 .

Antioksidativna aktivnost (AA_{OH}) uzoraka definisana je izrazom:

$$AA_{OH} = h_0 - h_x / h_0 \times 100 (\%)$$

gde je h_0 – visina drugog pika ESR signala slepe probe, a h_x – visina drugog pika ESR signala uzorka.

Antioksidativna aktivnost uzoraka izražena je i kao EC₅₀ vrednost, a predstavlja količinu uzorka (izraženu u µl/ml reakcione smeše) koja je potrebna za efekat “hvatanja” hidrosil radikala od 50% (Cuvelier i sar., 1992).

Statistička analiza. Prikazani rezultati za oba radikala predstavljeni su kao srednja vrednost tri merenja sa standardnom devijacijom. Statistička analiza izvedena je korišćenjem Origin 7.0 SRO softverskog paketa (OriginLab Corporation, USA, 1991-2002) i Microsoft Office Excel 2003. Signifikantne razlike između vrednosti računate su pomoću ANOVA testa, a nivo značajnosti bio je 95% ($p \leq 0,05$).

3.7. ISPITIVANJE ANTIPROLIFERATIVNE AKTIVNOSTI KOMBuha NAPITKA OD MELISE

Ćelijske linije. Ćelijske linije MCF7 (humani adenokarcinom dojke), HeLa (humani epitelni karcinom grlića materice) i HT-29 (humani adenokarcinom debelog creva) kultivisane su u DMEM (Dulbeco's Modified Essential Medium) (PAA, Pasing, Austrija), sa dodatkom 10% fetalnog telećeg seruma (FCS) (PAA, Pasing, Austrija), 100 µg/ml streptomocina i 100 IU/ml penicilina (Galenika, Srbija) u Kartel (Kartel, Švajcarska) 25cm² flaskovima, na 37°C u atmosferi 95% vazduha i 5% CO₂, pri visokoj relativnoj vlažnosti vazduha. Sve ćelijske linije su adherentne (Tabela 7), a subkultivisane su dva puta nedeljno upotrebom 0,1% tripsina (Sigma, SAD) u 0,04% EDTA i tretirane u logaritamskoj fazi rasta. Suspenzije ćelija gustine $3-5 \times 10^3$ ćelija/180µl/otvoru, zavisno od vremena udvajanja (Tabela 7), inokulisane su u Corning (Corning, SAD) mikrotitar ploče sa 96 otvora i preinkubirane 24h (pre dodavanja uzoraka). Nakon preinkubacije od 24 h ćelije su tokom tretmana inkubirane još 48h, što je adekvatno vremenu od 2-3 generacije ćelija u kontroli (Tabela 7).

Tabela 7. Osnovne karakteristike ćelijskih linija

Ćelijska linija	Katalpški broj	Vrsta (species)	Organ	Histološki tip/oboljenje	Afinitet za podlogu	Vreme udvajanja (h)*
MCF7	ECACC** 86012803		Dojka	Epitelne/adenokarcinom dojke		35
HeLa	ECACC** 93021013	<i>Homo sapiens</i> (čovjek)	Cerviks (grlič materice)	Epitelne/karcinom grlića materice	Adherentne	21
HT-29	ECACC** 91072201		Kolon (debelo crevo)	Epitelne/adenokarcinom debelog creva		39

* Vreme potrebno da se broj ćelija uveća dva puta

** European Collection of Cell Cultures

Uzorak za ispitivanje antiproliferativne aktivnosti bio je konzumni kombuha napitak (titrabilne kiselosti 4,56 g/l) pripremljen na uobičajen način fermentacijom zaslađenog čaja melise. Kontrolni uzorak bio je čajni napitak pripremljen dekokcijom 5 g/l čaja melise. Za analizu ćelijskog rasta pripremljena su serijska razblaženja uzoraka u 0,9% NaCl. Uzorci su filtrirani kroz membranske filtre prečnika pora 0,22 μm. Ćelije u kulturi su bile izložene delovanju ispitanih uzoraka u trajanju od 48 h, nakon čega su dobijeni efekti kvantifikovani sulforodamin B (SRB) kolorimetrijskim testom. Finalne koncentracije dobijene su dodavanjem 20 μl uzorka u 180 μl medijuma za kulturu ćelijskih linija sa 5% fetalnog telećeg seruma (FCS). Finalne koncentracije bile su u opsegu 1,95-500 μg/ml, računato na suvi ostatak. Kontrola ćelija dobijena je dodavanjem 20 μl 0,9% NaCl (rastvarača).

Sulforodamin B (SRB) test. Ukupna količina proteina merena je sulforodamin B kvantitativnim kolorimetrijskim testom po Skehan-u (Skehan et al, 1990). Sulforodamin B (C₂₇H₂₉N₂O₇T₂Na) (Sigma, SAD) je anjonska boja koja se u blago kiseloj sredini elektrostatički vezuje za pozitivno naelektrisane aminokiselinske ostatke ćelijskih proteina. U blago baznoj sredini SRB je moguće rastvoriti, kvantitativno ekstrahovati iz ćelije i optički izmeriti da bi se utvrdio relativni ćelijski rast.

Ćelije su fiksirane *in situ* hladnom 50% trihlorsirćetnom kiselinom (TCA) (50 μl/otvoru 96 well ploče) 1h na temperaturi od 4°C. Ploče su isprane destilovanom vodom (4 puta) automatski (Wellwash 4, Labsystems) da bi se uklonila TCA, medijum, niskomolekularni metaboliti i proteini seruma. Nakon sušenja ploče su bojene 0,4% sulforodaminom B (0,4% u 1% sirćetnoj kiselini) (w/v) (75 μl/otvoru), 30 minuta, na sobnoj temperturi. Boja je isprana (4 puta) 1% sirćetnom kiselinom automatski, a ploče ponovo osušene. Vezana boja ekstrahovana je 10 mM tris (hydroxymethyl) aminomethane (TRIS) bazom (200 μl/otvoru).

Fotometrijsko očitavanje izvedeno je na *Multiscan Ascent* fotometru (Labsystems, Helsinki, Finland) na talasnim dužinama 540 nm i 690 nm. Apsorbanca (A) je dobijena kao $A = A_{540nm} - A_{690nm}$.

Procenat ćelijskog rasta je izražen kao procenat od kontrole (%K) i izračunat u odnosu na kontrolu, po formuli:

$$K = (A_x/A_0) \times 100 (\%)$$

gde je: A_x – apsorbanca test otvora, a A₀ – apsorbanca kontrolnog otvora

Statistička analiza. Rezultati su izraženi kao srednja vrednost sa standardnom devijacijom (sd) tri nezavisna eksperimenta izvedena u kvadriplikatu (n=12). Razlike između kontrolnih i eksperimentalnih grupa određene su upotrebom dvostranog t-testa na nivou značajnosti od najmanje 0,05 ($p < 0,05$).

4. REZULTATI I DISKUSIJA

Rezultati istraživanja ovog rada podeljeni su u nekoliko odvojenih celina. U prvom delu ovog poglavlja prikazani su rezultati identifikacije tri izolata BSV metodom PCR. Zatim su prikazani fizičko-hemijski i mikrobiološki parametri fermentacije zaslađenog čaja od melise (*Melissa officinalis* L.), kao i zaslađenog crnog čaja (*Camelia sinensis* L.). Parametri fermentacije na crnom čaju (tradicionalna podloga) poslužili su kao kontrola prilikom praćenja procesa na alternativnoj podlozi od melise.

U drugom delu prikazani su rezultati ispitivanja funkcionalnih karakteristika kombuhe od melise: antimikrobne, antioksidativne i antiproliferativne aktivnosti. Antibakterijska aktivnost kombuhe od melise ispitana je prema izolatima iz namirnica i vode za piće, koji predstavljaju kontaminante i/ili mikroorganizme od zdravstvenog značaja, kao i prema BMK. Antioksidativna aktivnost fermentacionih tečnosti od zaslađenog čaja melise i crnog čaja praćena je tokom sedmodnevne fermentacije prema hidroksil i DPPH slobodnim radikalima. Rezultati ispitivanja antiproliferativne aktivnosti konzumnog napitka od melise na ćelije humanih karcinoma ukazuju na potencijalni antikancerogeni efekat ovog napitka.

U trećem delu rada prikazani su rezultati ispitivanja uticaja BMK na tok kombuha fermentacije u cilju dobijanja napitaka dodatnih funkcionalnih karakteristika. Ispitan je stepen preživljavanja BMK tokom fermentacije i čuvanja gotovih napitaka, efekat ovih bakterija na povećanje sadržaja mlečne kiseline u kombuhi, kao i njihov uticaj na mikroorganizme čajne gljive.

4.1. PRISUSTVO STRANIH MIKROORGANIZAMA U RADNOJ KULTURI

Pregledom literature utvrđeno je da se u većini naučnih radova ne navodi prisustvo drugih mikroorganizama u čajnoj gljivi, osim kvasaca i bakterija sirćetnog vrenja. Prema Tamura i sar. Dominantne bakterije u kombuhi su *Acetobacter* sp. ili mlečno kisele bakterije (Steels i sar., 2002). Teoh i sar. (2004) govore o prisustvu *Lactobacillus* vrsta u čajnoj gljivi, ali se ne navode podaci o njihovom broju. Sievers i sar. (1995) smatraju da sirćetna i glukonska kiselina kao glavni produkti metabolizma imaju konzervirajući efekat i zbog toga u čajnoj gljivi nisu prisutni drugi mikroorganizmi pored kvasaca i BSV. To su dokazali kultivacijom čajne gljive na različitim hranljivim podlogama određujući: ukupan broj bakterija (Plate count agar), broj laktokoka (M17 agar), broj laktobacila (MRS agar), broj stafilokoka (Baird Parker agar) i broj streptokoka (Streptococci selective medium). Na svim ispitanim podlogama rast nije detektovan (Sievers i sar., 1995).

U kombuha napicima dobijenim u deset nezavisnih sedmodnevnih kultivacija čajne gljive na tradicionalnoj podlozi, tokom višemesečnog perioda, određen je broj BMK, prisustvo stranih bakterija (koje ne pripadaju kulturi čajne gljive) i plesni (Tabela 8). Srednja vrednost osnovnih fizičko-hemijskih parametara ispitanih napitaka u navedenom periodu bila je: pH = 2,83±0,55 i TA = 4,32±1,47g/l).

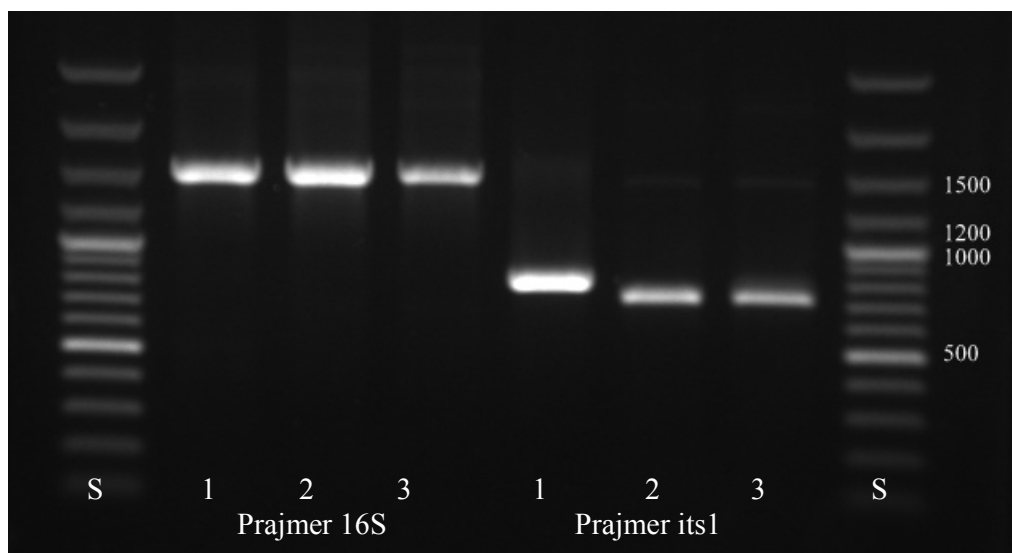
Tabela 8. Prisustvo BMK i stranih mikroorganizama u tradicionalnom kombuha napitku određen u deset nezavisnih kultivacija

	Laktobacili	Laktokoke	Ukupan broj bakterija	Plesni
Broj ćelija (cfu/ml)	nd	nd	nd	nd

Višemesečnom proverom tradicionalnih kombuha napitaka dobijenih u nezavisnim kultivacijama na prisustvo stranih bakterija i plesni dokazano je da čajna gljiva korišćena kao radna kultura u ovim istraživanjima ne sadrži strane mikroorganizme, kako kontaminante tako ni BMK (laktokoke i laktobacile).

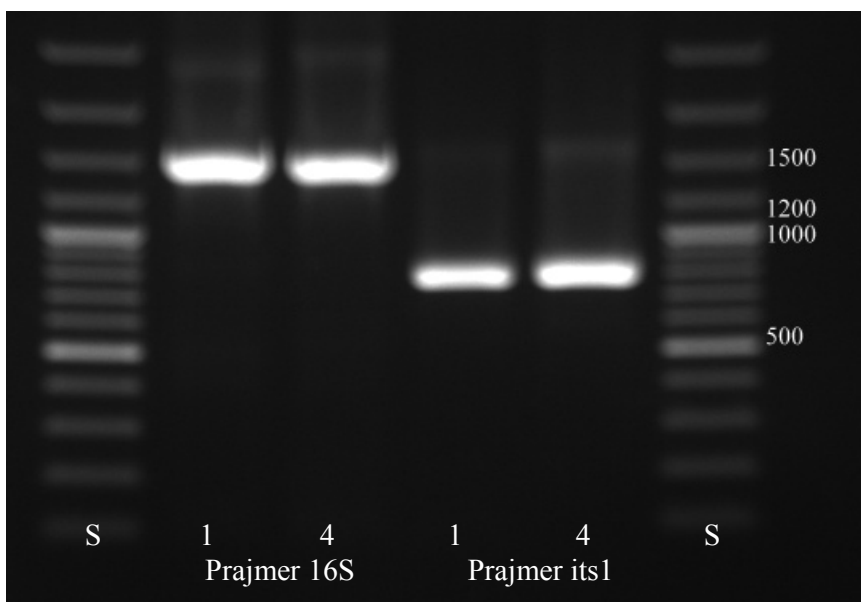
4.2. IDENTIFIKACIJA BAKTERIJA SIRĆETNOG VRENJA POREKLOM IZ ČAJNE GLJIVE PCR METODOM

U postupku identifikacije bakterija sirćetnog vrenja iz kombuha napitaka PCR metodom, ključni korak bio je izbor odgovarajućih oligonukleotidnih prajmera. Na osnovu rezultata istraživanja Ruiz i sar. (2000) koji su PCR metodom identifikovali veliki broj izolata BSV iz vina kao pripadnike rodova *Acetobacter*, *Acidomonas*, *Gluconacetobacter* i *Gluconobacter*, za amplifikaciju DNK izolata iz kombuhe odabrani su prajmeri korišćeni u pomenutom istraživanju (16S i its1, Tabela 3). Nakon ekstrakcije DNK i PCR amplifikacije sa prajmerima 16S i its1, veličine dobijenih PCR produkata određene su na osnovu migracije standarda (Slike 13 i 14).



Slika 13. Umnoženi fragmenti dobijeni sa prajmerima 16S i its1 (S-Standard Gene Ruler 100bp; 1-*A. aceti* ATCC 15973; 2-izolat A-3/2; 3-izolat N-3/1)

U reakciji sa prajmerom 16S, umnoženi fragmenti izolata A-3/2 i N-3/1 i referentnog soja su veličine približno 1500 baznih parova (bp). U reakciji sa prajmerom its1, vidi se da je veličina umnoženog fragmenta referentnog soja približno 800 bp, dok je veličina fragmenata izolata A-3/2 i N-3/1 oko 750 bp (Slika 13).



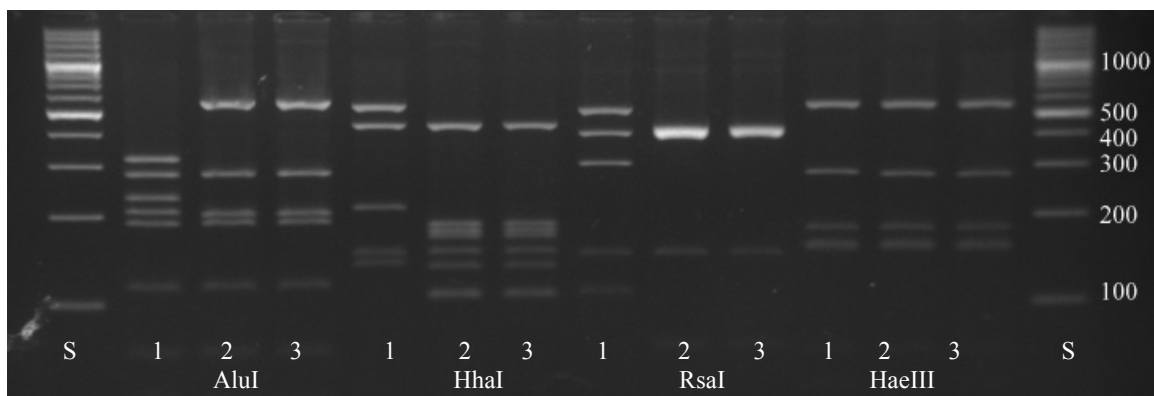
Slika 14. Umnoženi fragmenti dobijeni sa prajmerima 16S i its1 (S-Standard Gene Ruler 100bp; 1-A. *aceti* ATCC 15973; 4-izolat V/3)

Veličina umnoženog DNK fragmenta izolata V/3 u reakciji sa prajmerom 16S je ista kao i za izolate A-3/2 i N-3/1 i referentni soj i iznosi oko 1500 bp (Slike 13 i 14). U reakciji sa prajmerom its1 takođe se ne uočava razlika u veličini fragmenta referentnog soja i izolata V/3, koja iznosi oko 800 bp (Slika 14).

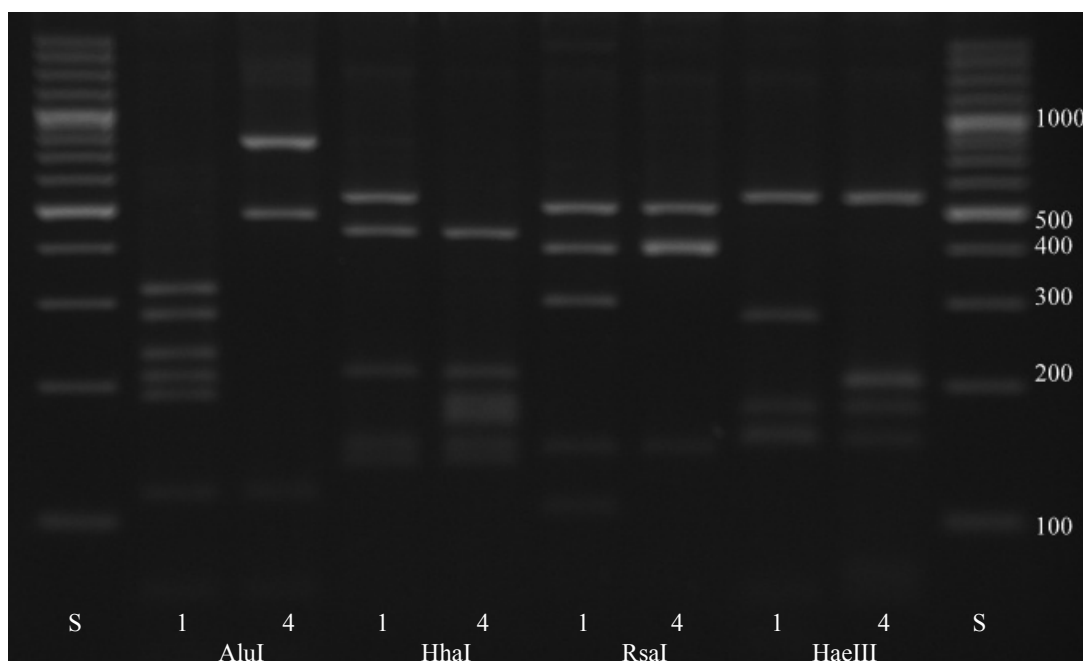
Na osnovu rezultata veličina umnoženih DNK fragmenata sva tri izolata i referentnog soja, može se pretpostaviti da izolati A-3/2 i N-3/1 ne pripadaju vrsti *Acetobacter aceti* (na osnovu reakcije sa its1 prajmerom, Slika 13), kao što se izolati A-3/2 i N-3/1 razlikuju od izolata V/3. Prema rezultatima reakcija sa oba prajmera, moguće je da izolat V/3 pripada vrsti *Acetobacter aceti*.

Dobijeni rezultati, odnosno veličine umnoženih fragmenata prikazane na Slikama 13 i 14, u saglasnosti su sa rezultatima Ruiz i sar. (2000) koji navode da je veličina amplifikovanih PCR produkata (sa 16S prajmerom) za više od 20 ispitanih sojeva koji pripadaju rodovima *Gluconobacter*, *Acidomonas*, *Acetobacter*, *Gluconacetobacter* oko 1450 bp. Veličina PCR produkata amplifikovanih sa its1 prajmerom je varirala u zavisnosti od soja u intervalu od 675 do 800 bp. Uporedivi rezultati ukazuju na mogućnost da izolati iz kombuhe pripadaju nekoj od brojnih vrsta pomenutih rodova identifikovanih u radu Ruiz i sar. (2000). Slično, u radovima Dutta i Gachhui (2006 i 2007) koji su iz kombuhe izolovali novu *Acetobacter* i *Gluconobacter* vrstu, dobijeni su fragmetni veličine 1451 bp, odnosno 1452 bp reakcijom na 16S rRNK genu korišćenjem drugih prajmera (fD1 i rD1).

Da bi se utvrdilo da li izolati iz kombuhe pripadaju vrsti *A. aceti*, kao što li postoji razlika među izolatima, izvedena je digestija PCR produkata sa četiri restrikciona enzima (AluI, HhaI, RsaI i HaeIII). Identifikacija BSV do nivoa vrste restrikcionom analizom pomoću ovih enzima je brza i pouzdana metoda (Ruiz i sar., 2000). Rezultati digestije PCR produkata amplifikovanih sa prajmerom 16S prikazani su na slikama 15 i 16, a rezultati digestije PCR produkata sa prajmerom its1 prikazani su na slikama 17 i 18.



Slika 15. Fragmenti dobijeni nakon digestije PCR produkata sa prajmerom 16S sa četiri restrikciona enzima (S-Standard Gene Ruler 100bp; 1-*A. aceti* ATCC 15973; 2-izolat A-3/2; 3-izolat N-3/1)



Slika 16. Fragmenti dobijeni nakon digestije PCR produkata sa prajmerom 16S sa četiri restrikciona enzima (S-Standard Gene Ruler 100bp; 1-*A. aceti* ATCC 15973; 4-izolat V/3)

Na osnovu veličine fragmenata dobijenih nakon digestije PCR produkata sa prajmerom 16S, vidi se da su izolati A-3/2 i N-3/1 međusobno jednaki, ali različiti od referentnog soja (Slika 15), dok se izolat V/3 razlikuje od druga dva izolata (A-3/2 i N-3/1) i takođe od referentnog soja (Slike 15 i 16).

Tri restrikciona enzima korišćena u ovom radu (AluI, RsaI i HaeIII), korišćena su i u istraživanju Ruiz i sar. (2000). Radi lakšeg upoređivanja rezultata, veličine fragmentata dobijene u istraživanju Ruiz i sar. (2000) i veličine fragmenata za *etabol* A-3/2, N-3/1, V/3 i referentni soj *A. aceti* (očitanje sa Slika 15 i 16) nakon digestije PCR produkata (umnoženih sa 16S prajmerom) sa restrikcionim enzimima AluI i RsaI prikazane su u Tabeli 9.

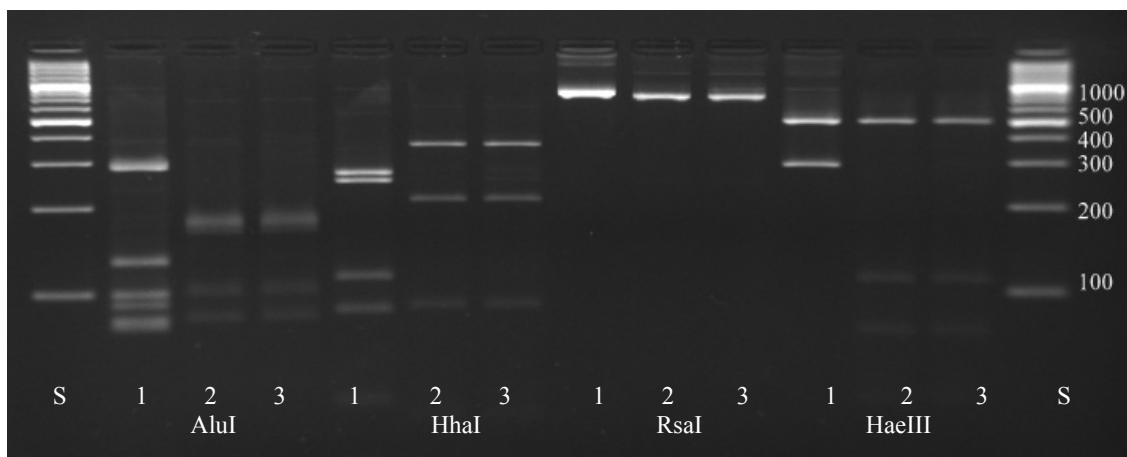
Tabela 9. Veličine fragmenata (bp) dobijenih nakon digestije PCR produkata (prajmer 16S) sa enzimima AluI i RsaI

Poreklo	Vrsta	Soj	Restrikcioni enzim	
			AluI	RsaI
Ruiz i sar. (2000)	<i>Acetobacter aceti</i>	LMG 1261 ^T , CECT 298 ^T , LMG 1505, LMG 1372	310, 290, 240, 210, 190, 125	500, 400, 300, 150, 125
		LMG 1262 ^T	450, 310, 290, 190	500, 400, 300, 150, 125
	<i>Acetobacter pasterianus</i>	LMG 1553	450, 290, 190, 140	500, 400, 300, 150, 125
		LMG 1282	790, 275, 210, 125	500, 400, 150
	<i>Gluconobacter oxydans</i>	LMG 1408 ^T , CECT 360 ^T , LMG 1484, LMG 1414	550, 290, 210, 190, 125	400, 150, 90
	<i>Gluconacetobacter hansenii</i>	LMG 1527 ^T	790, 480, 125	500, 400, 150
Izolati iz kombuhe	A-3/2	-	550, 290, 210, 190, 125	400, 150, 90
	N-3/1	-	550, 290, 210, 190, 125	400, 150, 90
	V/3	-	800, 500 i 125	500, 400, 150
Referentni soj	<i>Acetobacter aceti</i>	ATCC 15973	310, 290, 240, 210, 190, 125	500, 400, 300, 150, 125

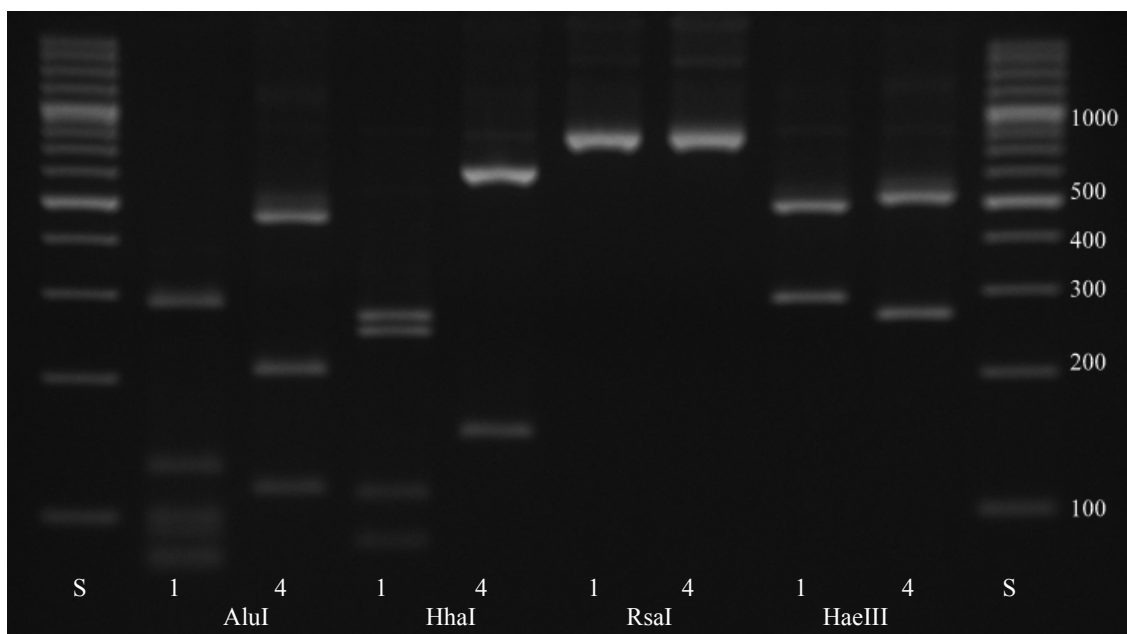
Upoređivanjem veličina fragmenata dobijenih nakon digestije sa restrikcionskim enzimima AluI i RsaI za referentni soj (*Acetobacter aceti* ATCC 15973), sa veličinama fragmentata za sojeve *A. aceti* iz rada Ruiz i sar. (2000) (Tabela 9), vidi se da su fragmenti istih veličina i da se radi o istoj vrsti. Veličine svih fragmenata izolata A-3/2 i N-3/1 dobijene nakon digestije sa restrikcionskim enzimom AluI i RsaI identične su kao veličine fragmenata za *Gluconobacter oxydans* iz rada Ruiz i sar. (2000) (Tabela 9). Na osnovu toga može se zaključiti da izolati A-3/2 i N-3/1 pripadaju vrsti *Gluconobacter oxydans*.

Na osnovu veličine fragmenata dobijenih nakon digestije PCR produkata jasno je da se izolat V/3 razlikuje se od izolata A-3/2 i N-3/1 (Tabela 9). Poređenjem sa veličinama fragmenata iz rada Ruiz i sar. (2000) (Tabela 9) može se zaključiti da izolat V/3 odgovara vrsti *Gluconacetobacter hansenii*. Sinonim za ovu vrstu je *Acetobacter hansenii*, i ova vrsta ima sposobnost oksidacije α -etabol i laktata do CO₂ i H₂O i može da sintetiše celulozu (Lisdiyanti i sar., 2006). U kombuha napitku za sintezu celuloze verovatno je odgovoran izolat V/3, jer *Gluconobacter* vrste (izolati A-3/2 i N-3/1) nemaju tu sposobnost (Tabela 1).

Ruiz i sar. (2000) su umnožavanjem sa 16S prajmerom uspešno identifikovali 24 izolata iz vina do nivoa vrste poređenjem sa 22 referentna soja BSV. Za identifikaciju do nivoa vrste od osam restrikcionskih enzima, odabrani su TaqI i RsaI jer je pomoću ovih restrikcionskih enzima omogućeno razdvajanje većine BSV bez varijacija unutar vrste.



Slika 17. Fragmenti dobijeni nakon digestije PCR produkata sa prajmerom *its1* sa četiri restrikciona enzima (S-Standard Gene Ruler 100bp; 1-*A. aceti* ATCC 15973; 2-izolat A-3/2; 3-izolat N-3/1)



Slika 18. Fragmenti dobijeni nakon digestije PCR produkata sa prajmerom *its1* sa četiri restrikciona enzima (S-Standard Gene Ruler 100bp; 1-*A. aceti* ATCC 15973; 4-izolat V/3)

Na osnovu veličine fragmenata dobijenih nakon digestije PCR produkata sa prajmerom *its1*, takođe se uočava da su izolati A-3/2 i N-3/1 identični, a različiti od izolata V/3, kao što ni jedan od njih ne odgovara referentnom soju *A. aceti* (Slike 17 i 18). Veličine dobijenih fragmenata mogu se uporediti sa veličinama fragmenata datim u radu Ruiz i sar. (2000), koji su takođe izveli enzimsku digestiju PCR produkata (umnoženih sa *its1* prajmerom) sa tri ista restrikciona enzima. Veličine dobijenih fragmenata iz rada Ruiz i sar. (2000) i veličine fragmenata za *Clotetabol* A-3/2, N-3/1, V/3 i referentni soj *A. aceti* (očitanje sa slika 17 i 18) nakon digestije PCR produkata (sa *its1* prajmerom) sa restrikcionim enzimima AluI i RsaI prikazane su u Tabeli 10.

Tabela 10. Veličine fragmenata (bp) dobijenih nakon digestije PCR produkata (prajmer ts1) sa enzimima AluI i RsaI

Poreklo	Vrsta	Soj	Restrikcioni enzim	
			AluI	RsaI
Ruiz i sar. (2000)	<i>Acetobacter aceti</i>	LMG 1261 ^T , CECT 298 ^T , LMG 1505, LMG 1372	290, 130, 110, 90	750
		LMG 1262 ^T	290, 130, 110, 90	750
	<i>Acetobacter pasterianus</i>	LMG 1553	290, 130, 110, 90	650, 100
		LMG 1282	425, 210, 110	425, 300
	<i>Gluconobacter oxydans</i>	LMG 1408 ^T , CECT 360 ^T , LMG 1484, LMG 1414	190, 175, 110	700
<i>Gluconacetobacter hansenii</i>	LMG 1527 ^T	475, 130, 90	775	
Izolati iz kombuhe	A-3/2	-	190, 110, 90	725
	N-3/1	-	190, 110, 90	725
	V/3	-	475, 210, 125	750
Referentni soj	<i>Acetobacter aceti</i>	ATCC 15973	290, 130, 110, 90	500, 400, 300, 150, 125

Veličine fragmenata dobijene nakon digestije PCR produkta sa prajmerom its1 za *A. aceti* ATCC 15973 identične su kao i za sojeve *A. aceti* iz rada Ruiz i sar. (2000) (Tabela 10), kao što je bio slučaj i sa prajmerom 16S (Slike 15 i 16, Tabela 9).

Veličine fragmenata izolata A-3/2 i N-3/1 dobijene nakon digestije sa restrikcijom AluI iznose približno: 190, 110 i 90 bp, a sa enzimom RsaI: 725 bp, što je slično, ali ne i identično sa veličinama fragmenata za *Gluconobacter oxydans* (Tabela 10).

Izolat V/3 razlikuje se od izolata A-3/2 i N-3/1 i veličine njegovih fragmenata nakon digestije sa AluI restrikcijom iznose približno: 475, 210 i 125 bp, a sa RsaI restrikcijom 750 bp, što je takođe slično, ali ne identično soju *Gluconacetobacter hansenii* (Tabela 10).

Na osnovu veličine fragmenata dobijenih nakon digestije PCR produkata sa prajmerom its1, a prema rezultatima iz rada Ruiz i sar. (2000), izolati A-3/2, N-3/1 i V/3 ne odgovaraju ni jednom od sojeva identifikovanih u tom radu, bez obzira na apsolutno poklapanje veličina fragmenata dobijenih nakon digestije PCR produkta sa 16S prajmerom. To ukazuje da ovi izolati možda pripadaju nekom novom soju. Ovakvi rezultati su očekivani, s obzirom da su Ruiz i sar. (2000) zaključili da je restrikcijom sa 16S rDNA pogodna za ispitivanje „interspecies“ varijabilnosti, dok je restrikcijom sa its regiona pogodna za ispitivanje „intraspecies“ varijabilnosti. Ni u njihovom istraživanju nijedan od izolata iz vina nije se poklapao sa referentnim sojevima u slučaju its1 prajmera, iako su u slučaju 16S prajmera svi identifikovani do nivoa vrste.

Rezultati identifikacije BSV iz dve čajne gljive sa istog geografskog područja, a različitih lokaliteta, pokazali su da obe čajne gljive sadrže istu vrstu i da je to verovatno

Gluconobacter hansenii. Da bi se utvrdilo da li je ta vrsta dominantna za ovo geografsko područje trebalo bi analizirati veći broj uzoraka čajne gljive (sa različitih lokaliteta) i veći broj izolata. Za dalja istraživanja koja bi utvrdila da li izolati iz kombuhe pripadaju novom soju/sojevima potrebno je uraditi sekvencioniranje na 16S rRNK genu.

4.3. PARAMETRI PROCESA KOMBUHA FERMENTACIJE MELISE

Čajna gljiva u kućnim uslovima i u većini naučnih radova kultiviše se na podlozi sa crnim čajem, koja predstavlja tradicionalnu podlogu za kombuha fermentaciju i često se primenjuje kao kontrolni uzorak pri izvođenju fermentacija na alternativnim podlogama. U ovom radu kao alternativna podloga korišćen je zaslađen čaj melise (*Melissa officinalis* L.) koja je odabrana nakon analize nekoliko lekovitih biljaka porodice Lamiaceae (Velićanski, 2008). Istraživanje kombuha fermentacije na melisi je nastavljeno u cilju ispitivanja funkcionalnih karakteristika. Takođe, ponovna određivanja parametara procesa kombuha fermentacije na melisi trebalo bi da utvrde da li promene u sastavu čaja, koje se mogu javiti pre svega kao posledica godine sakupljanja, utiču na sposobnost kulture čajne gljive da fermentiše supstrat sa melisom dajući napitak željenih karakteristika u odgovarajućem vremenskom periodu.

U cilju prikupljanja uzoraka za istraživanja izvedene su dve vremenski nezavisne fermentacije na melisi i crnom čaju kao kontroli. Podloga sa melisom inokulisana je gotovim napitkom dobijenim iz dve prethodne sukcesivne fermentacije na čaju melise da bi se čajna gljiva adaptirala na novi supstrat i da bi se eliminisao uticaj crnog čaja na dobijene rezultate.

Fizičko-hemijski i mikrobiološki parametri primenjenih inokuluma za oba oglada prikazani su u Tabeli 11.

Tabela 11. Osnovni parametri primenjenih inokuluma

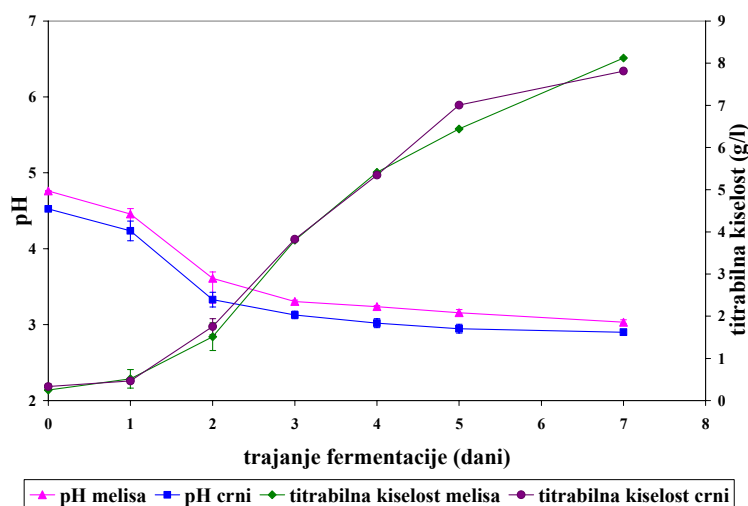
Podloga	Ogled I				Ogled II			
	pH	TA (g/l)	Kvasci (log cfu/ml)	BSV	pH	TA (g/l)	Kvasci (log cfu/ml)	BSV
Melisa	3,23 (0,06)*	3,70 (0,03)	6,10 (0,06)	5,75 (0,12)	3,32 (0,08)	4,17 (0,03)	6,56 (0,02)	6,18 (0,01)
Crni čaj	3,09 (0,04)	4,78 (0,05)	6,68 (0,03)	4,89 (0,07)	3,14 (0,06)	4,87 (0,1)	6,21 (0,03)	4,64 (0,04)

* standardna devijacija

Obe podloge inokulisane su sa fermentacionim tečnostima približno istih vrednosti fizičko-hemijskih parametara. Vrednosti pH kreću se oko 3 jedinice, a vrednosti titrabilne kiselosti bliske su vrednostima optimalne konzumne kiselosti (3,5-4,5 g/l). Optimalna konzumna kiselost kombuhe definisana je nakon senzornih ispitivanja od strane dugogodišnjih konzumenata kombuha napitaka (Cvetković, 2008). Ispitivanje funkcionalnih karakteristika u ovom radu je izvedeno na napicima optimalne konzumne kiselosti. Drugi autori uglavnom daju rezultate antimikrobne i antioksidativne aktivnosti sa napicima znatno veće kiselosti. Na taj način se dobija tzv. Kombuha sirće koje je neprihvatljivo za konzumente, bez obzira što je u takvim napicima ponekad povećana i koncentracija aktivnih komponenata. U ovom radu kultivacija čajne gljive je trajala 7 dana, kada je titrabilna kiselost napitka bila veća od optimalne konzumne. Razlog produžene fermentacije je zbog praćenja

parametara fermentacije na alternativnom supstratu u dužem periodu kako bi se video uticaj supstrata na tok fermentacije i neke metabolite čajne gljive u poređenju sa tradicionalnom podlogom. Takođe, većina autora koji istražuju kombuhu izvodila je produžene fermentacije, tako da će sedmodnevna fermentacija na melisi i crnom čaju biti bolja osnova za upoređivanje rezultata.

Promene pH i titrabilne kiselosti fermentacione tečnosti sa melisom i crnim čajem predstavljene su na Slici 19, a rezultati predstavljaju srednje vrednosti dve vremenski odvojene fermentacije.



Slika 19. Promena pH i titrabilne kiselosti fermentacione tečnosti sa melisom i crnim čajem

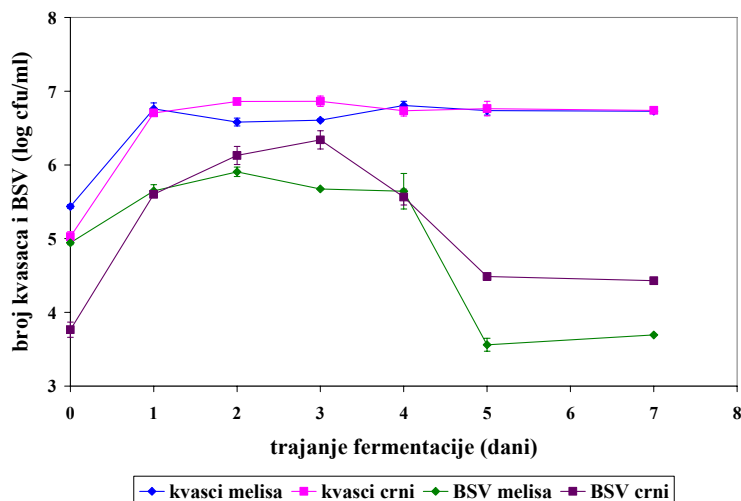
Promene pH vrednosti fermentacione tečnosti sa melisom i crnim čajem imaju sličan tok. pH vrednost zaslađenog čaja od melise i crnog čaja bila je 7,05, odnosno 6,94, a nakon inokulacije pH opada na 4,70, odnosno 4,50 zbog kiselosti inokuluma. Tokom prva dva dana kombuha fermentacije, pH opada za jednu jedinicu, u naredna 24h za 0,2-0,3 jedinice. Nakon toga ukupno smanjenje pH vrednosti do kraja procesa je 0,3 pH jedinice za podlogu sa melisom i 0,2 jedinice za podlogu sa crnim čajem. Na kraju fermentacije napitak od melise ima pH vrednost 3, a tradicionalni napitak 2,9. Za razliku od dinamike promene pH vrednosti, titrabilna kiselost za obe podloge raste tokom celog procesa. Na startu fermentacije sa inokulumom je uneto oko 0,33 g/l kiselina. Tokom kombuha fermentacije najviše kiselina sintetisano je između drugog i trećeg dana (više od 2 g/l), a posle toga svakim danom sintetisano je nešto manje kiselina. Optimalna konzumna kiselost je dostignuta u periodu između trećeg i četvrtog dana procesa, što potvrđuje da čaj od melise obezbeđuje dovoljnu količinu azotnih jedinjenja neophodnih za ćelije čajne gljive. Sedmog dana procesa napitak od melise dostigao je 8,12 g/l kiselina, a tradicionalni napitak za 0,3 g/l kiselina manje.

Trend promene pH vrednosti (opadanje u prvih nekoliko dana procesa, a zatim neznatno smanjenje ili stagnacija do kraja procesa) karakteristika je kombuha fermentacije, jer su i drugi autori uočili slične promene. Blanc (1996) u sličnim uslovima kultivacije (250 ml podloge sa crnim čajem), tokom prvih pet dana procesa, detektuje opadanje pH za čak 4,5 jedinice, a u narednih sedam dana za svega 0,5. U istoj zapremini podloge Belloso-Morales i Hernández-Sánchez (2003) zapažaju opadanje pH za dve jedinice u prvih 48h, a stagnaciju u narednih 48h. U bioreaktorima sa 400 ml podloge sa crnim čajem, za šest dana kultivacije pH opadne za 5,5 jedinica, a do četrnaestog dana ostaje gotovo nepromenjena (Sreeramulu i sar., 2000). Bez obzira na veličinu bioreaktora i podlogu za kultivaciju, promene pH ostaju iste. U bioreaktorima od 1 litre na podlozi sa zelenim čajem, Reiss (1994) dobija smanjenje pH sa 6

na startu do 4 pH jedinice šestog dana. Kultivirajući čajnu gljivu na različitim biljkama iz porodice Lamiaceae (menta, melisa, majčina dušica), Velićanski (2008) dobija isti trend promene pH koristeći male biorektore (sa 330 ml podloge) i tradicionalne biorektore (sa 3,3 l podloge). Ovaj trend je održan i prilikom izvođenja scale-up procesa (Cvetković i sar., 2008) u biorektorima različite zapremine (od početnih 0,33 l, preko boca sa 4,18-8,25 l, malih biorektora sa 11-19,25 l podloge, do velikog biorektora sa 90 l podloge). Cvetković i sar. (2008) su objasnili da se trend opadanja pH u prvih nekoliko dana procesa javlja kao rezultat sintetisanja kiselina (pre svega sirćetne), a zatim se do kraja procesa neznatno menja bez obzira na dalju produkciju kiselina zbog pufernog kapaciteta fermentisane tečnosti. Naime, tokom procesa fermentacije aktivnošću kvasaca stvara se ugljen-dioksid (CO_2). Disocijacijom vodenog rastvora CO_2 stvaraju se hidrogenkarbonatni anjoni (HCO_3^-), koji lako reaguju sa vodonikovim jonima iz nastalih organskih kiselina, sprečavajući dalje promene pH, odakle potiče puferni kapacitet kombuhe. U kasnijim danima fermentacije, povećava se koncentracija CO_2 , a s tim i puferni kapacitet fermentacione tečnosti. Iz tog razloga se pH vrednost ne može uzeti kao kritičan parametar fermentacije koji određuje kraj procesa, već je to titrabilna kiselost (Cvetković i sar., 2008). Bez obzira na ovu činjenicu, neki autori ne navode pri kojoj se kiselosti završila fermentacija, već su dostupni samo podaci o vrednostima pH, na osnovu čega se dobijeni rezultati ne mogu adekvatno upoređivati. Tako, Battikh i sar. (2012) navode da je u kombuha napicima od različitih biljaka nakon 21 dana fermentacije, pH vrednost iznosila od 2,4 do 3,1 zavisno od primenjene biljke, pri čemu nije naveden sadržaj kiselina u datim napicima. Uzimajući u obzir da su ovi napici korišćeni za ispitivanje antimikrobne aktivnosti, podatak o kiselosti ima još veći značaj. Osim toga, Cvetković i sar. (2008) definisali su specifičnu međufaznu površinu (a , odnos površine suda i zapremine medijuma) kao ključni parametar za definisanje scale-up modela. Došli su do zaključka da se u sudovima veće vrednosti a (bez obzira na veličinu suda za fermentaciju) proces odvija brže tako da se za kraće vreme fermentacije postiže kritična vrednost titrabilne kiselosti. Takođe, podjednake vrednosti a za različite reakcione sudove garantuju isto vreme trajanja procesa. Postavljen matematički model za izračunavanje završetka procesa uspešno je verifikovan i u biorektorima zapremine 110 l i u staklenim sudovima zapremine 0,72 l.

Porast titrabilne kiselosti tokom celog procesa zabeležen je od strane drugih istraživača koji su izvodili fermentaciju u sudovima slične zapremine kao i u ovom istraživanju. Kultivirajući čajnu gljivu u biorektorima sa 0,33 l podloga sa ehinaceom i rtanjskim čajem, Cvetković (2003) je postigao optimalnu konzumnost kiselosti za 4-5 dana, čime je proces skraćen u odnosu na tradicionalni. Belloso-Morales and Hernández-Sánchez (2003) u 250 ml podloge sa crnim čajem dobijaju oko 4,8 g/l ukupnih kiselina nakon 4 dana, što odgovara optimalnoj konzumnoj kiselosti, dok se kod Blanc-a (1996) optimalna konzumnost kiselosti postiže za 3 dana. Sreeramulu i sar. (2000) su u 400 ml podloge detektovali 4 g/l sirćetne kiseline tek nakon 8 dana. Međutim, u produženoj kombuha fermentaciji postoji ograničena produkcija kiselina. Blanc (1996) je kultivirao čajnu gljivu na crnom čaju 25 dana. Maksimalnih 4,5-5,6 g/l sirćetne kiseline dobio je nakon 15 dana, a posle toga sadržaj sirćetne kiseline ostaje gotovo nepromenjen. Tokom 60-odnevne fermentacije, Sievers i sar. (1995) su detektovali maksimalnu količinu sirćetne kiseline od oko 30 g/l nakon 40 dana, a zatim se njen sadržaj smanjuje za oko 5 g/l do kraja procesa. Slično su Chan i Liu (2000) izveli produženu fermentaciju (60 dana) gde su maksimalnih 30 g/l sirćetne kiseline detektovali nakon 30 dana procesa, nakon čega se sadržaj smanjuje za oko 2 g/l do kraja fermentacije. Objašnjenje limitirane produkcije sirćetne kiseline u produženoj fermentaciji je da visok sadržaj kiselina, a nizak sadržaj šećera inhibira fermentativnu aktivnost kvasaca i produkciju etanola, a samim tim i produkciju sirćetne kiseline. Međutim, u radu Chen i Liu (2000) titrabilna kiselost tokom svih 60 dana kombuha fermentacije raste verovatno na račun glukonske kiseline, koju bakterije sirćetnog vrenja stvaraju iz glukoze.

Promene fizičko-hemijskih parametara tokom kombuha fermentacije su u vezi sa brojem ćelija čajne gljive. Na Slici 20 prikazane su promene broja kvasaca i BSV tokom kombuha fermentacije na melisi i crnom čaju.



Slika 20. Promena broja kvasaca i bakterija sirćetnog vrenja (BSV) fermentacione tečnosti sa melisom i crnim čajem

Broj kvasaca unet sa inokulumom bio je približno isti za obe podloge, 5,4 log cfu/ml za podlogu sa melisom i 5,04 log cfu/ml za podlogu sa crnim čajem. Male razlike u broju kvasaca između dve podloge održale su se tokom sedmodnevne fermentacije. U prvih 24h broj kvasaca povećao se za 1,3 log jedinica u fermentacionoj tečnosti sa melisom, a za 1,7 log jedinica u podlozi sa crnim čajem. U fermentacionoj tečnosti sa crnim čajem maksimalnih 6,86 log cfu jedinica dostiže se drugog dana i održava se gotovo nepromenjeno do kraja fermentacije. Na podlozi sa melisom, nakon prva 24h broj kvasaca je dostigao 6,76 log jedinica, u naredna dva dana blago opada (za 0,2 jedinice), da bi se do kraja procesa održao na oko 6,80 log jedinica.

Veće razlike između primenjenih podloga zapažaju se u broju BSV. Sa inokulumima je unet različit broj BSV, 4,94 log cfu/ml za podlogu sa melisom i 3,76 log cfu/ml za podlogu sa crnim čajem. Bez obzira na razliku od preko jedne log jedinice na startu, broj BSV u fermentacionoj tečnosti sa crnim čajem već posle 24h dostiže red veličine od 5 log jedinica, i nastavlja da se povećava do maksimalnih 6,34. U fermentacionoj tečnosti sa melisom, maksimalnih 5,90 log jedinica dostiže se drugog dana. Nakon postignutog maksimuma, kod obe podloge se do petog dana broj BSV smanjuje za čak 2 log jedinice i održava se na toj vrednosti do kraja procesa.

Prisutan broj kvasaca u fermentacionim tečnostima obezbeđuju dovoljnu količinu izvora ugljenika (glukozu, fruktozu, etanol) neophodnih bakterijama sirćetnog vrenja. Razlike u broju BSV unetih sa inokulumima u podloge sa melisom i crnim čajem, kao i razlike u broju tokom fermentacije, nisu uticale na sadržaj sintetisanih kiselina i brzinu procesa (Slika 19). Iako je broj BSV opadao nakon drugog-trećeg dana fermentacije, očigledno je bio dovoljan da omogući oksidaciju stvorenog etanola od strane kvasaca i sintezu sirćetne kiseline, kao i ostalih kiselina koje se stvaraju iz monosaharida.

Broj kvasaca u fermentacionim tečnostima sa melisom i crnim čajem (Slika 20) istog je reda veličine (oko 7 log jedinica) kao broj koji su odredili drugi autori, dok promene BSV imaju sličan trend, ali se broj razlikuje. Sreeramulu i sar. (2000) su u četvrtom danu detektovali maksimalan broj ćelija kvasaca i BSV (oko 7 log jedinica), a nakon toga u naredna tri dana broj kvasaca opada za čak 3 log jedinice. Do kraja procesa prisutne su

neravnomerne promene u broju kvasaca pa se tako javio nagli porast broja za 4 log jedinice u poslednja dva dana procesa. Broj BSV lagano opada do 12-og dana za dve log jedinice, a zatim raste za jednu. Jayabalan i sar. (2007) nakon maksimalnih 7 log jedinica za kvasce i 3 log jedinice za BSV u devetom danu kombuha fermentacije, beleže smanjenje do kraja procesa. U produženoj kombuha fermentaciji (30 dana) u devet različitih uzoraka fermentacione tečnosti i pelikule, broj kvasaca dostiže maksimum između 6. i 14. dana procesa (6-7 log cfu/ml), a nakon toga javlja se neznatno opadanje broja (Chen i Liu, 2000). Broj BSV dostiže maksimum šestog dana (4 log cfu/ml) a zatim broj do kraja procesa opada za oko 1-2 log jedinice. Smanjenje broja ćelija kvasaca tokom kombuha fermentacije objašnjava se šokom od kiselina (niskim pH) u fermentacionoj tečnosti (Sreeramulu i sar., 2000; Jayabalan i sar., 2007). Osim kiselinskog šoka, opadanje broja ćelija čajne gljive tokom fermentacije pripisuje se i smanjenjem dostupnog kiseonika u podlozi. Naime, CO₂ nastao fermentativnom aktivnošću kvasaca se akumulira između celulozne pelikule i fermentacione tečnosti, što može da utiče na prenos kiseonika sa površine pelikule do tečnosti, kao i transfer nutrijenata iz fermentacione tečnosti do pelikule u kojoj su inkorporirane ćelije. Na taj način mogu da se stvore anaerobni uslovi u fermentacionoj tečnosti i smanjena količina hranljivih materija u pelikuli, što ne pogoduje svim vrstama prisutnim u čajnoj gljivi, zbog čega se njihov broj vremenom smanjuje (Chen i Liu, 2000).

U radovima različitih autora prisutne su razlike u fizičko-hemijskim i mikrobiološkim parametrima i ukoliko se kombuha fermentacija izvodi na istom supstratu i u bioreaktorima slične zapremine. Dobijene razlike posledica su, pre svega, različitog mikrobiološkog sastava primenjenih kombuha kultura, koje potiču sa različitih geografskih i klimatskih područja, kao i prisustva lokalnih vrsta divljih kvasaca i bakterija. Kombuha napici koji potiču sa različitih geografskih područja razlikuju se po kvalitativnom i kvantitativnom sastavu metabolita čajne gljive (etanol, sirćetne, glukonske kiseline i drugih), brzini fermentacije i ukusu (Frank, 1994; Maysen i sar., 1995; Teoh i sar., 2004). Zbog razlike u vrstama i broju, BSV nisu u svim čajnim gljivama sposobne da podjednako efikasno metabolišu etanol, što dovodi do različitog sadržaja kiselina u kombuha napicima (Belloso-Morales i Hernández-Sánchez, 2003). Treba uzeti u obzir i nejednake početne sadržaje izvora azota i ugljenika, upotrebljene različite bioreaktore (ukupne i radne zapremine), način uzorkovanja, uslove kultivacije, ali i različitu metodologiju pri određivanju metabolita, što otežava ili čak onemogućava upoređivanje rezultata.

4.4. FUNKCIONALNE KARAKTERISTIKE KOMBUHA NAPITAKA

U ovom delu rada izneti su rezultati ispitivanja antibakterijske, antioksidativne i antiproliferativne aktivnosti kombuha napitaka od melise. Uzorci za ispitivanje antibakterijske aktivnosti bili su kombuha napitak od melise optimalne konzumne kiselosti, kao i napici većih vrednosti titrabilne kiselosti. Antioksidativna aktivnost prema DPPH i $\cdot\text{OH}$ radikalima fermentacione podloge sa melisom i crnim čajem praćena je tokom sedmodnevne fermentacije ESR spektroskopijom, a istovremeno je praćen i sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja, kao i pojedinačnih fenolnih komponentata, da bi se utvrdio njihov uticaj na antioksidativnu sposobnost napitka. Rezultati ispitivanja antiproliferativne aktivnosti konzumnog kombuha napitka od melise su posebno značajni imajući u vidu da u literaturi nema podataka o ispitivanjima ovakvog tipa, a mogu doprineti budućim kliničkim istraživanjima terapeutskih efekata kombuha napitaka.

Rezultati ispitivanja funkcionalnih karakteristika kombuhe od melise trebali bi da ukažu na to da li ovaj napitak ima veći biološki potencijal u odnosu na tradicionalni napitak dobijen od crnog čaja.

4.4.1. Antibakterijska aktivnost kombuhe od melise

Kao test mikroorganizmi za ispitivanje antibakterijske aktivnosti kombuhe od melise korišćeni su izolati bakterija iz namirnica i vode za piće (Tabela 6) koji su manje osetljivi na ekološke faktore u odnosu na referentne sojeve ispitane u prethodnim istraživanjima (Velićanski, 2008), a mogu predstavljati potencijalni rizik od kontaminacije čajne gljive, odnosno samog napitka mikroorganizmima iz okruženja. Pored toga ispitano je antibakterijsko delovanje kombuhe prema bakterijama mlečne kiseline, koje kao stanovnicima intestinalnog trakta zavređuju posebnu pažnju.

U cilju prikupljanja uzoraka za ispitivanje antibakterijske aktivnosti kombuhe od melise, pripremljena podloga je inokulisana napitkom dobijenim iz dve sukcesivne fermentacije na čaju melise. Inokulum je dodat u količini 10% (v/v), a imao je sledeće parametre: pH = 3,12, TA = 5,6 g/l, broj kvasaca = 6,68 log cfu/ml, broj bakterija sirćetnog vrenja = 6,45 log cfu/ml. Tokom fermentacije praćeni su osnovni fizičko-hemijski parametri čije su vrednosti prikazane u Tabeli 12.

Tabela 12. Vrednosti pH i TA uzoraka za ispitivanje antibakterijske aktivnosti

Trajanje fermentacije (dani)	pH	TA (g/l)
3	3,12 (0,03)*	4,44 (0,01)
4	3,04 (0,02)	6,29 (0,08)
6	2,99 (0,1)	8,12 (0,06)

* standardna devijacija

Optimalna konzumna kiselost postignuta je nakon tri dana fermentacije. U cilju utvrđivanja nosilaca aktivnosti fermentacija je produžena da bi se dobili napici većeg sadržaja kiselina, za šta su odabrani uzorci nakon 4 i 6 dana fermentacije. Rezultati iz Tabele 12 ukazuju da se fermentacija odvijala nešto brže u odnosu na onu čiji su parametri prikazani na

Slici 19, kada su dodatna 24h bila potrebna za postizanje istih vrednosti kiselosti. Verovatno je na to uticao primenjeni inokulum, koji je u ovom ogledu imao i veću kiselost i veći broj ćelija u odnosu na parametre prikazane u Tabeli 11. Rezultati ispitivanja antibakterijske aktivnosti kombuha napitaka od melise prikazani su u Tabelama 13-15.

Kombuha napici od melise, rastvori sirćetne kiseline i toplotno denaturisani kombuha napici pokazali su izraženu antibakterijsku aktivnost prema svim ispitanim Gram-negativnim bakterijama. Najveća zona inhibicije javila se prema *Ent. Cloacae* (Slika 21^a), *Cit. Freundii* i *Proteus* sp. Kod većine test mikroorganizama rastvor sirćetne kiseline ima istu ili nešto veću aktivnost u odnosu na samu kombuhu. Takođe, sa porastom kiselosti napitka, povećavaju se i zone inhibicije, kako u uzorcima samog napitka, tako i u rastvorima sirćetne kiseline kao kontrolnim uzorcima (za većinu mikroorganizama statistički značajne razlike, $p < 0,05$), što potvrđuje navode iz prethodnih istraživanja (Steinkraus i sar., 1996; Greenwalt i sar., 1998; Sreeramulu i sar., 2000) da je sirćetna kiselina glavni nosilac antimikrobne aktivnosti. Međutim, u slučaju *Ent. Cloacae* i *Proteus* sp. Antibakterijska aktivnost kombuha napitka sa titrabilnom kiselošću (4,44 g/l) je veća u poređenju sa rastvorom sirćetne kiseline (statistički značajna razlika, $p < 0,05$), što ukazuje na prisustvo i drugih aktivnih komponenata u napitku osim sirćetne kiseline. U napicima povećane kiselosti nema značajne razlike u aktivnosti sirćetne kiseline i kombuhe za ova dva mikroorganizma. Toplotno denaturisana kombuha pokazuje jednaku ili manju aktivnost od kombuhe i sirćetne kiseline, čime se ukazuje da nosioci antibakterijske aktivnosti kombuhe nisu proteini, odnosno termolabilne komponente. Nakon neutralisanja napici su pokazali samo bakteriostatsku aktivnost (tj. Javile su se zone redukovano rasta oko bunarčića) prema *E. Coli*, *Cit. Freundii* i *Salmonella* sp., ali je ona manja od bakteriostatskih zona za kombuhu i toplotno denaturisanu kombuhu. Prema ostalim Gram-negativnim bakterijama, *Ent. Cloacae*, *Proteus* sp. I *P. Aeruginosa* (Slika 21b) delovanje neutralisane kombuhe izostaje, ali na te bakterije ni kombuha ni toplotno denaturisana kombuha nisu ispoljile bakteriostatsko delovanje.

Poredeći rezultate antibakterijske aktivnosti kombuhe prema Gram-negativnim (Tabela 13) i Gram-pozitivnim bakterijama (Tabela 14), zapaža se da su Gram-pozitivne bakterije manje osetljive jer baktericidnu aktivnost nije ispoljila ni kombuha ni sirćetna kiselina prema čak tri izolata: *St. Equorum* (slika 21c), *St. Saprophyticus* i *Bacillus* sp. Za date izolate i toplotno denaturisana kombuha je pokazala zonu redukovano rasta, dok je delovanje neutralisane kombuhe izostalo. Kombuha i sirćetna kiselina delovale su baktericidno jedino prema *Listeria monocytogenes* i *Listeria innocua*, i njihova aktivnost takođe se povećava sa porastom kiselosti. Rezultati ukazuju da je i kod Gram-pozitivnih bakterija glavni nosilac aktivnosti sirćetna kiselina i da se sa povećanjem njene koncentracije aktivnost povećava (statistički značajne razlike, $p < 0,05$).

Tabela 13. Antibakterijska aktivnost kombuha napitaka od melise prema Gram-negativnim bakterijama, izražena kao prečnik zone inhibicije, mm(sd)

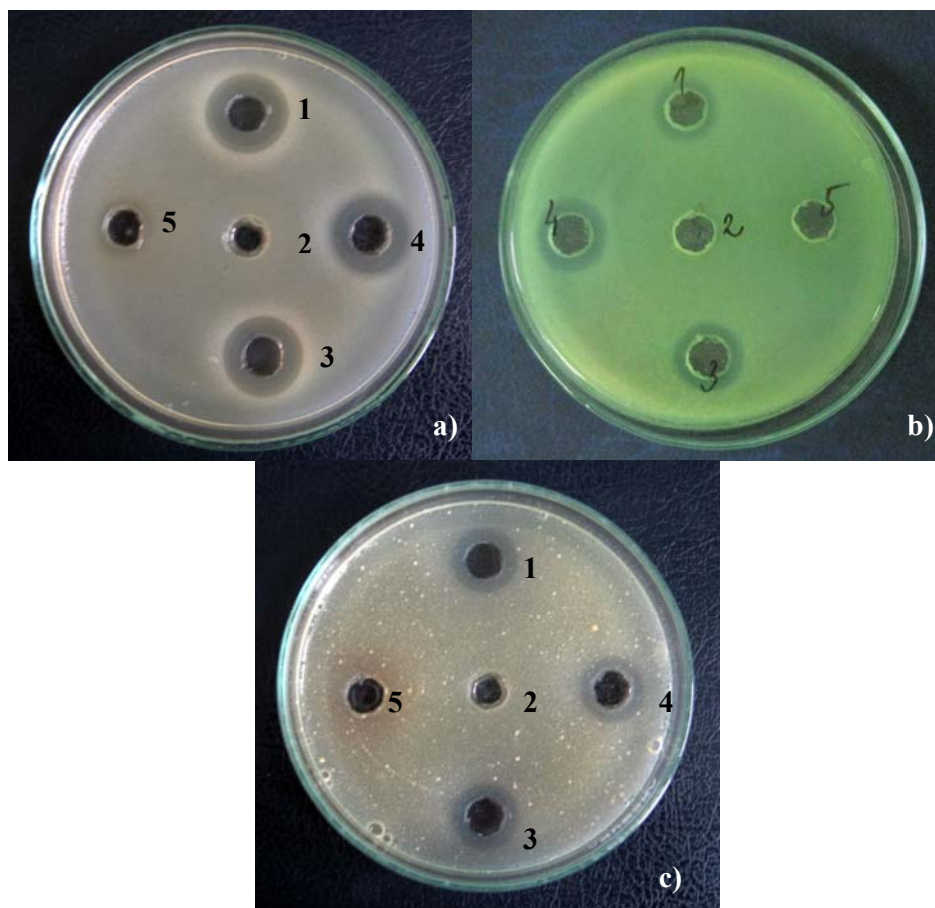
Izolat		Kombuha		Sirćetna kiselina	Toplotno denaturisana kombuha		Neutralisana kombuha
		A	B	A	A	B	B
<i>E.coli</i>	1	11,33(0,58) ^a	28,0(1,0)	11,33 (0,58) ^a	11,33(0,58)	29,0(1,0)	25,67(0,58)
	2	13,67(0,58) ^b	24,33(0,58)	14,33 (0,58) ^b	13,33(0,58)	29,0(1,0)	25,33(0,58)
	3	16,33(0,58) ^c	34,0(1,0)	16,33(0,58) ^c	14,67(0,58)	33,0(1,0)	29,33(0,58)
<i>Salm. Sp.</i>	1	11,67(0,58) ^a	30,0(1,0)	12,33(0,58) ^a	11,67(0,58)	29,33(1,15)	24,33(0,58)
	2	13,33(0,58) ^b	30,33(0,58)	15,33(0,58) ^b	13,0(0,00)	30,33(0,58)	22,67(1,53)
	3	15,0(0,0) ^c	29,33(1,15)	17,67(0,58) ^c	15,67(0,58)	31,67(0,58)	26,33(0,58)
<i>Ent. Cloacae</i>	1	16,0(0,0) ^{a,II}	nd	12,0(0,0) ^{a,I}	15,33(0,58)	nd	nd
	2	17,67(0,58) ^b	nd	16,67(0,58) ^b	17,67(0,58)	nd	nd
	3	18,67(0,58) ^b	nd	17,67(0,58) ^b	18,33(0,58)	nd	nd
<i>Cit. freundii</i>	1	13,67(0,58) ^a	26,33(1,15)	12,33(0,58) ^a	13,67(0,58)	26,0(0,0)	23,0(0,0)
	2	16,0(0,0) ^b	26,33(0,58)	17,67(0,58) ^b	16,0(0,0)	26,33(1,52)	22,67(0,58)
	3	17,0(0,0) ^c	23,67(0,58)	18,0(0,0) ^b	16,0(0,0)	25,0(0,0)	23,0(0,0)
<i>Proteus sp.</i>	1	12,33(0,58) ^{a,II}	nd	10,33(0,58) ^{a,I}	12,0(0,0)	nd	nd
	2	16,0(1,0) ^b	nd	15,33(0,58) ^b	15,0(0,0)	nd	nd
	3	18,67(0,58) ^c	nd	18,67(0,58) ^c	17,67(0,58)	nd	nd
<i>P. aeruginosa</i>	1	11,67(0,58) ^a	nd	11,33(0,58) ^a	11,33(0,58)	nd	nd
	2	12,67(0,58) ^a	nd	13,67(0,58) ^b	12,67(0,58)	nd	nd
	3	15,33(0,58) ^b	nd	16,67(0,58) ^c	15,67(0,58)	nd	nd

A-čista zona oko bunarčića; B-zona smanjenog rasta; 1-Kombuha i kontrolni uzorci sa TA = 4,4 g/l; 2-Kombuha i kontrolni uzorci sa TA = 6,29 g/l; 3-Kombuha i kontrolni uzorci sa TA = 8,12 g/l; nd-nije detektovana antimikrobna aktivnost. Različita slova u istoj koloni (za svaki pojedinačni mikroorganizam) ukazuju na statistički značajne razlike (p<0,05). Različiti rimski brojevi u istom redu ukazuju na statistički značajne razlike (p<0,05).

Tabela 14. Antibakterijska aktivnost kombuha napitaka od melise prema Gram-pozitivnim bakterijama, izražena kao prečnik zone inhibicije, mm(sd)

Izolat		Kombuha		Sirćetna kiseline		Toplotno denaturisana kombuha		Neutralisana kombuha
		A	B	A	B	A	B	B
<i>List. Monocytogenes</i>	1	11,0(0,0) ^a	nd	11,0(0,0) ^a	nd	10,0(0,0)	nd	nd
	2	13,33(0,58) ^b	nd	13,67(0,58) ^b	nd	12,33(0,58)	nd	nd
	3	17,0(0,0) ^c	nd	17,0(0,0) ^c	nd	14,33(0,58)	nd	nd
<i>List. Innocua</i>	1	11,0(0,0) ^a	nd	10,67(0,58) ^a	nd	11,33(1,15)	nd	nd
	2	14,33(0,58) ^b	nd	14,67(0,58) ^b	nd	13,67(0,58)	nd	nd
	3	17,67(0,58) ^c	nd	16,33(0,58) ^c	nd	17,33(0,58)	nd	nd
<i>St. equorum</i>	1	nd	11,0(0,0) ^a	nd	11,0 (0,0) ^a	nd	10,33(0,58)	nd
	2	nd	14,0(0,0) ^b	nd	15,0 (0,0) ^b	nd	14,0(0,0)	nd
	3	nd	15,33(0,58) ^c	nd	15,33 (0,58) ^b	nd	14,67(0,58)	nd
<i>St. saprophyticus</i>	1	nd	11,67(0,58) ^a	nd	10,33 (0,58) ^a	nd	11,67(0,58)	nd
	2	nd	15,67(0,58) ^b	nd	15,0 (0,0) ^b	nd	16,0(0,0)	nd
	3	nd	17,67(0,58) ^c	nd	17,0 (0,0) ^c	nd	16,67(0,58)	nd
<i>Bacillus sp.</i>	1	nd	11,67(0,58) ^a	nd	11,38 (0,58) ^a	nd	11,67(0,58)	nd
	2	nd	13,33(0,58) ^b	nd	13,0 (0,0) ^b	nd	14,0(0,0)	nd
	3	nd	15,33(0,58) ^c	nd	15,0 (1,0) ^c	nd	14,67(0,58)	nd

A-čista zona oko bunarčića; B-zona smanjenog rasta; 1-Kombuha i kontrolni uzorci sa TA = 4,4 g/l; 2-Kombuha i kontrolni uzorci sa TA = 6,29 g/l; 3-Kombuha i kontrolni uzorci sa TA = 8,12 g/l; nd-nije detektovana antimikrobna aktivnost. Različita slova u istoj koloni (za svaki pojedinačni mikroorganizam) ukazuju na statistički značajne razlike (p<0,05).



Slika 21. Zone inhibicije za uzorke kombuhe od melise i kontrolne uzorke prema *Enterobacter cloacae* (a), *Pseudomonas aeruginosa* (b) i *Staphylococcus equorum* (c) (1-kombuha kiselosti 8,12 g/l; 2-neutralisana kombuha; 3-toplotno denaturisana kombuha; 4-rastvor sirćetne kiseline; 5-čaj od melise)

Test mikroorganizmi korišćeni u ovim istraživanjima izolovani su iz okruženja (namirnica i vode za piće). Zbog njihove prilagođenosti uslovima okoline moglo bi se pretpostaviti da imaju povećanu otpornost prema različitim faktorima sredine, između ostalih i antimikrobnim. Otpornost ovih izolata potvrđuje se poređenjem sa rezultatima istraživanja Četojević Simin i sar. (2012) koji su ispitali antimikrobnu aktivnost konzumne kombuhe od melise (TA = 4,56 g/l) prema referentnim sojevima istih bakterijskih vrsta. Zone inhibicije za sve ispitane referentne bakterije veće su u odnosu na zone prikazane u Tabelama 13 i 14, a koje se odnose na uporedive sojeve i napitak konzumne kiselosti. U slučaju referentnih sojeva *St. Aureus* i *B. Cereus* aktivnost kombuhe i sirćetne kiseline je baktericidna (Četojević Simin i sar., 2012), dok se kod *Staphylococcus* izolata i *Bacillus* sp. (Tabela 14) javlja samo zona redukovano rasta. Četojević Simin i sar. (2008) ispitali su i antimikrobnu aktivnost konzumnih kombuha napitaka od crnog (TA = 3,55 g/l) i rtanjskog čaja (TA = 3,94 g/l) prema referentnim bakterijama. Zone inhibicije takođe su veće u odnosu na zone prema izolatima prikazane u Tabelama 13 i 14, iako napici od crnog i rtanjskog čaja imaju manju kiselost u odnosu na kombuhu od melise (TA = 4,44 g/l).

U istraživanju Greenwalt i sar. (1998) kombuha napici od crnog i zelenog čaja sa 7,2 g/l sirćetne i 33 g/l titrabilne kiselosti pokazali su izraženiju antimikrobnu aktivnost prema testiranim mikroorganizmima u odnosu na kombuhu od melise sa 8,12 g/l kiselina (Tabele 13 i 14). Razlog je u većem sadržaju ukupnih kiselina koje osim sirćetne, takođe doprinose

antimikrobnoj aktivnosti, ali i u primenjenoj metodologiji ispitivanja. Greenwalt i sar. (1998) koristili su papirne diskove (prečnika 2,5 cm) na koje su naneti test uzorci, ali se ne navodi u kojoj količini. Agar difuzionu metodu sa „bunarčićima“ u inokulisanoj podlozi su koristili Sreeramulu i sar. (2000) pri ispitivanju antimikrobne aktivnosti kombuhe od crnog čaja kiselosti 8,5 g/l. Poredeći njihove rezultate sa rezultatima antimikrobne aktivnosti kombuhe od melise kiselosti 8,12 g/l (Tabele 13 i 14) može se konstatovati da je slična antimikrobna aktivnost dobijena za *Ent. Cloacae*, *P. Aeruginosa* i *List. Monocytogenes*. Takođe, i u istraživanju Sreeramulu i sar. (2000), Gram-pozitivne bakterije *Staphylococcus* spp. I *B. Cereus* pokazale su se otpornijim u odnosu na druge test mikroorganizme.

U cilju određivanja aktivnih komponenata u kombuhi, Sreeramulu i sar. (2001) su ispitali napitak od crnog čaja sa oko 8,5 g/l sirćetne kiseline agar difuzionom metodom sa „bunarčićima“ sa 100 µl uzorka. Delovanje prema *E. Coli*, *Salm. Typhimurium* i *Salm. Enteritidis* je približno isto (20-30 mm) kao i delovanje kombuhe od melise sa 8,12 g/l kiseline (Tabela 13), što navodi na zaključak da su sadržaj kiselina i primenjena metodologija najdirektnije povezani sa dobijenim rezultatima. Kako bi potvrdili da nosioci antimikrobne aktivnosti kombuhe nisu proteini, autori su kombuha napitku nakon dvonedeljne fermentacije dodali enzime: tripsin, hemotripsin i proteinazu K. Utvrđeno je da dodatkom enzima ne dolazi do povećanja antimikrobne aktivnosti u odnosu na netretiranu kombuhu, čime je isključena mogućnost da su aktivne komponente u kombuhi proteini. Da bi ispitali da li su aktivne komponente rastvorljive u vodi ili ne, izvršena je ekstrakcija kombuhe sa različitim organskim rastvaračima (n-butanol, dietil etar, n-propanol, hloroform), a zatim određena antimikrobna aktivnost vodene i organske faze. Ni u jednom slučaju organska faza nije pokazala antimikrobnu aktivnost, dok je vodena faza aktivna prema svim test mikroorganizmina. Autori su zaključili da su aktivne komponente rastvorljive u vodi i da to nisu samo organske kiseline (Sreeramulu i sar., 2001).

Antimikrobna aktivnost kombuha napitaka od lekovitih biljaka ispitana je u radu Battikh i sar. (2012). Dobijeni napici nakon 21 dana fermentacije imali su pH vrednost od 2,4-3,1. Sadržaj kiselina nije naveden, ali na osnovu dužine fermentacije i pufernog kapaciteta kombuhe, možemo pretpostaviti da su napici bili kiseliji od kombuha napitaka od melise ispitanih u ovom radu. Shodno tome, zone inhibicije za Gram-pozitivne bakterije, *Staphylococcus* spp. I *List. Monocytogenes* u radu Battikh i sar. (2012) su veće nego bakteriostatske zone prikazane u Tabeli 14, dok su razlike u delovanju kombuha napitaka prema Gram-negativnim bakterijama bile manje izražene.

Ranija istraživanja antimikrobne aktivnosti kombuhe prema kvascima i plesnima pokazala su da u većini slučajeva antifungalno delovanje izostaje. Tradicionalna konzumna kombuha i kombuha od rtanjskog čaja nisu delovale na *Saccharomyces cerevisiae*, *C. Pseudotropicalis*, *Rhodotorula* sp. I *Asp. Niger*, dok je minimalna aktivnost zapažena kod *Asp. Flavus* i *Penicillium aurantiogriseum* (Četojević Simin i sar., 2008). Prema istim test mikroorganizmima konzumna kombuha od melise i kontrolni uzorci nisu pokazali antifungalnu aktivnost u radu Četojević Simin i sar. (2010). Ovi rezultati se objašnjavaju time što su kvasci i plesni acidotolerantni mikroorganizmi za razliku od većine bakterija. Zbog mogućnosti njihovog preživljavanja u takvoj sredini postoji realna opasnost od kontaminacije radne kulture pri pripremi kombuha napitka u kućnim uslovima.

Izvesna odstupanja rezultata antimikrobne aktivnosti kombuhe dobijena od različitih autora su očekivana. Razlike u rezultatima antimikrobne aktivnosti ne javljaju se samo pri ispitivanju kombuhe i kontrolnih uzoraka, već su prisutne i kod ispitivanja biljnih ekstrakata, i pojedinih antimikrobnih komponenata, kao npr. flavonoida (Cushnie i Lamb, 2005). Jedan od razloga jesu različite metode ispitivanja antimikrobne aktivnosti (agar difuzionu metoda sa papirnim diskovima, bunarčićima ili cilindrima, odnosno dilucionu metoda, mikrodilucionu i makrodilucionu) zbog čega se difuzija aktivnih komponenata ne odvija na isti način i u istom

stepenu, tako da nije uvek moguće izvesti pouzdana kvantitativna merenja. Osim toga, broj ćelija u primenjenim inokulumima i količina inokuluma nisu standardizovani, a u nekim israživanjima taj podatak i nije naveden. Količina i sastav podloge (bujona ili agara) takođe može uticati na rezultat, zatim veličina bunarčića i papirnih diskova, količina antimikrobne supstance, period inkubacije, rastvarači za pojedine ekstrakte itd. Zato je potrebno standardizovati ove metode kako bi se izbegle značajne razlike u rezultatima koje su posledica ovih faktora (Cushnie i Lamb, 2005). Takođe, kod određivanja minimalnih inhibitornih koncentracija (MIC) (npr. Kod flavonoida, ali to je često slučaj i sa ekstraktima biljaka) aktivne supstance mogu da se istalože, što dovodi do smanjenja kontakta ispitivanog soja i supstance, a moguće je i da se talog zameni sa bakterijskim rastom, čime se može dobiti lažno negativan rezultat (Cushnie i Lamb, 2005).

Čaj od melise (5 g/l) ispitivan u ovom radu pokazao je bakteriostatsko delovanje samo prema *Ent. Cloacae* (zona inhibicije 11,33 mm, Slika 21a) i *Proteus* sp. (zona inhibicije 15,67 mm). Kako je već navedeno, ove bakterije su bile najosetljivije i prema kombuhi i kontrolnim uzorcima (Tabela 13), zbog čega su jedino one pokazale osetljivost i prema čaju. U naučnoj literaturi malo je radova koji se bave antimikrobnom aktivnošću nefermentisanih čajeva (dekokta). Uglavnom su ispitivana etarska ulja ili ekstrakti biljaka koji sadrže znatno veću količinu aktivnih supstanci nego čajni napici pripremljeni u koncentracijama prihvatljivim za konzumente, zbog čega imaju i veću antimikrobnu aktivnost. Poznato je da etarsko ulje melise poseduje i antibakterijsku i antifungalnu aktivnost (Mimica Dukić i sar., 2004), dok je antimikrobnu aktivnost etanolnog ekstrakata ispitivao Ertürk (2006). Koncentracija ekstrakata bila je 6,25, 12,5, 25 i 50 mg/ml, a ispitani su u količini 400 µl prema: *B. Subtilis*, *P. Aeruginosa*, *St. Aureus*, *St. Epidermidis*, *E. Coli*, *C. Albicans* i *Asp. Niger*. Minimalna inhibitorna koncentracija ekstrakata melise prema *St. Aureus*, *St. Epidermidis* i *E. Coli* bila je 10 mg/ml, prema *B. Subtilis* i *P. Aeruginosa* 15 mg/ml, prema *Asp. Niger* 12,5 mg/ml i prema *C. Albicans* 25 mg/ml. Osim ekstrakata melise u ovom radu ispitano je još 10 lekovitih biljaka, od kojih su neke pokazale istu antibakterijsku aktivnost kao korišćene kontrole (antibiotici i antimikotici), a neke su imale čak veću antifungalnu aktivnost. Zato autor predlaže da dalja istraživanja treba usmeriti na izolovanje aktivnih komponenata iz biljaka, čime bi se smanjila doza čistih ekstrakata za postizanje antimikrobne aktivnosti (Ertürk, 2006). U istraživanju Uzun i sar. (2004), etanolni i petroletarski ekstrakti melise nisu inhibirali rast ni jednog od deset test mikroorganizama. Koncentracija ekstrakta bila je 10 mg/ml, a količine primenjene u istraživanjima nisu navedene i verovatno su bile nedovoljne da inhibiraju rast test mikroorganizama.

Nosioci antimikrobne aktivnosti biljnih ekstrakata su fenolna jedinjenja, ali i proantocijanidini i tanini, a osetljivost bakterija na fenolna jedinjenja zavisi od bakterijske vrste i strukture molekula (Almajano i sar., 2008). Naveći antimikrobni efekat imaju EGCG i EGC, zbog čega crni i zeleni čaj imaju veću antimikrobnu aktivnost u odnosu na crveni, beli i čajevе sa dodacima mente, melise, majčine dušice, hibiskusa, vanile, cimeta i raznih aroma (Gramza i Korczak, 2005; Cushnie i Lamb, 2005; Almajano i sar., 2008). Zbog niskog sadržaja fenolnih jedinjenja čajevi koprive i mente ne pokazuju antimikrobnu aktivnost, a afrički crveni čaj (rooibos) iako nema katehina, pokazuje slabu antimikrobnu aktivnost prema *B. Cereus*, što ukazuje da i druge komponente osim katehina (kao što su: aspalatin, izoorijentin, orijentin i rutin) poseduju biološku aktivnost (Almajano i sar., 2008).

Glavna polifenolna komponenta u ekstraktu melise je ruzmarinska kiselina koju su Mencherini i sar. (2007) izolovali iz nadzemnih delova biljke (stabljika i listovi) u cilju utvrđivanja njene biološke aktivnosti. Uporedo je ispitana i antimikrobna aktivnost etanolnog ekstrakta biljke. Ekstrakt i ruzmarinska kiselina pokazali su veću antimikrobnu aktivnost prema Gram-pozitivnom bakterijama u odnosu na Gram-negativne bakterije, kvasce i plesni. Minimalna inhibitorna koncentracija ruzmarinske kiseline prema *St. Aureus* i *St. Epidermidis*

bila je 0,12 mg/ml, a ekstrakata prema *B. Spizizenii*, 0,5 mg/ml. Prema Gram-negativnim bakterijama, kvascima i plesnima minimalne inhibitorne koncentracije bile su veće od 2 mg/ml. Minimalne baktericidne koncentracije bile su u opsegu 0,12-16 mg/ml, što je potvrdilo da ruzmarinska kiselina ima baktericidni i fungicidni efekat i da je ona glavna bioaktivna komponenta u ekstraktima melise. Ipak, u istraživanju Moreno i sar. (2006) ruzmarinska kiselina nije pokazala antimikrobnu aktivnost, verovatno zbog toga što je ona primenjena u niskim koncentracijama (5-250 µg/ml).

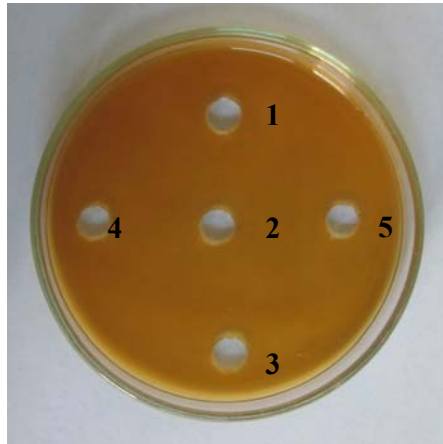
Antibakterijsko delovanje kombuha napitaka i kontrolnih uzoraka prema bakterijama mlečne kiseline prikazano je u Tabeli 15.

Tabela 15. Antibakterijska aktivnost kombuha napitaka od melise prema bakterijama mlečne kiseline

Izolat		Kombuha	Sirćetna kiselina	Toplotno denaturisana kombuha	Neutralisana kombuha
		A/B	A/B	A/B	A/B
<i>L. hilgardii</i>	1	nd	nd	nd	nd
	2	nd	nd	nd	nd
	3	nd	nd	nd	nd
<i>L. fermentum</i>	1	nd	nd	nd	nd
	2	nd	nd	nd	nd
	3	nd	nd	nd	nd
DELVO-YO G MY-1821	1	nd	nd	nd	nd
	2	nd	nd	nd	nd
	3	nd	nd	nd	nd

A-čista zona oko bunarčića; B-zona smanjenog rasta; 1-Kombuha i kontrolni uzorci sa TA = 4,4 g/l; 2-Kombuha i kontrolni uzorci sa TA = 6,29 g/l; 3-Kombuha i kontrolni uzorci sa TA = 8,12 g/l; nd-nije detektovana antimikrobna aktivnost.

U dosadašnjim istraživanjima antimikrobne aktivnosti kombuhe, BMK nisu bile predmet ispitivanja, već je ono bilo usmereno uvek ka patogenim i uslovno patogenim vrstama. Kombuha napitak od melise i kontrolni uzorci nisu ispoljili antibakterijsku aktivnost prema testiranim izolatima bakterija mlečne kiseline, *L. fermentum* (Slika 22) i *L. hilgardii*. Antibakterijska aktivnost prema komercijalnoj starter kulturi koja sadrži i streptokoke i laktobacile ispitana je na dve podloge, ali ni na MRS agaru (za laktobacile) ni na M17 agaru (za laktokoke) kombuha i kontrolni uzorci nisu pokazali aktivnost. Za razliku od ostalih testiranih bakterijskih sojeva (Tabele 13 i 14) prema kojima je kombuha ispoljila antimikrobno delovanje, ona nije delovala inhibirajuće na BMK. Ovi rezultati bi mogli da ukažu na selektivno delovanje kombuha napitaka prema mikroorganizmima koji kolonizuju digestivni trakt ljudi, represijom rasta patogenih i uslovno patogenih vrsta. Odsustvo delovanja kombuhe prema BMK se može objasniti njihovom otpornošću prema kiselinama kombuhe. To je indirektan dokaz da su kiseline aktivne komponente u kombuha napitku.



Slika 22. Odsustvo zona inhibicije za uzorke kombuhe od melise i kontrolne uzorke prema *Lactobacillus fermentum* (1-kombuha kiselosti 8,12 g/l; 2-neutralisana kombuha; 3-toplotno denaturisana kombuha; 4-rastvor sirćetne kiseline; 5-čaj od melise)

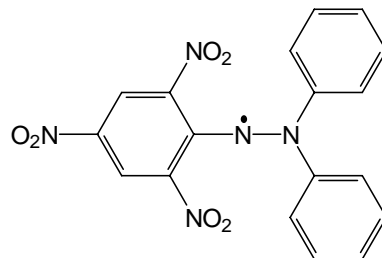
Malo je podataka u literaturi o ispitivanju antimikrobne aktivnosti biljnih ekstrakata i čajnih napitaka prema BMK. U istraživanju antimikrobne aktivnosti infuzuma crnog, zelenog i drugih čajeva (1,5 g/100ml vode), Almajano i sar. (2008) su u test mikroorganizme uvrstili i *Lactobacillus acidophilus*. Od ispitanih mikroorganizama (*B. Cereus*, *Mi. Luteus*, *E. Coli*, *P. Aeruginosa*, *C. Albicans*) najosetljivija vrsta bila je *B. Cereus*, dok su se Gram-negativne vrste pokazale kao otpornije, što se objašnjava strukturom ćelijskog zida. S obzirom da antimikrobna aktivnost zavisi od soja, ali i od koncentracije i količine ekstrakata, ovde se izostanak većeg antimikrobnog efekta objašnjava ograničenim kapacitetom diska (naneto je 50 µl infuzuma), iako je koncentracija čaja bila visoka (15 g/l). Testirani infuzumi nisu delovali na *Lactobacillus acidophilus*, što je u skladu sa navodima Gramza i Korczak (2005) po kojima polifenoli iz čaja mogu da inhibiraju rast klostridija i *He. Pylori*, ali ne i sojeva BMK koji naseljavaju intestinalni trakt.

Sojevi BMK: *L. plantarum*, *L. reuteri*, *L. acidophilus*, *L. delbrueckii* ssp. *Bulgaricus*, *Lc. lactis*, *Ln. Mesenteroides*, *S. Thermophilus* i dr. Izolovani iz fermentisanih proizvoda (mlad sir, grčki sir, jogurt, fermentisane kobasice, probiotski proizvodi itd.) pokazuju visoku prirodnu (urođenu) otpornost prema mnogim antibioticima, kao npr. tetraciklinu, hloramfenikolu, penicilinu, neomicinu, ampicilinu, vankomicinu, eritromicinu itd. (Mathur i Singh, 2005; Flórez i sar., 2005). Njihova otpornost razlikuje se između pojedinih rodova, ali i između pojedinih vrsta u okviru istog roda. Potvrđena je otpornost i referentnih sojeva *L. plantarum*, *Bi. Longum*, *S. Thermophilus* i *Lc. lactis* prema velikom broju antibiotika (Kushiro i sar., 2009). Istraživanja Velićanski (2008) pokazala su da je antimikrobna aktivnost komercijalnih antibiotika znatno veća u odnosu na aktivnost kombuhe i odgovarajućih kontrolnih uzoraka prema istim test mikroorganizmima. S obzirom da BMK imaju visoku prirodnu otpornost prema mnogim antibioticima, ne iznenađuje izostanak antibakterijskog delovanja kombuhe i kontrolnih uzoraka prema ovim bakterijama (Tabela 15).

4.4.2. Antioksidativna aktivnost čajnih napitaka, fermentacionih tečnosti i kombuha napitaka ESR spektralnom analizom

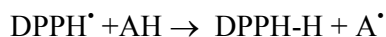
U cilju ispitivanja antioksidativne aktivnosti čajnih napitaka, fermentacionih tečnosti i kombuha napitaka od melise i crnog čaja tokom sedmodnevne kombuha fermentacije, definisana su dva model sistema: model sistem sa stabilnim DPPH radikalima i Fentonov reakcion sistem sa hidroksil radikalima.

DPPH radikali su stabilni slobodni radikali čija je hemijska struktura prikazana na Slici 23.

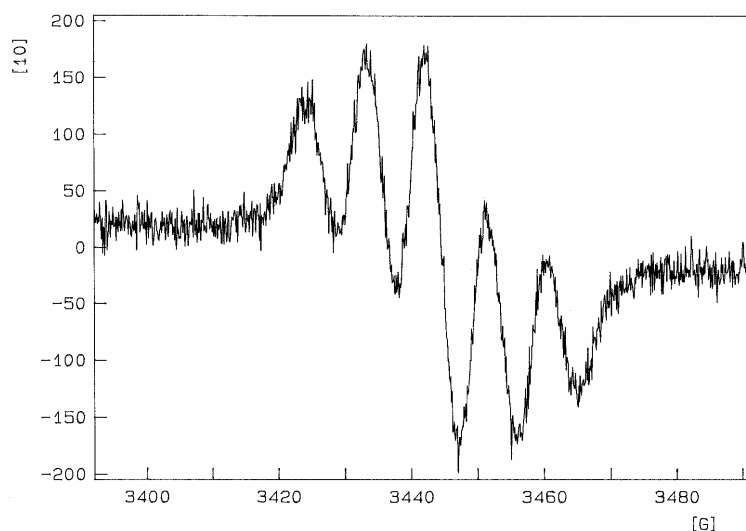


Slika 23. Hemijska struktura DPPH radikala

Antioksidanti, prisutni u ispitivanim uzorcima, različitim hemijskim transformacijama redukuju stabilne DPPH radikale u DPPH-H sledećim reakcionim mehanizmom:



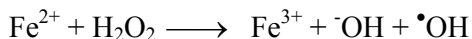
Ove hemijske promene se mogu pratiti spektrofotometrijski preko transformacije boje od ljubičaste do žute, ili ESR spektrometrijski direktnim merenjem koncentracije DPPH radikala. Na Slici 24 prikazan je ESR spektar stabilnih DPPH slobodnih radikala slepe probe (0,4 mM metanolni rastvor DPPH radikala).



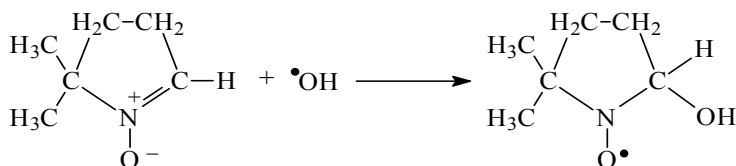
Slika 24. ESR spektar stabilnih DPPH radikala (slepa proba)

Hiperfina struktura ESR spektra stabilnih DPPH radikala potiče od interakcije nesparenog elektrona i dva ^{14}N atoma ($I=1$). Sastoji se od pet linija relativnog intenziteta 1:2:3:2:1. Konstanta hiperfinog cepanja ima vrednost $a_{\text{N}}=9,03\text{G}$.

Visokoreaktivni slobodni hidroksil radikali ($\bullet\text{OH}$ radikali) u ispitivanim model sistemima nastaju mehanizmom Fentonove reakcije, prikazanom sledećom hemijskom jednačinom:

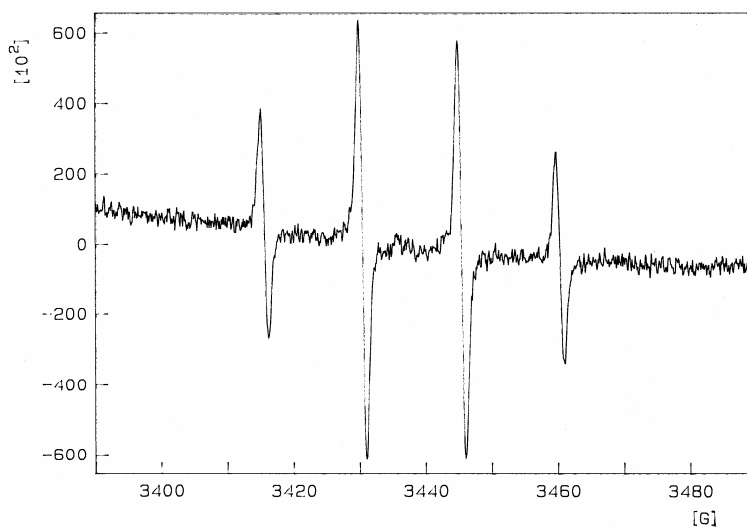


U prisustvu spin trapa, DMPO, nastaju stabilni nitroksid radikali (spin-adukti) sledećim reakcionim mehanizmom (Slika 25):



Slika 25. Mehanizam nastajanja stabilnih nitroksid radikala

ESR spektar DMPO-OH spin adukata nastalih u model sistemu mehanizmom Fentonove reakcije (slepa proba) prikazan je Slikom 26.



Slika 26. ESR spektar DMPO-OH spin adukata Fentonovog model sistema (slepa proba)

Hiperfina struktura ESR spektra (Slika 26) DMPO-OH spin-adukata potiče od interakcije nesparenog elektrona i jednog ^{14}N atoma ($I=1$) i jednog H atoma ($I=1/2$) i sastoji se iz četiri linije, relativnog odnosa intenziteta 1:2:2:1. Konstante hiperfinog cepanja imaju vrednosti $a_{\text{N}}=14,9\text{ G}$ i $a_{\text{H}}=14,9\text{ G}$.

Intenzitet ESR signala direktno je proporcionalan koncentraciji nastalih DMPO-spin adukata. U prisustvu čajnih i kombuha napitaka uočava se očuvanje hiperfine strukture spektra (broja linija, relativnog odnosa intenziteta linija i vrednosti konstanti hiperfinog cepanja), ali se intenziteti ESR signala snižavaju.

4.4.2.1. Sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja i HPLC analiza fenolnih komponenata u čajnim napicima, fermentacionim tečnostima i kombuha napicima od melise i crnog čaja

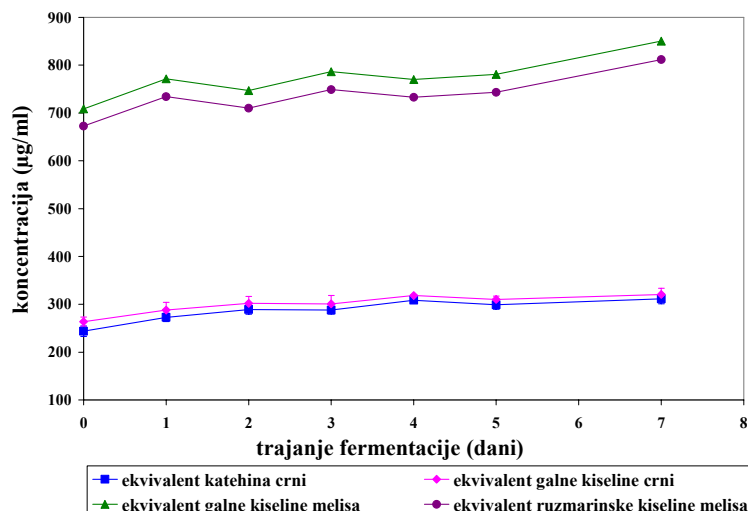
Za antioksidativnu aktivnost različitih čajeva najodgovornija su fenolna jedinjenja (Capecka i sar., 2005; Łuczaj i Skrzydlewska, 2005; Sharangi, 2009), zbog čega je određivan njihov ukupan sadržaj u čajnim napicima od melise i crnog čaja (Tabela 16), kao i fermentacionim tečnostima i gotovim kombuha napicima (Slika 27). Sadržaj fenolnih jedinjenja u uzorcima sa čajem melise izražen je kao ekvivalent galne i ruzmarinske kiseline. Galna kiselina izabrana je jer je u većini naučnih radova upravo na ovaj način izražen sadržaj fenolnih jedinjenja. S obzirom da je u čaju melise glavna fenolna komponenta ruzmarinska kiselina (Carnat i sar., 2008; Dastmalchi i sar., 2008), dobijeni rezultati su izraženi i kao ekvivalent galne kiseline, i kao ekvivalent ruzmarinske kiseline. Kod uzoraka sa crnim čajem, sadržaj fenolnih jedinjenja izražen je kao ekvivalent galne kiseline i katehina jer su one najčeće izolovane dominantne komponente u crnom čaju (Del Rio i sar., 2004; Marques i Farah, 2009).

Tabela 16. Sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja u čajnim napicima ($\mu\text{g/ml}$ (sd))

Sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja	Čaj od melise	Crni čaj
μg ekvivalenata katehina/ml čaja	-	169,47 (4,84)
μg ekvivalenata galne kiseline/ml čaja	660,94 (5,24)	200,95 (4,86)
μg ekvivalenata ruzmarinske kiseline/ml čaja	625,87 (6,18)	-

Čajni napici pripremljeni su u istim koncentracijama kao pri pripremi kombuhe (čaj od melise 5 g/l, crni čaj 3 g/l). S obzirom da je sadržaj fenolnih jedinjenja izražen u $\mu\text{g/ml}$ čajnog napitka, očekivano je da je sadržaj u napitku od melise veći nego kod crnog čaja, jer je za pripremu korišćeno 1,66 puta veća količina listova melise u odnosu na crni čaj. Međutim, sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja, izražen kao ekvivalent galne kiseline, u čaju melise je čak više od tri puta veći nego u napitku od crnog čaja. Ovaj rezultat nije posledica samo veće primenjene količine čaja, već ukazuje da je melisa bogatiji izvor fenolnih jedinjenja od crnog čaja.

Atoui i sar. (2005) su u infuzumu crnog čaja utvrdili sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja od 847 mg/šolji čaja (3,53 mg ekvivalenata galne kiseline/ml čaja), a Almajano i sar. (2008) su detektovali 1844 mg/l infuzuma (1,8 mg ekvivalenata galne kiseline/ml čaja). U infuzumu listova melise (15 g/l) detektovano je 2218 mg ekvivalenata katehina/l čaja. U istraživanjima navedenih autora za pripremu infuzuma korišćena je veća količina čaja (4-5 puta), nego tokom eksperimentalnog dela ove doktorske disertacije. Stoga je i sadržaj fenolnih jedinjenja detektovan u navedenim radovima veći u odnosu na rezultate prikazane u Tabeli 16.



Slika 27. Sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja u fermentacionim tečnostima i kombuha napicima od melise i crnog čaja

Nakon inokulacije podloga sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja se povećao za oko 40 µg/ml (za podlogu sa melisom), odnosno oko 70 µg/ml (za podlogu sa crnim čajem), u odnosu na same čajeve (Tabela 16). U daljem toku fermentacije promene sadržaja ukupnih fenolnih jedinjenja nisu linearne. Tokom kombuha fermentacije podloge sa melisom, u periodu od prvog do drugog dana procesa i od trećeg do četvrtog, smanjuje se sadržaj fenolnih jedinjenja za oko 25 µg/ml, da bi nakon četvrtog dana bio zabeležen porast, te je krajnji sadržaj fenolnih jedinjenja u sedmom danu 850,25 µg/ml (izraženo kao galna kiselina), odnosno 811,62 µg/ml (izraženo kao ruzmarinska). Tokom kombuha fermentacije podloge sa crnim čajem, između drugog i trećeg dana nema promene u sadržaju fenolnih jedinjenja, a do blagog pada za oko 10 µg/ml dolazi između četvrtog i petog dana. Na kraju fermentacije kombuha napitak od crnog čaja sadrži 311,26 µg/ml fenolnih jedinjenja (izraženo kao katehin), odnosno 320,59 µg/ml (izraženo kao galna kiselina). Kao i za same čajeve (Tabela 16), i tokom celog procesa fermentacije sadržaj fenolnih jedinjenja izražen preko ekvivalenta galne kiseline bio je veći za oko 30-40 µg/ml (u podlozi sa melisom), tj. 10-20 µg/ml (u podlozi sa crnim čajem), u odnosu na sadržaj izražen preko dominantnih komponenata. Kao i kod čajnih napitaka i tokom celog procesa sadržaj fenolnih jedinjenja u podlozi sa melisom je od 2,5-2,9 puta veći u odnosu na njihov sadržaj u podlozi sa crnim čajem. Iz navedenih podataka može se utvrditi da podloga sa melisom obezbeđuje dovoljne količine izvora azota mikroorganizmima čajne gljive.

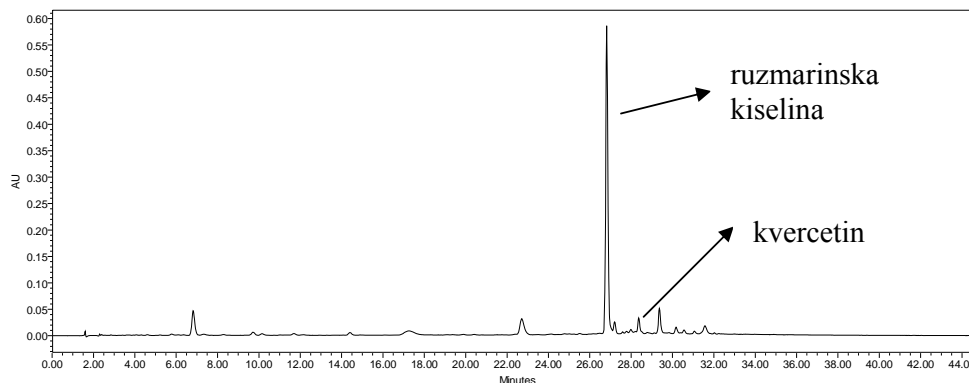
Sadržaj pojedinih fenolnih komponenata u čajnim napicima, fermentacionim tečnostima i kombuha napicima određen HPLC analizom prikazan je u Tabelama 17 (za fermentacionu tečnost sa melisom) i 18 (za fermentacionu tečnost sa crnim čajem), a hromatogrami kombuha napitaka po završetku procesa (sedmog dana fermentacije) na Slikama 28 i 29.

Glavna fenolna komponenta detektovana tokom kombuha fermentacije podloge sa melisom je ruzmarinska kiselina (Tabela 17). Nakon inokulacije podloge, njen sadržaj se povećava za oko 6 µg/ml i do kraja procesa promene u sadržaju ruzmarinske kiseline su neravnomerne, tako da gotov napitak u sedmom danu fermentacije ima manje ruzmarinske kiseline (18,76 µg/ml), nego nakon inokulacije (14,22 µg/ml) i 24h od starta fermentacije (21,71 µg/ml). Između drugog i trećeg dana i četvrtog i petog dana fermentacije sadržaj ruzmarinske kiseline u fermentacionoj tečnosti stagnira. Sadržaj ostalih komponenata (kafene,

hlorogenske, ferulne kiseline i kvercetin) značajno je manji od sadržaja ruzmarinske kiseline i takođe se neravnomerno menja tokom fermentacije.

Tabela 17. HPLC analiza fenolnih jedinjenja u čajnom napitku, fermentacionoj tečnosti i kombuha napitku od melise ($\mu\text{g/ml}$ (sd))

Trajanje fermentacije (dani)	Fenolna jedinjenja					Σ^a
	Ruzmarinska kiselina	Kafena kiselina	Kvercetin	Hlorogenska kiselina	Ferulna kiselina	
0 (zaslađen čaj)	14,22 (0,24)	0,63 (0,03)	1,23 (0,09)	0,9 (0,12)	0,66 (0,05)	17,64
0 (inokulisana podloga)	20,26 (0,55)	1,04 (0,08)	1,12 (0,08)	0,62 (0,06)	4,33 (0,23)	27,33
1	21,71 (0,43)	0,91 (0,07)	1,38 (0,1)	0,59 (0,02)	4,57 (0,23)	26,16
2	18,87 (0,77)	0,75 (0,05)	0,90 (0,08)	0,71 (0,01)	3,32 (0,20)	24,55
3	18,79 (0,55)	0,87 (0,09)	0,61 (0,06)	0,78 (0,05)	2,06 (0,16)	23,11
4	17,12 (0,43)	0,88 (0,1)	0,73 (0,1)	0,73 (0,02)	3,44 (0,13)	22,9
5	16,61 (0,40)	1,05 (0,1)	0,63 (0,05)	0,75 (0,04)	0,65 (0,1)	19,69
7	18,76 (0,52)	1,15 (0,15)	0,99 (0,11)	0,79 (0,03)	3,09 (0,15)	24,78



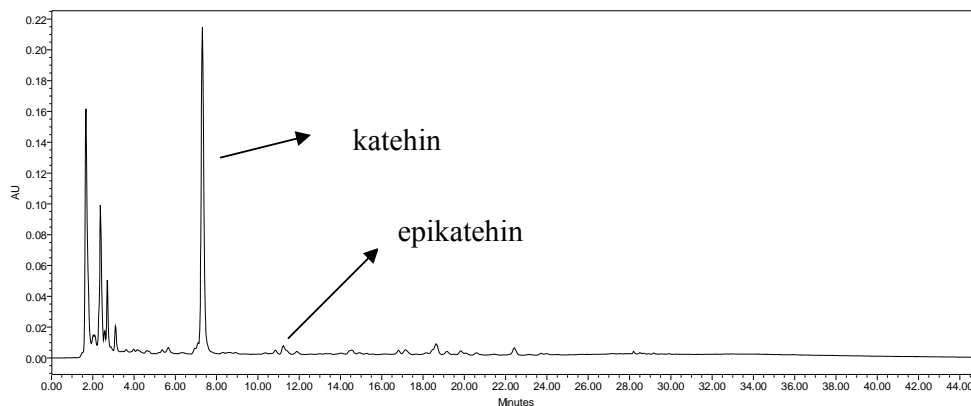
Slika 28. HPLC hromatogram fenolnih komponenata u kombuha napitku od melise

Ruzmarinska kiselina identifikovana je kao glavna fenolna komponenta u suvom listovima melise (frakcija 0,5 mm), infuzumu melise (10 g celih listova/l), kao i u listovima koji ostaju nakon infuzije (potapanja) (Carnat i sar., 1998). Od ukupnih derivata hidroksicimne kiseline (11,29% u listovima i 10,49% u infuzumu) najviše je ruzmarinske: 4,05% u listovima i 3,99% u infuzumu (računato na suhu masu). Tokom infuzije (15 minuta) skoro sve aktivne komponente iz lista prelaze u infuzum, pa tako u listovima nakon potapanja ostaje samo 0,33% ruzmarinske kiseline. Autori navode da jedna šolja (150 ml) čaja od lista

melise (1,5 g) sadrži 150-450 mg fenolnih jedinjenja (od kojih je 60-180 mg ruzmarinske kiseline) i 1,5-4,5 mg etarskog ulja zbog koga je ovaj čaj veoma aromatičan. Navodi se i da su fenolne komponente verovatno uključene u biološku aktivnost čaja, zbog čega čaj pripremljen u maloj koncentraciji ima slabu spazmolitičku aktivnost, dok bi čaj u većim koncentracijama (10-30 g/l) bio mnogo efikasniji farmakološki agens. Žiaková i sar. (2003) su primenom nove tehnike (matrix solid-phase dispersion-MSPD) iz melise izolovali glavne fenolne komponente: ruzmarinsku, kafenu i protokatehinsku kiselinu korišćenjem različitih eluenta. Najveći prinos pojedinačnih komponenata dobijen je primenom eluenta metanol:voda = 60:40 i 20:80, pri pH 2,5. Ipak, ruzmarinske kiseline ima znatno više u odnosu na ostale komponente, oko 20 mg/g, dok se sadržaj ostalih izražava u µg/g. Ruzmarinska i kafena kiselina takođe su dominantne fenolne komponente u ekstraktu melise (etanol:voda = 30:70 v/v), pri čemu je sadržaj ruzmarinske 27,4 mg/g čaja, a kafene čak oko 90 puta manje, tj. 0,3 mg/g (Wang i sar., 2004). Dominantnost ruzmarinske kiseline u odnosu na ostale fenolne komponente prisutna je tokom sedmodnevne kombuha fermentacije (Tabela 17), jer ove kiseline ima oko 20 puta više u odnosu na kafenu kiselinu, kao što su pokazali i drugi istraživači.

Marques i Farah (2009) su u metanolnom ekstraktu melise odredili sadržaj fenolnih komponentata. Ispitivani su mono- i di- estri hlorogenske kiseline (potencijalni antioksidativni i antimikrobni agensi), i po prvi put u melisi identifikovano je šest ovakvih jedinjenja. Među njima najzastupljeniji su: 4,5-dikafeilhinska kiselina (45,5 mg/100g suve mase čaja), 5-kafeilhinska kiselina (17 mg/100g), 3,4-dikafeilhinska kiselina (16,8 mg/100g) i 3-kafeilhinska kiselina (10,6 mg/100g). Ruzmarinska kiselina nije identifikovana, a kafena je druga po zastupljenosti (39,3 mg/100g suve mase čaja). Male su razlike u ukupnom sadržaju derivata hlorogenske kiseline u metanolnom ekstraktu melise i infuzumu (5 g/l), što ukazuje da se zadovoljavajuća ekstrakcija komponenata odvija i prilikom pripreme infuzuma. Sadržaj ovih komponenata u infuzumu melise izražen je u mg/200ml (odnosno, na jednu šolju čaja). Sadržaj kafene kiseline je 0,01-0,16 mg/200ml (0,05-0,8 µg/ml), zavisno od proizvođača čaja, što je uporedivo sa 0,66 µg/ml za čaj melise sa našeg područja (Tabela 17).

Osim dominantne fenolne komponente, ruzmarinske kiseline, čiji je sadržaj 622 mg/100g suve biljke i kafene kiseline (2,68mg/100g), u melisi je po prvi put identifikovana cikorna kiselina (Lee, 2010). Cikorna kiselina, glavna fenolna komponenta ehinacee, otkrivena i kod bosiljka, poseduje antioksidativna, antiinflamatorna, antivirusna i imunostimulativna svojstva. U suvim listovima melise sadržaj cikorne kiseline je 2,23 mg/100g suve mase, dok kod ostalih biljaka iz familije Lamiaceae nije identifikovana (origano, menta, žalfija, majčina dušica, ruzmarin itd.) (Lee, 2010).



Slika 29. HPLC hromatogram fenolnih komponenata u kombuha napitku od crnog čaja

Tabela 18. HPLC analiza fenolnih jedinjenja u čajnom napitku, fermentacionoj tečnosti i kombuha napitku od crnog čaja ($\mu\text{g/ml}$ (sd))

Trajanje fermentacije (dani)	Fenolna jedinjenja					Σ^a
	Katehin	Galna kiselina	Epikatehin	Rutin	Kumarna kiselina	
0 (zaslađen čaj)	61,54 (0,8)	16,51 (0,5)	1,60 (0,01)	2,17 (0,05)	0,48 (0,04)	65,79
0 (inokulisana podloga)	59,93 (0,98)	23,56 (1,56)	0,08 (0,02)	2,95 (0,05)	0,35 (0,06)	86,87
1	60,38 (3,38)	21,47 (0,44)	0,05 (0,01)	4,58 (0,3)	0,34 (0,08)	86,82
2	59,50 (1,68)	17,17 (1,25)	0,54 (0,04)	4,78 (0,32)	0,34 (0,06)	82,33
3	54,20 (3,20)	14,93 (1,18)	0,06 (0,00)	3,5 (0,19)	0,32 (0,03)	73,01
4	52,84 (1,88)	17,62 (1,32)	0,37 (0,01)	4,58 (0,28)	0,35 (0,02)	75,76
5	52,76 (0,93)	17,99 (0,99)	0,27 (0,02)	1,56 (0,02)	0,33 (0,04)	72,91
7	53,35 (1,34)	20,54 (0,46)	0,35 (0,03)	4,23 (0,03)	0,35 (0,04)	78,82

U uzorcima tokom biotransformacije podloge sa crnim čajem, dominantna fenolna komponenta je katehin, čiji se sadržaj ne povećava nakon inokulacije (Tabela 18). Tokom kombuha fermentacije dolazi do neravnomerne promene u sadržaju katehina, ali i ostalih prisutnih fenolnih komponenta. Sadržaj galne kiseline, naredne fenolne komponente po zastupljenosti, povećava se nakon inokulacije za oko 7 $\mu\text{g/ml}$ i do sedmog dana postepeno se smanjuje i dostiže 20,54 $\mu\text{g/ml}$. Epikatehina, rutina i kumarne kiseline ima znatno manje u odnosu na galnu kiselinu i katehin, a njihove promene tokom fermentacije takođe su neravnomerne.

Prema Del Rio i sar. (2004) u infuzumu crnog čaja (1 g/18 ml vode, što odgovara 55 g/l) dominantna je galna kiselina koje ima 125 mg/l infuzuma, dok su količine katehina i epikatehina približno jednake (11 mg/l, tj. 12 mg/l), za razliku od crnog čaja sa našeg podneblja kod kojeg je katehin dominantna komponenta i ima ga čak oko 40 puta više od epikatehina (Tabela 18). U metanolnom ekstraktu crnog čaja takođe su identifikovani mono- i di- estri hlorogenske kiseline: 4-kafeilhinske kiseline (63,5 mg/100g), 5-kafeilhinske kiseline (49,5 mg/100g) i 3-kafeilhinske kiseline (26,5 mg/100g). Kafena kiselina nije identifikovana, dok je galne u metanolnom ekstraktu bilo 36,2 mg/100g, a u infuzumu crnog čaja (5g/l) 0,4-0,55 mg/200ml napitka (2-2,75 $\mu\text{g/ml}$) (Marques i Farah, 2009). Prema drugim autorima dominantne fenolne komponente u metanolnom ekstraktu crnog čaja su kofein, EGC, ECG i EGCG, dok je manji sadržaj EC i galne kiseline (Zuo et al., 2002, Cabrera et al., 2003).

U većini sprovedenih istraživanja utvrđeni hemijski sastav čajeva melise i crnog čaja, potvrđuje prisutnost istih dominantnih jedinjenja koje su detektovane i u ovom istraživanju. Ipak, u radu Marques i Farah (2009) izostaje ruzmarinska kiselina (kod melise) i katehin (kod crnog čaja). Razlike u sastavu čajeva su očekivane, jer na hemijski sastav čaja utiču geografski uslovi, klima, godišnje doba, uslovi gajenja (zemljište, poljoprivredne mere, kao

npr. dubrenje), vrsta čaja (blendiran, dekofeiniziran, instant itd.) i način pripreme (količina čaja, vreme kuvanja, temperatura) (Cabrera i sar., 2003, Marques i Faraf, 2009, Bancirova, 2010). Wei i sar. (2010) potvrđuju da klima ima značajan uticaj na biosintezu katehina, ali i da formiranje hlorofila tokom razvoja mladih listova učestvuje u regulaciji proporcije pojedinih katehina u čaju. Takođe, s obzirom da se lekovito bilje koristi i kao začinsko bilje, a uzimajući u obzir i njihove funkcionalne karakteristike, moguće je pažljivom selekcijom sorti, unapređenjem njihove obrade i boljim uslovima čuvanja, smanjiti gubitak fenolnih komponenata, isparljivih komponenata i hlorofila na putu „od njive do trpeze“ (Lee, 2010).

Sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja u fermentacionim tečnostima od melise i crnog čaja (Slika 27) veći je u odnosu na ukupna fenolna jedinjenja određena HPLC metodom (Tabele 17 i 18), i to za uzorke sa crnim čajem do četiri puta, a za uzorke sa melisom čak i više od trideset puta. Ove razlike se objašnjavaju time da se metodom po Folin-Ciocalteu ne određuju isključivo fenolna jedinjenja već i komponente kao što su organske kiseline, šećeri, aminokiseline, proteini i druge hidrofilne komponente koje reaguju tokom ispitivanja. Osim toga, fenolna jedinjenja u zavisnosti od hemijske strukture različito reaguju tokom izvođenja Folin-Ciocalteu metode (Singleton i sar., 1999; Rigo i sar., 2000; Atoui i sar., 2005).

U naučnoj literaturi nema podataka o kombuha fermentaciji na podlozi sa melisom, samim tim ni o promeni sadržaja fenolnih jedinjenja. Međutim, sadržaj fenolnih jedinjenja tokom kombuha fermentacije tradicionalne podloge (od crnog čaja) ispitan je od strane više autora. Porast u sadržaju ukupnih fenolnih jedinjenja tokom kombuha fermentacije zabeležili su Chu i Chen (2006), kada je na kraju fermentacije (15. dan) određeno 7,8 mM ukupnih fenolnih jedinjenja (izraženih kao ekvivalent galne kiseline), što je skoro dva puta više od sadržaja u samom čaju (4 mM). Isti trend javio se tokom 21-dnevne kombuha fermentacije na crnom čaju, kada se sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja i flavonoida linearno povećava do 14. dana, dostiže maksimalnih 80% (izraženo u μg galne kiseline) fenolnih jedinjenja, odnosno 7% (μg kvercetina) flavonoida, i ostaje na toj vrednosti u narednih sedam dana (Bhattacharya i sar., 2011). Smatra se da su za ovakve promene u sadržaju fenolnih jedinjenja odgovorni enzimi kvasaca i BSV iz čajne gljive koji degradiraju kompleksna fenolna jedinjenja i stvaraju manje molekule, što rezultuje u povećanju njihovog sadržaja tokom fermentacije (Bhattacharya i sar., 2011). Ovi nepoznati enzimi verovatno katalizuju reakcije biodegradacije teaflavina, a stvoreni produkti su potencijalni antioksidativni molekuli. S druge strane, moguće je da dolazi do polimerizacije katehina do molekula veće molekulske mase što dovodi do detekcije nižeg sadržaja polifenola. Tokom oksidativne polimerizacije derivata katehina, hidroksilne grupe na aromatičnom prstenu odgovorne za formiranje prekursora tearubigina, takođe su povezane sa detektovanim sadržajem polifenola. Moguće je da se dešava depolimerizacija tearubigina što objašnjava fenomen porasta ukupnog sadržaja fenolnih jedinjenja (Chu i Chen, 2006).

Neravnomernu promenu tokom 18-dnevne kombuha fermentacije na crnom i zelenom čaju dokazali su i Jayabalan i sar. (2007). Prateći sadržaj četiri izomera epikatehina (EGCG, EGC, ECG, EC), teaflavina i tearubigina, ukazali su na njihovu degradaciju tokom prvih devet dana fermentacije. Najveći pad, za približno 50% u odnosu na početni sadržaj, je zabeležen za EC i ECG tokom fermentacije na crnom čaju, dok je kod zelenog ovaj pad bio oko 20%. U naredna tri dana zapaža se porast u sadržaju izomera katehina. Najveći porast zabeležen je za EGC i EC, čiji je sadržaj nakon dvanaestog dana fermentacije veći od inicijalnog (odnosno u samom čaju), što nije slučaj sa EGCG i ECG. Degradacija EGCG tokom kombuha fermentacije na zelenom čaju je 18%, a tokom fermentacije na crnom čaju 30%. Pretpostavka je da se tokom kombuha fermentacije deo prisutnih molekula EGCG i ECG konvertuje u odgovarajuće katehine, EGC i EC, zbog čega se njihov sadržaj povećava. Uniformna degradacija tokom 18-odnevne fermentacija zabeležena je u sadržaju teaflavina i tearubigina, koji se smanjuje za 5%, odnosno 11%, što ukazuje da su oni mnogo stabilniji u

odnosu na izomere epikatehina (Jayabalan i sar., 2007). Porast koncentracije EGC i EC tokom kombuha fermentacije se može objasniti biotransformacijom EGCG u EGC i ECG u EC, usled delovanja enzima čajne gljive. Ovim se mogu objasniti i neuniformne promene u sadržaju pojedinih fenolnih komponenata tokom fermentacije tradicionalne podloge (Tabela 12). Ova objašnjenja prihvataju Yang i sar. (2009) koji detektuju porast sadržaja ukupnih fenolnih jedinjenja u gotovim tradicionalnim kombuha napicima nakon osmodnevne fermentacije, u odnosu na čajni napitak. Sadržaj fenolnih jedinjenja u zaslađenom crnom čaju iznosio je 0,15 mg/ml (ekvivalent galne kiseline), dok je u kombuha napicima duplo veći. Naime, u napitku inokulisanom na tradicionalni način ima 0,33 mg/ml fenolnih jedinjenja, a u napitku inokulisanom starterom *Gluconobacter* sp. 0,34 mg/ml. Sadržaj fenolnih jedinjenja u tradicionalnoj kombuhi sa našeg područja nakon sedam dana vrlo je sličan (0,32 mg/ml ekvivalenta galne kiseline, Slika 28), a razlike u odnosu na čajni napitak su nešto manje (sadržaj fenolnih jedinjenja 0,2 mg/ml, Tabela 16).

Dokazano je da enzimi nekih mikroorganizama utiču na transformaciju i razgradnju fenolnih jedinjenja. Naime, kvasac *Candida tropicalis* odgovoran je za degradaciju fenolnih jedinjenja u otpadnim vodama, indukcijom peroksizomalnih enzima, kao što je katalaza (Ettayebi i sar., 2003). Takođe, intestinalne bakterijske vrste rodova *Clostridium*, *Bacteroides* i *Eubacterium* su sposobne da razgrade fenolna jedinjenja poreklom iz hrane, pri čemu cepanjem ugljeničnog prstena flavonoida nastaju fenolne kiseline (Rechner i sar., 2004). Slično, Duenas i sar. (2007) pokazali su da se bioaktivna fenolna jedinjenja iz sočiva modifikuju usled aplikacije enzima fitaze, α -galaktozisaze i tanaze, što dovodi do povećane antioksidativne aktivnosti enzimski tretiranog sočiva.

4.4.2.2. Antioksidativna aktivnost čajnih napitaka, fermentacionih tečnosti i kombuha napitaka od melise i crnog čaja

Tokom sedmodnevne kombuha fermentacije ispitana je antioksidativna aktivnost čajnih napitaka, fermentacionih tečnosti i gotovih kombuha napitaka od melise i crnog čaja na reaktivne hidroksil radikale (Tabele 19 i 21) i stabilne DPPH radikale (tabele 20 i 22). U cilju ispitivanja uticaja pomenutih uzoraka na stvaranje i transformaciju hidroksil radikala, u Fentonov model sistem dodata je rastuća količina svakog od uzoraka (3-200 μ l, zavisno od uzorka), što odgovara koncentracijama 0,5-33,33 % (v/v). U reakcionu smešu za ispitivanje uticaja na transformaciju DPPH radikala dodato je 1,5-120 μ l uzoraka (0,25-20 % (v/v)).

Tabela 19. Antioksidativna aktivnost čajnog napitka, fermentacione tečnosti i kombuha napitka od melise na hidroksil radikale (AA_{OH} , % (sd))

V/c*	Čaj	Trajanje fermentacije (dani)				
		2	3	4	5	7
3 μ l/0,5%	-	0	0	0	0	0
6 μ l/1%	-	0	10,4 (0,5)	0	1,59 (0,05)	0
15 μ l/2,5%	-	32 (0,57)	37,92 (1,13)	10,26 (0,47)	41,27 (1,06)	11,54 (0,34)
30 μ l/5%	0	55,2 (1,65)	67,52 (2,36)	54,06 (2,16)	65,01 (1,63)	54,36 (1,9)
45 μ l/7,5%	14,49 (0,36)	69,6 (1,57)	79,52 (1,72)	64,74 (2,64)	69,52 (2,09)	65,38 (2,61)
60 μ l/10%	30,43 (0,53)	77,76 (2,29)	83,52 (3,85)	95,73 (3,35)	76,51 (1,15)	77,44 (1,56)
75 μ l/12,5%	36,23 (0,67)	83,84 (2,95)	88,16 (2,89)	100 (0,0)	82,22 (3,30)	82,31 (3,52)
90 μ l/15%	39,71 (0,73)	87,04 (1,32)	82,31 (3,29)	-	85,4 (2,80)	83,59 (3,01)
120 μ l/20%	38,55 (0,65)	90,24 (1,82)	100 (0,0)	-	100 (0,0)	100 (0,0)
150 μ l/25%	56,52 (0,95)	100 (0,0)	-	-	-	-
180 μ l/30%	59,42 (1,78)	-	-	-	-	-
200 μ l/33,33%	72,75 (1,67)	-	-	-	-	-

* V/c-zapremina/koncentracija uzoraka

Čajni napitak pripremljen od melise koncentracije 5g/l pokazao je slabiju antioksidativnu aktivnost u odnosu na uzorke fermentacione tečnosti od melise. U opsegu ispitivanih koncentracija nije postignuta maksimalana AA_{OH} aktivnost od 100% za čajni napitak od melise. Uzorci fermentacione tečnosti i gotovih kombuha napitaka (optimalna konzumna kiselost postignuta između trećeg i četvrtog dana, Slika 19) dostižu AA_{OH} aktivnost od 100% pri različitim dodatim zapreminama. Za sve ispitane uzorke, antioksidativna aktivnost se povećava sa povećanjem zapremine dodatog uzorka u ispitivani reakcionu sistem. Tokom fermentacije, do četvrtog dana procesa, prisutan je porast antioksidativne aktivnosti na hidroksil radikale, te su manje zapremine uzoraka potrebne da se postigne 100%

antioksidativne aktivnosti. Tako, u četvrtom danu, kada je dobijen kombuha napitak željene kiselosti, antioksidativna aktivnost na hidroksil radikale je najveća, i samo je 75 μ l napitka (koncentracija u reakcionoj smeši 12,5%) potrebno za maksimalni efekat „hvatanja“. Tokom dalje fermentacije dolazi do pada antioksidativne aktivnosti na reaktivne hidroksil radikale, i do sedmog dana potrebno je čak 120 μ l napitka za postizanje 100% aktivnosti.

Tabela 20. Antioksidativna aktivnost čajnog napitka, fermentacione tečnosti i kombuha napitka od melise na DPPH radikale (AA_{DPPH} , % (sd))

V/c*	Čaj	Trajanje fermentacije (dani)				
		2	3	4	5	7
1,5 μ l/0,25%	-	0	0	0	-	0
3,0 μ l/0,5%	0	21,79 (0,64)	23,08 (0,67)	15,91 (0,24)	0	5,71 (0,21)
7,5 μ l/1,25%	25,71 (0,89)	29,49 (0,88)	48,72 (1,61)	36,36 (1,37)	4,55 (0,11)	22,86 (0,96)
10 μ l/1,67%	48,57 (1,55)	-	-	-	-	-
15 μ l/2,5%	65,71 (2,17)	46,15 (1,2)	66,67 (2,47)	52,27 (1,34)	36,36 (1,42)	45,71 (2,17)
30 μ l/5%	100 (0,0)	92,86 (3,29)	84,62 (2,88)	72,73 (2,11)	57,95 (2,03)	66,43 (2,53)
60 μ l/10%	-	100 (0,0)	100 (0,0)	100 (0,0)	78,41 (2,74)	100 (0,0)
120 μ l/20%	-	-	-	-	100 (0,0)	-

* V/c-zapremina/koncentracija uzoraka

Antioksidativna aktivnost na DPPH radikale raste sa povećanjem zapremine uzoraka dodatih u reakcionu smešu. Maksimalna antioksidativna aktivnosti ($AA_{DPPH} = 100\%$) za čajni napitak od melise postignuta je sa najnižom koncentracijom (30 μ l, odnosno 5%), u odnosu na sve druge uzorke. To može da navede na zaključak da čajni napitak ima veću antioksidativnu aktivnost u odnosu na kombuhu. Međutim, pri nižim AA_{DPPH} vrednostima od 100%, različita je aktivnost između uzoraka. Tako, pri primenjenoj količini uzoraka od 7,5 μ l, uzorci do četvrtog dana fermentacije pokazuju veće AA_{DPPH} vrednosti u odnosu na čaj, isto kao i uzorak u trećem danu fermentacije pri dodatih 15 μ l u reakcionu smešu. Fermentaciona tečnost do četvrtog dana fermentacije, pri zapremini u reakcionoj smeši od 60 μ l, postiže maksimalnu antioksidativnu aktivnost, koja se u petom danu fermentacije smanjuje (dostignuta je sa zapreminom od 120 μ l), a u sedmom danu ponovo dostiže prethodnu vrednost.

Čajni napitak od crnog čaja kao i uzorci fermentacione tečnosti i kombuha napitaka na crnom čaju ispitani su kao kontrolni uzorci, da bi se utvrdilo da li kombuha napitak dobijen od melise kao alternativne podloge ima veću antioksidativnu aktivnost u odnosu na napitak sa crnim čajem koji se koristi kao tradicionalna podloga za kombuha fermentaciju.

Antioksidativna aktivnost čajnog napitka od crnog čaja na hidroksil radikale (Tabela 21) znatno je niža u odnosu na sve uzorke fermentacione tečnosti i kombuha napitak, jer je u opsegu primenjenih koncentracija AA_{OH} vrednost dostigla svega 36,25% pri dodatih 200 μ l uzorka. Za razliku od čaja, fermentaciona tečnost u prva četiri dana procesa dostiže AA_{OH} od 100% sa 120 μ l (20% u reakcionoj smeši). U petom danu ova se aktivnost povećava (maksimum pri 90 μ l uzorka), da bi do kraja procesa opet blago opala.

Tabela 21. Antioksidativna aktivnost čajnog napitka, fermentacione tečnosti i kombuha napitka od crnog čaja na hidrosil radikale (AA_{OH} , % (sd))

V/c*	Čaj	Trajanje fermentacije (dani)				
		2	3	4	5	7
3 μ l/0,5%	-	0	0	0	0	0
6 μ l/1%	-	0	0	0	21,54 (0,86)	0
15 μ l/2,5%	-	1,59 (0,06)	8,8 (0,28)	21,54 (0,58)	49,23 (2,02)	2,1 (0,03)
30 μ l/5%	-	34,92 (1,38)	36,8 (1,21)	50 (1,5)	50,35 (1,96)	30,07 (0,81)
45 μ l/7,5%	-	57,14 (2,86)	74 (1,85)	72 (2,02)	63,29 (2,47)	56,29 (1,75)
60 μ l/10%	-	69,21 (2,42)	74,4 (2,9)	77,6 (2,33)	74,62 (2,8)	67,9 (2,04)
75 μ l/12,5%	-	77,14 (2,76)	77,6 (2,94)	79 (3,16)	88,06 (3,26)	73,99 (1,41)
90 μ l/15%	0	84,51 (3,80)	85,75 (4,29)	90,28 (2,71)	100 (0,0)	86,15 (2,67)
120 μ l/20%	7,27 (0,24)	100 (0,0)	100 (0,0)	100 (0,0)	-	100 (0,0)
150 μ l/25%	17,54 (0,51)	-	-	-	-	-
180 μ l/30%	23,64 (0,87)	-	-	-	-	-
200 μ l/33,33%	36,25 (1,42)	-	-	-	-	-

* V/c-zapremina/koncentracija uzoraka

Tabela 22. Antioksidativna aktivnost čajnog napitka, fermentacione tečnosti i kombuha napitka od crnog čaja na DPPH radikale (AA_{DPPH} , % (sd))

V/c*	Čaj	Trajanje fermentacije (dani)				
		2	3	4	5	7
15 μ l/2,5%	0	0	-	0	0	0
30 μ l/5%	33,33 (0,79)	12,5 (0,47)	0	31,25 (0,78)	14,86 (0,53)	5,41 (0,16)
60 μ l/10%	43,33 (1,95)	37,5 (1,28)	37,5 (0,71)	50 (1,4)	45,95 (1,88)	35,14 (1,02)
90 μ l/15%	60 (1,83)	65 (0,98)	60 (1,8)	60 (1,56)	66,22 (2,32)	45,95 (1,75)
120 μ l/20%	70,45 (2,32)	80 (2,6)	80 (2,0)	78,75 (2,36)	78,38 (3,9)	67,57 (3,04)
150 μ l /25%	85,98 (3,61)	83,13 (2,42)	85,28 (3,27)	84,58 (3,38)	82,43 (3,38)	71,62 (2,72)
180 μ l/30%	100 (0,0)	90 (3,06)	100 (0,0)	100 (0,0)	100 (0,0)	81,56 (2,85)
200 μ l/33,33%	-	100 (0,0)	-	-	-	100 (0,0)

* V/c-zapremina/koncentracija uzoraka

Na osnovu rezultata prikazanih u Tabelama 19 i 21, može se zaključiti da je antioksidativna aktivnost kombuha napitka od melise na hidroksil radikale veća u odnosu na tu aktivnost kod kombuha napitka od crnog čaja. Ovo se može pripisati i činjenici da se sadržaj ruzmarinske kiseline tokom fermentacije ne menja (nema degradacije) u tolikoj meri kao što je to slučaj sa katehinom i galnom kiselinom (Tabele 17 i 18), zbog čega su i variranja u antioksidativnoj aktivnosti manja.

Veće razlike između čajnog napitka, fermentacione tečnosti i kombuha napitka dobijenih od crnog čaja javljaju se pri njihovom delovanju na DPPH radikale (Tabela 22). Naime, čajni napitak dodat u količini od 180 μ l (30%) u reakcionu smešu, pokazuje maksimalnu antioksidativnu aktivnost, koja je veća od AA_{DPPH} uzoraka nakon 2. i 7. dana fermentacije, a jednaka sa ostalim uzorcima. Veće sličnosti u delovanju većine uzoraka prisutne su pri manjim ispitivanim koncentracijama (npr. 15%, 25%). Kombuha napitak na kraju procesa ima najmanju antioksidativnu aktivnost u poređenju sa svim ispitivanim uzorcima pri svim primenjenim koncentracijama (izuzev 200 μ l).

I u slučaju antioksidativne aktivnosti na hidroksil radikale, kao i na DPPH radikale, za sve ispitivane uzorke, nije dovoljno posmatrati samo vrednosti postignute maksimalne aktivnosti, već i preraspodelu antioksidativne aktivnosti pri nižim koncentracijama uzoraka (Tabele 19-22). Zato su antioksidativne aktivnosti ispitanih uzoraka izražene i pomoću još jednog parametra, EC_{50} vrednosti (Tabela 23). Ova vrednost predstavlja koncentraciju neke komponente pri kojoj se postiže polovina maksimalne antioksidativne aktivnosti (tj. 50% aktivnosti) (Tumbas i sar., 2012). Niže EC_{50} vrednosti odgovaraju većoj antioksidativnoj aktivnosti i obrnuto.

Tabela 23. Antioksidativna aktivnost (EC_{50}^{OH} i EC_{50}^{DPPH} , μ l/ml (sd)) čajnih napitaka, fermentacionih tečnosti i kombuha napitaka od melise i crnog čaja

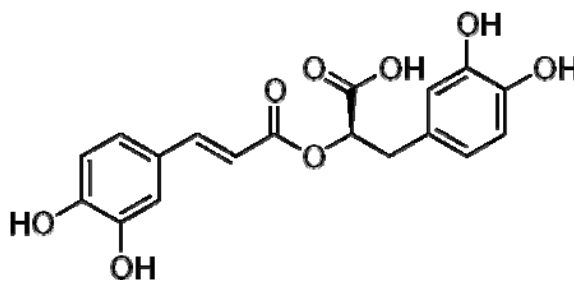
Trajanje fermentacije (dani)	EC_{50}^{OH}		EC_{50}^{DPPH}	
	Melisa	Crni čaj	Melisa	Crni čaj
Čaj	231,91 (5,51) ^d	> 333,4	27,09 (0,85) ^c	120,01 (3,51) ^c
2	40,97 (1,15) ^b	66,98 (1,53) ^d	25,57 (0,66) ^{b,c}	122,19 (2,72) ^{c,d}
3	35,42 (0,7) ^a	58,88 (1,52) ^c	13,39 (0,33) ^a	127,18 (3,26) ^{c,d}
4	47,68 (0,56) ^c	50,01 (1,15) ^b	25,17 (0,39) ^b	100,02 (3,06) ^a
5	34,21 (0,66) ^a	42,18 (0,88) ^a	40,81 (1,14) ^c	108,34 (2,55) ^b
7	47,46 (0,9) ^c	69,01 (1,33) ^d	30,17 (0,59) ^d	151,4 (3,01) ^e

Različita slova u istoj koloni ukazuju na statistički značajne razlike ($p < 0,05$)

Fermentaciona tečnost i kombuha napitak od melise imaju veću antioksidativnu aktivnost na oba ispitivana radikala u odnosu na uzorke sa crnim čajem (statistički značajna razlika, $p < 0,05$). EC_{50}^{OH} vrednost značajno je veća za fermentacionu tečnost i kombuhu od melise (EC_{50}^{OH} vrednosti kreću se u opsegu 40,97 μ l/ml do 47,46 μ l/ml) u odnosu na čajni napitak od melise ($EC_{50}^{OH} = 231,91$ μ l/ml). Isti je trend utvrđen i za fermentacionu tečnost sa crnim čajem, gde nije bilo moguće, u primenjenom opsegu koncentracija, izračunati tačnu EC_{50}^{OH} vrednost za čajni napitak.

Tokom ispitivanja antioksidativne aktivnosti na DPPH radikale, uzorci sa melisom, u odnosu na uzorke sa crnim čajem, pokazali su za 67 $\mu\text{l/ml}$ do čak 120 $\mu\text{l/ml}$ niže $\text{EC}_{50}^{\text{DPPH}}$ vrednosti. Međutim, čajni napici pripremljeni od melise i crnog čaja efikasniji su u odnosu na o kombuha napitke na kraju kombuha fermentacije. Ipak, u četvrtom danu kada su oba kombuha napitka postigla optimalnu konzumnu kiselost i kada se fermentacija može prekinuti (Slika 19), oba ta napitka imaju veću antioksidativnu aktivnost u odnosu na odgovarajuće čajne napitke (statistički značajne razlike, $p < 0,05$).

Kombuha napici od melise i crnog čaja, optimalne konzumne kiselosti, poseduju veću antioksidativnu aktivnost na oba ispitivana radikala u odnosu na čajne napitke. Veći sadržaj fenolnih jedinjenja u kombuha napicima (Slika 27) najverovatnije uslovljava veću antioksidativnu aktivnost nego u čajnim napicima (Tabela 16). Takođe, kombuha pripremljena na alternativnoj podlozi od melise ima bolju antioksidativnu aktivnost i prema $\cdot\text{OH}$ i prema DPPH radikalima u odnosu na napitak sa crnim čajem. Podloga sa čajem melise uspešno može zameniti podlogu sa crnim čajem, ne samo u pogledu dužine trajanja procesa, nego i zbog povećane biološke aktivnosti. Ovo je moguće pripisati sadržaju ukupnih fenolnih jedinjenja, koji je za uzorke od melise znatno veći u odnosu na uzorke sa crnim čajem (Slika 27). Međutim, sadržaj dominantnih komponenata u čaju i napicima od melise je manji (Tabele 17 i 18). Ruzmarinske kiseline, ne samo u čaju već i u fermentacionoj tečnosti ima duplo manje u odnosu na katehin i galnu kiselinu. Povećana antioksidativna aktivnost napitka od melise, na oba ispitana radikala, uslovljena je većom aktivnošću ruzmarinske kiseline u odnosu na neke druge fenolne komponente, što su i dokazali Chen i Ho (1997). Navedeni autori upoređivali su antioksidativnu aktivnost kafene i ferulne kiseline i njihovih estara, hlorogenske i ruzmarinske kiseline, sa aktivnošću α -tokoferola i BHT, u cilju pronalaženja veze između njihove aktivnosti i strukture molekula. Ruzmarinska kiselina ima visok potencijal u „hvatanju“ DPPH radikala (opadajući antioksidativni potencijal: ruzmarinska>fenetil estar kafene>kafena>hlorogenska> α -tokoferol>ferulna>fenetilestar ferulne kiseline>BHT) sa procentom inhibicije od 85,6%, što je za 30% više od naredne komponente, a za oko 50%, odnosno 75% u odnosu na sintetičke antioksidante. Antioksidativna aktivnost fenolnih jedinjenja pripisuje se prisustvu hidroksilnih grupa u molekulu (zbog mogućnosti doniranja vodonikovih atoma). Zato je najverovatnije ruzmarinska kiselina (koja ima četiri OH grupe, Slika 30) imala i najveću antioksidativnu aktivnost (Chen i Ho, 1997). To potvrđuju i Tepe i sar. (2007) koji povezuju antioksidativnu aktivnost ruzmarinske kiseline sa strukturom molekula. Pored prisustva većeg broja hidroksilnih funkcionalnih grupa, molekul ruzmarinske kiseline sadrži i karbonilnu, nezasićenu dvostruku vezu i karboksilnu grupu. Ipak, broj hidroksilnih grupa u molekulu nije uvek jedini faktor koji određuje antioksidativnu aktivnost. Položaj OH grupa, prisustvo drugih funkcionalnih grupa u molekulu, prisustvo dvostrukih veza i njihova konjugacija sa OH i keto grupama, kao i polarnost i hidrofobnost samog molekula, takođe ima značajnu ulogu u antioksidativnoj aktivnosti (Erkan i sar., 2008).



Slika 30. Strukturna formula ruzmarinske kiseline

Ruzmarinska kiselina ima tri puta veći antioksidativni potencijal u odnosu na Troloks. Takođe, ovaj molekul redukuje metalne jone (Mn (VI) u Mn (V)), i preventivno deluje na produkciju slobodnih radikala koju uzrokuju metali (Tepe i sar., 2007).

U odnosu na ostale fenolne kiseline (hlorogensku, protokatehinsku, kafenu, *p*-kumarinsku, ferulnu, sinapinsku kiselinu) ruzmarinska kiselina pokazuje veću sposobnost hvatnja O₂[•] radikala (Terpinc i Abramović, 2010). Takođe, ovo jedinjenje pokazuje bolju sposobnost hvatanja DPPH radikala u odnosu na BHT, jer dostiže „stady state“ stanje za oko 10 minuta, a BHT za više od 40 minuta (Romano i sar., 2009).

Osim ruzmarinske kiseline, u fermentacionoj tečnosti od melise prisutan je i kvercetin (Tabela 17), koji takođe doprinosi većoj antioksidativnoj aktivnosti kombuhe od melise u odnosu na tradicionalni napitak sa crnim čajem. Torel i sar. (1986) su pokazali da kvercetin inhibira autooksidaciju linolenske kiseline mnogo efikasnije od katehina. Takođe, kvercetin ima veću sposobnost hvatanja ABTS^{•+} radikala (4,7mM) u poređenju sa katehinom (2,4mM), izraženo preko troloks ekvivalenta (Rice-Evans i sar., 1997). Ruzmarinska kiselina i kvercetin imaju veću antioksidativnu aktivnost od katehina i sintetičkih antioksidanata (BHT i BHA) određeno TEAC i FRAP testom, a ruzmarinska kiselina ima i veći HOCl potencijal (Soobrattee et al., 2005). Antioksidativna aktivnost flavonol aglikona, kvercetina, takođe je povezana sa brojem i položajem hidroksilnih grupa u B prstenu, (Soobrattee i sar., 2005), prisustvom dvostruke veze u položaju 2, 3 i 4-okso grupu u konjugaciji sa 3-OH grupom u C prstenu (Bors i sar., 1990; Tumbas i sar., 2012). Ovakva hemijska struktura kvercetina, koja nije prisutna kod katehina, doprinosi njegovoj povećanoj antioksidativnoj aktivnosti.

U poređenju sa prirodnim i sintetičkim antioksidantima, infuzum melise (15 g/l) ima najveći ukupni antioksidativni potencijal (rastući potencijal: infuzum melise>vitamin C>trolox>katehin>Fe^{II}>BHT), što se pripisuje prisustvu fenolnih komponenta u čaju melise. Sposobnost redukcije DPPH radikala infuzuma melise je slična sa katehinom, manja od kvercetina, ali veća od vitamina C. Fenolne komponente iz infuzuma melise imaju značajno veću antioksidativnu aktivnost prema ABTS radikalima, u poređenju sa aktivnošću troloxa i vitamina C (Katalinic i sar., 2006).

U prethodnim istraživanjima antioksidativne aktivnosti kombuhe ispitani su tradicionalni supstrati (crni i zeleni čaj) (Chu i Chen, 2006; Jayabalan i sar., 2008; Bhattacharya i sar., 2011; Malbaša i sar., 2011), a pitanje alternativnih podloga i njihovog doprinosa antioksidativnoj aktivnosti ostaje otvoreno. Chu i Chen (2006), ispitujući osam čajnih gljiva različitog porekla, su dokazali da sastav kombuha napitka zavisi i od porekla čajne gljive. Bez obzira što je sadržaj fenolnih jedinjenja rastao, antioksidativna aktivnost kombuha napitaka nije za sve uzorke pokazivala rastući trend, pa su autori zaključili da nisu samo fenolna jedinjenja odgovorna za ovu aktivnost, već ona zavisi i od ćelija čajne gljive i njihovih metabolita. Malbaša i sar. (2011) su utvrdili da broj ćelija kvasaca i bakterija sirćetnog vrenja ne utiče na antioksidativnu aktivnost. Takođe, za adekvatno upoređivanje rezultata važna je metodologija kojom se ispituju pojedine karakteristike ovog napitka i antioksidativna aktivnost (Jayabalan i sar., 2008).

Antioksidativna aktivnost kombuha napitaka dobijenih od čajne gljive sa istog geografskog područja kao i čajna gljiva korišćena u ovom istraživanju, ispitana je na hidroksil i DPPH radikale primenom ESR spektrometrije (Cvetković, 2008; Malbaša i sar., 2011). Zbog istog porekla čajne gljive i primenjene metodologije, dobijeni rezultati predstavljaju adekvatnu osnovu za upoređivanje rezultata prikazanih u Tabelama 19-22. Supstrati na kojima je ispitivana ova aktivnost bili su crni, zeleni, rtanjski čaj i čaj korena i herbe ehinacee (Cvetković, 2008; Malbaša i sar., 2011).

U ispitivanju alternativnih podloga za kombuha fermentaciju, Cvetković (2008) je pokazao da čaj od korena i herbe ehinacee, rtanjski čaj, kao i od njih pripremljeni konzumni kombuha napici pokazuju veću antioksidativnu aktivnost u odnosu na crni čaj i tradicionalnu

kombuhu. Prema DPPH radikalima, pri 150 μ l uzorka u reakcionom sistemu, najveću antioksidativnu aktivnost ima kombuha od herbe ehinacee (100%), zatim od korena (90,16%), dok su izuzetno aktivni i odgovarajući čajevi, sa svega 3-6% manjom aktivnošću. Crni čaj ima znatno manju aktivnost (38,94%) u odnosu na njegov kombuha napitak (85,08%). Sa 100 μ l uzorka, rtanjski čaj ima za oko 7% manju antioksidativnu aktivnost u odnosu na kombuhu od rtanjskog čaja (100%), a veću od aktivnosti koju su pokazale kombuha od crnog čaja (76,19%) i crni čaj (17,94 %).

Prema hidroksil radikalima kombuha od korena i herbe ehinacee imala je veći antioksidativni potencijal (71,25%, odnosno 90,63%) od odgovarajućih čajeva (31,25%, tj. 84,38%), kao i kombuha od rtanjskog čaja (98,12%) u odnosu na sam čaj (90,14%), prisutni u količini od 100 μ l u reakcionom sistemu. Obe podloge efikasnije su u odnosu na tradicionalnu kombuhu (55,32 %) i crni čaj (16,35 %) (Cvetković, 2008).

Za izuzetnu antioksidativnu aktivnost čaja i kombuhe od ehinacee odgovorna je pre svega cikorna kiselina, ali i ostale fenolne kiseline (kafena, hlorogenska itd.), a u rtanjskom čaju prisutni molekuli EGCG, CG i galna kiselina (Cvetković, 2008). Iako su ovi alternativni supstrati bolji antioksidanti u odnosu na tradicionalni napitak, kombuha od melise ipak ima najveću antioksidativnu aktivnost, jer je AA_{DPPH} vrednost od 100% u konzumnom napitku postignuta sa samo 30 μ l u reakcionoj smeši, dok je za maksimalnu aktivnost čajnog napitka potrebno 60 μ l. Konzumna kombuha od melise efikasnija je i prema hidroksil radikalima u odnosu na ostale alternativne podloge, jer aktivnost od 100% postiže sa 75 μ l, dok je sam čaj manje efikasan prema hidroksil radikalima od rtanjskog čaja jer je sa 200 μ l AA_{OH} aktivnost 72,75% (Tabele 19 i 20).

Bez obzira na to, važno je istaći da su svi kombuha napici bolji antioksidanti u odnosu na čajne napitke. To znači da se antioksidativna aktivnost kombuhe ne pripisuje samo fenolnim jedinjenjima iz čaja i njihovoj preraspodeli tokom fermentacije, već i dodatnim bioaktivnim komponentama koje nastaju metaboličkom aktivnošću mikroorganizama čajne gljive. To potvrđuju i Chen i Ho (1997) koji navode da fenolna jedinjenja jesu glavni, ali ne i jedini faktor koji određuje antioksidativnu aktivnost kombuha napitaka.

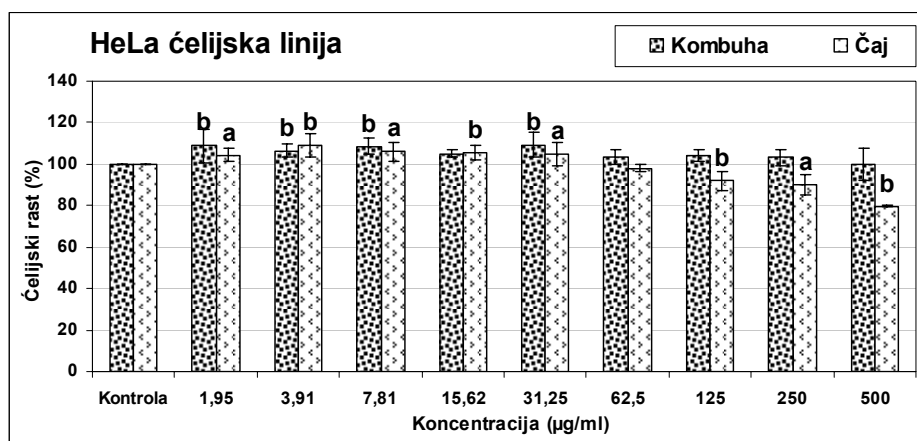
Boljoj antioksidativnoj aktivnosti kombuhe u odnosu na sam čaj svakako doprinosi veći sadržaj fenolnih jedinjenja, što su pokazali Bouayed i sar. (2007) koji su utvrdili linearnu korelaciju između sadržaja fenolnih jedinjenja ($R^2=0,9617$) i sposobnosti hvatanja ABTS radikala za ekstrakte različitih biljaka (melisu, lavandu, valerijanu itd.). Korelaciju između sadržaja fenolnih jedinjenja i sposobnosti hvatanja DPPH radikala utvrdili su Jayabalan i sar. (2008). Ipak, doprinos pojedinih fenolnih komponenta antioksidativnoj aktivnosti može biti značajno različit, zbog čega sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja ne odgovaraju uvek proporcionalno antioksidativnoj aktivnosti (Atoui i sar., 2005). Oni nisu dobili linearnu korelaciju u infuzumu crnog čaja ($R^2=0,58$) za antioksidativnu aktivnost na DPPH radikale i ukupna fenolna jedinjenja. Zato je teško objasniti vezu između pojedinih fenolnih komponenta i antioksidativne aktivnosti samo na osnovu kvantitativnog sadržaja, jer antioksidativnoj aktivnosti doprinosi ne samo sadržaj potencijalnih antioksidativnih komponenta već i sinergizam između njih i ostalih biljnih konstituenata (Capecka i sar., 2005).

Malbaša i sar. (2011) su ispitivali antioksidativnu aktivnost biotransformisane tečnosti od crnog i zelenog čaja tokom sedmodnevne fermentacije. Kao inokulum koristili su fermentacionu tečnost iz prethodnog procesa (10% v/v), ali i starter kulture izolovane iz čajne čljive: mešanu kulturu BSV i *Saccharomyces cerevisiae* (starter I) mešanu kulturu BSV i *Zygosaccharomyces* sp. (starter II). Sposobnost „hvatanja“ $\cdot OH$ radikala fermentacione tečnosti od crnog čaja (zapremina uzoraka 200 μ l) blago raste (za oko 5-10%) tokom fermentacije za sve kombinacije inokuluma, da bi u gotovom napitku desetog dana aktivnost bila oko 50% za klasičan inokulum i drugi starter, a oko 60% za prvi starter. Nešto je veća

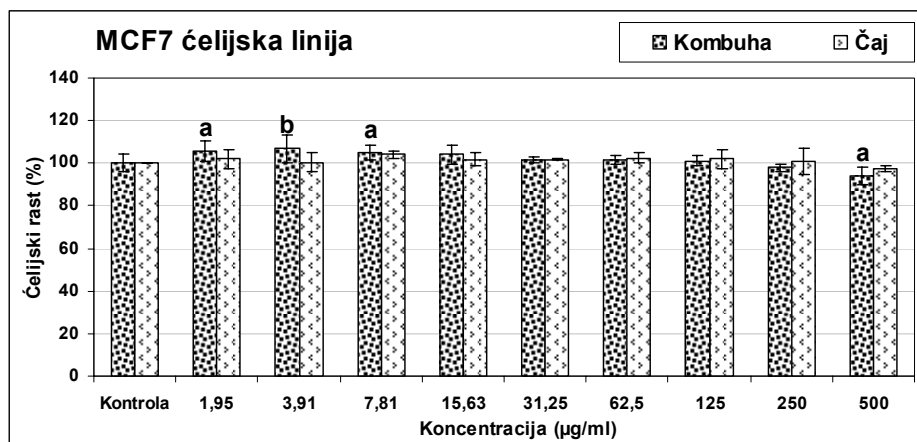
antioksidativna aktivnost (za oko 10%) za kombuha napitak sa zelenim čajem, što autori pripisuju različitom sastavu i sadržaju fenolnih jedinjenja u ova dva čaja. Za razliku od dinamike promena antioksidativne aktivnosti na hidroksil radikalima, antioksidativna aktivnost na DPPH radikale (zapremina uzoraka 100 μ l) nakon postignute maksimalne vrednosti od 55% za napitak sa crnim čajem i od oko 80% za napitak sa zelenim, do kraja procesa opada za oko 20%. U radu Malbaša i sar. (2011) nije ispitana aktivnost samih čajeva pa ostaje nejasno da li metaboliti čajne gljive u kombuha napicima doprinose antioksidativnoj aktivnosti i koliko. Kombuha napitak od melise ima veću antioksidativnu aktivnost i na hidroksil i na DPPH radikale u odnosu na tradicionalne napitke sa crnim i zelenim čajem koje su ispitali Malbaša i sar. (2011). Naime, AA_{OH} aktivnost od 100% tokom cele fermentacije postiže se sa 150 μ l uzorka ili manje (Tabela 19), a maksimalna AA_{DPPH} aktivnost za sve uzorke osim jednog, sa 60 μ l (Tabela 20). Prema tome, kombuha napici pripremljeni na alternativnim supstratima, kao što je lekovito bilje (melisa, koren i herba ehinacee) imaju veći antioksidativni potencijal u odnosu na tradicionalne napitke od crnog i zelenog čaja.

4.4.3. Antiproliferativna aktivnost čajnog i kombuha napitka od melise

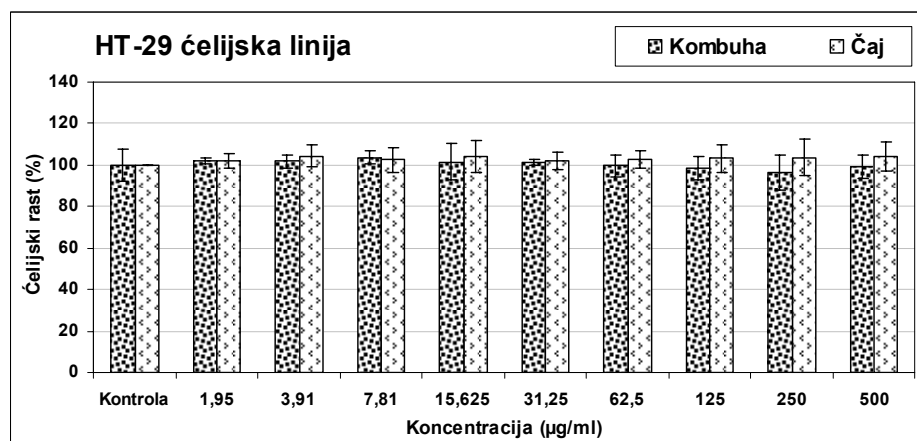
Antiproliferativna aktivnost konzumnog kombuha napitka od melise i čajnog napitka ispitana je na rast tri histološki različite ćelijske linije humanog karcinoma: HeLa (epitelni karcinom grlića materice), HT-29 (adenokarcinom debelog creva) i MCF-7 (adenokarcinom dojke). Antiproliferativna aktivnost je ispitana u opsegu masenih koncentracija uzoraka, 1,95-500 μ g/ml (Slike 31-33).



Slika 31. Antiproliferativna aktivnost čajnog i kombuha napitka od melise na HeLa ćelijskoj liniji (Prikazani podaci su $\bar{x}_{sr} \pm sd$ tri eksperimenta izvedena u kvadriplikatu; * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$; Studentov t-test, značajno različito u odnosu na kontrolu)



Slika 32. Antiproliferativna aktivnost čajnog i kombuha napitka od melise na MCF7 ćelijskoj liniji (Prikazani podaci su $\bar{x}_{sr} \pm sd$ tri eksperimenta izvedena u kvadriplikatu; * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$; Studentov t-test, značajno različito u odnosu na kontrolu)



Slika 33. Antiproliferativna aktivnost čajnog i kombuha napitka od melise na HT-29 ćelijskoj liniji (Prikazani podaci su $\bar{x}_{sr} \pm sd$ tri eksperimenta izvedena u kvadriplikatu; * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$; Studentov t-test, značajno različito u odnosu na kontrolu)

Čaj i konzumna kombuha od melise su pokazali (dozno) koncentracijski zavisnu aktivnost na rast ćelija u zavisnosti od ćelijske linije, ali ni jedan uzorak nije pokazao efekat inhibicije od 50% (Slike 31-33). Najveći uticaj na rast ćelijske linije, kao i najveća razlika (statistički značajna, $p < 0,01$ i $p < 0,05$) u aktivnosti čaja i kombuhe, uočena je na HeLa ćelijskoj liniji. Pri nižim koncentracijama (1,95-30 µg/ml) čaj i kombuha od melise izazivaju simulaciju rasta (proliferaciju) HeLa ćelijske linije. Čaj od melise pokazuje najznačajniju inhibiciju rasta HeLa ćelijske linije pri koncentracijama većim od 100 µg/ml (EC_{20} postignuta je pri koncentraciji od 500 µg/ml). Kombuha od melise stimulatивно deluje na rast MCF7 ćelijske linije pri nižim koncentracijama (manjim od 10 µg/ml), ali inhibira njihov rast pri koncentraciji od 500 µg/ml za oko 10%. Čaj i konzumna kombuha od melise ne utiču na rast HT-29 ćelijske linije u ispitanom koncentracionom opsegu.

U aktivnostima kombuha napitka od melise u odnosu na kontrolni uzorak (čaj od melise) nisu zabeležene značajnije razlike za iste ćelijske linije. Značajna razlika u delovanju čaja i kombuhe od melise javlja se samo u slučaju HeLa ćelijske linije, gde čaj od melise pokazuje veću antiproliferativnu aktivnost u odnosu na kombuhu za 20%.

Na osnovu EC_{20} vrednosti kombuha od melise pokazuje nižu aktivnost prema HeLa ćelijskoj liniji (Slika 31) u poređenju sa kombuhom od crnog i rtanjskog čaja, kod kojih se EC_{20} dostiže sa 250 $\mu\text{g/ml}$ (Četojević Simin i sar., 2008). U poređenju sa ova dva napitka, kombuha od melise ima sličnu aktivnost prema MCF7 ćelijskoj liniji, ali ne pokazuje aktivnosti prema HT-29 ćelijskoj liniji, prema kojoj su napici od crnog i rtanjskog čaja ispoljili aktivnost manju od 20%.

U prethodnim istraživanjima (Čanadanović-Brunet i sar., 2008) ekstrakata melise, od većeg broja ispitanih ekstrakata najveću antiproliferativnu aktivnost pokazao je hloroformni ekstrakt prema HeLa i MCF7 ćelijskim linijama, za koje je EC_{50} vrednost iznosila 0,09 mg/ml, odnosno 0,10 mg/ml. Pretpostavlja se da su aktivne komponente prisutne u hloroformskom ekstraktu melise odgovorne za antiproliferativnu aktivnost kombuhe i čaja od melise prema HeLa i MCF7 ćelijskim linijama.

Razlikama u antiproliferativnoj aktivnosti kombuha napitaka od različitih čajeva (melisa, rtanjski, crni) može doprineti različita titrabilna kiselost napitaka, ali i razlike u sastavu i količini fenolnih jedinjenja za koje je poznato da imaju antiproliferativnu aktivnost (Yokoyama i sar., 2008). Kao i kod antioksidativne aktivnosti, antiproliferativnoj aktivnosti doprinosi ne samo sadržaj i delovanje pojedinačnih fenolnih komponenata, već njihov sinergistički efekat i ukupni antioksidativni/antiproliferativni potencijal (Atoui i sar., 2005).

Razlike u delovanju čaja i kombuhe od melise dobijene na histološki različitim ćelijskim linijama mogu biti objašnjene različitim zaštitnim osobinama ispitivanih ćelijskih linija. Neki autori navode da su ćelijski mehanizmi koji kontrolišu gensku ekspresiju RON-a disfunkcionalni u ćelijama karcinoma debelog creva i dojke (Chen i sar., 2000), što bi moglo da dovede do povećane zaštite od ispitivanog kombuha napitka u ovim ćelijama. RON je član MET proto-onkogene familije i visoko je ekspimiran u HT-29 ćelijskoj liniji, ali ne i u normalnom epitelu debelog creva (Montero-Julian i sar., 1998), kao ni u mnogim epitelnim tumorskim ćelijama (Wang i sar., 1996). Visoka ekspresija RON-a je takođe uočena u tkivu humanih primarnih karcinoma dojke i ćelijskim linijama karcinoma dojke (Maggiore i sar., 1998), čime se može objasniti slabije delovanje ispitanih uzoraka (kombuhe i čaja od melise) prema ćelijskim linijama karcinoma debelog creva i dojke.

4.5. VIJABILNOST I FIZIOLOŠKA AKTIVNOST BMK TOKOM KOMBuha FERMENTACIJE

U ovom delu rada prikazani su rezultati ispitivanja vijabilnosti i fiziološke aktivnosti BMK dodatih u fermentacionu tečnost tokom kombuha fermentacije. Zbog poznatih korisnih efekata BMK, njihovo preživljavanje tokom kombuha fermentacije i u napitku u dužem periodu doprinelo bi poboljšanju funkcionalnih karakteristika napitka. Ispitan je i doprinos BMK povećanju sadržaja mlečne kiseline u napitku, koja takođe deluje korisno na organizam poboljšanjem peristaltike creva, održavanjem prirodne sluzavosti creva, održavanjem crevne mikroflore, pospešivanjem lučenja želučanih sokova, održavanjem kiselo-bazne ravnoteže itd. Za ispitivanje uticaja BMK na kombuha fermentaciju korišćene su komercijalne starter kulture koje se koriste za industrijsku proizvodnju fermentisanih mlečnih proizvoda i izolati BMK iz fermentisanih mlečnih proizvoda sa teritorije Srbije.

4.5.1. Inokulacija fermentacione tečnosti komercijalnim starter kulturama

Inokulacija fermentacione tečnosti suspenzijom komercijalnih starter kultura BMK izvedena je 48h od započinjanja kultivacije čajne gljive da bi se sprečio osmotski šok ćelija usled visoke koncentracije saharoze u podlozi za kultivaciju (70 g/l). Prethodna istraživanja (Cvetković, 2003) su pokazala da se nakon 48h u fermentacionoj tečnosti znatno smanjuje sadržaj saharoze (sa početnih 70 g/l na 27,8 g/l), a povećava sadržaj glukoze i fruktoze (na 18,57 g/l, odnosno 16,63 g/l), usled enzimske hidrolize saharoze do monosaharida. Poznato je da BMK lakše usvajaju monosaharide, tj. Različite heksoze i pentoze nego složenije ugljene hidrate (Kandler, 1983; Kandler i Weiss, 1986). Neki laktobacili, posebno oni izolovani iz kiselog testa (kao što je *L. amylovorus*) u monokulturi pokazuju vrlo mali rast ukoliko je jedini izvor energije saharoza, dok ukoliko je dostupna smeša različitih šećera (glukoza, fruktoza, maltoza i saharoza), rast je nesmetan (Leroy i sar., 2006). Izvor ugljenika utiče na sadržaj glavnih metabolita, tako da je prinos mlečne kiseline u prisustvu disaharida manji u odnosu na prinos kada je supstrat neki monosaharid. *L. delbrueckii* ssp. *Bulgaricus* produkuje manje mlečne kiseline na celobiozi nego na glukozi ili ksilozi, a *L. delbrueckii* ssp. *Delbrueckii* i *L. rhamnosus* više na glukozi i smeši glukoze i fruktoze nego na saharozi (Hofvendal i Hahn-Hägerdal, 2000). Značajan uticaj na preživljavanje BMK tokom kombuha fermentacije i produkciju mlečne kiseline ima pH vrednost fermentacione tečnosti. Oimalna pH vrednost za intenzivnu i potpunu fermentaciju ugljenih hidrata, samim tim i produkciju mlečne kiseline je u opsegu 5,5-6,0 što zavisi od soja, a fermentacija je inhibirana pri pH nižim od 4,5 (Kandler i Weiss, 1986; Panesar i sar., 2007).

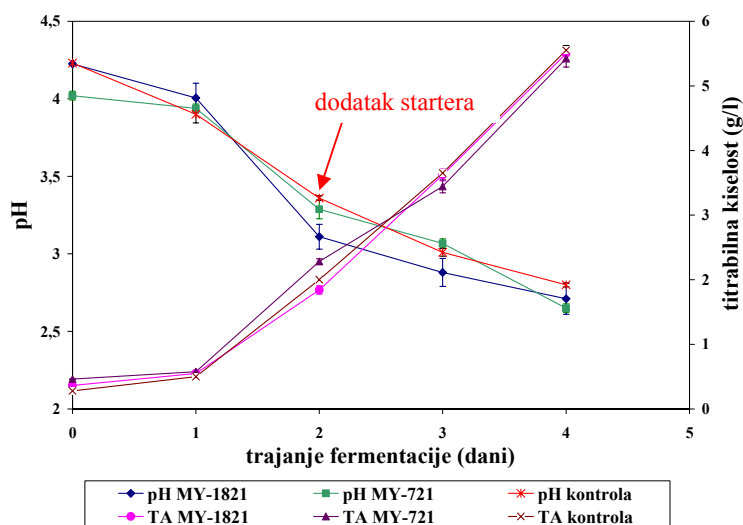
Pripremljene tradicionalne podloge (zaslađen crni čaj) inokulisane su sa 10% napitka iz prethodne fermentacije čiji su fizičko-hemijski i mikrobiološki parametri prikazani u Tabeli 24. Fermentaciona tečnost u drugom danu od početka fermentacije tradicionalne podloge inokulisana je sa dve starter kulture: DELVO-YOG MY-1821 i DELVO-YOG MY-721.

Tabela 24. Osnovni parametri fermentacionih tečnosti koji su primenjeni kao inokulumi u ogledima sa starter kulturama

Ogled	pH	TA (g/l)	Kvasci (log cfu/ml)	BSV
I	2,83 (0,02)*	4,76 (0,08)	6,36 (0,08)	5,16 (0,04)
II	2,92 (0,03)	7,32 (0,12)	5,75 (0,25)	3,76 (0,5)
III	2,85 (0,05)	5,32 (0,16)	6,82 (0,15)	5,75 (0,09)

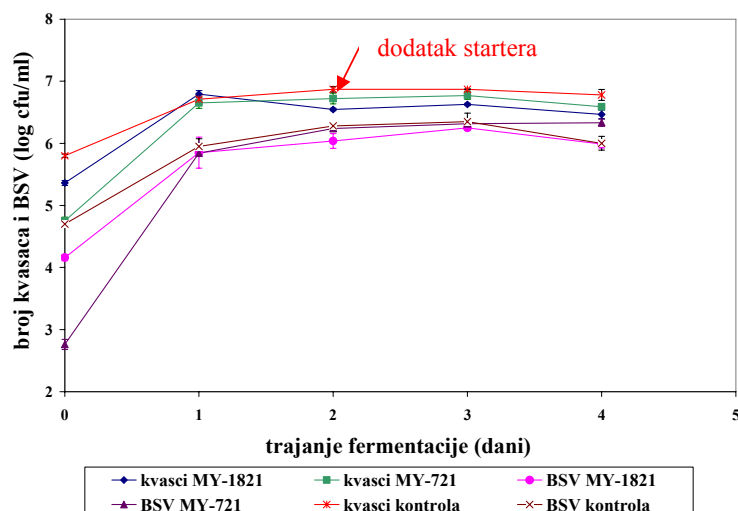
I – ogled sa starter kulturom MY-1821; II – ogled sa starter kulturom MY-721; III – kontrolna fermentacija; * standardna devijacija

Uporedo sa izvođenjem ogleda sa starter kulturama, postavljena je kontrolna fermentacija na tradicionalnoj podlozi bez dodatka startera u cilju upoređivanja rezultata i praćenja uticaja starter kultura na tok fermentacije. Fermentacija je trajala 4 dana u cilju dobijanja napitaka optimalne konzumne kiselosti, a fizičko-hemijski i mikrobiološki parametri u kontrolnoj i podlogama sa dodatim starterima praćeni su svakodnevno i prikazani na Slikama 34 i 35.



Slika 34. Promene pH i titrabilne kiselosti fermentacione tečnosti kojoj su dodate komercijalne starter kulture MY-1821 i MY-721

Dodatak starter kultura u fermentacionu tečnost 48h od početka fermentacije nije uticao na uobičajeni tok i brzinu fermentacije jer se i promene fizičko-hemijskih parametara u kontrolnom uzorku odvijaju na sličan način. Smanjenje pH vrednosti u prva dva dana procesa je za jednu pH jedinicu, a u naredna dva dana za oko 0,5 pH jedinica. Početne razlike u kiselosti primenjenih inokuluma (Tabela 24) ne utiču značajnije na sadržaj kiselina tokom fermentacije. Optimalna konzumna kiselost od 3,5 g/l postignuta je za tri dana, a u četvrtom danu za napitke sa starterima i kontrolni napitak iznosila je već 5,5 g/l.



Slika 35. Promene broja ćelija kvasaca i bakterija sirćetnog vrenja (BSV) fermentacione tečnosti kojoj su dodate komercijalne starter kulture MY-1821 i MY-721

U tradicionalnu podlogu za kombuha fermentaciju sa inokulumom je unet različit broj ćelija čajne gljive (Tabela 24). Najveći broj ćelija unet je u podlogu za kontrolnu fermentaciju. Početni broj kvasaca u toj podlozi je za oko 0,5 log cfu/ml, odnosno 1 log cfu/ml veći u odnosu na broj u podlogama koje su inokulisane starter kulturama MY-1821, tj. MY-721. Veće početne razlike su u broju BSV, kojih nakon inokulacije u kontrolnom uzorku ima za 0,6 log cfu/ml, odnosno 2 log cfu/ml više nego u uzorcima sa starterima MY-1821 i MY-721. Međutim, već nakon 24h ove razlike su nadoknađene zbog pogodnih uslova za razmnožavanje ćelija čajne gljive. Broj kvasaca postignut nakon 24h fermentacije zadržao se na istom nivou (6,5-6,7 log cfu/ml) do samog kraja procesa. Zabeležen je blagi porast broja bakterija sirćetnog vrenja do kraja procesa za oko 0,5 log cfu, te ih na kraju ima 6,3 log cfu/ml u napitku sa kulturom MY-721 i 5,98 log cfu/ml u napitku sa kulturom MY-1821 kod koga je zabeleženo smanjenje broja za oko 0,3 log jedinice u zadnjem danu procesa. BMK unete nakon 48h nisu uticale na promenu broja ćelija čajne gljive, jer se sličan broj tokom fermentacije određuje i u kontrolnim uzorcima fermentacione tečnosti.

Jedan sat nakon inokulacije i nakon toga u trećem i četvrtom danu fermentacije u fermentacionim tečnostima određen je broj laktobacila, bifidobakterija i streptokoka, pojedinačnih grupa BMK prisutnih u starter kulturama (Tabela 25).

Tabela 25. Broj bakterija mlečne kiseline (log cfu/ml (sd)) u fermentacionoj tečnosti nakon dodatka starter kultura MY-1821 i MY-721 drugog dana fermentacije

Grupa BMK	Trajanje fermentacije (dani)					
	2	3	4	2	3	4
	MY-1821			MY-721		
Laktobacili	9,41 (0,12)	<3	nd	7,19 (0,06)	nd	nd
Streptokoke	7,89 (0,08)	<3	<3	5,86 (0,09)	4,01 (0,09)	3,95 (0,08)
Bifidobakterije	<3	nd	nd	<2	nd	nd

nd – nije detektovano

Jedan sat od dodatka BMK u fermentacionu tečnost, broj bifidobakterija bio je najmanji, i iznosio je manje od 3 log cfu/ml, odnosno 2 log cfu/ml. Tokom fermentacije broj bifidobakterija se smanjuje u fermentacionim tečnostima sa oba startera i već u trećem danu (24 h od dodatka) nisu detektovane bifidobakterije. Broj laktobacila nakon 24h od dodatka u fermentacionu tečnost smanjuje se za više od 6 log jedinica za oba dodata startera, što direktno ukazuje na nepovoljne uslove u fermentacionoj tečnosti. Broj streptokoka u fermentacionoj tečnosti sa starterom MY-1821 takođe opada najmanje za 5 log jedinica, dok su se u podlozi sa drugim starterom streptokoke pokazale otpornijim, tj. na kraju fermentacije broj im je opao za manje od 2 log jedinice u odnosu na broj nakon inokulacije.

BMK pokazuju osetljivost tokom fermentacije, ne samo u kombuha napitku, već i u jogurtu (pH 4,5-4,9), gde može doći do smanjenja broja BMK (*L. acidophilus* i *Bi. Lactis*) za 3-4 log jedinice zbog naknadne produkcije mlečne kiseline i snižavanja pH vrednosti, u procesu poznatom kao „post-acidifikacije“ (Shah, 2000; Kailasapathy, 2006). Ni mleko ne predstavlja najoptimalniju sredinu za razmnožavanje probiotskih bakterija, iako preživljavanje probiotika tokom fermentacije mleka u velikoj meri zavisi od soja i proizvođača (Shah, 2000; Østlie i sar., 2003). U mleku kome su dodati probiotici *L. rhamnosus*, *L. reuteri*, *L. acidophilus* i *Bi. Animalis*, tokom 72h fermentacije, svi sojevi pokazuju visok stepen preživljavanja i održavaju broj od 7,8-8,7 log cfu/ml (Østlie i sar., 2003).

Shah (2000) je razmatrao mogućnost poboljšanja vijabilnosti probiotskih bakterija tokom čuvanja fermentisanih proizvoda. Bitan faktor je pridržavanje uputstava proizvođača u pogledu uslova inkubacije, pH vrednosti, temperature čuvanja, količine inokuluma. Tako, npr. *S. Thermophilus* se u jogurtu brže razmnožava pri manjoj količini inokuluma nego pri većoj. Slično, broj *L. delbrueckii* ssp. *Bulgaricus* u jogurtu tokom 15-20 dana čuvanja opada na <5 log jedinica, a vijabilnost bi bila veća ukoliko bi se koristilo manje inokuluma. Kao rešenje pominje se dvostepena fermentacija, u kojoj bi se fermentacija započela sa probiotskim bakterijama, a kasnije bi se dodavale jogurtne bakterije (Shah, 2000). Kako se jogurtne bakterije razmnožavaju brže od probiotskih i produkuju kiseline koje utiču na smanjenje vijabilnosti probiotskih bakterija, na ovaj način bi se omogućilo prvobitno razmnožavanje probiotskih bakterija, te bi one postale dominantna mikroflora. Dvostepenom fermentacijom omogućilo bi se da tokom šestonedelnog čuvanja broj probiotskih bakterija bude veći od 7 log jedinica (Shah, 2000).

U podlozi za kombuha fermentaciju i u fermentacionoj tečnosti tokom četvorodnevne fermentacije uz dodatak starter kultura MY-1821 i MY-721 određen je sadržaj L- i D- mlečne kiseline (Tabela 26).

Tabela 26. Sadržaj L- i D- mlečne kiseline (mg/l (sd)) u fermentacionoj tečnosti nakon dodatka starter kultura MY-1821 i MA-721 drugog dana fermentacije

Dani	MY-1821		MY-721	
	L	D	L	D
0	0,67 (0,01)	0,87 (0,08)	1,28 (0,03)	0,96 (0,02)
1	1,28 (0,04)	3,68 (0,13)	3,84 (0,13)	4,49 (0,16)
2	12,49 (0,44)	5,93 (0,15)	16,98 (0,64)	6,09 (0,17)
3	43,57 (1,5)	20,82 (0,77)	42,47 (1,65)	14,74 (0,59)
4	66,96 (1,67)	19,22 (0,86)	54,85 (1,37)	12,17 (0,43)

U fermentacionim tečnostima nakon dodatka startera (u periodu između drugog i trećeg dana) dolazi do značajnog porasta sadržaja oba oblika mlečne kiseline, pri čemu je veći sadržaj L- u odnosu na D- mlečnu kiselinu. U periodu od trećeg do četvrtog dana dolazi do manjeg porasta L- mlečne kiseline nego u prethodnom danu, dok se sadržaj D- mlečne kiseline čak blago smanjuje, što se može dovesti u vezu sa smanjenjem broja BMK u tom periodu fermentacije (Tabela 25). Najveći broj ćelija održao se u prvih 24h od dodatka u fermentacionu tečnost (Tabela 25), kada je sintetisana najveća količina mlečne kiseline. Sadržaj mlečne kiseline u podlozi sa dodatim starterom MY-1821 veći je nego u podlozi sa MY-721, verovatno zbog boljeg preživljavanja jednih u odnosu na druge (Tabela 25).

Bez obzira što je dodatkom komercijalnih startera 48h od starta fermentacije bakterijama mlečne kiseline obezbeđen povoljniji ugljenohidratni profil, njihov broj nije održan na početnom nivou, već se on značajno smanjio do kraja procesa. Činjenica je da su upotrebljene starter kulture (MY-1821 i MY-721) koje su dodate tokom kombuha fermentacije namenjene za fermentaciju mleka. Selekcija sojeva BMK u korišćenim starter kulturama je obavljena na osnovu njihovih svojstava tokom fermentacije mleka i dobijanja fermentisanih mlečnih proizvoda, zbog čega sredina kakva je kombuha nije najpogodnija za njihovo razmnožavanje. Moguće je da smanjenju broja i teškoći održivosti starter kultura u kombuha napitku doprinosi i temperatura inkubacije. Naime, za kombuha kulturu inkubacija se izvodi na 28-30°C, dok je prema uputstvu proizvođača za korišćene startere u pogledu brzine zakišeljavanja proizvoda, samim tim i njihovog preživljavanja, povoljnija temperatura 35-43°C, dok se metabolički procesi odvijaju, ali usporeno i na 30°C.

4.5.2. Inokulacija fermentacione tečnosti izolatima BMK

Dalja istraživanja mogućnosti preživljavanja BMK tokom kombuha fermentacije izvedena su sa izolatima *Lactobacillus* spp. (Tabela 5). Oni su izolovani iz kiselog testa i kiselo-mlečnih proizvoda u podmakloj fazi njihovog zrenja i kao takvi su verovatno otporniji na ekološke faktore. Pretpostavka je da će ovi sojevi biti otporniji na uslove tokom kombuha fermentacije i čuvanja dobijenih napitaka u odnosu na komercijalne starter kulture. Kao i komercijalne starter kulture, i *Lactobacillus* spp. Izolati su dodati u fermentacionu tečnost 48h od početka fermentacije. Fizičko-hemijski i mikrobiološki parametri primenjenih

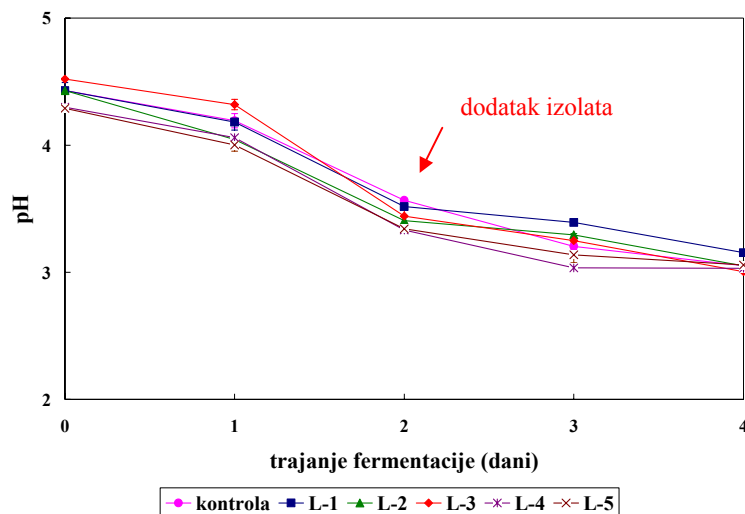
inokuluma u ogledima sa izolatima BMK, dobijenih sedmodnevnomkultivacijom su prikazani Tabeli 27.

Tabela 27. Osnovni parametri primenjenih inokuluma u ogledima sa izolatima *Lactobacillus* spp.

Ogled	pH	TA (g/l)	Kvasci (log cfu/ml)	BSV
I	3,22 (0,01)*	3,85 (0,09)	7,38 (0,13)	5,98 (0,12)
II	3,11 (0,03)	5,1 (0,3)	6,89 (0,1)	5,21 (0,02)
III	3,12 (0,04)	4,74 (0,06)	6,19 (0,02)	4,66 (0,09)
IV	3,09 (0,06)	5,0 (0,06)	6,71 (0,03)	4,72 (0,06)
V	3,09 (0,04)	4,53 (0,03)	6,67 (0,02)	4,90 (0,07)
VI	3,05 (0,05)	3,92 (0,07)	7,12 (0,14)	5,93 (0,09)

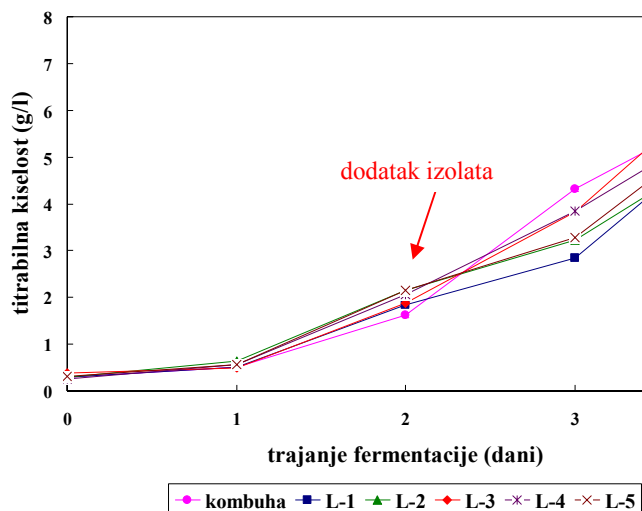
I – ogled sa izolatom L-1; II – ogled sa izolatom L-2; III – ogled sa izolatom L-3;
IV – ogled sa izolatom L-5; V- ogled sa izolatom L-5; VI – kontrolna fermentacija;
*standardna devijacija

Uporedo sa izvođenjem ogleda sa izolatima BMK, postavljena je kontrolna fermentacija na tradicionalnoj podlozi bez dodatka BMK radi praćenja uticaja izolata na tok fermentacije. Tokom četvorodnevne fermentacije u kontrolnoj i fermentacionim tečnostima inokulovanim izolatima BMK praćeni su pH (Slika 36), titrabilna kiselost (Slika 37), broj kvasaca (Slika 38) i broj bakterija sirćetnog vrenja (Slika 39).



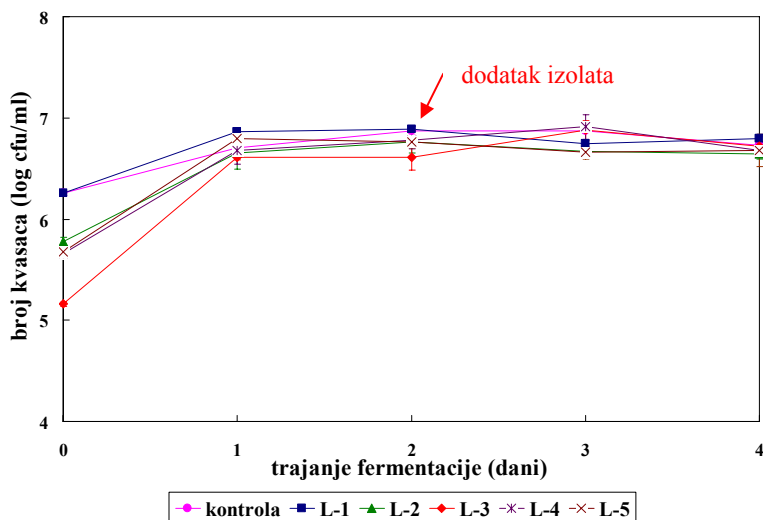
Slika 36. Promena pH vrednosti u fermentacionim tečnostima sa dodatim izolatima BMK i kontrolnom uzorku

Kao i pri dodatku komercijalnih startera, u slučaju dodatka izolata BMK, promena pH bila je karakteristična za kombuha fermentaciju. Opadanje za jednu jedinicu javlja se u prvih 48h, a u naredna dva dana ukupno smanjenje pH je za 0,3-0,4 jedinice. Slične promene kao i krajnja pH vrednost (oko 3) javljaju se kod svih podloga sa dodatim BMK sojevima i ne razlikuju se od kontrolnog uzorka.

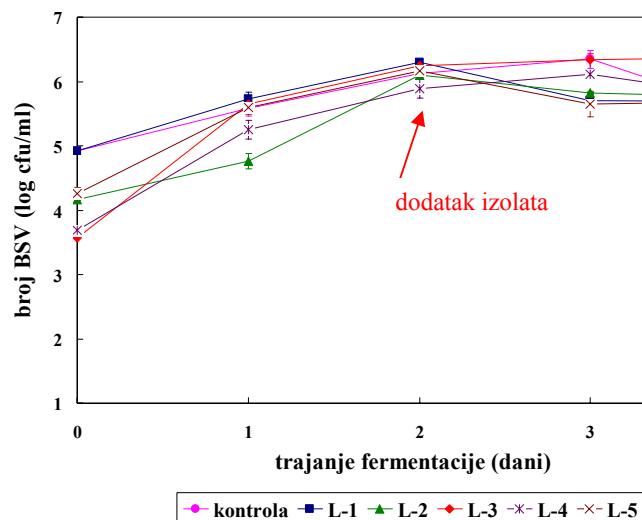


Slika 37. Promena titrabilne kiselosti u fermentacionim tečnostima sa dodatim izolatima BMK i kontrolnom uzorku

Kod svih oglada pre dodatka BMK, titrabilna kiselost povećava se sa startnih 0,3 g/l na 1,6-2,15 g/l u drugom danu fermentacije. Nakon dodatka suspenzije izolata *Lactobacillus* spp. Dolazi do značajnijih razlika u kiselosti među fermentacionim tečnostima. U trećem danu kontrolna kombuha imala je najveću kiselost (4,32 g/l), a na kraju fermentacije napitak sa dodatim izolatom L-3 sadrži 7 g/l kiselina, što je za 0,8-1,5 g/l više u odnosu na ostale napitke.



Slika 38. Promena broja kvasaca u fermentacionim tečnostima sa dodatim izolatima BMK i kontrolnom uzorku



Slika 39. Promena broja bakterija sirćetnog vrenja (BSV) u fermentacionim tečnostima sa dodatim izolatima BMK i kontrolnom uzorku

Na startu fermentacije zapažaju se razlike u broju kvasaca i BSV među uzorcima. Činjenica je da svi eksperimenti nisu izvedeni istovremeno tako da su za inokulaciju zaslađenog crnog čaja korišćeni napici dobijeni iz vremenski odvojenih kultivacija, zbog čega i postoje izvesne razlike u broju ćelija kvasaca i bakterija sirćetnog vrenja na startu fermentacije (Tabela 27). Najveći startni broj kvasaca javlja se kod kontrolnog i L-1 uzorka (6,2 log cfu/ml), a najmanji kod uzorka L-3 (5,2 log cfu/ml). U prvih 24 h došlo je do porasta broja kvasaca u svim uzorcima za 0,8-1,5 log cfu/ml do vrednosti od 6,6-6,8 log cfu/ml, koja ostaje do kraja procesa.

Najveći broj BSV nakon inokulacije takođe su imali kontrolni i L-1 uzorak (4,92 log cfu/ml), a najmanji L-3 (3,56 log cfu/ml). Broj BSV rastao je u prvih 48 h kada su izjednačene startne razlike među uzorcima (5,8-6,2 log cfu/ml), a zatim se kod nekih uzoraka broj smanjuje za oko 0,5 log jedinica. Bez obzira na startno najmanji broj BSV, na kraju procesa napitak sa dodatim sojem L-3 ima najveći broj BSV, 6,37 log cfu/ml, što je za jednu log jedinicu više u odnosu na ostale napitke i kontrolu. Zbog najvećeg broja BSV napitak inokulisan sojem L-3 ima i najveću titrabilnu kiselost na kraju procesa (Slika 39). Opadanje broja BSV u poslednjih nekoliko dana procesa nije izuzetak za kombuha fermentaciju jer se i veće smanjenje broja (oko 1,5 log jedinice za četiri dana) uočava tokom sedmodnevne kombuha fermentacije na crnom čaju (Slika 20).

Na osnovu rezultata prikazanih na Slikama 38 i 39 jasno je da početni broj ćelija kvasaca i BSV nije limitirajući za proces kombuha fermentacije. U svim izvedenim fermentacijama broj ćelija kvasaca i BSV tokom fermentacije nije bio manji od 6 log cfu/ml, odnosno, 5 log cfu/ml. Moguće je da je za uspešnu kontrolisanu fermentaciju zaslađenog čaja korišćenjem pojedinačnih sojeva kvasaca i BSV kao starter kultura upravo potrebno postići navedeni broj ćelija kvasaca i BSV u podlozi za kultivaciju. Takođe, dodatak *Lactobacillus* sojeva ne utiče na promenu fizičko-hemijskih i mikrobioloških parametara u odnosu na tradicionalnu fermentaciju.

Nakon jednog sata od dodatka izolata BMK, kao i u trećem i četvrtom danu fermentacije određen je broj BMK i sadržaj L- i D- mlečne kiseline u fermentacionim tečnostima (Tabela 28). Sadržaj L- i D- mlečne kiseline u kontrolnim uzorcima tokom fermentacije tradicionalne podloge sa crnim čajem prikazan je u Tabeli 29.

Tabela 28. Broj BMK (log cfu/ml (sd)) i sadržaj mlečne kiseline (mg/l (sd)) u fermentacionoj tečnosti inokulisanoj izolatima BMK

<i>Lactobacillus</i> izolat	Trajanje fermentacije (dani)	Broj BMK	D-mlečna kiselina	L-mlečna kiselina
L-1	2	8,16 (0,15)	3,7 (0,9)	9,8 (0,3)
	3	7,76 (0,1)	150,7 (1,5)	44,9 (0,1)
	4	7,6 (0,04)	189,1 (4,2)	51,9 (0,1)
L-2	2	7,18 (0,01)	3,9 (0,11)	6,6 (0,13)
	3	6,1 (0,11)	43,2 (1,4)	31,4 (0,1)
	4	nd	58,2 (0,7)	37,6 (0,4)
L-3	2	7,38 (0,03)	3,5 (0,02)	7 (0,11)
	3	2,02 (0,09)	14,4 (0,12)	30 (1,1)
	4	nd	11,1 (0,3)	53,6 (0,5)
L-4	2	7,54 (0,02)	3,8 (0,15)	8,5 (0,2)
	3	3,61 (0,41)	203,7 (1,4)	71 (1,0)
	4	2,95 (0,12)	247,6 (0,5)	95,5 (0,5)
L-5	2	6,34 (0,02)	3,3 (0,13)	5,1 (0,45)
	3	2,47 (0,32)	94,6 (0,5)	37,8 (0,3)
	4	1,9 (0,01)	95 (0,2)	40,5 (0,5)

nd – nije detektovano

Nakon inokulacije sa 10% suspenzije BMK, broj ćelija u fermentacionoj tečnosti iznosio je od 6,34-8,16 log cfu/ml. Startni broj BMK održao se do kraja procesa jedino za soj L-1, dok kod sojeva L-2 i L-3 na kraju procesa nisu detektovane BMK. Kod napitaka inokulisanih sojevima L-4 i L-5 inicijalni broj BMK do kraja procesa smanjio se za 5 log jedinica. Za razliku od komercijalnih starter kultura (Tabela 25), izolati *Lactobacillus* spp. poreklom iz tradicionalnih fermentisanih proizvoda (sir, kajmak, kiselo testo) su pokazali očekivano viši stepen preživljavanja tokom kombuha fermentacije. Ovo se može objasniti time da čiste kulture izolovane iz kompleksnih ekosistema (kao što su npr. tradicionalni fermentisani proizvodi) pokazuju raznovrsnost metaboličkih aktivnosti što ih umnogome razlikuje od uporedivih sojeva koji se koriste kao starteri u industriji. Takođe, korišćenjem prirodnih izolata dobija se veća raznolikost proizvoda u smislu ukusa, konzistencije i mikrobiološkog kvaliteta, za razliku od upotrebe starter kultura među čijim sojevima ne postoje velike razlike (Klijn i sar., 1995). Starteri se uglavnom biraju sa ciljem što brže acidifikacije, ne mogu da se prilagođavaju željenim osobinama i funkcionalnosti gotovog proizvoda, a njihov broj se često ne može održati na željenom nivou. Samim tim i proizvodi gube jedinstvenost i karakteristike koje ih čine popularnim i prepoznatljivim. S druge strane, tradicionalna fermentisana hrana dobija se pomoću divljih sojeva BMK izolovanih iz sirovina, procesne opreme ili okruženja. Razlike startera i divljih izolata uključuju razlike u stepenu rasta, ponašanju u mešanim kulturama, adaptaciji na određene supstrate, antimikrobnim svojstvima, ukusu, aromi i parametrima kvaliteta. Otpornosti divljih sojeva doprinosi i stalna kompeticija sa ostalim mikroorganizmima u cilju preživljavanja uslova u njihovom prirodnom okruženju, zbog čega ovi sojevi često proizvode antimikrobne supstance kao što su bakteriocini (Leroy i De Vuyst, 2004).

Treba napomenuti da smanjenje broja ćelija BMK tokom fermentacije, kako komercijalnih starter kultura tako i izolata, nije u vezi sa eventualnom antimikrobnom aktivnošću kombuhe prema ovim sojevima. Ovo dokazuju rezultati iz Tabele 15 koji su pokazali da kombuha i kontrolni uzorci nisu ispoljili antimikrobnu aktivnost prema *L. Hilgardii* (L-1), *L. Fermentum* (L-2) i starter kulturi MY-1821.

Mogućnost preživljavanja *Lactobacillus* spp. izolovanih iz mlečnih proizvoda na pH = 3 i pH = 1 (tokom tri sata) ispitali su Maragkoudakis i sar. (2006) u okviru ispitivanja njihovih probiotskih karakteristika. Svi sojevi pokazali su izuzetnu viabilnost na pH = 3 tokom tri sata, dok većina sojeva već nakon jednog sata ne može da preživi pH = 1. Izolati BMK korišćeni u ovom istraživanju pokazali su manju vijabilnost, jer im se broj u trećem danu fermentacije (pri pH oko 3) već značajno smanjio (Tabela 28). Ipak, faktore koji utiču na vijabilnost BMK ne možemo posmatrati pojedinačno, jer je u kombuhi prisutan i uticaj izvora ugljenika, interakcija sa bakterijama iz čajne gljive, količina inokuluma, vreme inokulacije itd., koji zajedno utiču na preživljavanje BMK.

Tabela 29. Sadržaj L- i D- mlečne kiseline (mg/l (sd)) i broj BMK (log cfu/ml) tokom fermentacije crnog čaja

Trajanje fermentacije (dani)	D-mlečna kiselina	L-mlečna kiselina	BMK
0	0,3 (0,1)	3,3 (0,5)	nd
1	1,7 (0,1)	12,5 (0,1)	nd
2	3,8 (0,6)	10,2 (0,8)	nd
3	4,2 (0,1)	12,9 (0,9)	nd
4	7,7 (0,1)	38,4 (0,1)	nd

nd – nije detektovano

Rezultati određivanja sadržaja mlečne kiseline tokom fermentacije u slučaju kombuhe koja je korišćena kao kontrolni uzorak su pokazali da sama čajna gljiva primarno sintetiše L- mlečnu kiselinu čija je količina u fermentacionoj tečnosti za oko 2-5 puta veća u odnosu na D- oblik (Tabela 29). Na kraju fermentacije u kontrolnom kombuha napitku sintetisano je 38,4 mg/l L- mlečne i 7,7 mg/l D- mlečne kiseline. Slike 38-41 su pokazale da dodatak *Lactobacillus* spp. U drugom danu fermentacije ne utiče na model rasta ćelija čajne gljive, njihov broj i njihovu fiziološku aktivnost, ali su zato laktobacili značajno uticali na sadržaj i profil mlečne kiseline u fermentacionoj tečnosti (Tabela 28). Naime, nakon dodatka suspenzije *Lactobacillus* spp. u fermentacionu tečnost, u narednih 24h (između trećeg i četvrtog dana fermentacije) dolazi do značajnog povećanja sadržaja L- i D- mlečne kiseline. Ovaj trend zadržava se i u naredna 24h, za sve uzorke osim L-3 kod koga se sadržaj D- mlečne kiseline smanjuje za 3,3 mg/l u odnosu na prethodni dan. Sadržaj D- mlečne kiseline je veći za sve primenjene sojeve u odnosu na L- mlečnu kiselinu, osim kod kombuhe obogaćene sojem L-3. Najveću količinu mlečne kiseline na kraju procesa produkovao je soj L-4 (247,6 mg/l D- i 95,5 mg/l L- mlečne kiseline), a najmanju sojevi L-3 (11,1 mg/l D- mlečne kiseline) i L-2 (37,6 mg/l L- mlečne kiseline). Dodatkom BMK (komercijalnih startera i izolata) tokom kombuha fermentacije dobija se napitak sa većim sadržajem mlečne kiseline nego u tradicionalnom napitku bez obzira na smanjenje broja ćelija tokom procesa. U napitku inokulisanom starterom MY-1821 sadržaj L- mlečne kiseline je dva puta veći, a u napitku inokulisanom divljim izolatom L-4 skoro tri puta veći nego u tradicionalnom.

Dok je u kombuhi dobijenoj na tradicionalan način i dodatkom komercijalnih startera dominantna L- mlečna kiselina (Tabele 26 i 29), u napicima koji su dobijeni uz dodatak izolata *Lactobacillus* spp. dominantan je D- oblik mlečne kiseline (Tabela 28). *Lactobacillus* spp. izolati proizvode mnogo više D- oblika mlečne kiseline nego komercijalni starteri i kultura čajne gljive. Povećan unos D- mlečne kiseline u organizam može štetno da deluje na

zdravlje, zbog čega je prema preporuci svetske zdravstvene organizacije ograničen unos D- mlečne kiseline na 100 mg/kg telesne mase na dan (Panesar i sar., 2007; Reddy i sar., 2008). Ukoliko se uzme u obzir da je najveći sadržaj D- mlečne kiseline u napitku inokulisanom sojem L-4 (247 mg/l) i preporučena dnevna doza kombuhe do dve čaše na dan, jasno je da štetna doza D- mlečne kiseline neće biti uneta konzumiranjem kombuha napitaka sa dodatim izolatima BMK (za čoveka telesne mase od 75 kg, dnevni unos u 0,5 l napitka sa najviše D- mlečne kiseline bio bi 125 mg, od dozvoljenih 7500 mg).

Imajući u vidu da u čajnoj gljivi koja je upotrebljena kao radna kultura u ovom radu nije dokazano prisustvo BMK (Tabela 8), mlečna kiselina primarno nastaje od strane BSV iz etanola i sirćetne kiseline (Reiss, 1994). Kvasci zbog nedostatka enzima laktat dehidrogenaze nisu u mogućnosti da tokom procesa glikolize produkuju mlečnu kiselinu iz piruvata (Gao i sar., 2009). U povelju su istraživanja u kojima je genetski modifikovan kvasac *Saccharomyces cerevisiae* (u čiji su genom inkorporirane kopije gena za laktat dehidrogenazu) u mogućnosti da produkuje mlečnu kiselinu sa izuzetnom optičkom čistoćom (iznad 99,9 %), čak i u medijumu jednostavnijeg sastava. Takav kvasac mogao bi da preuzme ulogu BMK u proizvodnji mlečne kiseline (Gao i sar., 2009).

Sadržaj L- i D- mlečne kiseline u kontrolnoj kombuhi je u skladu sa rezultatima koje su dobili Malbaša i sar. (2008) radeći istom metodom. U kombuha napitku nakon 14 dana fermentacije takođe je dominantan L- oblik mlečne kiseline čija je krajnja koncentracija iznosila 0,053 g/l (Malbaša i sar., 2008). Ostali autori detektuju uglavnom veći sadržaj mlečne kiseline tokom kombuha fermentacije u odnosu na ovde prikazane rezultate. Prema Reiss-u (1994) najveći sadržaj L- mlečne kiseline (određen enzimskim putem) dobija se pri koncentraciji saharoze od 50 g/l u podlozi i iznosi 0,9 g/l šestog dana, nakon čega opada. Mnogo manje količine (od 0,01 g/l do 0,16 g/l) detektovane su ukoliko su u podlozi prisutni drugi šećeri u različitim koncentracijama (laktaza, glukoza, fruktoza). Sličan sadržaj mlečne kiseline određen HPLC metodom (1,15 g/l) u kombuhi na crnom čaju nakon 4 dana fermentacije dobijaju i Bellosso-Morales i Hernández-Sánchez (2003), a mnogo više mlečne kiseline u napitku dobija se ukoliko se kao izvor N atoma koriste različite surutke (3-6 g/l). Malbaša i sar. (2008) utvrdili su da se sadržaj L- mlečne kiseline povećava i do deset puta (0,15-0,40 g/l) ukoliko se kao izvor C atoma koristi melasa umesto saharoze, što se pripisuje melasi kao povoljnijem supstratu za čajnu gljivu (zbog prisustva invertnog šećera, biotina kao faktora rasta i aminokiselina) za metaboličke procese. Najviše mlečne kiseline u fermentacionoj tečnosti, Jayabalan i sar. (2007) HPLC metodom detektuju nakon tri dana fermentacije (0,54 g/l na zelenom čaju i 0,44 g/l na crnom čaju), posle čega njen sadržaj opada do kraja procesa i 18-og dana iznosi 0,12 g/l, odnosno 0,18 g/l. Istom metodom Blanc (1996) je utvrdio da sadržaj mlečne kiseline tokom kombuha fermentacije ne prelazi 0,6 g/l (pri inicijalnoj koncentraciji saharoze od 100 g/l), a Sreeramulu i sar. (2001) tokom dvonedeljne fermentacije nisu detektovali mlečnu kiselinu u fermentacionoj tečnosti koristeći enzimске testove. Na razlike u rezultatima svakako utiče poreklo čajne gljive, ali i činjenica da za navedene studije nije poznato da li su u kombuha kulturama korišćenim za inokulaciju prisutne i BMK koje bi direktno uticale na produkciju mlečne kiseline tokom kultivacije i njen povećan sadržaj. Takođe, u većini istraživanja određen je samo sadržaj L- mlečne kiseline, dok D- oblik nije određen ili rezultati nisu prikazani, pa se ne može upoređivati odnos količina ovih izomera, sa rezultatima ovog rada. Slično, u slučaju određivanja HPLC metodom nepoznato je koji je oblik mlečne kiseline određivan, što takođe onemogućava adekvatno objašnjenje dobijenih razlika u njenom sadržaju.

Rezultati prikazani u Tabeli 28 pokazuju nemogućnost preživljavanja ćelija *Lactobacillus* sojeva L-2 i L-3 u sredini kao što je kombuha napitak, jer četvrtog dana fermentacije u napitku nisu detektovane ćelije ova dva soja. Zato je dalje ispitivanje preživljavanja tokom čuvanja, tj. skladištenja kombuha napitaka na temperaturi frižidera

(+4°C) ispitano samo za sojeve L-1, L-4 i L-5. Nakon 2 dana čuvanja u napicima inokulisanim sojevima L-4 i L-5 nisu detektovane BMK, a za isti period se fizičko-hemijske karakteristike ova dva napitka (pH i titrabilna kiselost) nisu značajnije promenile. Međutim, soj L-1 (*L. hilgardii*) pokazao je izuzetnu vijabilnost tokom desetodnevnog čuvanja kombuha napitka u frižideru. Promene pH, titrabilne kiselosti i broja BMK tokom čuvanja kombuha napitka inokulisanog sojem L-1 prikazane su u Tabeli 30.

Tabela 30. Fizičko-hemijski parametri i broj *Lactobacillus hilgardii* (L-1) tokom skladištenja kombuha napitka

Trajanje skladištenja (dani)	pH	Titrabilna kiselost (g/l)	BMK (log cfu/ml)
2	3,16 (0,01)*	5,19 (0,10)	7,55 (0,03)
4	3,16 (0,02)	5,18 (0,11)	7,37 (0,05)
6	3,25 (0,03)	5,31 (0,03)	7,15 (0,03)
10	3,26 (0,01)	5,20 (0,02)	7,18 (0,00)

* standardna devijacija

Kombuha napitak dobijem inokulisanjem sojem L-1 tokom skladištenja zadržava pH i titrabilnu kiselost na vrednostima sličnim kao i pre skladištenja (pH = 3,16, TA = 5,86 g/l). Takođe, broj ćelija BMK se smanjio za svega 0,4 log jedinica, tj. sa 7,6 log cfu/ml po završetku procesa na 7,18 log cfu/ml nakon 10 dana čuvanja, uprkos niskoj pH vrednosti napitka. Međutim, bez obzira na najveći broj tokom fermentacije i mogućnost preživljavanja u kombuhi, ovaj soj nije produkovao najveću količinu mlečne kiseline. Najveću količinu mlečne kiseline tokom fermentacije i u gotovom napitku produkovao je soj L-4 (*L. plantarum*), iako mu broj tokom kultivacije opada čak za 4,59 log jedinica. Rezultati ukazuju na činjenicu da vijabilnost BMK ne mora direktno da utiče na produkciju mlečne kiseline. Mathara i sar. (2008) navode da vijabilnost ćelija nije u direktnoj vezi sa probiotskom aktivnošću i da su tada zdravstveni efekti datih sojeva povezani sa nevijabilnim ćelijama ili ćelijskim komponentama, enzimskom aktivnošću ili produktima fermentacije.

Visok stepen otpornosti soja L-1 (*L. hilgardii*) na ekološke uslove tokom kombuha fermentacije i čuvanja napitka može se dovesti u vezu sa poreklom ovog soja. Naime, ovaj soj jedini je od svih izolata ispitanih u okviru inokulacije fermentacione tečnosti sojevima *Lactobacillus* spp. izolovan iz kiselog testa, sredine koja predstavlja konzorcijum BMK i kvasaca. U ovoj zajednici homofermentativni laktobacili odgovorni su za proces zakišeljavanja, a kvasci za fermentaciju, kojoj mogu da doprinesu i heterofermentativni laktobacili (De Vuyst i Neysens, 2005, Corsetti i Settanni, 2007). Ovim se može objasniti prilagodljivost i mogućnost preživljavanja *L. hilgardii* u sredini kao što je kombuha konzorcijum, gde su osim dodatih laktobacila već prisutni kvasci i bakterije sirćetnog vrenja. Kandler i Weiss (1986) navode da *L. hilgardii* spada u tipične BMK koje se nalaze u zakišeljanim napicima i alkoholnim pićima (npr. u vinu gde može biti odgovoran za malolaktičku fermentaciju, ali i za kvarenje), što takođe može da objasni njihovo preživljavanje u sredini sa niskom pH vrednošću i u zajednici sa drugim proizvodnim mikroorganizmima.

Figueiredo i sar. (2008) su ispitali uticaj fenolnih aldehida i flavonoida prisutnih u vinu na rast *L. hilgardii* i utvrdili da katehin (u opsegu koncentracija 0-50 mg/l) i epikatehin (3,12-12,5 mg/l) ne utiču na rast *L. hilgardii*, dok neki fenolni aldehidi, kao i kvercetin i kemferol značajno smanjuju rast ove bakterije. U tradicionalnom kombuha napitku identifikovani su upravo katehin i epikatehin (Tabela 18) čija je koncentracija ista (za katehin) ili mnogo niža (za epikatehin) od ispitane u radu Figueiredo i sar. (2008), te se može

prepostaviti da fenolna jedinjenja iz kombuhe ne utiču na smanjenje rasta *L. hilgardii*, dok je moguće da doprinose smanjenju broja drugih vrsta. Neka fenolna jedinjenja, pre svih katehin mogu čak i da stimulišu rast *L. hilgardii* (Figueiredo i sar., 2008).

5. ZAKLJUČAK

- ✓ U čajnoj gljivi koja je korišćena kao radna kultura u ovom istraživanju nije detektovano prisustvo bakterija mlečne kiseline (laktokoka i laktobacila), niti su detektovane strane bakterije i plesni – kontaminanti radne kulture.
- ✓ Iz dve čajne gljive istog geografskog porekla, a različitog lokaliteta izolovana su tri soja bakterija sirćetnog vrenja (A-3/2, N-3/1 i V/3) koji su identifikovani PCR metodom. Posle digestije PCR proizvoda umnoženog sa 16S rDNK prajmerom sa četiri restrikciona enzima (AluI, HhaI, RsaI i HaeIII), utvrđeno je da izolati bakterija sirćetnog vrenja iz kombuhe ne pripadaju vrsti *Acetobacter aceti*, već da najverovatnije izolati A-3/2 i N-3/1 pripadaju vrsti *Gluconobacter oxydans*, a izolat V/3 vrsti *Gluconacetobacter hansenii*. Ove rezultate potvrđuje i restrikciona analiza PCR proizvoda sa itsI prajmerom, koja dodatno ukazuje da se radi o drugačijim sojevima *Gluconobacter oxydans* i *Gluconacetobacter hansenii* od onih citiranih u literaturi.
- ✓ Kombuha napici od melise različite titrabilne kislosti (optimalne od 4,44 g/l i većih vrednosti od 6,29 i 8,12 g/l), toplotno denaturisani kombuha napici i odgovarajući rastvori sirćetne kiseline pokazali su izraženu antibakterijsku aktivnost prema svim odabranim izolatima Gram-negativnih bakterijama. Izolati Gram-pozitivnih bakterija su pokazali manju osetljivost prema kombuhi i kontrolnim uzorcima u odnosu na Gram-negativne bakterije, što se može objasniti razlikama u strukturi ćelijskog zida dveju bakterijskih grupa.
- ✓ Nosilac antibakterijske aktivnosti kombuhe od melise je sirćetna kiselina, čiji sadržaj u kombuhi određuje stepen antibakterijske aktivnosti. Međutim, na postojanje i drugih antibakterijskih komponenti u napitku pored sirćetne kiseline ukazuje bakteriostatsko delovanje neutralisane kombuhe prema nekim test mikroorganizmima (*Escherichia coli*, *Citrobacter freundii* i *Salmonella* sp.) i bakteriostatsko delovanje čajnog napitka od melise prema *Enterobacter cloacae* i *Proteus* sp.
- ✓ Kombuha napici od melise i kontrolni uzorci nisu ispoljili antibakterijsku aktivnost prema odabranim izolatima bakterija mlečne kiseline i komercijalnoj starter kulturi. Odsustvo inhibirajućeg delovanja prema bakterijama mlečne kiseline ukazuje na potencijalno selektivno delovanje kombuha napitaka na mikroorganizme, tj. Bakterije koje kolonizuju digestivni trakt ljudi.
- ✓ Sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja u čajnom napitku od melise veći je u odnosu na crni čaj. Tokom kombuha fermentacije sadržaj fenolnih jedinjenja se menjao nelinearno i u fermentacionoj tečnosti sa melisom je bio veći za 2,5-2,9 puta u odnosu na sadržaj u fermentacionoj tečnosti sa crnim čajem. Visok sadržaj fenolnih jedinjenja čini zaslađeni čaj melise adekvatnom podlogom za kombuha fermentaciju koja obezbeđuje dovoljne količine nutrijenata mikroorganizmima čajne gljive.
- ✓ Glavna fenolna komponenta detektovana HPLC analizom tokom kombuha fermentacije na podlozi sa melisom je ruzmarinska kiselina, a ostale komponente čija je koncentracija znatno manja su: kafena, hlorogenska, ferulna kiselina i kvercetin. U fermentacionoj tečnosti sa crnim čajem dominantna fenolna komponenta je katehin, a sledeće po zastupljenosti su: galna kiselina, epikatehin, rutin i kumarna kiselina.
- ✓ Antioksidativna aktivnost uzoraka fermentacionih tečnosti i kombuha napitaka od melise prema hidroksil radikalima bila je veća u odnosu na čajni napitak i povećavala se tokom fermentacije. Prema DPPH radikalima, čajni napitak od melise pokazao je veću maksimalnu antioksidativnu aktivnost u odnosu na ostale uzorke, ali je preraspodela aktivnosti pri nižim primenjenim količinama uzoraka bila različita.

- ✓ Antioksidativna aktivnost uzoraka fermentacionih tečnosti i kombuha napitaka od crnog čaja prema hidroksil radikalima bila je veća u odnosu na čajni napitak od crnog čaja i nije se značajno menjala tokom fermentacije. Prema DPPH radikalima, aktivnost čajnog napitka od crnog čaja bila je jednaka ili veća od aktivnosti ostalih uzoraka.
- ✓ Na osnovu EC₅₀ vrednosti, antioksidativna aktivnost konzumnih kombuha napitaka od melise i crnog čaja prema DPPH radikalima bila je veća od aktivnosti čajnih napitaka. Fermentaciona tečnost i kombuha napitak od melise pokazali su veću antioksidativnu aktivnost na oba ispitana radikala u odnosu na uzorke sa crnim čajem, što se može pripisati većem sadržaju fenolnih jedinjenja tokom fermentacije podloge sa melisom.
- ✓ Konzumni kombuha napitak od melise i čajni napitak nisu stimulisali proliferaciju ćelijskih linija humanih karcinoma: HeLa (epitelni karcinom cerviksa), HT-29 (adenokarcinom debelog creva) i MCF-7 (adenokarcinom dojke) pri koncentracijama većim od 100 µg/ml. Ni jedan od uzoraka nije pokazao efekat inhibicije rasta od 50%. Najveći uticaj i najveća razlika u aktivnosti čajnog i kombuha napitka uočena je za HeLa ćelijsku liniju, gde je EC₂₀ za čajni napitak postignuta sa koncentracijom od 500 µg/ml. Kombuha od melise inhibirala je rast MCF7 ćelijske linije za oko 10% pri koncentraciji od 500 µg/ml. Čajni i konzumni kombuha napitak od melise nisu uticali na rast ćelijske linije HT-29.
- ✓ Dodatak komercijalnih starter kultura bakterija mlečne kiseline (MY-1821 i MY-721) u fermentacionu tečnost 48h od početka fermentacije nije uticao na uobičajene promene vrednosti pH, titrabilne kiselosti i broja ćelija čajne gljive tokom kombuha fermentacije. Tokom fermentacije se broj bakterija mlečne kiseline iz starter kultura (laktobacila, streptokoka i bifidobakterija) smanjivao zbog nepovoljnih uslova kultivacije. Sadržaj L- i D- mlečne kiseline se tokom fermentacije povećavao kao posledica aktivnosti bakterija mlečne kiseline. L- oblik mlečne kiseline je bio dominantan tokom čitavog perioda kultivacije, a njen sadržaj u napicima je bio 66,96 mg/l, odnosno, 54,75 mg/l u zavisnosti od primenjene starter kulture. Uprkos slaboj održivosti ćelija bakterija mlečne kiseline sadržaj mlečne kiseline u napicima sa dodatim starter kulturama je veći nego u napitku dobijenom od zaslađenog crnog čaja.
- ✓ Dodatak izolata *Lactobacillus* sp. poreklom iz tradicionalnih fermentisanih proizvoda (sir, kajmak, kiselo testo) 48h od početka fermentacije takođe nije uticao na promene fizičko-hemijskih, hemijskih i mikrobioloških parametara kombuha fermentacije. Tokom kombuha fermentacije najveću vijabilnost pokazao je izolat *Lactobacillus hilgardii* poreklom iz kiselog testa, čiji se broj nije menjao ni tokom desetodnevnog čuvanja gotovog napitka na +4°C. Visok stepen otpornosti ovog izolata može se dovesti u vezu sa njegovim poreklom i sposobnošću preživljavanja u sredini sa niskom pH vrednošću, u konzorcijumu sa drugim mikroorganizmima.
- ✓ Dodatkom izolata *Lactobacillus* sp. se sadržaj L- i D- mlečne kiseline u fermentacionim tečnostima povećao skoro tri puta u odnosu na tradicionalni napitak. Najveću količinu mlečne kiseline (247,6 mg/l D- i 95,5 mg/l L-mlečne kiseline) je proizveo soj *Lactobacillus plantarum* poreklom iz kajmaka, uprkos manjoj vijabilnosti u odnosu na soj *Lactobacillus hilgardii*. Ovo ukazuje da stepen produkcije mlečne kiseline tokom simultane mlečno-kiselinske i kombuha fermentacije ne mora biti određen brojnošću ćelija bakterija mlečne kiseline.
- ✓ Sposobnost preživljavanja ćelija bakterija mlečne kiseline tokom kombuha fermentacije i u gotovom napitku tokom čuvanja, kao i sposobnost produkcije značajnije količine pre svega L- mlečne kiseline, uz eventualne probiotske karakteristike sojeva, jesu ključni faktori njihovog odabira za upotrebu tokom kultivacije čajne gljive u cilju dobijanja kombuhe povećane funkcionalne vrednosti.

6. LITERATURA

- Ahmad N., Mukhtar H. (1999): Green Tea Polyphenols and Cancer: Biologic Mechanisms and Practical Implications, *Nutrition Reviews*, 57, 78-83.
- Allahverdiyev A., Duran N., Ozguven M., Koltas S. (2004): Antiviral activity of the volatile oils of *Melissa officinalis* L. against Herpes simplex virus type-2, *Phytomedicine*, 11, 657-661.
- Allen C.M. (1998): Past research on Kombucha tea, The Kombucha FAQ Part 6, Research and tests results, <http://users.bestweb.net/~om/~kombu/FAQ/homeFAQ.html>.
- Almajano M.P., Carbó R., López Jiménez J.A., Gordon M.H. (2008): Antioxidant and antimicrobial activities of tea infusions, *Food Chemistry*, 108, 55-63.
- Araujo C., Sousa M.J., Ferreira M.F., Leao C. (2003): Activity of essential oils from Mediterranean *Lamiaceae* species against food spoilage yeasts, *Plant physiology*, Apr., 131(4), 1816-1825.
- Arthur H., Watson K. (1976): Thermal adaptation in yeast: growth temperatures, membrane lipid, and cytochrome composition of psychrophilic, mesophilic, and thermophilic yeasts, *Journal of Bacteriology*, 128(1), 56-68.
- Atoui A.K., Mansouri A., Boskou G., Kefalas P. (2005): Tea and herbal infusions: Their antioxidant activity and phenolic profile, *Food Chemistry*, 89, 27-36.
- Axelsson L. (2004): Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology, in: *Lactic Acid Bacteria Microbiological and Functional Aspects*, eds: Salminen S., von Wright A., Ouwehand A., 3rd ed, Marcel Dekker Inc., New York, Basel.
- Bahtiyarca Bağdat R. (2006): The essential oil of lemon balm (*Melissa officinalis* L.). Its components and using fields, *Journal of the Faculty of Agriculture, OMU*, 21(1), 116-121.
- Balentine D.A., Wiseman S.A., Bouwens L.C. (1997): The chemistry of tea flavonoids, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 37, 693-704.
- Bancirova M. (2010): Comparison of the antioxidant capacity and the antimicrobial activity of black and green tea, *Food Research International*, 43, 1379-1382.
- Barnett J.A. (1976): The Utilization of Sugars by Yeasts, *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, 32, 125-234.
- Barnett J. A., Payne R.W., Yarrow D. (2000): *Yeasts: Characteristics and identification*, Cambridge university press, Cambridge, pp. 7-29.
- Bartowski E.J., Henschke P.A. (2008): Acetic acid bacteria spoilage of bottled red wine- A review, *International Journal of Food Microbiology*, 125: 60-70.
- Battikh H., Bakhrouf A., Ammarb E. (2012): Antimicrobial effect of Kombucha analogues, *LWT - Food Science and Technology*, 47(1), 71-77.
- Bauer-Petrovska B., Petrushevska-Tozi L. (2000): Mineral and water soluble vitamin content in the Kombucha drink, *International Journal of Food Science and Technology*, 35, 201-205.
- Belloso Morales G., Hernández Sánchez H.H. (2003): Manufacture of a beverage from cheese whey using a "tea fungus" Fermentation, *Revista Latinoamericana de Microbiologia*, 45(1-2), 5-11.
- Bhattacharya S., Gachhui R., Sil P.C. (2011): Hepatoprotective properties of kombucha tea against TBHP-induced oxidative stress via suppression of mitochondria dependent apoptosis, *Pathophysiology*, 18, 221-234.
- Blanc P. J. (1996): Characterization of the tea fungus metabolites, *Biotechnology Letters*, 18(2), 139-142.

- Boesch C., Trček J., Sievers M., Teuber M. (1998): *Acetobacter intermedius*, sp. nov., Systematic and Applied Microbiology, 21, 220-229.
- Bors W., Heller W., Michel C., Sran M. (1990): Flavonoids as antioxidants: determination of radical-scavenging efficiencies, Methods in Enzymology, 186, 343-355.
- Bouayed J., Piri K., Rammal H., Dicko A., Desor F., Younos C., Soulimani R. (2007): Comparative evaluation of the antioxidant potential of some Iranian medicinal plants, Food Chemistry, 104, 364-368.
- Cabrera C., Giménez R., López M.C. (2003): Determination of Tea Components with Antioxidant Activity, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51, 4427-4435.
- Capecka E., Mareczek A., Leja M. (2005): Antioxidant activity of fresh and dry herbs of some *Lamiaceae* species, Food Chemistry, 93, 223-226.
- Carnat A.P., Carnat A., Fraisse D., Lamaison J.L. (1998): The aromatic and polyphenolic composition of lemon balm (*Melissa officinalis* L.subsp. *officinalis*) tea, Pharmaceutica Acta Helvetie, 72, 301-305.
- Cavusoglu K., Guler P. (2010): Protective effect of kombucha mushroom (*KM*) tea on chromosomal aberrations induced by gamma radiation in human peripheral lymphocytes *in-vitro*, Journal of Environmental Biology, 31(5), 851-856.
- Centers for disease control, USA, (1995): Unexplained sever illness possibly associated with consumption of Kombucha tea - Iowa, Morbidity and Mortality Weekly Report, 44 (48), 892-900.
- Chance B., Sies H., Boveris A. (1979): Hydroperoxide metabolism in mammalian organs, Physiological Reviews, 59, 527-605.
- Chen J.H., Ho C.-T. (1997): Antioxidant activities od caffeic acid and its related hydroxycinnamic acid compounds, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 45, 2374-2378.
- Chen C., Liu B.Y. (2000): Changes in major components of tea fungus metabolites during prolonged fermentation, Journal of Applied Microbiology, 89, 834-839.
- Chen Y-Q., Zhou Y-Q., Angeloni D., Kurtz A.L., Qiang X-Z., Wang M-H. (2000): Overexpression and activation of the RON receptor tyrosine kinase in a panel of human colorectal carcinoma cell lines, Experimental Cell Research, 261, 229-238.
- Chu S-C., Chen S. (2006): Effects of origins and fermentation time od the antioxidant activities of Kombucha, Food Chemistry, 98(3), 502-507.
- Cleenwerck I., De Vos P.D. (2008): Polyphasic taxonomy of acetic acid bacteria: An overview of the currently applied methodology, International Journal of Food Microbiology, 125, 2-14.
- Corsetti A., Settanni L. (2007): Lactobacilli in sourdough fermentation, Food Research International, 40, 539-558.
- Crueger W., Crueger A. (1984): Biotehnologija, R. Oldenburg Verlag, München-Wien, (prevod Gaćeša, S. (2000), Tehnološki fakultet, Novi Sad).
- Cushnie T.P., Lamb A.J. (2005): Antimicrobial activity of flavonoids, Inernational Journal of Antimicrobial Agent, 26, 343-356.
- Cuvelier M.-E., Richard H., Berset C. (1992): Comparison of the antioxidative activity of some acid-phenols: Structure-activity relationships, Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, 56, 324-325.
- Cvetković D. (2003): Metabolička aktivnost čajne gljive na različitim supstratima, Magistarski rad, Tehnološki fakultet, Novi Sad.

- Cvetković, D. (2008): Kombuha od lekovitog bilja – biološka aktivnost i parametri fermentacije, Doktorska disertacija, Tehnološki fakultet, Novi Sad.
- Cvetković D., Markov S., Djurić M., Savić D., Velićanski A. (2008): Specific interfacial area as a key variable in scaling-up Kombucha fermentation, *Journal of Food Engineering*, 85, 387–392.
- Čanadanović-Brunet J. (1997): Kiseonikovi slobodni radikali prirodnih i model sistema, Doktorska disertacija, Prirodno-matematički fakultet, Novi Sad, 4-14.
- Čanadanović-Brunet J., Četković G., Djilas S., Tumbas V., Bogdanović G., Mandić A., Markov S., Cvetković D., Čanadanović V. (2008): Radical scavenging, antibacterial, and antiproliferative activities of *Melissa officinalis* L. extracts, *Journal of Medicinal Food*, 11(1), 133-143.
- Četojević-Simin D., Čanadanović-Brunet J., Bogdanović G., Četković G., Tumbas V., Dilas S. (2004): Antioxidative and antiproliferative effects of *Satureja montana* L. extracts, *Journal of BUON*, 9, 443-449.
- Četojević Simin D.D., Bogdanović G.M., Cvetković D.D., Velićanski A.V. (2008): Antiproliferative and antimicrobial activity of traditional Kombucha and *Satureja montana* L. Kombucha, *Journal of BUON*, 13, 395-401.
- Četojević Simin D.D., Velićanski A.S., Cvetković D.D., Markov S.L., Mrđanović J.Ž., Bogdanović V.V., Šolajić S.V. (2012): Bioactivity of Lemon Balm Kombucha, *Food and Bioprocess Technology*, 5, 1756-1765.
- Dastmalchi K., Damien Dorman H.J., Oinonen P.P., Darwis Y., Laakso I., Hiltunen R. (2008): Chemical composition and in vitro antioxidative activity of a lemon balm (*Melissa officinalis* L.) extract, *LWT-Food Science and Technology*, 41(3), 391-400.
- De Ley J., Gillis M., Swings J. (1984): Family VI. Acetobacteriaceae, in: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 1, eds: Krieg, N.R., Holt, J.G., Williams & Wilkins, Baltimore/London, pp. 267-278.
- De Vero L., Giudici P. (2008): Genus-specific profile of acetic acid bacteria by 16S rDNA PCR-DGGE, *International Journal of Food Microbiology*, 125, 96-101.
- De Vries M.C., Vaughan E.E., Kleerebezem M., Vos W.M (2006): *Lactobacillus plantarum*- survival, functional and potential probiotic properties in the human intestinal tract, *International Dairy Journal*, 16, 1018-1028.
- De Vuyst L., Neysens P. (2005): The sourdough microflora: biodiversity and metabolic interactions, *Trends in Food Science & Technology*, 16, 43–56.
- Del Rio D., Stewart A.J., Mullen W., Burns J., Lean M.E.J., Brighenti F., Crozier A. (2004): HPLC-MSn Analysis of Phenolic Compounds and Purine Alkaloids in Green and Black Tea, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 2807-2815.
- Dimitrova Z., Dimov B., Manolova N. (1993): Antiherpes effect of *Melissa officinalis* L. Extracts, *Acta Mikrobiologia Bulgarica*, 29, 65-72.
- Diplock A.T., Aggett P.J., Ashwell M., Bornet F., Fern E.B., Roberfroid M.B. (1999): Scientific concepts of functional foods in Europe: consensus document, *British Journal of Nutrition*, 81(1), S1–S27.
- Dipti P., Yogesh B., Kain A.K., Pauline T., Anju B., Sairam M., Singh B., Mongia S.S., Ilavazhagan Devendra Kumar G., Selvamurthy W. (2003): Lead Induced Oxidative Stress: Beneficial Effects of Kombucha Tea, *Biomedical and Environmental Sciences*, 16, 276-282.
- Divies C., Cachon R. (1998): Altérations par les bactéries acétiques, in *Oenologie, Fondements scientifiques et technologiques*, ed. C. Flanzy, Londres, Paris-New York, 539-552.

- Duenas M., Hernandez T., Estrella I. (2007): Changes in content of bioactive polyphenolic compounds of lentils by the action of exogenous enzymes, Effect on their antioxidant activity, *Food Chemistry*, 101, 90-97.
- Dufresne C., Farnworth E. (2000): Tea, Kombucha, and health: a review, *Food Research International*, 33, 409-421.
- Dutta D., Gachhui R. (2006): Novel nitrogen-fixing *Acetobacter nitrogenifigens* sp. nov., isolated from Kombucha tea, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56, 1899–1903.
- Dutta D., Gachhui R. (2007): Nitrogen-fixing and cellulose-producing *Gluconacetobacter kombuchae* sp. nov., isolated from Kombucha tea, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57, 353–357.
- Du Toit W. J., Pretorius I. S. (2002): The occurrence, control and esoteric effect of acetic acid bacteria in winemaking, *Annals of Microbiology*, 52, 155–179.
- Entani E., Ohmuri S., Masai H., Suzuki K.I. (1985): *Acetobacter polyoxogenes* sp. nov., a new species of an acetic acid bacterium useful for producing vinegar with high acidity, *The Journal of General Applied Microbiology*, 31, 475-490.
- Erkan N., Ayranci G., Ayranci E. (2008): Antioxidant activities of rosemary (*Rosmarinus Officinalis* L.) extract, blackseed (*Nigella sativa* L.) essential oil, carnosic acid, rosmarinic acid and sesamol, *Food Chemistry*, 110, 76-82.
- Ertürk Ö. (2006). Antibacterial and antifungal activity of ethanolic extracts from eleven spice plants, *Biologia*, 61(3), 275-278.
- Ettayebi K., Errachidi F., Jamaï L., Tahri-Jouti M.A., Sendide K., Ettayebi M. (2003): Biodegradation of polyphenols with immobilized *Candida tropicalis* under metabolic induction, *FEMS Microbiology Letters*, 233, 215-219.
- Figueiredo A.R., Campos F., de Freitas V., Hogg T., Couto J.A. (2008): Effect of phenolic aldehydes and flavonoids on growth and inactivation of *Oenococcus oeni* and *Lactobacillus hilgardii*, *Food Microbiology*, 25, 105–112.
- Flórez A.B., Delgado S., Mayo B. (2005): Antimicrobial susceptibility of lactic acid bacteria isolated from a cheese environment, *Canadian Journal of Microbiology*, 51, 51–58.
- Fontana J.D., De Souza A.M., Fontana C.K., Torriani I.L., Moreschi J.C., Gallotti B.J., De Souza S.J., Narcisco G.P., Bichara J.A., Farah L.F.X. (1990): *Acetobacter* Cellulose Pellicle as a Temporary Skin Substitute, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 24/25, 253-264.
- Fontana J.D., Franco V.C., De Souza S.J. Lyra I.N., De Souza A.M. (1991): Nature of Plant Stimulators in the Production of *Acetobacter xylinum* („Tea Fungus“) Biofilm Used in Skin Therapy, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 28/29, 341- 351.
- Francois J.A., Starks C.M., Sivanuntakorn S., Jiang H., Ransome A.E., Nam J-W., Constantine C.Z., Kappock T.J. (2006): Structure of NADH-insensitive hexameric cytrate synthase that resists acid inactivation, *Biochemistry*, 45, 13487–13499.
- Frank G. (1994): Kombucha, Health Beverage and natural remedy from the Far East, Steyr., House Ennsthaler.
- Franker E.N. (1993): In search of better methods to evaluate natural antioxidants and oxidative stability in food lipids, *Trends in Food Science and Technology*, 4, 220-225.
- Fugelsang K.C., Edwards C.G. (2007): *Wine microbiology; Practical Application and Procedures*, Springer, p. 138.
- Galasinski W., Chlabicz J., Paszkiewicz-Gadek A. (1996): The substances of plant origin that inhibit protein biosynthesis, *Acta Poloniae Pharmaceutica*, 53, 311-318.

- Gao M.G., Shimamura T., Ishida N., Takahashi H. (2009): Fermentative lactic acid production with a metabolically engineered yeast immobilized in photo-crosslinkable resins, *Biochemical Engineering Journal*, 47, 66-70.
- Goicoechea H.C., Eluk D., Kubescha M.P., Ferraro J.B., Rodil B.M., Miglietta H.F., Mantovani V.E. (2000): Probiotic Production: An Interesting Example for the Undergraduate Analytical Chemistry Laboratory, *The Chemical Educator*, 5, 67-70.
- Gonzales de Mejia E., Ramirez-Mares M.V., Puangpraphant S. (2009): Bioactive components of tea: Cancer, inflammation and behavior, *Brain, Behavior and Immunity*, 26(6), 721-731.
- Gramza A., Korczak J. (2005): Tea constituents (*Camellia sinensis* L.) as antioxidants in lipid systems, *Trends in Food Science & Technology*, 16, 351-358.
- Greenwalt C.J., Ledford R.A., Steinkraus K.H. (1998): Determination and characterization of the antimicrobial activity of the fermented tea Kombucha, *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*, 31, 291-296.
- 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.
- Grlić Lj. (1986): Enciklopedija samoniklog jestivog bilja, ITRO August Cesarec, Zagreb, str. 265-275.
- Hartmann A.M., Burtleson L.E., Holmes A.K., Geist C.R. (2000): Effects of Chronic Kombucha Ingestion on Open-field Behaviors, Longevity, Appetitive Behaviors, and Organs in C57-BL/6 Mice: A Pilot Study, *Nutrition*, 16, 755-761.
- Hesseltine C.W. (1965): A Millennium of Fungi, *Food and Fermentation, Mycologia*, 57, 149-197.
- Hoffmann N. (1998): Basic Building Blocks, Nutrients and Growth Factors, What the Kombucha culture needs to survive, <http://www.kombu.de/nutrient.htm>.
- Hofvendahl K., Hahn-Hägerdal B. (2000): Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources, *Review, Enzyme and Microbial Technology*, 26, 87-107.
- Holzapfel W.H., Schillinger U. (2002): Introduction to pre- and probiotics, *Food Research International*, 35, 109-116
- Ilić M., Kanurić K., Milanović S., Lončar E., Djurić M., Malbaša R. (2012): Lactose fermentation by Kombucha – a process to obtain new milk-based beverages, *Romanian Biotechnological Letters*, 17(1), 7013-7021.
- Jacobson J.L. (2006): *Introduction to Wine Laboratory Practices and Procedures*, Springer Science+Business Media, Inc., New York, pp. 275-277.
- Janković I. (1995): *Određivanje međusobnih odnosa mikrobnih asocijacija i biohemijskih karakteristika čajne gljive*, Magistarski rad, Poljoprivredni fakultet, Beograd.
- Jarrell J., Cal T., Bennett J.W. (2000): The Kombucha Consortia of yeasts and bacteria, *Mycologist*, 14 (4), 166-170.
- Jayabalan R., Marimuthu S., Swaminathan K. (2007): Changes in content of organic acids and tea polyphenols uring kombucha tea fermentation, *Food Chemistry*, 102, 392-398.
- Jayabalan R., Subathradevi P., Marimuthu S., Sathishkumar M., Swaminathan K. (2008): Changes in free-radical scavenging ability of kombucha teaa during fermentation, *Food Chemistry*, 109, 227-234.
- Jošić D., Đurić S., Jarak M. (2011): *Molekularna determinacija zemljišnih mikroorganizama*, Priručnik, Univerzitet u Novom Sadu, Poljoprivredni fakultet.

- Kailasapathy K. (2006) Survival of free and encapsulated probiotic bacteria and their effect on the sensory properties of yoghurt, *LWT*, 39, 1221–1227.
- Kandler O. (1983): Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria, *Antonie van Leeuwenhoek*, 49, 209-224.
- Kandler O., Weiss N. (1986). Regular, non-sporing gram-positive rods, in: *Bergey's manual of systematic bacteriology*, Vol. 2, eds: Sneath P.H.A., Mair N.S., Sharpe M.E., Holt J.G., Williams & Wilkins, Baltimore/London/Los Angeles/Sydney, pp. 1208–1234.
- Katalinic V., Milos M., Kulisic T., Jukic M. (2006): Screening of 70 medicinal plant extracts for antioxidant capacity and total phenols, *Food Chemistry*, 94, 550-557.
- Kaufman K. (1995): *Kombucha Rediscovered, A Guide to the Medicinal Benefits of an Ancient Healing Tea*, Alive Books, Canada.
- Kersters K., Lisdiyanti P., Komagata K., Swings J. (2006): The Family Acetobacteraceae: The Genera *Acetobacter*, *Acidomonas*, *Asaia*, *Gluconacetobacter*, *Gluconobacter*, and *Kozakia*, in: *The Prokaryotes*, eds: Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer K.-H., Stackebrandt E., Springer, pp. 163-201.
- Kim E.S., Liang Y.R., Jin J., Sun Q.F., Lu J.L., Du Y.Y., Lin C. (2007): Impact of heating on chemical composition of green tea liquor, *Food Chemistry*, 103, 1263-1267.
- Kišgeci J. (2002): *Lekovito bilje*, Partenon, Beograd, str. 208-225.
- Klijn N., Weerkamp A. H., de Vos W. M. (1995): Detection and characterization of lactose-utilizing *Lactococcus* spp. in natural ecosystems, *Applied Environmental Microbiology*, 61, 788–792.
- Konovalov I. N., Semenova M. N. (1955): K fiziologii "čajnoga griba", *Bot. Žurnal*, Moskva, 40(4), 567-570.
- Kumar S.D., Narayan G., Hassarajani S. (2008): Determination of anionic minerals in black and kombucha tea using ion chromatography, *Food Chemistry*, 111, 784–788.
- Kunze W. (1998): *Tehnologija sladarstva i pivarstva*, Jugoslovensko udruženje pivara, Futura, Petrovaradin, str. 134.
- Kurtzman C. R., Robnett C. J., Basehoar-Powers E. (2001): *Zygosaccharomyces kombuchaensis*, a new ascosporegenous yeast from "Kombucha tea", *FEMS Yeast Research*, 1, 133-138.
- Kushiro A., Chervaux C., Cools-Portier S., Perony A., Legrain-Raspaud S., Obis D., Onoue M., van de Moer A. (2009): Antimicrobial susceptibility testing of lactic acid bacteria and bifidobacteria by broth microdilution method and Etest, *International Journal of Food Microbiology*, 132, 54–58.
- Kusumegi K., Yoshida H., Tomiyama S. (1998): Inhibitory Effects of Acetic Acid and Growth of on Respiration *Zygosaccharomyces rouxii*: *Journal of fermentation and bioengineering*, 85(2), 213-217.
- Kwak N.S., Jukes D.J. (2001): Functional foods. Part 1: The development of a regulatory concept, *Food Control*, 12, 99-107.
- Lampen J.O. (1968): *External Enzymes of Yeast: Their Nature and Formation*, *Antonie van Leeuwenhoek*, 34, 1-18.
- Lee J. (2010): Caffeic acid derivatives in dried Lamiaceae and Echinacea purpurea products, *Journal of functional foods*, 2, 158-162.
- León Peláez A.M., Serna Cataño C.A., Quintero Yepes E.A., Gamba Villarroel R.R., De Antoni G.L., Giannuzzi L. (2012): Inhibitory activity of lactic and acetic acid on *Aspergillus flavus* growth for food preservation, *Food Control*, 24, 177-183.
- Leroy F., De Vuyst L. (2004): Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry, *Trends in Food Science & Technology*, 15, 67–78.

- Leroy F., De Winter T., Adriany T., Neysens P, De Vuyst L. (2006): Sugars relevant for sourdough fermentation stimulate growth of and bacteriocin production by *Lactobacillus amylovorus* DCE 471, International Journal of Food Microbiology, 112, 102–111.
- Lisdiyanti P., Navarro R.R., Uchimura T., Komagata K. (2006): Reclassification of *Gluconacetobacter hansenii* strains and proposals of *Gluconacetobacter saccharivorans* sp. nov. and *Gluconacetobacter nataicola* sp. nov., International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 56, 2101–2111.
- Liu C.-H., Hsu S.-H., Lee F.-L., Liao C.-C. (1996): The isolation and identification of microbes from a fermented tea beverage, Haipao, and their interactions during Haipao fermentation, Food Microbiology, 13, 407-415.
- Lončar S.E., Petrović E.S., Malbaša V.R., Verac M. R. (2000): Biosynthesis of glucuronic acid by means of tea fungus, Nahrung, 44(2), 138-139.
- Lončar E., Djurić M., Malbaša R., Kolarov Lj., Klašnja M. (2006): Influence of Working Conditions Upon Kombucha Conducted Fermentation of Black Tea, Food and Bioproducts Processing, 84(C3), 186-192.
- Łuczaj W., Skrzydlewska E. (2005): Antioxidative properties of black tea, Preventive Medicine, 40, 910– 918.
- Maggiora P., Marchio S., Stella M.C., Gai M., Belfiore A., Bortoli DeM., Di Renzo M.F., Costantino A., Sismondi P., Comoglio P.M. (1998): Overexpression of RON gene in human breast carcinoma, Oncogene, 16, 2927-2933.
- Malbaša R. (2000): Mogućnost dobijanja dijetetskog napitka pomoću čajne gljive, Magistarski rad, Tehnološki fakultet, Novi Sad.
- Malbaša R., Lončar E., Djurić M., Klašnja M., Kolarov LJ., Markov S. (2006): Scale-up of Black Tea Batch Fermentation by Kombucha, Food and Bioproducts Processing, 84 (C3), 193-199.
- Malbaša R., Lončar E., Djurić M. (2008): Comparison of the products of Kombucha fermentation on sucrose and molasses, Food Chemistry, 106, 1039-1045.
- Malbaša R.V., Milanović S.D., Lončar E.S., Djurić M.S., Carić M.D., Iličić M.D., Kolarov Lj. (2009): Milk-based beverages obtained by Kombucha application, Food Chemistry, 112, 178–184.
- Malbaša R.V., Lončar E.S., Vitas J.S., Čanadanović-Brunet J.M. (2011): Influence of starter cultures on the antioxidant activity of kombucha beverage, Food Chemistry, 127, 1727-1731.
- Mani-López E., García H.S. i López-Malo A. (2011): Organic acids as antimicrobials to control *Salmonella* in meat and poultry products, Food Research International, 45, 713-721.
- Maragkoudakis P.A., Zoumpopoulou G., Miaris C., Kalantzopoulos G., Pot B., Tsakalidou E. (2006): Probiotic potential of *Lactobacillus* strains isolated from dairy products, International Dairy Journal, 16, 189-199.
- Markov S.L., Malbaša R.V., Hauk M.J., Cvetković D.D. (2001): Ispitivanje mikrobnih populacija čajne gljive. I. Kvasci, Acta Periodica Technologica, 32, 133-138.
- Marques V., Farah A. (2009): Chlorogenic acid and related compounds in medicinal plants and infusions, Food Chemistry, 113, 1370-1376.
- Mathara J.M., Schillinger U., Guigas C., Franz C., Kutima P.M., Mbugua S.K., Shin H.-K., Holzapfel W.H. (2008): Functional characteristics of *Lactobacillus* spp. from traditional Maasai fermented milk products in Kenya, International Journal of Food Microbiology, 126, 57-64.

- Mathur S., Singh R. (2005): Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria - a review, *International Journal of Food Microbiology*, 105, 281–295.
- Mayer P., Fromme S., Leitzmann C., Gruender K. (1995): The yeast spectrum of tea fungus kombucha, *Mycoses*, 38(7-8), 289-295.
- Mencherini T., Picerno P., Scesa C., Aquino R. (2007): Triterpene, Antioxidant, and Antimicrobial Compounds from *Melissa officinalis*, *Journal of Natural Products*, 70, 1889–1894.
- Mimica Đukić N., Božin B., Soković M., Šimin N. (2004): Antimicrobial and Antioxidant Activities of *Melissa officinalis* L. (Lamiaceae) Essential Oil, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 2485-2489.
- Montero-Julian F.A., Dauny I., Flavetta S. (1998): Characterization of two monoclonal antibodies against the RON receptor tyrosine kinase, *Hybridoma*, 17, 541-551.
- Moreno S., Scheyer T., Romano C.S., Vojnov A.A. (2006): Antioxidant and antimicrobial activities of rosemary extracts linked to their polyphenol composition, *Free Radical Research*, 40(2), 223–231.
- Mrđanović J., Bogdanović G., Cvetković D., Velićanski A. (2007): The frequency of sister chromatid exchange and micronuclei in evaluation of cytogenic activity of Kombucha on human peripheral blood lymphocytes, *Archive on Oncology*, 15(3-4), 85-88.
- Mullis K., Falsona F., Scharf S., Saiki R., Horn G., Erlich H. (1986): The polymerase chain reaction, *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 51, 263-273.
- Nguyen V.T., Flanagan B., Mikkelsen D., Ramirez S., Rivas L., Gidley M.J., Dykes G.A. (2010): Spontaneous mutation results in lower cellulose production by a *Gluconacetobacter xylinus* strain from Kombucha, *Carbohydrate Polymers*, 80, 337-343.
- Obe M.A. (2001): Functional foods: a simple scheme for establishing the scientific validity for all claims, *Public Health Nutrition*, 4(3), 859-862.
- Østlie H.M., Helland M.H., Narvhus J.A. (2003): Growth and metabolism of selected strains of probiotic bacteria in milk, *International Journal of Food Microbiology*, 87, 17–27.
- Panesar S.P., Kennedy J.F., Gandhi D.N., Bunko K. (2007): Bioutilization of whey for lactic acid production, *Food Chemistry*, 105, 1-14.
- Pereira P., Tysca D., Oliveira P., da Silva Brum L. F., Picada J. N., Ardenghi P. (2005): Neurobehavioral and genotoxic aspects of rosmarinic acid, *Pharmacological Research*, 52(3), 199–203.
- Pereira P.P., Fachineto R., Prestes A.S., Puntel R.L., Santos da Silva G.N., Heinzmann B.M. et al. (2009): Antioxidant Effects of Different Extracts from *Melissa officinalis*, *Matricaria recutita* and *Cymbopogon citrates*, *Neurochemical Research*, 34, 973–983.
- Petrović S., Lončar E. (1996): Content of water-soluble vitamins in fermentative liquids of tea fungus, *Mikrobiologija*, 33(2), 101-106.
- Petrović S., Lončar E., Ružić N., Kolarov Lj. (1995/96): Nutritive characteristics of tea fungus metabolites, *Proceedings 26-27, Faculty of Technology, Novi Sad*, 257-269.
- Phan T.G., Estell J., Duggin G., Beer I., Smith D., Ferson M.J. (1998): Lead poisoning from drinking Kombucha tea in a ceramic pot, *Medical Journal of Australia*, 169, 11-12, 644–646.
- Piletić M.V., Milić B.Lj., Đilas S.M. (1992): *Organska hemija II deo, Prometej, Novi Sad*.
- *Pravilnik o kvalitetu i drugim zahtevima za osvežavajuća bezalkoholna pića (2006), Službeni list SCG, Beograd, broj 18, član 7.*

- Pyke M. (1958): *The Technology of Yeast, The Chemistry and Biology of Yeast*, ed: Cook A.H., Academic Press, New York, 561-572.
- Raspor P., Goranovič D. (2008): *Biotechnological Applications of Acetic Acid Bacteria*, *Critical Reviews in Biotechnology*, 28, 101–124.
- Rechner A.R., Smith M.A., Kuhnle G., Gibson G.R., Debnam E.S., Srai S.K.S. (2004): Colonic metabolism of dietary polyphenols: influence of structure on microbial fermentation products, *Free Radical Biology and Medicine*, 36(2), 212-225.
- Reiss J. (1994): Influence of different sugars on the metabolism of the tea fungus, *Z Lebensm Unters Forsch*, 198:258-261.
- Reddy G., Altaf Md., Naveena B.J., Venkateshwar M., Vijay Kumar E. (2008): Amylolytic bacterial lactic acid fermentation – A review, *Biotechnology Advances*, 26, 22-34.
- Rice-Evans C.A., Miller N.J., Paganga G. (1997): Antioxidant properties of phenolic compounds, *Trends in plant science*, 2(4), 152-159.
- Rigo A., Vianello F., Clementi G., Rossetto M., Scarpa M., Vrhovšek U., Mattivi F. (2000): Contribution of proanthocyanidins to the peroxy radical scavenging capacity of some Italian red wines, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 1996-2002.
- Robards K., Prenzler P., Tucker G., Swatsitang P., Glover W. (1999): Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits, *Food Chemistry*, 66, 401-436.
- Roberfroid M.B. (2002): Global view on functional foods: European perspectives, *British Journal of Nutrition*, 88, Suppl. 2, S133–S138 DOI: 10.1079
- Roche J. (1998): The history and spread of Kombucha, <http://users.bestweb.net/~om/~kombu/roche.html>.
- Romac S., Vukosavić S., Stojković O., Čuljković B. (1999): PCR u kliničkoj dijagnostici, *Biološki fakultet, Novi Sad*
- Romano C.S., Abadi K., Repetto V., Vojnov A.A., Moreno S. (2009): Synergistic antioxidant and antibacterial activity of rosemary plus butylated derivatives, *Food Chemistry*, 115, 456-461.
- Roussin M.R. (1996): *Analyses of Kombucha ferments: report of growers*, Information Resources, LC, Salt Lake City, Utah; www.geocities.com/mikeroussin.
- Ruiz A., Poblet M., Mas A., Guillamón J.M. (2000): Identification of acetic acid bacteria by RFLP of PCR-amplified 16S rDNA and 16S-23S rDNA intergenic spacer, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50, 1981-1987.
- Safak S., Mercan, N., Aslim B., Beyatli Y. (2002): A study on the production of poly-beta-hydroxybutyrate by some eucaryotic microorganisms, *Turkish Electronic Journal, Special Issue*, 11-17.
- Salminen S., Gorbach S., Lee Y.-K., Benno Y. (2004): *Human Studies on Probiotics: What is Scientifically Proven Today?*, in: *Lactic Acid Bacteria Microbiological and Functional Aspects*, eds: Salminen S., von Wright A., Ouwehand A., 3rd ed., Marcel Dekker Inc., New York, Basel.
- Sengun I.Y., Karabiyikli S. (2011): Importance of acetic acid bacteria in food industry, *Food Control*, 22, 647-656.
- Shah N.P. (2000): Probiotic bacteria: Selective enumeration and Survival in Dairy Foods, *Journal of Dairy Science*, 83, 894-907.
- Sharangi A.B. (2009): Medicinal and therapeutic potentialities of tea (*Camelia sinensis* L.) - A review, *Food Research International*, 42, 529-535.

- Skehan P., Storeng R., Scudiero D., Monks A., McMahon J., Vistica D., Warren J., Bokesch H., Kenney S., Boyd M. (1990): New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening, *Journal of the National Cancer Institute*, 13, 1107-1112.
- Sievers M., Lanini C., Weber A., Schuler-Schmid U., Teuber M. (1995): Microbiology and Fermentation Balance in a Kombucha Beverage Obtain from a Tea Fungus Fermentation, *Systematic and Applied Mikrobiology*, 18, 590-594.
- Singleton V.L., Orthfer R., Lamuela-Raventos R.M. (1999): Analysis of total phenols and other oxidation substrates and oxidant by means of Folin-Ciocalteu reagent, *Methods in Enzymology*, 299, 152-178.
- Soobrattee M.A., Neergheen V.S., Luximon-Ramma A., Aruoma O.I., Bahorum T. (2006): Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: Mechanism and action, *Mutation Research*, 579, 200-213.
- Sreeramulu G., Zhu Y., Knol W. (2000): Kombucha fermentation and its antimicrobial activity, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(6), 2589-2594.
- Sreeramulu G., Zhu Y., Knol W. (2001): Characterization of Antimicrobial Activity in Kombucha Fermentation, *Acta Biotechnologica*, 1, 49-56.
- Srinivasan R., Smolinske S., Greebaum D. (1997): Probable Gastrontestinal Toxicity og Kombucha Tea – Is This Beverage Healthy or Harmful, *Journal of General Internal Medicine*, 12, 643-644.
- Stanier R. Y., Doudoroff M., Adelberg E.A. (1971): *General Microbiology*, 3th Edition, The Macmillan press, London and Basingstoke, 610-611.
- Steels H., James S.A., Bond C. J., Roberts I. N., Stratford M. (2002): *Zygosaccharomyces kombuchaensis*: the physiology of a new species related to the spoilage yeasts *Zygosaccharomyces lentus* and *Zygosaccharomyces bailii*, *FEMS Yeast Research*, 2, 113-121.
- Steinkraus K.H., Shapiro K.B., Hotchkiss J.H., Mortlock, R.P. (1996): Investigations into the antibiotic activity of tea fungus/kombucha beverage, *Acta Biotechnologica*, 16, 199-205.
- Stojanović M., Janković I. (1996): Gajenje čajne gljive-kombuhe, IGP SANBA, Beograd.
- Su Y.L., Leung L.K., Huang Y., Chen Z. (2003): Stability of tea theaflavins and catechins, *Food Chemistry*, 83, 189-195.
- Teoh A.L., Heard G., Cox J. (2004): Yeast ecology of Kombucha fermentation, *International Journal of Food Microbiology*, 95, 119-126.
- Tepe B., Eminagaoglu O., Askin Akpulat H., Ayidin E. (2007): Antioxidant potentiala and rosmarinic acid levels of the methanolic extracts of *Salvia verticillata* (L.) subsp. *verticillata* and *S. verticillata* (L.) subsp. *amasiaca* (Freyn & Bornm.) Bornm, *Food Chemistry*, 100, 985-989.
- Terpinč P., Abramovič H. (2010): A kinetic approach for evaluation of the antioxidant activity of selected phenolic acids, *Food Chemistry*, 121, 366-371.
- Torel J., Cillard J., Cillard P. (1986): Antioxidant activity of flavonoids and reactivity with peroxy radical, *Phytochemistry*, 25(2), 383-385.
- Trcek J. (2005): Quick identification of acetic acid bacteria based on nucleotide sequences of the 16S–23S rDNA internal transcribed spacer region and of the PQQdependent alcohol dehydrogenase gene, *Systematic and Applied Microbiology*, 28, 735-745.
- Tsuda T., Ohshima K., Kawakishi S., Osawa T. (1994): Antioxidative pigments isolated from the seeds of *Phaseolus vulgaris* L., *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42, 248-251.

- Tumbas V. (2005): Antioksidativna i biološka aktivnost ekstrakata biljaka iz familije Lamiaceae, Magistarski rad, Tehnološki fakultet, Novi Sad.
- Tumbas V.T., Čanadanović-Brunet J.M., Četojević-Simin D.D., Četković G.S., Đilas S.M., Gille L. (2012): Effect of rosehip (*Rosa canina* L.) phytochemicals on stable free radicals and human cancer cells, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92, 1273-1281.
- Uzun E., Sariyar G., Adersen A., Karakoc B., Ötük G., Oktayoglu E., Pirildar S. (2004): Traditional medicine in Sakaraya province (Turkey) and antimicrobial activities of selected species, *Journal of Ethnopharmacology*, 95, 287-296.
- Van der Walt J.P., Yarrow D. (1984): Methods for the isolation, maintenance, classification and identification of yeasts, u: *The yeasts, a taxonomic study*, ur. Kreger-van Rij N.J.W., Groningen, The Netherlands, 45-103.
- Vasiljević T., Shah N.P. (2008): Probiotics - From Metchnikoff to bioactives, *International Dairy Journal*, 18, 714-728.
- Velićanski A. (2008): Karakteristike kombuha fermentacija na lekovitom bilju familije Lamiaceae, Magistarski rad, Tehnološki fakultet, Univerzitet u Novom Sadu.
- Vrbaški Lj., Markov, S. (1992): Praktikum iz mikrobiologije, Tehnološki fakultet, Novi Sad, 150-155.
- Walker G. (1998): *Yeast - Physiology and Biotechnology*, Jonh Wiley&Sons, Chichester-New York-Weinheim-Brisbane-Singapore-Toronto.
- Wang, M.H., Montero-Julian, F.A., Dauny, I. (1996): Requirement of phosphatidylinositol-3-kinase for epithelial cell migration activated by human macrophage stimulating protein, *Oncogene*, 13, 2167-2175.
- Wang H., Provan G.J., Helliwell K. (2004): Determination of rosmarinic acid and caffeic acid in aromatic herbs by HPLC, *Food Chemistry*, 87, 307-311.
- Wang K., Gan X., Tang X., Wang S., Tan H. (2010): Determination of d-saccharic acid-1,4-lactone from brewed kombucha broth by high-performance capillary electrophoresis, *Journal of Chromatography B*, 878, 371-374.
- Wei K., Wang L., Zhou J., He W., Zeng J., Jiang Y., Cheng H. (2011): Catechin contents in tea (*Camellia sinensis*) as affected by cultivar and environment and their relation to chlorophyll contents, *Food Chemistry*, 125, 44-48.
- Weusthuis R.A. (1994): Disaccharide fermentation by yeasts, Proefschrift, Technische Universiteit Delft, Delft.
- Wiseman A.S., Balentine A.D., Frei B. (1997): Antioxidants in Tea, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 37(8), 705-718.
- Xiao J., Huo J., Jiang H., Yang F. (2011): Chemical compositions and bioactivities of crude polysaccharides from tea leaves beyond their useful date, *International Journal of Biological Macromolecules*, 49, 1143-1151.
- Yamada Y., Yukphan P. (2008): Genera and species in acetic acid bacteria, *International Journal of Food Microbiology*, 125, 15-24.
- Yamasaki K., Nakano M., Kawahata T. (1998): Anti-HIV-1 activity of herbs in Labiatae, *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 21, 829-833.
- Yamashita S., Uchimura T., Komagata K. (2004): Emendation of the genus *Acidomonas* Urakami, Tamaoka, Suzuki and Komagata 1989, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54, 865-870.
- Yang C.S., Lambert J.D., Ju J., Lu G., Sang S. (2007): Tea and cancer prevention: Molecular mechanisms and human relevance, *Toxicology and Applied Pharmacology*, 224, 265-273.

- Yang Z.W., Ji B.P., Zhou, F., Li B., Luo Y., Yang L., Li T. (2009): Hypocholesterolaemic and antioxidant effects of kombucha tea in high-cholesterol fed mice, *Journal of Science and Food Agriculture*, 89, 150-156.
- Yogesh B., Kain A. K., Pauline T., Anju B., Sairam M., Singh B., et al. (2003): Lead induced oxidative stress: beneficial effects of Kombucha tea, *Biomedical and Environmental Sciences*, 16(3), 276–282.
- Yokoyama M., Noguchi M., Nakao Y., Ysunaga M., Yamasaki F., Iwasaka T. (2008): Antiproliferative effects of the major tea polyphenol, (-)-epigallocatechin gallate and retinoic acid in cervical adenocarcinoma, *Gynecologic Oncology*, 108, 326-331.
- Zgóřka G, Glowniak K (2001): Variation of free phenolic acids in medicinal plants belonging to the *Lamiaceae* family, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 26, 79-87.
- Zhu Y.Q., Zhang A., Tsang D., Huang Y., Chen Z.Y. (1997): Stability of Green tea catechins, *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 45, 4624-4628.
- Zuo Y., Chen H., Deng Y. (2002): Simultaneous determination of catechins, caffeine and gallic acids in green, Oolong, black and pu-erh teas using HPLC with a photodiode array detector, *Talanta*, 57, 307-316.
- Žiaková A., Brandšteterova E., Blahová E. (2003): Matrix solid-phase dispersion for the liquid chromatographic determination of phenolic acids in *Melissa officinalis*, *Journal of Chromatography A*, 983, 271-275.
- <http://www.biolib.de>.
- <http://www.studpol.rs>.
- <http://www.wellness-institute.eu>.

**UNIVERZITET U NOVOM SADU
TEHNOLOŠKI FAKULTET**

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

Redni broj:
RBR

Identifikacioni broj:
IBR

Tip dokumentacije: Monografska dokumentacija
TD

Tip zapisa: Tekstualni štampani materijal
TZ

Vrsta rada: Doktorska disertacija
VR

Ime i prezime autora: mr Aleksandra S. Velićanski
AU

Mentor: dr Dragoljub D. Cvetković, docent, Tehnološki fakultet, Univerzitet u Novom Sadu
MN

Naslov rada: "Karakterizacija funkcionalnog napitka od melise (*Melissa officinalis* L.) dobijenog fiziološkom aktivnošću čajne gljive"
NR

Jezik publikacije: Srpski (latinica)
JP

Jezik izvoda: Srpski/engleski
JI

Zemlja publikovanja: Srbija
ZP

Uže geografsko područje: Vojvodina
UGP

Godina: 2012.
GO

Izdavač: Autorski reprint
IZ

Mesto i adresa: Novi Sad, Bulevar cara Lazara 1
MA

Fizički opis rada: Broj poglavlja 6, strana 122 , tabela 30, slika 39, literaturnih citata 214
FO

Naučna oblast: Tehnološko inženjerstvo
NO

Naučna disciplina: Biotehnologija
ND

Predmetna odrednica, ključne reči: Kombuha, melisa (*Melissa officinalis* L.), antimikrobna aktivnost, antioksidativna aktivnost, antiproliferativna aktivnost, bakterije mlečne kiseline

PO

UDK

Čuva se: Biblioteka Tehnološkog fakulteta u Novom Sadu,
ČU 21000 Novi Sad, Bulevar cara Lazara 1, Srbija

Važna napomena: Nema

VN

Izvod: Cilj rada je bio ispitivanje funkcionalnih karakteristika kombuha napitka
IZ od melise (*Melissa officinalis* L.). Antibakterijska aktivnost kombuha napitaka optimalne konzumne i većih kiselosti ispitana je prema bakterijama izolovanim iz hrane i vode za piće. Nosiocilj antimikrobne aktivnosti je sirćetna kiselina, a na ostale nosioce ukazuje delovanje neutralisane kombuhe i čajnog napitka prema nekim test bakterijama. Spektrofotometrijskom metodom određen je sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja, a HPLC analizom određen je kvalitativni i kvantitativni sastav fenolnih jedinjenja u fermentacionim tečnostima, čajnim i kombuha napicima od melise i crnog čaja. Antioksidativna aktivnost istih uzoraka ispitana je na DPPH i OH radikale ESR spektralnom metodom. Uzorci fermentacione tečnosti i kombuha napitka od melise imali su veću antioksidativnu aktivnost prema oba radikala u odnosu na uzorke sa crnim čajem. Konzumna kombuha od melise imala je veću antioksidativnu aktivnost od čajnog napitka. Aktivne komponente kombuha napitka od melise su verovatno ruzmarinska kiselina i kvercetin. U ispitivanju antiproliferativne aktivnosti konzumnog kombuha napitka i čajnog napitka od melise na tri ćelijske linije humanih karcinoma: HeLa (epitelni karcinom grlića materice), MCF-7 (adenokarcinom dojke) i HT-29 (adenokarcinom debelog creva) utvrđeno je da nije došlo do stimulacije proliferacije ispitanih ćelijskih linija pri koncentracijama većim od 100 µg/ml. Pored istraživanja biološke aktivnosti ispitana je mogućnost simultane mlečno-kiselinske i kombuha fermentacije. Dodatkom starter kultura i *Lactobacillus* spp. izolata u fermentacionu tečnost dolazi do povećanja sadržaja L- i D- mlečne kiseline, iako su ćelije bakterija mlečne kiseline, osim izolata iz kiselog testa (*L. hilgardii*), pokazale malu otpornost na uslove tokom fermentacije i čuvanja pripremljenih napitaka. Izvršena je i identifikacija bakterija sirćetnog vrenja izolovanih iz lokalnih čajnih gljiva PCR metodom. Dva izolata verovatno pripadaju vrsti *Gluconobacter oxydans*, a treći vrsti *Gluconacetobacter hansenii*.

Datum prihvatanja teme od strane NN

25.03.2011.

veća:

DP

Datum odbrane:

DO

Članovi komisije: Predsednik: dr Jasna Čanadanović-Brunet, red. prof. Tehnološkog fakulteta u Novom Sadu

KO

Član: dr Dragoljub Cvetković, docent Tehnološkog fakulteta u Novom Sadu

Član: dr Dragana Četojević-Simin, naučni saradnik Prirodno matematičkog fakulteta u Novom Sadu

Član: dr Dragiša Savić, red. prof. Tehnološkog fakulteta u Leskovcu

**UNIVERSITY OF NOVI SAD
FACULTY OF TECHNOLOGY
KEY WORD DOCUMENTATION**

Accession number:
ANO
Identification number:
INO
Document type: Monograph documentation
DT
Type of record: Textual printed material
TR
Contents code: PhD Thesis
CC
Author: Aleksandra S. Velićanski, M.Sc.
AU
Mentor: Dragoljub D. Cvetković, Assistant Professor, Faculty of Technology,
Novi Sad
MN
Title: "Characterization of functional lemon balm (*Melissa officinalis* L.)
beverage obtained by physiological activity of tea fungus"
TI
Language of text: Serbian
LT
Language of abstract: Serbian/English
LA
Country of publication: Serbia
CP
Locality of publication: Vojvodina
LP
Publication year: 2012.
PY
Publisher: Author's reprint
PU
Publication place: Novi Sad, Bulevar cara Lazara 1
PP
Physical description: Chapters 6, pages 122, tables 30, pictures 39, references 214
PD
Scientific field: Technological engineering
SF
Scientific discipline: Biotechnology
SD

Subject, Key words SKW Kombucha, lemon balm (*Melissa officinalis* L.), antimicrobial activity, antioxidant activity, antiproliferative activity, lactic acid bacteria

UC

Holding data: HD Library of Faculty of Technology, 21000 Novi Sad, Bulevar cara Lazara 1, Serbia

Note: N None

Abstract: AB The aim of this study was to investigate functional characteristics of a kombucha beverage from lemon balm (*Melissa officinalis* L.) tea. Antibacterial activity of kombucha beverages with optimum and higher acidities was tested against bacteria isolated from food and drinking water. The main active component of antibacterial activity was acetic acid, while slight activity of neutralized kombucha and unfermented tea against some test bacteria indicated presence of other antibacterial components. Total phenol concentration in unfermented tea samples, fermentation broths and kombucha beverages from lemon balm and black tea was determined spectrophotometrically whereas qualitative and quantitative concentration of polyphenolic compounds was determined by HPLC method. Antioxidant activity on DPPH and hydroxyl radical in the same samples was determined on an ESR spectrometer. Fermentation broth and kombucha beverage from lemon balm had higher antioxidant activity against both radicals than the samples from black tea. Kombucha beverage from lemon balm with optimum acidity had higher antioxidant activity than unfermented lemon balm tea. The main active components of antioxidant activity were probably rosmarinic acid and quercetin. Antiproliferative activity of lemon balm tea and kombucha was measured by sulforhodamine B colorimetric assay on HeLa (cervix epitheloid carcinoma), HT-29 (colon adenocarcinoma), and MCF-7 (breast adenocarcinoma) cell lines. By applying concentrations higher than 100 µg/ml, tested samples did not stimulate proliferation of cell lines. The possibility of simultaneous lactic acid and kombucha fermentation was tested as well. When starter cultures and *Lactobacillus* spp. isolates were applied, the content of L- and D- lactic acid increased during fermentation, although lactic acid bacteria (except *L. hilgardii* isolated from sour dough) showed low resistance to the conditions during fermentation and beverages storage. Acetic acid bacteria isolated from local tea fungus were identified by PCR method. Two isolates might be *Gluconobacter oxydans* and one - *Gluconacetobacter hansenii*.

Accepted on Scientific Board on: AS 25.03.2011.

Defended: DE

Thesis Defend Board: DB President: dr Jasna Čanadanović-Brunet, Full Professor, Faculty of Technology, Novi Sad
Member: dr Dragoljub Cvetković, Assistant Professor, Faculty of Technology, Novi Sad
Member: dr Dragana Četojević-Simin, Research Associate, Faculty of Science, Novi Sad
Member: dr Dragiša Savić, Full Professor, Faculty of Technology, Leskovac