

UNIVERZITET U NOVOM SADU
TEHNOLOŠKI FAKULTET

mr Dragoljub D. Cvetković

**KOMBUHA OD LEKOVITOG BILJA – BIOLOŠKA
AKTIVNOST I PARAMETRI FERMENTACIJE**

-doktorska disertacija-

Mentor:
dr Siniša L. Markov

Novi Sad, 2008.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. OPŠTI DEO	3
2.1. Mikrobiologija čajne gljive	3
2.1.1. Kvasci čajne gljive	4
2.1.2. Bakterije sirćetnog vrenja.....	8
2.2. Kultivacija čajne gljive	13
2.2.1. Uslovi za kultivaciju čajne gljive	15
2.2.2. Kontaminanti radne kulture tokom kultivacije.....	16
2.3. Hemijski sastav kombuha napitka	16
2.4. Terapeutski efekti kombuha napitka.....	18
2.4.1. Antimikrobno delovanje kombuha napitka	20
2.4.2. Antioksidativno delovanje kombuha napitka	21
2.4.3. Antikancerogeno delovanje čaja i kombuhe.....	24
2.4.4. Ostali efekti kombuhe i čajne gljive.....	25
2.4.5. Kombuha i štetni efekti	26
3. MATERIJAL I METODE.....	27
3.1. Karakteristike radne kulture	27
3.2. Priprema podloga za kultivaciju čajne gljive	27
3.3. Priprema suspenzija izolata kvasaca i bakterija sirćetnog vrenja kao starter kultura... 27	
3.4. Hemijske analize fermentisane tečnosti	28
3.5. Mikrobiološke analize fermentisane tečnosti	29
3.6. Senzorna analiza kombuha napitaka.....	29
3.7. Ispitivanje antimikrobne aktivnosti kombuha napitaka.....	29
3.8. ESR spektralna analiza antioksidativne aktivnosti kombuhe.....	31
3.8.1. ESR spektralna analiza uticaja čajnih i kombuha napitaka na transformaciju DPPH radikala	31
3.8.2. ESR spektralna analiza uticaja čajnih i kombuha napitaka na transformaciju hidriksil radikala	31
3.9. Ispitivanje antiproliferativne aktivnosti kombuha napitaka	31
4. REZULTATI I DISKUSIJA.....	33
4.1. Distribucija ćelija i metabolita čajne gljive i starter kultura tokom kombuha fermentacije čaja ehinacee.....	33
4.1.1. Autohtoni sojevi kvasaca i bakterija sirćetnog vrenja.....	34
4.1.2. Kombuha fermentacija čaja echinacea inokulisanog celuloznom pelikulom čajne gljive.....	35
4.1.3. Kombuha fermentacija čaja od echinacea inokulisanog starter kulturama čajne gljive	37
4.1.4. Distribucija glavnih metabolita čajne gljive u fermentisanoj tečnosti	42
4.1.5. Senzorna ocena kombuha napitaka od ehinacee	45
4.2. Biološka aktivnost kombuha napitaka.....	46
4.2.1. Antimikrobna aktivnost kombuhe od crnog čaja, rtanjskog čaja i čaja ehinacee..	46

4.2.2. Ispitivanje antioksidativne aktivnosti čajnih i kombuha napitaka ESR spektralnom analizom.....	52
4.2.2.1. Antioksidativna aktivnost čajnih i kombuha napitaka od korena i herbe <i>Echinacea purpurea</i>	54
4.2.2.2. Antioksidativna aktivnost čajnih i kombuha napitaka od rtanjskog čaja	56
4.2.3. Antiproliferativna aktivnost čajnih i kombuha napitaka od crnog i rtanjskog čaja	60
4.3. Optimizacija podloge za kultivaciju čajne gljive	63
4.3.1. Izvor C atoma	63
4.3.2. Izvor N atoma	66
4.4. Specifična međufazna površina kao ključni parametar scale-up modela kombuha fermentacije	69
4.4.1. Glavne karakteristike upotrebljenih inokuluma	70
4.4.2. Promene vrednosti pH i titrabilne kiselosti tokom fermentacije u sudovima različite zapremine.....	71
4.4.3. Matematički model kombuha fermentacije	74
4.4.4. Aplikativnost scale-up modela	75
4.4.5. Verifikacija modela za kombuha fermentaciju.....	75
5. ZAKLJUČAK	78
6. LITERATURA	80

1. UVOD

Kombuha (Kombucha tea, Manchurian tea, Russian tea, Kargasok tea, Japanese fungus, Haipao, Hongo) je tradicionalni napitak koji se dobija fermentacijom zaslađenog crnog ili zelenog čaja. Veruje se da kombuha vodi poreklo iz severnoistočne Kine (Mandžurije), a prvi zapisi o ovom napitku („čaju besmrtnosti“) su iz 221. godine pre nove ere u vreme vladavine dinastije Tsin. Iz Azije kombuha se širila preko Sibira i unutrašnjosti Rusije da bi pre više od 160 godina stigla i u Evropu. Glavni razlog popularnosti kombuhe, pored lekovitih efekata koji joj se pripisuju, je jednostavna priprema napitka u kućnim uslovima.

Kombuha je u široj javnosti poznata i pod imenom čajna gljiva uprkos činjenici da ona nije gljiva u pravom smislu te reči, niti je gljiva uključena u fermentaciju zaslađenog čaja. Čajna gljiva, kao simbiotska zajednica bakterija sirćetnog vrenja (rodova *Acetobacter* i *Gluconobacter*) i autohtonih vrsta kvasaca (rodova *Saccharomyces*, *Zygosaccharomyces*, *Saccharomycodes*, *Torulaspota* i dr.), predstavlja radnu kulturu kombuha fermentacije. Mikrobiološki sastav ove jedinstvene zajednice prokariotskih i eukariotskih mikroorganizama zavisi od porekla inokuluma za kombuha fermentaciju. Celulozna masa, koju tokom kultivacije stvaraju bakterije sirćetnog vrenja i koja pluta po površini fermentisane tečnosti, je verovatno i glavni razlog zašto se kombuha naziva „čajna gljiva“.

Kombuhi se tradicionalno pripisuju brojni terapijski efekti – delovanje protiv poremećaja metabolizma, artritisa, arterioskleroze, psorijaze, hipertenzije, konstipacije, delovanje na imunološki i nervni sistem, digestivni trakt, detoksikaciona svojstva, itd. Međutim, još uvek je nedovoljno naučnih dokaza o lekovitosti kombuhe, njenim aktivnim supstancama i mehanizmima delovanja. Verovatno da neki od terapijskih efekata potiču od sastojaka čaja, a neki od jedinjenja koja nastaju metaboličkom aktivnošću čajne gljive.

Iako je kombuha u upotrebi još iz vremena stare ere njeno ozbiljno proučavanje je započelo u XX veku. Danas je dobro poznat hemijski sastav napitka, njegova antimikrobna svojstva i mikrobiološki sastav čajne gljive. Međutim, do danas nije poznat model rasta kvasaca i bakterija sirćetnog vrenja tokom kombuha fermentacije, što je važno kada se razmišlja o korišćenju izolovanih sojeva kvasaca i bakterija kao starter kultura za inokulaciju. Takođe, u literaturi o kombuhi (naučnoj i patentnoj) nema podataka o tehnološkom postupku dobijanja napitka i izvođenju fermentacionog procesa u sudovima zapremine od nekoliko desetina ili stotina litara. Glavni problemi koji stoje pred industrijskom proizvodnjom kombuhe su standardizacija uslova fermentacije (podloge, inokuluma, temperature i trajanja fermentacije), kontrola procesa i projektovanje sudova za fermentaciju velikih zapremina, odnosno prenošenje procesa sa laboratorijskog na polu-industrijski i industrijski nivo.

Kombuha se gotovo isključivo priprema biotransformacijom zaslađenog crnog čaja, a pokušaji da se kao izvor azota u podlozi za kultivaciju umesto crnog ili zelenog upotrebi neki drugi čaj, su bili manje-više neuspešni. Na tržištu postoje kombuha napici sa ekstraktom papaje, aloje i različitog voća, ali je u osnovi ovih napitaka crni čaj. Pored toga, nema pouzdanih podataka o efektima dodatih ekstrakata na farmakološka svojstva kombuhe.

Savremeni način pripreme hrane, koji podrazumeva pasterizaciju, sterilizaciju, konzervisanje, zamrzavanje utiče na nutritivni kvalitet namirnica. Takođe, beleži se stalni porast broja teških oboljenja poput hroničnih i kancerogenih oboljenja kostiju, stomaka i jetre, a hrana i način ishrane su prepoznati kao jedan od glavnih faktora rizika po zdravlje ljudi. Zato su danas ljudi u potrazi za alternativnim metodama konzervisanja hrane, probiotskim i prebiotskim namirnicama, dodacima u ishrani prirodnog porekla i konzumiranju zdravstveno bezbedne hrane. U najvećem broju slučajeva u pitanju je

ponovno otkrivanje jednostavne i zaboravljene stare prakse korišćenja fermentisane hrane - kiselo testo, kefir, posebne vrste sireva, fermentisano voće i povrće. Iz istih razloga u zemljama zapadne Evrope i severne Amerike poslednjih decenija postoji veliko interesovanje za kombuhom kao funkcionalnim napitkom. Brojni naučni radovi, pored još brojnije popularne literature o kombuhi, pokazuju da iz objektivnih razloga ovaj napitak i dalje zaokuplja pažnju naučne i stručne javnosti u pokušaju da se odgovori na niz još otvorenih pitanja.

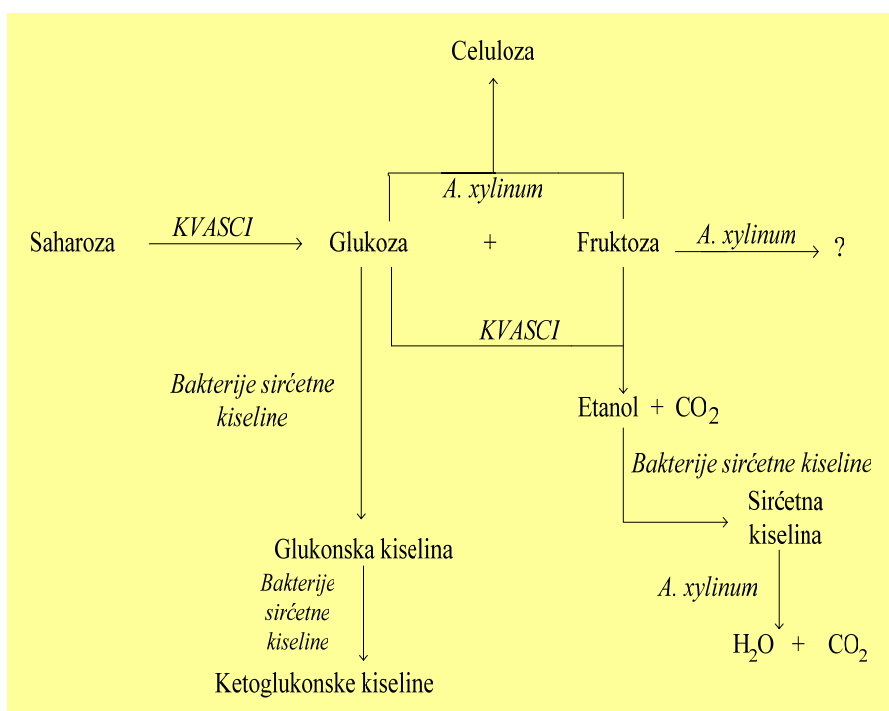
Cilj ispitivanja, čiji su rezultati prikazani u ovom radu bio, je da se ispita biološka aktivnost (antimikrobna, antioksidativna i antiproliferativna) kombuhe od crnog čaja i napitaka dobijenih fermentacijom čaja ehinacee (*Echinacea purpurea* L.) i rtanjskog čaja (*Satureja montana* L.). Čaj ehinacee i rtanjski čaj su poznati po svojoj lekovitosti i antioksidativnoj i antimikrobnoj aktivnosti, što bi moglo da obezbedi dobijanje kombuha napitaka velike biološke vrednosti. Akcenat je bio na ispitivanju biološke aktivnosti konzumnih kombuha napitaka, jer u literaturi postoje podaci o efektima napitaka od crnog i zelenog čaja čija je kiselost bila nekoliko puta veće od konzumne, a što može imati direktne posledice po njihovu biološku aktivnost. Koliko je poznato rezultati o antiproliferativnoj aktivnosti kombuha napitaka od crnog i rtanjskog čaja, tj. njihovom uticaju na rast ćelija humanih karcinoma – epitelnog karcinoma cerviksa, adenokarcinoma dojke i adenokarcinoma debelog creva su prvi podaci takve vrste.

Pored istraživanja biološke aktivnosti kombuha napitaka, cilj rada je bio da se ispita i je fermentacioni proces u smislu definisanja nekih od osnovnih parametara kombuha fermentacije – optimalne količine izvora ugljenika i azota u medijumu za kultivaciju, geometrijskih karakteristika fermentora, inokulacija starter kulturama. Definisanje kritičnih parametara kombuha fermentacije je osnov za izvođenje matematičkog modela za scale-up procesa. Predmet istraživanja je bio i razvoj starter kulture za kombuha fermentaciju koju čine odabrani sojevi kvasaca i bakterija sirćetnog vrenja izolovani iz autohtone čajne gljive. Upotrebom starter kultura omogućava se striktna kontrola fermentacionog procesa, sprečava se kontaminacije mikroorganizmima iz okruženja i dobijanje zdravstveno bezbednog proizvoda definisanog kvaliteta. Standardizacija uslova kultivacije i dobijanje kombuhe deklarisanog kvaliteta, uz zdravstvenu bezbednost proizvoda, je osnov za registrovanje napitka kao (pomoćnog) terapeutskog sredstva.

2. OPŠTI DEO

2.1. Mikrobiologija čajne gljive

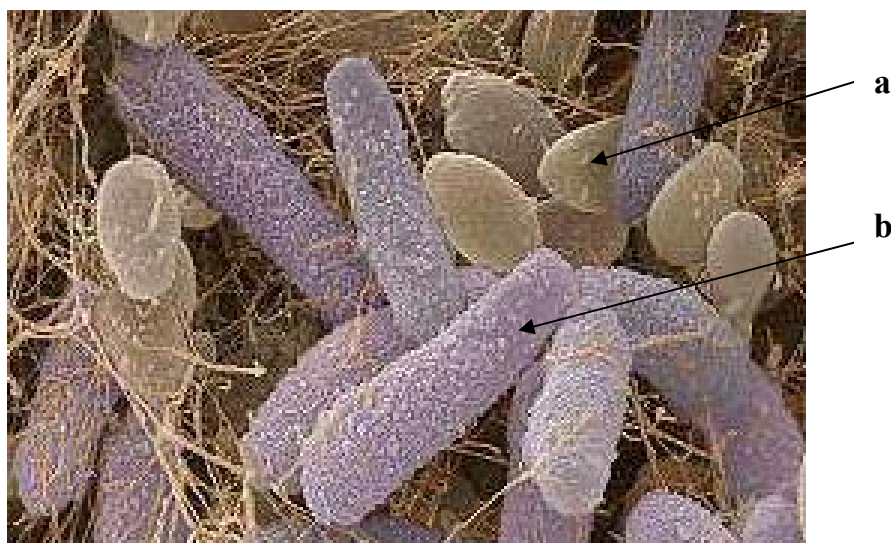
Čajna gljiva predstavlja simbiotsku zajednicu bakterija sirćetnog vrenja (BSV) i autohtonih vrsta kvasaca. Uloga kvasaca u ovoj zajednici je da enzimom invertazom (saharaza, β -fruktozidaza) hidrolizuju saharozu u podlozi za kultivaciju čajne gljive i tako je učine dostupnom bakterijama sirćetnog vrenja. Ove bakterije u nedostatku odgovarajućih enzima saharozu kao takvu ne mogu da usvoje, odnosno molekul saharoze ne mogu da transportuju u ćeliju niti ga mogu ekstracelularno hidrolizovati. Tokom kultivacije čajne gljive ćelije kvasaca fermentativno metabolišu glukozu i fruktozu, a nastali etanol bakterije sirćetnog vrenja enzimski oksiduju u sirćetnu kiselinu (Slika 1). Glukoza i fruktoza se metabolišu u ćelijama bakterije sirćetnog vrenja pri čemu se sintetiše niz biološki veoma vrednih jedinjenja. Karakterističan produkt fiziološke aktivnosti čajne gljive je celuloza koja se u vidu pelikule formira po površini tečnosti za kultivaciju, na kojoj je održava ugljendioksid nastao fermentativnom aktivnošću kvasaca (Sievers i sar., 1995; Stojanović i Janković, 1996; Divies i Cachon, 1998). Tradicionalno se celulozna pelikula zbog njenog izgleda poistovećuje sa pileusom (šeširom) viših gljiva zbog čega se združena kultura kvasaca i bakterija sirćetnog vrenja pogrešno definiše kao čajna gljiva. Mehanizam međusobnih odnosa ćelija kvasaca i bakterija sirćetnog vrenja u ovoj združenoj kulturi gljivi i model rasta ćelija još uvek je nepoznat (Teoh i sar., 2004).



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

Mikroskopskom analizom celulozne pelikule (Slika 2) utvrđeno je da se po njenoj površini nalazi veliki broj štapićastih bakterija koje kao striktni aerobi zauzimaju položaj prema atmosferskom kiseoniku, dok se sa donje strane pelikule mogu videti nakupine ćelija kvasaca (Stojanović i Janković, 1996). Po nekim podacima u mikrobnim populacijama čajne gljive se mogu naći i bakterije mlečne kiseline rodova *Lactobacillus* i *Pediococcus* (Stojanović i Nikšić, 2000; Steels i sar., 2002). Prisustvo ovih bakterija je od

posebne važnosti zbog stimulativnog delovanja mlečne kiseline na crevne populacije mikroorganizama i organizam konzumenta.

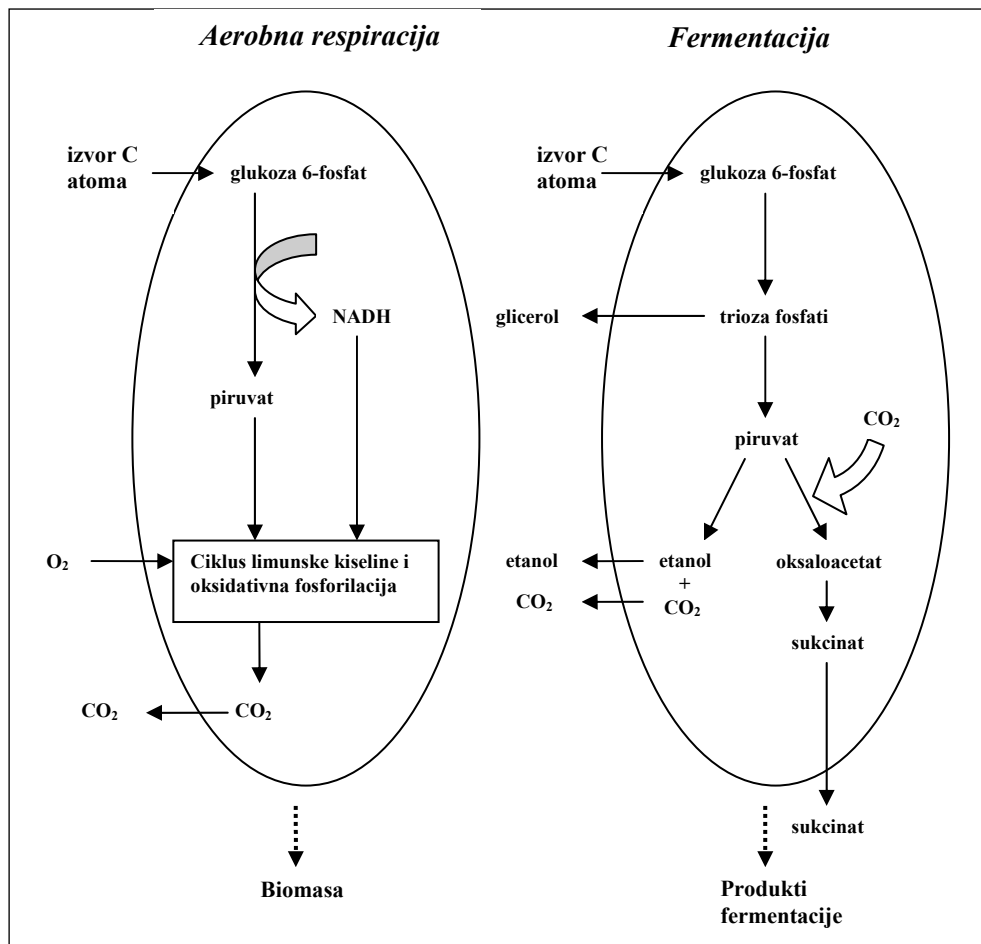


Slika 2. Mikroskopski prikaz ćelija kvasaca (a) i bakterija sirćetnog vrenja (b) u celuloznoj pelikuli kombuhe (<http://images.search.yahoo.com>)

2.1.1. Kvasci čajne gljive

Kvasci su nefilamentozne, jednoćelijske gljive široko rasprostranjene u prirodi (ubikvitarni mikroorganizmi) od izuzetnog industrijskog značaja zbog fermentativne sposobnosti i produkcije etanola i ugljendioksida. Po tipu metabolizma, odnosno svojim fiziološkim karakteristikama kvasci su fakultativno anaerobni mikroorganizmi. Optimalna temperatura za njihov rast je karakteristika vrste, ali je za većinu ona u opsegu od 15-30 °C. Osetljivi su na povišene temperature, a blago kisela sredina (vrednosti pH između 4 i 6) pogoduje razvoju ćelija. Iako su same ćelije kvasaca indiferentne na vrednosti pH sredine u širokom opsegu (3,5 - 8), njihov rast je ograničen zbog osetljivosti enzimskih sistema (Ingram, 1955). Pod striktno anaerobnim uslovima rast ćelija je minimalan, a reprodukcija ograničena na nekoliko generacija; pod istim uslovima je fermentativna aktivnost kvasaca maksimalna. S druge strane, prisustvo kiseonika u znatnoj meri stimuliše umnožavanje ćelija kvasaca (Slika 3) (Walker, 1998).

Usvajanje saharoze kod kvasaca započinje eksternalnom enzimskom hidrolizom β -fruktofuranozidne veze molekula pomoću enzima invertaze. Potvrđeno je da invertazu neki kvasci izlučuju u podlogu, a da se kod većine ona nalazi sa spoljašnje strane osnovne ćelijske membrane (Lampen, 1968). Zatim se u ćelijama kvasaca D-glukoza i D-fruktoza metabolišu nizom biohemijskih reakcija koje su poznate pod nazivom glikoliza (Embden-Meyerhof-Parnasov put) (Slika 4). U aerobnim uslovima, kada je krajnji akceptor elektrona kiseonik, razlaganje ugljenih hidrata se odvija kao respiracija, a nastala pirogroždana kiselina preko acetil-CoA kao intermedijera ulazi u ciklus trikarbonskih kiselina (Krebs-ov ciklus). S druge strane, tokom fermentativnog tipa metabolizma pirogroždana kiselina se transformiše u etanol i ugljendioksid (Barnett, 1976; Fugelsang i Edwards, 2007).



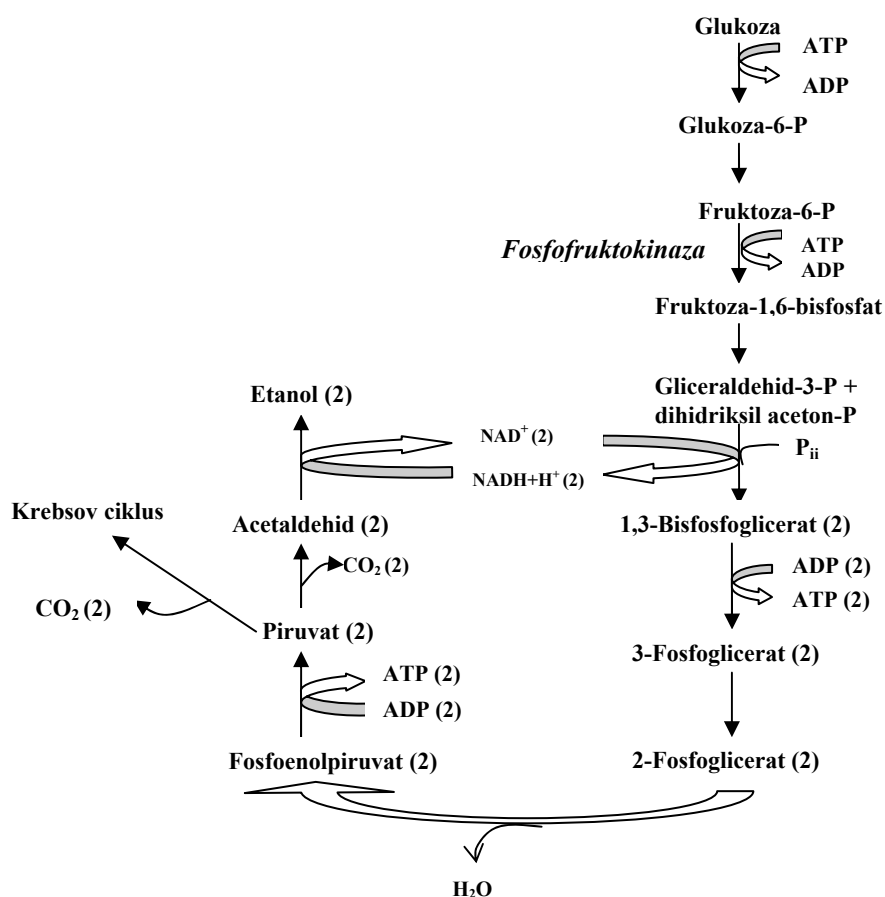
Slika 3. Šema glavnih kataboličkih puteva u ćeliji kvasca (Walker, 1998)

Pasteur je utvrdio da se fermentacija ugljenih hidrata odvija u anaerobnim uslovima, a da se aerisanjem kulture ona najpre usporava a zatim i potpuno zaustavlja uz pojavu respiratornog tipa metabolizma (pojava se definiše kao Pasteur-ov efekat) (Hoogerheide, 1971). Pošto se pod anaerobnim uslovima iz molekula glukoze stvaraju samo dva molekula ATP ćelija mora ubrzati usvajanje glukoze kao bi se osiguralo održavanje unutarćelijskog „pool-a“ ATP-a, što se postiže aktivacijom enzima fosfofruktokinaze (Slika 4). Do porasta brzine usvajanja glukoze pod anaerobnim dolazi kada je koncentracija glukoze u sredini oko 0,9 g/L (Fugelsang i Edwards, 2007).

Međutim, alkoholna fermentacija kvascima je moguća i pod aerobnim uslovima ukoliko je koncentracija D-glukoze u podlozi veća od 9 g/L, a ovaj fenomen je poznat pod nazivom Crabtree efekat (Barnett, 1997). Pri navedenoj koncentraciji glukoze dolazi do represije formiranja mitohondrijskih elemenata i respiratornih enzima. Neki kvasci roda *Dekkera* (*Brettanomyces*) čak glukozu fermentiraju brže pod aerobnim nego pod anaerobnim uslovima što za posledicu ima sintezu veće količine sirćetne kiseline. Ova alkoholna fermentacija u striktno aerobnim uslovima je poznata pod nazivom Custers-ov efekat (Wiken, 1968; Scheffers i Wiken, 1969; Barnett, 1981). Navedeni fenomeni su poznati i pod zajedničkim nazivom negativan Pasteur-ov efekat (Weusthuis, 1994).

Kvasci izolovani iz čajne gljive – Iz čajnih gljiva koje su poreklom iz različitih geografskih područja izolavane su različite vrste kvasaca, što je posledica geografskih i klimatskih uticaja, uslova kultivacije i prisustva lokalnih vrsta divljih kvasaca i bakterija (Frank, 1995; Mayser i sar., 1995). Međutim, pregledom literature se može konstatovati da su pojedini rodovi kvasaca zajednički za, po poreklu, različite kombuha kulture. Tako su

Herrera i Calderon-Villagomez (1989) u čajnoj gljivi sa teritorije Meksika determinisali sledeće vrste kvasaca: *Brettanomyces intermedius*, *Candida famata*, *Pichia membranaefaciens*, *Saccharomyces cerevisiae* subsp. *aceti*, *Saccharomyces cerevisiae* subsp. *cerevisiae*, *Torulaspora delbrueckii*, *Zygosaccharomyces bailii* i *Zygosaccharomyces rouxii*. Mayser i saradnici (1995) su ispitujući uzorke kombuhe prikupljene širom Nemačke (dva komercijalna napitka i trideset dva pripremljena u domaćinstvima) utvrdili da su kvasci rodova *Brettanomyces* (sa 56%), *Zygosaccharomyces* (sa 29%) i *Saccharomyces* (sa 26%) najdominantniji. Do sličnih rezultata su došli i Liu i saradnici (1996) koji su iz uzoraka tajvanske kombuhe (Haipao) izolovali vrste *Saccharomyces cerevisiae*, *Zygosaccharomyces bailii* i *Brettanomyces bruxellensis*. Roussin (1996) je u opsežnom istraživanju hemijskih i mikrobioloških karakteristika kombuha napitaka sa područja Severne Amerike utvrdio da su *Zygosaccharomyces* spp. i *Saccharomyces cerevisiae* bile tipične vrste kvasaca u ispitanim uzorcima.



Slika 4. Usvajanje glukoze kod *Saccharomyces* sp. (Embden-Meyerhof-Parnasov put)

Teoh i saradnici (2004) su pored identifikacije kvasaca čajne gljive istražili i promene broja ćelija pojedinačnih vrsta tokom kombuha fermentacije. Iz četiri komercijalna uzorka radne kulture izolovali su i identifikovali sledeće kvasce: *Brettanomyces bruxellensis*, *Candida stellata*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Torulaspora delbrueckii* i *Zygosaccharomyces bailii*. Sve vrste su izolovane i iz fermentisane tečnosti i iz celulozne pelikule, pri čemu je broj ćelija kvasaca u tečnosti tokom dvonedeljne kultivacije bio u opsegu od 10^4 do 10^6 ćelija/mL, dok je broj ćelija u pelikuli za svaki od

četiri ispitana uzorka tokom fermentacije bio konstantan (reda veličine 10^6 – 10^8 ćelija/g u zavisnosti od ispitano uzorka).

Vrste kvasaca izolovane iz čajnih gljiva različitog porekla pripadaju osmotolerantnim i fermentativnim vrstama sposobnim da proizvode veće količine kiseline. Vrste roda *Brettanomyces* spp. se veoma lako prilagođavaju uslovima sredine kakva je podloga za kombucha fermentaciju. *Brettanomyces* spp. su odgovorne za spontanu fermentaciju belgijskog piva (njegov karakterističan ukus potiče od sirćetne kiseline i njenih estara), ali su označeni i kao kontaminanti često izolovani tokom fermentacije drugih vrsta piva (Mayser i sar., 1995). *Candida stellata* je takođe kvasac sposoban da proizvode veću količinu sirćetne kiseline koji se obično izoluje tokom rane ili središnje faze fermentacije vina (Teoh i sar., 2004). *Zygosaccharomyces bailii*, *Schizosaccharomyces pombe* i *Torulasporea delbrueckii* su vrste koje pokazuju toleranciju prema koncentracijama glukoze u podlozi i do 60% (Barnett, 1997) što objašnjava njihovo prisustvo u fermentisanoj tečnosti i čajnoj gljivi.

Zygosaccharomyces bailii je kvasac koji se često izoluje i iz drugih napitaka i namirnica, posebno onih sa niskom vrednošću pH i visokom koncentracijom šećera. Jedna od karakteristika ovog kvasca je sposobnost da proizvode veće količine sirćetne kiseline pri čemu ispoljava i značajnu toleranciju prema njoj (Liu i sar., 1996). Po navodima Barnett i saradnika (2000) *Zygosaccharomyces bailii* je sposoban da toleriše koncentraciju sirćetne kiseline i od 20 g/L.

Saccharomyces cerevisiae je sigurno najpoznatiji kvasac od velikog industrijskog značaja zbog sposobnosti fermentacije ugljenih hidrata (pre svih glukoze i saharoze). Selekcionisani sojevi *Saccharomyces cerevisiae* se koriste u proizvodnji hleba, piva, vina i alkohola. Na istorijsku ulogu ovog kvasca u proizvodnji alkoholnih napitaka sugerise i njegov naziv: *Saccharomyces* na grčkom znači „plesan šećera“, a *cerevisiae* na latinskom „pivski“. U prirodi se kvasci ove vrste nalaze na voću i njihovim razvojem i aktivnošću dolazi do spontane alkoholne fermentacije.

Teoh i saradnici (2004) su pokazali da fermentaciju podloge za kultivaciju čajne gljive započinju osmotolerantni kvasci - *Schizosaccharomyces pombe*, *Torulasporea delbrueckii* i *Zygosaccharomyces bailii*. Tokom fermentacije, kako se povećava koncentracija kiseline u medijumu, tako se broj ćelija vrsta kvasaca koje su osetljivije na kiseline u ukupnoj populaciji smanjuje, a dominaciju preuzimaju acidotolerantni kvasci poput *Zygosaccharomyces bailii* (Teoh i sar., 2004).

Kurtzman i saradnici (2001) su iz kombuche izolovali i opisali nov askosporogeni kvasac *Zygosaccharomyces kombuchaensis*. Analiza je pokazala filogenetsku bliskost ovog kvasca sa *Zygosaccharomyces lentus* koji je poput *Zygosaccharomyces bailli*, *Zygosaccharomyces bisporus*, *Zygosaccharomyces rouxii* i *Zygosaccharomyces mellis* kvasac kvarenja. Steels i saradnici (2002) su utvrdili da je jedna od osnovnih fizioloških razlika između *Zygosaccharomyces lentus* i *Zygosaccharomyces kombuchaensis* njihova različita rezistencija prema sorbinskoj i benzojevoj kiselini. *Zygosaccharomyces lentus* (kao i *Zygosaccharomyces bailli*) je rezistentan na sirćetnu i sorbinsku kiselinu, dok *Zygosaccharomyces kombuchaensis* pokazuje rezistenciju samo prema sirćetnoj kiselini. Ovo ukazuje da su mehanizmi rezistencije kvasaca na sirćetnu i sorbinsku kiselinu različiti i da one inhibiraju rast kvasaca na različite načine. *Zygosaccharomyces lentus* se od *Zygosaccharomyces bailli* (ali i drugih *Zygosaccharomyces* vrsta) razlikuje po odsustvu rasta u kulturi koja se meša na temperaturama preko 25°C, ali i sposobnosti da raste na 4°C. Za četiri ispitana soja *Zygosaccharomyces kombuchaensis* je utvrđeno da su sposobni da rastu u statičnoj kulturi na temperaturama preko 30°C, dok je rast ovog kvasca u kulturi koja se meša na temperaturama iznad 25°C veoma slab (Steels i sar., 2002).

2.1.2. Bakterije sirćetnog vrenja

Bakterije sirćetnog vrenja (BSV) su mikroorganizmi sposobni da oksiduju različite vrste ugljenih hidrata i alkohola što im je obezbedilo veliki industrijski značaj, pre svega kao proizvodnih mikroorganizama u tehnologiji sirćeta. Međutim, one su i glavni uzročnici kvarenja vina usled oksidacije etanola u sirćetnu kiselinu. Oštećena i pokvarena zrna grožđa (posebno ona inficirana plesni *Botrytis cinerea*) sadrže veliki broj bakterija sirćetnog vrenja koje mogu da rastu i razmnožavaju se u širi i izazovu nakupljanje sirćetne i glukonske kiseline (González i sar., 2005). Zbog široke rasprostranjenosti u prirodi, visoke rezistentnosti prema kiselinama i sposobnosti da usvoje različite supstrate bakterije sirćetnog vrenja su česti uzročnici kvarenja hrane uopšte.

Sistematika BSV: Otkako je Pasteur 1864. godine opisao prvu kulturu bakterija sirćetnog vrenja i nazvao je *Mycoderma aceti*, opisano je preko 60 vrsta koje su sa manje ili više uspeha sistematizovane po postojećim taksonomskim sistemima (npr. po Bergeyu ili Krasiljnikovu). U pitanju su striktno aerobne, asporogene, Gram negativne ili Gram varijabilne štapičaste bakterije sa respiratornim tipom metabolizma i kiseonikom kao terminalnim akceptorom elektrona. Oksidacija etanola u sirćetnu kiselinu je tipična fiziološka karakteristika ove grupe bakterija (Korčulanin, 1984)

Usled velike genotipske sličnosti postoji problem diferencijacije pojedinih vrsta bakterija sirćetnog vrenja. Frateur je 1950. godine predložio klasifikaciju koja je šire prihvaćena (Tabela 1) (Korčulanin, 1984).

Tabela 1. Kriterijumi za determinaciju *Acetobacter* vrsta

Kriterijum	Grupe			
	<i>peroxydans</i>	<i>oxydans</i>	<i>mesoxydans</i>	<i>suboxydans</i>
Sinteza katalaze	-	+	+	+
Oksidacija acetata do CO ₂ i H ₂ O	+	+	+	-
Oksidacija laktata do karbonata	+	+	+	-
Oksidacija glicerola do dihidriksilacetona	-	-	+	+
Oksidacija glukoze u glukonsku kiselinu	-	-	+	+

Leifson je 1954. godine ustanovio da se vrlo srodne bakterije sirćetne kiseline razlikuju po položaju flagela (polarno ili peritrihno) što znači da ne mogu pripadati istom rodu, odnosno porodici u sistematici bakterija (Korčulanin, 1984). Na osnovu toga moguće je razlikovati dve grupe, odnosno dva roda bakterija sirćetnog vrenja - *Acetomonas* i *Acetobacter* (Tabela 2).

Sirćetna kiselina je konačni produkt metabolizma *Acetomonas* vrsta koja se ne oksiduje ni produženim trajanjem procesa nakon utroška etanola iz medijuma. Neki autori su za ovu grupu bakterija predlagali ime *Gluconobacter* jer vrste ovog roda mogu oksidovati glukozu do glukonske kiseline.

U priručniku po Bergeyu iz 1984. godine bakterije sirćetnog vrenja su sistematizovane u dva roda: *Acetobacter* i *Gluconobacter* (De Ley i sar., 1984). U rod *Acetobacter* svrstane su vrste: *A. aceti* (ranije *Mycoderma aceti*), *A. liquefaciens* (po De Ley i Frateur iz 1974. *A. aceti* subsp. *liquefaciens*), *A. pasteurianus* (po De Ley i Frateur iz 1974. *A. aceti* subsp. *xylinum*) i *A. hansenii* sp. nov.. Po prethodnom izdanju Bergey-evog priručnika iz 1974. godine rod *Gluconobacter* činila je vrsta *G. oxydans* sa podvrstama: *oxydans*, *industrius*, *suboxydans* i *melanogene*. Međutim, mnogi autori nisu prihvatili

ovakvu diferencijaciju roda *Gluconobacter* na podvrste smatrajući da se različiti sojevi ne mogu smatrati biološkim entitetima (De Ley i sar., 1984).

Tabela 2. Dve grupe bakterija sirćetne kiseline po Leisiger i Müller (Korčulanin, 1984)

Bakterije sirćetne kiseline		
Red	Pseudomonadales	Eubacteriales
Porodica	Pseudomonadaceae	Acetobacteriaceae
Rod	<i>Acetomonas</i>	<i>Acetobacter</i>
Svojstva	polarne flagele nemaju ciklus limunske kiseline ne oksiduju sirćetnu kiselinu	peritrihne flagele imaju ciklus limunske kiseline oksiduju sirćetnu kiselinu
Vrste	dve vrste koje se razlikuju po kriterijumima Frateura	devet vrsta koje se razlikuju po kriterijumima Frateura

Osnovni kriterijum za razlikovanje rodova *Acetobacter* i *Gluconobacter* je sposobnost bakterija roda *Acetobacter* da oksiduju acetat ili laktat do ugljendioksida i vode. U tabeli 3 prikazane su osnovne karakteristike rodova *Acetobacter* i *Gluconobacter* na osnovu kojih se vrši njihovo međusobnog razvrstavanja (Divies i Cachon, 1998).

Poslednjih godina je taksonomija bakterija sirćetnog vrenja doživela značajne promene i vrste koje su prethodno pripadale rodovima *Gluconobacter* i *Acetobacter* su sada smeštene u posebne rodove; tako se *Acetobacter liquefaciens*, *Acetobacter hansenii* i *Acetobacter xylinus* nalaze u rodu *Gluconaacetobacter* (Gullo i sar., 2006).

Po važećoj klasifikaciji ima osam rodova bakterija sirćetnog vrenja koji pripadaju familiji *Acetobacteriaceae*, α -klasa *Proteobacteria*: *Asaia* (*As.*), *Acidomonas* (*Ac.*), *Acetobacter* (*A.*), *Gluconobacter* (*G.*), *Gluconaacetobacter* (*Ga.*), *Kozakia* (*K.*), *Swaminathania* (*S.*) i *Saccharibacter* (*Sa*) (González i sar., 2006; De Vero i Giudici, 2007). Iako rod *Fraturia* (*F.*) pripada γ -klasi *Proteobacteria* vrsta *Fraturia aurantia* je takođe poznata kao bakterija sirćetnog vrenja (De Vero i Giudici, 2007). U skorije vreme *Neosasaia chiangmaiensis* (*N*) a gen. nov., sp. nov. je opisana kao nova osmotolerantna vrsta bakterija sirćetnog vrenja u okviru α -klase *Proteobacteria* (De Vero i Giudici, 2007).

Tabela 3. Osnove za razvrstavanje rodova *Gluconobacter* i *Acetobacter*

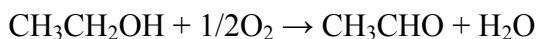
Karakteristika	<i>Gluconobacter</i>	<i>Acetobacter</i>
Flagelacija	polarna	peritrihna
rast na pH = 4,5	+	+
oksidacija etanola do sirćetne kiseline	+	+
oksidacija acetata do CO ₂ i H ₂ O	-	+
oksidacija glukoze u glukonat	+	+/-
aktivnost ciklusa trikarbonskih kiselina	-	+
produkcija 5-keto glukonata	+	+/-
dihidriksilaceton do glicerola	+	+/-

+ : pozitivno; - : negativno; +/- : različito od vrste do vrste

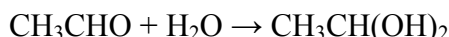
Izvesno je da taksonomija bakterija sirćetnog vrenja još uvek nije u potpunosti utvrđena i su određene izmene i pregrupisanja još uvek u toku. Razlozi taksonomske nepouzdanosti kada su bakterije sirćetnog vrenja u pitanju su nedovoljna saznanja u vezi

filogeneze ovih bakterija i poteškoće koje postoje tokom izolovanja, kultivacije i čuvanja bakterijskih sojeva (posebno onih sojeva koji su poreklom iz sredine sa visokim sadržajem sirćetne kiseline) (Gullo i sar., 2006; De Vero i Giudici, 2007).

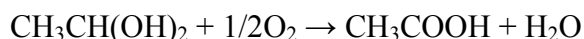
Fiziološke karakteristike BSV: Tipična fiziološka karakteristika bakterija sirćetnog vrenja je njihova sposobnost enzimske oksidacije etanola u sirćetnu kiselinu. Proces oksidacije etanola u sirćetnu kiselinu se odvija u dva stupnja; u prvoj fazi sirćetne fermentacije odvija se oksidacija etanola u acetaldehid u prisustvu enzima etanol dehidrogenaze:



da bi zatim iz acetaldehida nastao hidrat acetaldehida:



Dehidrogenacijom hidratisanog acetaldehida u prisustvu acetaldehid dehidrogenaze nastaje sirćetna kiselina:



Kod većine bakterija sirćetne kiseline aktiviranje vodonika obavljaju dehidrogenaze zavisne od koenzima NAD i NADP. Do konačne oksidacije aktiviranog vodonika (redukovanog NAD i NADP) dolazi gotovo uvek pomoću citohrom sistema respiratornog lanca pri čemu po molu sirćetne kiseline nastaje šest molova ATP. Zbirna jednačina oksidacije etanola bakterijama sirćetnog vrenja izgleda ovako:

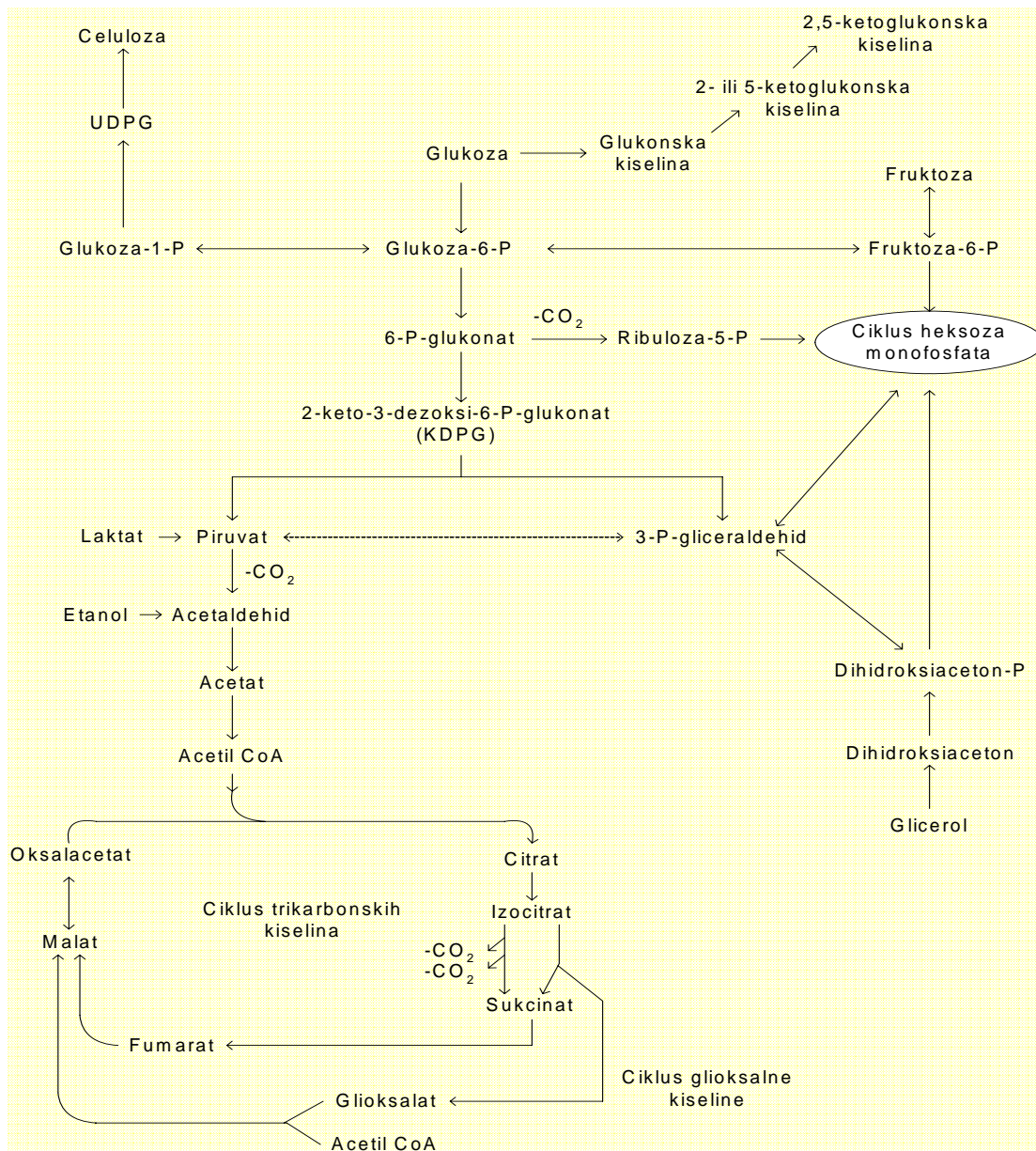


Ovaj proces je najupečatljiviji primer tzv. delimične oksidacije ugljenih hidrata tokom koje se u fermentisanoj tečnosti nagomilavaju nepotpuno oksidovana organska jedinjenja. Pojava nepotpune oksidacije je u direktnoj vezi sa visokom koncentracijom ugljenih hidrata koja je na raspolaganju ćelijama mikroorganizma (Rouz, 1975).

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

Otpornost koju bakterije sirćetnog vrenja pokazuju prema kiselinama je retka među aerobnim hemoheterotrofnim bakterijama (one rastu i u podlogama čija je inicijalna vrednost pH oko 4,5) (Stanier i sar., 1971). Međutim, još uvek nije potpuno jasno šta obezbeđuje visoku acidofilnost bakterija sirćetnog vrenja. Po jednoj od pretpostavki njihova ćelijska membrana je bogata zasićenim masnim kiselinama što je čini relativno nepropustivom za sirćetnu kiselinu (Entani i sar., 1985)

Bakterije sirćetnog vrenja mogu kao izvore ugljenika i energije da iskoriste veći broj organskih jedinjenja: ugljene hidrate (manji procenat sojeva BSV usvaja saharozu, rafinozu i dekstrin), primarne i sekundarne alkohole (etanol, n-propanol, D-manitol, ali ne i metanol), organske kiseline, poliole i dr. (De Ley i sar., 1984; Divies i Cachon, 1998). Slika 5 prikazuje sinoptičku šemu metabolizma jedinjenja koja su izvori ugljenika za bakterije sirćetnog vrenja.

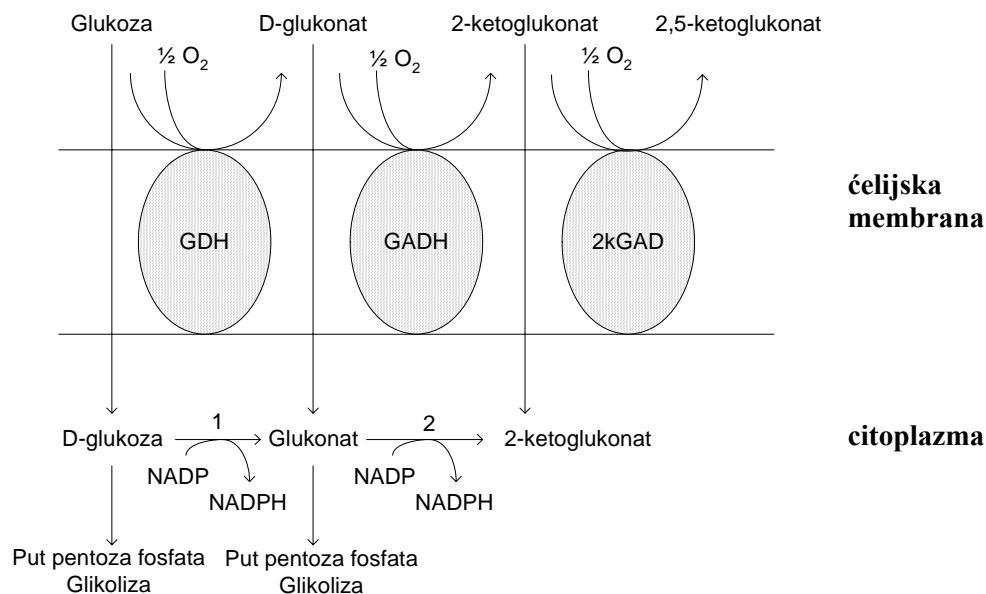


Slika 5. Sinoptička šema metabolizma izvora ugljenika kod bakterije sirćetnog vrenja (Divies i Cachon, 1998)

Glukoza se u ćelijama bakterija sirćetnog vrenja uglavnom razgrađuje glikolizom, ali se pored toga jedan njen deo na spoljašnjoj strani ćelijske membrane, ili unutar ćelije, enzimski oksiduje u glukonsku i glukonske kiseline (Slika 6; Divies i Cachon, 1998). Ove kiseline su posle sirćetne kiseline dominantni metabolički produkti bakterija sirćetnog vrenja.

Bakterije roda *Acetobacter* su sposobne da potpuno oksiduju acetat ciklusom trikarbonskih kiselina do čega dolazi nakon što je utrošen celokupan etanol iz sredine. U prisustvu etanola, a putem inhibicije enzima, onemogućena je dalja oksidacija sirćetne kiseline. Uz to sama sirćetna kiselina pri višim koncentracijama, odnosno vrednosti pH od 3 inhibira sopstvenu oksidaciju (Divies i Cachon, 1998). Za razliku od bakterija roda *Acetobacter* vrste roda *Gluconobacter*, iako striktni aerobi, nemaju kompletiran ciklus trikarbonskih kiselina kome nedostaju α -ketoglutarat dehidrogenaza i sukcinat dehidrogenaza (Divies i Cachon, 1998). Ovo je razlog zašto bakterije roda *Gluconobacter* ne mogu u potpunosti da oksiduju acetat. Posledica ovog metaboličkog nedostatka je

stehiometrijska oksidacija etanola u sirćetnu kiselinu; supstrati (npr. laktat) koji se oksiduju preko piruvata bivaju stehiometrijski konvertovani u sirćetnu kiselinu (Stanier i sar., 1971). Zato je za metabolizam ovih bakterije od ključnog značaja put heksozamonofosfata.



Slika 6. Oksidacija glukoze bakterijama sirćetnog vrenja

1: NADP-zavisna glukoza dehidrogenaza; 2: NADP-zavisna glukonat dehidrogenaza;
 GDH: glukoza dehidrogenaza; GADH: glukonat dehidrogenaza; 2kGADH: 2-ketoglukonat dehidrogenaza.

Specifična karakteristika bakterija sirćetnog vrenja je sposobnost sinteze ekstracelularnih polisaharida. Sintaza celuloze je dokazana za *Acetobacter pasteurianus* (vrstu koja je ranije klasifikovana kao *A. aceti* subsp. *xylinum*) i *Gluconobacter oxydans*, dok drugi sojevi sintetišu levane i dekstrane (Divies and Cachon, 1998). Dugo vremena se smatralo da su bakterije roda *Acetobacter* jedine sposobne za ekstracelularnu sintezu celuloze da bi Deinema i Zevenhuizen (1971) pokazali da određeni sojevi roda *Pseudomonas* to takođe mogu činiti (De Ley i sar., 1984). Mehanizam biosinteza celuloze kod bakterija sirćetnog vrenja - njeni prekursori, intermedijeri i polimerizacija još uvek su nerazjašnjeni. Po jednoj od teorija u početnoj fazi sinteze celuloze glukoza se intracelularno transformiše u poliglukane koji se oslobađaju iz ćelije. U drugoj fazi ovi se polimeri progresivno povezuju i kristalizuju u čvrstu mikrofibrilnu celulozu (De Ley i sar., 1984).

Celulozna navlaka koju stvara *Acetobacter xylinum* tokom kultivacije čajne gljive je debela i kožasta, laminarne strukture, sa dijametrom fibrila od oko 25 nm. Količina sintetisane celuloze tokom kultivacije čajne gljive može da dostigne i 40% od početne količine supstrata (Stojanović i Janković, 1996). Ustanovljeno je da izvor ugljenikovih atoma u podlozi za kultivaciju direktno utiče na sintezu celuloze tokom kombuha fermentacije. Glukoza, fruktoza, glicerol, manitol i etanol u podlozi za kultivaciju stimulišu produkciju celulozne pelikule tokom kombuha fermentacije. Pored toga, Balentine i saradnici (1997) su izneli podatak da i azotna jedinjenja ekstrahovana iz čaja (poput kofeina) takođe aktiviraju biosintezu celuloze.

Čajna gljiva i bakterije sirćetnog vrenja: Činjenica je da su bakterije sirćetnog vrenja poreklom iz čajne gljive mnogo manje istražene u odnosu na kvasce kombuhe. Pregledom literature o kombuhi i mikrobiološkom sastavu čajne gljive može se

konstatovati da u kulturama dominiraju sledeće vrste rodova *Acetobacter* i *Gluconobacter*: *A. xylinum*, *A. aceti*, *A. pasteurianus* i *G. oxydans* (Konovalov i Semenova, 1955; Sievers i sar., 1994; Greenwalt i sar., 2000). Liu i saradnici (1996) su iz kombuha kulture (lokalni naziv Haipao) izolovali dva reprezentativna soja Gram negativnih bakterija koje su bile sposobne da potpuno oksiduju laktat i acetat do CO₂ i proizvode sirćetnu kiselinu iz etanola. Na osnovu ovih fizioloških karakteristika izolovani sojevi su determinisani kao *Acetobacter* spp.. Daljim ispitivanjem njihovih biohemijskih karakteristika i poređenjem dobijenih rezultata sa rezultatima dobijenim za referentne sojeve bakterija sirćetnog vrenja (roda *Acetobacter*), izolovani sojevi bakterija iz čajne gljive su identifikovani kao *Acetobacter aceti* i *Acetobacter pasteurianus*. González i saradnici (2005) su ustanovili da je vrsta *Acetobacter aceti* dominantna bakterija sirćetnog vrenja tokom procesa proizvodnje vina, a uz vrstu *Gluconobacter oxydans* i najzastupljenija u pokvarenim zrnima grožđa.

Acetobacter xylinum (po važećoj taksonomiji vrsta *Acetobacter xylinum* nosi naziv *Gluconacetobacter xylinus*; <http://www.atcc.org>) je po podacima dominantna bakterija u celuloznoj pelikuli i fermentisanom zaslađenom čaju, koja je odgovorna za sintezu sirćetne kiseline, glukonske kiseline i celuloze iz izvora ugljenika tokom kultivacije čajne gljive (Greenwalt i sar., 2000).

Do danas karakterizacija sojeva bakterija sirćetnog vrenja izolovanih iz čajne gljive nije obavljena savremenim molekularnim tehnikama (metode DNA ili rRNA hibridizacije, odnosno različite PCR tehnike) kao što je to slučaj sa bakterijama sirćetnog vrenja izolovanih sa grožđa i tokom proizvodnje vina. Bakterije sirćetnog vrenja izolovane iz čajne gljive su do sada identifikovane ispitivanjem fizioloških i ekoloških osobina, ali ove konzervativne metode, za čije je izvođenje potrebno dosta vremena, nisu pouzdane. Imajući u vidu i činjenicu da je taksonomija ovih bakterija poslednjih decenija doživela velike promene, potrebno je da se ponovo obavi karakterizacija bakterija sirćetnog vrenja koje su poreklom iz čajne gljive.

2.2. Kultivacija čajne gljive

Tradicionalni supstrat za kultivaciju čajne gljive je saharozom zaslađen crni čaj. Početni sadržaj saharoze u podlozi je od 50–100 g/L pri čemu je utvrđena direktna veza između sadržaja saharoze i količine metabolita prisutnih u gotovom napitku (Blanc, 1996). Pokušaji da se saharoza kao izvor ugljenika u podlozi za čajnu gljivu zameni nekim drugim ugljenim hidratom nisu dali željene rezultate. Korišćenje laktoze, glukoze, ili fruktoze je imalo uticaja na sadržaj etanola i mlečne kiseline u fermentacionoj tečnosti i dužinu trajanja fermentacije, dok su efekti na ukus kombuhe bili minimalni (Reiss, 1994). U podlogama sa maltozom i dekstrinom fiziološka aktivnost čajne gljive je smanjena što ima za posledicu produkciju manje količine organskih kiselina i produženje perioda fermentacije (Janković, 1995).

Korišćenje meda u podlogama za kultivaciju čajne gljive, u nameri da se dobije kombuha povećane biološke vrednosti, nije dalo željene rezultate najverovatnije zbog antimikrobnog dejstva nekih aktivnih supstanci meda, koje su uticale na radnu kulturu (Frank, 1995).

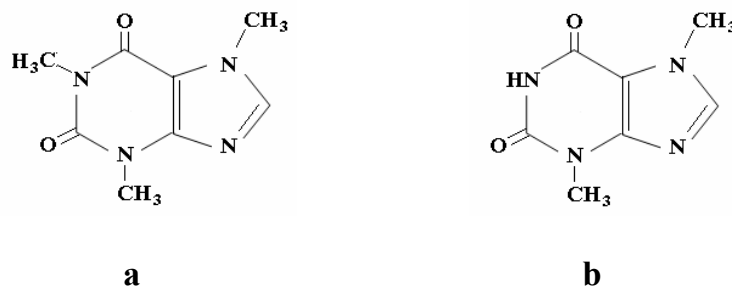
S obzirom da tokom kultivacije čajne gljive ne dolazi do usvajanja celokupne količine izvora ugljenika u gotovom kombuha napitku zaostaje određena količina glukoze, fruktoze i saharoze. Zato kombuha pripremljena od čaja zaslađenog saharozom nije prihvatljiva za dijabetičare, što je bio razlog ispitivanja odgovarajućih alternativnih supstrata. Malbaša (2000) je u cilju dobijanja dijetetskog kombuha napitka umesto saharoze kao izvor ugljenika koristio ekstrakt topinambura. Ovaj ekstrakt bogat

polifruktozom inulinom se u industriji koristi za dobijanje oligofruktozana (poznati probiotici) i fruktoze.

Cvetković (2003) je kao ugljenohidratnu osnovu podloge za kultivaciju čajne gljive koristio ekstrakt slada u količini od 100 g/L. Prisustvo lako usvojivih ugljenih hidrata (glukoze, fruktoze i maltoze) u podlozi sa ekstraktom slada doprinosi bržoj biotransformaciji i dobijanju kombuha napitka prihvatljivih senzornih svojstava, za kraće vreme kultivacije u poređenju sa napitkom pripremljenim na tradicionalan način.

Malbaša i saradnici (2008) su ispitali i mogućnost upotrebe melase u kombuha fermentaciji, koja je zbog svojih nutritivnih svojstava (sadržaja mineralnih materija, vitamina, mlečne kiseline) i relativno niske tržišne cene (kao sporedni produkt industrije šećera) zainteresovala istraživače. Međutim, transformacijom podloge sa melasom dobijen je napitak sa znatno nižim sadržajem sirćetne kiseline u poređenju sa kombuhom dobijenom na uobičajeni način. Tako je ukupni sadržaj kiselina nakon četrnaest dana fermentacije podloge sa melasom bio od 2,5-4,2 g/L (pH je bio između 4,8 i 6,2 u zavisnosti od upotrebene melase), a sadržaj sirćetne kiseline od 0,21–0,28 g/L.

Crni čaj ("fermentisani" listovi *Camellia sinensis* L.) u podlozi za kultivaciju obezbeđuje mikroorganizmima čajne gljive neophodne izvore azota (alkaloide, aminokiseline, proteine) i mikroelemente (hrom, magnezijum, selen i cink) (Cabrera i sar., 2003). Purinske komponente čaja – kofein i teofilin (Slika 7) su posebno značajni nutritivni faktori kao jedinjenja potrebna za sintezu nukleinskih kiselina (Frank, 1994). Chappuis (1998) je utvrdio da se tokom četrnaest dana kultivacije čajne gljive količina kofeina u fermentisanom zaslađenom crnom čaju smanji za 25%, što je posledica usvajanja kofeina od strane mikroorganizama čajne gljive (krajnji sadržaj kofeina u napitku bio je 147 mg/L).



Slika 7. Hemijska struktura kofeina (a) i teofilina (b)

Sadržaj kofeina u zelenom čaju (nefermentisani listovi *Camellia sinensis* L.) je za oko 2,5 puta veći nego u crnom tako da se upotrebom zelenog čaja u podlozi za čajnu gljivu odezbeđuje veća količina azotnih jedinjenja (Hoffman, 1998). Greenwalt i saradnici (1998) su potvrdili da zeleni čaj stimuliše fermentativnu aktivnost čajne gljive što obezbeđuje dobijanje kombuha napitka za kraće vreme kultivacije. Uprkos tome crni čaj je još uvek dominantan izvor azota u podlozi za kultivaciju čajne gljive.

Biljni čajevi poput čaja od nane, lipe, šipka, kamilice i dr. ne sadrže kofein i druga purinska jedinjenja neophodna čajnoj gljivi (Hoffmann, 1998), zbog čega se biljni čajevi u podlogama za kultivaciju koriste samo u kombinaciji sa crnim čajem.

U literaturi nema mnogo podataka o istraživanjima alternativnih podloga za kultivaciju čajne gljive u kojima bi crni (ili zeleni) čaj bio zamenjen nekim drugim izvorom azota. Cvetković i saradnici (2003) su ispitali mogućnosti upotrebe zaslađenog čaja *Echinacea purpurea* L.) kao podloge za kultivaciju čajne gljive. *Echinacea* spp. je lekovita biljka koja se tradicionalno koristi kao imunostimulator u tretmanu

inflamatornih i virusnih bolesti. U Sjedinjenim Američkim državama i Nemačkoj je čaj ehinacee oficijalno pomoćno terapijsko sredstvo u lečenju infekcija gornjih respiratornih organa, urogenitalnih infekcija i inficiranih rana (MaryAnn i sar., 1998). Dokazano je da ekstrakti ehinacee imaju izuzetna antioksidativna svojstva čime se objašnjava lekovitost biljke (Pellati i sar., 2004). Rezultati ispitivanja (Cvetković i sar., 2003) su pokazali da se čajna gljiva može veoma uspešno gajiti na zaslađenom čaju *Echinacea purpurea* jer se kombuha od ehinacee dobija za kraće vreme fermentacije u poređenju sa kombuhom od crnog čaja.

Rtanjski čaj (*Satureja montana* L) je jednogodišnja aromatična biljka koja je od davnina poznata po svojim lekovitim svojstvima. Biljka, etarska ulja i ekstrakti se koriste u tradicionalnoj medicini za lečenje mnogih oboljenja zbog svog baktericidnog, ekspektoranskog, fungicidnog, lachvnog, antidiuretskog, sedativnog i antioksidativnog delovanja (Bezbradica i sar., 2005). Ispitivanjima je dokazano prisustvo fenolnih jedinjenja u rtanjskom čaju koja obezbeđuju njegovo snažno antiseptično dejstvo (http://www.kirka.co.yu/kirkapha/lekovitobilje/rtanjski_caj.htm). Rtanjski čaj se preporučuje u lečenju infekcija organa za disanje, varenje i mokrenje, a uspešnim se pokazao i u terapiji upala kože i sluznica (Jančić i saradnici, 1995). Izuzetna lekovitost rtanjskog čaja je bio osnovni razlog da se ispita mogućnost kultivacije čajne gljive na zaslađenom rtanjskom čaju (Cvetković, 2003), a rezultati su pokazali da se za isto vreme kultivacije dobija napitak veće titrabilne kiselosti u poređenju sa tradicionalnim postupkom.

2.2.1. Uslovi za kultivaciju čajne gljive

Biotransformacija zaslađenog čaja čajnom gljivom se izvodi pod statičnim uslovima, najčešće u staklenim ili porcelanskim sudovima sa širokim otvorom, kako bi se obezbedilo dovoljno vazdušnog kiseonika. Temperatura kultivacije je od 25-30⁰C, a vreme trajanja procesa od 7–14 dana u zavisnosti od radne kulture i konkretnih uslova inkubacije (Reiss, 1994; Guttapadu i sar., 2000; Petrović, 2001). Kulturu bi tokom inkubacije trebalo zaštititi od direktne izloženosti sunčevoj svetlosti zbog negativnog uticaja UV zraka (Frank, 1995).

Za inokulaciju zaslađenog čaja koristi se ili celulozna pelikula nastala tokom procesa fermentacije (u njoj su inkorporirane fiziološki aktivne ćelije kvasaca i bakterija sirćetnog vrenja), ili fermentisana tečnost (maja) iz prethodne kultivacije koja se obično dodaje u količini od 10% (v/v). Poznato je da inicijalni dodatak male količina etanola stimulatивно deluje na proces i produkciju sirćetne kiseline od strane bakterija sirćetnog vrenja (Stojanović i Janković, 1996), što je od posebne važnosti na početku procesa zbog nepovoljnijih uslova sredine.

Otvori sudova za kultivaciju čajne gljive se prekrivaju gazom da bi se sprečila mikrobiološka kontaminacija podloge, odnosno prodiranje sirćetne mušice. Preporuka je da se za kultivaciju čajne gljive ne koriste plastični i metalni sudovi zbog moguće interakcije sa kiselinama nastalim fiziološkom aktivnošću mikroorganizama. Zbog kiselosti i prisustva sirćetne kiseline u fermentisanoj tečnosti (efektom samokonzerviranja) smanjen je rizik od kontaminacije mikroorganizmima iz ekološkog okruženja, zbog čega se kombuha može proizvoditi i u kućnim uslovima bez većih opasnosti po zdravlje konzumenata.

2.2.2. Kontaminanti radne kulture tokom kultivacije

Potencijalna opasnost tokom kultivacije čajne gljive je mogućnost kontaminacije patogenim mikroorganizmima iz okruženja, čemu je posebno izložena kultura kultivisana u kućnim uslovima. Činjenica je da se kombuha ne priprema u aseptičnim uslovima i da se čajna gljiva prenosi iz jednog domaćinstva u drugo, što objektivno povećava rizik od kontaminacije radne kulture i napitka. Potencijalni kontaminanti kombuhe su plesni (od posebnog značaja su mikotoksigene plesni rodova *Penicillium* i *Aspergillus*), patogene bakterije (npr. bakterije fekalnog porekla) i kvasci. Maysner i saradnici (1995) su analizirajući više od trideset uzoraka kombuhe koji su pripremljeni u kućnim uslovima zabeležili nizak nivo kontaminacije; samo su iz tri uzorka izolovali strane mikroorganizme – iz jednog je izolovana plesan *Penicillium* sp., a iz dva patogeni kvasac *Candida albicans*. Roussin (1996) u devet stotina uzoraka kombuhe sa teritorije Severne Amerike nije registrovao prisustvo kvasca *Candida albicans*, a u samo nekoliko uzoraka je identifikovao plesni *Aspergillus niger*, *Penicillium notatum* i *Mucor* sp..

Odsustvo neželjenih mikroorganizama u napitku se može pripisati prisustvu sirćetne kiseline (i drugih antimikrobnih supstanci) koja deluje konzervirajuće na fermentisanu tečnost smanjujući rizik od kontaminacije mikroorganizmima iz okruženja. Zadovoljenjem minimalnih higijenskih uslova tokom kultivacije čajne gljive, mogućnost kontaminacije toksigenim i patogenim mikroorganizmima se gotovo u potpunosti otklanja i obezbeđuje dobijanje zdravstveno bezbednog proizvoda.

2.3. Hemijski sastav kombuha napitka

Glavne hemijske komponente fermentisane tečnosti, odnosno kombuha napitka su supstance nastale metaboličkom aktivnošću mikroorganizama čajne gljive - sirćetna kiselina, glukonska kiselina i etanol (Roussin, 1996). Sirćetna kiselina je dominantna organska kiselina u fermentisanoj tečnosti koja nastaje enzimskom oksidacijom etanola tokom fiziološke aktivnosti bakterija sirćetnog vrenja. Sadržaj sirćetne kiseline se kontinuirano povećava tokom kultivacije čajne gljive - u istraživanju Sievers i saradnika (1995) sadržaj sirćetne kiseline u fermentisanoj podlozi je nakon deset dana dostigao vrednost od 2,1 g/L, nakon dvadeset dana 5,8 g/L, nakon trideset 13,1 g/L, a na kraju procesa posle četrdeset dana inkubacije 28,4 g/L. Glukonska kiselina je po zastupljenosti druga organska kiselina u kombuhi koja nastaje oksidacijom glukoze na ćelijskoj membrani bakterija sirćetnog vrenja. Međutim, moguće je da u produženoj (višenedeljnoj) kultivaciji sadržaj glukonske kiseline u fermentisanoj tečnosti bude i veći od količine sirćetne kiseline (Sievers i sar., 1995; Roussin, 1999; Sreeramulu i sar., 2000). Sinteza sirćetne kiseline je ograničena usled smanjene fermentativne aktivnosti kvasaca i manje količine etanola koji nastaje tokom dužeg trajanja fermentacije. U napitku se u manjoj količini nalaze i organske kiseline iz Krebsovog ciklusa - mlečna, vinska, ćilibarna, jabučna, limunska i oksalna (Reiss, 1987).

Prisustvo glukuronske kiseline u kombuhi je jedna od glavnih kontraverznih tema u vezi sa ovim napitkom imajući u vidu da je ona efikasan detoksikacioni agens. Blanc (1996) je HPLC metodom u fermentisanoj tečnosti tokom dvadesetpetodnevne kultivacije detektovao glukuronsku kiselinu u količini manjoj od 10 mg/L, dok su Lončar i saradnici (2000) tokom kultivacije najveću količinu glukuronske kiseline od 0,0175 mmol/L registrovali (spektrofotometrijskom metodom) nakon sedam dana fermentacije. Roussin (1996) upozorava na mogućnost pogrešne identifikacije glukonske kiseline kao glukuronske s obzirom na veliku sličnost u hemijskoj strukturi ovih jedinjenja i poklapanje njihovih retencionih vremena prilikom hromatografskog određivanja.

Jayabalan i saradnici (2007) su HPLC metodom utvrdili prisustvo D-glukuronske kiseline i u samoj podlozi za kultivaciju čajne gljive (na početku procesa nakon inokulacije) u količini od 0,94 g/L. Nakon osamnaest dana sadržaj ove kiseline u fermentisanom medijumu je dostigao vrednost od 1,73 g/L. Autori međutim ne objašnjavaju prisustvo kiseline u samoj podlozi; ona može da potiče od inokuluma, tj. fermentisane tečnosti iz prethodne kultivacije koji je u količini od 10% dodata podlozi. Međutim, u tom slučaju bi količina glukuronske kiseline trebala da odgovara jednoj desetini količine prisutne u gotovom napitku (ili fermentisanoj tečnosti). U tom smislu je teško objasniti kako u podlozi nakon inokulacije nije pored glukuronske identifikovana i sirćetna kiselina koja je glavni metabolit čajne gljive i dominantno organsko jedinjenje u napitku.

Količina ugljenih hidrata koja zaostaje u napitku po završetku fermentacije je različita, a određena je početnim sadržajem saharoze u podlozi za kultivaciju, dužinom trajanja fermentacije i karakteristikama radne kulture. Sievers i saradnici (1995) su u fermentisanoj tečnosti nakon desetodnevnog kultivacije podloge u kojoj je početna koncentracija saharoze bila 70 g/L detektovali 18,2 g/L saharoze, 28,8 g/L glukoze i 16,4 g/L fruktoze. Cvetković (2003) je određivanjem sadržaja ugljenih hidrata tokom biotransformacije podloge sa crnim čajem lokalnom čajnom gljivom utvrdio da u gotovom napitku dobijenom nakon pet dana kultivacije zaostaje količina glukoze od 29 g/L, fruktoze od 22 g/L i saharoze od 0,29 g/L. Ovi rezultati su pokazali da upotrebljena radna kultura poseduje izrazitu invertaznu aktivnost jer se za dva dana kultivacije polovina početnog sadržaja saharoze transformiše u glukozu i fruktozu, što omogućuje dobijanje kombuha napitka željenih senzornih svojstava za kraće vreme.

Ćelije kvasaca tokom metabolizma sposobne su da sintetišu veći broj biološki vrednih jedinjenja, pre svih vitamine B grupe: tiamin (B₁), riboflavin (B₂), niacin (B₃), pantotensku kiselinu (B₅), piridoksin (B₆), p-aminobenzojevu kiselinu, vitamin B₁₂, folnu kiselinu, nikotinsku kiselinu, biotin, inozitol i dr. (Pyke, 1958; Petrović, 2001). Bauer-Petrovska i Petruševska-Tozi (2000) su u kombuhi odredili kvantitativni sadržaj vitamina B₁ (0,74 mg/mL), B₆ (0,52 mg/mL), B₁₂ (0,84 mg/mL) i vitamina C (1,51 mg/mL). Isti autori su određivali i sadržaj mineralnih elemenata od kojih su neki bitni za normalno funkcionisanje fizioloških procesa u organizmu, a neki toksični: Mn, Fe, Ni, Cu, Zn, Pb, Co, Cr i Cd. Dobijene vrednosti su bile u granicama od 0,462 µg/mL za Mn do 0,001 µg/mL za Cr, pri čemu u kombuha napitku nije detektovan Cd. Istraživanje Petrović i saradnika (1995) je pokazalo da tokom fermentacije dolazi do usvajanja Cu i Zn tokom kultivacije čajne gljive tako da se početna količina Cu (428,9 µg/L) nakon tri dana smanjuje za oko 70%, a nakon 14 dana za preko 85%; količina Zn se naglo smanjuje tokom sedam dana (sa 146,5 na 88,3 µg/L) nakon kojih ostaje gotovo nepromenjena.

Vitamin C nastaje metaboličkom aktivnošću bakterija sirćetnog vrenja iz ketoglukonskih kiselina kao prekursora. Sintetisana količina vitamina C u velikoj meri zavisi od izvora ugljenika u podlozi za kultivaciju čajne gljive i saharoza u odnosu na glukozu i fruktozu stimulatивно deluje na sintezu vitamina C (Petrović i sar., 1995). Petrović i saradnici (1995) i Malbaša (2004) su za razliku od Bauer-Petrovske i Petruševske-Tozi (2000) u napitku utvrdili prisustvo znatno veće količine vitamina C; Petrović i saradnici (1995) su nakon sedam dana kultivacije u biotransformisanoj tečnosti sa saharozom detektovali količinu vitamina C od 0,76 mg/100mL, a Malbaša (2004) 27,86 mg/L nakon deset dana fermentacije. Razlike u količinama vitamina C objašnjavaju primenom različitih metoda određivanja.

Sadržaj etanola u fermentisanoj tečnosti tokom kultivacije čajne gljive prema većini autora ne prelazi koncentraciju od 10 g/L. Sievers i saradnici (1995) su u podlozi sa početnom količinom saharoze od 70 g/L nakon deset dana kultivacije registrovali količinu etanola od 3,6 g/L, a nakon trideset dana 7 g/L. Reiss (1994) je ispitujući uticaje različitih ugljenih hidrata (saharoze, laktoze, glukoze i fruktoze) na metabolizam čajne gljive

ustanovio da količina produkovanog etanola zavisi od upotrebljenog izvora ugljenika i njegove količine u podlozi za kultivaciju. Najveća količina etanola dobijena je u podlozi sa 50 g/L saharoze nakon deset dana fermentacije - 6,3 g/L. I dok je u podlozi sa 50 g/L glukoze nakon deset dana dobijena količina etanola od svega 0,08 g/L, dotle je u podlozi sa istim sadržajem fruktoze koncentracija alkohola relativno visoka - 5,81 g/L. U podlozi sa laktozom najveća koncentracija etanola od 0,4 g/L je postignuta nakon šestodnevne biotransformacije podloge sa 70 g/L laktoze (Reiss, 1994). Veće količine ugljenih hidrata u podlozi za kultivaciju i duža kultivacija ne vode daljem porastu koncentracije ovog alkohola jer se usled smanjenja fermentativne aktivnosti kvasaca, kao posledice porasta kiselosti podloge, produkuje manja količina etanola. S druge strane se tokom kultivacije odvija stalna enzimski oksidacija etanola u sirćetnu kiselinu, zbog čega dolazi do pada količine etanola u podlozi tokom fermentacije.

Količina glicerola nakon šest dana kultivacije čajne gljive dostiže vrednost nešto veću od 1 g/L (Liu i sar., 1996). Do sinteze glicerola dolazi redukcijom dihidriksilacetona nastalog tokom glikolize preko glicerol-3-fosfata uz oksidaciju NADH u NAD⁺ (Fugelsang i Edwards, 2007). Ova reakcija je posebno važna pod fermentativnim uslovima kada postoji nedostatak NAD⁺ u ćeliji. Glicerol prisutan u kombuhi ne utiče značajnije na aromu napitka, ali doprinosi njegovoj viskoznosti (Liu i sar., 1996).

Upoređujući različite literaturne podatke (Janković i Stojanović, 1994; Reiss, 1994; Sievers i sar., 1995; Blanc, 1996; Petrović i Lončar, 1996; Roussin, 1996) izvesno je da ne postoji konzistentnost hemijskog sastava kombuha napitaka. Glavni razlozi za ovo su razlike u primenjenim kombuha kulturama (njihova autentičnost), nepostojanje standardnih uslova za kultivaciju čajne gljive, niti definisane metodologije za određivanje glavnih sastojaka napitka. Ovo treba imati na umu kada se razmišlja o upotrebi kombuhe u medicinske svrhe, ili o kombuhi kao funkcionalnoj hrani, jer tada definisanje i deklarisanje mikrobiološkog i hemijskog sastav napitka postaje imperativ.

2.4. Terapeutski efekti kombuha napitka

Terapeutski efekti kombuha napitka su pre svega zasnovani na personalnim opservacijama, iskustvu i svedočanstvima njenih konzumenata. Međutim, u poslednjih pedesetak godina urađeno je nekoliko istraživanja sa ciljem da se farmakološki efekti kombuhe i naučno potvrde. Prva naučna istraživanja lekovitih svojstava kombuhe urađena su u Rusiji početkom prošlog veka po kojima napitak pomaže kod glavobolja, gastričnih oboljenja i regulisanja intestinalne aktivnosti (Allen, 1998). Između 1925. i 1950. godine nekoliko medicinskih studija je potvrdilo antibiotska svojstva kombuhe, njenu sposobnost regulacije gastro-intestinalne i glandularne aktivnosti, olakšavanja tegoba osobama obolelim od artritisa i hemoroida, kao i pozitivno delovanje na nivo holesterola u krvi i arteriosklerozu. Neke od studija su potvrdile i detoksikaciona svojstva kombuhe, njeno blagotvorno delovanje na nervni sistem i usporavanje procesa starenja (Allen, 1998).

Centar za onkološka istraživanja iz Moskve i Ruska akademija nauka su 1951. godine objavili rezultate obimnog istraživanja koji potvrđuju da dnevno konzumiranje kombuhe obezbeđuje visoku rezistenciju na kancer, što je posledica detoksikacije organizma i jačanja imunološkog sistema. Ovi rezultati su potvrđeni istraživanjima sprovedenim u Švajcarskoj, Nemačkoj i Holandiji (Allen, 1998).

Istraživanja tokom 60-tih godina prošlog veka su potvrdila antikancerogeno delovanje kombuhe kao posledice stimulacije produkcije interferona, proteina koga stvaraju ćelije imunostistema, a koji deluju na viruse, parazite i kancerogene ćelije (Dufresne i Farnworth, 2000). Hartmann i saradnici (2000) su objavili rezultate istraživanja tokom koga je eksperimentalnoj grupi miševa redovno davana kombuha i koji

su pokazali značajno poboljšanje zdravstvenog stanja i produženje životnog veka eksperimentalnih životinja koje su redovno dobijale kombuhu kao dodatak ishrani.

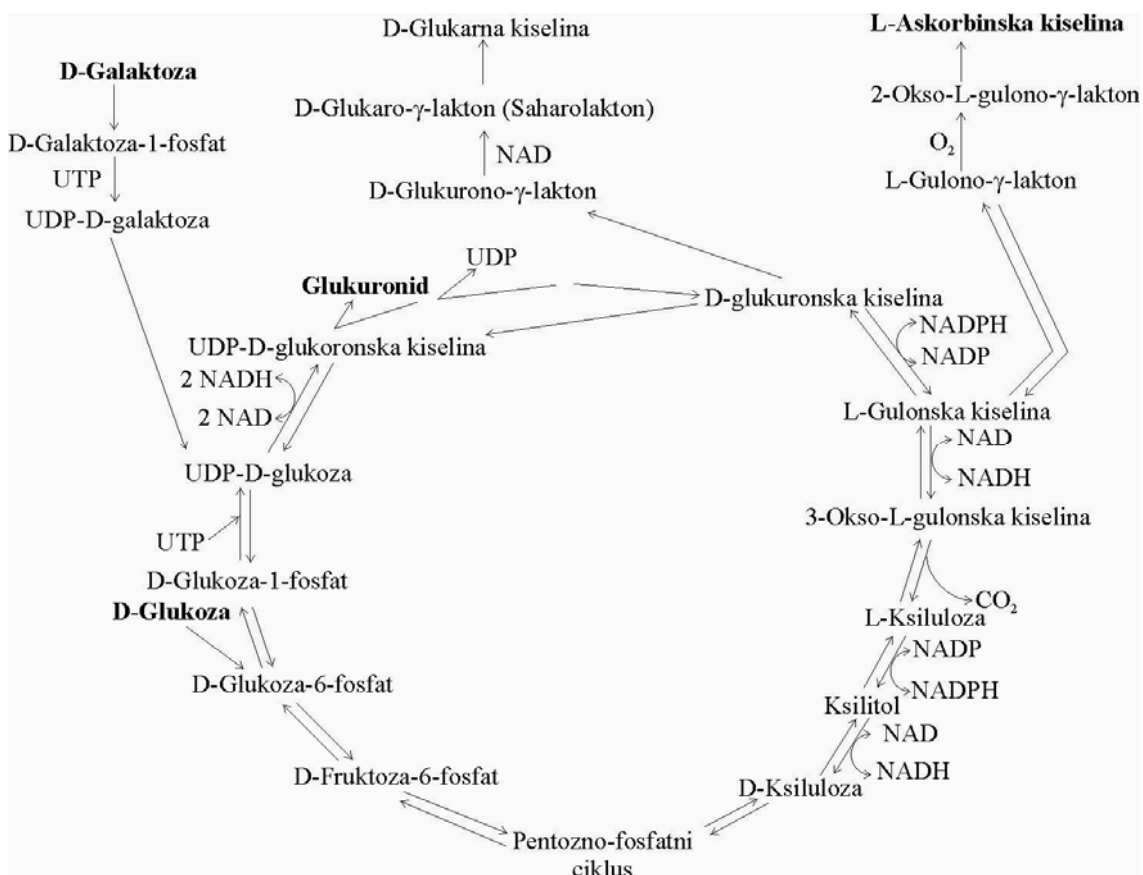
Većina terapijskih efekata kombuhe se objašnjava antioksidativnom aktivnošću i organskim kiselinama prisutnim u napitku - pre svih glukuronskom kiselinom. Glukuronska kiselina je poznati detoksikacioni agens jer je sposobna da veže molekule toksina i da obezbedi njihovu ekskreciju iz organizma. S druge strane, bolesti kao što su kostobolja, reumatizam, artritis i kamen u bubregu upravo nastaju kao posledica akumulacije toksina u organizmu (Dufresne i Farnworth, 2000). Međutim, još uvek ne postoje jasni dokazi o prisustvu glukuronske kiseline u kombuhi. Neki autori smatraju da je supstanca koja je u kombuhi identifikovana kao glukuronska kiselina zapravo 2-ketoglukonska kiselina (Roussin, 1999) i da je hromatografskim tehnikama teško razdvojiti ova jedinjenja. Nesporno je da se u urinu osoba koje konzumiraju kombuhu nalazi visok nivo glukuronida, koji jedni objašnjavaju prisustvom glukuronske kiseline, a drugi 1,4-saharolaktonom, jedinjenjem koje je pronađeno u kombuhi i koje deluje kao inhibitor β -glukuronidaze (Slika 8) (Roussin, 1999).

Hoffmann (1996) je izneo mišljenje da glukuronska kiselina nije direktno odgovorna za proces detoksikacije organizma, već da je to UDP-glukuronska kiselina, koja se uz druge intermedijerne metabolite transportuje kroz ćelijski zid u spoljašnjost. UDP-glukuronska kiselina, kao aktivni oblik glukuronske kiseline, nije nađen u kombuhi, ali nekoliko intermedijera metaboličkog puta glukuronske kiseline - glukarna kiselina, askorbinska kiselina i saharolakton (glukarolakton) jesu. Ovo potvrđuje da postoji značajna aktivnost ciklusa glukuronske kiseline tokom kultivacije čajne gljive (Slika 8).

Sudeći po nekim istraživanjima i sirćetna kiselina je sposobna da konjuguje toksine obezbeđujući njihovu eliminaciju iz organizma (Hoffmann, 1998). Ovo potkrepljuje stavove nekih istraživača po kojima je sirćetna kiselina, a ne glukuronska odgovorna za detoksikaciona svojstva kombuhe.

Vitamini B grupe imaju višestruko blagotvorno dejstvo na organizam i njihovim prisustvom u kombuhi se mogu objasniti neki od terapijskih efekata napitka. Poznato je da vitamini B jačaju nervni i imunološki sistem, pomažu rastu ćelija (efektom na crvena krvna zrnca preventivno sprečavaju anemiju), smanjuju rizik od raka pankreasa, pomažu kod stresa i depresije, kardiovaskularnih bolesti (Roche, 1998; <http://en.wikipedia.org/wiki/Bvitamins>).

I pored činjenice da se mlečna kiselina u napitku nalazi u relativno malim količinama (Reiss (1994) je maksimalnu količinu od 0,9 g/L zabeležio nakon 6 dana fermentacije podloge sa 50 g/L saharoze), njeno prisustvo je od velike važnosti za terapijske efekte kombuhe. Kod pacijenata obolelih od kancera primećen je nedostatak L-mlečne kiseline u vezivnom tkivu i vrednost pH krvi veća od 7,56 (Roche, 1998). Nedostatak L-mlečne kiseline u tkivima otežava respiraciju ćelija što rezultira stvaranjem racemske smeše L- i D-mlečne kiseline i uslovima za razvoj malignih ćelija (Frank, 1995). Zato neki od istraživača potencijalno antikancerogeno dejstvo kombuhe objašnjavaju sposobnošću napitka da koriguje vrednost pH krvi i kompenzuje nedostatak mlečne kiseline u organizmu (Roche, 1998).



Slika 8. Ciklus glukuronske kiseline

2.4.1. Antimikrobno delovanje kombuha napitka

Nekoliko istraživanja je provedeno kako bi se *in vitro* utvrdila antimikrobna aktivnost kombuhe i njeni nosioci. Stenkraus i saradnici (1996) su dokazali antimikrobnu aktivnost kombuhe od crnog čaja sa sadržajem sirćetne kiseline od 10,5 g/L na *Helicobacter pylori*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* i *Agrobacterium tumefaciens*. S obzirom na nizak sadržaj tanina u uzorcima kombuhe i na to da kombuha nakon neutralisanja nije pokazivala bilo kakvu antimikrobnu aktivnost zaključeno je da je sirćetna kiselina nosilac antimikrobne aktivnosti napitka.

Greenwalt i saradnici (1998) su utvrdili antimikrobni efekat kombuhe sa koncentracijom sirćetne kiseline od 7 g/L na: *A. tumefaciens*, *Bacillus cereus*, *Salmonella choleraesuis* serotip *typhimurium*, *S. aureus* i *E. coli*, dok je aktivnost na patogeni kvasac *Candida albicans* izostala. Zapazili su da se inhibitorski efekat kombuhe povećava sa porastom koncentracije čaja u podlozi za kultivaciju. Takođe su utvrdili da čaj u konzumnoj koncentraciji nema bilo kakvu antimikrobnu aktivnost; nefermentisani crni čaj je pri minimalnoj koncentraciji čaja od 35 g/L inhibirao rast samo *S. aureus*., dok u koncentraciji od čak 70 g/L nije ispoljio aktivnost na *E. coli*, *S. choleraesuis*, *B. cereus*, *C. albicans* i *A. tumefaciens*. Kombuhe od crnog i zelenog čaja su pokazale identičnu antimikrobnu aktivnost i pored očekivanja da će zeleni čaj zbog većeg sadržaja katehina doprineti izraženijoj aktivnosti napitka. Antimikrobno delovanje kombuhe se neutralizacijom gubilo zbog čega su aktivnost napitka prema test mikroorganizmima pripisali organskim kiselinama (pre svih sirćetnoj).

Poznato je da organske kiseline (sirćetna, benzoeva, sorbinska, sulfita) imaju određeni antimikrobni efekat što je u praksi iskorišćeno za konzervisanje različitih

prehrambenih proizvoda. U vodenim rastvorima slabe kiseline formiraju dinamičku ravnotežu između nedisosovanog molekula i jona. Klasičnom teorijom se konzervirajuće delovanje slabih kiselina objašnjava time da nedisosovani deo molekula kiseline, za razliku od anjona koji nemaju afinitet prema lipidima, prodire u ćeliju difuzijom kroz ćelijsku membranu. Molekul kiseline u ćelijskoj citoplazmi, koja je približno neutralnog pH, disocijacijom oslobađa protone što izaziva acidifikaciju citoplazme i inhibiciju ćelijskog rasta (Steels i sar., 2002).

Sreeramulu i saradnici (2000) su obavili najopsežnije ispitivanje antimikrobne aktivnosti kombuhe od crnog čaja (sadržaj sirćetne kiseline od 8,5 g/L), ispitujući istovremeno i uticaj nefermentisanog čaja i sirćetne kiseline kao kontrolnih uzoraka, kao i uticaj korekcije vrednosti pH napitka (korekcija na pH=7,00) na njegovu antimikrobnu aktivnost. Uz to su uzorci kombuhe i termički tretirani kako bi se utvrdilo da li su termostabilne supstance proteinske prirode nosioci antimikrobne aktivnosti. Uzorci nefermentisanog čaja jedva da su pokazali bilo kakvo antimikrobno dejstvo na test mikroorganizme (izuzetak je bio *Campylobacter jejuni*). Odgovarajući rastvor sirćetne kiseline je pokazao gotovo isti inhibitorski efekat kao i kombuha na deset od četrnaest sojeva bakterija (*Enterobacter cloacae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *B. cereus*, *H. pylori*, *Listeria monocytogenes*, *S. aureus*, *Aeromonas hydrophilia*, *Yersinia enterocolitica*, *C. jejuni*, *Staphylococcus epidermidis*); u preostala četiri slučaja (*E. coli*, *Salmonella enteritidis*, *S. typhimurium* i *Shigella sonnei*) kombuha je pokazala snažniji antimikrobni efekat na koji nije uticala korekcija vrednosti pH, odnosno termički tretman. Kombuha je za razliku od sirćetne kiseline inhibirala i rast patogenog kvasca *C. albicans*. Rezultati su upućivali na zaključak da nosioci antimikrobne aktivnosti kombuha napitka nisu supstance proteinske prirode, ali i na to da pored sirćetne kiseline u napitku postoje i druge aktivne komponente.

Teoh i saradnici (2004) navode da je Tietze (1995) u svom radu kao jednog od nosilaca antibakterijske aktivnosti kombuhe označio i usninsku kiselinu. Ova kiselina je poznat antivirusni, antiprotozoalni i antibakterijski agens, a najzastupljenija je u lišajevima (u kojima njen sadržaj može dostići i 6%) da bi tek od skoro i u gljivama bile identifikovane komponente slične usninskoj kiselini (Ingólfssdóttir, 2002).

Antimikrobna svojstva kombuhe zavise od nekoliko faktora; dokazano je da se inhibitorski efekat kombuhe povećava sa porastom koncentracije čaja u podlozi za kultivaciju (Greenwalt i sar., 1998); smanjenje dodirne površine podloge i vazduha doprinosi smanjenju antimikrobne aktivnosti napitka, a isti efekat imaju pojačana aeracija i mešanje podloge tokom kultivacije čajne gljive (Stojanović i Janković, 1996). Čini se da je od značaja za antimikrobnu aktivnost kombuhe i ugljeni hidrat upotrebljen u podlozi za kultivaciju kao izvor ugljenika. Tako se kombuha snažnijeg antimikrobnog dejstva dobija na podlogama sa saharozom i glukozom nego u sredinama sa istim sadržajem fruktoze (Janković, 1995).

2.4.2. Antioksidativno delovanje kombuha napitka

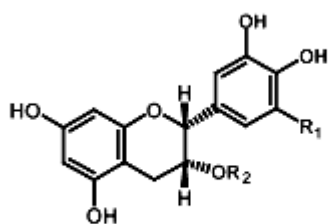
Način ishrane i sastojci hrane igraju važnu ulogu u razvoju hroničnih oboljenja zbog čega zdravstvene organizacije u poslednje vreme veliku pažnju posvećuju ovoj problematici. Kardiovaskularna i kancerogena oboljenja su dovedena u vezu sa postojanjem reaktivnih kiseoničnih vrsta i oksidativnim oštećenjima biomolekula (tj. sa postojanjem oksidativnog stresa) (Wiseman i sar., 1997). Humana ćelija je konstantno izložena reaktivnim kiseoničnim vrstama (superoksid anjon, hidriksil i peroksil radikali i vodonik peroksid) koje uglavnom nastaju iz endogenih izvora kao što su lanac prenosa elektrona, peroksizomi i citohrom P-450 sistem. Ostale reaktivne kiseonične vrste i slobodni radikali nastaju kao odgovor imunosistema (npr. makrofaga), ili kao rezultat spoljašnjih faktora (pušenja, vazdušnog zagađenja, uticaja UV zračenja). Hronično

izlaganje reaktivnim kiseoničnim vrstama može izazvati oštećenja DNA, membranskih lipida, lipoproteina, kao i funkcionalnih i strukturnih proteina ćelija.

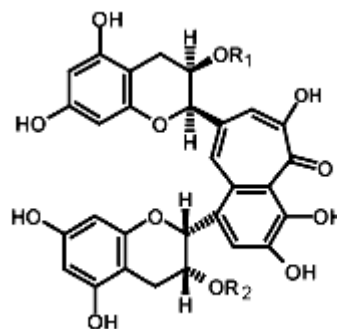
Ljudski organizam ima odbrambene mehanizme koji treba da spreče potencijalna oštećenja izazvana slobodnim radikalima. Intracelularni enzimi koji su sposobni da neutrališu reaktivne kiseonične vrste predstavljaju prvu liniju odbrane. Primarna reakcija u tom smislu je dizmutacija superoksid anjon radikala u vodonik peroksid i kiseonik enzimom superoksid dizmutazom, koju prati i uklanjanje vodonik peroksida u prisustvu glutation peroksidaze (Čanadanović-Brunet, 1997). Pored endogenih enzimskih sistema koji nisu u potpunosti efikasni u prevenciji oksidativnih oštećenja, kao hvatači („skevindžeri“) slobodnih radikala deluju i različita jedinjenja (endogene i egzogene prirode), predstavljajući tako drugu liniju odbrane organizma (vitamin E, vitamin C, karotenoidi, flavonoidi, selen i dr.) (Wiseman i sar., 1997).

Antioksidativna aktivnost čaja: Čaj (vodeni ekstrakt listova biljke *Camellia sinensis* L.) sa procenjenom dnevnom potrošnjom od 18-20 milijardi šolja je drugi najčešće konzumirani napitak na svetu. U zavisnosti od procesa dobijanja postoje tri glavna tipa čaja: nefermentisani zeleni čaj (proizveden sušenjem i oparivanjem svežeg lišća bez fermentacije pri čemu para inhibira aktivnost enzima polifenol oksidaze i autooksidacija lišća); semifermentisani oolong čaj (sveži listovi su delimično fermentisani pre sušenja); fermentisani crni čaj i crveni (pu-erh) čajevi (potpuna fermentacija listova pre sušenja delovanjem prirodne mikroflore u kojoj *Aspergillus niger* igra značajnu ulogu) (Cabrera i sar., 2003). Termin fermentacija listova čaja treba shvatiti uslovno jer to nije fermentacija u pravom smislu, poput alkoholne fermentacije koja je rezultat fiziološke aktivnosti kvasaca, već je u pitanju oksidativni proces tokom sušenja listova katalizovan enzimima prisutnim u čaju. U ukupnoj svetskoj proizvodnji čaja crni čaj učestvuje sa 76-78%, zeleni sa 20-22%, a manje od 2% otpada na oolong čaj (Cabrera i sar., 2003).

Glavni aktivni sastojci listova zelenog čaja su katehini - epikatehin (EC), epikatehin galat (ECG), epigalokatehin (EGC) i epigalokatehin galat (EGCG) (Slika 9). Tokom proizvodnje crnog čaja, zbog intezivne enzimske oksidacije katehina listova, nastaju jedinjenja od kojih potiče karakteristična boja i ukus crnog čaja - teaflavini (TF) i tearubigini (TR). Glavni teaflavini u crnom čaju su teflavin (TF1), teaflavin-3-galat (TF2A), teaflavin-3'-galat (TF2B) i teaflavin-3,3'-digalat (TF3) (Su i sar., 2003).



EGC – Epigalokatehin $R_1=OH$ $R_2=H$
 EC - Epikatehin $R_1=H$ $R_2=H$
 EGCG – Epigalokatehin galat $R_1=OH$ $R_2=galoil$
 ECG – Epikatehin galat $R_1=H$ $R_2=galoil$



TF₁ – Teaflavin-1 $R_1=R_2=H$
 TF_{2A}– Teaflavin-3-galat-A $R_1=galoil$ $R_2=H$
 TF_{2B}– Teaflavin-3'-galat-B $R_1=H$ $R_2=galoil$
 TF₃– Teaflavin-3,3'-digalat-B $R_1=R_2=galoil$

Slika 9. Struktura katehina i teaflavina zelenog čaja

Dokazano je da su katehini i flavonoli čaja veoma efikasni antioksidanti u prisustvu reaktivnih kiseoničnih vrsta i slobodnih radikala, koji svoju aktivnost ispoljavaju i u vodenim i u lipofilnim sredinama (Wiseman i sar., 1997; Mukhtar i Ahmad, 1999; Dufresne i Farnworth, 2000). Slobodne elektrone stabilizuju različitim mehanizmima koji

uključuju delokalizaciju elektrona i formiranje intramolekularnih vodoničnih veza (Jovanović i sar., 1994). Katehini čaja su mnogo moćniji antioksidanti u poređenju sa drugim fenolima biljaka. Eksperimenti su pokazali da je EGCG dvadeset puta aktivniji nego vitamin C, trideset puta nego vitamin E i 2-4 puta nego BHA ili BHT (Dufresne i Farnworth, 2000). Cao i saradnici (1996) su pokazali da zeleni i crni čaj imaju znatno višu antioksidativnu aktivnost prema peroksil radikalima u odnosu na povrće. Pod određenim uslovima katehini mogu delovati kao inhibitori lipidne peroksidacije u moždanom tkivu i to oko dvesto puta aktivnije u odnosu na α -tokoferole (Dufresne i Farnworth, 2000). Takođe, flavonoidi su sposobni da grade helate sa slobodnim jonima bakra i gvožđa i na taj način ih stabilizuju (Miller i sar., 1996). Ova sposobnost flavonoida je značajna jer navedeni joni katalizuju formiranje reaktivnih kiseoničnih vrsta, zbog čega se i koriste za generisanje stabilnih slobodnih radikala u model sistemima.

Istraživanja su pokazala da su katehini zelenog čaja veoma nestabilni u alkalnim rastvorima u kojima se razgrađuju za nekoliko min., dok su u kiselim rastvorima mnogo stabilniji (Zhu i sar., 1997). Su i saradnici (2003) su utvrdili da stabilnost EGCG i EGC mnogo više zavisi od vrednosti pH rastvora u odnosu na EC i ECG.

Tokom kombuha fermentacije i transformacije zaslađenog čaja dolazi do promena u sadržaju katehina u medijumu za kultivaciju. Jayabalan i saradnici (2007) su izučavali promene epikatehin izomera (EGCG, EGC, ECG i EC), teaflavina i tearubina i utvrdili da četiri epikatehinska izomera pokazuju različitu stabilnost tokom fermentacije i da se svi manje ili više razgrade tokom prvih devet dana. Najveći pad za približno 50% u odnosu na početni sadržaj je zabeležen za EC i ECG. Međutim, nakon devet dana isti autori utvrdili su značajan porast količine EGC i EC u fermentisanoj tečnosti, tako da je njihova koncentracija nakon dvanaestog dana fermentacije veća od inicijalne, što nije slučaj sa EGCG i ECG. Degradacija EGCG tokom fermentacije je u slučaju kombuhe od zelenog čaja 18%, a u slučaju kombuhe od crnog čaja čak 30%. S druge strane, tokom kultivacije čajne gljive stepen degradacije ECG u odnosu na početnu vrednost, je oko 23% (za zeleni čaj), odnosno 48% (crni čaj). Pretpostavka je da se tokom kombuha fermentacije deo EGCG i ECG konvertuje u odgovarajuće katehine - EGC i EC. Međutim, u istraživanju Zhu i saradnika (1997) nije zabeležena konverzija EGCG u EGC kada se hemijski čist EGCG inkubira u alkalnom ili kiselom rastvoru.

Porast koncentracije EGC i EC tokom kombuha fermentacije se može objasniti biotransformacijom EGCG u EGC i ECG u EC, usled delovanja enzima čajne gljive. Naime, poznato je da je kvasac *Candida tropicalis* odgovoran za degradaciju polifenola u otpadnim vodama indukcijom peroksizomalnih enzima, kao što je katalaza (Ettayebi i sar., 2003). Takođe, intestinalne bakterijske vrste rodova *Clostridium*, *Bacteroides* i *Eubacterium* su sposobne da razgrade polifenolne materije poreklom iz hrane, pri čemu cepanjem ugljeničnog prstena flavonoida nastaju fenolne kiseline (Rechner i sar., 2004).

Antioksidativna aktivnost kombuhe: Allen (1998) je zdravstvene efekte kombuhe kao što su olakšavanje tegoba, kod inflamatornih procesa i artritisa, prevencija kancera i jačanje imunološkog sistema, doveo u vezu sa njenom antioksidativnom aktivnosti. O antioksidativnoj aktivnosti kombuhe, aktivnim nosiocima i mehanizmima njenog delovanja, u literaturi postoji mali broj podataka. Pretpostavlja se da antioksidativna aktivnost napitka potiče delom od supstanci koje su ekstrahovane iz čaja, ali i da metaboliti čajne gljive nastali tokom fermentacije, daju svoj doprinos. Spektrofotometrijskim određivanjem DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) radikala u model sistemu, Chu i Chen (2006) su ispitali vezu između procesa fermentacije i antioksidativne aktivnosti kombuhe. Kontrolni uzorak tokom ispitivanja bio je dekokt čaja odgovarajuće koncentracije. Ispitani uzorci kombuhe su pokazali povećan "scavenging" efekat u odnosu na kontrolni uzorak tokom petnaest dana fermentacije. Kod četiri, od ukupno osam uzoraka kombuhe registrovan je porast antioksidativne aktivnosti za oko 1,7 puta, dok je kod preostalih uzoraka taj porast bio nešto manji. Različiti uzorci kombuhe su pokazali različitu

sposobnost neutralisanja slobodnih radikala što je posledica različitog porekla radnih kultura. Tokom istog istraživanja kombuha je pokazala veću sposobnost inhibicije peroksidacije linoleinske kiseline u odnosu na odgovarajući dekokt crnog čaja.

Chu i Chen (2006) su zaključili da povećan antioksidativni kapacitet ispitanih kombuha napitaka, u odnosu na crni čaj, nije u vezi sa njenom sposobnošću heliranja jona gvožđa. Kako je tokom fermentacije zabeleži porast ukupnih polifenola u fermentisanoj tečnosti, autori su zaključili da enzimi čajne gljive oslobođeni u medijumu, uzrokuju biodegradaciju teaflavina i stvaraju potencijalno antioksidativne molekule. Antioksidativna aktivnost kombuhe ne zavisi od ukupne količine polifenola u napitku, već i od vrste metabolita koji se oslobađaju tokom fermentacije.

Cvetković (2003) je ispitao antioksidativnu aktivnost kombuha napitaka od ehinacee (*Echinacea purpurea*) i crnog čaja, upoređujući je sa aktivnošću odgovarajućih čajnih napitaka. Čajevi pripremljeni od korena i herbe *Echinacea purpurea* dodati u model sistem sa hidriksil radikalima izazvali su značajnije sniženje relativnog inteziteta elektron spin rezonantnog (ESR) signala - za 31,25%, odnosno 84,38% u poređenju sa crnim čajem. Kombuha napici pripremljeni od crnog čaja, čaja korena i herbe *Echinacea purpurea* pokazali su značajnije smanjenje koncentracije hidriksil radikala model sistema u odnosu na čajne napitke. Kombuha od crnog čaja je smanjila intenzitet ESR signala za 60,94 %, kombuha od korena za 71,25 %, a kombuha od herbe ehinacee čak za 90,63 %.

Malbaša (2004) je ispitao uticaj vremena fermentacije na antioksidativnu aktivnost kombuha napitaka prema hidriksil i DPPH radikalima. Ustanovio je da na aktivnost hidriksil radikala u model sistemu ne utiče značajno trajanje kombuha fermentacije na crnom i zelenom čaju, jer se antioksidativna aktivnost napitka dobijenog nakon tri dana fermentacije menja za manje od 10% u narednih sedam dana. Kombuha napici od crnog i zelenog čaja su smanjili i koncentraciju DPPH radikala u model sistemu, pri čemu je najveći pad inteziteta ESR signala bio posle trećeg dana fermentacije, nakon kojih je zabeleženo opadanje ove aktivnosti do kraja procesa. Kombuha od zelenog čaja je u slučaju oba ispitana slobodna radikala pokazala veću antioksidativnu aktivnost nego kombuha od crnog čaja.

2.4.3. Antikancerogeno delovanje čaja i kombuhe

Od 1990. godine dijagnostikovano je oko deset miliona slučajeva kancerogenih oboljenja od kojih je četiri miliona okončano smrću (Mukhtar i Ahmad, 1999). Veruje se da je gotovo trećina oboljenja povezano sa načinom života i navikama u ishrani što treba imati u vidu kada se govori o razvijanju strategije borbe protiv kancera (Adebamowo i sar., 2005). S obzirom da hemoterapija i hiruški zahvati nisu potpuno efikasni u lečenju kancerogenih oboljenja, razvijen je koncept prevencije i kontrole kancera (hemoprevencija) pravilnom ishranom, pravilnim navikama u ishrani i korišćenjem prirodnih ili sintetičkih antikancerogenih komponenti

Brojna *in vitro* i *in vivo* istraživanja potvrđuju antikancerogene i protektivne efekte čaja i delovanje njegovih komponenti u različitim fazama razvoja malignih ćelija (Dufresne i Farnworth, 2000). Kako do razvoja kancerogenih ćelija dolazi zbog reakcije reaktivnih kiseoničnih vrsta sa DNA ćelijama, antikancerogeni efekat čaja se upravo može objasniti eliminacijom slobodnih radikala, odnosno njegovim antioksidativnim osobinama. Smatra se da je za antikancerogeno delovanje čaja veoma značajan mehanizam izazivanja apoptoze malignih ćelija i njegov direktan uticaj na neke od promotera tumora za koje je pokazano da inhibiraju apoptozu (Ahmad i sar., 1997).

Istraživanja na životinjama pokazala su da vodeni ekstrakt zelenog čaja i polifenoli izolovani iz zelenog čaja deluju protektivno kod hemijski izazvane karcinogeneze u plućima, jetri, esophagus, pankreasu, debelom crevu, grudima i duodenuma (Mukhtar i

Ahmad, 1999). Antikancerogeni efekti epigalokatehin galata (EGCG), kao glavnog polifenola zelenog čaja je dokazan kroz nekoliko istraživanja. Yokoyama i saradnici (2008) su pokazali da EGCG preventivno deluje na genezu kancera cervixa indukcijom apoptoze i inhibicije aktivnosti enzima telomeraze. Pokazano je i da EGCG poseduje i antikancerogeno delovanje kod adenokarcinoma, uključujući kancer stomaka, debelog creva i grudi (Yokoyama i sar., 2008). Lambert i Yang (2003) su u *in vitro* ogleđima utvrdili da polifenoli čaja (posebno EGCG) inhibiraju rast i apoptozu ćelijskih linija nekoliko humanih karcinoma uključujući melanom, karcinom grudi, pluća, debelog creva i leukemije. Međutim, još uvek su nepoznati mehanizmi antikancerogenog delovanja polifenola čaja.

Iako postoji veliki broj istraživanja o hemoprotektivnom delovanju zelenog i crnog čaja, još je nejasan efekat smanjenja rizika od pojedinih vrsta kancera uslovljen konzumiranjem čaja. Istraživanje sprovedeno u Holandiji 1996. godine pokazuje da konzumiranje crnog čaja nema efekta na rizik od kancera dojke, stomaka i colorectal kancera, dok po istraživanju iz SAD iz 2000. godine konzumiranje crnog čaja redukuje rizik od kancera debelog creva kod muškaraca i žena (Lambert i Yang, 2003). Međutim, istraživanja sprovedena u Kini i Japanu su pokazala da nema značajnije zavisnosti između konzumiranja zelenog čaja i smanjenja rizika od kancera želuca (Tsubono i sar., 2001; Lambert i Yang, 2003). Kontradiktorni rezultati su dobijeni i u ispitivanjima uticaja čaja na kancer esophageal (Lambert i Yang, 2003).

Bioraspoloživost polifenola čaja još uvek nije potpuno jasna, tako da je moguće da postoje individualne varijacije u metabolizmu i značajan uticaj crevne mikroflore na usvajanje i raspoloživost biološki aktivnih molekula.

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

- prevencija mutagenosti i genotoksičnosti hemikalija,
- redukcija biohemijskih markera koji iniciraju formiranje tumora,
- redukcija biohemijskih markera koji utiču na razvoj tumora,
- regulacija detoksikacionih enzima,
- uklanjanje aktivnih kancerogenih metabolita,
- antioksidativnom aktivnošću.

Iako je antikancerogeno delovanje kombuhe dovedeno u vezu sa antioksidativnim i detoksikacionim svojstvima napitka, teško je, bez opsežnijih istraživanja zaključiti ko su nosioci potencijalne aktivnosti kombuhe, odnosno da li su za njeno antiproliferativno delovanje odgovorni katehini čaja, ili i metaboliti čajne gljive, sami ili u sinergističkom delovanju sa komponentama čaja.

2.4.4. Ostali efekti kombuhe i čajne gljive

Celulozna masa koja se sintetiše tokom kultivacije čajne gljive primenjuje se i u terapiji oštećene kože. Fontana i saradnici (1991) su pelikulu nastalu tokom kultivacije čajne gljive koristili za izradu celuloznog biofilma koji se upotrebljava u terapiji rana na koži (Fontana i sar., 1991). Za razliku od celuloze koja se dobija iz drugih izvora, a koju je potrebno prečišćavati kako bi se kompletno uklonili lignin i hemiceluloza, celuloza koju stvaraju bakterije roda *Acetobacter* ne sadrži pirogene materije (Fontana i sar., 1990). Fontana i saradnici (1991) su utvrdili da kofein i ksantini iz biljnih ekstrakata stimulišu produkciju celuloze kod *Acetobacter xylinum*. Zato i zaslađeni crni čaj, kao podloga za kultivaciju čajne gljive, predstavlja dobru podlogu za produkciju celuloze i pelikula dobijena tokom kultivacije može biti iskorišćena za izradu biofilma sa terapijskim svojstvima.

Murugesan i saradnici (2005) su pokazali da je biomasa čajne gljive bogat nekonvencionalni izvor mikrobioloških proteina i da se ona osušena i samlevena može koristiti kao dodatak u ishrani živine. Biomasa čajne gljive sadrži 179,38 g sirovih proteina, 120 g sirovih vlakana, 44,14 g lipida, 4,82 g fosfora, 6,56 g kalcijuma i 8,92 MJ metabolički iskoristive energije po kg biomase. Pored toga, osušena čajna gljiva pokazuje aktivnost enzima fitaze od 23 IU/mg proteina. Za monogastrične životinje (živina, svinje) karakterističan je nedostatak ili smanjena aktivnost fitaze u digestivnom sistemu tako da fitinsku kiselinu najvećim delom nesvarenu izbacuju iz organizma. Prisustvo fitinske kiseline u hrani deluje kao antinutritivni faktor jer vezuje proteine čineći ih tako nedostupnim za apsorpciju. Visok nivo nesvarene fitinske kiseline u fekalnom otpadu je izvor zagađenja životne sredine i predstavlja veliki ekološki problem. Dodatak fungalne fitaze hrani za piliće izaziva povećanje performansi rasta zbog boljeg iskorišćenja fosfora, čija se koncentracija u ekskretu životinja značajno smanjuje (Murugesan i sar., 2005). Dodatak sprasene biomase čajne gljive hrani za živinu u količini od 150 g/kg je uticao na povećanje količine konzumirane hrane i vode, telesne mase životinja, poboljšanje fizičkih karakteristika životinja i smanjenje smrtnosti pilića u odnosu na kontrolnu grupu. Histopatološka istraživanja su potvrdila da je biomasa čajne gljive, koja je dodata hrani za piliće potpuno bezbedna za životinje.

Murugesan i saradnici (2006) su ispitali i osobine celulozne pelikule čajne gljive kao biosorbenta za efikasno uklanjanje jona As(III) i As(V) iz uzoraka površinskih voda. Prisustvo arsena u površinskim vodama predstavlja veliki problem u područjima u kojima su površinske vode glavni izvor vode za piće, jer duže izlaganje uticaju arsena može izazvati ozbiljne posledice po zdravlje ljudi (kancer kože, jetre i pluća, lezije na koži, oštećenja digestivnog, respiratornog i nervnog sistema). Rezultati su pokazali da stepen apsorpcije arsena zavisi od vremena kontakta, inicijalne koncentracije metala i količine pelikule čajne gljive kao biosorbenta. Pogodnost ovakvog biosorbenta je u činjenici da je pelikula čajne gljive biodegradabilna i da nakon desorpcija toksičnih metala ne predstavlja ekološki problem.

2.4.5. Kombuha i štetni efekti

Američka agencija za hranu i lekove (Food and Drug Administration) je ispitivanjem komercijalnih kombuha napitaka konstatovala odsustvo patogenih bakterija i zdravstvenu ispravnost napitaka, na osnovu čega je zaključeno da napitak nema štetnih efekata i da je bezbedan po zdravlje konzumenata (Srinivasan i sar., 1997). U literaturi je zabeleženo nekoliko slučajeva perforacija u intestinalnom traktu i acidoze kao posledice konzumiranja kombuhe (Perry, 1995), uslovljene samo u slučaju konzumiranja napitka ekstremne kiselosti u velikim količinama. Kod osoba sa predispozicijom na acidoosetljivost su utvrđene i alergijske reakcije (Srinivasan i sar., 1997).

Preporučena dnevna doza kombuhe je jedna do dve čaše (Centers for disease control, USA, 1995), uz koje bi trebalo da se unese i određena količina vode kako bi se potpomogla eliminacija toksina i izbegla eventualna neželjena reakcija organizma (Full Circle Press, 1998).

Treba imati u vidu da postoji mogućnost kontaminacije čajne gljive i napitka mikotoksigenim vrstama plesni i patogenim bakterijama iz okruženja, s obzirom da se kultivacija kombuhe u kućnim uslovima ne izvodi u aseptičnim uslovima. O ovome treba posebno voditi računa prilikom nabavke radne kulture koja nije ispitana na prisustvo stranih mikroorganizama. U literaturi je zabeleženo nekoliko slučajeva prisustva patogenih kvasaca i potencijalno mikotoksigenih plesni u radnoj kulturi (Maysen i sar., 1995), ali nisu registrovani slučajevi intoksikacija ili infekcija usled konzumiranja kombuhe.

3. MATERIJAL I METODE

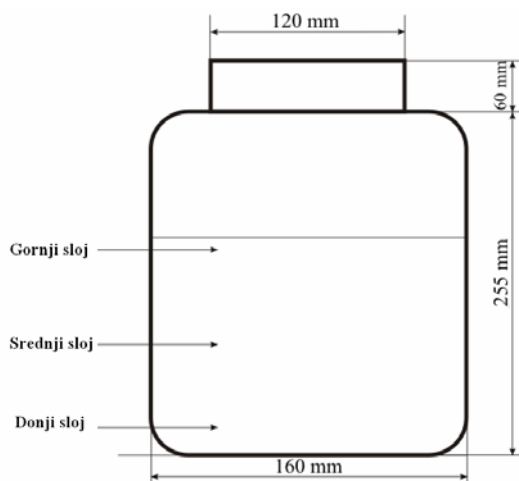
3.1. Karakteristike radne kulture

Čajna gljiva koja je kao radna kultura korišćena u ispitivanjima se čuva u muzeju kultura laboratorije za mikrobiologiju Tehnološkog fakulteta u Novom Sadu. Iz kulture su izolovane i identifikovane sledeće vrste i rodovi kvasaca: *Saccharomyces ludwigii*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces bisporus*, *Torulopsis* sp. i *Zygosaccharomyces* sp. (Markov i sar., 2001). Pored kvasaca identifikovana su i dva soja bakterija sirćetnog vrenja kao *Acetobacter* sp.. Pre izvođenja ogleda čajna gljiva ili fermentisana tečnost upotrebljena za inokulaciju su ispitani na eventualno prisustvo stranih bakterija i plesni.

3.2. Priprema podloga za kultivaciju čajne gljive

Podloga za kultivaciju čajne gljive pripremljena je dodavanjem 70 g/L komercijalne saharoze u česmensku vodu. Rastvoru je nakon ključanja dodat jedan od čajeva: crni (*Camellia sinensis* L.), ehinacea (*Echinacea purpurea* L), ili rtanjski čaj (*Satureja montana* L.). Količina čaja u podlozi se kretala od 5-10 g/L. Dekokcija čaja je trajala 15 min. nakon čega je podloga profiltrirana kroz sterilnu kvalitativnu filter hartiju i ohlađena na sobnu temperaturu. Inokulacija je u zavisnosti od ogleda obavljena celuloznom navlakom, fermentacionom tečnošću iz prethodne kultivacije, ili suspenzijom izolovanih (autohtonih) sojeva kvasaca i bakterija sirćetnog vrenja. Kultivacija čajne gljive (statična) izvedena je u staklenim sudovima ili sudovima od nerđajućeg čelika na temperaturi od 28°C.

Tradicionalan postupak kultivacije je podrazumevao izvođenje fermentacije u staklenom sudu ukupne zapremine V=5 L, koji je prikazan na slici 10.



Slika 10. Skica staklene boce za kombuha fermentaciju sa mestima uzorkovanja

Da bi se ispitala raspodela ćelija kvasaca i bakterija, kao i osnovnih metabolita čajne gljive, tokom kultivacije su uzorci fermentisane tečnosti za mikrobiološko i hemijsko ispitivanje prikupljeni sa različite visine staklene boce - neposredno ispod površine tečnosti, sa sredine stuba podloge i pri dnu posude (Slika 10).

3.3. Priprema suspenzija izolata kvasaca i bakterija sirćetnog vrenja kao starter kultura

Kao starter kulture za dobijanje kombuhe upotrebljena su tri soja kvasaca izolovana iz autohtone čajne gljive. Sojevi su na osnovu svojih morfoloških, makromorfoloških i

fizioloških karakteristika (Kreger van Rij, 1984) determinisani kao: *Saccharomyces ludwigi*, *Saccharomyces cerevisiae* i *Zygosaccharomyces* sp. (Markov i sar., 2001).

Pored kvasaca kao starter kulture upotrebljena su i dva soja bakterija sirćetnog vrenja izolovana iz iste čajne gljive. Za ove izolate je utvrđeno da su sposobni da oksiduju mlečnu i sirćetnu kiselinu do CO₂ i H₂O, zbog čega verovatno pripadaju rodu *Acetobacter*. S obzirom da bakterijski izolati u tečnom medijumu sintetišu celulozu moguće je pripadaju vrsti *A. xylinum*.

Navedeni izolati kvasaca i bakterija sirćetnog vrenja se čuvaju u muzeju kultura laboratorije za mikrobiologiju Tehnološkog fakulteta u Novom Sadu na +4⁰C. Sojevi kvasaca *Saccharomyces ludwigi*, *Saccharomyces cerevisiae* i *Zygosaccharomyces* sp. su fiziološki aktivirani dvostrukim pasažiranjem; najpre su kulture kvasaca presejane na kosi Sabouraud saharozni agar (SSA) (pepton 10 g/L, saharoza 40 g/L, agar 15 g/L) i inkubirane 48 h na 28⁰C. Nakon ovoga su kulture presejane na SSA u Koleovim bocama (ukupne zapremine 500 mL) i inkubirane 24 h na 28⁰C. Biomasa kvasaca iz Koleovih boca je suspendovana u sterilnom fiziološkom rastvoru. Ukupna zapremina suspenzija ćelija kvasaca je bila 10 mL, a sa po 3 mL svake od suspenzija je inokulirana pripremljena podloga sa čajem ehinacee, koja je razlivena u tri sterilna staklena suda (zapremina podloge je bila 3 L u sudu ukupne zapremine 5 L).

Izolati bakterija sirćetnog vrenja čajne gljive su pre inokulacije fiziološki aktivirani trostrukom pasažiranjem; najpre su kulture presejane na kosi Yeast Peptone Manitol (YPM) agar (Difco, Laboratories, Detroit, Michigan, USA) i inkubirane 72 h na 28⁰C. Zatim je deo biomase prenet u erlemajer bocu sa 50 mL modifikovane podloge po Carr-u (Gillis i De Ley, 1980) koja je inkubirana 24 h na 28⁰C, uz mešanje od 250 rpm (GFL, Burgwedel, Nemačka). Konačno je 10 mL podloge iz prethodne faze preneto u erlenmajer bocu sa 100 mL sveže modifikovane podloge po Carr-u. Nakon inkubacije od 24 h sa po 30 mL je inokuliran zaslađeni čaj ehinacee u staklenim sudovima.

3.4. Hemijske analize fermentisane tečnosti

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

Titabilna kiselost (ukupan sadržaj kiselina) određena je konduktometrijskom titracijom u skladu sa OIV metodom (1990). Nakon uklanjanja ugljendioksida alikvot od 20 mL fermentisane tečnosti je titrisan sa 0,1 mol/L NaOH. Titratibilna kiselost je izražena u g/L sirćetne kiseline.

Sadržaj sirćetne kiseline, D-glukonske kiseline, etanola, saharoze, D-glukoze, D-fruktoze je određen spektrofotometrijski (Ultraspec 2000, Amersham Pharmacia Biotech, Sweden) uz korišćenje enzimskih testova (Boehringer Mannheim/R-Biopharm, Darmstadt) (sirćetna kiselina: cat. no. 10148261035, D-glukonska kiselina: cat. no. 428191, etanol: cat. no. 176290 i saharoza/D-glukoza/D-fuktoza: cat. no. 716260). Priprema uzoraka je obavljena u skladu sa preporukama proizvođača.

Sadržaj etanola i sirćetne kiseline u fermentisanoj tečnosti određen je High Performance Liquid Chromatography (HPLC) metodom na hromatografu Pharmacia LKB, uz RI detektor: SP6040 Spectra-Physics. Korišćena je kolona Aminex HPX-87H, 300 x 7,8 mm (BioRad), a kao mobilna faza upotrebljen je rastvor 5mM H₂SO₄ uz protok od 0,6 mL/min; radna temperatura bila je 50⁰C a injektovana zapremina uzoraka 10 µL. Analiza je urađena u tri ponavljanja, a prikazane su srednje vrednosti merenja.

Sadržaj nekih aktivnih sastojaka u tradicionalnom kombuha napitku i nopicima od lekovitog bilja (ehinacea i rtanjski čaj) izvedeno je HPLC metodom hromatografu Agilent 1100 serija, opremljenim sa detektorom sa nizom dioda (DAD), programom za

prikupljanje i analizu podataka, automatskim injektorom za tečne uzorka sa 100 mesta i binarnom pumpom (Agilent Technologies, Palo Alto, CA). Korišćena je C-18 hromatografska kolona ODS Hypersil column, (2,1 mm, 200 mm; 5 µm, Thermo Electron Corporation, Cat No. 30105-202130, USA). Mobilna faza je bila 96 % CH₃COOH 0,1% u vodi + 2 % vol acetonitrila + 2 % vol tetrahidrofurana. Injekciona zapremina je bila 100 µl, a radna temperatura 25⁰C. Hromatogrami su snimani na 210 nm uz čuvanje kompletnih spektara u opsegu od 190 do 400 nm.

3.5. Mikrobiološke analize fermentisane tečnosti

Ukupan broj živih ćelija kvasaca i bakterija sirćetnog vrenja u fermentisanoj tečnosti tokom kultivacije i kombuha napicima određen je indirektnom metodom (Vrbaški i Markov, 1992). Za određivanje ukupnog broja bakterija sirćetnog vrenja korišćena je podloga YPM (Sievers i sar., 1995) u koju je neposredno pre razlivanja kao antimikotik dodat aktidion u količini od 300 mg/L (Gams, 1975; Laskin i Lechevalier, 1973). Podloga je inkubirana na temperaturi od 28⁰C, 5-7 dana. Za određivanje ukupnog broja ćelija kvasaca korišćen je podloga Sabouraud Dextrose Agar (SDA) (Merck, Darmstadt, Germany), sa dodatkom 50 mg/L hloramfenikola (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). Inkubacija je trajala 72 h na 28⁰C.

U cilju ispitivanja fermentativnih sposobnosti kvasaca, kulture izolovane iz čajne gljive su podvrgnute standardnom testu za utvrđivanje fermentativnih svojstava prema saharozi – merenjem količine produkovanog gasa u Durhamovim epruvetama i promenom boje podloge (van der Walt i Yarrow, 1984).

3.6. Senzorna analiza kombuha napitaka

Po završetku kultivacije čajne gljive fermentisana tečnost (kombuha) je filtrirana kroz sloj srednje grubog kieselguhr-a tipa Standard Super Cell (Johns Manville). Debljina naplavljenog sloja kieselguhr-a bila je 5 mm, a prosečna brzina filtracije 200 mL/min. Senzorna analiza filtriranih napitaka je izvršena u skladu sa ISO standardom koji propisuje senzornu analizu za specifične namirnice (ISO 4121, 1987), pri tom je za evaluaciju upotrebljena sledeća bodovna skala: 1 - kompletna promena i značajni nedostaci napitka, 2 - manje promene i manji nedostaci napitka, 3 – tipičan napitak (uz tolerisanje minimalnih promena). Uzorci za senzornu analizu su temperirani na 8±1⁰C, a u oceni napitaka (mirisa, ukusa, kiselosti, slatkosti i opšteg utiska) učestvovalo je desetero iskusnih i dugogodišnjih konzumenata kombuhe. Rezultati su statistički obrađeni korišćenjem programskog paketa SPSS 8.0 za Windows.

3.7. Ispitivanje antimikrobne aktivnosti kombuha napitaka

Kombuha napici za ispitivanje antimikrobne aktivnosti pripremljeni su fermentacijom zaslađenih čajeva ehinacee, crnog i rtanjskog čaja (količina čajeva je bila 5 g/L). Fermentacija je trajala do dobijanja napitaka optimalne konzumne kiselosti od 3,5–4 g/L. Inokulacija je obavljena celuloznom pelikulom čajne gljive koja je tokom dve prethodne kultivacije adaptirana na dati supstrat (zaslađeni crni, rtanjski ili čaj ehinacee).

Za ispitivanje antimikrobne aktivnosti kombuha napitaka upotrebljeni su sledeći sojevi bakterija, kvasaca i plesni: *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853, Gram negativna bakterija), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923, Gram pozitivna bakterija), *Bacillus* sp. (izolat iz prirodne sredine, Gram pozitivna, sporogena bakterija), *Salmonella*

enteritidis (ATCC 13076, Gram negativna bakterija), *Proteus mirabilis* (ATCC 35659, Gram negativna bakterija), *Escherichia coli* (ATCC 25922, Gram negativna bakterija), *Sarcina lutea* (ATCC 9341, Gram pozitivna bakterija), *Saccharomyces cerevisiae* (112, Hefebank Weihenstephan, kvasac), *Candida pseudotropicalis* (klinički izolat, kvasac), *Rhodotorula* sp. (izolat iz prirodne sredine, kvasac), *Penicillium aurantiogriseum* (izolat iz prirodne sredine, plesan), *Aspergillus niger* (izolat iz prirodne sredine, plesan) i *Aspergillus flavus* (izolat iz prirodne sredine, plesan) (identifikacija po Samson i van Reenen-Hoekstra, 1988). Navedeni sojevi se čuvaju na +4°C u muzeju kultura laboratorije za mikrobiologiju Tehnološkog fakulteta.

Priprema test sojeva bakterija za ispitivanja podrazumevala je dvostruko pasažiranje presejavanjem kultura na kosi Müller Hinton agar (MHA) (Difco, Laboratories, Detroit, Michigan, USA) uz inkubiranje 24 h na 37°C. Dvostruko pasažiranje sojeva kvasaca i plesni je izvedeno na kosom Sabouraud dekstroznom agaru (SDA) (Merck, Darmstadt, Germany). Kvasci su inkubirani 24 h na 28°C, a plesni na 22°C 72-96 h. Od fiziološki aktivnih kultura pripremljena je osnovna suspenzija prenošenjem biomase sa kosog agara u epruvetu sa sterilnim fiziološkim rastvorom. Od osnovne suspenzije pripremljena je serija razređenja tako da je u poslednjoj epruveti serije broj ćelija, odnosno spora, bio reda veličine 10⁶ cfu/mL.

Ispitivanje osetljivosti test mikroorganizama na antimikrobne supstance: Ispitivanje osetljivosti test mikroorganizama na standardne antimikrobne supstance obavljeno je disk-difuzionom metodom (Kavanagh, 1972), sa antibiogram diskovima D=6 mm: ketoconazole - koncentracije 100 µg/disku, amphotericin-B (100 U/disku), nystatin (100 U/disku), penicillin (10 U/disku), ceftriaxone (30 µg/disku), imipenem (10 µg/disku), amoxicillin (25 µg/disku) i amikacin (30 µg/disku) (Bioanalyse®). Po 1 mL suspenzije sa brojem ćelija, odnosno spora 10⁶ cfu/mL homogenizovan je sa 9 mL otopljene i na 45 °C ohlađene podloge (MHA za bakterijske kulture, a SDA za kvasce i plesni) koja je zatim razlivena u Petri kutije. Nakon želiranja na podlogu su naneti odgovarajući antibiogram diskovi. Zasejavanje je urađeno u tri ponavljanja, a rezultati su očitani kao prečnik zone inhibicije rasta i izraženi kao srednja vrednost u milimetrima uz standardnu devijaciju.

Ispitivanje antimikrobne aktivnosti kombuha napitaka: Po 2 mL suspenzija sa brojem ćelija, odnosno spora 10⁶ cfu/mL homogenizovan je sa 18 mL otopljene i na 45°C ohlađene podloge, koja je razlivena u Petri ploču. Nakon želiranja u podlozi su napravljeni "bunarčići" prečnika 9 mm, staklenom sterilnom cevčicom uz pomoć vakuum pumpe. U "bunarčice" je mikropipetom naneto po 100 µL uzoraka. Petri ploče su inkubirane na 37°C (bakterije), 28°C (kvasci) i 22°C (plesni). Prvo očitavanje zona inhibicije u slučaju kvasaca i bakterija je obavljeno nakon 24 h, a konačni rezultati su očitani nakon 48 h. U slučaju plesni očitavanje rezultata je obavljeno nakon 5 dana. Ogled je urađen u tri ponavljanja, a rezultati su izraženi kao srednja vrednost prečnika zone inhibicije rasta (u mm) uz standardnu devijaciju.

Kontrolni uzorci ispitivanja antimikrobne aktivnosti kombuhe: Kontrolni uzorci ispitivanja bili su:

- rastvor sirćetne kiseline iste koncentracije kao i u odgovarajućem kombuha napitku;
- kombuha pH=7 pripremljena neutralisanjem napitka rastvorom NaOH (c=0,1 mol/L);
- čaj - pripremljen dekokcijom 5 g/L crnog, rtanjskog ili čaja ehinacee;
- "model sistem" koga je činila sirćetna kiselina (količine kao u kombuhi), odgovarajući čaj (c=5 g/L), glukoza (c=20 g/L) i fruktoza (c=29 g/L). Sadržaji glukoze i fruktoze u "model sistemu" definisani su na osnovu literaturnih podataka o količini ovih ugljenih hidrata u kombuha napitku (Cvetković, 2003).

Uzorci kombuhe, neutralisane kombuhe i čaja su profiltrirani kroz membranske filtre prečnika pora Ø = 0,2 µm (Milipore).

3.8. ESR spektralna analiza antioksidativne aktivnosti kombuhe

3.8.1. ESR spektralna analiza uticaja čajnih i kombuha napitaka na transformaciju DPPH radikala

Stabilni DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) slobodni radikali ispitani su u reakcionoj smeši koja se dobija mešanjem 200 μL metanola i 600 μL 0,4 mM metanolnog rastvora DPPH (slepa proba). Uticaj čajnih i kombuha napitaka na transformaciju DPPH radikala analiziran je u rastvoru koji se dobija mešanjem: 100, odnosno 150 μL uzorka (x) čajnih i kombuha napitaka od korena i herbe *Echinacea purpurea* i 50, odnosno 100 μL , čajnih i kombuha napitaka od rtanjskog čaja (*Satureja montana*), (200-x) μL metanola i 600 μL 0,4 mM metanolnog rastvora DPPH.

Smeša je intenzivno mešana u toku 2 min. i prenetu u Bruker ER-160FC kvarcnu kivetu za vodene rastvove. ESR spektri su snimani na ESR spektrometru Bruker 300E pri sledećim uslovima: frekvencija modulacije: 100 kHz; amplituda modulacije 0,256 G; vremenska konstanta 40,96 ms; vremenski opseg merenja: 671,089 ms; centar polja 3440,00 G; ukupan opseg merenja: 100,00 G; frekvencija mikrotalasnog područja: 9,64 GHz; snaga mikrotalasnog područja: 20 mW; temperatura merenja: 23 °C.

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

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

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

3.8.2. ESR spektralna analiza uticaja čajnih i kombuha napitaka na transformaciju hidriksil radikala

U Fentonovom model sistemu, koji je dobijen mešanjem 1 mL 10 mM $\text{FeCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$, 1 mL 80 mM DMPO i 1 mL 10 mM H_2O_2 , ispitano je nastajanje hidriksil radikala nakon reakcionog perioda od 5 min. Da bi se ispitao uticaj čajnih i kombuha napitaka na stvaranje i transformaciju hidriksil radikala u Fentonov model sistem je dodato 50, odnosno 100 μL čajnih i kombuha napitaka rtanjskog čaja.

ESR spektralna određivanja hidriksil radikala u svim ispitivanim model sistemima izvršena su na ESR spektrometru Bruker 300E sledećih radnih karakteristika: frekvencija modulacije: 100 kHz; amplitude modulacije: 0,226 G; vremenska konstanta: 80,72 ms; vremenski opseg merenja: 327,68 ms; centar polja: 3440,00 G; ukupan opseg merenja: 100,00 G; frekvencija mikrotalasnog područja: 9,64 GHz; snaga mikrotalasnog područja: 20 mW; temperature merenja: 23 °C.

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

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

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

3.9. Ispitivanje antiproliferativne aktivnosti kombuha napitaka

Uzorci za ispitivanje antiproliferativne aktivnosti: Konzumni kombuha napici pripremljeni su na uobičajen način fermentacijom zaslađenog crnog i rtanjskog čaja. Suva materija uzoraka (kombuha napitaka) bila je 65,8 mg/mL (kombuha od crnog čaja) i 70,8

mg/mL (kombuha od rtajskog čaja). Za analizu antiproliferativne aktivnosti pripremljena je serija razređenja uzoraka u 0,9% NaCl do postizanja radnih koncentracija (0,0195-10 mg/mL). Uzorci su filtrirani kroz 0,22 µm filtre (Milipore).

Ćelijske linije: Korišćene su tri ćelijske linije humanih karcinoma: HeLa (epitelni karcinom cerviksa; ECACC 93021013), MCF-7 (adenokarcinom dojke; ECACC 86012803) i HT-29 (adenokarcinom debelog creva; ECACC 91072201). Ćelije su kultivisane u DMEM (Dulbecco's Modified Essential Medium) (Gibco BRL, Velika Britanija) sa dodatkom 4,5% glukoze i 10% fetalnog telećeg seruma (FCS; NIVNS, Srbija), 100 µg/mL streptomocina i 100 IU/mL penicilina (ICN Galenika, Srbija) u bočicama od 25 cm² (Corning, New York, USA). Ćelijske linije su kultivisane na 37°C u atmosferi 5% CO₂ i 100% vlažnosti, subkultivisane dva puta nedeljno i tretirane u ekspanzionalnoj fazi rasta. Suspenzije pojedinačnih ćelija dobijene su upotrebom 0,5% tripsina (Serva, UK).

Sulforodamin B (SRB) metoda: Suspenzije ćelija (180 µL) gustine 3×10³ ćelija po otvoru zasejane su u mikrotitar ploče sa 96 otvora (Corning, New York, USA) i preinkubirane u potpunom medijumu sa dodatkom 5% FCS, na 37 °C tokom 24 h. Serija razblaženja uzoraka kombuha napitaka je dodata u sve otvore (20 µL/otvoru), izuzev kontrole, da bi se dobile krajnje koncentracije u rasponu od 1,95 do 1000 µg/mL. Mikrotitar ploče su zatim inkubirane na 37°C dodatnih 48 h.

Za određivanje rasta ćelija korišćena je kolorimetrijska SRB metoda predložena od Skehan i saradnika (1990). Ćelije su fiksirane (50% trihlorosirćetna kiselina, 50 µL/otvoru, 1h, +4°C), isprane četiri puta destilovanom vodom (Wellwash 4, LabSystems, Helsinki, Finland) i obojene (0,4% SRB, C₂₇H₂₉N₂O₇S₂Na, 100 µL/otvoru, 30 min, na sobnoj temperaturi). Ploče su isprane četiri puta 1% sirćetnom kiselinom da bi se uklonio višak boje. Boja vezana za proteine ekstrahovana je 10 mM TRIS bazom (200 µL/otvoru).

Absorbanca (A) je merena na fotometru (Multiscan Ascent, LabSystems, Helsinki, Finland) na 540/620 nm. Antiproliferativna aktivnost uzoraka kombuhe (APA) je izražena u odnosu na kontrola, a izračunata je po formuli:

$$\text{APA (\%)} = (\text{At}/\text{Ac}) \times 100$$

gde je At – absorbancija uzorka, Ac – absorbancija kontrole

Statistička analiza: Prikazani rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost od tri zasebna eksperimenta, svaki izveden u kvadriplikatu. Signifikantne razlike između vrednosti su utvrđene korišćenjem dvostranog Studentovog t-testa. Nivo značajnosti bio je 95% (p ≤ 0,05) ili 99% (p ≤ 0,01).

4. REZULTATI I DISKUSIJA

U prvom delu ovog poglavlja su prikazani rezultati ispitivanja raspodele ćelija i glavnih metabolita čajne gljive, tokom fermentacije zaslađenog čaja ehinacee (*Echinacea purpurea*), kao i rezultati ispitivanja biološke aktivnosti konzumnih kombuha napitaka (titrabilne kiselosti od 3,5–4 g/L) od crnog čaja, čaja ehinacee i rtanjskog čaja. Antimikrobna aktivnost napitaka je ispitana na odabranim sojevima mikroorganizama sa eukariotskim i prokariotskim tipom ćelija, sa namerom da se utvrde nosioci aktivnosti. Antioksidativna aktivnost kombuha napitaka, koja je po literaturnim podacima ključna za terapijska svojstva kombuhe, je ispitana elektron spin rezonantnom (ESR) spektroskopijom na hidriksil i DPPH slobodne radikale. Rezultati ispitivanja antiproliferativne aktivnosti kombuha napitaka od crnog i rtanjskog čaja na ćelije humanih karcinoma su posebno značajni, s obzirom da u literaturi nema mnogo podataka o ovakvom tipu istraživanja. Podaci o antiproliferativnim i mutagenim efektima kombuhe na humane ćelije u *in vitro* ogleđima su neophodni pre bilo kakvog opsežnog kliničkog ispitivanja efekata napitka na zdravstveno stanje ispitanika.

U drugom delu su prikazani rezultati istraživanja bitni za optimizaciju podloge za kombuha fermentaciju, kao i rezultati ispitivanju uticaja geometrije suda na tok fermentacije. U literaturi ne postoje podaci o minimalnim količinama izvora ugljenika i azota koje obezbeđuju optimalno trajanje kombuha fermentacije, a što je važno iz ugla projektovanja troškova proizvodnog procesa. S druge strane, podaci dobijeni istraživanjem kombuha fermentacije u reaktorima različitih geometrijskih karakteristika i podaci o uticaju zapremine podloge na trajanje procesa, bili su neophodni za definisanje kritičnog parametra kombuha fermentacije i matematičkog modela za scale-up.

4.1. Distribucija ćelija i metabolita čajne gljive i starter kultura tokom kombuha fermentacije čaja ehinacee

U cilju upoznavanja komplikovanog i jedinstvenog odnosa ćelija kvasaca i bakterija sirćetnog vrenja čajne gljive, kao jednog od preduslova kontrole fermentativnog procesa, ispitana je distribucija ćelija kvasaca i bakterija tokom kultivacije. Broj ćelija kvasaca i bakterija i njihov odnos na početku i tokom procesa su od ključnog značaja za definisanje inicijalnog broja starter kultura za inokulaciju. Kao potencijalne starter kulture za izvođenje kombuha fermentacije ispitana su tri soja kvasaca i dva soja bakterija sirćetnog vrenja izolovani iz autohtone čajne gljive.

Dinamika transformacije podloge tokom kombuha fermentacije ispitana je praćenjem distribucije ćelija kvasaca i bakterija sirćetnog vrenja i osnovnih metabolita u fermentisanoj tečnosti. Podloga upotrebljena u ovom istraživanju (zaslađeni čaj *Echinacea purpurea*) je delom inokulirana na tradicionalan način celuloznom pelikulom dobijenom prethodnim fermentacijama (kontrolni uzorak), a drugi deo podloge je inokuliran sojevima kvasaca i bakterija sirćetnog vrenja izolovanim iz autohtone čajne gljive. Poznato je da model rasta kvasaca i bakterija sirćetnog vrenja tokom kombuha fermentacije još uvek nije detaljno ispitan (Sreeramulu i sar., 2000; Teoh i sar., 2004), najvećim delom zbog problema u izdvajanju ćelijske mase iz celulozne pelikule. Zato bi rezultati o raspodeli ćelija trebali da doprinesu boljem upoznavanju kompleksnog međusobnog odnosa kvasaca i bakterija sirćetnog vrenja u zajednici poznatoj kao čajna gljiva. S druge strane, prikazani rezultati bi trebali da pokažu mogućnost upotrebe odabrane kombinacije izolovanih sojeva kvasaca i bakterija sirćetnog vrenja u fermentaciji zaslađenog čaja u kombuha napitak.

4.1.1. Autohtoni sojevi kvasaca i bakterija sirćetnog vrenja

Tokom tronedeljne kultivacije autohtone čajne gljive na podlozi sa crnim čajem, iz fermentisane tečnosti je izdvojen veći broj sojeva kvasaca kao dominantnih kultura u pojedinim fazama fermentacije. Na osnovu fizioloških testova i morfoloških karakteristika (Kreger van Rij, 1984) identifikovano je ukupno pet sojeva kvasaca - tri izolata do nivoa vrste: *Saccharomyces ludwigi*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces bisporus*, a dva do nivoa roda: *Torulopsis* sp. i *Zygosaccharomyces* sp. (Markov i sar., 2001). Osnovno pitanje koje se postavilo u postavci oglada čiji su rezultati ovde prikazana, u kojem je ispitivana mogućnost upotrebe izolovanih sojeva kao starter kultura, bilo je ono o kriterijuma na osnovu kojih će se izvršiti odabir sojeva kvasaca za inokulaciju. Na osnovu literaturnih podataka poznato je da se rast kvasaca čajne gljive tokom fermentacije ne može okarakterih tipičnom krivom rasta mikroorganizama u šaržnoj kulturi. Ukupan broj ćelija kvasaca se skokovito menja tokom višenedelnog perioda kultivacije čajne gljive. Sreeramulu i saradnici (2000) su tokom dvonedeljne kultivacije čajne gljive zabeležili trostruki porast broja ćelija: u prva četiri dana sa početnih 10^2 na vrednost 10^7 cfu/mL, zatim između šestog i desetog dana ($10^4 \rightarrow 10^5$ cfu/mL) i najzad između dvanaestog i četrnaestog dana ($10^3 \rightarrow 10^7$ cfu/mL). Izvesno je da tokom fermentacije u različitim periodima dolazi do razmnožavanja i dominacije pojedinih vrsta kvasaca koji čine čajnu gljivu, a različitih su fizioloških i ekoloških karakteristika. Na početku fermentacije kada je koncentracija saharoze u podlozi velika (70–100 g/L) rastu i razmnožavaju se osmotolerantni kvasci (poput *Schizosaccharomyces pombe*, *Torulaspora delbrueckii*, *Zygosaccharomyces bailii*) (Teoh i sar., 2004). Vremenom, kako se smanjuje koncentracija šećera a raste koncentracija kiselina, stvaraju se povoljniji uslovi za razvoj acidotolerantnih kvasaca koji preuzimaju dominaciju u fermentisanoj tečnosti (npr. *Candida stellata*, *Torulaspora delbrueckii*).

Na osnovu ovih saznanja i poznavanja fizioloških karakteristika pojedinačnih izolata iz lokalne čajne gljive (osmotolerantnost, fermentativna sposobnost, acidotolerantnost), izvršen je odabir sojeva kvasaca koji su kao starter kulture upotrebljeni u ovom istraživanju - *Saccharomyces ludwigi* (oznaka soja 2/1), *Saccharomyces cerevisiae* (5/3) i *Zygosaccharomyces bailii* (7/2). Važan kriterijum u odabiru navedenih sojeva bilo je vreme za koje dati kvasac započinje fermentaciju saharoze (Tabela 4). Ova fiziološka karakteristika izolata kvasaca čajne gljive je direktno povezana sa vremenom njihove izolacije iz originalne čajne gljive - *Saccharomyces ludwigi* drugog, *Saccharomyces cerevisiae* petog i *Zygosaccharomyces bailii* sedmog dana kultivacije.

Odabrane sojeve *Saccharomyces ludwigi*, *Saccharomyces cerevisiae* i *Zygosaccharomyces* sp. i drugi autori navode kao kvasce čajne gljive, nezavisno od lokaliteta gajenja (Roussin, 1996; Liu i sar., 1996; Teoh i sar., 2004). Razlog ovome nije samo ubikvitarni karakter kvasaca već fiziološke osobine navedenih sojeva. *Saccharomyces ludwigi* je osmofilni kvasac (Reiss, 1994; Sievers i sar., 1995), *Saccharomyces cerevisiae* je jedan od najčešće izolovanih mikroorganizama iz tradicionalnih alkoholnih napitaka, a *Zygosaccharomyces* sp. (posebno *Zygosaccharomyces bailii*) su prisutni u mnogim napicima i hrani, posebno onim sa niskom vrednošću pH i visokim sadržajem šećera (Liu i sar., 1996).

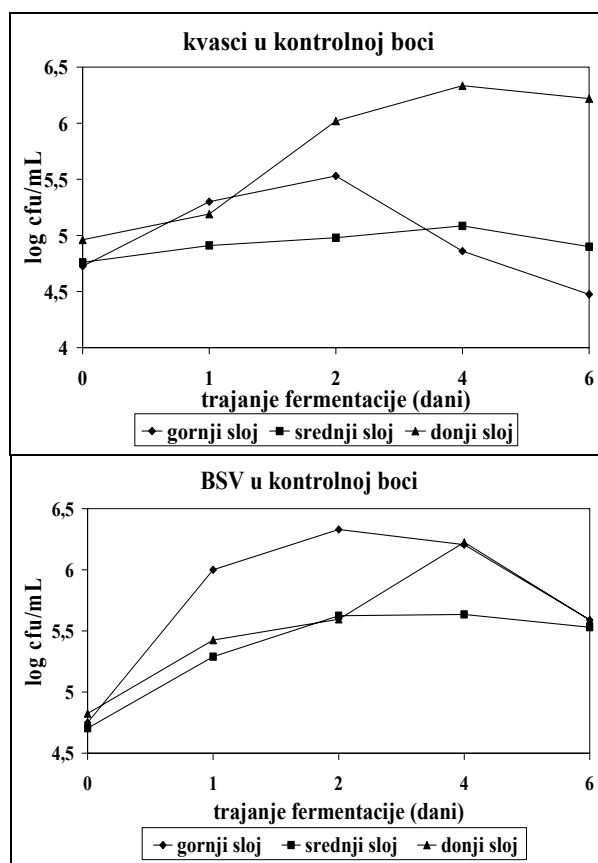
Tabela 4. Fiziološki test fermentacije saharoze odabranim sojevima kvasaca čajne gljive

šifra izolata	Trajanje fermentacije (dani)								
	1	2	3	4	5	6	7	8	11
2/1	-	+	-	-	-	-	-	-	-
5/3	-	-	-	+	+	-	-	-	-
7/2	-	-	-	-	-	+	+	-	-

Kriterijum u odabiru sojeva bakterija sirćetnog vrenja izolovanih iz autohtone čajne gljive, kao starter kultura, je bila brzina transformacije etanola u sirćetnu kiselinu. Da bi starter kultura bila što sličnija mikrobiološkom sastavu autohtone čajne gljive, odabrana su dva soja izolovanih bakterija sa najboljim acidogenim kapacitetom, koja su interno označena kao BSV 5 i BSV 9. Za izolate je karakteristično da su sposobni da oksiduju mlečnu i sirćetnu kiselinu do CO₂ i H₂O što ih verovarno određuje kao vrste roda *Acetobacter*.

4.1.2. Kombuha fermentacija čaja *echinacea* inokulisanog celuloznom pelikulom čajne gljive

Broj ćelija kvasaca i bakterija sirćetnog vrenja u podlozi je određen jedan sat nakon inokulacije celuloznom pelikulom i bio je reda veličine 10⁴ cfu/mL (Slika 11). Promene broja ćelija kvasaca i bakterija sirćetnog vrenja, kao i promene pH i titrabilne kiselosti fermentisane tečnosti, tokom procesa fermentacije zaslađenog čaja *echinacea* inokulisanog celuloznom pelikulom prikazane su slikama 12 i 13. Celulozna navlaka kombuhe deluje kao nosač inkorporiranih, fiziološki aktivnih ćelija kvasaca i bakterija, koje nisu čvrsto vezane za celulozna vlakna pelikule jer se vrlo brzo po inokulaciji oslobađa značajan broj ćelija u podlogu. Ovome sigurno doprinosi i laminarna struktura celulozne pelikule (Fontana i sar., 1991).



Slika 11. Broj ćelija kvasaca i bakterija sirćetnog vrenja u fermentisanoj tečnosti inokulisanog celuloznom pelikulom (kontrolna boca)

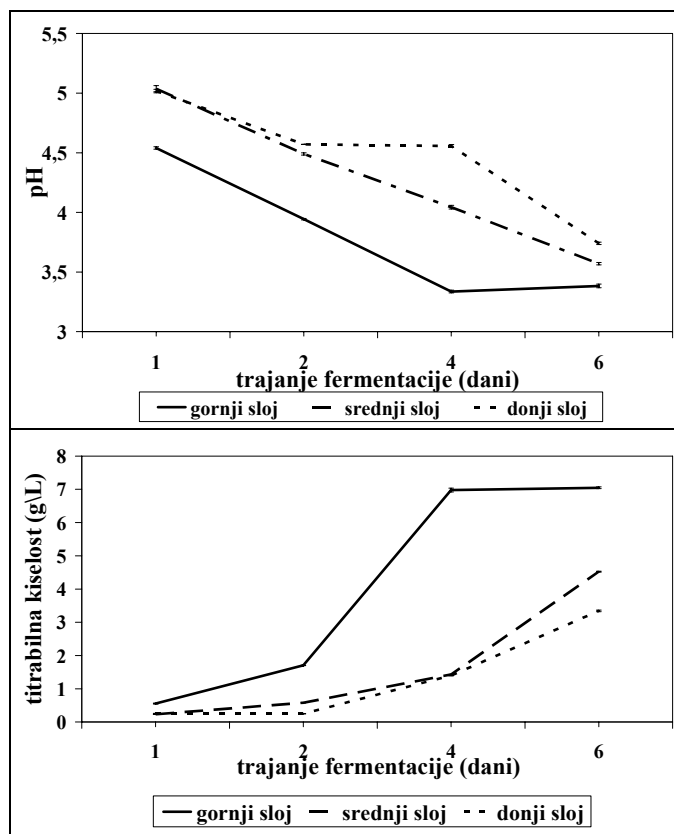
Tokom prva dva dana, u celokupnoj masi podloge inokulirane celuloznom opnom, došlo je do porasta broja ćelija kvasaca. Najveći porast broja ćelija bio je pri dnu suda - sa 4,96 na 6,02 log jedinica. Međutim, tokom dalje fermentacije trend porasta broja ćelija održao se samo u donjem delu podloge, gde se broj ćelija od 10^6 cfu/mL, postignut nakon prva dva dana, održava do kraja procesa. I dok se u središnjem delu podloge broj ćelija kvasaca praktično nije menjao u odnosu na početnu vrednost, dotle je u površinskom delu nakon 48 h došlo do naglog pada broja ćelija. Ovo smanjenje broja kvasaca se nastavilo do kraja fermentacije. Značajano smanjenje broja ćelija (5,53→4,47 log cfu/mL) u površinskom delu je verovatno posledica "trapovanja" ćelija kvasaca u navlaku i delovanja gravitacione sile. Uprkos tome, broj ćelija kvasaca u površinskoj zoni podloge tokom svih šest dana kultivacije nije manji od 10^4 ćelija/mL.

Početni broj ćelija bakterija sirćetnog vrenja u celokupnoj podlozi inokuliranoj celuloznom opnom je bio od $5-7 \cdot 10^4$ cfu/mL. Za sve vreme kultivacije ćelije bakterija su najbrojnije u površinskoj delu podloge, gde njihov broj značajno raste za prva dva dana, dostižući maksimalnu vrednosti od $2,13 \cdot 10^6$ cfu/mL. Broj bakterija u središnjem i donjem delu je bio desetostruko manji, ali je i tu registrovan stalni porast njihovog broja tokom kultivacije. Bakterije sirćetnog vrenja, pod datim uslovima kultivacije, nakon drugog ili četvrtog dana fermentacije se više nisu nalazile u stacionarnoj fazi rasta.

Posledica fiziološke aktivnosti čajne gljive tokom kultivacije je pad vrednosti pH i porast ukupne (titrabilne) kiselosti fermentisane tečnosti, zbog sinteze organskih kiselina, pre svega sirćetne. Dobro je poznato da tokom kultivacije čajne gljive na crnom čaju u prva 2-3 dana dolazi do značajnog pada pH fermentisane podloge. Međutim, nakon ovog perioda vrednost pH fermentisane tečnosti se neznatno menja i pored toga što se sinteza organskih kiselina nastavlja (Chen i Liu, 2000; Sreeramulu i sar., 2000; Cvetković, 2003). Zato kritični parametar za praćenje procesa i za određivanje završetka fermentacije zaslađenog čaja nije vrednost pH fermentisane tečnosti, već utrošak titracionog sredstva, odnosno titrabilna kiselost uzorka (Cvetković i sar., 2008).

Vrednost pH pripremljenog zaslađenog čaja ehinacee iznosila je $7,5 \pm 0,0$ da bi jedan sat nakon inokulacije celuloznom navlakom ona pala na $5,45 \pm 0,03$. Navlaka svojim visokim sadržajem vlage (više od 90%) odmah po inokulaciji obavlja „zakišeljavanje“ podloge, odnosno koriguje pH sveže podloge, čineći je tako pogodnom za rast i razmnožavanje kvasaca (Slika 12).

Po dubini podloge inokulirane celuloznom pelikulom postoje značajne razlike u vrednostima pH fermentisane tečnosti (Slika 12). Uzorci iz površinskog dela bili su značajno nižeg pH u odnosu na odgovarajuće uzorke prikupljene sa veće dubine. Razlog je što su u površinskom delu podloge sintetisane daleko najveće količine organskih kiselina (Slika 12). Odstupanja u količini sintetisanih organskih kiselina po dubini podloge bila su utoliko veća kako fermentacija odmiče. Na kraju procesa razlike titrabilne kiselosti za različite nivoe podloge bile su 1,7, odnosno 2,5 g/L. U gornjem sloju podloge najveće količine kiselina sintetisane su između drugog i četvrtog dana, a u nižim slojevima tokom poslednja dva dana fermentacije. Promene kiselosti u zoni celulozne opne između četvrtog i šestog dana kultivacije čajne gljive su minimalne ($6,98 \rightarrow 7,02$ g/L), što sugerise na ograničenost porasta kiselosti fermentisane tečnosti, pod datim uslovima kultivacije. Zapažanja o limitiranosti biosinteze sirćetne kiseline tokom duže kultivacije čajne gljive izneli su Reiss (1994) i Chen i Liu (2000). Razlog je u inhibiciji fermentativne aktivnosti kvasaca i produkcije etanola (indirektno i sirćetne kiseline), verovatno zbog visoke kiselosti sredine i smanjenja količine ugljenih hidrata u podlozi. Iz istih razloga nakon nekoliko dana kultivacije dolazi do opadanja količine etanola u fermentisanoj tečnosti. Tako je Reiss (1994) zabeležio da do pada koncentracije etanola u podlozi sa početnih 70 g/L saharoze dolazi nakon šest dana kultivacije čajne gljive.



Slika 12. Titrabilna kiselost i pH fermentisane tečnosti inokulirane celuloznom pelikulom

Produkcija metabolita i promene kiselosti zaslađenog čaja su posledica fiziološke aktivnosti i brojnosti mikroorganizama čajne gljive. Zato su vrednosti hemijskih parametara uzoraka fermentisane podloge neodvojivi od rezultata mikrobioloških određivanja broja ćelija kvasaca i bakterija sirćetnog vrenja. Kako je već konstatovano, u podlozi inokuliranoj celuloznom navlakom, najveća količina organskih kiselina registrovana je u površinskom delu podloge (u zoni celulozne pelikule). U istoj zoni je tokom prva dva dana kultivacije čajne gljive zabeležen intezivan rast i razmnožavanje ćelija kvasaca (Slika 11). Posledica fiziološke aktivnosti ćelija kvasaca (invertazne i fermentativne) je prisustvo glukoze, fruktoze i etanola u podlozi. Ova jedinjenja ćelije bakterija sirćetnog vrenja lako usvajaju, čime su stvoreni preduslovi za njihovo razviće. Zato je njihov broj daleko najveći u površinskom delu podloge inokulirane celuloznom opnom, koja je ujedno i zona najveće kiselosti. Može se pretpostaviti da visoka kiselost dela podloge pod celuloznom pelikulom dodatno utiče na smanjenje broja ćelija kvasaca u površinskoj zoni posle dva dana kultivacije.

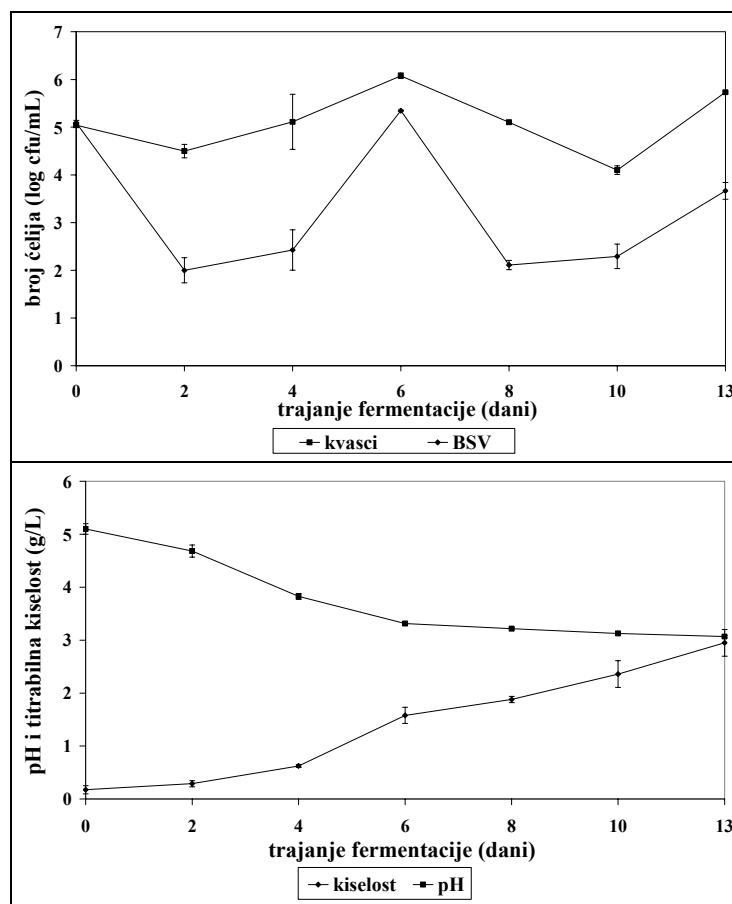
4.1.3. Kombuha fermentacija čaja od echinacea inokulisanog starter kulturama čajne gljive

Upotreba čistih kultura kvasaca i bakterija sirćetnog vrenja (kao starter kultura) bi omogućila striktnu kontrolu fermentacionog procesa, skraćivanje vremena fermentacije i dobijanje napitka kontrolisanog hemijskog i mikrobiološkog kvaliteta. Upotrebom starter kultura obezbedilo bi se i dobijanje zdravstveno bezbednog napitka jer je isključena mogućnost kontaminacija radne kulture mikotoksikogenim plesnima i kvascima. Takođe, korišćenje starter kulture je i potencijalno rešenje problema inokulacije podloge za čajnu

gljivu u industrijskim uslovima. Naime, u industrijskim uslovima proizvodnje kombuhe inokulacija celuloznom pelikulom je nepraktična (prenošenje pelikule veće mase iz reaktora u reaktor) i rizična (opasnost od kontaminacije), a inokulacija fermentisanom tečnošću (majom) iz prethodne šarže je ekonomski neisplativa, jer na taj način oko 10% proizvoda biva “zarobljeno”.

Prilikom definisanja starter kultura za inokulaciju zaslađenog čaja pošlo se od radne hipoteze da kritični parametar inokuluma predstavlja broj ćelija izolovanih sojeva kvasaca i bakterija sirćetnog vrenja u suspenzijama za inokulaciju. Preliminarna ispitivanja su pokazala da postoji uzajamna zavisnost između broja ćelija navedenih grupa mikroorganizama tokom kombuha fermentacije. Početni broj ćelija kvasaca i bakterija sirćetnog vrenja se ne može proizvoljno odabrati, jer postoji opasnost da proces fermentacije zaslađenog čaja krene u neželjenom pravcu usled fiziološke aktivnosti i brojnosti ćelija kvasaca. Posledica toga je dobijanje kombuhe sa povećanom količina etanola koja svojim neprijatnim mirisa i ukusom, usled autolize ćelija kvasaca, podseća na loše vino.

Na osnovu prethodnih istraživanja o inicijalnom broju ćelija starter kultura kvasaca i bakterija sirćetnog vrenja i literaturnih podataka o broju kvasaca i bakterija u fermentisanoj podlozi tokom kultivacije čajne gljive (Cvetković, 2003; Teoh i sar., 2004), pretpostavljeno je da je za uspešnu fermentaciju potreban početni broj ćelija kvasaca od 10^5 cfu/mL, a broj bakterija sirćetnog vrenja od 10^6 cfu/mL. Istraživanja su pokazala da je broj ćelija bakterija sirćetnog vrenja kritičan, a na slici 13 prikazana je promena broja ćelija kvasaca i bakterija sirćetnog vrenja u ogledu u kojem je početni broj kvasaca i bakterija u podlozi bio reda veličine 10^5 ćelija/mL. Pod ovim uslovima je fermentacija



Slika 13. Promene broja ćelija, titrabilne kiselosti i pH fermentisane tečnosti sa inicijalnim brojem ćelija kvasaca i BSV od 10^5 cfu/mL

podloge bila spora, tj. u podlozi nisu produkovane dovoljne količine kiseline usled nedovoljne aktivnosti BSV, čiji je broj za 48 h pao za 3 log jedinice. Uprkos što je petog dana fermentacije podlozi dodata nova suspenzija bakterija sirćetnog vrenja, što je razlog porasta broja ćelija BSV na slici 13, bilo je potrebno čak trinaest dana kako bi ukupna kiselost fermentisane tečnosti dostigla vrednost nešto manju od 3 g/L.

Rezultati određivanja količine glavnih metabolita čajne gljive – sirćetne kiseline i etanola tokom navedene fermentacije najbolje pokazuju u kom se pravcu odvijao proces (Tabela 5). Tokom celokupne fermentacije zabeležen je porast količine etanola u transformisanoj podlozi do vrednosti od oko 25,5 g/L; istovremeno je krajnji sadržaj sirćetne kiseline bio svega 1,49 g/L. Na osnovu akumulacije etanola u fermentacionoj tečnosti može se zaključiti da su kvasci svojom fiziološkom aktivnošću dominirali tokom procesa, što je pokazalo i određivanje njihovog broja (Slika 13). Očigledno da je broj ćelija kvasaca, pripremljenih kao starter kultura, od 10^5 ćelija/mL dovoljan za uspešnu fermentaciju zaslađenog čaja. Međutim, isti broj ćelija bakterija sirćetnog vrenja je nedovoljan za efikasnu transformisanje podloge u kombuha napitak. Veliki pad broja ćelija bakterija sirćetnog vrenja posle šestog dana procesa (Slika 13) je verovatno posledica nepovoljnih uslova sredine za njihov razvoj zbog visoke koncentracije etanola. Da bi enzimaska oksidacija etanola u podlozi tekla optimalno, bakterijama sirćetnog vrenja kao striktnim aerobima su potrebne dovoljne količine kiseonika; u uslovima nedovoljne količina kiseonika, a velike koncentracije sirćetne kiseline i etanola, bakterije sirćetnog vrenja ne mogu da prežive.

Tabela 5. Promene sadržaja glavnih metabolita čajne gljive, određene HPLC metodom, tokom kombuha fermentacije sa inicijalnim brojem ćelija kvasaca i BSV od 10^5 cfu/mL

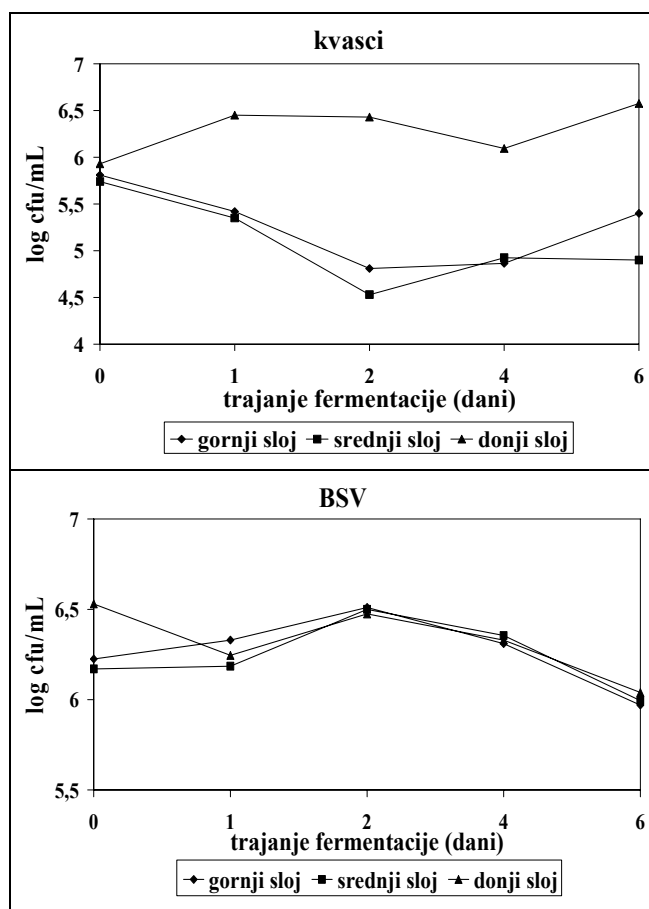
	Trajanje fermentacije (dani)						
	0	2	4	6	8	10	13
Etanol (g/L)	0,3325	0,7399	2,4136	6,7949	15,9606	23,5712	25,5028
Sirćetna kiselina (g/L)	0,3643	0,2511	0,4656	0,8443	1,3122	1,2325	1,4908

Definisan broj ćelija kvasaca od 10^5 ćelija/mL i bakterija sirćetnog vrenja od 10^6 ćelija/mL u podlozi za kultivaciju od čaja ehinacee, postignut je dodavanjem odgovarajuće zapremine suspenzija pripremljenih starter kultura. Tabela 6 prikazuje broj ćelija kvasaca i bakterija sirćetnog vrenja u suspenzijama za inokulaciju koje su pripremljene u fazi predinokulacije. Uslovi predinokulacije starter kultura kvasaca i bakterija (podloga, mešanje, dužina trajanja) moraju biti takvi da obezbede da ćelije budu u fazi aktivnog rasta i adaptirane na uslove podloge za kultivaciju.

Tabela 6. Broj ćelija starter kultura čajne gljive u suspenzijama za inokulaciju ($x_{st} \pm SD$)

<i>Tip mikrorganizma</i>	<i>oznaka izolata</i>	10^{-8} cfu/mL
<i>Kvasci</i>	2/1	0,87±0,3
	5/3	3,23±0,07
	7/2	1,54±0,02
<i>Bakterije sirćetnog vrenja</i>	BSV 5	2,01±0,11
	BSV 9	1,46±0,13

Početni broj ćelija kvasaca i bakterija sirćetnog vrenja u podlozi za kultivaciju određen je 60 min nakon inokulacije starter kulturama. Rezultati ove analize su potvrdili da je u celokupnoj masi podloge postignut željeni inicijalni broj ćelija kvasaca i bakterija sirćetnog vrenja (Slika 14).

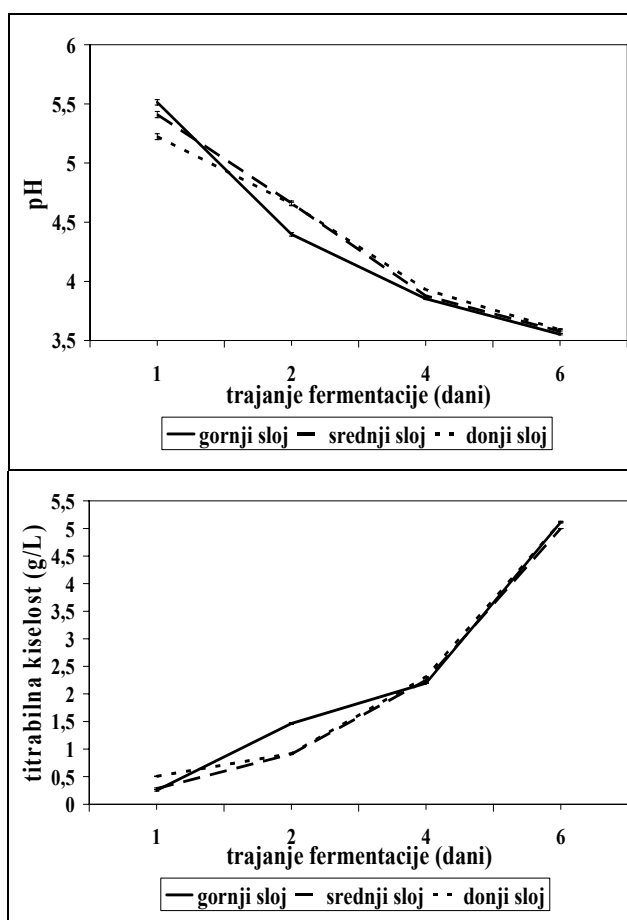


Slika 14. Broj ćelija kvasaca i bakterija sirćetnog vrenja u fermentisanoj tečnosti inokuliranoj starter kulturama

Promene mikrobioloških i hemijskih parametara tokom fermentacije zaslađenog čaja ehinacee, koji je inokulisan starter kulturom, prikazuju slike 14 i 15. U podlozi sa starter kulturama ćelije kvasaca su tokom kultivacije dominantno raspoređene u donjem delu podloge (Slika 14), gde njihov broj ostaje gotovo konstantan i ne manji od 10^6 cfu/mL fermentisane tečnosti (manji pad broja ćelija je zabeležen između drugog i četvrtog dana). Broj ćelija kvasaca u površinskom i središnjem delu podloge je u zavisnosti od perioda fermentacije za 10-100 puta manji od navedenog broja. Ovo se može objasniti flokulentnim karakteristikama ćelija kvasaca i njihovim odnosom prema kiseoniku. Za rast i razmnožavanje ćelija kvasaca neophodan je kiseonik i odgovarajuća koncentracija izvora ugljenika; u suprotnom je metabolizam ćelija kvasaca ograničen na fermentaciju, a reproduktivnost ćelija minimalna.

Bakterije sirćetnog vrenja, iako striktni aerobi, su u podlozi inokuliranoj starter kulturama bile ravnomerno raspoređene u celokupnoj zapremini podloge, tokom svih šest dana kultivacije (Slika 14). Početni broj ćelija bakterija sirćetnog vrenja reda veličine od 10^6 cfu/mL fermentisane tečnosti se održavao tokom čitavog perioda kultivacije, uz manji pad broja ćelija u poslednja četiri dana kultivacije. Ovaj rezultat upućuje na konstataciju da tokom procesa u fermentisanoj tečnosti postoji podjednak broj vitalnih ćelija bakterija

sirćetnog vrenja, a da je njihova fiziološka aktivnost prevashodno uslovljena raspoloživim količinama rastvorenog kiseonika.



Slika 15. Vrednost pH i titrabilna kiselost fermentisane tečnosti inokulirane starter kulturama

Vrednosti pH uzoraka fermentisane podloge inokulirane starter kulturama (Slika 15) se minimalno razlikuju tokom kultivacije (pH zaslađenog čaja ehinacee nakon inokulacije starter kulturama bio je $6,44 \pm 0,02$). Ovi podaci, uz rezultate određivanja titrabilne kiselosti, upućuju da je biotransformacija zaslađenog čaja echinacee inokuliranog starter kulturama bila ravnomerna. Tokom kultivacije, u svim zonama podloge, postoji stalni porast titrabilne kiselosti do maksimalnih vrednosti od 5-5,1 g/L (Slika 15). Nešto veće količine kiselina u površinskom delu podloge sa starter kulturama, u odnosu na ostatak podloge, su sintetisane između prvog i drugog dana fermentacije (razlika od oko 0,55 g/L), što se može pripisati većoj količini dostupnog kiseonika u površinskom delu podloge. Generalno je najveći porast titrabilne kiselosti u podlozi sa starter kulturama zabeležen između četvrtog i šestog dana fermentacije. Tokom istog perioda je zabeležen i porast ukupnog broja ćelija kvasaca (Slika 14).

I pored toga što je broj kvasaca u podlozi sa starter kulturama neravnomerno raspoređen, njena transformacija se odvijala ravnomerno u čitavoj masi, kao što to pokazuju rezultati određivanja titrabilne kiselosti podloge. Očigledno je da manji broj ćelija kvasaca u površinskom delu podloge sa starterima (10^4 cfu/mL) nije limitirajući faktor fermentativnog procesa. Pored broja ćelija kvasaca i bakterija sirćetnog vrenja (čiji je broj približno isti u svim nivoima podloge), limitirajući faktor statične kultivacije čajne gljive je i rastvoreni kiseonik, koji je neophodan za rast i razmnožavanje bakterija kao striktnih aeroba. Na osnovu ujednačenog sadržaja titrabilne kiselosti u svim nivoima podloge inokulisane starter kulturama, kao i broja ćelija, može se pretpostaviti da su

bakterijama sirćetnog vrenja na raspolaganju približno iste količine kiseonika u podlozi. Verovatno je distribucija atmosferskog kiseonika u podlogu sa starter kulturama tokom prvih dana kultivacije dobra zbog odsustva celulozne pelikule. Celulozna masa ("čajna gljiva") koja se koristi prilikom tradicionalne inokulacije, s jedne strane ograničava difuziju vazdušnog kiseonika u podlogu, a sa druge sprečava izlazak ugljendioksida pojačavajući tako anaerobioznost podloge. Imajući ovo u vidu može se pretpostaviti da je način inokulacije glavni razlog dominantnosti ćelija bakterija sirćetnog vrenja u površinskom delu podloge koja je inokulirana celuloznom opnom.

Manji broj ćelija kvasaca u površinskom delu podloge inokulirane celuloznom pelikulom, u odnosu na površinski deo podloge sa starter kulturama, nije limitirajući za proces fermentacije zaslađenog čaja, imajući u vidu vrednosti titrabilne kiselosti zona. Međutim, treba imati u vidu da i u samoj pelikuli verovatno postoji i veći broj ćelija kvasaca i bakterija sirćetnog vrenja, koje mogu da ispolje metaboličku aktivnost u površinskom delu podloge. Teoh i saradnici (2004) su utvrdili da se u celuloznoj pelikuli nalazi veći broj ćelija kvasaca u odnosu na fermentacionu tečnost. U njihovom istraživanju se broj ćelija kvasaca u tečnosti tokom dvonedeljne kultivacije kretao u opsegu od 10^4 do 10^6 ćelija/mL, dok je broj ćelija u pelikuli, za svaku od četiri ispitane kulture čajne gljive, tokom fermentacije bio konstantan u rasponu od 10^6 - 10^8 ćelija/g vlažne pelikule, u zavisnosti od ispitnog uzorka (Teoh i sar., 2004).

Kako za podlogu inokuliranu na tradicionalan način (Slika 12), tako i za podlogu inokulisanu starter kulturama (Slika 15), minimalan porast kiselosti je zabeležen u prva 24 h kultivacije. Ovakav rezultat je razumljiv imajući u vidu da je radnoj kulturi potrebno vreme da se prilagodi na nove uslove sredine (posebno visoku koncentraciju šećera), da intenzivira produkciju invertaze, hidrolizuje saharozu i sintetiše etanol. Uz to, ispitivanje fermentativnih karakteristika izolata kvasaca čajne gljive koji su kao starter kulture upotrebljeni u ovom radu, je pokazalo da pojedinačno *Saccharomyces ludwigi*, *Saccharomyces cerevisiae* i *Zygosaccharomyces bailli* ne fermentiraju saharozu u prva 24 h kultivacije (Markov i sar., 2001).

Tokom prvog dana kultivacije u podlozi sa starter kulturama je došlo do značajnijeg porasta kiselosti (od 0,05 na 0,35 g/L) u poređenju sa tradicionalnom kombuhom (0,4→0,55 g/L računato na površinski deo podloge). Razlog je taj što su u slučaju inokulacije starter kulturama upotrebljene fiziološki aktivnije ćelije radne kulture u odnosu na mikroorganizme imobilisane u/celuloznoj pelikuli. Celulozna pelikula upotrebljena za inokulaciju potiče iz znatno kiselijske sredine (iz fermentisane tečnosti prethodne kultivacije), tako da je ćelijama potrebno da se prilagode na uslove sredine u novo pripremljenom medijumu. Ćelije čajne gljive, našavši se u sredini sa velikom koncentracijom saharoze (70-100 g/L), doživljavaju osmotski stres što za neko vreme odlaže njihovu punu metaboličku aktivnost.

4.1.4. Distribucija glavnih metabolita čajne gljive u fermentisanoj tečnosti

Da bi se kompletnije sagledala dinamika procesa i aktivnost radne kulture, u uzorcima fermentisane tečnosti sa različitih dubina reaktora, su po završetku kultivacije (nakon 6 dana) određeni sadržaji saharoze, D-glukoze, D-fruktoze, sirćetne kiseline, D-glukonske kiseline i etanola (Tabele 7 i 8). Navedena jedinjenja su određena i u kombuha napicima koji su pripremljeni filtracijom celokupne fermentisane tečnosti (uzorak K, odnosno S).

S obzirom da bakterije sirćetnog vrenja ne mogu da usvoje saharozu, brzina fermentacije zaslađenog čaja zavisi od fizioloških karakteristika kvasaca čajne gljive, odnosno od brzine njihovog prilagođavanja na svežu podlogu i brzine hidrolize saharoze. Čelije kvasaca invertazom ekstracelularno hidrolizuju saharozu, a glukozu i fruktozu fermentativno metabolišu produkujući etanol.

Tabela 7. Hemijski sastav fermentisane tečnosti (g/L) inokulisane celuloznom pelikulom

<i>uzorak</i>	<i>saharoza</i>	<i>D-glukoza</i>	<i>D-fruktoza</i>	<i>sirćetna kiselina</i>	<i>D-glukonska kiselina</i>	<i>etanol</i>
<i>gornji sloj</i>	1,1217	22,1958	22,1688	4,7919	1,4004	3,2364
<i>srednji sloj</i>	1,4025	25,2186	25,8201	3,2840	1,0124	3,7662
<i>donji sloj</i>	1.4771	25,4777	26,3418	3,2775	0,615	2,4302
<i>K</i>	1.3130	24,5277	24,2553	3,3133	0,9651	3,1245

K-kombuha dobijena na tradicionalan način

Literaturni podaci o količinama ugljenih hidrata u fermentisanoj podlozi tokom kultivacije čajne gljive su različiti, što se pripisuje autentičnosti radne kulture i različitim uslovima kultivacije. Sievers i saradnici (1995) su u fermentisanoj podlozi nakon 8 dana fermentacije registrovali 25 g/L glukoze, 15 g/L fruktoze i 25 g/L saharoze (početna količina saharoze je bila 70 g/L), a Chen i Liu (2000) nakon 20 dana fermentacije podloge sa početnom koncentracijom saharoze od 100 g/L, količine od oko 10 g/L glukoze, 20 g/L fruktoze i 50 g/L saharoze. Kod većine autora krajnji sadržaj glukoze i fruktoze u fermentacionoj tečnostima je različit, što ukazuje na različite puteve metabolizma ova dva monosaharida u ćelijama čajne gljive (Chen i Liu, 2000).

Rezultati o količini glukoze i fruktoze u fermentisanoj tečnosti inokuliranoj celuloznom pelikulom (Tabela 7) približno odgovaraju većini literaturnih podataka, ali su zato vrednosti preostale količine saharoze u fermentisanoj tečnosti znatno manje. Ovo je pokazatelj da autohtona kultura upotrebljena u ovom istraživanju ima izuzetnu invertaznu i fermentativnu aktivnost i sposobnost prilagođavanja uslovima sa visokom koncentracijom šećera. Prethodna HPLC analiza medijuma tokom kultivacije autohtone čajne gljive na zaslađenom crnom čaju, pokazala je da do hidrolize saharoze dolazi već za 24 ili 48 h (Cvetković, 2003). Transformacija zaslađenog čaja u kombuhu ovakvom kulturom je efikasna, čime je obezbeđeno dobijanje napitka optimalne kiselosti za kraće vreme fermentacije.

Tabela 8. Hemijski sastav fermentisane tečnosti (g/L) inokulisane starter kulturom

<i>uzorak</i>	<i>saharoza</i>	<i>D-glukoza</i>	<i>D-fruktoza</i>	<i>sirćetna kiselina</i>	<i>D-glukonska kiselina</i>	<i>etanol</i>
<i>Gornji sloj</i>	0,7987	16,6684	14,4315	3,6587	0,3501	10,1151
<i>srednji sloj</i>	0,8183	16,7548	14,6053	3,5943	0,3406	12,1279
<i>Donji sloj</i>	0.8206	17,9283	14,5526	3,6192	0,3292	10,6134
<i>S</i>	0,8161	17,1866	14,6053	3,6314	0,3122	10,9646

S-kombuha dobijena starter kulturama

U fermentisanoj podlozi inokuliranoj celuloznom pelikulom najmanje količine glukoze i fruktoze (manje za preko 3 g/L u odnosu na ostatak podloge) registrovane su u gornjem sloju medijuma. Kako su rezultati hemijskih i mikrobioloških merenja pokazali, u površinskom delu podloge inokulirane na tradicionalan način, se najbrže obavlja transformacija zaslađenog čaja, zbog čega je ova zona najveće kiselosti. S druge strane, u celokupnoj masi podloge inokulirane starterima (Tabela 8) dobijene su približno iste

vrednosti saharoze, D-glukoze i D-fruktoze. Istovremeno, ove vrednosti su znatno niže od onih koje su dobijene za tradicionalnu kombuhu i upravo su onakve kakva je i bila biotransformacija podloge starter kulturama - brža i ravnomerna po čitavoj zapremini. Zanimljivo je da se, za razliku od podloge sa celuloznom opnom, u podlozi sa starter kulturama nalaze manje količine fruktoze od glukoze, što sugerise na zaključak da se fruktoza brže usvaja od glukoze. Ovu pojavu su zabeležili i drugi istraživači (Sievers i sar., 1995). Uostalom za neke vrste kvasaca, poput *Zygosaccharomyces* sp., je dokazano da brže usvajaju fruktozu od glukoze (Barnett, 1997).

U fermentisanoj tečnosti, nakon šestodnevne kultivacije čajne gljive, preostaje izvesna količina glukoze i fruktoze kao potencijalnih izvora ugljenika, tako da proces dalje fermentacije nije limitiran sadržajem ugljenih hidrata. Međutim, dalja fermentacija je nepotrebna jer bi se njome dobio napitak izuzetne kiselosti, koji je manje podesan za konzumaciju.

Najveća količina etanola u podlozi inokuliranoj celuloznom pelikulom dobijena je za uzorke iz središnjeg dela podloge - 3,77 g/L. Razlog što najveća količina etanola nije u površinskom delu podloge, kao zoni najveće kiselosti, je u tome što u dužoj kultivaciji, zbog niskog pH i male koncentracije izvora ugljenika u podlozi, dolazi do slabljenja fermentativne aktivnosti kvasaca (Flanzy, 1998), čime je produkcija etanola smanjena. S druge strane se, uprkos visokoj kiselosti podloge, nesmetano odvija oksidacija etanola u sirćetnu kiselinu delovanjem bakterija sirćetnog vrenja. Izuzetna otpornost prema kiselinama je jedna od osnovnih karakteristika bakterija sirćetnog vrenja (Entani i sar., 1985).

Literaturni podaci o količini etanola u fermentisanoj podlozi inokuliranoj na tradicionalan način su različiti. Reiss (1994) je u podlozi sa inicijalnih 70 g/L saharoze registrovao 3,3 g/L etanola nakon pet dana kultivacije, a Sievers i saradnici (1995) su količinu etanola od 3,6 g/L detektovali nakon 10 dana. Blanc (1996) je u podlozi sa početnih 100 g/L saharoze maksimalnu količinu etanola od 1,34 g/L dobio nakon 5 dana fermentacije. Rezultati o količini etanola u uzorcima tradicionalno inokulirane podloge (Tabela 7) pokazuju da se vrednosti od preko 3 g/L etanola postižu nakon šest dana kultivacije čajne gljive na zaslađenom čaju ehinacee, što govori o izuzetnoj fiziološkoj aktivnosti kvasaca autohtone kulture.

Količine etanola u uzorcima podloge fermentisane starter kulturama i odgovarajućem kombuha napitku, znatno su veće i iznose preko 10 g/L fermentisane podloge. Objašnjenje za visok sadržaj etanola i manje količine ugljenih hidrata u podlozi inokuliranoj starter kulturama je u izuzetnoj fiziološkoj aktivnosti čistih kultura (pre svega sojeva kvasaca), koje su u fazi predinokulacije umnožene i adaptirane na podlogu sa saharozom. Upotreba starter kultura u fermentativnim procesima upravo podrazumeva primenu fiziološki aktivnih ćelija, koje će omogućiti efikasnu transformaciju podloge, strogu kontrolu procesa i dobijanje finalnog proizvoda za kraće vreme.

Sirćetna kiselina tokom kultivacije čajne gljive nastaje enzimskom oksidacijom etanola na spoljašnjosti ćelijske membrane bakterija sirćetnog vrenja (*Acetobacter* sp. i *Gluconobacter* sp.). Bakterije roda *Acetobacter* (ali ne i *Gluconobacter* sp.) mogu da oksiduju dalje sirćetnu kiselinu u ciklusu trikarbonskih kiselina, ali se ovaj proces ne odvija sve dok u spoljašnjoj sredini postoji slobodan etanol koji inhibira enzime ciklusa (Divies i Cachon, 1998). Rezultati titrabilne kiselosti u fermentisanim podlogama (Slike 12 i 15) i rezultati o količini sirćetne kiseline (Tabele 7 i 8) potvrđuju da je sirćetna kiselina dominantna organska kiselina kombuhe. Glukonska kiselina, koja nastaje oksidacijom glukoze na spoljašnjoj ćelijskoj membrani bakterija sirćetnog vrenja (Divies i Cachon, 1998), je po zastupljenosti u kombuhi odmah iza sirćetne kiseline. Zanimljivo je da većinu glukoze bakterije sirćetnog vrenja metabolišu u glukonsku kiselinu i celulozu, a da se fruktoza iz medijumu metaboliše u sirćetnu kiselinu (Reiss 1994; Chen i Liu, 2000). Za razliku od sirćetne kiseline, čija je sinteza limitirana u produženoj kultivaciji čajne gljive

usled slabljenja fermentativne aktivnosti kvasaca, sinteza glukonske kiseline je neometana. Tokom duže kultivacije bakterije sirćetnog vrenja su dodatno primorane da, zbog smanjene količine ugljenih hidrata u podlozi, kao izvor ugljenika koriste i samu sirćetnu kiselinu. Zato glukonska kiselina tokom duže kultivacije čajne gljive sve više učestvuje u ukupnoj kiselosti kombuha napitka.

Poznat kvantitativni i kvalitativni sastav jedinjenja nastalih tokom kultivacije čajne gljive omogućava da se izračuna maseni bilans C atoma: $(g \text{ supstrata} \times \text{broj C atoma} \times 12) / M \text{ supstrata}$. Izračunavanjem masenog bilansa C atoma za kombuhu dobijenu pomoću starter kultura, dobijena je razlika od preko četiri jedinice u odnosu na početnu vrednost. Ovim proračunom je obuhvaćena masa dobijene celulozne pelikule od 1,4295 g (s.m.), kao i izračunata količina dobijenog CO₂. Kada se uzme u obzir da je ovakvim proračunom zanemaren gubitak mase podloge nastao isparavanjem, relativno velika razlika u materijalnom bilansu C atoma se jedino može objasniti anabolizmom izvora ugljenika. Povećanje broja ćelija kvasaca i bakterija sirćetnog vrenja, odnosno biomase kulture tokom kultivacije čajne gljive, je nemoguće bez utroška izvora energije i izvora ugljenika. Pretpostavka da se za deobu ćelija i njihov rast troše rezervne materije iz starter kulture je manje verovatno. Ovakav stav je u suprotnosti sa konstatacijom Sievers i saradnika (1995) po kojoj, tokom kultivacije čajne gljive na crnom čaju, ne dolazi do anabolizma izvora ugljenika; u proračunu navedenih autora ne postoji gubitak C atoma. Uz to, u ovim proračunima je zanemareno prisustvo primesa u pelikuli koja se tako smatra čistom celulozom, a novija istraživanja (Murugesan i sar., 2005) pokazuju da masa čajne gljive, sintetisana tokom fermentacije crnog čaja, sadrži oko 180 g/kg (s.m.) proteinskih materije, 44 g/kg sirovih lipida i oko 980 g/kg vlakana.

4.1.5. Senzorna ocena kombuha napitaka od ehinacee

Po završetku kombuha fermentacije zaslađenog čaja ehinacee, obe fermentisane tečnosti su profiltrirane kroz sloj kiselgura, kako bi se pripremili napici za konzumaciju i senzorno ispitivanje. Naplavnom filtracijom se značajno redukuje broj ćelija kvasaca i bakterija sirćetnog vrenja (do stotine ćelija po mL napitka) i dobija potpuno bistar napitak. Krajnji efekat ovakvog tretmana je povećanje stabilnosti i održivosti kombuhe (Cvetković, 2003). Iako je postojala velika razlika u titrabilnoj kiselosti uzoraka fermentisane tečnosti sa različitih nivoa podloga inokuliranih navlakom i starter kulturama, kiselost dobijenih kombuha napitaka se razlikovala za 0,31 g/L. Titrabilna kiselost kombuhe dobijene korišćenjem starter kulturama je bila $5,07 \pm 0,015$ g/L, a kiselost napitka dobijenog na tradicionalan način $4,76 \pm 0,025$ g/L.

Ocene članova komisije, koji su senzorno analizirali pripremljene kombuha napitke su prikazane tabelom 9. Kombuha pripremljena pomoću starter kultura je po većini parametara bila bolje ocenjena od kombuhe pripremljene na uobičajen način, pri čemu dobijeni rezultati senzornog ocenjivanja pokazuju statistički značajno odstupanje ($p > 0,05\%$) za miris i kiselost napitaka.

Čaj ehinacee nema izraženu aromu koja bi doprinela dodatnom kvalitetu kombuhe iz ugla senzornih karakteristika. Odabiru čaja, ili prave kombinacije čajeva za kultivaciju čajne gljive treba posvetiti posebnu pažnju. Dodatkom nekog aromatičnijeg čaja u kombinaciji sa herbom ehinacee verovatno bi se dobio napitak još boljih senzornih svojstava, koji ne bi izgubio od svoje lekovitosti.

Tabela 9. Senzorna evaluacija kombuha napitaka od čaja ehinacee

senzorni pokazatelj	tradicionalna kombuha	kombuha dobijena starter kulturama
<i>miris</i>	2,22±0,22* a	1,77±0,32 b
<i>ukus</i>	1,77±0,22 b	2±0,28 ab
<i>kiselost</i>	1,66±0,23 b	2,22±0,22 a
<i>slatkost</i>	1,77±0,22 b	2,11±0,20 b
<i>opšti utisak</i>	1,88±0,20 ab	2,11±0,26 ab

*- $\bar{x}_{sr} \pm SE$ ($p < 0,05$). Među vrednostima koje su označene istim slovom nema signifikantnih razlika

4.2. Biološka aktivnost kombuha napitaka

U ovom delu su izneti rezultati ispitivanja antimikrobne, antioksidativne i antiproliferativne aktivnosti kombuha napitaka od crnog čaja, čaja ehinacee i rtanjskog čaja. Prikazani rezultati se odnose na konzumne kombuha napitke, tj. napitke čija je titrabilna kiselost od 3,5–4 g/L. Dosadašnja istraživanja biološke aktivnosti kombuhe od crnog čaja (pre svih antimikrobnih efekata) se odnose na napitke čija je kiselost bila 2-3 puta veća u odnosu na vrednosti koje su konzumenti ocenili kao najprihvatljivije. U slučaju prethodnih ispitivanja antimikrobne aktivnosti kombuhe, sirćetna kiselina je označena kao nosilac antimikrobne aktivnosti, tako da kiselost napitka direktno utiče na nivo aktivnosti kombuhe (Greenwalt i sar., 1998; Guttapadu i sar., 2000). Rezultati ispitivanja kombuha napitaka od ehinacee i rtanjskog čaja su trebali da pokažu da li napici dobijeni fermentacijom ovih lekovitih biljaka imaju izraženije biološke efekte u odnosu na tradicionalnu kombuhu od crnog čaja.

Rezultati ispitivanja antiproliferativne aktivnosti kombuha napitaka od crnog i rtanjskog čaja su posebno značajni imajući u vidu da u literaturi nema podataka o ispitivanjima ovakvog tipa. Ispitivanje antiproliferativne aktivnosti i mutagenih efekata su preduslov za opsežno kliničko istraživanje terapijskih efekata kombuha napitaka.

4.2.1. Antimikrobna aktivnost kombuhe od crnog čaja, rtanjskog čaja i čaja ehinacee

Antimikrobna aktivnost konzumnih kombuha napitaka od crnog i rtanjskog čaja i čaja ehinacee je ispitana u cilju utvrđivanja nosilaca antimikrobne aktivnosti napitaka i uticaja samih čajeva na aktivnost kombuhe. Rezultati ne pokazuju samo terapijski efekat kombuha napitaka, već su i merilo potencijalnih rizika od kontaminacije čajne gljive, odnosno napitaka mikroorganizmima iz okruženja. Zato su kao test mikroorganizmi u ispitivanju, pored referentnih sojeva bakterija, kvasaca i plesni, upotrebljeni i sojevi izolovani iz okruženja (vrste rodova *Bacillus*, *Rhodotorula*, *Penicillium* i *Aspergillus*), ili kliničkog materijala (*Candida pseudotropicalis*).

Da bi se utvrdila osetljivost sojeva bakterija, kvasaca i plesni upotrebljenih u ispitivanju antimikrobne aktivnosti kombuha napitaka, urađeni su antibiogram testovi sa standardnim antimikrobnim supstancama. Tabela 10 prikazuje rezultate delovanja antibiotika penicilina, ceftriaksona, imipenema, amoksicilina i amikacina na bakterijske test sojeve.

Tabela 10. Dejstvo antibiotika na bakterijske test sojeve ($\bar{x}_{sr} \pm SD$)

Mikroorganizam	P*	CRO	IPM	AX	AK
<i>Salmonella enteritidis</i>	16±0,0	23±0,0	21±1,0	17±0,0	18±0,0
<i>Proteus mirabilis</i>	34,33±0,58	40±0,0	30,67±0,58	26,33 ±0,58	22±0,0
<i>Bacillus</i> sp.	34±0,0	31±0,0	41,33±0,58	29±0,0	45,33±0,58
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	23±1,0	27±1,0	44±1,0	22,67±1,15	34,67±0,58
<i>Staphylococcus aureus</i>	32,67±1,15	22±0,0	37±1,0	28±0,0	22,33±0,58
<i>Sarcina lutea</i>	38±0,0	47±0,0	59,67±0,58	56,67±0,58	40±0,0
<i>Escherichia coli</i>	10±0,0	28±0,0	27,67±0,58	21,33±1,15	17,67±0,58

* penicilin (P), ceftriakson (CRO), imipenem (IPM), amoksicilin (AX) i amikacin (AK).

Bakterijski sojevi su u različitoj meri ispoljili osetljivost na upotrebljene antibiotike. Patogene gram negativne bakterija *Salmonella enteritidis* i *Escherichia coli* se na osnovu zone inhibicije (<22 mm) mogu definisati kao rezistentni, ili umereno osetljivi sojevi na upotrebljene antibiotike (Suvajdžić, 2004). S druge strane, najveću osetljivost pokazale su gram pozitivne bakterije *Bacillus* sp. i *Sarcina lutea*.

Osetljivost test sojeva kvasaca i plesni na antimikotike ketokonazol, amfotericin-B i nistatin je bila različita (Tabela 11). Najveću osetljivost testirani sojevi kvasaca i plesni su pokazali prema polienskom antimikotiku nistatinu koji je prvi izbor u terapiji površinskih mikoza.

Tabela 11. Dejstvo antimikotika na test sojeve kvasaca i plesni ($\bar{x}_{sr} \pm SD$)

Mikroorganizam	KT*	AP	NS
<i>Penicillium aurantiogriseum</i>	21,67 ± 0,58	15 ± 0,0	33,67 ± 0,58
<i>Aspergillus niger</i>	13,67 ± 0,58	15 ± 1,73	21,67 ± 0,58
<i>Aspergillus flavus</i>	19,33 ± 1,15	13 ± 0,0	21 ± 0,0
<i>Candida pseudotropicalis</i>	19 ± 0,0	10,67 ± 0,58	21 ± 0,0
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	15 ± 0,0	14,33 ± 0,58	30,33 ± 0,58
<i>Rhodotorula</i> sp.	25 ± 0,0	10,33 ± 0,58	28 ± 0,0

* ketokonazol (KT), amfotericin-B (AP), nistatin (NS)

Rezultati ispitivanja antimikrobne aktivnosti kombuhe od crnog čaja titrabilne kiselosti od 3,55±0,03 g/L i odgovarajućih kontrolnih uzoraka prikazani su tabelom 12. Najizraženiju antimikrobnu aktivnost pokazali su kombuha od crnog čaja i rastvor sirćetne kiseline. Step en njihovog inhibitornog delovanja je gotovo identičan za sve test mikroorganizme, izuzev patogene bakterije *Staphylococcus aureus*, kod koje je izostalo baktericidno delovanje rastvora sirćetne kiseline. Nijedan od uzoraka nije ispoljio

antimikrobno delovanje na vrstu *S. lutea* uprkos osetljivosti ove bakterije na antibiotike (Tabela 10).

Kombuha od crnog čaja i njoj odgovarajući kontrolni uzorci nisu delovali na mikroorganizme sa eukariotskim tipom ćelija - kvasce *Rhodotorula* sp., *Candida pseudotropicalis*, *Saccharomyces cerevisiae* i plesni *Aspergillus niger* i *Aspergillus flavus*. *Penicillium aurantiogriseum* je bio jedini od ispitanih eukariotskim mikroorganizama na koji su kombuha od crnog čaja i rastvor sirćetne kiseline delovali ispoljavajući minimalnu inhibitornu aktivnost.

Tabela 12. Antimikrobno delovanje kombuhe od crnog čaja ($x_{sr} \pm SD$)

Mikroorganizam	Kombuha		Sirćetna kiselina c=3,55 g/L		Kombuha pH=7		"model sistem"
	a	b	a	b	a	b	b
<i>Salmonella enteritidis</i>	12,33 ±0,58	29 ±1,73	13 ±0,58	nd	nd	24,67 ±0,58	29,67 ±2,52
<i>Escherichia coli</i>	13,67 ±0,58	nd	13 ±0,5	nd	nd	nd	nd
<i>Proteus mirabilis</i>	nd	15,67 ±0,58	nd	17,33 ±0,58	+/-	20 ±0,0	nd
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	12 ±0,0	nd	12 ±0,0	nd	nd	nd	10,33 ±0,58
<i>Staphylococcus aureus</i>	12,33 ±0,58	nd	nd	14 ±0,0	nd	nd	nd
<i>Bacillus</i> sp.	9,33 ±1,53	9,33 ±0,71	10,33 ±1,53	10,67 ±0,58	9,33 ±1,35	nd	nd
<i>Penicillium aurantiogriseum</i>	+/-	nd	+/-	nd	nd	nd	nd

a – mikrobicidno delovanje; b – mikrobiostatsko delovanje (zona smanjenog rasta); nd – nema delovanja; +/- - granična antimikrobna aktivnost (odsustvo rasta unutar i po obodu " bunarčića")

Kombuha od crnog čaja nakon neutralizacije (kombuha pH=7) je pokazala bakteriostatsko delovanje na *S. enteritidis* i *Proteus mirabilis* i baktericidno delovanje na *Bacillus* sp., dok je "model sistema" pokazao bakteriostatsko delovanje na *S. enteritidis* i *Pseudomonas aeruginosa*.

Slični rezultati su dobijeni i prilikom ispitivanja antimikrobne aktivnosti kombuhe od rtanjskog čaja i čaja ehinacee (Tabele 13 i 14). Kombuha napici od rtanjskog čaja (titrabilne kiselosti 3,94±0,03 g/L) i ehinacee (3,73±0,02 g/L) su pokazali gotovo identično delovanje kao i rastvori sirćetne kiseline na bakterije *E. coli*, *S. aureus*, *S. enteritidis*, *P. mirabilis*, *P. aeruginosa* i *Bacillus* sp., odnosno plesni *P. aurantiogriseum* i *A. flavus* (na *A. flavus* je kombuha od ehinacee pokazala snažnije delovanje; Slika 16). Izostalo je delovanje na bakteriju *S. lutea* i plesan *A. niger* čiji rast nisu inhibirali ni ostali kontrolni uzorci.

Dok su neutralisana kombuha od rtanjskog čaja i "model sistem" pokazali bakteriostatsko delovanje samo na *S. enteritidis*, dotle su neutralisana kombuha od ehinacee i "model sistem" pokazali blago bakteriostatsko delovanje na *S. enteritidis*, *E. coli* i *P. mirabilis*. S obzirom da su slično delovanje neutralisana kombuha i "model sistem" ispoljili i u slučaju kombuhe od crnog čaja, ovo je bio prvi pokazatelj da nosioci antimikrobne aktivnosti kombuhe nisu samo organske kiseline (pre svih sirćetna kiselina).

Tabela 13. Antimikrobno delovanje kombuhe od rtanjskog čaja ($x_{sr} \pm SD$)

Mikroorganizam	Kombuha		Sirćetna kiselina c=3,94 g/L		Kombuha pH=7	"model sistem"
	a	b	a	b	b	b
<i>Salmonella enteritidis</i>	13,33 ±0,58	30 ±1,53	14 ±0,58	nd	21,33 ±0,58	33,33 ±1,53
<i>Escherichia coli</i>	14 ±0,0	nd	14,67 ±0,58	nd	nd	nd
<i>Proteus mirabilis</i>	nd	18 ±0,0	nd	18 ±0,0	nd	nd
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	12,67 ±0,58	nd	13,33 ±0,47	nd	nd	nd
<i>Staphylococcus aureus</i>	nd	15,33 ±0,58	nd	14,67 ±0,58	nd	nd
<i>Bacillus</i> sp.	9,33 ±0,58	11 ±0,0	9,33 ±0,58	11,33 ±0,58	nd	nd
<i>Penicillium aurantiogriseum</i>	+/-	nd	+/-	nd	nd	nd
<i>Aspergillus flavus</i>	+/-	nd	+/-	nd	nd	nd

a– mikrobicidno delovanje; b – mikrobiostatsko delovanje (zona smanjenog rasta); nd – nema delovanja; +/- - granična antimikrobna aktivnost (odsustvo rasta unutar i po obodu "bunarčića")

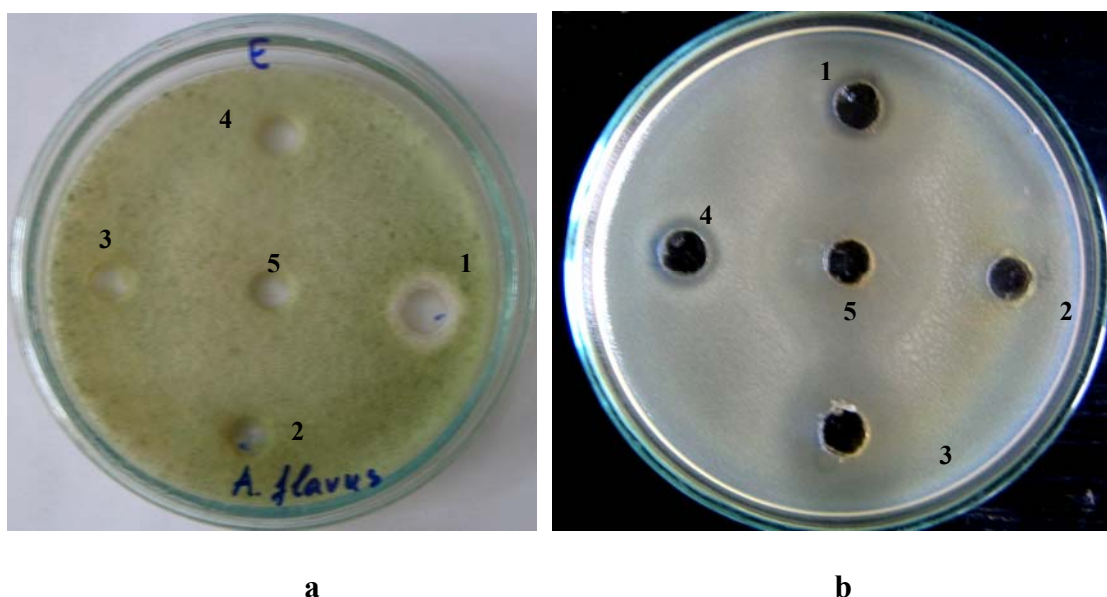
Tabela 14. Antimikrobno delovanje kombuhe od čaja ehinacee (izraženo kao $x_{sr} \pm SD$)

Mikroorganizam	Kombuha		Sirćetna kiselina c=3,73 g/L		Kombuha pH=7	"Model sistem"
	a	b	a	b	b	b
<i>Salmonella enteritidis</i>	12 ±0,0	29,67 ±0,58	13,67 ±0,58	nd	21,67 ±1,53	28 ±1,0
<i>Escherichia coli</i>	12,67 ±0,58	24 ±1,0	14 ±0,0	nd	20,67 ±0,58	21 ±2,65
<i>Proteus mirabilis</i>	nd	26,33 ±0,58	13,67 ±0,58	nd	20 ±0,58	25 ±0,0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	12 ±0,0	nd	13 ±1,0	nd	nd	nd
<i>Staphylococcus aureus</i>	13,33 ±0,58	nd	14 ±0,0	nd	nd	nd
<i>Bacillus</i> sp.	9,33 ±0,58	10,67 ±0,58	9,67 ±0,58	10,67 ±0,58	nd	nd
<i>Penicillium aurantiogriseum</i>	+/-	nd	+/-	nd	nd	nd
<i>Aspergillus flavus</i>	14 ±1,0	nd	+/-	nd	nd	nd

a– mikrobicidno delovanje; b – mikrobiostatsko delovanje (zona smanjenog rasta); nd – nema delovanja; +/- - granična antimikrobna aktivnost (odsustvo rasta unutar i po obodu "bunarčića")

Tokom ispitivanja antimikrobne aktivnosti kombuha napitaka od crnog i rtanjskog čaja i čaja ehinace, rastvori sirćetne kiseline i kombuha napici su pokazali baktericidno delovanje na sve Gram pozitivne bakterije osim *S. lutea*. Približno isto delovanje su navedeni uzorci pokazali i na Gram negativne bakterije, s tim da je izostalo baktericidno delovanje kombuha napitaka na bakteriju *P. mirabilis* (kombuhe delovale bakteriostatski). Kombuha napici su, kada se u obzir uzme i zona biostatskog delovanja, dali nešto širu zonu inhibicije u odnosu na rastvore sirćetne kiseline iste koncentracije. Ovi podaci takođe

upućuju na pretpostavku da kombuha pored sirćetne kiseline sadrži i druge antimikrobne komponente.



Slika 16. Antimikrobna aktivnost kombuhe od ehinacee na *Aspergillus flavus* (a) i *Escherichia coli* (b) (1-kombuha; 2-čaj; 3-neutralisana kombuha; 4-sirćetna kiselina; 5-„model sistem“)

Kombuha napici od crnog čaja, čaja ehinacee i rtanjskog čaja, kao i njihovi kontrolni uzorci, nisu delovali na ispitane vrste kvasaca (*Saccharomyces cerevisiae*, *Candida pseudotropicalis*, *Rhodotorula* sp.). Odsustvo antimikrobnog delovanja uzoraka na ćelije kvasaca se objašnjava činjenicom da su kvasci, kao acidofilni mikroorganizmi, otporniji na delovanje organskih kiselina. Uostalom, određene vrste kvasaca (poput *Saccharomyces cerevisiae*) su simbionti u čajnoj gljivi, a njihova viabilnost u fermentisanoj tečnosti čajne gljive je dokazana i posle višenedeljnog perioda kultivacije, uprkos visokoj koncentraciji kiselina (Markov i sar., 2001; Teoh i sar., 2004).

Infuzumi crnog i rtanjskog čaja (koncentracija čaja 5 g/L) su delovali bakteriostatski samo na bakteriju *P. aeruginosa*. Istraživanja su pokazala da crni čaj u koncentracijama koje su mnoge veće od konzumnih ispoljava antimikrobno delovanje prema nekim patogenim bakterijama. Tako je crni čaj u koncentraciji od 20% (suve materije) inhibirao rast *Staphylococcus epidermidis*, *S. enteritidis*, *Salmonella typhi*, *Salmonella typhimurium*, *S. aureus*, *Shigella flexneri*, *Shigella dysenteriae*, *Vibrio* sp., *Campylobacter* sp. i *Helicobacter pylori* (Greenwalt i sar., 1998). Baktericidnu aktivnost čaja autori objašnjavaju delovanjem polifenola, posebno katehina; tako je katehinska frakcija crnog čaja u količini od 0,4 mg/mL ispoljila identično delovanje na sve navedene bakterije, ali i na uzročnika karijesa *Streptococcus mutans* (Greenwalt i sar., 1998).

Zeleni čaj i ekstrakt svežih listova *Camellia sinensis* L. pokazuju snažniju antimikrobnu aktivnost u odnosu na ekstrakt crnog čaja (Chou i sar., 1999). Od ispitanih sojeva najveću osetljivost je pokazao *Pseudomonas fluorescens*, dok je *Bacillus subtilis* bio najmanje osetljiva bakterijska vrsta. *E. coli*, *S. aureus*, *Proteus vulgaris* i *Salmonella* sp. pokazali su podjednaku osetljivost. Ovi rezultati su potvrdili prethodna saznanja da ekstrakti čajeva imaju aktivnost i prema Gram pozitivnim i Gram negativnim bakterijama (Dufresne i Farnworth, 2000). Veću antimikrobnu aktivnost zelenog čaja Chou i saradnici (1999) objašnjavaju činjenicom da se tokom fermentacije listova smanjuje količina katehina (posebno EGC i ECG) u čaju, koji su nosilaca antimikrobne aktivnosti.

Rezultati istraživanja Ciani i saradnika (2000) su pokazali da etarsko ulje *Satureja montana* L. ima značajnu antimikrobnu aktivnost na ćelije kvasaca. Etarsko ulje je bilo aktivno prema patogenim kvascima *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Filobasidiella neoformans*, *Tricosporon cutaneum* i kvascima kvarenja *Bretanomyces* sp., *Saccharomycodes ludwigii*, *Schizosaccharomyces octosporus*, *Zygosaccharomyces baillii*, *Zygosaccharomyces rouxii*. Među patogenim kvascima *C. albicans* i *F. neoformans* su pokazali veću osetljivost nego *Candida parapsilopsis*. Vrste *Hanseniaspora uvarum*, *Z. rouxii* i *Nadsonia commutata* pokazale su manju osetljivost nego za ostale vrste. Inhibitorna aktivnost etarskog ulja rtanjskog čaja se objašnjava prisustvom karvakrola kao najvažnije aktivne supstance etarskog ulja rtanjskog čaja (Ultee i sar., 1999; Ciani i sar., 2000). Karvakrol je hidrofobna komponenta koja utiče na permeabilnost ćelijske membrane za transport katjona (među kojima su H^+ i K^+), što izaziva rasipanje jonskog gradijenta membrane i remećenje osnovnih procesa u ćeliji i njene smrti (Ultee i sar., 1999).

Bezbradica i saradnici (2005) su ispitali antimikrobnu aktivnost etarskog ulja *Satureja montana* L. prikupljene na lokalitetima Srbije i Crne Gore i utvrdili delovanje na *S. epidermidis*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *Corynebacterium* sp. (poreklom sa ljudske kože) i *Pseudomonas putida* (izolovana iz zemljišta). Najveću osetljivost pokazao je soj *Corynebacterium* sp. (zona inhibicije 24-29 mm), a najveću rezistenciju *P. aeruginosa* (zona inhibicije <5 mm).

Rezultati o antimikrobnoj aktivnosti rtanjskog čaja se odnose na etarska ulja, ili ekstrakte koji sadrže znatno veću količinu aktivnih supstanci nego čajni napitak rtanjskog čaja, koji je pripremljen u ispitivanju antimikrobne aktivnosti kombuhe od *Satureja montana*. Zato i nije bilo očekivano da ovaj čajni napitak pokaže značajniju antimikrobnu aktivnost

Droga ehinacee sadrži polisaharide velike molekulske mase (ehinacin), fenolna jedinjenja derivate kofeinske kiseline (cinarin), cikorijsku kiselinu, ehinakozid, alkaloida, itd. (Capasso i sar., 2003). Farmakološki efekti ehinacee verovatno potiču od kombinovanog delovanja više aktivnih supstanci. Smatra se da imunostimulativna svojstva ehinacee potiču od delovanja na nespecifičnu grupu imunoćelija (na fagocitne ćelije), a ne na ćelije stečenog imuniteta. Fagociti prodiru u inflamatorna mesta sa ciljem da izvrše ingestiju nepoželjnih čestica kao što su bakterije ili razorene ćelije. Ehinacea ubrzava ovaj proces poznat kao fagocitoza. Pored toga, ehinacea ispoljava efekat kod raznih infekcija, ali specifičnim antibakterijskim delovanjem. Njen mukopolisaharid ehinacin inhibira enzim hijaluronidazu streptokoka, pneumokoka, klostridija i drugih bakterija. Delovanjem ovog enzima oštećuje se ćelijska opna što omogućava prodiranje bakterija i virusa u tkiva organizma (Ognjanović, 2000). Zbog ovakvog specifičnog delovanja na patogene bakterije antimikrobna aktivnost samog čaja ehinacee nije se mogla ispoljiti u ogledu *in vitro*. Iz tabele 14 se vidi da čaj herbe ehinacee u koncentraciji od 5 g/L nije pokazao antimikrobno delovanje na test mikroorganizme.

Barrett (2003) je pokazao da ekstrakti *Echinacea purpurea* ispoljavaju značajnu antifungalnu aktivnost i na mikroorganizme sa eukariotskim tipom ćelije. U *in vitro* ogledu ekstrakti ehinacee su delovali protiv različitih sojeva *S. cerevisiae* i *Candida* sp., uključujući i patogenu vrstu *C. albicans* koja je najčešći uzročnik gljivičnih oboljenja ljudske kože.

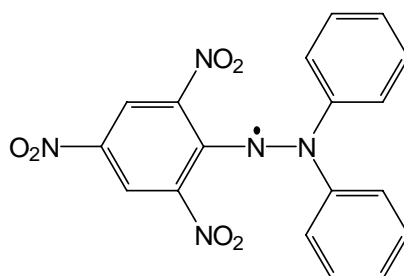
Upoređujući rezultate ispitivanja antimikrobne aktivnosti konzumnih kombuha napitaka od rtanjskog i crnog čaja i čaja ehinacee, sa rezultatima drugih autora koji su istraživali antimikrobna svojstva kombuhe od crnog i zelenog čaja (Greenwalt i sar., 1998; Guttapadu i sar., 2000), može se konstatovati da su uzorci kombuhe ispoljili inhibirajuće delovanje na iste mikroorganizme (*S. enteritidis*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* i *Bacillus* sp.). Poredeći baktericidno delovanje kombuha napitaka iz tabela 18, 19 i 20 sa

rezultatima Greenwalt i saradnika, može se pretpostaviti da je glavni razlog izraženijeg antimikrobnog delovanja kombuhe u istraživanju citiranih autora upravo veći sadržaj sirćetne kiseline, koja je glavni antimikrobni agens kombuhe. Koncentracija sirćetne kiseline u kombuhi od crnog čaja koju su ispitivali Greenwalt i saradnici je bila čak 7 g/L. S druge strane, kombuha napici čiju su antimikrobnu aktivnost ispitali Guttapadu i saradnici, nisu i pored veće kiselosti (koncentracija sirćetne kiseline 8,5 g/L) pokazali bitnije razlike u bakteriostatskom delovanju u poređenju sa napicima dobijenim od rtanjskog čaja, čaja ehinacee i crnog čaja.

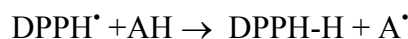
4.2.2. Ispitivanje antioksidativne aktivnosti čajnih i kombuha napitaka ESR spektralnom analizom

U cilju ispitivanja antioksidativne aktivnosti čajnih i kombuha napitaka od crnog čaja, čaja ehinacee i rtanjskog čaja definisana su dva model sistema: model sistem sa stabilnim DPPH radikalima i Fentonov reakcioni sistem sa hidriksil radikalima.

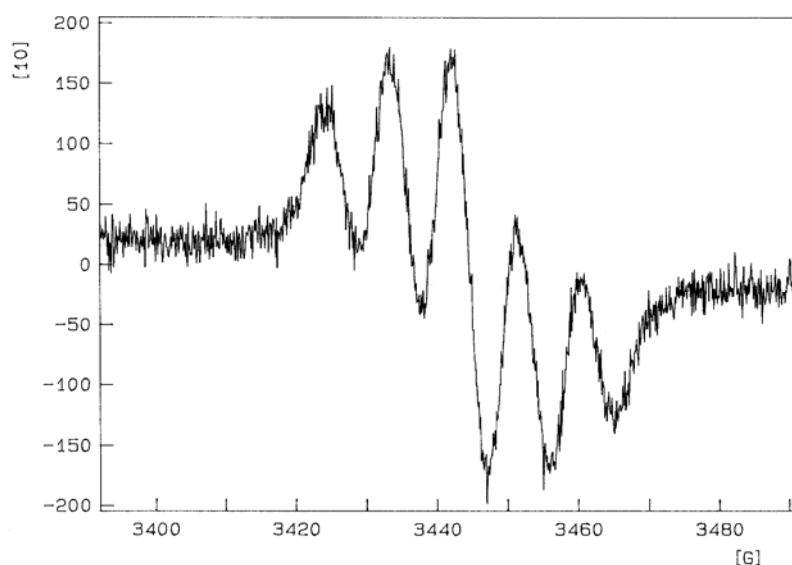
DPPH radikali su stabilni slobodni radikali sledeće hemijske strukture:



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



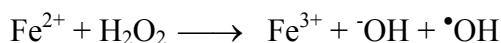
Ove hemijske promene se mogu pratiti spektrofotometrijski preko transformacije boje od ljubičaste do žute, ili ESR spektrometrijski direktnim merenjem koncentracije DPPH radikala. Na slici 17 prikazan je ESR spektar stabilnih DPPH slobodnih radikala slepe probe (0,4 mM metanolni rastvor DPPH radikala).



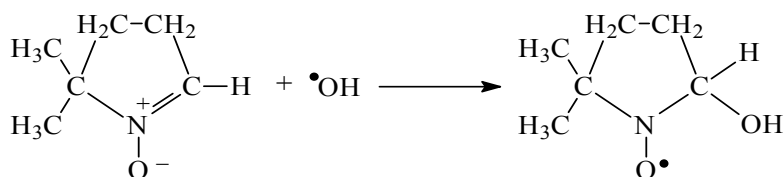
Slika 17. ESR spektar stabilnih DPPH radikala (slepa proba)

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

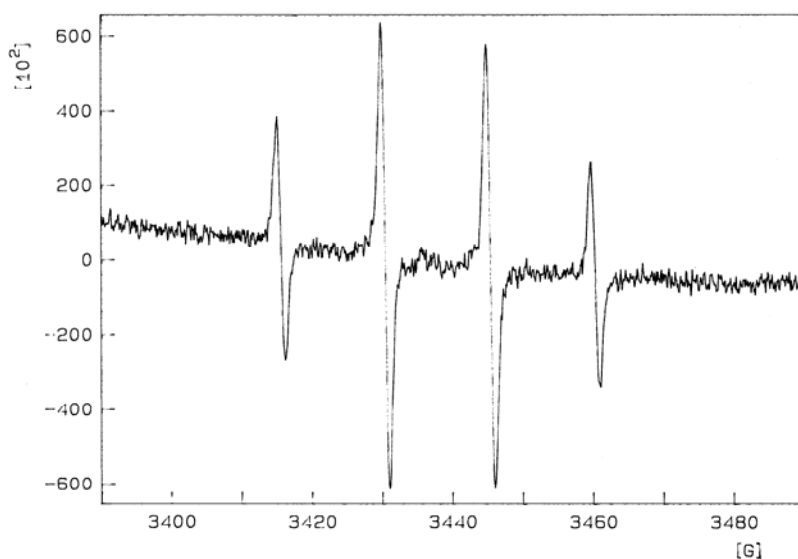
Visokoreaktivni slobodni hidriksil radikali u ispitivanim model sistemima nastaju mehanizmom Fentonove reakcije, prikazanom sledećom hemijskom jednačinom:



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



ESR spektar DMPO-OH spin adukata nastalih u model sistemu mehanizmom Fentonove reakcije (slepa proba) prikazan je slikom 18.



Slika 18. ESR spektar DMPO-OH spin adukata Fentonovog model sistema (slepa proba)

Hiperfina struktura ESR spektra (Slika 18) DMPO-OH spin-adukata potiče od inrterakcije nesporenog elektrona i jednog ^{14}N atoma ($I=1$) i jednog H atoma ($I=1/2$) i sastoji se iz četiri linije, relativnog odnosa intenziteta 1:2:2:1. Konstante hiperfinog cepanja imaju vrednosti $a_{\text{N}}=14.9\text{ G}$ i $a_{\text{H}}= 14.9\text{ G}$.

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

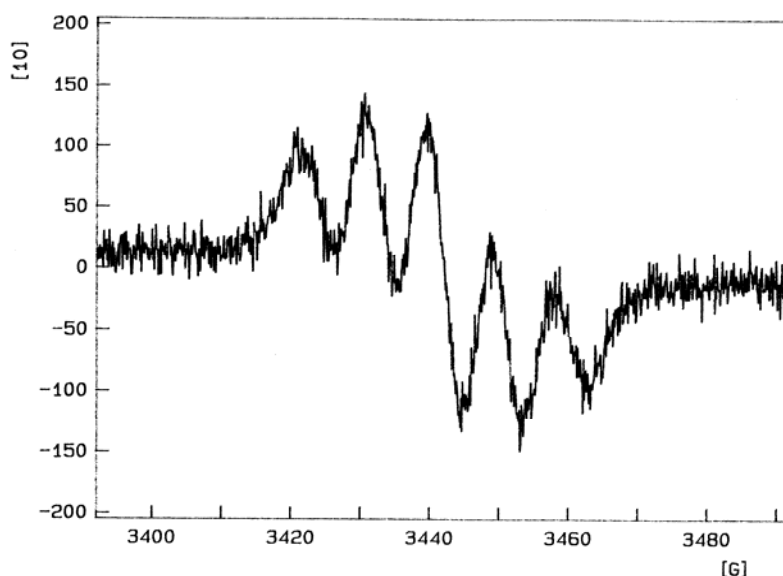
4.2.2.1. Antioksidativna aktivnost čajnih i kombuha napitaka od korena i herbe *Echinacea purpurea*

S obzirom da je antioksidativna aktivnost čajnih i kombuha napitaka pripremljenih od zaslađenog čaja korena i herbe *Echinacea purpurea* već potvrđena u Fentonovom reakcionom sistemu (Cvetković, 2003), antioksidativna aktivnost istih uzoraka ispitana je i na stabilne DPPH radikale (Tabela 15).

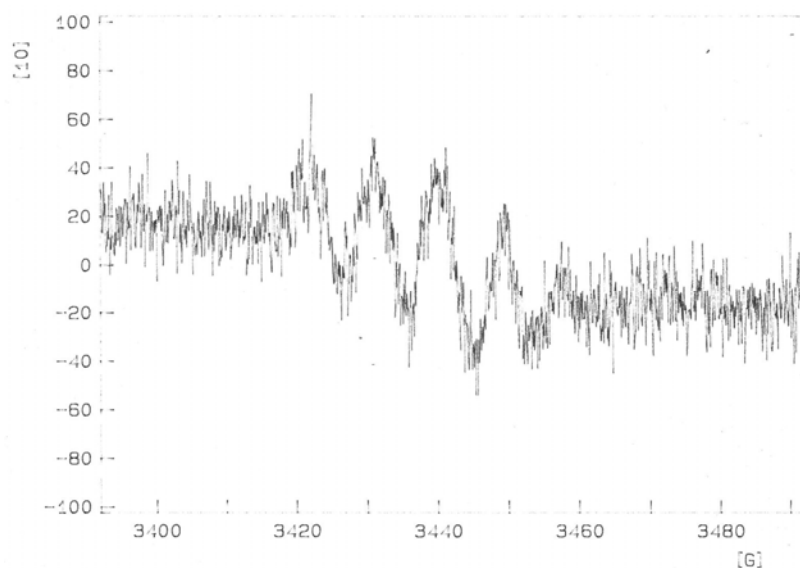
Tabela 15. Antioksidativna aktivnost čajnih i kombuha napitaka korena i herbe *Echinacea purpurea* na DPPH radikale

Uzorak	Antioksidativna aktivnost uzoraka AA _{DPPH} (%)	
	100μL	150μL
Crni čaj	17,94	38,94
Kombuha od crnog čaja	76,19	85,08
Čaj od korena ehinacee	62,86	87,94
Kombuha od korena ehinacee	82,22	90,16
Čaj od herbe ehinacee	64,13	93,02
Kombuha od herbe ehinacee	86,03	100

Intenzitet ESR signala DPPH u svim ispitivanim reakcionim sistemima su niži od intenziteta ESR signala DPPH slepe probe. Čajevi pripremljeni od korena i herbe *Echinacea purpurea*, kao i kombuha napici, dodati u model sistem izazivaju sniženje RI ESR signala (Slike 19 i 20), odnosno pokazuju veću AA_{DPPH} u zavisnosti od zapremine dodatog ispitivanog uzorka. Najizraženiji antioksidativni efekat (AA_{DPPH}=100%) na stvaranje i transformaciju DPPH radikala detektovan je u prisustvu 150 μL kombuha napitka pripremljenog od herbe ehinacee (Slika 20). U prisustvu iste zapremine kombuhe pripremljene od korena ehinacee antioksidativna vrednost je niža (AA_{DPPH}=90,16%). Čajni napici pripremljeni od korena i herbe ehinacee su u poređenju sa kombuha napicima pokazali niže vrednosti antioksidativne aktivnosti.



Slika 19. ESR spektar DPPH radikala u prisustvu 100 μL čajnog napitka pripremljenog od herbe *Echinacea purpurea*

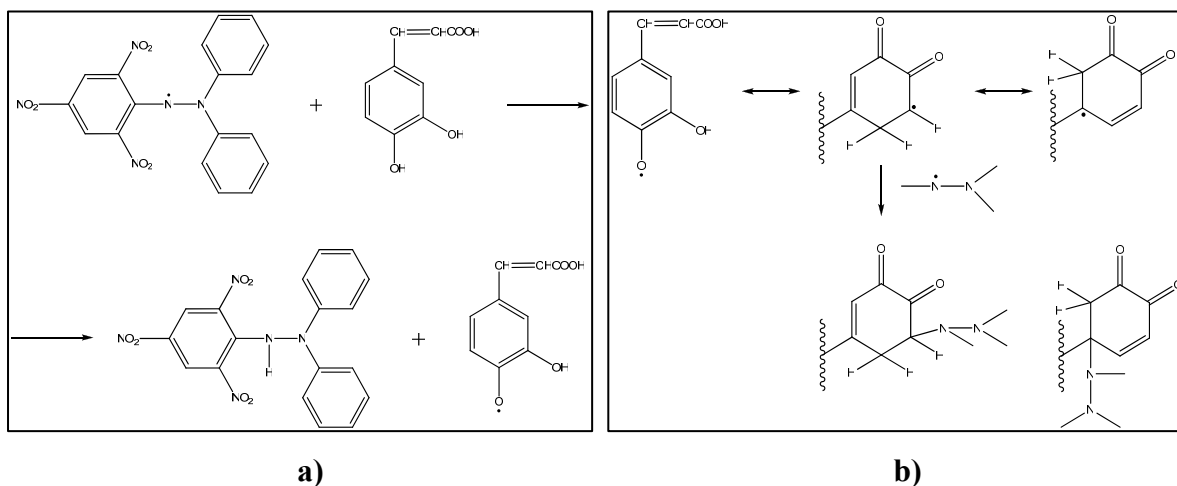


Slika 20. ESR spektar DPPH radikala u prisustvu kombuhe od zaslađenog čaja herbe *Echinacea purpurea*.

Očigledno je da su vrednosti antioksidativne aktivnosti za čajeve i kombuha napitke od *Echinacea purpurea* na DPPH radikale (AA_{DPPH}) signifikantno veće ($p < 0,05$), u odnosu na AA_{DPPH} za crni čaj i kombuha napitak pripremljen fermentacijom zaslađenog crnog čaja (Tabela 15).

Na osnovu hemijskog sastava korena i herbe *Echinacea purpurea* (Stuart i Willis, 2000; Kruk i sar., 2001) antioksidativna aktivnost ekstrakata može se pripisati aktivnim sekundarnim metabolitima i to: alkilamidima, fenolnim kiselinama, flavonoidima, taninima, terpenima, antocijanima i drugim. Izraženija antioksidativna aktivnost čaja herbe *Echinacea* u odnosu na čaj korena posledica je veće koncentracije fenolnih kiselina, posebno cikorne kiseline i njenih derivata u herbi. Sadržaj cikorne kiseline u herbi je 38,3 mg/g suve materije, a u korenu je 19,2 mg/g suve materije (Stuart i Willis, 2000). Na osnovu hemijskih struktura najzastupljenijih fenolnih kiselina (kafene, hlorogenske i cikorne) može se zaključiti da cikorna kiselina pokazuje izraženije antioksidativno delovanje u odnosu na kafenu i hlorogensku, s obzirom da ima dva o-dihidroksifenil ostatka.

Na slici 21 prikazan je mehanizam antioksidativnog delovanja fenolnih jedinjenja na DPPH radikale.



Slika 21. Mehanizam antioksidativnog delovanja fenolnih jedinjenja: a) otpuštanje H-atoma i b) reakcija aroksi radikala sa DPPH radikalom

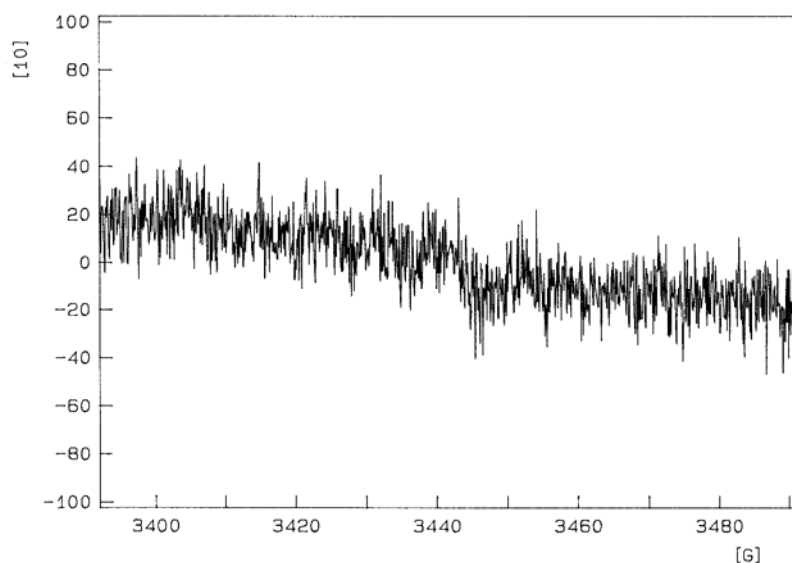
4.2.2.2. Antioksidativna aktivnost čajnih i kombuha napitaka od rtanjskog čaja

Antioksidativna aktivnost čajnih i kombuha napitaka pripremljenih od rtanjskog čaja ispitana je u dva model sistema, na dve vrste radikala, stabilne DPPH radikale i visokoreaktivne hidrosil (OH^\cdot) radikale. Dobijene vrednosti antioksidativne aktivnosti (AA_{DPPH} i AA_{OH}) prikazane su tabelom 16.

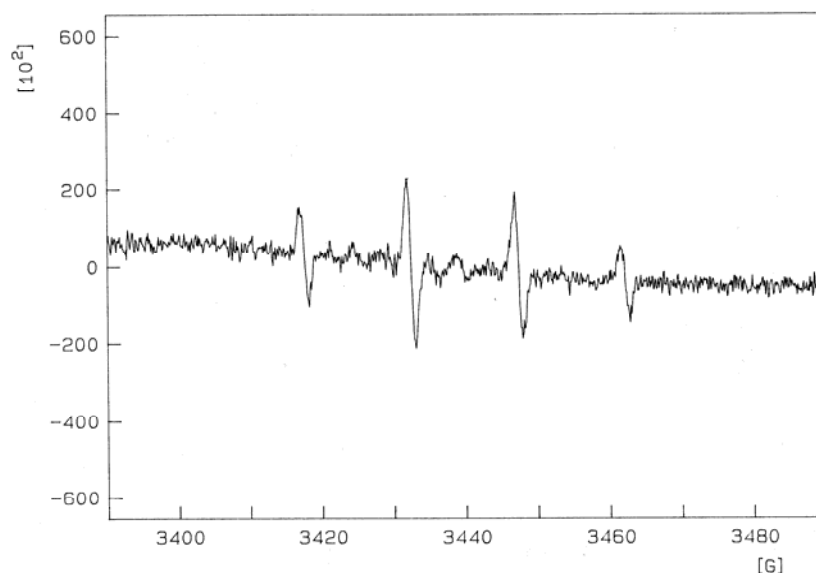
Tabela 16. Antioksidativna aktivnost čajnih i kombuha napitaka pripremljenih od rtanjskog čaja na DPPH (AA_{DPPH}) i OH (AA_{OH}) radikale

Uzorci	AA_{DPPH} (%)		AA_{OH} (%)	
	50 μL	100 μL	50 μL	100 μL
Crni čaj	14,12	17,94	10,12	16,35
Kombuha od crnog čaja	70,14	76,19	50,12	55,32
Rtanjski čaj	81,12	92,12	76,77	90,14
Kombuha od rtanjskog čaja	86,67	100	82,24	98,12

Na osnovu dobijenih podataka ESR spektralne analize i izračunatih vrednosti AA_{DPPH} i AA_{OH} može se zaključiti da kombuha napitak pripremljen od rtanjskog čaja, dodat u zapremini od 100 μL pokazuje najveću antioksidativnu aktivnost i u DPPH i u Fentonovom ispitivanom sistemu. Takođe, uočljivo je da čajni napici pripremljeni od rtanjskog čaja imaju visoke vrednosti i AA_{DPPH} i AA_{OH} , ali te vrednosti su niže u poređenju sa antioksidativnom vrednošću odgovarajućih kombuha napitaka (Slike 22 i 23). U svim ispitivanim uzorcima vrednosti AA_{DPPH} su veće u poređenju sa vrednostima AA_{OH} . Ove razlike su uslovljene: različitom polarnošću jedinjenja prisutnih u DPPH i Fentonovom sistemu, različitim konstantama brzine hemijskih reakcija između hidriksil, odnosno DPPH radikala i antioksidativnih jedinjenja, hemijskom različitošću model sistema za ispitivanje hidriksil i DPPH radikala.



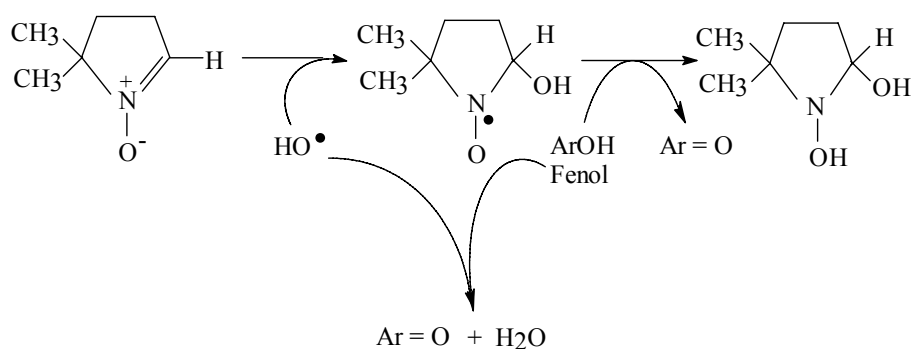
Slika 22. ESR spektralni graf prikazuje signal DPPH radikala u prisustvu prisustvu 100 μL kombuha napitka pripremljenog od rtanjskog čaja



Slika 23. ESR spektar DMPO-OH spin adukata Fentonovog model sistema u prisustvu 100 μL kombuha napitka pripremljenog od rtanjskog čaja

ESR spektralnom analizom je utvrđeno da čajni i kombuha napici pripremljeni od rtanjskog čaja imaju veće vrednosti antioksidativne aktivnosti i na DPPH i na hidriksil radikale (Tabela 16), u poređenju sa aktivnostima čajnih i kombuha napitaka pripremljenih od korena i herbe ehinacee (Tabela 15). Tako se maksimalna AA_{DPPH} (100%), odnosno AA_{OH} (90,63%) (Cvetković, 2003) postiže u prisustvu 150 μL kombuha napitka pripremljenog od herbe ehinacee, dok je za ovakvu sličnu aktivnost potrebna manja (100 μL) količina kombuha napitka od rtanjskog čaja (AA_{DPPH} =100%, odnosno AA_{OH} =98,12%).

U Fentonovom reakcionom sistemu u prisustvu spin trapa, hidriksil radikali mogu da reaguju i sa fenolnim jedinjenjima i sa DMPO. Pretpostavljeni reakcioni mehanizam u smeši fenolnih jedinjenja, hidriksil radikala i spin trapa DMPO, može se prikazati šematski:



Na osnovu rezultata HPLC analize kombuha napitaka od crnog čaja, čaja ehinacee i rtanjskog čaja (Tabela 17), može se zaključiti da su fenolna jedinjenja, tj. fenolne kiseline i flavonoidi, odgovorni za visoke vrednosti AA_{DPPH} i AA_{OH} .

Kurechi i saradnici (1983) navode da dominantnu ulogu za antioksidativno delovanje fenolnih jedinjenja (ArOH) ima prisustvo hidriksilne funkcionalne grupe. Može se, dakle, pretpostaviti da se mehanizam antioksidativnog delovanja ekstrakata bogatih

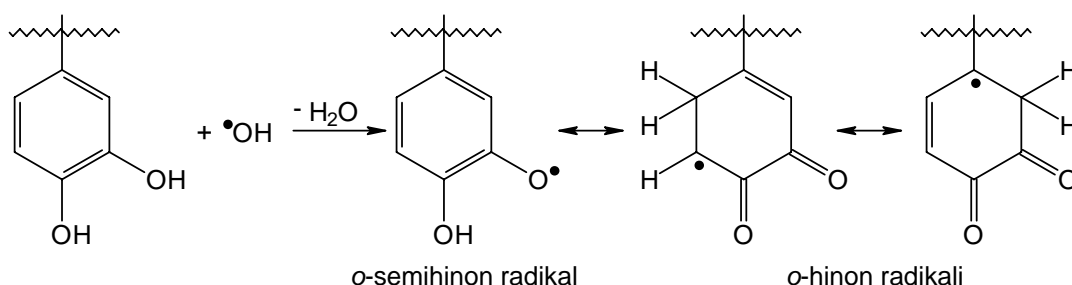
fenolnim jedinjenjima zasniva na njihovoj sposobnosti da otpuste H-atom uz nastajanje stabilnih aroksi radikala (ArO \cdot).

Tabela 17. Fenolna jedinjenja u različitim kombuha napicima

Fenolna jedinjenja (mg/mL)	Uzorak		
	<i>Kombuha - crni čaj</i>	<i>Kombuha - ehinacea</i>	<i>Kombuha - rtanjski čaj</i>
Galna kiselina	$9,81 \times 10^{-3}$	$2,21 \times 10^{-4}$	$3,16 \times 10^{-3}$
Kofein	$1,76 \times 10^{-1}$	$6,03 \times 10^{-4}$	$1,27 \times 10^{-2}$
Epigalokatehin (EGC)	$7,11 \times 10^{-3}$	$1,63 \times 10^{-3}$	$5,87 \times 10^{-4}$
Katehin	$2,01 \times 10^{-3}$	$1,37 \times 10^{-4}$	$8,15 \times 10^{-5}$
Epikatehin (EC)	$1,46 \times 10^{-3}$	$4,27 \times 10^{-3}$	$3,37 \times 10^{-4}$
Epigalokatehin galat (EGCG)	$9,92 \times 10^{-4}$	$9,92 \times 10^{-4}$	$1,22 \times 10^{-2}$
Epikatehin galat (ECG)	Nd	nd	nd
Katehin galat (CG)	$4,22 \times 10^{-3}$	nd	$1,28 \times 10^{-2}$

nd – nije detektovan.

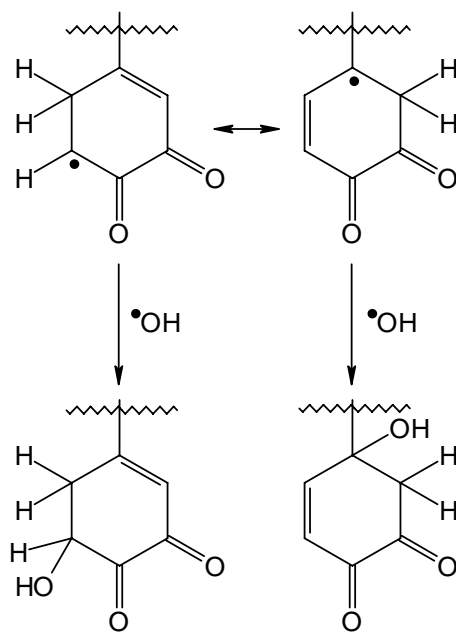
Kitagawa i saradnici (1992) navode da fenolna jedinjenja koja u svojoj strukturi sadrže veći broj hidriksilnih grupa vezanih za benzenov prsten, i to u o-položaju (kafena, hlorogenska, cikorna kiselina, tanini i dr.), imaju izraženije antioksidativno delovanje. Nakon predaje H-atoma nastaju stabilni o-semihinonski radikali (Slika 24):



Slika 24. Šematski prikaz antioksidativnog delovanja fenolnih jedinjenja na hidroksil radikale mehanizmom predaje H-atoma

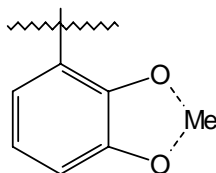
Fenoksi/semihinon-radikali stabilizuju svoju strukturu rezonancijom preko različitih mezomernih formi, uključujući hinonsku strukturu, zavisno od prisutnih supstituenata u molekulu (Milić i sar., 1998). Nastali fenoksi/semihinon-radikali teško podležu daljoj oksidaciji jer je konstanta brzine reakcije, između fenoksi, ili semihinon-radikala i molekuskog kiseonika mala, oko $10^5 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ s}^{-1}$.

Antioksidativna aktivnost fenolnih jedinjenja uslovljena je i "hvatanjem" hidroksil radikala ("skevindžer" efekat), pri čemu se formiraju proizvodi hinonske strukture OH-AR(=O) koji su stabilni i svojim nastankom uslovljavaju terminaciju reakcije oksidacije (Slika 25).



Slika 25. Šematski prikaz "skevindžer" efekta fenolnih jedinjenja

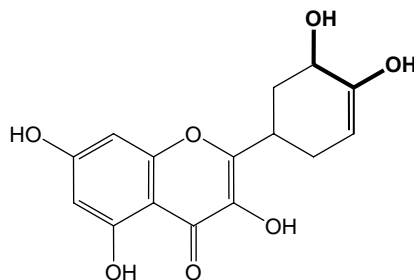
Veliki broj hidriksilnih grupa na benzenovom prstenu u molekulima hlorogenske, kafene i cikorne kiseline imaju sposobnost kompleksiranja gvožđe(II)-jona, čime je onemogućena Fentonova reakcija. Mehanizam građenja kompleksa fenolna kiselina-metalni jon (Slika 26) takođe doprinosi izraženom antioksidativnom efektu vodenih ekstrakata biljke *Echinacea purpurea*.



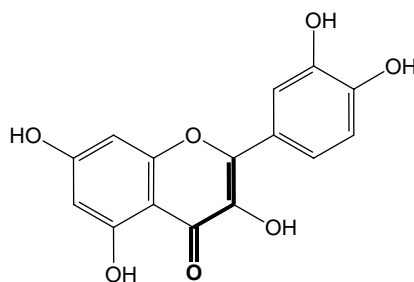
Slika 26. Šematski prikaz kompleksa fenolno jedinjenje/metalni jon

Prisustvo flavonoida, zasigurno značajno doprinosi opštem antioksidativnom statusu svih ispitivanih ekstrakata. Bors i saradnici (1990) navode da su najznačajniji elementi za antioksidativno delovanje flavonoida:

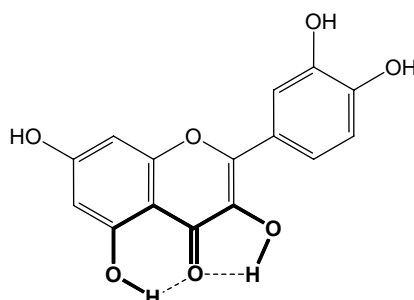
1. broj hidriksilnih grupa u B prstenu
2. *o*-dihidriksilne grupe B prstena



3. 2,3-dvostruka veza piranskog prstena u konjugaciji sa keto-grupom na C₄-atomu (zbog delokalizacije):



4. Hidriksilne grupe na položajima C₃ i C₅ kao "hvatači" slobodnih radikala, i njihova sposobnost stvaranja vodoničnih veza sa keto grupom,



Flavonoidi sa *o*-dihidriksil strukturom u B prstenu i 3- i/ili 5-OH grupama sa 4-okso funkcionalnom grupom u A i C prstenovima flavonola, i fenolnim kiselinama sa *o*-dihidriksil grupama mogu ispoljiti svoju antiradikalnu aktivnost i heliranjem jona metala u toku Fentonove reakcije, ili redukcijom gvožđa (Morel i sar., 1994)

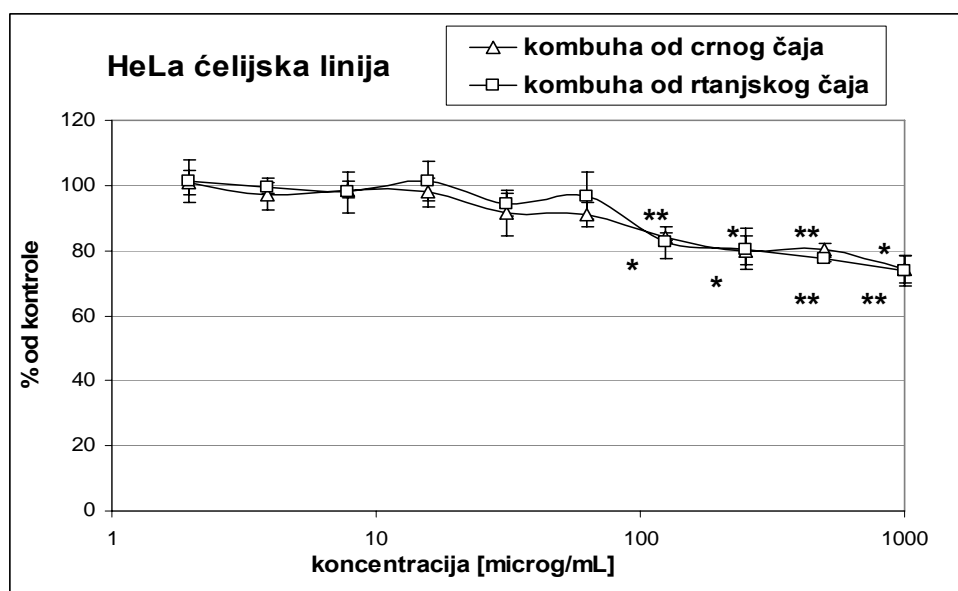
Pored fenolnih jedinjenja, koja su najodgovornija za AA_{DPPH} i za AA_{OH}, i drugi biomolekuli sigurno utiču na redukciju DPPH radikala, ili pojedinačnim ili sinergističkim efektom.

4.2.3. Antiproliferativna aktivnost čajnih i kombuha napitaka od crnog i rtanjskog čaja

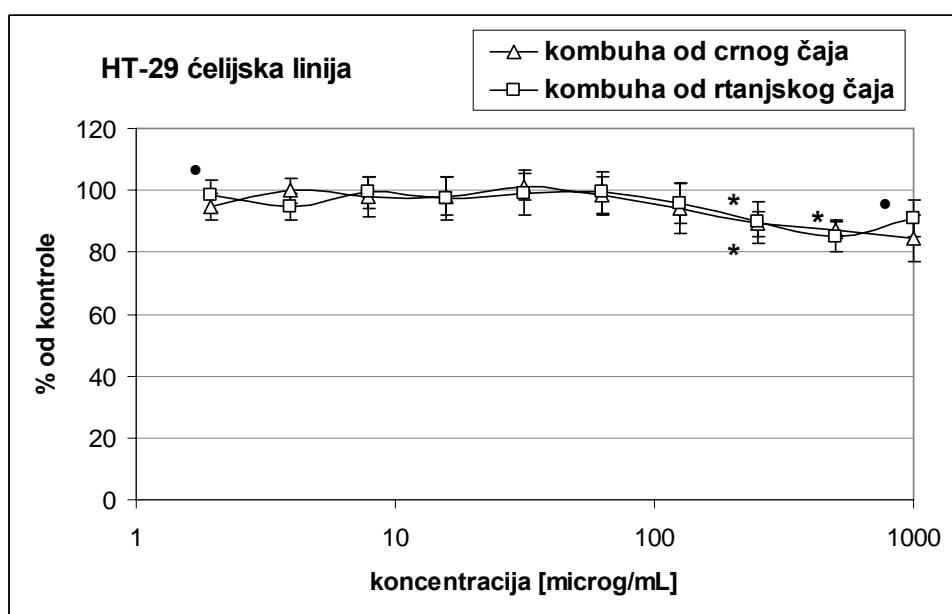
Antiproliferativna aktivnost kombuhe od crnog čaja (*Camelia sinensis* L.) i kombuhe od rtanjskog čaja (*Satureja montana* L) ispitana je na rast tri histološki različite ćelijske linije humanog kancera - HeLa (epitelni karcinom cerviksa), HT-29 (adenokarcinom debelog creva) i MCF-7 (adenokarcinom dojke). Antiproliferativna aktivnost je ispitana u opsegu masenih koncentracija 1,95-1000 µg/mL što odgovara opsegu konzumnih koncentracija kombuhe.

Kombuha napici od crnog i rtanjskog čaja su imali uticaj na rast ćelija u zavisnosti od ćelijske linije, ali nijedan uzorak nije pokazao efekat inhibicije od 50% (Slike 27-29).

Na HeLa ćelijskoj liniji oba uzorka kombuhe dostižu vrednost IC₂₀ pri koncentraciji oko 250 µg/mL (Slika 34). S druge strane, tradicionalna kombuha i napitak dobijen od rtanjskog čaja inhibiraju rast HT-29, odnosno MCF-7 ćelija za 15%, odnosno 10%, ali samo pri visokim koncentracijama (Slike 27 i 28).

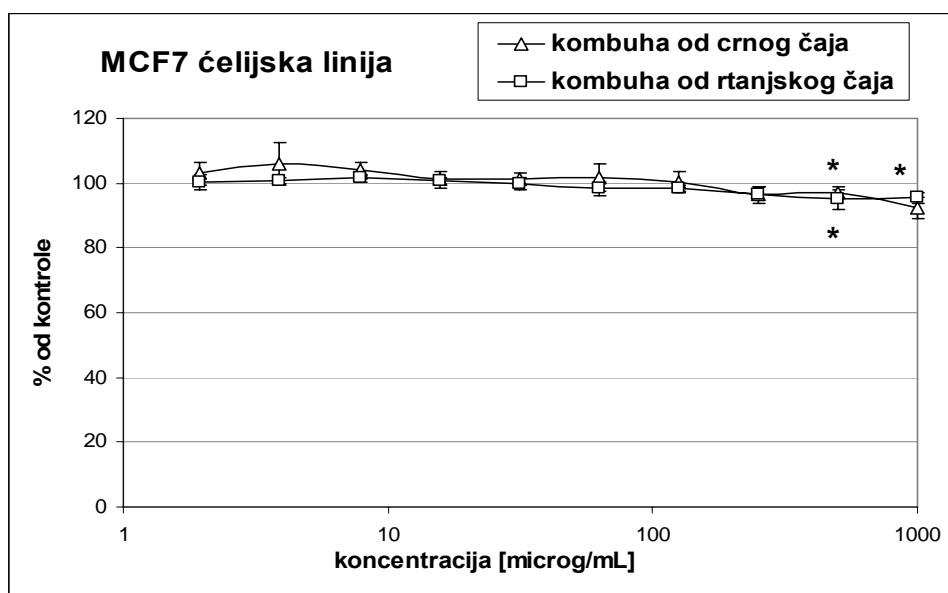


Slika 27. Antiproliferativna aktivnost kombuhe od crnog i rtanjskog čaja na HeLa ćelijskoj liniji (Prikazani podaci su $\bar{x}_{sr} \pm SD$ tri eksperimenta izvedena u kvadrilikatu; * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$; Studentov t-test, značajno različito u odnosu na kontrolu)



Slika 28. Antiproliferativna aktivnost kombuhe od crnog i rtanjskog čaja na HT-29 ćelijskoj liniji (Prikazani podaci su $\bar{x}_{sr} \pm SD$ tri eksperimenta izvedena u kvadrilikatu; * $p \leq 0,05$; Studentov t-test, značajno različito u odnosu na kontrolu; • $p \leq 0,05$, Studentov t-test, značajno različito između dve kombuhe).

Nisu zabeležene značajnije razlike u aktivnostima kombuha napitaka u odnosu na kontrolne uzorke za iste ćelijske linije. Razlike između kombuhe od crnog i rtanjskog čaja su bile statistički značajne ($p \leq 0,05$) samo u slučaju ćelijske linije HT-29 (Kombuha od crnog čaja je pokazala nešto veću antiproliferativnu aktivnost pri koncentracijama od 3,91 i 1000 µg/mL).



Slika 29. Antiproliferativna aktivnost kombuhe od crnog i rtanjskog čaja na MCF-7 ćelijskoj liniji (Prikazani podaci su $\bar{x}_{sr} \pm SD$ tri eksperimenta izvedena u kvadrilikatu. (* $p \leq 0,05$; Studentov t-test, značajno različito u odnosu na kontrolu).

U prethodnim istraživanjima HeLa ćelijska linija bila je najosetljivija na vodeni ekstrakt *Satureja montana* L. (IC_{20} i IC_{50} vrednosti su postignute pri koncentracijama od 400 $\mu\text{g/mL}$ i 840 $\mu\text{g/mL}$) (Četojević-Simin i sar., 2004). Ovo bi moglo da sugerise na postojanje aktivnijih antiproliferativnih komponenti u kombuhi dobijenoj od *Satureja montana* L. u poređenju sa samim čajnim napitkom. Vodeni ekstrakti *Satureja montana* pokazali su antiproliferativnu aktivnost na HeLa i HT-29 ćelije pri visokim koncentracijama, međutim pri nižim koncentracijama oni indukuju ćelijsku proliferaciju. Vodeni ekstrakti rtanjskog čaja su čak stimulisali rast MCF7 ćelija u celokupnom opsegu ispitivanih koncentracija, verovatno zbog prisustva fitoestrogena ili faktora koji stimulišu rast (Četojević-Simin i sar., 2004). Poznato je da genistein, prirodni izoflavonski fitoestrogen, pri niskim koncentracijama stimuliše rast estrogen zavisne ćelijske linije MCF7 (Fioravanti i sar., 1998; Constantinou i sar., 1998). Kombuha napici nisu pokazali stimulatívni efekat na proliferaciju ispitanih ćelijskih linija. Nepostojanje razlike u antiproliferativnoj aktivnosti kombuha napitaka od crnog i rtanjskog čaja na svakoj pojedinačnoj ćelijskoj liniji ukazuje na prisustvo iste aktivne komponente (poput sirćetne kiseline), dok razlike dobijene na histološki različitim ćelijskim linijama mogu biti objašnjene različitim zaštitnim osobinama ispitivanih ćelijskih linija. Neki autori navode da su ćelijski mehanizmi koji kontrolišu gensku ekspresiju RON-a disfunkcionalni u ćelijama karcinoma kolona i dojke (Chen i sar., 2000) što dovodi do povećane zaštite od ispitivanih kombuha u ovim ćelijama. RON je član MET proto-onkogene familije i visoko je ekspimiran u HT-29 ćelijskoj liniji, ali ne i u normalnom epitelu debelog creva (Montero-Julian i sar., 1998), ni u mnogim epitelnim tumorskim ćelijama (Wang i sar., 1996). Visoka ekspresija RON-a je takođe uočena u tkivu humanih primarnih karcinoma dojke i ćelijskim linijama karcinoma dojke (Maggiore i sar., 1998).

4.3. Optimizacija podloge za kultivaciju čajne gljive

Utvrđivanje optimalnog sadržaj saharoze i crnog čaja u podlozi za kultivaciju čajne gljive je veoma važno prilikom projektovanja procesa kombuha fermentacije. U literaturi postoje različiti podaci o potrebnim količinama saharoze i crnog čaja u podlogama za kultivaciju koje obezbeđuju uspešnu fermentaciju, ali u tom smislu nisu određene minimalne vrednosti izvora ugljenika i azota. Definisane optimalne količine saharoze i crnog čaja je potrebno i sa aspekta standardizacije podloge za kultivaciju čajne gljive, što je jedan od osnovnih zahteva koji se postavljaju pred komercijalizacijom i registracijom kombuhe kao terapijskog sredstva, ili funkcionalnog napitka.

4.3.1. Izvor C atoma

Tradicionalni izvor ugljenika u podlozi za kultivaciju čajne gljive je saharoza. Pregledom literaturnih podataka može se konstatovati da je koncentracija saharoze u podlozi za kultivaciju čajne gljive obično između 50 i 100 g/L (Blanc, 1996; Liu i sar., 1996; Sreeramulu i sar., 2000). Delovanjem invertaze kvasaca ovaj tradicionalni izvor ugljenikovih jedinjenja u podlozi za kultivaciju se hidrolizuje na glukozu i fruktozu, koje ćelije kvasaca i bakterija sirćetnog vrenja metabolišu.

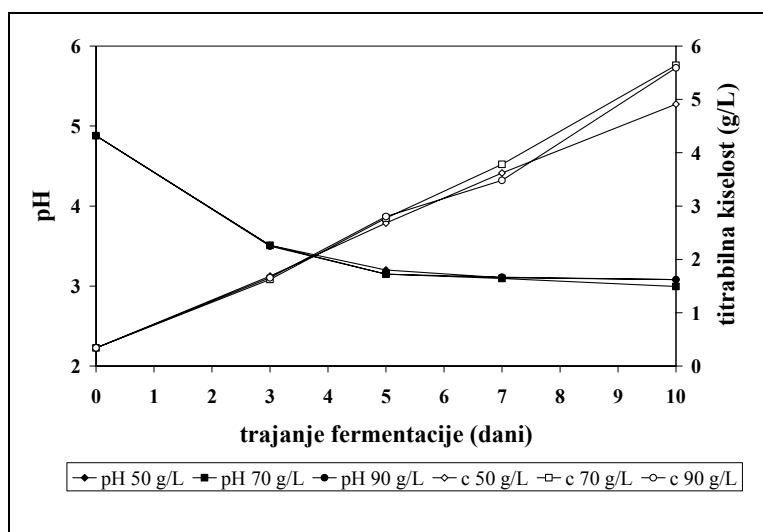
Da bi se ispitao uticaj različitih koncentracija saharoze u podlozi za kultivaciju čajne gljive na dužinu trajanja fermentacije, radna kultura je gajena na podlogama sa različitim količinom saharoze (50, 70 i 90 g/L). Za inokulaciju je korišćena fermentisana tečnost iz prethodne kultivacije (maja) koja je u količini od 10% (v/v) dodata podlogama za kultivaciju. Proces je izveden u staklenom sudu (cilindru) ukupne zapremine od 13 L ($D=180$ mm), sa zapreminom podloge od 5, 7,5 i 10 L, što je dalo različite vrednosti faktora $V_{\text{suda}}/V_{\text{podloge}}$. Paralelno je fermentacija izvedena i pod uslovima koji su uobičajeni za kultivaciju čajne gljive u kućnim uslovima - u sudu ukupne zapremine 5 L (Slika 10), sa zapreminom podloge od 3 L ($V_{\text{suda}}/V_{\text{podloge}}=1,66$) koja je imala 70 g/L saharoze. Pre same inokulacije, za maju su određene osnovne hemijske i mikrobiološke karakteristike - broj ćelija kvasaca i bakterija sirćetnog vrenja je bio reda veličine 10^6 ćelija/mL, a titrabilna kiselost oko 4 g/L.

Slika 30 prikazuje promene vrednosti pH i titrabilne kiselosti tokom fermentacije podloga (zapremina podloge 5 L) sa različitim količinom saharoze. Tokom procesa nisu zabeležena veća odstupanja u vrednostima pH u podlogama sa različitim koncentracijama saharoze, dok su značajnije razlike u titrabilnoj kiselosti registrovane nakon petog dana procesa. Na kraju fermentacije, podloga sa početnom količinom saharoze od 50 g/L, je za 0,7 g/L imala manje ukupnih kiselina u poređenju sa druge dve podloge, čija je titrabilna kiselost iznosila oko 5,6 g/L. Titrabilna kiselost napitak koji je dobijen pod tradicionalnim uslovima kultivacije je na kraju fermentacije takođe iznosila 5,6 g/L.

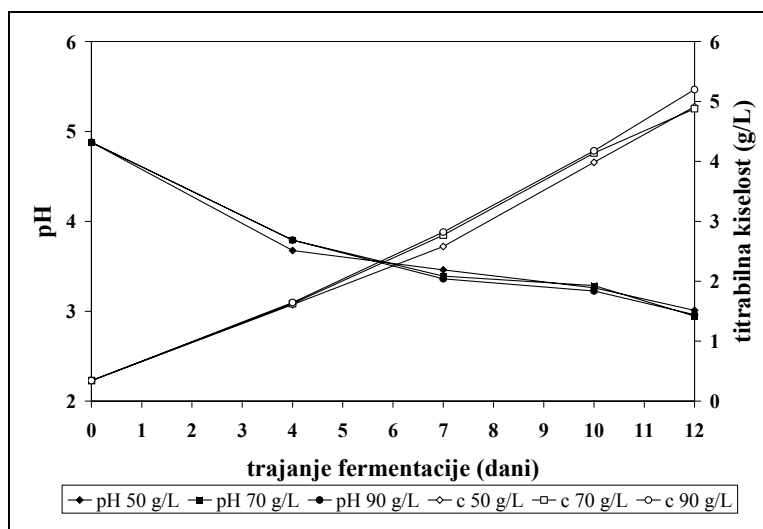
Tokom fermentacije 7,5 L zaslađenog čaja, razlike u količini kiselina u fermentisanoj tečnosti sa različitim udelom saharoze postaju značajnije između četvrtog i sedmog dana procesa (Slika 31). Na kraju procesa najveći sadržaj kiselina bio je u podlozi sa 90 g/L saharoze - 5,2 g/L, a nešto niži u podlogama sa 50 i 70 g/L saharoze - za 0,3 g/L. Optimalnu konzumnost kiselost od 3,5-4 g/L kombuha napici su dostigli između sedmog i desetog dana fermentacije.

Pored činjenice da se veća kiselost dobija u podlozi sa 90 g/L saharoze, do interesantnih zapažanja se dolazi poređenjem efekta zapreminskog udela podloge u sudu za fermentaciju. Očigledno je da se povećavanjem zapreminskog udela podloge u sudu za fermentaciju značajnije produžava proces kombuha fermentacije. Tako proces u sudu sa zapreminom podloge 10 L, tj. pri odnosu $V_{\text{suda}}/V_{\text{podloge}}=1,3$ (Slika 31), kasni za preko dva dana u odnosu na fermentaciju u istom sudu, pri odnosu $V_{\text{suda}}/V_{\text{podloge}}=1,73$. Sa slike 18 se

vidi da je najveća kiselost od 5,21 g/L ostvarena u podlozi sa 90 g/L saharoze, nakon četrnaest dana fermentacije.



Slika 30. Promene pH i titrabilne kiselosti fermentisane tečnosti ($V_{\text{podloge}}=5$ L; $V_{\text{suda}}/V_{\text{podloge}}=2,6$) tokom kultivacije čajne gljive

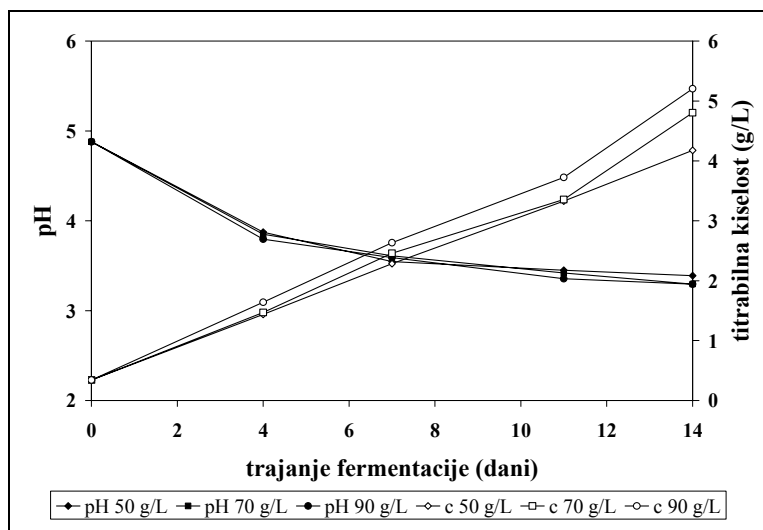


Slika 31. Promene pH i titrabilne kiselosti fermentisane tečnosti ($V_{\text{podloge}}=7,5$ L; $V_{\text{suda}}/V_{\text{podloge}}=1,73$) tokom kultivacije čajne gljive

Ukoliko se uporedi vreme potrebno da se postigne optimalna kiselost fermentisane tečnosti od oko 4 g/L u sudovima sa različitim udelom podloge, uočava se da povećanje udela podloge u sudu za fermentaciju dovodi do produženja procesa (Tabela 18). Tradicionalnim postupkom, u kontrolnoj boci gde je $V_{\text{suda}}/V_{\text{podloge}}=1,66$ i sa količinom saharoze od 70 g/L, je za dobijanje napitka potrebno sedam dana. Za dobijanje napitka željene kiselosti fermentacijom 7,5 L podloge u sudu od 13 L potrebno je oko devet dana, a povećanjem zapremine podloge na 10 L proces se produžava na više od jedanaest dana.

U literaturi nema podataka o uticaju efektivne zapremine podloge na tok i dužinu trajanja kombuha fermentacije. Uz to, nema ni podataka o geometrijskim karakteristikama sudova za fermentaciju, koji takođe imaju uticaja na dužinu trajanja

procesa. Sve ovo treba imati na umu kada se upoređuju podaci o sadržaju kiselina u fermentisanoj tečnosti iz različitih literaturnih izvora.



Slika 32. Promene pH i titrabilne kiselosti fermentisane tečnosti ($V_{\text{podloge}}=10$ L; $V_{\text{suda}}/V_{\text{podloge}}=1,3$) tokom kultivacije čajne gljive

Tabela 18. Promene titrabilne kiselosti (g/L) tokom kultivacije čajne gljive u podlogama sa različitim sadržajem saharoze

Sadržaj saharoze (g/L)	Zapremina podloge (L)	Trajanje fermentacije (dani)		
		7	10	14
50	5	3,62	4,91	-
	7,5	2,77	4,14	-
	10	2,29	-	4,18
70	5	3,78	5,64	-
	7,5	2,77	4,14	-
	10	2,46	-	4,81
90	5	3,48	5,59	-
	7,5	2,82	4,18	-
	10	2,64	-	5,21

Sievers i saradnici (1995) su za fermentaciju jednog litra podloge sa početnom količinom saharoze od 70 g/L koristili bocu ukupne zapremine od 3 L ($D=17$ cm), što daje $V_{\text{suda}}/V_{\text{podloge}}=3$. Uprkos visokoj, tj. povoljnoj vrednosti odnosa dve zapremine, kiselost fermentisane tečnosti u radu navedenih autora je bila manja, u odnosu na rezultate predstavljene slikama 30-32. Ovakvu rezultati se se mogu objasniti razlikama u fiziološkoj aktivnosti primenjenih radnih kultura.

Blanc (1996) je kombuha fermentaciju 0,25 L podloge, sa početnih 70 g/L saharoze, izveo u Roux boci. Uprkos tome što se korišćenjem Roux boce obezbeđuje velika dodirna površina između atmosferskog kiseonika i podloge za kultivaciju, što stimuliše produktivnost radne kulture, odnosno bakterija sirćetnog vrenja, sadržaj kiselina u fermentisanoj tečnosti se ne razlikuje značajno u odnosu na vrednosti iznete u ovom radu (bez obzira na razlike u zapremini medijuma za kultivaciju).

Chen i Liu (2000) su proces vodili u sudovima ukupne zapremine od 0,5 L, sa količinom zaslađenog čaja od 0,25 L ($V_{\text{suda}}/V_{\text{podloge}}=2$) i početnom količinom saharoze od

100 g/L. Rezultati su pokazali da se sadržaj titrabilnih kiselina od skoro 8 g/L ostvaruje nakon 10 dana procesa. Kako pokazuju rezultati (Slike 30-32) maksimalna kiselost od 5,66 g/L se postiže za deset dana kultivacije podloga sa 70 i 90 g/L saharoze u sudu ukupne zapremine 5 L i $V_{\text{suda}}/V_{\text{podloge}}=2,6$. Verovatno da veći udeo podloge u sudu zapremine 5 L i nepovoljniji odnos V_{suda} i V_{podloge} utiče na produženje procesa fermentacije.

Sreeramulu i saradnici (2000) su fermentaciju podloge sa 100 g/L saharoze i 25 g/L glukoze izveli uz faktor $V_{\text{suda}}/V_{\text{podloge}}=0,75/0,4=1,875$, pri čemu su nakon osam dana kultivacije u fermentisanoj tečnosti registrovali količinu sirćetne kiseline nešto manju od 4 g/L. Ovaj rezultat je uporediv sa podacima koje prikazuje slika 31, a odnose se na transformaciju podloge sa 70 g/L, pri vrednosti $V_{\text{suda}}/V_{\text{podloge}}=1,73$. Prisustvo glukoze u podlozi za kultivaciju sigurno doprinosi ubrzanju procesa, imajući u vidu da ćelije bakterija sirćetnog vrenja glukozu, za razliku od saharoze, mogu direktno da metabolišu.

Malbaša i saradnici (2006) su ispitali uticaj povećanja zapremine reaktora na kombuha fermentaciju, pri čemu su proces vodili u sudovima zapremine 0,5, 1, 5 i 10 L. U navedenim reaktorima je zapremina podloge bila redom 0,4, 0,8, 4 i 8 L. Sudovi su bili sličnih geometrijskih karakteristika, a odnos $V_{\text{suda}}/V_{\text{podloge}}$ je iznosio 0,8. Autori su zaključili da se trajanje kombuha fermentacije produžuje sa povećanjem veličine reaktora, pri čemu je kao kritični parametar procesa definisana vrednost pH od 3,8. U sudu ukupne zapremine 10 L (uz inokulaciju sa 10% maje) sadržaj glavnih metabolita (titrabilna kiselost + etanol) dostiže vrednost od 3 g/L nakon nepunih 8 dana procesa. Razlog dužeg trajanja fermentacije u slučaju istraživanja Malbaše i saradnika, u poređenju sa rezultatima koji su izneti u ovoj doktorskoj disertaciji, je najverovatnije u nepovoljnijem odnosu faktora $V_{\text{suda}}/V_{\text{podloge}}$ od 0,8.

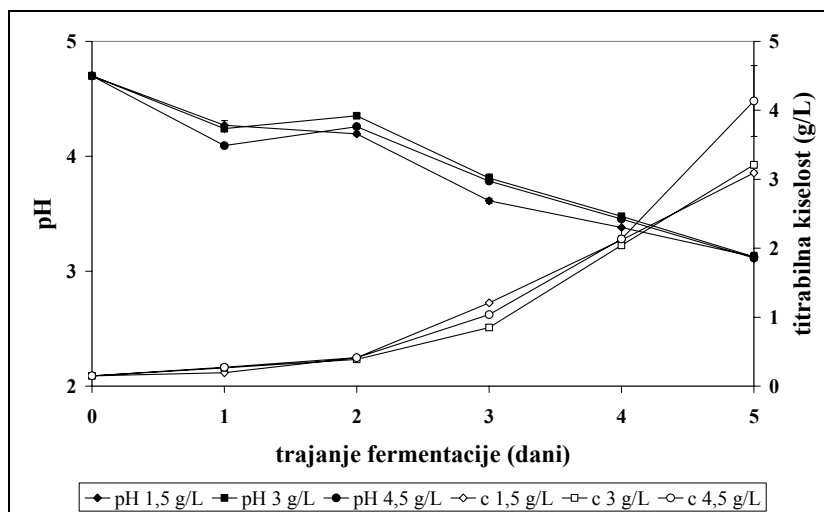
Izvesno je da porast zapremine supstrata u reaktoru za kultivaciju čajne gljive, tj. smanjenje faktora $V_{\text{suda}}/V_{\text{podloge}}$, vodi smanjenju količine sintetisanih kiselina i produženju procesa fermentacije. Moguće je da povećanjem zapremine podloge, pri statičnim uslovima kultivacije, dolazi do smanjenja količine rastvorenog kiseonika po jedinici zapremine podloge, kao jednog od limitirajućih faktora kombuha fermentacije.

4.3.2. Izvor N atoma

Tradicionalna podloga za kultivaciju čajne gljive je zaslađeni crni čaj (infuzum osušenih listova *Camellia sinensis* L.). Crni čaj obezbeđuje azotna jedinjenja (ali i druge nutritivne faktore) koja su neophodna za rast i razmnožavanje mikroorganizama čajne gljive. Po literaturnim podacima i uputstvima za pripremu kombuhe uobičajena koncentracija crnog čaja (računato na suhu masu) u podlogama za kultivaciju su 3-5 g/L (Liu i sar., 1996; Teoh i sar., 2004; Chu i Chen, 2006; Jayabalan, 2007).

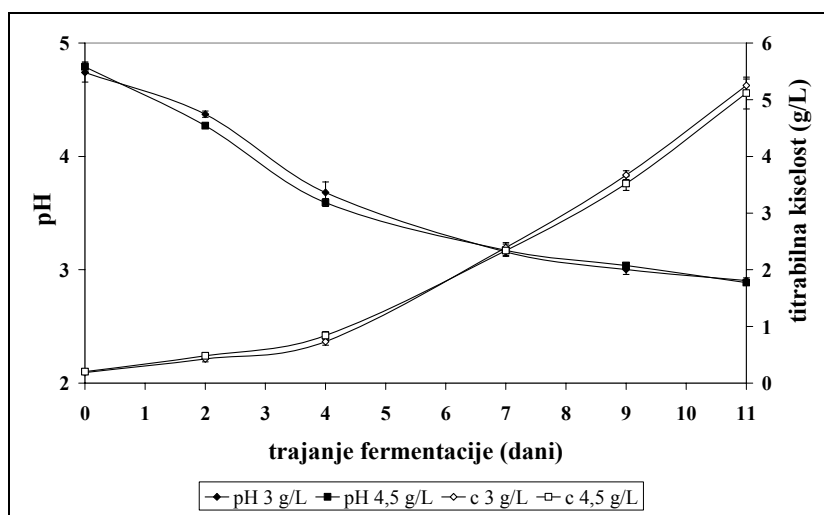
Da bi ispitali uticaj količine crnog čaja na proces fermentacije pripremljene su podloge sa sadržajem čaja od 1,5, 3 i 4,5 g/L. Fermentacija je izvedena u sudovima ukupne zapremine 0,72 L ($V_{\text{suda}}/V_{\text{podloge}}=2,42$) i 5 L ($V_{\text{suda}}/V_{\text{podloge}}=1,66$). Za inokulaciju je iskorišćena kombuha iz prethodne kultivacije koja je podlogama za kultivaciju dodata u količini od 10% (v/v); titrabilna kiselost inokuluma je bila 4,45 g/L, broj ćelija kvasaca u inokulumu 7,36 log cfu/mL, a broj ćelija bakterija sirćetnog vrenja 7,32 log cfu/mL. Sadržaj saharoze u podlogama za kultivaciju je bio 70 g/L.

Tokom prva dva dana fermentacije podloga sa različitim količinama crnog čaja nisu zabeležene značajnije razlike u titrabilnoj kiselosti (Slika 33); izvesne razlike zabeležene su nakon trećeg dana kultivacije. Na kraju procesa fermentacije u sudu zapremine 0,72 L najveća kiselost (4,12 g/L) je zabeležena za kombuhu dobijenu transformacijom podloge sa 4,5 g/L crnog čaja; kombuha dobijena od podloge sa 1,5 g/L crnog čaja je imala titrabilnu kiselost od 3,09 g/L, a kombuha sa početnih 3 g/L čaja - 3,2 g/L.



Slika 33. Promene vrednosti pH i titrabilne kiselosti podloga u bocama $V_{uk}=0,72$ L tokom kombuha fermentacije ($V_{suda}/V_{podloge}=2,42$)

Slika 34 prikazuje promene vrednosti pH i titrabilne kiselosti podloga sa 3 i 4,5 g/L crnog čaja u bocama od 5 L, pri čemu je zapremina podloga bila 3 L ($V_{suda}/V_{podloge}=1,66$). Za inokulaciju je korišćena kombuha iz prethodne kultivacije titrabilne kiselosti 2,87 g/L, sa brojem ćelija kvasaca 7,19 log cfu/mL i brojem ćelija bakterija sirćetnog vrenja 7,14 log cfu/mL.

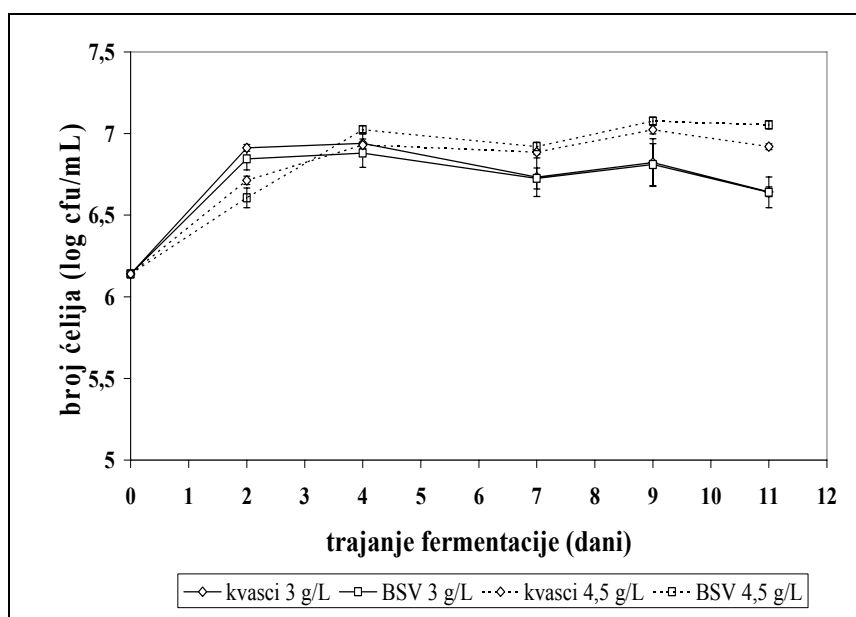


Slika 34. Promene vrednosti pH i titrabilne kiselosti podloga tokom kultivacije u bocama zapremine 5 L ($V_{suda}/V_{pod}=1,66$)

Tokom fermentacije pod navedenim uslovima (Slika 34) nisu zabeležene značajnije razlike u vrednostima pH i titrabilne kiselosti podloga; značajniji porast kiselosti je zabeležen nakon četvrtog dana fermentacije, verovatno nakon faze početnog prilagođavanja čajne gljive na uslove sredine i akumulacije etanola. Od četvrtog do jedanaestog dana fermentacije postoji gotovo linearna zavisnost titrabilne kiselosti od

vremena trajanja fermentacije. Optimalnu kiselost napici dostižu nakon devet dana procesa, nezavisno od početne koncentracije čaja u medijumu za kultivaciju čajne gljive.

Promene mikrobioloških parametara procesa – ukupnog broja ćelija kvasaca i bakterija sirćetnog vrenja tokom fermentacije podloga sa 3 i 4,5 g/L crnog čaja ($V_{\text{suda}}=5$ L) su u skladu sa rezultatima promene titrabilne kiselosti (Slika 35). Za obe koncentracije crnog čaja, tokom prvih četiri dana fermentacije, došlo je do porasta broja ćelija kvasaca i bakterija, nakon čega se broj ćelija neznatno menjao. I pored manjeg pada broja ćelija u periodu između četvrtog i sedmog dana, odnosno devetog i jedanaestog, broj ćelija kvasaca i bakterija sirćetnog vrenja za sve vreme procesa nije bio manji od 10^6 cfu/mL što je važno za efikasnost procesa fermentacije. Takođe, nisu zabeležene ni značajnije razlike u broju ćelija kvasaca i bakterija sirćetnog vrenja u podlogama sa različitim početnim koncentracijama crnog čaja.



Slika 35. Ukupan broj ćelija kvasaca i bakterija sirćetnog vrenja tokom kultivacije čajne gljive na podlogama sa 3 i 4,5 g/L crnog čaja ($V_{\text{suda}}/V_{\text{pod}}=1,66$)

Sreeramulu i saradnici (2000) su za kultivaciju čajne gljive koristili podlogu sa 5 g/L crnog čaja, 100 g/L saharoze i 25 g/L glukoze. Ukupno 400 mL podloge je razliveno u staklenu bocu zapremine od 750 mL ($V_{\text{suda}}/V_{\text{podloge}}=1,875$). Inokulacija je obavljena sa 5 g čajne gljive koja je prethodno gajena u istom medijumu četrnaest dana. Nakon osam dana fermentacije je sadržaj sirćetne kiseline bio nešto manji od 4 g/L. Broj ćelija bakterija sirćetnog vrenja je na početku procesa bio 10^4 cfu/mL, a kvasaca 10^2 cfu/mL. Nakon četiri dana fermentacije broj ćelija kvasaca i bakterija dostiže vrednosti od 10^7 cfu/mL. Tokom naredna dva dana je broj ćelija kvasaca naglo pao na 10^4 cfu/mL, a broj bakterija na 10^6 cfu/mL. Broj bakterija sirćetnog vrenja se, za razliku od kvasaca, tokom četrnaest dana kultivacije održavao manje-više na nivou od 10^6 cfu/mL.

Jayabalan i saradnici (2007) je za kultivaciju čajne gljive koristio podlogu sa čak 12 g/L crnog čaja i 100 g/L saharoze; inokulaciju podloge je obavio sa 3% (m/v) fermentacione tečnosti prethodne kultivacije. Za fermentaciju je koristio staklene posude ukupne zapremine 0,5 L, što je sa zapreminom podloge od 0,2 L dalo povoljniji odnos $V_{\text{suda}}/V_{\text{podloge}}=2,5$. Nakon šest dana fermentacije sadržaj sirćetne kiseline u fermentisanoj tečnosti je bio 1,5 g/L, nakon devet dana 2,44, a nakon dvanaest dana 4,72 g/L. Ukupan

broj ćelija kvasaca i bakterija sirćetnog vrenja u podlozi je tokom devet dana fermentacije konstantno rastao do vrednosti od 10^7 , odnosno 10^4 cfu/mL. Nakon toga zabeleženo je smanjenje broja ćelija kvasaca i bakterija do osamnaestog dana, što autori objašnjavaju niskom vrednošću pH sredine i kiselinskim šokom, nedostatkom hranljivih materija u podlozi i porastom anaerobioznosti sredine. Sporiji proces transformacije podloge u istraživanju Jayabalana i saradnika odnosu na rezultate koji su prikazani slikama 30 i 31, uprkos većoj početnoj količini crnog čaja u podlozi za kultivaciju i povoljnijem koeficijentu efektivne zapremine, se može objasniti manjim početnim broj ćelija čajne gljive u radu navedenih autora. Na osnovu ovoga se može zaključiti da sadržaj čaja nije odlučujući za efikasnu fermentaciju zaslađenog čaja čajnom gljivom, već da su fiziološke karakteristike kombuha kulture i inicijalni broj ćelija u podlozi mnogo značajniji.

4.4. Specifična međufazna površina kao ključni parametar scale-up modela kombuha fermentacije

Kombuha se obično priprema fermentacijom zaslađenog crnog čaja u staklenim sudovima zapremine manje od 0,5 L (Steinkraus i sar., 1996; Teoh i sar., 2004) do 1 L tečnosti (Sreeramulu i sar., 2000; Chen i Liu, 2000). Inokulacija podloge se izvodi fermentisanom tečnošću prethodne kultivacije, koja se u količini od 10-20% (v/v) dodaje podlozi, ili celuloznom pelikulom. Supstrat se inkubira statično pod aerobnim uslovioma 10-12 dana na temperaturi od 20-28⁰C (Reiss, 1994; Sievers i sar., 1995; Blanc, 1996). U dostupnoj naučnoj i patentnoj literaturi nema podataka da je fermentaciji izvedena na nivou od nekoliko desetina ili stotina litara fermentisane tečnosti.

Pretpostavka primene rezultata dobijenih istraživanjem na laboratorijskom nivou na velike sisteme je obezbeđivanje odgovarajućeg stepena sličnosti između malih i velikih zapremina. Za proizvodnju kombuhe na poluindustrijskom ili industrijskom nivou neophodan je scale-up procesa fermentacije. U literaturi se može naći vrlo ograničen broj informacija vezanih za ovu problematiku (Malbaša i sar., 2006).

Projektovanje fermentacionog procesa sa laboratorijskog nivoa na komercijalni je izazov zbog teškoća u definisanju faktora koji utiču na scale-up procesa tokom kultivacije (Hsu i Wu, 2002). Kao i u drugim fermentacionim procesima i u kombuha fermentaciji od ključnog značaja je obezbediti optimalne uslove za rast, razmnožavanje i metaboličku aktivnost radne kulture. Kako je u prethodnom delu ovog rada pokazano, količine izvora ugljenika i azota nisu presudne za proces fermentacije i početne koncentracije saharoze i crnog čaja u podlozi za kultivaciju se mogu kretati u relativno širokim granicama. Ono što kombuha fermentaciju čini specifičnom je priroda odnosa između bakterija sirćetnog vrenja i kvasaca tokom fermentacije koja do danas nije potpuno definisana.

Imajući u vidu prirodu zajednice kvasaca i bakterija sirćetnog vrenja u čajnoj gljivi i nemogućnost da bakterije sirćetnog vrenja usvoje saharozu iz podloge za kultivaciju, limitirajući faktor procesa je invertazna aktivnost kvasaca i njihova fermentativna aktivnost. Od brzine hidrolize saharoze i produkcije etanola, zavisi i brzina celokupnog procesa kombuha fermentacije. Kako su rezultati prethodnih istraživanja pokazali (Cvetković, 2003) kvasci lokalne čajne gljive svojom invertaznom i fermentativnom aktivnošću tokom početnog perioda fermentacije obezbeđuju dovoljnu količinu monosaharida i etanola koji su neophodni bakterijama sirćetnog vrenja. Zato je fiziološka aktivnost bakterija sirćetnog vrenja, kao striktno aerobnih organizama, tokom kombuha fermentacije limitirana brzinom transfera vazdušnog kiseonika u podlogu za kultivaciju. Pod statičnim uslovima količina rastvorenog kiseonika u podlozi zavisi isključivo od veličine gornje površine i ukupne zapremine medijuma. Ova zavisnost može biti izražena

preko specifične međufazne površine (a), kao kinetičkog faktora koji se definiše odnosom poprečnog preseka reaktora i zapremine tečne faze. Specifična međufazna površina je povezana i sa drugim kinetičkim faktorima kao što su koeficijent prenosa mase i koncentracija rastvorenog kiseonika (Nielsen i sar., 2003).

Na osnovu iznetih činjenica, specifična međufazna površina je odabrana kao ključna promenljiva za scale-up kombuha fermentacije. Za pretpostaviti je da dva reaktora koji imaju iste vrednosti specifične međufazne površine (a), uprkos razlikama u veličini, obezbeđuju podjednake uslove za prenos mase kiseonika i identično trajanje procesa.

Da bi se došlo do dovoljnog broja podataka za izvođenje modela i njegovu verifikaciju kombuha fermentacije su izvedene u šest reaktora različite zapremine (tri reaktora za izvođenje modela i tri za njegovu verifikaciju) čije su karakteristike date tabelom 11. Reaktori su punjeni različitom zapreminom podloge (zaslađeni crni čaj) pripremljene na uobičajen način. U tabeli 19 su prikazane i vrednosti specifične međufazne površine za pojedine reaktore. Uzorkovanje fermentisane tečnosti zbog određivanja vrednosti pH i titrabilne kiselosti je obavljeno svakog drugog ili trećeg dana.

Tabela 19. Karakteristike sudova za fermentaciju i opseg nezavisno promenljivih

	<i>Geometrijske karakteristike sudova</i>		<i>Zapremina tečnosti (L)</i>	<i>Opseg nezavisno promenljivih</i>	
	<i>Zapremina suda (L)</i>	<i>Prečnik, (cm)</i>		<i>Trajanje fermentacije (dani)</i>	<i>Specifična međufazna površina (cm⁻¹)</i>
Male boce	0,72	8	0,33	9	0,152
Uobičajene boce	5	16	4,18	9	0,0481
Velike boce	10	19,5	5,5	9	0,0543
			6,8	9	0,0438
			8,08	12	0,0369
			8,25	12	0,0362
Cilindri	13	18	5,5	9	0,0462
			8,25	12	0,0308
			11	14	0,0231
Mali reaktor	25	30	11	9	0,0642
			13,8	9	0,051
			16,5	11	0,0428
			19,25	14	0,0367
Veliki reaktor	110	63	90	13	0,0346

4.4.1. Glavne karakteristike upotrebljenih inokuluma

Za inokulaciju zaslađenog čaja je korišćena fermentisana tečnost iz prethodnog ciklusa kultivacije (3 L zaslađenog čaja u sudu ukupne zapremine 5 L inokuliran pelikulom čajne gljive). Prosečne vrednosti hemijskih (pH i titrabilna kiselost) i mikrobioloških (broj ćelija kvasaca i bakterija sirćetnog vrenja) parametara za sve primenjene inokulume su prikazane tabelom 20. Prosečne vrednosti pH i titrabilne kiselosti upotrebljenih inokuluma od 3 i 4,11 g/L (nakon sedam dana kultivacije) odgovaraju rezultatima koje su dobili drugi autori. Liu i saradnici (1996) su za fermentisanu tečnost nakon šest dana dobili vrednost pH od 3,5 i sadržaj sirćetne kiseline od 4 g/L, dok su Sievers i saradnici (1995) napitak iste kiselosti dobijali nakon devet dana fermentacije. Broj fiziološki aktivnih ćelija kvasaca i bakterija sirćetnog vrenja u inokulumima je bio 6,62 log cfu/mL, što takođe približno

Tabela 20. Osnovne karakteristike primenjenih inokuluma ($\bar{x}_{sr} \pm SD$)

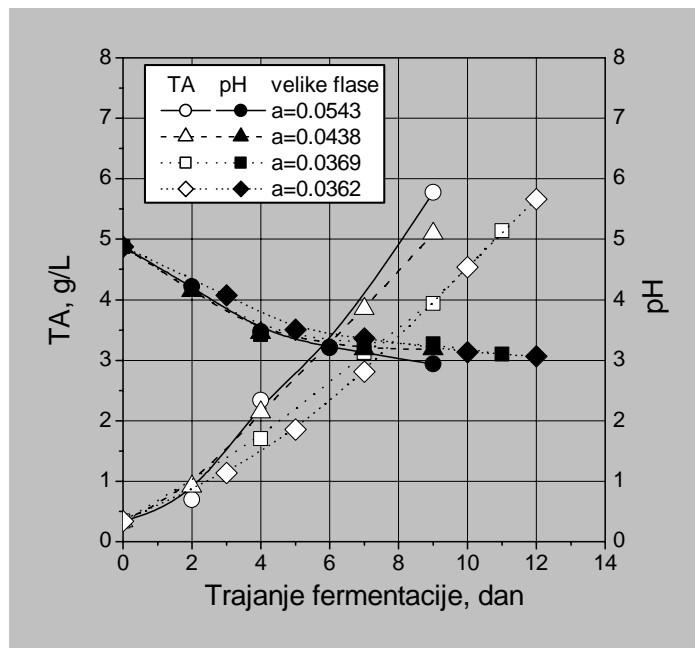
pH	Titribilna kiselost (g/L)	Broj ćelija (log cfu/mL)	
		kvasci	BSV
3,04 ± 0,14	4,11 ± 0,76	6,62 ± 0,45	6,62 ± 0,39

odgovara mikrobiološkim karakteristikama fermentisane tečnosti objavljenim od strane drugih istraživača. Na primer, Sreeramulu i saradnici (2000) su dobili 4,48 log cfu/mL ćelija kvasaca i 5,3 log cfu/mL bakterija sirćetnog vrenja u fermentisanoj tečnosti nakon šest dana kultivacije čajne gljive, dok su objavljeni rezultati Chen i Liu (2000) bili 7,55 i 4,5 log cfu/mL. Teoh i saradnici (2004) su utvrdili da je broj pojedinačnih vrsta kvasaca nakon šest dana procesa između 5 i 7 logaritamskih jedinica u zavisnosti od vrste kvasaca. Izvesne razlike u vrednostima hemijskih parametara, trajanju kombuha fermentacije i broju ćelija u fermentacionoj tečnosti je očekivan, jer kombuha napitak nije standardizovanog mikrobiološkog i hemijskog sastava (Teoh i sar., 2004). Međutim, prikazani rezultati pokazuju određenu sličnost između različitih kombuha kultura i mogućnost da se fermentacioni procesi ponove pod istim uslovima na različitim lokacijama.

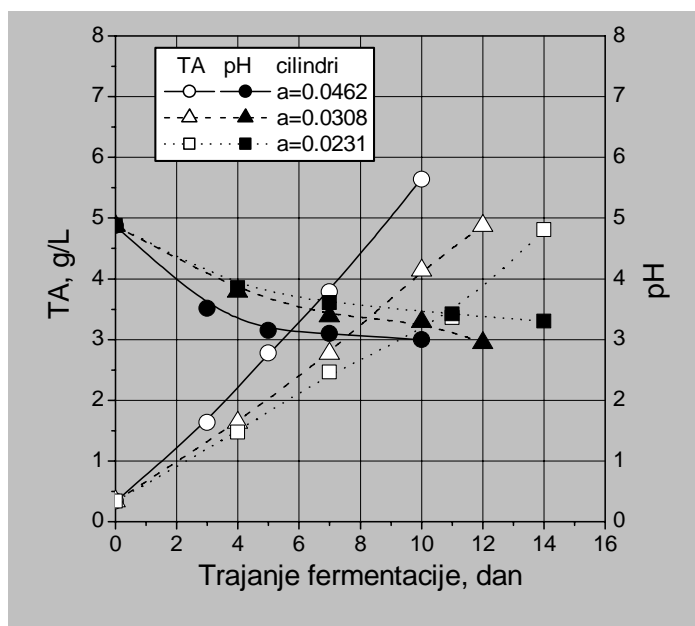
4.4.2. Promene vrednosti pH i titribilne kiselosti tokom fermentacije u sudovima različite zapremine

Vrednosti pH i titribilne kiselosti (TA) su merene u velikim staklenim bocama, staklenim cilindrima i malom reaktoru čije su karakteristike prikazane u tabeli 19. Promene vrednosti pH i titribilne kiselosti tokom kultivacije čajne gljive i zavisnost od specifične međufazne površine reaktora su prikazane na slikama 36-38. Prikazani podaci predstavljaju srednju vrednost iz šest pojedinačnih merenja (iz dva paralelna eksperimenta sa po tri merenja). Vrednosti titribilne kiselosti su služile kao baza podataka za izvođenje matematičkog modela kombuha fermentacije. Pored toga, isti parametri su određeni i za veliki reaktor (Tabela 19) u cilju verifikacija primene modela u scaling-u kombuha fermentacije. Konačno, fermentacija je izvedena i u malim staklenim sudovima kako bi se proverila mogućnost ekstrapolacije modela na male zapremine fermentora.

Analiza rezultata prikazanih slikama na 36-38 pokazuje da vrednosti pH i titribilne kiselosti fermentacione tečnosti značajno zavise od dužine trajanja procesa, što je u skladu sa zapažanjima drugih istraživača (Lončar i sar., 2006; Jayabalan i sar., 2007). Vrednost pH zaslađenog crnog čaja nakon pripreme je bila oko 7,4. Ova vrednost nakon inokulacije majom (10% v/v) trenutno pada na oko 4,7. Tokom prva četiri dana kultivacije vrednost pH pada za oko 1,6 jedinica pH, što je posledica fiziološke aktivnosti mikroorganizama čajne gljive i sinteze organskih kiselina (primarno sirćetne kiseline). Nakon ovog perioda promene vrednosti pH su zanemarljive uprkos daljoj sintezi organskih kiselina.



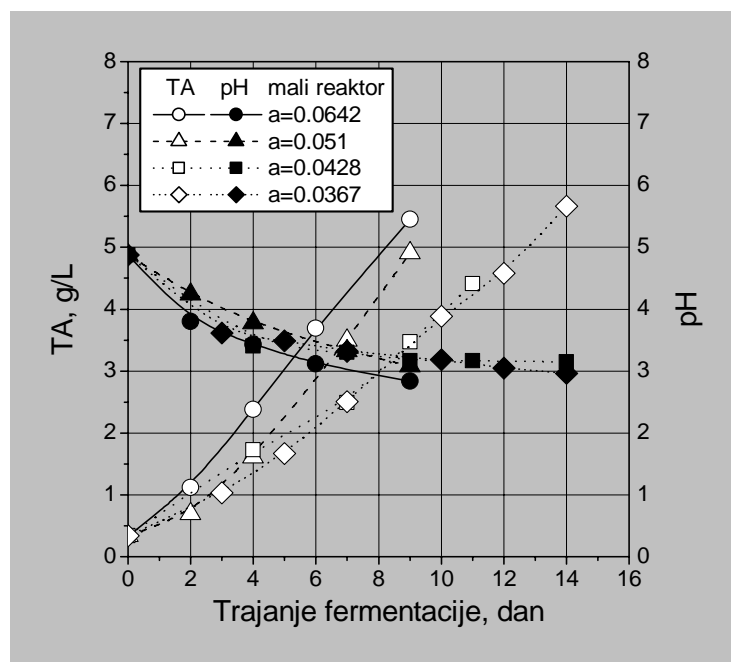
Slika 36. Promene pH i titrabilne kiselosti (TA) u velikim bocama za kombuha fermentaciju



Slika 37. Promene pH i titrabilne kiselosti (TA) u cilindrima za kombuha fermentaciju

Trend promena pH prikazan na slikama 36-38 su zabeležili i drugi autori (Chen i Liu, 2000; Sreeramulu i sar., 2000; Cvetković, 2003) i on je tipičan za kombuha fermentaciju. Očigledno je da fermentisana tečnost poseduje određeni puferski kapacitet koji sprečava dalje značajnije promene vrednosti pH tokom celokupnog procesa kultivacije. Verovatno je objašnjenje ove pojave u ugljendioksidu koji nastaje tokom kombuha fermentacije fiziološkom aktivnošću kvasaca i koji u rastvorenom obliku suzbija disocijaciju sintetisanih organskih kiselina (Tokom vremena usled stvaranja celulozne pelikule na površini medijuma onemogućena je difuzija ugljendioksida što izaziva njegovu kumulaciju). U vodenom rastvoru ugljendioksid disosuje dajući amfoprotični hidrokarbonatni anjon (HCO_3^-), koji reaguje sa protonima (H^+) prisutnih organskih kiselina, sprečavajući tako dalje promene pH fermentisane tečnosti. Zbog toga, vrednost

pH ne može biti kritičan parametar procesa koji određuje kraj kombuha fermentacije, kako je to predloženo od drugih autora koji su izučavali scale-up kombuha fermentacije. Kritični parametar fermentacije je titrabilna kiselost fermentisane tečnosti za koju je potrebno definisati željenu, tj. konzumnu optimalnu vrednost koja će određivati kraj procesa.



Slika 38. Promene pH i titrabilne kiselosti (TA) u malom reaktoru za kombuha fermentaciju

Kako je ranije spomenuto, specifična međufazna površina (a) je povezana sa ostalim kinetičkim parametrima sledećim matematičkim izrazom:

$$V_L \frac{dc}{d\tau} = K_L (c^* - c) A \Rightarrow \frac{dc}{d\tau} = K_L a (c^* - c) \quad (1)$$

gde V_L predstavlja zapreminu tečnosti; A je poprečni presek reaktora; K_L je koeficijent prenosa mase; τ predstavlja vreme, dok su c i c^* stvarna i ravnotežna koncentracija.

Specifična međufazna površina je u direktnoj vezi sa transportom mase, tj. transferom atmosferskog kiseonika i indirektno aktivnošću bakterija sirćetnog vrenja, kao striktno anaerobnih bakterija u podlozi za kultivaciju.

Analiza zavisnosti titrabilne kiselosti od specifične međufazne površine (Slike 36-38) pokazuje da se u sudovima veće vrednosti a (bez obzira na veličinu suda za fermentaciju) proces odvija brže tako da se za kraće vreme fermentacije postiže kritična vrednost titrabilne kiselosti. Takođe, podjednake vrednosti a za različite reakcione sudove garantuju isto vreme trajanja procesa. Na primer, željena kiselost fermentisane tečnosti od 4 g/L se postiže nakon devet dana u velikim bocama ($a \approx 0,036$), a nakon deset dana u cilindrima ($a \approx 0,031$) i malom reaktoru ($a \approx 0,037$). Očigledno je da iste vrednosti specifične međufazne površine za reaktore različite veličine najverovatnije obezbeđuje identičan prenos mase u različitim sistemima. Zato se međufazna površina može koristiti kao vodeći parametar scale-up procedure umesto zapremine tečnosti kako je predloženo od drugih autora (Malbaša i sar., 2006).

4.4.3. Matematički model kombuha fermentacije

Regresiona analiza je primenjena na bazu podataka koja je sadržavala 15 prosečnih vrednosti dobijenih za cilindre, 21 prosečnu vrednost za velike boce i 23 prosečne vrednosti za fermentaciju u malom reaktoru. Na ovaj način je dobijeno ukupno 59 vrednosti za titrabilnu kiselost (TA) i iskorišćeno za izvođenje funkcije $TA(\tau, a)$:

$$TA = b_1 a + b_2 \tau + b_3 a \tau + b_4 a \tau (a - \tau) + b_5 a \tau (a - \tau)^2 \quad (s^2 = 0,142) \quad (2)$$

Stakleni cilindri, velike staklene boce i mali reaktor su napunjeni različitim zapreminama tečne faze, odnosno podloge za kultivaciju čajne gljive (Tabela 19), dajući tako sisteme sa različitim vrednostima međufazne površine i široku bazu podataka.

Funkcija (2) je matematički opis zavisnosti između titrabilne kiselosti, trajanja fermentacije (τ) i specifične međufazne površine. Model (2) je od nekoliko modela definisan kao najbolji korišćenjem sledećeg kriterijuma:

$$s^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (TA_{i,exp} - TA_{i,calc})^2}{n - k} \quad (3)$$

gde $TA_{i,exp}$ označava prosečnu titrabilnu kiselost zasnovanu na eksperimentalnim podacima, dok $TA_{i,calc}$ reprezentuje odgovarajuću titrabilnu kiselost izračunatu pomoću jednačine (2); n predstavlja broj prosečnih vrednosti merenja (59), dok k predstavlja broj parametara u modelu (5).

Problem određivanja parametara (od b_1 do b_5) regresione jednačine (2), u skladu sa dobro poznatom metodom najmanjih kvadrata odstupanja, svodi se na nalaženje minimuma funkcije koja predstavlja zbir kvadrata odstupanja merenih vrednosti kiselosti od vrednosti koje su dobijene računanjem pomoću jednačine (2). Na osnovu potrebnog uslova za ekstrem poznatog iz diferencijalnog računa, određuju se prvi izvodi pomenute funkcije, kojih ima onoliko koliko ima nepoznatih parametara. Izjednačavanjem prvih izvoda sa nulom formira se sistem linearnih jednačina čije je jedinstveno rešenje set b -parametara. U tabeli 21 prikazane su vrednosti b -parametra određene obradom izmerenih vrednosti titrabilne kiselosti, zajedno sa odgovarajućim t -faktorima koji mogu da posluže za ocenu značajnosti parametara. Očigledno je da najveću vrednost ima t -faktor koji se odnosi na linearni vremenski član, čime je potvrđena činjenica da trajanje fermentacije ima najznačajniji uticaj na vrednost titrabilne kiselosti (TA). Vrlo značajni su i parametri b_5 i b_4 koji se odnose na kompleksnu interakciju dve nezavisno promenljive (tj. interakciju trajanja fermentacije i specifične interfazne površine). Ove interakcije unose značajan stepen nelinearnosti u matematički model. Takođe, imajući u vidu t -faktor, može se zaključiti da je od značaja i parametar b_1 koji izražava uticaj same specifične interfazne površine na titrabilnu kiselost reakcione tečnosti. Najmanje značajna je jednostavna interakcija dve nezavisno promenljive veličine - trajanja fermentacije i specifične interfazne površine.

Tabela 21. Parametri matematičkog modela (3) i njihovi *t*-faktori

	Simbol	Vrednost	t-vrednost
1	b_1	7,28	0,14
2	b_2	0,202	0,32
3	b_3	-0,61	0,015
4	b_4	-1,38	0,19
5	b_5	-0,074	0,20

4.4.4. Aplikativnost scale-up modela

Matematički model (2) bi trebao da važi za svaki fermentativni proces izveden uporedivom kombuha kulturom u zaslađenom crnom čaju kao supstratu sa 70 g/L saharoze, ukoliko sadržaj biosintetisanih kiselina ne prelazi 5,78 g/L i ukoliko proces ne traje duže od 14 dana, a specifična međufazna površina ima vrednosti u intervalu od 0,0231–0,0642 cm⁻¹. Funkcija (2) je izvedena pod tim eksperimentalnim uslovima i korišćena za scaling-up procesa kombuha fermentacije.

Za optimalnu titrabilnu kiselost ($b = 4$ g/L) jednačina 2 se transformiše u:

$$7,28a + 0,202\tau - 0,61a\tau - 1,38a\tau(a - \tau) - 0,074a\tau(a - \tau)^2 - b = 0 \quad (4)$$

Kako izraz sadrži dve nezavisno promenljive veličine do njegovog numeričkog rešenje se dolazi sledećim koracima. Kao prvo specificirano je trajanje procesa i zatim je specifična međufazna površina izračunata korišćenjem Newton-Raphson procedure. Tako je određena međufazna površina potrebna za postizanje kiselosti od 4 g/L za definisano vreme trajanja procesa. Ponavljanjem opisanog postupka, dobija se serija vrednosti za interfaznu specifičnu površinu prikazana u tabeli 22. Očigledno je da manje vrednosti faktora a zahtevaju duže trajanje fermentacije što je direktna posledica sporijeg prenosa mase u sistemu. Izračunate vrednosti za specifičnu međufaznu površinu mogu se upotrebiti za procenu geometrijskih karakteristika reaktora koje će obezbediti zadovoljavajuće uslove fermentacije. U tabeli 22 su prikazane vrednosti za nekoliko zapremina medijuma (20-100 L).

Tabela 22. Karakteristike velikih reaktora dobijenih scaling-up procedurom

Trajanje fermentacije (dani)	Međufazna površina (cm ⁻¹)	Reaktori za proizvodnju fermentisanog napitka kiselosti 4 g/L					
		V (L)	d (cm)	V (L)	d (cm)	V (L)	d (cm)
7	0,0573	20	38,2	50	60,4	100	85,4
8	0,0452	20	33,9	50	53,7	100	75,9
9	0,0366	20	30,5	50	48,3	100	68,3
10	0,0304	20	27,8	50	44	100	62,2

4.4.5. Verifikacija modela za kombuha fermentaciju

U cilju provere validnosti definisanog scale-up modela (4) za kombuha fermentaciju, izveden je eksperiment u reaktoru zapremine 110 L, prečnika $D=63$ cm

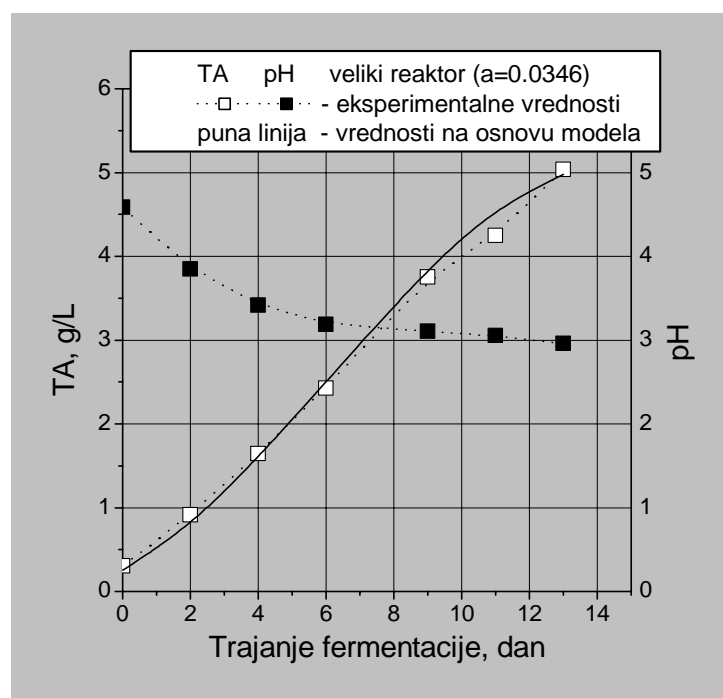
(Tabela 19; Slika 39). Izračunata specifična međufazna površina za ovaj reaktor je iznosila $a=0,0346$, a procenjeno vreme trajanja fermentacije na osnovu podataka iz tabele 14 je bilo 9-10 dana. Eksperimentalni podaci su pokazali da je željena ukupna kiselost od 4 g/L postignuta za 10 dana kultivacije (Slika 40). Ovo pokazuje visoku usklađenost između eksperimentalnih i izračunatih vrednosti titrabilne kiselosti tokom kombuha fermentacije i potvrdu da je scaling-up kombuha fermentacije izveden uspešno, pri scaling-up odnosu od 1:5, koji je predložen kao optimalan za bioreaktore (Junker, 2004). Takođe se može reći da je metod zasnovan na specifičnoj međufaznoj površini precizan i pouzdan, bar koliko i prethodno predloženi metod koji geometrijsku sličnost malih i velikih reaktora uzima kao glavni kriterijum (Malbaša i sar., 2006).



Slika 39. Reaktor za kombuha fermentaciju ukupne zapremine 110 L

Robusnost modela (4) je proverena i njegovom primenom na ekstremno male boce za fermentaciju. U tu svrhu je kombuha fermentacija izvedena u staklenim bocama ukupne zapremine 0,72 L, sa zapreminom tečne faze od 0,33 L, čiji je prečnik bio 8 cm (Tabela 19). Izračunata specifična međufazna površina za ove boce je bila $a=0,152$, što je vrednost oko 2,5 puta veća od najveće vrednosti za a (0,0642) koja je iskorišćenja za izvođenje matematičkog modela. Izračunato vreme trajanja fermentacije pomoću modela je bilo 4 dana, dok su ekperimentalni podaci pokazali da se kritična ukupna kiselost (4 g/L) postiže za 4,5 dana. Step en slaganja je prihvatljiv posebno imajući u vidu da je u ovom slučaju izvedena ekstrapolacija. U domaćinstvima se kombuha obično priprema u staklenim bocama zapremine 5 L (Tabel 19). Primenom modela (4) na ovaj sistem dobijeno je da se sa 4,18 L tečne faze titrabilna kiselost od 4 g/L postiže za 6,5 dana dok je izračunato vreme fermentacije aproksimativno 7,5 dana. Poredeći eksperimentalna i izračunata vremena trajanja kombuha fermentacije može se konstatovati da je trajanje fermentacije izračunato jednačinom 4 duže od eksperimentalnog u slučajevima kada se jednačina primeni na sisteme koji nisu uključeni u izvođenje scale-up modela (male boce i veliki reaktor).

Tabela 23 prikazuje promene glavnih metabolite čajne gljive (sirćetne kiseline i etanola) tokom fermentacije u sudovima različitih geometrijskih karakteristika i različitih vrednosti specifične međufazne površine (a). Uzorkovanje fermentisane tečnosti je obavljeno sa sredine sudova za kultivaciju, a sadržaj etanola i sirćetne kiseline je određen HPLC metodom.



Slika 40. Promene pH i titrabilne kiselosti u velikom reaktoru (110 L) u poređenju sa izračunatim vrednostima za kiselost napitka

Tabela 23. Promene sadržaja glavnih metabolita čajne gljive (g/L) tokom fermentacije u sudovima različite zapremine

Trajanje fermentacije	Sudovi za fermentaciju					
	V=5 L; a=0,0481 cm ⁻¹		V=25 L; a=0,0367 cm ⁻¹		V=100 L; a=0,0346 cm ⁻¹	
	Sirćetna kiselina	Etanol	Sirćetna kiselina	Etanol	Sirćetna kiselina	Etanol
0	-	-	0,2099	0,3847	0,3530	0,5342
2	0,253	1,3517	0,3421	1,4046	0,551	2,2202
4	0,5181	2,2041	0,8031	2,0422	0,9553	4,776
6	-	-	1,3592	2,9618	1,2965	4,8747
7	2,3857	4,0872	-	-	-	-
9	3,303	5,1614	1,8311	4,4281	1,8214	6,8359
11	4,7419	4,0705	2,3411	5,1319	2,2458	6,7451

Dobijeni rezultati pokazuju da se proces fermentacije u sudu zapremine 5 L odvijao najbrže; za 11 dana fermentacije u ovom sudu je sintetisana najveća količina sirćetne kiseline, a istovremeno se u podlozi nalazila i najmanja količina etanola. Verovatno da je zbog veće specifične međufazne površine osigurana bolja aerisanost podloge u reaktoru od 5 L, što za posledicu ima veću aktivnost bakterija sirćetnog vrenja i efikasniju transformaciju etanola u sirćetnu kiselinu. U tom smislu, u preostala dva reaktora, dolazi do izvesnog nakupljanja etanola usled smanjene fiziološke aktivnosti bakterija sirćetnog vrenja.

5. ZAKLJUČAK

- ❖ Čelije bakterija sirćetnog vrenja su u podlozi inokuliranoj celuloznom navlakom najbrojnije u površinskom delu, dok su u podlozi sa starter kulturama ravnomerno zastupljene u svim ispitanim zonama podloge. Čelije kvasaca su tokom fermentacije podloga blago raspoređuju ka dnu suda za kultivaciju. Ovakva raspodela ćelija u podlogama je razlog zašto je fermentacija podloge inokulirane celuloznom navlakom najintezivnija u površinskom delu podloge (pod celuloznom pelikulom), dok je transformacija podloge sa starter kulturama ravnomerna po celokupnoj zapremini.
- ❖ Broj ćelija kvasaca izolovanih iz autohtone čajne gljive, kao starter kultura, u podlozi za kultivaciju od 10^5 ćelija/mL je dovoljan za uspešnu fermentaciju zaslađenog čaja. Međutim, isti broj ćelija bakterija sirćetnog vrenja je nedovoljan za efikasnu transformisanje podloge u kombuha napitak. Minimalan broj bakterijskih ćelija u podlozi za uspešnu kombuha fermentaciju je 10^6 ćelija/mL. Limitirajući faktor fiziološke aktivnosti bakterija sirćetnog vrenja tokom statične kombuha fermentacije je količina dostupnog vazdušnog kiseonika u podlozi.
- ❖ U fermentisanoj tečnosti koja je inokulirana starter kulturama, na kraju fermentacije, je registrovana znatno veća količina etanola i znatno manja količina ugljenih hidrata (saharoze, glukoze i fruktoze), u odnosu na podlogu koja je inokulirana celuloznom pelikulom. Ovo je posledica izuzetne fiziološkoj aktivnosti čistih kultura kvasaca i bakterija sirćetnog vrenja, koje su upotrebljene kao starter kulture. Izolovani sojevi kvasaca su u fazi predinokulacije umnoženi i adaptirani na podlogu sa saharozom. Rezultat upotrebe starter kultura je dobijanje kombuhe veće titrabilne kiselosti u odnosu na tradicionalni postupak inokulacije, za isto vreme kultivacije.
- ❖ Sadržaj saharoze (u granicama od 5-10 g/L) i crnog čaja (3-4,5 g/L) nije odlučujući za efikasnu fermentaciju zaslađenog čaja čajnom gljivom, već su mnogo značajnije fiziološke karakteristike kombuha kulture i inicijalni broj ćelija kvasaca i bakterija sirćetnog vrenja u podlozi za kultivaciju. Međutim, pokazalo se da porast zapremine supstrata u reaktoru za kultivaciju čajne gljive, tj. smanjenje faktora $V_{\text{suda}}/V_{\text{podloge}}$ vodi smanjenju količine sintetisanih kiselina i produženju procesa fermentacije. Moguće je da povećanjem zapremine podloge, pri statičnim uslovima kultivacije, dolazi do smanjenja količine rastvorenog kiseonika po jedinici zapremine podloge, kao jednog od limitirajućih faktora kombuha fermentacije.
- ❖ Specifična međufazna površina (a) se može definisati kao kritična promenljiva i ključni parametar za izvođenje matematičkog modela za *scale-up* kombuha fermentacije. Dva reaktora različitih geometrijskih karakteristika, uz uslov da imaju iste vrednosti specifične međufazne površine, će najverovatnije za isto vreme trajanja fermentacije dati napitke istih senzornih karakteristika, tj. titrabilne kiselosti. Eksperimentalni podaci dobijeni za fermentaciju izvedenu u sudu ukupne zapremine 110 L, a za projektovanu vrednost a , su puna potvrda aplikativnosti definisanog matematičkog modela za *scaling-up* kombuha fermentacije.
- ❖ Konzumni kombuha napici od crnog i rtanjskog čaja i čaja ehinacee su pokazali gotovo identično antimikrobno delovanje na ispitane bakterije, na osnovu čega se može zaključiti da vrsta čaja i njegove komponente nisu odlučujući faktor antimikrobne aktivnosti napitka. Nosioci antimikrobne aktivnosti kombuha napitaka su metaboliti čajne gljive sintetisani tokom kultivacije, pre svih sirćetna kiselina. Međutim, s obzirom da su određeno antimikrobno delovanje pokazali i

uzorci kombuhe nakon neutralisanja, može se pretpostaviti da nosioci antimikrobne aktivnosti kombuhe nisu samo organske kiseline.

- ❖ Kombuha napici su antimikrobnu aktivnost ispoljili pre svega na mikroorganizme sa prokariotskim tipom ćelije – bakterije *Salmonella enteritidis*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* i *Bacillus* sp. Izvesno je da struktura ćelijskog zida bakterijske ćelija nije presudna za mehanizam antimikrobnog delovanja kombuhe, imajući u vidu da su uzorci delovali i na Gram pozitivne i na Gram negativne bakterije.
- ❖ Kombuha napici nisu inhibirali rast ni jednog od testiranih sojeva kvasaca, a *Penicillium aurantiogriseum* i *Aspergillus flavus* su bili jedini eukariotski mikroorganizmi na koji su kombuhe od crnog i rtanjskog čaja i čaja ehinacee pokazale graničnu inhibitornu aktivnost. Imajući u vidu ispoljenu aktivnost napitaka na potencijalne kontaminante tokom kultivacije čajne gljive, može se konstatovati da se poštovanjem minimalnih sanitarno-higijenskih uslova u domaćinstvu ili proizvodnom pogonu, obezbeđuje dobijanje kombuhe bez velikog rizika od kontaminacije radne kulture i napitka enterobakterijama. Međutim, izvesni rizik od kontaminacije plesnima i kvascima iz okoline postoji.
- ❖ Crni čaj, čajni napici od korena i herbe ehinacee i njihovi kombuha napici su pokazali antioksidativnu aktivnost na DPPH radikale. Čajni napici su pri tome imali niže vrednosti antioksidativne aktivnosti u poređenju sa konzumnim kombuha napicima. Najizraženiji antioksidativni efekat ($AA_{DPPH}=100\%$) na stvaranje i transformaciju DPPH radikala detektovan je u prisustvu kombuha napitka pripremljenog od herbe ehinacee.
- ❖ Čajni napitak od rtanjskog čaja i kombuha od rtanjskog čaja su pored aktivnosti na DPPH ispoljili antioksidativnu aktivnost i prema hidriksil radikalima. Čajni napitak pripremljen od rtanjskog čaja je imao visoke vrednosti i AA_{DPPH} i AA_{OH} , ali te vrednosti su niže u poređenju sa antioksidativnom vrednošću odgovarajućeg kombuha napitka.
- ❖ Izraženija antioksidativna aktivnost kombuha napitaka u odnosu na odgovarajuće čajeve je uzrokovana metabolitima koji nastaju tokom kultivacije čajne gljive (vitamini B i C, oksid karbonske kiseline, katehini), a koji utiču na nastajanje i transformaciju ispitanih radikala i/ili deluju sinergistički sa aktivnim sastojcima čajeva.
- ❖ Konzumni kombuha napici od crnog i rtanjskog čaja nisu stimulisali proliferaciju ćelijskih linija humanih karcinoma: HeLa (epitelni karcinom cerviksa), MCF-7 (adenokarcinom dojke) i HT-29 (adenokarcinom debelog creva). Čajni napici i kombuhe od rtanjskog i crnog čaja nisu pokazali značajniju razliku u antiproliferativnoj aktivnosti, pri čemu ni jedan od uzoraka nije pokazao efekat inhibicije od 50%. Nešto veću aktivnost u odnosu na HT-29 ćelije ispoljila je kombuha od crnog čaja. Kombuha od rtanjskog čaja je vrednost IC_{20} u slučaju ćelijske linije HeLa ostvarivala pri nižim koncentracijama nego vodeni ekstrakt biljke *Satureja montana*. Verovatno da kombuha od rtanjskog čaja metabolitima čajne gljive duguje povećanu antiproliferativnu aktivnost.

6. LITERATURA

- Adebamowo, C.A., Hu, F.B., Cho, E., Spiegelman, D., Holmes, M.D., Willett, W.C. (2005): Dietary Patterns and the Risk of Breast Cancer, *Annals of Epidemiology*, 15, 789-795.
- Ahmad, N., Feyes, D.K., Nieminen, A.-L., Agarwal, R., Mukhtar, H. (1997): Green tea constituent epigallocatechin-3-gallate and induction of apoptosis and cell cycle arrest in human carcinoma cells, *Journal of the National Cancer Institute*, 89, 24, 1881-1882.
- Allen, C.M. (1998): Past research on Kombucha tea, The Kombucha FAQ Part 6, Research and tests results, http://persweb.direct.ca/chaugen/kombucha_faq_part06.html.
- Balentine, D.A., Wiseman, S.A., Bouwens, L.C. (1997): The chemistry of tea flavonoids, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 37, 693-704.
- Barnett, J.A. (1976): The Utilization of Sugars by Yeasts, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, 32, 125-234.
- Barnett, J.A. (1981): The Utilization of Disaccharides and Some Other Sugars by Yeasts, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, 39, 347-404.
- Barnett, J.A. (1997): Sugar Utilization *Saccharomyces cerevisiae*; Yeast Sugar Metabolism edited by F. K. Zimmermann and K.-D. Entian, Technomic., Lancaster-Basel, 1-35.
- Barnett, J.A., Payne, P.W., Yarrow, D. (2000): Yeasts, characteristics and identification, Third Edition, Cambridge University Press. UK, 53-81.
- Barrett, B. (2003): Medicinal properties of *Echinacea*: A critical review, *Phytomedicine*, 10, 66-86.
- Bauer-Petrovska, B., Petrushevska-Tozi, L. (2000): Mineral and water soluble vitamin content in the Kombucha drink, *International Journal of Food Science and Technology*, 35, 201-205.
- Bezbradica, D., Tomović, J., Vukasinović, M., Siler-Marinković, S, Ristić, M. (2005): Composition and Antimicrobial Activity of Essential Oil of *Satureja montana* L. Collected in Serbia and Montenegro, *Journal of Essential Oil Research*, 17, 462-465.
- Blanc, P.J. (1996): Characterization of the tea fungus metabolites, *Biotechnology Letters*, 18 (2):139-142.
- Bors, W., Heller, W., Michel, C., Saran, M. (1990): Flavonoids as Antioxidants: Determination of Radical-Scavenging Efficiencies, *Methods in Enzymology*, 186, 343-355.
- Cabrera, C., Giménez, R., Carmen López (2003): Determination of Tea Components with Antioxidant Activity, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 4427-4435.
- Cao, G., Sofic, E., Prior, R.L. (1996): Antioxidant Capacity of Tea and Common Vegetables, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 3426-3431.
- Capasso, F., Gaginella, T., Grandolini, G., Izzo, A. (2003): *Phytotherapy – A Quick Reference to Herbal Medicine*, Springer-Verlag (izdanje za Srbiju i Crnu Goru IK Prometej, 2005).
- Centers for disease control, USA, (1995): Unexplained severe illness possibly associated with consumption of Kombucha tea - Iowa, *Morbidity and Mortality Weekly Report*, 44, 48:892-900.
- Chappius, D. (1998): Yes, Caffeine Reduction During Brewing, Post to the Kombucha Internet Discussion Group, www.microscopy-uk.org.uk.
- Chou, C.-C., Lin, L.-L., Chung, K.-T. (1999): Antimicrobial activity of tea as affected by the degree of fermentation and manufacturing season, *International Journal of Food Microbiology*, 48, 125-130.

- Chen, C., Liu, B.Y. (2000): Changes in major components of tea fungus metabolites during prolonged fermentation, *Journal of Applied Microbiology*, 89, 834-839.
- Chen, Y-Q., Zhou, Y-Q., Angeloni, D., Kurtz, A.L., Qiang, X-Z., Wang, M-H. (2000): Overexpression and activation of the RON receptor tyrosine kinase in a panel of human colorectal carcinoma cell lines, *Experimental Cell Research*, 261, 229-238.
- Chu, S-C., Chen, S. (2006): Effects of origins and fermentation time on the antioxidant activities of Kombucha, *Food Chemistry*, 98, 3, 502-507.
- Ciani, M., Menghini, L., Mariani, F., Pagiotti, R., Menghini, A., Fatichenti, F. (2000): Antimicrobial properties of essential oil of *Satureja montana* L. on pathogenic and spoilage yeasts, *Biotechnology Letters*, 22, 1007-1010.
- Constantinou, A.I., Kamath, N., Murley, J.S. (1998): Genistein inactivates bcl-2, delays the G2/M phase of the cell cycle, and induces apoptosis of human breast adenocarcinoma MCF-7 cells, *European Journal of Cancer*, 34, 1927-1934.
- Crueger, W., Crueger A. (1984): *Biotehnologija*, R. Oldenburg Verlag, München-Wien, (prevod Gaćeša, S. (2000), Tehnološki fakultet, Novi Sad).
- Cvetković, D. (2003): *Metabolička aktivnost čajne gljive na različitim supstratima*, Magistarski rad, Tehnološki fakultet, Novi Sad.
- Cvetković, D., Čanadanovic-Brunet, J., Markov, S. (2003): Cultivation of kombucha on sweetened echinacea tea, 1st FEMS Congress, The Abstract Book, 108.
- Cvetković, D., Markov, S., Djurić, M., Savić, D., Velićanski, A. (2008): Specific interfacial area as a key variable in scaling-up Kombucha fermentation, *Journal of Food Engineering*, 85, 387-392.
- Čanadanović-Brunet, J. (1997): *Kiseonikovi slobodni radikali prirodnih i model sistema*, Doktorska disertacija, Prirodno-matematički fakultet, Novi Sad, 4-14.
- Četojević-Simin, D., Čanadanović-Brunet, J., Bogdanović, G., Četković, G., Tumbas, V., Đilas, S. (2004): Antioxidative and antiproliferative effects of *Satureja montana* L. extracts. *J. BUON*, 9, 443-449.
- De Ley, J., Gillis, M., Swings, J. (1984) : Family VI. Acetobacteriaceae. In: Krieg, N.R., Holt, J.G. (Eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 1, Williams & Wilkins, Baltimore/London, 267-278.
- De Vero, L., Giudici, P. (2007): Genus-specific profile of acetic acid bacteria by 16S rDNA PCR-DGGE, *International Journal of Food Microbiology*, (u štampi).
- Divies, C., Cachon, R. (1998): Altérations par les bactéries acétiques - in *Oenologie, Fondaments scientifiques et technologiques*, C. Flanzy (ed), Londres, Paris-New York, 539-552.
- Dufresne, C., Farnworth, E. (2000): Tea, Kombucha, and health: a review, *Food Research International*, 33, 409-421.
- Entani, E., Ohmuri, S., Masai, H., Suzuki, K. I. (1985): *Acetobacter polyoxogenes* sp. nov., a new species of an acetic acid bacterium useful for producing vinegar with high acidity, *General Applied of Microbiology*, 31, 475-490.
- Ettayebi, K., Errachidi, F., Jamai, L., Tahri-Jouti, M.A., Sendide, K., Ettayebi, M. (2003): Biodegradation of polyphenols with immobilized *Candida tropicalis* under metabolic induction, *FEMS Microbiology Letters*, 233, 215-219.
- Fioravanti, L., Cappalletti, V., Miodini, P., Ronchi, E., Brivio, M., Di Fronzo, G. (1998): Genistein in the control of breast cancer cell growth: insights into the mechanism of action *in vitro*, *Cancer Letters*, 130, 143-152.
- Flanzy, C. (1998): *Oenologie, Fondaments scientifiques et technologiques*, Londres, Paris-New York, 414-494.
- Fontana, J.D., De Souza, A.M., Fontana, C.K., Torriani, I.L., Moreschi, J.C., Gallotti, B.J., De Souza, S.J., Narcisco, G.P., Bichara, J.A., Farah, L.F.X. (1990): *Acetobacter*

- Cellulose Pellicle as a Temporary Skin Substitute, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 24/25, 253-264.
- Fontana, J.D., Franco, V.C., De Souza, S.J. Lyra, I.N., De Souza, A.M. (1991): Nature of Plant Stimulators in the Production of *Acetobacter xylinum* („Tea Fungus“) Biofilm Used in Skin Therapy, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 28/29, 341- 351..
- Frank, G. (1994): *Kombucha, Health Beverage and natural remedy from the Far East*. Steyr., House Ennsthaler, 29.
- Frank, G.W. (1995): *Das Teepilz Getränk*. Ennsthaler Verlag, A-4402 Steyr.
- Fruton, S. J., Simonds, S. (1970): Opšta biohemija, Vuk Karadžić, Beograd, 421-422.
- Fugelsang, K.C., Edwards, C.G. (2007): *Wine Microbiology - Practical Applications and Procedures*, Second Edition, Springer 2007, 19-22.
- Full Circle Press (1998): *Kombucha tea culture - The ancient rejuvenating health drink*, <http://www.h2olily.com/~insect/kombuch2.html>.
- Gams, W. (1975): *CBS Course of Mycology*, Baarn, 11.
- Gillis, M., De Ley, J. (1980): Intra and intergenetic similarities of the ribonucleic acid citrons of *Acetobacter* and *Gluconobacter*, *International Journal of Systematic Bacteriology*, 30:7-27.
- Gillis, M., De Ley, J., Swings, J. (1984): Family VI. Acetobacteraceae in *Bergey's manual of systematic bacteriology* (1984), Volume 1, Williams & Wilkins, Baltimore/London, 267-278.
- González, Á., Hierro, N., Poblet, M., Mas, A., Guillamón, J.M. (2005): Application of molecular methods to demonstrate species and strain evolution of acetic acid bacteria population durin wine production, *International Journal of Food Microbiology*, 102, 295-303.
- González, Á., Guillamón, J.M., Mas, A., Poblet, M. (2006): Application of molecular methods for routine identification of acetic acid bacteria, *International Journal of Food Microbiology*, 108, 141-146.
- Greenwalt, C.J., Ledford, R.A., Steinkraus, K.H. (1998): Determination and characterization of the anti-microbial activity of the fermented tea Kombucha, *Lebensm.-Wiss. Technol.*, 31, 291-296.
- Greenwalt, C.J., Steinkraus, K.H., Ledford, R.A. (2000): Kombucha, the Fermented Tea: Microbiology, Composition, and Claimed Health Effects, *Jurnal of Food Protection*, 63, 7, 976-981.
- Gullo, M., Caggia, C., De Vero, L., Giudici, P. (2006): Characterization of acetic acid bacteria in “traditional balsamic vinegar”, *International Journal of Food Microbiology*, 106, 209-212.
- Guttapadu, S., Zhu, Y., Knol, W. (2000): Kombucha fermentation and its antimicrobial activity, *Jurnal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol. 48, 6, 2589-2594.
- Hartmann, A.M., Burleson, L.E., Holmes, A.K., Geist, C.R. (2000): Effects of Chronic Kombucha Ingestion on Open-field Behaviors, Longevity, Appetitive Behaviors, and Organs in C57-BL/6 Mice: A Pilot Study, *Nutrition*, 16, 755-761.
- Herrera, T., Calderon-Villagomez, A. (1989): Species of yeasts isolated in Mexico from the tea fungus, *Rev. Mex. Micol.* 5, 205-210.
- Hoffmann, N. (1996): The Ubiquitous Co-Enzyme UDP Glucuronic Acid, Detoxifying Agent in Kombucha Tea, <http://www.stolaf.edu/people/hoffmann/glucuron.htm>.
- Hoffmann, N. (1998): Basic Building Blocks, Nutrients and Growth Factors, What the Kombucha culture needs to survive, <http://www.kombu.de/nutrient.htm>.

- Hoogerheide J.C. (1971): On a disturbance of the normal Pasteur reaction in baker's yeast, *Antonie van Leeuwenhoek* 37(4): 435-448.
- Hsu, Y-L., Wu, W-T. (2002). A novel approach for scaling-up a fermentation system, *Biochemical Engineering Journal*, 11, 123-130.
- http://en.wikipedia.org/wiki/B_vitamins
- <http://images.search.yahoo.com>
- <http://www.atcc.org>
- http://www.kirka.co.yu/kirkapha/lekovitobilje/rtanjski_caj.htm
- http://www.happyherbalist.com/analysis_of_kombucha.htm
- Igram, M.A. (1955): An Introduction to the Biology of Yeast, Special aspects of yeast metabolism (ch.), Pitman, London, 129-150.
- Ingólfssdóttir, K. (2002): Usnic acid, *Phytochemistry*, 61, 729-736.
- ISO 4121 (1987): Sensory analysis-Methodology-Evaluation of food products by methods using scales. First edition 1987-12-15.
- Janković, I. (1995): Određivanje međusobnih odnosa mikrobnih asocijacija i biohemijskih karakteristika čajne gljive, Magistarski rad, Poljoprivredni fakultet, Beograd.
- Jančić, R., Stošić, D., Mimica Đukić, N., Lakušić, B. (1995): Aromatične biljke Srbije, Dečje novine, Beograd-Gornji Milanovac, 227-229.
- Jayabalan, R., Marimuthu, S., Swaminathan, K. (2007): Changes in content of organic acids and tea polyphenols during kombucha tea fermentation, *Food Chemistry*, 102, 392-398.
- Jovanović, S.V., Steenken, S., Tošić, M., Marjanović, B., Simić, M.S. (1994): Flavonoids as Antioxidants, *Journal of American Chemical Society*, 116, 4846-4851).
- Junker, B.H. (2004). Scale-Up Methodologies for *Escherichia coli* and Yeast Fermentation Processes. *Journal of Bioscience & Bioengineering*, 97: 347-364.
- Kavanagh, F. (1972): *Analytical Microbiology*, vol. 2, Academic Press, New York, 31-42.
- Kitagawa, S., Fujisawa, H., Sakurai, H. (1992): Scavenging effects of dihydric and polyhydric phenols on superoxide anion radicals, studied by ESR, *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 40, 304.
- Konovalov, I.N., Semenova, M.N. (1955): K fiziologiji "čajnoga griba", *Bot. Žurnal*, Moskva, 40, 4, 567-570.
- Korčulanin, A. (1984): Proizvodnja organskih kiselina, *Industrijska mikrobiologija, Prehrambeno-biotehnološki fakultet*, Zagreb, 162-178.
- Kreger-van Rij, N.J.W. (1984): *The yeasts – a taxonomic study*, 3rd ed. Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam.
- Kruk, M.B., Bornyak, I.M., Kruk, M.M., Oshchapovsky, V.V., Ryvak, O.V., Toropovska, O.M., Shylo, V.V. (2001): The application of *Echinacea* and nettle preparations in the complex treatment of chronic pharyngotonsillitis, *World conference on medicinal and aromatic plants*, Hungary, 196.
- Kurechi, T., Aizawa, N., Kunugi, A. (1983): Studies of the antioxidants, Oxidation products of TBHQ, *JAOCs*, 60, 1878-1882.
- Kurtzman, C., Robnett, C., Basehoar-Powers, E. (2001): *Zygosaccharomyces kombuchaensis*, a new ascosporogenous yeast from "Kombucha tea", *FEMS Yeast Research* 1, 133-138.
- Lambert, J.D., Yang, C.S. (2003): Cancer chemopreventive activity and bioavailability of tea and tea polyphenols, *Mutation Research*, 523-524, 201-208.
- Lampen J.O. (1968): External Enzymes of Yeast: Their Nature and Formation, *Antonie van Leeuwenhoek* 34: 1-18.

- Laskin, A.J., Lechevalier, H.A. (1973): Handbook of Microbiology, vol III: Microbiol Products, CRS Press; Cleveland, 343-354.
- Liu, C.-H., S.-H. Hsu, F.-L. Lee, and C.-C. Liao (1996): The isolation and identification of microbes from a fermented tea beverage, Haipao, and their interactions during Haipao fermentation, *Food Microbiol.*, 13, 407-415.
- Lončar, S.E., Petrović, E.S., Malbaša, V.R., Verac, M.R. (2000): Biosynthesis of glucuronic acid by means of tea fungus, *Nahrung* 44 (2), 138-139.
- Lončar, E., Djurić, M., Malbaša, R., Kolarov, Lj., Klašnja, M. (2006), Influence of Working Conditions Upon Kombucha Conducted Fermentation of Black Tea, *Food and Bioproducts Processing*, 84(C3), 186-192.
- Maggiara, P., Marchio, S., Stella, M.C., Gai, M., Belfiore, A., Bortoli, DeM., Di Renzo, M.F., Costantino, A., Sismondi, P., Comoglio, P.M. (1998): Overexpression of RON gene in human breast carcinoma, *Oncogene*, 16, 2927-2933.
- Malbaša, R. (2000): Mogućnosti dobijanja dijetetskog napitka pomoću čajne gljive, Magistarski rad, Tehnološki fakultet, Novi Sad.
- Malbaša, R. (2004): Istraživanje antioksidativne aktivnosti napitka od čajne gljive, Doktorska disertacija, Tehnološki fakultet, Novi Sad.
- Malbaša, R., Lončar, E., Djurić, M., Klašnja, M., Kolarov, Lj., Markov, S. (2006): Scale-up of black tea batch fermentation by kombucha, *Food and Bioproducts Processing*, 84(C3), 193-199.
- Malbaša R., Lončar E., Djurić M. (2008): Comparison of the products of Kombucha fermentation on sucrose and molasses, *Food Chemistry*, 106, 1039-1045.
- Markov, S.L., Malbaša, R.V., Hauk, M.J., Cvetković, D.D. (2001): Ispitivanje mikrobne populacije čajne gljive. I. Kvasci, *Acta Periodica Technologica*, 32, 133-138.
- Mayser, P., Fromme, S., Leitzmann, C., Gruender, K. (1995): The yeast spectrum of tea fungus Kombucha, *Mycoses* 38 (7-8), 289-295.
- MaryAnn, O'H., Kiefer, D., Farrell, K., Kemper, K. (1998): A review of 12 commonly used medicinal herbs, *Arch Fam Med.*, 7:523-536.
- Miller, N.J., Castelluccio, C., Tijburg, L., Rice-Evans, C. (1996): The antioxidant properties of the flavins and their gallate esters – radical scavengers or metal chelators?, *FEBS Letters*, 392, 40-44.
- Milić, B.Lj., Đilas, S.M., Čanadanović-Brunet, J.M. (1998): Antioxidative activity of phenolic compounds on the metal-ion breakdown of lipid peroxidation system, *Food Chemistry*, Vol. 61, 4, 443-447.
- Montero-Julian, F.A., Dauny, I., Flavetta, S. (1998): Characterization of two monoclonal antibodies against the RON receptor tyrosine kinase, *Hybridoma*, 17, 541-551.
- Morel, I., Lescoat, G., Cillard, P., Cillard, J. (1994): *Methods Enzymol*; 234:437-443.
- Mukhtar, H., Ahmad, N. (1999): Green Tea in Chemoprevention of Cancer, *Toxicological Sciences*, 52, 111-117.
- Murugesan, G.S., Sathishkumar, M., Swaminathan, K. (2005): Supplementation of waste tea fungal biomass as a dietary ingredient for broiler chicks. *Bioresource Technology* 96, 1743-1748.
- Murugesan, G.S., Sathishkumar, M., Swaminathan, K. (2006): Arsenic removal from groundwater by pretreated waste tea fungal biomass, *Bioresource Technology* 97, 483-487.
- Nielsen, J., Villadsen, J., Lidén, G. (2003): *Bioreaction Engineering Principles*, Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2nd ed., New York-Moscow, 477-518.
- Ognjanović, Z. (2000): Katalog Twinlab proizvoda, www.twinlab.com.

- OIV (1990): Recueil des méthodes internationales d'analyse des vins et des moûts, OIV, Paris, 155-162.
- Pellati, F., Benvenuti, S., Magro, L., Melegari, M., Soragni, F. (2004): Analysis of phenolic compounds and radical scavenging activity of *Echinacea* spp., Journal of Pharmaceutical and Biomedical analysis, 3, 289-301.
- Perry, N. (1995): Culture shock, Emerg. Med. Serv., 24:35-36.
- Petrović, S. (2001): Priča o kombuhi, Novi Sad.
- Petrović, S., Lončar, E. (1996): Content of water-soluble vitamins in fermentative liquids of tea fungus, Mikrobiologija, 33(2), 101-106.
- Petrović, S., Lončar, E., Ružić, N., Kolarov, Lj. (1995/96): Nutritive characteristics of tea fungus metabolites, Preceedings 26-27, Faculty of Technology, Novi Sad, 257-269.
- Pyke, M. (1958): The Technology of Yeast, The Chemistry and Biology of Yeast, A. H. Cook (ed.), Academic Press, New York, 561-572.
- Rechner, A.R., Smith, M.A., Kuhnle, G., Gibson, G.R., Debnam, E.S., Srai, S.K.S. (2004): Colonic metabolism of dietary polyphenols: influence of structure on microbial fermentation products, Free Radical Biology and Medicine, 36(2), 212-225.
- Reiss, J. (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.
- Roche, J. (1998): The history and spread of Kombucha, <http://www.trib.com~kombu/roche.html>.
- Roussin, M.R. (1996): Analyses of Kombucha ferments: report on growers, Information Resources, LC, Salt Lake City, Utah, www.kombucha-research.com.
- Roussin, M.R. (1999): Kombucha research.com.<http://www.kombucha-research.com>.
- Rouz, H.A. (1975): Hemijska mikrobiologija, ICS, Beograd, 121.
- Samson, R., van Reenen-Hoekstra, E. (1988): Introduction of food-borne fungi, Identification of the common food-borne fungi, 3th ed., Centraalbureau Voor Schimmelcultures, Baarn, Delft, 3-219.
- Scheffers W.A., Wiken T.O. (1969): The Custers effect (negative Pasteur effect) as a diagnostic criterion for the genus *Brettanomyces*, Antonie van Leuwenhoek, Vol 35, Supplement: Yeast Symposium, A31.
- Sievers, M., Lanini, C., Weber, A., Schuler-Schmid, U., Teuber, M. (1995): Microbiology and Fermentation Balance in a Kombucha Beverage Obtain from a Tea Fungus Fermentation, Systematic Applied of Microbiology 18:590-594.
- Skehan, P., Storeng, R., Scudiero, D., Monks, A., McMahon, J., Vistica, D., Warren, J., Bokesch, H., Kenney, S., Boyd, M. (1990): New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening, Journal of the National Cancer Institute, 13, 1107-1112.
- Sreeramulu, G., Zhu, Y., Knol, W. (2000): Kombucha fermentation and its antimicrobial activity. Journal of Agricultural and Food Chemistry 48, 6, 2589-2594.
- Srinivasan, R., Smolinske, S., Greebaum, D. (1997): Probable Gastrontestinal Toxicity og Kombucha Tea – Is This Beverage Healthy or Harmful, Journal of General Internal Medicine, 12, 643-644.
- Stanier, R. Y., Doudoroff, M., Adelberg, E., A. (1971): General Microbiology, 3th Edition, The Macmillan press, London and Basingstoke, 610-611.
- Steels H., James S.A., Bond C.J., Roberts I.N., Stratford M. (2002): *Zygosaccharomyces kombuchaensis*: the physiology of a new species related to the spoilage yeasts *Zygosaccharomyces lentus* and *Zygosaccharomyces bailli*, FEMS Yeast Research, 2, 113-121.

- Steinkraus, K.H., Shapiro, K.B., Hotchkiss J.H., Mortlock, R.P. (1996): Investigations into the antibiotic activity of tea fungus/kombucha beverage, *Acta Biotechnologica*, 16, 199-205.
- Stojanović M., Janković I. (1996): Gajenje čajne gljive - kombuhe, IGP SANBA, Beograd.
- Stojanović M., Nikšić, M. (2000): Novija saznanja o napitku čajne gljive - "Kombuhe" i proizvodima na bazi "kombuhe", V Savetovanje industrije alkoholnih i bezalkoholnih pića i sirćeta, Zbornik radova, Poslovna zajednica "Vrenje" Beograd, 205-211,
- Stuart, D.L., Wills, R.B.H. (2000): Alkylamide and Cichoric Acid Levels in *Echinacea purpurea* Tissues During Plant Growth, *Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants*, Vol. 7(1), 91-101.
- Su, Y.L., Leung, L.K., Huang, Y., Chen, Z. (2003): Stability of tea theaflavins and catechins, *Food Chemistry*, 83, 189-195.
- Suvajdžić, Lj. (2004): Priručnik iz mikrobiologije sa vežbama za studente farmacije, Ortomedics, Novi Sad.
- Teoh, L.A., Heard, G., Cox, J. (2004): Yeast ecology of Kombucha fermentation. *International Journal of Food Microbiology* 95, 119-126.
- Tsubono, Y., Nishino, Y., Komatsu, S., Hsieh, C.-C., Kanemura, S., Tsuji, I., Nakatsuka, H., Fukao, A., Satoh, H., Hisamichi, S. (2001): Green tea and the risk of gastric cancer in Japan, *New England Journal of Medicine*, 344, 632-636.
- Ultee, A., Kets, E.P.W., Smid, E.J. (1999): Mechanisms of Action of Carvacrol on the Food-Borne Pathogen *Bacillus cereus*, *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 4606-4610.
- van der Walt, J.P., Yarrow, D. (1984): Methods for the isolation, maintenance, classification and identification of yeasts, *The yeasts – a taxonomic study*, Kreger-van Rij (ed.), Elsevier Science Publishers B.V. – Amsterdam, 47-102.
- Vrbaški, Lj., Markov, S. (1992): Praktikum iz mikrobiologije, Tehnološki fakultet, Novi Sad, 150-155.
- Walker, G. (1998): *Yeast - Physiology and Biotechnology*, John Wiley&Sons, Chichester-New York-Weinheim-Brisbane-Singapore-Toronto.
- Wang, M.H., Montero-Julian, F.A., Dauny, I. (1996): Requirement of phosphatidylinositol-3-kinase for epithelial cell migration activated by human macrophage stimulating protein, *Oncogene*, 13, 2167-2175.
- Weusthuis, R.A. (1994): Disaccharide fermentation by yeasts, Proefschrift, Technische Universiteit Delft, Delft.
- Wiken, T.O. (1968): On "Negative Pasteur Effects" in Yeasts, in *Aspects of Yeast Metabolism*, A.K. Mills and H. Krebs (eds.), Blackwell Scientific Publications, Oxford and Edinburgh, 133-155.
- Wiseman, A.S., Balentine, A.D., Frei, B. (1997): Antioxidants in Tea, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 37(8), 705-718.
- Yokoyama, M., Noguchi, M., Nakao, Y., Ysunaga, M., Yamasaki, F., Iwasaka, T. (2008): Antiproliferative effects of the major tea polyphenol, (-)-epigallocatechin gallate and retinoic acid in cervical adenocarcinoma, *Gynecologic Oncology*, 108, 326-331.
- Zhu, Y.Q., Zhang, A., Tsang, D., Huang, Y., Chen, Z.Y. (1997): Stability of Green tea catechins, *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 45, 4624-4628.

**UNIVERZITET U NOVOM SADU
TEHNOLOŠKI FAKULTET**

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

Redni broj:
RBR

Identifikacioni broj:
IBR

Tip dokumentacije: monografska dokumentacija
TD

Tip zapisa: tekstualni štampani materijal
TZ

Vrsta rada: doktorska disertacija
VR

Autor: Dragoljub D. Cvetković
AU

Mentor: dr Siniša L. Markov, vanredni profesor Tehnološkog fakulteta u Novom Sadu
MN

Naslov rada "Kombuha od lekovitog bilja – biološka aktivnost i parametri fermentacije"
NR

Jezik publikacije: srpski (latinica)
JP

Jezik izvoda: srpski/engleski
JI

Zemlja publikovanja: Srbija
ZP

Uže geografsko područje: Vojvodina
UGP

Godina: 2008.
GO

Izdavač: Autorski reprint
IZ

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

Fizički opis rada: broj poglavlja 6, str. 86, lit. citata 143, tabela 23, slika 37, šema 3.
FO

Naučna oblast: Tehnološko inženjerstvo
NO

Naučna disciplina: Tehnološka mikrobiologija
ND

Predmetna odrednica/ključne reči: kombuha, ehinacea, rtanjski čaj, starter kulture, scale-up,
PO biološka aktivnost

UDK:

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

Važna napomena: nema
VN

Izvod/abstrakt:

IZ

Kombuha je tradicionalni napitak koji se dobija fermentacijom zaslađenog crnog ili zelenog čaja, fiziološkom aktivnošću čajne gljive, koja predstavlja simbiozu autohtonih vrsta kvasaca i bakterija sirćetnog vrenja. Cilj rada je bio da se ispita biološka aktivnost konzumnih kombuha napitaka (titrabilne kiselosti 3,5-4 g/L) od crnog čaja (*Camellia sinensis* L), čaja ehinacee (*Echinacea purpurea* L.) i rtanjskog čaja (*Satureja montana* L.). Za ispitivanje antimikrobne aktivnosti kombuha napitaka upotrebljeni su sledeći sojevi bakterija, kvasaca i plesni: *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus* sp., *Salmonella enteritidis*, *Proteus mirabilis*, *Escherichia coli*, *Sarcina lutea*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida pseudotropicalis*, *Rhodotorula* sp., *Penicillium aurantiogriseum*, *Aspergillus niger* i *Aspergillus flavus*. Antioksidativna aktivnost kombuha napitaka ispitana je na DPPH i OH radikale ESR spektralnom metodom. Antiproliferativna aktivnost čajeva i kombuha napitaka od crnog i rtanjskog čaja ispitana na tri ćelijske linije humanih karcinoma: HeLa (epitelni karcinom cerviksa), MCF-7 (adenokarcinom dojke) i HT-29 (adenokarcinom debelog creva). Pored istraživanja biološke aktivnosti kombuha napitaka, cilj rada je bio da se ispitaju i neki od osnovnih parametara kombuha fermentacije – optimalna količina izvora ugljenika i azota u medijumu za kultivaciju, geometrijske karakteristike fermentora, inokulacija starter kulturama. Definisane kritičnih parametara kombuha fermentacije je bio osnov za izvođenje matematičkog modela za scale-up fermentativnog procesa.

Datum prihvatanja teme od strane NN Veća Fakulteta: XXIV Sednica, 6.06.2008. godine
DP

Datum odbrane: 2008. godina
DO

Članovi komisije:
(Naučni stepen/Ime i prezime/Zvanje/Fakultet)
KO

Predsednik: dr Eva Lončar, red. prof. Tehnološkog fakulteta u Novom Sadu
Član: dr Siniša Markov, vanr. prof. Tehnološkog fakulteta u Novom Sadu
Član: dr Jasna Čanadanović-Brunet, red. prof. Tehnološkog fakulteta u Novom Sadu
Član: dr Viktor Nedović, vanr. prof. Poljoprivrednog fakulteta u Zemunu.

**UNIVERSITY OF NOVI SAD
FACULTY OF TECHNOLOGY**

KEY WORD DOCUMENTATION

Accession number:
ANO

Identification number:
INO

Document type: monographic publication
DT

Type of record: textual material, printed
TR

Contents code: PhD Thesis
CC

Author: Dragoljub D. Cvetković
AU

Menthor: Siniša L. Markov, assoc. prof., Faculty of Technology, Novi Sad
MN

Title: "Kombucha made from medical herbs - biological activity and fermentation parameters"
TI

Language of text: Serbian (roman)
LT

Language of abstract: Serbian/English
LA

Country of publication: Serbia
CP

Locality of publication: Vojvodina
LP

Publication year: 2008.
PY

Publisher: Author's reprint
PU

Publishing place: Novi Sad, Bulevar cara Lazara 1
PP

Physical description: Chapters 6, pages 86, references 143, tables 23, pictures 37, sheme 3.
PD

Scientific field: Technological engineering
SF

Scientific discipline: Technological microbiology
SD

Subject/key words: kombucha, echinacea, winter savory, starter culture, scale-up, biological activity
SX

UDK:

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

Note: none
N

Abstract:
AB

Kombucha is a traditional beverage obtained by fermenting sweetened black or green tea with tea fungus, which represents a symbiotic combination of acetic acid bacteria and autochthonous yeast species. In this study, the antimicrobial, antioxidative and antiproliferative activity of kombucha beverages (titratable acidity 3,5-4 g/L) obtain from black tea (*Camellia sinensis* L), echinacea tea (*Echinacea purpurea* L.) and rtanj tea (*Satureja montana* L.) were tested. *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus* sp., *Salmonella enteritidis*, *Proteus mirabilis*, *Escherichia coli*, *Sarcina lutea*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida pseudotropicalis*, *Rhodotorula* sp., *Penicillium aurantiogriseum*, *Aspergillus niger* i *Aspergillus flavus* were used as test microorganisms for examination of antimicrobial activity. The antioxidant activity of differently prepared kombucha beverages was examined against DPPH and OH radicals by ESR-spectrometry. Antiproliferative activity of black tea kombucha and *Satureja montana* kombucha was measured by sulforhodamine B colorimetric assay on HeLa (cervix epitheloid carcinoma), HT-29 (colon adenocarcinoma), and MCF-7 (breast adenocarcinoma) cells line. Also, same parameters of kombucha fermentation – optimal quantity of source of carbon and nitrogen in cultivation medium, geometric characteristics of reactors and inoculation by starter culture – were tested. Definition of critical parameters of kombucha fermentation is important for derivation of mathematical model for scaling-up fermentation process.

Accepted by the Scientific Board on: 6.06.2008.
ASB

Defended on: 2008.
DE

Thesis defend board:
(Degree/Names/Surname/Title/Faculty)
DB

President: dr Eva Lončar, Professor, Faculty of Technology, Novi Sad
Member dr Siniša Markov, Assist. Professor, Faculty of Technology, Novi Sad
Member: dr Jasna Čanadanović-Brunet, Professor, Faculty of Technology, Novi Sad
Member: dr Viktor Nedović, Assist. Professor, Faculty of Agriculture, Zemun.