



Doktorska disertacija

**FUNKCIONALNE KARAKTERISTIKE
FERMENTISANOG ČAJNOG NAPITKA
OBOGAĆENOG CoffeeBerry®-jem**

Mentor:
dr Dragoljub D. Cvetković

Kandidat:
mr Najmi Ahmed Essawet

Novi Sad, 2016. godine

SADRŽAJ

1.	UVOD	1
2.	PREGLED LITERATURE	3
2.1.	MIKROBIOLOŠKE KARAKTERISTIKE ČAJNE GLJIVE	3
2.1.1.	Bakterije sirćetnog vrenja	5
2.1.2.	Kvasci čajne gljive	11
2.2.	USLOVI ZA KULTIVACIJU ČAJNE GLJIVE	15
2.3.	HEMIJSKI SASTAV KOMBUHE I FUNKCIONALNA SVOJSTVA	18
2.4.	KAFA I CoffeeBerry®	22
3.	MATERIJAL I METOD RADA	31
3.1.	MATERIJAL, USLOVI KULTIVACIJE ČAJNE GLJIVE I UZORKOVANJE FERMENTACIONE TEČNOSTI	31
3.2.	ANALIZE FERMENTACIONE TEČNOSTI	32
3.3.	ISPITIVANJE ANTIMIKROBNE AKTIVNOSTI	33
3.4.	ISPITIVANJE ANTIOKSIDATIVNE AKTIVNOSTI	35
3.5.	ISPITIVANJE CITOTOKSIČNE AKTIVNOSTI ISPITIVANIH UZORAKA VARIJABILNIM MTT TESTOM U <i>in vitro</i> USLOVIMA ...	36
4.	REZULTATI I DISKUSIJA	38
4.1.	OPTIMIZACIJA SASTAVA PODLOGE ZA KOMBUHA FERMENTACIJU SA CoffeeBerry® EKSTRAKTOM	38
4.1.1.	Promene osnovnih fizičko-hemijskih i hemijskih parametara tokom kombuha fermentacije na podlozi sa CoffeeBerry® ekstraktom	38
4.1.2.	Promene mikrobioloških pokazatelja tokom kombuha fermentacije na podlozi sa CoffeeBerry® ekstraktom	42
4.1.3.	Kultivacija čajne gljive na podlozi od mešavine crnog čaja i CoffeeBerry® ekstrakta	43
4.2.	SADRŽAJ POLIFENOLNIH KOMPONENTI I HPLC ANALIZA TOKOM KOMBUHA FERMENTACIJE PODLOGE OBOGAĆENE CoffeeBerry® EKSTRAKTOM	46
4.3.	ESR SPEKTRALNA ANALIZA UTICAJA CoffeeBerry® EKSTRAKTA NA STVARANJE I TRANSFORMACIJU DPPH I HIDROKSIL RADIKALA TOKOM KOMBUHA FERMENTACIJE ...	51
4.4.	ISPITIVANJE ANTIMIKROBNE AKTIVNOSTI KOMBUHE OBOGAĆENE CoffeeBerry® EKSTRAKTOM	56
4.5.	ISPITIVANJE CITOTOKSIČNOSTI KOMBUHE OBOGAĆENE CoffeeBerry® EKSTRAKTOM	61
5.	ZAKLJUČAK	66
6.	LITERATURA	68

1. UVOD

Kombuha je napitak koji se tradicionalno priprema fermentacijom (biotransformacijom) zaslađenog crnog čaja (*Camelia sinensis* L.) pomoću čajne gljive kao radne kulture. Čajna gljiva nije gljiva u pravom smislu reči već predstavlja zajednicu bakterija sirćetnog vrenja i autohtonih vrsta kvasaca. Smatra se da je kombuha poreklom iz severoistočne Kine (Mandžurije) odakle je prenetu u Rusiju i istočnu Evropu, a sredinom XIX veka i u centralne delove Evrope. Brojni sinonimi za kombuhu (njih preko 70) upravo govore o širokoj rasprostranjenosti ovog napitka: „Kocha kinoko“, „Suancha“, „Takezutsu-sancha“, „Reishi“ (Japan), „Haipao“ (Tajvan), „Hongo“ (Nemačka), „Wolga jellyfish“, „Olinka“, „Tea kwass“ (centralna Evropa), „Japonski grib“, „Sakvasska“ (Rusija) itd. Poslednjih nekoliko decenija u zemljama zapadne Evrope i severne Amerike postoji veliko interesovanje za kombuhom kao funkcionalnim napitkom zbog njenih terapijskih svojstava, a u svetlu koncepta tzv. „zdrave hrane“.

Kombuhi se pripisuju brojna terapijska svojstva koja su pre svega zasnovana na iskustvima i svedočanstvima njenih dugogodišnjih konzumenata. Smatra se da kombuha blagotvorno deluje kod hipertenzije, arterioskleroze, dijareje, hemoroida, astme, reumatizma, da povoljno utiče na rad bubrega, da pomaže kod bolesti prostate, psorijaze, multipla skleroze, angine itd. Iako još uvek nema dovoljno naučnih dokaza o lekovitosti kombuhe, napitku se ne mogu osporiti vredna nutritivna i funkcionalna svojstva.

Kombuha se tradicionalno priprema fermentacijom zaslađenog crnog čaja, a pokušaji da se kao izvor azota u podlozi za kultivaciju čajne gljive umesto crnog ili zelenog upotrebe neki drugi čajevi bili su manje-više neuspešni. Na tržištu postoje kombuha napici sa ekstraktom papaje, aloje i različitog voća, ali je i u osnovi ovih napitaka crni čaj. Međutim, prethodna istraživanja alternativnih kombuha napitaka pokazala su da se lekovite biljke poput rtanjskog čaja (*Satureja montana* L.), ehinacee (*Ehinacea purpurea* L.) i melise (*Melissa officinalis* L.) mogu uspešno upotrebiti u podlogama za kultivaciju čajne gljive, a da tako dobijeni napici imaju poboljšane biološke karakteristike u odnosu na tradicionalnu kombuhu.

Cilj ispitivanja čiji su rezultati prikazani u ovoj doktorskoj disertaciji bio je da se ispita mogućnost dobijanja kombuha napitka od/sa CoffeeBerry® ekstraktom i utvrde njegove funkcionalne karakteristike. Upotrebljeni CoffeeBerry® ekstrakt je jedan od proizvoda koji se dobijaju CoffeeBerry® tehnologijom od integralnog zrna kafe (*Coffea arabica* L.) i koji kao takvi predstavljaju bogat izvor biološki aktivnih jedinjenja. CoffeeBerry® ekstrakt u podlogama za kultivaciju čajne gljive bi mogao da obezbede dodatne funkcionalne karakteristike kombuha napitku u poređenju sa onim pripremljenim na tradicionalan način od zaslađenog crnog čaja.

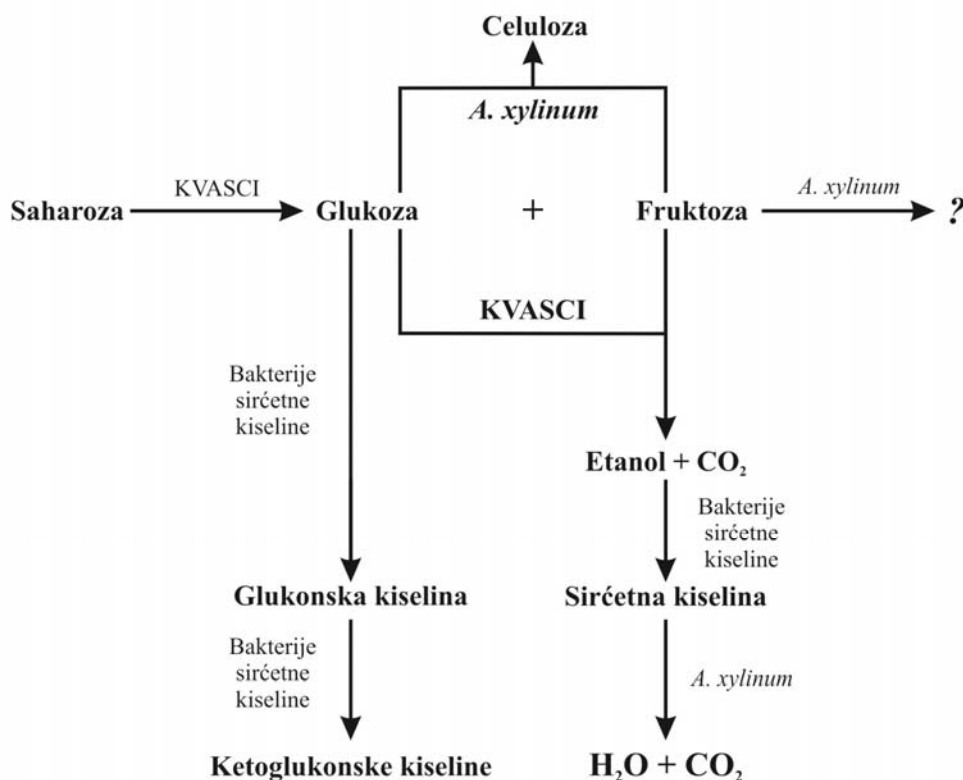
U disertaciji je nakon optimizacije sastava podloge za kultivaciju čajne gljive ispitana (*in vitro*) antioksidativna, antimikrobna i citotoksična (antiproliferativna) aktivnost kombuhe/fermentacione tečnosti obogaćene

CoffeeBerry[®] ekstraktom, kao i kvalitativni i kvantitativni sastav fenolnih jedinjenja, nosilaca biološke aktivnosti (HPLC metodom). Antioksidativna aktivnost je ispitana ESR (elektron-spin rezonantnom) spektroskopijom na reaktivne hidroksil i stabilne DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) radikale. Antimikrobna aktivnost je ispitana agar-difuzionom metodom na odabrane referentne i izolovane („divlje“) sojeve bakterija (Gram-pozitivnih i Gram-negativnih) i kvasaca. Citotoksična aktivnost uzoraka na rast odabranih ćelijskih linija: Hep2c (Human larynx carcinom), RD (Rhabdomyosarcoma) i L2OB (mišija tumorska fibroblastna linija u koju su transfektovani neki humani geni) ispitana je MTT testom. U navedenim ispitivanjima je tradicionalna kombuha dobijena od zaslađenog crnog čaja korišćena kao kontrolni uzorak.

2. PREGLED LITERATURE

2.1. MIKROBIOLOŠKE KARAKTERISTIKE ČAJNE GLJIVE

Čajna gljiva (ili kombuha kultura) predstavlja zajednicu bakterija sirćetnog vrenja (BSV) i autohtonih vrsta kvasaca čiji mikrobiološki profil zavisi od porekla kulture, tj. inokuluma za kombuha fermentaciju (Markov i sar., 2001). Glavni izvor ugljenika u podlogama za kultivaciju čajne gljive je saharoza koju same BSV ne mogu da usvoje jer nemaju mogućnost da je transportuju u ćeliju, niti da je ekstracelularno hidrolizuju (razlog je nedostatak enzima invertaze). Uloga kvasaca u čajnoj gljivi je da upravo enzimski hidrolizuju saharozu u podlozi za kultivaciju i tako je učine dostupnom i BSV (Slika 1). Nakon hidrolize kvasci čajne gljive fermentativno razlažu glukozu i fruktozu do ugljen dioksida i etanola, a BSV nastali etanol enzimski oksiduju do sirćetne kiseline koja je dominantan metabolit čajne gljive. Takođe, BSV glukozu oksiduju u glukonsku i ketoglukonske kiseline koje su posle sirćetne kiseline dominantni metabolički produkti ovih bakterija. Međutim, tačan mehanizam odnosa između kvasaca i BSV u čajnoj gljivi je još uvek nepoznat.



Slika 1. Šema osnovnog metaboličkog puta razgradnje saharoze (Sievers i sar., 1995)

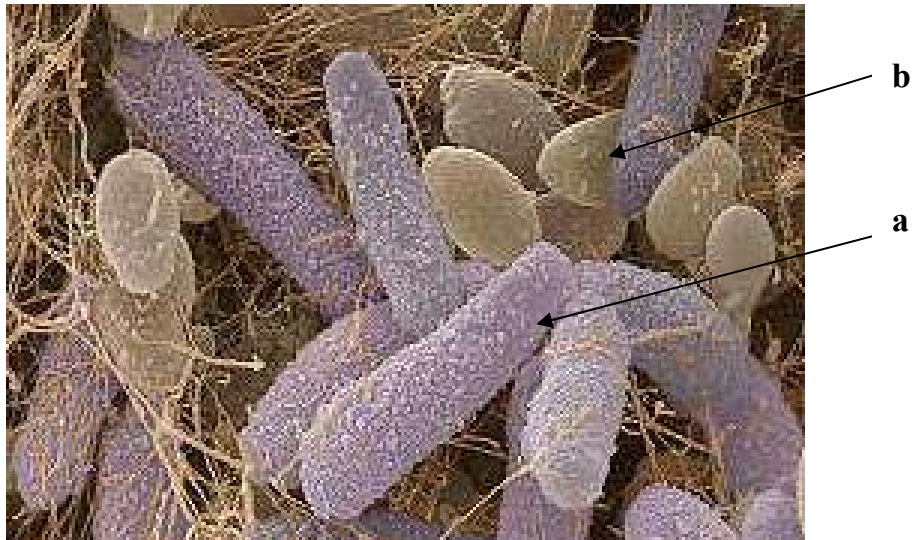
Tradicionalno se združena kultura kvasaca i BSV pogrešno naziva čajna gljiva verovatno zbog celulozne pelikule ("celuloznog biofilma" po Chakravorty i sar., 2016) (Slika 2) koja izgledom podseća na *pileus* (šešir) viših gljiva. Pelikula koju tokom kultivacije stvaraju BSV pluta po površini fermentisane tečnosti održavana ugljen dioksidom koji nastaje fermentativnom aktivnošću kvasaca.



Slika 2. Celulozna pelikula formirana tokom kombuha fermentacije

Mikroskopskim pregledom pelikule (Slika 3) 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 ćelije kvasaca (Stojanović i Janković, 1996). Pored toga, ćelije čajne gljive su raspoređene i u tečnosti ispod pelikule koja se takođe može koristiti za inokulaciju novopripremljene podloge (Chakravorty i sar., 2016).

Po navodima autora Stojanović i Janković (1996) celulozna pelikula koju stvara *Acetobacter xylinum* kao dominantna bakterija čajne gljive je debela i kožasta sa dijametrom fibrila od 25 nm.



Slika 3. Mikroskopski prikaz ćelija kvasaca (a) i bakterija sirćetnog vrenja (b) u celuloznoj pelikuli kombuhe (<http://images.search.yahoo.com>)

2.1.1. Bakterije sirćetnog vrenja

Bakterije sirćetnog vrenja (BSV) ili bakterije sirćetne kiseline su Gram pozitivne ili Gram varijabilne, nesporogene, striktno aerobne bakterije čije su ćelije elipsoidno-okruglog oblika a mogu se javiti kao samostalne, u paru ili lancima. Dužina ćelije varira od 0,8-4,5 μm dok je širina od 0,4-1 μm . Optimalna pH vrednost za rast ovih bakterija je između 5 i 6,5. BSV su mezofilni organizmi i njihova optimalna temperatura za rast je između 20 i 30 $^{\circ}\text{C}$, ali neke vrste (npr. *Acetobacter tropicalis* i *Acetobacter pasteurianus*) stvaraju sirćetnu kiselinu i na povišenim temperaturama. BSV su pokretne bakterije čije se ćelije kreću pomoću polarnih flagela i peritriha (flagele raspoređene po čitavoj površini ćelije) (De Ley i sar., 1984; Gonzales, 2005).

Taksonomija BSV još uvek nije potpuno uspostavljena i preuređivanje unutar grupe je još uvek u toku. Razlozi za ovu taksonomsku nepouzdanost su ograničena saznanja o njihovoj filogenezi, izolaciji, te teškoće koje se javljaju prilikom čuvanja pojedinih bakterijskih vrsta. Taksonomija BSV se prvobitno zasnivala na morfološkim i fiziološkim karakteristikama, a prva klasifikacija koju je predložio Hansen (1984) bazirala se na stvaranju filma u tečnoj sredini i njegovoj reakciji sa jodom. BSV su u priručniku po Bergey-u iz 1984. godine sistematizovane u dva roda: *Actobacter* i *Gluconobacter* (De Ley i sar., 1984). Danas, porodica *Acetobacteriaceae* obuhvata 12 rodova: *Acetobacter*, *Gluconobacter*, *Acidomonas*, *Gluconacetobacter*, *Asaia*, *Kozakia*, *Swaminathania*, *Saccharibacter*, *Neoasaia*, *Granulibacter*, *Tanticharoenia* i *Ameyamaea* (Tabela 1).

Tabela 1. Rodovi BSV i njihove vrste (Yamada i Yukphan, 2008)

Rod	Vrsta
<i>Acetobacter</i>	<i>A. aceti</i> , <i>A. cerevisiae</i> , <i>A. cibirongensis</i> , <i>A. estunensis</i> , <i>A. indonesiensis</i> , <i>A. lovaniensis</i> , <i>A. malorum</i> , <i>A. nitrogenifigens</i> , <i>A. oeni</i> , <i>A. orientalis</i> , <i>A. orleanensis</i> , <i>A. pasteurianus</i> , <i>A.</i> <i>peroxydans</i> , <i>A. pomorum</i> , <i>A. syzygii</i> , <i>A. tropicali</i>
<i>Gluconobacter</i>	<i>Ga. azotocaptans</i> , <i>Ga. diazotrophicus</i> , <i>Ga. entanii</i> , <i>Ga.</i> <i>europaeus</i> , <i>Ga. hansenii</i> , <i>Ga. intermedius</i> , <i>Ga. johannae</i> , <i>Ga.</i> <i>liquefaciens</i> , <i>Ga. nataicola</i> , <i>Ga. oboediens</i> , <i>Ga. rhaeticus</i> , <i>Ga.</i> <i>sacchari</i> , <i>Ga. saccharivorans</i> , <i>Ga. swingsii</i> , <i>Ga. xylinus</i>
<i>Acidomonas</i>	<i>Ac. methanolica</i>
<i>Gluconacetobacter</i>	<i>G. albidus</i> , <i>G. cerinus</i> , <i>G. frateurii</i> , <i>G. japonicus</i> , <i>G. kondonii</i> , <i>G. oxydans</i> , <i>G. roseus</i> , <i>G. sphaericus</i> , <i>G. thailandicus</i> , <i>G. wancherniae</i>
<i>Asaia</i>	<i>As. bogorensis</i> , <i>As. krungthrpensis</i> , <i>As. lannensis</i> , <i>As. siamensis</i> , <i>As. spathodeae</i>
<i>Kozakia</i>	<i>K. baliensis</i>
<i>Swaminathania</i>	<i>Sw. salitolerans</i>
<i>Saccharibacter</i>	<i>S. floricola</i>
<i>Neoasaia</i>	<i>N. chiangmaiensis</i>
<i>Granulibacter</i>	<i>Gr. bethesdensis</i>
<i>Tanticharoenia</i>	<i>T. sakaeratsensis</i>
<i>Ameyamaea</i>	<i>Am. chiangmaiensis</i>

Osnove za diferencijaciju navedenih 12 rodova BSV date su u Tabeli 2.

Tabela 2. Diferencijalne karakteristike 12 rodova BSV (Sengun i Karabiyyikli, 2011).

Karakteristika	Rodovi											
	<i>A</i>	<i>Ac</i>	<i>As</i>	<i>Ga</i>	<i>G</i>	<i>K</i>	<i>S</i>	<i>Sa</i>	<i>N</i>	<i>Gr</i>	<i>T</i>	<i>Am</i>
Flagelacija	pe/ nema	nema	pe/ nema	pe/ nema	pol./ nema	nema	pe	nema	nema	nema	nema	pol.
Oksidacija etanola u sirćetnu kiselinu	+	+	-/slabo ^a	+	+	+	+	var.	+	var.	+	+
Oksidacija sirćetne kiseline do H ₂ O i CO ₂	+	+	+	+ ^b	-	slabo	slabo	-	-	slabo	-	+
Oksidacija laktata do H ₂ O i CO ₂	+	slabo	+	+/-	-	slabo	slabo	slabo	-	+	-	slabo
Rast u podlozi sa 0,35% sirćetne kiseline	+	+	-	+	+	+	+	-	+	Nd	+	+
Rast u metanolu	- /slabo ^c	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	slabo
Rast u D-manitolu	+/-	slabo	+/-	+/-	+	+						
Rast u prisustvu 30% D-glukoze	-	-	+	+/-	-/+	-	Nd	+	+	Nd	+	-
Produkcija celuloze	-	-	-	+/-	-	-	Nd	-	Nd	Nd		
Produkcija mukozne supstance slične levanu iz saharoze	-/+	-	-	-/+	-	+	Nd	-	-	Nd	-	-
Fiksiranje molekularnog azota	-	-	-	-/+	-	-						
Ketogeneza (dihidroksi-aceton) iz glicerola	+/-	slabo	-/slabo	+/-	+	+	+	-	slabo	-	+	slabo
Proizvodnja kiseline iz D-manitola	-/+	-	+/-	+/-	+	-	-	+	slabo	-	-	-
Proizvodnja kiseline iz glicerola	-/+	-	+	+	+	+	+	-	+	var.	+	slabo
Proizvodnja kiseline iz rafinoze	-	Nd		-	-	+	Nd	-	+	Nd		
Vrsta celularnih masnih kiselina	C _{18:1}	C _{18:1}	C _{18:1}	C _{18:1}	C _{18:1}	C _{18:1}						
Tip ubikinona	Q-9	Q-10	Q-10	Q-10	Q-10	Q-10	Q-10	Q-10	Q-10	Q-10	Q-10	Q-10
Sastav DNK baza (% mol C+G)	52-60	63-66	59-61	55-66	53-63	56-57	57-60	52-53	63,1	59	66,0	65,6

A – *Acetobacter*; *Ac* – *Acidomonas*; *As* – *Asai*; *Ga* – *Gluconacetobacter*;

G – *Gluconobacter*; *K* – *Kozakia*; *S* – *Swaminathania*; *Sa* – *Saccharibacter*; *N* – *Neosai*;

Gr – *Granulibacter*; *T* – *Tanticharoenia*; *Am* – *Ameyamaea*

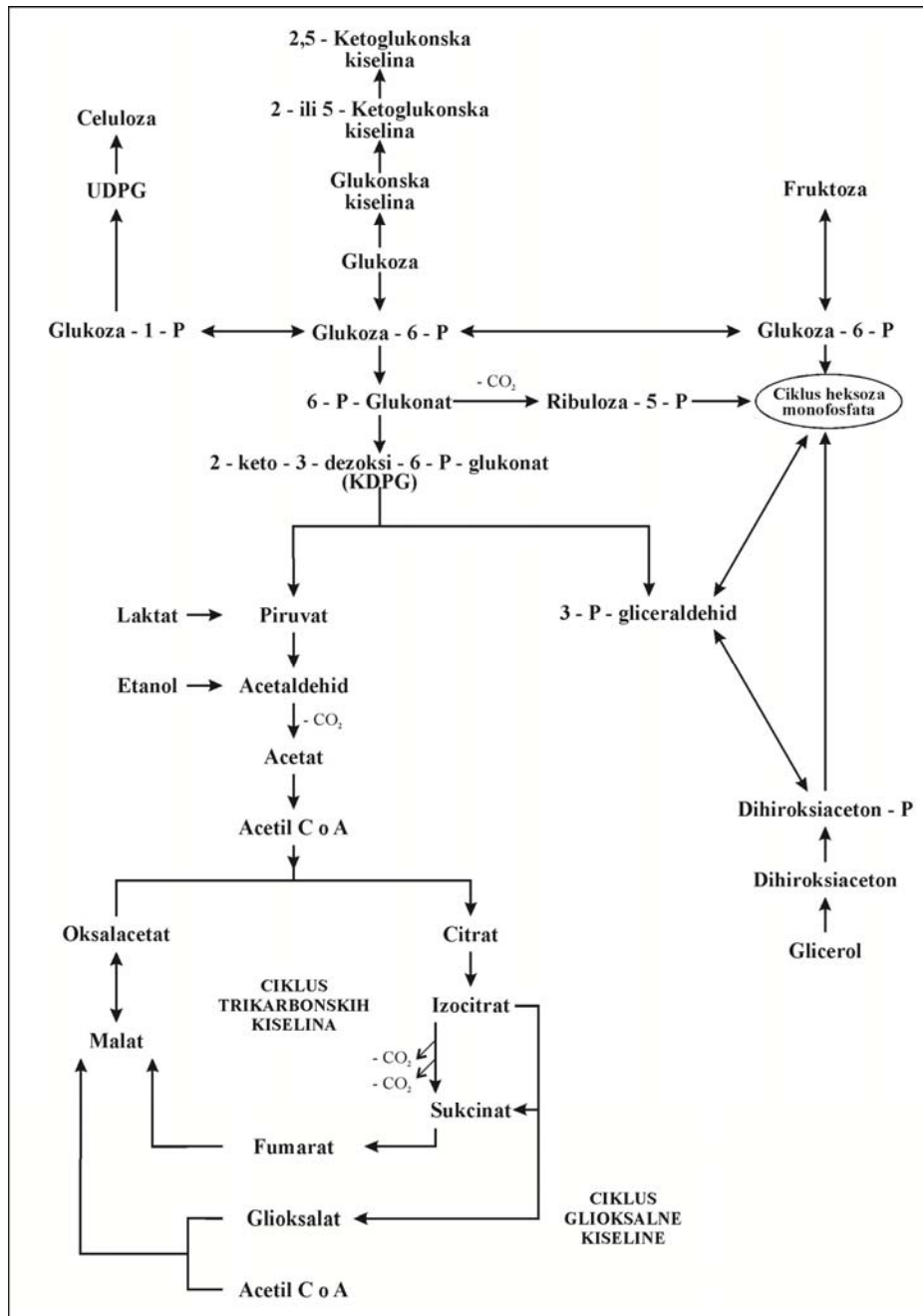
^a – *Asai* vrste ne proizvode sirćetnu kiselinu od etanola sa izuzetkom jednog soja koji to čini slabo;

^b – Potpuna oksidacija acetata do H₂O i CO₂ zavisi od koncentracije acetata u podlozi;

^c – *A. pomorum* asimiluje metanol slabo.

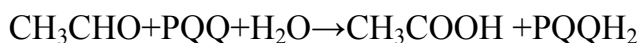
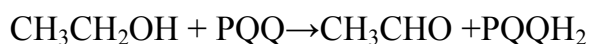
pe – peritrihe, pol. – polarno; var. – varijabilno; Nd – nije determinisano.

Osnov za razlikovanje BSV rodova *Acetobacter* i *Gluconobacter* je sposobnost bakterija roda *Acetobacter* da potpuno oksiduju acetat preko ciklusa trikarbonskih kiselina, do čega dolazi nakon što se utroši celokupan etanol u medijumu. U prisustvu etanola a putem inhibicije enzima onemogućena je dalja oksidacija sirćetne kiseline (Divies i Cachon, 1998). Vrste roda *Gluconobacter* za razliku od *Acetobacter* vrsta, iako striktni aerobi, nemaju kompletan ciklus trikarbonskih kiselina zbog nedostatka enzima α -ketoglutarat dehidrogenaza i sukcinat dehidrogenaza (Divies i Cachon, 1998) (Slika 4). Ovo je razlog zašto bakterije roda *Gluconobacter* ne mogu u potpunosti da oksiduju acetat.



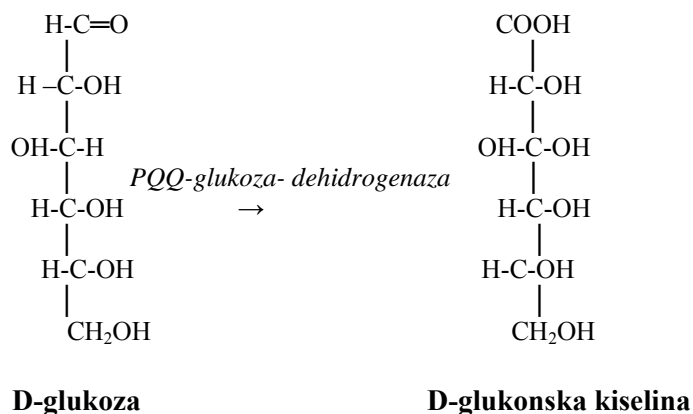
Slika 4. Sinoptička šema metabolizma jedinjenja izvora ugljenika u ćelijama BSV

Alkohol-dehidrogenaza i aldehid-dehidrogenaza su dva enzima koji imaju ulogu u procesu oksidacije etanola metaboličkom aktivnošću bakterija sirćetnog vrenja. Alkohol-dehidrogenaza roda *Acetobacter* je stabilnija u kiselim uslovima od alkohol-dehidrogenaze roda *Gluconobacter* što objašnjava činjenicu da vrste roda *Acetobacter* stvaraju više sirćetne kiseline (Matsushita i sar., 1994). Proces oksidacije etanola u sirćetnu kiselinu katalizuju membranske PQQ-zavisna alkohol-dehidrogenaza (ADH) i PQQ-zavisna aldehid-dehidrogenaza (ALDH) (PQQ-zavisine alkohol i aldehid-dehidrogenaze kao prostetsku grupu imaju pirolhinolin hinon) (Matsushita i sar., 1994). Ovi enzimi se nalaze na spoljašnoj strani citoplazmine membrane i katalizuju reakcije u periplazmatičnom prostoru. Alkohol i aldehid-dehidrogenaze su usko povezane sa respiratornim lancem BSV kojim se elektroni prenose do kiseonika kao krajnjeg akceptora. Tok oksidacije etanola je takav da prvo alkohol-dehidrogenaza oksiduje etanol u acetaldehid, a zatim aldehid-dehidrogenaza oksiduje acetaldehid u sirćetnu kiselinu. Reakcija se odvija prema sledećem mehanizmu:

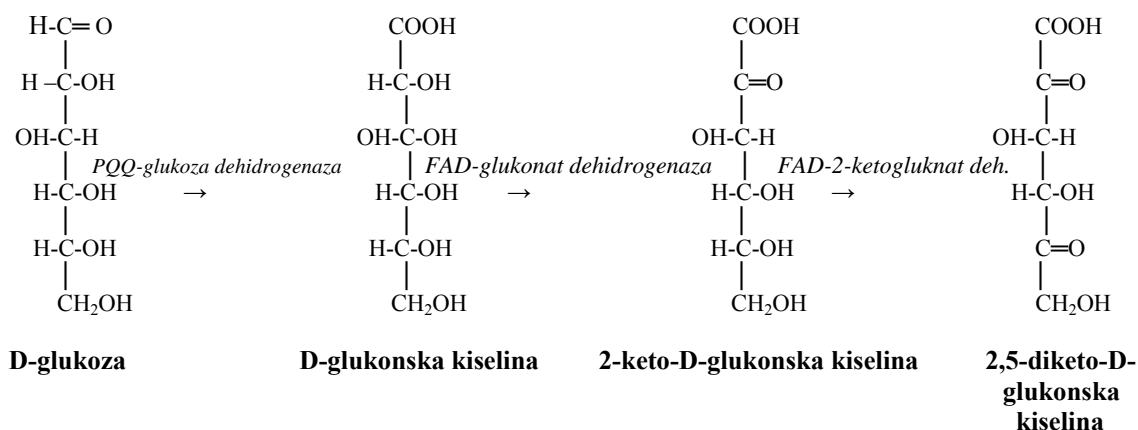


Kao akceptor vodonika služi PQQ koji dalje ima ulogu u prenosu elektrona. Elektroni se prvo prenose do ubihinona, sa ubihinona na ubihinon-oksidadu, a zatim do kiseonika kao krajnjeg akceptora.

BSV mogu da usvoje različite ugljene hidrate kao izvore ugljenika. Vrste roda *Gluconobacter* uglavnom koriste šećer kao izvor ugljenika jer mogu dobiti energiju iz šećera metabolisanog preko pentoza-fosfatnog puta. BSV glukozu oksiduju preko dva alternativna puta; prvi se dešava unutar ćelije i njime se glukozu oksiduje upravo preko pentoza-fosfatnog puta, a kao krajnji produkti nastaju gliceraldehid-3-fosfat i fruktoza-6-fosfat koji se dalje uključuju u proces glikolize. Drugi put se dešava izvan ćelije i uključuje stvaranje glukonske i ketoglukonske kiseline (Kulka i Walker, 1954; Olijve i Kok, 1979 u Sengun i Karabiyikli, 2011) i naziva se još i "put direktne oksidacije glukoze". Direktnu oksidaciju D-glukoze u D-glukonsku kiselinu (D-glukonat) katalizuje membranska glukozu-dehidrogenaza, enzim koji kao prostetsku grupu ima PQQ, sa optimalnom vrednošću pH za kataličko delovanje oko 6.



D-glukonska kiselina koja nastaje direktnom oksidacijom glukoze kod vrsta *Gluconobacter* (*Gluconobacter oxydans*) se uz pomoć flavin-adenin-dinukleotid (FAD)-zavisne glukonat dehidrogenaze prevodi u 2-keto-D-glukonsku kiselinu, koja se dalje pod kataličkim delovanjem FAD-2-ketoglukonat dehidrogenaze prevodi u 2,5-diketo-D-glukonsku kiselinu, koja ima ulogu u sintezi L-askorbinske kiseline.



Dekstrani, levani i celuloza su najvažniji egzopolisaharidi koji nastaju iz glukoze metaboličkom aktivnošću BSV. Sposobnost sinteze celuloze primećena je kod vrste *Acetobacter xylinum* koja je kasnije reklasifikovana u *Gluconacetbacter xylinus* (Yamada, 2000; Sievers i Swings, 2005). Bakterijska celuloza je nerazgranati polimer sastavljen od glukoznih ostataka koji su β -1-4 glikozidnim vezama povezani u β -1-4 glukan lance. Stvoreni lanci čine mikrovlakna koja spadaju u najtanja prirodna vlakna. Prvi korak u sintezi celuloze je stvaranje uridin-difosfat-glukoze (UDPGlc) koja ima ulogu prekursora reakcije sinteze celuloze. Uridin-difosfat-glukoza nastaje fosforilacijom glukoze u glukoza-6-fosfat u prisustvu UTP (uridin-trifosfata) pomoću glukokinaze. Nastala glukoza-6-fosfat se pod kataličkim delovanjem fosfoglukomutaze izomerizuje u glukoza- α -1-fosfat koja pomoću UDP-glukoza pirofosforilaze prelazi u uridin-difosfat-glukozu. Nastala UDP-glukoza služi kao supstrat za delovanje enzima celulaze. Dva molekula UDP-glukoze se vezuju za "katalitički džep" enzima celulaze tako da su glukozne grupe oba supstrata postavljene 180° jedna u odnosu na drugu. Za ove glukozne grupe se β -1-4 glikozidnim vezama vezuju glukozne rezidue formirajući na taj način β -1-4 glukan lance. Jedna ćelija *A. xylinum* može da polimerizuje čak 200.000 glukoznih ostataka u β -1-4 glukan lance u toku jedne sekunde po sledećem mehanizmu:



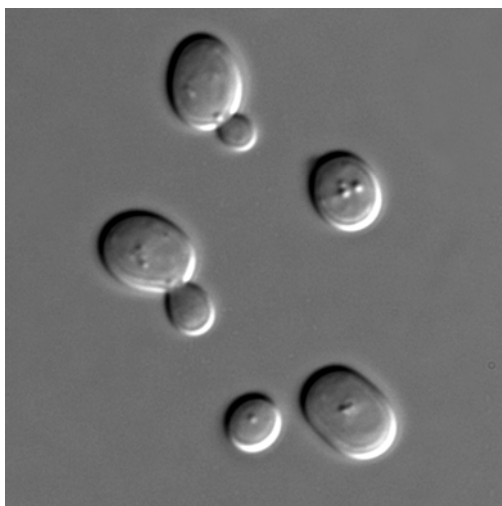
Pregledom literature o kombuhi i mikrobiološkom profilu čajne gljive može se konstatovati da u kulturama dominiraju sledeće vrste rodova *Acetobacter* i *Gluconobacter*: *A. xylinum*, *A. aceti*, *A. pasteurianus* i *G. oxydans* (Konovalov i Semenova, 1955; Sievers i sar., 1995; Greenwalt i sar., 2000). Liu i sar. (1996) su iz čajne gljive lokalnog naziva „Haipao” izolovali dva soja Gram-negativnih bakterija koja su potpuno oksidovala laktat i acetat do ugljen dioksida i proizvela sirćetnu kiselinu iz etanola. Na osnovu ovih fizioloških karakteristika i dodatnim ispitivanjem biohemijjskih karakteristika, bakterijski sojevi izolovani iz čajne gljive su identifikovani kao - *Acetobacter aceti* i *Acetobacter pasteurianus*. *Acetobacter xylinum* koji po važećoj taksonomiji vrsta nosi naziv *Gluconacetobacter xylinus* (<http://www.atcc.org>) je po literaturnim podacima dominantna bakterija u celuloznoj pelikuli i fermentisanoj tečnosti kombuhe. Ova vrsta je odgovorna za sintezu sirćetne kiseline i glukonske kiseline i celuloze iz izvora ugljenika tokom kultivacije čajne gljive (Greenwalt i sar., 2000).

Chakravorty i sar. (2016) su ustanovili da su bakterije familije Acetobacteriaceae dominantne kako u celuloznom biofilmu (88,5%) tako i u fermentisanoj tečnosti (63,5%). Vrste rodova *Komagataeibacter* i *Gluconobacter* bile su dominantne; *Komagataeibacter* sp. su bile zastupljene sa 50,3% u biofilmu i 49,9% u tečnosti, dok je zastupljenost *Gluconobacter* sp. bila 16,8%, odnosno 49,9%.

U čajnoj gljivi kojom raspolaže Odeljenje za mikrobiologiju Tehnološkog fakulteta u Novom Sadu, a koja je kao radna kultura korišćena u ovom radu su PCR (Polimerase Chain Reaction) metodom, tačnije digestijom PCR produkata sa restrikcionim enzimima, identifikovana dva soja BSV: *Gluconobacter oxydans* i *Gluconacetobacter hansenii* (sinonim *Acetobacter hansenii*) (Velićanski, 2012).

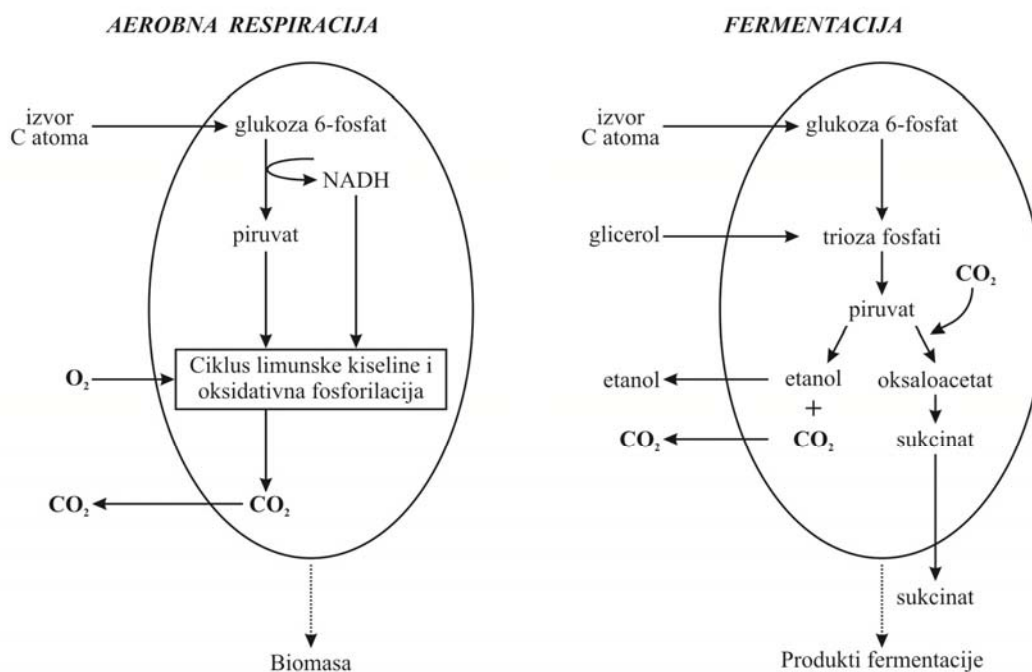
2.1.2. Kvasci čajne gljive

Kvasci su ubikvitarni mikroorganizmi i predstavljaju nefilamentozne, jednoćelijske gljive, čije su ćelije u obliku elipse sa prosečnom veličinom 6–3 µm (Slika 5). Oblik i veličina mogu znatno varirati od vrste i sredine u kojoj se razvijaju. Po svojim fiziološkim karakteristikama kvasci su fakultativno anaerobni mikroorganizmi sa temperaturnom valencom za njihov rast u opsegu od 15-30°C. Osetljivi su na povišene temperature, a blago kisela sredina (vrednosti pH između 4 i 6) pogoduje razvoju ćelija.



Slika 5. Mikrofotografija kvasca *Saccharomyces cerevisiae*
(<http://www.bing.com/images>)

Rast ćelija kvasaca je pod striktno anaerobnim uslovima minimalan, a reprodukcija ćelija je ograničena na nekoliko generacija, dok je fermentativna aktivnost maksimalna. U ovakvim okolnostima dominantni produkti metaboličke aktivnosti ćelija su etanol i ugljen dioksid (Slika 6). Prisustvo kiseonika u sredini s druge strane stimuliše umnožavanje ćelija kvasaca i produkciju biomase. Međutim, alkoholna fermentacija kvascima je moguća i pod aerobnim uslovima ukoliko je koncentracija D-glukoze u podlozi veća od 9 g/L, što je fenomen poznat pod nazivom Crabtree efekat (Barnett, 1997). Ovaj fenomen je zapažen kod većine vrsta rodova *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Debaryomyces*, *Brettanomyces*, *Torulopsis*, *Nematospora* i *Nadsonia*. Povećana koncentracija glukoze pospešuje glikolizu što rezultira produkcijom značajne količine ATP-a samom fosforilacijom supstrata. Ovim je redukovana potreba za oksidativnom fosforilacijom kroz ciklus trikarbonskih kiselina, što dovodi i do smanjenja potrošnje kiseonika.



Slika 6. Šema glavnih kataboličkih puteva u ćeliji kvasca (Walker, 1998 u Cvetković, 2008)

Početni korak u metabolizmu saharoze u ćeliji kvasca je eksternalna enzimaska hidroliza ovog disaharida pomoću enzima invertaze koji se kod većine kvasaca nalazi sa spoljašnje strane osnovne ćelijske membrane. Nakon usvajanja molekula D-glukoze u ćeliji kvasca dolazi do njene razgradnje do pirogroždane kiseline nizom biohemijskih reakcija koje su poznate pod nazivom glikoliza (poznata i kao Emben-Meyerhof-Parnasov put). Dalji tok razgradnje pirogroždane kiseline određuje krajnji akceptor elektrona; kada je akceptor elektrona kiseonik odvija se respiracija uz razlaganje pirogroždane kiseline u ciklusu trikarbonskih kiselina (Slika 6). U slučaju fermentacije pirogroždana kiselina se dekarboksilira u acetaldehid delovanjem piruvat-dekarboksilaze, a nastali acetaldehid se redukuje u etanol delovanjem enzima alkoholdehidrogenaze uz prisustvo koenzima NADH. Tokom alkoholne fermentacije pored etanola formira se i ugljen dioksid, a markiranjem ugljenikovih atoma u molekulu glukoze ustanovljeno je da prvi i drugi C-atom glukoze daju jedan molekul etanola, dok drugi molekul etanola nastaje od petog i šestog C-atoma. Od trećeg i četvrtog C-atoma molekula glukoze nastaju dva molekula ugljen dioksida. Glikolizom se razgrađuje i fruktoza uz formiranje fruktozo-fosfata kao početnog intermedijera koji se preko D-fruktozo-6-fosfata uključuje u put glikolize ili alternativno u pentozni ciklus (Barnett, 1976 i Barnett, 1981 u Cvetković, 2008).

Teoh i sar. (2004) su pokazali da fermentaciju podloge za kultivaciju čajne gljive započinju osmotolerantni kvasci - *Schizosaccharomyces pombe*,

Torulospora delbrueckii i *Zygosaccharomyces bailii*. Tokom fermentacije i metaboličke aktivnosti kvasaca i BSV dolazi do povećanja sadržaja kiselina u tečnosti. Ovo dovodi do smanjenja broj ćelija onih vrsta kvasaca prisutnih u čajnoj gljivi a koje su osjetljivije na kiseline, tako da dominaciju preuzimaju acidotolerantni kvasci poput *Zygosaccharomyces bailii*. *Candida stellata* je takođe kvasac koji toleriše veće količine sirćetne kiseline i koji je izolovan tokom kombuha fermentacije (Teoh i sar., 2004).

Mayser i sar. (1995) su ispitivanjem ukupno 34 uzorka kombuhe sa teritorije Nemačke utvrdili da su kvasci rodova *Brettanomyces*, *Zygosaccharomyces* i *Saccharomyces* najdominantniji, dok su Liu i sar. (1996) iz uzoraka tajvanske kombuhe poznate kao „Haipao“ izolovali vrste *Saccharomyces cerevisiae*, *Zygosaccharomyces bailii* i *Brettanomyces bruxellensis*. *Saccharomyces cerevisiae* je sigurno najpoznatiji kvasac od velikog značaja za pekarsku industriju, industriju piva, vina i alkohola. U prirodi se kvasci ove vrste nalaze na voću i njihovim razvojem i aktivnošću dolazi do spontane alkoholne fermentacije. *Zygosaccharomyces bailii* je kvasac poznat po sposobnosti da produkuje veće količine sirćetne kiseline prema kojoj pokazuje značajnu tolerantnost. Po navodima Barnett i sar. (2000) ovaj kvasac je sposoban da toleriše koncentraciju sirćetne kiseline i od 20 g/L. Vrste roda *Brettanomyces* su takođe kvasci koji se veoma lako prilagođavaju uslovima sredine kakva je podloga za kombuha fermentaciju (Mayser i sar., 1995).

Roussin (1996) je ustanovio da su kvasci *Saccharomyces cerevisiae* i *Zygosaccharomyces* spp. tipični za kombuha napitke koji su poreklom sa teritorije Severne Amerike.

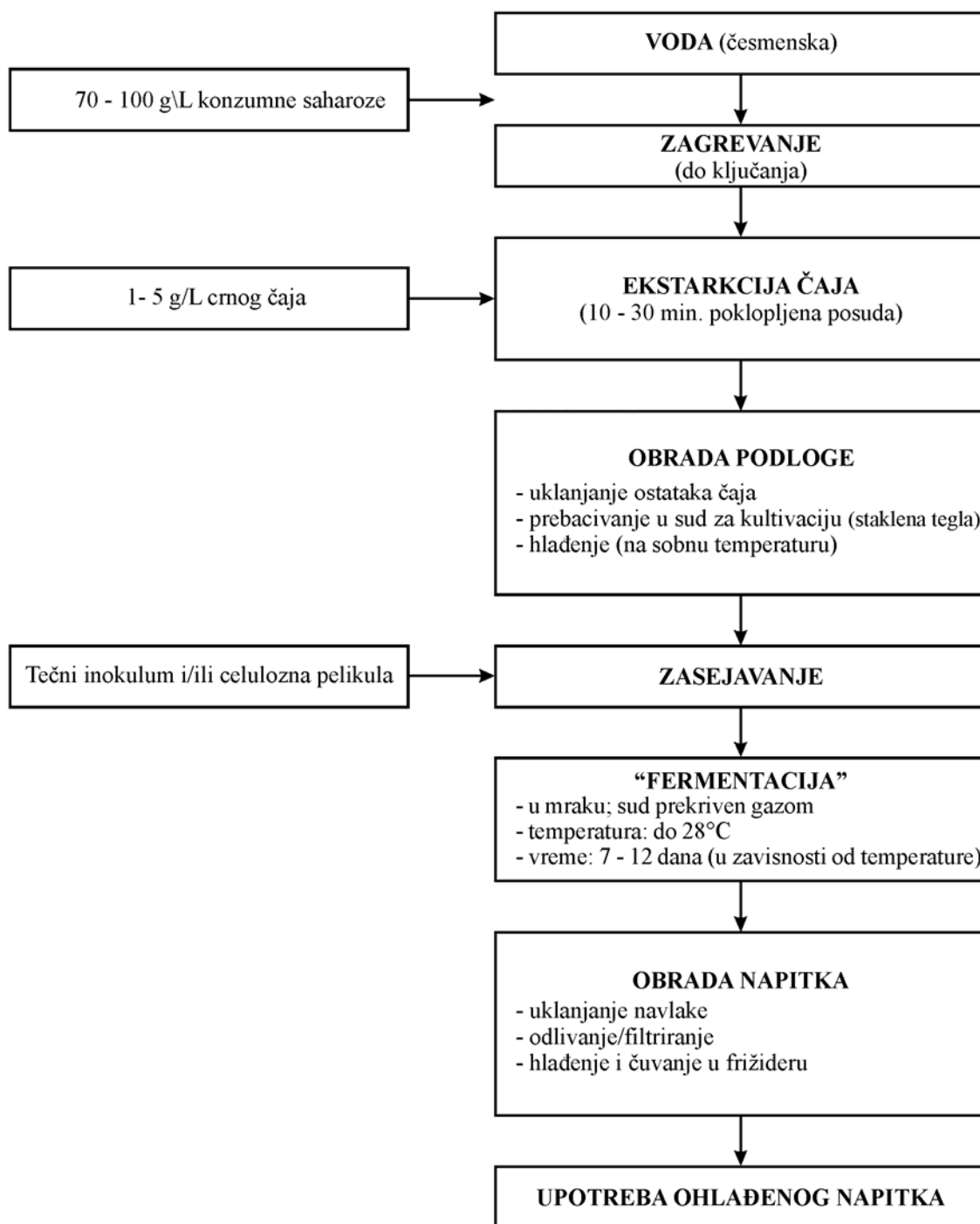
Chakravorty i sar. (2016) su ispitujući mikrobiološke i biohemijske karakteristike kombuha fermentacije konstatovali su dominaciju kvasaca roda *Candida* što nije u skladu sa rezultatima drugih autora po kojima su dominantni kvasci rodova *Zygosaccharomyces* i *Saccharomyces*. Tako rezultati Marsh i sar. (2014) koje su citirali Chakravorty i sar. (2016) pokazuju dominaciju *Zygosaccharomyces* vrsta u preko 95% fermentisanih napitaka. Dominacija kvasaca roda *Candida* je po prvu put zabeležena u radu Chakravorty i sar. (2016), koji pored toga u ispitanim uzorcima nisu ni identifikovali kvasce roda *Zygosaccharomyces*, dok je zastupljenost *Saccharomyces* spp. bila na niskom nivou. Chakravorty i sar. (2016) veruju da komparativna transkripciona analiza različitih kombuha sistema može dati korisne informacije vezano za razlike u kompoziciji kombuha kultura.

U čajnoj gljivi koja je kao radna kultura korišćena u ovom radu potvrđeno je prisustvo: *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces ludwigii*, *Saccharomyces bisporus*, *Torulopsis* sp. i *Zygosaccharomyces* sp. (Markov i sar., 2001).

2.2. USLOVI ZA KULTIVACIJU ČAJNE GLJIVE

Tradicionalno se kao supstrat za kultivaciju čajne gljive koristi saharozom zaslađeni crni čaj. Bilo je pokušaja da se saharoza kao izvor ugljenikovih atoma zameni nekim drugim ugljenim hidratom (fruktozom, maltozom, laktozom i dr), ali to nije dalo željene rezultate. Korišćenje meda u podlogama za kultivaciju čajne gljive nije dalo željene rezultate jer su neke njegove aktivne supstance uticale na mikrobiološki sastav čajne gljive (Frank, 1995).

Podloga za kultivaciju čajne gljive obično sadrži 50-100 g/L saharoze i 3-5 g/L crnog čaja. Ovaj zaslađeni crni čaj se inokuliše čajnom gljivom (celuloznom pelikulom) ili delom fermentisane tečnosti (napitka) iz prethodne kultivacije koja se obično dodaje u količini od 10% (v/v) (Slika 7). Fermentacija obično traje 7-10 dana na temperaturi od 25-28°C u mraku, bez mešanja. Kako UV zraci nepovoljno deluju na kulturu kombuhe, nju je tokom inkubacije potrebno zaštititi od direktne izloženosti sunčevoj svetlosti (Divies i Cachon, 1998). Za kultivaciju čajne gljive koriste se stakleni ili porcelanski sudovi (zbog njihove inertnosti i otpornosti na kiseline) sa širokim otvorom kako bi se obezbedile dovoljne količine kiseonika neophodnog BSV kao striktnim aerobima. Otvor suda za kultivaciju treba prekriti gazom (Slika 8) da bi se sprečila kontaminacija organizmima iz okoline, a pre svega ulazak u posudu sirćetne/vinske mušice (*Drosophila melanogaster*). Treba izbegavati upotrebu plastičnih i metalnih sudova zbog moguće reakcije pre svega sa sirćetnom kiselinom nastalom tokom kultivacije čajne gljive.

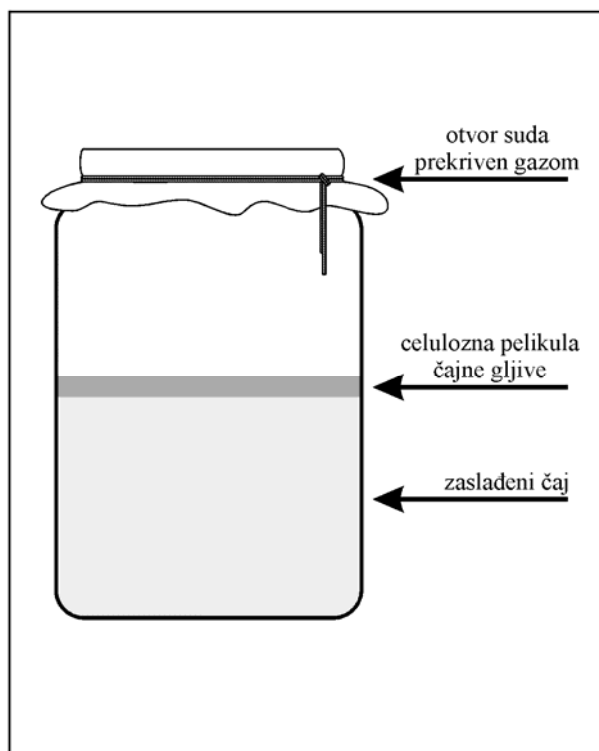


Slika 7. Šema pripreme kombuha napitka

Reiss (1994) je ispitujući uticaj različitih koncentracija (50-150 g/L) saharoze, laktoze, glukoze i fruktoze na metabolizam čajne gljive ustanovio da postoji značajan uticaj navedenih izvora ugljenika na produkciju etanola i mlečne kiseline. Rezultati Blanc (1996) koji je ispitivao uticaj različitih koncentracija saharoze (50, 70 i 100 g/L) na sadržaj etanola, sirćetne, mlečne, glukonske i glukuronske kiseline u kombuhi se nešto razlikuju od onih koje je publikovao

Reiss (1994), što se objašnjava različitim gljivama koje su korišćene kao radne kulture u navedenim istraživanjima.

Zbog zaostale količine saharoze (kao primarnog izvora ugljenika) u napitku po okončanju fermentacije, glukoze i fruktoze (nastalih enzimskom hidrolizom saharoze tokom kultivacije), kombuha napitak pripremljen na tradicionalan način nije prihvatljiv za dijabetičare. U tom smislu se kao alternativni izvor ugljenikovih atoma nameće polifruktozan inulin i topinambur kao njegov izvor (Malbaša, 2000).



Slika 8. Sud za kultivaciju čajne gljive

Čaj u podlozi za kultivaciju obezbeđuje čajnoj gljivi neophodna jedinjenja – pre svih izvore azota, vitamine, mikroelemente i dr. Kao izvori azota od posebnog značaja su purinska jedinjenja čaja – kofein i teofilin, važna za sintezu nukleinskih kiselina (Frank, 1995). Prema Del Rio i sar. (2004) u infuzumu crnog čaja (sadržaj čaja je bio 55 g/L) od fenolnih jedinjenja je dominantna galna kiselina sa sadržajem od 125 mg/L infuzuma, dok su količine katehina i epikatehina približno jednake i iznose 11 mg/l, odnosno 12 mg/L. Velićanski (2012) je ispitujući sadržaje fenolnih jedinjenja u infuzumu crnog čaja registrovala katehin kao dominantnu komponentu koja je prisutna u količini od oko 40 puta višoj od epikatehina.

Rezultati su pokazali da se zeleni čaj veoma uspešno može koristiti u podlogama za kultivaciju čajne gljive dajući napitak veće kiselosti u odnosu na

onaj dobijen od zaslađenog crnog čaja, za isto vreme kultivacije (Greenwalt i sar., 1998). Razlog za bržu transformaciju podloge sa zelenim čajem je gotovo dvostruko veća količina purinskih jedinjenja u zelenom čaju u odnosu na crn, što stimulatивно deluje na mikroorganizme čajne gljive.

Biljni čajevi kao što su čaj od nane, lipe, šipka i dr., ne sadrže dovoljne količine purinskih jedinjenja od značaja za čajnu gljivu što je glavni razlog zašto se oni koriste u kombinaciji sa crnim čajem. Međutim, rezultati istraživanja su pokazali da se uspešno se kao izvori azotnih jedinjenja u podlozi za kultivaciju čajne gljive mogu koristiti rtański čaj (*Satureja montana* L.) i ehinacea (*Echinacea purpurea* L.) (Cvetković, 2008), kao i matičnjak (*Melissa officinalis* L.) (Velićanski, 2012). Upotrebom ovih lekovitih biljaka dobijaju se napici poboljšanih funkcionalnih karakteristika što potvrđuju rezultati ispitivanja antioksidativnih svojstava ovih alternativnih napitaka u odnosu na tradicionalno pripremljenu kombuhu od crnog čaja.

2.3. HEMIJSKI SASTAV KOMBUHE I FUNKCIONALNA SVOJSTVA

Kombuha je nutritivno vredan napitak kompleksnog hemijskog sastava koga sa jedne strane čine metaboliti čajne gljive, a sa druge jedinjenja koja su poreklom iz same podloge za kultivaciju. Usled sadržaja sirćetne kiseline kao primarnog metabolita čajne gljive i CO₂, napitak je kiselog ukusa i umereno gaziran. Pored sirćetne u napitku su prisutne i druge organske kiseline: glukonska, glukuronska, vinska, ćilibarna, jabučna, limunska, oksalna, malonska (Reiss, 1987). Sadržaj etanola u fermentisanom napitku je uglavnom manji od 5 g/L što kombuhu svrstava u red bezalkoholnih napitaka po normativima Republike Srbije. U napitku su identifikovani i vitamini B₁, B₂, B₆, B₁₂ i C, enzimi (invertaza, amilaza, katalaza) i komponente ekstrahovane iz crnog čaja (katehini, teaflavini, flavonoli)(<http://www.psorijazalecenjeidetoksikacija.com/index>). Bauer-Petrovska i Petruševska-Tozi (2000) su određujući sadržaj mineralnih elemenata Mn, Fe, Ni, Cu, Zn, Pb, Co, Cr i Cd u kombuhi utvrdili da su navedeni elementi prisutni u količinama od 0,462 µg/mL (Mn) do 0,001 µg/mL (Cr), pri čemu u napitku nije detektovan Cd.

Sirćetna kiselina je dominantna organska kiselina u fermentisanoj tečnosti i napitku koja nastaje enzimskom oksidacijom etanola (koga proizvode kvasci čajne gljive) tokom fiziološke aktivnosti BSV. Sadržaj sirćetne kiseline se kontinuirano povećava tokom kultivacije čajne gljive. U istraživanju Sievers i sar. (1995) sadržaj sirćetne kiseline u fermentisanoj podlozi nakon deset dana kultivacije je dostigao vrednost od 2,1 g/L, nakon dvadeset dana 5,8 g/L, nakon trideset 13,1 g/L, a posle četrdeset dana inkubacije 28,4 g/L.

Cvetković (2003) je senzornom analizom utvrdio da se petodnevnom kultivacijom lokalne čajne gljive na podlozi od zaslađenog crnog čaja dobija

napitak optimalnih senzornih karakteristika. Ukupna titrabilna kiselost ovog napitka je između 3,5 i 4 g/L, a njegova vrednost pH je oko 3,2, pri čemu je pokazano da je ključni parametar fermentacije zapravo titrabilna kiselost napitka a ne vrednost pH napitka, odnosno, fermentisane tečnosti, imajući u vidu njen puferski kapacitet i efekat suzbijanja disocijacije slabih organskih kiselina (Cvetković, 2008).

Glukonska kiselina koja nastaje oksidacijom glukoze na ćelijskoj membrani BSV je po zastupljenosti druga organska kiselina u kombuhi. Međutim, moguće je da nakon višenedeljne kultivacije čajne gljive sadržaj glukonske kiseline u fermentisanoj tečnosti bude i veći od sadržaja sirćetne kiseline (Sievers i sar., 1995; Sreeramulu i sar., 2000). Razlog limitirane sinteze sirćetne kiseline tokom dužeg trajanja kombuha fermentacije je smanjenje fermentativne aktivnosti kvasaca usled nepovoljnih uslova sredine (visoka kiselost i nedostatak izvora ugljenika) što rezultira smanjenjem produkcije etanola.

Pojedini autori su detektovali prisustvo glukuronske kiseline u kombuhi kao veoma važno jedinjenje imajući u vidu njen detoksikacioni efekat (Lončar, i sar., 2000; Dufresne i Farnworth, 2000). Naime, ova kiselina je sposobna da toksine prisutne u organizmu vezuje u formi glukuronida koji se zatim putem mokraće izbacuju iz organizma. Istraživanja pokazuju da je u urinu osoba koje konzumiraju kombuhu nesporno prisutan visok nivo glukuronida i dok jedni istraživači ovo objašnjavaju prisustvom glukuronske kiseline u napitku, drugi ovaj detoksikacioni efekat kombuhe pripisuju 1,4-saharolaktonu (Roussin, 1999).

Sadržaj etanola u fermentisanoj tečnosti tokom kultivacije čajne gljive prema većini autora ne prelazi koncentraciju od 10 g/L, čak i u slučaju dugotrajne kultivacije čajne gljive kojom se dobija napitak kiselosti znatno veće od konzumne. Tako su Sievers i sar. (1995) u podlozi sa početnom količinom saharoze od 70 g/L nakon trideset dana fermentacije detektovali 7 g/L etanola. Reiss (1994) je ispitivao uticaj saharoze, laktoze, glukoze i fruktoze na metabolizam čajne gljive, pri čemu je ustanovio da se najveća količina etanola (6,3 g/L) dobija u podlozi sa početnih 50 g/L saharoze i to nakon deset dana fermentacije. Cvetković (2003) je tokom sedmodnevne kultivacije čajne gljive na tradicionalnoj podlozi utvrdio da postoji linearna zavisnost između sadržaja etanola u transformisanoj podlozi i vremena kultivacije. Količina etanola u napitku dobijenom nakon pet dana kultivacije nije bila veća od 5 g/L.

Količina saharoze, glukoze i fruktoze koja zaostaje u fermentisanoj tečnosti, odnosno napitku po završenoj fermentaciji je različita, a zavisi od početne količine saharoze u podlozi za kultivaciju, dužine trajanja fermentacije i proizvodnih karakteristika čajne gljive. 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. Sievers i sar. (1995) su u fermentisanoj tečnosti nakon 10 dana kultivacije čajne gljive na podlozi sa saharozom detektovali 18,2 g/L saharoze, 28,8 g/L glukoze i 16,4 g/L fruktoze (početna količina saharoze bila je 70 g/L).

Izvesna odstupanja u sadržaju metabolita čajne gljive generalno su očekivana, a što je u vezi sa poreklom čajne gljive koja je korišćena kao radna kultura i njenim proizvodnih karakteristika. Pored toga, ne postoje ni definisani (standardizovani) uslovi za kultivaciju čajne gljive, niti definisane metode određivanje glavnih sastojaka napitka, što takođe treba imati na umu prilikom poređenja rezultata različitih autora.

U literaturi ima podataka da se redovnim konzumiranjem kombuhe postiže poboljšanje opšteg stanja organizma. Neki od terapijskih efekata koji se pripisuju kombuhi su:

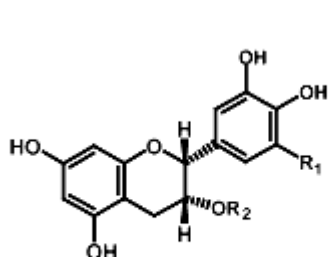
- njena antimikrobna aktivnost koja se vezuje za prisustvo sirćetne kiseline koja delimično konzervira sredinu i onemogućava razvoj drugih mikroorganizama; antimikrobna svojstva kombuhe se pored sirćetne kiseline pripisuju i usninskoj kiselini koja je poznati prirodni antibiotik;
- detoksikacioni efekat zahvaljujući prisustvu glukuronske kiseline koja u organizmu vezuje toksične organske supstance gradeći O-glukuronide koji se lako izlučuju iz organizma preko bubrega;
- glukozamini koji se nalaze u napitku podstiču proizvodnju hijaluronske kiseline koja ublažava bol izazvan artritismom;
- pozitivno dejstvo na nervni sistem objašnjeno je prisustvom vitamina B kompleksa;
- ostali terapijski efekti su: sposobnost regulacije gastrointestinalne aktivnosti, pozitivni dejstvo na nivo holesterola u krvi, arteriosklerozu i olakšavanje tegoba u slučaju hemoroida, snižava nivo glukoze u krvi kod pacijenata koji pate od dijabetesa, pomaže kod slučajeva astme, kašlja, bronhitisa, pomaže kod ljudi sa alergijama, pomaže u jačanju kose (<http://www.conopljanews.net/kombuha.html>).

Prva naučna istraživanja terapijskih svojstava kombuhe urađena su u Rusiji početkom prošlog veka koja su potvrdila efikasnost kombuhe kod glavobolja, gastričnih smetnji i regulisanja intestinalne aktivnosti. Istraživanja sprovedena između 1925. i 1950. godine su potvrdila antibiotska svojstva kombuhe, njenu sposobnost regulacije gastrointestinalne i glandularne aktivnosti, snižavanja nivoa holesterola u krvi, olakšavanja tegoba osobama obolelim od artritisa, arterioskleroze i hemoroida, kao i pozitivno delovanje na nervni sistem i usporavanje procesa starenja (Allen, 1998 u Cvetković, 2008).

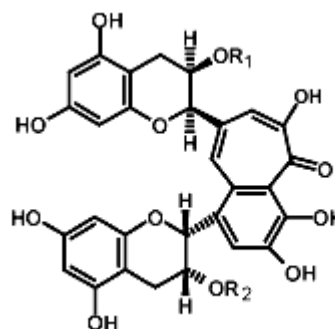
Istraživanja tokom 60-tih godina XX veka su pokazala antikancerogeno delovanje kombuhe koje je dovedeno u vezu sa aktiviranjem produkcije interferona, proteina koga stvaraju ćelije imunostistema, a koji deluju na viruse, parazite i kancerogene ćelije (Dufresne i Farnworth, 2000). Međutim, većina terapijskih efekata kombuhe se objašnjava antioksidativnom i detoksikacionom aktivnošću napitka. Detoksikaciona svojstva kombuhe se dovode u vezu sa prisutnim organskim kiselinama, pre svih glukuronskom kiselinom koja je poznati detoksikacioni agens.

U literaturi postoje izvesni podaci o antioksidativnoj aktivnosti kombuhe, o aktivnim komponentama napitka i mehanizmima njihovog delovanja. Pretpostavlja se da antoksidativna aktivnost napitka potiče jednim delom od

supstanci koje su ekstrahirane iz čaja (crnog ili zelenog) koji se koristi za kultivaciju čajne gljive, ali i da metaboliti čajne gljive koji nastaju tokom fermentacije daju svoj doprinos. U tom smislu glavne aktivne komponente zelenog čaja su katehini - epikatehin (EC), epikatehin galat (ECG), epigalokatehin (EGC) i epigalokatehin galat (EGCG) (Slika 9). Tokom proizvodnje crnog čaja, tj. tokom sušenja listova čaja zbog intenzivne enzimske oksidacije katehina enzimima prisutnim u čaju, nastaju jedinjenja od kojih potiče karakteristična boja i ukus crnog čaja - teaflavini (TF) i tearubigini (TR) (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

Poznato je da su katehini i flavonoli čaja veoma efikasni „skevindžeri“ (hvatači) slobodnih radikala, koje stabilizuju različitim mehanizmima koji uključuju delokalizaciju elektrona i formiranje intramolekularnih vodoničnih veza (Jovanović i sar., 1994). Kolika je antioksidativna moć katehina čaja najbolje pokazuju podaci po kojima je EGCG (epigalokatehin galat) dvadeset puta aktivniji nego vitamin C, trideset puta aktivniji nego vitamin E i 2-4 puta aktivniji u odnosu na sintetičke antioksidante BHA (butilhidroksianizol) ili BHT (butilhidroksiltoluen) (Dufresne i Farnworth, 2000).

O antioksidativnoj aktivnosti kombuhe i potencijalnim nosiocima i mehanizmima delovanja govore rezultati nekoliko istraživanja. 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 hidroksil 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 hidroksil radikala model sistema u odnosu na čajne napitka.

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%.

Chu i Chen (2006) su ispitali vezu između procesa fermentacije i antioksidativne aktivnosti kombuhe spektrofotometrijski određujući DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) radikale u model sistemu. Ispitani uzorci kombuhe su pokazali povećan "skevindžer" efekat u odnosu na kontrolni uzorak (dekoka crnog čaja odgovarajuće koncentracije) tokom petnaest dana fermentacije. Autori su zaključili da povećan antioksidativni kapacitet ispitanih kombuha napitaka u odnosu na crni čaj nije u vezi sa njenom sposobnošću heliranja jona gvožđa. Takođe su zaključili da enzimi čajne gljive koji se tokom kultivacije oslobode u podlogu uzrokuju biodegradaciju teaflavina i time stvaranje potencijalno antioksidativnih molekula.

Velićanski (2012) je pokazala da je antioksidativna aktivnost uzoraka fermentacionih tečnosti i kombuha napitaka od crnog čaja prema hidrosil radikalima veća u odnosu na čajni napitak od crnog čaja i da se ona značajnije ne menja tokom fermentacije. Prema DPPH radikalima, aktivnost čajnog napitka od crnog čaja bila je jednaka ili veća od aktivnosti ostalih uzoraka. Antioksidativna aktivnost konzumnih kombuha napitaka od melise i crnog čaja prema DPPH radikalima bila je veća od aktivnosti samih čajeva odgovarajuće koncentracije. Autorka je zaključila da se veća antioksidativna aktivnost fermentacione tečnosti i kombuha napitka od melise, na oba ispitana radikala, u odnosu na uzorke sa crnim čajem može objasniti većim sadržajem fenolnih jedinjenja u podlozi sa melisom.

2.4. KAFA I CoffeeBerry®

Kafa je najznačajniji bezalkoholni napitak na svetu i drugi (posle nafte) najznačajniji artikal na svetkom tržištu sa godišnjim prometom od oko 10 milijardi US\$ (Prabhakaran Nair, 2010). Za mnoge tropske i subtropske zemlje kafa je glavni poljoprivredni izvozni proizvod. Većina napitaka od kafe koji se konzumiraju širom sveta proizvodi se od vrsta *Coffea arabica* L. (Arabika) i *Coffea canephora* (Robusta), pri čemu se *Coffea arabica* L. smatra kvalitetnijom vrstom zbog svojih senzornih svojstava i više se uzgaja u komercijalne svrhe (zauzima 75% svetskog uzgoja kafe). *Coffea arabica* L. je vrsta kafe koja potiče iz šumovitog, brdskog područja jugozapadne Etiopije (oblast *Kaffa*), a poznata je još i kao "kafeni žbun Arabije", "planinska kafa" ili "arabijska kafa". Istorijski, upotreba kafe se razvijala od prvobitnog žvakanja njenih listova i zrna u cilju ublažavanja bolova, protiv gladi i umora, do današnje sofisticirane upotrebe kao espresso ili dekofeinirane kafe. Konzumiranje kafe je započelo između XV i XVI veka u Arabiji, odakle se ta navika proširila i u druge delove sveta, a u Evropu stiže u XVII veku preko Turske (Prabhakaran Nair, 2010).



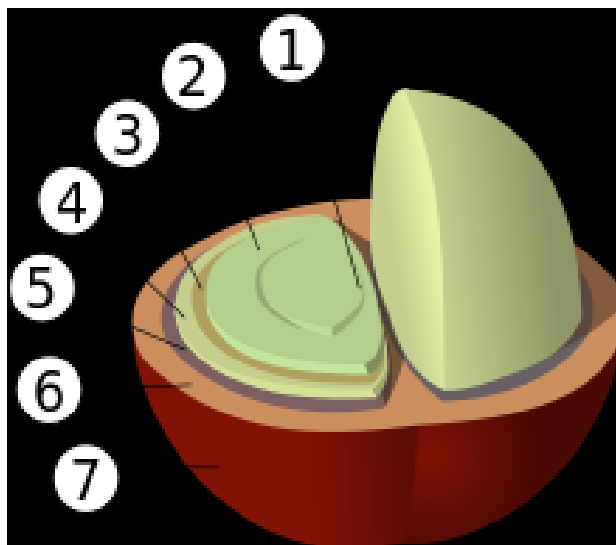
Slika 10. *Coffea arabica* L. (<http://en.wikipedia.org/wiki/coffea>)

Biljka kafe pripada rodu zimzelenog šiblja ili niskog drveća *Coffea* iz porodice *Rubiaceae*. Na drvetu kafe se tokom vegetacije prvo pojavljuju aromatični beli cvetovi koji se veoma kratko zadržavaju na stablu (Slika 10), oslobađajući miris koji podseća na kombinaciju mirisa jasmina i narandžinog cveta. Iz njih nastaju plodovi koji se nazivaju koštunice ili trešnje. Za prvi rod drveta potrebno je od 3-5 godina, a prosečno drvo u sezoni rađa od 1-3 kg. Plod dobija jasnu crvenu boju tek kada potpuno sazri posle 6-12 meseci, kada ima prečnik do 15 mm. Svaki plod sadrži dva semena ili zrna (Slika 11), opšte poznata kao “zelena zrna”, odnosno, sirova zrna kafe koja se koristi kao osnovna sirovina za proizvodnju pržene i mlevene kafe, rastvorljivog kafa praha, kao i kafa likera (Odžaković, 2015).



Slika 11. Plod kafe sa dva sirova zrna (www.illy.com)

Smatra se da je ceo plod kafe (Slika 12) izuzetno bogat antioksidansima zato što kafa raste na većim nadmorskim visinama, a manjim geografskim širinama gde je izloženost sunčevim zracima veća. U takvim uslovima biljke proizvode veliku količinu snažnih antioksidanasa kako bi se zaštitile od oštećenja izazvanih visokim dozama sunčevog zračenja i ozona. Zrna zelene kafe kao i većina biljnih tkiva su uglavnom sastavljena od nerastvornih polisaharida, poput celuloze i hemiceluloze (cca. 50% w/w). Pored toga, sadrži i rastvorljive ugljene hidrate kao što su monosaharidi fruktoza, glukoza, galaktoza i arabinoza, oligosaharidi saharoza (čini preko 90% oligosaharida), rafinoza i polimeri galaktoze, manoze, arabinoze i glukoze. Zelena kafa sadrži i neisparljive alifatične kiseline (limunsku, malonsku i hinsku kiselinu), kao i one isparljive - sirćetnu, propansku, buternu, izovaleričnu kiselinu i dr. Važni sastojci su i ulja i voskovi koji čine 8-18% suve materije, proteini i slobodne aminokiseline (9-12% w/w) i minerali (3-5% v/v). Lipidnu frakciju zelenog zrna kafe čine uglavnom triacilgliceroli, steroli, tokoferoli i diterpeni. Ulje zelene kafe se obično dobija mehaničkim hladnim presovanjem i ekstrakcijom, a industrijski se koristi u kozmetičkim preparatima za održavanje prirodne vlažnosti kože. Zbog relativno velikog udela diterpena ulje zelene kafe se ne upotrebljava kao jestivo biljno ulje. Međutim, frakcionisanjem koje se izvodi molekularnom destilacijom ili ekstrakcijom nadkritičnim CO₂ moguće je dobiti proizvod poboljšanih nutritivnih i tehnoloških karakteristika (de Azevedo i sar., 2008).

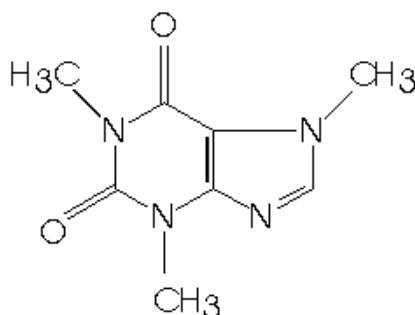


Slika 12. Šema celog zrna kafe

(1. centralni deo, 2. seme – endosperm, 3. “silverskin” – epidermis, 4. ljuska – endokarp, 5. pektinski omotač, 6. pulpa – spoljašnji mezokarp, 7. egzokarp)

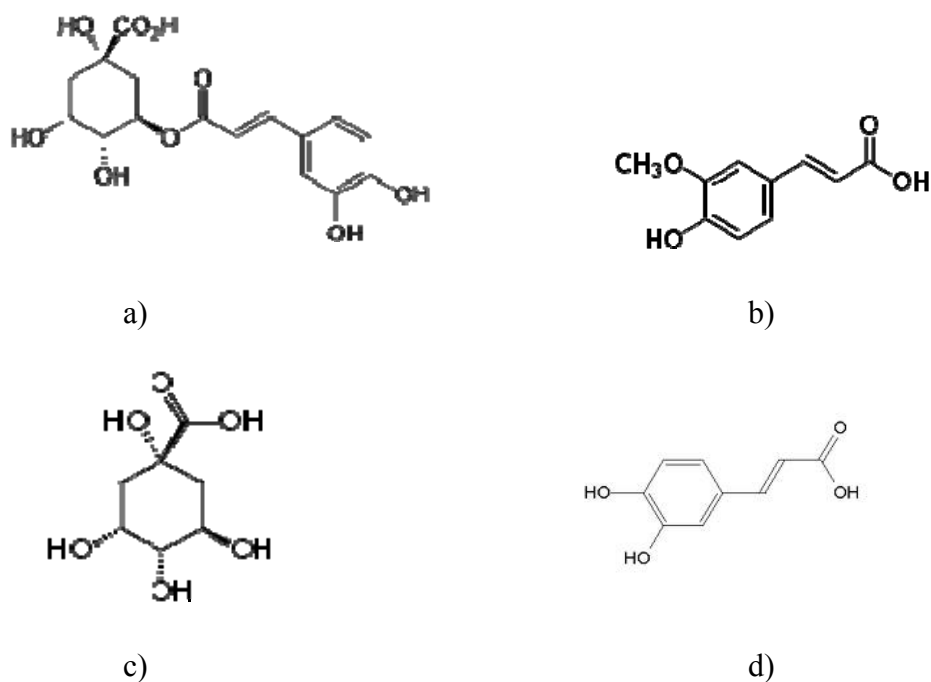
Ceo plod kafe sadrži veliki broj zdravih sastojaka, a lokalno stanovništvo u zemljama gde se uzgaja kafa je koristilo ove bobice za pripremanje čajeva, vina, lekova i hrane. Nedavna naučna otkrića o izuzetnoj zdravstvenoj vrednosti sastojaka kafe, pre svega antioksidativnoj, pružila su objašnjenje zašto je lokalno stanovništvo od davnina koristilo ceo plod kafe. Naučna istraživanja potvrđuju da sastojci koji su prisutni u celom plodu kafe, između ostalog, pomažu održavanju poželjnog nivoa šećera u krvi, štite od insulinske rezistencije i usporavaju proces starenja.

Kofein je glavni alkaloid zrna kafe (Slika 13) koji čini 1-4% suve materije, a čiji sadržaj zavisi od sorte. Sadržaj kofeina je snažno povezan sa kvalitetom kafenog napitka jer doprinosi njegovoj gorčini. Poznato je da kofein utiče na povećanje budnosti stimulacijom centralnog nervnog sistema, povećanjem cirkulacije krvi i disanja i verovatno je jedan od glavnih razloga popularnosti kafe. Dodatni efekti kofeina su i poboljšanje raspoloženja, poboljšanje performansi prilikom fizičkih aktivnosti i smanjenje vremena reakcije i smirivanje tremora kao simptoma povezanog sa Parkinsonovom bolešću (Esquivel i Jimenez, 2011). Negativni efekti kofein poput nesаницe i blage zavisnosti su podstakli razvoj i proizvodnju kafe bez kofeina, čiji se udeo procenjuje na oko 10-15% od ukupno konzumirane kafe u svetu. Visoke doze kofeina mogu da izazovu anksioznost, nemir, napetost, nervozu i psihomotornu agitaciju, a dugotrajna upotreba ovog alkaloida može povećati rizik od kardiovaskularnih oboljenja (Esquivel i Jimenez, 2011).



Slika 13. Kofein

Fenolna jedinjenja se uglavnom nalaze u zelenim plodovima kafe, a među njima dominiraju fenolne kiseline: hlorogenska, ferulna, kvinska i kafena kiselina. Hlorogenska kiselina ($C_{16}H_{18}O_9$) (Slika 14. a) pripada grupi estara p-hidroksicimetne kiseline sa kvinskom kiselinom. Ime joj potiče od grčke reči $\chi\lambda\omega\rho\varsigma$ (“svetlo zelena”) i $-\gamma\epsilon\nu\omicron\varsigma$ (sufiks koji znači “što dovodi do”), zbog zelene boje koja nastaje oksidacijom hlorogenske kiseline. Hlorogenska kiselina je dugo poznato kao antioksidans, pripisuju joj se antivirusna, antibakterijska i antifugalna svojstva, kao i sposobnost da usporava oslobađanje glukoze u krvotok posle obroka (<http://en.wikipedia.org/wiki/>). Ferulna kiselina ($C_{10}H_{10}O_4$) (Slika 14. b) spada u derivate cimetine kiseline koji se odlikuju veoma izrazitim ukusom i mirisom (Lajšić i Grujić-Injac, 1998). Poznat je antioksidans, a istraživanja na životinjama i *in vitro* analize nagoveštavaju da ferulna kiselina može imati antitumorno delovanje kod raka dojke i raka jetre. Kvinska kiselina ($C_7H_{12}O_6$) (Slika 14. c) je ciklični poliol koji se sintetički dobija hidrolizom hlorogenske kiseline i polazna je sirovina za sintezu mnogih lekova. Kafena kiselina ($C_9H_8O_4$) (Slika 14. d), ranijeg naziva karboksilna kiselina, najzastupljenije je fenolno jedinjenje koje se nalazi u većini voćnih plodova, povrću, travama i kafi, koja je dokazana kao kancerogeni inhibitor. Takođe je poznata i kao antioksidans u *in vivo* i *in vitro* uslovima. Prevelike doze kafene kiseline oralno uzete čine kafenu kiselinu kancerogenim agensom (<http://en.wikipedia.org/wiki/>).



Slika 14. Fenolne kiseline koje sadrži zrno kafe
 a) hlorogenska kiselina; b) ferulna kiselina; c) kvinska kiselina i d) kafena kiselina

Karakteristične osobine kafenog napitka poput boje, ukusa i arome se razvijaju tokom prženja zrna, pri čemu dolazi do degradacije ili modifikacije njenih sastojaka. U cilju bolje biološke iskoristivosti zelena zrna kafe se mogu koristiti za dobijanje tzv. „ekstrakta zelene kafe”, koji kao takav sadrži i biološki važna jedinjenja koja se gube tokom prženja zrna kafe. Ovom ekstraktu zelene kafe se pripisuju antioksidativna svojstva, sposobnost regulisanja telesne mase, antihipertenzivna i antibakterijska svojstva. Međutim, tokom prženja zrna zelene kafe se stvaraju i jedinjenjima odgovorna i za mnoge pozitivne biološke efekte kafenog napitka. Međutim, treba imati na umu da tokom prženja usled nepotpunog sagorevanja organskih materija mogu nastati i kancerogena jedinjenja kao što su policiklični aromatični ugljovodonici. Srećom, rezultati ispitivanja su pokazali da su ova jedinjenja prisutna u kafenom napitku samo u neznatnim količinama. Akrilamid je jedno od jedinjenja čije je prisustvo tokom prženja kafe i potvrđeno, naročito tokom prvih minuta procesa prženja, da bi daljim prženjem došlo do smanjenja njegove koncentracije (Esquivel i Jimenez, 2011).

Serotonin, poznati neurotransmiter centralnog nervnog sistema i njegovi prekursori L-tiptofan i 5-hidroksitriptofan su detektovani u zelenoj i prženoj kafi. Viši sadržaj serotonina uz manje količine prekursora u prženoj kafi sugerise da do formiranja serotonina dolazi termičkom degradacijom njegovih prekursora (Martins i Gloria, 2010 u Esquivel i Jimenez, 2011).

Rezultati pokazuju da ekstrakt dobijen iz pržene kafe ima antibakterijsku aktivnost prema nekoliko mikroorganizama kao što su *Staphylococcus aureus* i

Streptococcus mutans i nekoliko sojeva enterobakterija, verovatno zbog antibakterijskog delovanja karakterističnih komponenti kafe kao što su kafena kiselina, kofein, hlorogenska kiselina i protokatehinska kiselina (Almeida i sar., 2006), kao i malanoidina nastalih tokom procesa prženja (Rufián-Henares i de la Cueva, 2009).

Tokom konvencionalne proizvodnje kafe sa ploda se odvaja deo koji okružuje seme. Odavno je poznato da je plod kafe nutritivno i zdravstveno veoma vredan, ali je istovremeno i veoma kvarljiv usled razvoja bakterija i plesni koje uz to stvaraju i neželjene toksične sekundarne metabolite poznate kao mikotoksini. Frank i sar. (1965) su analizirali bakterijsku populaciju dekompoziranog ploda Kona kafe i došli su do zaključka da su u mikrobiološkoj populaciji ispitnog proizvoda dominantni organizmi bile Gram-negativne bakterije, naročito *Ervinia dissolvens* (Heimbach i sar., 2010). Silva i sar. (2000) su prilikom analize brazilskog ploda kafe izolovali preko 44 bakterijskih rodova i nekoliko rodova kvasaca; utvrđeno je da su Gram-negativne bakterije bile dominantne u vlažnim godinama, dok su Gram-pozitivne bakterije preovlađivale tokom sušnih godina (Heimbach i sar., 2010). Istraživači navode da primarni rizik po plod kafe kao kontaminanti predstavljaju pektinolitički kvasci i plesni kao što su *Saccharomyces* i *Aspergillus* vrste i *Aspergillus* vrste koje proizvode mikotoksin ohratoksin A (Heimbach i sar., 2010). Shodno tome, plod kafe se izuzimajući njegovo seme tradicionalno smatrao otpadnim materijalom neupotrebljivim za prehrambenu upotrebu i obično je bio odbacivan ili korišćen kao đubrivo. Primenom nove tehnologije koja je komercijalno označena terminom "CoffeeBerry[®]" (FutureCeuticals, Momence, IL, USA), tokom kultivacije, branja i zatim prerade celokupnog ploda kafe eliminisan je rizik od bakterijske i gljivične kontaminacije i prisustva mikotoksina u krajnjem proizvodu (Heimbach i sar., 2010).

Mnogi korisni sastojci kafe se gube tokom prerade celokupnog ploda kafe, odnosno, bivaju razorena tokom prženja zrna. "CoffeeBerry[®]" tehnologija obezbeđuje dobijanje različitih proizvoda od celog, termički netretiranog zrna kafe koji kao takvi sadrže značajno viši nivo biološki aktivnih jedinjenja nego uobičajeno pripremljena zrna kafe. CoffeeBerry[®] proizvodi su bogati polifenolima koji deluju kao prirodni antioksidansi u organizmu, štite ćelijsku membranu i plazmu od oštećenja koje izaziva preterana oksidacija, neutrališu toksične slobodne radikale i pomažu održavanju optimalnog nivoa šećera u krvi (<http://www.coffeeberry.org>).

Proizvodi dobijeni CoffeeBerry[®] tehnologijom su: osušeni prah ili granule od celog ploda kafe koji su pogodni za korišćenje u vrećicama za čaj, uobičajeno pržena kafa, energetske štapići, proizvodi slični čipsu i razni slatkiši. Posebna grupa proizvoda su u vodi rastvorni suvi ekstrakti dobijeni vodenom-etanolnom ekstrakcijom sa sadržajem fenolnih kiselina kafe preko 85%. Ovi ekstrakti čije su vrednosti ORAC (Oxygen Radical Absorbent Capacity) jedinica/100 g 600.000 – 1.500.000 se koriste u formi pića, kapsula i tableta. Poređenja radi, u izveštaju USDA (US Department of Agriculture) iz 2007. godine su navedene ORAC vrednosti odabranih namirnica (ORAC/100 g), po kojem najviše ORAC vrednosti imaju određeni začini (najviša vrednost je dobijena za karanfilić:

314.446 ORAC/100 g), čokolada (49.926 ORAC/100 g za pečenu čokoladu) i orašasti plodovi (17.940 ORAC/100 g ploda cikoriije). Ostali proizvodi sa relativno visokim ORAC vrednostima su: brusnica sa 9.584 ORAC/100 g, borovnica sa 6.552 ORAC/100 g, sirovi beli luk sa 5.346 ORAC/100 g i crvena stona vina sa 3.873 ORAC/100 g (Heimbach i sar., 2010).

Dokumentovanih podataka o konzumiranju celog ploda kafe nema ili su oni malobrojni. Zabeleženo je da se u nekim delovima Afrike i Azije plod kafe podvrgava fermentaciji kako bi se dobilo vino (Chinese Patent CN 1021949 u Miljković i sar., 2006), da se meša sa mastima ili žvaće sirov. U Jemenu se plod kafe kuva sa začinima kako bi se dobio napitak poznat kao "qishr" (Beckman, 2000 u Heimbach i sar., 2010).

Heimbach i sar. (2010) su prilazili rezultate ispitivanja bezbednosti Coffeeberry® ekstrakata (Tabela 3) na bakterijske ćelije i ćelije sisara sprovedenih kroz genotoksične studije, tri kratkotrajne studije oralne toksičnosti i studiju toksičnosti tokom 90 dana korišćenja u ishrani Coffeeberry® proizvoda – praha, vodenog i etanolnog ekstrakta. Ispitivanje mutagenosti na sojeve *S. typhimurium* i *E. coli* i mikronukleus test na perifernim ćelijama miša je pokazalo odsutvo mutagenog ili genotoksičnog efekta pod datim uslovima. Tokom kratkotrajnih studija toksičnosti ženke pacova su pokazale toleranciju na prah i etanolni ekstrakt u dozama do 8.800 mg/kg t.m./dan. Mužjaci su u ishrani tolerisali manje doze od oko 4.000 mg/kg t.m./dan etanolnog ekstrakta "via gavage" i oko 2.100 mg/kg t.m./dan praha ili vodenog ekstrakta. Tokom 90-dnevne ishrane Sprague-Dawney pacova etanolni ekstrakt nije pokazao negativne efekte u koncentraciji od 3.446 mg/kg t.m./dan kod mužjaka, odnosno, 4087 mg/kg t.m./dan kod ženki.

Tabela 3. Tipične karakteristike Coffeeberry® praha, vodenog i etanolnog ekstrakta proizvođača VDF FutureCeuticals Inc., Momence (IL, USA) (Heimbach i sar. (2010))

	Prah	Vodeni ekstrakt	Etanolni ekstrakt
Izgled	žuto mrk/braon prah	braon prah	braon prah
Ekstragens	-	voda	voda/etanol
Suva materija	≥90%	96%	90%
Rastvorljivost	delimično rastvorljiv u vodi	100% rastvorljiv u vodi	100% rastvorljiv u vodi
Ukupne fenolne kiseline ^a	≥2%	5,0%	35-40%
Kafein	0,7-1,0%	1,0% max.	0,6-9,08%
ORAC ^b	800 μmol/g prosečno	1.500 μmol/g	6.000 μmol/g

^a – Hlorogenska, kafena, hinska i ferulna kiselina; ^b – Oxygen radical absorption capacity

CoffeeBerry[®] proizvodi prikazani u Tabeli 3 dobijeni su na sledeći način (Heimbach i sar., 2010).:

- Coffeeberry[®] prah se dobija brzim sušenjem samlevenog materijala (brašna) koji se melje do finog praha;
- vodeni ekstrakt se dobija „freeze-drying“-om vodenog ekstrakta brzo osušenog brašna, a
- etanolni ekstrakt kao proizvod novijeg datuma se dobija „freeze-drying“-om vodeno-etanolnog ekstrakta brzo osušenog brašna.

3. MATERIJAL I METOD RADA

3.1. MATERIJAL, USLOVI KULTIVACIJE ČAJNE GLJIVE I UZORKOVANJE FERMENTACIONE TEČNOSTI

Čajna gljiva kao radna kultura – Za inokulaciju podloga za kombuha fermentaciju u ovom radu korišćena je fermentaciona tečnost koja je dobijena prethodnim kultivisanjem čajne gljive. Čajna gljiva je poreklom iz Mikrobiološkog odeljenja Katedre za biotehnologiju i farmaceutsko inženjerstvo Tehnološkog fakulteta u Novom Sadu. U ovoj radnoj kulturi je potvrđeno prisustvo kvasaca *Saccharomyces ludwigii*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces bisporus*, *Torulopsis* sp. i *Zygosaccharomyces* sp. (Markov i sar., 2001) i dva soja bakterija sirćetnog vrenja koji pripadaju rodu *Acetobacter* (Velićanski, 2012).

CoffeeBerry® ekstrakt - CoffeeBerry® ekstrakt proizvođača FutureCeuticals Inc. (Momence, IL, USA) obezbeđen je zahvaljujući firmi Fructus (Bačka Palanka, Srbija). Karakteristike ekstrakta prema proizvođačkoj specifikaciji su sledeće: prah svetlo braon boje, ukupan sadržaj fenolnih kiselina minimum 20%, sadržaj kofeina 1-1,5%, ORAC vrednosti 2500 $\mu\text{mol TE/g}$.

Uslovi kultivacije čajne gljive - Podloga za kultivaciju čajne gljive pripremljena je dodavanjem 70 g/L komercijalne saharoze u česmensku vodu. Rastvor je zagrevan do ključanja nakon čega mu je dodata odgovarajuća količina crnog čaja (*Camellia sinensis* L.) (Fructus, Bačka Palanka, Srbija), odnosno, CoffeeBerry® ekstrakta. Dekokcija sastojaka čaja je trajala 15 min nakon čega je podloga profiltrirana kroz sterilnu kvalitativnu filter hartiju u sterilan sud i ohlađena na sobnu temperaturu, nakon čega je podlozi dodata odgovarajuća količina čaja, odnosno, CoffeeBerry® ekstrakta. Pripremljena podloga je zatim inokulisana fermentacionom tečnošću iz prethodne kultivacije koja je dobijena pod istim uslovima od zaslađenog crnog čaja. Inokulum je u sveže pripremljenu podlogu dodat u količini od 10% (v/v). Nakon homogenizovanja po 0,33 L zasejane podloge je razliveno u sterilne staklene sudove za fermentaciju ($V=0,72$ L, $\varnothing=80$ mm, $H=145$ mm). Fermentacija je izvedena kao statična u sudovima prekrivenim gazom na temperaturi 28 ± 1 °C, sa različitom dužinom trajanja u zavisnosti od ogleđa.

Uzorkovanje - Tokom kombuha fermentacije, u predviđeno vreme uzorkovanja zavisno od ogleđa, izuziman je po jedan sud za kultivaciju (bioreaktor) kako bi se sprečila eventualna kontaminacija podloge i omogućilo da uzorci predstavljaju fermentacione tečnosti iste zapremine (0,33 L) koje je moguće kvalitetno homogenizovati. Uzorci za ispitivanje fizičko-hemijskih, hemijskih i mikrobioloških parametara fermentacije uzimani su nakon uklanjanja pelikule i homogenizacije fermentacione tečnosti u bioreaktorima, bez filtriranja. Uzorci za određivanje ukupnih fenola, HPLC (High Performance Liquid Chromatography)

analizu, ispitivanje antioksidativne i citotoksične aktivnost profilirani su kroz membranske filtere prečnika pora 0,2 μm (Chromafil[®] CA-20/25S). Za određivanje ukupnih fenola, HPLC analizu, ispitivanje antioksidativne i citotoksične aktivnost pripremljene su dve grupe uzoraka: prvu grupu činili su uzorci dobijeni tokom tradicionalne kombuha fermentacije na crnom čaju označeni kao: T–zaslađen crni čaj; TK0–zaslađen crni čaj nakon inokulacije koji odgovara 0-tom danu fermentacije; TK2–fermentaciona tečnost sa crnim čajem nakon 2 dana fermentacije; TK4–fermentaciona tečnost nakon 4 dana fermentacije; TK6–fermentaciona tečnost nakon 6 dana fermentacije; TK8–fermentaciona tečnost nakon 8 dana fermentacije; TK9–fermentaciona tečnost nakon 9 dana fermentacije. Drugu grupu uzoraka činili su uzorci dobijeni fermentacijom podloge koja je sadržavala crni čaj (3 g/L) i CoffeeBerry[®] ekstrakt (1,5 g/L) označeni kao: TCB-zaslađen crni čaj+CoffeeBerry[®] ekstrakt; CBK0-zaslađen crni čaj+CoffeeBerry[®] ekstrakt nakon inokulacije; CBK2–fermentaciona tečnost nakon 2 dana fermentacije podloge crni čaj+CoffeeBerry[®] ekstrakt; CBK4–fermentaciona tečnost nakon 4 dana fermentacije podloge crni čaj+CoffeeBerry[®] ekstrakt; CBK6–fermentaciona tečnost nakon 6 dana fermentacije podloge crni čaj+CoffeeBerry[®] ekstrakt; CBK8–fermentaciona tečnost nakon 8 dana fermentacije podloge crni čaj+CoffeeBerry[®] ekstrakt; CBK9–fermentaciona tečnost nakon 9 dana fermentacije podloge crni čaj+CoffeeBerry[®] ekstrakt.

3.2. ANALIZE FERMENTACIONE TEČNOSTI

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

Titribilna kiselost (TA) - Titribilna kiselost (ukupan sadržaj kiselina) u uzorcima fermentacione tečnosti i kombuha napicima određena je konduktometrijskom titracijom sa 0,1 mol/L NaOH do pH=7 (Jacobson, 2006) i izražena u g/L sirćetne kiseline.

Identifikacija i kvantifikacija fenolnih jedinjenja - Sadržaj fenolnih komponenata u čajnim napicima, fermentacionim tečnostima i kombuha napicima je određen reverzno faznom HPLC metodom. Uzorci su injektovani u Waters Breeze (Waters, Milford, MA, USA) HPLC sistem koji se sastoji od 1525 binarnih pumpi, termostata i 717+ autosemplera koji je povezan sa 2996 diode array detektorom (DAD). Razdvajanje fenola je izvršeno pomoću Symmetry C-18 RP kolone, 125×4 mm veličine i dijametra čestice od 5 μm (Waters, Milford, MA, USA) koja je povezana sa odgovarajućom pretkolonom. Mobilne faze, A (0,1% fosforna kiselina, H₃PO₄) i B (acetonitril, CH₃CN) su korišćene sa

protokom od 1 mL/min uz sledeći gradijentni profil: u prvih 20 min od 10-22% B, zatim 20 min linearnog povećanja do 40% B, zatim 5 min vraćanja na 10% B uz konačnih 5 min za ekvibraciju. Pikovi detektovanih jedinjenja su lokalizovani i identifikovani u HPLC-UV hromatogramima upoređujući analize standarda sa dobijenim zapisima upoređujući kako njihovo retenciono vreme, tako i UV spektar dobijen pomoću DAD. Kalibraciona kriva je dobijena ubrizgavanjem različitih zapremina smeše standarda uz korišćenje relacije linearne regresije za prikazivanje odnosa dobijene površine pika i poznate koncentracije standarda. Svaka komponenta je analizirana kvantitativno pomoću metode spoljašnjeg standarda koristeći čiste supstance kao reference za koncentraciju, retenciono vreme i karakteristike UV spektra. Za analizu hromatograma je korišćen Empower 2 programski paket (Waters, Milford, MA, USA). Rezultati su izraženi u µg/mL čajnog napitka, fermentacione tečnosti i kombuha napitka.

Mikrobiološke analize - Ukupan broj ćelija kvasaca i BSV u uzorcima fermentacione tečnosti tokom kultivacije i gotovim napicima određen je indirektnom metodom (metodom poseva). Za određivanje ukupnog broja ćelija kvasaca korišćena je podloga Sabouraud-4% Maltose Agar (HiMedia, India) u koju je neposredno pre razlivanja dodato 50 mg/L hloramfenikola (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). Zasejana podloga inkubirana je 3 dana na 28 °C. Za određivanje broja ćelija BSV korišćen je Yeast Peptone Mannitol Agar (Difco, Detroit, USA) u koju je pre razlivanja dodat aktidion (cikloheksimid; Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) u količini od 500 mg/L. Zasejana podloga inkubirana je 5-7 dana na 28°C.

3.3. ISPITIVANJE ANTIMIKROBNE AKTIVNOSTI

Uzorci za ispitivanje antimikrobne aktivnosti kombuha napitaka bili su:

- kombuha napitak od crnog čaja konzumne titrabilne kiselosti (vrednost TA = 3,88 g/L);
- kombuha napitak dobijen kombinacijom crnog čaja i CoffeeBerry® ekstrakta konzumne kiselosti (vrednost TA = 3,81 g/L);
- rastvori sirćetne kiseline iste koncentracije kao i kombuha napici;
- nefermentisani crni čaj - dekokt (3 g/L) i kombinacija nefermentisanog crnog čaja (3 g/L) i CoffeeBerry® ekstrakta (1,5 g/L);
- neutralisani kombuha napici od crnog čaja i kombinacije crnog čaja i CoffeeBerry® ekstrakta (pripremljeni neutralizacijom napitaka sa 0,1 mol/L NaOH do pH = 7) i
- toplotno denaturisani kombuha napici od crnog čaja i kombinacije crnog čaja i CoffeeBerry® ekstrakta, pripremljeni termičkim tretiranjem uzoraka na temperaturi od 100 °C u trajanju od 5 minuta.

Uzorci za ispitivanje antimikrobne aktivnosti su profiltrirani kroz membranske filtre prečnika pora 0,2 µm (Chromafil® CA-20/25S).

Test organizmi i metod ispitivanja - Za ispitivanje antimikrobne bakterijske aktivnosti kombuha napitaka upotrebljeni su pored referentnih sojeva bakterija i kvasaca i prirodni izolati bakterija (izolovani iz uzoraka hrane i vode za piće). Gram-negativne bakterije korišćene za ispitivanje bile su: *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (izolat iz vode) i *Citrobacter freundii* (izolovan iz melanža), a Gram-pozitivne: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Bacillus cereus* (ATCC 10876), *Listeria monocytogenes* (ATCC 13932) i *Enterococcus faecalis* (izolat iz vode). Test mikroorganizmi sa eukariotskim tipom ćelija bili su kvasci: *Saccharomyces cerevisiae* (ATCC 9763) i *Candida albicans* (ATCC 10231). Identifikacija prirodnih izolata obavljena je na Odeljenju za mikrobiologiju Tehnološkog fakulteta u Novom Sadu pomoću VITEK® 2 COMPACT SYSTEM-a (bioMérieux, USA). Svi navedeni test organizmi se čuvaju u kolekciji kultura Odeljenju za mikrobiologiju Tehnološkog fakulteta u zamrzivaču za ultraniske temperature (Snijders Labs, Tilburg, Holandija) na -72 °C u odgovarajućoj podlozi: bakterije u hranljivom bujonu (Himedia, Mumbai, India), a kvasci u Sabourad maltoznom bujonu (SMA; Himedia, Mumbai, India). U bujone je dodat glicerol kao krioprotektant do finalne koncentracije od 15% (v/v) za bakterije, odnosno, 10% za kvasce.

Antimikrobna aktivnost kombuha napitaka ispitana je agar difuzionom metodom sa bunarčićima (Mayo, 1998). Priprema test sojeva za ispitivanja podrazumevala je dvostruko pasažiranje presejavanjem kultura na kosi Miler Hinton agar za bakterije (MHA) (Himedia, Mumbai, India), odnosno SMA agar za kvasce. Bakterije su inkubirane 24 h na 37 °C, izuzev *Bacillus* sp. koji je inkubiran na 30 °C, a kvasci 48 h na 30 °C. Od fiziološki aktivnih kultura pripremljena je osnovna suspenzija prenošenjem biomase sa kosog agara u epruvetu sa sterilnim fiziološkim rastvorom (0,9% NaCl). Od osnovnih suspenzija pripremljena je serija razređenja tako da je u poslednjoj epruveti serije broj ćelija bio reda veličine 10⁶ cfu/mL, što je procenjeno aparatom Densichek (bioMérieux, Durham, USA). Po 2 mL ove suspenzije homogenizovano je sa 18 mL otopljene i na 45 °C ohlađene podloge (MHA za bakterije i SMA za kvasce), a potom razliveno u Petri kutije. Nakon želiranja podloge i isušivanja viška vlage (oko 2 h na sobnoj temperaturi), u podlogama su izbušeni „bunarčići“ prečnika 9 mm pomoću sterilne staklene cevčice i vakuum pumpe. U njih je mikropipetom uneto po 100 µL pripremljenih uzoraka kombuha napitaka i kontrolnih uzoraka. Petri kutije su ostavljene 1 h u frižideru na +8 °C u cilju difundovanja uzoraka u podlogu, a potom inkubirane na odgovarajućoj temperaturi (isti uslovi kao prilikom aktiviranja kultura). Prvo očitavanje zona inhibicije obavljeno je nakon 24 h, a konačni rezultati su očitani nakon 48 h.

Ispitivanje antimikrobne aktivnosti uzoraka je urađeno u tri ponavljanja, a rezultati su izraženi kao srednja vrednost prečnika zone inhibicije rasta (u mm) sa standardnom devijacijom (sd).

3.4. ISPITIVANJE ANTIOKSIDATIVNE AKTIVNOSTI

ESR spektralna analiza uticaja čajnih napitaka, fermentacionih tečnosti i kombuha napitaka na transformaciju DPPH radikala - Stabilni DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) slobodni radikali ispitani su u reakcionoj smeši koja se dobija mešanjem 0,2 ml vode i 0,4 ml 0,4 mM metanolnog rastvora DPPH radikala (slepa proba). Uticaj čajnih napitaka, fermentacionih tečnosti i kombuha napitaka na transformaciju DPPH radikala analiziran je u rastvoru koji se dobija mešanjem: x ml fermentacionih tečnosti i gotovih kombuha napitaka dobijenih na crnom čaju i podlozi obogaćenju CoffeeBerry® ekstraktom ili samih čajnih napitaka sa (0,2 - x) mL vode i 0,4 mL 0,4 mM metanolnog rastvora DPPH. Opseg očekivanih koncentracija je 0,25-20% v/v.

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

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

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

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

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

ESR spektralna analiza uticaja čajnih napitaka, fermentacionih tečnosti i kombuha napitaka na transformaciju hidroksil radikala - Hidroksil radikali ispitani su u Fentonovom model sistemu, koji je dobijen mešanjem 0,2 mL H₂O₂ (2 mM), 0,2 mL FeCl₂ (0,3 mM), 0,2 ml N,N-dimetil formamida (DMF) i 0,2 mL 5,5-dimetil-1-pirolin N-oksida (DMPO) (112 mM) kao spin trapa (kontrolni uzorak). Da bi se ispitao uticaj čajnih napitaka, fermentacionih tečnosti i kombuha napitaka na stvaranje i transformaciju hidroksil radikala u Fentonov model sistem su dodati uzorci u opsegu koncentracija 0,5-33,33% v/v. ESR spektri snimani su 2,5 minuta nakon homogenizovanja na pomenutom ESR spektrometru pri sledećim radnim karakteristikama: amplitude modulacije: 0,512 G; vremenska konstanta: 81,92 ms; vremenski opseg merenja: 163,84 ms; centar polja: 3440,00 G; ukupan opseg merenja: 100,00 G; frekvencija mikrotalasnog područja: 9,64 GHz; snaga mikrotalasnog područja: 20 mW; temperature merenja: 23°C, jačina struje 1×10⁴.

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

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

gde je h₀-visina drugog pika ESR signala slepe probe, a h_x-visina drugog pika ESR signala uzorka.

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

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

3.5. ISPITIVANJE CITOTOKSIČNE AKTIVNOSTI ISPITIVANIH UZORAKA VARIJABILNIM MTT TESTOM U *in vitro* USLOVIMA

U eksperiment su uključene sledeće tumorske ćelije, gajene na navedenim podlogama:

- Hep2 (podloga: MEM Eagle/5% FCS) humana ćelijska linija - Human larynx carcinoma;
- RD (podloga: MEM Eagle/10% FCS) – humana ćelijska linija – Rhabdomyosarcoma;
- L2OB (podloga: MEM Eagle/10% FCS) – mišija tumorska fibroblastna linija u koju su transfektovani neki humani geni.

MTT test citotoksičnosti - Suspenzija ćelija gustine 10⁴ po mL zasejane su u mikrotitar ploče sa 96 otvora i ostavljene da se inkubiraju na 37 °C i 5% CO₂, u inkubatoru. Nakon 24 časa inkubacije medijum je zamenjen sa 100 µL medijuma, koji redom sadrži uzorke T, TK0, TK2, TK4, TK6, TK8, TK9, TCB,

CBK0, CBK2, CBK4, CBK6, CBK8 i CBK9. Kontrolnim ćelijama je dodat svež medijum bez uzoraka. 48 časa nakon tretmana vijabilnost ćelija je određivana MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium-bromid, Sigma, USA) testom citotoksičnosti (Mosmann, 1983). Test se zasniva na bojenoj reakciji mitohondrijskog enzima dehidrogenaza iz živih ćelija sa MTT-em. Po završenku inkubacije ćelija sa etanolnim ekstraktima dodat je MTT (u finalnoj koncentraciji od 5 mg/mL PBS) u svaki bunarić i ploča je inkubirana 2-4 h na 37 °C. Obojeni kristali stvorenog formazana su rastvoreni sa 150 µL DMSO-a. Apsorbanca je merena na 570 nm na Mikroplate Reader-u. Procenat vijabilnih ćelija je određivan kao odnos apsorbanci tretiranih ćelija i kontrolnih ćelija pomnožen sa 100. Prikazani rezultati su dobijeni iz tri nezavisna eksperimenta.

4. REZULTATI I DISKUSIJA

U delu Rezultati i diskusija najpre su prikazani rezultati ispitivanja mogućnosti upotrebe CofeeBerry® ekstrakta kao alternativne podloge za čajnu gljivu u odnosu na tradicionalni napitak koji se dobija od zaslađenog crnog čaja. Na osnovu rezultata izvršena je optimizacija sastava podloge za kultivaciju čajne gljive sa CofeeBerry® ekstraktom. Zatim su prikazani rezultati *in vitro* ispitivanja funkcionalnih karakteristika (antioksidativne, antimikrobne i citotoksične aktivnosti) kombuha napitka obogaćenog CofeeBerry® ekstraktom tokom kojih je kao kontrolni uzorak korišćena kombuha dobijena od crnog čaja.

Prilikom profilisanja podloge sa CofeeBerry® ekstraktom vodilo se računa o količinama, kako CofeeBerry® ekstrakta tako i kombuhe, koje su preporučene za konzumiranje na dnevnom nivou.

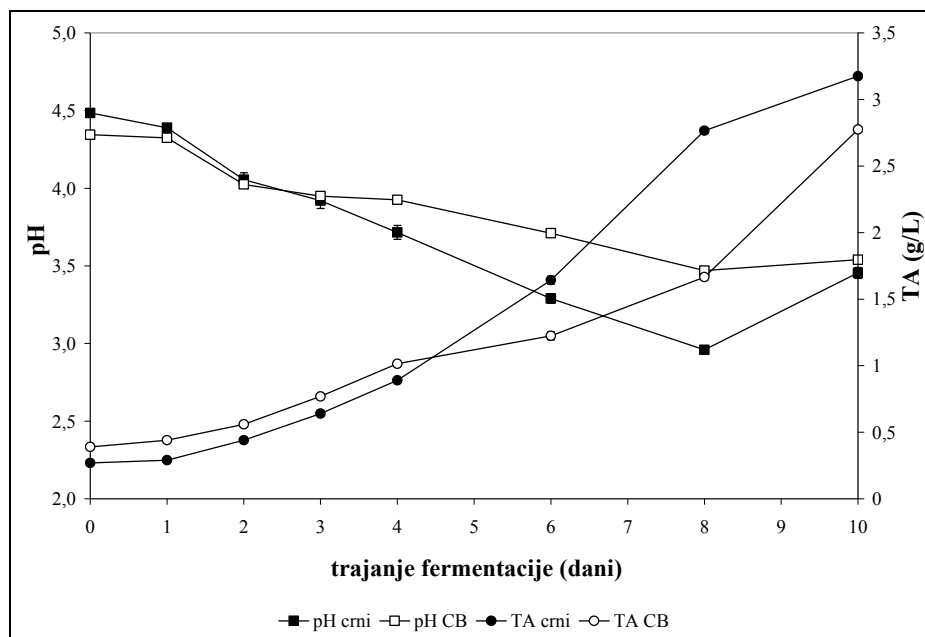
4.1. OPTIMIZACIJA SASTAVA PODLOGE ZA KOMBUHA FERMENTACIJU SA CofeeBerry® EKSTRAKTOM

4.1.1. Promene osnovnih fizičko-hemijskih i hemijskih parametara tokom kombuha fermentacije na podlozi sa CofeeBerry® ekstraktom

U cilju ispitivanja mogućnosti upotrebe CofeeBerry® ekstrakta kao alternativne podloge za kombuha fermentaciju izveden je ogled u kome je kao podloga korišćen zaslađen cofeeberry ekstrakt (u količini 3 g/L). Istovremeno je izvedena fermentacija na tradicionalnoj podlozi (zaslađen crni čaj u količini od 3 g/L) u cilju poređenja dobijenih rezultata. Kao inokulum za navedene oglede korišćen je napitak pripremljen u prethodnoj osmodnevnoj fermentaciji na podlozi sa crnim čajem. Vrednost pH inokuluma iznosila je 3,29, a titrabilna kiselost 4,39 g/L.

Tokom kultivacije čajne gljive na podlogama od zaslađenog crnog čaja i CofeeBerry® ekstrakta u fermentacionoj tečnosti su određeni osnovni hemijski, fizičko-hemijski i mikrobiološki parametri fermentacije: titrabilna kiselost (TA), promena vrednosti pH, sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja, ukupan broj ćelija kvasaca i bakterija sirćetnog vrenja (BSV). Dobijeni rezultati predstavljaju srednju vrednost sa ucertanim standardnim devijacijama. Rezultati su praćeni i predstavljeni u odnosu na kontrolni uzorak, kombuhu dobijenu na tradicionalan način od zaslađenog crnog čaja.

Promene pH vrednosti i titrabilne kiselosti tokom desetodnevne fermentacije na podlogama sa crnim čajem i CofeeBerry® ekstraktom prikazane su na Slici 15.



Slika 15. Promene pH i TA tokom fermentacije na tradicionalnoj podlozi (crni čaj) i podlozi sa CofeeBerry® ekstraktom (CB)

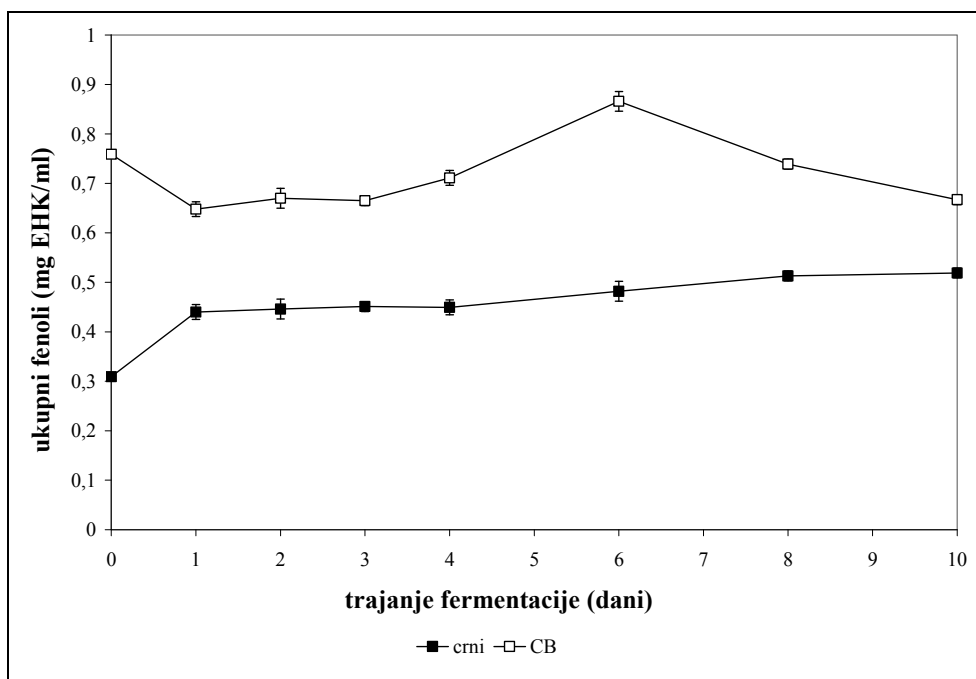
Tokom kultivacije čajne gljive na podlozi sa CofeeBerry® ekstraktom zabeležen je sličan trend opadanja vrednosti pH kao i kod kontrolnog uzorka (Slika 15). Ukupno smanjenje pH vrednosti tokom 8 dana fermentacije u slučaju tradicionalne podloge iznosilo je 1,5 jedinica. Tokom prva 3 dana fermentacije pH je smanjen za ukupno 0,6 jedinica, dok je do osmog dana smanjenje po danu za oko 0,2 jedinice. U poslednja dva dana fermentacije dolazi do porasta pH vrednosti za 0,5 jedinica. Tokom fermentacije podloge sa coffeeberry ekstraktom nakon trećeg dana zapažene su veće vrednosti pH u odnosu na tradicionalnu podlogu. Najveće smanjenje pH je do trećeg dana fermentacije, nakon čega pH sporije opada. U poslednja dva dana javlja se neznatno povećanje pH (za 0,07 pH jedinica), da bi desetog dana pH vrednost bila oko 3,5 za oba napitka.

Promene titrabilne kiselosti podloge sa CofeeBerry® ekstraktom i kontrolnog uzorka (Slika 15) pokazuju da je biotransformacija podloge sa coffeeberry ekstraktom sporija u poređenju sa podlogom od zaslađenog crnog čaja. Naime, tokom prva 4 dana fermentacije titrabilna kiselost podloge sa coffeeberry ekstraktom je neznatno veća od kiselosti kontrolnog uzorka (za oko 0,13 g/L), kada od početne vrednosti od oko 0,3 g/L dostiže vrednost od 1 g/L. Dalje promene kiselosti podloge sa coffeeberry ekstraktom su sporije u odnosu na podlogu sa crnim čajem, tako da se u slučaju alternativne podloge nakon 10 dana fermentacije dostiže vrednost titrabilne kiselosti od 2,77 g/L, koja je za 0,41 g/L manja u odnosu na tradicionalni napitak.

Trend promena pH i TA je tipičan za kombuha fermentaciju kao posledica sinteze pre svih sirćetne kiseline tokom kultivacije čajne gljive i metaboličke aktivnosti kvasaca i BSV. I dok TA linearno raste tokom kombuha fermentacije, dotle u jednom trenutku fermentacije dolazi do stabilizovanja vrednosti pH

fermentacione tečnosti, uprkos daljoj sintezi kiselina. Ovakav trend se objašnjava puferskim kapacitetom medijuma i suzbijanja disocijacije slabih organskih kiselina (Sreeramulu i sar., 2000; Cvetković, 2008). Do stabilizovanja vrednosti pH fermentacione tečnosti na Slici 15. došlo je nakon 8 dana kultivacije.

Tokom fermentacije na tradicionalnoj podlozi i podlozi sa CofeeBerry® ekstraktom određen je i sadržaj ukupnih fenola, a rezultati su izraženi kao ekvivalent hlorogenske kiseline (EHK; mg/mL fermentacione tečnosti). Dobijeni rezultati prikazani su na Slici 16.



Slika 16. Promena sadržaja ukupnih fenola tokom fermentacije na tradicionalnoj podlozi (crni čaj) i podlozi sa CofeeBerry® ekstraktom (CB)

Na početku fermentacije sadržaj fenola u tradicionalnoj podlozi iznosi 0,31 mg EHK/mL. Nakon prvih 24 h fermentacije sadržaj fenola u podlozi raste za 0,131 mg EHK/mL. Do kraja procesa zapaža se blag porast ukupnih fenola za manje od 0,1 mg EHK/mL, da bi u desetom danu u napitku bilo detektovano 0,52 mg EHK/mL. U podlozi sa CofeeBerry® ekstraktom sadržaj ukupnih fenola je bio znatno viši. Tokom prvih 24 h se sadržaj ukupnih fenola u ovoj podlozi smanjio sa vrednosti 0,76 na 0,65 mg EHK/mL, da bi nakon toga bio zabeležen porast do šestog dana kada je u fermentacionoj tečnosti registrovan maksimalan sadržaj od 0,86 mg EHK/mL. Do kraja procesa uočen je blagi pad ukupnih fenola za 0,2 mg EHK/mL.

U poređenju sa podlogom od crnog čaja, koja je sadržala 3 g čaja po litri podloge, podloga sa istom količinom coffeeberry ekstrakta ima veći sadržaj ukupnih fenola tokom desetodnevne fermentacije. Razlike u sadržaju ukupnih

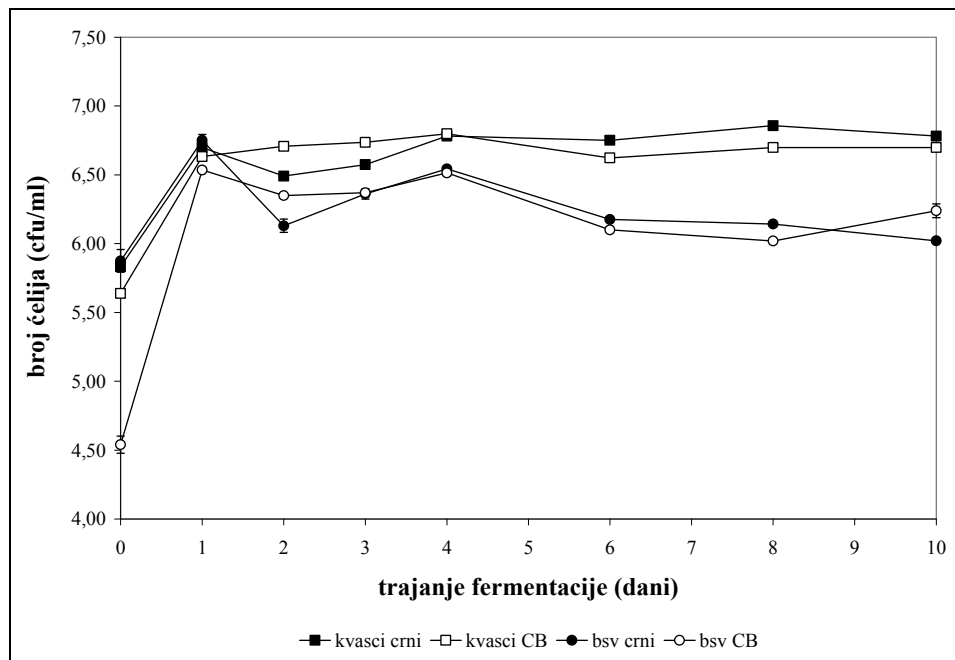
fenola mogle bi da ukažu na veći potencijal coffeeberry ekstrakta kao bioaktivnog agensa u odnosu na crni čaj jer je poznato da su fenolna jedinjenja nosioci antioksidativne aktivnosti (Łuczaj i Skrzydlewska, 2005; Sharangi, 2009).

Prilikom poređenja rezultata sadržaja fenolnih jedinjenja u različitim podlogama koji je određen spektrofotometrijskom metodom po Folin-Ciocalteu treba imati na umu ograničenja ove metode. Poznato je da različita fenolna jedinjenja imaju različit odziv na Folin-Ciocalteu reagens i da prisustvo interferirajućih jedinjenja (šećeri, vitamin C, organske kiseline, Fe(II) i druge supstance koje nisu polifenolnog porekla) mogu uticati na dobijene rezultate sadržaja ukupnih polifenolnih jedinjenja u uzorcima (Prior i sar., 2005).

Neravnomerne promene sadržaja ukupnih fenola tokom fermentacije mogu se objasniti degradacijom složenih fenolnih komponenata u kiseloj sredini tokom kombuha fermentacije ili degradacijom usled enzimske aktivnosti mikroorganizama čajne gljive. Pored toga, moguće je da usled aktivnosti enzima čajne gljive dolazi do vezivanja jednostavnijih fenolnih supstanci, tj. monomernih jedinica u složenija polifenolna jedinjenja (Jayabalan i sar., 2007).

4.1.2. Promene mikrobioloških pokazatelja tokom kombuha fermentacije na podlozi sa CofeeBerry® ekstraktom

Promene broja ćelija kvasaca i BSV tokom desetodnevne fermentacije na tradicionalnoj podlozi od crnog čaja (3 g/L) i podlozi sa CofeeBerry® ekstraktom (3 g/L) prikazane su na Slici 17.



Slika 17. Promena ukupnog broja ćelija kvasaca i BSV tokom fermentacije tradicionalne podloge (sa crnim čajem) i podloge sa CofeeBerry® ekstraktom (CB)

Broj ćelija kvasaca u podlozi sa CofeeBerry® ekstraktom i kontrolnom uzorku je nakon inokulacije iznosio 5,64 i 5,83 log cfu/mL (Slika 17). U prvih 24 h kultivacije je došlo do povećanja broja ćelija za jednu log jednicu i ovaj broj ćelija kvasaca (oko 6,7 log cfu/mL) održao se do kraja procesa uz neznatna variranja u broju (za 0,1-0,3 log cfu po danu).

Broj ćelija BSV u podlozi sa CofeeBerry® ekstraktom i u kontrolnom uzorku je nakon inokulacije iznosio 4,54 log cfu/mL, odnosno 5,88 log cfu/mL (Slika 17). Nakon 24 sata fermentacije primećuje se značajan porast broja BSV u tradicionalnoj podlozi za jednu log jednicu, odnosno, za dve log jedinice u slučaju podloge sa coffeeberry ekstraktom. Verovatno je broj ćelija BSV od 10^6 cfu/mL nakon 24 sata fermentacio onaj koji pod datim uslovima odgovara eksponencijalnoj fazi rasta i predstavlja maksimum. U daljem toku fermentacije, u fermentacionoj tečnosti sa crnim čajem došlo je do smanjenja broja BSV između prvog i drugog dana procesa, a blago opadanje se zapaža i nakon četvrtog dana sve do kraja procesa (ukupno smanjenje broja iznosilo je 0,5 log cfu/mL). Desetog dana broj BSV u fermentisanoj podlozi sa crnim čajem je iznosio 6 log

cfu/mL. Neujednačene promene zapažaju se i u slučaju podloge sa CofeeBerry® ekstraktom, s tim što se broj BSV u poslednjih 24h procesa povećava i iznosi 6,24 log cfu/mL u desetom danu.

Prisutan broj kvasaca na početku i tokom fermentacije u podlozi sa CofeeBerry® ekstraktom pokazuje da oni nisu limitirajući faktor procesa i da oni mogu da obezbede potrebne količine izvora ugljenika (glukoze, fruktoze i etanola) koji su neophodni BSV. Iako je broj BSV opadao nakon drugog i četvrtog dana fermentacije bio je dovoljan da omogući oksidaciju stvorenog etanola od strane kvasaca i sintezu sirćetne kiseline, kao i ostalih kiselina koje se stvaraju iz monosaharida.

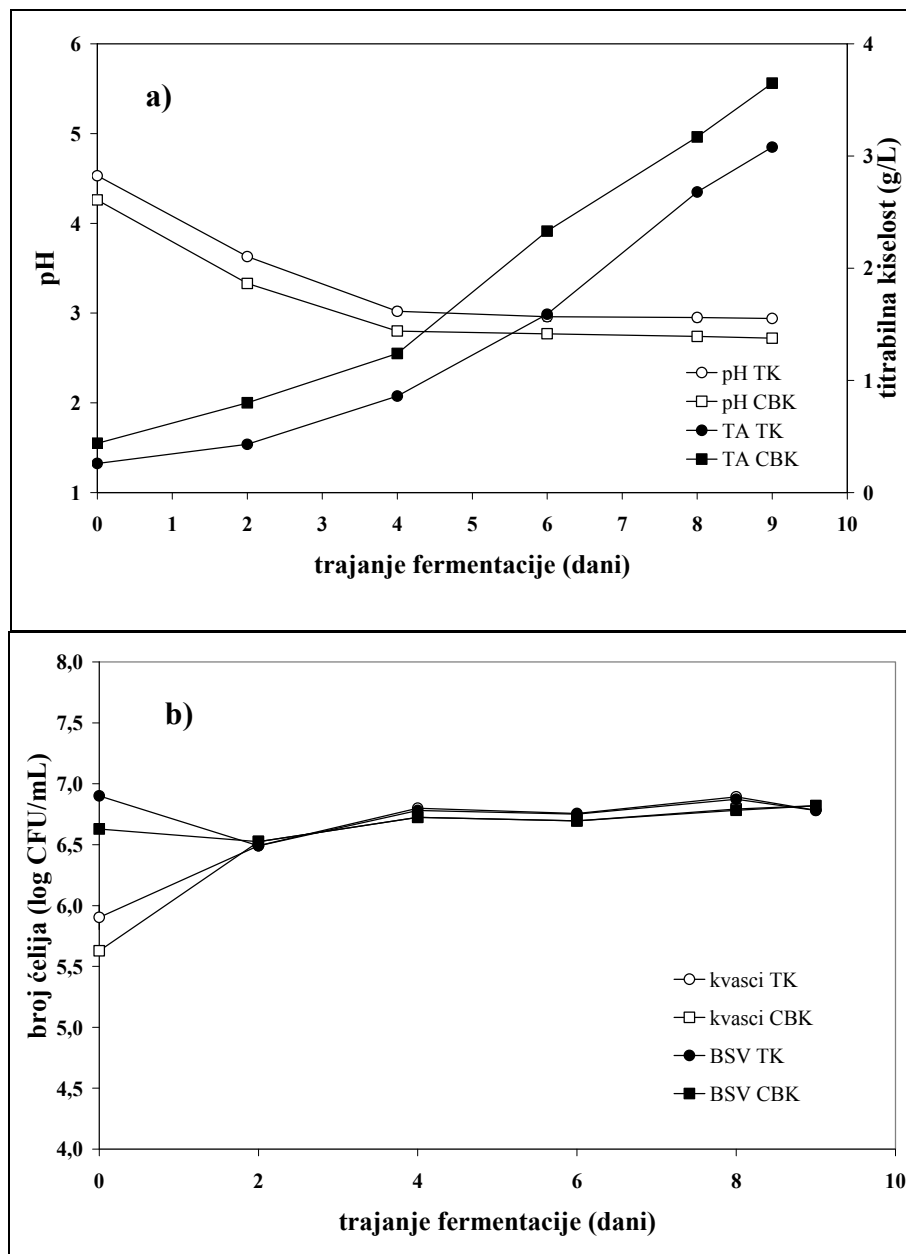
Promene pH, TA, kao i broja ćelija kvasaca i BSV ukazuju da podloga sa CofeeBerry® ekstraktom poseduje potencijal za kombuha fermentaciju, međutim transformacija ove podloge je sporija u poređenju sa podlogom od crnog čaja te je za dobijanje napitka odgovarajuće kiselosti potrebno više vremena. Visok sadržaj fenolnih jedinjenja ukazuje na potencijalnu biološku aktivnost napitka dobijenog gajenjem čajne gljive na ovoj podlozi.

4.1.3. Kultivacija čajne gljive na podlozi od mešavine crnog čaja i Coffe berry® ekstrakta

U preliminarnim ogledima je utvrđeno da CofeeBerry® ekstrakt može da se koristi kao alternativna podloga za kombuha fermentaciju, ali da ne može u potpunosti da zameni tradicionalnu podlogu, posmatrajući brzinu transformacije podloge i vreme potrebno za dobijanje kombuhe optimalne kiselosti. Tako da se ni nakon deset dana fermentacije podloge sa 3 g/L CofeeBerry® ekstrakta ne postiže optimalna konzumna kiselost napitka, odnosno, TA fermentisane tečnosti sa 3 g/L CofeeBerry®-jem je manja od 3 g/L. Pored toga, senzorske karakteristike napitka dobijenog od samog coffeeberry ekstrakta su nezadovoljavajuće u poređenju sa tradicionalnom kombuhom (rezultati nisu prikazani). S druge strane, rezultati su pokazali da Coffe berry® ekstrakt ima visok sadržaj fenolnih jedinjenja što značajno doprinosi poboljšanju bioloških karakteristika napitka sa Coffe Berry® ekstraktom u odnosu na tradicionalan. Ovo govori u prilog potpune opravdanosti upotrebe Coffe Berry® ekstrakta kao funkcionalnog dodatka kombuhi.

Uzimajući u obzir navedene činjenice u daljem radu je čajna gljiva kultivisana na podlozi koja predstavlja kombinaciju tradicionalne podloge sa crnim čajem i CofeeBerry® ekstrakta. Podlogu je činila uobičajena količina crnog čaja (3 g/L) u koju je dodato 1,5 g/L Coffe Berry® ekstrakta. Dodatak ovog ekstrakta tradicionalnoj podlozi bi mogao uticati na skraćenje vremena fermentacije, kao i na poboljšanje bioloških karakteristika tako dobijenog kombuha napitka. U tom smislu je izvedena devetodnevna fermentacija tokom koje su praćeni fizičko-hemijski, hemijski i mikrobiološki parametri procesa: pH, TA, ukupan broj kvasaca i BSV. Promene osnovnih parametara tokom kombuha

fermentacije na tradicionalnoj podlozi (TK) i podlozi kojoj je dodat CoffeeBerry® ekstrakt (CBK) prikazane su na Slici 18.



Slika 18. Promene pH i TA (a) i ukupnog broja kvasaca i BSV(b) tokom tradicionalne kombuha fermentacije (TK) i fermentacije na crnom čaju obogaćenom CoffeeBerry® ekstraktom (CBK)

Promene osnovnih fizičko-hemijskih/hemijskih parametara tokom kombuha fermentacije su posledica metaboličke aktivnosti ćelija čajne gljive (kvasaca i BSV). Vrednosti pH zaslađenog crnog čaja i crnog čaja obogaćenog CoffeeBerry® ekstraktom bile su približno 7, a nakon inokulacije sa

fermentacionom tečnošću iz prethodne fermentacije, pH vrednost opada i iznosi oko 4,5. U prva četiri dana fermentacije pH vrednost opada za oko 1,4 jedinice, a u narednih pet dana ukupno smanjenje je manje od 0,2. Trend promene pH vrednosti tokom fermentacije na oba medijuma je isti, a razlike u vrednostima su neznatne. Titrabilna kiselost nezasejanih podloga od crnog čaja i crnog čaja obogaćenog CoffeeBerry[®] ekstraktom iznosila je 0,09 g/L i 0,05 g/L, a njen sadržaj je rastao tokom fermentacije. TA fermentacione tečnosti CBK je tokom celog procesa fermentacije za 1,18-1,69 g/L veća od titrabilne kiselosti TK, što predstavlja statistički značajnu razliku ($p < 0,05$). Neujednačene promene pH i TA mogu se objasniti pufernim kapacitetom kombuha napitka. Cvetković i sar. (2008) su objasnili da se trend opadanja pH u prvih nekoliko dana procesa javlja kao rezultat sintetisanja kiselina (pre svega sirćetne), a zatim se do kraja procesa neznatno menja bez obzira na dalju produkciju kiselina zbog pufernog kapaciteta fermentisane tečnosti. Razlog tome je da se tokom procesa fermentacije aktivnošću kvasaca stvara ugljen dioksid (CO_2). Disocijacijom vodenog rastvora CO_2 stvaraju se hidrogenkarbonatni anjoni (HCO_3^-), koji lako reaguju sa vodonikovim jonima iz nastalih organskih kiselina, sprečavajući dalje promene pH, odakle potiče puferni kapacitet kombuhe. U kasnijim danima fermentacije, povećava se koncentracija CO_2 , a s tim i puferni kapacitet fermentacione tečnosti. Iz tog razloga se pH vrednost ne može uzeti kao kritičan parametar fermentacije koji određuje kraj procesa već je to titrabilna kiselost (Cvetković i sar., 2008). Slične trendove promena pH i TA zapazili su i drugi autori koji su čajnu gljivu gajili na različitim supstratima. Belloso-Morales i Hernández-Sánchez (2003) tokom tradicionalne fermentacije zapažaju opadanje pH za dve jedinice u prvih 48 h, a stagnaciju u naredna dva dana kada je TA dostigla vrednost od 4,8 g/L. Velićanski i sar. (2013) su prateći devetodnevnu fermentaciju čajne gljive na podlogama sa biljkama iz familije Lamiaceae (melisa, menta, majčina dušica, žalfija) utvrdili opadanje pH u prva tri dana procesa za ukupno 2-3 jedinice, a nakon toga blagi pad do kraja procesa za manje od 0,5 jedinica. TA je rasla svih devet dana, a krajnje vrednosti zavisile su od primenjene podloge (najbrža je bila fermentacija na podlozi sa melisom, a najsporija na podlozi sa žalfijom).

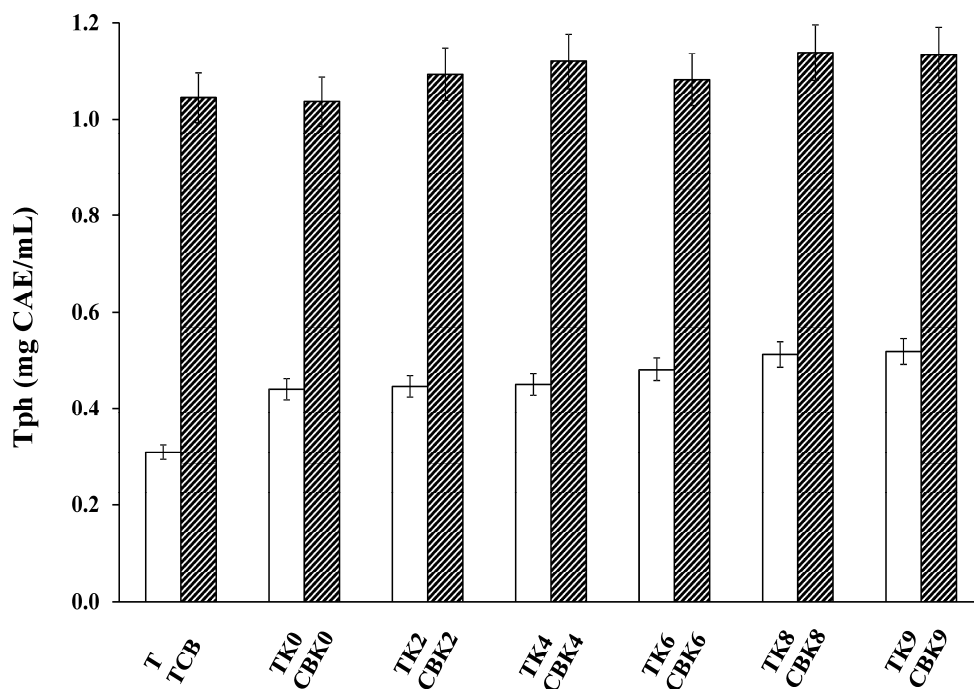
Početni broj kvasaca u oba medijuma (Slika 18) bio je u opsegu 5-6 log cfu/mL. Tokom prvih 48 h broj kvasaca porastao je za 0,9 log cfu/mL (CBK) i 0,59 log cfu/mL (TK), dok se broj BSV smanjio za 0,1 log cfu/mL (CBK) i 0,41 log cfu/mL (TK) (početne vrednosti su iznosile 6,63 log cfu/mL, odnosno 6,9 log cfu/mL). Do kraja procesa broj ćelija kvasaca i BSV je bio ujednačen i na kraju procesa je dostigao vrednost od 6,8 log cfu/mL. Promene u broju ćelija čajne gljive u saglasnosti su sa rezultatima drugih autora; Teoh i sar. (2004) su utvrdili da tokom kombuha fermentacije broj kvasaca prati standardnu krivu rasta, tj. eksponencijalni rast u prvih 8-10 dana, a zatim smanjenje broja usled nedostatka nutrijenata koje prati i opadanje pH. Broj kvasaca na početku procesa iznosio je 4 log jedinice, dok je maksimalan broj bio 7 log cfu/mL. Nasuprot tome, Sreeramulu i sar. (2000) su utvrdili drugačiji trend promene broja BSV, tj. zabeležili su nagli rast broja BSV u prva 4 dana (sa početne 4 log jedinice broj se

povećao na 7 log jedinice), a zatim naglo opadanje broja u naredna dva dana i blaži pad do kraja procesa.

Dobijene razlike u broju ćelija čajne gljive kada se porede rezultati različitih autora su posledica, pre svega, različitog mikrobiološkog sastava primenjenih kombuha kultura koje potiču sa različitih geografskih i klimatskih područja, što uslovljava i prisustva lokalnih vrsta divljih kvasaca i bakterija. Kombuha napici koji potiču sa različitih geografskih područja razlikuju se po kvalitativnom i kvantitativnom sastavu metabolita čajne gljive (etanola, sirćetne, glukonske kiseline i drugih), brzini fermentacije i ukusu (Mayser i sar., 1995; Teoh i sar., 2004). Zbog razlike u vrstama i broju BSV nisu u svim čajnim gljivama sposobne da podjednako efikasno metabolišu etanol što dovodi do različitog sadržaja kiselina u kombuha napicima (Beloso-Morales i Hernández-Sánchez, 2003).

4.2. SADRŽAJ POLIFENOLNIH KOMPONENTI I HPLC ANALIZA TOKOM KOMBuha FERMENTACIJE PODLOGE OBOGAĆENE Coffeeberry® EKSTRAKTOM

U uzorcima fermentacione tečnosti koji su prikupljeni tokom kultivacije čajne gljive na podlozi od crnog čaja (TK) i podlozi obogaćenoj CoffeeBerry® ekstraktom određen je ukupni sadržaj polifenola kao i pojedinačni komponente (Slika 19; Tabele 4 i 5). Metoda po Folin–Cioacaltea je brza i najčešće korišćena za ispitivanje ukupnih polifenola, a zasniva se na redukcionoj sposobnosti hidrosilnih grupa, iako je poznato da različite polifenolne komponente imaju različite odgovore na Folin–Cioacaltea reagens (Singleton i sar., 1999). Ukupni sadržaj polifenolnih komponenti je izražen kao ekvivalent mg hlorogenske kiseline (CAE) po mL ispitanih uzoraka, a zavisen je od dužine trajanja fermentacije kao i od tipa kultivacionog medijuma (Slika 19). Ukupni sadržaj polifenola se kretao od 0,309-0,519 mg CAE/mL u TK uzorcima, odnosno, od 1,037-1,139 mg CAE/mL u CBK uzorcima, zavisno od dužine trajanja fermentacije. Upoređujući dobijene rezultate može se konstatovati da je ukupni sadržaj polifenola veći u svim uzorcima fermentisane podloge obogaćene CoffeeBerry® ekstraktom. Samo manje razlike u dobijenim vrednostima su zabeležene kada se posmatraju pojedinačni uzorci određene grupe.



Slika 19. Ukupni sadržaj polifenolnih komponenti (Tph) u uzorcima fermentacione tečnosti tokom tradicionalne Kombuha fermentation (TK) i Kombuha fermentacije zaslađenog crnog čaja obogaćenog CoffeeBerry® ekstraktom (CBK)

Dominantne polifenolne komponente prisutne u ispitanim uzorcima su identifikovane i kvantifikovane HPLC analizom. Katehini (Tabela 4) su identifikovani u svim TK i CBK uzorcima, pri čemu je veći sadržaj katehina i epikatehina dobijen za sve ispitane uzorke. Izvesno je da je crni čaj primarni izvor ovih jedinjenja. Na osnovu dobijenih rezultata može se konstatovati da je sadržaj katehina, a posebno epikatehina, izuzimajući epigalokatehin galat, veći u CBK uzorcima.

Tabela 4. Sadržaj katehina ($\mu\text{g/mL}$) u uzorcima fermentacione tečnosti tokom tradicionalne kombuha fermentacije i kombuha fermentacije zaslađenog crnog čaja obogaćenog CoffeeBerry® ekstraktom

Uzorak	Galokatehin	Epigalokatehin	Katehin	Epikatehin	Galokatehin galat	Epigalokatehin galat	Katehin galat	Epikatehin galat
T	0,01±0,001	2,04±0,1	3,76±0,185	0,52±0,026	2,01±0,1	0,25±0,012	0,28±0,012	1,0±0,05
TK0	0,02±0,001	0,75±0,035	3,45±0,17	0,84±0,04	1,78±0,086	0,31±0,015	1,79±0,085	4,61±0,23
TK2	0,01±0,005	1,68±0,08	3,64±0,18	0,49±0,024	1,54±0,075	0,27±0,013	0,27±0,013	0,82±0,04
TK4	0,2±0,001	0,71±0,032	3,86±0,19	0,53±0,026	1,72±0,085	0,26±0,013	0,24±0,012	0,79±0,035
TK6	0,1±0,005	1,76±0,085	4,1±0,21	0,67±0,03	2,03±0,1	0,27±0,013	0,23±0,011	0,63±0,03
TK8	0,59±0,025	1,77±0,085	4,43±0,221	1,09±0,05	2,47±0,122	0,29±0,014	1,93±0,09	4,53±0,22
TK9	0,60±0,028	1,4±0,068	4,55±0,23	0,96±0,045	2,61±0,13	0,34±0,017	0,94±0,045	2,4±0,12
TCB	0,29±0,014	2,01±0,1	3,37±0,166	2,29±0,11	2,56±0,125	nd	0,49±0,022	0,07±0,003
CBK0	0,63±0,028	0,49±0,242	3,89±0,192	5,72±0,285	2,7±0,13	nd	1,28±0,064	0,18±0,009
CBK2	0,40±0,020	0,71±0,032	4,15±0,205	4,49±0,224	2,34±0,11	0,17±0,008	1,52±0,075	0,22±0,011
CBK4	0,26±0,013	2,45±0,122	3,28±0,164	2,73±0,135	2,22±0,11	nd	1,59±0,076	0,23±0,011
CBK6	0,71±0,034	1,42±0,07	4,14±0,205	5,42±0,265	3,24±0,16	nd	1,74±0,085	0,25±0,012
CBK8	0,58±0,028	1,31±0,06	4,16±0,205	4,99±0,245	3,36±0,165	nd	1,60±0,08	0,23±0,011
CBK9	0,63±0,031	1,82±0,09	4,28±0,21	7,47±0,37	3,59±0,175	0,28±0,011	1,28±0,06	0,18±0,009

nd – nije detektovano

Tabela 5. Sadržaj pojedinačnih polifenolnih komponenti ($\mu\text{g/mL}$) u uzorcima fermentacione tečnosti tokom tradicionalne kombuha fermentacije i kombuha fermentacije zaslađenog crnog čaja obogaćenog CoffeeBerry® ekstraktom

Uzorak	Galna kiselina	Kafein	Rutin	<i>P</i> -Kumarinska kiselina	Kafena kiselina	Ferulna kiselina	Izoferulna kiselina	Neo-hlorogenska kiselina	Kripto-hlorogenska kiselina	Hlorogenska kiselina
T	1,4±0,035	69,87±1,537	1,23±0,019	0,53±0,012	nd	nd	0,3±0,008	nd	nd	nd
TK0	20,0±0,36	61,97±1,983	4,67±0,110	0,47±0,023	nd	nd	0,53±0,016	nd	nd	nd
TK2	13,33±0,24	67,17±2,082	1,47±0,038	0,33±0,005	nd	nd	0,3±0,008	nd	nd	nd
TK4	13,43±0,402	70,97±1,561	1,7±0,043	0,37±0,013	nd	nd	0,27±0,012	nd	nd	nd
TK6	10,9±0,272	75,7±3,331	1,4±0,056	0,33±0,011	nd	nd	0,3±0,013	nd	nd	nd
TK8	19,60±0,59	73,93±1,626	5,27±,192	0,37±0,017	nd	nd	0,6±0,014	nd	nd	nd
TK9	19,46±0,584	82,33±3,046	4,67±0,17	0,4±0,01	nd	nd	0,4±0,01	nd	nd	nd
TCB	9,23±0,092	68,2±2,796	5,03±0,213	1,25±0,044	48,4±2,357	96,8±3,64	3,12±0,141	20,0±0,75	34,9±1,717	188,94±8,653
CBK0	18,93±0,757	63,4±1,236	5,67±0,145	0,57±0,013	191,1±8,924	77,63±3,54	1,9±0,086	12,0±0,306	25,0±0,193	423,36±14,902
CBK2	19,36±0,639	64,3±1,704	6,43±0,293	0,43±0,099	166,6±7,047	7,2±0,17	1,9±0,08	12,1±0,284	26,5±1,198	430,61±13,995
CBK4	12,53±0,15	66,9±2,435	1,03±0,016	0,37±0,089	24,63±1,108	1,73±0,056	2,15±0,054	11,1±0,174	20,2±0,711	342,66±14,563
CBK6	20,1±0,402	67,1±2,899	6,87±0,162	0,43±0,015	88,93±3,762	2,01±0,05	2,15±0,031	13,1±0,478	26,1±1,195	409,85±10,492
CBK8	20,36±0,407	67,5±1,728	6,72±2,383	0,43±0,021	63,22±2,165	2,03±0,048	2,03±0,048	13,2±0,594	26,9±0,982	435,55±14,181
CBK9	19,83±0,595	69,0±2,843	6,67±0,282	0,33±0,013	43,12±1,953	2,05±0,05	1,8±0,081	14,0±0,483	28,0±0,909	458,56±16,737

nd – nije detektovano

Struktura formiranih katehina u čaju zavisi od metode pripreme samoga čaja. Zbog toga, katehini i njihovi aktivni metaboliti mogu delovati različitim antioksidativnim mehanizmima što doprinosi njihovoj terapeutskoj ulozi. Pored toga, uzorci TK i CBK su veoma bogati i drugim polifenolnim bioaktivnim komponentama čiji su sadržaji prikazani u Tabeli 5.

Rezultati iz Tabele 5 pokazuju da je CoffeeBerry® ekstrakt primarni izvor pre svega kafene, ferulne, neo-hlorogenske, kriptohlorogenske i hlorogenske kiseline. Poslednje navedena kiselina je ubedljivo najdominantnija sa količinama koje su se kretale u granicama od 188,94 – 458,56 µg/mL u zavisnosti od perioda fermentacije.

U istraživanju Chu i Chen (2006) pokazano je da sadržaj ukupnih fenola raste linearno tokom kombuha fermentacije. Pored toga, pokazano je da četiri katehina - epikatehin, epikatehin galat, epigalokatehin i epigalokatehin galat (kao i drugi kompleksni polifenoli) mogu biti biotransformisani enzimima oslobođenim iz ćelija čajne gljive (Jayabalan i sar., 2007). Takođe, verovatno je da se katehini oslobađaju iz acido-senzitivnih ćelija tokom kombuha fermentacije što sa svoje strane može biti razlog povećanja sadržaja polifenola tokom fermentacije. S druge strane, katehini se tokom fermentacije mogu polimerizovati u molekule veće molekulske mase što rezultira nižim sadržajem polifenolnih komponenti (Chu i Chen, 2006). Ovim se mogu objasniti neuniformne promene u koncentraciji polifenola tokom kombuha fermentacije koje su dobijene i u ovom radu (Tabele 4 i 5).

Prisustvo polifenola u inokulumu (dobijenom u prethodnoj kombuha fermentaciji) može biti razlog povećanog sadržaja nekih polifenola u uzorcima TK0 i CBK0, u poređenju sa uzorcima T i TCB. S druge strane, smanjenje sadržaja polifenola u uzorcima TK0 i CBK0 može se objasniti uticajem enzima poreklom iz inokuluma.

Kafein, epigalokatehin galat i epigalokatehin su prepoznati kao glavne komponente metanolnog ekstrakta crnog čaja (Cabrera, 2003). Kafein je glavna polifenolna komponenta i infuzije crnog čaja koga prate galna, 5-galoilhinska kiselina, 4-*p*-kumaroilhinska kiselina, flavonoli i dr. (Del Rio, 2004). Izvesne razlike u sastavu čaja i njegovih ekstrakata su očekivane, uslovljene nizom faktora kao što su vrsta čaja, sezona, starost listova, klimatski uslovi i uslovi kultivacije (Cabrera, 2003).

Značajno je da su kafena, ferulna, neohlorogenska i kriptohlorogenska kiselina detektovane u relativno visokom sadržaju samo u uzorcima fermentacione tečnosti obogaćene CoffeeBerry® ekstraktom. Takođe, u navedenim uzorcima tokom devetodnevne fermentacije je u visokom sadržaju detektovana i hlorogenska kiselina od 188,94-458,56 µg/mL. Poznato je da zrna zelene kafe sadrže značajnu količinu hlorogenske kiseline (CAE) koja dostiže i do 10% od težine zrna (Ji i sar., 2013). Hlorogenska kiselina koja je estar kafene i hinske kiseline jedna je od glavnih derivata hidroksicimetne kiseline nađenih u CoffeeBerry® ekstraktu. Ekstrakt predstavlja smešu velikog broja bioaktivnih jedinjenja koja imaju potvrđenu antioksidativnu aktivnost (Dórea i sar., 2005). Za hlorogenske kiseline kafe, a među njima kvantitativno najrelevantniju

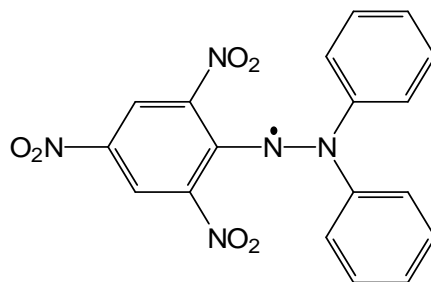
kafeilhinsku kiselinu (CQAs), i polifenolne produkte nastale njenom degradacijom, poput kafene kiseline (CA), utvrđeno je da poseduju izuzetnu *in vitro* aktivnost kao hvatači slobodnih radikala (Bøhn i sar., 2014). Hlorogenska i kafena kiselina poreklom iz CoffeeBerry® ekstrakta su komponente uzoraka označenih kao CBK0-CBK9.

Ukupni sadržaj polifenolnih komponenti je viši nego suma svih pojedinačnih polifenola koji su identifikovani HPLC metodom (Tabele 4 i 5). Ova razlika se može objasniti činjenicom da metoda po Folin–Ciocalteu nije apsolutna mera količine polifenola jer i neka druga jedinjenja kao što su organske kiseline, rezidualni šećeri, amino kiseline, proteini i druge hidrofilne komponente interferiraju tokom izvođenja ove metode (Singleton i sar., 1999).

4.3. ESR SPEKTRALNA ANALIZA UTICAJA CoffeeBerry® EKSTRAKTA NA STVARANJE I TRANSFORMACIJU DPPH I HIDROKSIL RADIKALA TOKOM KOMBUHA FERMENTACIJE

Antioksidativna aktivnost uzoraka dobijenih tokom kombuha fermentacije od zaslađenog crnog čaja, kao i uzoraka dobijenih tokom fermentacije Kombuhe na zaslađenom crnom čaju u prisustvu CoffeeBerry® ekstrakta određena je primenom antiradikalnih testova na dva različita tipa radikala: stabilnim 2,2-diphenil-1-pikrilhidrazil (DPPH[•]) radikalima i reaktivnim hidroksil radikalima, primenom ESR spektroskopije.

Slobodni DPPH radikali se najčešće upotrebljavaju u antiradikalnim testovima za određivanje sposobnosti prirodnih sekundarnih metabolita prisutnih u ekstraktima da predaju labilan vodonikov atom slobodnim radikalima. Ovaj mehanizam predstavlja najčešći i najjednostavniji mehanizam antioksidativne zaštite. DPPH radikal je stabilan slobodni radikal i ima sledeću hemijsku strukturu (Slika 20):

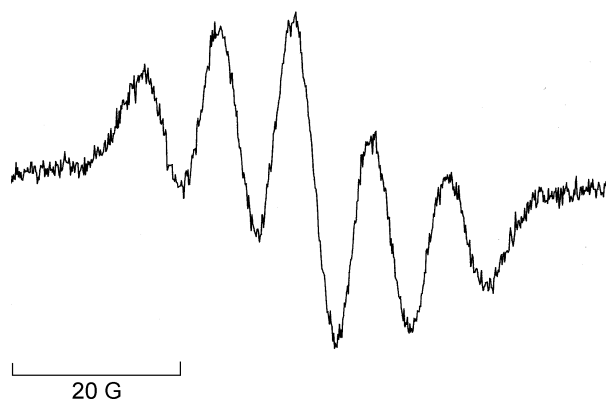


Slika 20. Hemijska struktura DPPH radikala

Primenom ESR spektrometrije može se direktno pratiti promena koncentracije DPPH radikala. Sniženje ESR signala je stehiometrijski proporcionalna broju elektrona koji su predati ($\text{DPPH}^{\bullet} + \text{AH} \rightarrow \text{DPPH-H} + \text{A}^{\bullet}$).

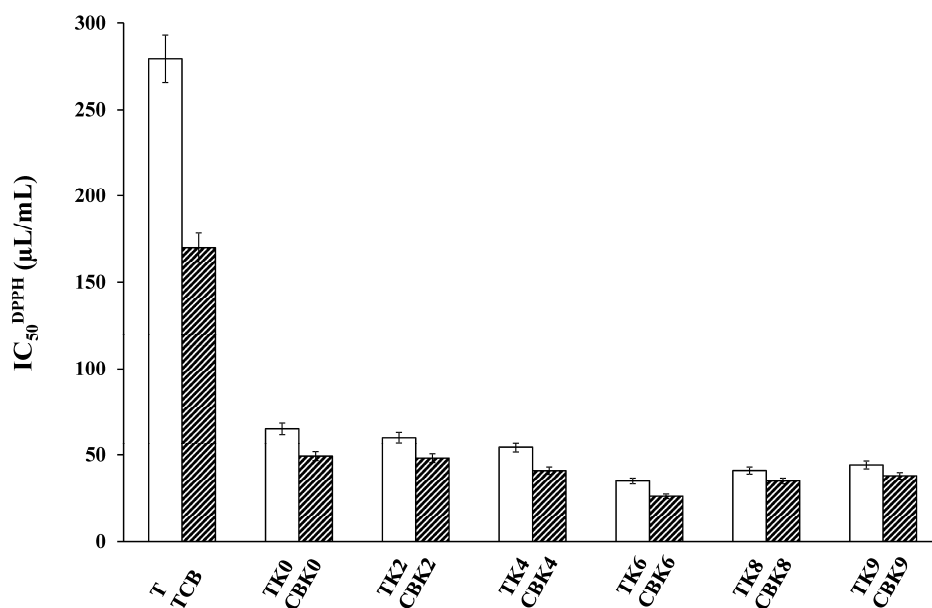
Hiperfina struktura ESR spektra stabilnih DPPH radikala potiče od interakcije nesporenog elektrona i dva ¹⁴N atoma (I = 1). Sastoji se od pet linija

relativnog intenziteta 1:2:3:2:1. Konstanta hiperfinog cepanja ima vrednost $a_N = 9,03\text{G}$. Na Slici 21 prikazan je ESR spektar stabilnih DPPH slobodnih radikala slepe probe (0,4 mM metanolni rastvor DPPH[•]).



Slika 21. ESR spektar stabilnih DPPH slobodnih radikala slepe probe

Antiradikalska aktivnost na DPPH radikala, $SA_{DPPH^{\bullet}}$, različitih uzoraka prikazana je na Slici 22. IC_{50} vrednost (koncentracija antioksidanta neophodna za 50% antioksidativne aktivnosti) je parametar koji se često koristi kao merilo antioksidativne aktivnosti (Cuvelier i sar., 1992), pri čemu niže IC_{50} vrednosti ukazuju na značajniju antioksidativnu aktivnost. $IC_{50,DPPH}$ vrednosti ispitivanih uzoraka u prisustvu ekstrakta CoffeeBerry[®] bile su opsegu 26,33-170,13 $\mu\text{L/mL}$ (Slika 22). Antiradikalska aktivnost na DPPH radikale povećavala se sa povećanjem dužine trajanja fermentacije.



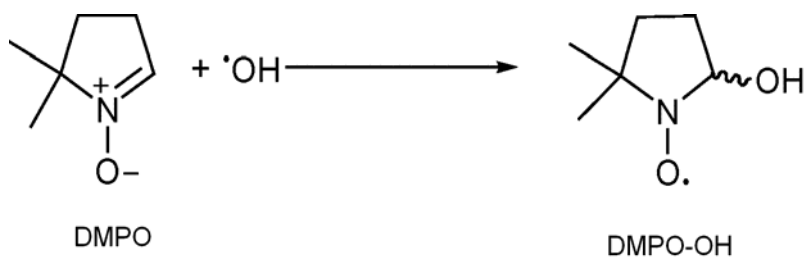
Slika 22. Uticaj CoffeeBerry® ekstrakta na stvaranje i transformaciju DPPH radikala tokom kombuha fermentacije (TK-kombuha od crnog čaja; CBK-kombuha obogaćena CoffeeBerry®)

Elektron spin rezonantna (ESR) spektroskopija je instrumentalna metoda koja omogućava direktnu detekciju slobodnih radikala. Iako je osetljivost ove metode veoma visoka, detekcija kratkoživećih, relativno nestabilnih, reaktivnih slobodnoradikalnih vrsta, poput superoksid anjon i hidrosil radikala nije moguća zbog njihovog kratkog vremena života. Jedna od metoda koja omogućava njihovu detekciju je „spin trapping“ metoda kojom se nestabilni slobodni radikali „hvataju“ pomoću određenih organskih jedinjenja tzv. „spin trapova“ i nastaju stabilni radikali tzv. „spin adukti“, DMPO-OH spin adukti koji se mogu detektovati ESR spektroskopijom (Čanadanović-Brunet, 1998).

Za određivanje antiradikalne aktivnosti kombuha uzoraka na reaktivne $\cdot\text{OH}$ korišćen je Fentonov model sistem. Reaktivni hidrosil radikali generisani su sledećim reakcionim mehanizmom:

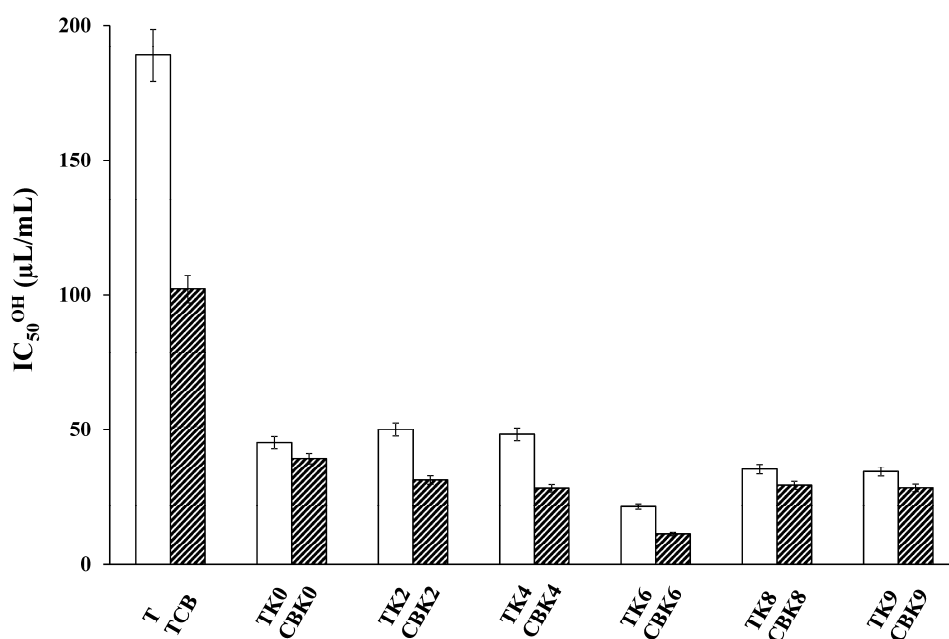


Nastali reaktivni $\cdot\text{OH}$ radikali u prisustvu „spin trapa“ DMPO formiraju stabilne nitroksid radikale, odnosno DMPO-OH „spin adukte“:



Ovaj antiradikalni test daje informaciju ne samo o antiradikalnoj aktivnosti ekstrakata na slobodne hidroksil radikale već i o sposobnosti aktivnih jedinjenja prisutnih u ekstraktima da stvaraju komplekse sa jonima gvožđa i da na taj način sprečavaju stvaranje hidroksil radikala Fentonovom reakcijom. Hiperfina struktura ovog ESR spektra je predstavljena sa četiri linije relativnog intenziteta 1:2:2:1 i istih konstanti hiperfinog cepanja za jedan ^{14}N -atom ($I = 1$) $a_{\text{N}} = 14,9 \text{ G}$, i za jedan ^1H -atom ($I = 1/2$) $a_{\text{H}} = 14,9 \text{ G}$ (28). $\text{IC}_{50,\text{OH}}$ vrednosti ispitivanih uzoraka u prisustvu CoffeeBerry[®] ekstrakta bile su u opsegu 11,33-102,22 $\mu\text{L}/\text{mL}$ (Slika 23).

Međutim, promene vrednosti IC_{50} u toku fermentacije nisu zavisile od promena u sadržaju polifenolnih jedinjenja. Može se uzeti u obzir i činjenica da jedinjenja nastala tokom fermentacije (vitamini, organske kiseline, itd) doprinose antioksidativnoj aktivnosti kombuha napitaka (Chu i Chen, 2006). Takođe, antiradikalna aktivnost uslovljena je i prisustvom ekstracelularnih enzima koji su uključeni u strukturnu modifikaciju komponenti medijuma tokom Kombuha fermentacije (Chu i Chen, 2006).



Slika 23. Uticaj CoffeeBerry[®] ekstrakta na stvaranje i transformaciju hidroksil radikala tokom kombuha fermentacije (TK-kombuha od crnog čaja; CBK-kombuha obogaćena CoffeeBerry[®])

Svi ispitani TK i CBK uzorci pokazali su antiradikalnu aktivnost i na DPPH i na OH radikale. Antiradikalna aktivnost na OH radikale bila je niža (11,33-102,22 $\mu\text{L}/\text{mL}$) u odnosu na DPPH (26,33-170,13 $\mu\text{L}/\text{mL}$).

Prirodni antioksidanti imaju sposobnost antiradikalnog delovanja koji uključuju različite hemijske mehanizme. Među najznačajnije mehanizme

delovanja ubrajaju se sposobnost predaje vodonikovog atoma, direktno vezivanje radikala u hemijsku strukturu antioksidanata, kao i sposobnost heliranja metalnih katalizatora oksidacije, pre svega metala gvožđa.

Važno je uočiti i činjenicu da su uzorci iz obe ispitane grupe najveću antiradikalnu aktivnost ispoljili šesti dan trajanja fermentacije. Ovakvi rezultati dobijeni za uzorke označena kao TK6 i CBK6 ukazuju na mogućnost formiranja i drugih antioksidativnih jedinjenja nefenolne strukture šestog dana fermentacije.

Struktura polifenolnih jedinjenja je ključna odrednica sposobnosti hvatanja slobodnih radikala i heliranja jona metala. Mnogi literaturni podaci potvrđuju da je sposobnost hvatanja slobodnih radikala katehina u direktnoj vezi sa hemijskom strukturom jedinjenja koja pripadaju ovoj klasi flavonoida i to sa estarski vezanom galnom kiselinom u položaju 3 prstena C, kateholnom grupom (3,4-dihidroksilna grupa) na prstenu B i hidroksilnom grupom u položajima 5 i 7 prstena A. Utvrđeno je da katehini koji u svojoj strukturi imaju galnu kiselinu (galokatehini) pokazuju izraženiju antioksidativnu aktivnost jer imaju veće koeficijente raspodele u sistemu fosfolipid/voda, zbog kojih se menjaju karakteristike fosfolipidnog dvosloja u membrani i time povećava njihova rastvorljivost (Sutherland i sar., 2006). Na osnovu literaturnih podataka može se pretpostaviti da katehini prisutni u uzorcima doprinose njihovom pozitivnom uticaju na zdravlje ljudi, pa se stoga ispitani uzorci sa CoffeeBerry® ekstraktom (CBK0-CBK9), odnosno, kombuha obogaćena ovim ekstraktom mogu klasifikovati kao visokovredni proizvodi. Mehanizam antioksidativnog delovanja svih prisutnih polifenola zasniva se na njihovoj sposobnosti da hvataju slobodne radikale, odaju vodonikove atome ili elektrone ili heliraju katjone metala (Apel i Hirt, 2004). Prethodne studije koje su se bavile ispitivanjem odnosa strukture i aktivnosti derivata cimetine kiseline ukazale su na značajan uticaj hidroksilnih grupa vezanih u *orto* položaju, i to u položajima 3 i 4 na antiradikalnu efikasnost

Pored toga, važno je istaći da kafena kiselina takođe ima dve hidroksilne grupe u *orto* položaju i to na 3 i 4 ugljenikovom atomu (Olthof i sar., 2001). Saopšteno je da je uvećan antioksidativni potencijal polifenola iz preparata CoffeeBerry® najverovatnije posledica povećane hidrofilnosti komponenata koje su esterifikovane (Kweon i sar., 2001). Pored toga, poznato je da je ukupan antioksidativni potencijal voća, povrća, čajeva i biljnih napitaka značajniji od antioksidativnog potencijala bilo kojeg pojedinačnog sastojka. Zbog toga antioksidativne karakteristike pojedinačne komponente u grupi mogu značajno da variraju, pa iste količine polifenola ne obezbeđuju uvek isti antioksidativni efekat. Posmatrana antioksidativna aktivnost je rezultat i sinergističkog delovanja svih prisutnih jedinjenja.

Antioksidativni potencijal uzoraka kombuha napitaka, dobijenih fermentacijom zaslađenog crnog čaja obogaćenog ekstraktom CoffeeBerry®, pripisuje se hlorogenskoj kiselini i njenim derivatima (Tabela 5), koja ima izraženu sposobnost hvatanja slobodnih radikala (Gomez-Ruiz i sar., 2008; Yashin i sar., 2013). Hlorogenska i kafena kiselina imaju antioksidativnu aktivnost *in vitro* i inhibiraju stvaranje mutagenih i kancerogenih *N*-nitrozo jedinjenja (Daglia i sar., 2004). Takođe, hlorogenska kiselina ima sposobnost sprečavanja oštećenja DNK *in vitro* (Bakuradze i sar., 2010). U epidemiološkim

studijama utvrđeno je da je hlorogenska kiselina, dominantna polifenolna komponenta u kafi, verovatno odgovorna za obrnuto proporcionalnu zavisnost između konzumiranja kafe i pojave kancera debelog creva (Bakuradze i sar., 2010).

4.4. ISPITIVANJE ANTIMIKROBNE AKTIVNOSTI KOMBUHE OBOGAĆENE CoffeeBerry® EKSTRAKTOM

Rezultati antimikrobne aktivnosti kombuha napitka od crnog čaja i onog obogaćenog CoffeeBerry® ekstraktom i odgovarajućih kontrolnih uzoraka prikazani su u Tabelama 6 i 7. Rezultati antimikrobne aktivnosti kombuha ukazuju da kombuha napici, rastvori sirćetne kiseline i toplotno denaturisani napici imaju najizraženiju antibakterijsku aktivnost prema svim ispitanim bakterijama. Takođe, u antimikrobnoj aktivnosti dva ispitana kombuha napitka nije bilo značajnije razlike, kao ni razlika u delovanju prema referentnim i tzv. „divljim“ bakterijskim sojevima.

Tabela 6. Antimikrobna aktivnost kombuhe od crnog čaja i kontrolnih uzoraka (prečnik zone inhibicije uključujući i bunarčić±sd mm)

Test organizam	Kombuha		Sirćetna kiselina		Toplotno denaturisana kombuha		Neutralisana kombuha		Nefermentisan crni čaj	
	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
<i>Salmonella typhimurium</i>	nd	11,7 (0,6)	nd	13,0 (0,0)	nd	12,0 (0,0)	nd	nd	nd	nd
<i>Escherichia coli</i>	nd	12,0 (0)	nd	12,0 (0,0)	nd	11,3 (0,6)	nd	nd	nd	nd
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	13,7 (0,5)	nd	14,2 (1,0)	nd	13,2 (0,5)	nd	nd	10,5 (0,4)	nd	10,7 (0,6)
<i>Citrobacter freundii</i>	12,2 (1,0)	22,0 (0)	12,7 (0,6)	nd	11,7 (1,0)	21,7 (0,5)	nd	22,5 (0,6)	nd	nd
<i>Staphylococcus aureus</i>	15,7 (0,6)	nd	nd	14,0 (0,0)	13,0 (0,8)	nd	nd	nd	nd	nd
<i>Bacillus cereus</i>	13,0 (0,8)	nd	nd	11,3 (0,6)	13,0 (0,8)	nd	nd	nd	nd	nd
<i>Enterococcus faecalis</i>	nd	12,0 (0,8)	nd	12,0 (0,8)	nd	11,5 (0,6)	nd	nd	nd	nd
<i>Listeria monocytogenes</i>	11,7 (0,6)	nd	nd	12,3 (1,1)	nd	11,7 (0,6)	nd	nd	nd	nd
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
<i>Candida albicans</i>	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd

A – čista zona oko bunarčića; B – zona redukovano rasta; nd – nije detektovana zona inhibicije.

Tabela 7. Antimikrobna aktivnost kombuhe od crnog čaja obogaćenog CoffeeBerry® ekstraktom
(prečnik zone inhibicije uključujući bunarčić±sd mm)

Test organizam	Kombuha		Sirćetna kiselina		Toplotno denaturisana kombuha		Neutralisana kombuha		Nefermentisan crni čaj+ CoffeeBerry	
	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
<i>Salmonella typhimurium</i>	nd	12,7 (0,5)	nd	12,3 (0,5)	nd	10,9 (0,6)	nd	nd	nd	nd
<i>Escherichia coli</i>	nd	11,7 (0,6)	nd	11,7 (0,5)	nd	11,5 (0,6)	nd	nd	nd	nd
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	13,4 (1,0)	nd	14,0 (0,3)	nd	14,0 (0,0)	nd	nd	13,0 (0,8)	-	10,2 (0,3)
<i>Citrobacter freundii</i>	12,4 (0,7)	15,0 (0,0)	12,7 (0,5)	nd	12,5 (0,6)	16,0 (0,4)	nd	nd	nd	nd
<i>Staphylococcus aureus</i>	13,0 (0,8)	nd	nd	13,1 (0,6)	12,5 (0,6)	nd	nd	nd	nd	nd
<i>Bacillus cereus</i>	14,5 (0,6)	nd	nd	11,6 (0,5)	13,0 (0,0)	nd	nd	nd	nd	nd
<i>Enterococcus faecalis</i>	nd	12,5 (0,6)	nd	11,7 (0,6)	nd	12,6 (0,5)	nd	nd	nd	nd
<i>Listeria monocytogenes</i>	12,0 (0,0)	nd	nd	11,5 (0,5)	nd	11,5 (0,5)	nd	nd	nd	nd
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
<i>Candida albicans</i>	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd

A - čista zona oko bunarčića; B – zona redukovanoog rasta; nd – nije detektovana zona inhibicije.

Čiste zone oko bunarčića ukazuju na baktericidnu aktivnost kombuha napitaka i kontrolnih uzoraka prema nekim Gram-negativnim (*Pseudomonas aeruginosa* i *Citrobacter freundii*) i svim Gram-pozitivnim bakterijama (izuzev soja *Enterococcus faecalis*). Ostali bakterijski sojevi ispoljili su veću osetljivost tako da su na njih kombuha napici i kontrolni uzorci delovali bakteriostatski što se ispoljilo zonom redukovano rastu oko bunarčića.

S obzirom da su ispitani kombuha napici i rastvori sirćetne kiseline ispoljili približno istu aktivnost prema test organizmima može se konstatovati da je sirćetna kiselina glavni nosilac antimikrobne aktivnosti u oba napitka. Poznato je da slabe organske kiseline deluju antimikrobno; u vodenim rastvorima slabe kiseline formiraju dinamičku ravnotežu između nedisosovanog molekula i jona. Konzervirajuće delovanje slabih organskih kiselina objašnjava se time da nedisosovani deo molekula kiseline koji se formira u vodenom rastvoru, za razliku od anjona, difunduje kroz ćelijsku membranu. Kako je vrednost pH unutar ćelije veća od pH okoline postoji težnja da se osmotski pritisci i koncentracija H^+ izjednače. Pod navedenim okolnostima molekul kiseline u ćelijskoj citoplazmi, koja je približno neutralnog pH, disocijacijom oslobađa H^+ jone što izaziva zakišeljavanje citoplazme, oštećuje ćelijske enzime, proteine i DNK i na kraju smrt ćelije. Antimikrobna aktivnost slabih organskih kiselina se povećava ukoliko je vrednost pH sredine oko ćelije niža jer je tada veća koncentracija nedisosovanog dela molekula kiseline, što povećava difuziju molekula kroz ćelijsku membranu. Pored toga, moguće je da su toksični efekti po ćeliju mikroorganizama rezultat nakupljanja anjona organskih kiselina u citoplazmi do koncentracija koje su kritične i koje sprečavaju reankalizaciju ćelije (Mani-López i sar., 2011).

Prethodna istraživanja antimikrobne aktivnosti kombuhe od zelenog čaja (Sreeramulu i sar., 2000 i 2001), kao i njenih anologa od žalfije i melise (Četojević Simin i sar., 2008 i 2012) takođe ukazuju da je glavni nosilac antimikrobne aktivnosti sirćetna kiselina. Međutim, verovatno je da antimikrobna aktivnost kombuhe nije posledica delovanja samo jedne komponente napitka već je posledica sinergističkog delovanja više različitih sastojaka kao što su organske kiseline, jedinjenja poreklom iz čaja koji je upotrebljen za fermentaciju i drugih metabolita čajne gljive i direktno zavisi od pH vrednosti napitka (Sreeramulu i sar., 2001; Battikh i sar., 2012). Izvesna odstupanja u rezultatima koji su prikazani u Tabeli 6 gde kombuha od crnog čaja ispoljava baktericidnu aktivnost prema *Staphylococcus aureus* i *Bacillus cereus*, dok sirćetna kiselina deluje bakteriostatski se upravo mogu objasniti prethodnim navodima. Slični rezultati su dobijeni i prilikom ispitivanja aktivnosti kombuhe od crnog čaja+CoffeeBerry® ekstrakt na *Bacillus cereus* (Tabela 7). Pored toga, kombuha od crnog čaja nakon neutralisanja pH je ispoljila bakteriostatsku aktivnost prema *Pseudomonas aeruginosa* i *Citrobacter freundii*, a kombuha od crnog čaja+CoffeeBerry® ekstrakta prema *Pseudomonas aeruginosa*. Bakteriostatsko delovanje prema *Pseudomonas aeruginosa* ispoljio je i sam crni čaj.

Odsustvo antimikrobne aktivnosti toplotno denaturisanih napitaka ukazuje da aktivne antimikrobne komponente kombuha napitaka nisu termolabilne i da po svojoj prirodi to nisu proteini velike molekulske mase.

Kombuha napici i kontrolni uzorci nisu ispoljili delovanje prema sojevima kvasaca koji su upotrebljeni kao test organizmi (Tabele 6 i 7) što se može objasniti činjenicom da su kvasci kao acidofilni/acidotolerantni organizmi mnogo rezistentniji prema organskim kiselinama u odnosu na bakterije. Greenwalt i sar. (1998) takođe nisu u svom istraživanju zabeležili antifungalnu aktivnost kombuha napitka, odnosno, crnog čaja i neutralisane kombuhe prema *Candida albicans*. U istom istraživanju jedino je komercijalno sirće sa koncentracijom sirćetne kiseline od 50 g/L dovelo do smrti ćelija *Candida albicans*. Iz tog razloga je moguća kontaminacije napitaka koji se pripremaju u kućnim uslovima kvascima i plesnima iz vazduha, kao eukariotskim organizmima.

Kako pokazuju rezultati prikazani u Tabelama 6 i 7 nefermentisani crni čaj i nefermentisani crni čaj sa dodatkom CoffeeBerry® ekstrakta su kao kontrolni uzorci pokazali identično bakteriostatsko delovanje samo prema *Pseudomonas aeruginosa* (zona delovanja je bila 10,7 i 10,2 mm). Ovi rezultati ukazuju da sam CoffeeBerry® ekstrakt primenjen u koncentraciji od 1,5 g/L u podlozi za kombuha fermentaciju ne doprinosi antimikrobnoj aktivnosti napitka. Iako u dostupnoj literaturi nema podataka o antimikrobnoj aktivnosti CoffeeBerry® ekstrakta, potencijalna aktivnost bi se mogla pripisati delovanju fenolnih jedinjenja iz ekstrakta. Istraživanja koja se odnose na antimikrobnu aktivnost asme kafe (*Coffea arabica*) pokazala su da ona poseduje baktericidnu aktivnost prema *Vibrio cholerae*, *Salmonella typhimurium* i *Salmonella typhi* (Handayani, 2009). Tanini i kofein iz kafe inhibiraju rast *Staphylococcus aureus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *V. cholerae* i *Salmonella* sp. (Michels, 2000). Almeida i sar. (2006) utvrdili su da ekstrakti prženih zrna kafe kao i pojedine komponente iz kafe (kofein, hlorogenska kiselina i protokatehinska kiselina) pokazuju aktivnost prema bakterijama familije Enterobacteriaceae. Utvrđeno je da kofein iz zrna kafe inhibira rast plesni *Aspergillus parasiticus* i produkciju aflatoksina, kao i da kofein u koncentraciji od 0,1% inhibira sintezu proteina u ćelijama bakterija i kvasaca (Mazzafera, 2002). Bez obzira na to, neki mikroorganizmi mogu da rastu i preživljavaju u prisustvu kofeina što je u vezi sa njihovom sposobnošću da degradiraju ovaj alkaloid. Samlevena zrna kafe ekstrahovana u toploj vodi pokazuju antivirusnu aktivnost koja se delimično pripisuje kofeinu, ali i drugim do sad neidentifikovanim komponentama zrna kafe (Utsunomiya i sar., 2008).

Ekstrakti pulpe zrna kafe pokazali su antibakterijsku aktivnost prema bakterijama *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* i *Pseudomonas fluorescens*, a kao glavne aktivne komponente antibakterijske aktivnosti označene su hlorogenska, kafena i p-kumarna kiselina (Handayani, 2009).

Istraživanja antimikrobne aktivnosti kombuhe su pokazala da vrsta čaja u podlozi za fermentaciju nije od ključnog značaja za aktivnost napitka jer čaj u primenjenim koncentracijama (manje od 5 g/L) ne pokazuje bilo kakvu antimikrobnu aktivnost (Sreeramulu i sar., 2001; Četojević Simin i sar., 2008; Četojević Simin i sar., 2012). Nefermentisani crni i zeleni čaj čak i u koncentracijama od 70 g/L nisu pokazali antimikrobnu aktivnost prema većini ispitanih mikroorganizama (Greenwalt i sar., 1998). Jedino je čaj u koncentraciji

od 35 g/L minimalno inhibirao rast *Staphylococcus aureus*. S druge strane, čaj u koncentraciji iznad 4,4 g/L ima izrazito gorak ukus i nije prijatan za konzumiranje (Greenwalt i sar., 1998), što treba uzeti u obzir iz ugla senzorskih karakteristika napitaka. Odsustvo antimikrobne aktivnosti crnog i zelenog čaja u konzumnim koncentracijama može se objasniti niskom koncentracijom aktivnih komponenata u tako pripremljenim napicima (Steinkraus i sar., 1996; Sreeramulu i sar., 2001). Pored crnog, odnosno, zelenog čaja ni čajevi pripremljeni od rtanjskog čaja (*Satureja montana* L.) i od melise (*Melissa officinalis* L.) u koncentraciji od 5 g/L nisu pokazali antimikrobnu aktivnost protiv test organizama prilikom ispitivanja antimikrobne aktivnosti kombuhe pripremljene od ovih čajeva kao alternativnih izvora azota (Četojević Simin i sar., 2008; 2012).

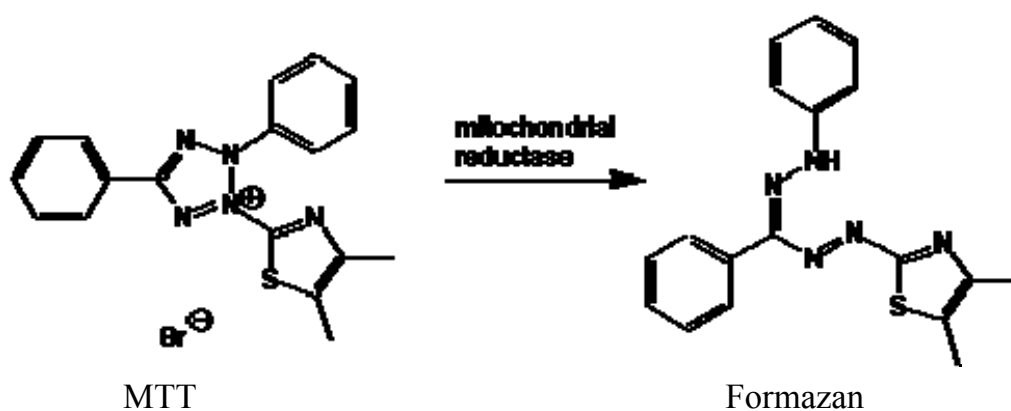
Odsustvo antimikrobne aktivnosti samog CoffeeBerry® ekstrakta kao dodatka crnom čaju u podlozi za kultivaciju čajne gljive u ovoj disertaciji, se takođe može se objasniti niskom koncentracijom aktivnih komponenata u primenjenoj koncentraciji CoffeeBerry® ekstrakta. Kao i u slučaju crnog čaja dodatak veće količine CoffeeBerry® ekstrakta u cilju povećanja eventualnog antimikrobnog efekta kombuhe bi nepovoljno uticao na senzorne karakteristike napitka. Pored toga, treba imati u vidu i dnevne doze CoffeeBerry® ekstrakta koje se preporučuju za konzumiranje, a što limitira i količinu ekstrakta kao funkcionalnog dodatka kombuhi.

4.5. ISPITIVANJE CITOTOKSIČNOSTI KOMBUHE OBOGAĆENE CoffeeBerry® EKSTRAKTOM

Tokom razvoja medicinskih nauka, priroda je oduvek predstavljala bogat i neiscrpan izvor novih biološki aktivnih supstanci, uključujući i antikancerogene supstance. Postoji veliki broj biljnih vrsta koje su kao izvor antitumorskih jedinjenja korišćene u tretmanima ili prevenciji kancera (Reddy i sar., 2003). Danas, kancer predstavlja jedan od vodećih uzroka smrti širom sveta, zbog čega su sprovedene različite terapije kancera, uključujući i korišćenje prirodnih, funkcionalnih produkata. Stoga, postoji velika potreba da se istraže efektivni, neiscrpani izvori sa cititoksičnom (antiproliferativnom) aktivnosti, uz razumevanje mehanizama delovanja antitumorskih agenasa zbog buduće primene u terapiji. Za testiranje cititoksične aktivnosti kombuhe obogaćene CoffeeBerry® ekstraktom i kontrolnog uzorka (kombuhe pripremljene na tradicionalan način od zaslađenog crnog čaja) su izabrane tumorske linije koje predstavljaju visoko učestale i široko rasprostranjene uzročnike tumor-zavisnih smrti širom sveta: Hep2c (humana ćelijska linija „human larynx carcinoma“), RD (humana ćelijska linija „rhabdomyosarcoma“) i L2OB (mišija tumorska fibroblastna linija u koju su transfektovani neki humani geni) (Half i Arber, 2009).

Analiza uzoraka kombuhe, tj. fermentacione tečnosti tokom kultivacije obogaćene CoffeeBerry® ekstraktom (CBK) i kombuhe/fermentacione tečnosti

pripremljene na tradicionalan način od zaslađenog crnog čaja (TK) je izvršena u *in vitro* uslovima na RD, Hep2c i L2OB ćelije. Citotoksični efekat ekstrakta je izražen kao IC₅₀ vrednost (koncentracija koja inhibira 50% ćelijskog rasta), a rezultati su sumarno prikazani u Tabeli 8. Kao kontrola su korišćene same nestimulisane ćelije, ćelije u kulturi čiji je rast 100%. U Tabeli 8 je data vrednost IC₅₀ (μM) za vreme delovanja od 48 h ispitanih uzoraka na Hep2, RD i L2OB ćelija, određen MTT testom. Eksperimenti kod kojih se koristi MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-ol)-2,5-difeniltetrazolijum bromid] se zasnivaju na osobini da životno sposobne ćelije razlažu tetrazolijum so MTT mitohondrijalnom sukcinat dehidrogenazom, pri čemu se dobija plavo obojen proizvod formazan (Slika 24) (http://www.en.wikipedia.org/wiki/MTT_assay, Cvetanović i sar., 2015).



Slika 24. Redukcija MTT-a mitohondrijalnom reduktazom do formazana

U Tabeli su date IC₅₀ (μg/mL) za 48 h delovanja ispitivanih uzoraka fermentisane tečnosti sa crnim čajem (TK) i one obogaćene CoffeeBerry[®] ekstraktom (CBK) na Hep2, RD i L2OB ćelija, određene MTT testom. Mikroskopska analiza je pokazala da svi uzorci u koncentracijama (<53 μg/mL) imaju izrazito citolitičko dejstvo na sve tri testirane ćelijske linije, a uzorak CBK6 se na sve tri ćelijske linije pokazao kao potentan inhibitor rasta ćelija. Kod uzorka CBK6 (fermentaciona tečnost nakon 6 dana fermentacije podloge crni čaj+CoffeeBerry[®]) značajniji inhibicioni efekat na rast/preživljavanje testiranih ćelija uočen je pri upotrebi koncentracija preko 2,36 μg/mL. Za ćelijske linije Hep2c, L2OB i RD, smanjenje broja ćelija za više od 50% u odnosu na odgovarajuće pozitivne kontrole je uočeno nakon tretmana uzorkom CBK6 u koncentracijama većim od 2,36, 7,36 i 11,12 μg/mL. Poređenja radi, odgovarajući kontrolni uzorak (TK6 – fermentaciona tečnost dobijena nakon 6 dana kultivacije čajne gljive na podlozi sa crnim čajem) su za ćelijske linije Hep2c, L2OB i RD dali vrednosti IC₅₀ od: 39,69, 50,91 i 42,61 μg/mL.

Tabela 8. Vrednosti IC₅₀ (µg/mL) za 48 h delovanja uzoraka fermentacione tečnosti tokom kultivacije čajne gljive na podlozi od zaslađenog crnog čaja (TK) i podlozi obogaćenom CoffeeBerry® ekstraktom (CBK) na Hep2, RD i L2OB ćelija, određene MTT testom

Uzorci	Hep2c ćelije ^a	RD ćelije ^b	L2OB ćelije ^c
TK	36,86±0,25*	43,18±0,72	53,66±0,27
TK0	38,88±0,17	45,03±1,85	51,74±2,52
TK2	37,78±0,64	44,25±0,25	52,34±0,17
TK4	38,77±1,28	43,47±1,01	51,76±1,65
TK6	39,69±0,55	42,61±0,18	50,91±0,25
TK8	34,66±1,14	29,25±0,78	32,74±0,71
TK9	33,58±0,88	31,35±0,47	33,36±0,85
TCB	29,56±0,35	53,85±0,28	44,24±0,96
CBK0	22,55±0,67	46,77±0,64	35,54±0,24
CBK2	20,48±0,55	44,98±1,08	32,27±2,18
CBK4	21,44±0,36	42,65±0,47	30,62±1,52
CBK6	2,36±0,25	11,12±1,06	7,36±0,47
CBK8	8,33±0,17	22,48±0,65	14,24±0,95
CBK 9	12,28±1,55	31,28±0,47	19,74±0,25
Cis-diamindihloroplatinum (Cis-DDP)	0,94±0,55	1,4±0,97	0,72±0,64

*Glavna vrednost±2SD; ^a humana ćelijska linija human larynx carcinoma; ^bhumana ćelijska linija rhabdomyosarcoma; ^cmišija tumorska fibroblastna linija u koju su transfektovani neki humani geni

Posle uzorka CBK6 koji je pokazao izuzetno dobru antiproliferativnu aktivnost pri čemu su Hep2c ćelije bile najosetljivije, sledi uzorak CBK8 (fermentaciona tečnost nakon 8 dana fermentacije podloge crni čaj+CoffeeBerry®) koji pokazuje nešto manju antiproliferativnu aktivnost, takođe sa najmanjom vrednošću IC₅₀ za Hep2c ćelijsku liniju od 8,33 µg/mL. Najveću vrednost za Hep2c ćelijsku liniju pokazao je uzorak TK6 (39,69 µg/mL), za RD TCB (zaslađen crni čaj+ CoffeeBerry®) (53,85 µg/mL), dok za L2OB ćelijsku liniju uzorak TK (zaslađen crni čaj) (53,66 µg/mL). Značajno je da tokom fermentacije u slučaju obe ispitane podloge dolazi do smanjenja vrednosti IC₅₀ u poređenju sa podlogama na početku fermentacije, što govori u prilog da se fiziološkom aktivnošću čajne gljive tokom njene kultivacije stvaraju jedinjenja sa antiproliferativnom aktivnošću.

Prema American National Cancer Institute (NCI), kriterijum za citotoksičnu aktivnost biljnih ekstrakata je IC₅₀ < 30 µg/mL (Itharat i sar., 2004). NCI kriterijum za Hep2c ćelije zadovoljavaju svi uzorci obogaćeni CoffeeBerry® ekstraktom: CBK, CBK0, CBK2, CBK4, CBK6, CBK8 i CBK9. Za RD ćelije

navedeni kriterijum zadovoljavaju samo uzorci CKB6 i TCB, dok za L2OB kriterijum vrednosti $IC_{50} < 30 \mu\text{g/mL}$ uzorci CKB6, CKB8 i CKB9.

Poređenjem vrednosti za Hap2c ćelijsku liniju i standarda cis-diamindihloroplatine (Cis-DDP), može se uvideti da su vrednosti svih uzoraka znatno veći od vrednosti dobijene za dati standard. Ukoliko je vrednost uzorka na ispitivane ćelijske linije manja, odnosno bliža standardu cis-diamindihloroplatini, utoliko je i antiproliferativna aktivnost jača. Najpribližnije vrednosti standardu pokazuju uzorci CKB6 i CKB8, dok najveća odstupanja od ove vrednosti pokazuju uzorci TK0 (zaslađeni crni čaj nakon inokulacije), TK4 (fermentaciona tečnost nakon 4 dana fermentacije podloge od crnog čaja) i TK6 (fermentaciona tečnost nakon 6 dana fermentacije podloge od crnog čaja). Vrednost svih uzoraka za RD ćelijsku liniju su znatno veći od vrednosti za dati standard. Najmanje odstupanje pokazuje uzorak CKB6, a najveće uzorci TCB, TK0 i CKB0. Uzorak fermentaciona tečnost nakon 6 dana fermentacije podloge obogaćene CoffeeBerry® ekstraktom (CBK6) ima najpribližnije vrednosti vrednosti standarda za sve tri ćelijske linije, dok uzorci TK, TK0 i TK2 pokazuju najveća odstupanja od vrednosti za dati standard.

Četojević-Simin i sar. (2008) su ispitali antiproliferativnu aktivnost kombuhe od crnog i rtanjskog čaja na rast tri histološki različite ćelijske linije humanog kancera: HeLa (epitelni karcinom grlića materice), HT-29 (adenokarcinom debelog creva) i MCF-7 (adenokarcinom dojke). Kombuha napici su pokazali najveći efekat inhibicije prema HeLa ćelijskoj liniji (oko 20%), dok je rast HT-29, odnosno MCF-7 ćelija smanjen za 15%, odnosno 10%. Nije bilo značajne razlike u delovanju kombuhe od crnog i od rtanjskog čaja na iste ćelijske linije. U istraživanju antiproliferativne aktivnosti vodenog ekstrakta rtanjskog čaja, takođe je najosetljivija bila HeLa ćelijska linija (20% od maksimalne inhibitorne koncentracije, IC_{20} , za vodeni ekstrakt je $400 \mu\text{g/ml}$), u odnosu na kombuhu (IC_{20} je $250 \mu\text{g/ml}$) (Četojević-Simin i sar., 2004). Ovo bi moglo da sugeriše na postojanje aktivnijih antiproliferativnih komponenti u kombuhi dobijenoj od rtanjskog čaja u poređenju sa samim čajnim napitkom.

Velićanski (2012) je ispitala antiproliferativan efekat konzumnog kombuha napitak od melise i odgovarajućeg čajnog napitka. rezultati su pokazali da ispitani napici nisu stimulisali proliferaciju ćelijskih linija humanih karcinoma: HeLa (epitelni karcinom cerviksa), HT-29 (adenokarcinom debelog creva) i MCF-7 (adenokarcinom dojke) pri koncentracijama većim od $100 \mu\text{g/mL}$. Takođe je ustanovljeno da ni jedan od uzoraka ne pokazuje efekat inhibicije rasta navedenih ćelija od 50%. Najveći uticaj i najveća razlika u aktivnosti čajnog i kombuha napitka uočena je za HeLa ćelijsku liniju, gde je IC_{20} za čajni napitak postignuta sa koncentracijom od $500 \mu\text{g/mL}$. Kombuha od melise inhibirala je rast MCF7 ćelijske linije za oko 10% pri koncentraciji od $500 \mu\text{g/mL}$. Čajni i konzumni kombuha napitak od melise nisu uticali na rast ćelijske linije HT-29.

Velićanski (2012) napominje da se prilikom upoređivanja rezultata ispitivanja antiproliferativne aktivnosti kombuha napitaka od različitih čajeva (melisa, rtanjski, crni) moraju uzeti u obzir različite vrednosti titrabilne kiselosti napitaka, ali i razlike u sastavu i količini fenolnih jedinjenja za koje je poznato da

imaju antiproliferativnu aktivnost. Kao i kod antioksidativne aktivnosti, antiproliferativnoj aktivnosti doprinosi ne samo sadržaj i delovanje pojedinačnih fenolnih komponenata, već njihov sinergistički efekat i ukupni antioksidativni/antiproliferativni potencijal (Atoui i sar., 2005).

5. ZAKLJUČAK

- Rezultati ispitivanja podloge pripremljene od CoffeeBerry® ekstrakta kao alternativne podloge za kombuha fermentaciju pokazuju da navedeni ekstrakt ne može u potpunosti da zameni crni čaj kao tradicionalni izvor azotnih jedinjenja u podlozi za kultivaciju čajne gljive, posmatrajući brzinu transformacije podloge i vreme potrebno za dobijanje napitka optimalne kiselosti. Pored toga, senzorske karakteristike napitka dobijenog od samog CoffeeBerry® ekstrakta su nezadovoljavajuće u poređenju sa tradicionalnom kombuhom. Međutim, rezultati su pokazali da Coffeeberry® ekstrakt ima visok sadržaj fenolnih jedinjenja (više nego dvostruko veći u poređenju sa podlogom od crnog čaja) što značajno doprinosi poboljšanju bioloških karakteristika napitka obogaćenog CoffeeBerry®-jem u odnosu na tradicionalnu kombuhu i govori u prilog opravdanosti upotrebe CoffeeBerry® ekstrakta kao funkcionalnog dodatka kombuhi.
- Zaslađena podloga od crnog čaja (sadržaj čaja od 3 g/L) koja sadrži Coffeeberry® ekstrakt kao funkcionalni dodatak (1,5 g/L) pokazala se kao optimalna uzimajući u obzir fizičko-hemijske/hemijske i mikrobiološke parametre fermentacije, ali i preporučene dnevne količine kako kombuhe tako i Coffeeberry® ekstrakta.
- Sadržaj katehina kao jednog od dominantnih jedinjenja u uzorcima fermentisane tečnosti sa crnim čajem i one obogaćene CoffeeBerry® ekstraktom je praktično nepromenjen tokom fermentacije i u opsegu je od 3,28-4,55 µg/mL, dok je sadržaj epikatehina bio značajno veći u podlozi sa CoffeeBerry® ekstraktom (2,73-7,47 µg/mL). Kafena, ferulna, neo-hlorogenska i kriptohlorogenska kiselina su detektovane u relativno visokom sadržaju samo u uzorcima fermentacione tečnosti obogaćene CoffeeBerry® ekstraktom. Pored toga je u navedenim uzorcima tokom fermentacije u visokom sadržaju detektovana i hlorogenska kiselina (188,94-458,56 µg/mL). Poznato je da hlorogenske kiseline kafe poseduju izuzetnu aktivnost kao hvatači slobodnih radikala što kombuhu obogaćenu CoffeeBerry® ekstraktom čini biološki veoma vrednim napitkom.
- Svi ispitani uzorci tradicionalne kombuhe i one obogaćene CoffeeBerry® ekstraktom prikupljeni tokom fermentacije su pokazali antiradikalnu aktivnost na DPPH i hidrosil radikale. IC_{50,DPPH} vrednosti ispitivanih uzoraka sa ekstraktom CoffeeBerry® bile su u opsegu od 26,33-170,13 µL/mL i bile su niže u poređenju sa odgovarajućim uzorcima fermentacione tečnosti sa crnim čajem. Antiradikalna aktivnost na hidrosil radikale bila je niža (11,33-102,22 µL/mL) u odnosu na DPPH radikale. Uzorci iz obe ispitivane grupe su najveću antiradikalnu aktivnost ispoljili šesti dan trajanja fermentacije, što ukazuje na mogućnost formiranja i drugih antioksidativnih jedinjenja nefenolne strukture tokom kombuha fermentacije.
- Pripremljeni kombuha napitak od crnog čaja i onaj obogaćen CoffeeBerry® ekstraktom konzumne titrabilne kiselosti, rastvori sirćetne kiseline iste

kiselosti i toplotno denaturisani napici su pokazali antibakterijsku aktivnost prema svim ispitanim bakterijskim sojevima. Ispitani kombuha napici su pokazali približno istu antibakterijsku aktivnost prema odabranim sojevima Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterijama, pri čemu su veću otpornost pokazale Gram-negativne bakterije. Glavni nosilac antibakterijske aktivnosti kombuha napitaka je sirćetna kiselina, a odsustvo aktivnosti toplotno denaturisanih uzoraka pokazuje da aktivne antimikrobne komponente kombuha napitaka nisu termolabilne i da po svojoj prirodi to nisu proteini velike molekulske mase. Kombuha napitak od crnog čaja i onaj obogaćen CoffeeBerry[®]-jem nisu ispoljili aktivnost prema kvascima *Candida albicans* i *Saccharomyces cerevisiae* kao organizmima sa eukariotskim tipom ćelije. Ovo treba imati u vidu kada se razmatraju potencijalni kontaminanti radne kulture u proizvodnom okruženju.

- Na osnovu ispitivanja (MTT testom) citotoksičnog (antiproliferativnog) efekta uzoraka fermentacione tečnosti obogaćene CoffeeBerry[®] ekstraktom (CBK) tokom kultivacije čajne gljive i poređenja sa kontrolnim uzorkom (tradicionalnom kombuhom od crnog čaja) (TK) konstatovano je da uzorak dobijen nakon 6 dana fermentacije podloge sa CoffeeBerry[®]-jem ima izuzetno dobru antiproliferativnu aktivnost u odnosu na sve tri ćelijske linije: Hep2c, RD i L2OB. NCI (American National Cancer Institute) kriterijum za citotoksičnu aktivnost biljnih ekstrakata od $IC_{50} < 30 \mu\text{g/mL}$ za Hep2c ćelije zadovoljavaju svi uzorci obogaćeni CoffeeBerry[®] ekstraktom: CBK, CBK0, CBK2, CBK4, CBK6, CBK8 i CBK9; za RD ćelije navedeni kriterijum zadovoljavaju samo uzorci CKB6 i TCB, a za L2OB uzorci CKB6, CKB8 i CKB9.
- RD ćelije (humana ćelijska linija rhabdomyosarcom-a) zadovoljavaju samo uzorci fermentacione tečnosti sa CoffeeBerry[®] ekstraktom dobijeni šestog i osmog dana fermentacije, dok su za L2OB ćelije (mišija tumorska fibroblastna linija u koju su transfektovani neki humani geni) kritičnu vrednost $IC_{50} < 30 \mu\text{g/mL}$ pokazali uzorci fermentacione tečnosti sa CoffeeBerry[®] ekstraktom dobijeni šestog, osmog i devetog dana fermentacije.
- Tokom fermentacije u slučaju obe ispitane podloge (one od crnog čaja i one obogaćene CoffeeBerry[®] ekstraktom) dolazi do smanjenja vrednosti IC_{50} u poređenju sa podlogama na početku fermentacije, što govori u prilog da se fiziološkom aktivnošću čajne gljive tokom njene kultivacije stvaraju jedinjenja sa antiproliferativnom aktivnošću.

6. LITERATURA

- Almeida A. A. P., Farah A., Silva D. A. M., Nunan E. A., Glória M. B. A. (2006): Antibacterial activity of coffee extracts and selected coffee chemical compounds against enterobacteria, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 8738-8743.
- Apel, K. i Hirt, H. (2004): Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction, *Annu. Rev. Plant Biol.* 55:373–399.
- Atoui A.K., Mansouri A., Boskou G., Kefalas P. (2005): Tea and herbal infusions: Their antioxidant activity and phenolic profile, *Food Chemistry*, 89, 27-36.
- Bakuradze, T., Lang, R., Hofmann, T., Stiebitz, H. i sar. (2010): Antioxidant effectiveness of coffee extracts and selected constituents in cell-free systems and human colon cell lines, *Mol. Nutr. Food Res.*, 54, 1734–1743.
- 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.
- Battikh H., Bakhrouf A., Ammarb E. (2012): Antimicrobial effect of Kombucha analogues, *LWT - Food Science and Technology*, 47(1), 71-77.
- Bauer-Petrovska, B., Petrushevskaja-Tozi, L. (2000): Mineral and water soluble vitamin content in the Kombucha drink, *International Journal of Food Science and Technology*, 35, 201-205.
- Belloso Morales G., Hernández Sánchez H.H. (2003): Manufacture of a beverage from cheese whey using a "tea fungus" Fermentation, *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 45(1-2), 5-11.
- Blanc, P.J. (1996): Characterization of the tea fungus metabolites, *Biotechnology Letters*, 18 (2):139-142.
- Bøhn, S. K., Blomhoff, R., Paur, I. (2014): Coffee and cancer risk, epidemiological evidence, and molecular mechanisms, *Molecular Nutrition Food Research*, 58, 915–930.
- Cabrera, C., Giménez, R., Carmen López (2003): Determination of Tea Components with Antioxidant Activity, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 4427-4435.
- Chakravorty, S., Bhattacharya, S., Chatzinotas, A., Chakraborty, W., Khattacharya, D., Gachhui, R. (2016): Kombucha tea fermentation: Microbial and biochemical dynamics.
- Chu, S-C., Chen, S. (2006): Effects of origins and fermentation time of the antioxidant activities of Kombucha, *Food Chemistry*, 98, 3, 502-507.
- Cuvelier M.-E., Richard H., Berset C. (1992): Comparison of the antioxidative activity of some acid-phenols: Structure–activity relationships, *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 56, 324-325.

- Cvetanović, A., Švarc-Gajić, J., Zeković, Z., Savić, S., Vulić, J., Mašković, P., Četković, G. (2015): Comparative analysis of antioxidant, antimicrobiological and cytotoxic activities of native and fermented chamomile ligulate flower extracts, *Planta*, 242:721-732.
- Cvetković, D. (2003): Metabolička aktivnost čajne gljive na različitim supstratima, Magistarski rad, Tehnološki fakultet, Novi Sad.
- Cvetković, D., Markov, S., Djurić, M., Savić, D., Velićanski, A. (2008): Specific interfacial area as a key variable in scaling-up Kombucha fermentation, *Journal of Food Engineering*, 85, 387-392.
- Cvetković, D. (2008): Kombucha od lekovitog bilja – biološka aktivnost i parametri fermentacije, Doktorska disertacija, Tehnološki fakultet, Novi Sad.
- Čanadanović-Brunet, J. (1998): Kiseonikovi slobodni radikali i prirodni antioksidanti, Zadužbina Andrejević, Beograd.
- Četojević Simin, D. D., Bogdanović, G. M., Cvetković, D. D., Velićanski, A. S. (2008): Antiproliferative and antimicrobial activity of traditional Kombucha and *Satureja montana* L. Kombucha, *Journal of BUONI*, 13, 395-401.
- Četojević Simin, D. D., Velićanski, A. S., Cvetković, D. D., Markov, S. L., Mrđanović, J. Ž., Bogdanović, V. V., Šolajić, S. V. (2012): Bioactivity of Lemon Balm Kombucha, *Food and Bioprocess Technnology*, 5, 1756-1765.
- Daglia, M., Racchi, M., Papetti, A., Lannji, C., Govoni, S, Gazzani, G. (2004): In vitro and ex vivo antihydroxyl radical activity of green and roasted coffee, *J. Agric. Food Chem.* 52, 1700-1704.
- de Azevedo, A. B. A., Kieckbush, T. G., Tashima, A. K., Mohamed, R. S., Mazzafera, P., Viera de Melo, S. A. B. (2008): Extraction of green coffee oil using supercritical carbon dioxide, *Journal of Supercritical Fluids*, 44, 186-192.
- 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.
- Del Rio, D., Stewart, A.J., Mullen, W., Burns, J., Lean, M.E.J., Brighenti, F., Crozier, A., (2004), *J. Agr. Food Chem.*, 52, 2807-2815.
- 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.
- Dórea, J. G., da Costa, T. H. M. (2005): Is coffee a functional food, *British Journal of Nutrition*, 93, 773-782.
- Dufresne, C., Farnworth, E. (2000): Tea, Kombucha, and health: a review, *Food Research International*, 33, 409-421.
- Esquivel, P., Jimenez V. M. (2011): Functional properties of coffee and coffee by-products, *Food Research International*, 46, 488-495.
- 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.
- 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 during wine production, *International Journal of Food Microbiology*, 102, 295-303.
- Gomez-Ruiz, J. A., Ames, J. M., Leake, D.S. (2008): Antioxidant activity and protective effects of green and dark coffee components against human low density lipoprotein oxidation, *European Food Research and Technology*, 227 (4), pp. 1017-1024. I
- Greenwalt, C.J., Ledford, R.A., Steinkraus, K.H. (1998): Determination and characterization of the antimicrobial 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, *Journal of Food Protection*, 63, 7, 976-981.
- Half E., Arber N. (2009): Colon cancer: Preventive agents and the present status of chemoprevention, *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 10: 211-219.
- Handayani, B. R. (2009): Study and characterization of antibacterial compounds of Arabica coffee berry pulp, PhD Thesis, Faculty of the Graduate College, Oklahoma State University.
- Heimbach J.T., Marone P.A., Hunter J.M., Nemzer B.V., Stanley S.M., Kennepohl E. (2010): Safety studies on products from whole coffee fruit, *Food and Chemical Toxicology*, 48, 2517-2525.
- <http://www.atcc.org>.
- <http://www.coffeeberry.org>.
- <http://www.conopljanews.net/kombuha.html>.
- <http://www.en.wikipedia.org/wiki/coffee>.
- http://www.en.wikipedia.org/wiki/MTT_assay.
- <http://www.en.wikipedia.org/wiki/>.
- <http://www.illy.com>
- <http://images.search.yahoo.com>.
- <http://www.bing.com/images>
- <http://www.pSORIJAZALECENJEIDETOKSIKACIJA.COM/index>.
- Itharat A., Houghton P., Eno-Amoogaye E., Burke P., Sampson J., Raman A. (2004): In vitro cytotoxic activity of Thai medicinal plant used traditionally to treat cancer, *J. of Ethoph.* 90: 33-38.
- Izhaki I. (2002): Emodin – a secondary metabolite with multiple ecological functions in higher plants. *New Phytologist*, 155(2), 205-217.
- Jacobson J.L. (2006): *Introduction to Wine Laboratory Practices and Procedures*, Springer Science+Business Media, Inc., New York, pp. 275-277.
- 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.
- Ji, L., Jiang, P., Lu, B., Sheng, Y., Wang, X., Wang, Z. (2013): Chlorogenic acid, a dietary polyphenol, protects acetaminophen-induced liver injury and its mechanism, *Journal of Nutritional Biochemistry*, 24, 1911–1919.

- Jovanović, S.V., Steenken, S., Tošić, M., Marjanović, B., Simić, M.S. (1994): Flavonoids as Antioxidants, *Journal of American Chemical Society*, 116, 4846-4851).
- Konovalov, I.N., Semenova, M.N. (1955): K fiziologii "čajnog griba", *Bot. Žurnal, Moskva*, 40, 4, 567-570.
- Kweon, MH, Hwang, HJ, Sung, HC, 2001, Identification and antioxidant activity of novel chlorogenic acid derivatives from bamboo (*Phyllostachys edulis*). *Food Chem.* 49, 4646-4655.
- Lajšić, S., Grujić-Injac, B. (1998): Hemija prirodnih proizvoda, Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet.
- 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.
- Łuczaj W., Skrzydlewska E. (2005): Antioxidative properties of black tea, *Preventive Medicine*, 40, 910– 918.
- Malbaša, R. (2000): Mogućnosti dobijanja dijetetskog napitka pomoću čajne gljive, Magistarski rad, Tehnološki fakultet, Novi Sad.
- Malbaša R., Lončar E., Djurić M. (2008): Comparison of the products of Kombucha fermentation on sucrose and molasses, *Food Chemistry*, 106, 1039-1045.
- Mani-López E, García HS and López-Malo A. (2011). Organic acids as antimicrobials to control *Salmonella* in meat and poultry products. *Food Research International*, *Food Research International* 45(2): 713-721.
- 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.
- Marsh, A. J., O'Sullivan, O., Hill, C., Ross, R. P., Cotter P. D. (2014): Sequence-based analysis of the bacterial and fungal compositions of multiple kombucha (tea fungus) samples
- Matsushita, K., Toyama, H., Adachi, O. (1994): Respiration chains and bioenergetics of acetic acid bacteria, *Advances in Microbial Physiology*, 35, 247-301.
- Mayser, P., Fromme, S., Leitzmann, C., Gruender, K. (1995): The yeast spectrum of tea fungus Kombucha, *Mycoses* 38 (7-8), 289-295.
- Mayo W.J. (1998). Chemical methods of control: Antimicrobial drugs. In: Johnson T.R. and Case C.L. (eds) *Laboratory experiments in microbiology*. San Francisco: The Benjamin/Cummings Publishing Company, pp. 179-181.
- Mazzafera, P. (2002): Degradation of caffeine by microorganisms and potential use of decaffeinated coffee husk and pulp in animal breeding, *Sci. Agric.*, 59,4,815-821.
- Michels, M.J.M. (2000): Tea, herbal teas, and coffee, *Microbiological safety and quality of food*, Barbara, L., Baird-Parker, M., Gould, T.C., (Ed.), Grahamew. Springer-Verlag, 960-971

- Miljković, D., Duell, B., Miljković, V. (2006): Low-mycotoxin coffee cherry products, Int. Patent App. Publ. WO 2006/0263507.
- Mosmann T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*. 65: 55-63.
- Olthof, M. R., Hollman, P.C.H., Katan, M.B. (2001): Chlorogenic acid and caffeic acid are absorbed in humans. *J. Nutr.* 131:66-71.
- Odžaković, B. (2015): Poboljšanje kvaliteta napitka kafe izborom optimalnih uslova prženja i odnosa različitih vrsta kafe, Doktorska disertacija, Tehnološki fakultet Novi Sad.
- Prabhakaran Nair, K. P. (2010): The Agronomy and Economy of Important Tree Crops of the Developing Word, 181-208, Elsevier Inc.
- Prior, R.L., Wu, X., Schaich, K. (2005): Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements, *J. Agric. Food Chem*, 53, 4290-4302.
- Reddy, G. S. N., Prakash, J. S. S., Srinivas, R., Matsumoto, G. I., Shivaji, S. (2003) *Leifsonia rubra* sp. nov. and *Leifsonia aurea* sp. nov., psychrophiles from a pond in Antarctica. *Int J Syst Evol Microbiol* 53, 977–984.
- 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.
- 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).<http://www.kombucha-research.com>.
- Rufián-Henares J. A., de la Cueva S. P. (2009): Antimicrobial activity of coffee melanoidins – A study of their metal-chelating properties, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 432-438.
- Sengun, I. Y., Karabiyikli, S. (2011): *Food Control*, 22, 647-656.
- 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.
- Sievers, M., Swings, J. (2005): u Garrity G. M. (Ed.), *Family Acetobacteriaceae* (2nd ed.), *Bergey's manual of systematic bacteriology*, Vol. 2, 41-95, New York:Springer.
- Singleton, V.L., Orthofer, R., Lamuela-Raventos, R.M. (1999): u *Methods in Enzymology*, Packer, L. (Ed.), CA: Academic Press, San Diego, pp. 152–178.
- Sharangi, A. B. (2009): Medicinal and therapeutic potentialities of tea (*Camelia sinensis* L.) - A review, *Food Research International*, 42, 529-535.

- Sreeramulu, G., Zhu, Y., Knol, W. (2000): Kombucha fermentation and its antimicrobial activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48, 6, 2589-2594.
- Sreeramulu G, Zhu Y i Knol W. (2001). Characterization of Antimicrobial Activity in Kombucha Fermentation, *Acta Biotechnologica* 21(1): 49-56.
- Steinkraus, K.H., Shapiro, K.B., Hotchkiss J.H., Mortlock, R.P. (1996): Investigations into the antibiotic activity of tea fungus/kombucha beverage, *Acta Biotechnologica*, 16, 199-205.
- Stojanović M., Janković I. (1996): Gajenje čajne gljive - kombuhe, IGP SANBA, Beograd.
- Su, Y.L., Leung, L.K., Huang, Y., Chen, Z. (2003): Stability of tea theaflavins and catechins, *Food Chemistry*, 83, 189-195.
- Sutherland, B. A., Rahman, R.M.A., Appleton, I.: (2006): *J. Nutr. Biochem.*, 17, 291–306.
- Teoh, L.A., Heard, G., Cox, J. (2004): Yeast ecology of Kombucha fermentation. *International Journal of Food Microbiology* 95, 119-126.
- Utsunomiya, H., Ichinose, M., Uozaki, M., Tsujimoto, K., Yamasaki, H., Koyama, A. H. (2008): Antiviral activities of coffee extracts *in vitro*, *Food and Chemical Toxicology*, 46, 1919–1924.
- Velićanski, A. (2012): Karakterizacija funkcionalnog napitka od melise (*Melissa officinalis* L.) dobijenog fiziološkom aktivnošću čajne gljive, Doktorska disertacija, Tehnološki fakultet, Novi Sad.
- Velićanski A., Cvetković D., Markov S. (2013): Characteristics of Kombucha fermentation on medicinal herbs from Lamiaceae family, *Romanian Biotechnological Letters*, 18 (1), 8034-8042.
- Yang, Z.W., Ji, B.P., Zhou, F., Li, B., Luo, Y., Yang, L., Li, T. (2009): Hypocholesterolaemic and antioxidant effects of kombucha tea in high-cholesterol fed mice, *Journal of Science and Food Agriculture*, 89, 150-156.
- Yamada, Y., Yukphan, P. (2008): Genera and species in acetic acid bacteria, *International Journal of Food Microbiology*, 125, 15-24.
- Yashin, A., Yashin, J.Y., Wang, Nemzer, B. (2013): Antioxidant and Antiradical Activity of Coffee, *Antioxidants*, 2, 230-245.

**UNIVERZITET U NOVOM SADU
TEHNOLOŠKI FAKULTET**

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

Redni broj:
RBR

Identifikacioni broj:
IBR

Tip dokumentacije: Monografska dokumentacija
TD

Tip zapisa: Tekstualni štampani materijal
TZ

Vrsta rada: Doktorska disertacija
VR

Ime i prezime autora: mr Najmi (Mansur) Ahmed Essawet
AU

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

Naslov rada: "Funkcionalne karakteristike fermentisanog čajnog napitka obogaćenog CoffeBerry®-jem"
NR

Jezik publikacije: Srpski (latinica)
JP

Jezik izvoda: Srpski/engleski
JI

Zemlja publikovanja: Srbija
ZP

Uže geografsko područje: Vojvodina
UGP

Godina: 2016.
GO

Izdavač: Autorski reprint
IZ

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

Fizički opis rada: Broj poglavlja 6, strana 73 , tabela 8, slika 24, literaturnih citata 101
FO

Naučna oblast: Tehnološko inženjerstvo
NO

Naučna disciplina: Biotehnologija
ND

Predmetna odrednica, ključne reči: Kombuha, čajna gljiva, CoffeBerry®, antioksidativna aktivnost, antimikrobna aktivnost, antiproliferativna aktivnost
PO

UDK**Čuva se:**

Biblioteka Tehnološkog fakulteta u Novom Sadu,

ČU

21000 Novi Sad, Bulevar cara Lazara 1, Srbija

Važna

Nema

napomena:**VN****Izvod:****IZ**

Cilj ispitivanja čiji su rezultati prikazani u ovoj doktorskoj disertaciji bio je da se ispita mogućnost dobijanja kombuha napitka od/sa CoffeeBerry® ekstraktom i da se ispituju njegove funkcionalne karakteristike. CoffeeBerry® ekstrakt kao bogat izvor biološki aktivnih jedinjenja bi obezbedio dodatne funkcionalne karakteristike kombuha napitku u poređenju sa onim pripremljenim na tradicionalan način od zaslađenog crnog čaja. U disertaciji je nakon optimizacije sastava podloge za kultivaciju čajne gljive ispitana (*in vitro*) antioksidativna, antimikrobna i citotoksična aktivnost kombuhe/fermentacione tečnosti obogaćene CoffeeBerry® ekstraktom. Antioksidativna aktivnost je ispitana ESR (elektron-spin rezonantnom) spektroskopijom na reaktivne hidroksil i stabilne DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) radikale, kao i kvalitativni i kvantitativni sastav fenolnih jedinjenja, potencijalnih nosilaca biološke aktivnosti (HPLC metodom). Antimikrobna aktivnost je ispitana agar-difuzionom metodom na odabrane referentne i izolovane („divlje“) sojeve bakterija (Gram-pozitivnih i Gram-negativnih) i kvasaca. Citotoksična aktivnost uzoraka na rast odabranih ćelijskih linija: Hep2c (Human larynx carcinom), RD (Rhabdomyosarcoma) i L2OB (mišija tumorska fibroblastna linija u koju su transfektovani neki humani geni) ispitana je MTT testom. U navedenim ispitivanjima je tradicionalna kombuha dobijena od zaslađenog crnog čaja korišćena kao kontrolni uzorak. Rezultati su pokazali da CoffeeBerry® ekstrakt značajno doprinosi antioksidativnoj i citotoksičnoj aktivnosti napitka što govori o punoj opravdanosti upotrebe ovog ekstrakta kao funkcionalnog dodatka podlozi za kultivaciju čajne gljive. Kombuha napici od crnog čaja i sa dodatkom CoffeeBerry® ekstrakta pokazali su približno isto delovanje na bakterijske sojeve, dok je delovanje na kvasce izostalo u potpunosti. Primarni nosilac antibakterijske aktivnosti napitaka je sirćetna kiselina.

**Datum
prihvatanja teme
od strane NN**

03.12.2010.

veća:**DP****Datum odbrane:****DO****Članovi komisije:**

Predsednik: dr Jasna Čanadanović-Brunet, redovni prof. Tehnološkog fakulteta u Novom Sadu

Član: dr Dragoljub Cvetković, vanredni profesor Tehnološkog fakulteta u Novom Sadu

Član: dr Pavle Mašković, docent Agronomskog fakulteta u Čačku

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

Accession number:
ANO
Identification number:
INO
Document type: Monograph documentation
DT
Type of record: Textual printed material
TR
Contents code: PhD Thesis
CC
Author: Najmi (Mansur) Ahmed Essawet, M.Sc.
AU
Mentor: Dragoljub D. Cvetković, Associate Professor, Faculty of Technology,
MN Novi Sad
Title: "Functional characteristics of the fermented tea beverage enriched with
TI CoffeBerry®"
Language of text: Serbian
LT
Language of abstract: Serbian/English
LA
Country of publication: Serbia
CP
Locality of publication: Vojvodina
LP
Publication year: 2016.
PY
Publisher: Author's reprint
PU
Publication place: Novi Sad, Bulevar cara Lazara 1
PP
Physical description: Chapters 6, pages 74, tables 8, pictures 24, references 101
PD
Scientific field: Technological engineering
SF
Scientific discipline: Biotechnology
SD

Subject, Key words SKW Kombucha, tea fungus, CoffeeBerry® (*Melissa officinalis* L.), antioxidant activity, antimicrobial activity, antiproliferative activity

UC

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

Note: N None

Abstract: AB The aim of this study was to investigate fermentation of sweetened medium prepared with CoffeeBerry® extract and functional characteristics of a kombucha beverage enriched with CoffeeBerry® extract. Total phenol concentration in unfermented samples, fermentation broths and kombucha beverages made of CoffeeBerry® extract and black tea was determined spectrophotometrically whereas qualitative and quantitative concentration of polyphenolic compounds was determined by HPLC method. Antioxidant activity on DPPH and hydroxyl radicals in the same samples was determined on an ESR spectrometer. Fermentation broth and kombucha beverage enriched with CoffeeBerry® extract had higher antioxidant activity against both radicals than control samples. Antimicrobial activity of kombucha beverages optimal acidity was tested against selected strains of bacteria (Gram-positive and Gram-negative) and yeast. The main active component of antibacterial activity was acetic acid, but samples did not show any activity against yeast *Candida albicans* and *Saccharomyces cerevisiae*. Antiproliferative activity of fermentation broth with and without CoffeeBerry® extract was measured by MTT test on following cell lines: Hep2c (Human larynx carcinom), RD (Rhabdomyosarcoma) i L2OB (murine tumor fibroblast lines transfected by some human genes). The highest antiproliferative activity shown fermentation broth enriched with CoffeeBerry® extract, wherein Hep2c cells was the most susceptible.

Accepted on Scientific Board on: AS 03.12.2010.

Defended: DE

Thesis Defend Board: DB President: dr Jasna Čanadanović-Brunet, Full Professor, Faculty of Technology, Novi Sad
Member: dr Dragoljub Cvetković, Associate Professor, Faculty of Technology, Novi Sad
Member: dr Pavle Mašković, Assistant Professor, Faculty of Agronomy, Čačak