

УНИВЕРЗИТЕТ У НОВОМ САДУ
ТЕХНОЛОШКИ ФАКУЛТЕТ

Број 020-219
19 02 2004 год.
НОВИ САД

UNIVERZITET U NOVOM SADU

TEHNOLOŠKI FAKULTET



Mr Radomir Malbaša

ISTRAŽIVANJE ANTIOKSIDATIVNE AKTIVNOSTI
NAPITKA OD ČAJNE GLJIVE

-doktorska disertacija-

Mentor: Prof. dr Eva Lončar

Novi Sad, 2004.

UNIVERZITET U NOVOM SADU
TEHNOLOŠKI FAKULTET

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

REDNI BROJ:
RBR

IDENTIFIKACIONI BROJ:
IBR

TIP DOKUMENTACIJE:
TD monografska publikacija

TIP ZAPISA:
TZ tekstualni štampani materijal

VRSTA RADA:
VR doktorska disertacija

AUTOR:
AU Radomir V. Malbaša

MENTOR/KO-MENTOR:
MN dr Eva Lončar, red. prof. Tehnološkog fakulteta u Novom Sadu

NASLOV RADA:
NR "Istraživanje antioksidativne aktivnosti napitka od čajne gljive"

JEZIK PUBLIKACIJE:
JZ srpski (latinica), osim poglavlja 6(engleski)

JEZIK IZVODA:
JI srpski/engleski

ZEMLJA PUBLIKOVANJA:
ZP Srbija i Crna Gora

UŽE GEOGRAFSKO PODRUČJE:
UGP Vojvodina

GODINA:
GO 2004.

IZDAVAČ:
IZ Autorski reprint

MESTO I ADRESA:
MA 21000 Novi Sad, Bul. Cara Lazara 1

FIZIČKI OPIS RADA:
FO (broj poglavlja 9/strana 108/ lit.citata 117/ tabela 11/ slika 80)

NAUČNA OBLAST:
OB Hemijsko-tehnološke nauke

NAUČNA DISCIPLINA:
DI Analitička hemija

PREDMETNA ODREDNICA
/KLJUČNE REČI:

Čajna gljiva, kombuha, fermentacija, slobodni radikali, antioksidanti, vitamini, ESR, HPLC

UDK :

663.88:577.164.1/2:541.515

ČUVA SE:
ČU

Biblioteka Tehnološkog fakulteta u Novom Sadu,
21000 Novi Sad, Bul.Cara Lazara 1

VAŽNA NAPOMENA:
VN

-

IZVOD:
IZ

Ispitana je antioksidativna aktivnost različito pripremljenih napitaka i fermentativnih tečnosti od čajne gljive, i to prvenstveno praćenjem sposobnosti transformacije i stabilizacije reaktivnih hidroksi-radikala i redukcije stabilnih 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) radikala. Određeni su i neki od metabolita kombuhe koji deluju kao antioksidanti (vitamini B₂ i C), kao i organske kiseline koje stabilizuju napitak od čajne gljive. Osnovne analitičke tehnike korišćene u radu bile su ESR, HPLC, TLC, spektrofotometrija proizvoda enzimskih reakcija i volumetrija.

DATUM PRIHVATANJA TEME:
DP

07.10.2002.

DATUM ODBRANE:
DO

21.05. 2004.

ČLANOVI KOMISIJE (NAUČNI STEPEN/ IME I PREZIME/ ZVANJE/ FAKULTET):
KO

PRESEDNIK: dr Mira Popović PMF

ČLAN: dr Ero Lončarić

ČLAN: dr Jasna Čanđanović - Brunet

ČLAN: dr Liniša Marković

UNIVERSITY OF NOVI SAD
FACULTY OF TECHNOLOGY

KEY WORDS DOCUMENTATION

ACCESSION NUMBER:
AN

IDENTIFICATION NUMBER:
IN

DOCUMENT TYPE:
DT Monographic Publication

TYPE OF RECORD:
TR Textual material, printed

CONTENTS CODE:
CC PhD Thesis

AUTHOR:
AU Radomir V. Malbaša

MENTHOR/CO-MENHTOR:
MN Eva Lončar, Ph.D., prof., Faculty of Technology,
Novi Sad

TITLE:
TI "Investigation of antioxidant activity of tea fungus
beverage"

LANGUAGE OF TEXT:
LT Serbian (Roman) except Chapter 6. (in English)

LANGUAGE OF ABSTRACT:
LA Serbian / English

COUNTRY OF PUBLICATION:
CP Serbia and Montenegro

LOCALITY OF PUBLICATION:
LP Vojvodina

PUBLICATION YEAR:
PY 2004

PUBLISHER:
PB Author's reprint

PUBLICATION PLACE:
PP 21000 Novi Sad, Blvd. Cara Lazara 1

PHYSICAL DESCRIPTION:
PD (chapters 9/ pages 108/ references 117/ tables 11/
figures 80)

SCIENTIFIC FIELD:
SF Chemical-technological sciences

SCIENTIFIC DISCIPLINE:
SD Analytical chemistry

SUBJECT/KEY WORDS:

SX

tea fungus, kombucha, fermentation, free radicals, antioxidants, vitamins, ESR, HPLC

UC:

663.88:577.164.1/2:541.515

HOLDING DATA:

HD

Library of Faculty of Technology, Novi Sad, 21000 Novi Sad, Blvd. Cara Lazara 1, Serbia and Montenegro

NOTE:

N

ABSTRACT:

A

The antioxidant activity of differently prepared beverages and fermentative liquids of tea fungus was examined, primarily by following of ability for transformation and stabilization of reactive hydroxyl-radicals and reduction of stable 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radicals. Some of the metabolites of kombucha that act as antioxidants (vitamins B₂ and C) and organic acids that stabilize tea fungus beverage were determined. The primary used analytical techniques were ESR, HPLC, TLC, spectrophotometry of products of enzymatic reactions and volumetry.

ACCEPTED BY THE SCIENTIFIC BOARD ON:

ASB

07.10.2002.

DEFENDED ON:

DE

2004.

THESIS DEFEND BOARD (NAME AND SURNAME /DEGREE/TITLE/ FACULTY):

DB

PRESIDENT: _____

MEMBER: _____

MEMBER: _____

MEMBER: _____

Veliko hvala dugujem mentoru ovog rada, prof. dr Evi Lončar, za pomoć pri definisanju ideje i konačnom uobličavanju ovog rada. Prilikom izrade eksperimenata, kao i tokom pisanja, mnogo su mi pomogli prof. dr Jasna Čanadanović-Brunet, prof. dr Siniša Markov i prof. dr Mira Popović.

Značajnu moralnu podršku, kao i asistencije tokom eksperimenata i konačne tehničke obrade rada, pružile su mi prof. dr Ljiljana Kolarov, dipl. inž. Vesna Tumbas i tehnički saradnik Suzana Anđelković.

Za međuinstitucionalnu saradnju sa Vojnomedicinskom akademijom (VMA) u Beogradu, zaslužni su mr Milan Maksimović i dipl. inž. Tatjana Branković sa Instituta za higijenu, Odeljenja za sanitarnu hemiju. Zajednički ostvareni rezultati mnogo su uticali na nivo ovog rada.

Finansijsku podršku ovom radu dalo je Ministarstvo za nauku, tehnologije i razvoj Republike Srbije.

I na posletku, najviše sam zahvalan svojoj porodici i neizmerno dragim prijateljima, koji su verovali u mene i pružili mi neophodni podsticaj, podršku i snagu da istrajem.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. OPŠTI DEO	3
2.1. ČAJNA GLJIVA	3
2.1.1. MIKROBIOLOŠKI SASTAV	4
2.1.2. OD ČAJA DO NAPITKA OD KOMBUHE-KULTIVACIJA	7
2.1.3. HEMIJSKI SASTAV FERMENTATIVNE TEČNOSTI	8
2.1.4. ANTIMIKROBNA SVOJSTVA FERMENTATIVNE TEČNOSTI	12
2.1.5. FARMAKOLOŠKA SVOJSTVA FERMENTATIVNE TEČNOSTI	13
2.1.6. KOMBUHA KAO FERMENTISANA HRANA	17
2.1.7. NEŽELJENI EFEKTI KORIŠĆENJA KOMBUHE	18
2.2. ČAJ	19
2.2.1. SASTAV I HEMIJA ČAJA	20
2.2.2. FIZIOLOŠKO DELOVANJE ČAJA	23
2.2.3. BIORASPOLOŽIVOST KOMPONENATA ČAJA	26
2.3. ANTIOKSIDANTI	26
2.3.1. ANTIOKSIDANTNI VITAMINI	27
2.3.1.1. VITAMIN B ₂	28
2.3.1.2. VITAMIN B ₆	29
2.3.1.3. VITAMIN C	30
2.4. SLOBODNI RADIKALI	32
2.4.1. HIDROKSI-RADIKALI	33
2.4.2. ELEKTRON SPIN REZONANTNA SPEKTROSKOPIJA	35
2.4.2.1. ESR I "SPIN-TRAP" METODA	36
3. MATERIJAL I METODI RADA	37
3.1. KULTIVACIJA ČAJNE GLJIVE	37
3.2. METODI ANALIZE	38
3.2.1. ODREĐIVANJE OSNOVNIH PARAMETARA METABOLIČKE AKTIVNOSTI ČAJNE GLJIVE	38
3.2.2. ANALIZA VITAMINA U NAPICIMA OD ČAJNE GLJIVE	39
3.2.3. ESR ANALIZA SLOBODNIH RADIKALA U NAPICIMA OD ČAJNE GLJIVE	40
4. REZULTATI I DISKUSIJA	42
4.1. KARAKTERIZACIJA NAPITKA OD ČAJNE GLJIVE	42
4.2. KARAKTERIZACIJA FERMENTATIVNIH TEČNOSTI DOBIJENIH SA RAZLIČITIM KULTURAMA ČAJNE GLJIVE	46
4.3. ANTIOKSIDATIVNA AKTIVNOST FERMENTATIVNIH TEČNOSTI NA HIDROKSI-RADIKALE	49
4.3. ANTIOKSIDATIVNA AKTIVNOST FERMENTATIVNIH TEČNOSTI NA DPPH RADIKALE	56
4.4. SADRŽAJ ANTIOKSIDATIVNIH VITAMINA I LIMUNSKKE KISELINE	62
4.4.1. SADRŽAJ VITAMINA B ₂	63
4.4.2. SADRŽAJ VITAMINA B ₆	66
4.4.3. SADRŽAJ VITAMINA C	67
4.4.4. SADRŽAJ LIMUNSKKE KISELINE	70
5. ZAKLJUČAK	73
6. SUMMARY	75
7. LITERATURA	77
8. PRILOG	87
9. BIOGRAFIJA	108

1. UVOD

Čajna gljiva ili kombuha, vodi poreklo sa Dalekog Istoka, gde se vekovima koristila za pripremanje napitka, za koji se veruje, da osim osvežavajućeg, poseduje i lekovito dejstvo. Nakon II Svetskog rata, zbog svojih blagotvornih svojstava, postala je predmet naučnih istraživanja koja su tokom poslednje dve decenije sve brojnija.

Kultura čajne gljive je složen sistem, koga čini simbioza više vrsta kvasaca i sirćetnih bakterija. Ne može se govoriti o tačnom i potpunom mikrobiološkom sastavu, jer varira od jedne do druge kulture i zavisi od mnogih faktora.

Za kultivaciju čajne gljive se koristi jednostavna hranljiva podloga; saharoza, kao izvor ugljenikovih atoma i crni čaj, kao izvor azota, mineralnih materija i faktora rasta. U određenom inkubacionom periodu, od 7 do 10 dana, ovaj supstrat se prevodi u prijatan, blago kiseo i gaziran osvežavajući napitak. Hemijskim analizama je utvrđeno da napitak sadrži brojna jedinjenja značajne nutritivne i farmakološke vrednosti.

Poslednjih godina, u različitim krajevima sveta, su se na tržištu pojavili različiti komercijalni proizvodi od kombuhe, čija su osnova, osim uobičajene, ekstrakti zelenog čaja, papaje, aloje ili različitog voća, što je u skladu sa trenutnim medicinskim trendovima. Ipak, za pripremanje napitka od čajne gljive tradicionalno je najzastupljeniji crni čaj. Ne treba zanemariti činjenicu da upotreba čaja kao supstrata, čini pripremu napitka od čajne gljive u domaćinstvu veoma jednostavnom.

Postoje brojne informacije o uticaju čaja *Camellia sinensis* (L.) na zdravlje ljudi. Ovaj napitak se veoma dugo konzumira u mnogim zemljama, a i u današnje vreme interes za njega raste, zbog brojnih naučnih podataka, koji ukazuju na blagotvorne efekte i prevenciju hroničnih bolesti. U Evropu su čaj kao lekovitu biljku uvezli portugalski i holandski pomorci. Tokom godina čaj je postao sastavni deo ishrane i navika življenja. Starenje populacije i ograničenja moderne medicine prouzrokovali su da mnogi ljudi traže nove načine da poboljšaju svoje zdravlje.

Sastav i osobine čaja, kao i pozitivni zdravstveni efekti koje izaziva, su i u popularnoj i u naučnoj literaturi dobro opisani.

Naučno su dokazana antimikrobna svojstva napitka od čajne gljive. Međutim, podaci o blagotvornim efektima napitka od čajne gljive, zasnivaju se, većinom, na svedočenjima korisnika. Prema tim informacijama, on lekovito deluje na različite bolesti, od kojih su mnoge inicirane ili promovisane dejstvom slobodnih radikala. Crni čaj, osnovni konstituent



podloge za kultivaciju čajne gljive, sadrži jedinjenja sa antioksidativnim svojstvima, te se može pretpostaviti da zbog toga i napitak od čajne gljive pokazuje antioksidativne efekte, pogotovo ako se uzme u obzir da fermentacijom kombuhe nastaju još neka jedinjenja, koja su po svojoj prirodi antioksidanti.

U naučnoj i stručnoj literaturi vezanoj za problematiku čajne gljive, već su objavljeni brojni podaci, kojim se karakteriše hemijski i mikrobiološki sastav, kao i antimikrobna svojstva napitka, međutim o antioksidativnim osobinama ima veoma malo podataka i odnose se eksperimente sa životinjama, u kojima je ispitivan oksidativni stres. Treba napomenuti da istraživanja vezana za antioksidativnu aktivnost napitka od čajne gljive, praćena preko transformacije i stabilizacije slobodnih radikala, do sada nisu rađena, što ostavlja dosta prostora za dalji rad u toj oblasti.

Uzimajući u obzir štetnost delovanja slobodnih radikala i značaj antioksidanata, cilj ovog rada je bio istraživanje i merenje antioksidativne aktivnosti različito pripremljenih napitaka i fermentativnih tečnosti od čajne gljive, i to prvenstveno praćenjem sposobnosti transformacije i stabilizacije slobodnih radikala, kako veoma reaktivnih hidroksi-radikala, tako i manje reaktivnih, stabilnih 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) radikala. Osim toga određeni su i neki od metabolita čajne gljive za koje se zna da imaju antioksidativno delovanje, pri čemu je akcenat stavljen na vitamine B₂ i C, jedinjenja na čiju stabilnost utiče kontakt sa kiseonikom, svetlost i voda kao rastvarač, kao i na organske kiseline koje stabilizuju napitak od kombuhe.



2.OPŠTI DEO

2.1. ČAJNA GLJIVA

Napitak od čajne gljive ili kombuhe je tradicionalno osvežavajuće i pomoćno lekovito sredstvo, koje se priprema u kućnoj radinosti fermentacijom zaslađenog crnog ili zelenog čaja, koristeći simbiotsku kulturu kvasaca i bakterija. Proizvod fermentacije je slatkast, blago gaziran i osvežavajući. Konzumira se širom sveta, ali tradicionalno najviše u Kini, Rusiji i Nemačkoj. Poslednjih godina su se na inostranom tržištu, u Nemačkoj, Austriji, Mađarskoj, Hrvatskoj, Australiji i SAD, pojavili i različiti komercijalni proizvodi od kombuhe, uz intenzivnu ekonomsku propagandu. Medijski je najviše promovisana u SAD, uz preporuke da snižava krvni pritisak, suzbija artritis, ojačava imuno sistem i leči rak. Ovi diskutabilni zdravstveni efekti su izazvali povećan interes za kombuhu, ali ipak treba naglasiti da nisu naučno dokazani (Greenwalt i sar., 2000).

Kombuha se konzumira, prema zapisima, još od 220 god. p.n.e. za vreme vladavine dinastije Tsin u Mandžuriji. Odatle je trgovačkim putevima stigla do Rusije i Istočne Evrope. Napitak je postao veoma popularan u Rusiji i njime su tretirane različite metaboličke bolesti, hemoroidi i reumatizam. Zabeleženo je da je nakon II Svetskog rata, u ruskim regijama gde se masovno pio napitak od čajne gljive, bila značajno niža stopa kancerogenih oboljenja u odnosu na druga područja. Poznato je da je tada stepen zagađenja, izazvan industrijom, kao i otrovima prisutnim iz rata, bio izuzetno visok (Frank, 1995).

Tokom II Svetskog rata, konzumiranje napitka od čajne gljive se iz Rusije prenelo u Zapadnu Evropu i u Severnu Afriku (Blanc, 1996). Evropljani su ga koristili uglavnom zbog njegovih detoksifikujućih efekata na krv i digestivni sistem.

Čajna gljiva je poznata pod različitim nazivima, kao što su kombuha, japanska čajna gljiva, indijska čajna gljiva, mandžurijska gljiva, čudesna gljiva, hongo, ruska meduza, čajni grib, olinka, champignon de longue vie, funko cinese, ling zhi, kocha kinoko, haipao i dr. Lindau je čajnoj gljivi dao latinski naziv *Medusomyces gisevii* (Steiger, Steinegger, 1957). U literaturi se pojavio i latinski naziv *Auricularia delicata* (Filho i sar., 1985). I jedan i drugi sistemski naziv su pogrešni, zbog toga što su prvim nazivom obuhvaćeni samo kvasci, a drugi naziv je neprihvatljiv, jer u rod *Auricularia* spadaju prave pečurke



(Janković, 1995). Na našim prostorima najviše su zastupljeni nazivi čajna gljiva i kombuha i zbog toga će se u daljem tekstu samo oni i pominjati.

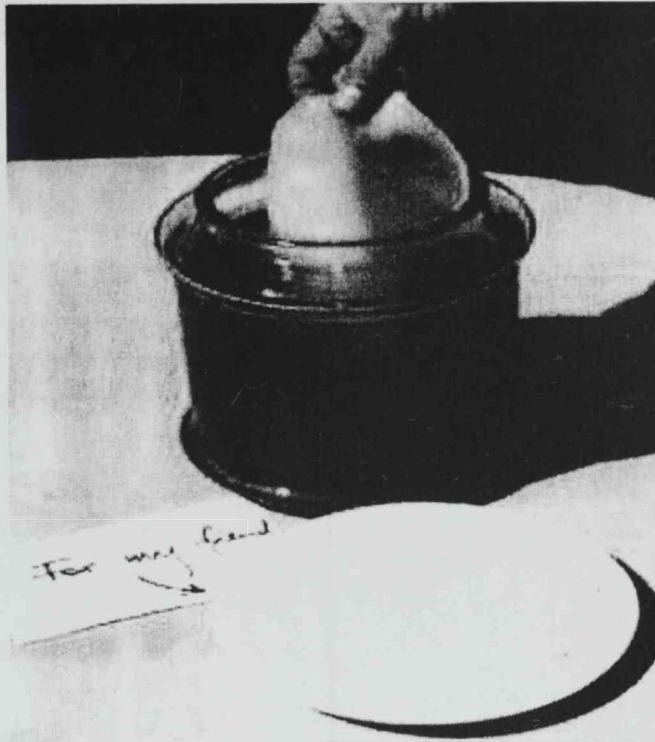
2.1.1. MIKROBIOLOŠKI SASTAV

Pojam čajne gljive ili kombuhe se vezuje za plutajuću mikrobiološku zajednicu sastavljenu od sirćetnih bakterija i kvasaca. Zapravo, plutajuću opnu čini celuloza stvorena tokom kultivacije i u njoj su prisutni i kvasci i bakterije. Potrebno je naglasiti da su bakterije u ovoj simbiozi striktni aerobi, dok se kvasci smatraju fakultativno anaerobnim. Tokom svake fermentacije na gornjoj površini ove zajednice formira se nov sloj celuloze, koji je jasno vidljiv golim okom i može se lako razdvojiti (Schramm, Hestrin, 1954; Greenwalt, 2000).

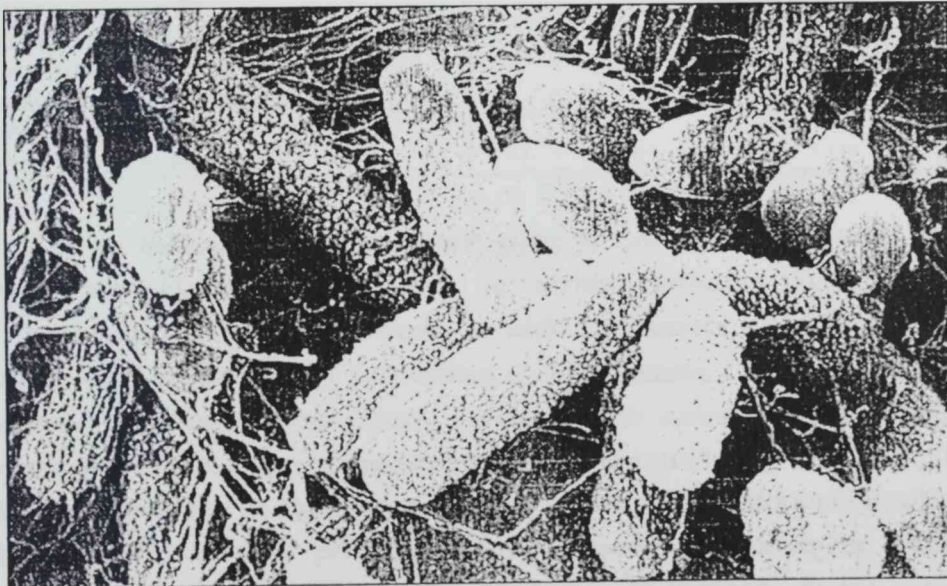
Bazarewski (1915) je delovanje združene kulture čajne gljive objasnio na sledeći način: kvasci iz šećera stvaraju etanol, koji služi bakterijama kao izvor energije, iz koga one stvaraju sirćetnu kiselinu. Stvorena sirćetna kiselina štiti zajednicu od konkurencije mikroorganizama slabije prilagođenih kiseloj sredini. Kvasci saharozu razgrađuju dejstvom enzima invertaze (Steiger, Steinegger, 1957).

Dokazano je da kofein i slična jedinjenja, teofilin i teobromin, stimulišu bakterijsku produkciju celuloze. Ovi metilksantini inhibiraju normalno postojeći prekidački (eng. switch off) mehanizam celuloza-sintetaze (Fontana i sar., 1991). Raspoloživost kiseonika u simbiozi je maksimalna ako je sastojak supstrata kofeinizovani čaj. Ipak, povećanje nivoa kofeina za 4 do 16 puta, u odnosu na normalni nivo (40 mg), inhibira fermentaciju kombuhe (Greenwalt i sar., 1998).

Mikrobiološki sastav čajne gljive varira od jedne do druge kulture, što uglavnom zavisi od geografskog porekla. Rodovi bakterija *Acetobacter* i *Gluconobacter* su najrasprostranjeniji prokarioti u ovoj kulturi. Spadaju u familiju *Acetobacteriaceae* i jedna od osnovnih razlika ovih rodova ogleda se u tome što bakterije roda *Acetobacter* imaju sposobnost da oksiduju acetat i laktat do ugljenik(IV)-oksida i vode, dok *Gluconobacter* bakterije nemaju tu sposobnost (De Ley i sar., 1984). Istraživanja mnogih naučnika su pokazala da je *Acetobacter xylinum* primarna bakterija u ovoj simbiozi (Danielova, 1954; Konovalov, Semenova, 1955; Sievers i sar., 1995; Roussin, 1996). *Acetobacter xylinum* stvara celulozu kao proizvod sekundarnog metabolizma. Ekskrecija celuloze zavisi od koncentracije ćelija u kultivacionoj smeši i površine zone aeracije (Schramm, Hestrin, 1954). Makroskopski i mikroskopski izgled kulture čajne gljive prikazan je na slici 1.



a)



b)

Slika 1. Prikaz kulture čajne gljive.

a) makroskopski

b) mikrofotografija elektronskim mikroskopom

Prema novijoj literaturi, osim prisustva bakterije *Acetobacter xylinum* kao primarne, tu su još i *Acetobacter aceti*, *Acetobacter pasteurianus* i *Gluconobacter oxydans* (Liu i sar., 1996). U tabeli 1 prikazan je moguć mikrobiološki sastav simbioze čajne gljive (rodovi i vrste). Tabela 1 je nastala korišćenjem više literaturnih izvora, što je navedeno u daljem tekstu.

Tabela 1. Mikrobiološki sastav simbioze čajne gljive (rodovi i vrste)

Kvasci	Bakterije
<i>Pichia</i>	<i>Acetobacter xylinum</i>
<i>Zygosaccharomyces</i>	<i>Acetobacter aceti</i>
<i>Saccharomyces</i>	<i>Acetobacter pasteurianus</i>
<i>Torulopsis</i>	<i>Gluconobacter oxydans</i>
<i>Mycotorula</i>	
<i>Schizosaccharomyces</i>	
<i>Saccharomycodes</i>	
<i>Mycoderma</i>	
<i>Candida</i>	
<i>Bretanomyces intermedius</i>	
<i>Candida famata</i>	
<i>Candida crusei</i>	
<i>Pichia membranefaciens</i>	
<i>Pichia fluxuum</i>	
<i>Saccaromyces cerevisiae</i> subsp. <i>aceti</i>	
<i>Saccaromyces cerevisiae</i> subsp. <i>cerevisiae</i>	
<i>Torulaspora delbrueckii</i>	
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	
<i>Zygosaccharomyces kombuchaensis</i>	
<i>Kloeckera apiculata</i>	
<i>Kluyveromyces africanus</i>	

U odnosu na bakterije, u simbiozi čajne gljive je zastupljen znatno veći broj vrsta kvasaca (Tabela 1). Hesseltine (1965) je utvrdio prisustvo kvasaca *Pichia* i *Zygosaccharomyces*. Iz uzoraka kombuhe iz Meksika, Herrera i Calderon-Villagomez (1989) su izolovali *Brettanomyces intermedius*, *Candida famata*, *Pichia membranefaciens*, *Saccharomyces cerevisiae* subsp. *aceti*, *Saccharomyces cerevisiae* subsp. *cerevisiae*, *Torulaspora delbrueckii*, *Zygosaccharomyces bailii* i *Zygosaccharomyces rouxii*. Za čajnu gljivu, koja je zastupljena na našim prostorima, se smatra da je poreklom iz Rusije. U njoj je Janković (1995) utvrdila prisustvo rodova kvasaca *Saccharomyces*, *Torulopsis*, *Mycotorula*, *Schizosaccharomyces*, *Saccharomycodes*, *Mycoderma*, *Pichia* i *Candida*. Mayser i saradnici (1995) su sprovedli studiju o mikrobnom sastavu brojnih uzoraka kombuhe sakupljenih iz različitih domaćinstava u Nemačkoj. Svi izolati kvasaca, koje su dobili, nalaze se u Američkoj kolekciji kultura (ATCC). Pokazalo se da je sastav kvasaca u zajednici veoma promenljiv, a da su najčešće zastupljeni rodovi *Saccharomyces* i *Zygosaccharomyces*. Roussin (1996) je determinisao *Zygosaccharomyces* i *Saccharomyces cerevisiae* kao tipične kvasce u severnoameričkoj kombuhi. Kurtzman i sar. (2001) su u napicima od kombuhe poreklom iz Rusije i SAD pronašli novu vrstu kvasca

Zygosaccharomyces kombuchaensis, a takode pominju i kvasac *Pichia fluxuum* koji se ne navodi u drugim literaturnim podacima. Steels i sar. (2002) su ispitali osobine kvasca *Zygosaccharomyces kombuchaensis*, pri čemu su utvrdili razlike u fiziološkim osobinama u odnosu na slične vrste *Zygosaccharomyces lentus* i *Zygosaccharomyces bailii*. Dominantne vrste kvasaca izolovane iz kombuhe karakteristične za podneblje Ankare (Turska) su: *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida krusei*, *Kloeckera apiculata* i *Kluyveromyces africanus* (Şafak i sar., 2002).

Mayser i sar. (1996) su zabeležili veoma nizak nivo kontaminacije patogenim i mikroorganizmima kvarenja, i zaključili da se napitak od čajne gljive može bezbedno spravljati u domaćinstvu, naravno pod uslovom da se striktno poštuje uputstvo o pripremi. Roussin (1996) je testirao oko 900 uzoraka kombuhe i nijednom nije utvrdio prisustvo humanog patogena *Candida albicans*, mada je u nekoliko uzoraka bilo vidljivo prisustvo plesni *Aspergillus niger* i *Penicillium notatum*.

2.1.2. OD ČAJA DO NAPITKA OD KOMBUHE-KULTIVACIJA

Uobičajeni supstrat za gajenje čajne gljive je crni čaj zaslađen saharozom, odnosno belim šećerom. Čaj za mikroorganizme kombuhe predstavlja izvor azota i mineralnih materija, dok saharoza predstavlja izvor C-atoma. Količina saharoze u supstratu, kreće se od 5 do 8% (Reiss, 1987), a crnog čaja od 1,5 do 4,5 g/L (Sievers i sar., 1995, Greenwalt i sar., 1998, Petrović i sar., 1999).

Kultivacija čajne gljive se odvija na temperaturi od 25 do 30°C (Danielova, 1954; Petrović i sar., 1997), u aerobnim uslovima, zbog čega se koriste sudovi sa širokim otvorom, jer je potrebno obezbediti potpuniji aktivni kontakt sa kiseonikom.

Inokulacija supstrata je moguća sa vlažnom ili suvom želatinoznom opnom, čajnom gljivom u užem smislu, ili sa fermentativnom tečnošću iz prethodne fermentacije (Konovalov, Semenova, 1955).

Tokom fermentacije, na površini kultivacione tečnosti čajna gljiva stvara, već pomenutu, belo-braonkastu celuloznu želatinoznu opnu-navlaku (Slika 1a), koju na površini održavaju mehurići ugljenik(IV)-oksida, uglavnom nastalog razgradnjom šećera u prisustvu kvasaca.

Čajna gljiva se može kultivisati i na drugim supstratima, kao što su crno pivo, koka-kola, kafa (Reiss, 1987), laktoza, glukoza, fruktoza (Reiss, 1994), crno vino, belo vino, alkoholno sirće, vinsko sirće (Janković, 1995), ekstrakt topinambura (Petrović i sar., 1997;

Petrović i sar., 1998-1999; Malbaša, 2000), melasa (Lončar i sar., 2001), rtanjski čaj, ehinacea, menta (Cvetković, 2003), ali su se kao najbolji i opšte prihvaćeni pokazali zaslađeni crni i zeleni čaj (Greenwalt i sar., 1998). Razlozi koji daju prednost crnom ili, u novije vreme, zelenom čaju su brojni: jednostavna priprema, veoma dobre senzorne karakteristike proizvedenog napitka i osvedočeno prisustvo bitnih hemijskih jedinjenja-proizvoda metabolizma čajne gljive (mlečna, glukonska i glukuronska kiselina).

Kao supstrat je moguće upotrebiti i mleko, pri čemu se dobijaju nisko energetske fermentisani mlečni proizvodi, senzorno veoma prihvatljivi i bolje održivosti od jogurta proizvedenog pomoću uobičajene jogurtne kulture (Lončar i sar., 2001; Milanović i sar., 2002).

Trajanje fermentacije prilikom pripreme napitka obično je između 6 i 10 dana, dok se produženom kultivacijom dobija proizvod sličan jabukovom i vinskom sirćetu (Reiss, 1987; Janković, 1995; Frank, 1995; Chen, Liu, 2000).

2.1.3. HEMIJSKI SASTAV FERMENTATIVNE TEČNOSTI

Proizvodi metabolizma čajne gljive su brojni. Osnovni sastojci napitka od čajne gljive su prikazani u tabeli 2.

Tabela 2. Osnovni sastojci napitka od čajne gljive

Komp.	Šećeri	Kiseline	Vitamini	Enzimi	Joni esencijalnih elemenata	Alkoholi
	saharoza glukoza fruktoza	glukonska mlečna glukuronska vinska ćilibarna jabučna limunska oksalna malonska	C B ₁ B ₂ B ₃ B ₆ B ₁₂ p-amino- benzoeva kiselina	invertaza amilaza katalaza citohrom- oksidaza	Cu ²⁺ Fe ²⁺ Mn ²⁺ Ni ²⁺ Zn ²⁺	etanol
Literatura	Steiger, Steinegger, 1957 Sievers i sar., 1995 Roussin, 1996	Valentin, 1930 Reiss, 1987 Blanc, 1996 Lončar i sar., 2000	Danielova, 1957 Petrović, Lončar, 1996 Bauer-Petrovska, Petrushevska-Tozi, 2000	Danielova, 1957 Kappel, Anken, 1993	Petrović i sar., 1999 Bauer-Petrovska, 1957 Petrushevska-Tozi, 2000	Steiger, Steinegger, 1957 Reiss, 1987, 1994

Osim jedinjenja prikazanih u tabeli 2, utvrđeno je i prisustvo 14 aminokiselina, biogenih amina (List, Hufschmidt, 1959), vitamina E u tragovima, kofeina (Greenwalt i sar., 1998, 2000), antibiotski aktivnih materija (Hesseltine, 1965) i usninske kiseline (Hauser, 1990). Usninsku kiselinu je pokušao da odredi i Blanc (1996), ali je taj pokušaj ostao neuspšan.

U tabeli 3, prikazan je literaturno utvrđen sadržaj primarnih hemijskih komponenata u napitku od čajne gljive, proizvedenom fermentacijom na crnom čaju.

Tabela 3. Sadržaj primarnih hemijskih komponenata u napitku od čajne gljive, proizvedenom fermentacijom na crnom čaju (Greenwalt i sar., 2000)

Literaturni citat	Vreme fermentacije, inicijalni sadržaj saharoze	Saharoza (g/L)	Glukoza (g/L)	Fruktoza (g/L)	Glukonska kiselina (g/L)	Etanol (g/L)	Sirćetna kiselina (g/L)
Sievers i sar., 1995	10 dana, 70 g/L	18,2	28,8	16,4	2,8	3,6	2,1
	30 dana, 70 g/L	0	30,2	0,35	8,9	7	13,1
Blanc, 1996	10 dana, 70 g/L	17	-*	-	12	<1	3
	25 dana, 70 g/L	4	-	-	31	0	2
Roussin, 1996	10 dana, 70 g/L	-	-	25	3,1	-	2
	30 dana, 70 g/L	-	-	17,04	7,21	-	2,4
Reiss, 1987	14 dana, 50 g/L	-	1	-	2,52	1,07	0,08

-* nije mereno

Rezultati prikazani u tabeli 3, jasno pokazuju razlike u količinama stvorenih metabolita tokom fermentacije, čak i kada je u pitanju isti početni sadržaj saharoze i kada se poredi vreme trajanja fermentacije. Sličnosti su u tome da je nakon 10 dana fermentacije izmeren značajan sadržaj šećera, nerazgrađene saharoze ili oslobođene glukoze i fruktoze, dok sadržaj glukonske kiseline varira i za 4,5 puta. Isti je slučaj i sa sirćetnom kiselinom nakon 30 dana fermentacije. Navedeni podaci ukazuju na činjenicu da poreklo čajne gljive, klimatski faktori i različiti sojevi kvasaca i bakterija značajno utiču na kvalitativni i kvantitativni sastav napitka od čajne gljive.

Važno je napomenuti da sadržaj etanola u čajnom napitku, prema navodima mnogih autora, ne prelazi 0,5%, što je veoma bitno zbog njegove klasifikacije u grupu osvežavajućih bezalkoholnih napitaka.

Elementi u tragovima mogu biti vitalno važni, indiferentni ili štetni za razvoj svakog živog organizma. Mogu biti aktivatori ili integralni delovi mnogih enzimskih sistema, npr. cink je aktivator alkohol-dehidrogenaze, proteaza i vezuje se za insulin, dok je bakar sastavni deo citohrom-oksidge i superoksid-dismutaze. Napitak od kombuhe, osim jona esencijalnih elemenata nabrojanih u tabeli 2, sadrži i štetne elemente u tragovima. Sadržaj jona elemenata u tragovima u napitku od čajne gljive prikazan je u tabeli 4.

Tabela 4. Sadržaj jona elemenata u tragovima u napitku od čajne gljive

Literaturni citat	Vreme fermentacije, inicijalni sadržaj saharoze	Sadržaj ($\mu\text{g/L}$)						
		Cu^{2+}	Fe^{2+}	Mn^{2+}	Ni^{2+}	Zn^{2+}	Pb^{2+}	Cr^{3+}
Petrović i sar., 1999	7 dana, 70 g/L	10	-*	-	-	112	22	-
Bauer-Petrovska, Petrushevska-Tozi, 2000	8 dana, 70 g/L	237	353	462	346	154	5	1

-* nije mereno

Prosečna dnevna doza napitka od kombuhe od 3 dL, zadovoljava potrebe čoveka za jonom nikla, delimično za jonima gvožđa i bakra, ali ne i za jonima cinka i mangana (Bauer-Petrovska, Petrushevska-Tozi, 2000). Sadržaj štetnih elemenata, jona olova i hroma, je daleko ispod granice humane toksičnosti (Malbaša i sar., 2002).

Napitak od čajne gljive sadrži čitavu lepezu u vodi rastvornih vitamina (Tabela 2). Malobrojni literaturni podaci o sadržaju nekih u vodi rastvornih vitamina u napitku od čajne gljive su prikazani u tabeli 5.

Tabela 5. Sadržaj nekih u vodi rastvornih vitamina u napitku od čajne gljive

Literaturni citat	Vreme fermentacije, inicijalni sadržaj saharoze	Vitamin (mg/L)			
		B_1	B_6	B_{12}	C
Konovalov, Semenova, 1955	7 dana, 70 g/L	-*	-	-	60
Steiger, Steinegger, 1957	28 dana, 70 g/L	-	-	-	86
Danielova, 1957	15 dana, 70 g/L	0,09	-	-	4,4
Malbaša, 2000	7 dana, 70 g/L	-	-	-	1,5
Bauer-Petrovska, Petrushevska-Tozi, 2000	8 dana, 70 g/L	740	520	840	1510

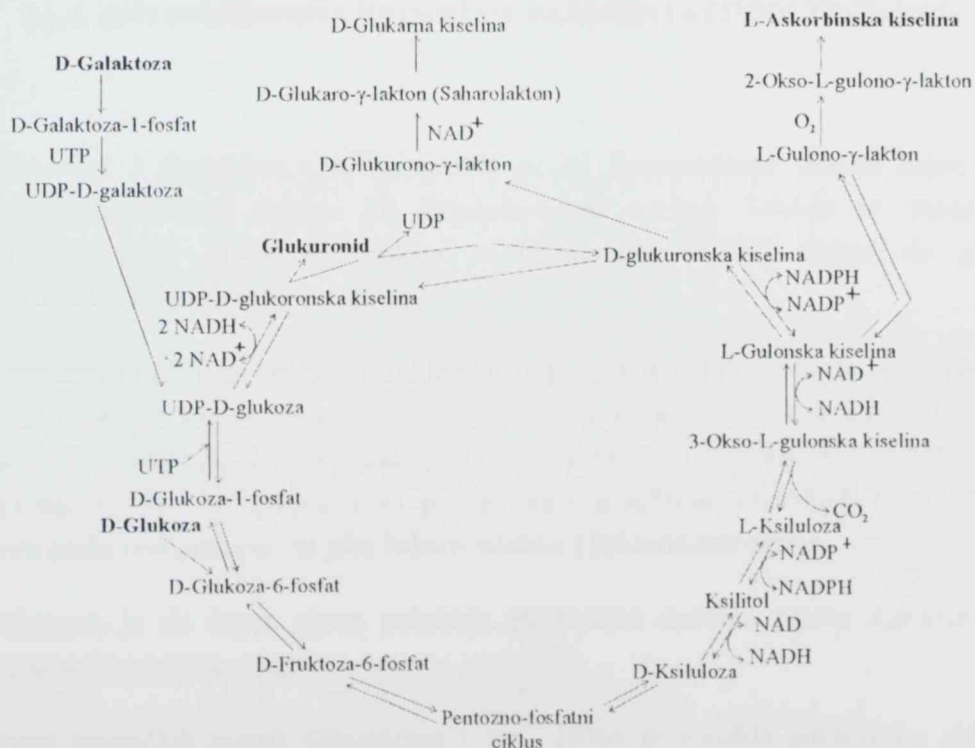
-* nije mereno

Kvantitativni sastav vitamina u napitku od čajne gljive se razlikuje, a zavisi i od toga koji je metod primenjen za njihovo određivanje. Kako se može primetiti, najviše literaturnih podataka ima o vitaminu C i odstupanja u rezultatima su veoma velika. Treba uzeti u obzir da su za analizu korišćene specifične enzimске reakcije (Malbaša, 2000), manje ili više selektivna titrimetrija (Konovalov, Semenova, 1955; Steiger, Steinegger, 1957; Danielova, 1957) i UV spektrofotometrija (Bauer-Petrovska, Petrushevska-Tozi, 2000).

Analiza vitamina u kompleksnom medijumu, kakav je napitak od čajne gljive, nije uopšte jednostavna, i najkompletniju sliku o količinama u vodi rastvornih vitamina dale su Bauer-Petrovska i Petrushevska-Tozi (2000). Ali, diskutabilno je to koliko je UV spektrofotometrijska metoda primenjena u njihovom radu selektivna, jer njihovi rezultati u odnosu na rezultate drugih autora (Tabela 5) pokazuju drastične razlike, a na neke od razlika biće ukazano i u poglavlju 4.4.

U veoma komplikovanom mikrobiološkom sistemu, kao što je simbioza čajne gljive, nije jednostavno napraviti shemu metaboličke aktivnosti svakog mikroorganizma pojedinačno, kao i objasniti njihove međusobne interakcije. Najozbiljniji pokušaj su dali Sievers i sar. (1995), pri čemu su koristili izolate bakterije *Acetobacter xylinum* i kvasca *Zygosaccharomyces* iz čajne gljive koja je fermentisala 60 dana (u daljem objašnjenju ovi mikroorganizmi biće pominjani samo kao bakterija i kvasac). Prema tim rezultatima saharozu razgrađuje kvasac i oslobađaju se glukoza i fruktoza. Iz ovih monosaharida, delovanjem bakterije nastaje celuloza, a delovanjem kvasca etanol i ugljenik(IV)-oksid. Bakterija prevodi glukoza u glukonsku kiselinu, a etanol u sirćetnu kiselinu i dalje u ugljenik(IV)-oksid i vodu. Lako se uočava da u ovom objašnjenju nedostaje čitav niz metabolita, koji su potencijalni proizvodi fermentacije čajne gljive. Na osnovu mikrobiološke fiziologije, mogu se dati realne pretpostavke i za ostala jedinjenja, koja nastaju fermentacijom.

Alternativnim putem oksidacije glukoze, putem uronske kiseline (Dutton, 1980), iz glukoze nastaju glukuronska i L-askorbinska kiselina (Slika 2). Takav je najverovatniji mehanizam i kod kombuhe. Za produkciju glukuronske kiseline odgovorne su bakterije, koje nizom reakcija glukoza prevode u uridin-difosfat-glukoza (UDP-glukoza), iz koje dehidrogenovanjem nastaje UDP-D-glukuronska kiselina. Oslobađanjem UDP-a nastaje D-glukuronska kiselina. Vitamin C nastaje iz L-gulonske kiseline kao prekursora, a L-gulonska kiselina nastaje iz glukoze različitim reakcionim mehanizmima. Pretpostavlja se da su i za stvaranje vitamina C odgovorne bakterije.



Slika 2. Put glukuronske kiseline

Glikolizom glukoze, pomoću kvasaca, dolazi do stvaranja piruvata, dok se fruktoza razlaže do 3-fosfoglicerata i gliceraldehid-3-fosfata, a zatim se ova jedinjenja uključuju u glikolizu. Ne može se reći, da li kultura čajne gljive brže metaboliše glukozu ili fruktozu, jer su eksperimenti sa zajednicama različitog porekla pokazali da ne postoji pravilo (Sievers i sar., 1995). Naime, prilikom eksperimenata, izvedenih u Švajcarskoj, sa lokalnom, domaćom kombuhom i kombuhom nabavljenom u apoteci, dobijeni su suprotni rezultati što se tiče prioriteta usvajanja glukoze, odnosno fruktoze. Prioritet usvajanja glukoze/fruktoze je genetska odrednica kvasaca, pa odatle potiču razlike.

Mikrobiološkom fermentacijom piruvata dobijaju se različiti proizvodi metabolizma, pretežno organske kiseline. Dekarboksilacijom piruvata pomoću kvasaca dobija se acetaldehid iz koga se hidrogenovanjem dobija etanol. Iz etanola se pomoću *Acetobacter xylinum* dobija sirćetna kiselina. Kvasci su stimulisani da stvaraju etanol produkcijom sirćetne kiseline.

Smatra se da su za stvaranje vitamina B grupe odgovorni kvasci, dok aminokiseline, biogeni amini i enzimi, koje sadrži napitak od kombuhe, mogu biti posledica metabolizma i kvasaca i bakterija, kao i prisustva njihovih odumrlih ćelija.

2.1.4. ANTIMIKROBNA SVOJSTVA FERMENTATIVNE TEČNOSTI

Konovalov i Semenova (1955) utvrdili su da fermentativna tečnost čajne gljive pokazuje antimikrobno dejstvo na *Staphylococcus aureus*. Takođe su zapazili da kultivacijom čajne gljive na niskim temperaturama (7-8°C) dolazi do gubitka antimikrobnih svojstava čajnog napitka.

Danielova (1957) je došla do zaključka o prisustvu nekih materija antimikrobnog karaktera, koje nije mogla da definiše. Sa grupom saradnika, ona je dve godine kasnije iz čajnog napitka izolovala dve supstance pod nazivom preparat MM i antibiotik baktericidin (Danielova, 1959). Ovi preparati su primenjivani u lečenju stomačnih infekcija i po njihovim podacima pokazali su jake bakteriostatske i baktericidne efekte.

Dokazano je da čajna gljiva pokazuje antibiotske osobine prema *Agrobacterium tumefaciens* (Hesseltine, 1965).

Grupa američkih autora (Steinkraus i sar., 1996) je utvrdila antibiotsku aktivnost kombuha napitka prema *Helicobacter pylori*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Echerichia coli* i

Staphylococcus aureus. Prema njihovim rezultatima dominantnu antibiotsku ulogu ima sirćetna kiselina i nije dobijena zona inhibicije u neutralizovanim uzorcima.

Greenwalt i sar. (1998) su potvrdili antibiotsku aktivnost kombuha napitka prema *Agrobacterium tumefaciens*, *Echerichia coli* i *Staphylococcus aureus* i utvrdili dejstvo prema *Bacillus cereus* i *Salmonella choleraesuis* serotip *typhimurium*. Oni su takođe zaključili da je antimikrobno dejstvo posledica dejstva organskih kiselina, naročito sirćetne.

Do sada najopsežnije istraživanje o antimikrobnim svojstvima napitka od čajne gljive sprovedli su Sreeramulu i sar. (2000). Dokazana je njegova aktivnost prema brojnim patogenim mikroorganizmima, kao što su *Staphylococcus aureus*, *Shigella sonnei*, *Echerichia coli*, *Aeromonas hydrophila*, *Yersinia enterocolitica*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter cloacae*, *Staphylococcus epidermis*, *Campylobacter jejuni*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium*, *Bacillus cereus*, *Helicobacter pylori* i *Listeria monocytogenes*. U ovom radu su proširena saznanja do kojih su došli Steinkraus i sar. (1996) i Greenwalt i sar. (1998). Oni su smatrali da su samo organske kiseline odgovorne za antibiotski efekat. Nakon neutralizacije i zagrevanja fermentativne tečnosti na 80°C, Sreeramulu i sar. (2000) su dokazali da ona pokazuje aktivnost prema *Shigella sonnei*, *Echerichia coli*, *Campylobacter jejuni*, *Salmonella enteritidis* i *Salmonella typhimurium*. Ovo otkriće je sugerisalo da su u napitku od kombuhe prisutne antimikrobne komponente, koje nisu sirćetna kiselina ili veliki molekuli proteina.

2.1.5. FARMAKOLOŠKA SVOJSTVA FERMENTATIVNE TEČNOSTI

Zbog visokog sadržaja šećera, prisustva velikog broja organskih kiselina, kao i u vodi rastvornih vitamina, jasno je da napitak od kombuhe ima visoku nutritivnu vrednost. Pojavile su se brojne publikacije, koje opisuju neka od lekovitih svojstava ovog napitka. Pomenute publikacije je hronološki sistematizovao Frank (1995) i iz njih su izdvojeni sledeći podaci:

- Batiskaja (1914) je objavila da kombuha pozitivno deluje na crevni trakt.
- Bazarevski (1915) je istražujući narodne lekove u baltičkim državama, primetio da Letonci koriste kombuhu kao lek protiv glavobolje.
- Lindner (1917/1918) je objavio da se kombuha koristi radi regulisanja probave, kao i za lečenje hemoroida.
- Kobert (1917/1918) je smatrao da se kombuha koristi za lečenje reumatizma.

- Henneberg (1926) je izvestio da se kombuha u Rusiji uspešno koristi kod svih bolesti, a posebno kod zatvora.
- Madaus (1927) je smatrao da kombuha učestvuje u regeneraciji ćelija i stoga pozitivno deluje protiv zakrečavanja arterija.
- Bing (1928) je smatrao da je kombuha sredstvo protiv zakrečavanja arterija, za lečenje gihta i crevnih poremećaja.
- Mollenda (1928) je izvestio da je kombuha preporučljiva kod tegoba u digestivnom traktu, kod gihta, reume i određenih stadijuma arterioskleroze.
- Irion (1944) je smatrao da je kombuha odlično sredstvo protiv gihta, reumatizma, visokog pritiska, nervoze, lenjosti creva i tegoba koje su posledice starenja.
- Dr Sklenar je šezdesetih godina razvio biološku terapiju kancera kombuhom kao osnovnim sredstvom, koju je prilično naplaćivao, a koja nije imala čvrstu medicinsku osnovu (Hauser, 1990).
- Pominje se i da se celulozna membrana čajne gljive koristi za tretman opekotina i povreda kože (Fontana i sar., 1991).

U novijim radovima o kombuhi (Sai Ram i sar., 2000; Vijayraghavan i sar., 2000; Hartmann i sar., 2000; Greenwalt i sar., 2000; Sreeramulu i sar., 2000), pominje se niz bolesti i fizioloških pojava, koje leči i sprečava napitak od kombuhe, kao što su glavobolja, hemoroidi, ateroskleroza, metabolički poremećaji, kostobolja, artritis, dijabetes, lenjost creva, nesanica, stres, gojaznost, gubitak kose, starenje, hipertenzija, psorijaza, mikrobiološke infekcije, kancer, oslabljen imuno sistem i dr. Može se uočiti da su zapravo na listu bolesti i tegoba, a čiji je izvor literatura starijeg datuma, samo dodate bolesti savremenog doba, što je u vezi sa intenzivnom ekonomskom propagandom komercijalnih proizvoda od kombuhe. Međutim, autori se slažu da za ovakve tvrdnje nema čvrstih naučnih dokaza, jer potiču iz predanja, i da je za ozbiljne tvrdnje o lekovitosti kombuhe neophodno sprovesti ozbiljna farmakološka ispitivanja, koja bi na kraju bila propraćena i savremenim kliničkim studijama.

Ipak, postoje i neke činjenice do kojih se došlo i naučnim, eksperimentalnim studijama. Jedna od najpoznatijih je početa u Rusiji 1951. godine i njena metodologija nije u potpunosti poznata. Sproveli su je "Centralna onkološka istraživačka jedinica" i "Ruska akademija nauka-Moskva". Istraživanje je bilo orijentisano ka traženju korelacije između dugotrajnog dnevnog konzumiranja kombuhe i visoke rezistencije prema kanceru. Šezdesetih godina XX veka, naučnici su preformulisali radni naziv studije, izbacivši kancer kao fokus ispitivanja i u zaključcima akcentovali efekte detoksikacije, jačanje imuno sistema i podsticanje produkcije interferona. Ruska otkrića su dalje podržana u Švajcarskoj, Nemačkoj i Holandiji (Dufresne, Farnworth, 2000).

Sa farmakološkog aspekta od metabolita čajne gljive posebno su značajne glukuronska, L-mlečna kiselina, glukonska kiselina i antioksidativni vitamini, a u smislu prevencije teških oboljenja.

Glukuronsku kiselinu proizvodi jetra zdravog čoveka i ta kiselina u jetri vezuje toksične materije dospele u organizam pomoću enzima glukuronil-transferaza, a zatim se tako vezane toksične materije eliminišu preko bubrega u vidu rastvorljivih glukuronida. U kasnijem životnom dobu kao i prilikom slabljenja funkcije jetre usled različitih bolesti, produkcija glukuronske kiseline u jetri opada, što je pogubno za imunološki sistem (Frank 1995).

Sai Ram i sar. (2000) su ispitivali uticaj napitka od kombuhe na oksidativni stres kod albino pacova, izazvan hrom(VI)-jonima, tačnije natrijum-dihromatom. Zaključili su da napitak snižava nivo oksidativnog stresa, a kao jedan od razloga su naveli uspešniju eliminaciju hrom(VI)-jona iz telesnih tkiva pomoću glukuronske kiseline.

Osim detoksikacije i prevencije oksidativnog stresa, glukuronska kiselina je bitna, jer je prekursor biosinteze mukopolisaharida. Poznatiji su kao glikozaminoglikani i ključni su konstituenti tkiva koja vezuju vodu, a u njih spadaju i potkožna tkiva. To je veoma važno za prevenciju boranja kože, jer su koloidna vezivna potkožna tkiva odgovorna za održavanje čvrstoće kože (Kaufman, 1996).

Najveći sadržaj glukuronske kiseline u fermentativnoj tečnosti čajne gljive, od 0,28 g/L sedmog dana fermentacije, odredili su Lončar i saradnici (2000).

L-mlečna kiselina je veoma bitna za prevenciju kancera. Krv, mišići i želudac sadrže L-mlečnu kiselinu i ona je neophodna za regulaciju pH krvi u organizmu. Postoje dva oblika mlečne kiseline, "dobra" ili L-mlečna, odnosno "loša" ili D-mlečna kiselina. L-mlečna kiselina potpomaže cirkulaciju krvi, sprečava truljenje u crevima i konstipaciju, podstičući rad creva. Utiče na kiselinsko-baznu ravnotežu i podržava dejstvo vitamina C u organizmu, čime je ojačana prirodna rezistencija na infekcije. Takođe podstiče funkciju pankreasa, što stimuliše sekreciju svih digestivnih organa (Kaufman, 1996). Nedostatak L-mlečne kiseline u organizmu otežava respiraciju ćelija, što dovodi do stvaranja racemske smeše L- i D-mlečne kiseline, a to su uslovi koji pogoduju stvaranju kancerogenih ćelija (Frank, 1995).

Mlečna kiselina u prehrambenim proizvodima ima dvojak značaj. Važna je za prezervaciju hrane, a poseduje i već pomenuta farmakološka svojstva.

Više autora je detektovalo i odredilo L-mlečnu kiselinu u fermentativnoj tečnosti čajne gljive, pri čemu je najveću vrednost izmerio Reiss (1987), nakon 14 dana fermentacije, i to 2,9 g/L.

D-glukonska kiselina nastaje konverzijom D-glukoze, a daljom oksidacijom mogu nastati 2-ketoglukonat i 2,5-diketoglukonat. Osim D-glukonske kiseline, 2-ketoglukonat je takođe jedan od metabolita čajne gljive (Dufresne, Farnworth, 2000). Glukonati su veoma bitni za apsorpciju i transport jona cinka, mangana(II) i hroma(III) u organizmu, čime se reguliše iskorišćenje glukoze, proteina i lipida, kao i sekrecija insulina (Barrie i sar., 1987; Potter i sar., 1990; Neve i sar., 1992; Brun i sar., 1995; Sun i sar., 2000).

Čista glukonska kiselina se primenjuje kao sekvestrirajući agens u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji (Deppenmeier i sar., 2002).

Najveći stepen konverzije saharoze u glukonsku kiselinu dobijen je u istraživanjima Blanca, 1996 (Tabela 3).

Ako se uzmu u obzir podaci o biološkoj aktivnosti napitka od čajne gljive i samog čaja, moguće je napraviti poređenje, pri čemu se dobija jasnija slika o tome, kako na neke tegobe i oboljenja čoveka utiče čist čaj, a kako napitak od čajne gljive. U tabeli 6 je sistematizovano i prikazano poređenje biološke aktivnosti čaja i napitka od kombuhe.

Tabela 6. Poređenje biološke aktivnosti čaja i napitka od kombuhe (Dufresne, Farnworth, 2000)

Uticaj	Napitak od kombuhe	Čaj
Detoksikacija organizma	+	
Snižavanje nivoa holesterola	+	+
Redukcija ateroskleroze regeneracijom ćelijskog zida	+	+
Sniženje krvnog pritiska	+	+
Redukcija upalnih procesa	+	+
Ublažavanje artritisa, reumatizma i simptoma gihta	+	
Podsticanje funkcija jetre	+	+
Normalizacija crevne aktivnosti i ravnoteža crevne flore	+	
Lečenje hemoroida	+	
Redukcija gojaznosti i regulacija apetita	+	
Prevenција/lečenje infekcije bešike i redukcija kalcifikacija	+	
Stimulacija rada žlezda	+	
Zaštita protiv dijabetesa	+	+
Povećanje telesne otpornosti na kancer	+	+
Antibiotski efekat protiv bakterija, virusa i kvasaca	+	+
Jačanje imuno sistema i stimulacija produkcije interferona	+	
Olakšavanje tegoba izazvanih bronhitisom i astmom	+	
Redukcija menstrualnih poremećaja i problema menopauze	+	
Poboljšanje zdravlja kose, kože i noktiju	+	
Redukcija žudnje za alkoholom	+	
Redukcija stresa, nervne napetosti i nesаницe	+	
Pomoć kod glavobolje	+	
Poboljšanje vida	+	
Poboljšanje ukupnog metabolizma	+	

Razlog različitog biološkog dejstva čaja i napitka od čajne gljive (Tabela 6) neosporno leži u različitom hemijskom sastavu. Dominantne komponente čaja su katehini, flavonoidi i metilksantini, te je jasno da su oni najviše zaslužni za njegovo biološko dejstvo (detaljnije u poglavlju 2.2.2.). Osim što sadrži ova ili samo neka od ovih jedinjenja, napitak od čajne

gljive poseduje i druga biološki veoma značajna jedinjenja, kao što su glukuronska, glukonska, L-mlečna kiselina, u vodi rastvorni vitamini, i niz drugih jedinjenja koja nemaju biološku aktivnost, ali pozitivno utiču na dejstvo biološki aktivnih komponenata (Tabela 2). Ovo se naročito odnosi na veliki broj organskih kiselina, koje su veoma važne za dobru senzornu prihvatljivost, kao i za prezervaciju napitka.

Ne treba zanemariti ni prisustvo slobodne glukoze, fruktoze i saharoze, koje su dominantna energetska snaga napitka od čajne gljive, koje se lako resorbuju u organizmu i koje regulišu apetit, smanjuju osećaj slabosti i slične tegobe.

2.1.6. KOMBUHA KAO FERMENTISANA HRANA

Fermentisana hrana, u koju spada i napitak od čajne gljive (Steinkraus, 1997), ima veliki značaj zbog toga što obezbeđuje i štiti visok kvalitet nutrijenata. Takođe, ona obezbeđuje raznolikost ukusa, mirisa i tekstura, koji obogaćuju ljudsku ishranu. Smatra se da ovakva hrana postoji od nastanka Zemlje i da je budućnost u artiklima u koje spadaju proizvodi dobijeni alkoholnom fermentacijom, zatim sirće, turšija, kobasice, sirevi, jogurt, biljni proteinski aminokiselinski/peptidni sosovi i paste mesnog ukusa i hleb. Vrlo je verovatno da će fermentisana hrana u ovom veku, kada se predviđa da će svetska populacija dostići 8 do 12 milijardi ljudi, doživeti svoju potpunu ekspanziju.

Fermentisana hrana, uopšteno govoreći, nastaje tako što se supstrat izlaže proizvodnim mikroorganizmima, koji enzimima, uglavnom amilazama, proteazama i lipazama hidrolizuju polisaharide, proteine i lipide do netoksičnih proizvoda sa ukusom, mirisom i teksturom prijatnim i atraktivnim za konzumenta. Ukoliko produkti enzimske aktivnosti imaju neprijatan ukus ili miris ili su toksični, došlo je do procesa kvarenja.

Prema kategorijama (Steinkraus, 1997) fermentacije hrane mogu se podeliti na:

1. alkoholne fermentacije pomoću kvasaca
2. sićetne fermentacije pomoću *Acetobacter* vrsta
3. mlečne fermentacije pomoću *Lactobacillus* vrsta
4. fermentacije kišeljenja pomoću *Lactobacillus* vrsta
5. fermentacije ribe ili mesa pomoću *Lactobacillus* vrsta
6. fermentacije proteina biljnog porekla plesnima, uz ili bez prisustva *Lactobacillus* vrsta i kvasaca

Fermentacije hrane se mogu klasifikovati i prema proizvodima (Steinkraus, 1997) i to na:

1. napitke
2. proizvode na bazi žitarica
3. mlečne proizvode
4. proizvode na bazi ribe
5. proizvode na bazi voća i povrća
6. proizvode na bazi leguminoza
7. proizvode na bazi mesa

Sudanci (Steinkraus, 1997) tradicionalno klasifikuju njihovu hranu, ne na osnovu proizvodnih mikroorganizama ili vrste proizvoda, nego na funkcionalnoj bazi. Podela je sledeća:

1. vezivna hrana-kaše i hlebovi
2. sosovi i začini za vezivnu hranu
3. različite vrste tamnih i svetlih piva, vina od urmi i medovine i druga alkoholna pića
4. hrana za posebne namene

Keith Steinkraus (1997) je napravila kombinovanu klasifikaciju fermentisane hrane, u kojoj je svoje mesto našla i kombuha. To su:

1. proizvodi na bazi proteina povrća, smeša leguminoza i žitarica, kao supstituti mesa
2. paste i aminokiselinski/peptidni sosovi, visokog sadržaja soli, sa mesnim ukusom
3. proizvodi mlečne fermentacije
4. proizvodi alkoholne fermentacije
5. proizvodi sirćetne fermentacije (jabukovo i vinsko sirće, palmino vino, kombuha)
6. proizvodi alkalne fermentacije
7. kvasni hlebovi

Jasno je da osim ove, kombuha lako može da nađe svoje mesto i u drugim klasifikacijama fermentisane hrane.

Kada se govori o proizvodnji ovakve hrane, ne treba zaboraviti da ona u osnovi potiče iz kućne radinosti i da je tu i dalje veoma razvijena. Što se tiče napitka od čajne gljive, u našim uslovima to i jeste dominantni način pripreme.

2.1.7. NEŽELJENI EFEKTI KORIŠĆENJA KOMBUHE

Sredinom devedesetih godina prošlog veka pojavili su se radovi, članci i novinski komentari koji su opisivali neželjena dejstva i posledice korišćenja napitka od kombuhe. Pri tome su pominjane tegobe i bolesti kao što su metaboličke acidoze, abdominalni grčevi,

teskoba u grudima, suvi kašalj, mučnina, drhtavica, gubitak daha, hipotenzija, tahikardija, trovanje olovom i antraks. Ovi tekstovi su privukli veliku pažnju i neophodno ih je objektivno analizirati.

Phan i sar. (1998) su opisali trovanje olovom kod bračnog para koji je konzumirao napitak od kombuhe, pripremljen u keramičkoj posudi. Kako glazura keramičke posude sadrži olovo u značajnoj količini, a napitak je jako kiseo, evidentno je da je došlo do ekstrakcije olova u napitak što je rezultovalo kontaminacijom. Dakle, napitak nije pripreman u skladu s preporukama. Sadjadi (1998), iz Irana, je objavio tekst o prisustvu *Bacillus anthrax* u napitku, koji je pripreman u stočnom dvorištu, odnosno u krajnje nehigijenskim uslovima. Srinivasan i sar. (1997) su pratili gastrointestinalnu toksičnost kod četiri pacijenta koji su konzumirali ovaj napitak, a Currier i sar. (1995) metaboličku acidozu kod samo dva pacijenta. Peron i sar. (1995) i Ishida (1999) su dali negativno mišljenje o alternativnoj medicini pozivajući se na kombuhu.

Sve ove publikacije opisuju samo izolovane slučajeve u koje je uključen veoma mali broj osoba (dve do četiri). Takođe, ni u jednom slučaju nema naučnih dokaza da je napitak od kombuhe uzrok toksičnosti (Sai Ram i sar., 2000).

2.2. ČAJ

Čaj je biljka, lišće ili napitak, koja potiče iz, kako je do sada razmatrano, jedne vrste *Camellia sinensis* (L.) Mogu se prepoznati dve glavne varijacije-*sinensis* i *assamica*. U poljima je razlika očigledna. Varijacija *sinensis* ima malo lišće (5-12 cm), dok varijacija *assamica* ima lišće dužine od preko 20 cm (Graham, 1992).

Camellia sinensis (L.) pripada porodici *Theaceae*. To je žbun ili drvo koje može da naraste do visine od 10 metara, ali se obično šiša tako da mu je visina tokom kultivacije od 0,6 do 1,5 metara. Žbun ili drvo je snažno razgranat, sa tamno zelenim, dlakavim, duguljastim lišćem, koje se bere uglavnom dok je mlado. Za starije lišće se smatra da ima slabiji kvalitet (Brown, 1999; Hirschsteiner, 2000).

Biljka čaja potiče iz Jugoistočne Azije, ali se trenutno proizvodi u preko 30 zemalja širom sveta. Najpoznatiji proizvođači čaja su Indija, Kina, Šri Lanka, Kenija, Indonezija, Turska, Rusija, Gruzija, Japan, Iran, Bangladeš, Vijetnam i Argentina.



Zeleni, crni i ulong (polufermentisani) čaj potiču iz iste biljke. Zeleni čaj je proizvod dobijen iz svežeg lišća, pri čemu je sprečena oksidacija polifenolnih komponenata. Crni čaj se proizvodi tako da se obezbedi visok stepen enzimski katalizovane aerobne oksidacije polifenola u lišću, pri čemu dolazi do hemijskih reakcija kondenzacije. Enzim odgovoran za oksidaciju je polifenol-oksidaža. Ulong čaj je delimično oksidovan (Graham, 1992).

Novija istraživanja o proizvodnji crnog čaja su pokazala da se kvalitet crnog čaja može značajno poboljšati ako se tokom tehnološkog procesa proizvodnje biljno tkivo tretira celulolitičkim enzimima produkovanim od strane čajne gljive. Ukoliko se lišće čaja tretira celulazom, pektinazom i ksilanazom dolazi do slabljenja ćelijskog zida, pri čemu se efikasnije oslobađaju polifenolne komponente i olakšana je oksidacija polifenol-oksidažom (Murugesan i sar., 2002).

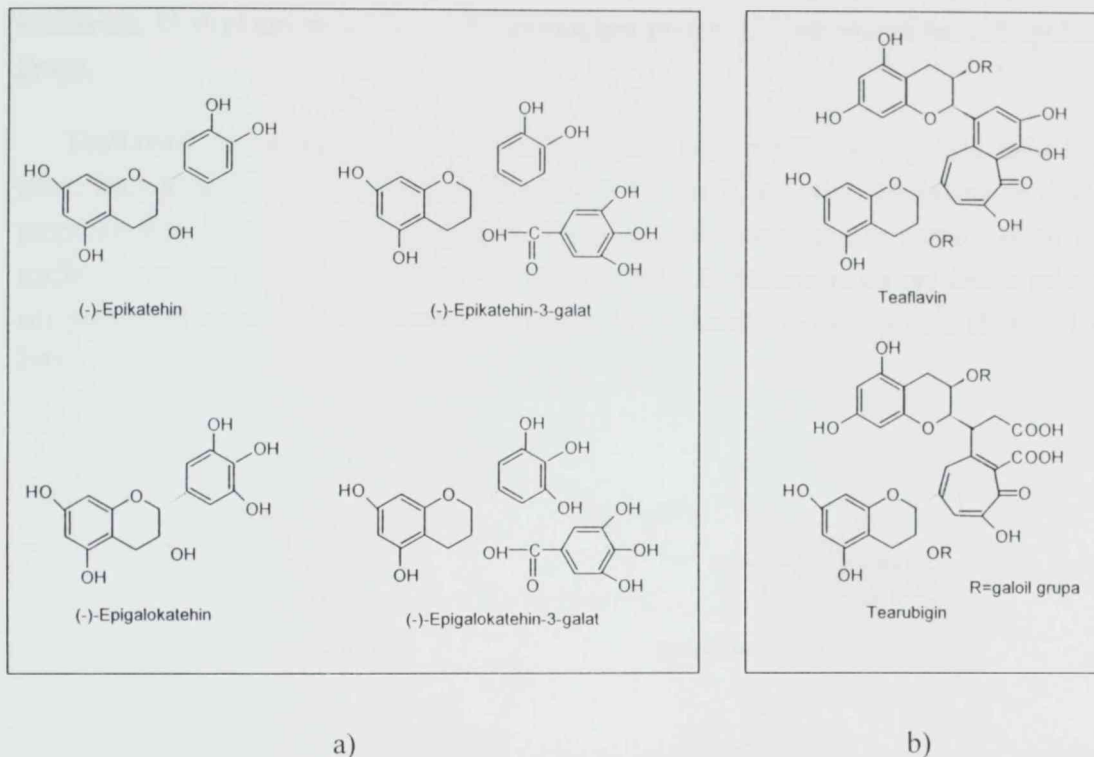
Od ukupne svetske proizvodnje čaja, 78% otpada na crni, 20% na zeleni, a oko 2% na ulong čaj. Crni čaj se najviše uživa u zapadnim zemljama (Irska, Engleska) i nekim delovima Azije, dok se zeleni čaj najviše koristi u Kini, Japanu, Indiji, nekim zemljama Severne Afrike i na Srednjem Istoku. Proizvodnja i upotreba ulong čaja je karakteristična za Jugoistočnu Kinu i Tajvan (Mukhtar, Ahmad, 2000).

Ako se izuzme voda, čaj je napitak koji se najviše konzumira u svetu i to 0,12 litara dnevno po glavi stanovnika (pretpostavljeno je da se uživa 1%-ni ekstrakt čaja). Države u kojima se čaj najviše koristi su Irska, Velika Britanija, Turska, Novi Zeland, Tunis, Egipat, Australija, Maroko, Japan, Pakistan, Rusija, Čile, Indija, Južna Afrika, Kanada i Kina (Graham, 1992).

2.2.1. SASTAV I HEMIJA ČAJA

Sastav lišća čaja zavisi od brojnih faktora, kao što su klima, godišnje doba, poljoprivredna proizvodnja, vrsta i starost biljke. Hemijski sastav zelenog čaja je sličan sastavu lišća. Zeleni čaj sadrži polifenolne komponente (oko 30% suve materije), u koje spadaju flavanoli, flavandioli, flavonoidi i fenolne kiseline. Dominantni polifenoli u zelenom čaju su flavanoli, poznatiji kao katehini. Glavni katehini u zelenom čaju su (-)-epikatehin (EC), (-)-epikatehin-3-galat (ECG), (-)-epigalokatehin (EGC) i (-)-epigalokatehin-3-galat (EGCG). U crnom čaju, od polifenola su najviše zastupljeni teaflavin i tearubigin (Mukhtar, Ahmad, 2000). Strukture glavnih polifenola prisutnih u zelenom i crnom čaju prikazane su na slici 3.

Koncentracija katehina u čaju bitno zavisi od starosti lišća. Pupoljci i najmlađe lišće su najbogatiji (-)-epigalokatehin-3-galatom. Zeleni čaj se često proizvodi iz lišća sa nešto nižim nivoom katehina nego lišće koje se koristi za proizvodnju crnog čaja. To je logično zato što se veći udeo katehina, prilikom proizvodnje crnog čaja, hemijskom kondenzacijom prevodi u teaflavin i tearubigin.



Slika 3. Dominantni polifenoli u: a) zelenom i b) crnom čaju

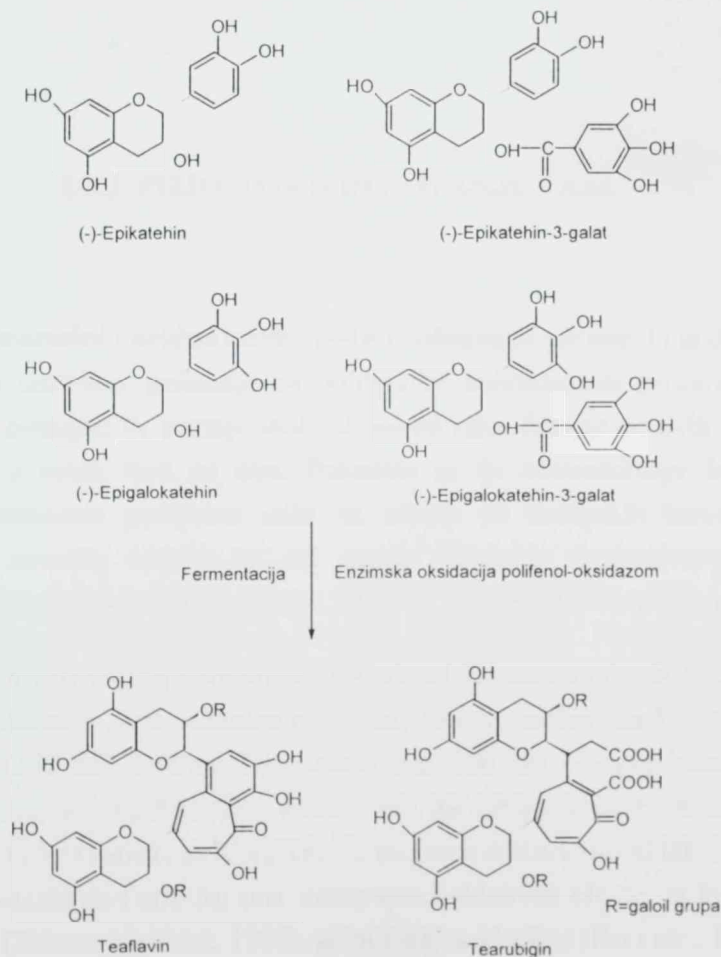
Katehini su najznačajniji od svih komponenata čaja. To su bezbojne, u vodi rastvorne komponente. Lako se oksiduju, iako njihov oksidacioni potencijal varira. Poznato je da deluju kao antioksidanti i na taj način sprečavaju oksidativno kvarenje masti (Djilas i sar., 2002). Antioksidativna aktivnost je slična kao i kod butilhidroksianizola, a ponekad su efikasniji od vitamina C i vitamina E. U tome poseban doprinos daju galokatehini i katehin galati.

Na popularnost čaja utiče i prisustvo umerenih količina kofeina (2,5 do 4,5%). Ostali metilksantini, teobromin i teofilin, su takođe prisutni, ali u veoma malim količinama.

U proteinsku frakciju čaja spadaju konstitutivni enzimi, neophodni za ćelijski metabolizam biljke. Identifikovani su enzimi odgovorni za sintezu katehina. Od najvećeg interesa je polifenol-oksidadza, koja katalizuje aerobnu oksidaciju katehina. Najintenzivnija aktivnost polifenol-oksidadze je u najmlađem lišću, što je veoma važno, naročito zbog proizvodnje crnog čaja (Graham, 1992).

Kao što je već pomenuto, veći deo katehina iz lišća čaja, prilikom proizvodnje crnog čaja, prevodi se u teaflavine i tearubigine. Reakcije su prikazane na slici 4. Početkom prošlog veka, smatralo se da do promena hemijskog sastava dolazi usled mikrobiološke fermentacije. Međutim, pokazalo se da su za hemijsku konverziju odgovorni enzimi čaja i atmosferski kiseonik. Prvi korak je enzimska oksidacija katehina, koja rezultuje stvaranjem hinona. Time se iniciraju sve dalje reakcije. Hinoni katehina i galokatehina reaguju dajući teaflavine. U strukturi se može uočiti sedmočlani prsten, koji se naziva benzotropolonska grupa.

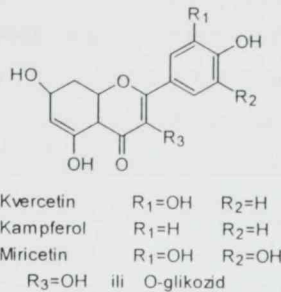
Teaflavini su narandžasto crvene komponente, koje napitku crnog čaja daju boju i ukus, iako je njihov udeo u osušenom listu od 1,5 do 2,5%. Nivo teaflavina je direktno proporcionalan sa kvalitetom crnog čaja. To je posebno bitno, ako se uzme u obzir da su teaflavini veoma dobri antioksidanti (Graham, 1992). Dokazano je da oni imaju približno isti potencijal stabilizacije slobodnih radikala, kao i katehini zelenog čaja (Leung i sar., 2002).



Slika 4. Reakcije nastajanja teaflavina (Stoner, Mukhtar, 1995)

Slobodna galna kiselina, značajno prisutna u crnom čaju, nije supstrat za čajnu polifenol-oksidadazu, već je molekul sa izraženom antioksidativnom aktivnošću (Ho i sar., 1992).

I crni i zeleni čaj sadrže glikozide flavonola kvercetina, kampferola i miricetina (Goldbohm i sar., 1996). Struktura ovih flavonola prikazana je na slici 5.



Slika 5. Struktura kvercetina, kamferola i miricetina

2.2.2. FIZIOLOŠKO DELOVANJE ČAJA

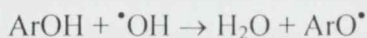
Brojni eksperimentalni i epidemiološki podaci, sakupljeni poslednjih godina u vodećim naučnim svetskim centrima, pokazuju da polifenolni antioksidanti prisutni u zelenom i crnom čaju mogu značajno da smanje rizik od bolesti raka. Mnoge od ovih studija odnose se na zeleni čaj, a manji broj na crni. Pokazalo se da konzumiranje čaja i njegovih polifenolnih konstituenata pozitivno utiče na zaštitu od hemijskih karcinogena i UV zračenja. To se naročito odnosi na rak pluća, jednjaka, dvanaestopalačnog creva, pankreasa, jetre, dojke, debelog creva i kože, a koji su izazvani hemijskim karcinogenima.

Konzumiranjem zelenog čaja smanjuje se rizik od kancerogenih oboljenja. Za to je, u najvećoj meri, zaslužan (-)-epigalokatehin-3-galat, glavni polifenolni konstituent zelenog čaja. Jedna šolja (240 ml) zelenog čaja sadrži oko 200 mg (-)-epigalokatehin-3-galata. Mnogi proizvodi kao što su šamponi, omekšivači za rublje, kreme, napici, kozmetika, lilihip i sladoled sadrže ekstrakt zelenog čaja u svojstvu aditiva (Mukhtar, Ahmad, 2000). Istraživanja su pokazala da i crni čaj ima slične antioksidativne efekte, za koje su zaslužni njegovi polifenoli (Stoner, Mukhtar, 1995), tačnije galna kiselina (Ho i sar., 1992).

X i UV zračenje može izazvati oštećenje DNK tokom kasne profaze ćelije. Korišćenjem crnog ili zelenog čaja ovo može biti značajno umanjeno. Prevencija oštećenja

DNK, može biti od primarne važnosti pri sprečavanju ili blokiranju karcinogenih procesa (Parshad i sar., 1998).

Antikancerogene i antimutagene osobine različitih antioksidanata često su u korelaciji sa njihovom sposobnošću da smanje koncentraciju slobodnih radikala nastalih kao rezultat metaboličkih procesa. Na primer, karcinogenost policikličnih aromatičnih ugljovodonika (eng. PAH, polycyclic aromatic hydrocarbons) potiče od toga što se formiraju PAH slobodni radikali. Dolazi do metaboličke aktivacije citohrom P-450 zavisnim enzimima. Pošto radikal-katjoni imaju kratak život, zbog svoje elektrofilne prirode, mogu reagovati sa važnim biomolekulima i na taj način izazvati karcinogenezu. Pokazalo se da ekstrakt zelenog čaja poseduje sposobnost transformacije policikličnih aromatičnih ugljovodoničnih katjon slobodnih radikala, čak je u tome i efikasniji u poređenju sa butilhidroksitoluenom (BHT) (Wang i sar., 1989). Takođe, ekstrakt zelenog čaja utiče na formiranje i transformaciju aktivnih kiseoničnih radikala, naročito hidroksi- i superoksid-anjon-radikala (Zhao i sar., 1989). Smatra se i da je konzumiranje jedne šoljice čaja, što se tiče antioksidativnog potencijala, ekvivalentno jednoj tableti od 200 mg vitamina C (du Toit i sar., 2001). Pretpostavljeni mehanizam interakcije hidroksi-radikala ($\cdot\text{OH}$) i polifenolnih jedinjenja (ArOH) je:



Polifenoli zelenog čaja u smeši ili pojedinačno su efikasni antioksidanti *in vitro* i *in vivo*, jer štite membrane crvenih krvnih zrnaca od lizisa izazvanog slobodnim radikalima (Zhang i sar., 1997).

Mnogi inicijatori i promotori tumora su generatori slobodnih radikala, što znači da su antioksidanti često i antikarcinogeni (Record i sar., 1996).

Većina podataka o antikancerogenim svojstvima crnog i zelenog čaja dobijena je tokom eksperimenata sa životinjama i sa kulturama humanih ćelija, mada postoje i naučne studije sa dobrovoljcima (Goldbohm i sar., 1996). Da bi se došlo do kompletnih podataka o lekovitom dejstvu oba čaja, potrebne su opsežne epidemiološke studije, i to sa populacijom koja ima predispozicije za oboljevanje od raka.

Bolesti srca, posebno zastupljene u zapadnom svetu, rezultat su načina života, koji podrazumeva ishranu bogatu zasićenim mastima i slabu fizičku aktivnost. Istraživanja su pokazala zaštitni efekat zelenog čaja, kada su u pitanju bolesti srca, visok krvni pritisak i arterioskleroza. Oksidacija lipoproteina male gustine (LDL) i lipoproteina veoma male gustine (VLDL) dovodi do progresivnih oštećenja arterija ili arterioskleroze, do angine pektoris, koronarnih oboljenja srca ili do infarkta. Flavonoidi čaja, uglavnom galokatehini, štite LDL i VLDL od oksidacije slobodnim radikalima i jonima bakra i sprečavaju širenje

glatkih vaskularnih mišićnih ćelija, čime se sprečava skleroza arterija. Neki od konstituenta čaja, kao što je kvercetin, snižavaju krvni pritisak kod životinja i čoveka, čime se smanjuje rizik od kardiovaskularnih bolesti. Katehini čaja su pronađeni u humanoj plazmi u koncentraciji dovoljnoj za antioksidativni efekat (Dufresne, Farnworth, 2000).

Neke studije o zelenom čaju i njegovoj polifenolnoj frakciji su kao rezultat imale podatke o jakom antiinflamatornom dejstvu čaja, naročito kada je povišena temperatura izazvana hemikalijama (12-O-tetradekanoilforbol-13-acetat) ili UV zračenjem. Takođe, zeleni čaj se pokazao kao odličan imunosupresant (Mukhtar, Ahmad, 2000) i kao sredstvo koje snižava nivo holesterola (Record i sar., 1996). Katehini čaja efikasno redukuju apsorpciju holesterola iz creva, čime se smanjuje njegova rastvorljivost i povećava fekalna ekskrecija, kako holesterola, tako i ukupnih masti (Dufresne, Farnworth, 2000).

Dijabetes je povezan sa povišenim sadržajem glukoze u krvi. Ekstrakti zelenog i crnog čaja mogu značajno da snize ovu vrednost kod pacova, redukujući apsorpciju glukoze i usmeravajući je drugim metaboličkim putevima. Polifenoli čaja inhibiraju α -amilazu iz pljuvačke, redukuju aktivnost crevne amilaze, što dovodi do nižeg stepena hidrolize skroba, a samim tim i do umanjene asimilacije glukoze. Kao posledica toga, mukozna resorpcija glukoze je otežana, jer polisaharidi onemogućavaju apsorpciju glukoze, a difenilamin iz čaja potstiče njihov metabolizam. Polifenoli mogu da snize digestivnu enzimsku aktivnost i da na taj način utiču na resorpciju glukoze. Oni mogu da budu zaštita, tako što obaraju nivo uratnih toksina i metilguanidina kod pacijenata podvrgnutih hemodijalizi. Takođe, oni štite od antioksidativnog stresa povezanog sa krajnjim komplikacijama u patologiji dijabetesa, tako što uspostavljaju ravnotežu između pro- i antioksidanata u organizmu (Dufresne, Farnworth, 2000).

Mogu se pronaći i podaci da je zeleni čaj veoma dobar za sprečavanje kapi, osteoporoze, bolesti jetre, bakterijskih i virusnih infekcija (Brown, 1999; Mukhtar, Ahmad, 2000). Što se tiče antibakterijskog dejstva o tome postoje detaljna istraživanja. Vodeni ekstrakti čajeva (*Camellia sinensis* L.) različitih vrsta i iz različitih izvora inhibiraju širok spektar patogenih bakterija, uključujući *Staphylococcus aureus*, koji je rezistentan na meticilin. Ekstrakti čaja, u dozama od oko jedne šolje čaja, imaju baktericidno dejstvo na *Staphylococci* i *Yersinia enterocolitica*. Testiranjem čistih komponenata, antibakterijska aktivnost ekstrakta zelenog čaja može se objasniti njegovim visokim sadržajem EGC, EGCG i ECG. U ekstraktima crnog čaja, teaflavini i njihovi galati su dodatne antibakterijske aktivne komponente (Yam i sar., 1997). Katehini čaja su mogući antivirusni i antiprotzoički agensi. EGCG spaja i inhibira A i B viruse gripa u animalnim kulturama ćelija. Utvrđena je i antiviralna aktivnost protiv enzima HIV virusa, rotavirusa i anterovirusa u kulturi majmunskih ćelija, prethodno tretiranoj sa EGCG (Dufresne, Farnworth, 2000).

Biološko dejstvo čaja zasniva se na:

- inhibiciji biohemijskih markera inicijacije tumora,
- inhibiciji biohemijskih markera razvoja tumora,
- uticaju na detoksikacione enzime,
- kompetitivnosti sa aktiviranim metabolitima karcinogena i
- antioksidativnoj aktivnosti.

2.2.3. BIORASPOLOŽIVOST KOMPONENATA ČAJA

Da bi se postiglo potpuno razumevanje mogućih uticaja flavonoida iz čaja na žive organizme, bitno je obratiti pažnju na njihovu bioraspoloživost uključujući i njihovu apsorpciju, raspodelu, metabolizam i eliminaciju. Za razliku od čistih flavonola, njihovi glikozidi se veoma brzo apsorbuju, pogotovo u ljudskom organizmu. Verovatan razlog ove pojave je aktivni transport glukoze u tankom crevu. Katehini i njihovi kondenzacioni produkti iz crnog čaja se dobro apsorbuju. Prolaze kroz glukuronizaciju, sulfataciju i O-metoksilaciju u jetri. U debelom crevu, bakterije raskidaju prstenove stvarajući valerolaktone, polipropionsku i benzoevu kiselinu. Polifenoli poseduju jak afinitet prema proteinima preko različitih fenolnih grupa, naročito kada proteini imaju visok sadržaj prolina, što je slučaj u kazeinu, želatinu i proteinima pljuvačke. Ipak, dodatak mleka u čaj ne utiče na koncentraciju polifenola u plazmi. Flavonoidi čaja imaju i jak afinitet prema gvožđu, s kojim formiraju nerastvorne komplekse, čime se smanjuje bioraspoloživost nehem gvožđa. Međutim, vitamin C inhibira formiranje ovih kompleksa. Ovo je veoma važna činjenica, pogotovo za ljude koji su vegetarijanci (Dufresne, Farnworth, 2000).

2.3. ANTIOKSIDANTI

Antioksidanti su jedinjenja koja usporavaju ili sprečavaju redoks reakcije. Mogu da deluju u svim fazama reakcija slobodnih radikala. Prema poreklu mogu biti prirodni i sintetski. Delovanje antioksidanata može da se zasniva na sprečavanju nastajanja novih slobodnih radikala, kao i na uklanjanju (hvatanju) već stvorenih slobodnih radikala. U najpoznatije antioksidante koji sprečavaju nastajanje slobodnih radikala spadaju sledeći enzimi:

- superoksid-dismutaza (SOD)-razgrađuje superoksid-anjon radikal,
- glutation-peroksidaza (GPx)-redukuje vodonik-peroksid i hidroperokside masnih kiselina, i
- katalaza (CAT)-katalizuje razgradnju vodonik-peroksida na kiseonik i vodu.

Prema novijim podacima (Xu i sar., 2002), glukoza-6-fosfat dehidrogenaza, prvi enzim u metaboličkom putu pentoze fosfata, inače široko rasprostranjen u prirodi, je deo antioksidantnog enzimskog sistema koji igra važnu ulogu u zaštiti tkiva od razornog dejstva kiseoničnih slobodnih radikala.

Antioksidanti koji uklanjaju stvorene slobodne radikale, predstavljaju hvatače ili skevindžere (eng. scavenger) slobodnih radikala i najpoznatiji su vitamini (C, E, A, B₂, B₆), flavonoidi, katehini, tanini i terpeni (Djilas et al., 2002). Za antioksidativnu aktivnost ovih grupa jedinjenja odgovorna je njihova hemijska struktura, kojom značajno smanjuju reaktivnost slobodnih radikala.

O antioksidativnom delovanju flavonioda i katehina bilo je reči u poglavlju 2.2.2.

2.3.1. ANTIOKSIDANTNI VITAMINI

Prema klasifikaciji Nacionalnog zdravstvenog instituta (eng. National Institute of Health), ureda za zvaničnu alternativnu medicinu (eng. Office Alternative Medicine) u SAD-u, tretman antioksidantima spada u jedan od pet farmakoloških i bioloških tretmana (Bloch, 2000). Pri tome su, u funkciji antioksidanata, vitamini našli svoje važno mesto.

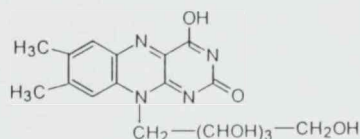
Megadoze antioksidanata-vitamina u nekim okolnostima umanjuju neželjene efekte tokom terapije citostaticima. Pokazalo se da su neke pojave, kao što su bol, anemija i gubitak apetita u mnogome ublažene. Preliminarna istraživanja su pokazala da terapija smešom četiri vitamina (C, A, E i retinolna kiselina) može poboljšati učinak terapije na humani melanom. Takođe je otkriveno da multipli antioksidativni dodaci ishrani, zajedno sa promenom načina života i dijetom, mogu unaprediti uspešnost standardnih i eksperimentalnih terapija kancera (Bloch, 2000).

Prema najnovijim rezultatima istraživanja američkih hirurga (Nathens i sar., 2002), davanje vitamina C i E kritično bolesnim pacijentima nakon operativnog zahvata smanjuje rizik od zastoja organa, povećava efikasnost ventilacije pluća aparatima i skraćuje dužinu intenzivne nege u jedinicama intenzivnog lečenja. Oksidativni stres povezan je sa razvojem sindroma akutnog respiratornog distresa, zastoja organa i aktivacije gena odgovornih za

upalne prosece. Uz to, smanjenje endogenih antoksidanata povezano je s povećanjem rizika prema različitim infekcijama. U studiji koja je obuhvatila 595 pacijenata, pokazalo se da je, kod onih koji su posle operacije lečeni antioksidativnim suplementima α -tokoferola i askorbata, znatno smanjeno vreme mehaničke potpore disanju i boravka u jedinicama intenzivne nege.

Kako je vitamin E, u napitku od čajne gljive, detektovan samo u tragovima, a vitamin A nije detektovan, neće biti predmet daljeg razmatranja. Iz ove grupe jedinjenja će detaljnije biti opisani samo vitamini B₂, B₆ i C, koji su obavezni konstituenti napitka.

2.3.1.1. VITAMIN B₂



Slika 6. Vitamin B₂

Izvor vitamina B₂ (riboflavina) za čoveka su prehrambeni proizvodi i, delimično, intestinalna bakterioflora. Džigerica, bubreg, meso, žumance, mleko, tvrdi sir i cerealijske su bogati riboflavinom. Manje je zastupljen u proizvodima od povrća. Preporučena dnevna doza vitamina B₂ za odraslog čoveka od 1,2 do 1,7 mg (Stroev, 1989; Chaney, 1997).

U hrani je riboflavin uglavnom deo flavin mononukleotida (FMN) i flavin adenin dinukleotida (FAD). Dejstvom digestivnih enzima, riboflavin se oslobađa i prostom difuzijom apsorbuje u tankom crevu. Nakon usvajanja od strane mukoze i drugih tkiva koristi se za biosintezu FMN i FAD. Ovi koenzimi su konstituenti flavin enzima (Stroev, 1989).

Flavin koenzimi imaju ulogu u brojnim reakcijama oksidacije supstrata u ćeliji, kao što su transfer elektrona i protona u respiratornom lancu, mitohondrijska oksidacija piruvata, sukcinata, 2-oksoglutarata, α -glicerol fosfata, masnih kiselina, biogenih amina, aldehida i dr.

Pošto riboflavin učestvuje u oksidativnim procesima, od kojih su mnogi energogenerišući, lako se može utvrditi razlog zbog kojeg nedostatak ovog vitamina uglavnom utiče na regenerativna tkiva (Stroev, 1989). Avitainoza B₂ se manifestuje sniženom koncentracijom koenzimskih riboflavinskih formi, naročito FMN. Relevantni simptomi su takođe lezije epitela mukoze kože i rožnjače. Poznati su i isušenost mukoze

usta i usne šupljine. Mukoza usta je crvene boje, a usne i uglovi usta su često ispucali. Koža, pogotovo koža lica, je deskvamativna zbog smanjenog obnavljanja epitela. Sluzokoža oka je suva i upaljena, a rožnjača crvena. Pacijenti često pate od fotofobije (Stroev, 1989).

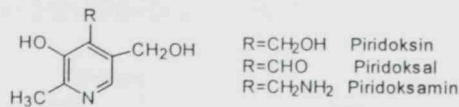
Za vitamin B₂ se smatra da je, uz vitamine A i C, jedan od najznačajnijih agenasa za protekciju od kancera debelog creva (La Vecchia i sar., 2001). Naučno-istraživačka studija rađena na Kubi je pokazala znatno niži status ovog vitamina kod aktivnih pušača, te je preporučen njegov dodatan unos putem ishrane (Barnouin i sar., 2000). U Indiji je sprovedena studija sa decom, koja su patila od bolesti izazvanih oksidativnim stresom, a lečena su steroidima. Pokazalo se da je nakon ovakve terapije aktivnost riboflavina u eritrocitima značajno smanjena, te da pojačane doze ovog jedinjenja mogu povoljno da utiču na pacijente (Mathew i sar., 2002).

Postoje različite pretpostavke mehanizma antioksidativnog dejstva vitamina B₂. Jedna od njih je da on ima funkciju kofaktora glutation reduktaze, koja održava glutation u redukovanom stanju, te se u tom kontekstu posmatra kao indirektni antioksidativni vitamin (Bohles, 1997). Osim toga, smatra se da oksidovani oblik riboflavina ima efikasnu interakciju sa organskim slobodnim radikalima i superoksid-anjon radikalima, prilikom koje se stvara leuko oblik. Ova forma se mnogo lakše oksiduje vazдушnim kiseonikom ili gvožđe(III)-oblikom hemoglobina i citohroma c, i mogu nastati riboflavin i vodonik-peroksid ili gvožđe(II)-oblici proteina koji sadrže hem. Redoks reakcije u prisustvu vitamina B₂, organskih slobodnih radikala, kiseonika i gvožđe(III)-oblika proteina koji sadrže hem, sugerišu da riboflavin igra ulogu antioksidanta u organizmu. Pretpostavljeno je da usled interakcije sa superoksid-anjon radikalima, riboflavin stabilizuje nivo azot(II)-oksida u organizmu, i to u uslovima povećanog stvaranja superoksid-anjon radikala i snižene aktivnosti superoksid-dismutaze (Stepuro i sar., 2002).

2.3.1.2. VITAMIN B₆

Izvori vitamina B₆ (piridoksina) za čoveka su intestinalne bakterije i hrana, u koju spadaju cerealije, leguminoze, meso i riba (Stroev, 1989).

Vitamin B₆ je u hrani prisutan kao piridoksin, piridoksamin ili piridoksal (Slika 7), i to slobodan ili vezan za fosfate, proteine ili aminokiseline.

Slika 7. Vitamin B₆

Sva tri oblika se u telu efikasno konvertuju u piridoksal 5-fosfat, koji je neophodan za sintezu, katabolizam i interkonverziju aminokiselina. Piridoksal 5-fosfat je esencijalan za produkciju energije iz aminokiselina i može se razmatrati kao vitamin koji oslobađa energiju. Vitamin B₆ je takođe neophodan za sintezu neurotransmitera serotonina i norepinefrina, kao i za sintezu sfingolipida neophodnih za nastanak mijelina. Stoga manji nedostatak ovog vitamina često ima za posledicu iritabilnost, nervozu i depresiju. Piridoksal 5-fosfat je potreban i za sintezu Δ-aminolevulinske kiseline, koja je prekursor hema. Ponekad nedostatak vitamina B₆ prouzrokuje srpastu anemiju. To je karakteristična mikrocitozna anemija, vidljiva u prisustvu visokog sadržaja gvožđa u serumu. Biološka studija o ljudskoj krvi je pokazala da, prilikom oksidativnog oštećenja, piridoksin pokazuje veoma veliku zaštitnu ulogu, čak oko tri puta veću u poređenju sa vitaminom C (Stocker i sar., 2003). Za vitamin B₆ se još smatra da utiče na jačanje imuno sistema kod AIDS pacijenata (Liang i sar., 1996).

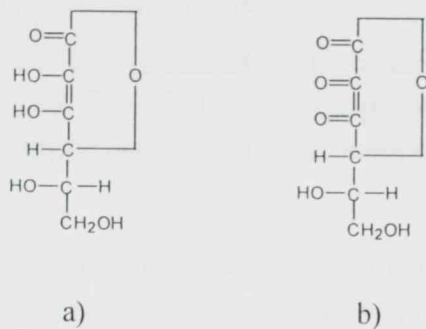
Piridoksal 5-fosfat je takođe neophodan kao sastojak glikogen fosforilaze. Kovalentno je vezan za lizin, čime stabilizuje ovaj enzim. Ovom ulogom vitamina B₆ se može objasniti slabija tolerancija na glukozu. Ovaj vitamin je potreban i za konverziju homocisteina u cistein, što je veoma važno, jer je poznato da hiperhomocisteinemija može biti rizičan faktor za kardiovaskularne bolesti. Piridoksal 5-fosfat je jedan od kofaktora, neophodnih za konverziju triptofana u nikotinamid adenin dinukleotid (NAD) (Chaney, 1997).

Dnevne potrebe odraslog čoveka za vitaminom B₆ iznose od 1,4 do 2,0 mg dnevno, pri čemu treba naglasiti da su ove potrebne vrednosti veće tokom trudnoće i laktacije. Takođe, sa starenjem rasti i potrebe za ovim vitaminom (Chaney, 1997).

2.3.1.3. VITAMIN C

Namirnice bogate vitaminom C (L-askorbinskom kiselinom) su sveže voće i povrće. Posebno se izdvaja plod nara (Stroev, 1989).

Vitamin C je lakton 2-keto L-gulonske kiseline (Slika 8).



Slika 8. Vitamin C

a) L-askorbinska kiselina

b) L-dehidroaskorbinska kiselina

Glavna biološka uloga vitamina C ogleda se u tome da je on redukcionni agens u nekoliko važnih reakcija hidroksilacije u organizmu. Učestvuje u hidroksilaciji lizina i prolina u protokolagen. Bez ove reakcije, protokolagen se ne može pravilno umrežiti u normalna vlakna kolagena. Zbog toga je vitamin C neophodan za održavanje vezivnog tkiva i za zarastanje rana. Bitan je i za formiranje kostiju, pošto tkivo kostiju poseduje i organski matriks koji sadrži kolagen. Pošto je kolagen komponenta koja učestvuje u formiranju zidova kapilara, može se reći da je nedostatak vitamina C u direktnoj vezi sa krtošću kapilara (Chaney, 1997).

Vitamin C se koncentriše u nadbubrežnoj žlezdi, naročito tokom stresa, a može učestvovati i u reakcijama hidroksilacije tokom sinteze nekih kortikosteroida. L-askorbinska kiselina poseduje i druge važne osobine, koje nisu u vezi sa enzimskom hidroksilacijom. Na primer, pomaže apsorpciju jona gvožđa redukujući ga, u želucu, u gvožđe(II)-oblik; štiti vitamin A, vitamin E i neke B vitamine od oksidacije; pospešuje iskorišćenje folne kiseline i, što je najvažnije, vitamin C je veoma biološki važan antioksidant. Smatra se da antioksidanti, kao što su β -karoten i vitamin C, a unose se ishranom, snižavaju rizik od kancera (Chaney, 1997). Eksperimenti su pokazali da i u većim količinama, u prisustvu jona gvožđa ili bakra i vodonik-peroksida, askorbinska kiselina deluje kao antioksidant koji sprečava lipidnu peroksidaciju i ne stimuliše oksidaciju proteina u humanoj plazmi *in vitro* (Suh i sar., 2003). Tokom jednog atletskog takmičenja, dakle sa ljudima izloženim ekstremnim fizičkim naporima, sprovedena su istraživanja gde je praćena zavisnost između količine unetog vitamina C i njegovog nivoa u plazmi. U grupi koja je dobijala veći dozu vitamina C, analiza plazme nakon nadmetanja je pokazala povećanu aktivnost katalaze ertirocita, kao i glutation peroksidaze. Ovi rezultati bi mogli da sugerišu veoma važnu ulogu askorbata u plazmi, onosno da se povećanim dnevnim unosom askorbata putem ishrane, u cilju odbrane protiv oksidativnog stresa

izazvanog vežbanjem ili nekim drugim fizičkim opterećenjima, realno mogu izbeći negativni efekti na integritet eritrocita (Tauler i sar., 2003).

Simptomi izazvani nedostatkom vitamina C su uglavnom direktno povezani sa njegovom metaboličkom ulogom. Posledice su krtost kapilara, slabljenje imuno sistema i skorbut. Skorbut je praćen sporijim zarastanjem rana, osteoporozom i anemijom (Chaney, 1997).

Često se dešava i da pored unete dovoljne količine vitamina C, njegovo iskorišćenje nije adekvatno. To je uglavnom posledica stresa. Takođe, pušenje prouzrokuje niži nivo vitamina C u serumu. Zbog toga je preporučena dnevna doza ovog vitamina za pušače, sa uobičajenih 60 mg dnevno, povećana na 100 mg. Aspirin, oralna kontraceptivna sredstva i kortikosteroidi snižavaju efikasnost L-askorbinske kiseline u organizmu, pa se i u ovim slučajevima preporučuje povećana dnevna doza.

2.4. SLOBODNI RADIKALI

Slobodni radikali su atomi, joni, molekuli ili druge molekulske vrste, koje sadrže nesparene elektrone. Nespareni elektron se može nalaziti na ugljenikovom atomu, kao kod alkil-radikala, na kiseonikovom atomu, kao kod alkoksi-, hidroksi-, peroksi-, superoksid-anjon-radikala, ili na atomu sumpora, kao kod tiil- radikala i dr. Nespareni elektron mogu imati i atomi halogena, alkalnih metala i joni nekih drugih metala.

Radikal-joni su molekulske vrste koje nastaju prelaskom samo jednog elektrona na neutralni molekul ili oduzimanjem samo jednog elektrona od neutralnog molekula. Ove molekulske vrste nose istovremeno i naelektrisanje i nespareni elektron (Čanadanović-Brunet, 1997).



Postoji nekoliko procesa nastajanja slobodnih radikala, a to su:

- homolitičko raskidanje veze unutar molekula,
- oksido-redukcione reakcije,
- termoliza,
- fotoliza,
- radioliza,
- prenos jednog elektrona sa jona prelaznog metala na organski molekul,

- dejstvo ozona, azot(IV)-oksida ili singlet kiseonika i
- *in vivo* enzimski procesi nastajanja slobodnih radikala.

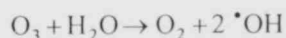
Prema relativnoj stabilnosti, slobodni radikali su podeljeni na nepostojane i postojeane. Stabilnost slobodnih radikala je termodinamička karakteristika, koja zavisi od sposobnosti ostalog dela molekula da stabilizuje nespareni elektron. Glavni faktori koji utiču na stabilnost slobodnih radikala su delokalizacija i sterni efekat. Delokalizacija nesparenog spina povećava stabilnost radikala i omogućava reakciju preko više različitih položaja. Vreme života radikala zavisi i od sternog zaklanjanja centra radikala, od strane velikih supstituisanih grupa, koje se nalaze u okolini i ometaju radikal-radikal reakcije i reakcije sa nekim supstratom. Utvrđeno je da je sterni efekat, kao faktor stabilnosti radikala, važniji od efekta delokalizacije (Čanadanović-Brunet, 1997).

Slobodni radikali su visoko potencijalne oksidativne vrste, koje reaguju sa velikim brojem organskih jedinjenja u hemijskim i biološkim sistemima, smanjuju nutritivnu vrednost prehrambenih proizvoda i oštećuju ćelije tkiva živih organizama, uz iniciranje mutagenih i kancerogenih procesa u njima. Do štetnog delovanja slobodnih radikala u organizmu dolazi usled slabljenja kontrolnih mehanizama, što dovodi do niza negativnih promena u ćelijama, kao što je hidrosilacija purinskih i pirimidinskih baza DNK, peroksidacija lipidnih membrana i oksidacija tiolnih grupa enzima i proteina (Čanadanović-Brunet, 1997).

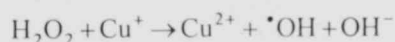
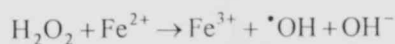
2.4.1. HIDROKSI-RADIKALI

Hidroksi-radikali mogu nastati:

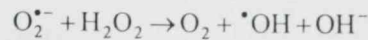
- homolitičkim raskidanjem O-O veze u molekulu vodonik-peroksida, pod dejstvom toplote, jonizujućeg zračenja i UV svetlosti,
- reakcijom ozona i vode u alkalnoj sredini



- reakcijom vodonik-peroksida sa bakar(II)- i gvožđe(II)-jonima (Fentonova reakcija)



- reakcijom vodonik-peroksida sa superoksid-anjon-radikalima (Haber-Weissova reakcija), koja se višestruko ubrzava u prisustvu gvožđe(III)-jona kao katalizatora



Neki autori smatraju da u toku Fentonove reakcije, pre nastajanja hidroksi-radikala, nastaje intermedijer feril, u kome gvožđe ima oksidacioni broj +4 (Čanadanović-Brunet, 1997):



Inhibicija reaktivnih hidroksi-radikala, koji u većini slučajeva nastaju mehanizmima Fentonove i Haber-Weiss-ove reakcije, moguća je u prisustvu:

- superoksid-dismutaze,
- helata kod kojih je veza između gvožđa i polidentatnih liganada teško raskidiva,
- enzima ili drugih molekula koji uklanjaju vodonik-peroksid i
- hvatača (skevindžera) hidroksi-radikala.

Treba naglasiti da inhibicija Fentonove i Haber-Weiss-ove reakcije zavisi od karakteristika ispitivanih model, prirodnih, hemijskih ili bioloških sistema, koji omogućavaju nastajanje hidroksi-radikala, kao i od pH vrednosti reakcionih sredina i primenjene metode za detekciju hidroksi-radikala (Čanadanović-Brunet, 1997).

Prema klasifikaciji, postoje tri osnovna tipa reakcija hidroksi-radikala:

- izdvajanje vodonika (na pr., reakcija hidroksi-radikala sa alkoholima)
- adicija (na pr., na purinske i pirimidinske baze DNK) i
- prenos elektrona u reakcijama sa organskim i neorganskim jedinjenjima (na pr., sa hloridnim jonom)

Ovim reakcijama, u biološkim sistemima, najčešće nastaju slobodni radikali, koji su manje reaktivni od hidroksi-radikala, ali su i oni štetni za žive organizme. Hidroksi-radikali su najreaktivnija hemijska vrsta i reaguju sa skoro svim molekulskim vrstama u živim organizmima: šećerima, aminokiselinama, fosfolipidima, nukleotidima i organskim kiselinama (Čanadanović-Brunet, 1997).

2.4.2. ELEKTRON SPIN REZONANTNA SPEKTROSKOPIJA

Elektron spin rezonantna (ESR) tehnika je jedina instrumentalna metoda za direktno određivanje slobodnih radikala. Ova metoda u kombinaciji sa "spin-trap" tehnikom je primenljiva u svim živim sistemima, kao i u prehrambenim proizvodima. Zasniva se na rezonantnoj apsorpciji elektromagnetnog zračenja od strane nesparenih elektrona u homogenom magnetnom polju. Ova metoda se često naziva i elektron paramagnetna rezonancija (EPR), jer se njome mogu ispitivati samo paramagnetne supstance, tj. supstance koje sadrže atome, jone ili molekule sa nesparenim elektronima. Takođe, ESR spektroskopija se koristi u fizici, hemiji, biologiji i medicini. U biologiji se ESR spektroskopija koristi za detekciju slobodnih radikala nastalih fotohemijским ili radiolitičkim putem, za ispitivanje enzimskih reakcija, fotosinteze, metalo-enzima, flavo-proteina i mikroorganizama. U medicini se ESR spektroskopija primenjuje za ispitivanje kancerogeneze, krvi, živih tkiva i dr. U hemiji slobodnih radikala, ESR predstavlja osnovnu eksperimentalnu tehniku za ispitivanje oksido-redukcija, biradikalskih i triplet stanja molekula, strukture i reakcija polimera, kao i mehanizama organskih reakcija slobodnih radikala (Čanadanović-Brunet, 1998).

ESR spektar je prvi izvod apsorbovane mikrotalasne energije u zavisnosti od jačine primenjenog magnetnog polja. Za interpretaciju ESR apsorpcione linije spektra, u cilju dobijanja informacija o posmatranom sistemu, bitne su sledeće karakteristike:

1. položaj apsorpcione linije,
2. intenzitet apsorpcione linije,
3. širina apsorpcione linije,
4. oblik apsorpcione linije i
5. broj linija i njihovo razdvajanje, odnosno hiperfina struktura apsorpcione linije.

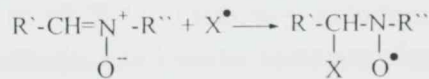
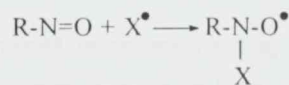
U praksi je utvrđeno da se zadovoljavajući ESR spektri mogu dobiti ako se koristi magnetno polje čija je jačina veličine od 10 do 100 G, pri čemu je neophodno korišćenje elektromagnetnog zračenja iz mikrotalasnog dela spektra. Zbog praktičnih ograničenja u radu sa mikrotalasnim zračenjima, prilikom snimanja ESR spektra fiksira se frekvencija mikrotalasnog zračenja i prati se njegova apsorpcija u funkciji jačine primenjenog magnetnog polja. Većina komercijalnih ESR spektrometara koristi mikrotalasno zračenje X-trake, čija je nominalna vrednost 9,5 GHz, jer se time postiže zadovoljavajući kompromis između osetljivosti, spektralne rezolucije, veličine uzorka koji se može koristiti i cene tehničkih rešenja koja se primenjuju u konstrukciji instrumenata. Ovoj frekvenciji

zračenja za g -vrednost (spektroskopski faktor cepanja) slobodnog elektrona odgovara jačina magnetnog polja od oko 34 G (Čanadanović-Brunet, 1998).

2.4.2.1. ESR I "SPIN-TRAP" METODA

ESR spektroskopija je izuzetno osetljiva metoda, kojom mogu da detektuju koncentracije slobodnih radikala i niže od 10^{-10} mol/l, pod uslovom da se radikali zadrže u ispitivanom sistemu onoliko vremena koliko je potrebno da se detektuju. Za analiziranje nestabilnih slobodnih radikala primenjuje se "spin-trap" (hvatanje radikala) metoda. Dodavanjem određenih organskih jedinjenja, "spin-trap" reagenasa (hvatača radikala), u sistem sa prisutnim reaktivnim radikalima, reakcijom nastaju relativno stabilni radikali pogodni za detekciju ESR spektroskopijom (Čanadanović-Brunet, 1998).

Reakcijom nitrozo-jedinjenja ili nitrona sa reaktivnim radikalima (X^\bullet), dobijaju se nitroksid-radikali sa relativno dugim vremenom života. Na primer:



U praksi se najčešće koriste sledeći "spin-trap" reagensi: *tert*-Nitrozobutan (tNB); *N-tert*-Butil- α -fenilnitron (PBN); 5,5-Dimetilpirolin-N-oksid (DMPO); 2,4,6-Tri-*tert*-butil-nitrozobenzon (BNB) i α -(4-Piridil-1-oksid)-*N-tert*-butilnitron (4-POBN).

3. MATERIJAL I METODI RADA

3.1. KULTIVACIJA ČAJNE GLJIVE

Čajna gljiva poreklom iz Rusije, čiji je mikrobiološki sastav kompleksan i sastoji se od više izolata kvasaca i bakterija (Markov i sar., 2001), je paralelno kultivisana na dva različita supstrata:

- vodeni ekstrakt crnog čaja (1,5 g/L), dobavljača "Adonis", Jagodina, zaslađen saharozom (70 g/L),
- vodeni ekstrakt zelenog čaja (1,5 g/L), Milford Grüner Tee, China Green, zaslađen saharozom (70 g/L)

Priprema supstrata za kultivaciju čajne gljive je ranije detaljno opisana (Sievers i sar., 1995; Lončar i sar., 2000).

Da bi se postigla reproduktivnost pripreme čajnog ekstrakta, listovi čaja, kako crnog, tako i zelenog, su samleveni u električnom mlinu. Prosejavanjem je određen srednji prečnik, koji je kod listova crnog čaja iznosio 0,2132 mm, a kod zelenog 0,2044 mm.

Supstrati su zasejavani sa 10 % (v/v) nativnog inokuluma lokalne, domaće kombuhe, uzetog nakon 7 dana fermentacije, kao i starter kulturama formiranim od izolata kvasaca i bakterija iz iste lokalne, domaće kombuhe. Izolati mikroorganizama se čuvaju na predmetu Mikrobiologija, Tehnološkog fakulteta u Novom Sadu.

Starter kulture su pripremljene od kvasaca *Torulopsis sp.*, *Saccharomyces bisporus*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Zygosaccharomyces sp.*, *Saccharomycodes ludwigii* i mešane kulture sirćetnih bakterija, i to tako da su kombinovani jedan kvasac i mešana kultura sirćetnih bakterija. Na taj način je formirano pet različitih starter kultura. Prilikom pripreme inokuluma starter kultura, inicijalna koncentracija kvasca i mešane kulture sirćetnih bakterija iznosila je oko $5,8 \cdot 10^4$ ćelija/mL supstrata.

Fermentacija, na 28°C, je trajala 10 dana, a uzorci su uzimani u isto vreme trećeg, sedmog i desetog dana. Neinokulirani supstrati su nazvani "nultim" uzorcima.

3.2. METODI ANALIZE

3.2.1. ODREĐIVANJE OSNOVNIH PARAMETARA METABOLIČKE AKTIVNOSTI ČAJNE GLJIVE

Vrednost pH fermentativnih tečnosti merena je električnim pH metrom.

Sadržaj D-glukoze i D-fruktoze je određen enzimskim testom po Boehringeru (Cat. No. 139106). Određivanje sadržaja D-glukoze se zasniva na merenju apsorpcije redukovanog oblika nikotinamid adenin dinukleotid fosfata (NADPH) (340 nm), nastalog u reakciji između D-glukoze i enzima glukoza-6-fosfat-dehidrogenaza, a sadržaja D-fruktoze na merenju apsorpcije NADPH (340 nm), nastalog u reakciji između D-fruktoze i enzima fosfoglukoza-izomeraza.

Sadržaj saharoze je dobijen računskim putem, nakon merenja sadržaja D-glukoze i D-fruktoze nastalih enzimskom hidrolizom.

Glukuronska kiselina je određena metodom po Niru (1964), zasnovanom na merenju apsorpcije ružičaste boje (580 nm), koja se stvara u reakciji između glukuronske kiseline i naftolrezorcinola.

L-mlečna kiselina je određena spektrofotometrijski (340 nm) preko redukovanog oblika nikotinamid adenin dinukleotida ($\text{NADH}+\text{H}^+$), koji nastaje redukcijom NAD^+ pri oksidaciji L-mlečne u pirogroždanu kiselinu (Boehringer, Mannheim, Cat. No. 138084).

Limunska kiselina je određena enzimskim testom, Boehringer, Mannheim (Cat. No. 139076), koji je zasnovan na sledećim principima: limunska kiselina se konvertuje u oksalacetat i acetat u reakciji katalizovanoj enzimom citrat liaza. U prisustvu enzima L-malat-dehidrogenaza i L-laktat-dehidrogenaza, oksalacetat i piruvat kao njegov produkt dekarboksilacije se redukuju u L-malat i L-laktat, respektivno, pomoću redukovanog nikotinamid adenin dinukleotida (NADH). Količina stvorenog NADH je stehiometrijski ekvivalentna količini citrata u uzorku. Meri se apsorpcija NADH, na 340 nm.

Enzimski testovi izvedeni su striktno prema uputstvu proizvođača, a spektrofotometrijska merenja su urađena na UV-VIS uređaju Hewlett Packard.

Sadržaj ukupnih kiselina je određen titracijom toplog uzorka fermentativne tečnosti (oko 70 °C) rastvorom natrijum-hidroksida, koncentracije 0,09551 mol/L, uz fenolftalein kao indikator (OIV, 1990).

Isparljive kiseline su destilovane vodenom parom, a zatim određene titracijom natrijum-hidroksidom, uz indikator fenolftalein (OIV, 1990).

Organske kiseline (jabučna, vinska, limunska, glukuronska, mlečna) su analizirane hromatografijom na tankom sloju (eng. Thin layer chromatography, TLC). Nepokretna faza je bila celuloza MN 300 (Serva, Heidelberg, Germany), u sistemu rastvarača etanol-cc amonijak-voda (16:1:3, v/v), uz dodatak 3% piridina i 0,05% indikatora bromfenol plavo (Hais, Macek, 1959).

Prirodna aromatična jedinjenja su analizirana hromatografijom na tankom sloju mikrokristalinične celuloze (Avicel, Merck, Darmstadt, Germany) sa pokretnom fazom etil-acetat : mravlja kiselina : sirćetna kiselina : voda (100:11:11:26, v/v). Mrlje su identifikovane posmatranjem ploča u UV komori na 254 nm, kao i prskanjem ploča 1%-nim rastvorom gvožđe(III)-hlorida u etanolu (Ahrem, Kuznecova, 1976, Exarchou i sar., 2002).

Masa celulozne opne-biomasa je merena na tehničkoj vagi, nakon sušenja opne filter hartijom.

3.2.2. ANALIZA VITAMINA U NAPICIMA OD ČAJNE GLJIVE

Sadržaj **vitamina C** je određen enzimskim testom po Boehringeru, Mannheim (Cat. No. 0409677). Određivanje se zasniva na redukciji tetrazolijumove soli MTT (3-(4,5-dimetiltiazolil-2)-2,5-difeniltetrazolijum bromid) od strane vitamina C, u prisustvu prenosioca elektrona 5-metilfenazinijum metil sulfata (PMS) na pH 3,5, u MTT-formazan. Merena je apsorbancija MTT-formazana, 578 nm (instrument Hewlett Packard).

Vitamini B₂ i B₆ su analizirani tečnom hromatografijom pod visokim pritiskom (eng. High performance liquid chromatography, HPLC), na uređaju Shimadzu-Japan sa softverskom podrškom istog proizvođača. Uzorci su za analizu pripremani propuštanjem kroz hidrofilni membranski filter, prečnika pora 20 µm. Sve analize su rađene na sobnoj temperaturi.

	B ₂	B ₆
Kolona	NOVA-PAK™ (Waters-USA) 100x8 mm, prečnik 10 μm	NOVA-PAK™ (Waters-USA) 100x8 mm, prečnik 10 μm
Cartridge	RP-Radial PAK™	RP-Radial PAK™
Pokretna faza	Amonijum-acetat (5 mmol/L) + metanol, 770 + 300, pH 3	Pentansulfonska kiselina (5 mmol/L) u 20% metanolu
Protok (mL/min)	2	1
Zapremina petlje (μL)	20	20
Detektor	Fluorescentni RF-535	Fluorescentni RF-535
Talasna dužina ekscitacije (nm)	450	286
Talasna dužina emisije (nm)	530	392

3.2.3. ESR ANALIZA SLOBODNIH RADIKALA U NAPICIMA OD ČAJNE GLJIVE

Antioksidativna aktivnost napitaka od čajne gljive ispitana je ESR spektroskopskom analizom njihovog uticaja na formiranje i transformaciju dve vrste slobodnih radikala, reaktivnih hidroksi- i stabilnih 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) radikala. ESR spektri u svim ispitivanim model sistemima snimani su na ESR spektrometru Bruker 300 E (Rheinstetten, Karlsruhe, Nemačka), mikrotalasnog zračenja nominalne frekvencije 9,5 GHz (X-traka).

Reaktivni hidroksi-radikali su analizirani u rastvoru dobijenom mešanjem 0,2 mL 5,5-dimetilpirolin-N-oksida (DMPO), koncentracije 0,3 mol/L; 0,2 mL vodonik-peroksida, koncentracije 10 mmol/L; 0,2 mL gvožđe(II)-jona, koncentracije 10 mmol/L i 0,2 mL crnog ili zelenog čaja ("nulti" uzorci). Smeša je intenzivno mešana u toku 5 minuta i prenetu u kvarcnu ESR kivetu za vodene rastvore (ER-160-FC). ESR spektri su snimani na sobnoj temperaturi, pri sledećim uslovima:

-frekvencija modulacije	100 KHz,
-amplituda modulacije	0,512 G,
-vremenska konstanta	81,92 ms,
-vremenski opseg merenja	163,84 ms,
-centar polja	3440 G,
-ukupan opseg merenja	100 G,
-frekvencija mikrotalasnog područja	9,64 GHz,
-snaga mikrotalasnog područja	20 mW i
-temperatura	20°C.

Da bi se utvrdio uticaj uzoraka fermentativne tečnosti čajne gljive na formiranje i transformaciju hidroksi-radikala, u već opisani model sistem je, umesto “nultih” uzoraka, dodavano 0,2 mL uzorka fermentativne tečnosti.

Antioksidativna ($AA_{\bullet\text{OH}}$) aktivnost definisana je kao:

$$AA_{\bullet\text{OH}} = \frac{h_0 - h_x}{h_0} \cdot 100[\%]$$

gde je:

h_0 -visina drugog pika ESR signala DMPO-OH, pre dodatka uzorka,

h_x -visina drugog pika ESR signala DMPO-OH, nakon dodatka uzorka.

Stabilni DPPH radikali su analizirani u rastvoru dobijenom mešanjem 200 μL metanola i 600 μL metanolnog rastvora DPPH koncentracije 0,4 mmol/L (slepa proba). Ovako dobijena smeša je intenzivno mešana u toku 2 minuta i prenetu u kvarenu ESR kivetu (ER-160-FC), a ESR spektri su snimani na sobnoj temperaturi, pri sledećim uslovima:

-frekvencija modulacije	100 KHz,
-amplituda modulacije	0,226 G,
-vremenska konstanta	40,96 ms,
-vremenski opseg merenja	671,089 ms,
-frekvencija mikrotalasnog područja	9,64 GHz.

Antioksidativna aktivnost fermentativnih tečnosti ispitana je ESR spektroskopskom analizom DPPH radikala pod istim eksperimentalnim uslovima, u rastvorima dobijenim mešanjem 100 μL fermentativne tečnosti, 100 μL metanola i 600 μL rastvora DPPH koncentracije 0,4 mol/L (proba).

Antioksidativna aktivnost (AA_{DPPH}) definisana je kao:

$$AA_{\text{DPPH}} = \frac{h_0 - h_x}{h_0} \cdot 100[\%]$$

gde je:

h_0 -visina drugog pika ESR signala DPPH radikala slepe probe,

h_x -visina drugog pika ESR signala DPPH radikala probe.

Kalibracija magnetnog polja i određivanje g-vrednosti su urađeni korišćenjem Fermi soli (peroksilamin-disulfonat). Konstante hiperfinog cepanja izračunate su direktnim merenjem ili na osnovu kompjuterski dobijenog drugog izvoda spektra, posle optimizacije odnosa signal/šum. Dobijeni ESR spektri poređeni su sa kompjuterski simuliranim spektrima.

4. REZULTATI I DISKUSIJA

4.1. KARAKTERIZACIJA NAPITKA OD ČAJNE GLJIVE

Da bi se okarakterisala fermentacija i napitak od čajne gljive, morala su se uraditi mnoga istraživanja. Pri tome je u većini eksperimenata urađena fermentacija čajne gljive na najčešće upotrebljavanom supstratu, crnom čaju zaslađenom saharozom, tokom 21 dana, na temperaturi od 28°C. Uzorci dobijeni nakon 7 dana fermentacije su u tekstu pominjani kao napitak, a ostali uzorci kao fermentativna tečnost. Neki od rezultata koji karakterišu napitak i fermentaciju čajne gljive, odnosno parametri fermentacije čajne gljive na crnom čaju zaslađenom saharozom, prikazani su u Tabeli 7.

Tabela 7. Parametri fermentacije čajne gljive na crnom čaju zaslađenom saharozom.

Vreme fermentacije (dani)	Glukoza (g/L)	Fruktoza (g/L)	GK* (g/L)	MK** (g/L)	UK*** (g/L)	IK**** (g/L)	pH	Biomasa (g)
0	0,03	0,03	0,068	0,00	0,07	0,03	6,65	-
3	6,38	3,57	0,132	0,02	2,63	1,37	3,40	1,54
7	8,44	6,93	0,280	0,26	5,99	3,31	3,34	4,20
10	13,04	7,11	0,236	0,25	9,77	5,16	3,25	4,74
14	13,59	5,62	0,260	0,27	14,10	8,20	3,06	5,32
21	12,45	5,33	0,258	0,29	22,04	12,56	2,94	6,27

*GK-glukuronska kiselina

**MK-mlečna kiselina

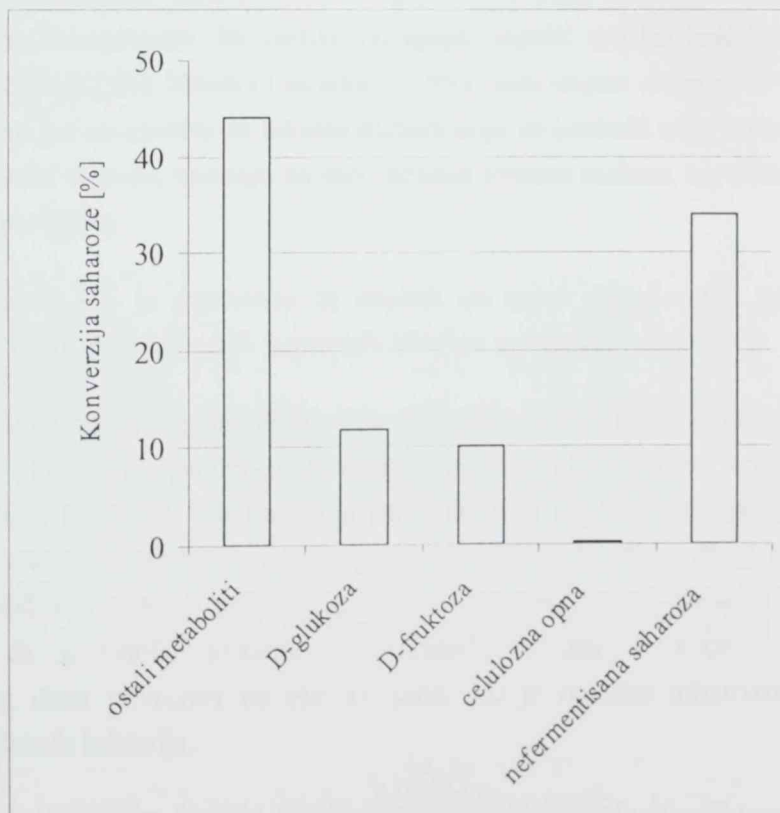
***UK-ukupne kiseline

****IK-isparljive kiseline

Osnovni izvor ugljenika za fermentaciju čajne gljive je saharoza i jedino je ona dodavana u supstrat, tako da se početni sadržaj glukoze i fruktoze od 0,03 g/L (Tabela 7)

može pripisati greški metode. Tokom fermentacije, za nastanak slobodne glukoze i fruktoze odgovoran je enzim invertaza i mogao bi se očekivati podjednak sadržaj i jednog i drugog monosaharida. Međutim, kako se vidi mikroorganizmi ih ne usvajaju podjednako. Očigledno je da korišćena kultura čajne gljive brže metabolizira fruktozu. Isto su pokazali i rezultati drugih autora (Sievers, 1995). Koji će monosaharid kombuha brže usvajati zavisi, prvenstveno, od tipa lokalne kulture.

Posmatrajući bilans iskorišćenja saharoze tokom fermentacije kombuhe, došlo se do interesantnih podataka (Malbaša i sar., 2002). Ako se akcenat stavi na sedmi dan fermentacije (slika 9), kada se napitak proizveden lokalnom, domaćom kombuhom, zbog senzornih karakteristika, preporučuje za konzumiranje, uočeno je da od 70 g/L saharoze ostaje nefermentisano 34,06%, da 11,74% otpada na D-glukoza, 9,99% na D-fruktozu, 0,12% na celuloznu plutajuću opnu, a 44,09% na ostale metabolite. Od tih ostalih metabolita, najveći udeo imaju organske kiseline, koje su veoma bitne za stabilnost i održivost napitka, dok je udeo drugih supstanci mnogo manji, ali je njihova važnost ogromna, bilo da se posmatraju antioksidativne karakteristike, bilo da su neke druge funkcije u pitanju.



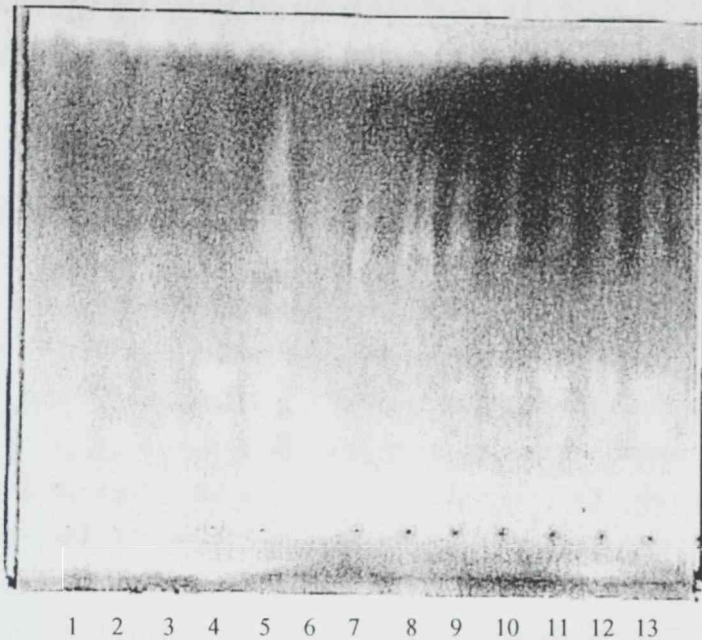
Slika 9. Bilans iskorišćenja saharoze tokom fermentacije čajne gljive na zaslađenom crnom čaju nakon 7 dana fermentacije

Sa fiziološkog stanovišta glukuronska kiselina je veoma bitna za čoveka, tako da njena biosinteza tokom fermentacije čajne gljive (0,280 g/L, sedmog dana fermentacije) u mnogome doprinosi farmakološkom dejstvu napitka (Lončar i sar., 2000). Potrebno je naglasiti da ona ireverzibilno vezuje metaboličke i toksine poreklom iz spoljne sredine i da se tako inhibirani toksini u vidu glukuronida ili konjugovanih glukuronskih kiselina izbacuju iz organizma putem urina. Ovaj proces je odgovoran za sprečavanje/lečenje gihta, reumatizma i artritisa (Kaufman, 1996). Postoje različiti podaci o kvalitetu i količini glukuronske kiseline u napitku od čajne gljive. Neki autori (Roussin, 1996; Greenwalt i sar., 2000) smatraju da čajna gljiva nema sposobnost biosinteze ove kiseline, dok su je neki detektovali u veoma niskim koncentracijama (Blanc, 1996). U poređenju sa rezultatima Blanca (1996), vrednosti sadržaja glukuronske kiseline prikazane u ovom radu su za oko 30 puta veće (Lončar i sar., 2000).

U fermentisanoj hrani se obično nalaze oba oblika mlečne kiseline, ali više L-mlečne kiseline, dok je kod kombuhe L- forma primarna (Kaufman, 1996). Kao što se iz tabele 7 vidi, sedmog dana fermentacije, sadržaj L-mlečne kiseline je 0,26 g/L, što bitno doprinosi kvalitetu proizvoda (Malbaša i sar., 2002). Reiss (1987) je pronašao kontinualan porast sadržaja mlečne kiseline tokom fermentacije, sa maksimalnom vrednošću od 2,9 g/L, nakon 14 dana fermentacije. Za razliku od njega, najviši sadržaj koji je izmerio Blanc (1996) bio je 0,6 g/L, dok Sievers i saradnici (1995) nisu uopšte detektovali bilo koji oblik mlečne kiseline, jer su utvrdili da lokalna kultura koju su koristili metabolizuje laktat. Ove razlike se, sasvim sigurno, baziraju na specifičnosti lokalne kulture, korišćene za pripremu napitka od čajne gljive.

U poglavlju 2.1.3. je pomenuto da napitak od čajne gljive sadrži brojne organske kiseline. TLC hromatogram nekih organskih kiselina prikazan je na slici 10.

Posmatranjem hromatograma (Slika 10), može se uočiti da primenjena lokalna, domaća kultura čajne gljive ima sposobnost biosinteze mlečne, glukuronske, limunske, vinske i jabučne kiseline. Međutim, kiselina koja preovlađuje u napitku od čajne gljive i čija je biosinteza dominantna tokom fermentacije jeste sirćetna kiselina. Zbog toga je sadržaj ukupnih i isparljivih kiselina, prikazan u tabeli 7, izražen kao g/L sirćetne kiseline. Može se primetiti da se sadržaj kiselina, kako isparljivih, tako i ukupnih, od trećeg do dvadesetprvog dana povećava za oko 10 puta, što je rezultat intenzivne metaboličke aktivnosti sirćetnih bakterija.



Slika 10. Hromatogram nekih organskih kiselina u uzorcima fermentativne tečnosti čajne gljive (Lončar i sar., 2000)

1-5: Standardi-jabučna, vinska, limunska, glukuronska i mlečna kiselina

6: Smeša standarda

7: Crni čaj

8-13: Fermentativna tečnost trećeg, sedmog, desetog, četrnaestog, sedamnaestog i dvadesetprvog dana

Kada se posmatra pH kao parametar fermentacije, uočava se da vrednost pH fermentativnih tečnosti opada tokom fermentacije. Najznačajnije promene izražene su do trećeg dana fermentacije, i to 3,25 pH jedinica. Nakon toga, do kraja fermentacije je ukupna promena za 0,46 pH jedinica. Ako se to poveže sa vrednostima sadržaja kiselina u istom periodu, vidi se da značajan porast njihove količine ne utiče značajno na pH. To ukazuje na činjenicu da se fermentativna tečnost čajne gljive nakon trećeg dana fermentacije ponaša kao pufer (Petrović i sar., 1999).

Inokulacija supstrata u eksperimentima, radena je fermentativnom tečnošću od prethodne kultivacije. U tabeli 7 je kao parametar fermentacije čajne gljive prikazan porast mase celulozne plutajuće opne, odnosno biomase koja se stvara tokom fermentacije, čime je pokazano da je *Acetobacter xylinum*, mikroorganizam koji stvara celulozu, aktivan i da mu aktivnost ne opada, tokom celog inkubacionog perioda. Iz rezultata se vidi da je biosinteza celuloze, koja je osnovna komponenta želatinozne opne, intenzivnija do sedmog dana fermentacije, nego u daljem toku procesa.

4.2. KARAKTERIZACIJA FERMENTATIVNIH TEČNOSTI DOBIJENIH SA RAZLIČITIM KULTURAMA ČAJNE GLJIVE

Prilikom pripreme i izbora uzoraka za ispitivanje antioksidativne aktivnosti napitka od čajne gljive, za fermentaciju je korišćen inokulum native kombuhe (u daljem tekstu kombuha), kao i pet starter kultura, formiranih od kvasaca i bakterija sirćetnog vrenja izolovanih iz native kombuhe. Fermentacija na temperaturi od 28°C je trajala 10 dana. Period duži od 10 dana nema praktičnog smisla, jer se nakon toga dobija napitak previše kiselog ukusa, koji nije senzorno prihvatljiv za konzumente. Nakon analize ukupne kiselosti napitaka proizvedenih pomoću starter kultura, za dalji rad su, uz kombuhu, odabrane dve starter kulture: kultura sa kvascem *Saccharomyces cerevisiae* (SK1) i sa kvascem *Zygosaccharomyces sp.* (SK2). Ove starter kulture kvasaca su izabrane, zbog toga što su, na različitim supstratima, verovatno odlučujuće doprinosile da se proizvedu napici sa najvišim (SK1), odnosno najnižim (SK2) sadržajem ukupnih kiselina. Ukupna kiselost, izražena preko sadržaja sirćetne kiseline, bila je kriterijum izbora uzoraka, odnosno starter kultura, zbog toga što sirćetna fermentacija, kako je već navedeno, karakteriše i klasifikuje napitak od čajne gljive. Osim toga, kiseline mogu efektom prezervacije da utiču na antioksidativne karakteristike prehrambenih proizvoda.

Rad sa starter kulturama ima tehnološku opravdanost, zbog mogućnosti podešavanja ujednačenog broja mikroorganizama u inokulumu prilikom ponovljenih fermentacija i dobijanja napitka standardnog kvaliteta. To je, između ostalog, i deo aktuelne problematike na projektu Б.Т.Н.7.2.3.0424.Б-"Bezalkoholni napitak biosintezom čajnom gljivom", koji finansira Ministarstvo za nauku, tehnologije i razvoj Republike Srbije.

Da bi se lakše pratili rezultati rada, treba napomenuti da su uzorci uzimani nakon 3, 7 i 10 dana fermentacije, i da su skraćenice za obeležavanje uzoraka dobijene tako što je uz oznake kombuha, SK1 i SK2, koje ukazuju na kulture mikroorganizama, dodato slovo C ili Z, koje označava supstrat, crni (C) ili zeleni (Z) čaj, i brojke 3, 7 ili 10, koje govore o danu fermentacije. Nazivi uzoraka će biti isti kao u poglavlju 4.1., tj. napitak i fermentativna tečnost.

U tabeli 8 prikazani su rezultati merenja vrednosti pH tokom fermentacije različitih kultura čajne gljive.

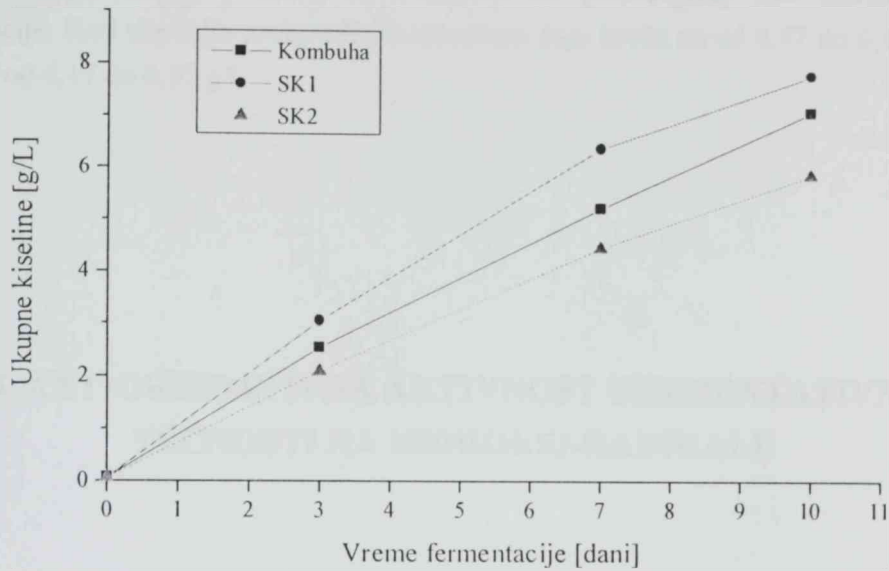
Tabela 8. Vrednosti pH tokom fermentacije različitih kultura čajne gljive

Vreme fermentacije (dani)	pH					
	Crni čaj			Zeleni čaj		
	Kombuha	SK1	SK2	Kombuha	SK1	SK2
0	6,82	6,82	6,82	6,46	6,46	6,46
3	3,53	3,84	4,02	3,97	4,14	4,36
7	2,95	3,03	3,12	3,21	3,33	3,65
10	2,88	2,75	3,01	2,98	3,17	3,49

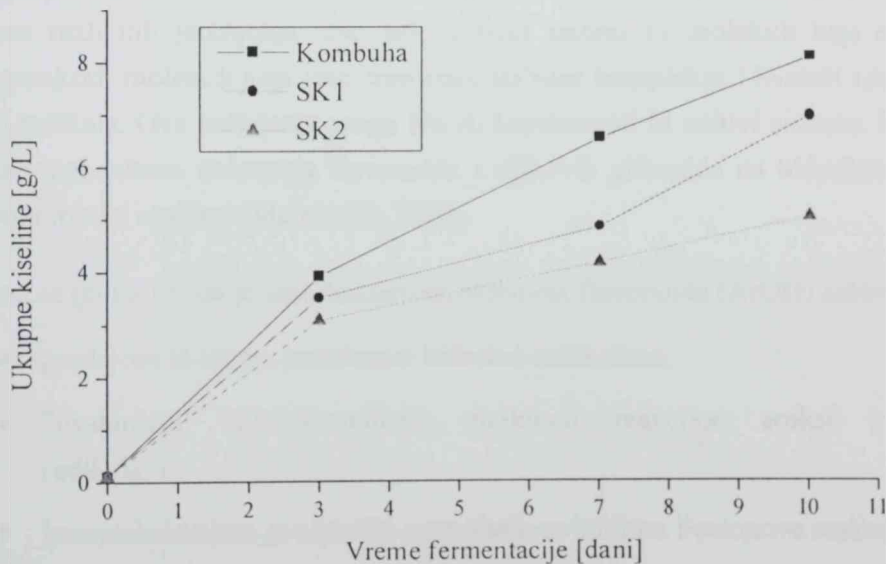
Analizom rezultata merenja vrednosti pH, može se zaključiti da je fermentacija, posmatrano preko tog parametra, imala karakterističnu dinamiku. Najveće sniženje pH desilo se do trećeg dana fermentacije, i to u proseku za 3,02 pH jedinice za uzorke kultivisane na crnom čaju, odnosno 2,3 jedinice za uzorke kultivisane na zelenom čaju. Do kraja kultivacionog perioda, bilo je promena pH, ali ne tako značajnih u poređenju sa promenama do trećeg dana. Početno niži pH zelenog čaja, nije imao uticaja na krajnju vrednost, na protiv, na kraju fermentacije dobijene su niže vrednosti u fermentacionim serijama na crnom čaju.

Posmatranjem pH napitaka i fermentativnih tečnosti, proizvedenih na oba supstrata istog dana fermentacije, može se uočiti isti trend, odnosno najniža vrednost u kombuha uzorcima, a najviša u SK2 uzorcima. Jedino odstupanje se javilo u C10 uzorcima, gde je najniži pH imao uzorak SK1 C10. Međutim, ovakav rezultat se može smatrati i logičnim pošto je SK1 kultura na crnom čaju pokazala izrazitu acidoproduktivnost. Ako se poredi uticaj čaja, jasno je da je metabolička aktivnost kombuhe nešto intenzivnija na crnom u odnosu na zeleni čaj.

Već je pomenuto da su prilikom preliminarnih istraživanja formirane starter kulture mikroorganizama sa 5 determinisanih izolata kvasaca iz lokalne, domaće čajne gljive i da je sadržaj ukupne kiselosti u uzorcima nakon fermentacije bio kriterijum za izbor za dalji rad sa starter kulturom sa *Saccharomyces cerevisiae*-SK1, sa najvišim, odnosno starter kulturom sa *Zygosaccharomyces sp.*-SK2, sa najnižim sadržajem ukupnih kiselina. Na slikama 11 i 12 prikazani su rezultati merenja ukupne kiselosti svih ispitivanih uzoraka.



Slika 11. Sadržaj ukupnih kiselina u uzorcima fermentisanim na crnom čaju



Slika 12. Sadržaj ukupnih kiselina u uzorcima fermentisanim na zelenom čaju

Rezultati su pokazali da je najveću kiselost, od uzoraka pripremanih na crnom čaju imala serija SK1, a na zelenom čaju serija kombuhe. Dobijene vrednosti su u okviru uobičajenih, prikazanih u tabeli 7, i sasvim su prihvatljive, kao merilo uspešne fermentacije. Kod napitaka proizvedenih na crnom čaju kreću se od 4,47 do 6,4 g/L, a na zelenom od 4,17 do 6,55 g/L.

4.3. ANTIOKSIDATIVNA AKTIVNOST FERMENTATIVNIH TEČNOSTI NA HIDROKSI-RADIKALE

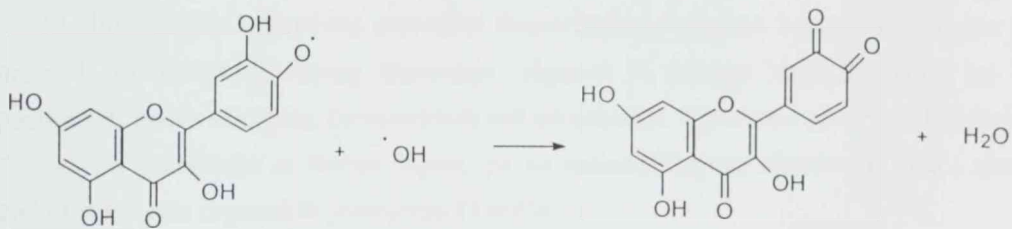
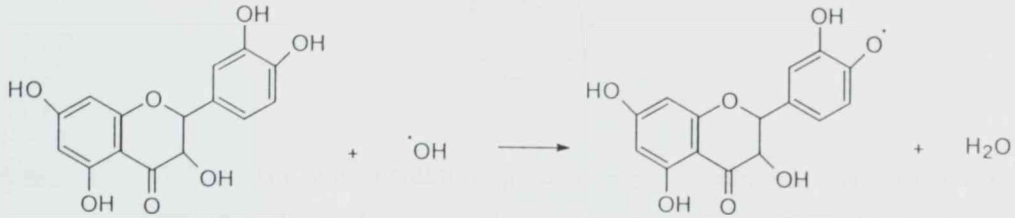
Reaktivni hidroksi-radikali mogu, između ostalog, nastati reakcijom vodonik-peroksida sa dvovalentnim jonima bakra i gvožđa. Aerobni procesi, u koje spada i kultivacija čajne gljive, osetljivi su i pogodni za nastajanje veoma reaktivnih radikalskih vrsta. Ako se uzme u obzir, da je prisustvo jona bakra i gvožđa u fermentativnoj tečnosti čajne gljive nedvosmisleno dokazano i kvantifikovano (Petrović i sar., 1999; Bauer-Petrovska, Petrushevska-Tozi, 2000) (Tabela 4), ta činjenica se u ovom kontekstu ne sme zanemariti.

Nastajanje hidroksi-radikala u različitim procesima može se inhibirati ili ublažiti delovanjem različitih jedinjenja, kao što su neki enzimi ili molekuli koji degradiraju vodonik-peroksid, molekuli koji lako formiraju stabilne komplekse i hvatači (skevindžeri) slobodnih radikala. Ova jedinjenja mogu biti ili konstituenti ili aditivi sistema. Na slici 13 je prikazan mehanizam delovanja flavonoida i njihovih glikozida na hidroksi-radikale u Fentonovom model sistemu (Malešević, 2002).

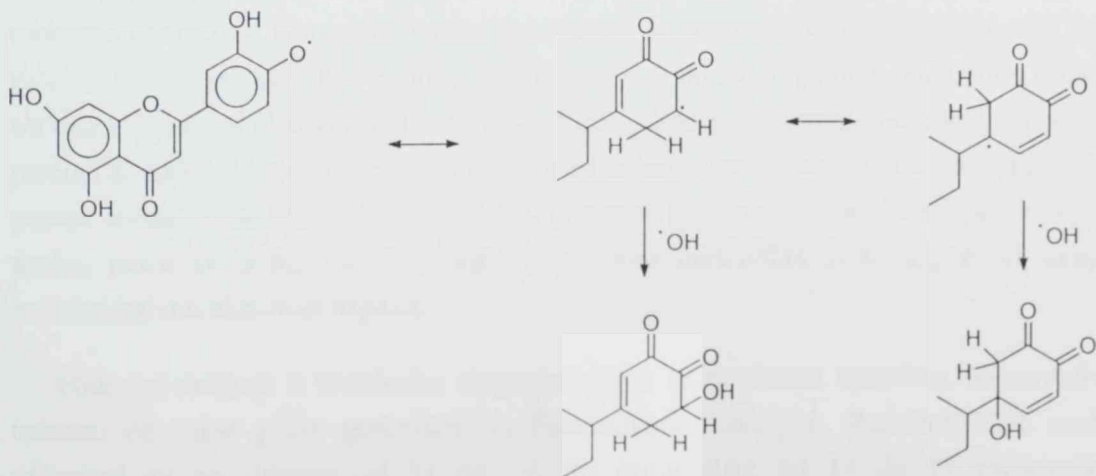
Uočava se (slika 13) da je antioksidativna aktivnost flavonoida (ArOH) uslovljena:

- predajom H-atoma reaktivnim hidroksi-radikalima,
- "hvatanjem" hidroksi-radikala, direktnom reakcijom aroksi- i hidroksi-radikala, i
- kompleksiranjem gvožđe(II)-jona, čime se inhibira Fentonova reakcija.

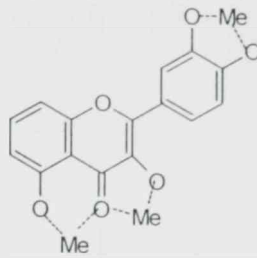
a) Predaja H-atoma hidroksi-radikalima



b) "Hvatanje" hidroksi-radikala



c) Kompleksiranje metalnih jona



Slika 13. Mehanizam antioksidativnog delovanja flavonoida na hidroksi-radikale u Fentonovom model sistemu (Malešević, 2002). Mehanizam je prikazan na primeru kvercetina.

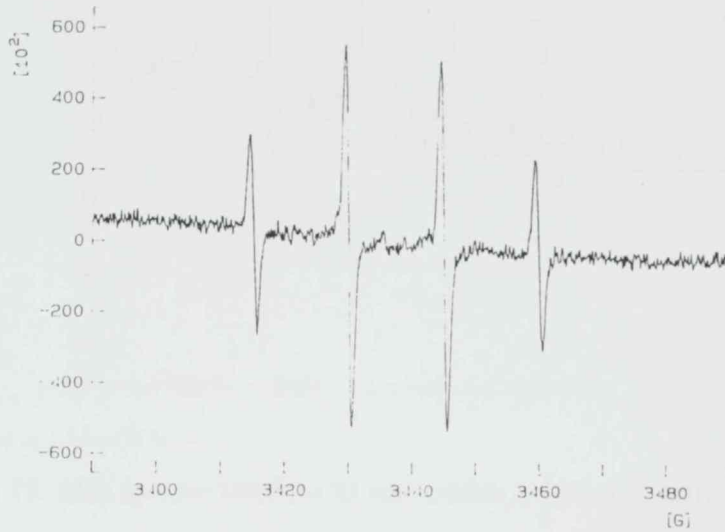
Međutim, antioksidativna aktivnost fermentativne tečnosti i napitka od čajne gljive, tj. mehanizam antioksidativnog delovanja, sigurno je mnogo kompleksniji i ne može se posmatrati samo uticajem flavonoidnih antioksidanata. Ispitivani sistem je hemijski mnogo složeniji u poređenju sa čistim čajem, pa na antioksidativnu aktivnost utiče i sinergistički efekat prisutnih organskih jedinjenja (Tabela 2).

Fermentacija čajne gljive u neraskidivoj je vezi sa brojnim enzimima i manje ili više komplikovanim metaboličkim putevima. Tako je već prilično davno (Danielova, 1957) dokazano prisustvo enzima katalaze. Supstrat, crni ili zeleni čaj, kao konstituente sadrži različita prirodna aromatična jedinjenja, koja mogu različitim mehanizmima da spreče nastajanje ili smanje reaktivnost slobodnih radikala. Iz navedenog se može pretpostaviti da sam fermentacioni sistem čajne gljive poseduje sposobnost samozaštite od nastajanja reaktivnih radikalskih vrsta.

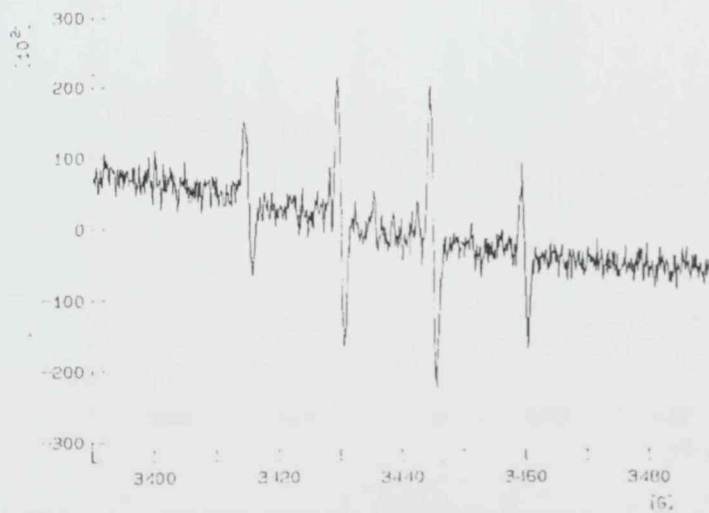
U poglavlju 2.1.5. su detaljnije opisana svedočenja o blagotvornim i lekovitim efektima napitka od kombuhe. Važno je istaknuti da su za nastajanje i proliferaciju nekih patoloških stanja, kao što su npr. kancerogene promene i gubitak elastičnosti krvnih sudova, odgovorni slobodni radikali. Zbog toga je bilo veoma značajno istražiti i odrediti potencijal antioksidativne aktivnosti napitka od čajne gljive i utvrditi da li postoji pozitivan pomak u odnosu na čist crni ili zeleni čaj, tj. ako se crni i zeleni čaj posmatraju kao slepa proba, može se dobiti jasnija slika o doprinosu metabolita čajne gljive na ukupnu antioksidativnu aktivnost napitka.

Hidroksi-radikali u izvedenim eksperimentima sa različitim uzorcima fermentativne tečnosti od čajne gljive generisani su Fentonovom reakcijom. Rezultati ESR analize prikazani su na slikama od 14 do 19, pri čemu slike od 14 do 17 predstavljaju karakteristične ESR spektre DMPO-OH spin adukata crnog i zelenog čaja i uzoraka koji su izazvali najveće sniženje intenziteta ESR signala, dok su na slikama 18 i 19 prikazane

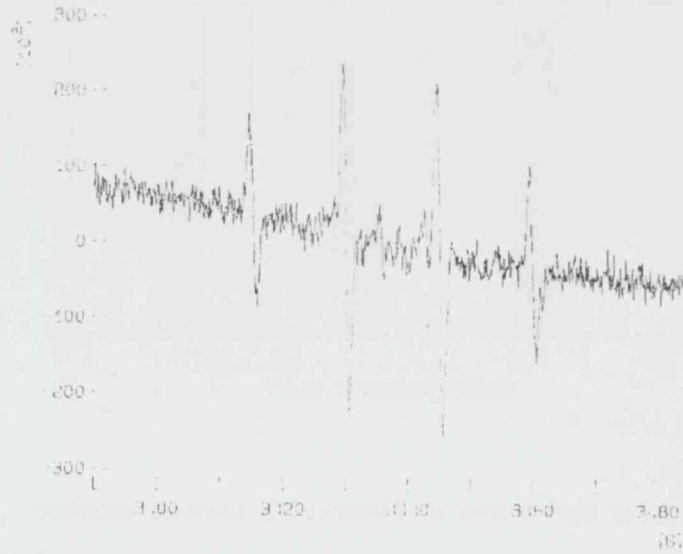
vrednosti antioksidativne aktivnosti ($AA_{\bullet OH}$) svih ispitivanih uzoraka. ESR spektri DMPO-OH spin adukta svih ostalih uzoraka dati su u Prilogu rada (Poglavlje 7).



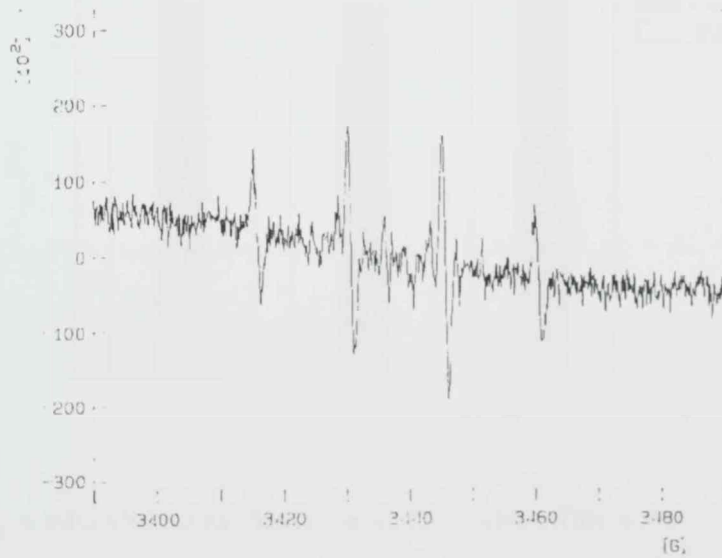
Slika 14. ESR spektar DMPO-OH spin adukta u prisustvu crnog čaja



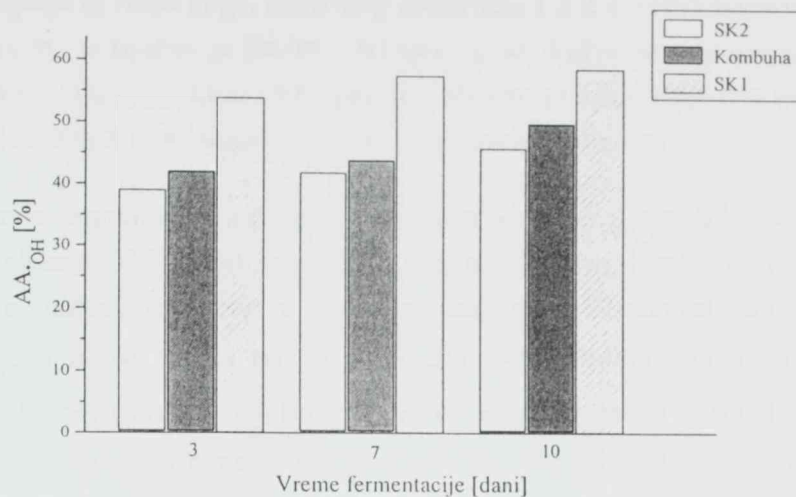
Slika 15. ESR spektar DMPO-OH spin adukta u prisustvu uzorka SKI C10



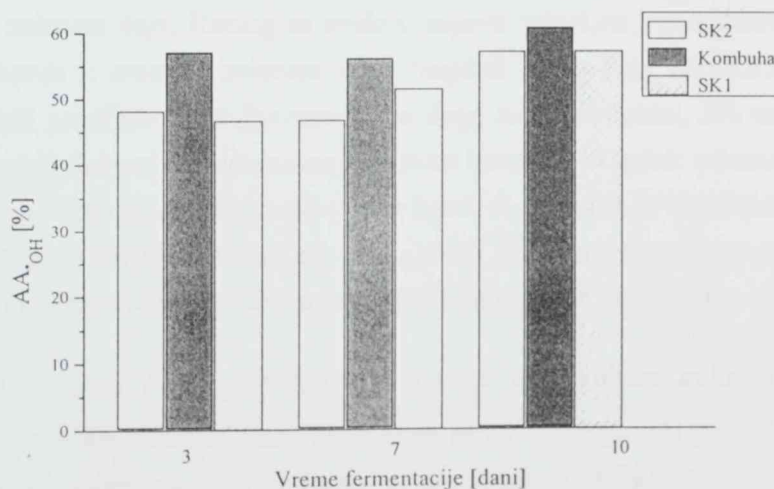
Slika 16. ESR spektar DMPO-OH spin adukta u prisustvu zelenog čaja



Slika 17. ESR spektar DMPO-OH spin adukta u prisustvu uzorka kombuha Z10



Slika 18. AA_{OH} vrednosti uzoraka kultivisanih na crnom čaju u zavisnosti od vremena trajanja fermentacije



Slika 19. AA_{OH} vrednosti uzoraka kultivisanih na zelenom čaju u zavisnosti od vremena trajanja fermentacije

Analizom dobijenih ESR spektara (Slike 14-17) može se uočiti da je hiperfina struktura spektra predstavljena sa četiri linije, relativnog intenziteta 1:2:2:1, i istih konstanti cepanja (a_N i $a_H=14,9$ G), što je tipično za DMPO-OH spin adukt. Važno je naglasiti da nije bilo promena izgleda (položaja i oblika) ESR spektara. Menjao se samo intenzitet ESR signala DMPO-OH spin adukta, u zavisnosti od toga koji je uzorak analiziran.

Svi uzeti uzorci fermentativnih tečnosti i napitaka od čajne gljive su izazvali sniženje intenziteta ESR signala DMPO-OH spin adukta, što znači da ispitivani uzorci učestvuju u transformacijama hidroksi-radikala u stabilne proizvode. Vrednosti antioksidativne aktivnosti ($AA_{\cdot OH}$) su se kretale od 39 do 61,2%. Najznačajniji pad intenziteta ESR signala DMPO-OH spin adukta zabeležen je u uzorcima uzetim nakon 3 dana fermentacije, tako da je prosečna $AA_{\cdot OH}$ vrednost iznosila 47,71% (Slike 18 i 19). U daljem toku, od trećeg dana pa do kraja desetodnevne fermentacije, promena $AA_{\cdot OH}$ vrednosti je bila manje značajna i u proseku je zabeležen porast ove aktivnosti od 7,59%. Očigledno je i veoma indikativno da su ovakve promene prouzrokovale supstance koje proizvodi čajna gljiva.

Ako se uporede intenziteti ESR signala, tj. $AA_{\cdot OH}$ vrednosti uzoraka dobijenih fermentacijom čajne gljive na različitim supstratima i sa različitim kulturama mikroorganizama, može se uočiti da su prosečne promene bile veće u uzorcima dobijenim inkubacijom na zelenom čaju. Razlog za ovakvu pojavu uslovljen je različitim sastavom i sadržajem polifenola u crnom i zelenom čaju. Napitak crnog čaja, izraženo u masenim procentima, sadrži približno 31% flavonoida, od čega su 9% katehini, 4% teaflavini, 3% flavonoli i 15% nedefinisani kondenzacioni produkti katehina. Napitak zelenog čaja sadrži 33% flavonoida, od čega su 3% flavonoli i 30% katehini, od kojih je dominantni oblik (-)-epigalokatehin-3-galat (EGCG) (Wiseman i sar., 1997). Kao posledica navedenog, može se pretpostaviti da i količine nastalih supstanci tokom fermentacije čajne gljive nisu jednake.

Poređenjem rezultata $AA_{\cdot OH}$ vrednosti za uzorke istih kultura mikroorganizama, a različitih supstrata (slike 18 i 19), primećeno je da se ne može povući paralela. Na crnom čaju kao supstratu, najveće $AA_{\cdot OH}$ vrednosti su postignute u seriji uzoraka starter kulture SK1, dok je na zelenom čaju to slučaj sa kombuha serijom. Realno je pretpostaviti da je i ovo posledica različitog hemijskog sastava supstrata.

Kod napitaka pripremljenih na crnom čaju, izražene su značajnije razlike u vrednostima $AA_{\cdot OH}$ i to do 16% između napitka sa najvišom (SK1 C7) i sa najnižom (SK2 C7) sposobnošću transformacije i stabilizacije hidroksi-radikala. Razlike u vrednostima $AA_{\cdot OH}$ kod napitaka pripremljenih na zelenom čaju su manje, ispod 10%, između napitka

sa najvišom (kombuha Z7) i sa najnižom (SK2 Z7) vrednošću. Analizirajući procentualne vrednosti $AA_{\bullet OH}$, najvišu antioksidativnu aktivnost na hidroksi-radikale pokazuje napitak SK1 C7, a najniže aktivnosti napici starter kulture SK2.

Ako se prikazani rezultati ukupne kiselosti (Slike 11 i 12) uporede sa rezultatima $AA_{\bullet OH}$ vrednosti (Slike 18 i 19), zapaža se interesantna zavisnost. Za uzorke proizvedene fermentacijom čajne gljive na crnom čaju, postoji veza između opadanja intenziteta ESR signala DMPO-OH spin adukta i porasta sadržaja ukupnih kiselina. Serija SK1 uzoraka na crnom čaju poseduje najveću ukupnu kiselost, a ujedno i najveću vrednost $AA_{\bullet OH}$. Uzorci dobijeni fermentacijom na zelenom čaju u proseku imaju veću ukupnu kiselost, u poređenju sa uzorcima sa crnim čajem, pri čemu je najveći sadržaj ukupnih kiselina u uzorcima kombuha serije. Ovde takođe postoji obrnuto proporcionalna veza između pada intenziteta ESR signala DMPO-OH spin adukta i rasta sadržaja ukupnih kiselina.

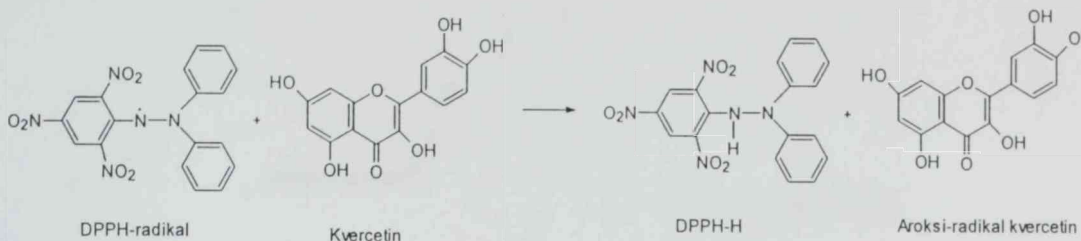
Sumirajući rezultate vrednosti $AA_{\bullet OH}$, može se zaključiti da bi u tehnološkom smislu najveću opravdanost imala proizvodnja napitka sa proizvodnom starter kulturom SK1, jer se u radu manipuliše sa manjim brojem izolata kombuhe, u poređenju sa kulturom kombuhe. Dobija se napitak s najvećom sposobnošću transformacije i stabilizacije hidroksi-radikala, i to na supstratu na kome je fermentacija intenzivna, a tradicionalno je, što se senzornih karakteristika tiče, on veoma dobro prihvaćen.

4.3. ANTIOKSIDATIVNA AKTIVNOSTI FERMENTATIVNIH TEČNOSTI NA DPPH RADIKALE

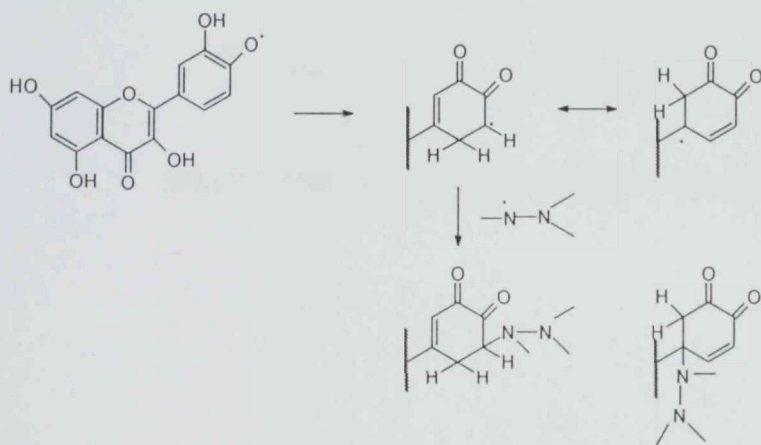
Neki autori (Malešević, 2002) su razmatrali pretpostavku da prirodna aromatična jedinjenja, pogotovo ona iz klase flavonoida, različitim hemijskim transformacijama uslovljavaju redukciju DPPH radikala. Takođe se smatra da je za antioksidativnu aktivnost fenolnih jedinjenja posebno bitno prisustvo hidroksilne funkcionalne grupe. Stoga se verovatni mehanizam antioksidativnog delovanja flavonoida, fenolnih kiselina i tanina zasniva na njihovoj sposobnosti da otpuste H-atom uz nastajanje relativno stabilnih aroksi radikala, kao i na sposobnosti formiranja stabilnih jedinjenja reakcijom aroksi radikala

(ArO^{*}) i DPPH radikala. Na slici 20 prikazan je mehanizam antioksidativnog delovanja flavonoida iz klase flavonola na DPPH radikale (Malešević, 2002).

a) Predaja H atoma DPPH radikalima

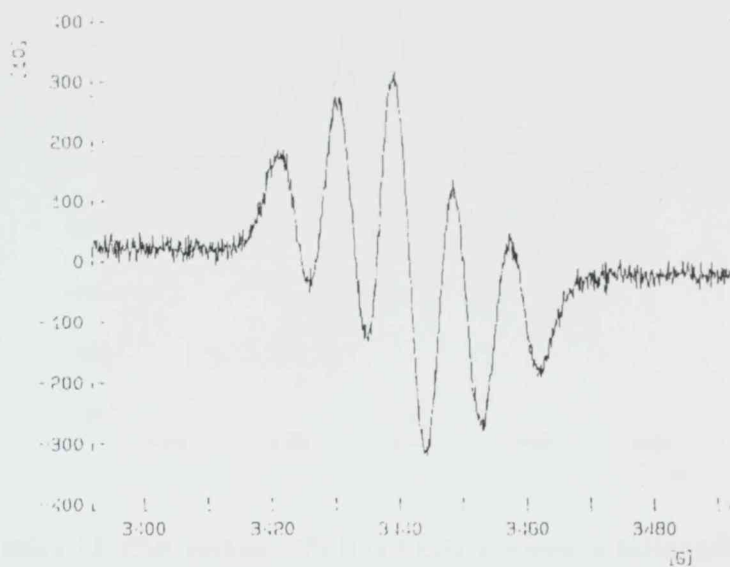


b) "Hvatanje" DPPH radikala

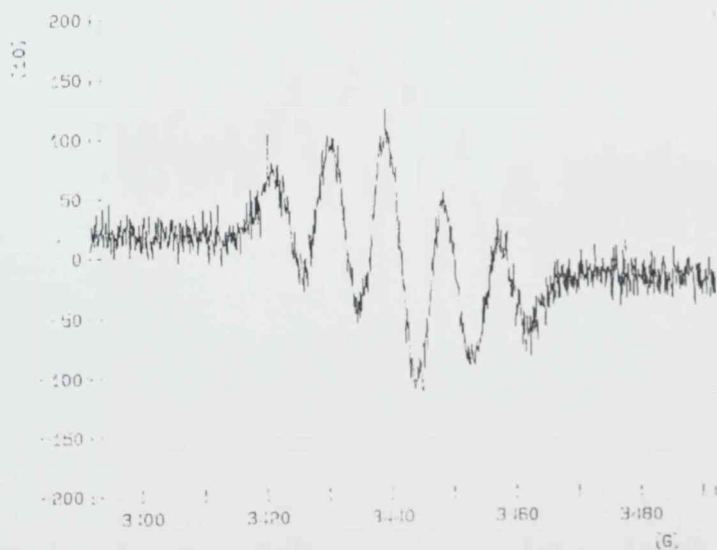


Slika 20. Mehanizam antioksidativnog delovanja flavonola na DPPH radikale (Malešević, 2002). Mehanizam prikazan na primeru kvercetina.

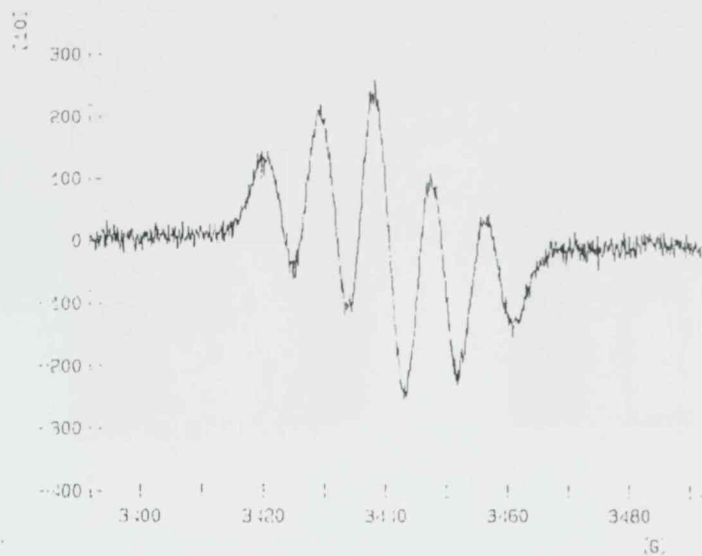
Da bi se bolje objasnila antioksidativna aktivnost napitaka od čajne gljive, proizvedenih sa različitim kulturama mikroorganizama, na različitim supstratima, ispitan je njihov uticaj na transformaciju i stabilizaciju relativno stabilnih DPPH radikala. Imajući u vidu činjenicu da čaj i napitak od čajne gljive sadrže veliki broj različitih prirodnih aromatičnih jedinjenja (Poglavlje 2.2.1.), moglo se očekivati da, osim što deluje na veoma reaktivne hidroksi-radikale, kombuha napitak smanjuje koncentraciju i stabilnih radikaliskih vrsta. Rezultati delovanja kombuha napitaka na DPPH radikale, prikazani su na slikama od 21 do 26, pri čemu slike od 21 do 24 predstavljaju karakteristične ESR spektre DPPH radikala u prisustvu crnog i zelenog čaja i uzoraka koji su izazvali najveće sniženje intenziteta ESR signala, dok su na slikama 25 i 26 prikazane vrednosti AA_{DPPH} svih ispitivanih uzoraka. ESR spektri DPPH radikala u prisustvu svih ostalih uzoraka dati su u Prilogu rada (Poglavlje 7).



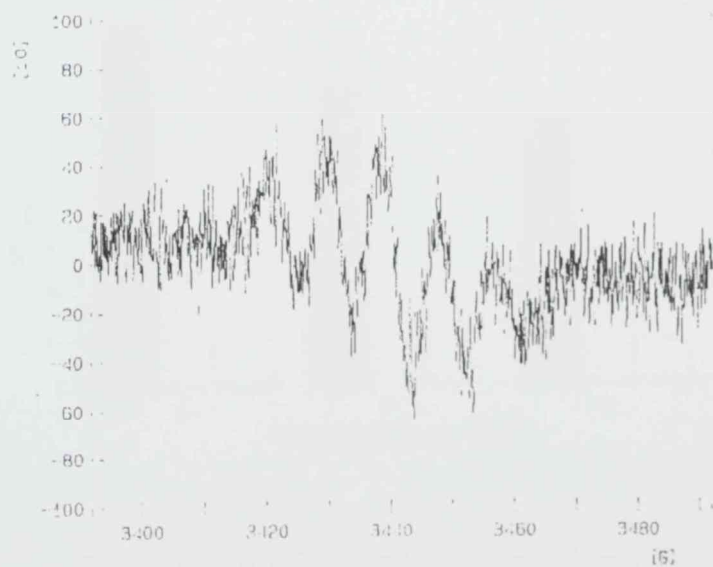
Slika 21. ESR spektar DPPH radikala u prisustvu crnog čaja



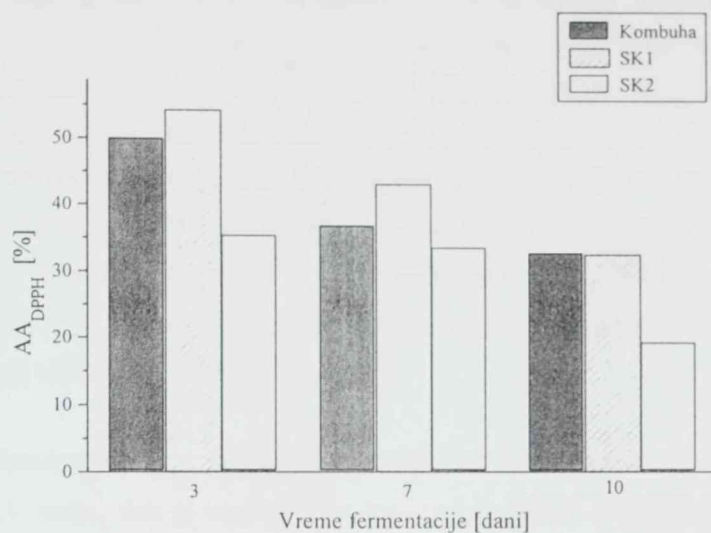
Slika 22. ESR spektar DPPH radikala u prisustvu uzorka SK1 C3



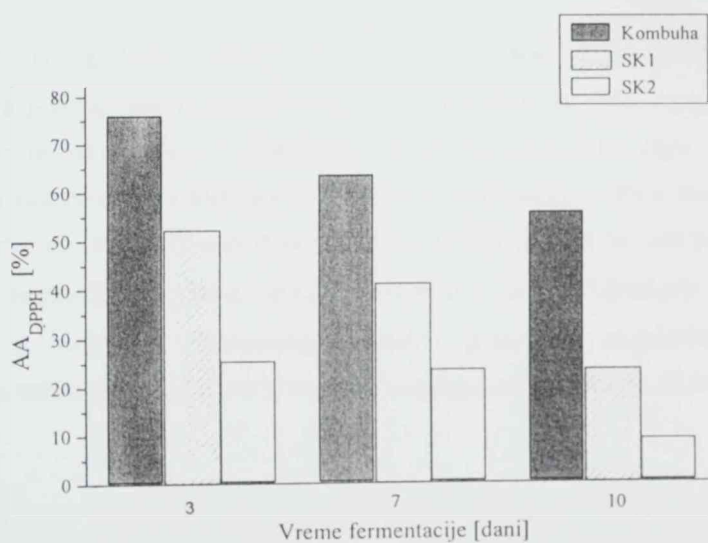
Slika 23. ESR spektar DPPH radikala u prisustvu zelenog čaja



Slika 24. ESR spektar DPPH radikala u prisustvu uzorka kombuha Z3



Slika 25. AA_{DPPH} vrednosti uzoraka kultivisanih na crnom čaju u zavisnosti od vremena fermentacije



Slika 26. AA_{DPPH} vrednosti uzoraka kultivisanih na zelenom čaju u zavisnosti od vremena fermentacije

Prikazani ESR spektri DPPH slobodnih radikala (Slike 21-24) imaju hiperfinu strukturu koja potiče od interakcije nesporenog elektrona i dva ^{14}N atoma ($I=1$). Uočava se kvintet linija relativnog intenziteta 1:2:3:2:1, dok konstanta hiperfinog cepanja ima vrednost $a_N=9,03$ G. Posmatrajući crni i zeleni čaj kao slepu probu, u odnosu na njih svi uzorci su izazvali sniženje intenziteta ESR signala i to od 9,09% do 76,14%. Najveći pad intenziteta ESR signala DPPH radikala bio je posle 3 dana fermentacije, u svim ispitivanim serijama uzoraka, što znači da je AA_{DPPH} vrednost tad bila najveća i do kraja fermentacije je pokazala tendenciju opadanja (Slike 25 i 26). Ovo je u suprotnosti sa trendom promena AA_{OH} vrednosti kod analize hidroksi-radikala.

Najveće prosečne AA_{DPPH} vrednosti u uzorcima pripremljenim na crnom čaju, bile su u uzorcima SK1 serije, dok je na zelenom čaju to bio slučaj sa uzorcima kombuha serije gde su zabeležene ubedljivo najveće vrednosti. Razlike u sposobnosti redukcije DPPH radikala između SK1 i SK2 kreću se oko 10% kod napitaka proizvedenih na crnom do oko 18% kod napitaka pripremljenih na zelenom čaju. Ako se uporede AA_{DPPH} vrednosti ovih starter kultura na različitim supstratima, razlike su mnogo manje i iznose oko 2% za SK1, odnosno oko 10% za SK2, i to u korist napitaka od kombuhe sa crnim čajem.

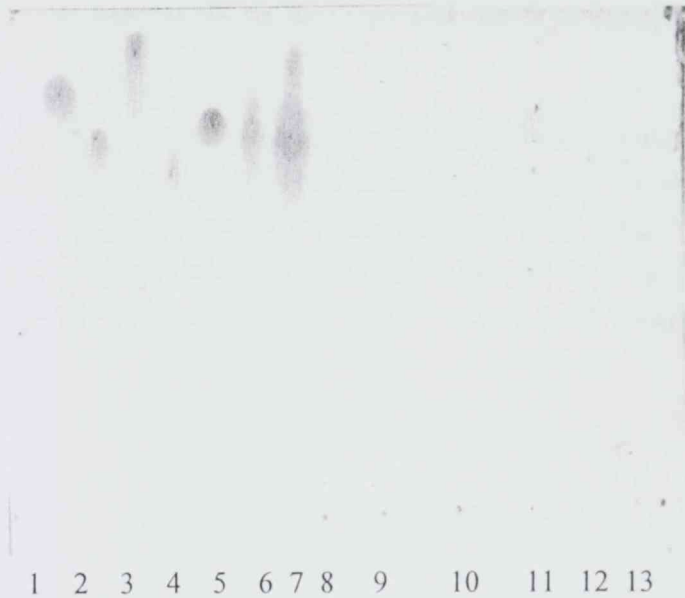
Iako nakon trećeg dana fermentacije dolazi do pada AA_{DPPH} vrednosti, u samom napitku još uvek postoji značajna antioksidativna aktivnost na stabilne radikale. Zanimljivo je da SK1 serija na crnom i kombuha serija na zelenom čaju pokazuju najveću antioksidativnu aktivnost i na hidroksi-radikale. Ako se uzme u obzir značajna aktivnost na hidroksi-radikale, uz to i aktivnost na DPPH radikale, može se zaključiti da je ukupan antioksidativni potencijal napitaka od kombuhe veoma dobar. Opadanje AA_{DPPH} vrednosti je verovatno u vezi sa promenom sastava prirodnih aromatičnih jedinjenja u fermentacionim tečnostima, bilo da je u pitanju njihova degradacija ili biosinteza glikozida flavonoida.

Ako se uporede prosečne AA_{DPPH} vrednosti (Slike 25 i 26) i vrednosti sadržaja ukupnih kiselina odgovarajućih serija (Slike 11 i 12), zapaža se da serija fermentativnih tečnosti i napitka, koja poseduje veću kiselost, ima i veći prosečan AA_{DPPH} efekat.

Rezultati aktivnosti fermentisanih uzoraka na DPPH radikale mogu se dovesti u vezu sa rezultatima preliminarne TLC analize nekih prirodnih aromatičnih jedinjenja i nekih od uzoraka fermentacione tečnosti čajne gljive. TLC hromatogram prikazan je na slici 27.

Za TLC analizu, ispitivani uzorci napitaka bili su veoma kompleksni. To se pogotovo odnosi na startne mrlje 8 i 9, gde zbog velike koncentracije šećera u uzorcima, nije ni došlo do potpunog pokretanja uzoraka sa starta. Sedmog dana fermentacije (startne mrlje 10 i

11), napitak pripremljen na zelenom čaju je nešto bogatiji prirodnim aromatičnim jedinjenjima. Poređenjem sa R_f vrednostima standarda, uočava se da u njemu, za razliku od napitka sa crnim čajem, ima katehina, dok oba sadrže i supstance nižih R_f vrednosti u odnosu na standarde. Pretpostavka je da su u pitanju flavonoidi i njihovi glikozidi. Posle deset dana fermentacije (startne mrlje 12 i 13) kvalitativni sastav prirodnih aromatičnih jedinjenja na oba supstrata je promenjen. Verovatno je da je do ove promene došlo usled metaboličkog delovanja mikroorganizama, što je rezultovalo biosintezom flavonoidnih glikozida.



Slika 27. TLC analiza prirodnih aromatičnih jedinjenja u napicima od čajne gljive.

- 1-6: Standardi-katehin, epikatehin, kvercetin, miricetin, galna i taninska kiselina
- 7: Smeša standarda.
- 8-9: Čist zaslađen crni i zeleni čaj
- 10-11: Sedmi dan fermentacije na crnom i zelenom čaju (kombuha)
- 12-13: Deseti dan fermentacije na crnom i zelenom čaju (kombuha)

4.4. SADRŽAJ ANTIOKSIDATIVNIH VITAMINA I LIMUNSKÉ KISELINE

Rezultati ESR analize izloženi u ovom radu, pokazali su da se efekat uklanjanja slobodnih radikala značajno povećava, ako se uporede crni i zeleni čaj i kombuha napici proizvedeni na ovim čajevima, kao komponentama podloge. Jasno je da na pomenuti pozitivan efekat mogu da utiču i prisutni metaboliti čajne gljive, kao što su vitamini B

grupe, naročito B₂ i B₆, zatim vitamin C, purini i pirimidini, katalaza, itd. Ne treba zaboraviti ni prirodna aromatična jedinjenja, jer iako nisu proizvodi metabolizma u pomenutoj fermentaciji, nalaze se u napitku. Organske kiseline po svojoj strukturi ne pripadaju grupi antioksidanata, međutim indirektno mogu da povoljno utiču na AA_{•OH} i AA_{DPPH} vrednost (Rižner Hraš i sar., 2000).

U cilju boljeg razumevanja antioksidativne aktivnosti napitka od čajne gljive, analizirani su neki od sastojaka nastalih tokom fermentacije. Posebno je obraćena pažnja na antioksidativne vitamine, od kojih su neki jedinjenja na čiju stabilnost značajno utiče kontakt sa kiseonikom, svetlost i voda kao rastvarač, kao i na jedinjenja koja stabilizuju napitak od kombuhe.

Analizirajući vitamine B grupe, dokazano je da nativna kombuha, na crnom čaju zaslađenom saharozom, do sedmog dana fermentacije sintetiše vitamine B₁, B₂, B₆ i B₁₂ (Petrović, Lončar, 1996; Bauer-Petrovska, Petrushevska-Tozi, 2000; Malbaša, 2000). U ovom radu je naročita pažnja posvećena količini vitamina B₂ i B₆, jer podaci o ovim vitaminima ukazuju da su u pitanju veoma jaki antioksidansi (Maestro-Durán, Borja-Padilla, 1993).

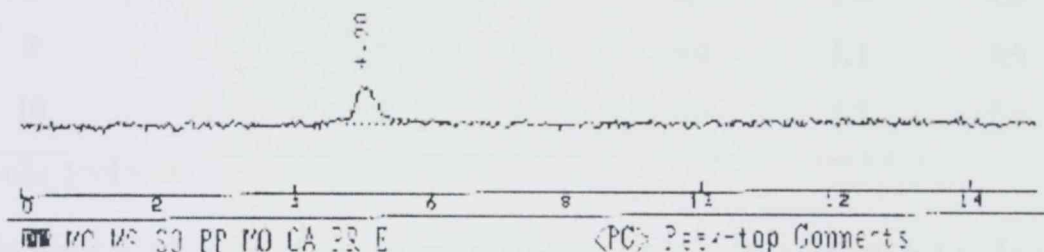
4.4.1. SADRŽAJ VITAMINA B₂

Za komercijalne vitaminske preparate veoma često se koristi FMN, koji je u vodenom rastvoru mnogo stabilniji od riboflavina, međutim, za razliku od riboflavina FMN je veoma teško dobiti u čistom obliku (Okamoto i sar., 2003), te je riboflavin u ovom radu i korišćen kao standard.

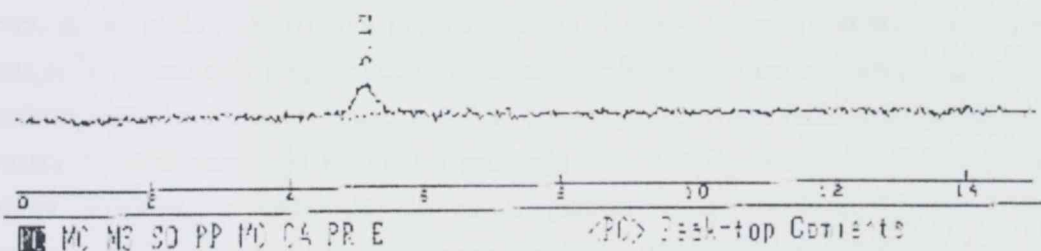
Prema literaturnim podacima (Marletta, Light, 1985), flavini se mogu detektovati UV detektorom na talasnim dužinama od 210, 254 i 280 nm ili VIS detektorom, pri čemu se talasna dužina od 450 nm koristi za detekciju FAD-a, FMN-a i riboflavina. Više talasne dužine eliminišu interferenciju tragova UV-apsorbujućih kontaminanata. Fluorescentna detekcija, ekscitacija od 440 do 450 nm i emisija od 520 do 530 nm, takođe uklanja interferenciju i veoma je osetljiva. Velika osetljivost je bila razlog što je u radu primenjen fluorescentni detektor. Zbog malih količina ispitivanog jedinjenja, rađena je manuelna, a ne automatska integracija pikova.

Sama HPLC analitika vitamina B₂ i tumačenje hromatograma ispitivanih uzoraka bili su prilično jednostavni, zbog toga što priprema uzoraka nije bila komplikovana i zato što se pik supstance jasno izdvajao i uočavao u odnosu na baznu liniju. Iz navedenog se može zaključiti da je primenjena analitička tehnika pogodna za analizu vitamina B₂ u fermentativnoj tečnosti čajne gljive, pri čemu se dobijaju visoko reproduktivni rezultati.

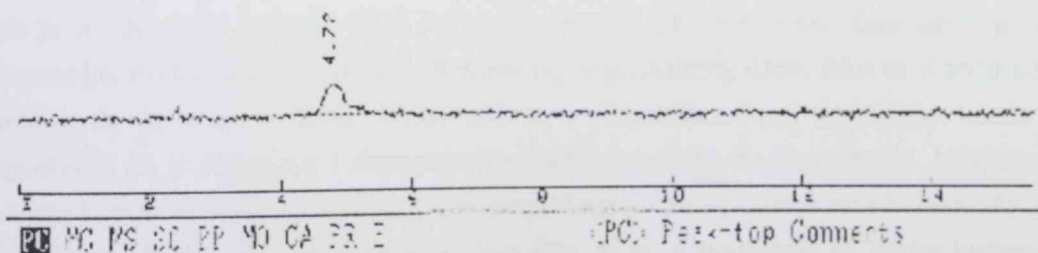
Rezultati HPLC analize vitamina B₂ prikazani su na slikama od 28 do 30, gde su dati hromatogram standarda B₂ i hromatogrami uzoraka, koji su na crnom i na zelenom čaju imali najveći sadržaj ovog jedinjenja. Hromatogrami ostalih ispitivanih uzoraka prikazani su u Prilogu rada (Poglavlje 7).



Slika 28. Hromatogram standarda vitamina B₂



Slika 29. Hromatogram uzorka kombuha C10 u sistemu za analizu vitamina B₂



Slika 30. Hromatogram uzorka kombuha Z10 u sistemu za analizu vitamina B₂

Integrirane vrednosti sadržaja vitamina B₂ u fermentativnim tečnostima čajne gljive sumirane su u tabeli 9.

Tabela 9. Sadržaj vitamina B₂ u fermentativnim tečnostima čajne gljive

Vreme fermentacije (dani)	Vitamin B ₂ (µg/100 mL)					
	Crni čaj			Zeleni čaj		
	Kombuha	SK1	SK2	Kombuha	SK1	SK2
0	nd*	nd	nd	nd	nd	nd
3	7,2	5,2	6,6	5,0	5,8	4,2
7	7,5	5,8	6,6	8,4	5,1	4,9
10	8,3	5,2	6,1	9,6	2,7	5,5

nd*-nije detektovan

Iz tabele 9 je lako uočljivo da su najveći sadržaji vitamina B₂ u napitku, nakon 7 dana fermentacije, izmereni u uzorcima kombuha serije na zelenom čaju 8,4 µg/100 mL, odnosno na crnom čaju 7,5 µg/100 mL. Prateći tok fermentacije u celini, takođe se može primetiti da su najviše vrednosti sadržaja vitamina B₂ zabeležene u kombuha serijama. Pretpostavka je da je za ovakvu pojavu odgovoran sastav kvasaca u inokulumu, jer su za nastajanje vitamina B grupe odgovorni kvasci. Prilikom analize mikrobiološkog sastava kombuhe korišćene u ovom radu, metodom poseva je izolovano 10 najdominantnijih vrsta kvasaca. Nakon sumiranja rezultata ispitivanja morfoloških i fizioloških osobina izolata kultura kvasaca, utvrđeno je da su u pitanju vrste *Saccharomyces ludwigii*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces bisporus*, *Torulopsis sp.* i *Zygosaccharomyces sp.* Neki od izolata nisu bili identifikovani (Malbaša, 2000). Dakle, u fermentaciji kontrolnih serija učestvovalo je više vrsta kvasaca. To znači da je više mikroorganizama u istoj kultivacionoj smeši moglo da sintetiše isto jedinjenje, vitamin B₂, odnosno ispoljen je efekat podudarnih metaboličkih odnosa.

Poređenjem serija uzoraka proizvedenih fermentacijom starter kultura SK1 i SK2, vidi se da je u obe serije uzoraka SK1 i u seriji uzoraka SK2 na crnom čaju desetog dana fermentacije, niža vrednost sadržaja vitamina B₂ nego sedmog dana. Ako se u obzir uzme činjenica da je ovaj vitamin fotosenzitivno i termosenzitivno jedinjenje, može se pretpostaviti da je stajanjem i manipulacijom uzoraka došlo do degradacije. Međutim, u uzorcima kombuha serija (deseti dan) nije zabeležena ovakva pojava i zato se ne može doći do potpunog objašnjenja, nego samo do hipoteze da je, u poređenju sa starter kulturama SK1 i SK2, mnogo bolja autoprotekcija nativnih kultura čajne gljive.

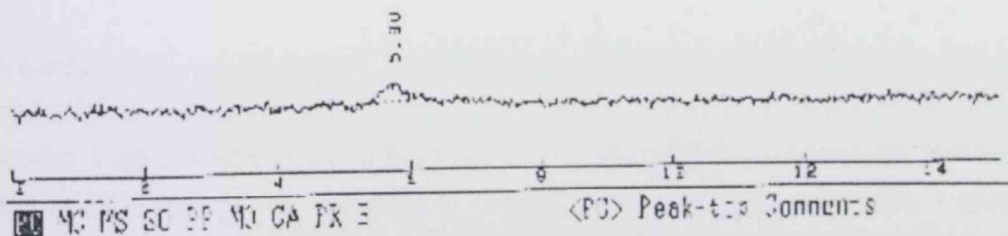
Na supstratu sa crnim čajem, fermentacijom starter kulturom SK2, u svim uzorcima je dobijen nešto viši sadržaj vitamina B₂ u poređenju sa kulturom SK1.

Na supstratu sa zelenim čajem trendovi su suprotni, odnosno kod SK2 je uočljiv rast, a kod SK1 opadanje sadržaja ovog vitamina. Prosečni sadržaj vitamina B₂ u serijama uzoraka SK1 i SK2 je veći na supstratu sa crnim čajem. Ne može se reći da su vrednosti prikazane u tabeli 9 u funkcionalnoj vezi sa vrednostima AA_{OH} i AA_{DPPH} (slike 18, 19, 25 i 26), ali je sigurno da vitamin B₂ daje svoj doprinos antioksidativnom potencijalu fermentativnih tečnosti i napitaka od čajne gljive.

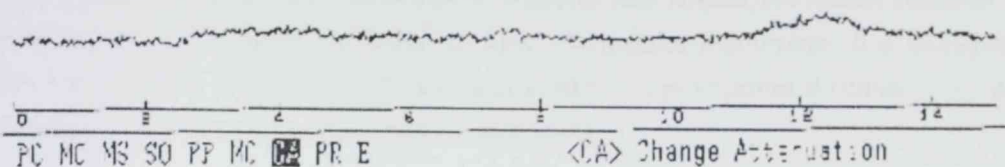
4.4.2. SADRŽAJ VITAMINA B₆

Usavršene su mnoge metode za ekstrakciju i određivanje vitamina B₆, od čega su najzastupljenije mikrobiološke i HPLC tehnike (Bognár, Ollilainen, 1997). U sistemima za tečnu hromatografiju, najčešće korišćeni detektori su UV apsorbujući i fluorescentni. To je naoptimalniji izbor koji omogućava potrebnu osetljivost i selektivnost za uzorke od biološkog interesa. Nije moguće definisati opšte uslove za određivanje vitamina B₆ fluorescentnim detektorom, jer u mnogome zavise od rastvarača, jonske jačine rastvora i vrednosti pH (Vanderslice i sar., 1985).

HPLC analizom ispitivanih uzoraka fermentativne tečnosti čajne gljive nije detektovano prisustvo vitamina B₆. Sa slike 31, gde je prikazan hromatogram standarda vitamina B₆, očitava se da je retenciono vreme ovog vitamina 5,88 s, što nije uočljivo na hromatogramima uzoraka. Karakterističan hromatogram uzoraka prikazan je na slici 32.



Slika 31. Hromatogram standarda vitamina B₆



Slika 32. Hromatogram uzorka kombuha C3

Posmatrajući sliku 32 na kojoj je prikazan hromatogram uzorka kombuha C3, ne može se reći da se pik supstance uočava iz linije šuma. Svi ostali uzorci prilikom analize vitamina B₆, dali su slične rezultate. Međutim, nije ispravno tvrditi da ovog vitamina nema u ispitivanim uzorcima. Granica detekcije bila je 3 µg/100 mL, te je sasvim moguće da je vitamin B₆ produkovan u količini nižoj od ove vrednosti, jer kako je već rečeno postoje podaci o njegovom prisustvu u napitku od čajne gljive (Petrović, Lončar, 1996; Bauer-Petrovska, Petrushevska-Tozi, 2000; Malbaša, 2000).

Sastav simbioze čajne gljive je promenljiv u skladu sa klimatskim i geografskim uslovima i zavisi od različitih sojeva kvasaca i bakterija. Kultura kombuhe je živi organizam izložen mnogim uticajima, koji napitku daju različit konačni hemijski sastav i ukus. Tako neki autori (Bauer-Petrovska, Petrushevska-Tozi, 2000) nisu detektovali vitamin B₂, dok je zabeležen značajan sadržaj vitamina B₆ i to 0,84 mg/mL. Važno je napomenuti da nije primenjen isti metod određivanja. Korišćena je spektrofotometrija, koja je za ispitivane supstance mnogo manje selektivna od HPLC tehnike.

4.4.3. SADRŽAJ VITAMINA C

Vitamin C je, uz vitamin E i karotenoide, jedan od najpoznatijih antioksidativnih sastojaka hrane i u mnogome pomaže organizmu u odbrani od oksidativnih oštećenja (Wiseman i sar., 1997). Kao stabilizator slobodnih radikala indukovanih Fentonovom reakcijom efikasniji je od vitamina E, ekstrakta zelenog čaja, polifenola i ekstrakta ruzmarina (Zhao i sar., 1989). Proučavanjem sinergizma antioksidativnih materija, utvrđeno je da askorbil-palmitat u smeši sa ekstraktom ruzmarina pokazuje značajno poboljšanje u zaštiti od reaktivnih slobodnih radikala. Pomenuta smeša u suncokretovom ulju ima značajno inhibitorno dejstvo u nastajanju vodonik-peroksida.

Uopšteno govoreći, mogu se definisati tri glavna tipa biološke aktivnosti L-askorbinske kiseline. Može funkcionisati kao kofaktor enzima, kao hvatač slobodnih radikala i kao donor/akceptor u transportu elektrona, ili kroz plazmatsku membranu ili u hloroplastima (Djilas i sar., 2002). Poznato je da neki antioksidanti u povećanim dozama mogu postati prooksidanti. Međutim, kod vitamina C to nije slučaj.

Rezultati analize sadržaja vitamina C u uzorcima fermentativne tečnosti čajne gljive, prikazani su u tabeli 10.

Tabela 10. Sadržaj vitamina C u uzorcima fermentativne tečnosti čajne gljive

Vreme fermentacije (dani)	Vitamin C (mg/L)					
	Crni čaj			Zeleni čaj		
	Kombuha	SK1	SK2	Kombuha	SK1	SK2
0	nd*	nd	nd	nd	nd	nd
3	1,69	9,00	0,84	1,41	3,09	2,25
7	15,19	20,26	3,09	7,88	4,78	2,25
10	27,86	28,98	2,81	9,27	9,57	5,07

nd*-nije detektovan

Sadržaj vitamina C sintetisanog tokom fermentacije kombuhe je, prosečno gledano, značajno veći u uzorcima dobijenim na crnom čaju kao supstratu, naročito posle 7 i 10 dana fermentacije. Pošto je za sve kultivacione smeše izvor ugljenika isti, kako kvalitativno, tako i kvantitativno, jasno je da je crni čaj razlog ovakvog ishoda, odnosno da različiti polikondenzacioni sastojci crnog čaja stimulišu intenzivniju biosintezu ovog vitamina.

Za biosintezu vitamina C su odgovorne bakterije, a prekursor je glukoza (Dutton, 1980). Polazna sirovina, izvor ugljenikovih atoma, za fermentaciju čajne gljive je saharoza. Za razgradnju ovog disaharida odgovoran je enzim invertaza (3.2.1.26). To bi mogao biti razlog najvišeg sadržaja vitamina C u uzorku SK1 C3 (9 mg/L). Naime, kvasac u SK1, *Saccharomyces cerevisiae* je poznatiji kao pekarski kvasac, koji načelno ima dobru invertaznu aktivnost i verovatno je da je SK1 najbrže oslobađala glukoza, prekursor biosinteze vitamina C. Isto ponašanje za SK1 je primećeno i na zelenom čaju. Iako je nastali sadržaj 3,09 mg/L oko tri puta manji u odnosu na uzorak SK1 C3, u istom

vremenskom periodu je značajno veći u odnosu na ostale kulture kultivisane na zelenom čaju.

Upoređujući napitke, najviši sadržaj vitamina C je zabeležen u uzorku SK1 C7. Međutim ono što je interesantno uporediti jesu kombuha i SK1 serija na crnom i zelenom čaju. Na kraju inkubacionog perioda, desetog dana fermentacije, sadržaji su približno isti za isti supstrat. To znači da složeni metabolički procesi i putanje ublažavaju početno najbržu biosintezu vitamina C kod SK1. Ovo je dobar primer kako nije jednostavno posmatrati fermentaciju čajne gljive samo preko jednog metabolita. Pogotovo zbog toga što se radi o simbiozi, koja je u ovim eksperimentima kultivisana pod optimalnim uslovima i nije stimulirana biosinteza nekog od jedinjenja.

Poredeći vrednosti $AA_{\bullet OH}$ (Slike 18 i 19) i sadržaj vitamina C (Tabela 10), kada se posmatra supstrat i serija mikroorganizama, može se primetiti da postoji stroga direktno proporcionalna veza. Jedini uzorak koji odstupa od ove zavisnosti jeste SK1 Z10, u kome je sadržaj vitamina C nešto viši, a $AA_{\bullet OH}$ vrednost nešto niža, u odnosu na uzorak kombuha Z10.

Sadržaj vitamina C nije u saglasnosti sa vrednostima koje su objavili drugi autori (Konovalov, Semenova, 1955, Danielova, 1957, Steiger, Steinegger, 1957, Bauer-Petrovska, Petrushevska-Tozi, 2000). Potpuno poređenje nije moguće čak ni onda kada bi se znalo da su primenjene iste kulture mikroorganizama, jer nisu primenjene iste metode određivanja. Ono što je sigurno, jeste da je metod primenjen u ovom radu (Boehringer, Mannheim, 409677) veoma selektivan, zato što je zasnovan na enzimskim reakcijama, čime je maksimalno blokirana interferencija drugih supstanci, kojih je bilo u veoma kompleksnim, ispitivanim uzorcima. Koncentracija proizvoda stvorenih u enzimskim reakcijama merena je spektrofotometrijski.

Za određivanje vitamina C razvijeno je nekoliko metoda, od kojih su najzastupljenije elektrohemijske, katalitičke, spektrofotometrijske, spektrofluorimetrijske i hromatografske metode. Od hromatografskih, najviše je zastupljena HPLC tehnika, koja je posebno pogodna kada postoji potreba da se utvrde različiti hemijski oblici vitamina C i njihov odnos u ispitivanom uzorku. Međutim, ukoliko analiza zahteva da se izmeri ukupan sadržaj vitamina C, enzimska metoda, primenjena u ovom radu, je zadovoljavajuća, sa stanovišta osetljivosti i preciznosti (Sánchez-Mata i sar., 2000).

4.4.4. SADRŽAJ LIMUNSKKE KISELINE

Limunska kiselina ulazi u sastav gotovo svih biljnih i životinjskih vrsta. Ima sposobnost da gradi helate sa metalnim jonima, formirajući veze između metala i karboksilnih ili hidroksilnih grupa molekula. To je supstanca koja je od davnina poznata po svojim konzervirajućim osobinama i u tu svrhu se i koristi u prehrambenoj industriji. Upravo zbog sposobnosti da gradi helate, limunska kiselina je veoma efikasna u usporavanju oksidativnog kvarenja lipida u hrani i uobičajeno je da se dodaje u biljna ulja posle dezodorizacije (Panaia i sar., 2000; Rižner Hraš i sar., 2000). Eksperimenti sa životinjama su pokazali, da prisustvo jona aluminijuma u organizmu izaziva pad aktivnosti antioksidativnih enzima u jetri i cerebralnoj hemisferi. Međutim, ovaj efekat je znatno slabije izražen, ukoliko je u organizam, zajedno sa jonima aluminijuma, unešena povećana doza limunske kiseline (Swain, Chainy, 1998).

Limunska kiselina je jedan od dominantnih fizioloških modifikatora, koji štite urin od taloženja soli kalcijuma i formiranja patološki velikih kristala ili agregata. Postoje brojne studije o tome kako limunska kiselina sprečava formiranje jezgra, rast i agregaciju kamena u vodenom rastvoru ili urinu. Divalentni citratni anjon ne deluje samo kao helirajući agens kalcijum(II)-jona, formirajući kalcijum-citratni kompleks, nego i kao tzv. "kristalni otrov", koji se vezuje na površinu kristala ("prava inhibicija"). Citrat(III)-anjon se može vezati za površinu kristala kalcijum-oksalata (CaO_x), pri čemu nastaje ($\text{CaO}_x\text{-citrat}$) kompleks. Ukoliko se to desi, rast kristala i agregacija su efikasno redukovani, tako da i ako dođe do stvaranja kamena, mnogo je manji i izbacuje se putem urinarnog trakta bez većih posledica (Laube i sar., 2002).

Već je ranije potvrđeno (Reiss, 1987, Lončar i sar., 2000) da napitak od čajne gljive sadrži limunsku kiselinu. Takođe, objavljeno je da u smeši sa drugim antioksidantima, kao što je ekstrakt ruzmarina, limunska kiselina ispoljava sinergistički antioksidativni efekat (Rižner Hraš i sar., 2000). Zbog toga je bilo zanimljivo pratiti sadržaj ovog jedinjenja tokom fermentacije čajne gljive. Rezultati sadržaja limunske kiseline tokom fermentacije čajne gljive prikazani su u tabeli 11.

Tabela 11. Sadržaj limunske kiseline tokom fermentacije čajne gljive

Vreme fermentacije (dani)	Limunska kiselina (mg/L)					
	Crni čaj			Zeleni čaj		
	Kombuha	SK1	SK2	Kombuha	SK1	SK2
0	nd*	nd	nd	nd	nd	nd
3	41,4	18,4	11,5	23,0	nd	2,3
7	34,5	23,0	11,5	20,7	18,4	4,6
10	34,5	32,2	18,4	25,3	18,4	13,8

nd*-nije detektovana

Kao što se iz prikazanih rezultata vidi (tabela 11), tokom fermentacije čajne gljive sadržaj limunske kiseline se kontinualno povećava. Izuzetak je uzorak kombuha serije C3. Najviši prosečan sadržaj izmeren je u kombuha seriji na crnom čaju (36,8 mg/L), a najniži u seriji uzoraka SK2 na zelenom čaju (6,9 mg/L). Na oba supstrata SK1 je proizvela veći sadržaj limunske kiseline u odnosu na SK2, a apsolutna vrednost sadržaja je veća na supstratu sa crnim čajem u svim serijama uzoraka. Poređenjem ovih rezultata sa rezultatima merenja ukupne antioksidativne aktivnosti (Slike 18, 19, 25 i 26), uočava se da ne postoji korelacija između sadržaja limunske kiseline i vrednosti AA_{OH} i AA_{DPPH} . Iz navedenog se može zaključiti da uticaj limunske kiseline na antioksidativne karakteristike napitka od čajne gljive nije značajan, ali se ne može zanemariti njena važnost kao prirodnim putem stvorenog konzervansa, koji je uz to veoma bitan za formiranje ukusa.

Rezultati istraživanja antioksidativne aktivnosti napitka od čajne gljive prikazani u ovom radu su pokazali da, što se tiče napitaka proizvedenih na crnom čaju, najveću sposobnost transformacije hidroksi-radikala u stabilne proizvode pokazuje napitak dobijen fermentacijom SK1, tj. kulturom koja se sadržala kvasac *Saccharomyces cerevisiae* i mešanu kulturu sirćetnih bakterija. Napitak SK1 C7 je takode pokazao najveću AA_{DPPH} vrednost. To je proizvod koji je sadržao 5,8 $\mu\text{g}/100\text{ mL}$ vitamina B₂, 20,26 mg/L vitamina C i 23 mg/L limunske kiseline. Napitak kombuha C7 je pokazao nižu antioksidativnu aktivnost, a sadržao je nešto više vitamina B₂ i limunske kiseline, i manje vitamina C, u poređenju sa SK1 C7. Napitak SK2 C7 je pokazao najslabije antioksidativno dejstvo (AA_{OH} i AA_{DPPH}), poredeći ga sa napicima pripremljenim na crnom čaju.

Procenom i poređenjem napitaka proizvedenih na zelenom čaju, uočeno je da najveću sposobnost transformacije i stabilizacije slobodnih radikala, kako veoma reaktivnih hidroksi-, tako i DPPH radikala poseduje kombuha Z7. To je napitak koji je sadržao 8,4

$\mu\text{g}/100\text{ mL}$ vitamina B₂, 7,88 mg/L vitamina C i 20,7 mg/L limunske kiseline. U poređenju sa napitkom kombuha Z7, napici SK1 Z7 i SK2 Z7 su pokazali nižu antioksidativnu aktivnost ($AA_{\bullet\text{OH}}$ i AA_{DPPH}), što je praćeno i nižim sadržajem vitamina B₂ i C, kao i limunske kiseline.

Indikativno je da su napici proizvedeni starter kulturom SK2, koja je bila sastavljena od kvasca *Zygosaccharomyces sp.* i mešane kulture sirćetnih bakterija, pokazali najnižu ukupnu antioksidativnu aktivnost na oba supstrata, te se može zaključiti da ova starter kultura nije pogodna za proizvodnju čajnog napitka. Treba naglasiti da je ta starter kultura imala najnižu produkciju ukupnih kiselina. Međutim, na crnom čaju sa ovom kulturom je produkcija vitamina B₂ veća.

Najbolje antioksidativne karakteristike ($AA_{\bullet\text{OH}}$ i AA_{DPPH}), imali su napici SK1 C7 i kombuha Z7, proizvedeni kulturama mikroorganizama koji su na pomenutim supstratima, tj. crnom i zelenom čaju, imali najviši sadržaj organskih kiselina. Navedena razmatranja potvrdila su opravdanost da acidoproduktivnost bude kriterijum za izbor kvasca/kvasaca za starter kulturu, naravno ukoliko se kvalitet napitka od čajne gljive posmatra samo sa stanovišta njegove antioksidativne aktivnosti. To potvrđuju i izračunate $AA_{\bullet\text{OH}}$ i AA_{DPPH} vrednosti.

Prilikom donošenja odluke koja starter kultura i koji supstrat treba da se koristi za proizvodnju napitka od čajne gljive, treba uzeti u obzir i neke praktične aspekte. Naime, iako napitak pripremljen kulturom kombuhe na zelenom čaju ima skoro istu $AA_{\bullet\text{OH}}$ i AA_{DPPH} vrednost, u poređenju sa napitkom SK1 C7, za proizvodnju napitka od kombuhe visokog antioksidativnog potencijala bi se ipak mogla preporučiti starter kultura SK1 i supstrat crni čaj. Ovakva preporuka ima svoju tehnološku opravdanost, jer se tokom proizvodnje manipuliše sa manjim brojem sojeva mikroorganizama, u poređenju sa kompletnom kulturom kombuhe, a što se tiče crnog čaja zaslađenog saharozom kao supstrata, uslovi fermentacije na njemu su dovoljno detaljno ispitani, dobija se proizvod senzorno veoma dobro prihvatljiv, a ne sme se zanemariti ni činjenica da je tradicionalno mnogo češće korišćen za pripremu napitka od kombuhe.

5. ZAKLJUČAK

- ✓ Karakterizacijom fermentacije i napitka od čajne gljive, pokazalo se da se, lokalnom domaćom kombuhom karakterističnom za ovo podneblje, može proizvesti napitak koji sadrži 0,28 g/L glukuronske kiseline, 0,26 g/L mlečne kiseline, 5,99 g/L ukupnih kiselina i 3,34 g/L isparljivih kiselina. Lokalna domaća kultura brže metabolizira fruktozu od glukoze, na temperaturi od 28 °C.
- ✓ U cilju istraživanja antioksidativne aktivnosti napitka od čajne gljive, za desetodnevnu fermentaciju zaslađenog crnog i zelenog čaja, na temperaturi od 28°C, su korišćene kulture nativne kombuhe (kombuha), acidoproduktivnija starter kultura SK1 i manje acidoproduktivna kultura SK2. Starter kulture su formirane od izolata čajne gljive i to: SK1-mešana kultura sirćetnih bakterija i *Saccharomyces cerevisiae*; SK2- mešana kultura sirćetnih bakterija i *Zygosaccharomyces sp.* Osim analize antioksidativne aktivnosti, rad sa starter kulturama ima i tehnološku opravdanost.
- ✓ Svi ispitivani uzorci fermentacione tečnosti i napitaka izazvali su sniženje intenziteta ESR signala hidroksi-radikala. Vrednosti antioksidativnog efekta na hidroksi-radikale (AA_{OH}) su se kretale od 39 do 61,2%. Najznačajniji pad intenziteta ESR signala DMPO-OH spin adukta zabeležen je u uzorcima uzetim nakon 3 dana fermentacije, kada je prosečna AA_{OH} vrednost iznosila 47,71%. U daljem toku, od trećeg dana pa do kraja desetodnevne fermentacije, promena AA_{OH} vrednosti je bila mnogo manje značajna i u proseku je zabeležen porast od 7,59%. Indikativno je da su za ovakve promene odgovorna jedinjenja, koje metabolizmom stvara čajna gljiva.
- ✓ Sniženje intenziteta ESR signala DPPH radikala su izazvali svi uzorci i to od 9,09% do 76,14%. Najznačajniji, a ujedno i najveći pad intenziteta ESR signala bio je posle 3 dana fermentacije, u svim ispitivanim serijama uzoraka, što znači da je antioksidativna aktivnost na DPPH radikale (AA_{DPPH}) tad bila najveća i do kraja fermentacije je pokazala tendenciju opadanja. Ovo je u suprotnosti sa trendom promena AA_{OH} .
- ✓ Serija uzoraka SK1 na crnom i kombuha serija na zelenom čaju pokazuju najveću prosečnu antioksidativnu aktivnost i na hidroksi- i na DPPH radikale.

- ✓ Poređenjem prosečnih $AA_{\cdot OH}$ i AA_{DPPH} i vrednosti sadržaja ukupnih kiselina odgovarajućih serija, uočava se da serija koja poseduje veću kiselost ima veći prosečan $AA_{\cdot OH}$ i AA_{DPPH} efekat. Time je dokazano da je acidoproduktivnost dobar kriterijum za izbor starter kulture za fermentaciju.
- ✓ Sedmog dana fermentacije, kada se napitak preporučuje za konzumiranje, najveći sadržaji vitamina B₂ izmereni su u uzorcima kombuha serije na zelenom čaju 8,4 µg/100 mL, odnosno na crnom čaju 7,5 µg/100 mL. Prateći tok fermentacije u celini, najviše vrednosti sadržaja vitamina B₂ zabeležene su u kombuha serijama. Za ovakvu pojavu je odgovoran mikrobiološki sastav kvasaca, koji su najznačajniji producenti vitamina B grupe.
- ✓ Pri granici detekcije od 3 µg/100 mL, vitamin B₆ nije detektovan. Kako već postoje podaci o njegovom prisustvu u napitku od čajne gljive, moguće je da je sintetisan u količini nižoj od ove vrednosti.
- ✓ Sadržaj vitamina C produkovanog tokom fermentacije kombuhe je, prosečno gledano, značajno veći u uzorcima dobijenim na crnom čaju kao supstratu. Pošto je za sve kultivacione smeše izvor ugljenika isti, kako kvalitativno, tako i kvantitativno, jasno je da je hemijski sastav crnog čaja uzrok ovakvog ishoda.
- ✓ Analitičke tehnike, ESR spektroskopija za određivanje slobodnih radikala, kao i HPLC metod sa fluorescentnim detektorom za određivanje vitamina B₂ i B₆, koje do sada nisu primenjivane na matriks napitka od čajne gljive, pokazale su se veoma pogodne, sa visokom reproduktivnošću rezultata i jednostavnom pripremom uzoraka.
- ✓ Ne postoji korelacija između sadržaja limunske kiseline i vrednosti AA, bilo da su u pitanju hidroksi- ili DPPH radikali. Može se zaključiti da uticaj limunske kiseline na antioksidativne karakteristike napitka od čajne gljive nije značajan.
- ✓ Analiza $AA_{\cdot OH}$ i AA_{DPPH} i sadržaja nekih antioksidanata u napicima ukazuju da bi se za proizvodnju napitka od kombuhe visokog antioksidativnog potencijala mogla preporučiti starter kultura SK1 i supstrat crni čaj. Ovakva preporuka ima svoju tehnološku opravdanost, jer se tokom proizvodnje manipuliše sa manjim brojem sojeva mikroorganizama, u poređenju sa kompletnom kulturom kombuhe. Uslovi fermentacije na crnom čaju zaslađenom saharozom kao supstratu su dovoljno detaljno ispitani, dobija se proizvod senzorno veoma dobro prihvatljiv, a ne sme se zanemariti ni činjenica da je tradicionalno mnogo češće korišćen za pripremu kombuha napitka, što je za konzumente veoma bitno.

6. SUMMARY

- ❖ The characterization of fermentation of the tea fungus that is characteristic for this area showed the possibility for production of the beverage that contains 0.28 g/L of glucuronic acid, 0.26 g/L of lactic acid, 5.99 g/L of total and 3.34 g/L of volatile acids. Local tea fungus culture metabolized fructose prior than glucose at 28°C.
- ❖ For the investigation of the antioxidant activity of the tea fungus beverage, native kombucha culture (kombuha), starter culture with more intensive production of organic acids (SK1) and starter culture with less intensive production of organic acids (SK2) were used. They were cultivated on the sweetened black and green tea. Starter cultures were formed of the tea fungus isolates: SK1- mixed culture of acetic bacteria and *Saccharomyces cerevisiae*; SK2- mixed culture of acetic bacteria and *Zygosaccharomyces sp.* Besides the analysis of the antioxidant activity, manipulation with starter cultures is technologically justified.
- ❖ All the examined samples of the fermentative liquids and the beverages caused the decrease of the intensity of ESR signal of the hydroxyl-radicals. Values of $AA_{\cdot OH}$ were from 39 to 61.2%. The most significant decrease of the intensity of ESR signal of DMPO-OH spin adduct was noticed after 3 days of fermentation when average $AA_{\cdot OH}$ was 47.71%. Till the end of the 10 days long fermentation $AA_{\cdot OH}$ changes were slighter and the average increase was 7.59%. For this kind of changes were responsible substances produced by means of the tea fungus.
- ❖ The decrease of the intensity of ESR signal of DPPH radicals was noticed in the all samples in a range of 9.09 to 76.14%. The highest decrease of ESR signal was after 3 days of fermentation. It means that AA_{DPPH} was the highest at that point and was decreasing till the end of fermentation. This trend was opposite than $AA_{\cdot OH}$ trend.
- ❖ The SK1 samples on the black and the kombuha samples on the green tea showed the highest average antioxidant activity ($AA_{\cdot OH}$ and AA_{DPPH}).
- ❖ The comparison of the average $AA_{\cdot OH}$, AA_{DPPH} and total acid content of appropriate series of the samples indicated the fact that the samples with higher content of total acids had higher average $AA_{\cdot OH}$ and AA_{DPPH} . It was proved that the production of organic acids is good criteria for the selection of the starter culture for the fermentation.

- ❖ After 7 days of fermentation, when the beverage is recommended for the consumption, the highest contents of vitamin B₂ were measured in samples of kombucha series on the green tea (8.4 µg/100 mL) and on the black tea (7.5 µg/100 mL). This was caused by yeasts that are the most important producers of the vitamins of B group.
- ❖ Vitamin B₆ was not detected in any sample with detection limit of 3 µg/100 mL. It is possible that B₆ was synthesized below that value.
- ❖ The content of vitamin C produced during kombucha fermentation was significantly higher in the samples obtained on the black tea as a substrate. The chemical composition of the black tea caused this result.
- ❖ ESR spectroscopy for the determination of the free radicals and HPLC method with fluorescent detector for the determination of vitamins B₂ and B₆ are the methods that were not used earlier on for the analysis of matrix of the tea fungus beverage. High reproducibility of the results and the simple sample preparation indicated the suitability of the methods mentioned above.
- ❖ It could be concluded that the influence of the content of citric acid on the antioxidant characteristics of the tea fungus beverage was not significant, because there was not correlation between the content of citric acid and AA values.
- ❖ Analysis of the AA_{•OH}, AA_{DPPH} and the content of the some antioxidants in the beverages indicates that SK1 culture that grows on the sweetened black tea can be recommended for the production of the kombucha beverage with high antioxidant potential. This suggestion has the technological justification because of the manipulation with less number of microorganisms, in comparison with the complete kombucha culture. Fermentation conditions on the black tea sweetened with the sucrose as a substrate are well enough investigated. The product has good sensorial characteristics and the fact is that the black tea was traditionally used for the kombucha beverage preparation. That is very important for the consumers.

7. LITERATURA

- Ahrem, A. A. i Kuznecova, A. I. (1976): Hromatografija na tankom sloju. Savez studenata PMF-a, Beograd, 1976.
- Barnouin, J., Perez Cristia, R., Chassagne, M., Barrios, T. V., Arnaud, J., Fleits Mestre, P. and Favier, A. (2000): Vitamin and nutritional status in Cuban smokers and nonsmokers in the context of an emerging epidemic neuropathy. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* 70 (3), 126-138.
- Barrie, S. A., Wright, J. V., Pizzorno, J. E., Kutter, E. and Baron, P. C. (1987): Comparative absorption of zinc picolinate, zinc citrate and zinc glukonate in humans. *Agents Actions* 21 (1-2), 223-238.
- Bauer-Petrovska, B. and Petrushevska-Tozi, L. (2000): Mineral and water soluble vitamins content in the Kombucha drink. *International Journal of Food Science and Technology* 35, 201-205.
- Bazarewski, S. (1915): Über den sogenannten "Wunderpilz" in den baltischen Provinzen. *Correspondenzblatt Naturforscher-Verein, Riga* 57, 61-69.
- Blanc, P. J. (1996): Characterization of the Tea Fungus Metabolites. *Biotechnology letters* 18 (2), 139-142.
- Bloch, A. S. (2000): Pushing the Envelope of Nutrition Support: Complementary Therapies. *Nutrition* 16, 236-239.
- Bognår, A. and Ollilainen, V. (1997): Influence of the extraction on the determination of vitamin B₆ in food by HPLC. *Z. Lebensm. Unters. Forsch. A* 204, 327-335.
- Bohles, H. (1997): Antioxidative vitamins in prematurely and maturely born infants. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* 67 (5), 321-328.
- Brown, M. D. (1999): Green Tea (*Camellia Sinensis*) Extract and Its Possible Role in the Prevention of Cancer. *Altern. Med. Rev.* 4 (5), 360-370.
- Brun, J. F., Guinrand-Hugret, R., Fons, C., Carvajal, J., Fedou, C., Fussellier, M., Bardet, L. and Orsetti, A. (1995): Effects of oral zinc gluconate on glucose

- effectiveness and insulin sensitivity in humans. *Biol. Trace Elem. Res.* 47 (1-3), 385-391.
- Chaney, S. G. (1997): Principles of Nutrition II: Micronutrients in: Textbook of Biochemistry With Clinical Correlation, Devlin, T. M. (ed.), A John Wiley&Sons, Inc., Publication, Willey-Liss, Inc., New York, 1121.
 - Chen, C. and Liu, B. Y. (2000): Changes in major components of tea fungus metabolites during prolonged fermentation. *Journal of Applied Microbiology* 89, 834-839.
 - Currier, R. W., Goddard, J., Buechler, K. and Quinlisk, M. P. (1995): Unexplained Severe Illness Possibly Associated with Consumption of Kombucha Tea-Iowa. *MMWR* 44 (48), 897-900.
 - Cvetković, D. (2003): Metabolička aktivnost čajne gljive na različitim supstratima. Magistarska teza, Tehnološki fakultet, Novi Sad.
 - Čanadanović-Brunet, J. (1997): Kiseonikovi slobodni radikali prirodnih i model sistema. Doktorska disertacija, Tehnološki fakultet, Novi Sad.
 - Čanadanović-Brunet, J. (1998): Oxygen free radicals and natural antioxidants. Monografija, Zadužbina Andrejević, Belgrade, 30-54.
 - Danielova, L. T. (1954): K morfologii "čajnog griba". *Trudy Erevanskogo zooveterinarnog Instituta* 17, 201-206.
 - Danielova, L. T. (1957): K himičeskomu sastavu i fiziko-himičeskim svojstvama kul'turalnoj židkosti čajnog griba. *Trudy Erevanskogo zooveterinarnog Instituta* 22, 111-121.
 - Danielova, L. T. (1959): Vlijanije baktericidina na dyhanie bakterij. *Trudy Erevanskogo zooveterinarnog Instituta* 23, 165-169.
 - De Lay, J. (1984): Family VI *Acetobacteriaceae*. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (Eds Kreig, R. N., Holt, G. J.), Williams&Wilkins Co., Baltimore.
 - Deppenmeier, U., Hoffmeister, M. and Prust, C. (2002): Biochemistry and biotechnological applications of *Gluconobacter* strains. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 60, 233-242.
 - Djilas, S. M., Čanadanović-Brunet, J. and Četković, G. S. (2002): Antioxidants in Food. *Chem. Ind.* 56 (3), 105-112.

- Dufresne, C. and Farnworth, E. (2000): Tea, Kombucha, and health: a review. *Food Research International* 33 (6), 409-421.
- Du Toit, R., Volsteedt, Y. And Apostolides, Z. (2001): Comparison of the antioxidant content of fruits, vegetables and teas measured as vitamin C equivalents. *Toxicology* 166 (1-2), 63-69.
- Dutton, G. (1980): *Glucuronidation of drugs and other compounds*. CRC Press, Boca Raton.
- Exarchou, V., Nenadis, N., Tsimidou, M., Gerothanassis, I. P., Troganis A. and Boskou, D. (2002): Antioxidant Activities and Phenolic Composition of Extracts from Greek Oregano, Greek Sage, and Summer Savory. *J. Agric. Food Chem.* 50, 5294-5299.
- Frank, G. W. (1995): *Das Teepilz- Getränk*. Ennsthaler Verlag, A-4402 Steyr.
- Filho, L. X., Paulo, M. Q., Pereira, E. C. and Vicente, C. (1985): Phenolics from tea fungus analyzed by high performance liquid chromatography. *Phyton* 45 (2), 187-191.
- Fontana, J. D., Valeria, C. F., De Souza, S. J., Lyra, I. N. and De Souza, A. M. (1991): Nature of plant stimulators in the production of *Acetobacter xylinum* ("tea fungus") biofilm used in skin therapy. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 28/29, 341-351.
- Goldbohm, R. A., Hertog, M. G. L. and Henny, A. M. (1996): Consumption of Black Tea and Cancer Risk: a Prospective Study. *Journal of the National Cancer Institute* 88 (2), 93-100.
- Graham, H. N. (1992): Green Tea Composition, Consumption, and Polyphenol Chemistry. *Preventive Medicine* 21, 334-350.
- Greenwalt, C. J., Ledford, R. A. and Steinkraus, K. H. (1998): Determination and Characterization of the Antimicrobial Activity of the fermented Tea *Kombucha*. *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.*, 31, 291-296.
- Greenwalt, C. J., Steinkraus, K. H. and Ledford, R. A. (2000): Kombucha, the Fermented Tea: Microbiology, Composition, and Claimed Health Effects. *Journal of Food Protection* 63 (7), 976-981.
- Hais, M. I. i Macek, K. (1959): *Papirova Chromatografie*. Nakladatelstvi Československe Akademie Ved, Praha.

- Hartman, A. M., Bureson, L. E., Holmes, A. K. and Geist, C. (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.
- Hauser, S. P. (1990): Sklenar's Kombucha mushroom infusion-a biological cancer therapy. *Schweiz. Rundsch. Med. Prax.*, 27 (9), 243-246.
- Herrera, T. and Calderon-Villagomez, A. (1989): Species of yeasts isolated in Mexico from the tea fungus. *Rev. Mex. Micol.* 5, 205-210.
- Hesseltine, C. W. (1965): A Millenium of Fungi. *Food and Fermentation, Mycologia* 57 (2), 148-167.
- Hirschsteiner, T. (2000): Home Remedies (English translation). Barron's Educational Series, Inc., Hauppauge, New, York.
- Ho, C., Chen, Q., Shi, H., Zhang, K. and Rosen, R. T. (1992): Antioxidative Effect of Polyphenol Extract Prepared from Various Chinese Teas. *Preventive Medicine* 21, 520-525.
- Ishida, Y. (1999): Kombucha. *MJA* 170, 454.
- Janković, I. (1995): Određivanje međusobnih odnosa mikrobnih asocijacija i biohemijskih karakteristika čajne gljive. Magistarska teza, Poljoprivredni fakultet, Beograd.
- Kappel, T., Anken, H. R. (1993): The tea mushroom. *The Mycologist* 7 (1), 12-13.
- Kaufmann, K. (1996): Kombucha Rediscovered. Alive Books, Canada.
- Konovalov, I. N. i Semenova, M. N. (1955): K fiziologii "čajnog griba". *Bot. Žurnal (Moskva)* 40 (4), 567-570.
- Kurtzman, C. P., Robnett, C. J., Basehoar-Powers, E. (2001): *Zygosaccharomyces kombuchaensis*, a new ascosporegenous yeast from 'Kombucha tea'. *FEMS Yeast Research* 1, 133-138.
- Laube, N., Jansen, B. and Hesse, A. (2002): Citric acid or citrates in urine: which should we focus on in the prevention of calcium oxalate crystals and stones? *Urol. Res.* 30 (5), 336-341.

- La Vecchia, Altieri, A. and Tavani, A. (2001): Vegetables, fruit, antioxidants and cancer: a review of Italian studies. *Eur. J. Nutr.* 40 (6), 261-267.
- Leung, L. K., Su, Y., Chen, R., Zhang, Z., Huang, Y. and Chen, Z. Y. (2002): Theaflavins in black tea and catechins in green tea are equally effective antioxidants. *J. Nutr.* 132 (4), 785-786.
- Liang, B., Chung, S., Araghiniknam, M., Lane L. C. and Watson, R. R. (1996): Vitamins and immunomodulation in AIDS. *Nutrition* 12, 1-7.
- List, P.H., Hufschmidt, W. (1959): *Basische Pilzinhaltstoffe: 5. Über Biogene Amine und Aminosäuren des Teepilzes.* *Pharm. Zentralhalle* 98, 594-598.
- Liu, C. H., Hsu, W. H., Lee, F. L. and 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, E. S., Petrović, S. E., Malbaša, R.V. and Verac, R. M. (2000): Biosynthesis of glucuronic acid by means of tea fungus. *Nahrung* 44 (2), 138-139.
- Lončar, E. S., Malbaša, R. V., Kolarov, Lj. A. (2001): Metabolic activity of tea fungus on molasses as a source of carbon. *Acta Periodica Technologica* 32, 21-26.
- Lončar, E. S., Milanović, S. D., Carić, M. Đ., Malbaša, R. V. i Panić, M. D. (2001): Metabolička aktivnost čajne gljive u mleku. *Prehrambena industrija-Mleko i mlečni proizvodi* 12 (1-2), 13-17.
- Maestro-Durán, R., Borja-Padilla, R. (1993): Actividad antioxidante de compuestos naturales nitrogenados. *Grasas Aceites* 44 (3), 204-207.
- Malešević, Z. (2002): Ispitivanje antioksidativne aktivnosti čajeva elektron spin rezonantnom spektroskopijom. Magistarski rad, Tehnološki fakultet, Novi Sad.
- Malbaša, R. (2000): Mogućnost dobijanja dijetetskog napitka pomoću čajne gljive. Magistarski rad, Tehnološki fakultet, Novi Sad.
- Malbaša, R. V., Lončar, E. S. and Kolarov, Lj. A. (2002): Sucrose and Inulin Balance During Tea Fungus Fermentation. *Roumanian Biotechnological Letters* 7 (1), 573-576.
- Malbaša, R. V., Lončar, E. S. and Kolarov, Lj. A. (2002): L-ascorbic, L-lactic, Total and Volatile Acids Contents in Dietetic Kombucha Beverage. *Roumanian Biotechnological Letters* 7 (5).

- Malbaša, R. V., Lončar, E. S., Suturović, Z. J. and Kolarov, Lj. A. (2002): Lead-, zinc- and copper-ions in dietetic tea fungus beverage. 6th International Symposium Interdisciplinary Regional Research Hungary-Romania-Yugoslavia. Papers proceedings on CD-ROM.
- Markov, S. L., Malbaša, R. V., Hauk, M. J. and Cvetković, D. D. (2001): Investigation of tea fungus microbe associations. I. The Yeasts. *Acta Periodica Technologica* 32, 133-138.
- Marleta, M. A., Light, D. R. (1985): *Flavins in Modern Chromatographic Analysis of the Vitamins*, edited by De Leenheer, Lambert, De Ruyter, Marcel Decker, Inc., New York and Basel, 413-431.
- Mathew, J. L., Kabi, B. C. and Rath, B. (2002): Anti-oxidant vitamins and steroid responsive nephritic syndrome in Indian children. *J. Paediatr. Child. Health.* 38 (5), 450-457.
- Mayser, P., Fromme, S., Leitzmann, C. and Grunder, K. (1995): The yeast spectrum of the 'tea fungus Kombucha'. *Mycoses* 38 (7-8), 289-295.
- Milanović, S. D., Carić, M. Đ., Lončar, E. S., Panić, M. D., Malbaša, R. V. i Dobrić, D. Đ. (2002): Primena koncentrata čajne gljive u proizvodnji fermentisanih melčnih napitaka. *Prehrambena industrija-Mleko i mlečni proizvodi* 13 (1-2), 8-13.
- Mukhtar, H. and Ahmad, N. (2000): Tea polyphenols: prevention of cancer and optimizing health. *Am. J. Clin. Nutr.* 71, 1698S-1702S.
- Murugesan, G. S., Angayarkanni, J. and Swaminathan, K. (2002): Effect of tea fungal enzymes on the quality of black tea. *Food Chemistry* 79, 411-417.
- Nathens, A. B., Neff, M. J., Jurkovich, G. J., Klotz, P., Farver, K., Ruzinski, J. T., Radella, F., Garcia, I. and Maier, R. V. (2002): Randomized, prospective trial of antioxidant supplementation in critically ill surgical patients. *Ann Surg.* 236 (6), 814-822.
- Neve, J., Hanocq, M., Peretz, A., Khalil, F. A. and Pelen, F. (1992): Absorption and metabolism of oral zinc gluconate in humans in fasting state, during, and after a meal. *Biol. Trace Elem. Res.* 32, 201-212.
- Nir, I. (1964): Determination of Glucuronic Acid by Naphthoresorcinol. *Analytical biochemistry* 8, 20-23.

- OIV, Paris (1990): Recequeil de methods internationaux d' analyse des vins et des monts, 155-159.
- Okamoto, H., Nakajima, T. and Ito, Y. (2003): Simultaneous determination of water-soluble vitamins in a vitamin-enriched drink by an in-capillary enzyme reaction method. *Journal of Chromatography A* 986, 153-161.
- Panaia, M., Senaratna, T., Bunn, E., Dixon, K. W. and Sivasithamparam, K. (2000): Micropropagation of the critically endangered Western Australian species, *Symonanthus bancroftii* (F. Muell.) L. Haegi (*Solanaceae*). *Plan Cell, Tissue and Organ Culture* 63 (1), 23-29.
- Parshad, R., Sanford, K. K., Price, F. M., Steele, V. E., Tarone, R. E., Kellof, G. J. and Boone, C. W. (1998): Protective Action of Plant Polyphenols on Radiation-Induced Chromatid Breaks in Cultured Human Cells. *Anticancer Research* 18, 3263-3266.
- Perron, A. D., Patterson, J. A. and Yanofsky, N. N. (1995): Kombucha "Mushroom" Hepatotoxicity. *Annals of Emergency Medicine* 26 (5), 660-661.
- Petrović, S., Lončar E. (1996): Content of water-soluble vitamins in fermentative liquids of tea fungus. *Mikrobiologija* 33 (2), 101-106.
- Petrović, S. E., Lončar, E. S., Kolarov, Lj. A. and Malbaša, R. V. (1997): Vitamin C Biosynthesis by Tea Fungus Using Jerusalem Artichoke Tubers Extract. *Acta Periodica Technologica* 28, 67-72.
- Petrović, S. E., Suturović, Z. J., Lončar, E. S., and Malbaša, R. V. (1999): Potentiometric stripping analysis of certain metal ions in tea fungus beverage. *Nahrung* 43 (5), 345-346.
- Petrović, S. E., Lončar, E. S., Malbaša, R. V. (1998-1999): Tryptophan in Metabolites of Tea Fungus on a Jerusalem Artichoke as a Source of Carbon. *Acta Periodica Technologica* 29-30, 191-197.
- Phan, T.G., Estell, J., Duggin, G., Beer, I., Smith, D. and Ferson, M. J. (1998): Lead poisoning from drinking Kombucha tea brewed in a ceramic pot. *MJA* 169, 644-646.
- Potter, S. M., Kies, C. V. and Rojhani, A. (1990): Protein and fat utilization by humans as affected by calcium phosphate, calcium carbonate, and manganese gluconate supplements. *Nutrition* 6 (4), 309-312.
- Record, I. R., McInerney, J. K. and Dreosty, I. E. (1996): Black Tea, Green Tea, and Tea Polyphenols. *Biological Trace Elements Research* 53, 27-43.

- Reiss, J. (1987): Der Teepilz und seine Stoffwechselproducte. Deutsche Lebensmittel-Rundschau 9, 286-290.
- Reiss, J. (1994): Influence of different sugars on the metabolism of the tea fungus. Z Lebensm Unters Forsch 198, 258-261.
- Rižner Hraš, A., Hadolin, M., Knez, Ž. and Bauman, D. (2000): Comparison of antioxidative and synergistic effects of rosemary extract with α -tocopherol, ascorbil palmitate and citric acid in sunflower oil. Food Chemistry 71, 229-233.
- Roussin, M. R. (1996): Analyses of Kombucha ferments: report on growers. Information Resources, LC, Salt Lake City, Utah.
- Sadjadi, J. (1998): Cutaneous Antrax Associated with the Kombucha "mushroom" in Iran. JAMA 280 (18), 1567-1568.
- Şafak, S., Mercan, N., Aslim, B. and Beyatli, Y. (2002): A study on the production of poly-beta-hydroxybutyrate by some eukaryotic microorganisms. Turkish Electronic Journal of Biotechnology, Special Issue, 11-17.
- Sai Ram, M., Anju, B., Pauline, T., Dipti Prasad, A. K., Kain, S. S., Mongia, S., Sharma, K., Singh, B., Singh, R., Ilavazhagan, G., Devendra, K. and Selvamurthy, W. (2000): Effect of Kombucha tea on chromate(VI)-induced oxidative stress in albino rats. Journal of Ethnopharmacology 71, 235-240.
- Sánchez-Mata, M. C., Cámara-Hurtado, M., Díez-Marques, C. and Torija-Isasa, M. E. (2000): Comparison of high-performance liquid chromatography and spectrofluorimetry for vitamin C analysis of green beans (*Phaseolus vulgaris* L.). Eur. Food Res. Technol. 210, 220-225.
- Schramm, M., Hestrin, S. (1954): Factors affecting Production of Cellulose at the Air/Liquid Interface of a Culture of *Acetobacter xylinum*. J. gen. Microbiol. 11, 123-129.
- Sievers, M., Lanini, C., Weber, A., Schuler-Schmid, U. and Teuber, M. (1995): Microbiology and Fermentation Balance in a Kombucha Beverage Obtained from a Tea Fungus Fermentation. System. Appl. Microbiol. 18, 590-594.
- Sreeramulu, G., Zhu, Y. and Knol, W. (2000): Kombucha Fermentation and Its Antimicrobial Activity. Journal of Agricultural and Food Chemistry 48 (6), 2589-2594.

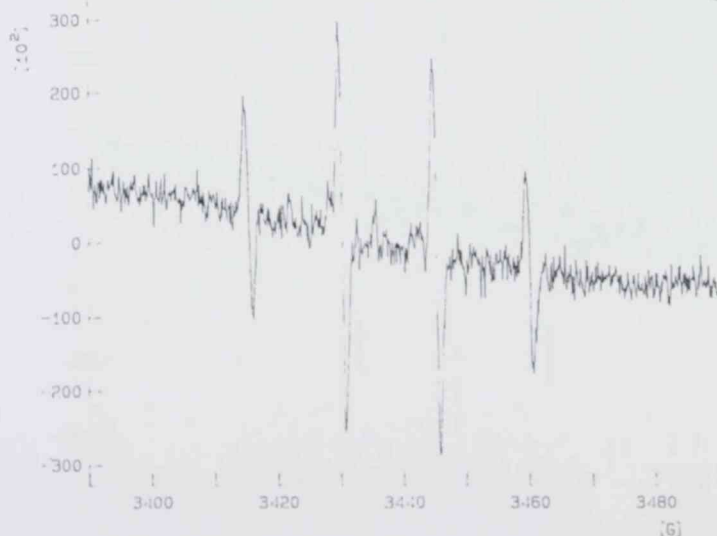
- Srinivasan, R., Smolinske, S. and Greenbaum, D. (1997): Probable Gastrointestinal Toxicity of Kombucha Tea. Is this beverage healthy or harmful? *J. Gen. Intern. Med.* 12, 643-644.
- Steels, H., James, S. A., Bond, C. J., Roberts, I. N., Stratford, M. (2002): *Zygosaccharomyces kombuchaensis*: the physiology of a new species related to the spoilage yeasts *Zygosaccharomyces lentus* and *Zygosaccharomyces bailii*. *FEMS Yeast Research* 2, 113-121.
- Steiger, K. E., Steinegger, E. (1957): Über den Teepilz. *Pharm Acta Helv.* 32, 133-154.
- Steinkraus, K. H., Shapiro, K. B., Hotchkiss, J. H., Mortlock, R.P. (1996): Investigations into the Antibiotic Activity of Tea Fungus/Kombucha Beverage. *Acta Biotechnol.* 16 (2-3), 199-205.
- Steinkraus, K. H. (1997): Classification of fermented foods: worldwide review of household fermentation techniques. *Food Control* 8 (5/6), 311-317.
- Stepuro, I. I., Adamchuk, R. I. and Stepuro, A. I. (2002): Interaction of riboflavin and hemoproteins with organic free radicals and superoxide anions generated in the ultrasound field. *Biofizika* 47 (6), 977-988.
- Stocker, P., Lesgards, J-F., Vidal, N., Chalier, F. and Prost, M. (2003): ESR study of a biological assay on whole blood: antioxidant efficiency of various vitamins. *Biochimica et Biophysica Acta* (in press), dostupno on-line.
- Stoner, G. D. and Mukhtar, H. (1995): Polyphenols as Cancer Chemopreventive Agents. *Jornal of Cellular Biochemistry, Supplement* 22, 169-180.
- Stroev, E. A. (1989): *Biochemistry* (translated from the Russian). Mir Publishers, Moskow, 348.
- Suh, J., Zhu, B. Z. and Frei, B. (2003): Ascorbate does not act as a pro-oxidant towards lipids and proteins in human plasma exposed to redox-active transition metal ions and hydrogen peroxide. *Free Radic. Biol. Med.* 34 (10), 1306-1314.
- Sun, C., Zhang, W., Wang S. and Zhang, Y. (2000): Effect of chromium gluconate on body weight, serum leptin and insulin in rats. *Wei Sheng Yan Jiu.* 29 (6), 370-371.
- Swain, C. and Chainy, G. B. N. (1998): Effects of aluminum sulphate and citric acid ingestion on lipid peroxidation and on activities of superoxide dismutase and catalase in cerebral hemisphere and liver of developing young chicks. *Molecular and Cellular Biochemistry* 187 (1-2), 163-172.

- Tauler, P., Aguilo, A., Gimeno, I., Fuentespina, E., Tur, J. A. and Pons, A. (2003): Influence of vitamin C diet supplementation on endogenous antioxidant defences during exhaustive exercise. *Pflugers Arch.* 12, (in press), dostupno on-line.
- Valentin, H. (1930): Wesentliche Bestandteile der Grungsprodukte in den durch Pilztzigkeit gewonnenen Hausgetränken sowie die Verbreitung der letzteren. *Apoth. Ztg.* 45, (91) 1464-1465; (92) 1477-1478.
- Vanderslice, J. T., Brownlee, S. G., Cortissoz, M. E. and Maire, C. E. (1985). "Vitamin B₆ analysis: Sample preparation, extraction procedures, and chromatographic separations." In: *Modern Chromatographic Analysis of the Vitamins*, edited by De Leenheer, Lambert, De Ruyter, Marcel Decker, Inc., New York and Basel, pp. 435-475.
- Vijayaraghavan, R., Singh, M., Rao, P. V. L., Bhattacharya, R., Kumar, P., Sugendran, K., Kumar, O., Pant, S. C. and Singh, R. (2000): Subacute (90 Days) Oral Toxicity Studies of Kombucha Tea. *Biomedical and Environmental Sciences* 13, 293-299.
- Wang, Z. Y., Cheng, S. J., Zhou, Z. C., Athar, M., Khan, W. A., Bickers, D. R. and Mukhtar, H. (1989): Antimutagenic activity of green tea polyphenols. *Mutation Research* 223, 273-285.
- Wiseman, S. A., Balentine, D. A. and Frei, B. (1997): Antioxidants in Tea. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 37 (8), 705-718.
- Xu, Z., Vitolo, M., Northfleet Albuquerque, C. and Pessoa Jr., A. (2002): Affinity partitioning of glucose-6-phosphate dehydrogenase and hexokinase in aqueous two-phase systems with free triazine dye ligands. *Journal of Chromatography B* 780, 53-60.
- Yam, T. S., Shah, S., Hamilton-Miller, J. M. T. (1997): Microbiological activity of whole and fractionated crude extracts of tea (*Camellia sinensis*), and of tea components. *FEMS Microbiology Letters* 152, 169-174.
- Zhao, B., Li, X., He, R., Cheng, S. and Wenjuan, X. (1989): Scavenging Effect of Extract of Green Tea and Natural Antioxidants on Active Oxygen Radicals. *Cell Biophysics* 14, 175-185.
- Zhang, A., Zhu, Q. Y., Luk, Y. S., Ho, K. Y., Fung, K. P. and Chen, Z. (1997): Inhibitory effects of jasmine green tea epicatechin isomers on free radical-induced lysis of red blood cells. *Life Sciences* 61 (4), 383-394.

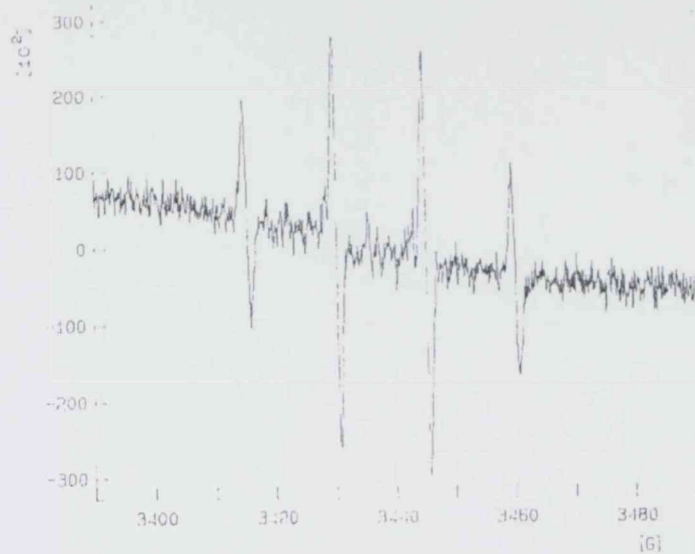
8. PRILOG

Ovo poglavlje je napisano kako diskusija rezultata ne bi bila preterano opterećena slikama. U poglavlju 4., Rezultati i diskusija, prikazani su samo karakteristični ESR spektri, kao i hromatogrami uzoraka čaja i fermentativnih tečnosti, ispitivanih HPLC tehnikom. U ovom prilogu prikazano je 48 slika. Na slikama od 33 do 48 su ESR spektri DMPO-OH spin adukata, od 49 do 64 ESR spektri DPPH radikala, a na slikama od 65 do 80 HPLC hromatogrami u sistemu za određivanje vitamina B₂.

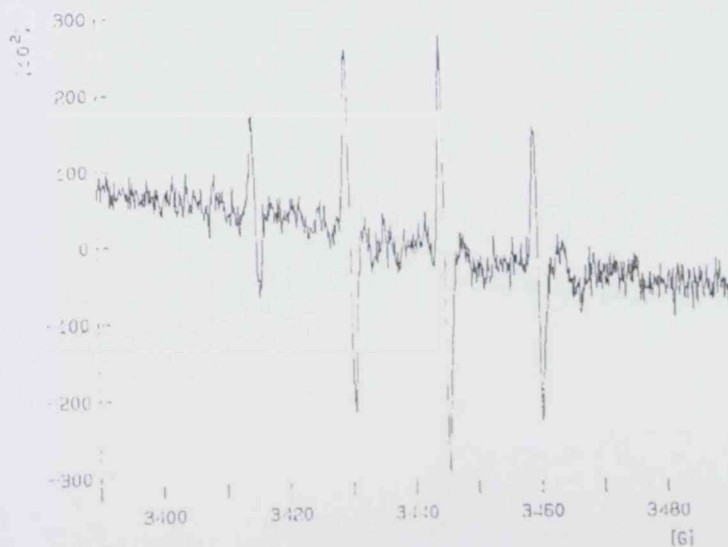
Kako HPLC tehnikom u opisanom sistemu za određivanje vitamina B₆ nije došlo do detekcije, pojedinačni hromatogrami za sve ispitivane uzorke nisu prikazani.



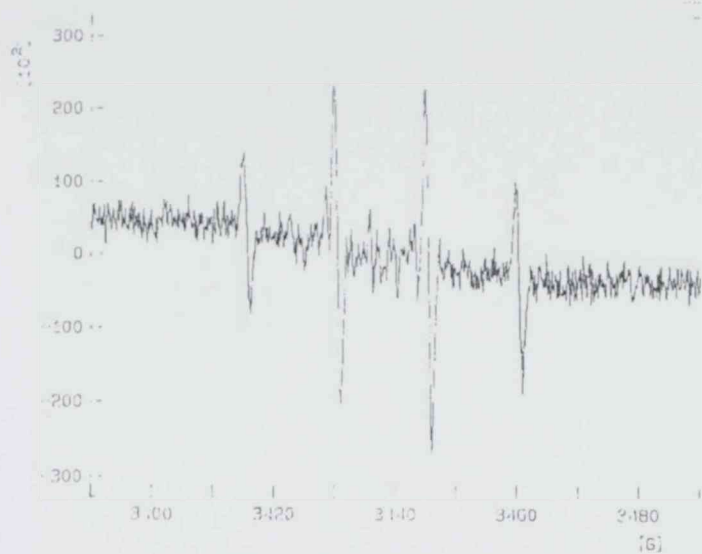
Slika 33. ESR spektar DMPO-OH spin adukta u prisustvu uzorka kombuha C3



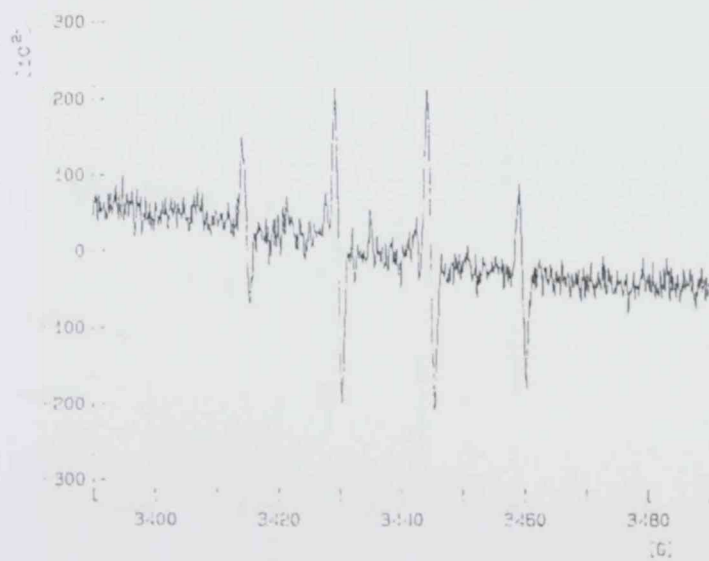
Slika 34. ESR spektar DMPO-OH spin adukta u prisustvu uzorka kombuha C7



Slika 35. ESR spektar DMPO-OH spin adukta u prisustvu uzorka kombuha C10



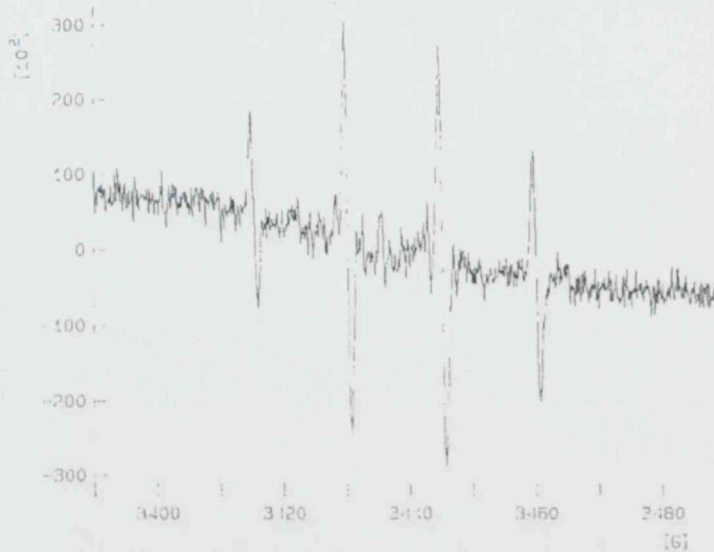
Slika 36. ESR spektar DMPO-OH spin adukta u prisustvu uzorka SK1 C3



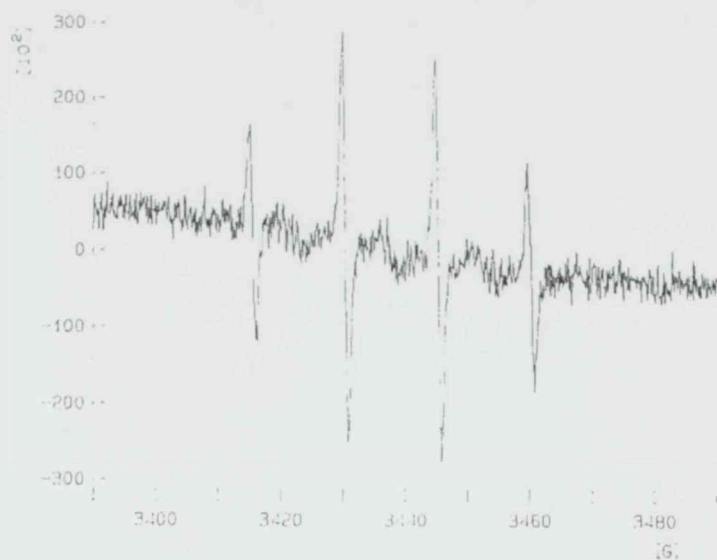
Slika 37. ESR spektar DMPO-OH spin adukta u prisustvu uzorka SK1 C7



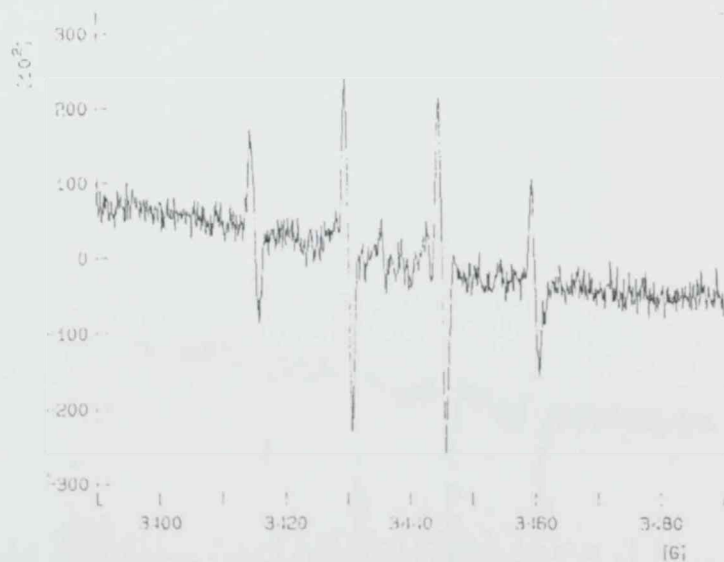
Slika 38. ESR spektar DMPO-OH spin adukta u prisustvu uzorka SK2 C3



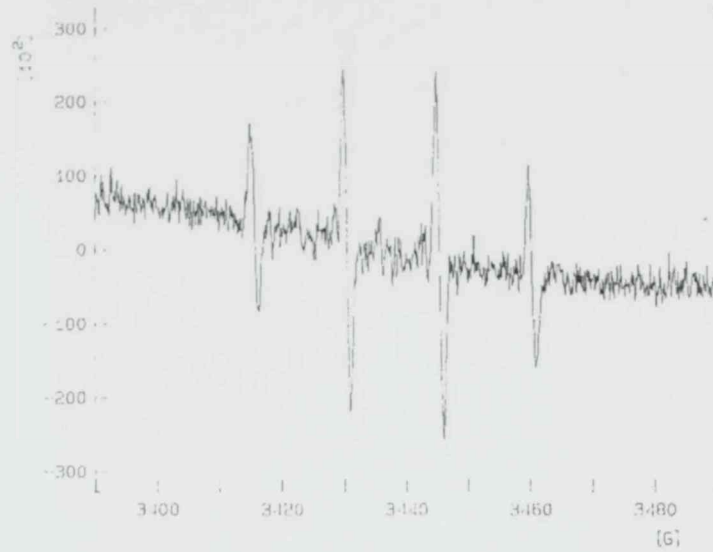
Slika 39. ESR spektar DMPO-OH spin adukta u prisustvu uzorka SK2 C7



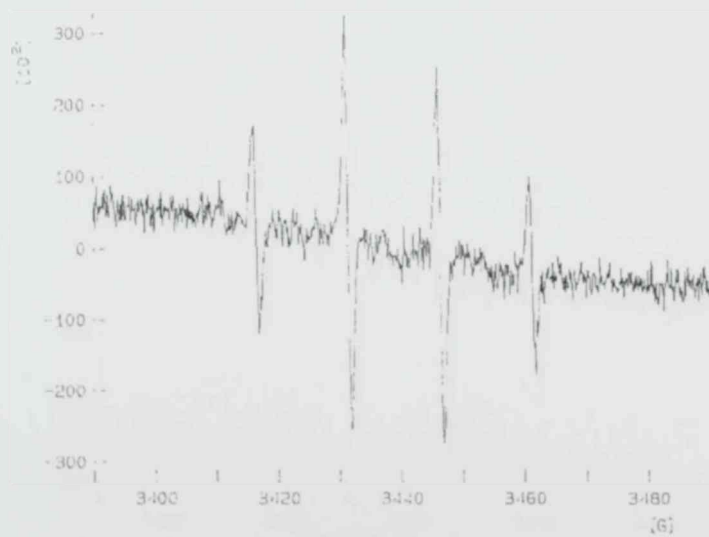
Slika 40. ESR spektar DMPO-OH spin adukta u prisustvu uzorka SK2 C10



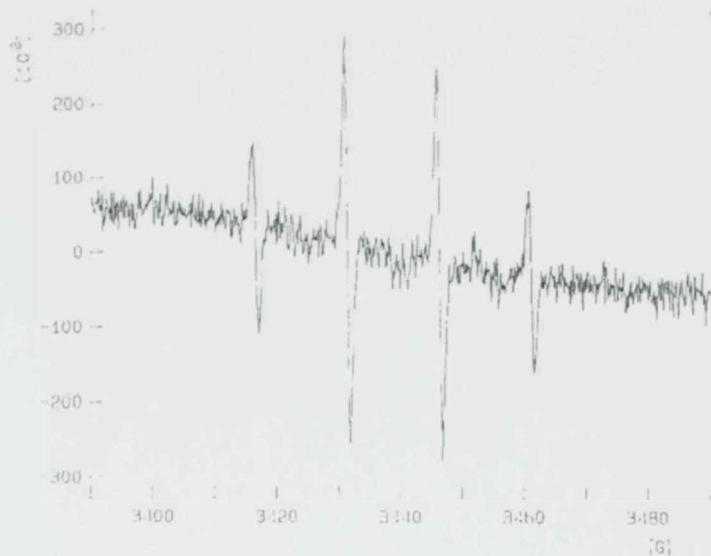
Slika 41. ESR spektar DMPO-OH spin adukta u prisustvu uzorka kombuha Z3



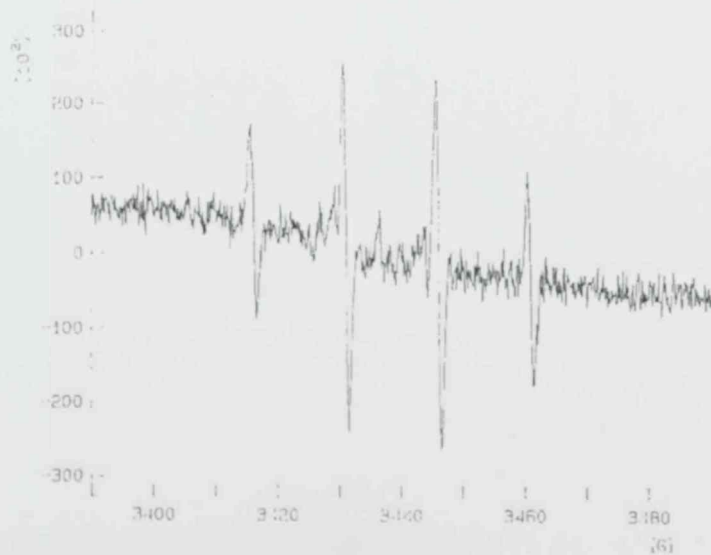
Slika 42. ESR spektar DMPO-OH spin adukta u prisustvu uzorka kombuha Z7



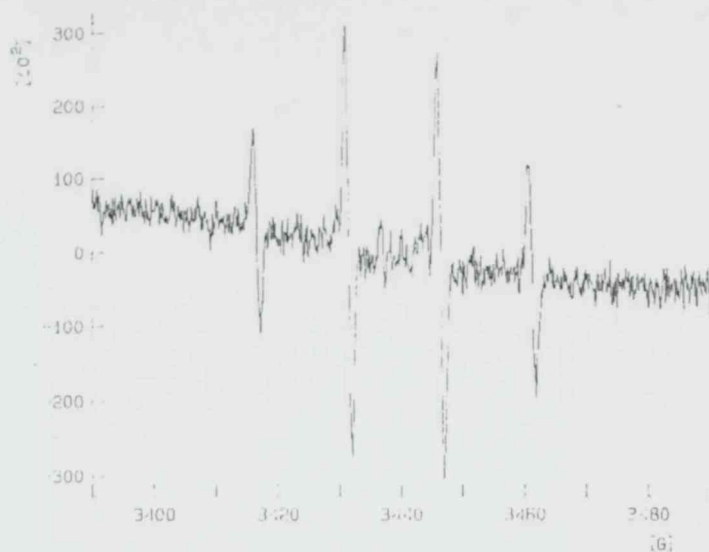
Slika 43. ESR spektar DMPO-OH spin adukta u prisustvu uzorka SK1 Z3



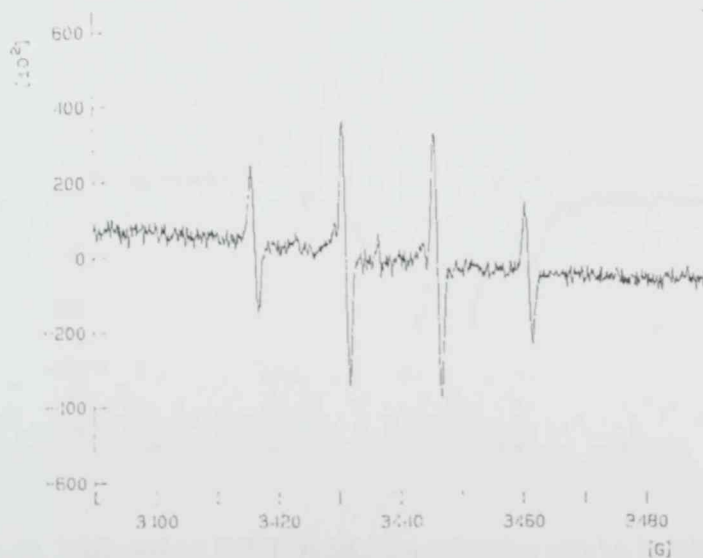
Slika 44. ESR spektar DMPO-OH spin adukta u prisustvu uzorka SK1 Z7



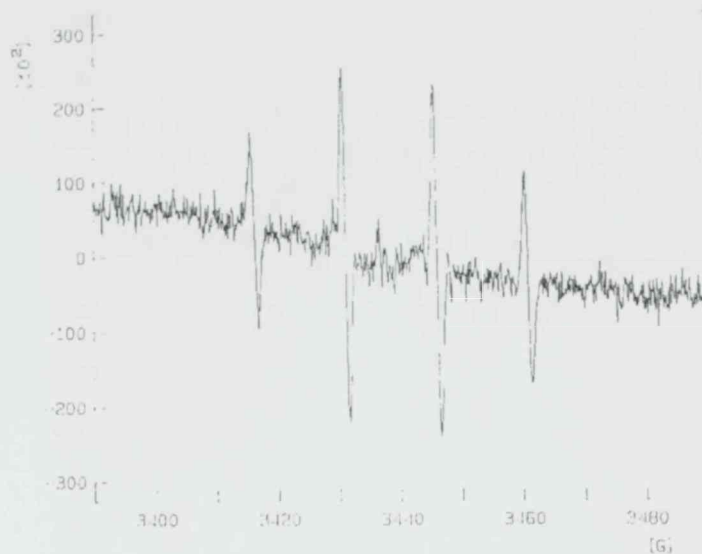
Slika 45. ESR spektar DMPO-OH spin adukta u prisustvu uzorka SK1 Z10



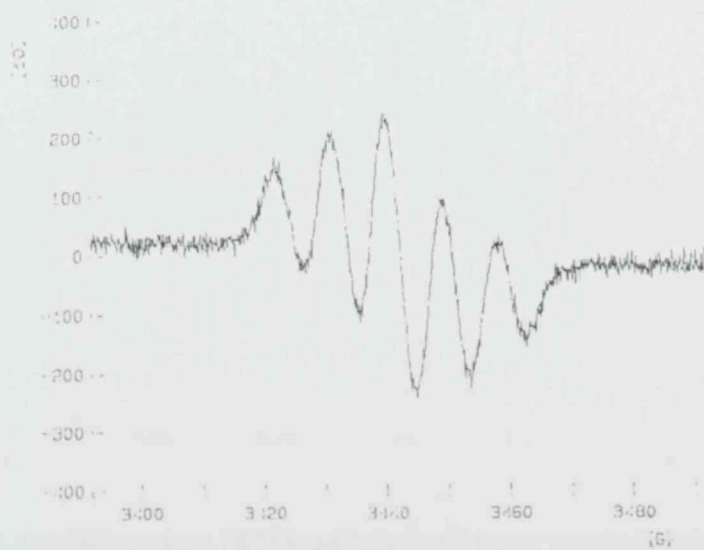
Slika 46. ESR spektar DMPO-OH spin adukta u prisustvu uzorka SK2 Z3



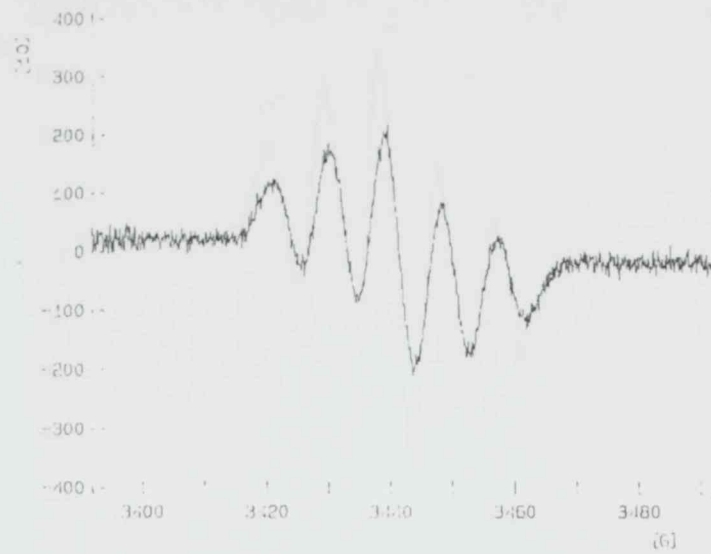
Slika 47. ESR spektar DMPO-OH spin adukta u prisustvu uzorka SK2 Z7



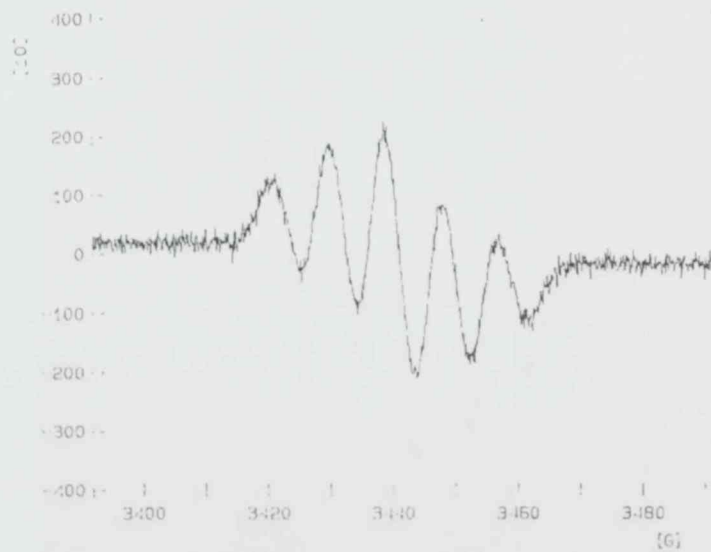
Slika 48. ESR spektar DMPO-OH spin adukta u prisustvu uzorka SK2 Z10



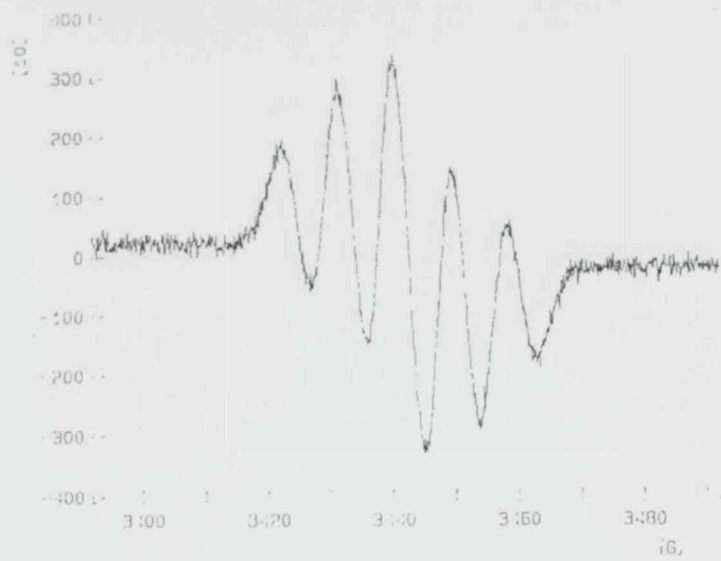
Slika 49. ESR spektar DPPH radikala u prisustvu uzorka kombuha C3



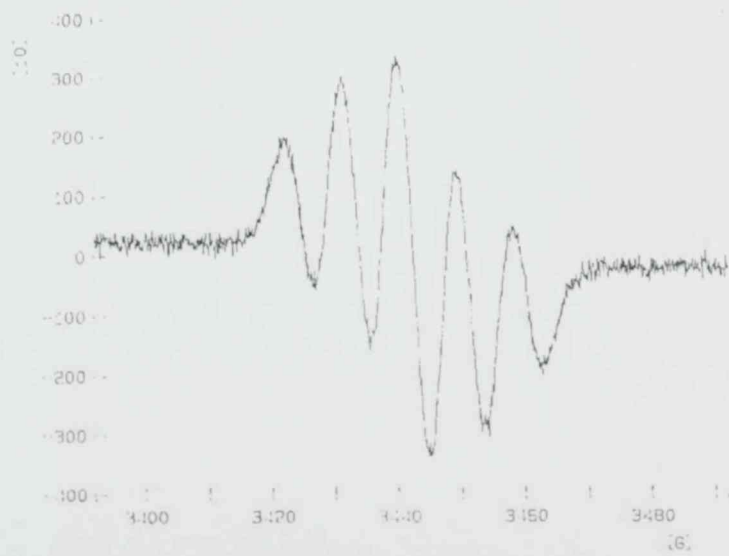
Slika 50. ESR spektar DPPH radikala u prisustvu uzorka kombuha C7



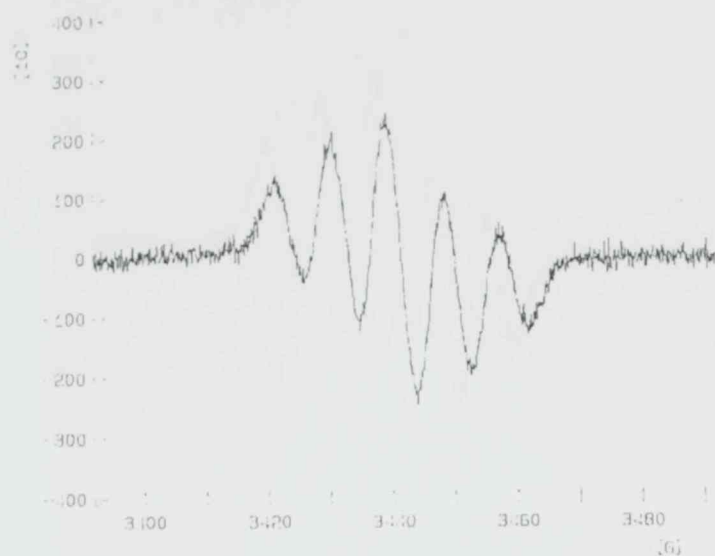
Slika 51. ESR spektar DPPH radikala u prisustvu uzorka kombuha C10



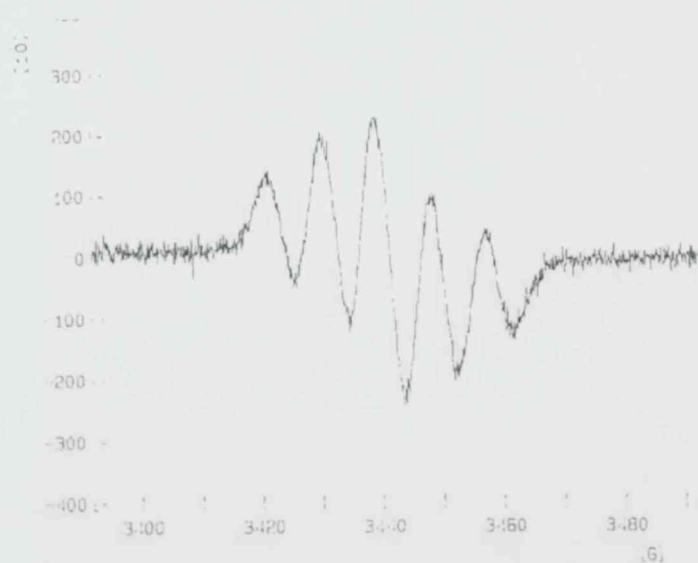
Slika 52. ESR spektar DPPH radikala u prisustvu uzorka SK1 C7



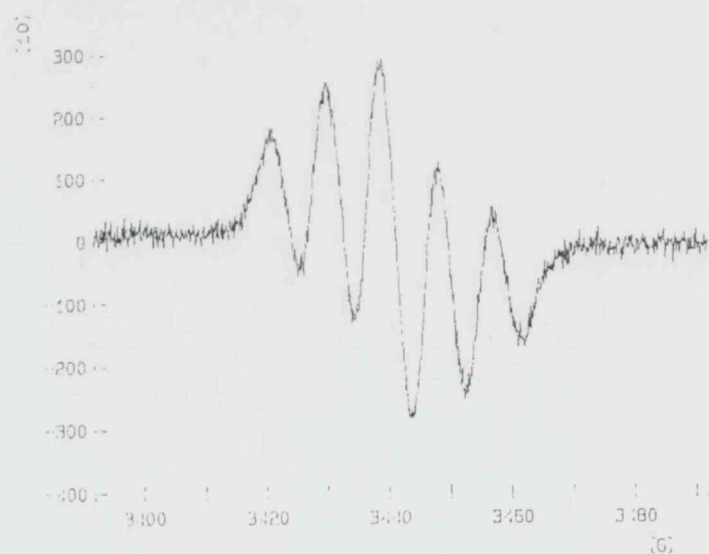
Slika 53. ESR spektar DPPH radikala u prisustvu uzorka SK1 C10



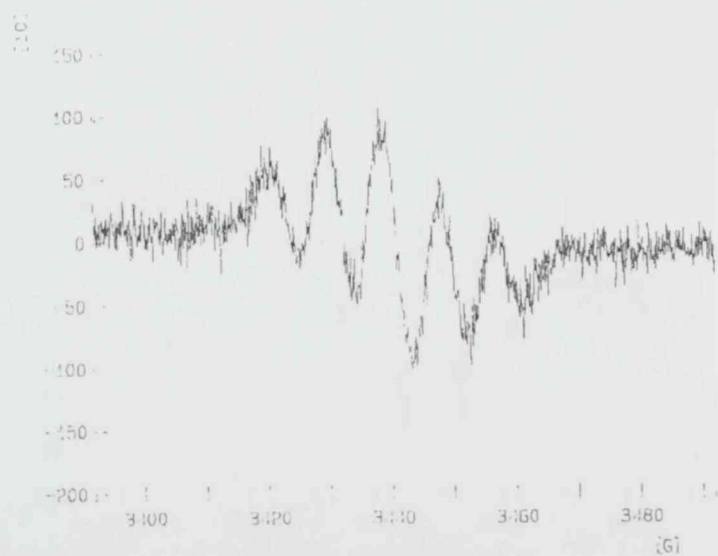
Slika 54. ESR spektar DPPH radikala u prisustvu uzorka SK2 C3



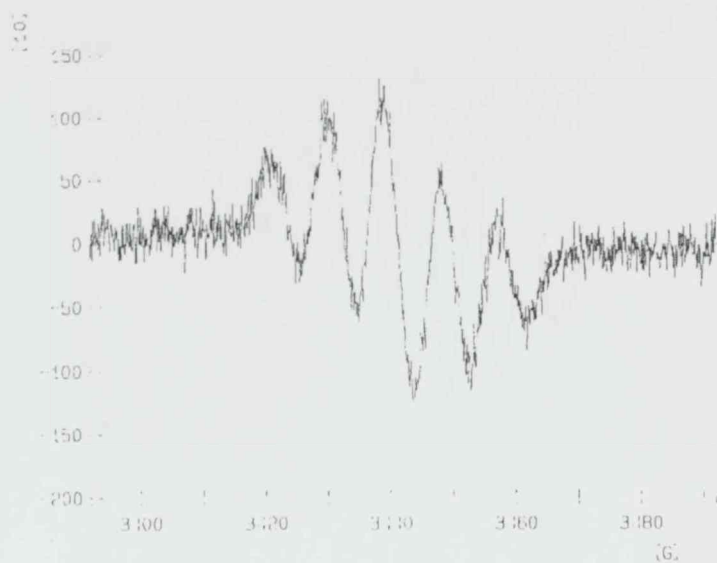
Slika 55. ESR spektar DPPH radikala u prisustvu uzorka SK2 C7



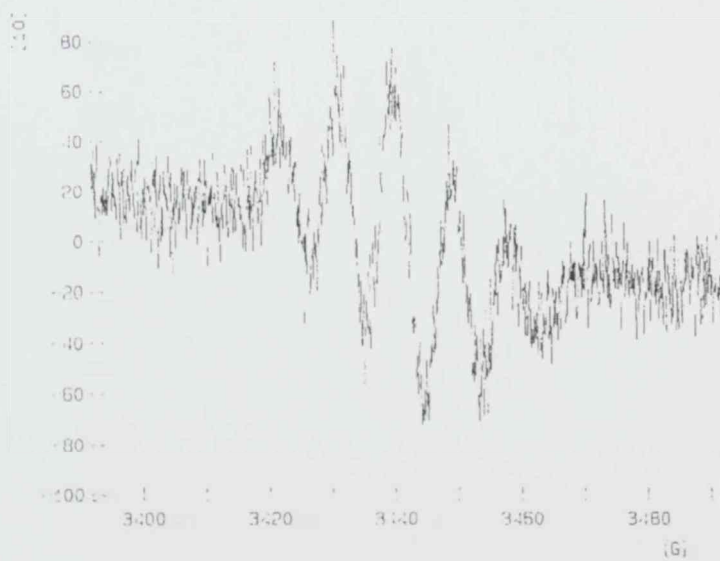
Slika 56. ESR spektar DPPH radikala u prisustvu uzorka SK2 C10



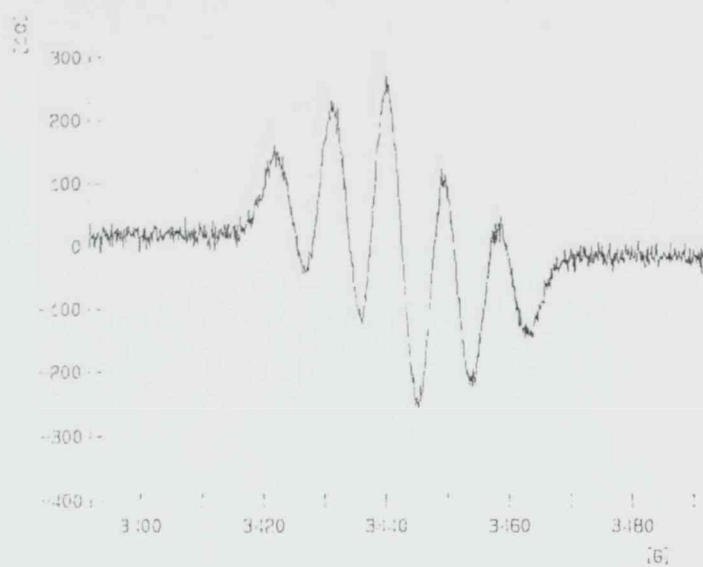
Slika 57. ESR spektar DPPH radikala u prisustvu uzorka kombuha Z7



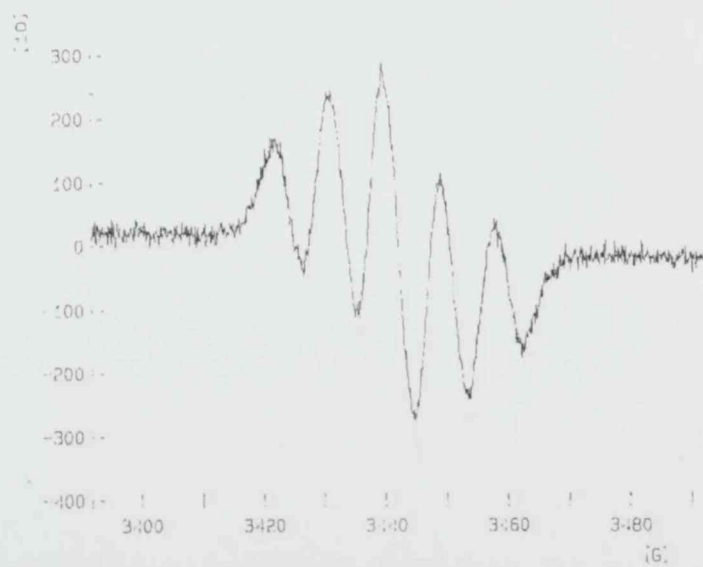
Slika 58. ESR spektar DPPH radikala u prisustvu uzorka kombuha Z10



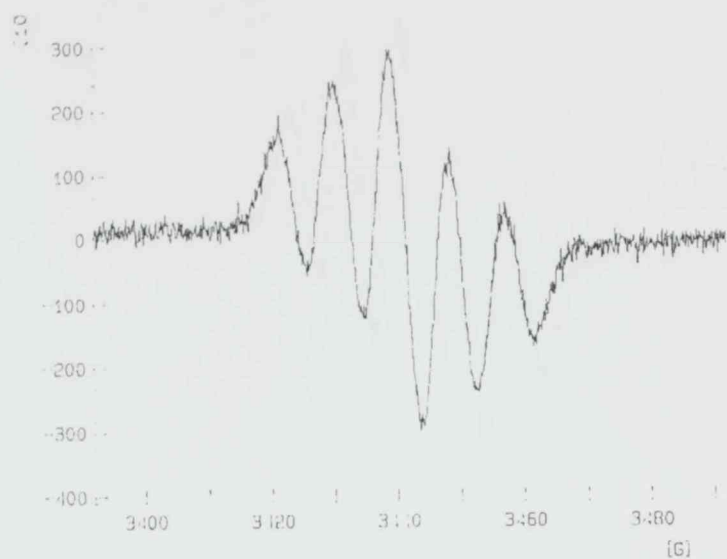
Slika 59. ESR spektar DPPH radikala u prisustvu uzorka SK1 Z3



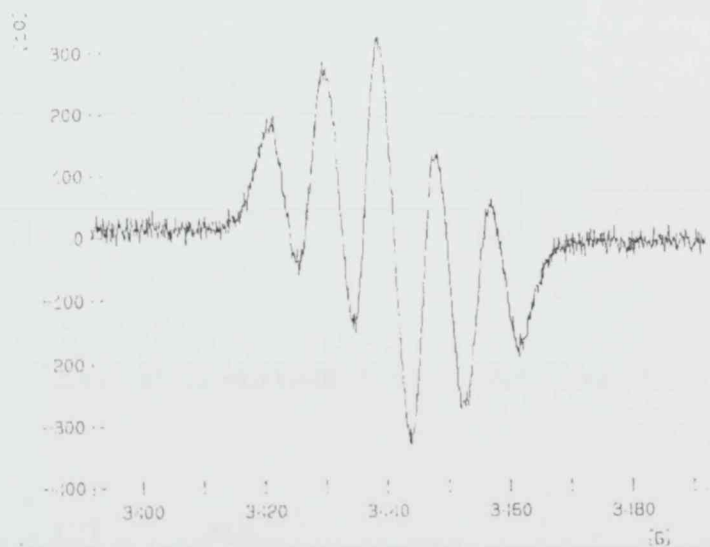
Slika 60. ESR spektar DPPH radikala u prisustvu uzorka SK1 Z7



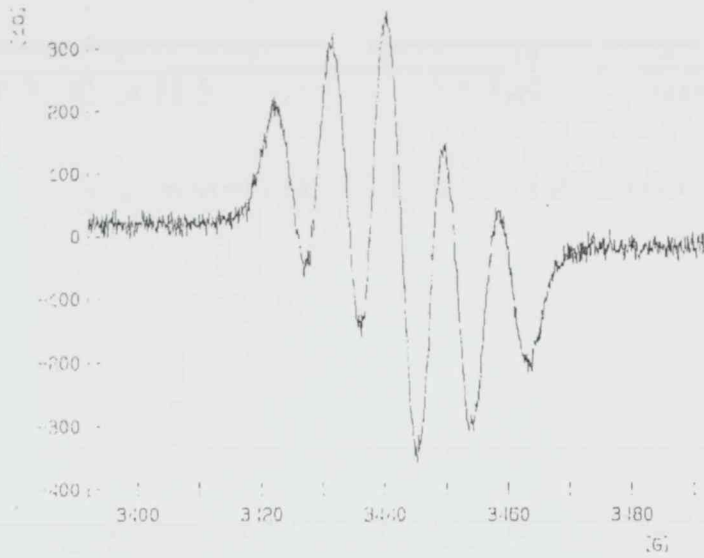
Slika 61. ESR spektar DPPH radikala u prisustvu uzorka SK1 Z10



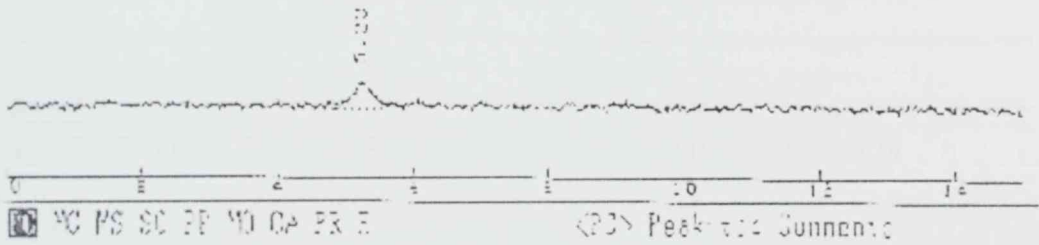
Slika 62. ESR spektar DPPH radikala u prisustvu uzorka SK2 Z3



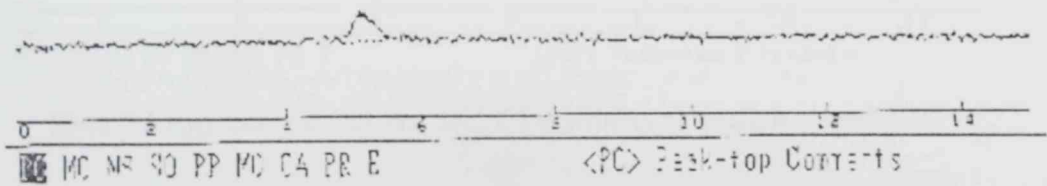
Slika 63. ESR spektar DPPH radikala u prisustvu uzorka SK2 Z7



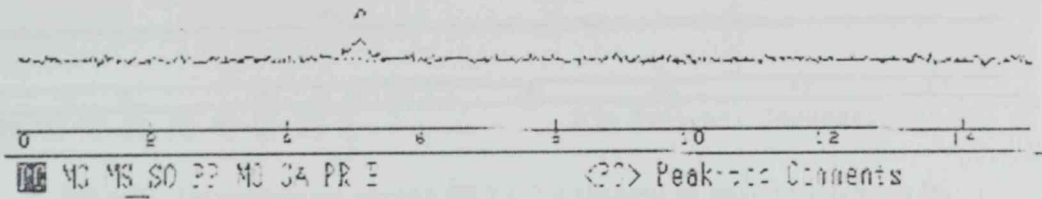
Slika 64. ESR spektar DPPH radikala u prisustvu uzorka SK2 Z10



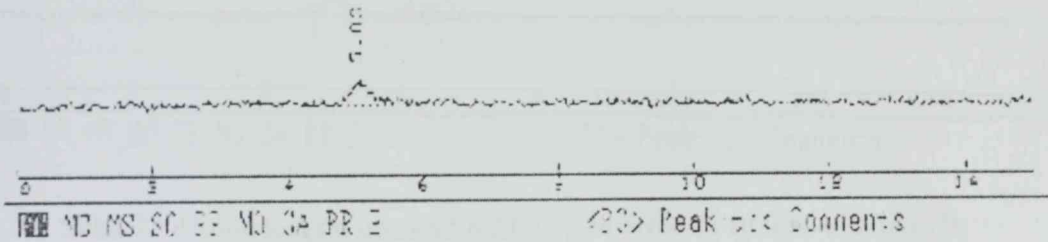
Slika 65. Hromatogram uzorka kombuha C3 u sistemu za analizu vitamina B₂



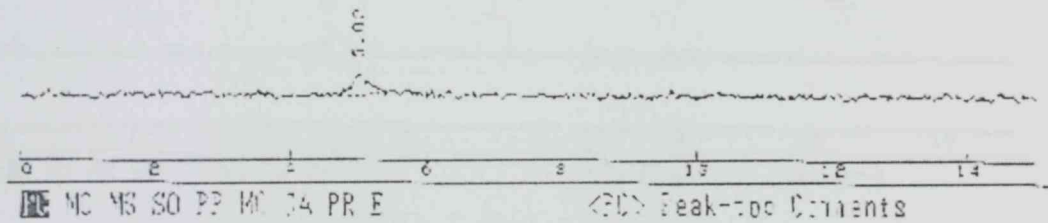
Slika 66. Hromatogram uzorka kombuha C7 u sistemu za analizu vitamina B₂



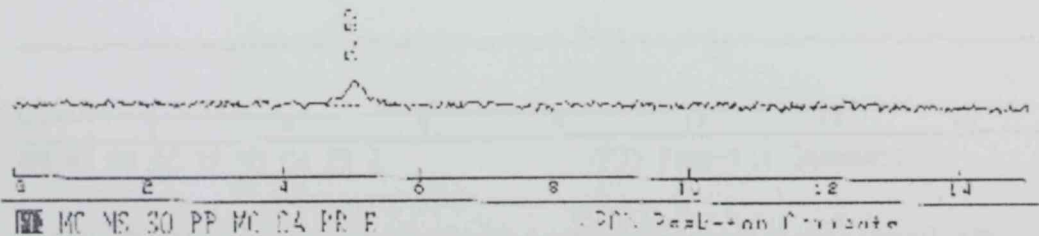
Slika 67. Hromatogram uzorka SK1 C3 u sistemu za analizu vitamina B₂



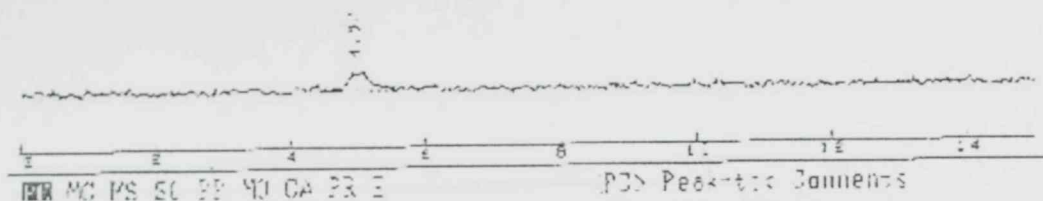
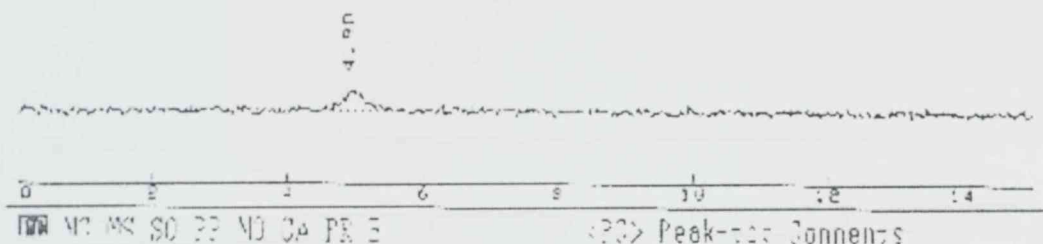
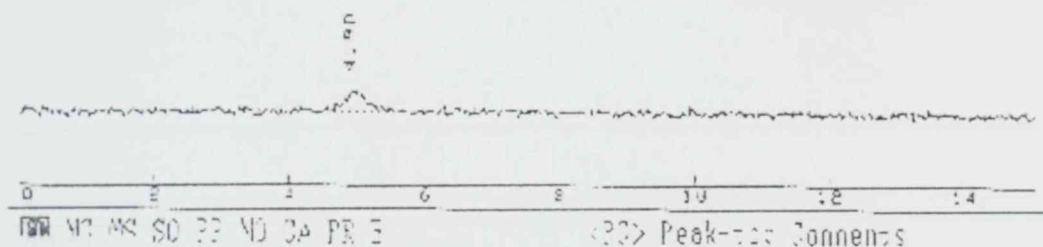
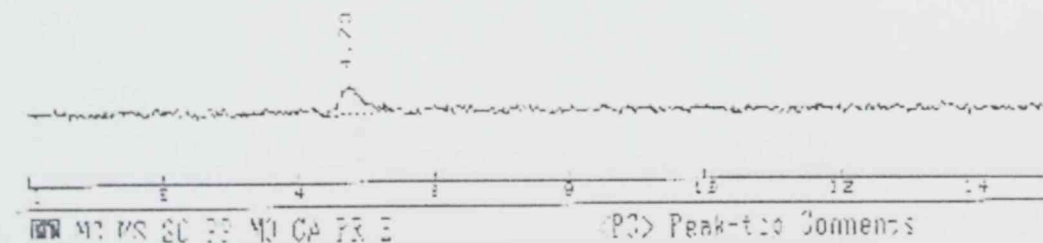
Slika 68. Hromatogram uzorka SK1 C7 u sistemu za analizu vitamina B₂

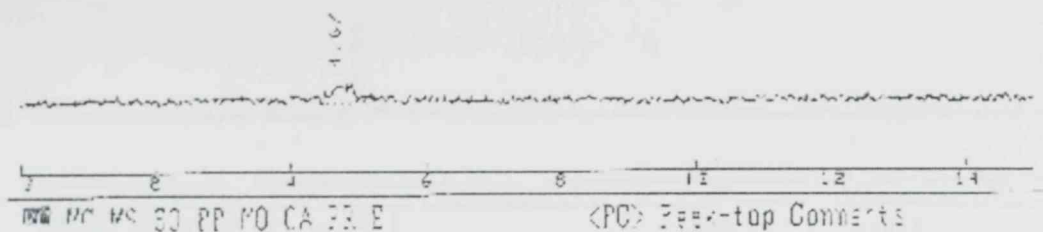
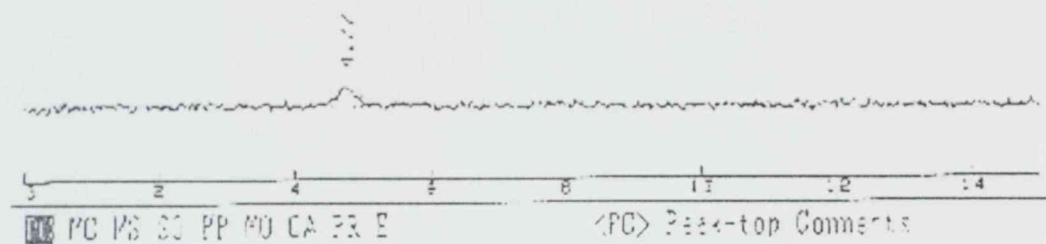
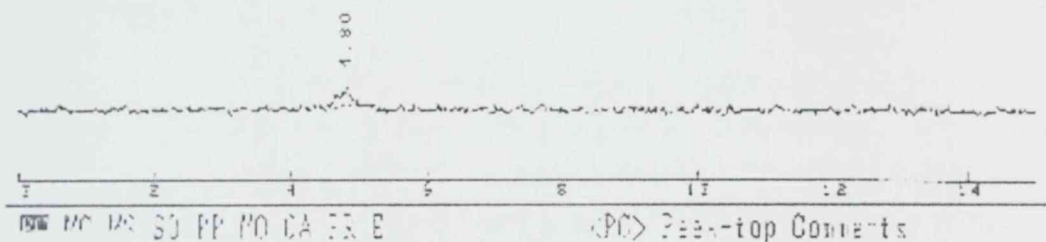
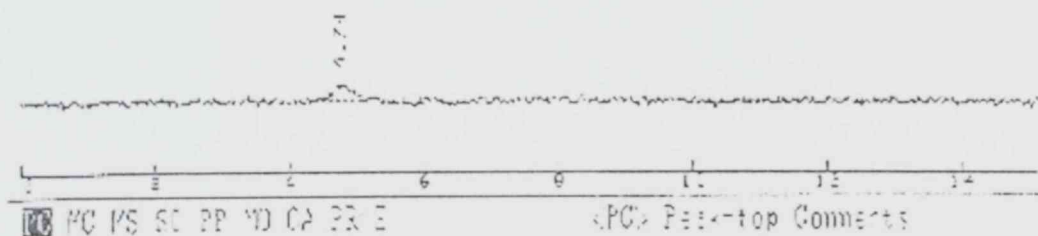


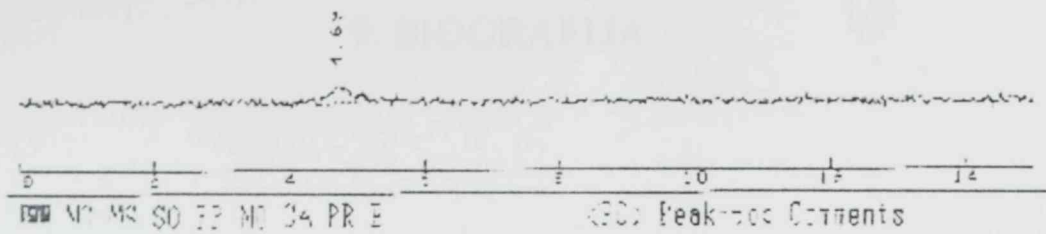
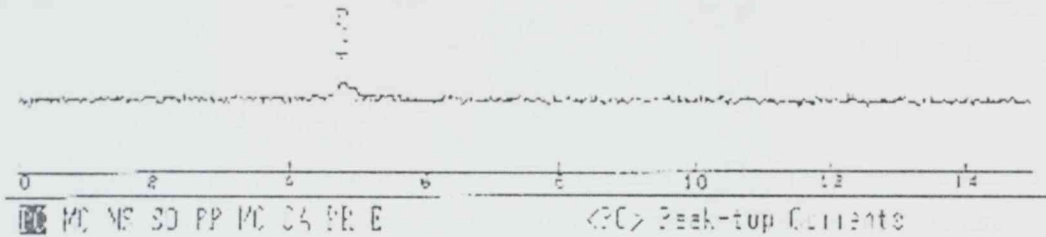
Slika 69. Hromatogram uzorka SK1 C10 u sistemu za analizu vitamina B₂



Slika 70. Hromatogram uzorka SK2 C3 u sistemu za analizu vitamina B₂

Slika 71. Hromatogram uzorka SK2 C7 u sistemu za analizu vitamina B₂Slika 72. Hromatogram uzorka SK2 C10 u sistemu za analizu vitamina B₂Slika 73. Hromatogram uzorka kombuha Z3 u sistemu za analizu vitamina B₂Slika 74. Hromatogram uzorka kombuha Z7 u sistemu za analizu vitamina B₂

Slika 75. Hromatogram uzorka SK1 Z3 u sistemu za analizu vitamina B₂Slika 76. Hromatogram uzorka SK1 Z7 u sistemu za analizu vitamina B₂Slika 77. Hromatogram uzorka SK1 Z10 u sistemu za analizu vitamina B₂Slika 78. Hromatogram uzorka SK2 Z3 u sistemu za analizu vitamina B₂

Slika 79. Hromatogram uzorka SK2 Z7 u sistemu za analizu vitamina B₂Slika 80. Hromatogram uzorka SK2 Z10 u sistemu za analizu vitamina B₂

9. BIOGRAFIJA

Radomir V. Malbaša rođen je 28.07.1971. godine u Sremskoj Mitrovici.

Osnovnu i srednju školu završio je u Sremskoj Mitrovici. Diplomirao je na Tehnološkom fakultetu u Novom Sadu 26.03.1997. godine. Magistarsku tezu pod nazivom "Mogućnost dobijanja dijetetskog napitka pomoću čajne gljive" odbranio je 22.06.2000. godine na Tehnološkom fakultetu u Novom Sadu.

Od 08.05.1997. godine, zaposlen je na Tehnološkom fakultetu u Novom Sadu, prvo kao istraživač-saradnik na predmetu Biohemija, a od 07.08.2000. kao asistent na predmetima Analitička hemija i Analiza farmaceutskih proizvoda. U svom pedagoškom radu, držao je eksperimentalne vežbe na predmetima Fizička hemija makromolekula, Hemija i tehnologija emulzija i kozmetičkih preparata, Biohemija, Analitička hemija i Analiza farmaceutskih proizvoda. Asistirao je pri izradi više diplomskih radova i studentskih temata.

Autor je i koautor 35 naučnih radova i saopštenja, uglavnom iz oblasti hemijske, biohemijske i instrumentalne analize i hromatografije metabolita čajne gljive, kao i ispitivanja uslova fermentacije. Učesnik je naučnih projekata, koje finansira Ministarstvo za nauku, tehnologije i razvoj republike Srbije, koji se bave problematikom vezanom za napitak od čajne gljive i zaštitu čovekove okoline.

Posедуje aktivno znanje engleskog jezika.

