

UNIVERZITET U BEOGRADU

POLJOPRIVREDNI FAKULTET

Aleksandra S. Sknepnek

**KARAKTERISTIKE ČAJNE GLJIVE –  
KOMBUHE, FERMENTISANE U  
PRISUSTVU EKSTRAKATA ODABRANIH  
VRSTA MEDICINSKIH GLJIVA**

Doktorska disertacija

Beograd, 2019.

UNIVERSITY OF BELGRADE  
FACULTY OF AGRICULTURE

Aleksandra S. Sknepnek

**CHARACTERISTICS OF TEA FUNGUS –  
KOMBUCHA, FERMENTED IN THE  
PRESENCE OF SELECTED MEDICINAL  
MUSHROOM SPECIES EXTRACTS**

Doctoral dissertation

Belgrade, 2019.

**Mentor:**

dr Miomir Nikšić, redovni profesor,  
Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet

**Članovi komisije:**

dr Anita Klaus, vanredni profesor,  
Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet

dr Viktor Nedović, redovni profesor,  
Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet

dr Siniša Markov, redovni profesor,  
Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet

dr Predrag Vukosavljević, redovni profesor,  
Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet

***Datum odbrane doktorske disertacije:***

## **Zahvalnica**

Zahvaljujem se svom mentoru **prof. dr Miomiru Nikšiću** na ukazanoj prilici da razvijam i proširujem svoje znanje u oblasti nauke, kao i na poverenju, savetima i sugestijama tokom izrade i pisanja doktorske disertacije.

Veliku zahvalnost dugujem **doc. dr Mileni Pantić** na nesebičnoj podršci, idejama i pomoći tokom izrade doktorske disertacije, na sugestijama tokom pisanja i na iskrenom prijateljstvu svih ovih godina.

Zahvaljujem se **prof. dr Aniti Klaus** na podršci tokom izrade i pisanja doktorske disertacije.

Zahvaljujem se **prof. dr Viktoru Nedoviću** na pomoći tokom rada na projektu III 46010, Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja i sugestijama tokom pisanja doktorske disertacije.

Zahvaljujem se **prof. dr Siniši Markovu** na pomoći prilikom izvođenja dela eksperimenata prikazanih u radu, na sugestijama tokom izrade i pisanja doktorske disertacije.

Zahvaljujem se **prof. dr Predragu Vukosavljeviću** na podršci tokom pisanja doktorske disertacije.

Veliku zahvalnost dugujem **doc. dr Stevi Leviću** na pomoći tokom izvođenja eksperimenata, kao i na mnogim korisnim savetima i idejama.

Veliko hvala **dr Danki Matijašević**, naučnom saradniku, na svakodnevnoj podršci, pomoći i idejama tokom izrade i pisanja doktorske disertacije i na prijateljstvu tokom svih ovih godina.

Veliko hvala **dr Dunji Duvnjak**, naučnom saradniku, na prijateljstvu tokom svih ovih godina, svakodnevnoj podršci, pomoći i idejama tokom izrade i pisanja doktorske disertacije.

Zahvaljujem se **dr Nemanji Mirkoviću** na pomoći tokom molekularne identifikacije mikroorganizama i sugestijama tokom pisanja doktorske disertacije.

Zahvaljujem se **dr Sergeju Tomiću**, naučnom saradniku, na analizama imunomodulatorne i citotoksične aktivnosti, na pomoći prilikom tumačenja rezultata i pisanja doktorske disertacije.

Zahvaljujem se **dr Milici Carević**, naučnom saradniku i prof. dr Dejanu Bezbradici, na pomoći prilikom izvođenja tečno-hromatografskih analiza.

Zahvaljujem se svim **kolegicama i kolegama** sa Katedre za Tehnološku mikrobiologiju, Katedre za ekološku mikrobiologiju i Katedre za konzervisanje i vrenje na razumevanju, podršci i pomoći.

Najveću zahvalnost dugujem svojim roditeljima **Ljiljani i Stevanu** i sestrama **Bojani i Tatjani** koji su mi pružili nesebičnu podršku, ljubav i pomoć.

Posebnu i beskrajnu zahvalnost dugujem svom **Joci** na ljubavi i strpljenju, na savetima i podršci, na zagrljajima kad je i najteže i najlepše. Mojoj **Lenki** i mom **Vidu**, hvala na svim igrama, zagrljajima, suzama, osmesima, na osećanju da smo jedno i da smo deca.

# KARAKTERISTIKE ČAJNE GLJIVE – KOMBUHE, FERMENTISANE U PRISUSTVU EKSTRAKATA ODABRANIH VRSTA MEDICINSKIH GLJIVA

## REZIME

Veliki broj medicinski značajnih gljiva upotrebljava se za razvijanje novih, funkcionalnih prehrambenih proizvoda koji sadrže bioaktivne komponente, u cilju povećanja njihove upotrebe i postizanja zdravstvenih efekata kod konzumenata. Tokom fermentacije kombuhe simbiotskom aktivnošću kvasaca i bakterija sirćetnog vrenja (BSV), prepliću se veoma složeni mehanizmi alkoholne i sirćetne fermentacije, čime nastaje proizvod veoma prijatnog i osvežavajućeg ukusa, blage kiselosti, gaziranosti i voćnih aroma. Do sada nije ispitan potencijal dobijanja novog, funkcionalnog kombuha napitka primenom medicinski značajnih gljiva.

Iz kombuha kulture koja je korišćena tokom fermentacija podloga pripremljenih vrelom vodenom ekstrakcijom odabranih vrsta medicinskih gljiva (*Ganoderma lucidum*, *Lentinus edodes* i *Coriolus versicolor*) izolovano je devet izolata kvasaca koji su identifikovani primenom biohemijskih metoda i molekularnom metodom, dok je šest izolata BSV identifikovano jedino molekularnom metodom.

Mikrobiološke i fizičko - hemijske promene, tokom fermentacije kombuha napitaka od medicinskih gljiva, praćene su u trajanju od jedanaest dana. Najintenzivnija promena broja kvasaca i BSV, u fermentacionim tečnostima, zabeležena je nakon 24 h od početka fermentacije. U fermentacionoj tečnosti, od gljive *L. edodes*, utvrđen je najviši broj kvasaca od 7,83 log CFU/mL, drugog dana fermentacije, što je u skladu sa najvišom utvrđenom koncentracijom etanola u ovom uzorku nakon trećeg dana fermentacije (4,3 % v/v). Najviši broj ćelija BSV od 7,56 log CFU/mL, utvrđen je trećeg dana fermentacije u fermentacionoj tečnosti od gljive *C. versicolor*. Sadržaj ukupnih kiselina se konstantno povećavao u sve tri fermentacione tečnosti. Najviša koncentracija ukupnih kiselina postignuta je u uzorku od gljive *C. versicolor* (33 g/L), što je u skladu sa najvišim utvrđenim brojem BSV u ovom uzorku. Promena pH vrednosti nije pratila povećanje sadržaja kiselina u uzorcima usled puferskog efekta koji nastaje u tečnostima. Utvrđen je konstantan pad u koncentraciji saharoze tokom

fermentacije u svim fermentacionim tečnostima i viši sadržaj fruktoze u odnosu na glukozu.

Kvalitativni hemijski sastav kombuha uzoraka od medicinskih gljiva, nakon dostignute konzumne kiselosti, analiziran je primenom FTIR spektroskopije. U svim uzorcima, dominantnom se pokazala polisaharidna frakcija uz prisutvo proteina, lipida, fenolnih jedinjenja i primarnih alkohola. Ustanovljeno je da među uzorcima postoji razlika u pojedinim polisaharidnim i monosahridnim komponentama. Kvantitativna analiza hemijskog sastava primenom spektrofotometrijskih metoda, pokazala je statistički značajnu razliku u sadržaju ukupnih polifenola među uzorcima. U svim uzorcima je potvrđeno prisustvo flavonoida u različitim koncentracijama. Uzorak kombuhe od gljive *L. edodes* imao je značajno niži sadržaj ukupnih polisaharida i ukupnih glukana u odnosu na uzorke kombuha od gljiva *G. lucidum* i *C. versicolor*.

Antioksidativni potencijal dobijenih napitaka ispitan je primenom četiri antioksidativne metode. Uzorak kombuhe od gljive *G. lucidum* ispoljio je najbolju sposobnost hvatanja slobodnih DPPH radikala ( $83,37 \pm 0,73$  %). Upareni uzorci ispoljili su povećanje sposobnosti hvatanja DPPH radikala sa povećanjem koncentracije. Utvrđena je visoka i negativna korelacija sadržaja ukupnih polisaharida i izračunatih  $EC_{50}$  vrednosti, kao i između sadržaja ukupnih glukana i  $EC_{50}$  vrednosti. Najbolju sposobnost redukcije ispoljio je uzorak kombuhe od gljive *C. versicolor* koji je dostigao vrednost apsorbanse od  $1,64 \pm 0,03$ . Takođe je utvrđeno povećanje redukcione sposobnosti sa povećanjem ispitivane koncentracije uzoraka uparenih pod vakuumom, pri čemu su dostignute apsorbanse  $> 2,0$  kod sva tri uzorka kombuha od gljiva pri koncentraciji od 60 mg/mL. Ustanovljeno je da postoji korelacija između redukcione sposobnosti i sadržaja ukupnih polifenola i flavonoida. Uzorak kombuhe od gljive *L. edodes* ispoljio je najviši stepen inhibicije lipidne peroksidacije ( $89,80 \pm 5,20$  %). Porast inhibicije utvrđen je sa porastom primenjene koncentracije kod vakuum uparenih uzoraka. Jedino je uzorak kombuhe od gljive *G. lucidum* ispoljio suprotan trend, odnosno pad aktivnosti sa povećanjem koncentracije, što bi moglo biti usled nižeg sadržaja polifenola i flavonoida u odnosu na ostale uzorke.

Inhibitorno dejstvo na svih šesnaest ispitanih bakterijskih sojeva ispoljila su sva tri uzorka kombuhe od medicinskih gljiva. Baktericidno dejstvo kombuhe od gljive *G. lucidum* je izostalo kod tri soja. Najniža inhibitorna koncentracija (MIC) kod ovog

uzorka ustanovljena je prema *Staphylococcus epidermidis* (0,04 mg/mL), dok je najniža baktericidna koncentracija (MBC), za isti uzorak, utvrđena prema *Bacillus cereus* i *Bacillus spizizenii* (0,16 mg/ml). Mikrobicidno dejstvo kombuhe od gljive *L. edodes* nije ispoljeno na dva soja. Najosetljivija na ovaj uzorak je bila bakterija *S. epidermidis* sa vrednošću MIC i MBC < 0,06 mg/mL. Kod uzorka kombuhe od gljive *C. versicolor* izostala je baktericidna aktivnost na četiri soja. Najosetljivije bakterije bile su *Yersinia enterocolitica*, *B. spizizenii*, *B. cereus*, *S. epidermidis* i *Staphylococcus aureus*, sa MIC vrednošću 2,25 mg/mL. Ista koncentracija uzorka je bila mikrobicidna za *B. spizizenii*, *B. cereus* i *S. aureus*. Antibakterijske komponente prisutne u kombuha uzorcima su ekstrahovane iz gljiva ili su sintetisane tokom fermentacije. Aktivnost koju ispoljavaju uzorci kombuha od medicinskih gljiva ne potiču jedino od sirćetne kiseline, kao ni od termolabilnih proteina i enzima.

Imunomodulatorno dejstvo kombuha napitaka od gljiva u kulturi humanih mononuklearnih ćelija periferne krvi (PBMC), ispitano je nakon precipitacije polisaharida u uzorcima pomoću etanola. Stimulatorni efekat uzorka od gljive *C. versicolor* na povećanje brojnosti PBMC stimuliranih sa PHA ispoljen je počevši od koncentracije 62,5 µg/mL, dok je uzorak od gljive *L. edodes* stimulatorni efekat ispoljio pri koncentraciji od 125 µg/mL. Stimulaciju u produkciji citokina IL-2 ispoljila su sva tri ekstrakta. Najsnažniji efekat ekstrakata je povezan sa redukcijom produkcije IL-4 i IL-5 citokina. Uzorak od gljive *C. versicolor* je pokazao najsnažniji efekat na TNF-α i IL-8 i najslabiji efekat na inhibiciju produkcije IL-10, uzorak od gljive *L. edodes* je jedini ispoljio stimulatorni efekat na produkciju IL-6. Ekstrakt od gljive *G. lucidum* se izdvaja po najsnažnijem inhibitornom efektu na citokin IL-4. Uzorci nisu ispoljili citotoksičnu aktivnost u kulturi humanih PBMC.

Senzorna prihvatljivost dobijenih proizvoda je ispitana primenom hedonske skale sa devet nivoa. Najbolju ocenu dobila je kombuha od gljive *L. edodes*. Aromatizacija uzoraka aromom kokosa, doprinela je postizanju boljih rezultata kod kombuha uzoraka od gljiva *G. lucidum* i *C. versicolor*.

Dobijeni rezultati ukazuju da vreli vodeni ekstrakti od medicinskih gljiva deluju stimulatorno na produkciju etanola od strane kvasaca, kao i na produkciju kiselina od strane BSV, čime je skraćeno vreme potrebno za dobijanje gotovog proizvoda. Utvrđeno je da napici ispoljavaju antibakterijsko, antioksidativno i imunomodulatorno



dejstvo, na osnovu čega ovi proizvodi poseduju potencijal da budu klasifikovani kao funkcionalna hrana.

**Ključne reči:** *Ganoderma lucidum*, *Lentinus edodes*, *Coriolus versicolor*, kombuha, fermentacija, antibakterijska aktivnost, antioksidativna aktivnost, imunomodulatorna aktivnost

**Naučna oblast:** Biotehničke nauke

**Uža naučna oblast:** Tehnološka mikrobiologija

**UDK:** 582.282.23:579.67(043.3)

**CHARACTERISTICS OF TEA FUNGUS – KOMBUCHA, FERMENTED IN  
THE PRESENCE OF SELECTED MEDICINAL MUSHROOM SPECIES  
EXTRACTS**

**ABSTRACT**

A variety of medically significant mushrooms are used to develop new, functional food products containing bioactive components in order to increase their use and achieve health effects among consumers. During the fermentation of kombucha beverage by the symbiotic activity of yeasts and acetic acid bacteria (AAB), complex mechanisms of alcoholic and acetic fermentation interweave, resulting in a product of very pleasant and refreshing taste, mild acidity, slightly carbonated and fruity aroma. So far, the potential of obtaining a new, functional kombucha beverage with the use of medicinally significant mushrooms has not been investigated.

From the kombucha culture used, during the fermentation of the hot water extracts of selected medicinal mushrooms (*Ganoderma lucidum*, *Lentinus edodes* and *Coriolus versicolor*), nine yeast isolates were identified using biochemical methods and a molecular method, while six isolates of AAB were identified by the molecular method, only.

Microbiological, physico - chemical changes were monitored for eleven days. The most intense change in the number of yeasts and AAB in fermentation broths was observed 24 hours after the beginning of fermentation. In the *L. edodes* fermentation broth, the highest number of yeasts of 7,83 log CFU/mL was determined on the second day, which corresponds to the highest established concentration of ethanol in this sample, after the third day of fermentation (4,3 % v/v). The highest number of AAB (7,56 log CFU/mL) was determined on the third day in the fermentation broth from *C. versicolor* mushroom. Total acid content constantly increased in all three fermentation broths. The highest value of total acids was achieved in the fermentation broth from *C. versicolor* mushroom (33 g/L), which is in the line with the highest established number of AAB in this sample. The change in the pH value was not accompanied by an increase in the acid content of the samples due to the buffering effect of broth. A constant

decrease in sucrose concentration during fermentation, in all fermentation liquids, and higher fructose content compared to glucose, was determined.

The qualitative chemical composition of the kombucha samples from medicinal mushrooms were analyzed using FTIR spectroscopy, after the desired acidity was reached. According to FTIR spectra, proteins, lipids, phenolic compounds and primary alcohols were also detected together with polysaccharides as dominant components. The differences in the polysaccharide and monosaccharide components among the samples, was found. The quantitative analysis of the chemical composition, using spectrophotometric methods, showed a statistically significant difference, of total polyphenole content among samples. The presence of flavonoids, in different concentrations, was confirmed in all samples. *L. edodes* kombucha sample had significantly lower content of total polysaccharides and total glucans, compared to kombucha samples from *G. lucidum* and *C. versicolor* mushrooms.

The antioxidant potential of obtained beverages was tested using four antioxidative methods. Kombucha sample made from *G. lucidum* mushroom showed the highest ability to scavenge free DPPH radicals ( $83,37 \pm 0,73$  %). Scavenging abilities on DPPH radicals of dried samples steadily increased as their concentration increased. High and negative correlation of total polysaccharide content and  $EC_{50}$  values, as well as between total glucan content and  $EC_{50}$  values, was determined. The best reduction ability expressed *C. versicolor* kombucha sample which showed the absorbance value of  $1,64 \pm 0,03$ . Also, it was found that an increased concentration of vacuum dried samples lead to an increased reduction ability when absorbance  $> 2,0$  was reached in all three samples of kombucha made from mushrooms, at concentration of 60 mg/mL. Correlation between the reduction ability and the content of total polyphenols and flavonoids, was established. Kombucha sample from *L. edodes* mushroom showed the highest level of lipid peroxidation inhibition ( $89,80 \pm 5,20$  %). The increasing inhibition was determined with an increased concentration of samples dried under the vacuum. Only kombucha sample made from *G. lucidum* mushroom exhibited the opposite trend, declined activity with increased concentration, which could be due to the lower content of polyphenols and flavonoids compared to other samples.

The inhibitory effect against all sixteen tested bacterial strains exhibited all kombucha samples from three medicinal mushrooms. The bactericidal effect of

kombucha from *G. lucidum* mushroom was not shown against three strains. The minimum inhibitory concentration (MIC) for T2 sample was established against *Staphylococcus epidermidis* (0,04 mg/mL), while the minimum bactericidal concentration (MBC) for the same sample was determined against *Bacillus cereus* and *Bacillus spizizenii* (0,16 mg/ml). The microbicidal effect of *L. edodes* mushroom was not detected against two strains. The most susceptible to this sample was *S. epidermidis* with MIC and MBC value <0,06 mg/mL. Kombucha sample from *C. versicolor* mushroom did not express bactericidal activity against four strains. The most susceptible bacteria were *Yersinia enterocolitica*, *B. spizizenii*, *B. cereus*, *S. epidermidis* and *Staphylococcus aureus*, with an MIC value of 2,25 mg/mL. The same concentration of the sample was microbicidal to *B. spezizeni*, *B. cereus* and *S. aureus*. The antibacterial components present in kombucha samples were extracted from mushrooms or were synthesized during fermentation. The activity of kombucha samples from medicinal mushrooms does not come solely from acetic acid, thermolabile proteins or enzymes.

The immunomodulatory effect of kombucha beverages from mushrooms in the culture of human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) was examined after the precipitation of polysaccharides in samples using ethanol. The stimulatory effect of the *C. versicolor* mushroom sample on the increasing of PBMCs stimulated with PHA was expressed starting from the concentration of 62,5 µg/mL, while sample from *L. edodes* mushroom showed stimulatory effect at concentration of 125 µg/mL. Stimulation to produce cytokine IL-2 exhibited all three extracts. The most powerful effect of extracts was associated with the reduction in the production of IL-4 and IL-5 cytokines. The *C. versicolor* mushroom sample showed the most potent effect on TNF-α and IL-8 and the weakest effect on the inhibition of IL-10 production. *L. edodes* mushroom sample exhibited a stimulatory effect on IL-6 production, alone. *G. lucidum* extract is distinguished by the most potent inhibitory effect on cytokine IL-4. Samples did not exhibit cytotoxic activity in human PBMC culture.

The sensory acceptance of obtained products was tested using a hedonic scale with nine levels. The best result achieved kombucha sample made from *L. edodes* mushroom. Aromatization of the samples using coconut flavour, contributed to

achievement of better results for kombucha samples made from *G. lucidum* and *C. versicolor* mushrooms.

Obtained results indicated that hot water extracts from medicinal mushrooms act stimulatory on the production of ethanol, by yeasts, as well as the production of acids by AAB, which shortened the time necessary to obtain the final product. It has been found that beverages exhibit an antibacterial, antioxidant, and immunomodulatory effects, and according to that, these products have a potential to be classified as functional food.

**Key words:** *Ganoderma lucidum*, *Lentinus edodes*, *Coriolus versicolor*, kombucha, fermentation, antibacterial activity, antioxidant activity, immunomodulatory activity

**Academic Expertise:** Biotechnical sciences

**Field of Academic Expertise:** Food and Industrial Microbiology

**UDK:** 582.282.23:579.67(043.3)

## SKRAĆENICE:

ACETIL Co-A: Acetil koenzim A

ADH: Alkoholna dehidrogenaza

ALDH: Aldehidna dehidrogenaza

ANOVA: Jednofaktorska analiza varijanse

ATCC: Američka kolekcija tipskih kultura

ATP: Adenozin trifosfat

BHA: Butilovani hidroksianizol

BHT: Butilovani hidroksitoluen

BSV: Bakterije sirćetnog vrenja

CE: Ekvivalent (+)-katehina

CFU: Broj formiranih kolonija

Cov-1: Soj gljive *Coriolus versicolor*

CM-101: Soj gljive *Coriolus versicolor*

DPPH: 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil

EDTA: Etilendiamintetrasirćetna kiselina

FDA: Uprava za hranu i lekove

FT-IR: Infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom

GAE: Ekvivalenti galne kiseline

GLPS: Polisaharidna frakcija gljive *Ganoderma lucidum*

HIV: Virus humane imunodeficijencije

HPLC: Tečna hromatografija visokog stepena razdvajanja

IFN: Interferon

IL: Interleukin

LEM: Ekstrakt micelijuma gljive *Lentinus edodes*

LZ-8: Imunomodulatorni polipeptid gljive *Ganoderma lucidum*

MIC: Minimalna inhibitorna koncentracija

MBC: Minimalna baktericidna koncentracija

MRSA: Meticilin rezistentni *Staphylococcus aureus*

NAD(P)<sup>+</sup>: Nikotin amid dinukleotid fosfat

NK: Urođeno ubilačke ćelije

PBMC: Mononuklearne ćelije periferne krvi

PBS: Fosfatni pufer  
PCR: Lančana reakcija polimeraze  
PG: Propil galat  
PHA: Fitohemaglutinin  
PSK: Polisaharid krestin gljive *Coriolus versicolor*  
PSP: Polisaharid-peptid gljive *Coriolus versicolor*  
ROS: Reaktivne vrste kiseonika  
RNS: Reaktivne vrste azota  
SDS: Natrijum dodecil sulfat  
SOD: Superoksid dismutaza  
TBHP: Tercijarni butil hidroperoksid  
TBHQ: Tercijarni butil hidrohinon  
TCA: Ciklus trikarbonskih kiselina  
Th: Pomoćničke T ćelije  
TLR: Tolu slične ćelije  
TNF: Faktor nekroze tumora  
TTC: 2,3,5-trifenil-tetrazolijum hlorid  
UK: Ukupne kiseline  
VVE: Vreli vodeni ekstrakt

## SADRŽAJ:

<b>1. UVOD</b> .....	1
<b>2. PREGLED LITERATURE</b> .....	4
2.1. Medicinske gljive.....	4
2.1.1. Bioaktivne komponente poreklom iz gljiva .....	4
2.1.2. Odabrane vrste medicinskih gljiva.....	8
2.1.2.1. <i>Ganoderma lucidum</i> [(W.Curt.:Fr.) P.Karst.] .....	8
2.1.2.2. <i>Lentinus edodes</i> [(Berk.) Singer] .....	10
2.1.2.3. <i>Coriolus versicolor</i> [(L:Fr.) Lloyd].....	13
2.1.3. Biološka aktivnost medicinskih gljiva .....	14
2.1.3.1. Antimikrobno dejstvo.....	14
2.1.3.2. Antioksidativno dejstvo .....	16
2.1.3.3. Imunomodulatorna aktivnost.....	20
2.1.4. Gljive kao funkcionalna hrana i nutraceutici .....	23
2.1.4.1. Funkcionalni proizvodi na bazi gljiva.....	25
2.1.4.2. Primena gljiva u proizvodnji napitaka .....	26
2.2. Kombuha.....	29
2.2.1. Mikroorganizmi kombuhe.....	30
2.2.1.1. Kvasci u proizvodnji kombuhe .....	31
2.2.1.2. Bakterije sirćetnog vrenja izolovane iz kombuhe .....	34
2.2.2. Proces fermentacije kombuhe .....	41
2.2.3. Funkcionalna svojstva kombuha napitka .....	45
<b>3. CILJEVI RADA</b> .....	49
3.1. Šematski prikaz ciljeva rada .....	51
<b>4. MATERIJAL I METODE</b> .....	52
4.1. Izolacija bakterija sirćetnog vrenja i kvasaca iz kombuhe .....	52
4.2. Identifikacija izolata .....	53
4.2.1. Biohemijska identifikacija izolata kvasaca API testovima .....	53
4.2.2. Biohemijska identifikacija kvasaca primenom Vitek 2 sistema.....	53
4.2.3. Formiranje pseudohifa/hifa na morfološkom (krompirovom) agaru .....	53



4.2.4. Test korišćenja D–ksiloze kao jedinog izvora ugljenika.....	54
4.2.5. Izolacija ukupne DNK iz kvasaca .....	54
4.2.6. Izolacija ukupne DNK iz bakterija sirćetnog vrenja .....	55
4.2.7. Lančana reakcija polimeraze (PCR) - umnožavanje DNK fragmenata .....	56
4.2.8. Vizuelizacija PCR produkata bakterija i kvasaca horizontalnom elektroforezom .....	57
4.2.9. Sekvenciranje PCR produkata.....	57
4.3. Priprema gljiva korišćenih za proizvodnju kombuha napitaka.....	57
4.4. Priprema podloge za fermentaciju i uslovi fermentacije kombuha od medicinskih gljiva .....	59
4.5. Fizičko - hemijske i mikrobiološke promene tokom fermentacije kombuha od medicinskih gljiva.....	59
4.5.1. Promena broja kvasaca i bakterija sirćetnog vrenja tokom fermentacije.....	59
4.5.2. Određivanje pH vrednosti i titrabilne kiselosti fermentacione tečnosti .....	60
4.5.3. Kvantitativna analiza saharoze, glukoze, fruktoze i etanola HPLC metodom tokom fermentacije.....	60
4.6. Kvalitativna i kvantitativna hemijska analiza gotovih proizvoda kombuha od medicinskih gljiva.....	61
4.6.1. Priprema uzoraka za ispitivanje .....	61
4.6.2. Određivanje suve materije u kombuha uzorcima.....	61
4.6.3. FTIR spektroskopska analiza .....	61
4.6.4. Određivanje sadržaja ukupnih polisaharida .....	62
4.6.5. Određivanje sadržaja ukupnih glukana .....	62
4.6.6. Određivanje sadržaja ukupnih fenolnih jedinjenja.....	63
4.6.7. Određivanje sadržaja ukupnih flavonoida.....	63
4.7. Biološka svojstva kombuha napitaka od medicinskih gljiva .....	64
4.7.1. Antioksidativna aktivnost.....	64
4.7.1.1. Sposobnost hvatanja slobodnih 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) radikala .....	64
4.7.1.2. Redukciona sposobnost .....	65
4.7.1.3. Sposobnost heliranja jona gvožđa .....	65
4.7.1.4. Inhibicija lipidne peroksidacije .....	66
4.7.2. Antibakterijska aktivnost .....	66

4.7.2.1. Priprema uzoraka za ispitivanje .....	66
4.7.2.2. Sojevi mikroorganizama i priprema inokuluma.....	67
4.7.2.3. Difuzioni test sa bunarićima.....	67
4.7.2.4. Mikrodilucioni test .....	68
4.7.3 Citotoksična i imunomodulatorna aktivnost polisaharidnih ekstrakata kombuha.....	69
4.7.3.1. Priprema uzoraka za ispitivanje .....	69
4.7.3.2. Izolacija perifernih humanih mononuklearnih ćelija (PBMC).....	69
4.7.3.3. Citotoksičnost polisaharidnih ekstrakata kombuha od gljiva u kulturi humanih PBMC.....	70
4.7.3.4. Merenje metaboličke aktivnosti ćelija MTT testom .....	70
4.7.3.5. Detekcija citokina u kulturi PBMC-PHA.....	71
4.8. Senzorna analiza kombuha proizvoda od medicinskih gljiva.....	71
4.9. Statistička analiza .....	72
<b>5. REZULTATI I DISKUSIJA.....</b>	<b>73</b>
5.1. Identifikacija mikroorganizama iz kombuhe .....	73
5.1.1. Biohemijska identifikacija izolata kvasaca primenom API testova i Vitek 2 sistema.....	73
5.1.2. Molekularna identifikacija izolata kvasaca .....	77
5.1.3. Molekularna identifikacija izolata bakterija sirćetnog vrenja .....	80
5.2. Praćenje toka fermentacije kombuha od medicinskih gljiva <i>G. lucidum</i> , <i>L. edodes</i> i <i>C. versicolor</i> .....	84
5.2.1. Promena broja kvasaca i bakterija sirćetnog vrenja tokom kombuha fermentacija.....	84
5.2.2. Promene sadržaja ukupnih kiselina, pH vrednosti i vizuelne promene tokom kombuha fermentacija.....	88
5.2.3. Promena sadržaja saharoze, glukoze, fruktoze i etanola tokom kombuha fermentacija.....	92
5.3. Hemijska karakterizacija kombuha napitaka i polisaharidnih ekstrakata od medicinskih gljiva <i>G. lucidum</i> , <i>L. edodes</i> i <i>C. versicolor</i> .....	96
5.3.1 ATR-FTIR analiza kvalitativnog hemijskog sastava uzoraka kombuhe.....	96
5.3.2. ATR-FTIR analiza kvalitativnog hemijskog sastava polisaharidnih ekstrakata iz kombuha.....	98
5.3.3. Kvantitativni hemijski sastav uzoraka kombuhe.....	100

5.3.4. Kvantitativni hemijski sastav polisaharidnih ekstrakata iz kombuha .....	106
5.4. Biološka svojstva kombuha proizvoda od medicinskih gljiva <i>G. lucidum</i> , <i>L. edodes</i> i <i>C. versicolor</i> .....	108
5.4.1. Antioksidativna svojstva kombuha proizvoda .....	108
5.4.1.1. Sposobnost hvatanja DPPH radikala.....	108
5.4.1.2. Redukciona sposobnost kombuha napitaka.....	112
5.4.1.3. Heliranje jona gvožđa.....	115
5.4.1.4. Sposobnost inhibicije peroksidacije lipida .....	117
5.4.2. Antibakterijska svojstva kombuha proizvoda .....	120
5.4.3. Citotoksična i imunomodulatorna aktivnost polisaharidnih ekstrakata iz kombuha .....	135
5.4.3.1. Citotoksičnost polisaharidnih ekstrakata kombuhe u kulturama PBMC .	135
5.4.3.2. Efekat polisaharidnih ekstrakata kombuha na proliferaciju PBMC stimulisanih sa PHA .....	136
5.4.3.3. Efekti polisaharidnih ekstrakata kombuha od gljiva na produkciju citokina u kulturi stimulisanih PBMC .....	140
5.5. Senzorna analiza kombuha proizvoda od medicinskih gljiva.....	147
<b>6. ZAKLJUČAK</b> .....	<b>151</b>
<b>7. LITERATURA</b> .....	<b>159</b>
<b>8. PRILOG</b> .....	<b>183</b>
8.1. Prilog A. Biohemijske karakteristike izolata kvasaca.....	183
8.2. Prilog B. Hromatogrami sadržaja saharoze, glukoze, fruktoze i etanola tokom fermentacije kombuhe od gljive <i>Ganoderma lucidum</i> .....	186
8.3. Prilog C. Hromatogrami sadržaja saharoze, glukoze, fruktoze i etanola tokom fermentacije kombuhe od gljive <i>Lentinus edodes</i> .....	190
8.4. Prilog D. Hromatogrami sadržaja saharoze, glukoze, fruktoze i etanola tokom fermentacije kombuhe od gljive <i>Coriolus versicolor</i> .....	194

## 1. UVOD

Gljive su među najrasprostranjenijim organizmima na Zemlji. Njihov značaj je ekološke, ekonomske, medicinske, nutritivne i biotehnološke prirode (Wasser, 2014). Najčešće stanište im je zemljište, međutim, organsku materiju nalaze i u biljkama, životinjama i ljudima, često izazivajući bolesti. Procenjuje se da postoji do 5,1 milion vrsta gljiva, da je između 150.000 i 160.000 vrsta makrogljiva, dok je svega oko 10 % identifikovano (Wasser, 2014). Postoji oko 7000 vrsta pečuraka koje imaju različit stepen jestivosti, među njima je preko 3000 vrsta koje su primarne jestive pečurke, dok približno 700 vrsta poseduje medicinska svojstva. Svetska proizvodnja pečuraka 2012. godine bila je 30 miliona tona, dok je 2015. godine dostigla 33 miliona tona (Badalyan et al., 2019; Wasser, 2014).

Zbog jedinstvenog ukusa i arome, gljive su vrlo cenjene kao gurmanska hrana. Supstance koje doprinose karakterističnoj aromi gljiva, visoko vrednovane od strane konzumenata, potiču od neisparljivih komponenata koje pretežno čine peptidi male molekulske mase, slobodne aminokiseline, mononatrijum glutamat, organske kiseline, rastvorljivi šećeri, alkoholi i njihovi estri, ketoni, 5'-nukleotidi, kao i isparljive masne kiseline (Wang et al., 2014; Bisen et al., 2010). Na miris pečuraka utiče sastav isparljivih komponenata, kojih je identifikovano na stotine (Kalač, 2009).

Rastući problem, u dvadeset prvom veku, u siromašnim zemljama je nedostatak hrane, dok razvijene zemlje opterećuje problem nepravilne ishrane stanovništva i zagađenja okoline. Nepravilna ishrana može dovesti do poremećaja u funkcionisanju organizma, razvoja različitih bolesti i pada kvaliteta života (Stajić et al., 2019). Ukazivanjem na povezanost kvaliteta ishrane sa kvalitetom života i značaja ishrane hranom koja poseduje visokonutritivna svojstva, koja je minimalno obrađena, bez veštačkih aditiva i koja pozitivno utiče na zdravlje, uticalo se na trenutne tokove u prehrambenoj industriji. Javljanju se novi trendovi u ishrani usled podizanja svesti kod ljudi o značaju potpuno prirodne i zdravije ishrane, što je uticalo na razvoj novih pojmova, u koje se ubrajaju funkcionalna hrana kao i nutraceutici (Lavefve et al., 2019; Villarreal-Soto et al., 2018). Koncept funkcionalne hrane i bioaktivnosti hrane, odnosno hrane koja utiče na sniženje rizika od bolesti i održava dobro stanje organizma, je

uveden pre više od trideset godina. Od tada se bioaktivna svojstva namirnica dodatno analiziraju u hrani, pored analize nutritivne vrednosti (Cheung, 2008).

Iako pečurke ljudi koriste već više hiljada godina, značajno povećanje njihove upotrebe, u zemljama Zapada, zabeleženo je tek poslednjih nekoliko desetina godina (Reis et al., 2017). Od jestivih i medicinskih gljiva i njihovih bioaktivnih komponenata formirani su proizvodi u obliku dijetetske hrane, dijetetskih suplemenata, kozmeceutika (aktivatori faktora rasta epiderma), mikofarmaceutika i dr. (Badalyan et al., 2019). Smatra se da su pojedine bolesti (tumori, artritis, alergije) u značajnom porastu, kao posledica oslabljenog imunog sistema koji nastaje unošenjem prerađene i brze hrane koja ne sadrži dovoljne količine  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3) glukana. U prošlosti su ovi imunomodulatorni molekuli unošeni putem ovsu i pšenice koje su ih prirodno sadržale oko 2 - 3 %. Međutim, njihov sadržaj je danas smanjen usled zahteva modernih kompanija da sadržaj  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3) glukana bude nizak u zrnima zbog njihove lakše digestije ili prihvatljivijih tehnoloških karakteristika proizvoda. Uključivanjem jestivih i medicinskih gljiva u ishranu, moguće je ovaj nedostatak  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3) glukana nadoknaditi, ali uneti i druge bioaktivne komponente koje ove gljive poseduju (Halpern, 2007).

Mnoštvo gljiva koje ispoljavaju medicinska svojstva, primenjeno je u proizvodnji funkcionalne hrane za koju je dokazano da poseduje, između ostalog, antimikrobnu i antioksidativnu aktivnost. Broj infekcija izazvanih patogenima koji se prenose hranom je u porastu, a mnogi sintetički prehrambeni aditivi koji se i dalje koriste kao antimikrobni ili antioksidativni agensi mogu biti toksični i za ljude. Na primer, aditiv kalijum metabisulfit (E224), koji se koristi u konzervisanju vina, smrznutog povrća i osušenog voća, zabranjen je u Sjedinjenim Američkim Državama usled potvrđenog toksičnog efekta. Međutim, od strane Evropske Unije njegovo korišćenje je dozvoljeno. Ustanovljeno je da ovaj aditiv redukuje sadržaj vitamina u hrani, dok kod dece može izazvati iritaciju kože, očiju i respiratornog sistema (Petrović et al., 2013). U društvu je odnedavno razvijen odbojan stav prema sintetičkim hemikalijama u hrani, ali ne i prema prirodnim hemijskim jedinjenjima, naročito onim koja su izdvojena iz hrane koja se tradicionalno koristi u ishrani, kao što su i gljive. Usled toga je isptivanje mogućnosti primene gljiva i njihovih ekstrakata kao konzervansa i antioksidansa, u porastu. Takođe je utvrđen i porast broja patenata koji se

zasnivaju na primeni bioaktivnih jedinjenja iz gljiva u cilju povećanja bezbednosti hrane (Shen et al., 2017).

Tokom dvadesetog veka, industrijalizacijom proizvodnje hrane u zemljama Zapada, dolazi do pada u interesovanju za fermentisanom hranom, osim za hlebom, pivom i vinom. Fermentacijom se hrana konzervira, zaustavljanjem rasta patogenih mikroorganizama, usled formiranja inhibitornih metabolita u koje se ubrajaju: organske kiseline, etanol, ugljendioksid, diacetil, bakteriocini i drugi. Kvalitet hrane se fermentacijom povećava poboljšanjem nutritivne vrednosti i digestibilnosti proizvoda, dok prisustvo raznovrsnih mikrobiota doprinosi potencijalu da ovakva hrana ispolji probiotske efekte. Dodatno se formiraju originalna organoleptička svojstva čime je omogućen razvoj novih proizvoda inspirisanih tradicionalnom hranom (Lavefve et al., 2019; Villarreal-Soto et al., 2018; Ray i Didier, 2014).

Kombuha je proizvod koji nastaje simbiotskom aktivnošću različitih vrsta kvasaca i bakterija sirćetnog vrenja, čiji sastav varira zavisno od geografskih i klimatskih karakteristika regiona odakle inokulum potiče. Napitak koji nastaje je složenog hemijskog sastava i u njemu se nalaze različite komponente koje potiču od pripremljene podloge, kao i one koje nastaju tokom procesa fermentacije. Tradicionalno se proizvodi na crnom čaju, međutim, mogućnost proizvodnje ovog napitka je ispitana i primenom različitih podloga za fermentaciju kao što su zeleni čaj, biljni čajevi (od nane, jasmína, ehinacee, šipka i dr.), ali i mleka, vina i dr. (Jayabalan et al., 2014). Međutim, mogućnost primene vrelog vodenog ekstrakta od medicinskih gljiva *Ganoderma lucidum*, *Lentinus edodes* i *Coriolus versicolor* u proizvodnji kombuha napitka do sada nije ispitana. Takođe, nisu poznata ni potencijalna funkcionalna svojstva kombuha napitaka od medicinskih gljiva koja bi mogla biti postignuta, s obzirom da plodnosna tela ovih gljiva poseduju veliki broj bioaktivnih komponentata koje bi mogle doprineti biološkoj aktivnosti novih napitaka.

## 2. PREGLED LITERATURE

### 2.1. Medicinske gljive

#### 2.1.1. Bioaktivne komponente poreklom iz gljiva

Gljive se više hiljada godina koriste u prevenciji, poboljšanju ili lečenju bolesti, kao i u cilju postizanja izbalansirane ishrane koja može doprineti boljem zdravstvenom stanju organizma (Zhu et al., 2015). Smatra se da medicinske gljive poseduju oko 130 medicinskih funkcija među kojima su: imunomodulatorna, antitumorna, antimikrobna, antioksidativna, hepatoprotektivna, antidijabetska, analgetska, hipoglikemijska, hipotenzivna i dr. Naročito važnom se smatra njihova upotreba u prevenciji i tretiranju poremećaja imunog sistema, posebno kod imunokompromitovanih osoba, zatim kod obolelih od različitih oblika tumora, heptitisa B, C i D, kod različitih tipova anemije, hroničnog gastritisa izazvanog bakterijom *Helicobacter pylori* i mnogih drugih (Wasser, 2014). U pojedinim zemljama, naročito u Kini, se plodonosno telo i micelijum medicinskih gljiva prepisuje za lečenje hronične hepatopatije, hipertenzije, bronhitisa, artritisa i drugih poremećaja u organizmu (Sheena et al., 2003).

U postupcima dobijanja ekstrakata od medicinskih gljiva, primenjuje se niz koraka kojima se ekstrakti prečišćavaju, kako bi se dobila izolovana aktivna komponenta. Međutim, usled moguće pojave sinergetskog efekta, u slučaju prisustva različitih komponenata u ekstraktu, primena postupaka za dobijanje čiste komponente, često nije neophodna. Prisustvo više različitih polisaharida dovodi do ćelijskog odgovora posredovanog različitim receptorima na površini ćelije, što posledično izaziva bolju biološku aktivnost, nego što bi se postiglo prečišćenim ekstraktom (Lull et al., 2005).

Svojim primarnim i sekundarnim metabolizmom ove gljive produkuju niz bioaktivnih jedinjenja, male ili velike molekulske mase, koja ispoljavaju pomenute efekte (Badalyan et al., 2019). Među veoma potentne bioaktivne materije gljiva spadaju polisaharidi, naročito  $\beta$ -glukani. Oni predstavljaju dijetetna vlakna koja se javljaju u žitaricama, kvascima, gljivama, pojedinim bakterijama i morskoj travi. Razlika u načinu granjanja, vrsti veze i molekulskoj masi javlja se među različitim izvorima. Sadržaj  $\beta$ -

glukana u gljivama varira u zavisnosti od vrste, uslova gajenja, stepena zrelosti plodonosnog tela i drugih faktora. Polisaharidi gljiva su pretežno monomeri D-glukoze koji su povezani  $\beta$ -glikozidnim vezama (Zhu et. al, 2015). Između 80 i 85 % produkata medicinskih gljiva, su  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)-(1 $\rightarrow$ 6) glukani, koji ispoljavaju antitumorno i imunomodulatorno dejstvo (Badalyan et al., 2019). Glukani su prisutni u gljivama, kao što su: *Ganoderma lucidum*, *Agaricus brasiliensis*, *Schizophyllum commune*, *Grifola frandosa*, *L. edodes*, *C. versicolor*, *Pleurotus ostreatus*, *Flammulina velutipes* i dr. (Zhu et. al, 2015).

Farmakološku aktivnost ne ispoljavaju svi  $\beta$ -glukani, već na nju utiče njihova rastvorljivost u vodi, veličina molekula, molekulska masa, broj i dužina bočnih lanaca vezanih za glavni lanac, molekularni mehanizam dejstva i dr. (Wasser, 2014). Rastvorljivost u vodi je važan faktor bioaktivnosti  $\beta$ -glukana. Nerastvorljivi glukani pokazuju slabu bioaktivnost, međutim, hemijskom modifikacijom je postignuto povećanje njihove rastvorljivosti, antikancerogene i antiviralne aktivnosti. Svi lekovi do sada proizvedeni od polisaharida medicinskih gljiva su visoke molekulske mase (100 do 500 kDa). Ne mogu se sintetisati i proizvodnja je moguća jedino iz plodonosnih tela, micelijuma ili bujona u kom se gaje, što veoma utiče na njihovu visoku cenu (Wasser, 2014). Polisaharidi gljiva bi se, u budućnosti, mogli primeniti za tretman različitih tipova maligniteta usled toga što primarno na tumorske ćelije utiču stimulacijom imunog sistema ali i indukcijom apoptoze ćelija (Stajić et al., 2019). Međutim, i dalje je nedovoljno razjašnjen mehanizam biološke aktivnosti, bolje bioaktivnosti u vodi rastvorljivih  $\beta$ -glukana, kao i intestinalne apsorpcije oralno primenjenog  $\beta$ -glukana (Zhu et al., 2015).

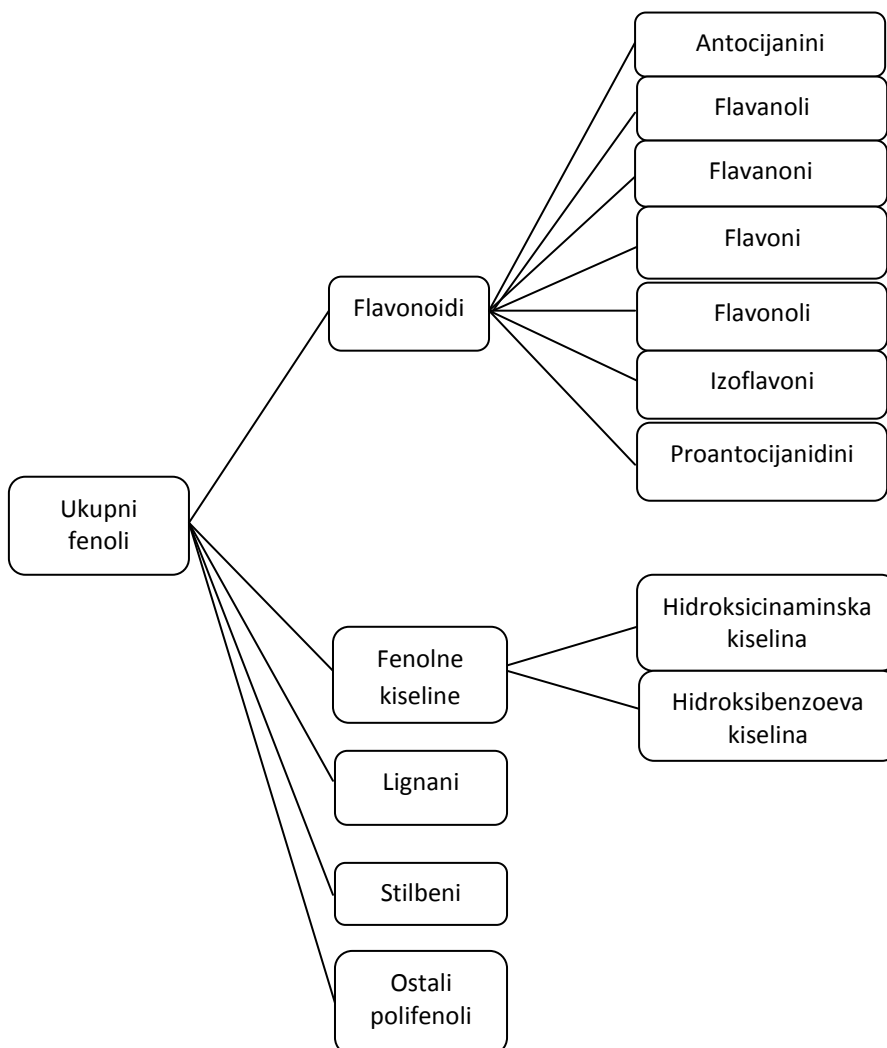
Fenolne komponente broje više od hiljadu fenolnih jedinjenja, usled mogućnosti da grade različite komplekse. Sadrže najmanje jedan aromatičan prsten za koji su vezane hidroksilne grupe. Ukoliko je vezana jedna hidroksilna grupa, zovemo ih monofenolima, ako su vezane dve, bifenolima, a u slučaju tri ili više vezanih hidroksilnih grupa, govorimo o polifenolima (Lin i Harnly, 2007). Polifenoli su grupa biokomponenta koja obuhvata veliki broj podklasa i usled raznolikog sastava još uvek nije razjašnjen doprinos biološkoj aktivnosti. Na osnovu broja fenolnih prstenova i strukturnih elemenata povezanih za njih, podela je izvršena na: flavonoide, fenolne kiseline, stilbene i lignane i prikazana je na slici 2.1 (Probst et al., 2018). U prirodi se



većina polifenola retko sreće u slobodnom obliku i uglavnom su prisutni u obliku estara, glikozida ili polimera, dok se u prerađenoj hrani koja je zamrznuta, sterilisana ili fermentisana, javljaju i u obliku aglikona. Na ovaj način se postiže bolja usvojivost ovih komponenata, s obzirom da u svom nativnom obliku polifenoli ne mogu biti apsorbirani. U intestinalnom traktu oni podležu razgradnji intestinalnim enzimima ili prisutnim mikrobiotama (Ferreira et al., 2009; Kozarski et al., 2015). Način ekstrakcije i primena različitih rastvarača utiče na sastav ekstrakta, sadržaj polifenola i njegovu bioaktivnost. Etanolni i metanolni ekstrakti gljiva imaju visok sadržaj fenolnih komponenata (Cheung i Cheung, 2005). Pop i sar. (2018) utvrdili su da je najviši sadržaj ukupnih polifenola i flavonoida detektovan u vodenom ekstraktu gljive *C. versicolor*, u odnosu na metanolni i acetonski. Dominantne fenolne komponente u gljivama su hidroksibenzoeva i hidroksicinaminska kiselina, uz češće pojavljivanje kiselina iz hidroksicinaminske grupe kao što su: p-kumarinska, kafeinska, ferulinska i sinapinska (Kozarski et al., 2015). Fenolni derivati gljiva poseduju antioksidativni, antikancerogeni, anitinflamatorni, antimikrobni i antimutageni efekat (Badalyan et al., 2019), koji ispoljavaju usled sposobnosti da hvataju slobodne radikale doniranjem atoma vodonika, preveniranjem preveremene smrti ćelije, indukcijom apoptoze i sprečavanjem rasta tumora (Kozarski et al., 2015).

Flavonoidi su najčešća, široko rasprostranjena grupa fenolnih komponenata koja se javlja u biljkama i njihovim proizvodima. Smatralo se da životinje i gljive ne poseduju sposobnost biosinteze ovih komponenata (Ferreira et al., 2009). Međutim, u mnogim gljivama je utvrđeno njihovo prisustvo, a u pojedinim vrstama su flavonoidi bili dominantni u odnosu na ostale polifenolne komponente (Kozarski et al., 2015). U prirodi se nalaze u glikozilovanom ili esterifikovanom obliku, dok se u hrani, usled obrade i prerade, sreću i u obliku aglikona. Flavonoidi detektovani u gljivama su: flavonoli (kvercetin, rutin, kampferol, miricetin), flavoni (hrizin), flavanoni (hesperitin, naringenin, naringin), izoflavoni (formonetim, biohanin) i flavan-3-oli (katehin). Flavonoli su najzastupljenija grupa flavonoida u hrani. Antioksidativna aktivnost flavonoida je prva ispitana biološka aktivnost koja doprinosi zdravstvenim efektima. Pokazalo se da poseduju veliku sposobnost hvatanja nascentnog kiseonika, slobodnih radikala i drugih molekula koji imaju moć oksidacije. Ovom aktivnošću oni pomažu

sprečavanje oštećenja DNK molekula i razvoju maligniteta. Pored toga, utvrđeno je da poseduju antizapaljensku i antiproliferativnu aktivnost (Ferreira et al., 2009).



Slika 2.1. Podklase polifenola (Probst et al., 2018)

Gljive proizvode veliki broj proteina i peptida sa biološkom aktivnošću koji zauzimaju značajan udeo među funkcionalnim komponentama u gljivama. Utvrđeno je da ispoljavaju imunomodulatorno, antitumorno, antivirusno, antibakterijsko i antifungalno dejstvo, a dele se na: lektine, antimikrobne proteine, ribonukleaze, lakaze ribozom inaktivirajuće proteine i imunomodulatorne proteine gljiva (Xu et al., 2011). Dodatno, polisaharidi gljiva i njihovi derivati (polisaharopeptidi, proteoglikani)

poseduju prebiotska svojstva, podržavajući rast probiotskih bakterija u crevima (Badalyan et al., 2019).

## 2.1.2. Odabrane vrste medicinskih gljiva

### 2.1.2.1. *Ganoderma lucidum* [(W.Curt.:Fr.) P.Karst.]

Prema taksonomskoj klasifikaciji, gljiva *Ganoderma lucidum* je svrstana u sledeće taksonomske grupe (Kozarski, 2012):

Kraljevstvo: Fungi

Razdeo: Basidiomycota

Klasa: Basidiomycetes

Red: Polyporales

Familija: Ganodermataceae

Rod: Ganoderma

Vrsta: *Ganoderma lucidum*



Slika 2.2. Plodonosno telo gljive *G. lucidum*, autor Aleksandra Sknepnek

Ova gljiva spada među najpoznatije medicinske gljive korišćene u tradicionalnoj medicini Dalekog istoka, gde se primenjuje u vidu suvog praha ili vrelog vodenog

ekstrakta (Reis et al., 2017). Medicinski efekti ove gljive zapisani su u najstarijoj knjizi o medicinskim materijalima u Kini, „Shen Noug’s Herbel”, a njeno korišćenje traje najmanje 4000 godina (Rowan i Sullivan, 2002). Veliki broj naziva se koristi za ovu gljivu: Ling Zhi, Renzhi, Gljiva besmrtnosti u Kini; Reishi, Munnertake, Sachitake, Saruno, Koshikake ili Manendake u Japanu; Youngzhi u Koreji, dok je u Srbiji poznata kao Hrastova sjajnica (Vukojević i Hadžić, 2013; Chang i Wasser, 2012; Paterson, 2006; Gao et al., 2005). Latinski naziv potiče od reči *gan* – blistav, *derm* – koža i *lucidum* – sjajan (Halpern, 2007). U drevnoj kineskoj, japanskoj i koreanskoj umetnosti je najviše prikazivana gljiva, a pozato je da je bila korišćena i kao amajlija (Smith et al., 2002).

Javlja se kao razgrađivač lignoceluloze na panjevima, korenju, obolelim listopadnim i četinarskim stablima širom Evrope, Azije i Južne Amerike, s tim što joj je pojavljivanje u prirodi veoma retko (Wasser, 2005). Nije jestiva usled veoma gorkog i drvenastog ukusa, zbog čega se koristi u obliku čaja. Ova gljiva se javlja u šest boja: crvena (akashiba), bela (shiroshinba), crna (kuroshiba), plava (aoshiba), žuta (kishiba) i ljubičasta (murasakishiba). Gljiva *G. lucidum* koja se koristi u terapeutske svrhe je crvena. Postoje naznake da bi ove gljive, različitih boja, mogle biti svrstane u različite rodove, od strane taksonoma (Halpern, 2007).

U plodonosnom telu, micelijumu i sporama ove gljive detektovan je veliki broj bioaktivnih komponenata među kojima su najznajčajniji bioaktivni polisaharidi:  $\alpha/\beta$ -(1→3),(1→6) glukani, glikoproteini i heteropolisaharidi rastvorljivi u vodi (Paterson et al., 2006; Ferreira et al., 2015). Utvrđeno je da proteoglikani izolovani iz gljive *G. lucidum* ispoljavaju aktivnost protiv herpes simpleks virusta tipa 1 (HSV-1) i tipa 2 (HSV-2) (Halpern, 2007). Protein sa biološkom aktivnošću, Ling Zhi 8 (LZ8) izolovan je iz micelijuma ove gljive i utvrđeno je da poseduje imunosupresivnu aktivnost, dok ganodermin iz plodonosnog tela ispoljava antifungalnu aktivnost (Wang i Ng, 2006; Van Der Hem et al., 1995). Iz 22 vrste koje pripadaju rodu *Ganoderma* izolovano je preko 430 sekundarnih metabolita, među kojima je detektovano oko 380 terpenoida koji najvećim delom obuhvataju ganoderinsku i lucideninsku kiselinu, a čije prisustvo utiče na gorak ukus gljive (Badalyan et al., 2019). Gljiva *G. lucidum* sadrži i različite fenolne komponente (p-hidroksibenzoeva kiselina, p-kumarinska kiselina, galna kiselina,

pirogalol, protokatehinska kiselina, (+) katehin i kvercetin (Paterson, 2006). Takođe su u gljivi prisutni i steroidi, laktoni i alkaloidi.

Usled prisustva svih ovih komponenata, *G. lucidum* ispoljava antimikrobno, antioksidativno, antiinflamatorno, imunomodulatorno, antitumorno, anti-HIV, antikancerogeno, hipoglikemijsko, antianemijsko i druga dejstva (Vitak et al., 2015; Halpern, 2007; Paterson, 2006; Wasser, 2005; Mau et al., 2002; Smith et al., 2002; Smania et al., 1999). Tradicionalno se ova gljiva, kao lek, koristi u Orijentalnoj medicini za lečenje bolesti kao što su: hronični hepatitis, bronhitis, astma, hipertenzija, čir na želucu (Smith et al., 2002; Kabir et al., 1988). Zbog snažnog citostatičkog efekta na brojne ćelijske linije raka (grlića materice, debelog creva, pluća, prostate) koji poseduju plodnosna tela i micelijum gljive *Ganoderma* spp., preporučuje se njihova primena u kombinaciji sa hemo i radioterapijom (Stajić et al., 2019).

Razvijeno je preko stotinu različitih proizvoda na bazi gljive *G. lucidum*, koji su ostvarivali promet od 2,16 milijarde dolara, 2002. godine (Lai et al., 2004).

#### **2.1.2.2. *Lentinus edodes* [(Berk.) Singer]**

Gljiva *Lentinus edodes*, medicinska i jestiva gljiva, poznatija kao shiitake gljiva, je prema učestalosti proizvodnje na drugom mestu na svetu (Hobbs, 2000). Zbog svoje fenomenalne arome i medicinskih svojstava, godišnje se proizvede preko 130.000 tona. Veoma je cenjena kao funkcionalna hrana i koristi se u orijentalnoj tradicionalnoj medicini za lečenje tumora, bolesti srca, gripa, visokog krvnog pritiska, dijabetesa, bolesti jetre, seksualne disfunkcije i u prevenciji starenja. Bogat je izvor ugljenih hidrata, proteina, svih esencijalnih aminokiselina, polinezasićenih masnih kiselina, vitamina i minerala. Gljiva *L. edodes* je veoma značajan izvor vitamina D<sub>2</sub>, koji se nalazi u obliku ergosterola (provitamina D<sub>2</sub>) i koji se izlaganjem UV zracima i zagrevanjem konvertuje u vitamin D<sub>2</sub>. Sadržaj ovog vitamina u gljivi *L. edodes*, viši je u odnosu na sve biljke (Bisen et al., 2010). Poznata je kao „mirisna gljiva” i veoma je cenjena u kineskoj kuhinji. Preporučuje se konzumiranje celih zrelih plodnosnih tela, naročito šešira, zbog toga što se sadržaj amino kiselina, proteina, glikogena, lipida, vitamina C i ukupnog pepela povećava sa razvojem plodnosnog tela (Hobbs, 2000).

Prema taksonomskoj klasifikaciji, vrsta *L. edodes* je svrstana u sledeće taksonomske grupe (Bisen et al., 2010):



Kraljevstvo: Fungi  
Razdeo: Basidiomycota  
Klasa: Basidiomycetes  
Red: Agaricales  
Familija: Agaricaceae  
Rod: Lentinus  
Vrsta: *Lentinus edodes*

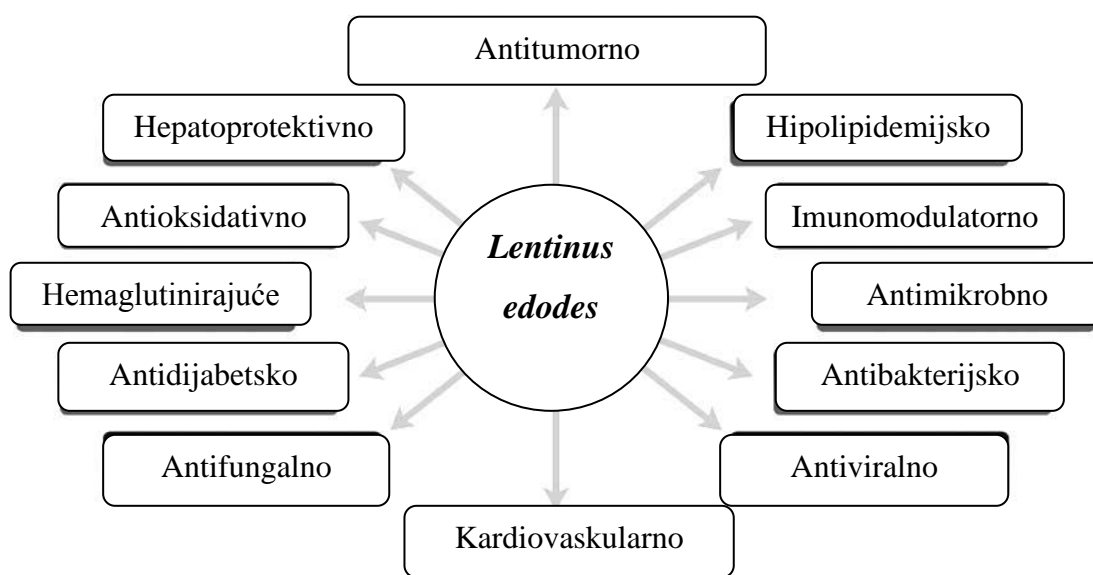
Slika 2.3. Plodonosno telo gljive *L. edodes*, autor Aleksandra Sknepnek

Geografska rasprostranjenost ove gljive je u predelima sa toplom i vlažnom klimom koja se prostire od Japana, preko Tanzanije, Novog Zelanda do regiona Himalaja (Butan, Nepal i Indija). Javlja se kao razlagač drveta na palim deblima hrasta, kestena, bukve, javora, topole, duda i dr. (Wasser et al., 1997; Bisen et al., 2010).

Proučavanje medicinskih karakterisitka ove gljive potiče iz perioda vladavine dinastije Ming (1369 - 1644). Danas su, među najviše proučavanim ekstraktima ove gljive, u farmakološkom smislu, LEM-ekstrakt micelijuma i lentinan,  $\beta$ -glukan izolovan iz ćelijskog zida micelijuma ili plodonosnog tela, ali i druge komponente koje poseduju sposobnost redukcije nivoa holesterola, antibakterijsku i antiviralnu aktivnost (Hobbs, 2000). Među ovim komponentama su: komponenta bogata lignanom koja je dobijena iz micelijuma, sa veoma dobrim potencijalom za tretiranje hepatitisa B i AIDS-a i polisaharid KS-2, izolovan takođe iz micelijuma, a koji poseduje antitumornu aktivnost (Bisen et al., 2010).

Lentinan je visoko prečišćen polisaharid velike molekulske mase koji se sastoji jedino od monomera glukoze povezanih  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3) glikozidnim vezama uz  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6) bočno vezanu glukozu. Karakteriše ga struktura heliksa, koja se smatra veoma važnom

za biološku aktivnost. Sastavljen je jedino od ugljenika, kiseonika i vodonika, što znači da je potpuno prečišćen od azota (proteina), fosfora, sumpora itd. Lentinan se u Japanu od 1986. godine koristi kao intravenozni lek za kombinovani tretman pacijenata obolelih od raka želuca, doprinoseći povećanju stepena preživljavanja (Reis et al., 2017; Badalyan et al., 2019). LEM je kompleks proteina vezanih za polisaharid. U strukturi se sreću ksiloza, arabinoza i glukoza, dok su u manjim količinama prisutni i galaktoza, manosa i fruktoza. Dodatno su u sastavu detektovane i nukleinske kiseline, vitamini grupe B, ergosterol i eritadein (Hobbs, 2000).



Slika 2.4. Medicinski značaj gljive *L. edodes* (Bisen et al., 2010)

Oko 45 % proizvedenih plodonosnih tela se na tržište plasira u svežem stanju, a ostatak u osušenom obliku. Takođe, postoje i komercijalni preparati u vidu vrelih vodenih i alkoholnih ekstrakata, biomase ili ekstrakata micelijuma, koji mogu biti pripremljeni u vidu tableta, kapsula ili eliksira (Bisen et al., 2010).

### 2.1.2.3. *Coriolus versicolor* [(L:Fr.) Lloyd]

Taksonomske kategorije kojima pripada gljiva *Coriolus versicolor*, prema taksonomskoj klasifikaciji su (Justo i Hibbett, 2011):



**Kraljevstvo:** Fungi  
**Razdeo:** Basidiomycota  
**Klasa:** Agaricomycetes  
**Red:** Polyporales  
**Familija:** Polyporaceae  
**Rod:** *Coriolus*  
**Vrsta:** *Coriolus versicolor*

Slika 2.5. Plodonosno telo gljive *C. versicolor*, autor Aleksandra Sknepnek

Gljiva *C. versicolor* raste tokom cele godine na prostoru Severne Amerike, Azije i Evrope. Može se naći na mrtvim deblima, panjevima, granama i trupcima, kao saprofit, ali se može sresti i na živim stablima, kao parazit. Plodonosno telo joj je u obliku lepeze, sa talasastim ivicama i obojenim koncentričnim zonama koje variraju od svetlo žute ili braon, do tamnijih zona crvene, plave i braon pa sve do crnih. Imena koja se sreću u literaturi su brojna: *Agaricus versicolor*, *Boletus versicolor*, *Polyporus versicolor*, *Polystictus versicolor*, *Poria versicolor*, *Trametes versicolor*, Yun-Zhi u Kini, Kawaratake u Japanu, što znači „gljiva pored obale reka” i Ćuranov rep u Severnoj Americi. Ova gljiva nije jestiva, pa se njena primena u tradicionalnoj medicini zasnivala na pripremi čaja od plodonosnog tela koje je osušeno i samleveno, kao i u vidu vrelih vodenih ekstrakata (Smith et al., 2002; Cui i Christi, 2003). Utvrđeno je i da je sadržaj bioaktivnih polimera u čaju sličan dozama koje se, u savremenoj kliničkoj praksi, primenjuju u vidu ekstrakata (Cui i Christi, 2003).

Polisaharopeptidi ove gljive su komercijalno najviše zastupljeni u poređenju sa svim terapeutičima dobijenih od medicinskih gljiva. Polisaharopeptid PSP i polisaharopeptid Krestin PSK se dugi niz godina koriste u Kini i Japanu, a proizvode od



miceljuma gljive *C. versicolor*, i to PSK od soja „CM-101”, a PSP od soja „Cov-1” (Reis et al., 2017). Predstavljaju heteroglukane sa  $\alpha$ -(1→4) i  $\beta$ -(1→3) glikozidnim vezama i proteinskom komponentom. Glavna monosaharidna komponenta je D-glukoza, dok je osnovna razlika u sastavu ova dva polisaharopeptida u tome što PSK sadrži fukožu, dok PSP sadrži ramnozu i arabinozu. U humanoj terapiji ovi polisaharopeptidi nemaju negativne efekte kada se primenjuju u visokim dozama i tokom produženog perioda korišćenja (Cui i Christi, 2003; Reis et al., 2017).

PSK je komercijalizovala kompanija Kuresha Chemicals iz Japana. Nakon kliničkih ispitivanja, 1977. godine, odobreno je njegovo korišćenje. Devetnaesto mesto, na listi najuspešnijih svetskih komercijalnih lekova, dostiže 1985. godine (Cui i Christi, 2003). Njegovom primenom se povećava stepen preživljavanja kod pacijenata sa rakom dojke, želuca i kolorektalnog kancera (Reis et al., 2017). U osam kliničkih ispitivanja u kojima je učestvovalo ukupno 8009 pacijenata sa rakom želuca, ustanovljeno je da je stepen preživaljavanja povećan dodatkom imunoterapije sa PSK uz hemoterapiju, u odnosu na hemoterapiju samu (Badalyan et al., 2019).

PSP se na tržištu pojavio deset godina nakon PSK-a (Cui i Christi, 2003). Njegovo dejstvo na tumorske ćelije se ispoljava inhibicijom proliferacije putem indukovanja apoptoze, kao i zaustavljanjem ćelijskog ciklusa tokom S faze (faza replikacije DNK). Utvrđeno je i da PSP doprinosi povećanju citotoksičnosti lekova koji se koriste za ovu fazu ćelijskog ciklusa, kao što su doksorubicin, etopozid, kamptotecin i ciklofosamid (Zong et al., 2012).

### **2.1.3. Biološka aktivnost medicinskih gljiva**

#### **2.1.3.1. Antimikrobno dejstvo**

Najveća pretnja ljudskom zdravlju su infektivne bolesti koje izazivaju različiti patogeni: virusi, bakterije, gljive, protozoe i metazoe, najčešće helminti (Gao et al., 2005). Otkriće penicilina spada u najvažnija otkrića dvadesetog veka. Od tada su gljive prepoznate kao veoma važne u sintezi širokog spektra antibiotika i u tretmanu bakterijskih infekcija (Sheena et al., 2003). Međutim, njihova neadekvatna primena dovodi do razvoja rezistencije bakterija na postojeće antibiotike i sve teži tretman

bolesti. Svetska zdravstvena organizacija je 2010. godine istakla rizik usled nedostatka alternativnih terapija za sve veći broj multirezistentnih bakterija koje, usled otpornosti na postojeće antibiotike, izazivaju oboljenja, nekada, veoma lako lečena (Alves et al., 2012). Antibiotici ispoljavaju svoje dejstvo inhibiranjem sinteze peptidoglukana u ćelijskom zidu; uticajem na celovitost ćelijske membrane usled čega se remeti njena propustljivost; inhibicijom sinteze nukleotida; interferiranjem sa polimerazama koje učestvuju u DNK replikaciji i transkripciji (Reis et al., 2017).

Proizvodnja određenih antibiotika danas se najviše sprovodi upotrebom mikrogljiva, iako je dokazano da i pečurke (makrogljive) sintetisu antimikrobne komponente kako bi preživele i napredovale u okruženju. Te komponente su identifikovane kao komponente male molekulske mase. Uglavnom su to sekundarni metaboliti: terpeni, steroidi, antrakinoni, derivati benzojeve kiseline i kinolini. Takođe i primarni metaboliti mogu ispoljiti ovakvo dejstvo, npr. oksalna kiselina. Jedinjenja velike molekulske mase koja ispoljavaju antibiotsko dejstvo su pretežno peptidi i proteini (Alves et al., 2012). Takođe, gljive ispoljavaju i antifungalno dejstvo vezivanjem antifungalnih jedinjenja za ergosterol narušavajući propustljivost ćelijske membrane ili inhibicijom enzima neophodnih za sintezu sterola što dalje vodi do razgradnje ergosterola u membrani. Dodatno, dejstvo se može ispoljiti i inhibicijom  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3) glukan sintetaze što će inhibirati sintezu glukana. Za gljive *L. edodes* i *C. versicolor* je potvrđeno da poseduju sposobnost i da inhibiraju produkciju mikotoksina, naročito aflatoksina (Reis et al., 2017). Polisaharidi, triterpeni, lektini, alkaloidi, fenoli, saponini iz gljiva ispoljavaju i antiviralno dejstvo sprečavanjem viralne replikacije, viralnog integriteta, adsorpcije virusa, formiranja i oslobađanja (Gao et al., 2005).

Antibakterijsko dejstvo Basidiomycetes gljiva je otkriveno 1950-ih godina, i potvrđeno je u mnogim kasnijim istraživanjima. Kod 34 Basidiomycetes gljive antibiotsko dejstvo je ispoljeno na *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella* spp. i *Candida albicans* (Gao et al., 2005). Kombinovanje ekstrakta gljiva sa antibioticima može dovesti do pojave aditivnog ili sinergetskog efekta, a u određenim slučajevima i do antagonizma (Yoon et al., 1994). Na osnovu podataka iz literature, može se zaključiti da ekstrakti gljiva i komponente izolovane iz gljiva imaju jače antimikrobno dejstvo na Gram-pozitivne u odnosu na Gram-negativne bakterije. Među najosetljivijim Gram-pozitivnim

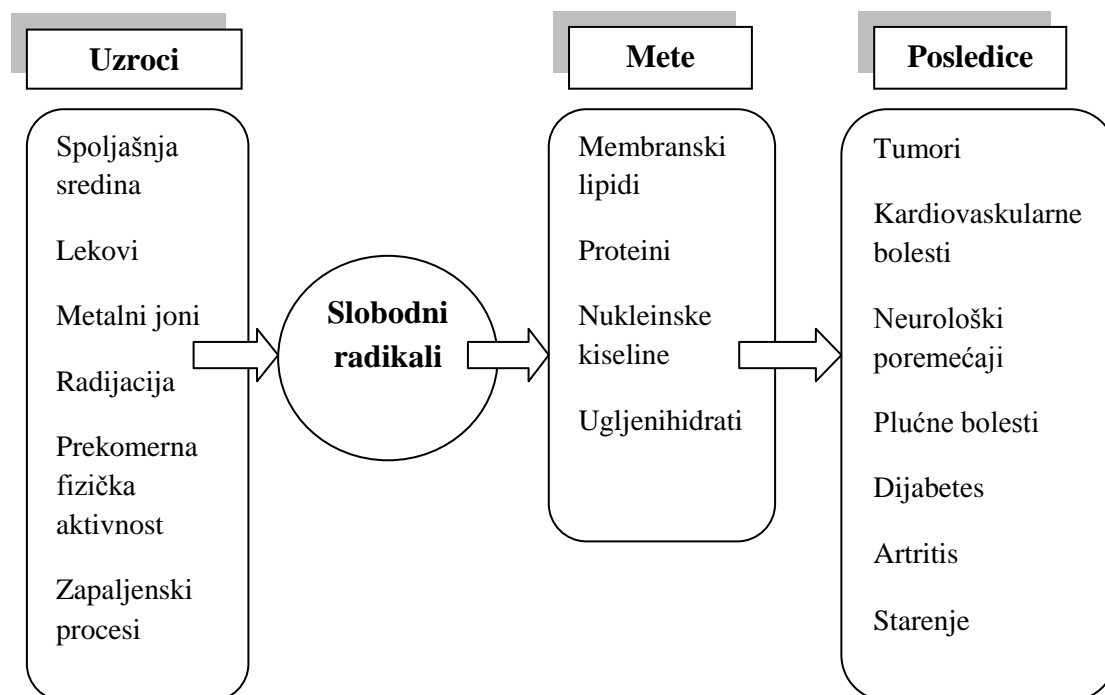
bakterijama na ekstrakte mnogih gljiva su *S. aureus*, *B. subtilis* i *B. cereus*. Najosetljivije Gram-negativne bakterije na ekstrakte gljiva *G. lucidum*, *L. edodes*, *Agaricus bisporus* i *Lepista nuda* su *E. coli* i *Klebsiella pneumoniae* (Alves et al., 2012).

Među najviše proučavanim gljivama je *L. edodes* koja ispoljava širok spektar dejstva. Utvrđeno je da oksalna kiselina iz ove gljive ispoljava dejstvo na *B. cereus*, *B. subtilis*, *S. aureus*, MRSA (engl. methicillin resistant *S. aureus*), *Streptococcus faecalis*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium* (Alves et al., 2012). Iz gljive *G. lucidum* izolovane su steroidne komponente koje poseduju baktericidni efekat, kao i hidrokinoni i ganomicini A i B koji ispoljavaju dejstvo na Gram-pozitivne i Gram-negativne bakterije (Paterson et al., 2006; Ferreira et al., 2015). Metanolni ekstrakt gljive *C. versicolor* pokazao je različit mehanizam delovanja na Gram-pozitivne i Gram-negativne bakterije usled različite strukture ćelijskog zida kod ove dve grupe bakterija, kao i usled različitih komponenata neprečišćenog ekstrakta koje deluju na ove vrste. Dejstvo ekstrakta kod bakterije *S. aureus* ispoljeno je na citoplazmatičnoj membrani, dok je kod bakterije *Salmonella* Enteritidis utvrđeno oštećenje ćelijskog zida (Matijašević et al., 2016).

### 2.1.3.2. Antioksidativno dejstvo

U normalnom metabolizmu ćelija proizvode se slobodni radikali kao deo prirodnog procesa, a najčešće u obliku reaktivnih kiseoničnih vrsta (engl. reactive oxygen species, ROS). Za normalno funkcionisanje organizma, veoma je važno održavanje balansa između produkcije slobodnih radikala i odbrane od njih (Ferreira et al., 2009; Badalyan et al., 2019).

U slučaju nastanka disbalansa, prekomernom produkcijom ROS, javlja se oksidativni stres koji razara ćelijske lipide, proteine i DNK, čime se remeti njihova normalna funkcija. Oksidativni stres je povezan sa više od stotinu bolesti, kao i sa ubrzanim procesom starenja (Ferreira et al., 2009). Reaktivne kiseonične i nitrogen vrste ( $O_2^-$ ,  $H_2O_2$ ,  $\bullet OH$ ,  $NO$ ) mogu, iniciranjem promena u strukturi, funkciji i aktivnosti ćelijskih molekula (nukleinskih kiselina, proteina, ugljenih hidrata, lipida) i procesa, dovesti do razvoja tumora, nekontrolisanog deljenja ćelija (proliferacije), odsustva apoptoze i pojave metastaza (Stajić et al., 2019).



Slika 2.6. Najznajčajniji uzroci pojave oksidativnog stresa (slobodnih radikala), moguća mesta na kojima deluju i stanja do kojih najčešće dovode (Ferreira et al., 2009)

Slobodni radikali su pretežno nestabilni i reaktivni molekuli, usled toga što sadrže nespareni elektron u spoljašnjoj orbiti. Najvažnija klasa slobodnih radikala su ROS (engl. reactive oxygen species), derivati molekuskog kiseonika ( $O_2$ ). Dodavanjem jednog elektrona kiseoniku, nastaje tzv. primarni ROS, superoksid anjon ( $O_2^{\bullet-}$ ). Superoksid anjon nastaje u mitohondijama usled toga što se mala količina elektrona oslobodi u mitohondrijskom elektron transportnom sistemu (ETS). Kao posledica, kiseonik ne biva redukovan do vode, već od njega nastaje superoksid anjon. Superoksid anjon generiše sekundarne ROS: vodonik peroksid ( $H_2O_2$ ) i hidroksil radikale ( $OH^{\bullet}$ ). Hidroksil radikali su najtoksičniji među ROS i odgovorni su za napad na DNK molekule. Membranski lipidi su vrlo osetljivi na napad slobodnih radikala, usled čega dolazi do peroksidacije lipida i produkcije različitih ROS. Početak lipidne peroksidacije je oslobađanje vodonikovog atoma iz polinezasićeniog lipidnog lanca (LH), nakon čega nastaje visoko reaktivan lipidni radikal ( $L^{\bullet}$ ). U reakciji sa molekulskim kiseonikom formira se peroksil radikal ( $LOO^{\bullet}$ ) koji sa susednim lipidima dovodi do nastanka

hidroperoksida lipida (LOOH) i lako se razgrađuje usled čega nastaju novi L<sup>•</sup> radikali. Ovim procesom nastaje lančana reakcija propagacije, koja može biti štetnija po biološki sistem, nego što su to ROS. Među reaktivnim azotnim vrstama (RNS), najznajčajniji je azot oksid (NO<sup>•</sup>), čijom prekomernom produkcijom dolazi do nitrozilacije proteina i uticajem na njihovu normalnu funkciju. U reakciji sa superoksid anjom, nastaju velike količine peroksinitritnog anjona koji dovodi do fragmentacije DNK i oksidacije lipida (Ferreira et al., 2009).

Dodatno, kvalitet i bezbednost hrane zavise od njene oksidativne stabilnosti i odsustva oksidativnih promena u mastima i uljima, koje vode ka produkciji sekundarnih, potencijalno toksičnih komponenata. U cilju sprečavanja pojave oksidativnih procesa, u prehrambenoj industriji se primenjuju sintetički antioksidansi: butilovani hidroksi anizol, BHA (E320), butilovani hidroksi toluen, BHT (E321), propil galat, PG (E310) i tercijarni butilhidrokinon, TBHQ (E319). Međutim, postoje naznake da pojedini sintetički antioksidansi mogu imati toksični efekat, što povećava potrebu za pronalaženjem novih, prirodnih antioksidativnih izvora (Kozarski et al., 2014).

Ljudski organizam je razvio odbrambeni mehanizam za borbu protiv oksidativnog stresa ekspresijom enzimskih sistema, kao i neenzimskim sistemom. Enzimi uključeni u uklanjanje ROS su superoksid dismutaza, katalaza, glutation peroksidaza i tireodoksin sistem. Neenzimski antioksidansi u ljudskom organizmu obuhvataju: hormone estrogena, glutation, mokraćnu kiselinu, bilirubin, koenzim Q, melanin, melatonin,  $\alpha$ -tokoferol i lipoičnu kiselinu (Kozarski et al., 2014). Smanjenju oksidativnih oštećenja, jačanjem unutrašnjeg odbrambenog sistema, mogu doprineti prirodni proizvodi koji poseduju antioksidativnu aktivnost (Badalyan et al., 2019).

Nakon što je utvrđeno da prirodni proizvodi u svom hemijskom sastavu sadrže antioksidativne komponente, i da postoji obrnuto proporcionalna veza njihovog unošenja putem hrane i pojave bolesti kod ljudi, širom sveta je povećano interesovanje za primenom prirodnih antioksidanasa u hrani, farmaceutskoj industriji i kozmetici (Reis et al., 2017). Slobodne radikale mogu neutralisati metaboliti gljiva koji se javljaju intracelularno ili ekstracelularno, u micelijumu, bazidiokarpu ili supstratu, odnosno fermentacionom bujonu (Stajić et al., 2019). Antioksidativne komponente doprinose stabilnosti kako prehrambenih proizvoda, kozmetičkih preparata, farmaceutskih proizvoda, biodizela, tako i antioksidativnoj zaštiti bioloških sistema (Ferreira et al.,

2009; Kozarski et al., 2014). Smatra se da najvećem antioksidativnom značaju kod gljiva doprinose fenoli (fenolne kiseline i flavonoidi), polisaharidi, proteini, terpeni, vitamini, karotenoidi i minerali prisutni u gljivama (Reis et al., 2017; Badalyan et al., 2019). Primenom visokih temperatura postiže se veoma efikasno izolovanje polisaharidnih komponenata iz ćelijskog zida viših gljiva, i postiže se značajna antioksidativna aktivnost ekstrakta (Kozarski et al., 2014).

Efekat fenola kao antioksidansa se zasniva na delovanju fenolnog vodonika u slobodno radikalskim reakcijama, pri čemu se prekida lančana reakcija. Povećanju antioksidativne aktivnosti doprinose supstituti vodonika u *orto* i *para* poziciji. Flavonoidi, kao velika grupa fenolnih komponenata, pokazuju visoki stepen hvatanja slobodnih radikala i drugih vrsta oksidišućih molekula koji utiču na oštećenje DNK i nastanak tumora, kao i na smanjenje rizika od hroničnih oboljenja (Lo et al., 2011; Kozarski et al., 2014).

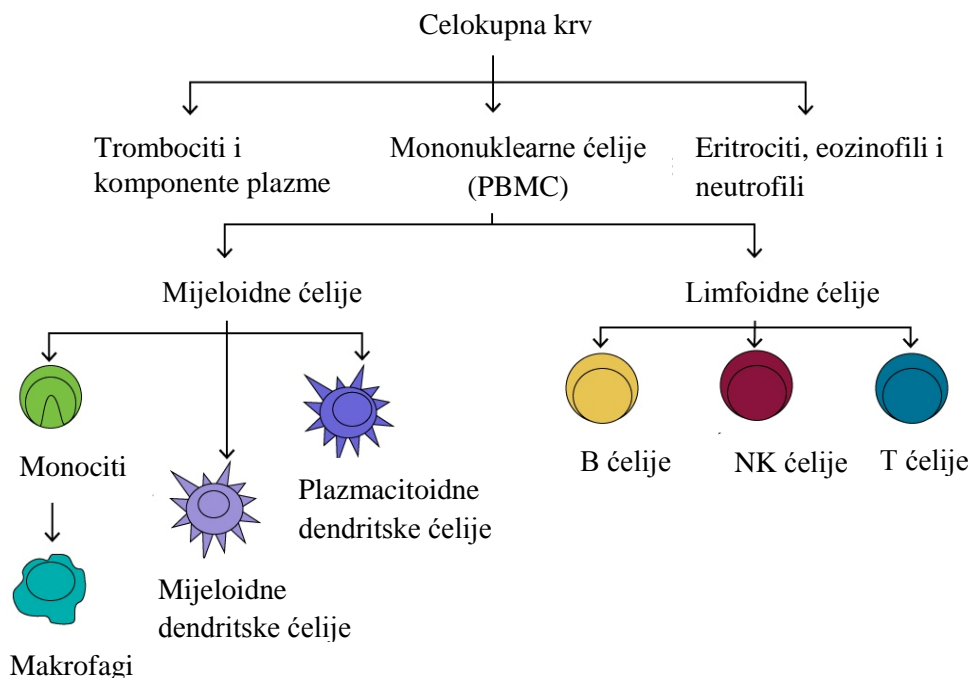
Polisaharidi ekstrahovani iz gljiva imaju veliku sposobnost hvatanja slobodnih radikala, što će zavistiti od njihovog sastava, veličine molekula, bočnih lanaca vezanih za glavni lanac polisaharida i dr. Dejstvo im se ispoljava u hvatanju slobodnih radikala, heliranju  $Fe^{2+}$  jona, inhibiciji lipidne peroksidacije, kao i u povećanju ekspresije antioksidativnih enzima kao što su superoksid dismutaza i glutation peroksidaza (Kozarski et al., 2014; Lo et al., 2011).

Vitamin E može da reaguje sa peroksil radikalima, koji nastaju od polinezasićenih masnih kiselina, fosfolipida i lipoproteina i da formira stabilni lipidni vodonikperoksid. Time ovaj vitamin doprinosi zaštiti organizma od degenerativnih funkcija u organizmu i pojavi kardiovaskularnih bolesti i maligniteta. Sinergetski efekat se javlja između vitamina C i vitamina E. Vitamin C doprinosi regeneraciji oksidisanog vitamina E koji je vezan za membranu. Pored toga, vitamin C je veoma efikasan protiv superoksid, hidroksil i peroksil radikala, vodonik peroksida i nascentnog kiseonika. (Ferreira et al., 2009).

### 2.1.3.3. Imunomodulatorna aktivnost

Imunomodulatornu aktivnost poseduju bioaktivni molekuli medicinskih gljiva kao što su polisaharidi (pretežno  $\beta$ -glukani), proteini, glikoproteini, lipopolisaharidi, terpenoidi i lektini (Reis et al., 2017). Potvrđeno je da najveću imunomodulatornu i antikancerogenu aktivnost poseduju polisaharidi, pretežno  $\alpha$ -glukani i  $\beta$ -glukani, kao i kompleksi glukana i peptida (Zong et al., 2012). Polisaharidi nemaju mogućnost da penetriraju u ćeliju usled velike molekulske mase, pa usled toga, biološki odgovor domaćina indukuju vezivanjem za receptore imunih ćelija. Identifikovano je nekoliko receptora za  $\beta$ -glukane: komplementarni receptor tip 3 (CR3 - engl. complement receptor type 3), dektin-1, TLR-2 i TLR-4 (engl. tool like receptors), laktozilceramid i receptori hvatači (Lull et al., 2005; Zong et al., 2012). Polisaharidi gljiva ispoljavaju antitumorni efekat aktivacijom imunog odgovora domaćina, čime mogu prevenirati onkogenezu, ali i direktnom inhibicijom proliferacije različitih tumorskih ćelija, zaustavljanjem ćelijskog ciklusa, kao i indukcijom apoptoze (Hobbs, 2000; Zong et al., 2012; Badalyan et al., 2019). Bioaktivni molekuli gljiva poboljšavaju imuni sistem putem aktivacije dendritskih ćelija, NK (eng. natural killer) ćelija, T ćelija, B ćelija i makrofaga, koja rezultuje produkcijom citokina (Lull et al., 2005; Wasser, 2014). Citokini su proteini male molekulske mase koji su ključni za međućelijsku komunikaciju u okviru ćelija imunskog sistema, ali i između neimunskih ćelija. Indukovanjem produkcije brojnih citokina pokreće se ekspresija gena imunomodulatornih citokina i njihovih receptora (Wasser, 2014). Vezujući se za specifične receptore na površini ćelije, citokini mogu izazvati promene u diferencijaciji, migraciji i ćelijskoj proliferaciji (Zhang et al., 2013; Xu et al., 2014). Zavisno od vrste citokina koji se proizvode, pomoćničke T ćelije (engl. T helper, Th) se u kontaktu sa dendritskim ćelijama mogu diferencirati u različite subpopulacije T ćelija, kao što su Th1, Th2, Th17, Th9, Treg, CD8+ CTL, supresorske CD8T ćelije i druge. Th1 ćelije proizvode IL-2, IFN- $\gamma$  i TNF- $\beta$  i predstavljaju ćelijski imunitet kod većine unutarćelijskih infekcija organizma. Th2 ćelije proizvode citokine IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 i IL-13 koji aktiviraju humoralni imunitet i biosintezu antitela protiv ekstracelularnih infekcija (Loll et al., 2005).

Stimulativni efekat  $\beta$ -glukana na imuni sistem se može iskoristiti kao dodatna terapija pacijentima koji boluju od tumora, u slučajevima operacije, hemo ili radiotretmana (Badalyan et al., 2019). Smatra se da  $\beta$ -glukani rastvorljivi u vodi imaju bolju imunostimulativnu aktivnost u odnosu na nerastvorljive, najverovatnije usled toga što dolazi do degradacije nerastvorljivih  $\beta$ -glukana u manje bioaktivne oligomere, nakon oralne upotrebe (Wasser, 2014).



Slika 2.7. Ćelijski sastav krvi ([https://bioscience.lonza.com/lonza\\_bs/US/en/pbmcs-the-one-stop-immune-cells-shop](https://bioscience.lonza.com/lonza_bs/US/en/pbmcs-the-one-stop-immune-cells-shop))

Razvijeno je nekoliko proizvoda za kliničke i komercijalne svrhe među kojima su: PSK i PSP od gljive *C. versicolor*; Lentinan od gljive *L. edodes*; Shizopyllan od gljive *Schizophyllum commune*; Befungin od gljive *Inonotus obliquus*; D frakcija od gljive *Grifola frondosa*; Ling Zhi-8 (LZ-8) – imunomodulatorni polipeptid gljive *G. lucidum*, GLPS - polisaharidna frakcija gljive *G. lucidum* i dr. (Paterson, 2006; Wasser, 2014). Smatralo se da lentinan poseduje jedino imunoobnavljačku aktivnost, odnosno da imuni sistem aktivira jedino kod imunokompromitovanih organizama. Međutim, imunopotentna aktivnost je potvrđena nakon što je lentinan ispoljio stimulativni efekat na proliferaciju perifernih mononuklearnih ćelija zdravih donora (Hobbs, 2000).



Proizvodi od gljiva *G. lucidum*, *L. edodes* i *C. versicolor* koji se nalaze na tržištu pojedinačno ili u formulaciji sa drugim gljivama, a koji, po tvrdnjama proizvođača, imaju uticaj na imuni sistem na taj način što ga modifikuju, regulišu, poboljšavaju ili stimulišu, prikazani su u Tabeli 2.1.

Tabela 2.1. Komerrijalni nutraceutici od gljiva *G. lucidum*, *L. edodes* i *C. versicolor* sa uticajem na imuni sistem (Reis et al., 2017)

Proizvod	Vrste gljiva prisutne u formulaciji
„AHCC” Komponenta povezana sa aktivnom heksozom	<i>L. edodes</i>
„Agrikon.1”	<i>G. lucidum</i> , <i>L. edodes</i> , <i>Agaricus blazei</i> , <i>G. frondosa</i> , <i>Pleurotus ostreatus</i>
„Breast Defend <sup>®</sup> ”	<i>G. lucidum</i> , <i>C. versicolor</i> , <i>Phellinus linteus</i>
„Concord Sunchih GPSP”	<i>G. lucidum</i>
„Coriolus MRL <sup>TM</sup> ”	<i>C. versicolor</i>
„GanoPoly <sup>®</sup> ”	<i>G. lucidum</i>
„LifeShield <sup>TM</sup> Immune Support”	<i>G. lucidum</i>
„Mycoformulas Immune <sup>TM</sup> ”	<i>G. lucidum</i>
„MycoPhyto <sup>®</sup> Complex”	<i>G. lucidum</i> , <i>Agaricus</i> spp., <i>Cordyceps</i> spp., <i>Coriolus</i> spp., <i>G. frondosa</i> , <i>Umbellatus</i> spp.
„MycoPlex-7 <sup>TM</sup> ”	<i>C. versicolor</i> , <i>A. blazei</i> , <i>Cordyceps sinensis</i> , <i>Hericium erinaceus</i> , <i>Poria cocos</i> , <i>S. commune</i> , <i>Tremella fuciformes</i>
„Mycoprotect.1”	<i>G. lucidum</i> , <i>L. edodes</i>
„ORIVEDA <sup>®</sup> ”	<i>C. versicolor</i>
„Organic Rare Red Reishi <sup>TM</sup> ”	<i>G. lucidum</i>
„Organic ReiShi-Gen”	<i>G. lucidum</i> , <i>L. edodes</i>
„ReishiMax GLP <sup>®</sup> ”	<i>G. lucidum</i>
„Lentinan/LentinanXP/Lentinex <sup>®</sup> ”	<i>L. edodes</i>
„PSK-16 <sup>TM</sup> ”	<i>C. versicolor</i> , <i>L. edodes</i> , <i>G. lucidum</i> , <i>A. blazei</i> , <i>Armilleria mellea</i> , <i>Cordyceps militaris</i> , <i>C. sinensis</i> , <i>G. applanatum</i> , <i>G. frondosa</i> , <i>Grifola umbellata</i> , <i>H. erinaceus</i> , <i>Poria</i> spp., <i>Poria sclerotium</i> , <i>Tremella</i> spp., <i>P. ostreatus</i> , <i>S. commune</i>

#### 2.1.4. Gljive kao funkcionalna hrana i nutraceutici

Nakon Drugog svetskog rata lekovi su gotovo u potpunosti potisnuli tradicionalnu medicinu. Međutim, sintetički proizvodi su poslednjih dvadeset godina ponovo dobili konkurenciju u vidu biljnih i drugih prirodnih preparata koji se na tržištu nalaze u obliku čajeva, ekstrakata, napitaka itd. (Bisen et al., 2010). U cilju održavanja energetskeg balansa organizma, normalne težine i smanjenog rizika za oboljevanje od pojedinih bolesti, Svetska zdravstvena organizacija preporučuje izbalansiranu svakodnevnu ishranu koja će obezbediti sve esencijalne nutrijente za potrebe metabolizma. Ona obuhvata ograničen unos ukupnih masti i konzumiranje nezasićenih masnoća, uz istovremeno izbegavanje *trans*-masnih kiselina. Ishranu treba obogatiti namirnicama koje su izvor dijetnih vlakana, vitamina, nezasićenih masnih kiselina, esencijalnih aminokiselina i minerala, a koje se sreću u namirnicama kao što su povrće, voće, žitarice, leguminoze, orašasti plodovi i druge (Reis et al., 2017).

Hemijski sastav gljiva određuje njihovu nutritivnu vrednost i potencijalni uticaj na zdravlje. Gljive su dobar izvor proteina, vitamina, esencijalnih minerala, dijetnih vlakana, ugljenih hidrata, nezasićenih masnih kiselina, esencijalnih aminokiselina, elemenata u tragovima, isparljivih organskih kiselina i dr. (Wang et al., 2014; Badalyan et al., 2019). Prosečan sadržaj proteina, u čiji sastav ulaze sve esencijalne aminokiseline, u svežim gljivama se kreće od 3,5 do 4,0 %, dok je u odnosu na suhu masu taj sadržaj od 19 - 35 %. U odnosu na voće, povrće i mleko, gljive sadrže više proteina, ali su količine 4 – 5 puta niže u odnosu na meso (Cheung, 2008). Iako je sadržaj lipida relativno nizak (2 – 6 %), treba napomenuti da u sastavu lipida dominiraju polinezasićena linoleinska kiselina i mononezasićena oleinska i da *trans* masne kiseline nisu detektovane. Utvrđen je viši sadržaj linoleinske kiseline u dršci u odnosu na klobuk gljive, stoga se preporučuje konzumiranje celih plodova (Kalač, 2009). Gljive su značajan izvor vitamina D<sub>2</sub>, koji se iz ergosterola konvertuje tokom izlaganja UV zracima. Gljiva *L. edodes* sadrži više vitamina D<sub>2</sub> od bilo koje biljke (Bisen et al., 2010). U gljivama se sreću i značajne količine vitamina B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>3</sub>, B<sub>5</sub>, B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub>, H, C, kao i minerala i to Mg, Fe, Zn, Mn i dr. (Breene, 1990; Kalač et al., 2009).

Koncept funkcionalne hrane i nutraceutika je razvijen sa napretkom prehrambene tehnologije i nauke o hrani. Funkcionalana hrana je deo svakodnevne

ishrane koja, pored nutritivne vrednosti koju poseduje, ispoljava dodatne pozitivne efekte na ciljane funkcije u organizmu i/ili redukuje rizik od pojedinih bolesti. Ovakva hrana ne može biti u obliku pilula, tableta ili u obliku suplementa, za razliku od nutraceutika. Nutraceutici su prvi put opisani 1989. godine i do danas je zadržana ista definicija. Oni predstavljaju „hranu (ili deo hrane) koja obezbeđuje medicinske ili zdravstvene benefite uključujući prevenciju i tretiranje bolesti”. S obzirom da se nutraceutici koriste u istom obliku kao i lekovi i da ispoljavaju farmakološku aktivnost, neophodno je da ne budu pomešani sa lekovima. Lekovi se primenjuju za tretiranje ili prevenciju određenih bolesti, koriste se u preciznim dozama pod medicinskom kontrolom (Reis et al., 2017). S obzirom da je mali broj aktivnih komponenata gljiva izolovan i okarakterisan i da se gljive pretežno koriste u obliku micelijuma i ekstrakata dobijenih od plodonosnih tela, mogu se smatrati funkcionalnom hranom ili nutraceuticima, ali ne i lekovima (Stajić et al., 2019). Dodatno, postoje i dijetetski suplementi koji predstavljaju dodatak ishrani kojim se povećava unos određene komponente (vitamina, minerala, aminokiselina) i može pomoći u smanjenju rizika od pojedinih bolesti (Wasser, 2014).

Za tretman različitih bolesti, gljive se smatraju bezbednim, bez potrebe da prodju kroz faze I, II, III u kliničkim ispitivanjima, kao što to mora da se sprovede za lekove (Lull et al., 2005). Bioaktivne komponente gljiva, nalaze se na tržištu u obliku kapsula ili tableta kao vreli vodeni ili etanolni ekstrakti plodonosnih tela gajenih gljiva, osušen prah micelijuma i primordija, biomasa ili ekstrakt submerzno gajenog micelijuma, osušena plodonosna tela gljiva ili ekstrakti spora (Wasser et al., 2014; Reis et al., 2017). Niz prekliničkih toksikoloških testova polisaharo-peptida gljive *C. versicolor* (PSP) pokazalo je da ne postoji uticaj na folikularni razvoj jajnika, kvalitet oocita, steroidogenezu, trudnoću niti na razvoj embriona. Takođe ni lentinan kao ni derivati drugih medicinskih gljiva nemaju značajnih sporednih efekata. Do sada nisu prijavljene ni interakcije sa drugim primenjenim lekovima (Wasser, 2014).

Razvoj funkcionalnih prehrambenih proizvoda koji sadrže  $\beta$ -glukane ili druge bioaktivne komponente iz jestivih i medicinskih gljiva je jedan od pravaca za povećanje njihove upotrebe i prenošenje zdravstvenih efekata koje ispoljavaju, preko hrane do potrošača.

#### 2.1.4.1. Funkcionalni proizvodi na bazi gljiva

Interesovanje za primenom medicinskih gljiva u proizvodnji funkcionalne fermentisane i nefermentisane hrane beleži porast poslednjih 20 godina. Više autora je ispitalo uticaj dodatih gljiva na biološki potencijal dobijenih proizvoda.

Prah gljiva *Agaricus bisporus*, *Lentinus edodes* i *Boletus edulis* primenjeni su kao dodatak pri proizvodnji paste od durum pšenice. Njihov dodatak je uticao na obogaćenje paste proteinima i rastvorljivim i nerastvorljivim dijetetnim vlaknima. Takođe je utvrđeno i povećanje sadržaja ukupnih fenolnih komponenata i antioksidativnog kapaciteta uzoraka. Nakon primenjene digestije *in vitro*, ustanovljeno je da bi pasta obogaćena prahom pečuraka mogla da redukuje glikemijski odgovor (Lu et al., 2018).

Van Ba i sar. (2017) su pokazali da etanolni ekstrakt pripremljen od drški gljive *L. edodes* može biti primenjen kao funkcionalni dodatak fermentisanim kobasicama u cilju poboljšanja roka trajanja inhibicijom oksidacije lipida, kao i povećanja mikrobiološke bezbednosti proizvoda zbog antimikrobnog dejstva na patogene bakterije (*Escherichia coli* O157:H7, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*).

Mogućnost primene hidrofilnog ekstrakta gljive *Flammulina velutipes* kao prirodnog antioksidansa, ispitali su Bao i sar. (2009). Različite koncentracije ekstrakata, dodate mesu tune (*Thunnus obesus*), uticale su na produženje roka trajanja i antioksidativna svojstva proizvoda. Ekstrakt gljive je doprineo inhibiciji lipidne oksidacije i formiranja metmioglobina, što je posledično doprinelo očuvanju boje svežeg mesa.

Reis i sar. (2012b) su utvrdili da metanolni ekstrakt gljive *Agaricus bohusii* poseduje visoke koncentracije ukupnih fenolnih jedinjenja čiji je sadržaj sa snažnim antioksidativnim kapacitetom koji bi mogao doprineti antioksidativnoj zaštiti krem sira. Takođe je metanolni ekstrakt ove gljive inhibirao razvoj *Penicillium verucosum* var. *cyclopium* u krem siru na sobnoj temperaturi tokom sedam dana. Dodatno je pokazano da gljiva *A. bohusii* predstavlja bogat izvor ugljenih hidrata, proteina, polinezasićenih masnih kiselina i da sadrži  $\gamma$ -tokoferol.

Francisco i sar. (2018) su upotrebili novi materijal pripremljen od maltodekstrina i limunske kiseline za mikroenkapsulaciju sprej sušenih alkoholnih

ekstrakata gljive *Agaricus bisporus*. Na ovaj način su ekstrakti uspešno inkorporirani u mikrosferu i tako zaštićeni od degradacije. Enkapsulisani i neenkapsulisani ekstrakti *A. bisporus* su inkorporirani u jogurt. Slobodni i termički netretirani oblici ekstrakata imali su višu inicijalnu antioksidativnu aktivnost u odnosu na aktivnost nakon sedam dana. Sa druge strane, termički tretirani mikroenkapsulati ispoljili su bolju antioksidativnu aktivnost nakon sedam dana. Dodatno, ovako funkcionalizovani jogurti su zadržali nutritivne karakteristike koje poseduju neobogaćeni uzorci jogurta.

Pokazalo se da ekstrakti gljive *Laetiporus sulphureus* ispoljavaju antibakterijsko i antifungalno dejstvo *in vitro*. Dodatno je potvrđeno da metanolni ekstrakt u paradajz pasti može biti korišćen kao antifungalni konzervans u hrani usled kompletne inhibicije gljive *Aspergillus flavus* tokom 15 dana na sobnoj temperaturi. Za razliku od biljnih ulja koja poseduju snažan miris i negativno utiču na ukus paradajz paste, prednost ekstrakta ove gljive je što snažan miris ne poseduje (Petrović et al., 2013). Konzervišući potencijal metanolnog ekstrakta ove gljive je potvrđen i u model sistemu pileće paštete. Pri višim primenjenim koncentracijama ekstrakta potpuno je inhibiran rast micelijuma gljive *A. flavus*, tokom dvadeset jednog dana, dok je u kontrolnom uzorku (bez ekstrakta gljive) rast ove mikromicete detektovan nakon sedam dana skladištenja na temperaturi od 4 °C (Petrović et al., 2014).

Potencijalna primena metanolnog ekstrakta gljive *Tirmania pinoyi*, koji *in vitro* ispoljava antioksidativnu i antimikrobnu aktivnost, ispitana je u kontroli rasta bakterije *Staphylococcus aureus* u pilećoj supi. Nakon inkorporacije različitih koncentracija ekstrakta, postigla se inhibicija rasta *S. aureus*, kako na temperaturi od 4 °C, tako i na 25 °C (Stojković et al., 2013).

#### **2.1.4.2. Primena gljiva u proizvodnji napitaka**

U okviru sektora funkcionalne hrane, vrlo značajnu poziciju zauzimaju funkcionalni napici, koji donose zaradu od 48,9 % na tržištu bezalkoholnih napitaka u SAD. Godišnji rast ovog tržišta se kreće od 15 do 20 % usled povećane zainteresovanosti ljudi za kontrolom i prevencijom bolesti. Funkcionalni napici sadrže

komponente koje nisu uobičajene za tradicionalne proizvode, a koji pored hranljivosti, obezbeđuju i određene zdravstvene efekte (Vina et al., 2013).

Kim i sar. (2004) su dokazali mogućnost proizvodnje koreanskog, tradicionalnog pirinčanog vina „Yakju”, dodavanjem gljive *G. lucidum* u koncentraciji od 0,1 do 2,0 %. Na ovaj način su dizajnirali novo funkcionalno pirinčano vino. Dodatak gljive ovom vinu je doprinelo povećanju aktivnosti angiotenzim I konvertujućeg enzima usled prisustva triterpena - ganoderinske kiseline K, a takođe je utvrđeno i povećanje aktivnosti enzima superoksid dismutaze (SOD).

Lin i sar. (2010) su primenili različite *S. cerevisiae* kvasce (iz pekarske industrije, pivske industrije, industrije vina i sakea) u proizvodnji novog vina na bazi drške gljive *L. edodes*. Dostignuta koncentracija produkovanog etanola kretala se od 10,9 do 14,1 % v/v. Svi parametri ukazuju na to da se konvencionalni izvor azota koji se primenjuje kao dodatak u fermentaciji vina, može zameniti izvorima azota iz gljiva, kao i za razvoj novih funkcionalnih alkoholnih pića sa posebnim mirisnim aromama. Autori navode da je piće imalo značajno bolju senzornu prihvatljivost nego belo vino poreklom iz Francuske.

Etanolni ekstrakt gljive *G. lucidum* primenjen je za dobijanje novog tipa piva sa povećanim funkcionalnim svojstvima. Dominantne grupe jedinjenja detektovane u oba uzorka bili su triterpeni: ganoderinske kiseline i lucidenske kiseline. Senzorna prihvatljivost piva sa ekstraktom gljive bila je slična ili bolja u mnogim parametrima od standardnog piva (Leskosek-Cukalović et al., 2010).

Osušena plodonosna tela gljive *G. lucidum* korišćena su i za proizvodnju specijalnih vrsta žitnih jakih alkoholnih pića. Ekstrakcija različitih koncentracija gljive *G. lucidum* u 45 vol. % žitnoj rakiji, primenjena je tokom 7, 21 i 60 dana. Analizom sastava pića, utvrđeno je prisustvo 15 različitih triterpena. Koncentracija gljive i vreme ekstrakcije imalo je značajan uticaj na sadržaj ukupnih fenola. Analizirana pića su pokazala značajnu antioksidativnu aktivnost koja je zavisila od koncentracije primenjene gljive, a takođe je utvrđena i snažna korelacija sa sadržajem fenola. Senzorna analiza je pokazala da su karakteristike proizvoda unapređene dodatkom gljive, ali da koncentracija ekstrahovanih komponenata nema uticaj na senzorne karakteristike. Dodatkom ove gljive, boja pića se menja čime se postiže boja

karakteristična za pića koja tokom dugog perioda sazrevaju u drvenim buradima, što je predstavljeno kao inovativni i alternativni proces sazrevanju pića (Pecić et al., 2016).

Liofilizovan prah gljive *Hericium erinaceus*, u različitim koncentracijama, je primenjen za alkoholnu fermentaciju kvascima *S. cerevisiae*. Nakon dobijenog vina, izvršena je i acetatna fermentacija primenom *Acetobacter aceti* bakterija. Maksimalne dostignute koncentracije alkohola bile su između 16,33 i 16,87 %, kada je fermentacija prekinuta. Tokom sirćetne fermentacije nakon 9 dana, dostignuta je koncentracija kiselina od 4,09 %, što je u skladu sa sirćetom od sajdera, pirinča i piva. Utvrđeno je da novo sirće od gljive *H. erinaceus* poseduje antioksidativnu aktivnost koja je slična drugim sirćima (Li et al., 2014).

Mogućnost primene micelijuma gljiva *Pleurotus pulmonaris* i *Volvariella volvaceae* i kvasca *S. cerevisiae* kao starter kulture za razvoj i optimizaciju alternativnog sistema za fermentaciju ispitali su Isham i sar. (2019). S obzirom da je ranije utvrđeno da gljive poseduju alkoholnu dehidrogenazu (ADH), ključnu za fermentaciju glukoze u etanol, micelijumi ovih gljiva su primenjeni u cilju proizvodnje više koncentracije etanola, nego što to može da proizvede sam kvasac *S. cerevisiae*. Gljive tolerišu više koncentracije etanola zbog toga što su složeniji organizmi, pa bi se njihovom primenom moglo sprečiti zaustavljanje fermentacije nakon što se postigne koncentracija alkohola koja inhibira aktivnost kvasaca, od oko 15 %. Najviša koncentracija etanola je postignuta primenom startera *S. cerevisiae* i *P. pulmonaris* u odnosu 1:1. Nakon alkoholne, izvršena je i acetatna fermentacija primenom bakterija sirćetnog vrenja koje se nalaze u sirćetu od jabukovog sajdera i kombuhi, pri čemu su postignute niže koncentracije sirćetne kiseline nego što to propisuje standard pri proizvodnji sirćeta.

Hou i sar. (2008) su ispitali optimalne uslove za ekstrakciju polisaharida iz gljive *Helvella leucopus* (BaChu) i nakon toga optimalne parametre procesne tehnologije za proizvodnju osvežavajućeg soka sa polisaharidima. Uticaj na aromu prvenstveno je pokazao glog, zatim ekstrakt gljive i na kraju sok jabuke.

Yang i sar. (2014) ispitali su mogućnost fermentacije sojinog mleka micelijumom gljive *Grifola frandosa* i utvrdili promene koje nastaju primenom ove gljive. Tokom fermentacije došlo je do povećanja sadržaja slobodnih aminokiselina, polisaharida, tiamina i niacina, kao i daidzeina zbog hidrolize pojedinih glukozida

izoflavona, koji bi mogao da doprinese bioaktivnosti usled bolje apsorpcije. S druge strane, utvrđeno je sniženje sadržaja proteina i oligosaharida usled hidrolize, usled čega se povećava prihvatljivost proizvoda.

## 2.2. Kombuha

Kombuha predstavlja simbiotski sistem bakterija sirćetnog vrenja (BSV) i kvasaca, kod kog se prepliću veoma složeni mehanizmi alkoholne i sirćetne fermentacije. Mikroorganizmi svojom metaboličkom aktivnošću sprečavaju rast kompetitivne mikroflore koja potencijalno može kontaminirati proizvod (Villarreal-Soto et al., 2018). Istovremeno se na površini fermentišuće tečnosti formira celulozna navlaka, odnosno biofilm (Chakravorty et al., 2016), koji sadrži sve glavne metabolite prisutne u tečnosti, usled visoke moći apsorpcije vode (Villarreal-Soto et al., 2018). Proizvod koji nastaje fermentacijom na crnom čaju je veoma prijatnog i osvežavajućeg ukusa, karakteriše ga blaga kiselost, gaziranost i voćna aroma (Chen i Liu, 2000; Chakravorty et al., 2016).

Prvobitno botaničko ime konzorcijuma BSV i kvasaca bilo je *Medusomyces gisevii* na osnovu izgleda plutajuće celulozne navlake na površini fermentišućeg čaja. Naziv kombuha je germanizovani oblik japanskog imena (Jayabalan et al., 2014). Neki od naziva kombuhe koji se sreću širom sveta su čajna gljiva, „teakwass”, Hipao (Chen i Liu, 2000), Ma Gu, kineska gljiva, japanska gljiva, Hongo (Kersteras et al., 2006) i druga (Tabela 2.2).

Smatra se da kombuha potiče iz Mandžurije, severoistočnog regiona Kine, gde je oko 220 g.p.n.e. bila veoma cenjena tokom vladavine dinastije Ćin. Prvo je prenetu u Japan, 414. godine, kada ju je fizičar Kombu koristio za lečenje digestivnih problema imperatora Inkio-a (Jayabalan et al., 2014). Proširivanjem trgovačkih puteva, 1915. godine je primenu našla i u Rusiji, Poljskoj, Baltičkim zemljama, a oko 1925. godine i na Balkanu, u Nemačkoj i zemljama istočne Evrope. U Španiju, Italiju i Francusku stiže oko 1955. godine (Kersteras et al., 2006). Popularnost kombuhe raste nakon što su, 60-ih godina dvadesetog veka, švajcarski naučnici objavili da je korist konzumiranja kombuha napitka slična konzumiranju jogurta (Jayabalan et al., 2014).



Tabela 2.2. Sinonimi za kombuha kulturu i pića (Jarrel et al., 2000)

<b>Jezik</b>	<b>Kultura</b>	<b>Fermentisano piće</b>
<b>holandski</b>	Čajna gljiva	Čajno pivo, Kombuha
<b>engleski</b>	Kombuha, Čajna gljiva, Mandžurijska gljiva	Čajni sajder, Čajno pivo, Kombuha
<b>francuski</b>	Gljiva za dug život, Kombuha	Elikzir za dug život
<b>nemački</b>	„Indischer Teepliz”, „Gichtqualle”	„Kombuchagetrank”, „Teekvass”, „Teemost”
<b>ruski</b>	„Japonski grib”, „Sakvasska”	„Cainii kvass”
<b>japanski</b>	„Reishi”	
<b>litvanski</b>	„Brinum-Ssene”	
<b>španski</b>	„Hongo”	

### 2.2.1. Mikroorganizmi kombuhe

Vrste mikroorganizama koje se sreću u kombuha kulturi zavise od geografskog porekla inokuluma (Teoh et al., 2004; Marsh et al., 2014; Chakravorty et al., 2016), klimatskih karakteristika regiona, pa i od lokalnih vrsta divljih kvasaca i bakterija (Mayser et al., 1995; Teoh et al., 2004; Jayabalan et al., 2014). Najčešći rodovi bakterija su *Acetobacter*, *Komagataeibacter*, *Gluconobacter*. Daleko je veći broj rodova kvasaca koji se sreću tokom fermentacije. Među najzastupljenijim su rodovi *Brettanomyces/Dekkera*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Saccharomycodes*, *Shizosaccharomyces*, *Zygosaccharomyces*, *Kloeckera*, *Candida*, *Torula*, *Torulaspora* (Jankovic i Stojanovic, 1994; Mayser et al., 1995; Teoh et al., 2004; Jayabalan et al., 2014). Kvasci pretežno pripadaju osmotolerantnim, fermentativnim i vrstama koje proizvode kiselinu (Teoh et al., 2004).

Među bakterijama koje ne pripadaju bakterijama sirćetnog vrenja, Chakravorty i sar., (2016) detektovali su i rodove *Bifidobacterium*, *Collinsella*, *Enterobacter*,

*Weissella*, *Lactobacillus*. Rod *Lactobacillus* je detektovan u kombuhama sa različitih geografskih područja. Smatra se da *Lactobacillus* vrste u kombuha simbiozi doprinose rastu bakterija sirćetnog vrenja i sintezi celulozne navlake. Dodatno je utvrđeno prisustvo drugih rodova među kojima su bili i rodovi *Leuconostoc*, *Enterococcus*, *Propionibacterium* i *Bifidobacterium* (Marsh et al., 2014).

### **2.2.1.1. Kvasci u proizvodnji kombuhe**

Fermentaciona industrija se najvećim delom zasniva na primeni vrste *Saccharomyces cerevisiae* jer poseduje visoku efikasnost fermentacije šećera i toleranciju na više koncentracije etanola. Značajan je i doprinos kvasaca aromatskom profilu proizvoda, koji nastaje tokom njihovog sekundarnog metabolizma, produkcijom metabolita koji su značajni za aromu proizvoda, kao što su viši alkoholi, polifenoli, estri i dr. (Dussap i Poughon, 2017). Kvasci koji su nekada karakterisani jedino kao kvasci koji izazivaju kvarenje ili divlji sojevi kvasaca kao što su *Brettanomyces* (*Dekkera*), *Torulaspora* i *Pichia*, primenu sve više nalaze u fermentativnoj industriji hrane (Lavefve et al., 2019). Divlji sojevi kvasaca, kojima se vrši spontana fermentacija, kao i kultivisani sojevi kvasaca u mešanim kulturama, sa ili bez *S. cerevisiae*, koriste se kako bi se izbegao rizik od zaustavljanja fermentacije, kao i za postizanje željenih karakteristika proizvoda koje se odnose na ukus, miris i kompleksniji aromatski profil pića (Dussap i Poughon, 2017; Villarreal-Soto et al., 2018).

Kvasci su jednoćelijski eukariotski mikroorganizmi, koji pripadaju carstvu gljiva (Fungi). Trenutno je opisano oko 1500 vrsta kvasaca, što čini svega 1 % svih opisanih vrsta gljiva. Većina kvasaca se aseksualno razmnožava asimetričnim pupljenjem (Dussap i Poughon, 2017). Rast većine vrsta se odvija pri temperaturi između 15 i 30 °C, u blago kiseloj sredini pri pH između 4 i 6. Po fiziološkim karakteristikama, kvasci su fakultativno anaerobni mikroorganizmi, što znači da će se u aerobnim uslovima javiti oksidativni tip metabolizma, a pri anaerobnim, fermentativni (Walker, 1998).

U biotehnologiji su kvasci najviše korišćena grupa mikroorganizama (prvenstveno *S. cerevisiae*), prevazilazeći upotrebu bilo kog drugog industrijskog mikroorganizma. Ovaj kvasac primenu nalazi u fermentaciji prehrambenih proizvoda i pića, ali i u proizvodnji heterolognih proteina, farmaceutika, hemikalija i dr. (Marques

et al., 2016; Ray i Didier, 2014). *S. cerevisiae* ima sposobnost da šećere kataboliše respiracijom, respirofermentacijom ili fermentacijom. Fenomen da se fermentativni proizvodi pojavljuju i u prisustvu kiseonika, kada je u podlozi prisutna visoka koncentracija ugljenih hidrata ( $> 9$  g/L glukoze) se naziva „Crabtree efekat” (Dai et al., 2018). Ova pojava se dešava usled zasićenja metabolizma i ograničenog kapaciteta respiratornog sistema koji učestvuje u oksidaciji mitohondrijskog NADH (Van den Brink, 2009). U slučaju prelaska sa anaerobnih u aerobne uslove, prisustvo kiseonika dovodi do smanjenja razgradnje i potrošnje ugljenih hidrata, što je prvobitno opisano od strane Pastera, 1861. godine i po njemu je ovaj fenomen nazvan „Pasterov efekat” (Barnett, 1976). *Brettanomyces (Dekkera)* kvasac učestvuje u spontanoj fermentaciji belgijskog piva doprinoseći specifičnoj aromi usled produkcije sirćetne kiseline i njenih estara, u anaerobnim uslovima. Međutim, u drugim tipovima piva je izolovan kao kontaminant. U uslovima za fermentaciju kombuhe je dobro adaptiran i često izolovan tokom fermentacije (Teoh et al., 2004). Kod ovog roda kvasca je utvrđeno da se dešava tzv. „negativan Pasterov efekat”, pojava da se fermentacija D-glukoze i produkcija etanola odvija brže u prisustvu kiseonika, nego u njegovom odsustvu. Takođe je moguća i pojava fermentativnog metabolizma u aerobnim uslovima, kao što je to slučaj sa vrstom *Schizosaccharomyces pombe* (Barnett, 1976).

U metabolizmu disaharida, ekstracelularna hidroliza saharoze do glukoze i fruktoze se odvija periplazminim invertazama. Divlji sojevi kvasaca *S. cerevisiae* preferiraju konzumiranje glukoze i fruktoze u odnosu na druge monosaharide, jer poseduju veliki broj heksoza transportera, s tim što veći afinitet imaju prema glukozi u odnosu na fruktozu (Van den Brink, 2009). S druge strane, *Candida stellata* i *Zygosaccharomyces bailii*, kvasci koji se sreću u kombuhi, preferiraju fruktozu u odnosu na glukozu (Berthels et al., 2004). Oksidacija glukoze se odvija glikolitičkim putem do piruvata, a dodatno se formira ATP. Dalje se piruvat može, respiratornim metabolizmom, oksidisati ulaskom u mitohondrijalni matriks gde se dešava oksidativna dekarboksilacija pomoću kompleksa enzima koji pripadaju piruvat dehidrogenazi, do acetilkoenzima A (acetil-CoA). Potom se oksidacija nastavlja ulaskom u TCA (Krebsov) ciklus do  $\text{CO}_2$  i  $\text{H}_2\text{O}$  (Barnett, 1976). Fermentativni metabolizam dovodi do nastanka etanola pomoću enzima piruvatdekarboksilaze i alkoholne dehidrogenaze. Pri tom, tokom celog respiratornog metabolizma nastaje prosečno 38 mol-ova ATP po molu

šećera heksoze, dok fermentativni proces dovodi do nastanka 2 mol-a ATP. Usled toga, produkcija biomase ovim procesom će biti značajno niža nego u respiratornim uslovima (Rodrigues et al., 2006; Van den Brink, 2009; Zhou et al., 2009).

Fermentaciju kombuhe često započinju osmotolerantni kvasci, povezani sa fermentacijom vina i proizvodnjom šampanjca: *Shizosaccharomyces pombe*, *Torulasporea delbrueckii*, *Z. bailii* i dr., koji imaju sposobnost tolerancije i do 60 % koncentracije glukoze. Porastom sadržaja kiseline u podlozi, broj ćelija neotpornih na niske pH, opada (Teoh et al., 2004). Mayser i sar., (1995) su putem mikrobioloških i bioloških testova analizirali 32 kombuha uzorka poreklom iz domaćinstava sa teritorije Nemačke. Dominantnim kvascima su se pokazali rodovi: *Brettanomyces* koji je izolovan u 56 % uzoraka, zatim *Zygosaccharomyces* u 29 % i *Saccharomyces* u 26 %. U devet uzoraka postojala je samo jedna vrsta kvasca, dok je u preostalih 23 uzoraka izolovano po dve ili više vrsta. Marsh i sar. (2014) su analizirali biodiverzitet kvasaca, molekularnim metodama, u navlaci i tečnosti tokom trećeg i desetog dana fermentacije. Analizirana su dva uzorka kombuhe poreklom iz Kanade, i jedna iz Irske, kada je najviše detektovano kvasaca bilo iz razdela Ascomycota. Rod *Zygosaccharomyces* je dominantan bio u kombuha tečnostima, a utvrđeno je i prisustvo roda *Dekkera*. U celuloznim navlakama je pored ova dva roda utvrđeno prisustvo i roda *Pichia*. Autori navode i da su prvi put detektovali sledeće vrste: *Lachancea fermentati*, *Kluyveromyces marxianus*, *Naumovozyma castelli*, i *Leucosporidiella fragaria* iz razdela Basidiomycota. Chakravorty i sar., (2016) su primenom molekularnih metoda utvrdili da je tokom dvadeset jednog dana fermentacije, na podlozi pripremljenoj od crnog čaja, biodiverzitet kvasaca u kombuha napitku, poreklom iz Indije, bio najveći u tečnosti sedmog dana fermentacije. Tokom celog procesa biodiverzitet je bio veći u tečnosti u odnosu na celuloznu navlaku. Dominantni mikroorganizmi pripadali su razdelu Ascomycota (>98 %), porodici Saccharomycetaceae. Najdominantnije vrste bile su *Candida stellimalicola* u navlaci i *Lachancea fermentati* u tečnosti. Tokom fermentacije su detektovane i vrste iz roda *Kluyveromyces*, *Waitea*, *Saccharomyces*, *Debaryomyces*, *Pichia*, *Saccharomycopsis*, *Hanseniaspora*, *Eremothecium*, *Starmera*, *Kazachstania*, *Meyerozyma*, *Merimbla*, *Sporopachydermia*, *Zygowilliopsis*, *Sugiyamaella*. U devet kombuha kultura sa Tajvana dominantnima su se pokazale vrste *Pichia membranefaciens* i *Schizosaccharomyces pombe* (Chen and Liu, 2000). Liu i sar. (1996)

su u čajnoj gljivi („Hipao”) sa Tajvana identifikovali kvasace: *S. cerevisiae*, *Z. bailii* i *Brettanomyces bruxelensis*.

Na teritoriji Australije, Teoh i sar. (2004) su identifikovali šest dominantnih vrsta kvasaca. *Z. bailii* je bio prisutan u tri od četiri kombuha uzorka, dok su se u dva našli *S. pombe*, *T. delbrueckii* i *Rhodotorula mucilaginosa*. *C. stelata* i *B. bruxellensis* identifikovani su u po jednom uzorku. Pri tom, u svakom od uzoraka kombuhe je detektovano dve, tri ili četiri vrste kvasaca koji su fermentaciju obavljali u simbiozi. Analizom kvasaca u celuloznoj navlaci i u fermentišućoj tečnosti, utvrđen je jedinstven sastav mikroorganizama, ali se razlikovala dinamika rasta. Opadanje broja ćelija kvasaca detektovana je sa padom pH vrednosti podloge i usled iscrpljivanja hranljivih materija. Međutim, celulozna navlaka je pokazala zaštitni efekat, pa usled enkapsulacije kvasaca i bakterija sirćetnog vrenja, broj ćelija je ostao konstantan. Zaštitni efekat od germicidnog UV delovanja, celulozna navlaka (mineralizovana dodatkom antrozita u podlogu za fermentaciju kombuhe) je pokazala u istraživanju Podolich i sar. (2019). Ispitivano je preživljavanje mikroorganizama kombuhe u celuloznoj navlaci nakon izlaganja simuliranim uslovima unutrašnje atmosfere Marsa (95,55 % CO<sub>2</sub>, 2,70 % N<sub>2</sub>, 1,60 % Ar, 0,15 % O<sub>2</sub>, 370 ppm H<sub>2</sub>O, pritisak 980 Pa, >200nm UV-C). Pre testiranja u navlaci su bile prisutne sledeće vrste kvasaca: *Pichia* sp., *Bretanomyces/Dekkera anomala*, *Z. bailii* i bakterijske vrste *Komagataeibacter saccharivorans*, *Komagataeibacter intermedius*, *Gluconobacter oxydans*. Utvrđeno je da su u mineralizovanoj celuloznoj navlaci, ovakve uslove preživeli mikroorganizmi *Z. bailii*, *P. mansurica* i *K. intermedius*.

### **2.2.1.2. Bakterije sirćetnog vrenja izolovane iz kombuhe**

Ćelije bakterija sirćetnog vrenja (BSV) su Gram-negativne ili Gram-varijabilne, pojavljuju se pojedinačno, u parovima ili lancima. Dužina varira od 0,8 do 4,5 μm, a širina od 0,4 do 1,0 μm (Sengun i Karabiyikli, 2011). Oblik može biti elipsoidan, štapićast sa ili bez zaobljenja na krajevima. Mogu biti nepokretne ili se kretati pomoću polarne ili peritrihalno raspoređenih flagela (Vidra i Németh, 2018). Obligatni su aerobi, što znači da poseduju respiratorni metabolizam gde je kiseonik krajnji receptor

elektrona (Kersters et al., 2006). Imaju sposobnost oksidacije šećera, šećernih alkohola i alkohola (Komagata et al., 2014). Pripadaju mezofilnim mikroorganizmima sa optimalnom temperaturom za rast od 25-30 °C (Ndoye et al., 2006). Optimalan pH za rast je između 5 i 6,5 uz mogućnost rasta i pri pH između 3 i 4 (Sengun i Karabiyikli, 2011). Poseduju katalazu ali ne i oksidazu. Pojedine vrste imaju sposobnost fiksiranja azota iz vazduha. Do sada su identifikovane sledeće vrste sa ovom sposobnošću: *Gluconacetobacter azotocaptans*, *Ga. diazotrophicus*, *Ga. johanna*, *A. peroxydans*, *A. nitrogenifigens*, *Saccharibacter salitolerans* (Sengun i Karabiyikli, 2011).

Taksonomska klasifikacija BSV je od početka do danas, značajno promenjena i još uvek nije konačna usled razvoja novih metodologija, ograničenog poznavanja tehnika izolacije, identifikacije i čuvanja sojeva (Mounir et al., 2016; Sengun i Karabiyikli, 2011). Prvu klasifikaciju BSV je izvršio Hansen 1894. godine. Klasifikacija na rodove *Acetobacter* i *Gluconobacter* je predložena od strane Asai, između 1934. i 1935. godine. Tada je potvrđeno da jedna grupa bakterija poseduje peritrihijalno rasporedene flagele i da intenzivnije oksidiše etanol u odnosu na D-glukozu, dok je druga grupa posedovala polarnu flagelu i pokazivala snažniju oksidišuću moć prema D-glukozi u odnosu na etanol. Prva grupa je nazvana *Acetobacter*, a druga *Gluconobacter* (Komagata et al., 2014). Nakon genetske analize rodova *Acetobacter* i *Gluconobacter*, 1980. godine, primenom DNK-rRNK hibridizacije, formirana je porodica *Acetobacteriaceae*. Rod *Gluconacetobacter* je odvojen od roda *Acetobacter* 1997 - 1998, godine (Komagata et al., 2014; Sengun i Karabiyikli, 2011), nakon analize parcijalne sekvence 16S rDNK i hemotaksonomijske analize ubihinona (Kersters et al., 2006). *Komagataeibacter* rod je na osnovu delimične 16S rRNK, filogenetskih, fenotipskih i ekoloških osobina odvojen 2012. godine od *Gluconacetobacter* roda (Yamada et al., 2012). Porodica *Acetobacteriaceae* pripada redu Rhodospirillales, klasi Alphaproteobacteria. Trenutno je podeljena u 32 roda, među kojima 16 rodova pripada acidofilnoj grupi, a 16 acidogenoj, među kojima su i BSV (Komagata et al., 2014): *Acetobacter*, *Gluconobacter*, *Gluconacetobacter*, *Acidomonas*, *Asaia*, *Kozakia*, *Saccharibacter*, *Swaminathania* (Dutta i Gachhui, 2006), *Neoasaia*, *Granulibacter*, *Tanticharoenia*, *Ameyamaea* (Mounir et al., 2016; Sengun i Karabiyikli, 2011), *Komagataeibacter* (Yamada et al., 2012), *Nguyenibacter* (Vu et al., 2013), *Neokomagataea*, *Endobacter* (Komagata et al., 2014). Rodovi *Acetobacter*,

*Gluconobacter* i *Komagataeibacter* učestvuju u dobijanju kombuha proizvoda (Villarreal-Soto et al., 2018). Osnovne karakteristike za razlikovanje rodova *Acetobacter*, *Gluconobacter* i *Komagataeibacter* prikazane su u Tabeli 2.3.

Ćelije roda *Gluconobacter* su elipsoidne ili štapićaste, javljaju se pojedinačno ili u paru. Ukoliko su pokretne poseduju polarnu flagelu. Aerobne su, katalaza pozitivne i oksidaza negativne (Komagata et al., 2014). Vršer oksidaciju etanola do sirćetne kiseline, ali nemaju sposobnost potpune oksidacije sirćetne kiseline do CO<sub>2</sub> i H<sub>2</sub>O (Sengun i Karabiyikli, 2011). Većina vrsta raste pri koncentraciji glukoze od 30 %, rast se može javiti i pri pH 3,0. Optimalna temperatura za rast je 30 °C, ali ne rastu pri 37 °C (Komagata et al., 2014). Rod *Gluconobacter* je industrijski značajan jer iz D-sorbitola produkuje L-sorbozu, koja je intermedijer u proizvodnji L-askorbinske kiseline. Iz D-glukoze produkuje glukonsku kiselinu, 5-keto-D-glukonat i 2-keto-D-glukonat, dok dihidroksiaceton proizvodi iz glicerola (Mounir et al., 2016). Trenutno ovaj rod sadrži 13 vrsta: *G. oxydans*, *G. albidus*, *G. cerinus*, *G. frateurii*, *G. japonicus*, *G. kanchanaburiensis*, *G. kondonii*, *G. nephelii*, *G. roseus*, *G. sphaericus*, *G. thailandicus*, *G. uchimurae*, *G. wancherniae* (Komagata et al., 2014).

Pokretne *Acetobacter* vrste poseduju peritrihalno postavljene flagele, osim vrste *A. nitrogenifigens* koja ima polarnu flagelu. Katalaza su pozitivne (osim kod vrste *A. peroxydans*) i oksidaza negativne. Optimalna temperatura za rast im je 30 °C, mogu rasti i na 37 °C, ali ne i na 45 °C. Mogu rasti pri pH između 3,0 i 8,0. Rast nije moguć u sredini sa preko 30 % glukoze, kao ni u prisustvu iznad 10 % etanola (Komagata et al., 2014). Oksidaciju etanola vrše do sirćetne kiseline, koju mogu dalje da oksidišu do CO<sub>2</sub> i H<sub>2</sub>O. U odnosu na rod *Gluconobacter*, produkuju više kiselina usled toga što je alkoholna dehidrogenaza stabilnija u kiseljoj sredini. *Acetobacter* se može hemotaksonomijski razdvojiti od ostalih rodova na osnovu prisustva hinona Q9 koji je glavni respiratorni koenzim, dok ostali rodovi poseduju koenzim Q10 (Sengun i Karabiyikli, 2011). Ovaj rod trenutno sadrži 23 vrste: *A. acetii*, *A. cerevisiae*, *A. cibinongensis*, *A. estunensis*, *A. fabarum*, *A. farinalis*, *A. ghanensis*, *A. indonesiensis*, *A. lovaniensis*, *A. molarum*, *A. nitrogenifigens*, *A. oeni*, *A. okinawensis*, *A. orientalis*, *A. orleanensis*, *A. papayae*, *A. pasteurianus*, *A. peroxydans*, *A. persici*, *A. pomorum*, *A. senegalensis*, *A. syzygii*, *A. tropicalis* (Komagata et al., 2014).

*Komagataeibacter* rod je na osnovu predloga Yamada i sar., (2012) odvojen od *Gluconacetobacter* roda. Predstavljaju gram-negativne, nepokretne (osim vrste *K. xylinus* koja poseduje peritrihalno postavljene flagele), štapićaste bakterije, koje se javljaju pojedinačno, u parovima ili kratkim lancima. Aerobne su, katalaza pozitivne i oksidaza negativne. Rastu pri pH 3,0. Poseduju sposobnost oksidacije etanola do sirćetne kiseline i acetata i laktata do CO<sub>2</sub> i H<sub>2</sub>O. Pojedini sojevi formiraju celuloznu navlaku. Iz glukoze proizvode 2-keto-D-glukonat i/ili 5-keto-D-glukonat, ali ne i 2,5-diketo-D glukonat (Komagata et al., 2014; Yamada et al., 2012). Ovaj rod trenutno sadrži 14 vrsta: *K. xylinus*, *K. hansenii*, *K. europaeus*, *K. oboediens*, *K. swingsii*, *K. rhaeticus*, *K. saccharivorans*, *K. nataicola*, *K. kombuchae*, *K. sucrofermentans*, *K. kakiaceti*, *K. intermedius*, *K. medellinensis*, *K. maltaceti* (Yamada, 2014).

Chakavorty i sar. (2016) su se bavili utvrđivanjem biodiverziteta bakterija u kombuha tečnosti, kao i u navlaci, odnosno celuloznom biofilmu. Sedmog dana fermentacije je, u oba sistema, utvrđen najveći biodiverzitet, s tim što je u tečnosti diverzitet bio veći nego u biofilmu. Bakterije sirćetnog vrenja koje se sreću u kombuhi pripadaju rodovima *Acetobacter*, *Gluconobacter* i *Komagataeibacter*. Ranija istraživanja su pokazala da su dominantni rodovi *Acetobacter* i *Gluconobacter*, međutim, dominacija roda *Komagataeibacter* u istraživanju koje su sproveli Chakarvorty i sar. (2016), je objašnjena reklasifikacijom *Komagataeibacter* roda, 2012. godine, iz roda *Gluconacetobacter*. Takođe, iz *Gluconacetobacter* roda je pored roda *Komagataeibacter*, proizišao i rod *Nguyenibacter* (Yamada et al., 2012; Vu et al., 2013).



Tabela 2.3. Diferencijalne karakteristike rodova *Acetobacter*, *Gluconobacter* i *Komagataeibacter* (Yamada et al., 2012; Sengun i Karabiyikli, 2011; Kersteras et al., 2006)

<b>Karakteristika</b>	<i>Acetobacter</i>	<i>Gluconobacter</i>	<i>Komagataeibacter</i>
<b>Flagelacija</b>	Pe/n	Po/n	n
<b>Produkcija sirćetne kiseline iz etanola</b>	+	+	+
<b>Oksidacija acetata do CO<sub>2</sub> i H<sub>2</sub>O</b>	+	-	+
<b>Oksidacija laktata do CO<sub>2</sub> i H<sub>2</sub>O</b>	+	-	+
<b>Katalaza</b>	+	+	+
<b>Oksidaza</b>	-	-	-
<b>Produkcija celuloze</b>	-	-	+/-
<b>Produkcija braon pigmenta rastvorljivog u vodi</b>	-	+/-	-
<b>Produkcija dihidroksiacetona iz glicerola</b>	+/-	+	+/-
<b>Produkcija 2-keto-D-glukonata</b>	+/-	+	+/-
<b>Produkcija 5-keto-D-glukonata</b>	+/-	+	+/-
<b>Produkcija 2,5-diketo-D-glukonata</b>	-	+/-	-
<b>Rast u prisustvu 0,35 % sirćetne</b>	+	+	+
<b>Produkcija kiseline iz glukoze</b>	+/-	+	+
<b>Produkcija kiseline iz fruktoze</b>	-	+	-
<b>Produkcija kiseline iz D-manitola</b>	+/-	+	-
<b>Tip ubihinona</b>	Q9	Q10	Q10

Pe: peritrihijalna; Po: polarna; n: nepokretne; +: preko 90 % vrsta je pozitivno; -: preko 90 % vrsta je negativno; +/-: neke vrste pozitivno, neke negativno

U kombuhama koje geografski potiču sa različitih geografskih područja: Kanade, Sjedinjenih Američkih Država, Ujedinjenog Kraljevstva i Irske, utvrđeno je da je dominantniji rod *Gluconobacter*, u odnosu na *Acetobacter* (Marhs et al., 2014). Na Tajvanu su u devet uzoraka kombuhe najzastupljenije vrste bile *A. xylinum* i *A. aceti* (Chen i Liu, 2000). U čajnoj gljivi („Hipao”) sa Tajvana, identifikovane su *A. aceti* i *A. pasterianus* (Liu et al. 1996), dok su u drugom istraživanju u devet uzoraka sa Tajvana identifikovane *A. xylinum* (koji je reklasifikovan u *K. xylinum*) i *A. aceti*, takođe (Chen i Liu, 2000).

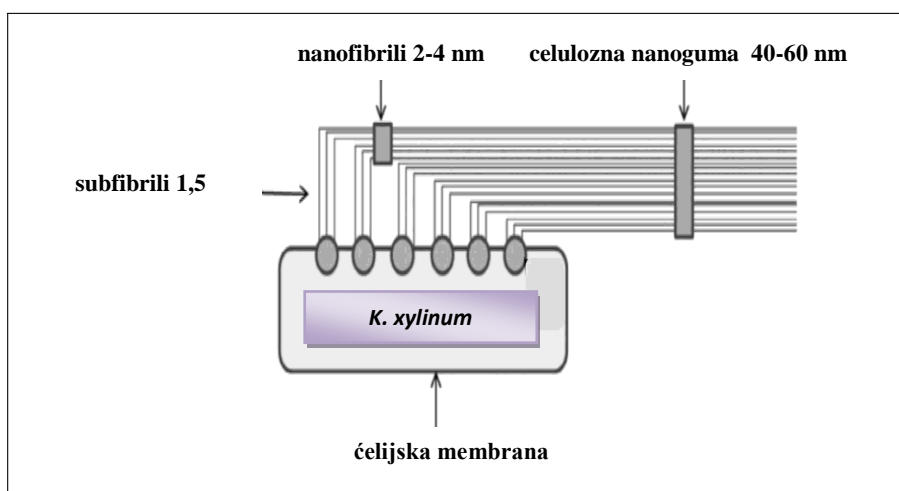
BSV primenu nalaze u proizvodnji sirćeta, u razvoju karakteristične arome kakaoa tokom fermentacije kakao zrna, fermentaciji zrna kafe i proizvodnji kombuhe. Celuloza koju produkuje *Komagataeibacter xylinum* u Jugoistočnoj Aziji se u ishrani koristi kao poslastica „Nata de coco” i „Nata de pina”. Iako je poznato da se sirće proizvodilo još u Vavilonu, 5000 godina pre nove ere, Paster je razjasnio ulogu BSV u njegovoj proizvodnji pre samo 150 godina (Komagata et al., 2014). Primena 5-keto-D-glukonata je u sintezi tartarne kiseline, kao njenog prekursora, dok je 2-keto-D-glukonat prekursor u sintezi izoaskorbinske kiseline. Kada ćelije BSV proizvedu 2,5-diketo-D-glukonat, on se može konvertovati do 2-keto-L-glukonske kiseline koja je preposlednji intermedijer u sintezi L-askorbinske kiseline. Oksidacija glicerola do dihidroksiacetona se odvija pomoću glicerol dehidrogenaze koja je vezana za ćelijsku membranu. Dihidroksiaceton je intermedijer u sintezi mnogih organskih hemikalija i surfaktanata, dok u kozmetici primenu nalazi u kremama za potamnjanje kože (Kersters et al., 2006).

Sa druge strane, štetnost BSV se ogleda u kvarenju voća, suvog voća, sokova i fermentisanih proizvoda. Voće predstavlja vrlo pogodnu sredinu za razvoj BSV usled prisustva značajnih koncentracija šećera. *Acetobacter* i *Gluconobacter* vrste mogu izazvati bakterijsko truljenje voća, pretežno krušaka i jabuka, koje se manifestuje omekšavanjem tkiva i pojavom braon zona. Vrste iz roda *Asaia* su pronađene na cveću (Kersteras et al., 2006). *Gluconobacter* vrste su rezistentne na konzervanse (sorbate, benzoate i dimetilkarbonate), usled čega predstavljaju veliki problem u industriji sokova jer izazivaju kvarenje pri niskim pH (Sengun i Karabiyikli, 2011). U proizvodnji vina, vrste iz roda *Gluconobacter* i *Acetobacter* dospevaju u fermentacione tankeve preko inficiranog grožđa i dovode do stvaranja nepoželjnih isparljivih kiselina u vinu. U

proizvodnji piva, bakterije sirćetnog vrenja, pretežno *K. xylinum*, *A. pasterianus*, *G. oxydans*, izazivaju probleme stvaranjem zamućenja, oksidacije alkohola, nepoželjnih mirisa i promene boje. Problemi se smanjuju primenom adekvatne sanitacije, prohromskih tankova, adekvatnih anaerobnih uslova i izbegavanjem upotrebe drvenih sudova. Probleme mogu praviti i u proizvodnji sajdera od jabuke, ukoliko se koristi sirovina zaražena BSV. Tada *Acetobacter* vrste dovode do pojave neprijatnog mirisa koji potiče od acetaldehida, ili koloidnog belog taloga usled reakcije acetaldehida sa polifenolnim komponentama (Kersteras et al., 2006).

Pojava celulozne navlake na površini podloga za proizvodnju kombuhe je karakteristika koja se javlja tokom kombuha fermentacija i predstavlja sporedni proizvod. Dominantna vrsta koja produkuje celulozu je *Komagataeibacter xylinum*, (ranije klasifikovana kao *Acetobacter xylinum*, a potom i kao *Gluconacetobacter xylinum*) (Villarreal-Soto, 2018). Produkcija celuloze se javlja i kod drugih rodova: *Rhizobium*, *Agrobacterium*, *Aerobacter*, *Achromobacter*, *Azotobacter*, *Salmonella*, *Escherichia* i *Sarcina*, kao dela njihovog normalnog metabolizma (Islam et al., 2017). Ostale vrste roda *Komagataeibacter* koje produkuju celulozu su: *K. hansenii*, *K. swingsii*, *K. rhaeticus*, *K. oboediens*, *K. kombuchae*, *K. nataicola*, *K. sucrofermentas* (Yamada et al., 2012; Campano et al., 2016). Proizvodnja se obavlja u aerobnim uslovima, uz mešanje, pri čemu nastaju peleti ili u statičnim uslovima, kada se formira porozna navlaka, sastavljena od guste mreže dobro organizovanih celuloznih vlakana (Islam et al., 2017). Celulozna navlaka nastaje polimerizacijom ostataka glukoze, formiranjem lanaca  $\beta$ -1,4-glukana i vezana je ekstracelularno za bakterijsku ćeliju. Svaka ćelija sadrži između 50 i 80 pora, prečnika 3,5 nm, kroz koje celuloza izlazi iz membrane. Sastavljanjem ovih celuloznih niti nastaju čvršći fibrili koji, nakon što se poveže oko 1000 glukanskih lanaca, formiraju makrofibrile u 3D strukturi (Slika 2.8). Nastala celuloza se sastoji od dva tipa celuloze. Prva je nalik na gumu, dok je druga amorfan polimer koji je termodinamički stabilniji (Villarreal-Soto, 2018). U strukturi amorfno polimera se nalaze mikro-i nanopore koje mogu zadržati različite nanočestice čime se povećava mogućnost primene nastalih nanostrukture. Uklanjanjem amorfno delu kiselinom hidrolizom, mogu se proizvesti nanokristali koji primenu mogu naći u proizvodnji stabilizatora i učvršćivača za hranu, prehrambene ambalaže, biomedicinskih materijala (veštačka koža, veštački krvni sudovi, veštačke dijafragme), tretiranju rana i

opekotina (Campano et al., 2016). Karakteristike bakterijskog celuloznog polimera su visoka kristalnost, visoka zatezna čvrstoća, elastičnost, nerastvorljivost u većini rastvarača, mogućnost željenog oblikovanja, visok stepen polimerizacije i zadržavanje do 200 puta više vode u odnosu na suhu masu. Za razliku od biljne celuloze, niti bakterijske celuloze su do 100 puta tanje, ne sadrže hemicelulozu, pektin i lignin, što ih čini čistijim izvorom celuloze (Villarreal-Soto, 2018).



Slika 2.8. Građa celuloznih mikrofibrila kod bakterije *K. xylinum* (Villarreal-Soto, 2018)

### 2.2.2. Proces fermentacije kombuhe

Najstariji metod konzervisanja hrane, pored sušenja, je fermentacija. Otkrivena je slučajno i dugo nije bilo poznato šta je izaziva. Fermentacija pića koja su nalik vinu potiče iz perioda Neolita. Međutim, tek krajem osamnaestog veka, naučnici su razjasnili da su mikroorganizmi odgovorni za fermentaciju hrane, nakon što je Luj Paster pokazao da fermentacija nije moguća bez prisustva mikroorganizama (Lavefve et al., 2019). Uloga fermentacije u preradi hrane je višestruka. Fermentacijom se postiže trajnost proizvoda formiranjem inhibitornih metabolita u koje se ubrajaju: organske kiseline, etanol, ugljendioksid, diacetil, bakteriocini i dr., čime se hrana konzervira, stvaranjem nepovoljnih uslova za rast mikroorganizama koji mogu dovesti do kvarenja proizvoda. Dodatno se postiže i bezbednost proizvoda, inhibicijom patogenih mikroorganizama, ali

i kvalitet hrane poboljšanjem nutritivne vrednosti, kao i unapređenje organoleptičkih svojstava (Ray i Didier, 2014; Villarreal-Soto et al., 2018; Lavefve et al., 2019). Istovremeno, štedi se energija neophodna za konzervisanje proizvoda, dok nutritivne komponente, koje nastaju usled biohemijskih promena tokom fermentacije, utiču na bioaktivnost i digestibilnost krajnjeg proizvoda (Villarreal-Soto et al., 2018). Fermentisana hrana sadrži raznovrsne mikrobiote i veliki broj vijabilnih ćelija usled čega postoji potencijal da ovakva hrana ispolji probiotska svojstva, s obzirom da veliki broj ćelija može dospeti do donjeg intestinalnog trakta i kolonizovati ga. Dodatno, usled mikrobiološke aktivnosti, negativne nutritivne karakteristike se mogu izmeniti. Obogaćenje hrane makro- i mikronutrijentima se postiže tokom fermentacije kvascima, i njihovim oslobađanjem iz uginulih ćelija (Lavefve et al., 2019).

Kombuha se tradicionalno proizvodi od crnog čaja i saharoze, ali je veoma česta upotreba i zelenog čaja. Krajnji produkti metabolizma će zavisi od mnoštva faktora: vrste i količine čaja, koncentracije saharoze, temperature i vremena fermentacije, vrsta bakterija i kvasaca prisutnih u starter kulturi. Svaka promena uslova fermentacije utiče i na krajnji proizvod (Neffe-Skocińska et al., 2017; Villarreal-Soto et al., 2018)

Koncentracija čaja koja se primenjuje varira od 1,5 do 12 g/L (Jayabalan et al., 2014; Marsh et al., 2014; Chakravorty et al., 2016), dok se početna koncentracija saharoze kreće od 5 do 10 % (Mayser et al., 1995; Jayabalan et al., 2014). Fermentacija traje najčešće od 7 do 12 dana (Chakravorty et al., 2016), ali i do 14 dana (El-Salam, 2012), dok su produžene fermentacije obavljene između 18 i 60 dana (Jayabalan et al., 2014). Zasejavanje pripremljene podloge sa saharozom se može izvršiti dodatkom 10 - 15 % prethodno fermentisane tečnosti ili male količine formiranog celuloznog biofilma (Chakravorty et al., 2016). Moguće je primeniti temperature širokog spektra za fermentaciju i to od 18 do 28 °C (Jayabalan et al., 2014). Fermentacija se obavlja u aerobnim uslovima, kada se bioreaktori, različitih zapremina, pokrivaju sterilnom gazom ili celuloznim papirom u cilju sprečavanja kontaminacije iz vazduha ili napada sirćetnih mušica (*Drosophila*).

Saharoza je najčešće korišćen izvor ugljenika koji se dodaje pre otpočinjanja kombuha fermentacije. Kvasci će je enzimom invertazom razgraditi do fruktoze i glukoze, koji će na taj način postati dostupni i bakterijama sirćetnog vrenja. Kvasci koriste oba monosaharida i putem glikolize nastaje etanol i ugljen dioksid (El-Salam et

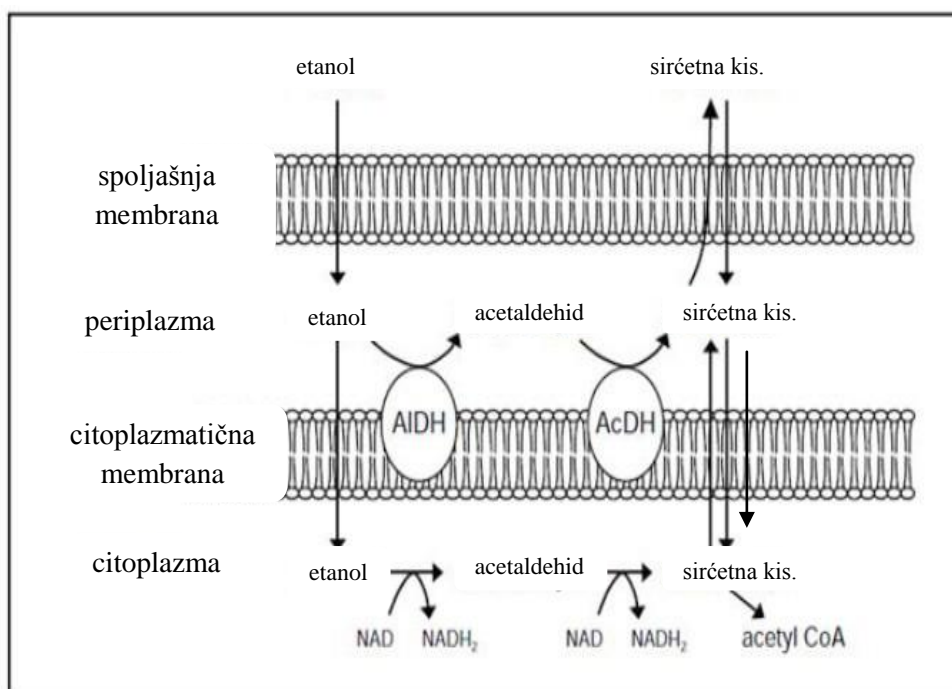
al., 2012; Neffe-Skocińska et al., 2017). Neffe-Skocińska i sar. (2017) su utvrdili da se sadržaj saharoze najbrže smanjivao primenom temperature za fermentaciju od 25 °C, uz istovremeno najvišu produkciju glukoze i fruktoze pri istoj temperaturi. Od vrste mikroorganizama prisutnih u simbiotskoj kulturi kombuhe i njihove metaboličke aktivnosti, zavisiće stepen iskorišćenja glukoze i fruktoze, kao i prioritet njihovog korišćenja (Sievers et al., 1995). *Komagataeibacter xylinum* koristi glukožu za sintezu sirćetne kiseline, glukonske kiseline, kao i celulozne navlake. Sa druge strane, fruktozu slabo metaboliše, dok saharozu ne koristi uopšte. *Acetobacter* vrste mogu oksidisati glukožu i proizvesti glukonat, i hidrolizovati saharozu pomoću levansaharaze, pri čemu nastaje glukoza i levan (Chen i Liu, 2000). U odnosu na *Acetobacter*, rod *Gluconobacter* više koristi glukožu kao izvor energije (Sengun i Karabiyikli, 2011).

Oksidaciju etanola do acetaldehida vrši alkoholna dehidrogenaza (ADH), a potom aldehidna dehidrogenaza (ALDH) oksidiše aldehid do sirćetne kiseline. Ovu sposobnost poseduju svi rodovi BSV izuzev roda *Asaia*. Dehidrogenacija se odvija na površini ćelijskog zida (Slika 2.9) gde su vezani enzimi dehidrogenaze, kao i na citoplazmatičnoj membrani, na strani periplazme, gde se nalazi još jedan set dehidrogenaza (Komagata et al., 2014; Vidra i Németh, 2018). Oksidacijom u periplazminom prostoru, ćelija dolazi do energije, bez ulaska supstanci u citoplazmu, a produkti oksidacije lako izlaze u medijum (Raspor i Goranovič, 2008). ADH može biti dvokomponentna ili trokomponentna. Tokom oksidacije etanola, veće podjedinice (dehidrogenaza i citohrom c) učestvuju u unutarmolekularnom transportu elektrona od ADH do ubihinona i dalje do krajnje oksidaze. Manje podjedinice služe za povezivanje većih podjedinica za membranu. ADH koja je vezana za membranu je NAD(P)<sup>+</sup> nezavisna, dok postoji i NAD(P)<sup>+</sup> zavisna ADH, koja za aktivnost zahteva pH između 6 i 8, i zbog toga ima manji doprinos u oksidaciji etanola (Raspor i Goranovič, 2008).

*Acetobacter* vrste proizvode više kiselina nego vrste iz roda *Gluconobacter* jer poseduju ADH koja je stabilnija pri nižim pH. Dalju oksidaciju sirćetne kiseline, i drugih kiselina, ovaj rod obavlja preko ciklusa trikarbonskih kiselina (TCA), kada u spoljašnjoj sredini nije prisutan etanol. Rod *Gluconobacter* nema ovu sposobnost zbog neaktivnosti enzima  $\alpha$ -ketoglutarat dehidrogenaze i sukcinat dehidrogenaze, što TCA ciklus čini nefunkcionalnim. S druge strane, rod *Gluconobacter* više koristi šećere kao izvor ugljenika, i glukožu će, zavisno od koncentracije, oksidisati do glukonske, 2-keto-

glukonske ili 2,5-diketoglukonske kiseline, delovanjem glukoza dehidrogenaze (Raspor i Goranovič, 2008).

Rezistencija na visoke koncentracije kiselina kod određenih vrsta BSV, još uvek nije razjašnjena. Utvrđeno je da uticaj može imati prisustvo velikih količina fosfatidilholina, glavne komponente u citoplazmatskoj membrani u ćelijama BSV (Kersteras et al., 2006). Takođe je utvrđen i uticaj enzima citrat sintetaze, koji uklanja sirćetnu kiselinu njenim uključivanjem u ciklus trikarbonskih kiselina ili ciklus glioksilata (Francois et al., 2006). Razmatran je i uticaj protonski zavisne efluks pumpe kojom se sirćetna kiselina transportuje van citoplazme. Dodatno, povećana aktivnost enzima akotinaze utiče na povećanu rezistentnost na sirćetnu kiselinu, dok enzim alanin racemaza održava pH citoplazme vrste *A. aceti* u oblasti koja je bliska neutralnoj (Raspor i Goranovič, 2008).



Slika 2.9. Formiranje sirćetne kiseline iz etanola delovanjem bakterija sirćetnog vrenja (Vidra i Németh, 2018)

Dominantne kiseline koje se proizvode tokom fermentacije su sirćetna i glukonska, dok su u mnogo manjim količinama pronađene kininska, oksalna, limunska, jabučna, glukuronska, mlečna, malonska, jantarna, usninska, piruvinska (Neffe-Skocińska et al., 2017). Simbiotska aktivnost BSV i kvasaca je u tome što BSV koriste sintetisani etanol za svoj rast i proizvodnju sirćetne kiseline čije prisustvo stimuliše kvasce dalje da proizvode još etanola (Chen i Liu, 2000). Mlečna kiselina nije karakteristična za kombuha napitak, i verovatno njeno prisustvo zavisi od mikroorganizama prisutnih u starter kulturi. Njeno odsustvo potvrdili su Neffe-Skocińska i sar. (2017), dok je, sa druge strane, detektovana tokom fermentacije kombuhe na podlozi od crnog čaja, ostacima od prerade čaja i najviše u podlozi od zelenog čaja (Jayabalan et al., 2007).

Tokom fermentacije, dolazi do promene boje napitka od tamno braon do svetlo braon, što se dešava usled delovanja enzima, oslobođenih od strane mikroorganizama prisutnih u kombuhi, na kompleksne polifenolne komponente i njihove razgradnje do manjih molekula. Utvrđeno je da je konverzija dela tearubigina do teaflavina uticala na promenu boje napitka tokom fermentacije (Chakravorty et al., 2016).

Ukus i aroma tradicionalnog napitka će zavistiti od njegovog hemijskog sastava, odnosno zaostalih šećera, sintetisanih kiselina (naročito sirćetne i glukonske kiseline), oslobođenog ugljen dioksida i koncentracije etanola (Chen i Liu, 2000). U kombuhi je detektovan širok spektar jedinjenja koja doprinose ukusu i aromi. Među njima dominiraju alkoholi, aldehidi, ketoni, estri i aminokiseline (Teoh et. al, 2004). Različite koncentracije glukonske kiseline utiču na parametre kvaliteta promenom viskoziteta prehrambenih proizvoda i uticajem na aromatski sastav (Mounir et al., 2016). Prisustvo glukonske kiseline doprinosi blagom ukusu, dok sinteza sirćetne kiseline utiče na povećanje oporosti. Kombuha napitak produžetkom fermentacije postiže aromu sirćeta, i ne može se svakodnevno konzumirati (Chen i Liu, 2000).

### **2.2.3. Funkcionalna svojstva kombuha napitka**

Komponente mikrobioloških i hemijskih procesa tokom kombuha fermentacije čine ovaj napitak visoko vrednim i pogodnim za ljudsko zdravlje (Neffe-Skocińska et al., 2017). Različite hemijske komponente koje potiču od lista čaja, kao i one koje



nastaju tokom fermentacije kombuhe, čine ovaj napitak vrlo složenim. U njemu se sreću šećeri, kiseline, polifenoli, etanol, aminokiseline, esencijalni elementi: Cu, Fe, Mn, Ni, Zn, hidrolitički enzimi, antibiotski aktivne materije (Kapp et al., 2019). Vitamini koji se javljaju u kombuhi su vitamini grupe B (B1, B2, B6, B12) i vitamin C (Malbaša et al., 2011).

Nakon što su sprovedene mikrobiološke i biohemijske analize kombuha napitaka od strane FDA (engl. Food and Drug Administration), kombuha je proglašena bezbednom za ljudsku upotrebu (Vīna et al., 2014). U prošlosti su zdravstveni efekti kombuhi pripisivani na osnovu svedočenja ljudi koji je konzumiraju. Usled toga, smatra se da joj ne treba prepisati terapijska, već nutritivna svojstva. Smatra se da kombuha ima uticaj na rad digestivnog trakta, na snižavanje nivoa holesterola u krvi i sprečavanje arteroskleroze, da pomaže kod metaboličkih poremećaja, artritisa, bolesti bubrega, prostate, kod glavobolja, kao i da poseduje detoksikaciona svojstva, da utiče na nervni sistem i usporava proces starenja (Kaufman, 1995; Greenwalt, 2000). Međutim, poslednjih 15 godina, povećan je broj eksperimentalnih ispitivanja ovakvih tvrdnji (Vīna et al., 2014).

Greenwalt i sar. (1998) su detektovali antimikrobnu aktivnost kombuhe pripremljene od različitih koncentracija crnog i zelenog čaja na vrste *Agrobacterium tumefaciens*, *B. cereus*, *Salmonella choleraesuis* serotip Typhimurium, *S. aureus* i *E. coli* i ustanovili su da aktivnost potiče od sintetisane sirćetne kiseline. Takođe su i Battikh i sar. (2012) utvrdili aktivnost kombuhe od crnog i zelenog čaja na sve testirane patogene mikroorganizme: *S. epidermidis*, *S. aureus*, *Micrococcus luteus*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *L. monocytogenes*, kao i na patogene kvasce. Međutim, ispitivanjem je pokazano da aktivnost kombuhe ne potiče jedino od sintetisanih organskih kiselina, već uticaj mogu imati i druge biološki aktivne komponente kao što su bakteriocini, proteini i enzimi, kao i fenolne komponente ekstrahovane iz čaja. I drugi autori su potvrdili da antimikrobna aktivnost kombuhe, na Gram-pozitivne i Gram-negativne bakterijske vrste potiče, pretežno, od sintetisane sirćetne kiseline, ali i od katehina i jedinjenja velike molekulske mase, proteina, usninske kiseline i bakteriocina (Jayabalan et al., 2014; Battikh e al., 2013; Teoh et al., 2004).

Kombuha napici od crnog i zelenog čaja poseduju, takođe, vrlo značajnu antioksidativnu aktivnost. Antioksidansi kombuhe, posebno polifenoli, potiču od lista

čaja. Dodatno, metaboliti mikroorganizama (vitamin C, B<sub>2</sub>, B<sub>6</sub>) mogu sinergetskim efektom doprineti antioksidativnoj aktivnosti. Razlika u antioksidativnoj aktivnosti se javlja i usled razlike u biodiverzitetu starter kultura. Utvrđeno je da je fermentacija kombuhe od crnog čaja, kvascem *S. cerevisiae* ima bolji antioksidativni efekat od kombuhe fermentisane kvascem *Zygosaccharomyces* sp. (Malbaša et al., 2011). Primena kombuhe u ishrani pacova kod kojih je izazvan stres olovo acetatom, dovelo je do smanjenja lipidne peroksidacije i oštećenja DNK i povećanja nivoa redukovano glutaciona, usled čega se smatra da je kombuha potencijalni antioksidans (Dipti et al., 2003). Oksidativni stres, izazvan primenom TBHP-a (trecijarnog butil hidroperoksida), u izolovanim hepatocitima miševa, primenom kombuhe, bio je redukovano i sličan normalnim, netretiranim ćelijama. Zaključeno je da je hepatoprotektivni i detoksikacioni agens u kombuhi D-saharolakton (Bhattacharya et al., 2011).

Polifenoli crnog čaja i njihovi produkti nastali tokom fermentacije, takođe ispoljavaju i antitumorno dejstvo. Mehanizam delovanja polifenola čaja su: inhibicija mutacije gena, inhibicija proliferacije tumorskih ćelija, indukcija apoptoze i sprečavanje metastaze (Jayabalan et al., 2014). Liofilizovana kombuha utiče na preživljavanje ćelija tumora prostate usled snižavanja ekspresije stimulatora angiogeneze: ciklooksigenaze-2, IL-8, endotelijalnog faktora rasta i humanog inducibilnog faktora-1 $\alpha$  (Srihari et al., 2013). Nakon frakcionisanja kombuhe primenom organskih rastvarača: hloroforma, etilacetata i butanola, ekstrakti su ispitani na antikancerogenu aktivnost. Najznajčajniji citotoksični efekat je ispoljio etilacetatni ekstrakt na ćelije 768-O (humani renalni karcinom) i U2OS (humani osteosarkom), kao i značajnu redukciju ćelijske invazije i pokretljivosti ćelija A549 (humani karcinom pluća). Aktivne komponente koje su detektovane i koje su najverovatnije odgovorne za aktivnost su viteksin i dimetil-2-(2-hidroksi-2-metoksipropiliden) malonat (Jayabalan et al., 2011).

Rezultati ranijih istraživanja ukazuju na to da i glukuronska kiselina (GlcUA) pripada ključnim komponentama za funkcionalnost kombuha napitaka. Njen značaj se ogleda u tome što je prekursor biosinteze vitamina C, kao i to što poseduje sposobnost konvertovanja u glukozamin kojim se toksini eliminišu iz organizma (Neffe-Skocińska et al., 2017). Tokom detoksikacije organizma, vezuje toksične ksenobiotike, povećava njihovu rastvorljivost omogućavajući njihovu eliminaciju iz organizma i vrši prevenciju apsorpcije toksina u tkivima, posebno u zagađenim industrijskim područjima (Viña et

al., 2014). U organizmu se sintetiše određena količina GlcUA, međutim, savremen način života je doveo do povećanog unosa ksenobiotika usled čega, sintetisana količina ove kiseline, nije dovoljna za detoksikaciju i njihovu eliminaciju. Napici koji sadrže GlcAU, kakva je i kombuha, mogli bi da doprinesu rešenju problema. GlcUA takođe utiče i na prevenciju razvoja kancera, kao i kardio-vaskularnih i neurodegenerativnih bolesti (Vina et al., 2013). Na prinos GluAC utiču vrsta podloge, parametri fermentacije, kao i mikroorganizmi uključeni u proces fermentacije (Vina et al., 2013; Nguyen et al., 2015).

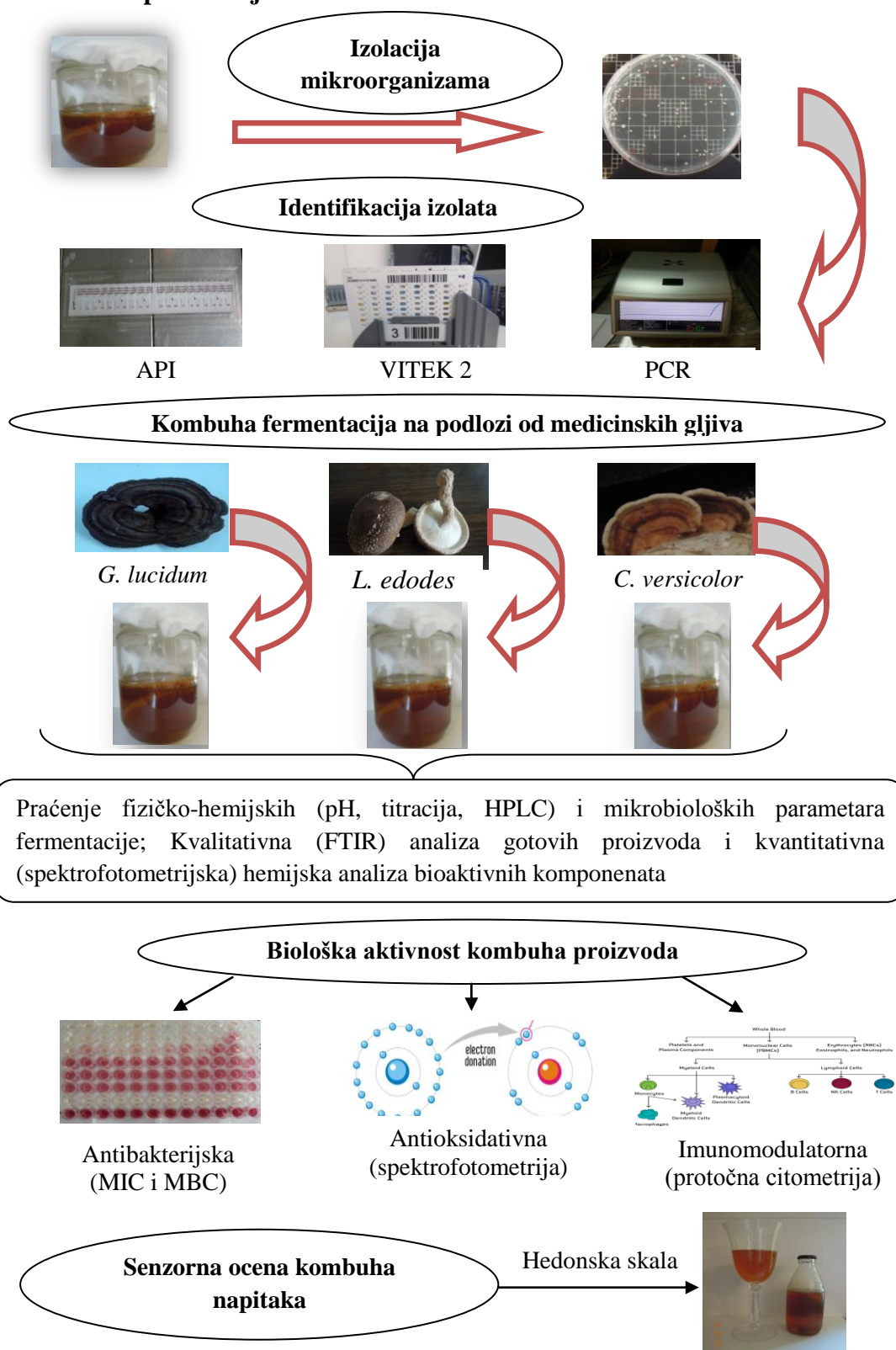
### 3. CILJEVI RADA

Uzimajući u obzir navedeno u prethodnom poglavlju, može se zaključiti da su medicinski značajne gljive bogat izvor bioaktivnih jedinjenja koja ispoljavaju niz pozitivnih dejstava na biološki sistem. Potencijal njihovog korišćenja kao jedinog izvora azota za mikroorganizme prisutne u kombuha kuturi, do sada nije ispitivan. Kako bi se utvrdila mogućnost izvođenja fermentacije na podlozi od medicinskih gljiva i promene koje se dešavaju tokom fermentacije, neophodno je bilo ispratiti dinamiku fermentacije, praćenjem fizičko – hemijskih parametara. Krajnjim proizvodima je bilo potrebno ispitati sadržaj bioaktivnih komponenata, kao i bioaktivna svojstva u cilju potvrđivanja njihove funkcionalnosti, kako bi ovakav proizvod mogao biti deklarisan kao funkcionalni. Za postizanje navedenog, postavljeni su sledeći ciljevi istraživanja:

- Izolacija kvasaca iz matične kombuha kulture i njihova identifikacija biohemijskim API testovima, primenom Vitek 2 sistema i molekularnom metodom
- Izolacija bakterija sirćetnog vrenja iz matične kombuha kulture i njihova identifikacija molekularnom metodom
- Ispitivanje mogućnosti upotrebe gljiva *Ganoderma lucidum*, *Lentinus edodes* i *Coriolus versicolor* u fermentaciji kombuha napitaka, praćenjem promena fizičko – hemijskih parametara tokom fermentacije:
  - broja kvasaca i bakterija sirćetnog vrenja,
  - pH,
  - titrabilne kiselosti,
  - sadržaja saharoze, glukoze i fruktoze, HPLC metodom i
  - etanola, HPLC metodom.
- Kvalitativna hemijska analiza gotovih proizvoda, FTIR analizom.
- Spektrofotometrijska kvantitativna hemijska analiza bioaktivnih komponenata u uzorcima kombuhe određivanjem:
  - ukupnih polisaharida,
  - ukupnih glukana,
  - ukupnih polifenola i

- ukupnih flavonoida.
- *In vitro* utvrđivanje antioksidativne aktivnosti kombuha uzoraka od medicinskih gljiva, metodama:
  - hvatanja slobodnih DPPH radikala,
  - redukcije Fe(III)-jona gvožđa,
  - heliranja jona gvožđa ( $\text{Fe}^{2+}$ ) i
  - inhibicije lipidne peroksidacije.
- *In vitro* ispitivanje antibakterijske aktivnosti uzoraka kombuha od medicinskih gljiva primenom difuzione i mikrodilucione metode.
- *In vitro* ispitivanje citotoksičnosti polisaharadnih ekstrakata izolovanih iz kombuha od medicinskih gljiva i njihov uticaj na imunomodulatornu aktivnost detekcijom citokina, primenom protočne citometrije.
- Analiza senzorne prihvatljivosti kombuha napitaka od medicinskih gljiva.

### 3.1. Šematski prikaz ciljeva rada



## 4. MATERIJAL I METODE

### 4.1. Izolacija bakterija sirćetnog vrenja i kvasaca iz kombuhe

Radna kombuha kultura koja je korišćena u istraživanju potiče iz kolekcije Katedre za Tehnološku mikrobiologiju, Poljoprivrednog fakulteta, Univerziteta u Beogradu. Kultura je periodično održavana fermentacijama na podlozi od crnog čaja, 3 g/L (*Camellia sinensis*, Ceylon Op Nuwara Eliya, Šri Lanka) uz dodatak 70 g/L saharoze (Sunoko, Srbija). Bakterije sirćetnog vrenja (BSV) i kvasci izolovani su iz fermentacione tečnosti kombuhe, nakon 5 dana fermentacije na podlozi od crnog čaja. Za izolaciju BSV, tečni deo kombuhe je homogenizovan, 1 mL odgovarajućeg razređenja kombuha napitka je prenesen u Petri šolju i potom je izliven sterilni YPM agar sledećeg sastava: kvašćev ekstrakt 5 g/L, pepton 3 g/L, manitol 25 g/L, agar 12 g/L. Pre izlivanja u agar su dodati cikloheksimid (10 mg/mL, Applichem GmbH, Nemačka, rastvoren u 50 % etanolu) i penicilin (20 mg/L, Bioanalyse, Turska, pripremljen kao 0,25 % rastvor) u cilju sprečavanja rasta kvasaca i bakterija mlečne kiseline (Amoa-Awua et al., 2006). Inkubacija je izvršena na 30 °C tokom 5 dana. Izolacija kvasaca iz fermentacione tečnosti je izvedena kao i kod BSV, s tim što je nakon dodatka uzorka u Petri šolju izliven Sladni agar (Biolife, Italija) u koji je dodat hloramfenikol (100 mg/L, Bioanalys, Turska) (Cvetković, 2008). Inkubacija je izvršena na 30 °C tokom 72 h. Potom su morfološki različite kolonije presejavane na YPM ili Sladni agar dok nisu dobijene čiste kulture bakterija, odnosno kvasaca. Čistoća bakterijskih kultura je potvrđena mikroskopiranjem (Olympus, Tokio, Japan), nakon bojenja po Gramu, dok je čistoća kultura kvasaca proverena nakon pripreme fiksiranog preparata koji je obojen fuksinom. Sojevi su čuvani u kolekciji kultura Katedre za tehnološku mikrobiologiju, Poljoprivrednog fakulteta u Beogradu, na -80 °C, u YPM bujonu (BSV) ili Sladnom bujonu (kvasci) uz dodatak glicerola, 20 % v/v.

## **4.2. Identifikacija izolata**

### **4.2.1. Biohemijska identifikacija izolata kvasaca API testovima**

API sistem AUX 20 C (bioMèrieux, Francuska) je korišćen za identifikaciju izolata kvasaca na osnovu biohemijskih karakteristika. Prema uputstvu proizvođača, svaki izolat kvasca je zasejan na Sabouraud dekstrozni agar (Torlak, Srbija) i nakon 20 h inkubacije na 30 °C je kultura prenetu u fiziološki rastvor (0,85 % NaCl) i suspenzija je homogenizovana na vorteksu. Pripremljena suspenzija je unesena sterilnom pipetom u bunariće testa. Inkubacija je obavljena tokom 24-72 h pri temperaturi od 30 °C. Pozitivne reakcije su one kod kojih se primećuje zamućenje. Rezultati su analizirani korišćenjem softvera APIWeb, Version-1.1.0.

### **4.2.2. Biohemijska identifikacija kvasaca primenom Vitek 2 sistema**

Vitek 2 – compact sistem (bioMèrieux, Francuska) podrazumeva identifikaciju kvasaca primenom identifikacionih kartica (YST) u kojima postoji 46 biohemijskih testova kojima se određuje korišćenje izvora ugljenika, azota i enzimska aktivnost. Identifikacija je izvršena na osnovu uputstva proizvođača. Čiste kulture kvasaca su zasejane na Sabouraud dekstrozni agar (Torlak, Srbija) i inkubirane 20 h na 30 °C, nakon čega su prenete u 0,45 % rastvor NaCl. Nakon homogenizovanja, na Vitek 2 Densichek-u je podešena gustina ćelija koja je bila između 1,80 i 2,20 ekvivalenata McFarland broja. YST kartice su postavljene u kasetu Vitek 2 uređaja, cevčice su uronjene u epruvete sa uzorcima i kasete su unete u uređaj. Nakon 18-20 h rezultati su automatski očitani.

### **4.2.3. Formiranje pseudohifa/hifa na morfološkom (krompirovom) agaru**

Usled loše diskriminacije dve vrste kvasaca nakon biohemijske identifikacije Vitek 2 sistemom, radi utvrđivanja kojoj vrsti izolati pripadaju, bilo je neophodno utvrditi da li formiraju pseudohife ili hife. Takođe, formiranje pseudohifa ili hifa je



neophodno utvrditi i tokom identifikacije API 20 C AUX testom. U tu svrhu je pripremljen krompirov agar tako što je usitnjen krompir pomešan sa 300 mL vodovodske vode i ostavljen 3 h na 4 °C. Nakon filtriranja, filtrat je kuvan 1h na 120 °C. Podloga je pripremljena mešanjem 230 mL krompirovog filtrata, 770 mL vodovodske vode, 20 g glukoze i 20 g agara i sterilizacija je obavljena na 120 °C, 15 minuta. Krompirov agar je izliven u sterilnu Petri šolju sa mikroskopskom pločicom. Kada se agar stegao, pločica sa agarom je prenetu u drugu Petri šolju, koja je prethodno sterilisana zajedno sa staklenim štapićem u obliku slova „U”. Pločica sa agarom je postavljena na stakleni štapić i izolati kvasaca su zasejani sterilnom ezom. Inkubacija je izvršena na 30 °C, tokom 5 dana, nakon čega je izvršeno mikroskopiranje kako bi se utvrdilo postojanje pseudohifa, odnosno hifa (Mihajlović, 1983).

#### **4.2.4. Test korišćenja D–ksiloze kao jedinog izvora ugljenika**

Kako je Vitek 2 sistemom utvrđena loša diskriminacija kod dva izolata kvasaca, bilo je neophodno utvrditi da li ovi izolati koriste D-ksilozu kao jedini izvor ugljenika. Pripremljen je YNB (engl. Yeast Nitrogen Base) sa  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  u koji je dodato 5 g ksiloze. Nakon sterilizacije, agar je razliven u sterilne Petri šolje i izolati od značaja su zasejani po površini agara. Inkubacija je izvršena na 30 °C, 48–72 h, nakon čega je posmatrano da li je došlo do rasta kvasaca na podlozi (Wang i Schneider, 1980).

#### **4.2.5. Izolacija ukupne DNK iz kvasaca**

Ekstrakciji DNK iz kvasaca izvršena je prema metodi koju su naveli Amberg i sar. (2005), sa malim modifikacijama. Nakon gajenja ćelija u Sladnom bujonu u inkubator šejkeru (SI 600R, Jeio Tech, Koreja) pri 150 obrtaja na 30 °C tokom 24 h, bujon sa kulturama je centrifugiran (Eppendorf 5804R Nemačka) pri 4500 obrtaja tokom 10 min. Talog je resuspendovan u 200  $\mu\text{L}$  pufera za razbijanje ćeliskog zida (2 % Triton X-100, 1 % natrijum dodecil sulfat (SDS), 100mM NaCl, 10 mM Tris pH 8,0, 1mM EDTA pH 8,0). Potom je dodato 10-12 staklenih kuglica (200  $\mu\text{L}$ ) i 200  $\mu\text{L}$  fenol-hloroforma. Nakon intenzivnog homogenizovanja tokom 5 minuta, dodato je 200  $\mu\text{L}$  TE

pufera (10 mM Tris pH 8,0 i 1 mM EDTA pH 8,0). Potom je izvršeno centrifugiranje pri 13000 obrtaja tokom 5 minuta i u 400  $\mu$ L supernatanta je dodato 400  $\mu$ L fenol-hloroforma. Ponovo je izvršeno centrifugiranje (13000 obrtaja, 5 minuta) i izdvojenoj tečnoj fazi je dodata 1/10 volumena natrijum-acetata i 1 volumen izopropanola. Nakon laganog mešanja istaložen je ukupan DNK centrifugiranjem 5 minuta na 13000 obrtaja. Talog je ispran sa 70 % etanolom (800  $\mu$ L), centrifugiran pri 13000 obrtaja (5 minuta), osušen na 37 °C i resuspendovan rastvorom RNK-ze (40  $\mu$ L, 10 mg/mL). Pri završenoj inkubaciji na 37 °C tokom 30 minuta, izolovana DNK je skladištena na -20 °C.

#### **4.2.6. Izolacija ukupne DNK iz bakterija sirćetnog vrenja**

Čiste kulture bakterija sa YPM agara su zasejane u YPM bujon. Gajenje je izvršeno na inkubator šejkeru (SI 600R, Jeio Tech, Koreja) uz 180 obrtaja na 30 °C, do postizanja logaritamske faze rasta koja je utvrđena spektrofotometrijski kada je na talasnoj dužini od 600 nm postignuta apsorbanca od 0,6 - 0,8. Centrifugirano je 10 mL bujona sa bakterijskim ćelijama (Eppendorf 5804R, Nemačka) pri 4500 obrtaja tokom 10 minuta. Dobijeni talog ćelija je resuspendovan u 500  $\mu$ L TEN pufera (50 mM Tris-HCl pH8; 10 mM EDTA pH8; 50 mM NaCl) i centrifugiran pri 13000 obrtaja, 1 minut (5415, Eppendorf, Nemačka). Nakon odlivanja supernatanta, dodato je 250  $\mu$ L 2 % natrijum dodecil-sulfata (SDS) i izvršeno je intenzivno homogenizovanje 1-2 minuta. Fenol-hloroform je potom dodat u zapremini od 250  $\mu$ L i nakon homogenizovanja tokom jednog minuta, izvršeno je centrifugiranje 5 minuta na 13000 obrtaja. Korak fenolne ekstrakcije je neophodno ponoviti sve dok se ne dobije potpuno bistar supernatant, bez nečistoća. Potom je supernatantu dodata 1/10 volumena 3M natrijum-acetata (pH 4,8) i 1 volumen izopropanola, smeša je lagano promešana i taloženje ukupne DNK je obavljeno centrifugiranjem 5 minuta pri 13000 obrtaja. Ispiranje taloga je izvršeno sa 800  $\mu$ L, 70 % etanola. Nakon centrifugiranja pri 13000 obrtaja (5 minuta), talog je osušen na 37 °C i resuspendovan rastvorom ribonukleaze (40  $\mu$ L, 10 mg/mL). Pri završenoj inkubaciji na 37 °C tokom 30 minuta, izolovana DNK je skladištena na -20 °C (Mirković, 2016).

#### 4.2.7. Lančana reakcija polimeraze (PCR) - umnožavanje DNK fragmenata

Identifikacija izolata kvasaca i bakterija sirćetnog vrenja izvršena je primenom molekularne metode – PCR (engl. Polimerase Chain Reaction), nakon sekvenciranja PCR produkata i analize sekvenci.

Kod izolata kvasaca, za umnožavanje varijabilnog regiona D1/D2 gena za 26S rRNK, korišćeni su univerzalni prajmeri za taj region: NL1 (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3' i NL4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG) (Kurtzman i Robnett, 1997). Reakciona smeša je pripremljena od reakcionog pufera (1x) sa 1,5 mL MgCl<sub>2</sub> (Kapa Biosystems Inc., Boston, USA), smeše dNTP (svaki po 0,2 mM), prajmera (svaki po 2,5 μM), enzima DNK polimeraza, 1U (Kapa Biosystems Inc., Boston, USA) i DNK prethodno izolovanog iz bakterije u količini 0,1-1 μg. Dopunjavanje do radne zapremine od 50 μL vršeno je vodom bez RNK-ze (Molecular Biology Grade Water, Eppendorf). PCR reakcija je izvedena prema sledećem programu: inicijalna denaturacija je trajala 2 minuta na 94°C, potom je izvedeno 30 ciklusa umnožavanja DNK fragmenata: denaturacija 30 s pri 94 °C, hibridizacija 30 s pri 52 °C, elongacije prajmera 60 s pri 72 °C i finalna elongacija od 7 minuta pri 72 °C (Marshall et al., 2003).

Umnožavanje kod BSV izolata varijabilnog regiona gena za 16S rRNK izvršeno je primenom specifičnih 16S prajmera P1 16S Fw (5'-GAGAGTTTGATCCTGGC-3') i P2 16S Rev (5'-AGGAGGTGATCCAGCCG-3') (Jovčić et al., 2009). Smeša za PCR reakciju je pripremljena na isti način kao što je opisano kod kvasaca, osim što je umesto DNK iz kvasaca, korišćen DNK izolovan iz BSV. Kao negativna kontrola poslužila je reakciona smeša sa vodom umesto uzorka DNK. Reakcije su izvedene u PCR uređaju (Kyrattec, Australia) prema sledećem programu: primarna denaturacija u trajanju od 10 minuta na 94 °C, a potom 35 ciklusa umnožavanja DNK fragmenata: denaturacija 30 s na 94 °C; hibridizacija (annealing) 30 s pri 55 °C i polimerizacija lanca 60 s na 72 °C. (Mirković, 2016).

#### **4.2.8. Vizuelizacija PCR produkata bakterija i kvasaca horizontalnom elektroforezom**

U cilju očitavanja rezultata PCR reakcije, PCR produkti su u količini od 5 µL uneseni u 1 % agarozni gel koji je pripremljen rastvaranjem agaroze u 1x TAE pufer (40 mM Tris-acetat, 1 mM EDTA) uz dodatak boje Midori Green (Nippon Genetics Europe GmbH). TAE pufer (1x) je poslužio kao pufer za elektroforezu. Tokom izvođenja elektroforeze u aparatu, napon je bio konstantan i iznosio je 1-10 V/cm gela. Veličine PCR produkata su utvrđivane poređenjem sa dužinom pređenog puta DNK fragmenata poznate veličine (DNA Ladder Mix, GeneRuler, Fermentas UAB, Litvanija). Gel je posmatran i fotografisan pomoću UV transiluminatora (Nippon Genetics Europe GmbH).

#### **4.2.9. Sekvenciranje PCR produkata**

Prečišćavanje PCR produkata bakterija i kvasaca izvedeno je primenom kita za prečišćavanje PCR produkata (FastGene Gel/PCR Extraction Kit, Nippon Genetics Europe GmbH). Sekvenciranje uzoraka je urađeno u centru za sekvenciranje Microgen sequencing service u Holandiji. Analiza sekvenci je izvršena u programu BLAST, korišćenjem NCBI baze podataka. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) (Altschul et al., 1997).

### **4.3. Priprema gljiva korišćenih za proizvodnju kombuha napitaka**

Plodonosna tela gljive *Ganoderma lucidum* su komercijalni proizvod proizvođača „Alphay Co” (Nantong, Kina). Plodonosna su pre upotrebe samlevena na mlinu (SpectraAlyzer, Zeutec GmbH, Rendsburg, Nemačka).

Micelijum gljive *C. versicolor* potiče iz kolekcije kultura Katedre za Tehnološku mikrobiologiju, Poljoprivrednog fakulteta, Univerziteta u Beogradu. U sterilnim uslovima, micelijum prečnika 9 mm je prenesen na Sladni agar (Biolife, Italija) koji je pretodno sterilisan. Inkubacija je trajala 7 - 9 dana u mraku, na temperaturi od  $25 \pm 1$

°C. Navlaženim pšeničnim zrnima je dodatkom  $\text{CaCO}_3$  podešen pH na 6,5, i ona su sterilisana u autoklavu (121 °C, 2 h). Prohlađena zrna su inokulisana prethodno proraslim micelijumom na Petri šolji i inkubirana na  $25 \pm 1$  °C do potpunog obrastanja zrna micelijumom.

Supstrat za proizvodnju plodonosnih tela gljive *Coriolus versicolor* je pripremljen od hrastove piljevine (50 %), pšenične slame (30 %), i pšeničnih mekinja (20 %). Nakon vlaženja supstrata vodom do relativne važnosti od 65 %, supstrat je pakovan u polipropilenske džakove (Mycelia, Sac O2, Microsac, Belgija) i sterilisan u autoklavu (121 °C, 2 h). Ohlađen supstrat je pod sterilnim uslovima zasejan sa 10 % inokuluma proizvedenog na zrnima žita. Prorastanje je izvršeno na  $25 \pm 1$  °C, bez prisustva svetla, tokom 20 dana. Za postizanje faze fruktifikacije, džakovi su otvoreni, uspostavljena je ventilacija, temperatura je podešena na  $18 \pm 2$  °C, vlažnost vazduha 85 - 90 %, a osvetljenje na 100 luksa svakih 12 h. (Klaus et al., 2009). Plodonosna tela su se pojavila nakon 45 dana, potom su ubrana, osušena na 40 °C i samlevena.

Micelijum gljive *Lentinus edodes*, soj M 3776, potiče od proizvođača „Mycelia” iz Belgije. Micelijum na Sladnom agaru i na zrnima žita je proizveden na isti način kao što je opisano za gljivu *C. versicolor*. Supstrat za proizvodnju gljive *L. edodes* pripremljen je od 60 % mešavine piljevine od hrasta, bukve i topole (u odnosu 60:20:20), 20 % pšeničnih mekinja, 8 % pšenične slame i 2 % gipsa ( $\text{CaSO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ ). Nakon vlaženja supstrata vodom do relativne važnosti od 60 %, supstrat je pakovan u polipropilenske džakove (Mycelia, Sac O2, Microsac, Belgija) i sterilisan (121 °C, 2 h). Ohlađen supstrat je zasejan inokulumom, prethodno proizvedenim na zrnima žita, u količini od 10 %. Prorastanje supstrata je izvršeno na  $22 \pm 1$  °C, bez prisustva svetla, tokom 15 dana. Faza sazrevanja je trajala 60 dana, pri temperaturi od  $18 \pm 2$  °C, nakon čega su džakovi otvoreni i postavljeni u prostoriju za plodonošenje. Temperatura prostorije je podešena na  $16 \pm 2$  °C, vlažnost vazduha na 85 – 90 %, a osvetljenje je bilo 500 luksa, svakih 12 h. Između talasa, temperatura prostorije je podizana na  $22 \pm 1$  °C, a vlaga održavana na 85 %. Kako bi se ponovo izazvalo formiranje primordija, blokovi su potapani u hladnu vodu, temperature 14 °C tokom 12 h i nakon toga su vraćani u prostoriju za plodonošenje. Plodonosna tela su su ubrana, osušena na 40 °C i samlevena.

#### **4.4. Priprema podloge za fermentaciju i uslovi fermentacije kombuha od medicinskih gljiva**

Vreli vodeni ekstrakti od celih plodonosnih tela gljiva *C. versicolor*, *L. edodes* i *G. lucidum* pripremljeni su na isti način. U 25 g osušene i fino samlevene gljive dodato je 1000 mL destilovane vode i primenjena je temperatura ekstrakcije od 121 °C tokom 45 min, pri pritisku od 1,2 bar. Potom je dodato 70 g/L komercijalne saharoze i nakon njenog rastvaranja izvršena je filtracija kroz sterilnu gazu. U prethodno sterilisane (121 °C, 15 min.) male, staklene bioreaktore za fermentaciju ( $V = 0,72$  L,  $\varnothing = 80$  mm,  $H = 145$  mm), pod sterilnim uslovima je preneto 300 mL filtrata koji je potom ohlađen do sobne temperature. Za potrebe inokulacije, korišćena je tradicionalno proizvedena kombuha od crnog čaja, pripremljena dodatkom 70 g/L saharoze u česmensku vodu zagrejanu do ključanja. Potom je 3 g/L crnog čaja dodato, dekokcija je trajala 15 minuta, nakon čega je čaj profiltriran kroz sterilnu gazu. Inokulacija staklenih bioreaktora je izvršena, u aseptičnim uslovima, fermentativnom tečnošću nakon 5 dana fermentacije u zapremini od 10 %. Bioreaktori su prekriveni sterilnom gazom kako bi bio omogućen dotok kiseonika. Fermentacija je izvršena na  $25 \pm 1$  °C, bez prisustva svetlosti do postizanja željene kiselosti (Velićanski et al, 2014). Na osnovu literaturnih podataka, optimalnom konzumnom kiselošću kombuhe smatra se vrednost između 3,5 i 4,0 g/L (Cvetković, 2008). Utvrđeno je da kiselost komercijalnog proizvoda kombuhe, koji se može naći na tržištu (Macrobiotic Pharma, Srbija), iznosi  $2,7 \pm 0,1$  g/L. Nakon degustacije kombuha napitaka od medicinskih gljiva, za željenu kiselost kombuha u ovoj disertaciji određena je vrednost od 3,0 g/L.

#### **4.5. Fizičko - hemijske i mikrobiološke promene tokom fermentacije kombuha od medicinskih gljiva**

##### **4.5.1. Promena broja kvasaca i bakterija sirćetnog vrenja tokom fermentacije**

Tokom fermentacionog perioda, ukupan broj živih ćelija kvasaca i bakterija sirćetnog vrenja (BSV) je određen osam puta (0., 1., 2., 3., 5., 7., 9. i 11. dan). Uzorkovanje iz bioreaktora je vršeno samo jednom, nakon čega su uklanjani iz komore

za fermentaciju. Na taj način se izbegava opasnost od kontaminacije kao i razlika u zapremini nakon uzorkovanja, što bi dovelo da različitih uslova fermentacije. Broj ćelija kvasaca i BSV je praćen na podlozi koja je primenjena za izolaciju kvasaca, odnosno BSV, pri istim uslovima kao što je navedeno u poglavlju 4.1. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost tri merenja  $\pm$  standardna devijacija i izraženi u log CFU/mL.

#### **4.5.2. Određivanje pH vrednosti i titrabilne kiselosti fermentacione tečnosti**

Tokom perioda fermentacije u trajanju od 11 dana (0., 1., 2., 3., 5., 7., 9. i 11. dan), pH vrednost je merena pomoću električnog pH metra (Basic 20, Crison, Španija) uz kalibraciju na pH 4, pH 7 i pH 9. U istom periodu je određena i titrabilna kiselost korišćenjem 0,1 M NaOH i fenolftaleina kao indikatora. Rezultat je izražen kao g sirćetne kiseline po L uzorka. Sva merenja su izvedena u triplikatima i prikazana kao srednja vrednost  $\pm$  standardna devijacija.

#### **4.5.3. Kvantitativna analiza saharoze, glukoze, fruktoze i etanola HPLC metodom tokom fermentacije**

U cilju utvrđivanja promene sadržaja saharoze, glukoze, fruktoze i etanola u fermentacionoj tečnosti tokom fermentacije, primenjena je tečna hromatografija visokih performansi (HPLC), korišćenjem sistema Dionex Ultimate 3000 (Thermo Scientific, Waltham, USA). Sistem se sastojao od kolone za ugljene hidrate (Hyper REZ XP Carbohydrate Ca<sup>2+</sup>, 300 mm  $\times$  7.7 mm, 8  $\mu$ m) na 80 °C i RI detektorom (RefractoMax 520, ERC, Riemerling, Nemačka). Uzorci su analizirani 0., 1., 2., 3., 7. i 11. dan. Nakon uzorkovanja vršeno je centrifugiranje pri 9000 obrataja (Eppendorf 5840R, Nemačka) tokom 10 minuta i uzorak je unesen u kolonu u zapremini od 10  $\mu$ L. Dejonizovana voda je korišćena kao mobilna faza sa protokom od 0,6 mL/min. Uzorci su analizirani u tri ponavljanja i izraženi kao srednja vrednost  $\pm$  standardna devijacija. Obrada rezultata je izvršena korišćenjem softvera Chromeleon™ 7.2 (Thermo Scientific) (Carević et al., 2016).

## **4.6. Kvalitativna i kvantitativna hemijska analiza gotovih proizvoda kombuha od medicinskih gljiva**

### **4.6.1. Priprema uzoraka za ispitivanje**

U momentu kada je postignuta željena kiselost kombuha napitaka od 3 g/L, proces fermentacije je prekinut. Prvo je uklonjena formirana celulozna navlaka sa površine pa je tečni deo centrifugiran (Eppendorf 5840R, Nemačka) pri 6500 obrtaja u trajanju od 10 minuta i supernatant je skladišten na -20 °C.

Za dobijanje vakuum uparenih uzoraka, supernatant je uparen pod sniženim pritiskom pri temperaturi od 40 °C (R-II rotovapory Buchi, Švajcarska) a potom čuvan pri temperaturi od 4 °C, do daljih analiza.

### **4.6.2. Određivanje suve materije u kombuha uzorcima**

Suva materija u kombuha uzorcima, nakon dostizanja konzumne kiselosti od 3 g/L, utvrđena je gravimetrijskim sušenjem na  $103 \pm 2$  °C do postizanja konstantne mase između dva uzastopna merenja (Gramza-Michałowska et al., 2016).

### **4.6.3. FTIR spektroskopska analiza**

Analiza strukturnih karakteristika vakuum uparenih napitaka i polisaharidnih ekstrakata iz kombuha napitaka je izvršena snimanjem FTIR spektara primenom ATR-FTIR spektrometra IRAffinity (Shimadzu, Japan). Primenjena je rezolucija  $4 \text{ cm}^{-1}$  u spektralnom opsegu  $4000\text{-}600 \text{ cm}^{-1}$  (Duvnjak et al., 2016; Sknepnek et al., 2018).



#### 4.6.4. Određivanje sadržaja ukupnih polisaharida

U cilju kvantifikovanja sadržaja ukupnih polisaharida primenjena je fenol-sumporna metoda prema Dubois i sar. (1956). Uzeto je 200  $\mu\text{L}$  odgovarajućeg razređenja uzorka i dodato 200  $\mu\text{L}$  ultra čiste, milli Q vode (MQ) i 400  $\mu\text{L}$  5 % fenola. Nakon homogenizovanja, pažljivo je dodato 2 mL 96 % sumporne kiseline. Posle 10 minuta, smeša je homogenizovana i potom inkubirana još 30 minuta na sobnoj temperaturi. Vrednosti apsorbance su očitane na spektrofotometru (UV-1800, Shimadzu, Japan) pri talasnoj dužini od 490 nm. Za konstruisanje standardne krive korišćena je D-glukoza (15,6 – 125  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ).

#### 4.6.5. Određivanje sadržaja ukupnih glukana

Sadržaj ukupnih glukana u finalnim, vakuum uparenim napicima, određen je primenom enzimskog kita Mushroom and Yeast  $\beta$ -glukan Assay Procedure K-YBGL (Megazyme Int. Wicklow, Ireland), prema uputstvu proizvođača. Uzorci su hidrolizovani primenom 37 % v/v hlorovodonične kiseline i nakon razblaženja inkubirani 2 h na ključalom vodenom kupatilu. Nakon neutralizacije 2 M kalijum hidroksidom dodat je 200 mM natrijum-acetatni pufer (pH 5,0) i sadržaj je centrifugiran pri 3000 obrtaja, tokom 15 minuta. Supernatantu je dodata mešavina egzo-1,3- $\beta$ -glukanaze i  $\beta$ -glukozidaze kako bi se hidroliza nastavila do glukoze tokom 60 minuta na 40 °C. Nakon dodatka GOPOD-ovog reagensa koji sadrži glukoza oksidazu, peroksidazu i 4-aminoantipirin, smeša je inkubirana još 20 minuta na 40 °C i izmerena je apsorbance pri talasnoj dužini od 510 nm. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost tri merenja  $\pm$  standardna devijacija i izraženi u mg/g suve mase.

#### **4.6.6. Određivanje sadržaja ukupnih fenolnih jedinjenja**

Ukupan sadržaj fenola je određen kod tečnih i vakuum uparenih napitaka primenom Folin-Ciocalteu reagensa (Oh et al., 2013). Pomešano je 2mL natrijum karbonata (2 %) i 100  $\mu$ L uzorka i smeša je inkubirana 2 minuta. Potom je dodato 100  $\mu$ L Folin – Ciocalteu reagensa koji je prethodno razblažen 10 puta. Po izvršenoj inkubaciji u trajanju od 30 minuta, na sobnoj temperaturi, merena je apsorbancija pri talasnoj dužini od 750 nm, na UV/VIS spektrofotometru (UV-1800, Shimadzu, Japan). Kao standard je korišćen rastvor galne kiseline (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, USA) u opsegu koncentracija 0,250 mg/mL – 0,015 mg/mL. Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti  $\pm$  standardna devijacija i izraženi kao ekvivalenti galne kiseline (GAE – gallic acid equivalents), odnosno mg GAE/ml tečnog uzorka ili mg GAE/g suve mase.

#### **4.6.7. Određivanje sadržaja ukupnih flavonoida**

Ukupni flavonoidi su određeni primenom kolorimetrijske metode koju su opisali Oh i saradnici (Oh et al., 2013). Uzorak u količini od 250  $\mu$ L je pomešan sa 1,25 mL destilovane vode i 75  $\mu$ L natrijum – nitrita. Nakon 6 minuta je dodato 150  $\mu$ L 10 % rastvora aluminijum – hlorida i izvršena je inkubacija tokom 5 minuta. Nakon dodatka 500  $\mu$ L natrijum – hidroksida (1 M) i 275  $\mu$ L destilovane vode, apsorbancija je merena na 510 nm korišćenjem UV/VIS spektrofotometra (UV-1800, Shimadzu, Japan). Rezultati za ukupan sadržaj flavonoida su prikazani kao srednje vrednosti  $\pm$  standardna devijacija i izraženi izražen u ekvivalentima (+) – katehina (CE), odnosno mg CE/ml tečnog uzorka ili mg CE/g suve mase.

## 4.7. Biološka svojstva kombuha napitaka od medicinskih gljiva

### 4.7.1. Antioksidativna aktivnost

Antioksidativna aktivnost tečnih i vakuum uparenih uzoraka je određena testovima *in vitro*. Ispitana je sposobnost hvatanja slobodnih 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) radikala, sposobnost redukcije Fe(III)-jona gvožđa, sposobnost heliranja jona gvožđa ( $\text{Fe}^{2+}$ ) i sposobnost inhibicije lipidne peroksidacije (konjugen dienska metoda).

#### 4.7.1.1. Sposobnost hvatanja slobodnih 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) radikala

Sposobnost hvatanja DPPH radikala određen je za tečne kombuha napitke, kao i za vakuum uparene proizvode (koncentracije 0,1 - 60 mg/mL). U 100  $\mu\text{L}$  ispitivanog uzorka kombuhe dodat je 1 mL sveže pripremljenog 0,1 mM rastvora DPPH (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, SAD) u etanolu i 450  $\mu\text{L}$  Tris HCl pufera (50 mM, pH 7.4). Nakon mešanja ovog rastvora, inkubacija je izvršena u mraku, 30 minuta na 20 °C. Apsorbanca je merena na 517 nm korišćenjem UV/VIS spektrofotometra (UV-1800, Shimadzu, Japan). Kontrola je bio rastvor sa svim komponentama bez ispitivanog uzorka. Formula za izračunavanje sposobnosti hvatanja slobodnih DPPH radikala je sledeća:

$$\text{Sposobnost hvatanja slobodnih radikala (\%)} = [(A_k - A_{uz}) / A_k] \times 100$$

$A_k$  – apsorbanca kontrolnog uzorka;  $A_{uz}$  – apsorbanca uzorka kombuhe

U cilju poređenja dobijenih rezultata, korišćena je askorbinska kiselina i butilhidroksitoluen, BHT (Jayabalan et al, 2008a).

#### 4.7.1.2. Redukciona sposobnost

Sposobnost redukcije jona gvožđa je određena za vakuum uparene proizvode (za koncentracije 0,1 – 60 mg/mL), kao i za tečne uzorke kombuha napitaka, prema metodi koju su koristili Oh i sar., (2013). Uzorak zapremine 250 µL (destilovana voda za kontrolu ) je pomešana sa 250 µL natrijum fosfanog pufera (200mM, pH 6.6) i 250 µL kalijum fericijanida (1 %). Inkubacija je potom izvršena na 50 °C tokom 20 minuta. Reakcija je zaustavljena dodatkom trihlorsirćetne kiseline (10 %). Rastvor je centrifugiran (Boeco M-240R, Nemačka) pri 5000 obrtaja tokom 5 minuta. Pomešana je ista zapremina supernatanta i destilovane vode (500 µL ) i 100 µL ferihlorida (0,1 %). Apsorbanca je merena u odnosu na slepu probu pri talasnoj dužini od 700 nm primenom UV/VIS spektrofotometra (UV-1800, Shimadzu, Japan). Kao pozitivna kontrola korišćena je askorbinska kiselina (VWR Prolab, Luven, Belgija). Viša vrednost apsorbance ukazuje na bolju redukcionu sposobnost.

#### 4.7.1.3. Sposobnost heliranja jona gvožđa

Na osnovu metode prema Oh i sar., (2013) je određena sposobnost heliranja jona gvožđa vakuum uparenih proizvoda (koncentracije 0,1 – 20 mg/mL), kao i tečnih napitaka kombuha. Uzorku (1 mL) je dodat rastvor FeCl<sub>2</sub> (2 mM, 100 µL). Nakon 10 minuta reakcija je inicirana dodatkom 5 mM ferozina (100 µL) i rastvor ostavljen narednih 10 minuta. Na kraju je 3 mL destilovane vode dodato i nakon 10 minuta, je merena apsorbanca na 562 nm na UV/VIS spektrofotometru (UV-1800, Shimadzu, Japan). Slepa proba je predstavljala rastvor sa svim reagensima, bez uzorka koji se testira. Sposobnost heliranja jona gvožđa je izračunata prema formuli:

$$\text{Sposobnost heliranja jona gvožđa ( \% )} = [(A_k - A_{uz}) / A_k] \times 100$$

A<sub>k</sub> – Apsorbanca kontrolnog rastvora; A<sub>uz</sub> – Apsorbanca rastvora sa uzorkom

Za poređenje, kao pozitivna kontrola, korišćena je limunska kiselina (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, SAD).

#### 4.7.1.4. Inhibicija lipidne peroksidacije

Sposobnost inhibicije lipidne peroksidacije određena je za vakuum uparen proizvod (koncentracije 0,1 – 10 mg/mL) kao i za tečne kombuha napitke od medicinskih gljiva. Uzorku u količini od 100 µL je dodato 2 mL emulzije linoleinske kiseline (10 mM) koja je pripremljena u 0,2 M natrijum fosfatnom puferu (pH 6,5) i stabilizovana dodatkom 6,5 mM Tween-a 20. Radi ubrzanja oksidacije, smeša je konstantno mešana, na temperaturi od 37 °C, u mraku. Potom je uzeto 120 µL rastvora i dodato u 3,6 mL apsolutnog metanola. Uzorci su mešani na vorteksu, a potom centrifugirani pri 3000 obrtaja, 10 minuta. Apsorbanca je merena pri talasnoj dužini od 234 nm na UV/VIS spektrofotometru (UV-1800, Shimadzu, Japan). Kontrolni rastvor pripremljen je od svih komponenata izuzimajući uzorak. Proračun je izveden prema sledećoj formuli:

$$\text{Sposobnost inhibicije (\%)} = [(A_k - A_{uz}) / A_k] \times 100$$

A<sub>k</sub> – Apsorbanca kontrolnog rastvora; A<sub>uz</sub> – Apsorbanca rastvora sa uzorkom

Za poređenje su korišćeni α-tokoferol i askorbinska kiselina (Kozarski et al., 2011)

#### 4.7.2. Antibakterijska aktivnost

##### 4.7.2.1. Priprema uzoraka za ispitivanje

Antibakterijski potencijal kombuha napitaka od gljiva *Ganoderma lucidum*, *Lentinus edodes* i *Coriolus versicolor* ispitana je u trenutku dostizanja konzumne kisleosti od 3 g/L. Fermentisana tečnost i uzorak kombuhe koji je osušen pod vakuumom, su pripremljeni kao što je opisano u poglavlju 4.6.1. Zbog antibakterijskog delovanja sirćetne kiseline, koja je produkt metabolizma bakterija sirćetnog vrenja, pripremljen je i neutralisan proizvod. Za podešavanje pH vrednosti napitaka do 7,0 primenjen je 0,1 M NaOH. U cilju utvrđivanja termostabilnosti antimikrobnih komponenata, pripremljen je i uzorak denaturisan visokom temperaturom (100 °C, 5 minuta). Ista koncentracija sirćetne kiseline (Batahem, Srbija) kao u kombuha napicima od gljiva (3 g/L) je pripremljena za testiranje (Velićanski et al., 2014). Koncentracije uzoraka osušenih pod vakuumom, nakon rastvaranja u destilovanoj vodi, su bile u

opsegu od 0,23 – 30 mg/mL, dok su koncentracije za tečni, toplotno denaturisan i neutralisan uzorak izračunate na osnovu prethodno utvrđene suve materije u tečnim uzorcima i bile su za *Ganoderma lucidum* kombuhu u opsegu 0,01 – 24,95 mg/mL, za kombuhu od gljive *Lentinus edodes* 0,062 – 7,99 mg/mL i za *Coriolus versicolor* kombuhu u opsegu 0,14 – 18,05 mg/mL. Pre izvršenih analiza, sve četiri vrste uzoraka (tečni, toplotno denaturisan, neutralisan i vakuum osušeni) su sterilisani filtriranjem kroz filtere sa otvorom pora od 0,22 µm (Sartorius, Nemačka).

#### **4.7.2.2. Sojevi mikroorganizama i priprema inokuluma**

Devet Gram-negativnih bakterijskih sojeva (*Proteus mirabilis* ATCC 12453, *Proteus hauseri* ATCC 13315, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Escherichia coli* O157:H7 ATCC 35150, *Salmonella* serotip Enteritidis ATCC 13076, *Shigella sonnei* ATCC 29930, *Yersinia enterocolitica* ATCC 27729 i *Citrobacter freundii* ATCC 43864) i sedam Gram-pozitivnih bakterijskih sojeva (*Bacillus spizizenii* ATCC 6633, *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Listeria monocytogenes* ATCC 19111, *Listeria ivanovii* ATCC 19119, *Listeria innocua* ATCC 33090) je korišćeno za ispitivanje antibakterijske aktivnosti. Suspenzije bakterija su pripremljene u Müller Hinton bujonu/agaru (HiMedia, India) dok su *E. coli* O157:H7 i vrste iz roda *Listeria* pripremljene u tripton soja bujonu (HiMedia, India). Nakon inkubacije na 37 °C tokom 20 h, koncentracija bakterijske suspenzije je podešena na 10<sup>5</sup> - 10<sup>6</sup> CFU/mL primenom serijskih decimalnih razređenja.

#### **4.7.2.3. Difuzioni test sa bunarićima**

U 9 mL Müller Hinton agara, koji je prethodno otopljen i na 45 °C ohlađen, dodat je 1 mL pripremljene bakterijske suspenzije. Nakon homogenizacije, agar je izliven u Petri šolju. Kada se podloga stegla, napravljeni su bunarići prečnika 5 mm pomoću sterilne metalne cevčice (Cork-borer). Uzorci (50 µL) su uneti u bunariće i

nakon inkubacije na 37 °C tokom 24 h, meren je prečnik zone inhibicije rasta (Velićanski et al., 2014).

#### **4.7.2.4. Mikrodilucioni test**

Za dalje ispitivanje antibakterijske aktivnosti pripremljenih uzoraka kombuhe od gljiva, primenjena je jednostavna, osetljiva i brza mikrodiluciona metoda. Minimalne inhibitorne koncentracije (MIC) utvrđene su korišćenjem mikrotitar ploča sa 96 bunarića. U svaki bunarić dodato je po 50 µL duplo razblaženih uzoraka (tečni, neutralisani ili osušeni pod vakuumom) ili sirćetne kiseline pripremljene u destilovanoj vodi i 50 µL bakterijske suspenzije u odgovarajućem medijumu. Bakterijska suspenzija je poslužila kao pozitivna kontrola. Negativnu kontrolu je činio medijum bez bakterijske suspenzije. Kako bi se utvrdilo da li postoji ćelijska respiracija kod Gram-negativnih bakterija, TTC (2,3,5-tetrafenil-tetrazolijum hlorid, Sigma Chemical Co.) je dodat medijumu. Pojava crvene boje će se dogoditi usled redukcije bezbojnog TTC-a ćelijskim enzimima (Klančnik et al., 2010). Najniža koncentracija pri kojoj nije došlo do promene boje indikatora predstavlja MIC. Za detekciju rasta Gram-pozitivnih bakterija korišćen je oksido-redukcioni indikator, resazurin. Kada se resazurin redukuje do resorufina delovanjem oksidoreduktaza u živim ćelijama, boja se menja iz plave, nefluorescentne boje u fluorescentnu i roze boju. Dalja redukcija resorufina u hidroresorufin dovodi do obezbojavanja i gubitka fluorescencije (Sarker, 2007). Najniža koncentracija pri kojoj nije došlo do promene boje nakon inkubacije na 37 °C tokom 24 h je MIC vrednost. Iz bunarića u kojima nije bilo rasta mikroorganizama, ezama (10 µL) su zasejane odgovarajuće podloge i ponovo inkubirane pri istim uslovima. Najniža koncentracija pri kojoj je izostao rast na čvrstoj podlozi je definisana kao MBC (Nowacka et al., 2014).

### **4.7.3 Citotoksična i imunomodulatorna aktivnost polisaharidnih ekstrakata kombuha**

#### **4.7.3.1. Priprema uzoraka za ispitivanje**

Priprema polisaharidnog ekstrakta je izvršena tako što je supernatant tečnog uzoraka kombuhe nakon centrifugiranja (6500 obrtaja, 10 minuta) uparen do 10 % početne zapremine (R-II rotovapory Buchi, Švajcarska). Kako bi se uklonila jedinjenja malih molekulskih masa i izvršila precipitacija polisaharida, dodata je duplo veća zapremina 96 % etanola, i uzorak je ostavljen na temperaturi od 4 °C, tokom 24 h. Nakon centrifugiranja (Eppendorf 5840R, Nemačka) 20 minuta pri 9000 obrtaja alkohol je odliven i ekstrakti su osušeni na vakuum uparivaču (R-II rotovapory Buchi, Švajcarska) (Klaus et al. 2011). Na ovaj način su dobijeni uzorci TP2, TP4 i TP6, koji su pre analiza rastvoreni u fosfatnom puferu (engl. Phosphate buffer saline, PBS), pH 7,2.

#### **4.7.3.2. Izolacija perifernih humanih mononuklearnih ćelija (PBMC)**

Mononuklearne ćelije periferne krvi (engl. Peripheral blood mononuclear cells, PBMC) su izolovane iz koncentrovanih ćelijskih elemenata periferne krvi (engl. buffy coats) zdravih dobrovoljaca, nakon informisanja o proceduri i načinu upotrebe njihovih krvnih produkata i dobijanja pisane saglasnosti. Nakon razblaživanja koncentrovanih ćelijskih elemenata periferne krvi tri puta u PBS-u, pažljivo su postavljeni na medijum za gradijent gustine (Lymphoprep, PAA, Nycomed, Oslo, Norway) čime se ćelije razdvajaju na osnovu razlika u gustini. Tokom centrifugiranja (2200 obr/min, 20 minuta) na sobnoj temperaturi, formirani su slojevi ćelija i pažljivo je sakupljen sloj koji se sastoji od PBMC. Ćelije su četiri puta isprane sa PBS puferom na sobnoj temperaturi primenom centrifugiranja pri maloj brzini (800 obr/min, 8 minuta), kako bi se uklonili zaostali trombociti. Na kraju, ćelije su resuspendovane u RPMI medijumu, a broj ćelija kao i njihova vijabilnost je ispitana primenom svetlosnog mikroskopa (Olympus, Tokio,



Japan) nakon bojenja ćelija Tripan plavim. Ovako dobijene PBMC su korišćene u daljim analizama (Tomić, 2016).

#### **4.7.3.3. Citotoksičnost polisaharidnih ekstrakata kombuha od gljiva u kulturi humanih PBMC**

Kulture humanih PBMC ( $3 \times 10^5$ /bunariću, u ploči sa 96-bunarića) su kultivisane u RPMI medijumu koji sadrži 10 % FCS (engl. fetal calf serum), fetalni teleći serum (ICN, Costa Mesa, CA), 50  $\mu$ M 2-merkaptoetanol, 1 % antibiotika (gentamicin, penicilin, streptomycin) uz prisustvo kombuha ekstrakata (TP2, TP4 ili TP6) u različitim dozama (7 - 500  $\mu$ g/mL) tokom 24 h. Dodatno, kulture su tretirane sa različitim dozama kombuha ekstrakta i 10  $\mu$ g/mL fitohemaglutinina (PHA) ili samo sa PHA, tokom 48 h. Za blank kontrole su korišćene kulture bez ćelija a u kojima su druge odgovarajuće supstance prisutne. Nakon kultivacije, metabolička aktivnost, koja odgovara ukupnom broju vijabilnih ćelija, je određena MTT testom.

#### **4.7.3.4. Merenje metaboličke aktivnosti ćelija MTT testom**

Rastvor 3-[4,5 dimetil-tiazol-2-il]-2,5 difenil tetrazolijum hlorida u PBS-u (MTT, Sigma, 100 mg/mL) je dodat u bunariće i kulture su inkubirane na 37 °C, tokom 4 h. Nakon toga, uzorci su centrifugirani i suspenzija je uklonjena. U bunariće sa peletama je dodat 0,1 mL izopropil alkohola koji je doveo do rastvaranja formazana nastalog usled aktivnosti sukcinat dehidrogenaze. Potom je intenzitet boje očitana na 570/650 nm talasne dužine (Bahering ELISA Processor II, Heidelberg, Nemačka). Svi eksperimenti su izvedeni u četiri ponavljanja, a rezultati su izraženi kao relativna metabolička aktivnost u odnosu na odgovarajuće kontrole (100 %), pomoću formule:

Relativna metabolička aktivnost ( %) =

$$= \frac{\bar{x}(\text{apsorpcija uzorka (OD570-OD650)} - \bar{x}(\text{blank uzorka (OD570-OD650)})}{\bar{x}(\text{apsorpcija kontrle (OD570-OD650)} - \bar{x}(\text{blank kontrole (OD570-OD650)})}$$

#### 4.7.3.5. Detekcija citokina u kulturi PBMC-PHA

Za merenje koncentracije citokina, kultivisane su kulture PBMC u ploči sa 96 bunarića ( $3 \times 10^5$ /bunariću) u prisustvu kombuha ekstrakata i PHA, ili samo u prisustvu PHA (kontrola). Naime, nakon 48 h kultivacije su sakupljeni supernatanti i uskladišteni na  $-80\text{ }^\circ\text{C}$  za analizu citokina. Nivo IL-1 $\beta$ , IL2, IL4, IL5, IFN- $\gamma$ , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 i TNF- $\alpha$  određena je iz 50  $\mu\text{L}$  supernatanta primenom protočne citometrije (BD LSR II) pomoću fluorescentnih kuglica (BioLegend, San Diego, USA). Koncentracije citokina su određene na osnovu konstruisane standardne krive primenom odgovarajućih rekombinantnih citokina poznatih koncentracija.

#### 4.8. Senzorna analiza kombuha proizvoda od medicinskih gljiva

Senzorna ocena kombuha proizvoda izvršena je korišćenjem metode koja u ocenjivanju koristi hedonsku skalu, odnosno skalu preferencije sa devet nivoa (Radovanović i Popov-Raljić, 2001). Cilj je bio utvrditi senzornu prihvatljivost kombuha proizvoda od medicinskih gljiva. Vrednost 1 označava maksimalno neprijatan, dok se ocena 9 tumači kao maksimalno prijatan utisak (Slika 4.1).

Ocenjeni su uzorci kombuhe od gljiva *G. lucidum*, *L. edodes* i *C. versicolor* pri konzumnoj kiselosti od 3 g/L, kao i aromatizovani uzorci kombuha od ove tri gljive. Aromatizacija kombuha od gljive *G. lucidum* i *C. versicolor* je izvršena dodatkom 3 ml/L arome kokosa (Milkom inženjering d.o.o., Srbija) dok je kombuha od gljive *L. edodes* aromatizovana dodatkom 3 ml/L arome maline (Milkom inženjering d.o.o., Srbija). Kao kontrolni uzorak poslužila je kombuha koja je pripremljena na podlozi od crnog čaja, a koja je sadržala istu koncentraciju kiselina i fermentisana je istom kombuha kulturom.

U ocenjivanju je učestvovalo sedamnaest ocenjivača laika, koji pre ispitivanja nisu imali nikakvu obuku i koji pri tom nisu redovni konzumenti kombuha napitaka. Servirano je 50 mL uzorka u neprovidnim čašama od 100 mL. Temperatura proizvoda prilikom ispitivanja je bila  $+8\text{ }^\circ\text{C}$ . Svi uzorci su šifrirani trocifrenim brojevima koji su slučajno izabrani. Servirani su uzorci jedan po jedan po slučajnom redosledu.

### Hedonska skala

Šifra uzorka:

Zaokružite broj ispred termina koji u najvećoj meri odgovara Vašem sudu o kvalitetu proizvoda



Slika 4.1. Obrazac ocenjivačkog lisat sa hedonskom skalom

#### 4.9. Statistička analiza

Dobijeni podaci su podvrgnuti jednofaktorijalnoj analizi varijanse (ANOVA), dok je za utvrđivanje statističke značajnosti između vrednosti korišćen Tukey-ev HSD (engl. honesty significant difference) test, na nivou značajnosti  $p \leq 0,05$ . Statistička analiza je urađena primenom Origin Pro 9.0. softvera. Linearna regresiona analiza je korišćena za utvrđivanje efektivne koncentracije ( $EC_{50}$ ), odnosno koncentracije uzorka pri kojoj se postiže 50 % antioksidativne aktivnosti, kao i za utvrđivanje inhibitorne koncentracije ( $IC_{50}$ ), odnosno koncentracije pri kojoj se postiže 50 % inhibicije antioksidativne aktivnosti. Ova analiza je korišćena i za utvrđivanje korelacije između promenljivih od značaja.

## 5. REZULTATI I DISKUSIJA

### 5.1. Identifikacija mikroorganizama iz kombuhe

#### 5.1.1. Biohemijska identifikacija izolata kvasaca primenom API testova i Vitek 2 sistema

Iz kombuha kulture koja je korišćena u eksperimentima, izolovano je devet izolata kvasaca koji izdvojeni na osnovu različitih makromorfoloških i mikromorfoloških karakteristika.

Identifikacija kvasaca je moguća primenom, vremenski veoma dugotrajnih metoda na osnovu morfoloških, biohemijskih i fizioloških karakteristika. Primena API 20 C AUX (bioMérieux, Francuska) sistema pojednostavljuje i ubrzava identifikaciju, i komercijalano je dostupan za identifikaciju izolata na osnovu 19 asimilacionih biohemijskih karakteristika. Nakon izolacije devet kultura kvasaca, pristupilo se identifikaciji pomoću API 20 C AUX testova. Rezultati identifikacije izolata API testovima su prikazani u tabeli 5.1, dok su asimilacione reakcije izolata kvasaca prikazane u tabeli 8.1 (Prilog A).

Na osnovu biohemijskih reakcija, izolat 1<sub>1</sub> je pokazao najviši stepen sličnosti sa vrstom *Candida pelliculosa* i to 98,1 %. Prema rezultatima testa, ovaj izolat vrši asimilaciju glukoze, glicerola, D-ksiloze, D-galaktoze, metil- $\alpha$ D-glukopiranozida, D-celobioze, D-laktoze, D-maltoze, D-saharoze, D-trehaloze, D-melezitoze i D-rafinoze.

Izolat 1<sub>2</sub> je pokazao vrlo visok stepen sličnosti sa vrstom *Candida spherica* (99,8 %). Izolat je asimilovao sledeće šećere: glukozu, glicerol, D-galaktozu, D-celobiozu, D-laktozu, D-maltozu, D-saharozu, D-trehalozu i D-rafinozu.

Izolat 2<sub>1</sub> je ispoljio sličnost < 50 % sa dve vrste: *Candida guilliermondii* i *Trihosporon mucoides*. Izolat je asimilovao: glukozu, glicerol, kalcijum 2-keto glukonat, L-arabinozu, D-ksilozu, D-galaktozu, metil- $\alpha$ D-glukopiranozid, D-celobiozu, D-laktozu, D-maltozu, D-saharozu, D-trehalozu i D-rafinozu.

Izolat 2<sub>3</sub> je pokazao nizak stepen sličnosti sa rodovima: *Rhodotorula mucilaginoso* < 50 % i *Candida guilliermondii* < 50 %. Ovaj izolat je asimilovao sledeća jedinjenja: glukozu, glicerol, kalcijum 2-keto glukonat, L-arabinozu, D-ksilozu, ksilitol,

D-galaktozu, D-celobiozu, D-laktozu, D-maltozu, D-saharozu, D-trehalozu i D-rafinozu.

Tabela 5.1. Rezultati identifikacije izolata kvasaca API 20C AUX sistemom

Izolat	Identifikovana vrsta	Stepen poklapanja (%)
1 <sub>1</sub>	<i>Candida pelliculosa</i>	98,1
1 <sub>2</sub>	<i>Candida spherica</i>	99,8
2 <sub>1</sub>	<i>Candida guilliermondii</i> <i>Trihosporon mucoides</i>	< 50
2 <sub>3</sub>	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> <i>Candida guilliermondii</i>	< 50
3	<i>Candida boidinii</i> <i>Candida zeylanoides</i>	< 50
4 <sub>1</sub>	<i>Trihosporon mucoides</i>	92,2
4 <sub>2</sub>	<i>Candida pelliculosa</i>	99,3
5	<i>Candida guilliermondii</i> <i>Candida famata</i>	56,9 < 50
6	<i>Candida zeylanoides</i>	< 50

Izolat 3 je bio najbližnji rodovima *Candida boidinii* < 50 % i *Candida zeylanoides* < 50 %. Pozitivne asimilacione reakcije su bile: glukozu, glicerol, ksilitol, N-acetil-glukozamin, D-celobioza, D-trehaloza.

Na osnovu biohemijskih testova izolat 4<sub>1</sub> je identifikovan kao *Trihosporon mucoides* 92,2 %. Ovaj izolat asimiluje glukozu, glicerol, kalcijum 2-keto glukonat, L-arabinozu, D-ksilozu, adonitol, ksilitol, D-galaktozu, metil- $\alpha$ D-glukopiranozida, D-celobioze, D-laktoze, D-maltoze, D-saharoze, D-trehaloze i D-rafinozu.

Kod izolata 4<sub>2</sub> utvrđena je sličnost od 99,3 % sa vrstom *Candida pelliculosa*. Utvrđeno je da ovaj izolat asimiluje: glukozu, glicerol, D-galaktozu, metil- $\alpha$ D-glukopiranozid, D-celobiozu, D-maltoze, D-saharozu, D-trehaloze, D-melezitoze i D-rafinoze.

Sličnost sa vrstama *Candida guilliermondii* 56,9 % i *Candida famata* < 50 % pokazao je izolat 5 koji je asimilovao sledeća jedinjenja: glukozu, glicerol, L-arabinozu, D-ksilozu, adonitol, D-galaktozu, D-sorbitol, metil- $\alpha$ D-glukopiranozida, D-celobiozu, D-maltoze, D-saharozu, D-trehaloze, D-melezitoze i D-rafinoze.

Izolat 6 je pokazao nizak stepen sličnosti sa rodnom *Candida zeylanoides* < 50 %. Pozitivne asimilacione reakcije su bile: glukozu, glicerol, ksilitol, D-celobioza i D-trehaloza.

Usled toga što je stepen sličnosti kod 5 izolata, primenom API 20 C AUX, bio < 50 %, pristupilo se dodatnom ispitivanju na osnovu opsežnijih biohemijskih karakteristika. Primenjen je Vitek 2 sistem koji podrazumeva upotrebu YST kartica sa 46 biohemijskih testova asimilacije ugljenih hidrata i azota kao i enzimskih reakcija.

Na osnovu rezultata biohemijskog ispitivanja primenom YST kartica (Tabela 8.2, Prilog A) utvrđeno je da izolati 1<sub>1</sub>, 1<sub>2</sub>, 2<sub>1</sub>, 2<sub>3</sub>, 4<sub>1</sub>, 4<sub>2</sub> i 5 sa tačnošću od 98 % pripadaju vrsti *Saccharomyces cerevisiae*. Ovi izolati pokazali su pozitivne reakcije asimilacije D-galaktoze, D-glukoze, D-maltoze, D-rafinoze, D-manoze, saharoze, D-turanoze, D-trehaloze, DL-laktata i acetata. Kod svih izolata utvrđeno je da poseduju aktivnost leucin arilamidaze (aminopeptidaze) dok je kod izolata 1<sub>2</sub>, 2<sub>1</sub> i 2<sub>3</sub> ustanovljena aktivnost i tirozin arilamidaze, na osnovu čega možemo pretpostaviti da svi izolati ne pripadaju istom soju.

Rezultati za izolate 3 i 6 pokazali su nizak nivo diskriminacije uz priložen spisak vrsta: *Candida krusei*, *Candida lambica* ili *Candida inconspicua*. Izolati 3 i 6 su pokazali asimilaciju D-glukoze, D-manoze, L-sorboze, DL-laktata, acetata, L-prolina, N-acetil-glukozamina i aktivnost leucin arilamidaze. Nakon urađenih dodatnih predloženih testova, utvrđeno je da izolati formiraju pseudohife i da koriste D-ksilozu kao jedini izvor ugljenika, na osnovu čega je zaključeno da izolati 3 i 6 pripadaju vrsti *Candida lambica*.

Tabela 5.2. Rezultati biohemijske identifikacije izolata kvasaca primenom Vitek 2 sistema

<b>Izolat</b>	<b>Identifikovana vrsta</b>	<b>Pouzdanost identifikacije (verovatnoća, %)</b>	<b>Kontraindikovani testovi</b>	<b>Predloženi dodatni testovi</b>
<b>1<sub>1</sub></b>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Odlična identifikacija (98 %)	dTREa*	/
<b>1<sub>2</sub></b>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Odlična identifikacija (98 %)	dTREa	/
<b>2<sub>1</sub></b>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Odlična identifikacija (98 %)	dTREa	/
<b>2<sub>3</sub></b>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Odlična identifikacija (98 %)	dTREa	/
<b>3</b>	<i>Candida krusei</i> <i>Candida inconspicua</i> <i>Candida lambica</i>	Niska diskriminacija	ISBEa	HYPH/PH dXYLOSEa
<b>4<sub>1</sub></b>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Odlična identifikacija (98 %)	dTREa	/
<b>4<sub>2</sub></b>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Odlična identifikacija (98 %)	dTREa	/
<b>5</b>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Odlična identifikacija (98 %)	dTREa	/
<b>6</b>	<i>Candida krusei</i> <i>Candida inconspicua</i> <i>Candida lambica</i>	Niska diskriminacija	ISBEa	HYPH/PH dXYLOSEa

\* dTREa – sposobnost korišćenja D-trehaloze kao jedinog izvora ugljenika; ISBEa – sposobnost korišćenja L-sorboze kao jedinog izvora ugljenika; HYPH/PH – mikroskopsko ispitivanje prisustva hifa ili pseudohifa; dXYLOSEa – sposobnost korišćenja D-ksiloze kao jedinog izvora ugljenika; / – nema predloženih testova

Rezultati Posteraro i sar. (2013) su ukazali na to da je Vitek 2 sistem kod analize 250 kliničkih izolata kvasaca pokazao pouzdanost od 94,2 %. Neidentifikovanih izolata bilo je 2,2 %, dok je pogrešno identifikovanih bilo 3,6 % od kojih su svi pripadali vrstama iz roda *Candida* izuzev jednog *Saccharomyces cerevisiae* izolata. Sanguinetti i sar. (2007) su testirali 750 kliničkih izolata kvasaca primenom Vitek 2 sistema i utvrdili tačnost identifikacije od 98,2 % u poređenju sa referentnom metodom (analizom sekvenci rRNK gena, ITS regiona). Pogrešna identifikacija se dogodila u 1 % slučajeva, niska diskriminacija u 0,3 % slučajeva, dok 0,5 % izolata nije bilo moguće identifikovati ovim sistemom.

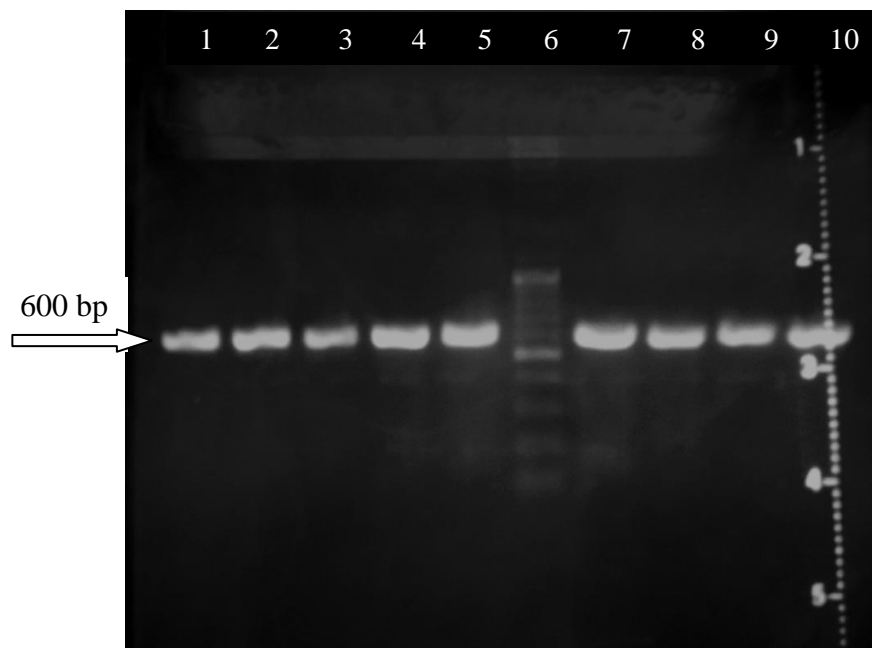
Rezultati biohemijske identifikacije izolata kvasaca primenom API 20C AUX testova, nisu bili u skladu sa utvrđenim rezultatima primenom Vitek 2 sistema. U literaturi se navodi da je češća primena Vitek 2 sistema (do 60 %) u identifikaciji izolata, dok se API testovi primenjuju u svega 8 % slučajeva (Posteraro i sar., 2013).

### **5.1.2. Molekularna identifikacija izolata kvasaca**

Usled neusaglašenosti rezultata dobijenih biohemijskom identifikacijom izolata kvasaca, identifikacija izolata je izvršena i primenom molekularne PCR metode, koju karakteriše visoka specifičnost, brzina i jednostavnost, u cilju postizanja višeg stepena pouzdanosti rezultata, koji se dobijaju nakon sekvenciranja PCR produkata i analize sekvenci.

Nakon uspešne izolacije kvasaca pristupilo se izolaciji DNK iz ćelija, a potom i amplifikaciji varijabilnog regiona (D1/D2) gena za 26S rRNK, primenom univerzalnih prajmera NL1 i NL4. Veličine dobijenih PCR produkata određene su na osnovu migracije u 1 % agaroznom gelu u poređenju sa standardom. Na ovaj način je potvrđeno da su produkti PCR reakcija bili očekivane veličine od 600 bp (Slika 5.1), kod svih izolata kvasaca. Nakon prečišćavanja PCR produkata, izvršeno je njihovo sekvenciranje, a potom su analize sekvenci izvršene u programu BLAST, korišćenjem NCBI baze podataka. Rezultati su prikazani u tabeli 5.3.





Slika 5.1. Elektroforetogram PCR produkata izolata kvasaca (korišćenjem prajmera NL1/NL4) na 1 % agaroznom gelu. 1-izolat 1<sub>1</sub>, 2-izolat 2<sub>1</sub>, 3-izolat 3, 4-izolat 4<sub>1</sub>, 5-izolat 4<sub>2</sub>, 6-DNK Ladder Mix (GeneRuler, Fermentas), 7-izolat 5, 8-izolat 6, 9-izolat 1<sub>2</sub>, 10-izolat 2<sub>3</sub>.

Utvrđeno je da rezultati identifikacije kvasaca primenom API 20C AUX testova nisu u skladu sa dobijenim rezultatima primenom molekularne metode, kao ni sa prethodno utvrđenim rezultatima identifikacije primenom Vitek 2 sistema. Sa druge strane, utvrđeno je da primena Vitek 2 sistema omogućava visok stepen pouzdanosti prilikom identifikacije vrste *Saccharomyces cerevisiae* budući da su dobijeni istovetni rezultati kao i primenom molekularne metode. Međutim, u slučaju dva izolata kvasaca *Pichia manshurica*, Vitek 2 sistemom je utvrđeno da ovi izolati pripadaju rodu *Candida* sa niskim stepenom diskriminacije vrsta. Posteraro i sar. (2013) su utvrdili da Vitek 2 sistem nije u mogućnosti da identifikuje vrste iz roda *Pichia* (*P. caribbica*, *P. fabianii*, *P. manshurica*, *P. onichis*) što je u skladu sa dobijenim rezultatima. Takođe, ako bi se identifikacija vršila samo na osnovu fenotipskih karakteristika, *P. manshurica* bi bila pogrešno identifikovana kao *P. membranefaciens* (Zhang et al., 2017).

Tabela 5.3. Rezultati molekularne identifikacije izolata kvasaca iz kombuhe

<b>Izolat</b>	<b>Identifikovana vrsta</b>	<b>Najsličniji izolati dostupni u GenBank bazi podataka (NCBI pristupni broj sekvence iz Blasta)</b>	<b>Stepen poklapanja (%)</b>
<b>1<sub>1</sub></b>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> strain CR-Y123 26S ribosomal RNA gene, partial sequence (KY 273294)	100
<b>1<sub>2</sub></b>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> strain S5R1-1 large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence (MG773372.1)	100
<b>2<sub>1</sub></b>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> isolate SFM40 26S ribosomal RNA gene, partial sequence (MG017581.1)	92
<b>2<sub>3</sub></b>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> strain CR-Y123 26S ribosomal RNA gene, partial sequence (KY273294.1)	100
<b>3</b>	<i>Pichia manshurica</i>	<i>Pichia manshurica</i> strain RHTD23 large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence (MK034873.1)	99
<b>4<sub>1</sub></b>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> strain CR-Y123 26S ribosomal RNA gene, partial sequence (KY273294.1)	100
<b>4<sub>2</sub></b>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> strain CR-Y123 26S ribosomal RNA gene, partial sequence (KY273294.1)	99
<b>5</b>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> strain CR-Y123 26S ribosomal RNA gene, partial sequence (KY273294.1)	99
<b>6</b>	<i>Pichia manshurica</i>	<i>Pichia manshurica</i> strain RHTD23 large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	99

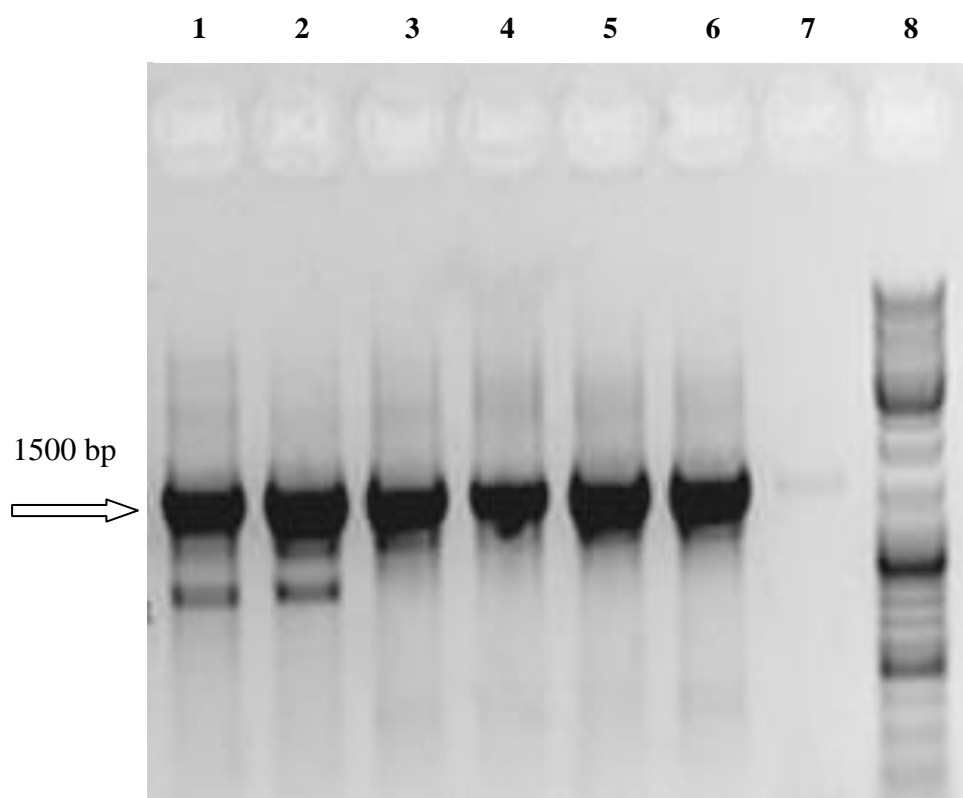
*Pichia mansurica* je kvasac koji je pronađen u mnogim supstratima gde kvasci igraju značajnu ulogu tokom fermentacije, kao što su kombuha, kiseli kupus, kakao zrna, kumis, Shanxi sirće. Rast je moguć pri 10 % v/v etanola, a preživljava i u crvenom vinu sa 12,6 % v/v etanola. Tokom proizvodnje Shanxi sirćeta u Kini, primenom Daqu startera, utvrđen je značajan uticaj kvasca *P. mansurica* na aromatsko poboljšanje proizvoda. Povećana je produkcija ukupnih estara, posebno etil acetata koji je glavna aromatska komponenta kod fermentisanih likera i sirćeta kao i izoamil acetata koji doprinosi svežoj voćnoj i cvetnoj aromi (Zhang et al., 2017). Podolich i sar. (2019) su utvrdili da kvasac *P. mansurica* u mineralizovanoj celuloznoj navlaci kombuhe, može preživeti simulirane ekstremne uslove koji vladaju u unutrašnjoj atmosferi Marsa, uz *Z. bailii* i *K. intermedius*.

*S. cerevisiae* je izolovan sa raznih staništa kao što su zemljište ispod drveća u šumama i voćnjacima, voćni plodovi, nektar i eksudati cveća, intestinalni trakt insekata itd. *S. cerevisiae* je od strane Američke uprave za hranu i lekove, FDA (Food and Drug Administration, USA) okarakterisan kao GRAS (engl. Generally Regarded As Safe), zbog veoma duge i bezbedne upotrebe (Marques et al., 2016). Česta je pojava ovog kvasca u kombuha fermentacijama. Zhao i sar., (2018) su iz kombuha fermentišuće tečnosti izolovali i identifikovali kvasac *Saccharomyces cerevisiae* i *Arxula adeninovorans*. Prisustvo *S. cerevisiae* utvrđeno je do sedmog dana fermentacije. *S. cerevisiae* je kvasac koji ima uticaj na aromu fermentisanog proizvoda i u 32 kombuhe sa teritorije Nemačke, rod *Saccharomyces* je detektovan u 26 % slučajeva (Mayser et al., 1995). Ustanovljeno je da kvasac *S. cerevisiae* može uticati i na poboljšanje antioksidativnih svojstava kombuhe od crnog čaja (Malbaša et al., 2011).

### **5.1.3. Molekularna identifikacija izolata bakterija sirćetnog vrenja**

Iz kombuha tečnosti koja je korišćena u eksperimentima, izolovano je šest izolata bakterija sirćetnog vrenja (BSV). Identifikacija vrsta BSV na osnovu fenotipskih karakteristika je nepouzdana, jer su karakteristike veoma slične, što dovodi do niske diskriminacije vrsta. Radi postizanja pouzdane identifikacije, neophodno je izvršiti genotipsku karakterizaciju izolata (El-Salam, 2012). Molekularnim metodama

identifikacije mikroorganizama bez prethodne izolacije, uspešno su identifikovani mikroorganizmi tokom fermentacije do roda (Chakravorty et al., 2016; Marsh et al., 2014). Međutim, vrste nisu određene, što bi moglo uticati na neke od ključnih informacija koje se tiču procesa fermentacije i njenog kontrolisanja (Coton et al., 2017).



Slika 5.2. Elektroforetogram PCR produkata izolata BSV (korišćenjem prajmera 16S) na 1 % agaroznom gelu. 1-izolat IV, 2-izolat VI<sub>A</sub>, 3-izolat I, 4-izolat I<sub>A</sub>, 5-izolat III<sub>k2</sub>, 6-izolat S<sub>2</sub>, 7-negativna kontrola, 8-DNK Ladder Mix (GeneRuler, Fermentas)

Nakon uspešne izolacije bakterija sirćetnog vrenja i provere čistoće izolata, pristupilo se izolaciji DNK iz ćelija, a potom i amplifikaciji varijabilnog regiona gena za 16S rRNK primenom prajmera P1 16S Fw i P2 16S Rev. Veličine dobijenih PCR produkata određene su na osnovu migracije u 1 % agaroznom gelu u poređenju sa standardom. Na ovaj način je potvrđeno da su produkti PCR reakcija bili očekivane veličine od 1500 bp kod svih izolata BSV (slika 5.2). S obzirom da je u slučaju izolata IV i VI<sub>A</sub> uočena pojava nespecifičnih traka veličine 1000 bp (Slika 5.2), kod pomenutih

uzoraka prečišćavanje produkata je rađeno isecanjem trake odgovarajuće veličine (1500 bp) iz gela. Produkti PCR reakcije su prečišćeni i sekvencirani (Macrogen's sequencing service, Holandija). Upotrebom NCBI baze podataka, utvrđeno je kojim rodovima i/ili vrstama pripadaju izolati iz korišćene kombuha kulture i rezultati su prikazani u Tabeli 5.4.

Tabela 5.4 Rezultati molekularne identifikacije izolata BSV iz kombuhe

<b>Izolat</b>	<b>Identifikovana vrsta</b>	<b>Najsličniji izolati dostupni u GenBank bazi podataka (NCBI pristupni broj sekvence iz Blasta)</b>	<b>Stepen poklapanja (%)</b>
<b>I</b>	<i>Gluconobacter japonicus</i>	<i>Gluconobacter japonicus</i> strain HD1025 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (LC434017.1)	100
<b>IA</b>	<i>Gluconobacter japonicus</i>	<i>Gluconobacter japonicus</i> strain HD1025 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (KT964237.1)	99
<b>S<sub>2</sub></b>	<i>Gluconobacter japonicus</i>	<i>Gluconobacter japonicus</i> strain HD1025 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (KT964237.1)	100
<b>III<sub>K2</sub></b>	<i>Acetobacter papayae</i>	<i>Acetobacter papayae</i> gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence, strain: VTH-AH49 (LC103256.1)	99
<b>IV</b>	<i>Acetobacter senegalensis</i>	<i>Acetobacter senegalensis</i> genome assembly <i>Acetobacter senegalensis</i> 108B, chromosome : I (LN 606600.1)	100
<b>VI<sub>A</sub></b>	<i>Acetobacter senegalensis</i>	<i>Acetobacter senegalensis</i> genome assembly <i>Acetobacter senegalensis</i> 108B, chromosome : I (LN 606600.1)	100

Na osnovu rezultata identifikacije izolata BSV molekularnom PCR metodom, nakon sekvenciranja PCR produkata i analize sekvenci, utvrđeno je da izolati I, I<sub>A</sub> i S<sub>2</sub> pripadaju vrsti *Gluconobacter japonicus* izolati VI i VI<sub>A</sub> pripadaju vrsti *Acetobacter senegalensis*, a izolat III<sub>K2</sub> je identifikovan kao *Acetobacter papayae* (Tabela 5.4)

*Gluconobacter japonicus* je izolovan u Japanu iz planinske breskve (*Myrica rubra*). Gram-negativna je pokretna štapićasta bakterija koji raste pri pH 3,0 i na temperaturi od 35 °C. Međutim, optimalni uslovi za rast su pri vrednosti pH 5,5 i pri temperaturi od 25 °C. Podloge pogodne za rast su sa D-glukozom, D-fruktozom, D-manitolom, D-sorbitolom, mezo-eritrolom ili glicerolom. Karakteriše ga produkcija 2-keto-D-glukonata i 5-keto-D-glukonata iz D-glukoze. Kiselinu produkuje iz D-glukoze, D-manoze, D-galaktoze, D-xyloze, D-arabinoze, L-arabinoze, L-ramnoze, D-fruktoze, L-sorboze, D-manitola, D-sorbitola, mezo-ertitriola, glicerola, melobioze, sukroze, rafinoze i etanola (Malimas et al. 2009).

*Acetobacter senegalensis* je prvi put izolovan u Senegalu iz manga (Ndoye et al., 2007). Takođe je detektovan tokom spontanog fermentacionog procesa mase kakao zrna u Gani (Camu et al., 2007). Ovu vrstu karakteriše rast na podlozi sa kvašćevim ekstraktom i 30 % D-glukoze, rast na podlozi sa amonijum jonom kao jedinim izvorom azota i etanolom kao izvorom energije, takođe raste u prisustvu 10 % v/v etanola, kao i u prisustvu glicerola kao jedinog energetskog izvora. Rast nije primećen u prisustvu maltoze i metanola. Iz D-glukoze produkuje 2-keto-D-glukonsku kiselinu, ali ne produkuje 5-keto-D-glukonsku kiselinu. Striktni je aerob, Gram negativan, kokoidnog izgleda. Ispoljava katalaznu aktivnost, ali ne i oksidaznu. Optimalna temperatura za rast je 35 °C, dok je rast moguć između 28 i 40 °C (Camu et al. 2007; Ndoye et al., 2007). Značaj termotolerantnih vrsta, koje vrše fermentaciju na visokim temperaturama, je sve veći u mnogim fermentacionim procesima. Sa ekonomskog aspekta, tokom fermentacije nije neophodno trošiti energiju na rashlađivanje fermentacionih tankova, naročito u toplijim krajevima, radi postizanja optimalne temperature za fermentaciju (Mounir et al., 2016).

Vrsta *Acetobacter papayae* je prvi put izolovana iz papaje na Okinavi (Japan), 2004. godine. Ova vrsta oksidiše acetat, laktat i etanol. Iz D-glukoze produkuje glukonsku kiselinu, ali ne i 2-keto-D-glukonsku, 5-keto-D-glukonsku, niti 2,5-diketo-D-glukonsku kiselinu. Takođe ima sposobnost produkcije kiseline iz L-arabinoze, D-

riboze, D-ksiloze, D-galaktoze, D-glukoze, D-manoze, etanola, 1-propanola i 1-butanola. Rast je moguć između 10 i 30 °C, pri pH od 3 do 8, u prisustvu od 10 % v/v etanola i 20 % w/v glukoze (Lino et al., 2012).

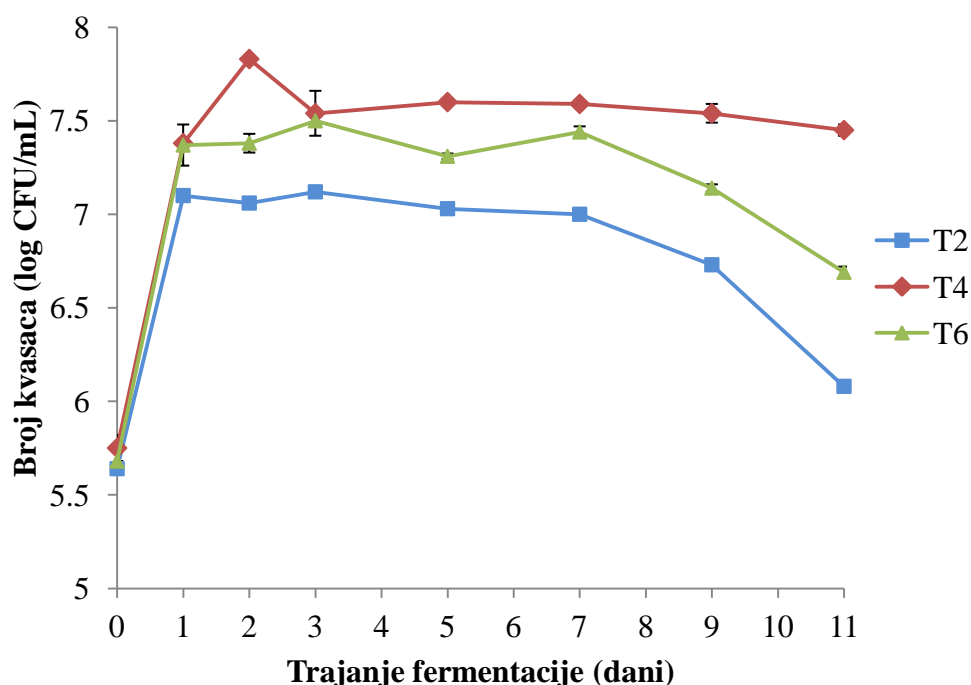
## **5.2. Praćenje toka fermentacije kombuha od medicinskih gljiva *G. lucidum*, *L. edodes* i *C. versicolor***

### **5.2.1. Promena broja kvasaca i bakterija sirćetnog vrenja tokom kombuha fermentacija**

Promena broja kvasaca tokom fermentacije praćena je u fermentacionoj tečnosti tokom 11 dana, za sva tri kombuha napitka od gljiva *Ganoderma lucidum* (T2), *Lentinus edodes* (T4) i *Coriolus versicolor* (T6) (Grafik 5.1). Početni broj kvasaca u sve tri podloge za fermentaciju bio je gotovo isti. U fermentacionoj podlozi od gljive *G. lucidum* (T2) nađeno je  $5,64 \pm 0,11$  log CFU/mL, u podlozi od gljive *L. edodes* (T4),  $5,75 \pm 0,07$  log CFU/mL i u podlozi od gljive *C. versicolor* (T6),  $5,68 \pm 0,00$  log CFU/mL. Najintenzivnija promena broja ćelija primećena je nakon 24 h od početka fermentacije i to za  $1,46$  log CFU/mL,  $1,63$  log CFU/mL i  $1,69$  log CFU/mL u uzorcima T2, T4 i T6, redom. Najveći broj kvasaca je utvrđen drugog dana kod uzorka T4 ( $7,83 \pm 0,01$  log CFU/mL) i do kraja procesa ovaj broj je konstantno blago opadao, ali nije bio niži od  $7,45 \pm 0,03$  log CFU/mL. Uzorci T2 i T6 su maksimalnu vrednost broja ćelija kvasaca postigli trećeg dana fermentacije ( $7,12 \pm 0,00$  i  $7,50 \pm 0,02$  log CFU/mL, redom). Broj ćelija kvasaca održavao se preko 7 log CFU/mL tokom sedam dana kod uzorka T2, i jedanaestog dana je utvrđen najniži broj od  $6,08 \pm 0,11$  log CFU/mL. Kod uzorka T6, tek jedanaestog dana je utvrđen broj ćelija kvasaca ispod 7 log CFU/mL i to  $6,69 \pm 0,03$  log CFU/mL. Pad broja ćelija mikroorganizama u kombuhi dešava se usled veoma niskih vrednosti pH i povećane koncentracije sintetisanih kiselina u podlozi koja fermentiše (Marsh et al., 2014).

Jayabalan i sar. (2007) su u kombuhama od crnog i zelenog čaja pronašli maksimalan broj kvasaca od 7 log CFU/mL, devetog dana fermentacije, nakon čega sledi pad do kraja procesa. Sreeramulu i sar. (2000) u kombuhi od crnog čaja utvrdili su maksimalan broj od 7 log CFU/mL, četvrtog dana koji je opao za 3 log jedinice tokom

naredna tri dana, a kasnije ponovo porastao za 4 log jedinice. Prema Neffe-Skocińska i sar. (2017) u kombuhi od kombinacije crnog i zelenog čaja (2:1) je tek sedmog dana dostignut broj kvasaca  $> 7 \log \text{CFU/mL}$ , a maksimalan je bio desetog dana. Broj ćelija kvasaca koji su odredili Chen i Liu (2000) u tečnosti je bio viši od broja ćelija kvasaca u celuloznoj navlaci, ali je u oba slučaja dostizao 6 - 7 log CFU/mL, tokom svih 30 dana produžene fermentacije. Dostignute vrednosti broja ćelija kvasaca u kombuhama od medicinskih gljiva u skladu su sa literaturnim podacima utvrđenog broja kvasaca u tradicionalnoj kombuhi, s tim što je maksimalan broj kvasaca u kombuhama od gljiva postignut ranije nego što je to slučaj sa tradicionalnom kombuhom.

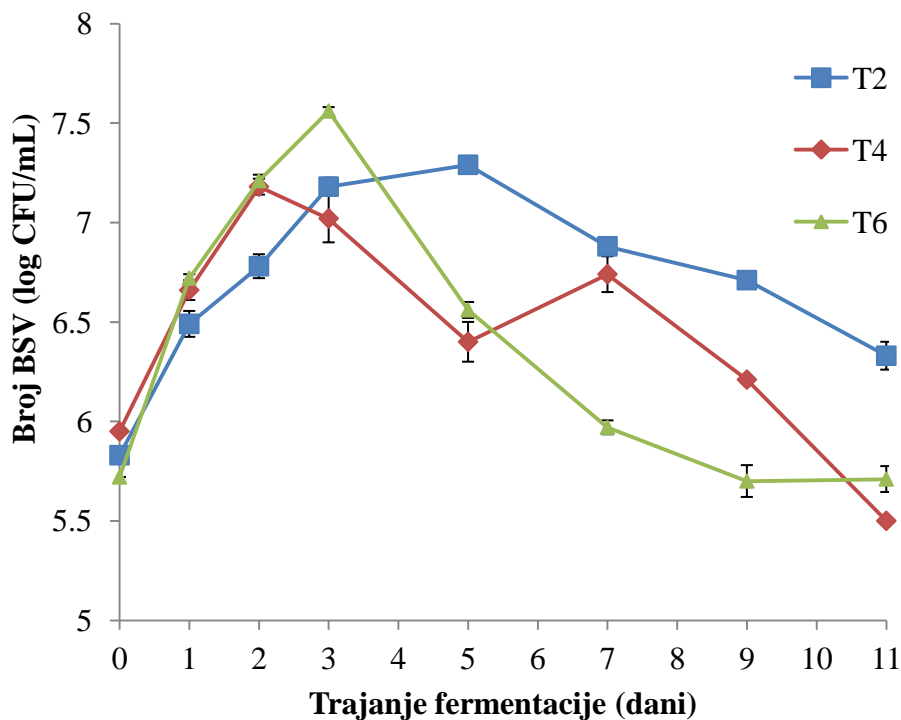


Grafik 5.1. Promena broja kvasaca ( $x_{sr} \pm sd$ ,  $n=3$ ) tokom fermentacije kombuha od gljiva *G. lucidum* (T2), *L. edodes* (T4) i *C. versicolor* (T6).

Početni broj bakterija sirćetnog vrenja (BSV), u inokulisanim podlogama za fermentaciju od gljiva *G. lucidum* (T2), *L. edodes* (T4) i *C. versicolor* (T6) bio je  $5,83 \pm 0,00 \log \text{CFU/mL}$ ,  $5,95 \pm 0,01 \log \text{CFU/mL}$  i  $5,72 \pm 0,00 \log \text{CFU/mL}$  (Grafik 5.2.). Tokom prvih 24 h primećen je najviši porast broja ćelija i to za 0,66, 0,71 i 1,0 log jedinica u podlogama T2, T4 i T6, redom.



Tokom fermentacije kombuhe T2, porast broja ćelija BSV odvijao se tokom pet dana, kada je dostignut maksimum od  $7,29 \pm 0,00$  log CFU/mL, a potom je broj ćelija padao do kraja eksperimenta (do  $6,33 \pm 0,1$  log CFU/mL).



Grafik 5.2. Promena broja BSV ( $x_{sr} \pm sd$ ,  $n=3$ ) tokom fermentacije kombuha od gljiva *G. lucidum* (T2), *L. edodes* (T4) i *C. versicolor* (T6).

Maksimalan broj ćelija BSV kod napitka od gljive *L.edodes* dostignut je drugog dana ( $7,18 \pm 0,06$  log CFU/mL) nakon čega je usledio pad. Smanjenje broja ćelija se može očekivati usled povećane koncentracije sirćetne kiseline, koja najverovatnije dovodi do kiselinskog šoka usled niske pH vrednosti medijuma (Sreeramulu et al., 2000; Jayabalan et al., 2007). Ponovni blagi porast u uzorku T4 primećen je sedmog dana zbog mogućeg razmnožavanja bakterijskih sojeva koji su otporni na povišen sadržaj kiselina (Sreeramulu et al., 2000) i potom ponovni pad do 5,5 log CFU/mL, na kraju procesa.

Kod uzorka T6 dostignut je najviši broj ćelija BSV ( $7,56 \pm 0,01$  log CFU/mL) u odnosu na uzorak T2 i T4, i to trećeg dana, nakon čega je usledio konstantan pad,

najverovatnije usled kiselinskog šoka. Minimalan utvrđen broj ćelija BSV bio je  $5,71 \pm 0,06 \log \text{CFU/mL}$ , jedanaestog dana.

U kombuhi od crnog i zelenog čaja Jayabalan i sar. (2007) pronašli su maksimalan broj ćelija od 3 log jedinice, devetog dana fermentacije, nakon čega je došlo do pada broja ćelija. Sa druge strane, Chen i Liu (2000) u devet uzoraka kombuha od crnog čaja utvrdili broj ćelija BSV od 3 - 4 log CFU/mL, tokom 14 dana fermentacije, što je značajno niže od broja ćelija u svim kombuhama od gljiva. U istraživanju Sreeramulu i sar. (2000) maksimalan broj ćelija je bio u skladu sa ovim istraživanjem ( $10^7$ ). Vrednost iznad  $10^7$  ćelija BSV našli su i Neffe-Skocińska i sar. (2017), ali je u ovom slučaju ta vrednost postignuta sedmog dana fermentacije. Petog dana fermentacije, Zhao i sar., (2018) ustanovili su da je dostignut veoma visok broj ćelija BSV  $2,70 \times 10^9 \text{CFU/mL}$ .

Na variranje u broju ćelija mikroorganizama u kombuhi utiče više faktora. Osetljivost ćelija na niske pH, usled visokih koncentracija sintetisanih kiselina, vremenom dovodi do smanjenja njihovog broja. Takođe na broj utiče i smanjenje dostupnog kiseonika usled stvaranja ugljen dioksida metabolizmom kvasaca i njegove akumulacije između celulozne pelikule i fermentacione tečnosti, čime je onemogućen njegov transfer do tečnosti, kao i prenos nutrijenata do ćelija u pelikuli (Chen i Liu, 2000). Na tok fermentacije i fizičko – hemijske karakteristike proizvoda utiče i poreklo kombuha kulture, odnosno vrste mikroorganizama koje su prisutni u njoj, a koje variraju u zavisnosti od klimatskih i geografskih područja, odnosno lokalnog diverziteta kvasaca i BSV (Mayser et al., 1995; Teoh et al., 2004).

Rezultati promene broja ćelija kvasaca i BSV tokom fermentacije ukazuju na to da je podloga dobijena vrelom vodenom ekstrakcijom plodonosnih tela medicinski značajnih gljiva *G. lucidum*, *L. edodes* i *C. versicolor*, sa nutritivnog aspekta, veoma pogodna za rast ćelija mikroorganizama. Iz tih razloga, može se zaključiti da je na ovaj način moguća uspešna proizvodnja novih fermentisanih kombuha napitaka na podlozi od vrelih vodenih ekstrakata medicinskih gljiva.

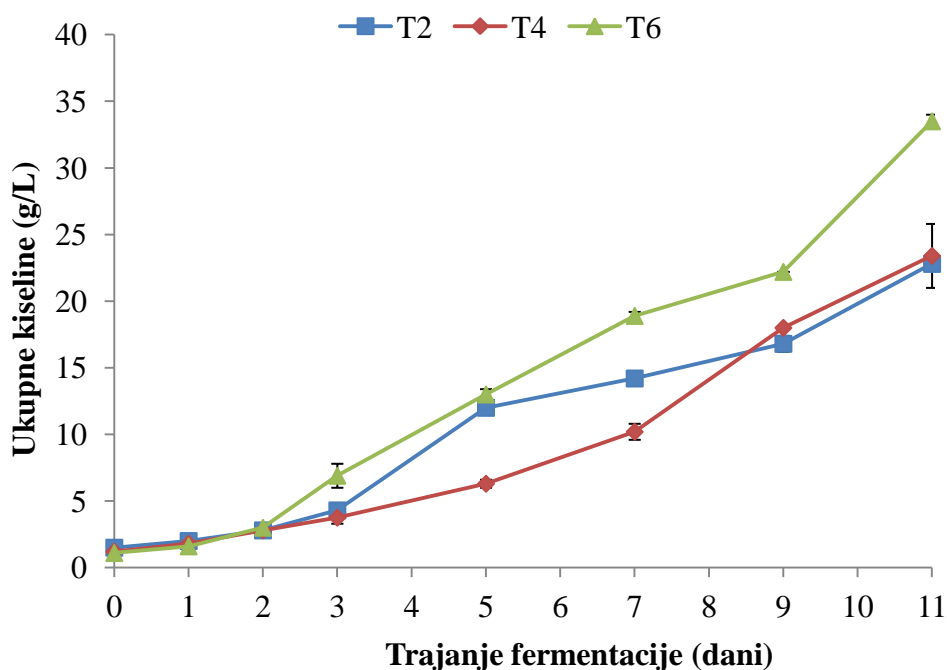
### 5.2.2. Promene sadržaja ukupnih kiselina, pH vrednosti i vizuelne promene tokom kombuha fermentacija

Tokom kombuha fermentacije BSV koriste produkte kvašćevog metabolizma (etanol, glukozu i fruktozu) i proizvode različite kiseline. Dominantna kiselina je sirćetna i njena koncentracija se, tokom trajanja fermentacije, uglavnom povećava.

Sadržaj ukupnih kiselina (UK) praćen je tokom fermentacija kombuha od medicinskih gljiva i prikazan je na grafiku 5.3. Željena kiselost napitka od 3 g/L kod kombuha napitka od gljive *C. versicolor* (uzorak T6) postignuta je najbrže, već nakon  $48 \pm 1$  h od početka fermentacije, dok je kod kombuhe od gljiva *G. lucidum* (uzorak T2) i *L. edodes* (uzorak T4) ista kiselost postignuta nakon  $56 \pm 2$  h i  $50 \pm 2$  h, redom. Tok fermentacije je produžen kako bi se ispratilo dalje promene tokom procesa. Utvrđeno je da je titrabilna kiselost neprekidno rasla tokom svih jedanaest dana. U uzorku T2 najviše kiselina je sintetisano između trećeg i petog dana, 7,7 g/l, kod uzorka T4 između sedmog i devetog dana (7,8 g/L), dok je uzorak T6 je imao maksimalnu sintezu kiseline između devetog i jedanaestog dana, čak 11,3 g/L. Nakon 11 dana utvrđene su veoma visoke koncentracije UK kod sva tri uzorka (*G. lucidum*  $22,8 \pm 0,4$  g/L; *L. edodes*  $23,4 \pm 2,4$  g/L; *C. versicolor*  $33,5 \pm 0,5$  g/L).

Porast ukupnih kiselina u podlozi karakteristika je kombuha fermentacija. U literaturi se navodi da su tradicionalni kombuha napici koji se prave na podlozi od crnog čaja, pokazali značajno nižu vrednost UK. Najviše vrednosti su bile 7,92 g/L nakon sedam dana (Velićanski et al., 2014), 8,5 g/L četrnaestog dana (Sreeramulu et al., 2000), 1,15 g/L takođe četrnaestog dana fermentacije (Malbaša i et al., 2008), 1,65 g/L desetog dana (Neffe-Skocińska et al., 2017), 9,5 g/L petnaestog dana (Jayabalan et al., 2007) i 4 g/L takođe desetog dana (Lončar et al., 2006). Produžetkom kombuha fermentacija na tradicionalnoj podlozi od crnog čaja, sintetiše se veća količina kiselina, pa je tako, dvadeset prvog dana fermentacije utvrđena koncentracija sirćetne kiseline od 16,57 g/L (Chakravorty et al., 2016). Sievers i sar. (1995) su nakon četrdeset dana fermentacije detektovali maksimalnu koncentraciju sirćetne kiseline od oko 30 g/L, nakon čega je usledilo smanjenje na oko 5 g/L narednih dvadeset dana. Smanjenje sadržaja kiselina, tokom produženih fermentacija, nastaje usled niskog sadržaja šećera što posledično dovodi do smanjene produkcije etanola od strane kvasaca, usled čega su bakterije sirćetnog vrenja, primorane da oksidišu sirćetnu kiselinu do CO<sub>2</sub> i H<sub>2</sub>O. Oksidacija se

odvija ciklusom trikarbonskih kiselina nakon oksidacije etanola i u prisustvu visoke koncentracije kiseonika (El-Salam, 2012). Fermentacije kombuhe, kod kojih se dobija sadržaj kiselina koji nije u opsegu optimalnom za konzumiranje, dovode do proizvodnje kombuha sirćeta i ukusa na sirće koji nije pogodan za svakodnevnu upotrebu (Chen i Liu, 2000).

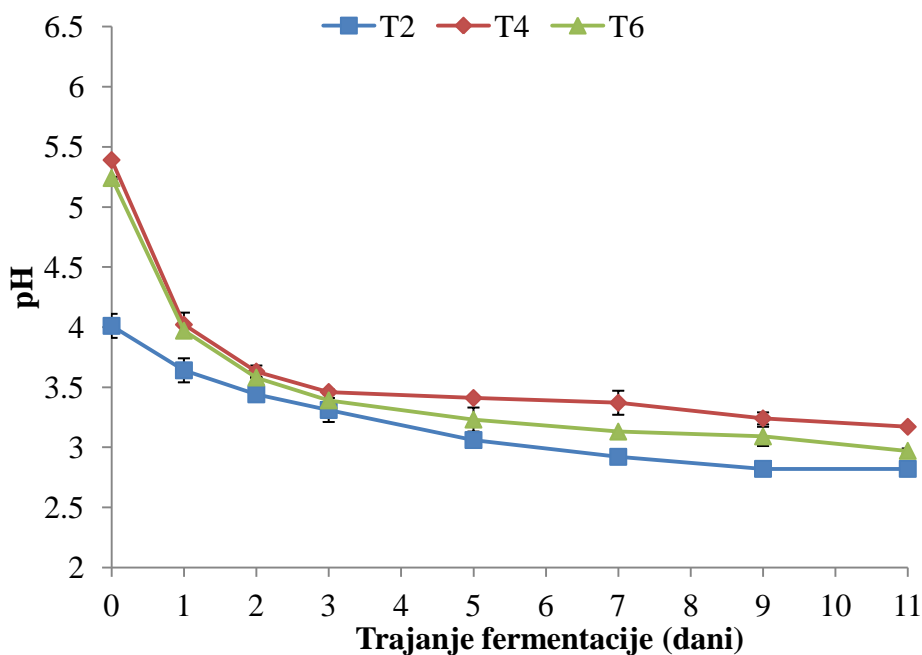


Grafik 5.3. Promena sadržaja ukupnih kiselina ( $\bar{x}_{sr} \pm sd$ ,  $n=3$ ) tokom fermentacija kombuha od gljiva *G. lucidum* (T2), *L. edodes* (T4) i *C. versicolor* (T6).

Tokom fermentacije podloga od medicinski značajnih gljiva kombuha kulturom, nije utvrđena direktna veza između sadržaja ukupnih kiselina i broja ćelija BSV. Iako je broj ćelija BSV nakon trećeg (uzorci T4 i T6), odnosno petog dana (uzorak T2) uglavnom padao, koncentracija ukupnih kiselina je konstantno rasla kod sva tri uzorka. Sa druge strane, u literaturi se navodi da je na tradicionalnoj podlozi utvrđen konstantan porast koncentracije sirćetne kiseline i istovremeno porast broja ćelija BSV (Neffe-Skocińska et al., 2017).

Kao posledica povećanja ukupnih kiselina u tečnosti koja fermentiše, pH vrednost se smanjuje. Najniža inicijalna vrednost pH utvrđena je vrelog vodenog ekstrakta (VVE) gljive *G. lucidum* ( $4,24 \pm 0,03$ ), u odnosu na VVE druge dve gljive, i nakon inokulacije se vrednost smanjila na  $4,01 \pm 0,13$  zbog kiselina prisutnih u

inokulumu (Grafik 5.4). Najviša promena pH vrednosti se dogodila nakon 24 h fermentacije i to 0,37 pH jedinica. Od sedmog do jedanaestog dana, ukupna promena pH bila je 0,15 pH jedinica. Najniža utvrđena vrednost iznosila je  $2,82 \pm 0,06$  devetog dana i do kraja procesa promene nije bilo, iako se koncentracija sintetisanih kiselina i dalje značajno povećavala.



Grafik 5.4. Promena pH vrednosti ( $x_{sr} \pm sd$ ,  $n=3$ ) tokom fermentacija kombuha od gljiva *G. lucidum* (T2), *L. edodes* (T4) i *C. versicolor* (T6).

Inicijalna pH vrednost VVE od gljive *L. edodes* iznosila je  $6,11 \pm 0,05$  i nakon inokulacije se spustila do  $5,39 \pm 0,02$  pH jedinica. Nakon prvog dana fermentacije pad je bio za 1,37 pH jedinica. Od petog do jedanaestog dana, ukupan pad pH vrednosti iznosio je svega 0,29 iako je u tom periodu zabeležen najintenzivniji rast sadržaja ukupnih kiselina. Najniža pH vrednost jedanaestog dana fermentacije bila je  $3,17 \pm 0,03$  pH jedinica.

Vrednost pH kod vrelog vodenog ekstrakta gljive *C. versicolor* bila je  $5,54 \pm 0,03$  i posle inokulacije je pala na  $5,24 \pm 0,01$ . Nakon 24 h od početka fermentacije, pH vrednost je bila niža za 1,27 jedinica. Usporen pad pH vrednosti primećen je već nakon trećeg dana. Poslednjih sedam dana praćenja toka, pH vrednost je pala svega 0,33 pH

jedinica. Istovremeno je u tom periodu sintetisano 26,6 g/L ukupnih kiselina. Najniža utvrđena vrednost pH, poslednjeg dana, bila je  $2,97 \pm 0,02$ .

Literaturni podaci ukazuju na to da je za proizvodnju kombuhe na tradicionalnoj podlozi karakterističan je trend opadanja pH vrednosti u prvim danima fermentacije i stagnacija promene pH na kraju procesa. Velićanski i sar. (2014) su izmerili pH vrednost infuzije matičnjaka u iznosu od 7,05 pH jedinica i 6,94 pH jedinice kod crnog čaja. Nakon inokulacije uočen je pad do 4,70 i 4,60 pH jedinica, redom, usled prisustva kiselina u inokulumu. Tokom prva dva dana pad je bio po oko jednu pH jedinicu, a potom je u narednih pet dana, ukupan pad bio još 0,6 pH jedinica. Malbaša i sar. (2008) su utvrdili intenzivan pad pH vrednosti do trećeg dana fermentacije u podlozi sa crnim čajem, nakon čega pad pH postaje sporiji. Sreeramulu i sar. (2000) su detektovali pad pH od 5 do 2,5 tokom 6 dana nakon čega se stanje nije znatno menjalo do četrnaestog dana. Zhao i sar., (2018) su utvrdili pad pH od 6,71 do oko 4,0 tokom tri dana, i dalji pad do 2,91 desetog dana. Nakon toga, do četrnaestog dana usledilo je povećanje pH vrednosti do 3,74 pH jedinica. Inicijalna pH kod kombuhe od zelenog i crnog čaja bila svega oko 3,07 i nakon 10 dana utvrđen je pad do 2,77 pH jedinica na temperaturi od 25 °C (Neffe-Skocińska et al., 2017).

Uprkos konstantnom povećanju kiselina u podlozi koja fermentiše, usporena promena pH, posle izvesnog vremena, dešava se usled puferskog efekta koji je posledica interakcije između sintetisanih kiselina i minerala prisutnih u tečnosti (Malbaša i sar, 2008). Takođe, reakcija između vodonikovih jona iz organskih kiselina i  $\text{HCO}_3^-$  anjona koji nastaju iz oslobođenog  $\text{CO}_2$  u vodenom rastvoru, doprinose puferskom efektu koji utiče na promene pH vrednosti (Velićanski et al., 2014). Koncentracija  $\text{CO}_2$  u fermentacionoj tečnosti raste, kako fermentacije odmiče, što dalje utiče na porast puferskog kapaciteta. Iz tog razloga se za određivanje kraja procesa fermentacije mora uzimati u obzir koncentracija ukupnih kiselina, a ne pH vrednost kombuha tečnosti (Cvetković et al., 2008).

Tokom 11 dana fermentacije praćene su vizuelne promene koje nastaju u uzorcima. Nakon inokulacije, najsvetliju braon boju imao je uzorak T2, dok su uzorci T4 i T6 bili tamno braon boje. Svi uzorci bili su svetliji na kraju procesa, dok je najveća promena nijanse utvrđena u uzorku T6. Fermentaciona tečnost je tokom procesa bila mutna, sa pojavom taloga. Taloga je najmanje bilo u uzorku T2, dok je značajna

količina primećena u uzorku T4, i nešto manja u uzorku T6. Pojava celulozne navlake utvrđena je drugog dana fermentacije kod sva tri uzorka. Na kraju perioda fermentacije, najdeblja celulozna navlaka na površini bila je u uzorku T6, kog su se pojavljivale deblje i tanje zone. Navlake su posedovale čvrstinu, glatkoću i homogenost.

### **5.2.3. Promena sadržaja saharoze, glukoze, fruktoze i etanola tokom kombuha fermentacija**

Ćelije kvasaca pomoću enzima invertaze ekstracelularno hidrolizuju saharozu do glukoze i fruktoze. Kao krajnji proizvodi fermentacije monosaharida javljaju se etanol i ugljen dioksid (Chen and Liu, 2000; Neffe-Skocińska et al., 2017).

Promene koncentracija saharoze, glukoze, fruktoze i etanola, do kojih je došlo tokom fermentacije kombuha od gljiva *G. lucidum* (uzorak T2), *L. edodes* (uzorak T4) i *C. versicolor* (uzorak T6), prikazane su u tabeli 5.5. Sadržaj saharoze u uzorcima T2, T4 i T6 smanjivao se konstantno tokom fermentacije. Posledično je došlo do povećanja sadržaja glukoze i fruktoze tokom prvog i drugog dana kod uzoraka T2 i T6, dok je porast kod uzorka T4 trajao svega jedan dan. Drugog dana je kod ovog uzorka ustanovljen najizraženiji pad koncentracije saharoze, a došlo je i do pada koncentracije glukoze i fruktoze. Razlog bi mogao biti što je u uzorku T4, drugog dana, utvrđen maksimalan broj ćelija kvasaca (7,83 log CFU/mL), u odnosu na druga dva uzorka. Ovakav rezultat je u skladu sa rezultatima istraživanja koje su sproveli Lin i sar. (2010). Tokom fermentacije vina na podlozi od vrelog vodenog ekstrakta drški gljive *L. edodes* uz dodatak tršćanog šećera, utvrdili intenzivnu hidrolizu saharoze tokom kratkog vremenskog perioda. Za svega dva dana, pad koncentracije saharoze od 25 % je dostizao do oko 1 % i zavisio je od primenjenog soja kvasca *S. cerevisiae*. Pad sadržaja saharoze pratio je porast koncentracije glukoze i fruktoze na početku fermentacije. Potrošnja monosaharida je varirala u zavisnosti od primenjenog soja kvasca za fermentaciju.

Tabela 5.5. Promena ( $x_{sr} \pm sd$ ,  $n=3$ ) koncentracije (g/L) saharoze, glukoze, fruktoze i sadržaja etanola (v/v, %) tokom fermentacije kombuha od medicinskih gljiva *G. lucidum* (T2), *L. edodes* (T4) i *C. versicolor* (T6)

Uzorak	Trajanje fermentacije (dani)						
	0	1	2	3	7	11	
<b>T2</b>	S <sup>1</sup>	64,2±0,5 <sup>a2</sup>	49,6±0,4 <sup>b</sup>	40,8±1,6 <sup>c</sup>	11,8±0,7 <sup>d</sup>	2,3±0,5 <sup>e</sup>	1,3±0,2 <sup>e</sup>
	G	3,2±0,1 <sup>aA3</sup>	10,2±1,1 <sup>bA</sup>	13,5±1,5 <sup>cA</sup>	6,6±0,5 <sup>dA</sup>	1,2±0,6 <sup>eA</sup>	0,0±0,0 <sup>eA</sup>
	F	1,4±0,2 <sup>aB</sup>	9,4±1,2 <sup>bB</sup>	15,2±2,5 <sup>cB</sup>	11,9±1,5 <sup>dB</sup>	7,4±0,8 <sup>dB</sup>	0,0±0,0 <sup>eA</sup>
	E	0,0±0,0 <sup>a</sup>	0,4±0,0 <sup>b</sup>	1,7±0,1 <sup>c</sup>	1,2±0,3 <sup>c</sup>	1,8±0,0 <sup>c</sup>	0,5±0,2 <sup>dA</sup>
<b>T4</b>	S	67,5±0,4 <sup>a</sup>	66,5±0,1 <sup>b</sup>	6,1±0,5 <sup>c</sup>	1,4±0,3 <sup>d</sup>	0,6±0,0 <sup>e</sup>	0,6±0,0 <sup>e</sup>
	G	3,3±0,1 <sup>aA</sup>	5,8±0,1 <sup>bA</sup>	1,7±0,1 <sup>cA</sup>	0,0±0,0 <sup>dA</sup>	0,0±0,0 <sup>dA</sup>	0,0±0,0 <sup>dA</sup>
	F	1,5±0,1 <sup>aB</sup>	6,5±0,1 <sup>bB</sup>	2,3±0,1 <sup>cB</sup>	0,7±0,1 <sup>dB</sup>	0,0±0,0 <sup>eA</sup>	0,0±0,0 <sup>eA</sup>
	E	0,0±0,0 <sup>a</sup>	1,7±0,0 <sup>b</sup>	3,6±0,0 <sup>c</sup>	4,3±0,1 <sup>d</sup>	4,0±0,0 <sup>e</sup>	3,5±0,1 <sup>f</sup>
<b>T6</b>	S	64,9±0,5 <sup>a</sup>	34,8±1,2 <sup>b</sup>	13,2±1,1 <sup>c</sup>	2,5±0,3 <sup>d</sup>	1,0±0,1 <sup>e</sup>	1,1±0,0 <sup>e</sup>
	G	3,1±0,0 <sup>aA</sup>	3,5±0,1 <sup>bA</sup>	3,7±0,2 <sup>bA</sup>	0,0±0,0 <sup>cA</sup>	0,1±0,0 <sup>cA</sup>	0,0±0,0 <sup>cA</sup>
	F	1,2±0,0 <sup>aB</sup>	4,6±0,2 <sup>bB</sup>	6,1±0,4 <sup>cB</sup>	4,8±0,1 <sup>cB</sup>	3,5±0,2 <sup>dB</sup>	0,0±0,0 <sup>eA</sup>
	E	0,0±0,0 <sup>a</sup>	1,3±0,1 <sup>b</sup>	3,1±0,0 <sup>c</sup>	2,1±0,1 <sup>d</sup>	2,5±0,2 <sup>d</sup>	0,4±0,2 <sup>e</sup>

<sup>1</sup> S - koncentracija saharoze, G – koncentracija glukoze, F – koncentracija fruktoze, E – sadržaj etanola. <sup>2</sup>Unutar istog reda vrednosti obeležene različitim malim slovima se statistički značajno razlikuju,  $p \leq 0,05$ , ANOVA, Tukey's HSD. <sup>3</sup> Unutar iste kolone, za svaki od tri ispitvana uzorka posebno (T2, T4 i T6), vrednosti obeležene različitim velikim slovima pokazuju statistički značajnu razliku u sadržaju glukoze i fruktoze,  $p \leq 0,05$ , ANOVA, Tukey's HSD.



Ranija istraživanja pokazuju da se u tradicionalnim kombuha napicima od crnog čaja smanjenje koncentracije saharoze odvijalo sporije nego kod kombuha od gljiva (uzorci T4 i T6) i kod uzoraka nije primećen pad koncentracije glukoze i fruktoze tokom deset dana fermentacije (Lončar et al., 2006). Sa druge strane, Chakarvorty i sar. (2016) utvrdili su porast redukujućih šećera tokom sedam dana, nakon čega je usledilo smanjenje koncentracije. Rezultati dobijeni u ovoj disertaciji pokazuju da je sadržaj glukoze (kod svih uzoraka, izuzev prvog dana kod uzorka T2) tokom celog procesa fermentacije bio niži od sadržaja fruktoze, što sugeriše da kvasci prisutni u kombuhi (*S. cerevisiae* i *P. mansurica*) prvo koriste glukozu kao izvor ugljenika. Lin i sar., (2010) su takođe ustanovili da je tokom proizvodnje vina od drški gljive *L. edodes*, primenom kvasaca *S. cerevisiae* iz četiri različite fermentacione industrije, ustanovljeno da je kod sva četiri slučaja potrošnja glukoze bila brža nego potrošnja fruktoze, što potvrđuje da ovi kvasci poseduju glukofilni karakter. Neffe-Skocińska i sar. (2017) utvrdili su da je koncentracija fruktoze u kombuhi od mešavine crnog i zelenog čaja, bila niža u odnosu na glukozu, međutim, nisu bile poznate vrste kvasaca prisutne u simbiozi. Za izolovanu vrstu kvasca iz roda *Zygosaccharomyces* sp. iz kombuhe utvrđena je brža potrošnja fruktoze u odnosu na glukozu. Isti autori su izolovali drugi kvasac (koji nisu identifikovali) iz druge kombuhe i utvrdili da glukozu metaboliše pre fruktoze (Sievers et al., 1995). Takođe, poznato je da vrste iz roda *Acetobacter* oksidišu glukozu produkujući glukonat, dok fruktozu slabije metabolišu (Chen and Liu, 2000). Krajnja koncentracija šećera se razlikuje od jedne do druge fermentacije usled različitih metaboličkih puteva koji se ne odvijaju uvek na isti način (Chen and Liu, 2000). Stepen iskorišćenja glukoze i fruktoze, kao i prioritet njihovog korišćenja, zavisiće od vrste mikroorganizama prisutnih u starter kulturi i od njihove metaboličke aktivnosti (Sievers et al., 1995).

Kvasci anaerobno fermentišu šećer, produkujući etanol (Chakarvorty et al. 2016). Najviša vrednost etanola je takođe utvrđena kod uzorka T4, trećeg dana (4,3 % v/v), u odnosu na kombuhe T2 i T6. Kod ovog uzorka je utvrđen i najviši broj ćelija kvasaca, drugog dana (Grafik 5.1), što bi mogao da bude razlog više koncentracije etanola u napitku. Maksimalan sadržaj etanola kod uzorka T6 bio je 3,1 % v/v, drugog dana, a kod uzorka T2 1,8 % v/v, sedmog dana fermentacije (Tabela 5.5). Najniži

sadržaj etanola u kombuhi od gljive *G. lucidum* u skladu je sa najmanjim brojem ćelija kvasaca utvrđenim tokom procesa fermentacije (Grafik 5.1).

Supresija broja ćelija i posledično, koncentracije produkovanog etanola, može biti usled prisustva određenih komponenata koje potiču od gljive. Literaturni podaci ukazuju na to da antifungalno dejstvo ispoljavaju fenolne kiseline (p-hidroksibenzoeve i cinaminske kiseline), zatim ganodermin, protein izolovan iz ove gljive, kao i steroli i terpeni prisutni u gljivama iz roda *Ganoderma* (Alves et al., 2013a). Kim i sar. (2004) su ustanovili da je povećanje koncentracije gljive *G. lucidum* do 2 %, u proizvodnji tradicionalnog koreanskog pirinčanog vina (Yakju), dovelo do sniženja produkcije etanola, ali je u svim uzorcima sadržaj etanola bio viši u odnosu na kontrolni uzorak, bez dodate gljive. Nakon dostignutih maksimalnih vrednosti etanola u kombuhama od gljiva, koncentracije etanola su opadale, što je direktna posledica potrošnje etanola od strane BSV koje ga oksiduju i proizvode sirćetnu kiselinu (Chen and Liu, 2000; Chakarvorty i sar. 2016). Poređenjem sa literaturnim podacima, dostignute vrednosti sadržaja etanola kod kombuha od gljiva bile su više od onih utvrđenih za kombuhe od crnog ili zelenog čaja. Najviši sadržaj etanola u tradicionalnoj kombuhi bio je 0,55 % između desetog i dvadesetog dana (Chen and Liu, 2000), 0,28 g/L sedmog dana (Chakarvorty i sar. 2016), nakon čega je usledio pad koncentracije. Desetog dana fermentacije kombuhe Neffe-Skocińska i sar. (2017) utvrdili su maksimalnu količinu etanola od 1,1 %. Liu i sar. (1996) su zaključili da sirćetna kiselina stimuliše kvasce da proizvode etanol. Sadržaj sirćetne kiseline kao i etanola u kombuha napicima od gljiva bili su višestruko viši od njihovog sadržaja u kombuhama proizvedenim na tradicionalnoj podlozi od crnog čaja, kako je navedeno u literaturi.

Prema pravilniku o kategorijama, kvalitetu i deklarisanju rakije i drugih alkoholnih pića (Službeni glasnik RS, 74/2010 i 70/2011), dobijeni kombuha napici od upotrebljenih vrsta medicinskih gljiva, u momentu kada je sadržaj kiselina u napitku na nivou pogodnom za konzumiranje, mogu se klasifikovati u niskoalkoholna pića.

### 5.3. Hemijska karakterizacija kombuha napitaka i polisaharidnih ekstrakata od medicinskih gljiva *G. lucidum*, *L. edodes* i *C. versicolor*

#### 5.3.1 ATR-FTIR analiza kvalitativnog hemijskog sastava uzoraka kombuhe

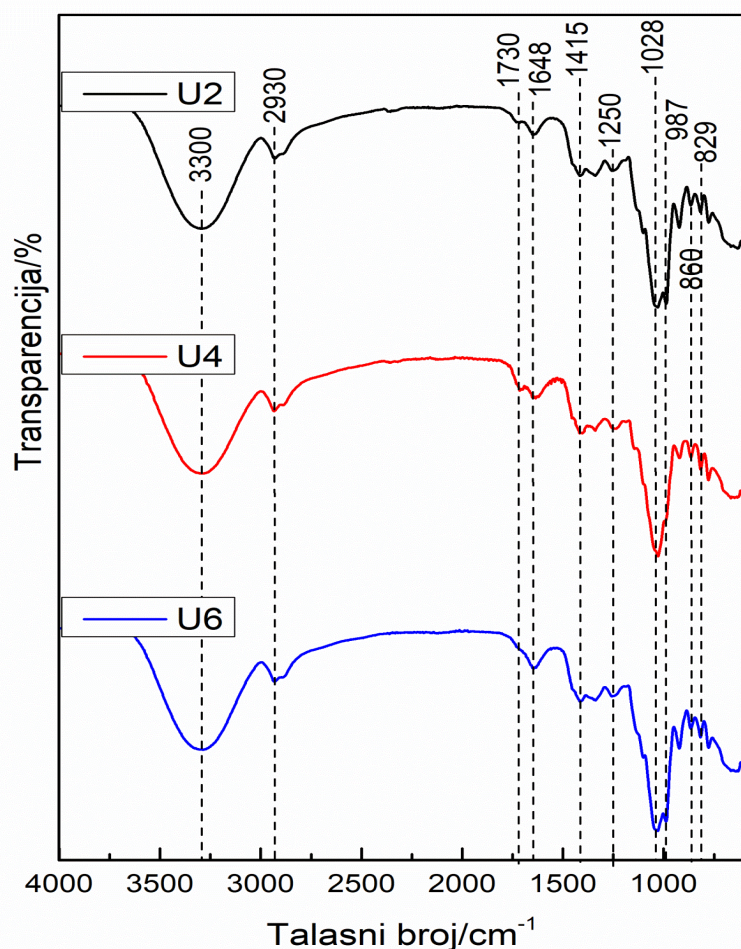
FTIR spektri uzoraka kombuhe od medicinskih gljiva *G. lucidum* (uzorak U2), *L. edodes* (uzorak U4) i *C. versicolor* (uzorak U6), nakon uparavanja u vakuum uparivaču su analizirani u cilju detektovanja razlika u hemijskoj strukturi, a pre svega razlika u sastavu makromolekula. Prema literaturi, FTIR spektroskopija je pouzdan i jednostavan metod za hemijsku karakterizaciju gljiva i njihovih produkata (Synytsya et al., 2009; Klaus et al., 2011; Kozarski et al., 2012). FTIR spektri uzoraka U2, U4 i U6 su prikazani na grafiku 5.5.

Snažna široka apsorpciona traka detektovana na  $\approx 3300\text{ cm}^{-1}$  ukazuje na prisustvo unutar-molekulskih i međumolekulskih interakcija u polisaharidnom lancu (Kozarski et al., 2011) dok se traka na  $2930\text{ cm}^{-1}$  odnosi na  $\text{CH}_2$  vibracije istezanja kod lipida (Mohaček-Grošev et al., 2001; Synytsya et al., 2009; Ren et al., 2014). Apsorpcione trake niskog intenziteta identifikovane u spektralnom regionu  $1720 - 1745\text{ cm}^{-1}$ , ukazuju na prisustvo slobodnih ili esterifikovanih  $\text{C}=\text{O}$  grupa polisaharida u uzorcima (Kozarski et al., 2012; Xiao et al., 2012) i moguće prisustvo uronske kiseline, čiji je apsorpciona traka na  $1730\text{ cm}^{-1}$  (Šandula et al., 1999). Dodatno su asimetrične vibracije istezanja karbonilnih ( $\text{C}=\text{O}$ ) grupa polisaharida detektovane na  $\approx 1648\text{ cm}^{-1}$  (Ren et al., 2014).

Apsorpcione trake na  $\approx 1415\text{ cm}^{-1}$ ,  $\approx 1250\text{ cm}^{-1}$ , kao i između  $3000$  i  $3500\text{ cm}^{-1}$  ukazuju na prisustvo proteina i proteinskih frakcija (Kozarski et al., 2011; Ren et al., 2014). Prisustvo OH grupa fenolnih komponenata je detektovano u regionu između  $1410\text{ cm}^{-1}$  i  $1310\text{ cm}^{-1}$  (Kozarski et al., 2012). Apsorpciona traka na  $\approx 1028\text{ cm}^{-1}$  ukazuje na prisustvo C-O vibracije istezanja kod primarnih alkohola (Gonzaga, 2013).

U srednjem infracrvenom regionu trake od  $800$  do  $1200\text{ cm}^{-1}$ , pretežno CC i CO vibracija istezanja u glikozidnim vezama i piranoidnim prstenovima, potiču od prisustva polisaharida, kao dominantne komponente, različite strukture i sastava. Pikovi detektovani pri  $1150\text{ cm}^{-1}$  ukazuju na C-O-C vibracije glikozidnih veza (Kozarski et al., 2011; Ren et al., 2014). Takođe, na prisustvo  $\beta$ -glikozidnih veza i  $\beta$ -glukana ukazuju specifične trake na  $1080\text{ cm}^{-1}$  i  $1024\text{ cm}^{-1}$  (Sarangi et al., 2006; Synytsya et al., 2009;

Ren et al., 2014), dok trake na  $860 - 850 \text{ cm}^{-1}$  i između  $920 - 930 \text{ cm}^{-1}$  potiču od  $\alpha$ -glikozidnih veza (Synytsya et al., 2009; Ren et al., 2014). Takođe, apsorpcione trake na  $987 \text{ cm}^{-1}$  i  $829 \text{ cm}^{-1}$  pripadaju, najverovatnije, različitim polisaharidima koji su identifikovani u gljivama (Synytsya et al., 2009). ATR-FTIR analiza vakuum uparenih uzoraka kombuhe od medicinskih gljiva, ukazuje na dominantnu polisaharidnu frakciju. Takođe je u spektru utvrđeno i prisustvo manjih količina proteina, lipida, fenola i primarnih alkohola.



Grafik 5.5. FTIR spektri kombuha napitaka od gljiva *G. lucidum* (U2), *L. edodes* (U4) i *C. versicolor* (U6), dobijenih uparavanjem pod vakuumom.

Razlike među uzorcima se javljaju u spektralnom regionu  $1720 - 1745 \text{ cm}^{-1}$  koji se odnosi na prisustvo C=O grupa polisaharida (Xiao et al., 2012). Ove trake se pojavljuju u uzorku U2, dok su kod uzorka U4 više izražene. U uzorku U6, apsorpcione

trake u ovom regionu su izostale. Vibracije pri  $1150\text{ cm}^{-1}$  koje ukazuju na prisustvo glikozidnih veza, detektovane su jedino kod uzorka U4. U uzorku U4, nije detektovana traka pri  $987\text{ cm}^{-1}$  koja ukazuje na prisustvo polisaharida. Na osnovu utvrđenih razlika među uzorcima, može se zaključiti da se uzorci razlikuju u pojedinim polisaharidnim ili monosaharidnim komponentama.

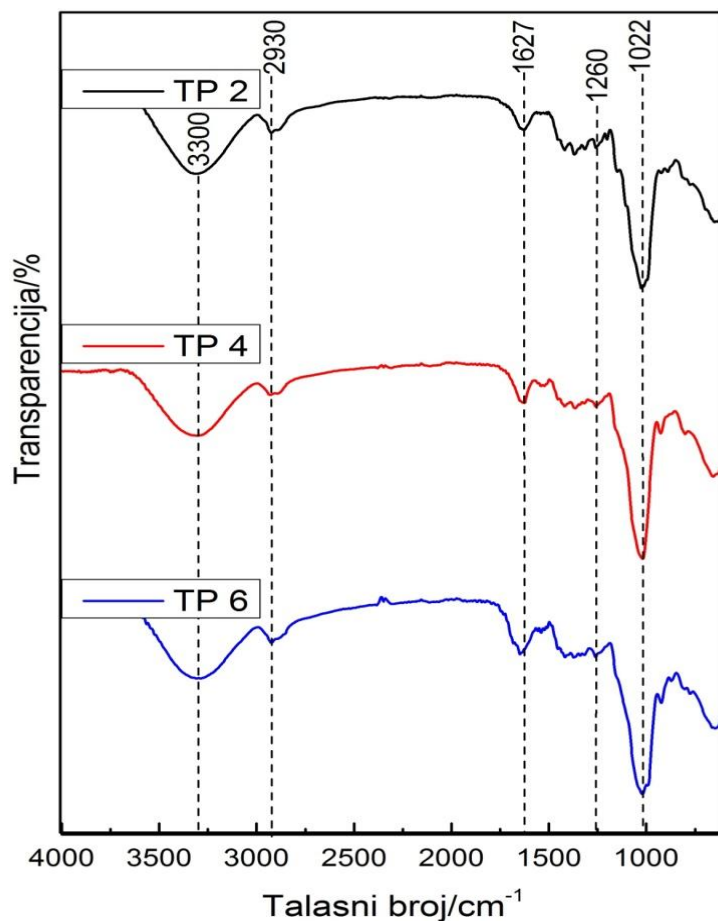
### **5.3.2. ATR-FTIR analiza kvalitativnog hemijskog sastava polisaharidnih ekstrakata iz kombuha**

Nakon fermentacije i uparavanja kombuha uzoraka od medicinskih gljiva, primenjena je precipitacija 96 % etanolom u cilju odvajanja polisaharidnih komponenata i uklanjanja jedinjenja malih molekulskih masa (Kozarski et al., 2012). Na osnovu FTIR analize, zapaža se odsustvo pika između  $1720 - 1745\text{ cm}^{-1}$ , odnosno odsustvo pojedinih C=O grupa polisaharida, koje su bile detektovane u uzorcima U2 i U4 (Kozarski et al., 2012; Xiao et al., 2012) pre precipitacije. Dodatno, promene u sastavu polisaharida nakon precipitacije su primećene usled promena položaja traka karakterističnih za polisaharide, u uzorcima U2 i U4, sa  $1648\text{ cm}^{-1}$  na  $1627\text{ cm}^{-1}$ , u uzorcima TP2 i TP4 (Grafik 5.6) što ukazuje na prisustvo proteina (Kozarski et al., 2011; Ren et al., 2014). FTIR spektri uparenih kombuha napitaka (Grafik 5.5.) pokazuju mnogo izraženije trake u opsegu  $1000 - 600\text{ cm}^{-1}$ . Šta više, većina traka u ovom opsegu nije bilo detektovano (npr. trake na  $987$  i  $829\text{ cm}^{-1}$ ) kod uzoraka dobijenih precipitacijom pomoću etanola (Grafik 5.6). Ove trake pripadaju frakciji ugljenih hidrata, te njihovo odsustvo kod uzoraka koji su dobijeni precipitacijom pomoću etanola ukazuje na to da je uklonjen deo polisaharida manjih molekulskih masa.

Kod sva tri polisaharidna uzorka je utvrđeno prisustvo polisaharida  $3300\text{ cm}^{-1}$  (Kozarski et al., 2011),  $\beta$ -glukana ( $1024\text{ cm}^{-1}$ ,  $1317\text{ cm}^{-1}$ ) (Sarangi et al., 2006; Synytsya, 2009) i  $\alpha$ -glukana ( $920\text{ cm}^{-1}$ ) (Ren et al., 2014). Prisustvo polifenola je potvrđeno u regionu  $1410 - 1310\text{ cm}^{-1}$  (Kozarski et al., 2012), lipida u regionu  $2930\text{ cm}^{-1}$  (Mohaček-Grošev et al., 2001; Ren et al., 2014) dok su proteini i proteinske frakcije detektovane pri  $\approx 1415\text{ cm}^{-1}$  i između  $3000$  i  $3500\text{ cm}^{-1}$  (Kozarski et al., 2011; Ren et al., 2014).

Među uzorcima, koji su na isti način pripremljeni, primećuju se razlike kod uzorka TP6 kod kog nije došlo do promene u sastavu polisaharida, na šta ukazuje traka na  $\approx 1650\text{ cm}^{-1}$ . Sa druge strane, jedino je u uzorku TP2 detektovana traka pri  $1200\text{ cm}^{-1}$  koja je karakteristična za vibracije prstena kod šećera, kao i traka pri  $1150\text{ cm}^{-1}$  koja ukazuje na prisustvo C-O-C glikozidnih veza (Kozarski et al., 2011; Ren et al., 2014).

FTIR analiza je pokazala da se kod uparenog uzorka nakon alkoholne precipitacije postiže izdvajanje polisaharidne frakcije i njeno prečišćavanje od ugljenih hidrata male molekulske mase. Utvrđeno je da su u uzorcima zadržani polifenoli, proteini i lipidi. Takođe je utvrđena razlika u polisaharidnom sastavu među uzorcima koji su pripremljeni na isti način nakon fermentacije kombuhom, što je rezultat različitog sastava gljiva upotrebljenih za pripremu podloge za fermentaciju.



Grafik 5.6. FTIR spektri polisaharidnih ekstrakata iz kombuha napitaka od gljiva *G. lucidum* (TP2), *L. edodes* (TP4) i *C. versicolor* (TP6), dobijenih uparavanjem pod vakuumom i etanolnom precipitacijom.

### 5.3.3. Kvantitativni hemijski sastav uzoraka kombuhe

Na hemijski sastav kombuha napitaka uticaće izbor podloge za fermentaciju, dužina procesa fermentacije, temperatura, početna koncentracija saharoze kao i sastav kombuha inokuluma (Jayabalan et al., 2014).

U trenutku postizanja željene kiselosti (3 g/L) kombuha napitka od korišćenih medicinskih gljiva, gravimetrijski je određen sadržaj suve materije u uzorcima i prikazan u tabeli 5.6. Najveći sadržaj suve materije detektovan je u uzorku T2 (kombuhi od gljive *G. lucidum*),  $49,91 \pm 0,02$  mg/mL, zatim u uzorku T6 (kombuha od gljive *C. versicolor*),  $36,10 \pm 0,30$  mg/mL, a najniža u uzorku T4 (kombuha od gljive *L. edodes*),  $16,20 \pm 2,20$  mg/mL. Razlika među uzorcima bila je statistički značajna. Na osnovu sadržaja suve materije u tečnim uzorcima, izračunat je sadržaj polifenola i flavonoida i izražen u mg GAE/g suve materije, odnosno mg CE/g suve materije.

U tečnim uzorcima T4, T2 i T6, sadržaj ukupnih polifenola iznosio je  $0,19 \pm 0,01$ ,  $0,24 \pm 0,01$  i  $0,33 \pm 0,01$  mg GAE/mL uzorka, redom (Tabela 5.6) Proračun na osnovu suve materije u uzorcima, pokazao je da je sadržaj polifenola u kombuhi T2  $4,91 \pm 0,23$  mg GAE/g, značajno viši u kombuhi T6 i iznosi  $9,17 \pm 0,39$  mg GAE/g i najviši u kombuhi T4  $11,71 \pm 0,40$  mg GAE/g.

U kombuha proizvodima od gljiva je sadržaj flavonoida bio značajno niži od sadržaja ukupnih polifenola (Tabela 5.6). U uzorcima T2 i T4 detektovano je  $0,011 \pm 0,001$  mg CE/mL, dok je u uzorku T6 bilo  $0,024 \pm 0,007$  mg CE/mL. Proračun na osnovu suve materije u uzorcima pokazao je sadržaj od  $0,21 \pm 0,06$  mg CE/g,  $0,68 \pm 0,24$  mg CE/g i  $0,67 \pm 0,35$  mg CE/g kod uzoraka T2, T4 i T6, redom.

Tabela 5.6. Sadržaj suve materije, polisaharida, polifenola i flavonoida u kombuha napicima

Uzorci	T2 <sup>1</sup>	T4	T6
Sadržaj suve materije			
(mg/mL)	49,91 ± 0,02 <sup>a2,3</sup>	16,20 ± 0,30 <sup>b</sup>	36,10 ± 2,20 <sup>c</sup>
Sadržaj polisaharida			
(mg/mL)	47,11 ± 0,42 <sup>a</sup>	7,97 ± 0,24 <sup>b</sup>	35,16 ± 0,18 <sup>c</sup>
(mg/g)	943,90 ± 8,41 <sup>a</sup>	491,97 ± 14,8 <sup>b</sup>	973,96 ± 5,95 <sup>a</sup>
Sadržaj polifenola			
(mg GAE/mL)	0,24 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,19 ± 0,02 <sup>b</sup>	0,33 ± 0,01 <sup>c</sup>
(mg GAE/g)	4,91 ± 0,23 <sup>a</sup>	11,71 ± 0,40 <sup>b</sup>	9,17 ± 0,39 <sup>c</sup>
Sadržaj flavonoida			
(mg CE/ml)	0,011 ± 0,001 <sup>a</sup>	0,011 ± 0,001 <sup>a</sup>	0,024 ± 0,007 <sup>a</sup>
(mg CE/g)	0,21 ± 0,06 <sup>a</sup>	0,68 ± 0,24 <sup>b</sup>	0,67 ± 0,35 <sup>b</sup>

<sup>1</sup>T2 - uzorak kombuhe od gljive *G. lucidum* pri konzumnoj kiselosti od 3 g/L; T4 - uzorak kombuhe od gljive *L. edodes* pri konzumnoj kiselosti od 3 g/L; T6 - uzorak kombuhe od gljive *G. lucidum* pri konzumnoj kiselosti od 3 g/L. <sup>2</sup>Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± standardna devijacija, (n=3) <sup>3</sup>Unutar istog reda vrednosti obeležene različitim slovima se statistički značajno razlikuju,  $p \leq 0,05$ , ANOVA, Tukey's HSD.

Nakon uparavanja uzoraka pod vakuumom, utvrđeno je višestruko smanjenje u sadržaju ukupnih polifenola (Tabela 5.7). Sadržaj kod uzorka U2 bio je  $0,29 \pm 0,00$  mg GAE/g, kod uzorka U4  $0,65 \pm 0,22$  mg GAE/g i u uzorku U6  $2,89 \pm 0,39$  mg GAE/g. Polifenoli su prisutni u značajnim koncentracijama u pojedinim medicinski značajnim gljivama. Smanjenje u sadržaju bi moglo biti usled delimičnog isparavanja ovih komponenata tokom uparavanja uzoraka kombuhe (Bai et al., 2013; Taskin et al., 2013). Sa druge strane, nakon uparavanja, nije utvrđena statistički značajna promena u sadržaju flavonoida kod sve tri kombuhe. U uparenom uzorku U2 sadržaj flavonoida iznosio je  $0,24 \pm 0,02$  mg CE/g, u uzorku U4  $0,58 \pm 0,01$  mg CE/g, i u uzorku U6 koncentracija bila  $0,72 \pm 0,05$  mg CE/g.



Tabela 5.7. Ukupan sadržaj polisaharida, glukana, polifenola i flavonoida u vakuum uparenim uzorcima kombuha napitaka

Uzorci	U2 <sup>1</sup>	U4	U6
Sadržaj polisaharida (mg/g)	922,63 ± 36,25 <sup>a2,3</sup>	495,00 ± 2,12 <sup>b</sup>	995,00 ± 0,00 <sup>a</sup>
Sadržaj glukana (mg/g)	242,20 ± 0,40 <sup>a</sup>	166,80 ± 0,22 <sup>b</sup>	237,00 ± 0,03 <sup>a</sup>
Sadržaj polifenola (mg GAE/g)	0,29 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,65 ± 0,22 <sup>b</sup>	2,89 ± 0,39 <sup>c</sup>
Sadržaj flavonoida (mg CE/g)	0,24 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,58 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,72 ± 0,05 <sup>c</sup>

<sup>1</sup>U2 – vakuum uparen uzorak kombuhe od gljive *G. lucidum* pri konzumnoj kiselosti od 3 g/L; U4 - vakuum uparen uzorak kombuhe od gljive *L. edodes* pri konzumnoj kiselosti od 3 g/L; U6 - vakuum uparen uzorak kombuhe od gljive *G. lucidum* pri konzumnoj kiselosti od 3 g/L.

<sup>2</sup>Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± standardna devijacija (n=3). <sup>3</sup>Unutar istog reda vrednosti obeležene različitim slovima se statistički značajno razlikuju,  $p \leq 0,05$ , ANOVA, Tukey's HSD.

Polifenoli nastaju kao sekundarni metaboliti gljiva i biljaka sa ciljem da se zaštite od napada insekata, virusa, bakterija, kao i od štetnog delovanja UV zraka (Heleno et al., 2015). Na sadržaj ukupnih polifenola će, zato, uticati i uslovi tokom rasta, vrsta gljive kao i njeno poreklo (Carneiro et al., 2013). Poznato je da fenolne komponente poseduju visoku antioksidativnu moć zbog sposobnosti da hvataju slobodne radikale i aktivne slobodne kiseonične vrste (hidroksil radikale, superoksid slobodne radikale, nascentni kiseonik i dr.) (Jayabalan et al., 2008b). Analiza suvog komercijalnog praha (suplementa) gljive *L. edodes* sadržao je 0,0069 mg/g ukupnih polifenola (Carneiro et al., 2013). Termički tretman gljive *L. edodes* uticao je na porast koncentracije ukupnih slobodnih polifenola u gljivi od 0,29 mg GAE/g do 0,546 mg GAE/g nakon tretmana na 121 °C tokom 30 minuta, kao i na porast vezanih polifenola od 0,016 do 0,03 mg GAE/g pri tretmanu 121 °C, 15 minuta (Choi et al., 2006). Polarniji rastvarači, voda i metanol, doveli su do bolje ekstrakcije polifenola iz suve gljive *L. edodes*, pa je tako najviši sadržaj utvrđen u metanolnom ekstraktu (4,79 mg

GAE/g), potom u vodenom ekstraktu (1,33 mg GAE/g), petrolej etarskom ekstraktu (0,44 mg GAE/g) i najmanje u etil acetatnom ekstraktu (0,03 mg GAE/g) (Cheung et al., 2003). Kozarski i sar. (2012) su u precipitiranim i dijalizovanim vrelin vodenim ekstraktima utvrdili sadržaj polifenola od 3,3, 1,2 i 1,8 mg GAE/g kod gljiva *G. lucidum*, *L. edodes* i *T. versicolor*, redom. Sadržaj ukupnih polifenola u metanolnom ekstraktu gljive *C. versicolor* bio je 23,28 mg GAE/g, dok je ekstraktima gljive *G. lucidum* sadržaj bio od 47,25 do 55,96 mg GAE/g (Mau et al., 2002). Siu i sar. (2014) su u vrelin vodenim ekstraktima polisaharida, nakon dijalize, utvrdili sadržaj ukupnih polifenola kod gljive *L. edodes* u količini od 30 mg GAE/g i u gljivi *T. versicolor*, 26,7 mg GAE/g. Etanolni ekstrakti od gljiva *G. lucidum*, koje su gajene na supstratu od slame, imali su sadržaj polifenola od 28,06 do 52,15 mg GAE/g, dok je ekstrakt komercijalnog soja sadržao 33,42 mg GAE/g ukupnih polifenola (Ćilerdžić et al., 2014). Saltarelli i sar., (2009) su u etanolnim ekstraktima micelije gljive *G. lucidum* detektovali polifenole (u količini od 16,5 - 27,9 mg kafe kiseline/g ekstrakta) kao glavne komponente odgovorne za antioksidativne karakteristike ekstrakata.

Velićanski i sar. (2014) su zabeležili promenu u sadržaju ukupnih polifenola tokom fermentacije kombuhe od crnog čaja i tokom celog procesa sadržaj je bio viši (0,468 – 0,574 mg GAE/mL) nego u gotovim napicima kombuha od gljiva. Paralelno su ovi autori u kombuhi od matičnjaka detektovali sadržaj od 0,709 – 0,85 mg GAE/mL tokom sedam dana fermentacije i ruzmarinsku kiselinu, kao dominantnu. Chakravorty i sar., (2016) su utvrdili da je došlo do konstantnog povećanja sadržaja ukupnih polifenola od oko 1,5 mg GAE/g uzorka do oko 2,25 mg GAE/g uzorka, tokom 21 dan fermentacije. Sun i sar. (2015) su, takođe, detektovali konstantno povećanja sadržaja polifenola tokom dvanaest dana fermentacije kombuhe od crnog čaja i mešavine crnog čaja i soka od pšenice u različitim odnosima. Najviša vrednost je bila između 30 - 35 mg GAE/ml. Shahbazi i sar. (2018) su ustanovili da je nakon početnog smanjenja sadržaja polifenola u aromatizovanim kombuhama, sadržaj na kraju procesa bio značajno viši. Kombuha aromatizovana cimetom je sadržala najviše ukupnih polifenola (0,582 mg GAE/ml). Statistički značajno povećanje sadržaja polifenola je zabeleženo prvog dana kod kombuha od crnog čaja sa Šri Lanke i kineskog zelenog čaja, a nakon toga, do sedmog dana sadržaj je ostao nepromenljiv. Najviši početni i krajnji sadržaj je zabeležen kod kombuhe od crnog čaja sa Šri Lanke, između 30 i 40 mg GAE/g

(Watawana et al., 2018). Na povećanje fenolnih komponenata tokom fermentacije, biotransformacijom fitohemikalija utiču mikroorganizmi, prisutni u inokulumu kombuhe, svojim enzimima (Chu et al., 2006). Dokazano je da je aktivacijom katalaze, kvasac *Candida tropicalis* degradirao fenolna jedinjenja u otpadnim vodama (Ettayebi i sar., 2003). Takođe, flavonoidi su podložni cepanju ugljenikovog prstena pod uticajem intestinalnih bakterija iz rodova *Clostridium*, *Bacteroides* i *Eubacterium*, pri čemu nastaju fenolne kiseline (Rachner et al., 2004). Sa druge strane, Watawana i sar. (2017) nisu našli značajnu razliku u sadržaju polifenola nakon sedam dana fermentacije u kombuhama pripremljenim sa različitim zaslađivačima. Sadržaj se kretao od 0,00386 do 0,00466 mg GAE/mL, što je niže nego u sve tri kombuhe od gljiva. Takođe su i Gramza-Michałowska i sar. (2016) utvrdili da na sadržaj ukupnih polifenola ne utiču mikroorganizama u kombuha kulturi, jer je utvrđeno da tokom fermentacije nije došlo do njegove promene, već je sadržaj ukupnih polifenola zavisio od vrste čaja koji je upotrebljen za fermentaciju. Dodatno, aroma i gorčina fermentisanih napitaka velikim delom zavise od sadržaja i vrste fenola kao i od sadržaja etanola i temperature pri kojoj se piće konzumira (Leskosek-Cukalović et al., 2010).

Tokom dvadeset jednog dana fermentacije crnog čaja kombuha kulturom, sadržaj flavonoida se povisio za 24 % sa najvišim dostignutim sadržajem oko 15 µg QE/100 mg, poslednjeg dana. Povišenje u sadržaju najverovatnije nastaje usled enzimske aktivnosti mikroorganizama iz inokuluma kombuhe usled čega se složeni molekuli flavonoida razgrađuju do prostijih i dovode do sveukupnog povećanja njihovog sadržaja (Chakravorty et al., 2016). Najviši dostignuti sadržaj je niži u poređenju sa koncentracijom flavonoida kod sva tri uzorka kombuha od gljiva, u momentu dostizanja konzumne kiselosti. Gaggia i sar. (2019) su detektovali povišenje u ukupnom sadržaju flavonoida jedino nakon sedam dana fermentacije zelenog čaja, dok je četrnaestog dana sadržaj bio niži nego pre fermentacije. Kod crnog čaja i rooibos čaja nije zabeleženo povećanje u sadržaju ukupnih flavonoida tokom četrnaest dana fermentacije. Ipak, sadržaj je u ove tri podloge, sve vreme trajanja fermentacije, bio visok i kretao od 13,87 – 18,49 mg CE/g suve materije. Povišenje sadržaja flavonoida dvanaestog dana fermentacije je detektovano i u aromatizovanim kombuha uzorcima, a najviši sadržaj je utvrđen kod kombuhe aromatizovane cimetom (0,00312 mg CTE /ml) (Shahbazi et al., 2018).

Ćilerdžić i sar. (2014) su utvrdili da je u etanolnim ekstraktima gljive *G. lucidum*, sadržaj flavonoida bio od 0,18 mg - 3,53 mg QE/g u sojevima gajenim na pšeničnoj slami, dok je ekstrakt komercijalnog soja sadržao 3,58 mg QE/g. Metanolni ekstrakt gljive *C. versicolor* sadržao je 4,3 mg CE/g ukupnih flavonoida (Matijašević, 2017). Palacios i sar. (2011) su u osam vrsta jestivih gljiva *Agaricus bisporus*, *Boletus edulis*, *Calocybe gambosa*, *Cantharellus cibarius*, *Craterellus cornucopioides*, *Hygrophorus marzuolus*, *Lactarius deliciosus* i *Pleurotus ostreatus* utvrdili sadržaj flavonoida u opsegu od 0,9 do 3,0 mg CE/g.

U uzorcima kombuha od gljiva određen je sadržaj ukupnih polisaharida, u trenutku kada je dostignuta konzumna kiselost. Primena uparavanja pod vakuumom nije uticala na statistički značajnu promenu u sadržaju ukupnih polisaharida među uzorcima T2 i U2, T4 i U4 i T6 i U6 (Tabele 5.6 i 5.7) Sadržaj u uzorcima T2 i U2 iznosio je  $943,90 \pm 8,41$  i  $922,63 \pm 36,25$  mg/g, redom. U uzorcima kombuhe od gljive *C. versicolor*, T6 i U6, sadržaj ukupnih polisaharida iznosio je  $973,96 \pm 5,95$  i  $995 \pm 0,0$  mg/g uzorka, redom. Sadržaj polisaharida u uzorcima T4 i U4 iznosio je  $491,97 \pm 14,8$  i  $495,00 \pm 2,12$  mg/g uzorka, redom. Nije pronađena statistički značajna razlika između uzorka od gljive *G. lucidum* i *C. versicolor*. Međutim, u kombuhi od gljive *L. edodes* (U4) sadržaj ukupnih polisaharida je bio statistički značajno niži u odnosu na druge dve gljive. Primenom Megazyme  $\beta$ -glukan kita (Megazyme International, Wicklow, Ireland) određen je sadržaj ukupnih glukana u uparenim uzorcima. Rezultati pokazuju da je sadržaj bio najviši u uzorku U2,  $242,2 \pm 0,40$  mg/g, zatim u uzorku U6  $237,0 \pm 0,03$  mg/g i u zorku U4  $166,8 \pm 0,22$  mg/g. Statistički značajna razlika je utvrđena kod uzorka U4 u odnosu na druga dva uzorka.

Ranija istraživanja su pokazala da je delimično prečišćeni vreli vodeni ekstrakt spora gljive *G. lucidum* sadržao 276 mg/g ukupnih polisaharida, dok je sadržaj ukupnih glukana bio 208 mg/g (Kozarski et al., 2011). Metanolni ekstrakt gljive *C. versicolor* sadržao je 351,0 mg/g ukupnih polisaharida, a od toga 203,0 mg/g ukupnih glukana (Matijašević, 2017). Siu i sar. (2014) su u vrelim vodenim ekstraktima polisaharida, nakon dijalize, utvrdili sadržaj ukupnih polisaharida 508 mg/g i 581 mg/g kod gljiva *L. edodes* i *C. versicolor*, redom. Dijalizovani vreli vodeni ekstrakti gljiva *G. lucidum*, *L. edodes* i *C. versicolor* sadržali su 566, 782 i 839 mg/g, redom, dok je sadržaj ukupnih glukana u istim uzorcima bio 471, 426 i 366 mg/g ekstrakta, redom (Kozarski et al.,

2012). Sari i sar. (2017) su utvrdili da je sadržaj ukupnih glukana u klobuku gljive *L. edodes* bio 205,39 mg/g dok je nešto viši sadržaj bio u dršci ove gljive (267,49 mg/g). U istom istraživanju, gljiva *T. versicolor* sadržala je značajno više ukupnih glukana 611,94 mg/g. Kod sva tri uzorka, sadržaj  $\beta$ -glukana bio je dominantan i kretao se od 94,617 – 99,337 %. U drugom istraživanju, u različitim sojevima gljive *L. edodes* sadržaj glukana je značajno varirao. Najviši sadržaj utvrđen je u dršci i varirao je u opsegu od 325,1 do 578,1 mg/g, u klobuku se kretao od 291,6 do 463 mg/g, dok je u micelijumu utvrđen najniži sadržaj u količini od 224,8 do 348,7 mg/g (Bak et al.,2018). Lee i sar. (2005) utvrdili su da je od 222,4 mg/g ukupnih glukana u gljivi *G. lucidum* 160,8 mg/g rastvorljivo u vodi, u gljivi *L. edodes* od ukupnih 339,9 mg/g u vodi je bilo rastvorljivo 202,1 mg/g, dok je u gljivi *C. versicolor* od ukupnih 226,9 mg/g, rastvorljivo svega 108,5 mg/g.

Kod uzorka kombuhe od gljiva *G. lucidum* i *C. versicolor*, sadržaj ukupnih polisaharida je bio značajno viši nego što se može naći u literaturi, najverovatnije iz razloga što je primenjenom metodom određen i sadržaj disaharida, saharoze, koja je dodata u podlogu na početku fermentacije i monosaharida, tj. glukoze i fruktoze, koji su produkt metabolizma kvasaca, kao i iz razloga što ekstrakti nisu podvrgavani procesima prečišćavanja. Sadržaj ukupnih glukana, koji je utvrđen u uzorcima kombuha od gljiva, u skladu je sa literaturnim podacima, što nam ukazuje na to da su bioaktivni glukani preneti iz gljiva u konačan proizvod, tj. kombuha napitak.

#### **5.3.4. Kvantitativni hemijski sastav polisaharidnih ekstrakata iz kombuha**

Nakon alkoholne precipitacije, pomoću fenol-sumporne metode, određen je sadržaj polisaharida u uzorcima (Tabela 5.8). Zapaženo je da se ovim postupkom smanjio sadržaj ukupnih polisaharida u sva tri uzorka, u odnosu na uzorke uparene pod vakuumom (Tabela 5.7), najverovatnije usled uklanjanja ugljenih hidrata male molekulske mase (Kozarski et al., 2012). Promena u polisaharidnom sastavu uzoraka prethodno je utvrđena i FTIR analizom. Kao i kod uzoraka pripremljenih uparavanjem (Tabela 5.7), i ovde je potvrđeno da je sadržaj ukupnih polisaharida najmanji u kombuhi poreklom od gljive *L. edodes* (TP4) i da se statistički značajno razlikuje od količine

polisaharida u uzorcima poreklom od *G. lucidum* (TP2) i *C. versicolor* (TP6). Između uzoraka TP2 i TP6 nije detektovana statistički značajna razlika.

Alkoholna precipitacija uzoraka uparenih u vakuumu je dovela do značajnog povećanja sadržaja polifenola i flavonoida. Poznato je da polifenoli, kojima pripadaju flavonoidi, fenolne kiseline, lignani i stilbeni, postoje kao aglikoni ili esterifikovani sa ugljenim hidratima (Ding et al., 2018). Alkoholna precipitacija je najverovatnije uticala na raskidanje veza polifenola sa polisaharidima pa time i na povećanje njihove koncentracije. Najveći sadržaj polifenola detektovan je u uzorku TP6, potom u TP2 i najmanji u TP4. Između ispitivanih uzoraka je postojala statistički značajna razlika (Tabela 5.8). Sadržaj flavonoida u uzorcima TP2 i TP6 statistički se nije razlikovao, dok je u uzorku TP4 sadržaj bio statistički značajno niži.

Tabela 5.8. Sadržaj ukupnih polisaharida, polifenola i flavonoida polisaharidnih ekstrakata iz kombuha proizvoda

Uzorak	TP2 <sup>1</sup>	TP4	TP6
Sadržaj polisaharida (mg/g)	763,39 ± 7,52 <sup>a2,3</sup>	363,50 ± 19,10 <sup>b</sup>	745,00 ± 9,33 <sup>a</sup>
Sadržaj polifenola (mg GAE/g)	18,88 ± 2,00 <sup>a</sup>	2,37 ± 0,67 <sup>b</sup>	27,13 ± 2,36 <sup>c</sup>
Sadržaj flavonoida (mg CE/g)	3,38 ± 0,08 <sup>a</sup>	1,03 ± 0,03 <sup>b</sup>	3,37 ± 0,20 <sup>a</sup>

<sup>1</sup>TP2 - uzorak kombuhe od gljive *G. lucidum* uparen pod vakuumom i precipitiran etanolom pri konzumnoj kiselosti od 3 g/L; T4 - uzorak kombuhe od gljive *L. edodes* uparen pod vakuumom i precipitiran etanolom pri konzumnoj kiselosti od 3 g/L; T6 - uzorak kombuhe od gljive *G. lucidum* uparen pod vakuumom i precipitiran etanolom pri konzumnoj kiselosti od 3 g/L.

<sup>2</sup>Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± standardna devijacija (n=3). <sup>3</sup>Unutar iste kolone vrednosti obeležene različitim slovima se statistički značajno razlikuju,  $\alpha \leq 0,05$ , ANOVA, Tukey's HSD.

## 5.4. Biološka svojstva kombuha proizvoda od medicinskih gljiva *G. lucidum*, *L. edodes* i *C. versicolor*

### 5.4.1. Antioksidativna svojstva kombuha proizvoda

#### 5.4.1.1. Sposobnost hvatanja DPPH radikala

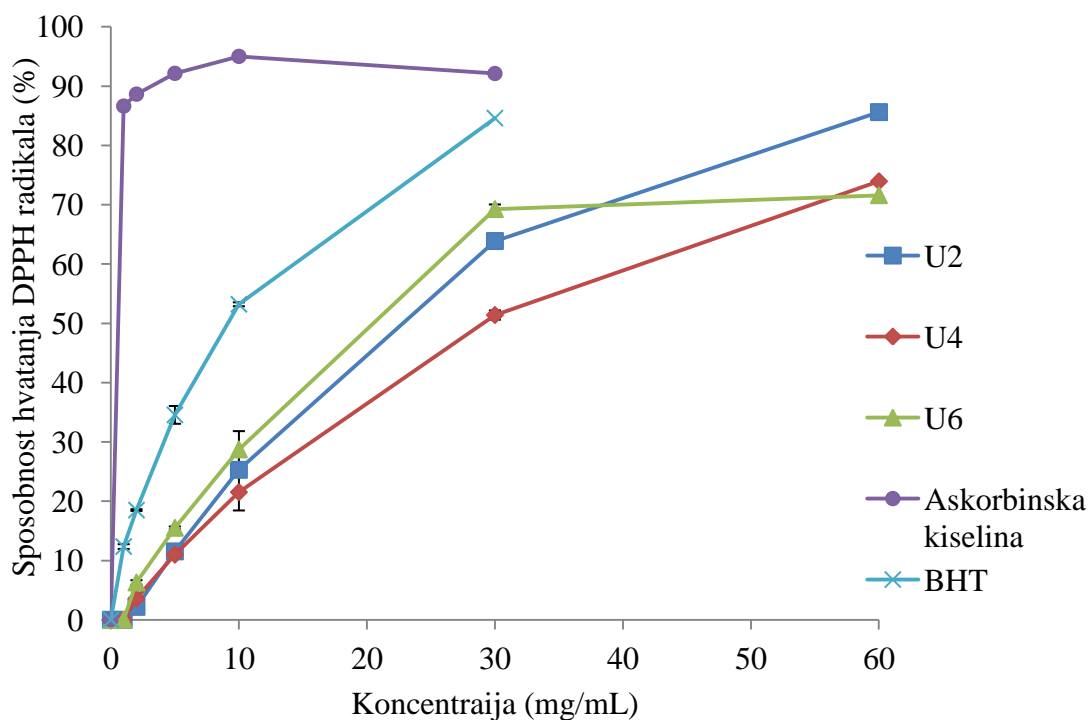
Negativan uticaj slobodnih radikala se manifestuje na makromolekulima kao što su proteini, lipidi i DNK molekuli. Iz tog razloga se smatraju jednim od najznačajnijih izazivača velikog broja hroničnih bolesti (Chandrasekara et al., 2011). Za utvrđivanje moći prirodnih komponenata da hvataju slobodne radikale, veoma je rasprostranjen metod sa slobodnim DPPH radikalima. Kada antioksidant preda proton, DPPH gubi karakter slobodnog radikala, što se spektrofotometrijski može detektovati, usled promene boje od tamnoljubičaste do bezbojne (Sun et al., 2014).

Sposobnost hvatanja slobodnih DPPH radikala tečnih kombuha napitaka od gljive *G. lucidum* (T2) iznosila je  $83,37 \pm 0,73$  %, od gljive *L. edodes* (T4)  $22,41 \pm 1,02$  % i od gljive *C. versicolor* (T6)  $58,18 \pm 0,18$  %. Prethodno je predstavljen sadržaj suve materije koji je kod uzoraka T4 i T6 iznosio  $16,2 \pm 0,30$  mg/mL odnosno  $36,1 \pm 2,20$  mg/mL što je statistički značajno niže nego što je izmerena kod uzorka T2,  $49,91 \pm 0,02$  mg/mL. Regresionom analizom je utvrđeno da u tečnim uzorcima postoji veoma visoka, statistički značajna, korelacija između sadržaja suve materije i sposobnosti hvatanja slobodnih radikala ( $r = 1$ ,  $p \leq 0,05$ ). Korelacija između sposobnosti hvatanja slobodnih DPPH radikala i sadržaja ukupnih polifenola u tečnim uzorcima bila je niska i statistički neznačajna ( $r = 0,46$ ,  $p \leq 0,05$ ), dok korelacija između sposobnosti hvatanja DPPH radikala i sadržaja flavonoida u istim uzorcima ne postoji.

Sposobnosti hvatanja DPPH radikala različitih koncentracija uparenih uzoraka (U2, U4 i U6) kombuha napitaka od gljiva su prikazani na grafiku 5.7. Najniža koncentracija pri kojoj je detektovana sposobnost hvatanja slobodnih DPPH radikala bila je  $2,5$  mg/mL i aktivnost je rasla sa povećanjem koncentracije dostižući maksimalnih  $86,58 \pm 0,43$  %,  $73,94 \pm 0,61$  %,  $71,6 \pm 0,61$  % pri najvišoj testiranoj koncentraciji od  $60$  mg/mL kod sva tri uzorka U2, U4 i U6, redom.  $EC_{50}$  vrednost je

određena primenom linearne regresione analize i iznosila je  $22,81 \pm 0,28$  mg/mL za uzorak U2,  $29,06 \pm 1,02$  mg/mL za uzorak U4 i  $20,68 \pm 0,25$  mg/mL za uzorak U6. L-askorbinska kiselina je pokazala  $EC_{50}$  vrednost ispod 0,1 mg/mL, dok je za BHT (butil hidroksi toluen) iznosila  $9,14 \pm 0,36$  mg/mL.

Veoma visok, statistički značajan, stepen negativne korelacije ( $r = -0,94$ ,  $p \leq 0,05$ ) je utvrđen za  $EC_{50}$  vrednosti vakuum uparenih uzoraka i sadržaja ukupnih glukana, kao i između  $EC_{50}$  vrednosti i sadržaja ukupnih polisaharida ( $r = -0,99$ ,  $p \leq 0,05$ ). Utvrđen je umeren stepen negativne korelacije, statistički neznačajan, između  $EC_{50}$  vrednosti i sadržaja polifenola ( $r = -0,61$ ,  $p \leq 0,05$ ), dok je korelacija sa flavonoidima nije bila značajna.



Grafik 5.7. Spособnost hvatanja DPPH radikala ( $\bar{x}_{sr} \pm sd$ ,  $n=3$ ) pod vakuumom uparenih kombuha napitaka od medicinskih gljiva *G. lucidum* (U2), *L. edodes* (U4) i *C. versicolor* (U6)



Delimično prečišćeni polisaharidni ekstrakti gljiva *G. lucidum*, *L. edodes* i *C. versicolor* imali su značajno niže EC<sub>50</sub> vrednosti: 0,1 mg/mL, <0,1 mg/mL i 0,23 mg/mL, redom (Kozarski i sar. 2012). Utvrđena EC<sub>50</sub> vrednost za kombuhu od gljive *L.edodes* bila je niža od EC<sub>50</sub> vrednosti (26,32 mg/mL) komercijalnog suplementa u vidu praha (Carneiro, 2013). Čilerdžić i sar., (2014) su za tri soja gljive *G. lucidum* gajene na pšeničnoj slami utvrdili EC<sub>50</sub> vrednosti od 1,76 do 7,49 mg/mL i 4,32 mg/mL.

Dijalizovani polisaharidni ekstrakt gljive *G. lucidum* imao je najviši sadržaj ukupnih glukana i najvišu dostignutu vrednost hvatanja DPPH radikala (94,8 % pri koncentraciji od 2,5 mg/mL) u odnosu na ekstrakte gljiva *L.edodes* (71,7 %), *C. versicolor* (77,5 %) i *G. applanatum* (81,9 %). Pokazalo se da konformacija polisaharida ima veći značaj za sposobnost hvatanja DPPH radikala nego monosaharidni sastav (Kozarski et al., 2012). Metanolni ekstrakt gljive *C. versicolor* pri koncentraciji od 20 mg/mL hvatao je 87,78 % DPPH slobodnih radikala (Dundar et al., 2016). Veoma dobru antioksidativnu aktivnost pokazali su i polisaharidni ekstrakti gljive *G. lucidum* pripremljeni vrelom vodenom ekstrakcijom (93,29 %) i ekstrakti pripremljeni pomoću ultrazvuka (80,80 %) (Kang et al., 2019). Pripremljeni ekstrakti, nakon termičkog tretmana gljive *L. edodes*, imali su povećanu sposobnost hvatanja DPPH radikala od 45,1 % kod netretiranih uzoraka do 88,6 % pri tretmanu 121 °C tokom 30 minuta. Povećanje sadržaja polifenolnih komponenata se dovodi u vezu sa sveukupnim povećanjem antioksidativne aktivnosti usled oštećenja ćelijskog zida visokim temperaturama i njihovog oslobađanja iz nerastvorljivih delova gljive (Choi et al., 2006). Vodeni ekstrakt gljive *L. edodes* je pri koncentraciji od 10 mg/mL hvatao ispod 40 % slobodnih DPPH radikala (Ren et al., 2014). Kod vodenih i metanolnih ekstrakata gljive *L. edodes*, pri koncentracijama od 1,5 – 3 mg/mL, utvrđen je vrlo visok stepen korelacije između hvatanja slobodnih DPPH radikala i sadržaja ukupnih polifenola, dok je maksimum hvatanja za vodeni ekstrakt bio 55,4 % pri koncentraciji od 6 mg/mL (Cheung et al., 2003). Etanolni ekstrakti različitih sojeva gljive *G. lucidum* takođe su ispoljili visok stepen korelacije između sposobnosti hvatanja slobodnih DPPH radikala i sadržaja ukupnih polifenola (Čilerdžić et al., 2014).

Ranija istraživanja su pokazala da kombuha napici od crnog čaja imaju značajnu sposobnost hvatanja slobodnih DPPH radikala. Sun i sar. (2015) su utvrdili porast hvatanja DPPH radikala kombuhe od crnog čaja tokom 12 dana fermentacije sa

maksimalnom vrednošću preko 90 %, uz povećanje aktivnosti dodatkom soka od pšenice. Tokom fermentacije crnog čaja različitim kombuha kulturama sa Tajvana, sposobnost hvatanja DPPH radikala je kod četiri od osam uzoraka rasla tokom celog procesa fermentacije i petnaestog dana je bila povišena 1,7 puta u odnosu dekokte čajeva pre početka fermentacije. Maksimalna dostignuta vrednost bila je 69,2 % (Chu et al., 2006). Fu i sar. (2014) su utvrdili da je kombuha od crnog čaja hvatala 38,7 % DPPH radikala, dok je kombuha proizvedena od zelenog čaja koji je imao nisku cenu, hvatala čak 95,3 % ovih radikala.

Razlike u sposobnosti hvatanja DPPH radikala mogu poticati od prisustva različitih mikroorganizama u starter kulturama (Chu et al., 2006; Chakavorty et al, 2016), što će odrediti vrstu metabolita u fermentacionoj tečnosti, kao i od trajanja fermentacije i materijala koji fermentiše (Jayabalan et al., 2008a). Malbaša i sar. (2011) su utvrdili najviši stepen hvatanja DPPH radikala u kombuhi od crnog čaja trećeg dana fermentacije, gde je starter kultura bio kvasac *S. cerevisiae*, a najniža sa *Zygosaccharomyces* sp. kvascem kao starterom. Međutim, upotrebom zelenog čaja kao podloge za fermentaciju, najboljom se pokazala prirodna lokalna kombuha, a najlošija ponovo kombuha sa kvascem *Zygosaccharomyces* sp. Sadržaj ukupnih polifenola u kombuhi nije po pravilu ključan za antioksidativan potencijal napitka. Metaboliti koje proizvode mikroorganizmi prisutni u starter kulturi bi mogli biti ključni u aktivnosti kombuhe na tradicionalnoj podlozi (Jayabalan et al., 2008a).

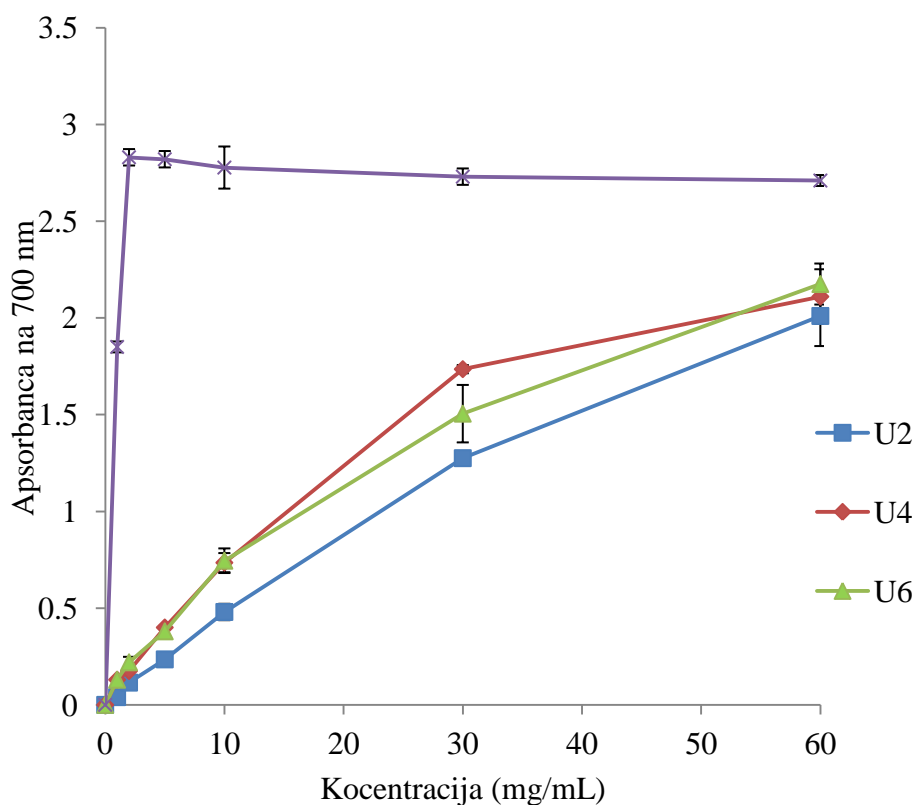
Kod testiranih kombuha napitaka od gljiva, u tečnom i vakuum uparenom obliku, nije pronađena značajna korelacija sa ukupnim polifenolima, kao ni sa flavonoidima. Iz rezultata se može zaključiti da sposobnost doniranja protona slobodnim DPPH radikalima, u kombuha napicima od gljiva zavisi od sadržaja ukupnih polisaharida i sadržaja ukupnih glukana.

#### 5.4.1.2. Redukciona sposobnost kombuha napitaka

Sposobnost određene komponente da donira elektrone drugoj komponenti predstavlja redukcionu sposobnost i ukazuje na potencijal njenog korišćenja kao antioksidansa (Jayabalan et al., 2008a). U ovoj metodi antioksidansi redukuju  $\text{Fe}^{3+}$  jone do  $\text{Fe}^{2+}$  jona i reakciona smeša menja boju iz žute u plavu. Viša apsorbanca ukazuje na bolju redukcionu sposobnost (Reis et al., 2012a).

Kod kombuha napitaka od gljiva, u tečnom i uparenom uzorku, ispitan je potencijal doniranja elektrona i redukcija  $\text{Fe}^{3+}$  do  $\text{Fe}^{2+}$ . Apsorbance kombuha napitaka, nakon postignute željene kiselosti od 3 g/L, bile su:  $1,19 \pm 0,05$ ;  $0,82 \pm 0,02$  i  $1,64 \pm 0,03$  za kombuhe od gljiva *G. lucidum* (T2), *L. edodes* (T4) i *C. versicolor* (T6), redom. Redukciona sposobnost uparenih uzoraka prikazana je na grafiku 5.8. Kod testiranih koncentracija od 1 do 60 mg/mL detektovano je povećanje apsorbance sa porastom koncentracije. Najviše postignute vrednosti bile su  $2,18 \pm 0,11$  za uzorak U6,  $2,11 \pm 0,14$  za uzorak U4 i  $2,01 \pm 0,16$  za uzorak U2. Primenom linearne regresione analize određene  $\text{EC}_{50}$  vrednosti bile su:  $10,61 \pm 0,34$ ,  $6,67 \pm 0,27$  i  $6,17 \pm 0,54$  za uzorke U2, U4 i U6, redom. Kod L-askorbinke kiseline  $\text{EC}_{50}$  vrednost je bila ispod testiranih 0,1 mg/mL.

Kombuha napici dobijeni od gljiva su se pokazali kao bolji potencijalni antioksidanti u odnosu na tradicionalni kombuha napitak proizveden od zelenog čaja, kod kog je detektovana maksimalna redukciona sposobnost od 0,6 petnaestog dana fermentacije (Jayabalan i sar. 2008a) dok je kod kombuha od crnog čaja bila ispod 0,1 (Jayabalan i sar. 2008b). Apsorbanca na 700 nm kod kombuhe od crnog čaja bila je 0,613, dok je kod kombuhe od zelenog čaja 0,304 (Fu et al., 2014).



Grafik 5.8. Spособnost redukcije  $\text{Fe}^{3+}$  jona ( $x_{\text{sr}} \pm \text{sd}$ ,  $n=3$ ) pod vakuumom uparenih kombuha napitaka od medicinskih gljiva *G. lucidum* (U2), *L. edodes* (U4) i *C. versicolor* (U6).

Maksimalne vrednosti apsorbance, kod dva polisheridna uzorka male molekulske mase od gljive *G. lucidum*, bile su niže nego kod kombuha uzoraka od gljiva i to 0,3 i 0,24 pri koncentraciji od 10 mg/mL (Liu et al., 2010). Metanolni ekstrakti gljiva *G. lucidum* i *C. versicolor* pri maksimalnoj testiranoj koncentraciji od 4 mg/mL pokazali su redukcionu sposobnost od 1,62 i 0,79, redom (Mau et al., 2002). U drugom istraživanju, metanolni ekstrakt gljive *C. versicolor* pri koncentraciji od 10 mg/mL pokazao je redukcionu sposobnost od 1,21 (Dundar et al., 2016). Delimično prečišćeni polisaharidni, vreli vodeni ekstrakti gljiva *G. lucidum*, *L. edodes* i *C. versicolor* imali su  $\text{EC}_{50}$  vrednost 0,83 mg/mL, 2,66 mg/mL i 5,37 mg/mL, redom što je niže nego kod kombuha napitaka od istih gljiva. Utvrđeno je da je na smanjenje  $\text{EC}_{50}$  vrednosti uticao viši sadržaj polifenola i  $\alpha$ -glukana (Kozarski i sar., 2012). Vreli vodeni ekstrakt polisaharida od gljive *G. lucidum* imao je  $\text{EC}_{50}$  vrednost 2,54 mg/mL, dok je

ekstrakt dobijen pomoću ultrazvuka pokazao  $EC_{50}$  vrednost od 4,48 mg/mL (Kang et al., 2019). Osušeni prah gljive *L. edodes* iz Brazila imao je nešto višu  $EC_{50}$  vrednost, 7,54 mg/mL, u odnosu na kombuhu od ove gljive (Cameiro et al., 2013).

Regresiona analiza je pokazala da kod tečnih kombuha od gljiva, postoji veoma visok i statistički značajan stepen pozitivne korelacije između sadržaja ukupnih polifenola i redukcionne sposobnosti ( $r = 0,998$ ;  $p \leq 0,05$ ) i između sadržaja flavonoida i redukcionne sposobnosti ( $r = 0,941$ ;  $p \leq 0,05$ ). Utvrđen je srednji stepen pozitivne korelacije između sadržaja suve materije i redukcionne sposobnosti ( $r = 0,54$ ) i srednji stepen korelacije između sadržaja ukupnih polisaharida i redukcionne sposobnosti ( $r = 0,63$ ). U oba slučaja korelacija nije bila statistički značajna.

Pod vakuumom osušeni uzorci imaju takođe veoma visok stepen statistički značajne negativne korelacije ( $r = -0,98$ ;  $p \leq 0,05$ ) između  $EC_{50}$  vrednosti i sadržaja ukupnih flavonoida i srednji stepen negativne korelacije ( $r = -0,68$ ;  $p \leq 0,05$ ) između  $EC_{50}$  vrednosti i sadržaja ukupnih polifenola, ali ova korelacija nije pokazala statističku značajnost. Korelacija sadržaja polisaharida i  $EC_{50}$  vrednosti bila je zanemarljiva ( $r = 0,28$ ), dok je korelacija sa ukupnim glukanim bila niska ( $r = 0,46$ ).

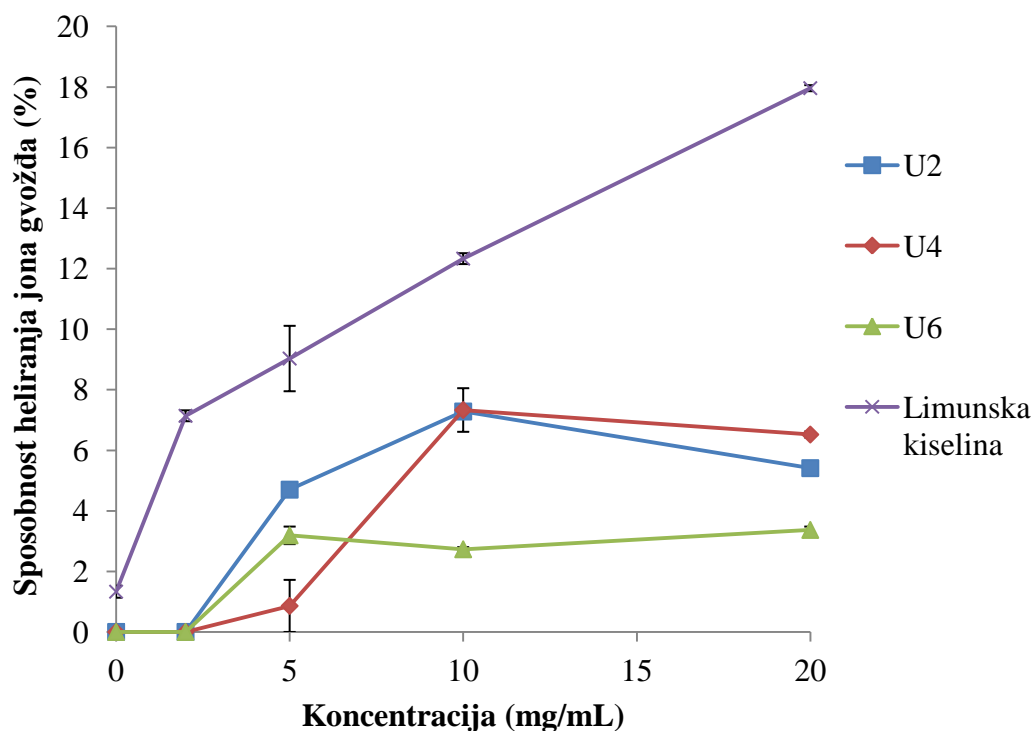
Medicinske gljive sadrže kompleks fenolnih komponenata, dok deo njih može biti povezan sa polisaharidima gljiva. Procesom glikozilacije, slobodne OH grupe kod polifenola se vezuju i dovode do smanjenja njihove reaktivnosti prema reaktivnim slobodnim radikalima (Rice-Evans et al., 1997). Bakterije sirćetnog vrenja i kvasci koji su prisutni u inokulumu kombuhe izlučuju enzime koji razgrađuju ugljene hidrate (invertaza, amilaza) usled čega dolazi do hidrolize fenolnih glikozida i oslobađanja aglikona koji poseduju bolje antioksidativne osobine nego odgovarajući glikozidi (Hur et al., 2014; Essawet et al., 2015). Pored toga, proizvodnja kiseline tokom fermentacije i niska pH vrednost fermentacione tečnosti sprečavaju degradaciju polifenola usled toga što su pojedini polifenoli (flavonoidi, proantocijani, teaflavin) stabilniji u kiseloj sredini (Jayabalan et al., 2008b).

### 5.4.1.3. Heliranje jona gvožđa

Okidači i pojačivači slobodnoradikalnih reakcija, koji dovode do oštećenja ćelija u biološkim sistemima ili u hrani, mogu biti prelazni metali kao što su:  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^+$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$  (Chen et al., 2012). Katališući oslobađanje prvih nekoliko radikala, oni iniciraju oksidativnu lančanu reakciju. Antioksidansi mogu imati sposobnost heliranja metalnih jona kao jedan od antioksidativnih mehanizama, kao i sposobnost inhibicije Fentonove reakcije i razlaganje vodonik peroksida do hidroksil radikala (Liu et al., 2010). U reakciji, formiranje crvenog kompleksa  $\text{Fe}^{2+}$ -ferozin u prisustvu drugog helirajućeg agensa je sprečeno, što se vizuelno primećuje kao smanjenje crvenog obojenja (Chen et al., 2012).

Tečni uzorci kombuha napitaka od gljiva pokazali su niske stepene sposobnosti heliranja jona gvožđa. Kombuha od gljive *C. versicolor* helirala je  $7,05 \pm 1,10$  % jona, kombuha od *L. edodes* gljive  $2,58 \pm 0,20$  %, dok kombuha od gljive *G. lucidum* nije imala sposobnost heliranja. Regresionom analizom je utvrđeno da postoji statistički značajna visoka korelacija između sposobnosti heliranja i sadržaja flavonoida u tečnim kombuha uzorcima ( $r = 0,82$ ,  $p \leq 0,05$ ) i umerena korelacija između sposobnosti heliranja i sadržaja ukupnih polifenola ( $r = 0,69$ ,  $p \leq 0,05$ ).

Nakon uparavanja uzoraka na vakuum uparivaču testirane su koncentracije od 0,1 do 20 mg/mL. Aktivnost nije detektovana pri koncentraciji nižoj od 5 mg/mL (Grafik 5.9). Maksimalno heliranje jona gvožđa bilo je pri koncentraciji od 5 mg/mL za kombuhe od gljiva *G. lucidum* ( $7,28 \pm 0,21$  %) i *L. edodes* ( $7,33 \pm 0,72$  %), nakon čega je usledio pad aktivnosti sa povećanjem koncentracije. Upareni uzorak kombuhe od gljive *C. versicolor* najvišu sposobnost heliranja postigao pri koncentraciji od 20 mg/mL ( $6,32 \pm 0,28$  mg/mL).  $\text{EC}_{50}$  vrednosti nije bilo moguće odrediti zbog niske aktivnosti. Istovremeno je utvrđeno da limunska kiselina poseduje sposobnost heliranja od  $1,33 \pm 0,2$  do  $17,96 \pm 0,1$  % pri istim koncentracijama.



Grafik 5.9. Sposobnost heliranja jona gvožđa ( $x_{sr} \pm sd$ ,  $n=3$ ) pod vakuumom uparenih kombuha napitaka od medicinskih gljiva *G. lucidum* (U2), *L. edodes* (U4) i *C. versicolor* (U6).

Ustanovljeno je da je metanolni ekstrakt gljive *G. lucidum* dobar helator sa sposobnošću heliranja jona gvožđa od 55,5 % pri koncentraciji od 2,4 mg/mL, dok je metanolni ekstrakt gljive *C. versicolor* označen kao loš helator sa sposobnošću heliranja od 13,2 % pri istoj koncentraciji (Mau et al., 2002). Maksimum heliranja su polisaharidni ekstrakti gljiva *G. lucidum* i *C. versicolor* postigli pri koncentraciji od 10 mg/mL, 68,9 % i 28,7 %, redom, dok je ekstrakt gljive *L. edodes* helirao 73,8 % jona pri koncentraciji od 20 g/mL (Kozarski et al., 2012). Različita konformacija polisaharida i njihova molekulska masa su mogući razlozi različitog postignutog stepena heliranja kod prečišćenih polisaharidnih ekstrakata gljive *G. lucidum*. GLP<sub>L1</sub> niže molekulske mase, pokazao je bolju sposobnost heliranja (58 %) od prečišćenog polisaharidnog ekstrakata GLP<sub>L2</sub> (21 %), više molekulske mase (Liu et al., 2010). Zapaženo je da neutralni polisaharidni ekstrakti gljive *L. edodes* pokazuju nizak stepen heliranja Fe<sup>2+</sup> jona (< 10 %), dok kiseli polisaharidi ove gljive heliraju preko 99 % jona

pri koncentraciji od 4 mg/mL (Chen et al., 2012). Generalno, različiti polisaharidni ekstrakti medicinski značajnih gljiva su se pokazali kao bolji helatori  $Fe^{2+}$  jona u odnosu na pripremljene kombuha napitke.

Chu i Chen (2006), utvrdili su da kombuha fermentacija na crnom čaju dovodi do sniženja sposobnosti heliranja od 16 % do 3 %, što se najverovatnije dogodilo usled modifikacije polifenola delovanjem mikroorganizama tokom fermentacije. Lokacija i broj hidroksilnih grupa kod fenolnih komponenata određuje sposobnost heliranja metalnih jona. Potencijal polifenola kod čaja zavisi od strukture flavonola (prisustvo 3'-4' dihidroksi grupa u B prstenu i galoil estara u C prstenu) i kvercetina (metilacija 3-OH i 5-OH grupa ili 4-keto grupa i 2-3 dvostrukih veza) (Chu i Chen, 2006).

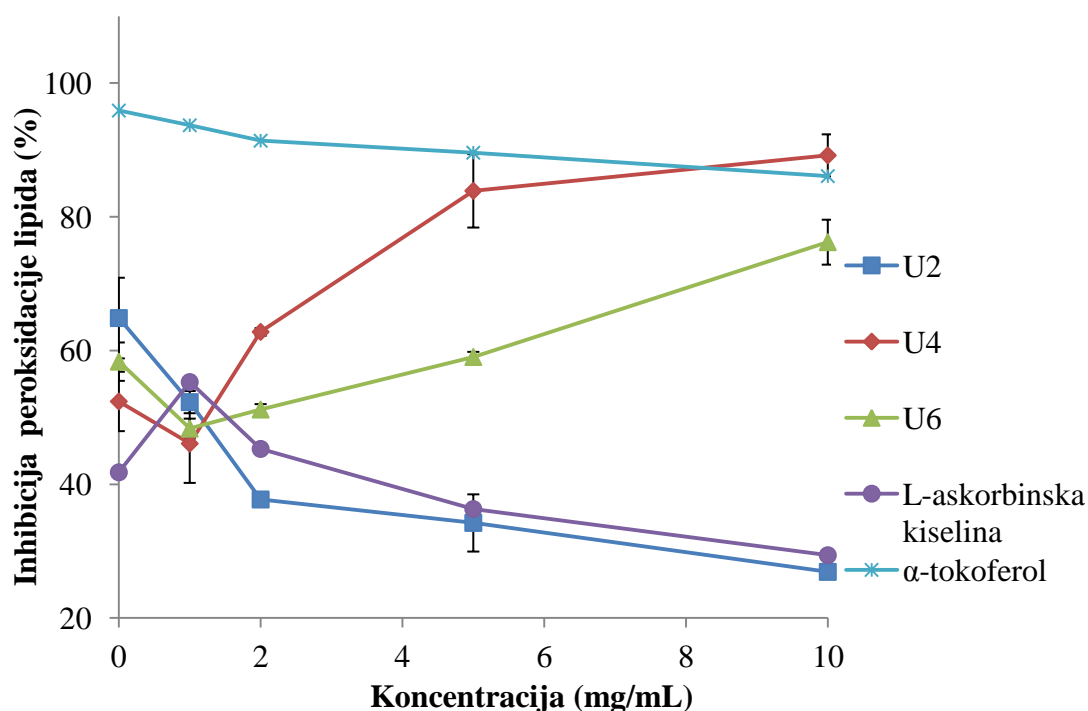
#### **5.4.1.4. Sposobnost inhibicije peroksidacije lipida**

Peroksidi lipida, kao i drugi slobodni radikali, mogu imati koristan ili štetan uticaj na biološki sistem. Njihova prekomerna produkcija dovodi do aktiviranja letalne lančane reakcije i apoptoze ćelija, usled izazvane inaktivacije enzima, proteina i drugih elemenata bitnih za ćelijsku aktivnost (Hrnjez et al., 2014). Oksidacija linoleinske kiseline je praćena merenjem apsorbanse pri talasnoj dužini od 234 nm, koja se povećava formiranjem konjugovanih diena (Lo et al., 2011). Unosom antioksidanasa u organizam, normalizuje se kako oksidacija peroksida, tako i sadržaj lipida. Visoke koncentracije antioksidanasa kao monoterapija se primenjuje u ranim fazama arterioskleroze i onkološkim bolestima (Kanceva i Angelova, 2017).

Nakon postignute željene kiselosti i prekida fermentacije, najsnažniju inhibiciju lipidne peroksidacije ispoljio je uzorak T4, odnosno kombuha od gljive *L. edodes*,  $89,80 \pm 5,20$  %. Kombuha od gljive *C. versicolor* (T6), postigla je aktivnost od  $76,94 \pm 1,44$  %, dok je najnižu postigla kombuha od gljive *G. lucidum* (T2), svega  $38,78 \pm 7,73$  %. Regresionom analizom utvrđena je vrlo visoka, statistički značajna, negativna korelacija između antioksidativne aktivnosti tečnih uzoraka i sadržaja suve materije ( $r = -0,922$ ,  $p \leq 0,05$ ), kao i visoka negativna korelacija između inhibicije lipidne peroksidacije i sadržaja ukupnih polisaharida ( $r = -0,87$ ,  $p \leq 0,05$ ). Utvrđena je niska korelacija sa polifenolima i flavonoidima.



Među uzorcima osušenim pod vakuumom, takođe je uzorak kombuhe od gljive *L. edodes* (U4) postigao najviši stepen inhibicije,  $89,2 \pm 3,15$  % pri koncentraciji od 10 mg/mL (Grafik 5.10). Pri istoj koncentraciji maksimalnu vrednost inhibicije postigao je i uzorak U6 (kombuha od gljive *C. versicolor*) i to  $76,22 \pm 3,36$  %. Kod ova dva uzorka kombuhe, aktivnost je rasla sa porastom koncentracije i bila je viša od L-askorbinske kiseline, dok je u odnosu na  $\alpha$ -tokoferol bila niža sve do koncentracije od 10 mg/mL, kada je uzorak U4 pokazao snažniju aktivnost. Uzorak U2, tj. kombuha od gljive *G. lucidum*, ispoljio je drugačiji trend, odnosno smanjenje inhibicije sa porastom koncentracije. Maksimalna inhibicija lipidne peroksidacije postignuta je pri najnižoj testiranoj koncentraciji od 0,1 mg/mL i iznosila je  $64,87 \pm 6,03$  %, dok je pri koncentraciji od 10 mg/mL detektovana aktivnost od svega  $26,91 \pm 0,55$  %. L-askorbinska kiselina je takođe ispoljila pad u aktivnosti nakon koncentracije od 1 mg/mL, kada je dostignuta maksimalna vrednost od  $55,30 \pm 3,23$  %.



Grafik 5.10. Sposobnost inhibicije peroksidacije lipida ( $\bar{x}_{sr} \pm sd$ ,  $n=3$ ) pod vakuumom uparenih kombuha napitaka od medicinskih gljiva *G. lucidum* (U2), *L. edodes* (U4) i *C. versicolor* (U6).

EC<sub>50</sub> vrednost za uzorke U4 i U6 utvrđena je linearnom regresionom analizom i iznosila je < 0,1 mg/mL. EC<sub>50</sub> vrednost za α-tokoferol takođe je bio je ispod testiranih 0,1 mg/mL. Za uzorak U2 određena je IC<sub>50</sub> vrednost koja je iznosila 1,68 ± 0,8 mg/mL. IC<sub>50</sub> vrednost za L-askorbinsku kiselinu bila je 0,48 ± 0,23 mg/mL. Utvrđeno je da je uzorak U2 imao najniži i statistički značajno različit ( $p \leq 0,05$ ) sadržaj ukupnih polifenola i flavonoida (Tabela 5.7.) u odnosu na ostala dva uzorka, što bi mogao biti razlog ovakvih rezultata.

Polisaharidi dobijeni od deset sojeva gljive *L. edodes* ispoljili su antioksidativnu aktivnost između 14,56 i 58,27 % (Lo et al., 2011), nižu nego kombuha od ove gljive. Kozarski i sar. (2011) su postigli EC<sub>50</sub> vrednost od 7,07 mg/mL kod delimično prečišćenog vrelog vodenog ekstrakta spora gljive *G. lucidum*. Dijalizovani polisaharidni ekstrakti pokazali su različite stepene inhibicije lipidne peroksidacije: *G. lucidum* 77,3 %, *L.edodes* 84,6 % i *C. versicolor* 31,3 %, dok su EC<sub>50</sub> vrednosti bile 4,05 mg/mL, 8,12 mg/mL i > 20 mg/mL, redom (Kozarski et al., 2012). Chu i sar. (2006) su ispitali inhibiciju lipidne peroksidacije kod osam uzoraka kombuha poreklom sa Tajvana, gajenih na crnom čaju. Aktivnost nefermentisanog čaja je sa početnih 65 % inhibicije nakon tri dana fermentacije povećana do 90 %, u proseku. Jayabalan i sar. (2008a) su devetog dana fermentacije zelenog čaja utvrdili maksimalnu inhibiciju (merena testom tiobarbiturne kiseline) od 51,84 %, dok je kod crnog čaja postignuta petnaestog dana u vrednosti od 51,8 %. Do osamnaestog dana fermentacije utvrđene su niže vrednosti inhibicije najverovatnije usled slabijeg anti-lipidnog delovanja fenolnih kiselina ili estara pri niskim pH vrednostima sredine. U složenim sistemima, kakva je i kombuha, mnogo je teže detektovati antioksidativno delovanje pojedinačnog faktora (nego što je to slučaj u uprošćenim sistemima) usled istovremenog efekta antioksidanata i prooksidanata (Jayabalan et al., 2008a).

#### 5.4.2. Antibakterijska svojstva kombuha proizvoda

U ispitivanju antimikrobnih svojstava dobijenih kombuha napitaka fermentacijom vrelih vodenih ekstrakata od gljiva *Ganoderma lucidum*, *Lentinus edodes* i *Coriolus versicolor* prvo je primenjena difuziona metoda sa bunarićima. Ispitana je antibakterijska aktivnost na tri Gram-pozitivna (*B. spizizenii*, *S. aureus* i *S. epidermidis*) i tri Gram-negativna (*S. sonnei*, *C. freundii* i *Y. enterocolitica*) bakterijska ATCC soja. Zone inhibicije su izostale kod svih uzoraka na ispitane sojeve, što ukazuje na potencijalno odustvo antibakterijske aktivnosti. Međutim, prema literaturnim podacima, odsutvo inhibitorne zone može ukazivati i na to da antimikrobna komponenta difunduje sporije u medijum, kao što je to slučaj kod polisaharida visoke molekulske mase (Klančnik et al., 2010; Ren et al., 2014). U ispitivanju antibakterijske aktivnosti ekstrakata biljaka i čistih fenolnih komponenata, koje su sproveli Klančnik i sar. (2010), utvrđeno je da su minimalne inhibitorne koncentracije (MIC), primenom disk difuzione metode, bile od 3 do 20 puta više u odnosu na dobijene MIC vrednosti mikrodilucionom metodom.

S obzirom da je mikrodiluciona metoda daleko osetljivija, ona je i pogodnija za brzu kvantitativnu determinaciju antimikrobne aktivnosti. S toga je antibakterijska aktivnost kombuha napitaka od gljiva ispitana primenom mikrodilucione metode, na osnovu koje su određene minimalne inhibitorne (MIC), kao i minimalne baktericidne (MBC) koncentracije uzoraka.

Kombuha od gljive *G. lucidum* pri konzumnoj kiselosti od 3 g/L, pokazala je inhibitornu aktivnost prema svim testiranim, Gram-negativnim, bakterijskim sojevima, što je prikazano u tabeli 5.9. Najosetljivije bakterije na ovaj uzorak bile su *Y. enterocolitica* i *C. freundii* (MIC = 0,08 mg/mL i MBC = 0,62 mg/mL). Baktericidna aktivnost je izostala jedino kod bakterije *E. coli* O157:H7. U odnosu na ispitivanu aktivnost sirćetne kiseline prema Gram-negativnim bakterijama, kombuha od gljive *G. lucidum* (T2) pokazala je jaču inhibitornu i baktericidnu aktivnost prema: *E. coli*, *S. sonnei*, *Y. enterocolitica* i *P. mirabilis*, dok je prema *S. Enteritidis* i *C. freundii* kombuha pokazala jaču inhibitornu aktivnost.

Nakon neutralizacije kiselina inhibitorno dejstvo je detektovano na pet od devet testiranih bakterija: *S. sonnei*, *E. coli*, *S. Enteritidis*, *Y. enterocolitica* i *C. freundii* uz

najbolju efikasnost prema *Y. enterocolitica* i *C. freundii*. Neutralisan uzorak (N2) je baktericidno delovao jedino prema *Y. enterocolitica*.

Tabela 5.9. Antibakterijska aktivnost uzoraka kombuhe od gljive *G. lucidum* na Gram-negativne bakterije, izražena kao MIC (mg/mL) i MBC (mg/mL)

Gram (-)		T2 <sup>1</sup>	(S.K.T2)	S.K.	N2	TD2	U2
<b><i>S. Enteritidis</i></b>	MIC	0,31 <sup>a2,3</sup>	(0,37)	0,75 <sup>b</sup>	1,25 <sup>c</sup>	0,37 <sup>a</sup>	15,0 <sup>d</sup>
<b>ATCC 13076</b>	MBC	1,25 <sup>a</sup>	(1,5)	0,75 <sup>b</sup>	n.d. <sup>4</sup>	0,62 <sup>c</sup>	n.d.
<b><i>P.aeruginosa</i></b>	MIC	0,62 <sup>a</sup>	(0,75)	0,75 <sup>b</sup>	n.d.	0,62 <sup>a</sup>	n.d.
<b>ATCC 27853</b>	MBC	1,25 <sup>a</sup>	(1,5)	1,5 <sup>b</sup>	n.d.	1,25 <sup>a</sup>	n.d.
<b><i>E. coli</i></b>	MIC	0,62 <sup>a</sup>	(0,75)	1,5 <sup>b</sup>	1,25 <sup>c</sup>	0,62 <sup>a</sup>	15,0 <sup>d</sup>
<b>ATCC 25922</b>	MBC	1,25 <sup>a</sup>	(1,5)	n.d.	n.d.	1,25 <sup>a</sup>	n.d.
<b><i>E. coli</i> O157:H7</b>	MIC	1,25 <sup>a</sup>	(1,5)	1,5 <sup>b</sup>	n.d.	0,37 <sup>c</sup>	n.d.
<b>ATCC 35150</b>	MBC	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<b><i>S. sonnei</i></b>	MIC	0,16 <sup>a</sup>	(0,19)	0,75 <sup>b</sup>	0,31 <sup>c</sup>	0,08 <sup>d</sup>	3,75 <sup>e</sup>
<b>ATCC 29930</b>	MBC	1,25 <sup>a</sup>	(1,5)	n.d.	n.d.	0,62 <sup>b</sup>	n.d.
<b><i>Y. enterocolitica</i></b>	MIC	0,08 <sup>a</sup>	(0,09)	0,75 <sup>b</sup>	0,08 <sup>a</sup>	0,62 <sup>c</sup>	1,88 <sup>d</sup>
<b>ATCC 27729</b>	MBC	0,62 <sup>a</sup>	(0,75)	1,5 <sup>b</sup>	1,25 <sup>c</sup>	0,62 <sup>a</sup>	n.d.
<b><i>P. mirabilis</i></b>	MIC	1,25 <sup>a</sup>	(1,5)	n.d.	n.d.	0,37 <sup>b</sup>	30,0 <sup>c</sup>
<b>ATCC 12453</b>	MBC	1,25 <sup>a</sup>	(1,5)	n.d.	n.d.	0,37 <sup>b</sup>	n.d.
<b><i>P. hauseri</i></b>	MIC	0,62 <sup>a</sup>	(0,75)	0,75 <sup>b</sup>	n.d.	0,04 <sup>c</sup>	30,0 <sup>d</sup>
<b>ATCC 13315</b>	MBC	1,25 <sup>a</sup>	(1,5)	1,5 <sup>b</sup>	n.d.	0,04 <sup>c</sup>	30,0 <sup>d</sup>
<b><i>C. freundii</i></b>	MIC	0,08 <sup>a</sup>	(0,09)	0,38 <sup>b</sup>	0,08 <sup>a</sup>	0,16 <sup>c</sup>	1,88 <sup>d</sup>
<b>ATCC 43864</b>	MBC	0,62 <sup>a</sup>	(0,75)	0,75 <sup>b</sup>	n.d.	0,16 <sup>c</sup>	n.d.

<sup>1</sup>T2- uzorak kombuhe od gljive *G. lucidum* pri konzumnoj kiselosti od 3 g/L; (S.K.T2) - koncentracija sirćetne kiseline u uzorku T2; S.K. - antibakterijsko dejstvo sirćetne kiseline; N2- neutralisan uzorak (pH7) kombuhe od gljive *G. lucidum*; TD2 - toplotno denaturisan uzorak kombuhe od gljive *G. lucidum*; U2 - uparen uzorak kombuhe od gljive *G. lucidum*. <sup>2</sup>Vrednosti su prikazane kao srednje vrednosti za tri ponavljanja. Standardne devijacije nisu prikazane, jer su vrednosti sva tri ponavljanja bile iste. <sup>3</sup>Unutar istog reda vrednosti obeležene različitim slovima se statistički značajno razlikuju,  $\alpha \leq 0,05$ , ANOVA, Tukey's HSD. <sup>4</sup>n.d. - nije detektovano.

Toplotna denaturacija tečnih kombuha napitaka je izvršena u cilju utvrđivanja da li su antimikrobne komponente prisutne u kombuhi termolabilne. Rezultati pokazuju da inhibitorna i baktericidna aktivnost, toplotno denaturisanog uzorka (TD2), ni u jednom slučaju nije izostala, s tim što je u četiri slučaja došlo da pada vrednosti MIC, u pet slučajeva do pada MBC, dok je u dva slučaja vrednost MIC bila viša nego pre termičkog tretmana. Najosetljivijom na uzorak TD2 pokazao se *P. hauseri*.

Uzorak uparen pod vakuumom (U2) je pokazao inhibitornu aktivnost na sedam sojeva testiranih bakterija sa najsnažnijim dejstvom, ponovo, na sojeve vrsta *Y. enterocolitica* i *C. freundii*, dok je baktericidna aktivnost ispoljena samo kod *P. hauseri*. Upareni uzorak je pokazao inhibitornu aktivnost na iste bakterije kao i neutralisan, pri nižim ili istim koncentracijama, a ustanovljeno je i da je aktivnost detektovana i prema vrstama iz roda *Proteus*, prema kom neutralisan uzorak nije pokazao aktivnost. Ovakvo dejstvo bi moglo biti usled prisustva kiselina koje zaostaju u uzorku nakon uparavanja. Slabija antibakterijska aktivnosti uzorka U2, u odnosu na uzorak T2 je najverovatnije usled nižeg sadržaja polifenola u uparenom uzorku, koji su delimično izgubljeni postupkom vakuum uparavanja (Tabele 5.6 i 5.7.).

Prema svim testiranim Gram-pozitivnim bakterijama kombuha napitak od gljive *G. lucidum* pokazao je inhibitornu aktivnost (Tabela 5.10). Najosetljivijim se pokazao *S. epidermidis* (MIC = 0,04 mg/mL), dok je najotpornija bila *L. monocytogenes* sa MIC vrednošću od 1,25 mg/mL. Baktericidna aktivnost je ispoljena na pet sojeva mikroorganizama, a jedino je izostala kod ispitivanih sojeva *L. innocua* i *L. ivanovii*. Najbolju baktericidnu aktivnost je kombuha od gljive *G. lucidum* ispoljila na bakterije *B. cereus* i *B. spizizenii* (MBC = 0,16 mg/mL). Utvrđeno je da dejstvo sirćetne kiseline nije bilo presudno za inhibitornu aktivnost uzorka T2 na bakterije *S. aureus* i *L. innocua*. U prilog tome da nije jedino sirćetna kiselina zaslužna za inhibitornu aktivnost prema ispitivanim Gram-pozitivnim bakterijama, govori i činjenica da je inhibitorna aktivnost zadržana i nakon neutralizacije uzorka i to na pet od sedam ispitivanih sojeva, pri istim ili višim koncentracijama. Baktericidna aktivnost neutralisanog uzorka nije detektovana. Toplotna denaturacija uzorka kombuhe (TD2) dovela je do gubitka baktericidne aktivnosti jedino kod bakterije *L. monocytogenes*. Bolja inhibitorna aktivnost ispoljena je prema *S. aureus* i *S. epidermidis*, dok je poboljšanje baktericidne

aktivnosti utvrđeno kod *S. aureus*, *S. epidermidis* i *L. ivanovii*. *S. epidermidis* bila je najosetljivija, sa vrednostima MIC i MBC < 0,01 mg/mL.

Upareni uzorak pokazao je inhibitornu aktivnost prema svih sedam bakterijskih sojeva, a najosetljiviji je bio *L. ivanovii* (MIC < 0,23 mg/mL). Snažnija inhibitorna aktivnost uzorka U2 u odnosu na uzorak T2 ispoljena je kod *S. epidermidis* i *L. ivanovii*. Baktericidna aktivnost, uzorka U2, je utvrđena prema *B. spizizenii*, *B. cereus* i *S. epidermidis* čije su se vrednosti MBC kretale od 7,5 – 15 mg/mL.

Tabela 5.10. Antibakterijska aktivnost uzoraka kombuhe od gljive *G. lucidum* na Gram-pozitivne bakterije, izražena kao MIC (mg/mL) i MBC (mg/mL)

Gram (+)		T2 <sup>1</sup>	S.K.T2	S.K.	N2	TD2	U2
<i>B. spizizenii</i>	MIC	0,16 <sup>a2,3</sup>	(0,19)	0,19 <sup>b</sup>	n.d. <sup>4</sup>	0,16 <sup>a</sup>	7,5 <sup>c</sup>
ATCC 6633	MBC	0,16 <sup>a</sup>	(0,19)	0,19 <sup>b</sup>	n.d.	0,31 <sup>c</sup>	15,0 <sup>d</sup>
<i>B. cereus</i>	MIC	0,16 <sup>a</sup>	(0,19)	0,09 <sup>b</sup>	n.d.	0,16 <sup>a</sup>	7,5 <sup>c</sup>
ATCC 11778	MBC	0,16 <sup>a</sup>	(0,19)	0,09 <sup>b</sup>	n.d.	0,16 <sup>a</sup>	7,5 <sup>c</sup>
<i>S. aureus</i>	MIC	0,16 <sup>a</sup>	(0,19)	0,75 <sup>b</sup>	0,31 <sup>c</sup>	0,04 <sup>d</sup>	7,5 <sup>e</sup>
ATCC 25923	MBC	1,25 <sup>a</sup>	(1,5)	1,5 <sup>b</sup>	n.d.	0,16 <sup>c</sup>	n.d.
<i>S. epidermidis</i>	MIC	0,04 <sup>a</sup>	(0,05)	<0,01 <sup>b</sup>	1,25 <sup>c</sup>	<0,01 <sup>b</sup>	0,47 <sup>d</sup>
ATCC 12228	MBC	0,31 <sup>a</sup>	(0,38)	0,02 <sup>b</sup>	n.d.	<0,01 <sup>b</sup>	7,5 <sup>c</sup>
<i>L. monocytogenes</i>	MIC	1,25 <sup>a</sup>	(1,5)	0,75 <sup>b</sup>	1,25 <sup>a</sup>	1,25 <sup>a</sup>	15,0 <sup>b</sup>
ATCC 19111	MBC	1,25 <sup>a</sup>	(1,5)	1,5 <sup>b</sup>	n.d.	n.d.	n.d.
<i>L. innocua</i>	MIC	0,62 <sup>a</sup>	(0,75)	1,5 <sup>b</sup>	n.d.	1,25 <sup>a</sup>	30,0 <sup>c</sup>
ATCC 33090	MBC	n.d.	n.o. <sup>5</sup>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>L. ivanovii</i>	MIC	0,08 <sup>a</sup>	(0,09)	<0,01 <sup>b</sup>	0,08 <sup>a</sup>	1,25 <sup>c</sup>	<0,23 <sup>d</sup>
ATCC 19119	MBC	n.d.	n.o.	n.d.	n.d.	1,25	n.d.

<sup>1</sup>T2- uzorak kombuhe od gljive *G. lucidum* pri konzumnoj kiselosti od 3 g/L; (S.K.T2) - koncentracija sirćetne kiseline u uzorku T2; S.K. - antibakterijsko dejstvo sirćetne kiseline; N2- neutralisan uzorak (pH7) kombuhe od gljive *G. lucidum*; TD2 -toplotno denaturisan uzorak kombuhe od gljive *G. lucidum*; U2 - uparen uzorak kombuhe od gljive *G. lucidum*. <sup>2</sup>Vrednosti su prikazane kao srednje vrednosti za tri ponavljanja. Standardne devijacije nisu prikazane, jer su vrednosti sva tri ponavljanja bile iste. <sup>3</sup>Unutar istog reda vrednosti obeležene različitim slovima se statistički značajno razlikuju,  $\alpha \leq 0,05$ , ANOVA, Tukey's HSD.<sup>4</sup>n.d. – nije detektovano. <sup>5</sup>nije određeno.

Prema literaturi, različiti ekstrakti gljive *G. lucidum* su ispitani na antimikrobnu aktivnost. Svih 36 neprečišćenih vrelih vodenih ekstrakata gljive *G. lucidum*, koja je proizvedena na različitim supstratima, pokazalo je umerenu inhibitornu i baktericidnu aktivnost na sve testirane bakterijske sojeve. Vrednosti za MIC su se kretale od 0,62 do 5,0 mg/mL, dok su MBC vrednosti bile od 2,5 do 5,0 mg/mL. Najosetljivijom na ekstrakte se pokazala bakterija *Micrococcus luteus* (Skalicka-Wozniak et al., 2012). Etanolni ekstrakti različitih sojeva gljive *G. lucidum* su pokazali različitu antimikrobnu aktivnost, pa su tako dva soja pokazala najbolju aktivnost prema *S. aureus* i *Micrococcus flavus* (MIC = 1 mg/mL), dok je komercijalni soj gljive imao najslabiju aktivnost upravo prema *S. aureus* i *L. monocytogenes*. Najbolja baktericidna aktivnost je ispoljena prema *B. cereus* (MBC = 1,7 mg/mL), dok se najotpornijom pokazala *L. monocytogenes* (MBC = 4,0 mg/mL) (Ćilerdžić et al., 2014). Metanolni ekstrakt gljive *G. lucidum* delovao je inhibitorno na sve testirane bakterije pri koncentraciji od 0,0125 do 0,75 mg/mL, i baktericidno pri koncentraciji od 0,035 do 1,5 mg/mL, sa najboljom aktivnošću prema *S. aureus* i *B. cereus*, dok je najotpornija na ovaj ekstrakt bila *P. aeruginosa*. Fenolne kiseline, koje se sreću u najvišim koncentracijama u gljivi (cinaminska kiselina i p-hidroksibenzoeva kiselina), pokazale su snažnu antibakterijsku aktivnost na osam testiranih bakterija, sa MIC i MBC vrednostima nižim nego kod streptomocina i ampicilina (Heleno et al., 2013). Vrlo važne bioaktivne komponente gljive *G. lucidum* su seskviterpeni. Utvrđeno je da ekstrakt seskviterpena od ove gljive pokazuje antimikrobnu aktivnost prema *E. coli*, *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *P. mirabilis*, *C. albicans* i *B. subtilis*, pri MIC vrednostima od 32 µg/mL i MBC vrednostima na *P. mirabilis* i *C. albicans* od 64 µg/mL (Sharifi et al., 2012).

Na sve ispitane sojeve Gram - negativnih bakterija kombuha od gljive *L. edodes* (T4) delovala je inhibitorno pri koncentraciji od 2,02 do 8,1 mg/mL (Tabela 5.11). Najosetljivijom se pokazala *Y. enterocolitica* kod koje je detektovana vrednost MIC od 2,02 mg/mL. Mikrocidno dejstvo ovaj uzorak je ispoljio na šest od osam testiranih bakterija, sa najnižom MBC od 4,05 mg/mL na *P. hauseri* i *C. freundii*. U odnosu na dejstvo sirćetne kiseline, uzorak kombuhe je imao snažnije inhibitorno dejstvo prema bakterijama *Y. enterocolitica* i *P. mirabilis*, dok je snažnije baktericidno dejstvo ispoljio prema *E. coli*, *P. mirabilis* i *P. hauseri*. Neutralizacijom kiselina u kombuhi (N4), dobar

deo inhibitorne aktivnosti je izgubljen i zadržan je samo kod *S. sonnei*, *Y. enterocolitica* i *C. freundii*. Baktericidno dejstvo nije ispoljeno. Nakon toplotne denaturacije kombuha napitka, aktivnost je ostala ista ili je poboljšana. Najznajčajnije poboljšanje aktivnosti je utvrđeno prema *P. hauseri*, kada je dostignuta MIC i MBC od 0,25 mg/mL. Baktericidna aktivnost, koju uzorak T4 nije ispoljio prema *S. Enteritidis* i *S. sonnei*, nakon toplotnog tretmana je postignuta. Uzorak uparen pod vakuumom (U4) je pokazao inhibitorno dejstvo na svih osam testiranih bakterija, kao i uzorak T4, uglavnom pri višim koncentracijama. Baktericidno dejstvo je utvrđeno jedino prema *Y. enterocolitica* i *C. freundii*.

Gram – pozitivne bakterije (Tabela 5.12) su pokazale veću osetljivost prema kombuhi od gljive *L. edodes* (T2) u odnosu na Gram – negativne bakterije. Rast svih Gram – pozitivnih bakterija bio je inhibiran kombuha uzorkom og gljive *L. edodes* (T2), sa opsegom efektivnih inhibitornih koncentracija od <0,06 do 4,05 mg/mL. Baktericidni efekat ispoljen je na četiri od sedam bakterija, pri koncentracijama od 0,06 do 8,01 mg/mL. Najosetljivijom na ovaj uzorak pokazao se bakterijski soj *S. epidermidis* (MIC < 0,06 mg/mL, MBC < 0,06 mg/mL). Baktericidna aktivnost nije postignuta kod vrsta iz roda *Listeria*. Inhibitorna aktivnost kombuhe od gljive *L. edodes* nije zavisila samo od sirćetne kiseline pri delovanju prema *B. spizizenii*, *S. epidermidis* i *S. aureus*, kao ni baktericidna aktivnost na ispitivani soj bakterijske vrste *S. epidermidis*.

Nakon neutralizacije kiselina u tečnom uzorku (N4), inhibitorna aktivnost se zadržala jedino na *L. ivanovii*. Ovakvi rezultati nam ukazuju na to da kiseline u kombuhi od gljive *L. edodes* imaju sinergetsko dejstvo sa drugim bioaktivnim materijama prisutnim u napitku, protiv određenih bakterijskih sojeva. Toplotnom denaturacijom napitka (TD4), aktivnost je većim delom smanjena, ali nije izgubljena. Jedino je prema *S. aureus* inhibitorna i baktericidna aktivnost bila bolja, a kod *S. epidermidis*, nepromenjena. Uzorak uparen pod vakuumom (U4) pokazao je inhibitornu aktivnost na svih sedam ispitivanih bakterijskih sojeva, sa opsegom koncentracija od 0,23 do 7,5 mg/mL. Baktericidna aktivnost je ispoljena na šest od osam sojeva bakterija, sa opsegom koncentracija od 3,75 do 30 mg/mL. Pri testiranju antibakterijske aktivnosti, dejstvo koje je izgubljeno neutralisanjem je ponovo detektovano primenom viših koncentracija uparenog uzorka, što nam ukazuje na to da bi antibakterijska aktivnost kombuhe mogla biti značajnija povećanjem suve materije u tečnom uzorku.



Tabela 5.11. Antibakterijska aktivnost uzoraka kombuhe od gljive *L. edodes* na Gram-negativne bakterije, izražena kao MIC (mg/mL) i MBC (mg/mL)

G (-)		T4 <sup>1</sup>	S.K.T4	S.K.	N4	TD4	U4
<i>S. Enteritidis</i>	MIC	4,5 <sup>a2,3</sup>	(0,75)	0,75 <sup>b</sup>	n.d. <sup>4</sup>	4,05 <sup>a</sup>	30 <sup>c</sup>
ATCC 13076	MBC	n.d.	(n.o.)	0,75 <sup>a</sup>	n.d.	4,05 <sup>b</sup>	n.d.
<i>P.aeruginosa</i>	MIC	8,1 <sup>a</sup>	(1,5)	0,75 <sup>b</sup>	n.d.	4,05 <sup>c</sup>	30 <sup>d</sup>
ATCC 27853	MBC	8,1 <sup>a</sup>	(1,5)	1,5 <sup>b</sup>	n.d.	8,1 <sup>a</sup>	n.d.
<i>E. coli</i>	MIC	8,1 <sup>a</sup>	(1,5)	1,5 <sup>b</sup>	n.d.	8,1 <sup>a</sup>	15 <sup>c</sup>
ATCC 25922	MBC	8,1 <sup>a</sup>	(1,5)	n.d.	n.d.	8,1 <sup>a</sup>	n.d.
<i>E. coli</i> O157:H7	MIC	8,1 <sup>a</sup>	(1,5)	1,5 <sup>b</sup>	n.d.	8,1 <sup>a</sup>	30 <sup>c</sup>
ATCC 35150	MBC	n.d.	(n.o.) <sup>5</sup>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>S. sonnei</i>	MIC	4,05 <sup>a</sup>	(0,75)	0,75 <sup>b</sup>	8,1 <sup>c</sup>	2,02 <sup>d</sup>	3,75 <sup>e</sup>
ATCC 29930	MBC	n.d.	(n.d.)	n.d.	n.d.	4,05	n.d.
<i>Y. enterocolitica</i>	MIC	2,02 <sup>a</sup>	(0,37)	0,75 <sup>b</sup>	2,02 <sup>a</sup>	2,02 <sup>a</sup>	1,87 <sup>c</sup>
ATCC 27729	MBC	8,1 <sup>a</sup>	(1,5)	1,5 <sup>b</sup>	n.d.	4,05 <sup>c</sup>	30 <sup>d</sup>
<i>P. mirabilis</i>	MIC	8,1 <sup>a</sup>	(1,5)	n.d.	n.d.	2,02 <sup>b</sup>	30 <sup>c</sup>
ATCC 12453	MBC	8,1 <sup>a</sup>	(1,5)	n.d.	n.d.	2,02 <sup>b</sup>	n.d.
<i>P. hauseri</i>	MIC	4,05 <sup>a</sup>	(0,75)	0,75 <sup>b</sup>	n.d.	0,25 <sup>c</sup>	30 <sup>d</sup>
ATCC 13315	MBC	4,05 <sup>a</sup>	(0,75)	1,5 <sup>b</sup>	n.d.	0,25 <sup>c</sup>	n.d.
<i>C. freundii</i>	MIC	2,02 <sup>a</sup>	(0,37)	0,37 <sup>b</sup>	4,05 <sup>c</sup>	4,05 <sup>c</sup>	3,75 <sup>d</sup>
ATCC 43864	MBC	4,05 <sup>a</sup>	(0,75)	0,75 <sup>b</sup>	n.d.	4,05 <sup>a</sup>	30 <sup>c</sup>

<sup>1</sup>T4- uzorak kombuhe od gljive *L. edodes* pri konzumnoj kiselosti od 3 g/L; (S.K.T4) - koncentracija sirćetne kiseline u uzorku T4; S.K. - antibakterijsko dejstvo sirćetne kiseline; N4- neutralisan uzorak (pH7) kombuhe od gljive *L. edodes*; TD4 -toplotno denaturisan uzorak kombuhe od gljive *L. edodes*; U2 - uparen uzorak kombuhe od gljive *L. edodes*. <sup>2</sup>Vrednosti su prikazane kao srednje vrednosti za tri ponavljanja. Standardne devijacije nisu prikazane, jer su vrednosti sva tri ponavljanja bile iste. <sup>3</sup>Unutar istog reda vrednosti obeležene različitim slovima se statistički značajno razlikuju,  $\alpha \leq 0,05$ , ANOVA, Tukey's HSD. <sup>4</sup>n.d. – nije detektovano. <sup>5</sup> n.o. – nije određeno.

Tabela 5.12. Antibakterijska aktivnost uzoraka kombuhe od gljive *L. edodes* na Gram-pozitivne bakterije, izražena kao MIC (mg/mL) i MBC (mg/mL)

G (+)		T4 <sup>1</sup>	S.K.T4	S.K.	N4	TD4	U4
<i>B. spizizenii</i>	MIC	0,5 <sup>a2,3</sup>	(0,09)	0,19 <sup>b</sup>	n.d. <sup>4</sup>	2,02 <sup>c</sup>	3,75 <sup>d</sup>
ATCC 6633	MBC	1,01 <sup>a</sup>	(0,19)	0,19 <sup>b</sup>	n.d.	4,05 <sup>c</sup>	7,5 <sup>d</sup>
<i>B. cereus</i>	MIC	1,01 <sup>a</sup>	(0,19)	0,09 <sup>b</sup>	n.d.	2,02 <sup>c</sup>	7,5 <sup>d</sup>
ATCC 11778	MBC	1,01 <sup>a</sup>	(0,19)	0,09 <sup>b</sup>	n.d.	2,02 <sup>c</sup>	7,5 <sup>d</sup>
<i>S. aureus</i>	MIC	2,02 <sup>a</sup>	(0,37)	0,75 <sup>b</sup>	n.d.	1,01 <sup>c</sup>	7,5 <sup>d</sup>
ATCC 25923	MBC	8,1 <sup>a</sup>	(1,5)	1,5 <sup>b</sup>	n.d.	2,02 <sup>c</sup>	n.d.
<i>S. epidermidis</i>	MIC	<0,06 <sup>a</sup>	(<0,01)	<0,01 <sup>b</sup>	n.d.	<0,06 <sup>a</sup>	3,75 <sup>c</sup>
ATCC 12228	MBC	<0,06 <sup>a</sup>	(<0,01)	0,02 <sup>b</sup>	n.d.	<0,06 <sup>a</sup>	7,5 <sup>c</sup>
<i>L. monocytogenes</i>	MIC	4,05 <sup>a</sup>	(0,75)	0,75 <sup>b</sup>	n.d.	8,1 <sup>c</sup>	30 <sup>d</sup>
ATCC 19111	MBC	n.d.	(n.o.) <sup>5</sup>	1,5	n.d.	n.d.	n.d.
<i>L. innocua</i>	MIC	4,05 <sup>a</sup>	(0,75)	1,5 <sup>b</sup>	n.d.	8,1 <sup>c</sup>	30 <sup>d</sup>
ATCC 33090	MBC	n.d.	(n.o.)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>L. ivanovii</i>	MIC	<0,06 <sup>a</sup>	(<0,01)	<0,01 <sup>b</sup>	1,01 <sup>c</sup>	n.d.	<0,23 <sup>d</sup>
ATCC 19119	MBC	n.d.	(n.o.)	n.d.	n.d.	n.d.	30

<sup>1</sup>T4- uzorak kombuhe od gljive *L. edodes* pri konzumnoj kiselosti od 3 g/L; (S.K.T4) - koncentracija sirćetne kiseline u uzorku T4; S.K. - antibakterijsko dejstvo sirćetne kiseline; N4- neutralisan uzorak (pH7) kombuhe od gljive *L. edodes*; TD4 -toplotno denaturisan uzorak kombuhe od gljive *L. edodes*; U2 - uparen uzorak kombuhe od gljive *L. edodes*. <sup>2</sup>Vrednosti su prikazane kao srednje vrednosti za tri ponavljanja. Standardne devijacije nisu prikazane, jer su vrednosti sva tri ponavljanja bile iste. <sup>3</sup>Unutar istog reda vrednosti obeležene različitim slovima se statistički značajno razlikuju,  $\alpha \leq 0,05$ , ANOVA, Tukey's HSD. <sup>4</sup>n.d. – nije detektovano. <sup>5</sup> n.o. – nije određeno.

Prema navodima u literaturi, različiti ekstrakti ove gljive ispoljavaju antimikrobno dejstvo. Vodeni ekstrakt je delovao na bakterije *S. aureus* i *E. coli* sa nižim vrednostima MBC (1 mg/mL i 0,4 mg/mL, redom) u odnosu na metanolni ekstrakt na iste vrste i to pri MBC od 7,5 mg/mL na *S. aureus* i 6,1 mg/mL na *E. coli* (Santoyo et al., 2009). Sedam od devet vodenih ekstrakata različitih sojeva gljive *L. edodes* ispoljili su MIC između 3,3 i 6,7 mg/mL na *S. aureus*, dok je *P. aeruginosa* bila mnogo rezistentnija. Aktivnost je ispoljena kod dva ekstrakta pri koncentraciji od 2,5

mg/mL (Parola et al., 2017). Kitzberger i sar. (2007) su primenom različitih tretmana superkritičnim fluidima postigli vrednosti MIC prema *M. luteus* od 0,5 do 1,0 mg/mL i prema *B. cereus* 0,25 do 0,5 mg/mL.

Uzorak kombuhe od gljive *C. versicolor* (T6), pri konzumnoj kiselosti od 3 g/L, pokazao je inhibitornu aktivnost na sve ispitane Gram – negativne bakterije pri koncentraciji od 2,25 do 18 mg/mL (Tabela 5.13). *Y. enterocolitica* je bila najosetljivija. Uzorak je pokazao i baktericidnu aktivnost pri koncentraciji od 18 mg/mL na osam ispitanih bakterija. Baktericidna aktivnost nije ispoljena jedino prema soju *E. coli* O157:H7. Prisustvo sirćetne kiseline nije bilo presudno za inhibitornu aktivnost uzorka T6 prema *S. sonnei*, *Y. enterocolitica* i *P. mirabilis*, kao ni za baktericidnu aktivnost prema *E. coli*, *S. sonnei* i *P. mirabilis*.

Nakon neutralizacije kiselina u uzorku, inhibitorna aktivnost je zadržana prema sledećim sojevima bakterijskih vrsta: *S. Enteritidis*, *E. coli*, *S. sonnei* i *Y. enterocolitica*, dok je baktericidna aktivnost izostala.

Toplotnom denaturacijom uzorka (TD6), inhibitorna aktivnost je kod dela bakterijskih sojeva poboljšana, a kod dugog dela je ostala nepromenjena. Najsnažnije baktericidno dejstvo ispoljeno je prema *P. mirabilis* pri koncentraciji od 0,56 mg/mL. Baktericidna aktivnost je izgubljena kod sojeva *S. Enteritidis*, *P. aeruginosa* i *E. coli*, kod roda *Proteus* je poboljšana, dok je kod ostalih nepromenjena.

Niži sadržaj ukupnih polifenola u uzorku uparenom pod vakuumom (U6), verovatno je uticao na slabiju aktivnost u odnosu na uzorak (T6). Inhibitorna aktivnost ispoljena je na šest bakterijskih sojeva, a baktericidna jedino na *P. hauseri*.

Na svih sedam ispitanih Gram-pozitivnih bakterijskih sojeva, inhibitorno dejstvo uzorka T6 ispoljeno je pri koncentraciji od 2,25 do 18 mg/mL, dok je baktericidno dejstvo pri istom rasponu koncentracija ispoljeno na četiri bakterijska soja (Tabela 5.14). Najotpornije su bile vrste iz roda *Listeria* prema kojima je izostala baktericidna aktivnost. Sirćetna kiselina je slabiji efekat od uzorka T6 imala jedino prema *S. aureus*. Neutralisan uzorak je inhibitorni efekat pokazao jedino kod *S. epidermidis*, dok je baktericidni efekat potpuno izostao. Na osnovu ovih rezultata, može se zaključiti da kod kombuhe od gljive *C. versicolor* sirćetna kiselina u antibakterijskom efektu ima značajnu ulogu.

Tabela 5.13. Antibakterijska aktivnost uzoraka kombuhe od gljive *C. versicolor* na Gram-negativne bakterije, izražena kao MIC (mg/mL) i MBC (mg/mL)

G (-)		T6 <sup>1</sup>	S.K.T6	S.K.	N	TD6	U6
<i>S. Enteritidis</i>	MIC	9 <sup>a2,3</sup>	(0,75)	0,75 <sup>b</sup>	18 <sup>c</sup>	4,5 <sup>d</sup>	15 <sup>e</sup>
ATCC 13076	MBC	18 <sup>a</sup>	(1,5)	0,75 <sup>b</sup>	n.d. <sup>4</sup>	n.d.	n.d.
<i>P.aeruginosa</i>	MIC	18 <sup>a</sup>	(1,5)	0,75 <sup>b</sup>	n.d.	4,5 <sup>c</sup>	n.d.
ATCC 27853	MBC	18 <sup>a</sup>	(1,5)	1,5 <sup>b</sup>	n.d.	n.d.	n.d.
<i>E. coli</i>	MIC	18 <sup>a</sup>	(1,5)	1,5 <sup>b</sup>	18 <sup>a</sup>	18 <sup>a</sup>	30 <sup>c</sup>
ATCC 25922	MBC	18	(1,5)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>E. coli</i> O157:H7	MIC	18 <sup>a</sup>	(1,5)	1,5 <sup>b</sup>	n.d.	9 <sup>c</sup>	n.d.
ATCC 35150	MBC	n.d.	(n.o.) <sup>5</sup>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>S. sonnei</i>	MIC	4,5 <sup>a</sup>	(0,37)	0,75 <sup>b</sup>	9 <sup>c</sup>	4,5 <sup>a</sup>	3,75 <sup>d</sup>
ATCC 29930	MBC	18 <sup>a</sup>	(1,5)	n.d.	n.d.	18 <sup>a</sup>	n.d.
<i>Y. enterocolitica</i>	MIC	2,25 <sup>a</sup>	(0,19)	0,75 <sup>b</sup>	4,5 <sup>c</sup>	2,25 <sup>a</sup>	1,87 <sup>d</sup>
ATCC 27729	MBC	18 <sup>a</sup>	(1,5)	1,5 <sup>b</sup>	n.d.	9 <sup>c</sup>	n.d.
<i>P. mirabilis</i>	MIC	18 <sup>a</sup>	(1,5)	n.d.	n.d.	0,56 <sup>b</sup>	n.d.
ATCC 12453	MBC	18 <sup>a</sup>	(1,5)	n.d.	n.d.	4,5 <sup>b</sup>	n.d.
<i>P. hauseri</i>	MIC	9 <sup>a</sup>	(0,75)	0,75 <sup>b</sup>	n.d.	1,12 <sup>c</sup>	30 <sup>d</sup>
ATCC 13315	MBC	18 <sup>a</sup>	(1,5)	1,5 <sup>b</sup>	n.d.	2,25 <sup>c</sup>	30 <sup>d</sup>
<i>C. freundii</i>	MIC	4,5 <sup>a</sup>	(0,37)	0,37 <sup>b</sup>	n.d.	4,5 <sup>a</sup>	3,75 <sup>c</sup>
ATCC 43864	MBC	18 <sup>a</sup>	(1,5)	0,37 <sup>b</sup>	n.d.	18 <sup>a</sup>	n.d.

<sup>1</sup>T6- uzorak kombuhe od gljive *C.versicolor* pri konzumnoj kiselosti od 3 g/L; (S.K.T6) - koncentracija sirćetne kiseline u uzorku T6; S.K. - antibakterijsko dejstvo sirćetne kiseline; N6- neutralisan uzorak (pH7) kombuhe od gljive *C. versicolor*; TD6 -toplotno denaturisan uzorak kombuhe od gljive *C. versicolor*; U6 - uparen uzorak kombuhe od gljive *C. versicolor*  
<sup>2</sup>Vrednosti su prikazane kao srednje vrednosti za tri ponavljanja. Standardne devijacije nisu prikazane, jer su vrednosti sva tri ponavljanja bile iste. <sup>3</sup>Unutar istog reda vrednosti obeležene različitim slovima se statistički značajno razlikuju,  $\alpha \leq 0,05$ , ANOVA, Tukey's HSD. <sup>4</sup>n.d. – nije detektovano. <sup>5</sup> n.o. – nije određeno.

Tabela 5.14. Antibakterijska aktivnost uzoraka kombuhe od gljive *C. versicolor* na Gram-pozitivne bakterije, izražena kao MIC (mg/mL) i MBC (mg/mL)

G (+)		T6 <sup>1</sup>	S.K.T6	S.K.	N	TD6	U6
<i>B. spizizenii</i>	MIC	2,25 <sup>a2,3</sup>	(0,19)	0,19 <sup>b</sup>	n.d. <sup>4</sup>	2,25 <sup>a</sup>	7,5 <sup>c</sup>
ATCC 6633	MBC	2,25 <sup>a</sup>	(0,19)	0,19 <sup>b</sup>	n.d.	9 <sup>c</sup>	15 <sup>d</sup>
<i>B. cereus</i>	MIC	2,25 <sup>a</sup>	(0,19)	0,09 <sup>b</sup>	n.d.	4,5 <sup>c</sup>	15 <sup>d</sup>
ATCC 11778	MBC	2,25 <sup>a</sup>	(0,19)	0,09 <sup>b</sup>	n.d.	4,5 <sup>c</sup>	15 <sup>d</sup>
<i>S. aureus</i>	MIC	2,25 <sup>a</sup>	(0,19)	0,75 <sup>b</sup>	n.d.	4,5 <sup>c</sup>	7,5 <sup>d</sup>
ATCC 25923	MBC	18 <sup>a</sup>	(1,5)	1,5 <sup>b</sup>	n.d.	18 <sup>a</sup>	n.d.
<i>S. epidermidis</i>	MIC	2,25 <sup>a</sup>	(0,19)	<0,01 <sup>b</sup>	18 <sup>c</sup>	<0,14 <sup>d</sup>	15 <sup>e</sup>
ATCC 12228	MBC	4,5 <sup>a</sup>	(0,37)	0,02 <sup>b</sup>	n.d.	<0,14 <sup>c</sup>	15 <sup>d</sup>
<i>L. monocytogenes</i>	MIC	18 <sup>a</sup>	(1,5)	0,75 <sup>b</sup>	n.d.	18 <sup>a</sup>	n.d.
ATCC 19111	MBC	n.d.	(n.o.) <sup>5</sup>	1,5	n.d.	n.d.	n.d.
<i>L. innocua</i>	MIC	18 <sup>a</sup>	(1,5)	1,5 <sup>b</sup>	n.d.	18 <sup>a</sup>	n.d.
ATCC 33090	MBC	n.d.	(n.o.)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>L. ivanovii</i>	MIC	2,25 <sup>a</sup>	(0,37)	0,01 <sup>b</sup>	n.d.	n.d.	n.d.
ATCC 19119	MBK	n.d.	(n.o.)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

<sup>1</sup>T6- uzorak kombuhe od gljive *C.versicolor* pri konzumnoj kiselosti od 3 g/L; (S.K.T6) - koncentracija sirćetne kiseline u uzorku T6; S.K. - antibakterijsko dejstvo sirćetne kiseline; N6- neutralisan uzorak (pH7) kombuhe od gljive *C. versicolor*; TD6 -toplotno denaturisan uzorak kombuhe od gljive *C. versicolor*; U6 - uparen uzorak kombuhe od gljive *C. versicolor*  
<sup>2</sup>Vrednosti su prikazane kao srednje vrednosti za tri ponavljanja. Standardne devijacije nisu prikazane, jer su vrednosti sva tri ponavljanja bile iste. <sup>3</sup>Unutar istog reda vrednosti obeležene različitim slovima se statistički značajno razlikuju, p <0,05, ANOVA, Tukey's HSD. <sup>4</sup>n.d. – nije detektovano. <sup>5</sup> n.o. – nije određeno.

Toplotna denaturacija uzorka T6, zavisno od vrste bakterije, dovela je do smanjenja antibakterijske aktivnosti ili je aktivnost ostala ista. Jedino poboljšanje aktivnosti je zabeleženo prema *S. epidermidis*, pri čemu su postignute vrednosti za MIC i MBC < 0,14 mg/mL. Vrste iz roda *Listeria* bile su najotpornije i na uzorak U6, prema kojima nije utvrđena ni inhibitorna ni baktericidna aktivnost. Kod preostalih pet bakterija, utvrđeno je inhibitorno dejstvo pri koncentraciji od 7,5 do 15 mg/mL, dok je

baktericidno dejstvo potvrđeno na tri bakterije: *B. spizizenii*, *B. cereus* i *S. epidermidis* pri koncentraciji od 15 mg/mL.

Prema navodima u literaturi, neprečišćeni vreli vodeni ekstrakti gljive *C. versicolor* sa različitih staništa, pokazali su se kao bolji antimikrobni agensi u odnosu na primenjene druge rastvarače: hloroform i etanol. Zbog veće polarnosti i sposobnosti da lakše probije u unutrašnjost ćelijskog zida gljive, ekstrakcija bioaktivnih materija pokazala se boljom primenom vode kao rastvarača. Najosetljiviji na vodene ekstrakte bio je standardni soj *S. aureus* (MIC = 0,5 mg/mL i MBC = 0,5 mg/mL) (Gebreyohannes et al., 2019). Delimično prečišćeni vreli vodeni ekstrakti gljive *C. versicolor* ispoljili su inhibitornu aktivnost na ispitane bakterijske sojeve pri koncentraciji od 2,5 do 10 mg/mL. Najosetljiviji su bili sojevi *Enterococcus faecalis*, *Geobacillus stearothermophilus* i *B. cereus* (Kozarski, 2012). Metanolni ekstrakt gljive *C. versicolor* pokazao je bolju aktivnost prema Gram-pozitivnim bakterijama u odnosu na Gram - negativne, sa najnižom vrednošću MIC prema *S. epidermidis*, 0,625 mg/mL i najnižom MBC od 1,25 mg/mL. *L. monocytogenes* se pokazala kao najrezistentnija sa postignutom MIC od 20 mg/mL. Među Gram – negativnim bakterijama najosetljivijom se pokazala bakterija *S. sonnei* (MIC = 2,5 mg/mL), dok je baktericidno dejstvo ispoljeno na *S. Enteritidis*, *Y. enterocolitica* i *P. hauseri* pri koncentraciji od 40 mg/mL (Matijašević et al., 2016). U drugom istraživanju, metanolni ekstrakt micelije gljive *C. versicolor* inhibitorno je delovao sa najnižom koncentracijom na ispitivani soj *B. spizizenii* i *S. epidermidis* (MIC < 0,3125 mg/mL) i *Y. enterocolitica* (MIC = 5 mg/mL), dok je najsnažnije baktericidno dejstvo utvrđeno pri MBC od 10 mg/mL na *B. spizizenii* i pri 20 mg/mL na *P. hauseri* i *S. sonnei* (Duvnjak et al., 2016).

Testiranjem istih koncentracija uzoraka kombuhe od gljiva koji su upareni u vakuumu (U2, U4 i U6), na antibakterijsku aktivnost, utvrđeno je da je uzorak od gljive *G. lucidum* (U2) pokazao najnižu vrednost MIC prema *S. epidermidis*, *L. monocytogenes* i *C. freundii*. Uzorak od gljive *L. edodes* (U4) je najniže inhibitorne koncentracije ispoljio prema *B. spizizenii*, *P. aeruginosa* i *E. coli* O157:H7, dok su najniže vrednosti MBC bile prema *B. spizizenii*, *L. ivanovii*, *Y. enterocolitica* i *C. freundii*. Uzorak od gljive *C. versicolor* (U6) ni u jednom slučaju nije ispoljio bolju

antibakterijsku aktivnost u odnosu na uzorke U2 i U4. Jednaka inhibitorna aktivnost sva tri uzorka je ispoljena prema *S. aureus*, *S. sonnei* i *P. hauseri*.

Uzorci kombuha od tri ispitane gljive ispoljili su različito dejstvo koje je najverovatnije posledica različitog sastava podloge za fermentaciju, kao i produkata metabolizma simbiotske kulture tokom fermentacije. Prisustvo različitih komponenata je utvrđeno FTIR analizom vakuum uparenih uzoraka (Grafik 5.5). Dominantnima su se pokazali polisaharidi, različite strukture i sastava, a utvrđeno je i prisustvo polifenola, proteina i lipida. Među polisaharidima gljiva razlikuju se  $\alpha$ -D-glukani,  $\beta$ -D-glukani, kao i mešoviti  $\alpha,\beta$ -D-glukani. Na osnovu pozicija glikozidnih veza, glukani mogu biti linearni ili razgranati, dok se na osnovu molekulske mase mogu razvrstati na glukane sa niskom, srednjom ili visokom molekulskom masom. Takođe, sa polisaharidima gljiva mogu biti povezani proteini, lipidi, polifenoli, kao i drugi polisaharidi. Od svih navedenih karakteristika zavisice terapeutska svojstva gljiva i njihovih proizvoda (Synytsya i Novak, 2013). Organske supstance će antimikrobno dejstvo ispoljiti uticajem na sintezu ćelijskog zida, promenom propustljivosti ćelijske membrane ili inhibicijom sinteze proteina i DNK. Polifenoli i fenolne kiseline ispoljavaju različitu aktivnost protiv mikroorganizama, zavisno od pozicija i broja hidroksilnih grupa (Matijašević et al., 2016), primenjene koncentracije i soja mikroorganizma na koji deluju (Cardona et al., 2013). Rastvorljivi fenoli mogu delovati prekidanjem sinteze ATP-a na površini citoplazmatične membrane mikroorganizama usled hiperacidifikacije i denaturacije  $H^+$ -ATP-aze (Velićanski et al., 2014). S druge strane, p-kumarinska kiselina, koja je pronađena u velikom broju vrsta medicinskih gljiva, utiče na propustljivost ćelijske membrane i zaustavlja ćelijske funkcije vezivanjem za DNK molekul (Alves et al., 2013b).

Pri analizi antibakterijskog dejstva kombuha od gljiva, utvrđeno je da nije jedino sirćetna kiselina zaslužna za antibakterijsku aktivnost, već i druge komponente ekstrahovane iz gljiva ili komponente sintetisane tokom fermentacije. Redukcija antibakterijske aktivnosti nakon neutralizacije bi mogla biti usled činjenice da pojedine biološke komponente (proteini i enzimi) za aktivnost zahtevaju specifičnu pH vrednost (Battikh et al., 2012). Takođe je ustanovljeno da su aktivne komponente prisutne u kombuhi od gljiva termostabilne, na osnovu čega možemo zaključiti da to nisu proteini i enzimi velike molekulske mase. Razlog za povećanje antibakterijske aktivnosti napitka

na pojedine sojeve bakterijskih vrsta, nakon toplotnog tretmana, može biti usled epimerizacije polifenolnih komponenata prisutnih u napitku (Battikh et al., 2012). S obzirom da su antimikrobne komponente u kombuhi od gljiva stabilne, njihova primena kao konzervanasa bi mogla biti kod proizvoda koji prolaze kratak termički tretman ili proces pasterizacije. Uticaj na antibakterijsku aktivnost poseduju i polifenoli prisutni u napicima, s obzirom na utvrđen različit sadržaj ovih komponenata u tečnim i vakuum uparenim uzorcima i smanjenu aktivnost usled niže koncentracije polifenola u uparenim uzorcima.

Literaturni podaci ukazuju na to da je antibakterijska aktivnost kombuhe od crnog čaja pretežno testirana primenom disk difuzione metode i metode sa bunarićima, pri čemu se vrši merenje zona inhibicije. Battikh i sar. (2012), su ispitali antimikrobnu aktivnost kombuha proizvedenih od ekstrakata šest različitih vrsta lekovitog bilja. Crni čaj je pokazao najveću efikasnost prema vrsti *P. aeruginosa* (zona inhibicije 19 mm), dok je najslabiji efekat ispoljen prema *E. coli* (11 mm). Neutralizacija je dovela do redukcije ili potpunog nestanka aktivnosti. Zadržana je jedino aktivnost prema *S. aureus* i *M. luteus*, koja je bila slaba. Toplotna denaturacija je dovela do gubitka aktivnosti jedino prema bakteriji *L. monocytogenes*. Autori navode da se na osnovu rezultata može zaključiti da antimikrobna aktivnost ne zavisi jedino od prisustva organskih kiselina, već i od drugih biološki aktivnih komponenata kao što su bakteriocini, proteini, enzimi i fenolne komponente prisutne u kombuhi. Greenwalt i sar. (1998), su ispitali antibakterijsku aktivnost kombuha pripremljenih od različitih koncentracija crnog čaja (4,4 – 70 g/L). Utvrđena aktivnost napitaka prema *E. coli*, *B. cereus*, *S. aureus*, *Salmonella sp.* i *Agrobacterium tumefaciens* poticala je od sintetisane sirćetne kiseline. Sreeramulu i sar. (2000) su ispitali antimikrobnu aktivnost kombuhe od crnog čaja. Sirćetna kiselina i napitak su imali istu aktivnost na 10 od 14 testiranih bakterija, dok je u 4 slučaja (*S. Enteritidis*, *S. typhimurium*, *E. coli* and *S. sonnei*) kombuha ispoljila snažnije dejstvo i pri pH 7 i nakon termičkog tretmana. Na osnovu rezultata je pretpostavljeno da antimikrobna aktivnost kombuhe od crnog čaja ne potiče od sirćetne kiseline, katehina i proteina velike molekulske mase. Velićanski i sar. (2014) su utvrdili da kombuha od melise poseduje antibakterijsku aktivnost na sve testirane Gram – pozitivne i Gram – negativne bakterijske vrste. Dominatna komponenta koja ispoljava antimikrobno dejstvo je sirćetna kiselina, s obzirom da se povećanjem kiselosti napitka



povećavaju zone inhibicije. Nakon neutralizacije, inhibitorna aktivnost je ispoljena na pojedine Gram – negativne vrste: *E. coli*, *Salmonella* sp., *C. freundii*. Ovi rezultati ukazuju na to da ipak postoje komponente koje dodatno utiču na aktivnost, najverovatnije tanini iz čaja ili određeni metaboliti mikroorganizama. Takođe je utvrđeno da su komponente termostabilne i da ne pripadaju proteinima velike molekulske mase, koji su denaturisani na 100 °C. Antimikrobno dejstvo kombuhe od zelenog čaja nakon aromatizacije cimetom, kardamonom i timijanom, ispitali su Shahbazi i sar. (2018) primenom mikrodilucione metode. MIC vrednosti su određene kod četiri patogene vrste: *E. coli* O157:H7, *Salmonella typhimurium*, *B. cereus* i *S. aureus*. Antibakterijska aktivnost se povećavala tokom fermentacije, pa ipak, nije utvrđena statistički značajna razlika u aktivnosti nakon 4 i nakon 16 dana fermentacije. Kombuha aromatizovana cimetom, nakon 16 dana fermentacije poseduje značajnu inhibitornu aktivnost prema *E. coli*, *Salmonella typhimurium* i *S. aureus*. S druge strane, aromatizacija kardamonom je ispoljila najnižu inhibitornu aktivnost. Najosetljivija Gram – pozitivna bakterija bila je *B. cereus*, a Gram – negativna, *E. coli*. Povećanje koncentracije cimeta u kombuhi uticalo je na vrednosti MIC, pri čemu su najniže vrednosti dobijene pri 100 % koncentracije cimeta. Komponente cimeta utiču na razgradnju citoplazmatične membrane i na iscrpljenje unutarćelijskog ATP-a. Na sniženje MIC vrednosti tokom fermentacije uticalo je i sniženje pH vrednosti. Ashrafi i sar. (2018) primenili su kombuha napitak u pripremi biorazgrađivog aktivnog pakovanja. Film je napravljen od hitozana uz dodatak kombuhe od crnog čaja u koncentraciji od 1 %, 2 % i 3 %. Primena kombuhe je dovela do povećanja antibakterijske aktivnosti biofilma ispitane prema *S. aureus* i *E. coli*. Nakon pakovanja mlevenog mesa u ovakvu aktivnu ambalažu, ukupna broj bakterija se smanjivao i doveo do produžetka roka trajanja mesa sa 3 na 6 dana. Takođe je smanjen i broj *S. aureus*.

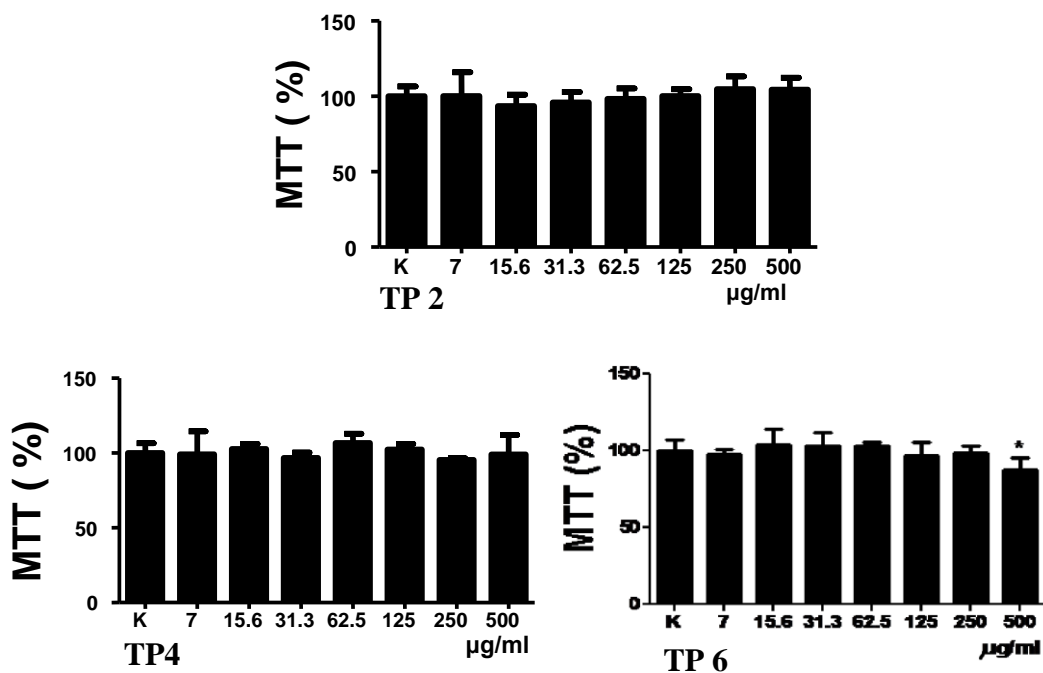
Na osnovu literaturnih podataka, sirćetna kiselina ima značajan uticaj za inhibitorni efekat velikog broja mikroorganizama. Međutim, nakon neutralizacije uzorka do pH 7, aktivnost se ispoljava na pojedinim bakterijskim vrstama. To ukazuje da nije jedino sirćetna kiselina zaslužna za aktivnost. Toplotna denaturacija napitka ne utiče na smanjenje aktivnosti kombuhe, i u pojedinim slučajevima dovodi i do njenog povećanja, što dovodi do zaključka da su antimikrobne komponente termostabilne i da to nisu proteini i enzimi velike molekulske mase koji bi ovim tretmanom bili

denaturisani. Takođe ni polifenoli i katehini iz čaja nisu presudni za aktivnost, već su to metaboliti mikroorganizama iz inokuluma. Antimikrobne komponente i nizak pH, dovode do sinergetskog efekta i povećane antimikrobne aktivnosti (Mo et al., 2008).

### **5.4.3. Citotoksična i imunomodulatorna aktivnost polisaharidnih ekstrakata iz kombuha**

#### **5.4.3.1. Citotoksičnost polisaharidnih ekstrakata kombuhe u kulturama PBMC**

Kulture humanih PBMC su tretirane različitim dozama polisaharidnih ekstrakata kombuha od medicinskih gljiva tokom 24 h u cilju utvrđivanja njihove citotoksične doze za PBMC. U ovom modelu su korišćeni nestimulisani PBMC, te se promena brojnosti PBMC u kulturi na osnovu njihove spontane proliferacije može zanemariti. MTT testom je utvrđeno delimično smanjenje metaboličke aktivnosti kod uzorka TP6 pri najvišoj primenjenoj dozi (Grafik 5.11), dok kod ostalih uzoraka nije primećena značajna promena % MTT u odnosu na kontrolne netretirane ćelije. Smanjenje metaboličke aktivnosti kod uzorka TP6 (500 µg/mL) je bilo manje od 30 %, što se prema standardu za ispitivanje citotoksičnosti (ISO 10933-5) može tumačiti kao odustvo značajne citotoksične aktivnosti TP6 uzorka (ISO, P., 2009). Nije utvrđeno ni povećanje % MTT u poređenju sa kontrolnim uzorkom, što se može tumačiti kao odsustvo direktnog stimulatornog efekta ekstrakata na proliferaciju PBMC u kulturi.



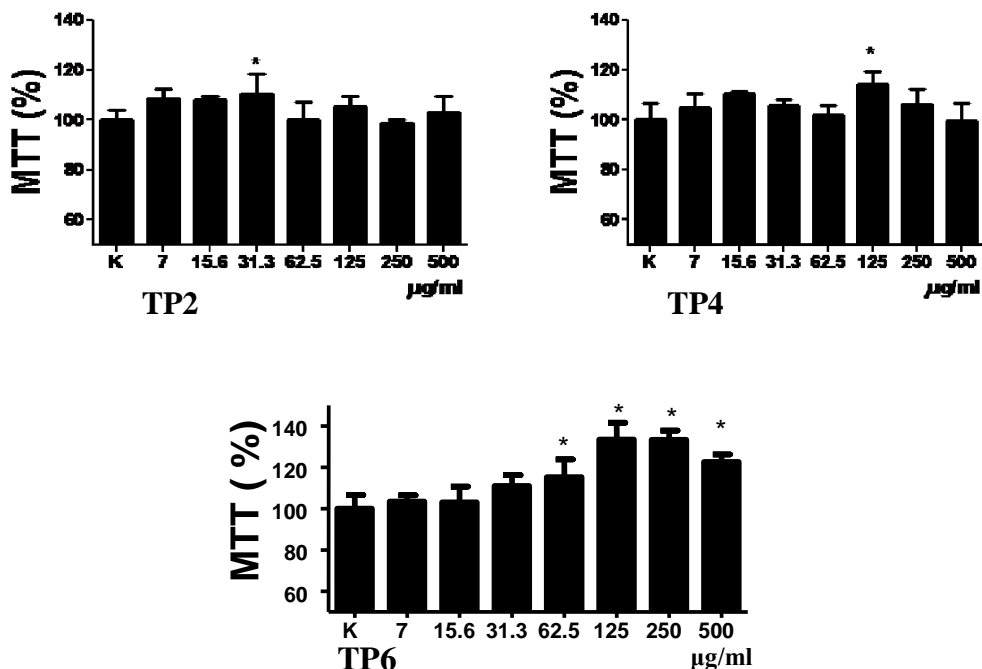
Grafik 5.11. Citotoksičnost polisaharidnih uzoraka (TP2, TP4 i TP6) kombuha napitaka od medicinskih gljiva na humane PBMC.

K-kontrolni uzorak bez ekstrakata, TP2-polisaharidni ekstrakt kombuhe od gljive *Ganoderma lucidum*, TP4- polisaharidni ekstrakt kombuhe od gljive *Lentinus edodes*, TP6-polisaharidni ekstrakt kombuhe od gljive *Coriolus versicolor*. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  standardna devijacija (n=4). \* $p < 0,05$ , u odnosu na kontrolu.

#### 5.4.3.2. Efekat polisaharidnih ekstrakata kombuha na proliferaciju PBMC stimulisanih sa PHA

Humani PBMC sadrže heterogenu grupu imunskih ćelija: limfocite i antigen-prezentujuće ćelije kao što su monociti i manjim delom dendritske ćelije (Shin et al., 2007). Ove ćelije upravljaju urođenim i stečenim imunim odgovorom, koji nakon dodatka komponenata iz gljiva može biti stimulisan ili redukovan (Li et al., 2013). Radi utvrđivanja da li polisaharidni ekstrakti kombuha uzoraka od medicinskih gljiva utiču na modifikaciju imunskog odgovora, prvo je ispitan njihov efekat na proliferaciju PBMC u kulturi nakon stimulacije sa PHA. U ovom modelu, PHA deluje kao superantigen, premošćava veze između MHC (engl. major histocompatibility complex) molekula na antigen-prezentujućim ćelijama i receptora na T limfocitima, što indukuje

proliferaciju T limfocita (Majumdar et al., 1990). PHA takođe indukuju produkciju citokina u kulturi PBMC (Shin et al., 2007).



Grafik 5.12. Proliferacija PHA stimuliranih humanih PBMC u prisustvu polisaharidnih ekstrakata (TP2, TP4 i TP6) kombuha napitaka od medicinskih gljiva.

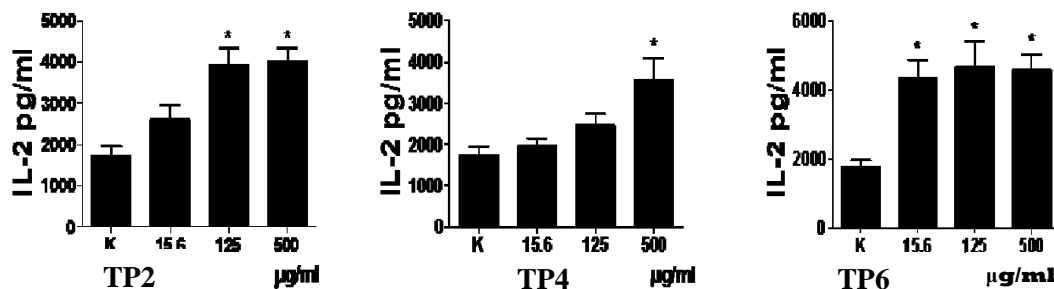
K-kontrolni uzorak bez ekstrakata, TP2-polisaharidni ekstrakt kombuhe od gljive *Ganoderma lucidum*, TP4- polisaharidni ekstrakt kombuhe od gljive *Lentinus edodes*, TP6-polisaharidni ekstrakt kombuhe od gljive *Coriolus versicolor*. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  standardna devijacija (n=4). \*p < 0,05, u odnosu na kontrolu

Primenjene su iste doze ekstrakata kombuha od gljiva (7–500 µg/mL), a nakon 48 h je urađen MTT test u cilju određivanja ukupne metaboličke aktivnosti u kulturi koja je direktno proporcionalna broju metabolički aktivnih ćelija. U tom smislu, ukupna brojnost ćelija u kulturi predstavlja balans između proliferacije i umiranja ćelija. TP6 je ispoljio stimulatorni efekat na ukupno povećanje brojnosti PBMC stimuliranih sa PHA, počevši od 62,5 µg/mL (Grafik 5.12). Blago smanjenje % MTT pri dozi TP6 od 500 µg/mL se može objasniti povećanim toksičnim efektom TP6 pri ovoj dozi (Grafik 5.11) Uzorak TP2 nije uticao na ukupnu brojnost PBMC stimuliranih sa PHA, dok je uzorak TP4 doveo do povećanja brojnosti pri višim koncentracijama (125 µg/mL).

Obzirom da su uzorci TP6 i TP4 doveli do povećanja brojnosti ćelija usled proliferacije, samo u prisustvu PHA, kao i to da PHA stimuliše proliferaciju limfocita

samo u kulturama u kojima su prisutne antigen-prezentujuće ćelije (Majumdar et al. 1990), može se pretpostaviti da je ovakav efekat ekstrakata kombuhe od gljiva posledica njihovog imunomodulatornog efekta na limfocite i antigen prezentujuće ćelije u populaciji PBMC. U tom cilju su u sledećem koraku analizirani nivoi citokina produkovanih u kulturama PBMC stimulisanih sa PHA.

Usled toga što je IL-2 ključan za proliferaciju limfocita u ispitivanom modelu sistemu (Shin et al., 2007; Xu et al., 2014), prvo je merena koncentracija ovog citokina u supernatantima kultura PHA-stimuliranih PBMC i različitim koncentracijama polisaharidnih ekstrakata kombuha napitaka od medicinskih gljiva. Rezultati (Grafik 5.13) su pokazali da uzorak TP2 značajno stimuliše produkciju IL-2 u dozama 125 i 500 µg/mL, dok je uzorak TP4 stimulirao produkciju IL-2 samo u najvećim primenjenim koncentracijama (500 µg/mL). Najsnažniji efekat na produkciju IL-2 je ispoljio uzorak TP6 (Grafik 5.13) koji je značajno stimulirao produkciju IL-2 u svim ispitivanim dozama. Međutim, nije uočen značajan dozno-zavisni efekat između ispitivanih doza na produkciju IL-2 u ovim eksperimentima.

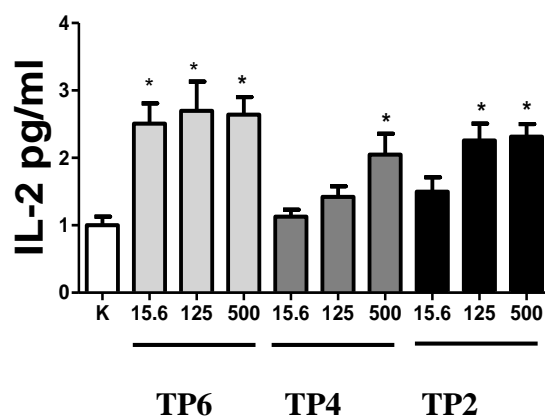


Grafik 5.13. Produkcija IL-2 od strane PHA stimuliranih humanih PBMC u prisustvu polisaharidnih ekstrakata kombuha napitaka od medicinskih gljiva.

K-kontrolni uzorak bez ekstrakata, TP2-polisaharidni ekstrakt kombuhe od gljive *Ganoderma lucidum*, TP4-polisaharidni ekstrakt kombuhe od gljive *Lentinus edodes*, TP6-polisaharidni ekstrakt kombuhe od gljive *Coriolus versicolor*. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± standardna devijacija (n=4). \*p < 0,05, u odnosu na kontrolu

Poređenjem indeksa produkcije IL-2 nakon tretmana različitim uzorcima, takođe je uočeno da TP6 ispoljava najsnažniji stimulatorni efekat na produkciju IL-2 (Grafik 5.14), dok su TP2 i TP4 imale nešto slabiji efekat čak i pri najvećoj testiranoj

dozi (500 µg/mL). Ovi rezultati su u skladu sa podacima dobijenim analizom ukupne brojnosti PBMC u prisustvu polisaharidnih ekstrakata. Treba uzeti u obzir činjenicu da je izmerena koncentracija IL-2 u supernatantima kultura rezultat balansa produkcije i potrošnje ovog citokina u kulturi, što može biti razlog, zašto je npr. detektovan povećan broj PHA-PBMC nakon tretmana sa TP4 (125 µg/mL), a da pri tome nije detektovana veća koncentracija IL-2 u supernatantu kultura. Stoga je neophodno primeniti preciznije metode merenja proliferacije ćelija u cilju određivanja preciznije veze između produkcije IL-2 i proliferacije ćelija. Osim toga, za kompletno razumevanje efekta polisaharidnih ekstrakata na funkcije imunskih ćelija sprovedena je detaljnija analiza efekata na produkciju proinflamacijskih i anti-inflamacijskih citokina, koji osim na proliferaciju i preživljavanje, utiču i na ostale funkcije imunskih ćelija.



Grafik 5.14. Indeks promene u produkciji IL-2 od strane PHA stimulisanih PBMC pod uticajem polisaharidnih ekstrakata kombuha napitaka.

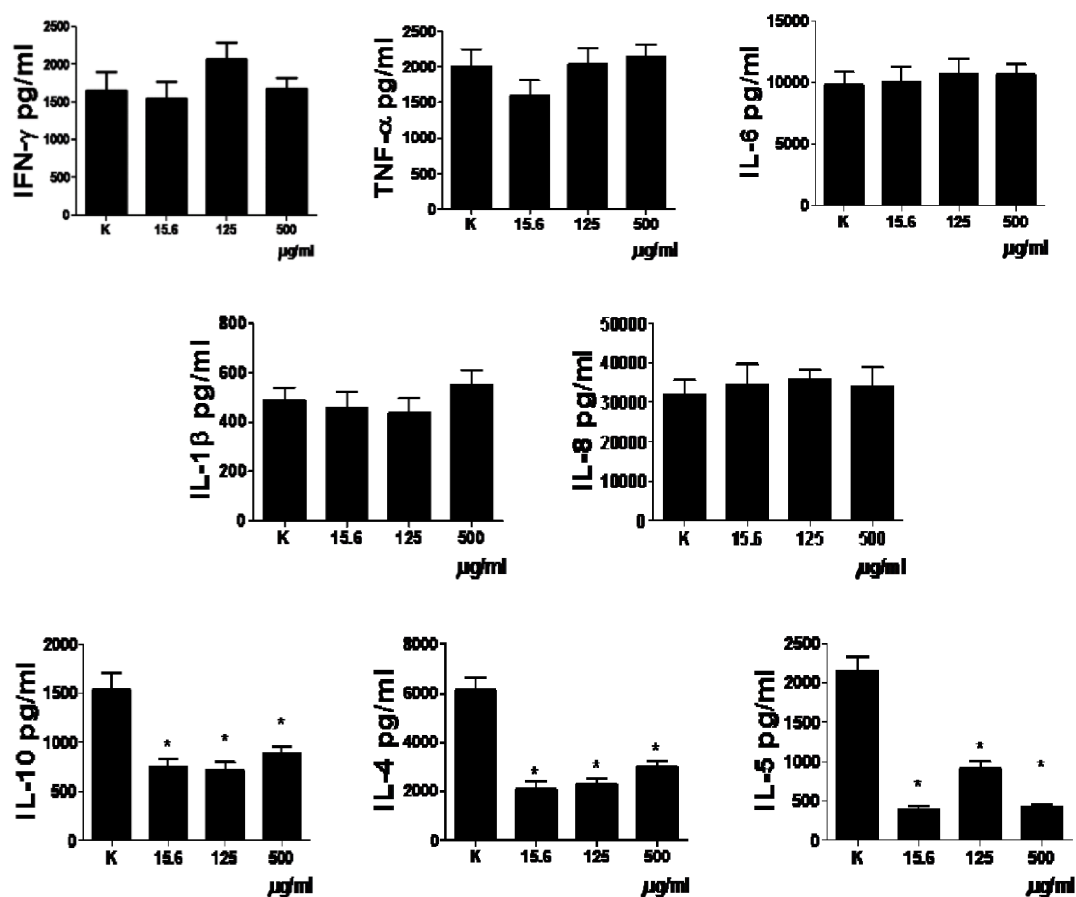
K-kontrolni uzorak bez ekstrakata, TP6-polisaharidni ekstrakt kombuhe od gljive *Coriolus versicolor*, TP4-polisaharidni ekstrakt kombuhe od gljive *Lentinus edodes*, TP2-polisaharidni ekstrakt kombuhe od gljive *Ganoderma lucidum*. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± standardna devijacija (n=4). \*p < 0,05, u odnosu na kontrolu.

#### **5.4.3.3. Efekti polisaharidnih ekstrakata kombuha od gljiva na produkciju citokina u kulturi stimuliranih PBMC**

Jedan od potencijalno efikasnih načina za povećanje odbrambene sposobnosti imunskog sistema nekog organizma je njegova stimulacija pomoću imunomodulatornih agenasa (Li et al., 2018). Imunomodulatorna aktivnost polisaharida (pretežno  $\alpha$ -glukana,  $\beta$ -glukana, proteina vezanih za polisaharide ili glikoproteina) se može ispoljiti kao povećanje produkcije citokina od strane antigen-prezentujućih ćelija kao što su dendrične ćelije i limfociti (Lull et al., 2005; Choi et al., 2013).

Kao i u prethodnom dizajnu eksperimenta, PBMC su stimulirane sa PHA i različitim netoksičnim dozama (15,6 - 500  $\mu\text{g/mL}$ ) ekstrakata kombuhe, ili bez ekstrakata (kontrola), u cilju praćenja produkcije proinflamacijskih citokina (TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ ), hemokina (IL-8), Th1 citokina (IFN- $\gamma$ ), Th2 citokina (IL-4, IL-5), kao i ključnog antiinflamacijskog citokina IL-10.

Rezultati efekta polisaharidnog ekstrakta kombuhe od gljive *G. lucidum* (TP2) na ispitivane citokine su prikazani na grafiku 5.15. Uzorak TP2 nije dovodio do značajne modulacije produkcije Th1, proinflamacijskih citokina i hemokina (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$  i IL-8). Nasuprot tome, zabeležena je statistički značajna redukcija Th2 citokina (IL-4 i IL-5), kao i imunoregulatornog citokina IL-10. Svi ovi citokini ispoljavaju anti-inflamatorno dejstvo (Han et al., 2011; Choi et al., 2013). Osim toga, IL-4 i IL-5 su veoma važni u odbrani organizma od parazitskih infekcija helmintima, ali i u patogenezi alergija (Steinke i Borish, 2001).



Grafik 5.15. Uticaj polisaharidnog ekstrakta kombuha napitka od gljive *G. lucidum* (TP2) na produkciju citokina od strane PBMC stimulisanih sa PHA.

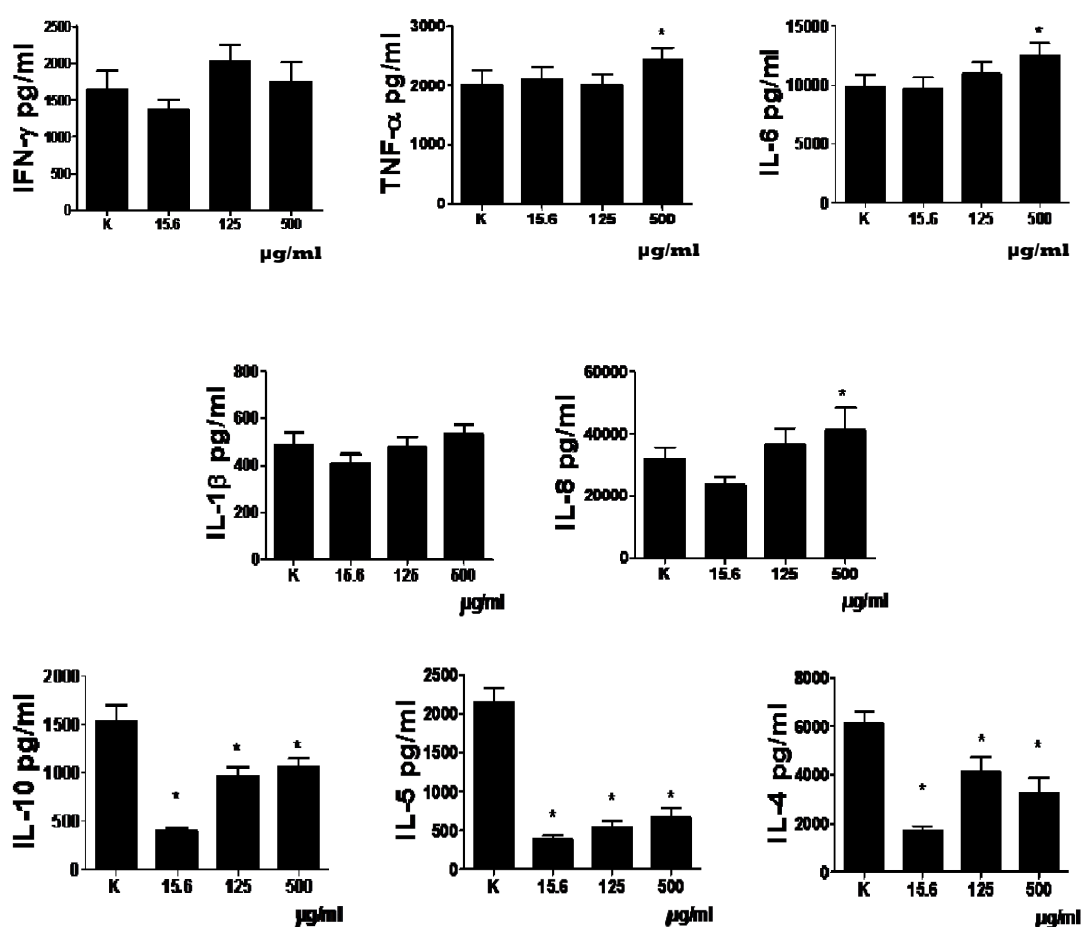
K-kontrolni uzorak bez ekstrakata, TP2-polisaharidni ekstrakt kombuhe od gljive *Ganoderma lucidum*, TP4-polisaharidni ekstrakt kombuhe od gljive *Lentinus edodes*, TP6-polisaharidni ekstrakt kombuhe od gljive *Coriolus versicolor*. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  standardna devijacija (n=4). \*p < 0,05, u odnosu na kontrolu.

Efekti polisaharidnog ekstrakta kombuha napitka od gljive *L. edodes* (TP4) na produkciju citokina u PHA - stimulisanih PBMC su prikazani na grafiku 5.16. Slično ekstraktu TP2, TP4 je takođe suprimirao PHA - indukovanu produkciju Th2 (IL-4, IL-5) citokina i IL-10, u sve tri ispitivane doze. Pri tome je efekat na supresiju produkcije IL-10 bio najmanji pri najvećoj primenjenoj dozi TP4 (500 µg/mL). S tim u vezi, uočeno je da ovaj uzorak stimuliše produkciju proinflamacijskih citokina TNF-α, IL-6 i IL-8, u najvećim primenjenim dozama (500 µg/mL).

IL-6 je citokin koji igra važnu ulogu u imunskom odgovoru organizma i njegovoj regulaciji tokom akutne faze infekcije i povrede (Heinrich et al., 2003), kao i u



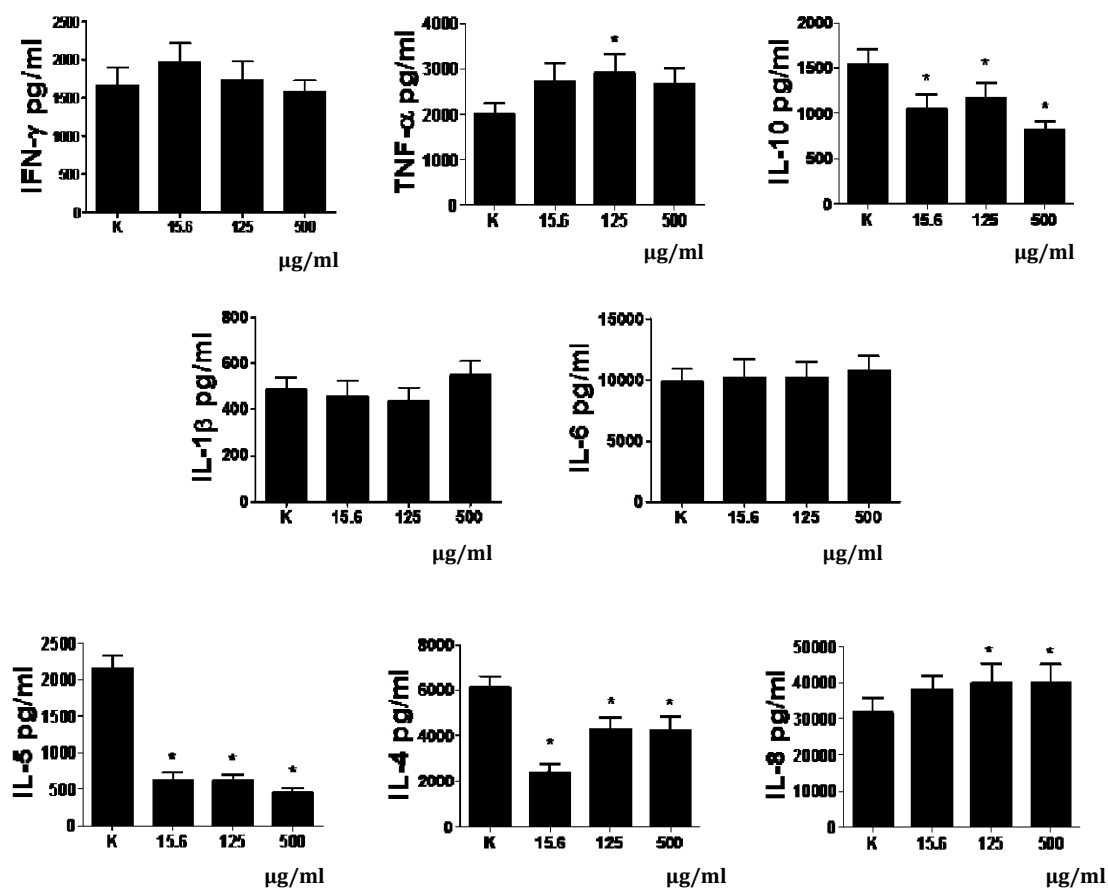
zarastanju rana (Lin et al., 2003) TNF- $\alpha$  proizvode makrofagi kao deo imunog odgovora i vrlo je značajno njihovo učešće u uništenju tumora i tretmanu humanih kancer ćelija (Hobbs, 2000). Dok su TNF- $\alpha$  i IL-6 važni za lokalni i sistemski imuni odgovor i spremnost organizma za borbu protiv infekcija, IL-8 je ključan hemokin za privlačenje leukocita, na mesto infekcije tokom rane faze razvoja imunskog odgovora (Matsuo, et al., 2019). Ovi rezultati ukazuju na to da, za razliku od TP2, TP4 je osim supresije anti-inflamacijskih citokina, ispoljio i stimulatorne efekte na produkciju proinflamacijskih citokina u najvećoj primenjenoj dozi (500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ).



Grafik 5.16. Uticaj polisaharidnog ekstrakta kombuhe od gljive *L. edodes* (TP4) na produkciju citokina od strane PBMC stimuliranih sa PHA.

K-kontrolni uzorak bez ekstrakata, TP2-polisaharidni ekstrakt kombuhe od gljive *Ganoderma lucidum*, TP4-polisaharidni ekstrakt kombuhe od gljive *Lentinus edodes*, TP6-polisaharidni ekstrakt kombuhe od gljive *Coriolus versicolor*. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  standardna devijacija (n=4). \*p < 0,05, u odnosu na kontrolu.

Uticao ekstrakta kombuhe od gljive *C. versicolor* (TP6) na citokine je prikazan na grafiku 5.17. Primećeno je da je uzorak TP6 ispoljio stimulatorni efekat na produkciju TNF- $\alpha$  (pri dozi od 125  $\mu\text{g/mL}$ ) i IL-8 (125  $\mu\text{g/mL}$  i 500  $\mu\text{g/mL}$ ). Slično prethodnim uzorcima, TP6 je inhibirao produkciju Th2 citokina (IL-4 i IL-5) kao i IL-10 u sve tri ispitivane doze, dok produkcija IFN- $\gamma$ , IL-6 i IL-1 $\beta$  nije bila značajnije modulirana.

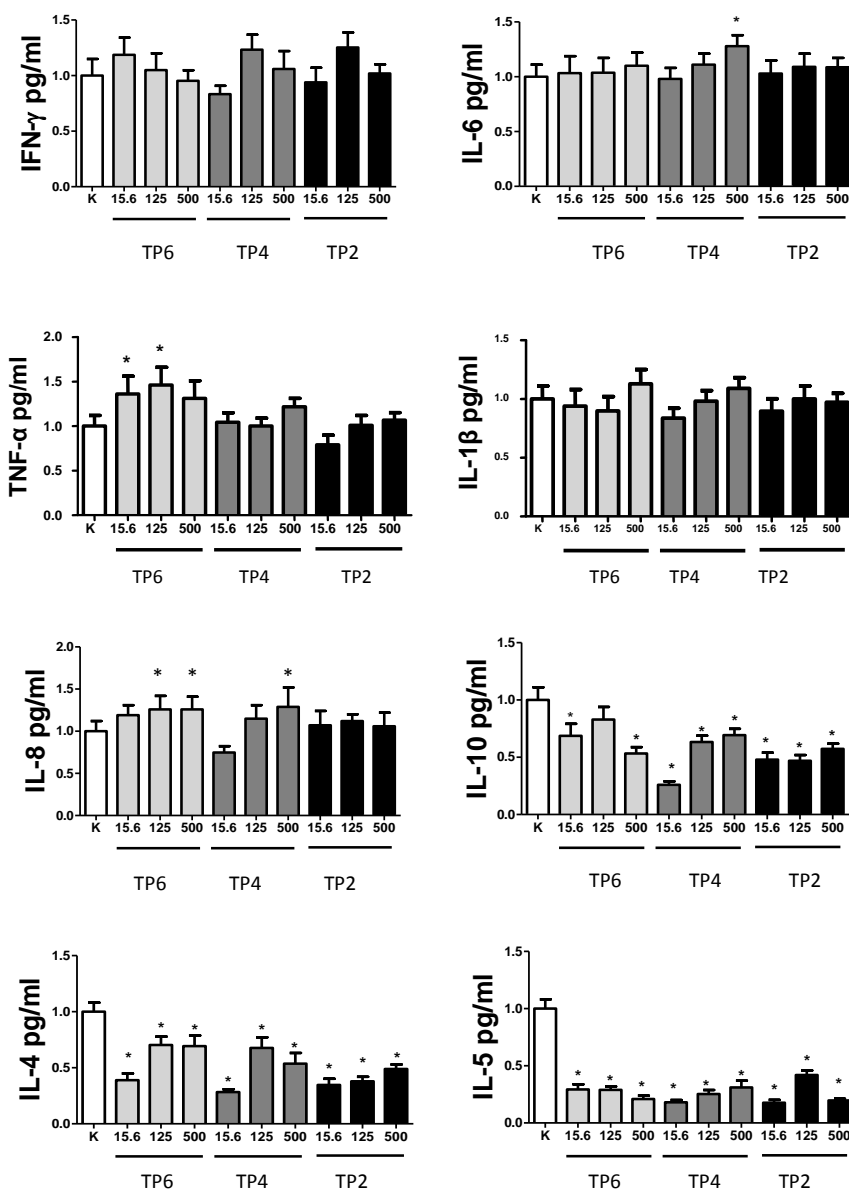


Grafik 5.17. Uticaj polisaharidnog ekstrakta kombuha napitka od gljive *C. versicolor* (TP6) na produkciju citokina od strane PBMC stimuliranih sa PHA.

K-kontrolni uzorak bez ekstrakata, TP2-polisaharidni ekstrakt kombuhe od gljive *Ganoderma lucidum*, TP4-polisaharidni ekstrakt kombuhe od gljive *Lentinus edodes*, TP6-polisaharidni ekstrakt kombuhe od gljive *Coriolus versicolor*. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  standardna devijacija (n=4). \*p < 0,05, u odnosu na kontrolu .

U cilju komparacije imunomodulacijskih efekata tri ispitivana ekstrakta kombuhe, izračunat je odnos između produkcije citokina u kulturama tretiranim ekstraktima i produkcije citokina u kontrolnim kulturama (index produkcije citokina) i rezultati su prikazani na grafiku 5.18. Zapaženo je da je najsnažniji efekat kod sva tri ekstrakta povezan sa redukcijom produkcije IL-5 i IL-4. Ekstrakt TP6 je ispoljio najsnažniji stimulatorni efekat na produkciju TNF- $\alpha$  i IL-8 kao i najslabiji efekat na inhibiciju produkcije IL-10 od strane PHA-stimuliranih PBMC. Ekstrakt TP4 je ispoljio nešto blaži imunomodulatorni efekat na PBMC i jedini je stimulisao produkciju IL-6. Sa druge strane, TP2 ekstrakt je pokazao najsnažniji efekat na inhibiciju produkcije IL-4 citokina.

Inhibitorni efekat ekstrakata na produkciju anti-inflamacijskog citokina IL-10 može biti značajan za efikasniji porinflamatorni odgovor imunskog sistema na potencijalne infektivne stimulse. Naime, pokazano je da IL-10 suprimira diferencijaciju i funkcije Th1 i Th17 ćelija, antigen-prezentujućih ćelija, kao i produkciju proinflamacijskih citokina (Couper et al., 2008). Stoga bi smanjenje produkcije ovog citokina nakon tretmana sa ekstraktima moglo da bude tumačeno i kao smanjenje praga osetljivosti za aktivaciju imunskog odgovora na potencijalno infektivne agense. U cilju potvrde ove hipoteze neophodno je ispitati kakav je potencijal PBMC tretiranih sa ekstraktima da produkuju proinflamacijske citokine nakon sekundarne stimulacije sa infektivnim agensima.



Grafik 5.18. Poređenje indeksa produkcije citokina polisaharidnih ekstrakata TP2, TP4 i TP6 izolovanih iz kombuha od medicinskih gljiva.

K-kontrolni uzorak bez ekstrakata, TP6-polisaharidni ekstrakt kombuhe od gljive *Coriolus versicolor*, TP4-polisaharidni ekstrakt kombuhe od gljive *Lentinus edodes*, TP2-polisaharidni ekstrakt kombuhe od gljive *Ganoderma lucidum*. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  standardna devijacija (n=4). \*p < 0,05, u odnosu na kontrolu.

FTIR analiza tri ispitana uzorka kombuha od gljiva je pokazala da se uzorci sastoje dominantno od polisaharida različitog sastava, kao i od proteina, polifenola i lipida. Utvrđena je i razlika u polisaharidnom i proteinskom sastavu među uzorcima. Kvantitativna analiza je pokazala da uzorak TP6 sadrži najviše polifenola za razliku od druga dva uzorka, što bi mogao biti razlog uticaja na proliferaciju PHA stimulisanih

PBMC i najsnažnijeg uticaja na produkciju IL-2 i TNF- $\alpha$ . Takođe, FTIR analizom je utvrđeno da uzorak TP6 jedini sadrži apsorpcionu traku na  $\approx 1650\text{ cm}^{-1}$ , karakterističnu za polisaharide, što nam ukazuje na razliku u polisaharidnom sastavu uzorka TP6 i uzoraka TP2 i TP4 kod kojih je utvrđena traka na  $1628\text{ cm}^{-1}$  (Grafik 5.6).

Pokazano je da polisaharidi iz gljiva, različitog sastava i molekulske mase mogu ispoljiti imunomodulatorno dejstvo (Jeong et al., 2013). Uticaj na produkciju citokina od strane polisaharopeptida (PSP) iz submerzno gajenog micelijuma gljive *C. versicolor* ranije su ispitivali Lee i sar. (2006) u PHA stimulisanim humanim PBMC. Autori su pokazali da primena PSP pri koncentracije od 1 mg/mL stimuliše produkciju citokina IL-1 $\beta$  i TNF- $\alpha$  od 2,8, odnosno 3,63 puta, dok je stimulacija produkcije IFN- $\gamma$  bila slabija. Verovatni razlog niže stimulacije primenom polisaharidnog ekstrakta iz kombuha napitka TP6, u odnosu na ranije objavljene rezultate, bi mogao biti zbog primene različitih sojeva ove gljive, različitog načina gajenja i korišćenje niže koncentracije tokom ispitivanja. Značaj TNF- $\alpha$  ogleda se u imunomodulatornom i antitumornom delovanju. S tim u vezi su Zang i sar. (2013) antitumorna svojstva ekstrakta gljive *Ganoderma atrum* povezali sa povećanom produkcijom TNF- $\alpha$  u eksperimentu na miševima sa tumorom debelog creva, CT26. Istovremeno su ekstrakti ispoljili nisku toksičnost i odsustvo sporednih efekata na zdrave ćelije. Smith i sar. (2002) su ustanovili da polisaharidi, proteini i triterpeni izolovani iz gljive *G. lucidum* ispoljavaju imunomodulatorna aktivnost aktivacijom imunskih efektorskih ćelija, kao što su T ćelije, makrofagi i NK ćelije, čija aktivacija vodi ka produkciji citokina (interleukina, TNF- $\alpha$  i interferona). Takođe je i intravenozna primena lentinana, kod deset pacijenata sa tumorom želuca, povećala produkciju TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$  i IL-1 $\beta$  u PBMC (Hobbs, 2000).

Rezultati ranijih istraživanja ukazuju na to da polifenoli pored imunomodulatorne aktivnosti ispoljavaju i antitumornu aktivnost i stimulišu imunski odgovor na mukoznim barijerama. Takođe, ranije je pokazan povoljan efekat na regulaciju Th1/Th2 balansa i u sprječavanju alergijskih bolesti putem inhibicije formiranja antigen-IgE antitelo (Ding et al., 2018). Utvrđeno je da pojedine medicinski značajne gljive poseduju anti-alergijsko dejstvo, međutim, još uvek nisu identifikovane sve bioaktivne komponente odgovorne za ovaj efekat (Badalyan et al., 2019). Poznato je da lucideninske kiseline A, B, C, D i E, lucidon A i ganoderinske kiseline B i C iz gljive *Ganoderma lucidum*, imaju

sposobnost da inhibiraju oslobađanje histamina iz većine ćelija (Kim et al., 2004). Takođe, pokazano je da je topikalna primena etanolnog ekstrakta gljive *Pleurotus eryngii* umanjila lezije kože usled atopijskog dermatitisa izazvanog 2,4-dinitrochlorbenzenom (DNCB), kod miševa, smanjenjem Th2 imunskog odgovora (Choi et al., 2013). U drugom istraživanju, etanolni ekstrakt gljive *Pleurotus eryngii* uticao je na značajno smanjenje sekrecije IL-4 citokina i signalnih proteina povezanih sa alergijama, usled čega je ovaj ekstrakt ispoljio anti-alergijska svojstva u antigen stimulisanim ćelijama monocita (Han et al., 2011). Ovi rezultati dodatno potvrđuju potencijalan benefit dobijenih ekstrakata u tretmanu alergijskih oboljenja i atopijskog dermatitisa

Da li će određeni metabolit pojačati ili stišati određeni imunski odgovor zavisi od brojnih faktora u koje spadaju: primenjena doza, način i momentat primene (Lull et al., 2005). Rezultati ukazuju na to da komponente kombuhe od medicinskih gljiva, izolovane u momentu kada je proizvod pogodan za konzumiranje, poseduju imunomodulatorna aktivnost. Benefite od konzumiranja kombuha proizvoda od medicinskih gljiva ili izdvojenih polisaharidnih ekstrakata, bi mogla da ima populacija kod koje je Th2 imunski odgovor prenaplašen, kao što je slučaj sa alergijskim reakcijama, astmom i atopijskim dermatitisom. Problem alergija u svetu je u porastu, pa se usled toga istražuju novi prirodni izvori anti-alergijskih komponenata koje bi pomogle u preventivnoj terapiji (Badalyan et al., 2019). Dodatno, stimulacija proinflamacijskih citokina i smanjenje anti-inflamacijskog IL-10 citokina, može doprineti odbrani domaćina od patogenih bakterija, virusa i gljiva, kao i u borbi protiv tumora. Ove hipoteze je neophodno potvrditi dodatnim eksperimentima *in vitro*, kao i u eksperimentima *in vivo*, a potom i u kliničkim ispitivanjima.

## **5.5. Senzorna analiza kombuha proizvoda od medicinskih gljiva**

Veoma je česta i uspešna primena hedonske skale za merenje nivoa prihvatljivosti prehrambenih proizvoda i izražavanja stepena dopadljivosti kod ispitanika. Skala sadrži 9 gradacija, gde 1 označava maksimalno neprijatan, a 9 maksimalno prijatan utisak (Radovanović i Popov-Raljić, 2001). Primenom ove skale,

ocenjeni su uzorci kombuha napitaka od gljiva *G. lucidum*, *L. edodes* i *C. versicolor* kada je kod uzoraka postignuta konzumna kiselost od 3 g/L. Takođe su ocenjeni i aromatizovani uzorci kombuha napitaka od ove tri gljive. Aromatizacija kombuha od gljive *G. lucidum* i *C. versicolor* je izvršena dodatkom arome kokosa, dok je kombuha napitak od gljive *L. edodes* aromatizovana dodatkom arome maline. Kao kontrolni uzorak poslužila je kombuha koja je pripremljena na podlozi od crnog čaja, a koja je sadržala istu koncentraciju kiselina i fermentisana je istom kombuha kulturom. U tabeli 5.15 prikazani su rezultati ocenjivanja proizvoda kombuha od medicinskih gljiva sa i bez aroma.

Najbolju ocenu tokom senzornog ocenjivanja dobila je kombuha od gljive *L. edodes* (T4), 6,82. Na osnovu ocene, dopadljivost ovog proizvoda se može opisati između „malo mi se dopada” i „umereno mi se dopada”. Aromatizacija napitka T4 nije dovela do poboljšanja opšteg utiska kod ispitanika, već do blagog pada ocene koja nije bila statistički značajan. Najlošiju ocenu dobila je kombuha od gljive *G. lucidum* (T2), svega 2,35 što označava utisak između „veoma mi se ne dopada” i „umereno mi se ne dopada”. Aromatizacija ovog proizvoda aromom kokosa, nakon što je postignuta ukupna kiselost od 3 g/L, dovela je do statistički značajne promene rezultata ispitivanja, postizanjem ocene 5,23. Kombuha od gljive *C. versicolor* nakon aromatizacije, takođe aromom kokosa, postigla je povećanje ocene od 5,11 pre aromatizacije, do 5,59, ali ovo povećanje nije bilo statistički značajno. U odnosu na kontrolni uzorak, koji je predstavljala kombuha od crnog čaja, bolju ocenu postigla je kombuha od gljive *L. edodes*. Ostale ocene bile su niže, ali se jedino ocena kombuhe od gljive *G. lucidum* statistički značajno razlikovala.

Komponente koje najviše utiču na karakterističan ukus gljiva su jedinjenja koja doprinose ukusu sličnom mononatrijum glutamatu (MNG) i slatke komponente. Slobodne aminokiseline koje doprinose ukusu gljiva su alanin, glicin, zatim MNG komponente, pretežno aspartinska i glutaminska kiselina i treonin koji utiče na sladak ukus (Mau et al., 2001). Sadržaj aminokiselina sa MNG ukusom u gljivi *C. versicolor* je iznosio 0,50 mg/g, u gljivi *G. lucidum* 0,17 mg/g (Mau et al., 2001), dok je u dva soja gljive *L. edodes* bio viši (1,71 i 1,93 mg/g) (Yang et al., 2001). Industrijskom preradom pečuraka, primenom visokih temperatura, utvrđeno je da dolazi do niza hemijskih reakcija usled čega se menja sastav komponenata arome (Wang et al., 2014). U gljivi *L.*

*edodes* nakon kuvanja se pojavljuje 1,2,4-tritriolan, koji nije prisutan u svežim plodonosnim telima (Hobbs, 2000). Dodatno je utvrđeno i da toplotni tretman, pored izmene aromatskog sastava utiče i na povećanje sadržaja vitamina u proizvodu (Wang et al., 2014).

Tabela 5.15. Rezultati senzornog ocenjivanja uzoraka kombuhe od medicinskih gljiva hedonskom skalom

Uzorak <sup>1</sup>	Senzorna ocena
<b>T2</b>	2,35 ± 1,41 <sup>a2,3</sup>
<b>T2-k</b>	5,23 ± 2,94 <sup>b</sup>
<b>T4</b>	6,82 ± 1,23 <sup>b</sup>
<b>T4-m</b>	6,35 ± 1,73 <sup>b</sup>
<b>T6</b>	5,11 ± 2,09 <sup>b</sup>
<b>T6-k</b>	5,59 ± 1,87 <sup>b</sup>
<b>Kontrola</b>	6,18 ± 2,04 <sup>b</sup>

<sup>1</sup>T2: kombuha od gljive *G. lucidum*; T4: kombuha od gljive *L. edodes*; T6: kombuha od gljive *C. versicolor*; T2-k: kombuha od gljive *G. lucidum* aromatizovana aromom kokosa; T4-m: kombuha od gljive *L. edodes* aromatizovana aromom maline; T6-k: kombuha od gljive *C. versicolor* aromatizovana aromom kokosa; K: kontrolni uzorak- kombuha od crnog čaja. <sup>2</sup>Vrednosti su prikazane kao srednjevrednosti ± standardna devijacija (n = 17). <sup>3</sup>Unutar iste kolone, srednje vrednosti obeležene istim slovima se statistički značajno razlikuju, p ≤ 0,05, ANOVA, Tukey (HSD).

Pojedine medicinske gljive sadrže gorke komponente, koje mogu dominantno uticati na ukus i prihvatljivost namirnice od strane konzumentata (Mau et al., 2001).



Mau i sar. (2001) su utvrdili da je sadržaj slobodnih aminokiselina, koje doprinose gorkom ukusu, u gljivi *C. versicolor* i *G. lucidum* iznosio 8,42 i 6,58 mg/g suve mase. S druge strane, sadržaj u dva soja gljive *L. edodes* iznosio je 2,53 i 2,78 mg/g suve mase (Yang et al., 2001). Ovim komponentama priradaju i goraki triterpeni, medicinski visoko vredna jedinjenja, kojih je u gljivi *G. lucidum* nađeno preko 380 (Badalyan et al., 2019). Gorčina se javlja u naknadnom ukusu, a najveći stepen gorčine nose lucidinska kiselina D, ganoderinska kiselina C, lucidon A i lucidinska kiselina A (Nishitoba et al., 1985). Na gorak ukus fermentisanih alkoholnih pića, kao što je pivo, uticaće punoća, stepen slasti, vrsta polifenola, sadržaj etanola i temperatura konzumiranja. Gorak ukus će biti viši sa povećanjem sadržaja alkohola, dok viši stepen punoće može zamaskirati gorčinu proizvoda (Leskošek-Cukalovic et al., 2010). Iako je sadržaj zaostalih šećera nakon fermentacije bio najviši u uzorku T2, ipak je bio nedovoljan da eliminiše ili umanjí gorak ukus koji potiče od gljive, što je verovatan uzrok niskih ocena od strane konzumenata.

Hemijska analiza proizvoda pokazala je da je uzorak T4, koji je dobio najbolje senzorne ocene kod ispitanika, imao najvišu vrednost pH, najviši sadržaj etanola, najniži sadržaj zaostalih rastvorljivih šećera i najniži sadržaj polifenola.

Aromatizacija kombuha napitka od gljive *G. lucidum* i *C. versicolor* pozitivno je uticala na promenu prihvatljivosti napitaka od strane konzumenata. S obzirom na pozitivan uticaj aroma, dalje senzorne karakteristike bi mogle biti unapređene određenim aromatičnim biljem, smanjenjem početne koncentracije gljive pri ekstrakciji, kao i promenom starter kulture kombuhe, koja može uticati na bolji aromatski profil napitaka. Takođe, senzorna ocena je izvedena od strane neobučениh ispitanika u cilju testiranja prihvatljivosti novog proizvoda od strane konzumenata. Nakon daljeg razvoja proizvoda, variranjem komponenata koje bi mogle da doprinesu kvalitetu proizvoda, ali ne i umanjenju njegovih funkcionalnih svojstava, neophodna je i evaluacija od strane obučениh ocenjivača.

## 6. ZAKLJUČAK

1. U cilju identifikacije devet izolata kvasaca iz matične kombuha kulture, primenjene su dve biohemijske metode i molekularna metoda. Rezultati identifikacije ukazuju na prisustvo dve vrste kvasaca u simbiotskoj kulturi: *Saccharomyces cerevisiae* i *Pichia mansurica*. Rezultati biohemijske identifikacije primenom API 20C AUX testova nisu bili u skladu sa rezultatima dobijenim biohemijskom identifikacijom primenom Vitek 2 sistema, kao ni sa rezultatima dobijenim molekularnom metodom. Rezultati identifikacije primenom Vitek 2 sistema pokazali su da sedam izolata pripada vrsti *S. cerevisiae*, ali da ove vrste ne pripadaju istom soju. Takođe je utvrđeno da dva izolata pripadaju kvascima iz roda *Candida*, međutim rezultati nisu bili precizni, usled loše diskriminacije vrsta. Rezultatima molekularne metode je ustanovljeno da ova dva izolata pripadaju vrsti *P. mansurica*, dok je za ostale izolate potvrđena pripadnost vrsti *S. cerevisiae*.

2. Identifikacija vrsta bakterija sirćetnog vrenja, prisutnih u matičnoj kombuha kulturi, izvršena je primenom molekularne metode. Usled toga što su fenotipske karakteristike ovih vrsta veoma slične, biohemijska identifikacija nije korišćena. Rezultati su pokazali da, od šest analiziranih izolata iz simbiotske kombuha kulture, tri pripadaju vrsti *Gluconobacter japonicus*, dva *Acetobacter senegalensis* i jedan izolat je identifikovan kao *Acetobacter papayae*.

3. U fermentacionim tečnostima od sve tri korišćene medicinske gljive, *Ganoderma lucidum* (T2), *Lentinus edodes* (T4) i *Coriolus versicolor* (T6), utvrđena je najintenzivnija promena broja kvasaca nakon 24 h od početka fermentacije. U uzorku T4 je maksimalan broj ćelija kvasaca dostignut drugog dana fermentacije, 7,83 log CFU/mL, dok su u uzorcima T2 i T6 maksimalne koncentracije ćelija kvasaca ustanovljene trećeg dana fermentacije: 7,12 i 7,50 log CFU/mL, redom. Promena broja ćelija bakterija sirćetnog vrenja (BSV) je takođe najintenzivnija bila tokom prva 24 h fermentacije. Najviši broj ćelija BSV utvrđen je u uzorku T6, 7,56 log CFU/mL, trećeg dana fermentacije, u odnosu na druga dva uzorka. U uzorku T2 maksimalan broj BSV bio je 7,29 log CFU/mL, petog dana, dok je u uzorku T4 dostignuto 7,18 log CFU/mL, drugog dana. Podloga dobijena vrelom vodenom ekstrakcijom plodonosnih tela

upotrebljenih medicinski značajnih, sa nutritivnog aspekta, je veoma pogodna za rast ćelija mikroorganizama kombuhe. Na ovaj način moguća uspešna proizvodnja novih fermentisanih kombuha napitaka na podlozi od vrelih vodenih ekstrakata medicinskih gljiva.

4. Najviša vrednost ukupnih kiselina postignuta je kod uzorka T6, 33,5 g/L. Kod uzoraka T4 i T2 dostignuta je koncentracija od 23,4 g/L i 22,8 g/L, redom. Titrabilna kiselost kod sva tri napitka se tokom 11 dana, koliko je praćen tok fermentacije, konstantno povećavala. Sa druge strane, broj ćelija BSV se posle trećeg dana (kod uzoraka T4 i T6), odnosno petog dana (kod uzorka T2) smanjivao, usled čega nije utvrđena direktna veza sadržaja ukupnih kiselina i broja ćelija BSV.

5. Najintenzivnija promena pH vrednosti fermentacionih tečnosti od sve tri korišćene medicinske gljive (T2, T4 i T6) detektovana je nakon 24 h od početka fermentacije. Najintenzivniji pad je zabeležen u uzorku T4, 1,37 pH jedinica, zatim u uzorku T6, 1,27 pH jedinica i najblaža promena je primećena u uzorku T2 u iznosu od 0,37 pH jedinica. Usporena promena pH vrednosti kod uzorka T2 primećena je nakon sedam dana, kod uzorka T4 posle pet dana, a kod uzorka T6 već nakon tri dana fermentacije, uprkos konstantnom povećanju kiselina u tečnosti u kojoj se dešava fermentacija kombuhe, a što je posledica puferskog efekta koji nastaje u tečnosti.

6. Za vreme praćenja toka fermentacije kombuhe, sadržaj saharoze u fermentacionim tečnostima od sve tri korišćene medicinske gljive (T2, T4 i T6) konstantno se smanjivao. Porast sadržaja glukoze i fruktoze trajao je jedan dan kod uzorka T4 i dva dana kod uzoraka T2 i T6, nakon čega je detektovan pad u koncentraciji ova dva monosaharida. Koncentracija glukoze je kod sva tri uzorka, tokom celog procesa fermentacije (izuzev prvog dana kod uzorka T2), bila niža od koncentracije fruktoze, na osnovu čega je zaključeno da kvasci identifikovani u ovoj kombuhi (*S. cerevisiae* i *P. mansurica*) poseduju glukofilni karakter.

7. U uzorku T4 utvrđen je najviši sadržaj etanola trećeg dana (4,3 % v/v), u odnosu na uzorak T6 (3,1 % v/v, drugog dana) i T2 (1,8 % v/v, sedmog dana). Razlog najviše koncentracije etanola u uzorku T4 može biti usled najvećeg broja ćelija kvasaca, drugog dana fermentacije ove podloge. Sa druge strane, najniži sadržaj sintetisanog

etanola utvrđen je prilikom fermentacije podloge od gljive *G. lucidum* (T2), što je u skladu sa najmanjim utvrđenim brojem ćelija kvasaca tokom celog procesa fermentacije. Na osnovu dostignutih vrednosti etanola primenom podloga od medicinskih gljiva, može se zaključiti da njihova upotreba, dovodi do proizvodnje nisko alkoholnog kombuha napitka.

8. ATR-FTIR analizom kvalitativnog hemijskog sastava vakuum uparenih kombuha napitaka, utvrđeno je da je u uzorcima dominantna polisaharidna frakcija, kao i da su u sastavu uzoraka prisutni i proteini, lipidi, fenolna jedinjenja i primarni alkoholi. Takođe, FTIR analiza je pokazala da među uzorcima postoji razlika u pojedinim polisaharidnim ili monosaharidnim komponentama, usled odsustva traka u regionu  $1720 - 1745 \text{ cm}^{-1}$  kod uzorka U6 (*C. versicolor*), a koje su detektovane kod uzoraka U2 (*G. lucidum*) i U4 (*L. edodes*). Dodatno je, jedino kod uzorka U4, detektovana traka pri  $1150 \text{ cm}^{-1}$  koja ukazuje na prisustvo glikozidnih veza. Takođe je samo u uzorku U4 izostala traka pri  $987 \text{ cm}^{-1}$  koja ukazuje na prisustvo polisaharida.

9. ATR-FTIR analiza kvalitativnog hemijskog sastava polisaharidnih ekstrakata izolovanih iz kombuha napitaka nakon uparavanja i precipitacije etanolom, ukazuje na to da je polisaharidna frakcija izdvojena i prečišćena od ugljenih hidrata male molekulske mase. Utvrđeno je da su u uzorcima zadržani proteini, fenolna jedinjenja i lipidi. Takođe, među uzorcima TP2 (*G. lucidum*), TP4 (*L. edodes*) i TP6 (*C. versicolor*), dobijenih od različitih gljiva, ustanovljeno je da postoji razlika u polisaharidnom sastavu. Kod uzorka TP6 utvrđeno je prisustvo trake na  $\approx 1650 \text{ cm}^{-1}$ , koja je izostala kod druga dva uzorka. Sa druge strane, jedino su u uzorku TP2 detektovane trake pri  $1200 \text{ cm}^{-1}$  i  $1150 \text{ cm}^{-1}$ .

10. Analiza kvantitativnog hemijskog sastava pokazala je da postoji statistički značajna razlika u sadržaju ukupnih polifenola među uzorcima kombuha napitaka od različitih gljiva. U svim uzorcima je sadržaj ukupnih polifenola bio značajno viši u odnosu na sadržaj flavonoida. Uparavanje pod vakuumom uticalo je na smanjenje sadržaja ukupnih polifenola, ali ne i na sadržaj flavonoida. Sadržaj ukupnih polisaharida u kombuha napicima od gljiva *G. lucidum* i *C. versicolor* bio je statistički značajno viši nego u kombuhi od gljive *L. edodes*. Primena uparavanja pod vakuumom nije uticala na promenu u sadržaju ukupnih polisaharida. Sadržaj ukupnih glukana, takođe je bio

značajno niži u uzorku kombuhe od gljive *L. edodes* u odnosu na sadržaj u uzorcima od druge dve gljive.

11. Nakon precipitacije polisaharida iz kombuha od medicinskih gljiva, detektovan je niži sadržaj ukupnih polisaharida u odnosu na uparene uzorke koji, na ovaj način, nisu prečišćeni od ugljenih hidrata male molekulske mase. Koncentracija ukupnih polisaharida bila je statistički značajno niža u uzorku od gljive *L. edodes* (TP4) u odnosu na sadržaj u preostala dva uzorka. Sa druge strane, precipitacija etanolom je dovela do značajnog povećanja koncentracije ukupnih polifenola i flavonoida kod sva tri polisaharidna uzorka iz kombuha u odnosu na uparene uzorke kombuha.

12. Kombuha napici od medicinskih gljiva ispoljili su različit stepen sposobnosti hvatanja slobodnih DPPH radikala. Najboljom se pokazala kombuha od gljive *G. lucidum* (T2) koja je hvatala  $83,37 \pm 0,73$  %, zatim kombuha od gljive *C. versicolor* (T6)  $58,18 \pm 0,18$  % i najslabiju sposobnost ispoljila je kombuha od gljive *L. edodes* (T4) koja je hvatala svega  $22,41 \pm 1,02$  %. Utvrđeno je da postoji veoma visoka korelacija između sadržaja suve materije i sposobnosti hvatanja DPPH radikala kod uzoraka T2, T4 i T6. Kod uparenih uzoraka kombuha *G. lucidum* (U2), *L. edodes* (U4) i *C. versicolor* (U6) sa povećanjem koncentracije utvrđeno je povećanje aktivnosti prema DPPH radikalima. Maksimalne dostignute vrednosti hvatanja ovih radikala postignute su pri koncentraciji od 60 mg/mL i to  $86,58 \pm 0,43$  %,  $73,94 \pm 0,61$  %,  $71,6 \pm 0,61$  % kod uzoraka U2, U4 i U6, redom. Veoma visok stepen negativne korelacije ustanovljen je između utvrđenih  $EC_{50}$  vrednosti ovih uzoraka i sadržaja ukupnih glukana, kao i između  $EC_{50}$  vrednosti i sadržaja ukupnih polisaharida.

13. Vrednosti apsorbanci kombuha napitaka koje su dostignute pri određivanju redukcionne sposobnosti iznosile su  $1,19 \pm 0,05$ ;  $0,82 \pm 0,02$  i  $1,64 \pm 0,03$  za kombuhe od gljiva *G. lucidum* (T2), *L. edodes* (T4) i *C. versicolor* (T6), redom. Analiza uparenih uzoraka je pokazala da dolazi do povećanja sposobnosti redukcije kada se povećava ispitivana koncentracija. Najviše dostignute vrednosti apsorbanci bile su  $2,18 \pm 0,11$  (U6),  $2,11 \pm 0,14$  (U4) i  $2,01 \pm 0,16$  (U2) pri koncentraciji od 60 mg/mL. Regresiona analiza je pokazala da je redukciona sposobnost u korelaciji sa sadržajem polifenola i flavonoida u uzorcima.

14. Tečni i upareni kombuha uzorci od gljiva su se pokazali kao loši helatori jona gvožđa. Najviši stepen heliranja je postignut kod kombuhe od gljive *C. versicolor* (T2), svega  $7,05 \pm 1,10$  %. Među uparenim uzorcima kombuha od gljiva *G. lucidum* i *L. edodes* su dostigli maksimalnih  $7,28 \pm 0,21$  % i  $7,33 \pm 0,72$  %, redom.

15. Kombuha napitak od gljive *L. edodes* (T4) ispoljio je najsnažniju inhibiciju lipidne peroksidacije u iznosu od  $89,80 \pm 5,20$  %. Nešto nižu aktivnost ( $76,94 \pm 1,44$  %) imala je kombuha napitak od gljive *C. versicolor* (T6), a najnižu kombuha napitak od gljive *G. lucidum* (T2), svega  $38,78 \pm 7,73$  %. Utvrđena je vrlo visoka negativna korelacija između inhibicije lipidne peroksidacije i sadržaja suve materije u uzorcima, kao i visoka negativna korelacija inhibicije i sadržaja ukupnih polisaharida. Vakuum upareni uzorci kombuha napitaka od gljive *C. versicolor* (U6) i od gljive *L. edodes* (U4) ispoljili su najsnažniju aktivnost od  $89,2 \pm 3,15$  i  $76,22 \pm 3,36$  % redom, pri najvišoj ispitanoj koncentraciji od 10 mg/mL. Uzorak od gljive *G. lucidum* (U2) ispoljio je suprotan trend, odnosno opadanje aktivnosti sa povećanjem koncentracije, najverovatnije usled nižeg sadržaja polifenola i flavonoida u odnosu na druga dva uzorka.

16. Kombuha napitak od gljive *G. lucidum* ispoljio je inhibitornu aktivnost prema svim ispitanim sojevima Gram – negativnih bakterija, dok je baktericidna aktivnost izostala jedino kod bakterije *E. coli* O157:H7. Najosetljivije na ovaj napitak bile su *Y. enterocolitica* i *C. freundii* sa utvrđenim MIC vrednostima od 0,08 mg/mL i MBC vrednostima od 0,62 mg/mL. Takođe su i sve Gram – pozitivne bakterije inhibirane delovanjem ovog kombuha napitka, sa najnižom ispoljenom MIC vrednošću prema *S. epidermidis* (MIC = 0,04 mg/mL). Baktericidno dejstvo je ispoljeno na pet sojeva bakterija sa najnižom vrednošću MBC od 0,16mg/mL prema *B. cereus* i *B. spizizenii*.

17. Kombuha napitak od gljive *L. edodes* delovala je inhibitorno na sve ispitivane bakterijske sojeve, dok je mikrobicidno dejstvo izostalo kod dva soja. Najniža vrednost MIC je detektovana kod *Y. enterocolitica* i to 2,02 mg/mL, dok je najniža MBC od 4,05 mg/mL ispoljena prema *P. hauseri* i *C. freundii*. Niže koncentracije su bile neophodne za inhibitorno i baktericidno dejstvo prema Gram – pozitivnima bakterijama. Najosetljivija je bila bakterija *S. epidermidis* (MIC < 0,06 mg/mL, MBC <

0,06 mg/mL). Utvrđeno je da kiseline prisutne u kombuhi od gljive *L. edodes* i bioaktivne materije koje potiču iz gljive ili su produkt fermentacije ispoljavaju sinergetski efekat na određene bakterijske sojeve.

18. Sve ispitane Gram – negativne bakterije su bile osetljive na kombuhu od gljive *C. versicolor*, sa najnižom vrednošću MIC od 2,25 mg/mL na bakteriji *Y. enterocolitica*. Baktericidna aktivnost je ispoljena prema svim bakterijama pri koncentraciji od 18 mg/mL, osim na *E. coli* O157:H7 na koju uzorak nije baktericidno delovao. Prema svim Gram – pozitivnim bakterijama uzorak je ispoljio inhibitorno dejstvo, sa najnižim vrednostima MIC na *B. spizizenii*, *B. cereus*, *S. aureus* i *S. epidermidis* (2,25 mg/mL). Baktericidna aktivnost je ispoljena na četiri bakterijska soja, sa najnižim vrednostima MBC od 2,25 mg/mL, na *B. spizizenii*, *B. cereus* i *S. aureus*. Utvrđeno je da je kod kombuhe od gljive *C. versicolor* značajan uticaj sirćetne kiseline na antibakterijsku aktivnost.

19. Poređenjem istih testiranih koncentracija kombuha napitaka uparenih u vakuumu, ustanovljeno je da je uzorak od gljive *G. lucidum* (U2) pokazao najnižu vrednost MIC prema *S. epidermidis*, *L. monocytogenes* i *C. freundii*. Uzorak od gljive *L. edodes* (U4) je najniže vrednosti MIC ispoljio prema *B. spizizenii*, *P. aeruginosa* i *E. coli* O157:H7, dok su najniže vrednosti MBC bile prema *B. spizizenii*, *L. ivanovii*, *Y. enterocolitica* i *C. freundii*. Uzorak od gljive *C. versicolor* (U6) ni u jednom slučaju nije ispoljio bolju aktivnost u odnosu na uzorke U2 i U6. Svi uzorci su pokazali jednaku inhibitornu aktivnost prema *S. aureus*, *S. sonnei* i *P. hauseri*.

20. Utvrđeno je da antibakterijska aktivnost kombuha napitaka od gljiva ne potiče jedino od sirćetne kiseline, već i od komponenata koje su ekstrahovane iz gljiva ili su nastale tokom procesa fermentacije. Aktivne komponente u kombuha napicima nisu proteini i enzimi velike molekulske mase, usled utvrđene činjenice da su te komponente termostabilne. Antibakterijskom potencijalu doprinose i prisutni polisaharidi i fenolne komponente, čije je prisustvo utvrđeno FTIR analizom.

21. Nakon 24 h tretmana kultura humanih PBMC polisaharidnim ekstraktima iz kombuha napitaka, nije primećena statistički značajna citotoksična aktivnost kod uzoraka TP2 i TP4, dok je kod uzorka TP6, pri najvišoj koncentraciji, ustanovljeno

smanjenje relativne metaboličke aktivnosti. Međutim, smanjenje je bilo manje od 30 %, što se prema standardu za ispitivanje citotoksičnosti, može tumačiti kao odustvo značajne citotoksične aktivnosti.

22. Polisahridni ekstrakt kombuha napitka od gljive *C. versicolor* ispoljio je stimulatorni efekat na povećanje brojnosti PBMC stimuliranih sa PHA počevši od koncentracije 62,5 µg/mL. Ekstarkt kombuha napitka od gljive *L. edodes* (TP4) doveo je do povećanja proliferacije pri koncentraciji od 125 µg/mL, dok uzorak od gljive *G. lucidum*, (TP2) nije uticao na proliferaciju PBMC stimuliranih sa PHA. Obzirom da su uzorci TP6 i TP4 doveli do povećanja brojnosti ćelija usled proliferacije, samo u prisustvu PHA, pretpostavlja se da ekstrakti kombuha napitaka od gljiva imunomodulatorno dejstvo ispoljavaju na limfocite i antigen prezentujuće ćelije u populaciji PBMC.

23. Stimulatorni efekat na produkciju citokina IL-2 koji je ključan za proliferaciju limfocita u ispitivanom model sistemu, ispoljila su sva tri uzorka, s tim što je uzorak TP6 u svim ispitivanim dozama, pokazao najsnažnije dejstvo. Polisahridni ekstrakt kombuha napitka od gljive *G. lucidum* (TP2) nije doveo do značajne promene u produkciji Th1, proinflamacijskih citokina i hemokina, dok je sa druge strane, utvrđena statistički značajna redukcija Th2 citokina. Uzorak polisaharida kombuha napitka od gljive *L. edodes* (TP4) stimulatorno dejstvo je ispoljio na produkciju TNF- $\alpha$ , IL-6 i IL-8 pri najvišoj koncentraciji. Utvrđena je i značajna redukcija citokina IL-4, IL-5, IL-10 pri svim koncentracijama. Uzorak od gljive *C. versicolor* (TP6) stimulirao je citokine TNF- $\alpha$  i IL-8, a inhibirao citokine IL-4, IL-5 i IL-10. Najsnažniji efekat kod sva tri uzorka je povezan sa redukcijom produkcije IL-4 i IL-5 citokina. Uzorak TP2 se izdvaja po najsnažnijem inhibitornom efektu na citokin IL-4, uzorak TP4 je jedini ispoljio stimulatorni efekat na produkciju IL-6, a ekstrakt TP6 je pokazao najsnažniji efekat na TNF- $\alpha$  i IL-8 i najslabiji efekat na inhibiciju produkcije IL-10.

Na osnovu iznetog se može očekivati da bi korist od kombuha proizvoda mogla da ima populacija kod koje je Th2 imuni odgovor prenaplašen, kao što je slučaj sa alergijskim reakcijama, astmom i atopijskim dermatitisom dok, sa druge strane, stimulacija proinflamacijskih citokina i smanjenje anti-inflamacijskog IL-10 citokina,



može doprineti odbrani domaćina od patogenih bakterija, virusa i gljiva, kao i u borbi protiv tumora.

24. Primenom hedonske skale, nakon postizanja kiselosti napitaka od 3 g/L, ocenjeni su uzorci kombuha napitaka od gljiva *G. lucidum*, *L. edodes* i *C. versicolor*, kao i aromatizovani uzorci kombuha napitaka od ove tri gljive. Kombuha od gljive *L. edodes* (T4) postigla je najbolju senzornu ocenu (6,82) primenom hedonske skale sa devet nivoa i ova ocena je bila viša u odnosu na kombuha uzorak od crnog čaja, koji je postigao ocenu 6,18. Slabije ocene uzoraka kombuhe od gljiva *G. lucidum* (T2) i *C. versicolor* (T6) poboljšane su nakon što su uzorci aromatizovani aromom kokosa, pa su ocene aromatizovanih uzoraka bile 5,23 i 5,59, redom.

Usled pozitivnog uticaja aroma na prihvatljivost proizvoda od strane konzumenata, dodatno unapređenje senzornih svojstava napitaka bi se mogao postići dodatkom određenih aromatičnih biljaka u podlogu za fermentaciju, promenom početne koncentracije gljiva pri ekstrakciji ili promenom starter kulture kombuhe koja, svojim metabolitima, može značajno uticati na aromatske osobine proizvoda.

### **Ukupan zaključak disertacije**

Primena vrele vodene ekstrakcije medicinskih gljiva u pripremi podloge za fermentaciju kombuha kulturom, nakon dodatka saharoze, pokazala se sa nutritivnog aspekta, pogodnom za postizanje adekvatnih uslova i uspešno dobijanje fermentisanog kombuha proizvoda. Ustanovljeno je da su sve tri gljive stimulisale bakterije sirćetnog vrenja da proizvode sirćetnu kiselinu, što je uticalo na skraćanje fermentacionog procesa. Takođe, ovakva fermentaciona podloga je stimulisala kvasce da proizvode etanol, usled čega je nastalo alkoholno piće, za razliku od kombuhe koja se proizvodi od crnog ili zelenog čaja i koju karakteriše nizak sadržaj etanola. Hemijska analiza je pokazala da svi napici poseduju bioaktivna jedinjenja u različitim koncentracijama, usled čega funkcionalna svojstva ovih napitaka variraju. Ustanovljeno antimikrobno, antioksidativno i imunomodulatorno dejstvo uzoraka dobijenih iz kombuha uzoraka potvrđuju da novi kombuha napici poseduju potencijal da budu deklarirani kao funkcionalni proizvod.

## 7. LITERATURA

- Alves, M. J., Ferreira, I. C., Dias, J., Teixeira, V., Martins, A., Pintado, M. (2012): A review on antimicrobial activity of mushroom (Basidiomycetes) extracts and isolated compounds. *Planta Medica* 78(16): 1707-1718.
- Alves, M. J., Ferreira, I. C., Dias, J., Teixeira, V., Martins, A., Pintado, M. E. (2013a): A review on antifungal activity of mushroom (basidiomycetes) extracts and isolated compounds. *Current Topics in Medicinal Chemistry* 13: 2648-2659.
- Alves, M. J., Ferreira, I. C., Froufe, H. J., Abreu, R. M. V., Martins, A., Pintado, M. (2013b): Antimicrobial activity of phenolic compounds identified in wild mushrooms, SAR analysis and docking studies. *Journal of Applied Microbiology* 115(2): 346-357.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D. J. (1997): Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* 25(17), 3389-3402.
- Amberg, D. C., Burke, D. J., Strathern, J. N. (2005): *Methods in Yeast Genetics: A Cold Spring Harbor Laboratory Course Manual*, 2005 Edition (Cold Spring).
- Amoa-Awua WK, Sampson E, Tano-Debrah K. (2006): Growth of yeasts, lactic and acetic acid bacteria in palm wine during tapping and fermentation from felled oil palm (*Elaeis guineensis*) in Ghana. *Journal of Applied Microbiology* 102(2): 599-606.
- Ashrafi, A., Jokar, M., Nafchi, A. M. (2018): Preparation and characterization of biocomposite film based on chitosan and kombucha tea as active food packaging. *International Journal of Biological Macromolecules* 108: 444-454.
- Badalyan, S. M., Barkhudaryan, A., Rapior, S. (2019): Recent progress in research on the pharmacological potential of mushrooms and prospects for their clinical application. In *Medicinal mushrooms*. Springer, Singapore, pp. 1-70.
- Bai WF, Guo XY, Ma LQ, Guo LQ, Lin JF. (2013): Chemical composition and sensory evaluation of fermented tea with medicinal mushrooms. *International Journal of Microbiology*. 53(1):70-6.

- Bak, W. C., Park, J. H., Park, Y. A., Ka, K. H. (2014): Determination of glucan contents in the fruiting bodies and mycelia of *Lentinula edodes* cultivars. *Mycobiology* 42(3): 301-304.
- Bao, H. N. D., Ushio, H., Ohshima, T. (2009): Antioxidative Activities of mushroom (*Flammulina velutipes*) extract added to bigeye tuna meat: Dose-Dependent Efficacy and Comparison with Other Biological Antioxidants. *Journal of Food Science* 74(2): C162-C169.
- Barnett J.A. (1976): The Utilization of Sugars by Yeasts. *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry* 32: 125-234.
- Battikh H., Bakhrouf A., Ammar E. (2012): Antimicrobial effect of Kombucha analogues. *LWT-Food Science and Technology* 47(1): 71-77.
- Battikh, H., Chaieb, K., Bakhrouf, A., Ammar, E. (2013): Antibacterial and antifungal activities of black and green kombucha teas. *Journal of Food Biochemistry*, 37(2): 231-236.
- Bhattacharya S., Gachhui R., Sil P.C. (2011): Hepatoprotective properties of kombucha tea against TBHP-induced oxidative stress via suppression of mitochondria dependent apoptosis. *Pathophysiology* 18: 221-234.
- Berthels, N. J., Cordero Otero, R. R., Bauer, F. F., Thevelein, J. M., Pretorius, I. S. (2004): Discrepancy in glucose and fructose utilisation during fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast strains. *FEMS Yeast Research* 4(7): 683-689.
- Bisen, P. S., Baghel, R. K., Sanodiya, B. S., Thakur, G. S., Prasad, G. B. K. S. (2010): *Lentinus edodes*: a macrofungus with pharmacological activities. *Current Medicinal Chemistry* 17(22): 2419-2430.
- Breene, W. M. (1990): Nutritional and medicinal value of specialty mushrooms. *Journal of Food Protection* 53(10): 883-894.
- Campano, C., Balea, A., Blanco, A., Negro, C. (2016): Enhancement of the fermentation process and properties of bacterial cellulose: a review. *Cellulose* 23(1): 57-91.
- Camu, N., De Winter, T., Verbrugge, K., Cleenwerck, I., Vandamme, P., Takrama, J. S., Vancanneyt, M., De Vuyst, L. (2007): Dynamics and biodiversity of populations of lactic acid bacteria and acetic acid bacteria involved in spontaneous heap

- fermentation of cocoa beans in Ghana. *Applied and Environmental Microbiology* 73(6): 1809-1824.
- Carević, M., Ćorović, M., Mihailović, M., Banjanac, K., Milisavljević, A., Veličković, D., Bezbradica, D. (2016): Galacto-oligosaccharide synthesis using chemically modified  $\beta$ -galactosidase from *Aspergillus oryzae* immobilised onto macroporous amino resin. *International Dairy Journal* 54: 50-57.
- Cardona, F., Andrés-Lacueva, C., Tulipani, S., Tinahones, F. J., Queipo-Ortuño, M. I. (2013): Benefits of polyphenols on gut microbiota and implications in human health. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 24(8): 1415-1422.
- Carneiro, A. A., Ferreira, I. C., Dueñas, M., Barros, L., Da Silva, R., Gomes, E., Santos-Buelga, C. (2013): Chemical composition and antioxidant activity of dried powder formulations of *Agaricus blazei* and *Lentinus edodes*. *Food Chemistry* 138(4): 2168-2173.
- Chakravorty, S., Bhattacharya, S., Chatzinotas, A., Chakraborty, W., Bhattacharya, D., Gachhui, R. (2016): Kombucha tea fermentation: Microbial and biochemical dynamics. *International Journal of Food Microbiology* 220: 63-72.
- Chandrasekara A, Shahidi F. (2011): Bioactivities and antiradical properties of millet grains and hulls. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59(17): 9563-9571.
- Chang, S.T, Wasser S.P. (2012): The role of culinary-medicinal mushrooms on human welfare with a pyramid model for human health. *International Journal of Medicinal Mushrooms* 14(2): 95-104
- Chen, C., Liu, B. Y. (2000): Changes in major components of tea fungus metabolites during prolonged fermentation. *Journal of Applied Microbiology* 89(5): 834-839.
- Chen, H., Ju, Y., Li, J., & Yu, M. (2012): Antioxidant activities of polysaccharides from *Lentinus edodes* and their significance for disease prevention. *International Journal of Biological Macromolecules* 50(1): 214-218.
- Cheung, L. M., Cheung, P. C. (2005). Mushroom extracts with antioxidant activity against lipid peroxidation. *Food Chemistry* 89(3): 403-409.
- Cheung, L. M., Cheung, P. C., Ooi, V. E. (2003): Antioxidant activity and total phenolics of edible mushroom extracts. *Food Chemistry* 81(2): 249-255.
- Cheung, P. C. (Ed.). (2008): *Mushrooms as functional foods*. John Wiley & Sons, New Jersey.

- Choi, J. H., Kim, H. G., Jin, S. W., Han, E. H., Khanal, T., Do, M. T., Hwang, Y. P., Choi J. M., Chun S. S., Chung Y. C., Jeong, T. C., Jeong H. G. (2013): Topical application of *Pleurotus eryngii* extracts inhibits 2, 4-dinitrochlorobenzene-induced atopic dermatitis in NC/Nga mice by the regulation of Th1/Th2 balance. *Food and Chemical Toxicology* 53: 38-45.
- Choi, Y., Lee, S. M., Chun, J., Lee, H. B., Lee, J. (2006): Influence of heat treatment on the antioxidant activities and polyphenolic compounds of Shiitake (*Lentinus edodes*) mushroom. *Food chemistry* 99(2): 381-387.
- Chu SC, Chen C. (2006): Effects of origins and fermentation time on the antioxidant activities of kombucha. *Food Chemistry* 98(3): 502-507.
- Coton, M., Pawtowski, A., Taminiau, B., Burgaud, G., Deniel, F., Coulloume-Labarthe, L., Fall A., Daube G., Coton, E. (2017): Unraveling microbial ecology of industrial-scale Kombucha fermentations by metabarcoding and culture-based methods. *FEMS Microbiology Ecology* 93(5).
- Couper, K. N., Blount, D. G., Riley, E. M. (2008): IL-10: the master regulator of immunity to infection. *The Journal of Immunology* 180(9): 5771-5777.
- Cui, J., Chisti, Y. (2003): Polysaccharopeptides of *Coriolus versicolor*: physiological activity, uses, and production. *Biotechnology Advances* 21(2): 109-122.
- Cvetković, D. (2008): Kombucha od lekovitog bilja – biološka aktivnost i parametri fermentacije, Doktorska disertacija, Univerzitet u Novom Sadu Tehnološki fakultet, Novi Sad, Srbija.
- 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(3): 387-392.
- Ćilerdžić, J., Vukojević, J., Stajić, M., Stanojković, T., Glamočlija, J. (2014): Biological activity of *Ganoderma lucidum* basidiocarps cultivated on alternative and commercial substrate. *Journal of Ethnopharmacology* 155(1): 312-319.
- Dai, Z., Huang, M., Chen, Y., Siewers, V., Nielsen, J. (2018): Global rewiring of cellular metabolism renders *Saccharomyces cerevisiae* Crabtree negative. *Nature Communications* 9(1): 3059.
- Ding, S., Jiang, H., Fang, J. (2018). Regulation of immune function by polyphenols. *Journal of Immunology Research* 12664074

- Dipti, P., Yogesh, B., Kain, A. K., Pauline, T., Anju, B., Sairam, M., Singh, B., Mongia, S.S., Kumar G. I., Selvamurthy, W. (2003): Lead Induced Oxidative Stress: Beneficial Effects of Kombucha Tea. *Biomedical and Environmental Sciences* 16: 276-282.
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamiton, J. K., Reders, P. A., Smith, F. (1956): Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry* 28: 350–356.
- Dussap, C. G., Poughon, L. (2017): Microbiology of Alcoholic Fermentation. *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering* 263–279.
- Dutta, D., Gachhui, R. (2006): Novel nitrogen-fixing *Acetobacter nitrogenifigens* sp. nov., isolated from Kombucha tea. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 56(8): 1899-1903.
- Duvnjak, D., Pantić, M., Pavlović, V., Nedović, V., Lević, S., Matijašević, D., Sknepnek A., Nikšić M. (2016): Advances in batch culture fermented *Coriolus versicolor* medicinal mushroom for the production of antibacterial compounds. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 34: 1-8.
- Dundar, A., Okumus, V., Ozdemir, S., Celik, K. S., Boğa, M., Ozcagli, E. (2016): Determination of cytotoxic, anticholinesterase, antioxidant and antimicrobial activities of some wild mushroom species. *Cogent Food & Agriculture* 2(1): 1178060.
- El-Salam, S. S. A. (2012): 16S rRNA gene sequence detection of acetic acid bacteria isolated from tea Kombucha. *New York Science Journal*, 5(3), 55-61.
- Essawet NA, Cvetković D, Velićanski A, Čanadanović-Brunet J, Vulić J, Maksimović V, Markov S. (2015): Polyphenols and antioxidant activities of Kombucha beverage enriched with Coffeeberry® extract. *Chemical Industry & Chemical Engineering Quarterly* 21(3): 399-409.
- Ettayebi, K., Errachidi, F., Jamai, L., Tahri-Jouti, M. A., Sendide, K., Ettayebi, M. (2003): Biodegradation of polyphenols with immobilized *Candida tropicalis* under metabolic induction. *FEMS Microbiology Letters* 223(2): 215-219.
- Ferreira, I.C, Heleno, S.A, Reis, F.S, Stojkovic, D, Queiroz, M.J., Vasconcelos, M.H., Sokovic, M. (2015): Chemical features of *Ganoderma* polysaccharides with antioxidant, antitumor and antimicrobial activities. *Phytochemistry* 114: 38-55.

- Ferreira, I. C., Barros, L., Abreu, R. (2009): Antioxidants in wild mushrooms. *Current Medicinal Chemistry* 16(12): 1543-1560.
- Francisco, C. R., Heleno, S. A., Fernandes, I. P., Barreira, J. C., Calhella, R. C., Barros, L., Gonçalves, O. H., Ferreira, I. C. F. R., Barreiro, M. F. (2018): Functionalization of yogurts with *Agaricus bisporus* extracts encapsulated in spray-dried maltodextrin crosslinked with citric acid. *Food Chemistry* 245: 845-853.
- Francois, J. A., Starks, C. M., Sivanuntakorn, S., Jiang, H., Ransome, A. E., Nam, J. W., Constantine, C. Z., Kappock, T. J. (2006): Structure of a NADH-insensitive hexameric citrate synthase that resists acid inactivation. *Biochemistry* 45(45): 13487-13499.
- Fu, C., Yan, F., Cao, Z., Xie, F., Lin, J. (2014): Antioxidant activities of kombucha prepared from three different substrates and changes in content of probiotics during storage. *Food Science and Technology* 34(1): 123-126.
- Gaggia, F., Baffoni, L., Galiano, M., Nielsen, D., Jakobsen, R., Castro-Mejía, J., Bosi, S., Truzzi F., Musumeci F., Dinelli G., Di Gioia, D. (2019): Kombucha Beverage from Green, Black and Rooibos Teas: A Comparative Study Looking at Microbiology, Chemistry and Antioxidant Activity. *Nutrients* 11(1): 1.
- Gao, Y., Tang, W., Gao, H., Chan, E., Lan, J., Li, X., Zhou, S. (2005): Antimicrobial activity of the medicinal mushroom *Ganoderma*. *Food Reviews International* 21(2): 211-229.
- Gebreyohannes, G., Nyerere, A., Bii, C., Berhe Sbhatu, D. (2019): Determination of Antimicrobial Activity of Extracts of Indigenous Wild Mushrooms against Pathogenic Organisms. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 6212673.
- Gonzaga, M. L. C., Menezes, T. M., de Souza, J. R. R., Ricardo, N. M., Soares, S. D. A. (2013): Structural characterization of  $\beta$  glucans isolated from *Agaricus blazei* Murill using NMR and FTIR spectroscopy. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre* 2(2): 152-156.
- Gramza-Michałowska, A., Kulczyński, B., Xindi, Y., Gumienna, M. (2016): Research on the effect of culture time on the kombucha tea beverage's antiradical capacity and sensory value. *Acta scientiarum polonorum. Technologia Alimentaria* 15(4).

- Greenwalt, C. J., Ledford, R. A., Steinkraus, K. H. (1998): Determination and characterization of the antimicrobial activity of the fermented tea kombucha. *LWT-Food Science and Technology* 31(3): 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.
- Halpern, G. M. (2007): *Healing mushrooms*. Square One Publishers, Inc., New York.
- Han, E. H., Hwang, Y. P., Kim, H. G., Choi, J. H., Im, J. H., Yang, J. H., Lee L. U., Chun, S. S., Chung, Y. C., Jeong, H. G. (2011): Inhibitory effect of *Pleurotus eryngii* extracts on the activities of allergic mediators in antigen-stimulated mast cells. *Food and Chemical Toxicology* 49(6): 1416-1425.
- Heinrich, P. C., Behrmann, I., Serge, H., Hermanns, H. M., Müller-Newen, G., Schaper, F. (2003): Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochemical Journal* 374(1): 1-20.
- Heleno, S.A., Ferreira, I.C., Esteves, A.P., Ćirić, A., Glamočlija, J., Martins, A., Soković, M., Queiroz, M.J.(2013): Antimicrobial and demelanizing activity of *Ganoderma lucidum* extract, p-hydroxybenzoic and cinnamic acids and their synthetic acetylated glucuronide methyl esters. *Food and Chemical Toxicology* 58: 95-100.
- Heleno, S. A., Martins, A., Queiroz, M. J. R., Ferreira, I. C. (2015): Bioactivity of phenolic acids: Metabolites versus parent compounds: A review. *Food Chemistry*, 173:501-513.
- Hobbs, C. (2000). Medicinal value of *Lentinus edodes* (Berk.) Sing.(Agaricomycetidae). A literature review. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 2(4): 287-302
- Hou X., Zhang, N., Xiong, S., Li, S., Yang, B. (2008): Extraction of BaChu mushroom polysaccharides and preparation of a compound beverage. *Carbohydrate Polymers* 73(2): 289-294.
- Hrnjez, D., Vaštag, Ž., Milanović, S., Vukić, V., Iličić, M., Popović, L., Kanurić, K. (2014): The biological activity of fermented dairy products obtained by kombucha and conventional starter cultures during storage. *Journal of Functional Food* 10: 336-45.



[https://bioscience.lonza.com/lonza\\_bs/US/en/pbmcs-the-one-stop-immune-cells-shop](https://bioscience.lonza.com/lonza_bs/US/en/pbmcs-the-one-stop-immune-cells-shop)

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>

- Hur, S. J., Lee, S. Y., Kim, Y. C., Choi, I., Kim, G.B. (2014): Effect of fermentation on the antioxidant activity in plant-based foods. *Food Chemistry* 160: 346-356.
- Isham, N. K. M., Mokhtar, N., Fazry, S., Lim, S. J. (2019): The development of an alternative fermentation model system for vinegar production. *LWT* 100: 322-327.
- Islam, M. U., Ullah, M. W., Khan, S., Shah, N., Park, J. K. (2017): Strategies for cost-effective and enhanced production of bacterial cellulose. *International Journal of Biological Macromolecules* 102: 1166-1173.
- ISO, P. (2009): 10993–5: 2009 Biological Evaluation of Medical Devices—Part 5: Tests for In Vitro Cytotoxicity. ISO: Geneva, Switzerland.
- Jankovic, I., Stojanovic, M. (1994): Microbial and chemical composition, growth, therapeutical and antimicrobial characteristics of tea fungus. *Mikrobiologija* 31(1): 35-43.
- Jarrell, J., Cal, T., Bennett, J. W. (2000): The Kombucha consortia of yeasts and bacteria. *Mycologist*, 14(4): 166-170.
- Jayabalan, R., Chen, P. N., Hsieh, Y. S., Prabhakaran, K., Pitchai, P., Marimuthu, S., Thangaraj, P., Swaminathan, K., Yun, S. E. (2011): Effect of solvent fractions of kombucha tea on viability and invasiveness of cancer cells—characterization of dimethyl 2-(2-hydroxy-2-methoxypropylidene) malonate and vitexin. *Indian Journal of Biotechnology* 10: 75-82.
- Jayabalan, R., Malbaša, R. V., Lončar, E. S., Vitas, J. S., Sathishkumar, M. (2014): A review on kombucha tea—microbiology, composition, fermentation, beneficial effects, toxicity, and tea fungus. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 13(4): 538-550.
- Jayabalan, R., Marimuthu, S., Swaminathan, K.(2007): Changes in content of organic acids and tea polyphenols during kombucha tea fermentation. *Food Chemistry* 102(1): 392-398.
- Jayabalan, R., Marimuthu, S., Thangaraj, P., Sathishkumar, M., Binupriya, A. R., Swaminathan, K., Yun, S. E. (2008b): Preservation of Kombucha Tea- Effect of Temperature on Tea Components and Free Radical Scavenging Properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56(19): 9064-9071.

- Jayabalan R., Subathradevi P., Marimuthu S., Sathishkumar M., Swaminathan K. (2008a): Changes in free-radical scavenging ability of kombucha tea during fermentation. *Food Chemistry* 109(1): 227-234.
- Jeong, S. C., Koyyalamudi, S. R., Hughes, J. M., Khoo, C., Bailey, T., Marrisudi, K., Park, J. P., Song, C. H. (2013): Antioxidant and immunomodulating activities of exo- and endopolysaccharide fractions from submerged mycelia cultures of culinary-medicinal mushrooms. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 15(3): 251-266.
- Jovčić, B., Begović J., Lozo, J., Topisirović, L., Kojić, M. (2009): Dynamics of sodium dodecyl sulfate utilization and antibiotic susceptibility of strain *Pseudomonas* sp. ATCC19151. *Archives of Biological Sciences* 61(2): 159-164.
- Justo, A., Hibbett, D. S. (2011): Phylogenetic classification of *Trametes* (Basidiomycota, Polyporales) based on a five-marker dataset. *Taxon* 60(6): 1567-1583.
- Kabir, Y., Kimura, S., Tamura, T., (1988): Dietary effect of *Ganoderma lucidum* mushroom on blood pressure and lipid levels in spontaneously hypertensive rats (SHR). *Journal of Nutritional Science and Vitaminology* 34: 433-438.
- Kalač, P. (2009): Chemical composition and nutritional value of European species of wild growing mushrooms: A review. *Food Chemistry* 113(1): 9-16.
- Kancheva, V. D., Angelova, S. E. (2017): Synergistic effects of antioxidant compositions during inhibited lipid autoxidation. In *Lipid Peroxidation: Inhibition, Effects and Mechanisms*, Nova Science Publishers Inc., New York, pp. 49-81
- Kang, Q., Chen, S., Li, S., Wang, B., Liu, X., Hao, L., Lu, J. (2019): Comparison on characterization and antioxidant activity of polysaccharides from *Ganoderma lucidum* by ultrasound and conventional extraction. *International Journal of Biological Macromolecules* 124: 1137-1144.
- Kapp, J. M., Sumner, W. (2019): Kombucha: A systematic review of the empirical evidence of human health benefit. *Annals of Epidemiology*, 30: 66-70.
- Kaufman K. (1995): *Kombucha Rediscovered, A Guide to the Medicinal Benefits of an Ancient Healing Tea*, Alive Books, Canada.
- Kerstens, K., Lisdiyanti, P., Komagata, K., Swings, J. (2006): The family Acetobacteraceae: the genera *Acetobacter*, *Acidomonas*, *Asaia*, *Gluconacetobacter*,

- Gluconobacter*, and *Kozakia*. In: Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer KH., Stackebrandt E. (ed.) *The Prokaryotes*. Springer, New York, 5: 163-200.
- Kim, J. H., Lee, D. H., Lee, S. H., Choi, S. Y., Lee, J. S. (2004): Effect of *Ganoderma lucidum* on the quality and functionality of Korean traditional rice wine, yakju. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 97(1): 24-28.
- Kitzberger, C. S. G., Smânia Jr, A., Pedrosa, R. C., Ferreira, S. R. S. (2007): Antioxidant and antimicrobial activities of shiitake (*Lentinula edodes*) extracts obtained by organic solvents and supercritical fluids. *Journal of Food Engineering* 80(2): 631-638.
- Klančnik, A., Piskernik, S., Jeršek, B., Možina, S. S. (2010): Evaluation of diffusion and dilution methods to determine the antibacterial activity of plant extracts. *Journal of Microbiological Methods* 81: 121-126.
- Klaus, A., Kozarski, M., Niksic, M., Jakovljevic, D., Todorovic, N., Van Griensven, L. J. (2011): Antioxidative activities and chemical characterization of polysaccharides extracted from the basidiomycete *Schizophyllum commune*. *LWT-Food Science and Technology* 44(10): 2005-2011.
- Klaus A., Savić M., Grubišić M., Nikšić M., (2009): The growth of mushroom *Trametes versicolor* under the influence of some mineral rows, Abstracts of the 5th International Medicinal Mushroom Conference, 5th-8th September., Nantong, China, pp. 154-155.
- Komagata K., Iino T., Yamada Y. (2014): The Family *Acetobacteraceae*. In: Rosenberg E., DeLong E.F., Lory S., Stackebrandt E., Thompson F. (eds) *The Prokaryotes*. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 3-78.
- Kozarski, M. S. (2012): Hemijska karakterizacija, antioksidativna i antimikrobna svojstva polisaharidnih ekstrakata odabranih vrsta gljiva. Doktorska disertacija, Univerzitet u Beogradu, Hemijski fakultet, Beograd, Srbija.
- Kozarski, M., Klaus, A., Jakovljevic, D., Todorovic, N., Vunduk, J., Petrović, P., Niksic, M., Van Griensven, L. (2015): Antioxidants of edible mushrooms. *Molecules* 20(10): 19489-19525.
- Kozarski, M., Klaus, A., Niksic, M., Jakovljevic, D., Helsper, J. P., Van Griensven, L. J. (2011): Antioxidative and immunomodulating activities of polysaccharide extracts

- of the medicinal mushrooms *Agaricus bisporus*, *Agaricus brasiliensis*, *Ganoderma lucidum* and *Phellinus linteus*. *Food Chemistry* 129(4): 1667-1675.
- Kozarski, M. S., Klaus, A. S., Nikšić, M. P., Van Griensven, L. J. L. D., Vrvic, M. M., Jakovljević, D. M. (2014): Polysaccharides of higher fungi: biological role, structure and antioxidant activity. *Hemijska Industrija* 68(3): 305-320.
- Kozarski, M., Klaus, A., Nikšić, M., Vrvic, M. M., Todorović, N., Jakovljević, D., Van Griensven, L. J. (2012): Antioxidative activities and chemical characterization of polysaccharide extracts from the widely used mushrooms *Ganoderma applanatum*, *Ganoderma lucidum*, *Lentinus edodes* and *Trametes versicolor*. *Journal of Food Composition and Analysis* 26(1-2): 144-153.
- Kurtzman, C. P., Robnett, C. J. (1997): Identification of clinically important ascomycetous yeasts based on nucleotide divergence in the 5' end of the large-subunit (26S) ribosomal DNA gene. *Journal of Clinical Microbiology* 35: 1216-1223.
- Lai T., Gao Y., Yhou S. (2004): Global marketing of medicinal mushroom Ling Zhi *Ganoderma lucidum* (W.Curst.:Fr.) Lloyd (Aphyllphoromycetidae) Products and Safety Concerns, *International Journal for Medicinal Mushrooms*, 6.
- Lavefve, L., Marasini, D., Carbonero, F. (2019): Microbial Ecology of Fermented Vegetables and Non-Alcoholic Drinks and Current Knowledge on Their Impact on Human Health. *Advances in Food and Nutrition Research* 87: 147.
- Lee, Y. T., & Kim, Y. S. (2005): Water-solubility of  $\beta$ -glucans in various edible mushrooms-research note. *Preventive Nutrition and Food Science*, 10(3): 294-297.
- Lee, C. L., Yang, X., & Wan, J. M. F. (2006): The culture duration affects the immunomodulatory and anticancer effect of polysaccharopeptide derived from *Coriolus versicolor*. *Enzyme and Microbial Technology* 38(1-2): 14-21.
- Leskosek-Cukalovic, I., Despotovic, S., Lakic, N., Niksic, M., Nedovic, V., Tesevic, V. (2010): *Ganoderma lucidum*—medical mushroom as a raw material for beer with enhanced functional properties. *Food Research International* 43(9): 2262-2269.
- Li, L. F., Chan, B. C. L., Yue, G. G. L., Bik-San Lau, C., Han, Q. B., Leung, P. C., Liu, J. K., Fung, K. P. (2013): Two immunosuppressive compounds from the mushroom *Rubinoletus ballouii* using human peripheral blood mononuclear cells by bioactivity-guided fractionation. *Phytomedicine* 20(13): 1196-1202.

- Li, T., Lo, Y. M., Moon, B. (2014): Feasibility of using *Hericium erinaceus* as the substrate for vinegar fermentation. *LWT-Food Science and Technology* 55(1): 323-328.
- Li, Q., Zhang, F., Chen, G., Chen, Y., Zhang, W., Mao, G., Zhao, T., Zhang, M., Yang, L., Wu, X. (2018): Purification, characterization and immunomodulatory activity of a novel polysaccharide from *Grifola frondosa*. *International Journal of Biological Macromolecules* 111: 1293-1303.
- Lin, L. Z., Harnly, J. M. (2007): A screening method for the identification of glycosylated flavonoids and other phenolic compounds using a standard analytical approach for all plant materials. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55(4): 1084-1096.
- Lin, P. H., Huang, S. Y., Mau, J. L., Liou, B. K., Fang, T. J. (2010): A novel alcoholic beverage developed from shiitake stipe extract and cane sugar with various *Saccharomyces* strains. *LWT-Food Science and Technology* 43(6): 971-976.
- Lin, Z. Q., Kondo, T., Ishida, Y., Takayasu, T., Mukaida, N. (2003): Essential involvement of IL-6 in the skin wound-healing process as evidenced by delayed wound healing in IL-6-deficient mice. *Journal of Leukocyte Biology* 73(6): 713-721.
- Lino, T., Suzuki, R., Kosako, Y., Ohkuma, M., Komagata, K., Uchimura, T. (2012): *Acetobacter okinawensis* sp. nov., *Acetobacter papayae* sp. nov., and *Acetobacter persicus* sp. nov.; novel acetic acid bacteria isolated from stems of sugarcane, fruits, and a flower in Japan. *The Journal of General and Applied Microbiology* 58(3): 235-243.
- Liu, C. H., Hsu, W. H., Lee, F. L., Liao, C. C. (1996): The isolation and identification of microbes from a fermented tea beverage, Haipao, and their interactions during Haipao fermentation. *Food Microbiology* 13(6): 407-415.
- Liu, W., Wang, H., Pang, X., Yao, W., Gao, X. (2010): Characterization and antioxidant activity of two low-molecular-weight polysaccharides purified from the fruiting bodies of *Ganoderma lucidum*. *International Journal of Biological Macromolecules* 46(4): 451-457.
- Lo, T. C. T., Chang, C. A., Chiu, K. H., Tsay, P. K., Jen, J. F. (2011): Correlation evaluation of antioxidant properties on the monosaccharide components and

- glycosyl linkages of polysaccharide with different measuring methods. *Carbohydrate Polymers* 86(1): 320-327.
- Lončar, E., Djurić, M., Malbaša, R., Kolarov, L. J., Klašnja, M. (2006): Influence of working conditions upon kombucha conducted fermentation of black tea. *Food and Bioproducts Processing* 84(3), 186-192.
- Lu, X., Brennan, M. A., Serventi, L., Liu, J., Guan, W., Brennan, C. S. (2018): Addition of mushroom powder to pasta enhances the antioxidant content and modulates the predictive glycaemic response of pasta. *Food Chemistry* 264: 199-209.
- Lull, C., Wichers, H. J., Savelkoul, H. F. (2005): Antiinflammatory and immunomodulating properties of fungal metabolites. *Mediators of Inflammation* 2005(2): 63-80.
- Majumdar, G., Beachey, E. H., Tomai, M., Kotb, M. (1990): Differential signal requirements in T-cell activation by mitogen and superantigen. *Cellular Signalling* 2(6): 521-530.
- Malbaša, R. V., Lončar, E. S., Vitas, J. S., Čanadanović-Brunet, J. M. (2011): Influence of starter cultures on the antioxidant activity of kombucha beverage. *Food Chemistry* 127(4): 1727-1731.
- Malbaša R, Lončar E, Djurić M. (2008): Comparison of the products of Kombucha fermentation on sucrose and molasses. *Food Chemistry* 106(3): 1039-45.
- Malimas, T., Yukphan, P., Takahashi, M., Muramatsu, Y., Kaneyasu, M., Potacharoen, W., Tanasupawat, S., Nakagawa, Y., Tanticharoen, M., Yamada, Y. (2009): *Gluconobacter japonicus* sp. nov., an acetic acid bacterium in the *Alphaproteobacteria*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 59(3): 466-471.
- Matijašević, D. M. (2017): Uticaj Se (IV)-i Se (VI)-modifikovanog zeolita na antioksidativno i antimikrobno dejstvo gljiva *Pleurotus ostreatus* i *Coriolus versicolor*. Doktorska disertacija, Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet, Beograd, Srbija.
- Matijašević, D., Pantić, M., Rašković, B., Pavlović, V., Duvnjak, D., Sknepnek, A., Nikšić, M. (2016): The antibacterial activity of *Coriolus versicolor* methanol extract and its effect on ultrastructural changes of *Staphylococcus aureus* and *Salmonella* Enteritidis. *Frontiers in Microbiology*, 7: 1226.

- 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. *Food Microbiology*, 38: 171-178.
- Marshall, M.N., Cocolin, L., Mills, D.A., Vander Gheynst, J.S. (2003): Evaluation of PCR primers for denaturing gradient gel electrophoresis analysis of fungal communities in compost. *Journal of Applied Microbiology* 95: 934-948.
- Marques, W. L., Raghavendran, V., Stambuk, B. U., Gombert, A. K. (2016): Sucrose and *Saccharomyces cerevisiae*: a relationship most sweet. *FEMS Yeast research*, 16(1).
- Matsuo, J., Sakai, K., Okubo, T., Yamaguchi, H. (2019): *Chlamydia pneumoniae* enhances Interleukin 8 (IL-8) production with reduced azithromycin sensitivity under hypoxia. *Journal of Pathology, Microbiology and Immunology*, 127(3): 131-138.
- Mau, J. L., Lin, H. C., Chen, C. C. (2001): Non-volatile components of several medicinal mushrooms. *Food Research International* 34(6): 521-526.
- Mau, J.L., Lin, H.C., Chen, C.C. (2002): Antioxidant properties of several medicinal mushrooms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50(21): 6072-7.
- Mayser, P., Fromme, S., Leitzmann, G., Gründer, K. (1995): The yeast spectrum of the 'tea fungus Kombucha' Das Hefespektrum des 'Teepilzes Kombucha'. *Mycoses* 38(7-8): 289-295.
- Mihajlović, M. B. (1983): Priručnik za identifikaciju bakterija, kvasaca i plesni. Savez veterinarara i veterinarskih tehničara Jugoslavije. Odbor za izdavačku delatnost, Beograd, Jugoslavija.
- Mirković, N. L. (2016). Karakterizacija i determinacija bakteriocina autohtonih laktokoka. Doktorska disertacija, Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet, Beograd, Srbija.
- Mo, H., Zhu, Y., Chen, Z. (2008): Microbial fermented tea—a potential source of natural food preservatives. *Trends in Food Science & Technology* 19(3), 124-130.
- Mohaček-Grošev, V., Božac, R., Puppels, G. J. (2001): Vibrational spectroscopic characterization of wild growing mushrooms and toadstools. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 57(14): 2815-2829.

- Mounir, M., Shafiei, R., Zarmehrkorshid, R., Hamouda, A., Alaoui, M. I., Thonart, P. (2016): Simultaneous production of acetic and gluconic acids by a thermotolerant *Acetobacter* strain during acetous fermentation in a bioreactor. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 121(2): 166-171.
- Mau, J. L., Lin, H. C., Chen, C. C. (2001): Non-volatile components of several medicinal mushrooms. *Food Research International* 34(6): 521-526.
- Mau, J. L., Lin, H. C., Chen, C. C. (2002): Antioxidant properties of several medicinal mushrooms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50(21): 6072-7.
- Ndoye, B., Lebecque, S., Dubois-Dauphin, R., Tounkara, L., Guiro, A. T., Kere, C., Diawara, P., Thonart, P. (2006): Thermoresistant properties of acetic acids bacteria isolated from tropical products of Sub-Saharan Africa and destined to industrial vinegar. *Enzyme and Microbial Technology* 39(4): 916-923.
- Ndoye, B., Cleenwerck, I., Engelbeen, K., Dubois-Dauphin, R., Guiro, A. T., Van Trappen, S., Willems, A., Thonart, P. (2007): *Acetobacter senegalensis* sp. nov., a thermotolerant acetic acid bacterium isolated in Senegal (sub-Saharan Africa) from mango fruit (*Mangifera indica* L.). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 57(7): 1576-1581.
- Neffe-Skocińska, K., Sionek, B., Ścibisz, I., Kołożyn-Krajewska, D. (2017): Acid contents and the effect of fermentation condition of Kombucha tea beverages on physicochemical, microbiological and sensory properties. *CyTA-Journal of Food* 15(4): 601-607.
- Nguyen, N. K., Nguyen, P. B., Nguyen, H. T., Le, P. H. (2015): Screening the optimal ratio of symbiosis between isolated yeast and acetic acid bacteria strain from traditional kombucha for high-level production of glucuronic acid. *LWT-Food Science and Technology* 64(2): 1149-1155.
- Nishitoba, T., Sato, S., Sakamura, S. (1985): New terpenoids from *Ganoderma lucidum* and their bitterness. *Agricultural and Biological Chemistry* 49(5): 1547-1549.
- Nowacka, N., Nowak, R., Drozd, M., Olech, M., Los, R., Malm, A. (2014): Analysis of phenolic constituents, antiradical and antimicrobial activity of edible mushrooms growing wild in Poland. *LWT - Food Science and Technology* 59: 689-694.
- Oh J, Jo H, Cho AR, Kim SJ, Han J. (2013): Antioxidant and antimicrobial activities of various leafy herbal teas. *Food Control* 31(2):403-9.



- Parola, S., Chiodaroli, L., Orlandi, V., Vannin, C., Panno, L. (2017): *Lentinula edodes* and *Pleurotus ostreatus*: functional food with antioxidant-antimicrobial activity and an important source of Vitamin D and medicinal compounds. *Functional Foods in Health and Disease* 7(10): 773-794.
- Paterson, R. R. (2006). *Ganoderma*—A therapeutic fungal biofactory. *Phytochemistry* 67(18): 1985-2001.
- Pecić, S., Nikićević, N., Veljović, M., Jardanin, M., Tešević, V., Belović, M., Nikšić, M. (2016): The influence of extraction parameters on physicochemical properties of special grain brandies with *Ganoderma lucidum*. *Chemical Industry & Chemical Engineering Quarterly* 22(2):181-189.
- Petrović, J., Glamočlija, J., Stojković, D. S., Ćirić, A., Nikolić, M., Bukvički, D., Guerzoni, M. E., Soković, M. D. (2013): *Laetiporus sulphureus*, edible mushroom from Serbia: Investigation on volatile compounds, *in vitro* antimicrobial activity and *in situ* control of *Aspergillus flavus* in tomato paste. *Food and Chemical Toxicology* 59: 297-302.
- Petrović, J., Stojković, D., Reis, F. S., Barros, L., Glamočlija, J., Ćirić, A., Ferreira, I. C. F. R., Soković, M. (2014): Study on chemical, bioactive and food preserving properties of *Laetiporus sulphureus* (Bull.: Fr.) Murr. *Food & Function* 5(7): 1441-1451.
- Podolich, O., Kukharenko, O., Haidak, A., Zaets, I., Zaika, L., Storozhuk, O., Palchikovska, L., Orlovska, I., Reva, O., Borisova, T., Khirunenko, L., Sosnin, M., Rabbow, E., Kravchenko, V., Skoryk, M., Kremenskoj, M., Demets, R., Olsson-Francis, K., Kozyrovska, N., De Vera, J. P. P. (2019): Multimicrobial kombucha culture tolerates Mars-like conditions simulated on low Earth orbit. *Astrobiology* 19(2): 183-196.
- Pop, R. M., Puia, I. C., Puia, A., Chedea, V. S., Leopold, N., Bocsan, I. C., Buzoianu, A. D. (2018): Characterization of *Trametes versicolor*: Medicinal Mushroom with Important Health Benefits. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca* 46(2):343-349.
- Posteraro B., Ruggeri A., De Carolis E., Torelli R., Vella A., De Maio F., Ricciardi W., Posteraro P., Sanguinetti, M. (2013): Comparative evaluation of BD Phoenix and

- Vitek 2 systems for species identification of common and uncommon pathogenic yeasts. *Journal of Clinical Microbiology* 51(11): 3841-3845.
- Pravilnik o kategorijama, kvalitetu i deklarisanju rakije i drugih alkoholnih pića (2011). Službeni glasnik RS, br. 74/2010 i 70/2011.
- Probst, Y., Guan, V., Kent, K. (2018): A systematic review of food composition tools used for determining dietary polyphenol intake in estimated intake studies. *Food Chemistry* 238: 146-152.
- Palacios, I., Lozano, M., Moro, C., D'Arrigo, M., Rostagno, M. A., Martínez, J. A., García-Lafuente, A., Guillamón, E., Villares, A. (2011): Antioxidant properties of phenolic compounds occurring in edible mushrooms. *Food Chemistry* 128(3): 674-678.
- Radovanović, R., Popov-Raljić, J. (2001): Senzorna analiza prehrambenih proizvoda. Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Beogradu, Srbija.
- Raspor, P., Goranovič, D. (2008): Biotechnological applications of acetic acid bacteria. *Critical Reviews in Biotechnology* 28(2): 101-124.
- Ray, R. C., Didier, M. (Eds.). (2014): *Microorganisms and fermentation of traditional foods*. CRC Press.
- Rechner, A. R., Smith, M. A., Kuhnle, G., Gibson, G. R., Debnam, E. S., Srai, S. K. S., Moore, K. P., Rice-Evans, C. A. (2004): Colonic metabolism of dietary polyphenols: influence of structure on microbial fermentation products. *Free Radical Biology and Medicine* 36(2): 212-225.
- Reis, F. S., Martins, A., Barros, L., Ferreira, I. C. (2012a): Antioxidant properties and phenolic profile of the most widely appreciated cultivated mushrooms: a comparative study between in vivo and in vitro samples. *Food and Chemical Toxicology* 50(5):1201-1207.
- Reis, F. S., Martins, A., Vasconcelos, M. H., Morales, P., Ferreira, I. C. F. R. (2017): Functional foods based on extracts or compounds derived from mushrooms. *Trends in Food Science & Technology* 66: 48-62.
- Reis, F. S., Stojković, D., Soković, M., Glamočlija, J., Ćirić, A., Barros, L., Ferreira, I. C. F. R. (2012b): Chemical characterization of *Agaricus bohusii*, antioxidant potential and antifungal preserving properties when incorporated in cream cheese. *Food Research International* 48(2): 620-626.

- Ren, L., Hemar, Y., Perera, C. O., Lewis, G., Krissansen, G. W., Buchanan, P. K. (2014): Antibacterial and antioxidant activities of aqueous extracts of eight edible mushrooms. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre* 3: 41-51.
- Rice-Evans C, Miller N, Paganga G. (1997): Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in Plant Science* 2(4): 152-9.
- Rodrigues, F., Ludovico, P., Leão, C. (2006). Sugar metabolism in yeasts: an overview of aerobic and anaerobic glucose catabolism. In *Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts*. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 101-121.
- Rowan, N., Sullivan, R. (2002): Medicinal mushrooms: their therapeutic properties and current medical usage with special emphasis on cancer treatments. *Cancer Research UK*.
- Santoyo, S., Ramírez-Anguiano, A. C., Reglero, G., Soler-Rivas, C. (2009): Improvement of the antimicrobial activity of edible mushroom extracts by inhibition of oxidative enzymes. *International Journal of food Science & Technology* 44(5): 1057-1064.
- Saltarelli R, Ceccaroli P, Iotti M, Zambonelli A, Buffalini M, Casadei L, Vallorani L, Stocchi V. (2009): Biochemical characterisation and antioxidant activity of mycelium of *Ganoderma lucidum* from Central Italy. *Food Chemistry* 116(1): 143-151.
- Sanguinetti, M., Porta, R., Sali, M., La Sorda, M., Pecorini, G., Fadda, G., Posteraro, B. (2007): Evaluation of VITEK 2 and RapID yeast plus systems for yeast species identification: experience at a large clinical microbiology laboratory. *Journal of Clinical Microbiology* 45(4): 1343-1346.
- Sarangi, I., Ghosh, D., Bhutia, S. K., Mallick, S. K., Maiti, T. K. (2006): Anti-tumor and immunomodulating effects of *Pleurotus ostreatus* mycelia-derived proteoglycans. *International Immunopharmacology* 6(8): 1287-1297.
- Sari, M., Prange, A., Lelley, J. I., Hambitzer, R. (2017): Screening of beta-glucan contents in commercially cultivated and wild growing mushrooms. *Food Chemistry* 216: 45-51.
- Sengun, I. Y., Karabiyikli, S. (2011): Importance of acetic acid bacteria in food industry. *Food Control* 22(5): 647-656.

- Shahbazi, H., Hashemi Gahruei, H., Golmakani, M. T., Eskandari, M. H., Movahedi, M. (2018): Effect of medicinal plant type and concentration on physicochemical, antioxidant, antimicrobial, and sensorial properties of kombucha. *Food Science & Nutrition* 6(8): 2568-2577.
- Sharifi A., Khoramrooz S. S., Jahedi S., Khosravani S. A. (2012): Screening Of Antimicrobial Activity Of Sesquiterpenoid Crude Extract Of *Ganoderma*. *Life Science Journal* 9(4): 2516-2519.
- Sheena, N., Ajith, T. A., Mathew, A., Janardhanan, K. K. (2003): Antibacterial activity of three macrofungi, *Ganoderma lucidum*, *Navesporus floccosa* and *Phellinus rimosus* occurring in South India. *Pharmaceutical Biology* 41(8): 564-567.
- Shen, H. S., Shao, S., Chen, J. C., Zhou, T. (2017): Antimicrobials from mushrooms for assuring food safety. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 16(2): 316-329.
- Shin, S. H., Ye, M. K., Kim, H. S., Kang, H. S. (2007): The effects of nano-silver on the proliferation and cytokine expression by peripheral blood mononuclear cells. *International Immunopharmacology* 7(13): 1813-1818.
- Sievers, M., Lanini, C., Weber, A., Schuler-Schmid, U., Teuber, M. (1995): Microbiology and fermentation balance in a kombucha beverage obtained from a tea fungus fermentation. *Systematic and Applied Microbiology* 18(4): 590-594.
- Siu, K. C., Chen, X., Wu, J. Y. (2014): Constituents actually responsible for the antioxidant activities of crude polysaccharides isolated from mushrooms. *Journal of Functional Foods* 11: 548-556.
- Skalicka-Wozniak, K., Szypowski, J., Los, R., Siwulski, M., Sobieralski, K., Glowniak, K., Malm, A. (2012): Evaluation of polysaccharides content in fruit bodies and their antimicrobial activity of four *Ganoderma lucidum* (W Curt.: Fr.) P. Karst. strains cultivated on different wood type substrates. *Acta Societatis Botanicu Polonie* 81(1):17-21.
- Sknepnek, A., Pantić, M., Matijašević, D., Miletić, D., Lević, S., Nedović, V., & Nikšić, M. (2018): Novel kombucha beverage from lingzhi or reishi medicinal mushroom, *Ganoderma lucidum*, with antibacterial and antioxidant effects. *International Journal of Medicinal Mushrooms* 20(3): 243-258.

- Smania, Jr. A., Monache, F.D., Smania, E.D., Cuneo, R.S. (1999): Antibacterial activity of steroidal compounds isolated from *Ganoderma applanatum* (Pers.) Pat. (Aphyllophoromycetidae) fruit body. *International Journal of Medicinal Mushrooms* 1(4): 325-330.
- Smith, J., Rowan, N., Sullivan, R. (2002): *Medicinal mushrooms: their therapeutic properties and current medical usage with special emphasis on cancer treatments*. London: Cancer Research UK.
- Sreeramulu, G., Zhu, Y., Knol, W.(2000): Kombucha fermentation and its antimicrobial activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48(6): 2589-2594.
- Srihari, T., Arunkumar, R., Arunakaran, J., Satyanarayana, U. (2013): Downregulation of signalling molecules involved in angiogenesis of prostate cancer cell line (PC-3) by kombucha (lyophilized). *Biomedicine & Preventive Nutrition* 3(1): 53-58.
- Stajić, M., Vukojević, J., Čilerdžić, J. (2019): Mushrooms as Potential Natural Cytostatics. In *Medicinal Mushrooms* Springer, Singapore, pp. 143-168.
- Steinke, J. W., Borish, L. (2001): Th2 cytokines and asthma Interleukin-4: its role in the pathogenesis of asthma, and targeting it for asthma treatment with interleukin-4 receptor antagonists. *Respiratory Research* 2(2): 66-70.
- Stojković, D., Reis, F. S., Ferreira, I. C., Barros, L., Glamočlija, J., Čirić, A., Nikolić, M., Stević, T., Giveli, A., Soković, M. (2013): *Tirmania pinoyi*: Chemical composition, in vitro antioxidant and antibacterial activities and in situ control of *Staphylococcus aureus* in chicken soup. *Food Research International* 53(1): 56-62.
- Sun, T. Y., Li, J. S., Chen, C. (2015): Effects of blending wheatgrass juice on enhancing phenolic compounds and antioxidant activities of traditional kombucha beverage. *Journal of Food and Drug Analysis* 23(4): 709-718.
- Synytsya, A., Míčková, K., Synytsya, A., Jablonský, I., Spěvák, J., Erban, V., Kovářiková, E., Čopíková, J. (2009): Glucans from fruit bodies of cultivated mushrooms *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus eryngii*: Structure and potential prebiotic activity. *Carbohydrate Polymers* 76(4): 548-56.
- Synytsya, A., Novák, M. (2013): Structural diversity of fungal glucans. *Carbohydrate Polymers* 92(1): 792-809.

- Šandula, J., Kogan, G., Kačuráková, M., Machová, E. (1999): Microbial (1→3)-β-D-glucans, their preparation, physico-chemical characterization and immunomodulatory activity. *Carbohydrate Polymers* 38(3): 247-253.
- Taskin H, Kafkas E, Çakiroglu Ö, Büyükalaca S. (2013): Determination of volatile aroma compounds of *Ganoderma lucidum* by gas chromatography mass spectrometry (HS-GC/MS). *African Journal of Traditional Complementary and Alternative Medicines* 10(2): 353-5.
- Teoh, A. L., Heard, G., Cox, J. (2004): Yeast ecology of Kombucha fermentation. *International Journal of Food Microbiology* 95(2): 119-126.
- Tomić, S. Z. (2016). Biokompatibilnost i imunomodulatorne osobine nanomaterijala na bazi nanočestica zlata i ugljeničnih nanocevi, i naprednih biomaterijala na bazi NiTi i CuAlNi legura. Doktorska disertacija, Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet, Beograd, Srbija.
- Van Ba, H., Seo, H. W., Cho, S. H., Kim, Y. S., Kim, J. H., Ham, J. S., Park, B., Y., Pil-Nam, S. (2017): Effects of extraction methods of shiitake by-products on their antioxidant and antimicrobial activities in fermented sausages during storage. *Food Control* 79: 109-118.
- Van den Brink, J. (2008): Dynamic response of *Saccharomyces cerevisiae* to fermentative growth conditions. Doctoral thesis, Delft University of Technology, Netherlands.
- Van der Hem, L. G., Van der Vliet, J. A., Bocken, C. F. M., Kino, K. O. H. S. U. K. E., Hoitsma, A. J., Tax, W. J. M. (1995): Ling Zhi-8: studies of a new immunomodulating agent. *Transplantation* 60: 438-443
- Velićanski A. S., Cvetković D. D., Markov S. L., Šaponjac T., Šaponjac, V. T. T., Vulić J. J. (2014): Antioxidant and antibacterial activity of the beverage obtained by fermentation of sweetened lemon balm (*Melissa officinalis* L.) tea with symbiotic consortium of bacteria and yeasts. *Food Technology and Biotechnology* 52(4): 420-429.
- Vidra, A., Németh, Á. (2018): Bio-produced Acetic Acid: A Review. *Periodica Polytechnica Chemical Engineering* 62(3): 245-256.

- Vīna, I., Semjonovs, P., Linde, R., Deniņa, I. (2014): Current evidence on physiological activity and expected health effects of kombucha fermented beverage. *Journal of Medicinal Food* 17(2): 179-188.
- Vīna, I., Semjonovs, P., Linde, R., Patetko, A. (2013): Glucuronic acid containing fermented functional beverages produced by natural yeasts and bacteria associations. *International Journal of Research and Reviews in Applied Sciences* 14(1): 17-25.
- Villarreal-Soto, S. A., Beaufort, S., Bouajila, J., Souchard, J. P., Taillandier, P. (2018): Understanding Kombucha Tea Fermentation: A Review. *Journal of Food Science* 83(3): 580-588.
- Vitak, T. Y., Wasser, S. P., Nevo, E. D., Sybirna, N. O. (2015): The effect of the medicinal mushrooms *Agaricus brasiliensis* and *Ganoderma lucidum* (higher Basidiomycetes) on the erythron system in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. *International Journal of Medicinal Mushrooms* 17(3): 277-286.
- Vu, H. T. L., Yukphan, P., Chaipitakchonlatarn, W., Malimas, T., Muramatsu, Y., Bui, U. T. T., Tanasupawat, S., Duong, K. C., Nakagawa, Y., Pham, H. T., Yamada, Y. (2013): *Nguyenibacter vanlangensis* gen. nov., sp. nov., an unusual acetic acid bacterium in the  $\alpha$ -Proteobacteria. *The Journal of General and Applied Microbiology* 59(2): 153-166.
- Vukojević, J., Hadžić, I. (2013): Atlas gljiva i internacionalni rečnik narodnih imena gljiva. Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet, Alta Nova, Beograd.
- Walker, G. (1998): *Yeast - Physiology and Biotechnology*. John Wiley & Sons, New York
- Wang, H., Ng, T. B. (2006): Ganodermin, an antifungal protein from fruiting bodies of the medicinal mushroom *Ganoderma lucidum*. *Peptides* 27(1): 27-30.
- Wang, P. Y., Schneider, H. (1980): Growth of yeasts on D-xylulose. *Canadian Journal of Microbiology* 26(9): 1165-1168.
- Wang, X. M., Zhang, J., Wu, L. H., Zhao, Y. L., Li, T., Li, J. Q., Wang, J. Z., Liu, H. G. (2014): A mini-review of chemical composition and nutritional value of edible wild-grown mushroom from China. *Food Chemistry* 151: 279-285.
- Wasser S.P. (2005): Reishi or Ling Zhi (*Ganoderma lucidum*). In *Encyclopedia of dietary supplements*. Marcel Dekker, New York, pp. 603-622.

- Wasser, S. P. (2014): Medicinal mushroom science: Current perspectives, advances, evidences, and challenges. *Biomedical Journal* 37(6): 345-356.
- Wasser, S.P.; Weis, A.L. (1997): Medicinal Mushrooms, *Lentinus edodes* (Berk.) Singer; Nevo, E., Ed.; Peledfus Publ. House: Haifa, Israel, pp. 95.
- Watawana, M. I., Jayawardena, N., Ranasinghe, S. J., Waisundara, V. Y. (2017): Evaluation of the Effect of Different Sweetening Agents on the Polyphenol Contents and Antioxidant and Starch Hydrolase Inhibitory Properties of Kombucha. *Journal of Food Processing and Preservation* 41(1): e12752.
- Watawana, M., Jayawardena, N., Waisundara, V. Y. (2018): Value-added Tea (*Camellia sinensis*) as a Functional Food using the Kombucha 'Tea Fungus'. *Chiang Mai Journal of Science* 45(1): 136-146.
- Xiao J., Sun J., Yao L., Zhao Q., Wang L., Wang X., Yuan X., Zhao B. (2012): Physicochemical characteristics of ultrasonic extracted polysaccharides from cordyceps cephalosporium mycelia. *International Journal of Biological Macromolecules* 51(1):64-9.
- Xu, X., Yan, H., Chen, J., Zhang, X. (2011): Bioactive proteins from mushrooms. *Biotechnology Advances* 29(6): 667-674.
- Xu, X., Li, J., Hu, Y. (2014): Polysaccharides from *Inonotus obliquus* sclerotia and cultured mycelia stimulate cytokine production of human peripheral blood mononuclear cells in vitro and their chemical characterization. *International Immunopharmacology* 21(2): 269-278.
- Yamada, Y. (2014): Transfer of *Gluconacetobacter kakaiceti*, *Gluconacetobacter medellinensis* and *Gluconacetobacter maltaceti* to the genus *Komagataeibacter* as *Komagataeibacter kakaiceti* comb. nov., *Komagataeibacter medellinensis* comb. nov. and *Komagataeibacter maltaceti* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 64(5):1670-1672.
- Yamada, Y., Yukphan, P., Vu, H. T. L., Muramatsu, Y., Ochaikul, D., Tanasupawat, S., Nakagawa, Y. (2012): Description of *Komagataeibacter* gen. nov., with proposals of new combinations (*Acetobacteraceae*). *The Journal of General and Applied Microbiology* 58(5): 397-404.
- Yang, H., Zhang, L., Xiao, G., Feng, J., Zhou, H., Huang, F. (2014): Changes in some nutritional components of soymilk during fermentation by the culinary and



- medicinal mushroom *Grifola frondosa*. LWT-Food Science and Technology 62(1): 468-473.
- Yang, J. H., Lin, H. C., Mau, J. L. (2001): Non-volatile taste components of several commercial mushrooms. Food Chemistry 72(4), 465-471.
- Yoon, S. Y., Eo, S. K., Kim, Y. S., Lee, C. K., Han, S. S. (1994): Antimicrobial activity of *Ganoderma lucidum* extract alone and in combination with some antibiotics. Archives of Pharmacal research 17(6): 438-442.
- Zong, A., Cao, H., Wang, F. (2012): Anticancer polysaccharides from natural resources: A review of recent research. Carbohydrate Polymers 90(4): 1395-1410.
- Zhang, S., Nie, S., Huang, D., Li, W., Xie, M. (2013): Immunomodulatory effect of *Ganoderma atrum* polysaccharide on CT26 tumor-bearing mice. Food Chemistry 136(3-4): 1213-1219.
- Zhang, Q., Huo, N., Wang, Y., Zhang, Y., Wang, R., & Hou, H. (2017): Aroma-enhancing role of *Pichia manshurica* isolated from daqu in the brewing of shanxi aged vinegar. International Journal of Food Properties 20(9): 2169-2179.
- Zhao, Z. J., Sui, Y. C., Wu, H. W., Zhou, C. B., Hu, X. C., Zhang, J. (2018): Flavour chemical dynamics during fermentation of kombucha tea. Emirates Journal of Food and Agriculture 30(9): 732-741.
- Zhou, J., Liu, L., Shi, Z., Du, G., Chen, J. (2009): ATP in current biotechnology: regulation, applications and perspectives. Biotechnology Advances 27(1): 94-101.
- Zhu, F., Du, B., Bian, Z., Xu, B. (2015): Beta-glucans from edible and medicinal mushrooms: characteristics, physicochemical and biological activities. Journal of Food Composition and Analysis 41: 165-173.

## 8. PRILOG

### 8.1. Prilog A. Biohemijske karakteristike izolata kvasaca

Tabela 8.1. Asimilacione karakteristike izolata kvasaca (API 20C AUX, bioMérieux, Francuska)

Aktivna supstanca/Izolat	1 <sub>1</sub>	1 <sub>2</sub>	2 <sub>1</sub>	2 <sub>3</sub>	3	4 <sub>1</sub>	4 <sub>2</sub>	5	6
Glukoza	+ <sup>1</sup>	+	+	+	+	+	+	+	+
Glicerol	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Kalcijum 2-ketoglukonat	-	-	+	+	-	+	-	-	-
L-arabinoza	-	-	+	+	-	+	-	+	-
D-ksiloza	+	-	+	+	-	+	-	+	-
Adonitol	-	-	-	-	-	+	-	+	-
Ksilitol	-	-	-	+	+	+	-	-	+
D-galaktoza	+	+	+	+	-	+	+	+	-
Inozitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-sorbitol	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Metil- $\alpha$ D-glukopiranozid	+	-	+	-	-	+	+	+	-
N-acetil-glukozamin	-	-	-	-	+	-	-	-	+
D-celobioza	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-laktoza	+	+	-	-	-	+	-	-	-
D-maltoza	+	+	+	+	-	+	+	+	-
D-saharoza	+	+	+	+	-	+	+	+	-
D-trehaloza	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-melezitoza	+	-	+	-	-	-	+	+	-
D-rafinoza	+	+	+	+	-	+	+	+	-
Pseudohife	+	-	+	-	+	+	-	-	+

<sup>1</sup>+: pozitivna reakcija, -: negativna reakcija

Tabela 8.2. Biohemijske karakteristike izolata kvasaca primenom Vitek 2 sistema

Udubljenje	Test/Izolat										
		1 <sub>1</sub>	1 <sub>2</sub>	2 <sub>1</sub>	2 <sub>3</sub>	3	4 <sub>1</sub>	4 <sub>2</sub>	5	6	
3	L-Lizin-arilamidaza	- <sup>1</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	
4	L-malat asimilacija	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
5	Leucin-arilamidaza	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
7	Arginin GP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
10	Eritrol asimilacija	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
12	Glicerol asimilacija	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
13	Tirozin arilamidaza	(-)	+	+	+	-	-	(-)	(-)	-	
14	Beta-N-acetil-glukozaminidaza	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
15	Arbutin asimilacija	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
18	Amigdalinalin asimilacija	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
19	D-galaktoza asimilacija	+	+	+	+	-	+	+	+	-	
20	Gentiobioza asimilacija	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
21	D-glukoza asimilacija	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
23	Laktoza asimilacija	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
24	Metil-A-D-glukopiranozid asimilacija	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
26	D-celobioza asimilacija	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
27	Gama-glutamyl-transferaza	-	-	(-)	(-)	-	-	-	-	-	
28	D-maltoza asimilacija	+	+	+	+	-	+	+	+	-	
29	D-rafinosa asimilacija	+	+	+	+	-	+	+	+	-	
30	PNP-N-acetil-BD-galactosaminidaza 1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
32	D-manoza asimilacija	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
33	D-melobioza asimilacija	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
34	D-melezitoza asimilacija	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
38	L-sorboza asimilacija	-	-	-	-	+	-	-	-	+	
39	L-ramnoza asimilacija	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
40	Ksilitol asimilacija	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
42	D-sorbitol asimilacija	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
44	Saharoza asimilacija	+	+	+	+	-	+	+	+	-	
45	Ureaza	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
46	Alfa-glukozidaza	-	-	-	-	-	-	-	(-)	-	
47	D-turanoza asimilacija	+	+	+	+	-	+	+	+	-	

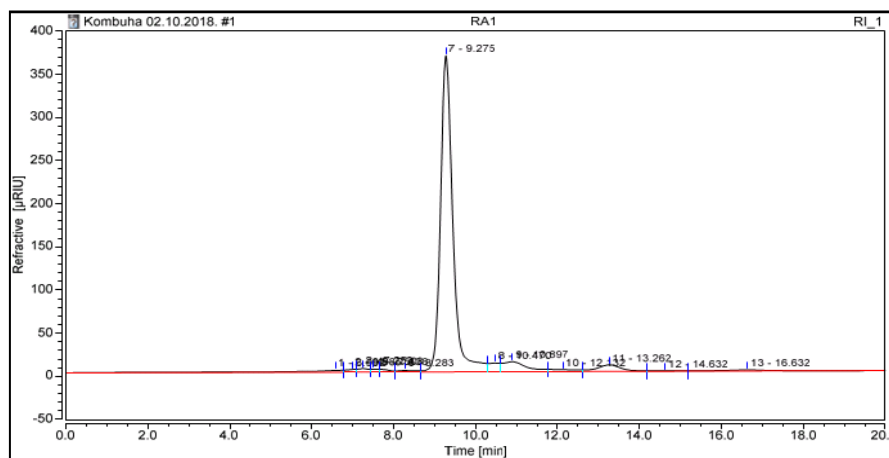
Tabela 8.2. nastavak

<b>48</b>	D-trehaloza asimilacija	+	+	+	+	-	+	+	+	-
<b>49</b>	Nitrat asimilacija	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>51</b>	L-arabinoza asimilacija	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>52</b>	D-galakturonat asimilacija	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>53</b>	Eskulin hidroliza	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>54</b>	L-glutamat asimilacija	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>55</b>	D-ksiloza asimilacija	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>56</b>	DL-laktat asimilacija	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>58</b>	Acetat asimilacija	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>59</b>	Citrat (natrijum) asimilacija	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>60</b>	Glukuronat asimilacija	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>61</b>	L-prolin asimilacija	-	-	-	-	+	-	-	-	+
<b>62</b>	2-keto-D-glukonat asimilacija	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>63</b>	N-acetil-glukozamin asimilacija	-	-	-	-	+	-	-	-	+
<b>64</b>	D-glukonat asimilacija	-	-	-	-	-	-	-	-	-

<sup>1</sup>+ - pozitivna reakcija; - negativna reakcija; (-) – slabo negativna reakcija

## 8.2. Prilog B. Hromatogrami sadržaja saharoze, glukoze, fruktoze i etanola tokom fermentacije kombuhe od gljive *Ganoderma lucidum*

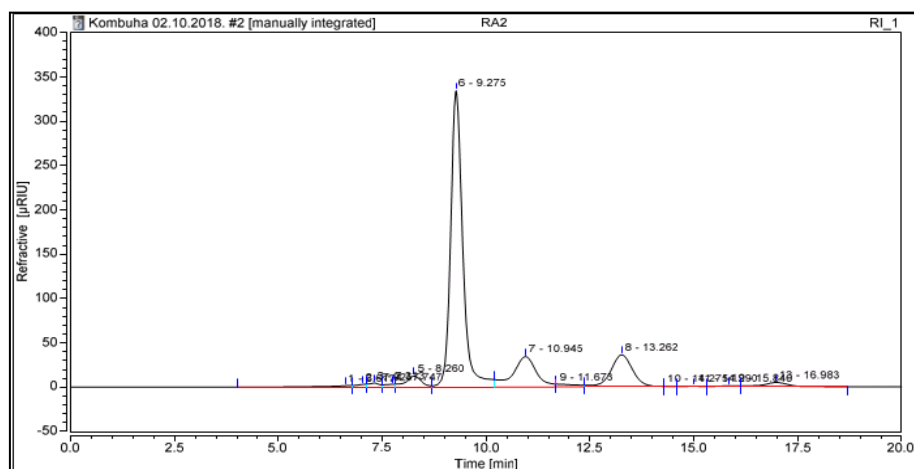
T2 - 0. dan



Pik br.	Naziv	Retenciono vreme (min)	Površina (μRIU*min)
10	Saharoza	9,3	149,10
13	Glukoza	10,9	7,84
17	Fruktoza	13,23	3,65

Grafik 8.1. Sadržaj saharoze, glukoze i fruktoze u kombuhi od gljive *G. lucidum*, 0. dan fermentacije.

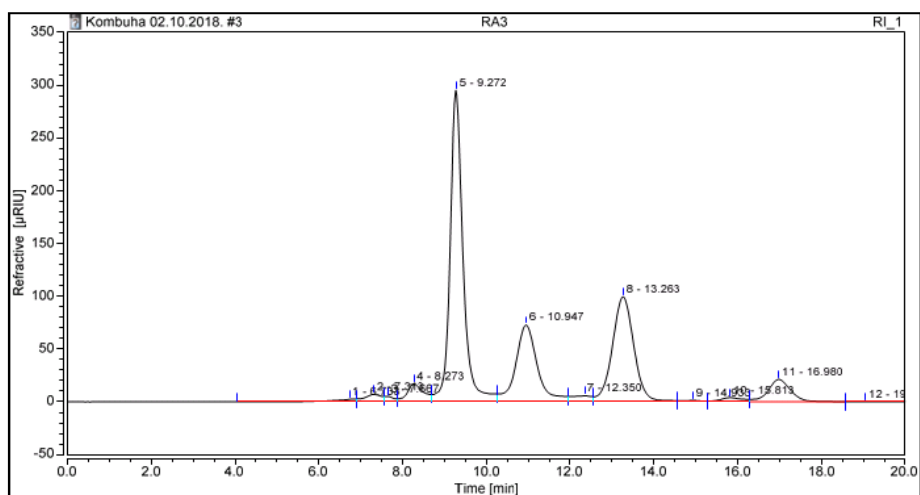
### T2 – 1. dan



Pik br.	Naziv	Retenciono vreme (min)	Površina (µRIU*min)
6	Saharoza	9,27	112,55
7	Glukoza	10,94	24,04
8	Fruktoza	13,26	22,43
13	Etanol	16,98	3,56

Grafik 8.2. Sadržaj saharoze, glukoze i fruktoze i etanola u kombuhi od gljive *G. lucidum*, 1. dan fermentacije.

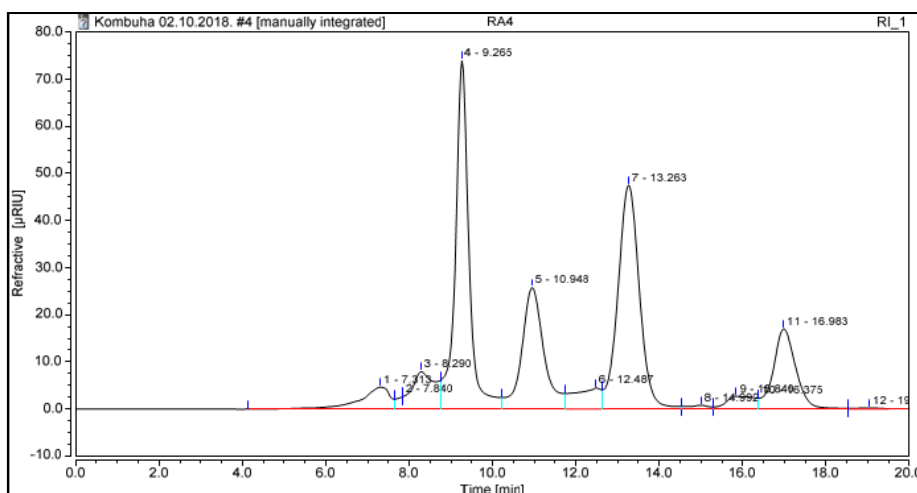
### T2 – 2. dan



Pik br.	Naziv	Retenciono vreme (min)	Površina (µRIU*min)
5	Saharoza	9,27	96,4
6	Glukoza	10,95	34,70
8	Fruktoza	13,26	38,24
11	Etanol	16,98	13,19

Grafik 8.3. Sadržaj saharoze, glukoze i fruktoze i etanola u kombuhi od gljive *G. lucidum*, 2. dan fermentacije.

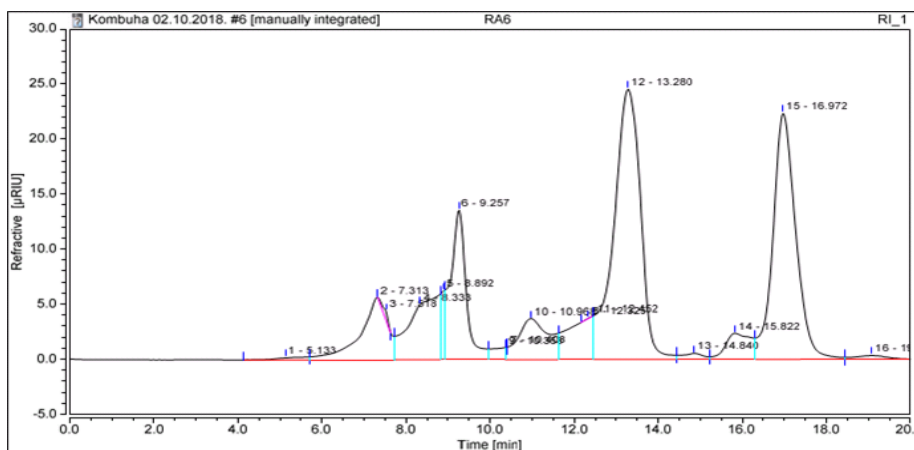
### T2- 3.dan



Pik br.	Naziv	Retenciono vreme (min)	Površina (μRIU*min)
4	Saharoza	9,27	28,05
5	Glukoza	10,95	15,91
7	Fruktoza	13,26	28,53
11	Etanol	16,98	17,00

Grafik 8.4. Sadržaj saharoze, glukoze i fruktoze i etanola u kombuhi od gljive *G. lucidum*, 3. dan fermentacije.

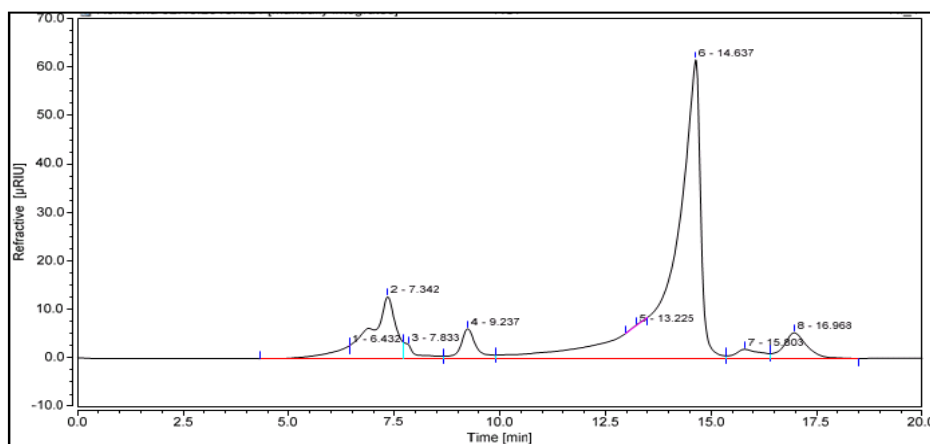
### T2 – 7. dan



Pik br.	Naziv	Retenciono vreme (min)	Površina (μRIU*min)
5	Saharoza	9,26	20,04
6	Glukoza	10,95	11,142
7	Fruktoza	13,27	30,15
10	Etanol	16,98	13,97

Grafik 8.5. Sadržaj saharoze, glukoze i fruktoze i etanola u kombuhi od gljive *G. lucidum*, 7. dan fermentacije.

T2 - 11. dan



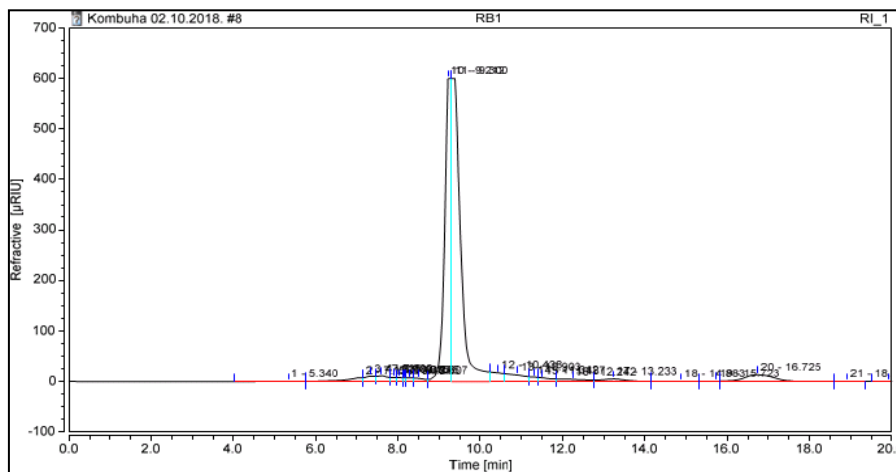
Pik br.	Naziv	Retenciono vreme (min)	Površina ( $\mu\text{RIU} \cdot \text{min}$ )
4	Saharoza	9,24	2,61
5	Fruktoza	13,23	0,04
8	Etanol	16,97	3,34

Grafik 8.6. Sadržaj saharoze, glukoze i fruktoze i etanola u kombuhi od gljive *G. lucidum*, 11. dan fermentacije.



### 8.3. Prilog C. Hromatogrami sadržaja saharoze, glukoze, fruktoze i etanola tokom fermentacije kombuhe od gljive *Lentinus edodes*

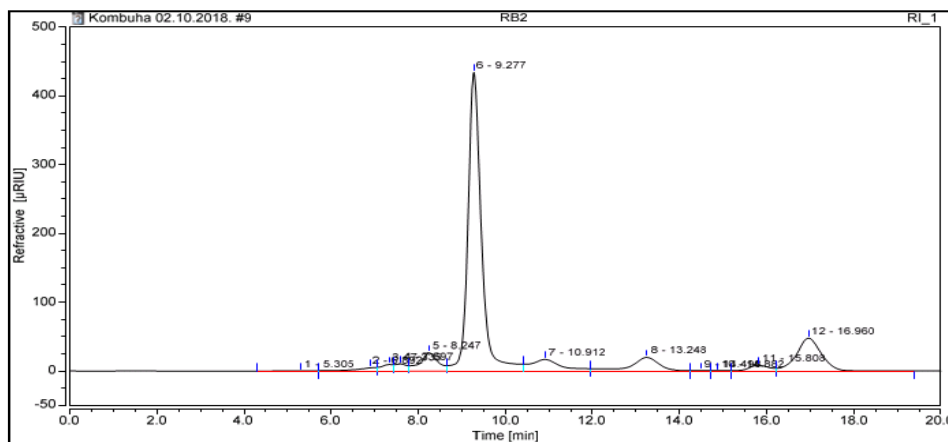
T4 – 0. dan



Pik br.	Naziv	Retenciono vreme (min)	Površina (μRIU*min)
18	Saharoza	9,26	164,91
20	Glukoza	10,81	5,61
23	Fruktoza	13,23	1,73

Grafik 8.7. Sadržaj saharoze, glukoze i fruktoze i etanola u kombuhi od gljive *L. edodes*, 0. dan fermentacije.

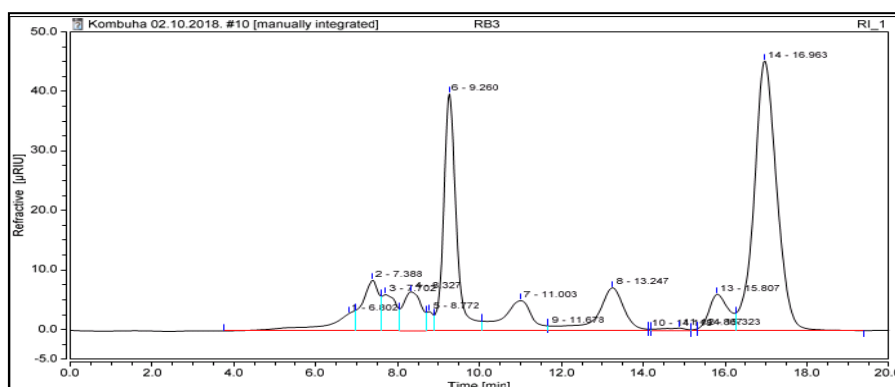
T4 – 1. dan



Pik br.	Naziv	Retenciono vreme (min)	Površina (µRIU*min)
6	Saharoza	9,27	155,45
7	Glukoza	10,91	13,77
8	Fruktoza	13,25	15,28
12	Etanol	16,96	31,86

Grafik 8.8. Sadržaj saharoze, glukoze i fruktoze i etanola u kombuhi od gljive *L. edodes*, 1. dan fermentacije.

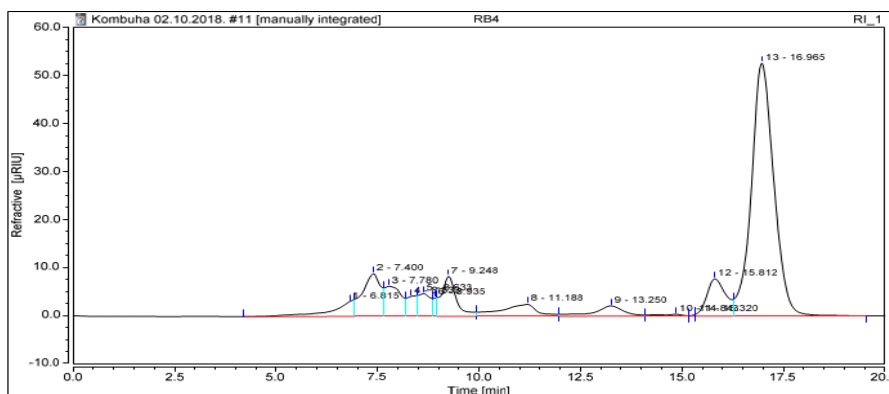
T4 – 2. dan



Pik br.	Naziv	Retenciono vreme (min)	Površina (µRIU*min)
6	Saharoza	9,26	14,21
8	Fruktoza	13,25	5,55
14	Etanol	16,96	28,93

Grafik 8.9. Sadržaj saharoze, glukoze i fruktoze i etanola u kombuhi od gljive *L. edodes*, 2. dan fermentacije.

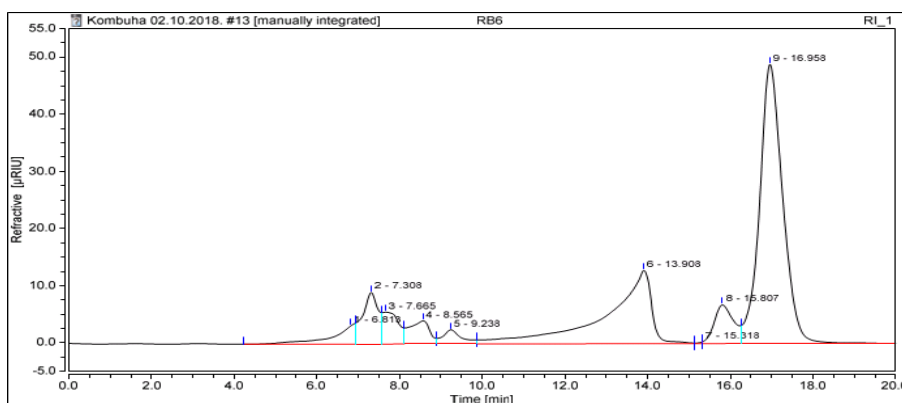
### T4 – 3. dan



Pik br.	Naziv	Retenciono vreme (min)	Površina (µRIU*min)
7	Saharoza	9,25	3,50
9	Fruktoza	13,25	1,82
13	Etanol	16,96	33,80

Grafik 8.10. Sadržaj saharoze, glukoze i fruktoze i etanola u kombuhi od gljive *L. edodes*, 3. dan fermentacije.

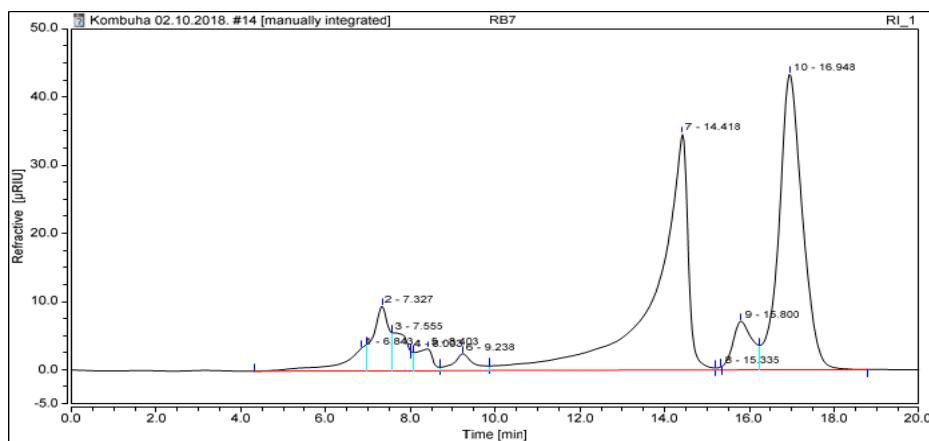
### T4 – 7. dan



Pik br.	Naziv	Retenciono vreme (min)	Površina (µRIU*min)
5	Saharoza	9,24	1,31
13	Etanol	16,96	31,63

Grafik 8.11. Sadržaj saharoze, glukoze i fruktoze i etanola u kombuhi od gljive *L. edodes*, 7. dan fermentacije.

### T4 – 11. dan

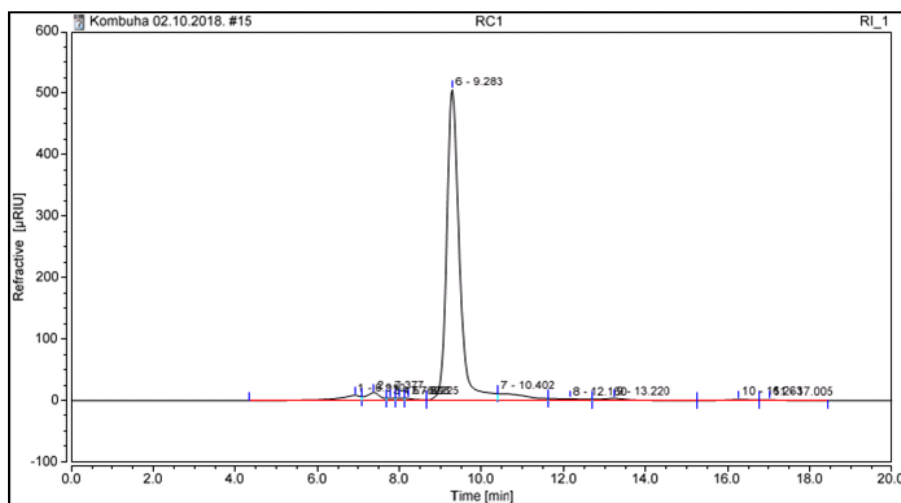


Pik br.	Naziv	Retenciono vreme (min)	Površina (μRIU*min)
5	Saharoza	9,24	1,36
13	Etanol	16,96	27,78

Grafik 8.11. Sadržaj saharoze, glukoze i fruktoze i etanola u kombuhi od gljive *L. edodes*, 11. dan fermentacije.

#### 8.4. Prilog D. Hromatogrami sadržaja saharoze, glukoze, fruktoze i etanola tokom fermentacije kombuhe od gljive *Coriolus versicolor*

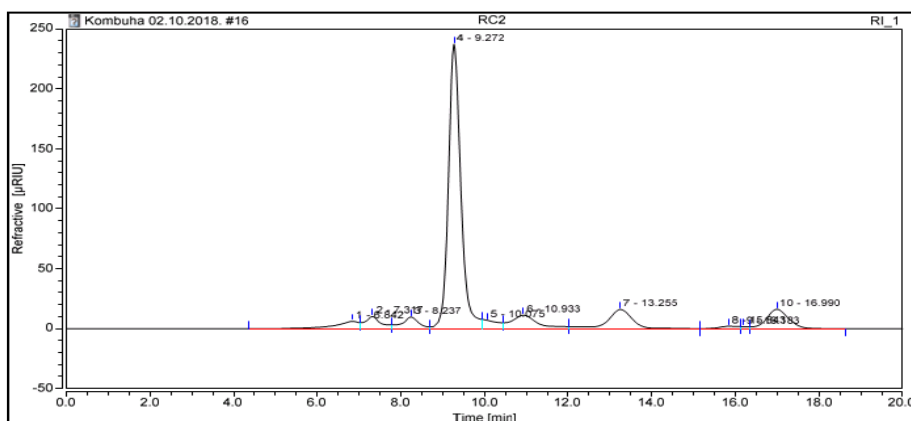
T6 - 0. dan



Pik br.	Naziv	Retenciono vreme (min)	Površina ( $\mu$ RIU*min)
6	Saharoza	9,28	145,72
7	Glukoza	10,4	8,98
13	Fruktoza	13,22	2,67

Grafik 8.12. Sadržaj saharoze, glukoze i fruktoze u kombuhi od gljive *C. versicolor*, 0. dan fermentacije.

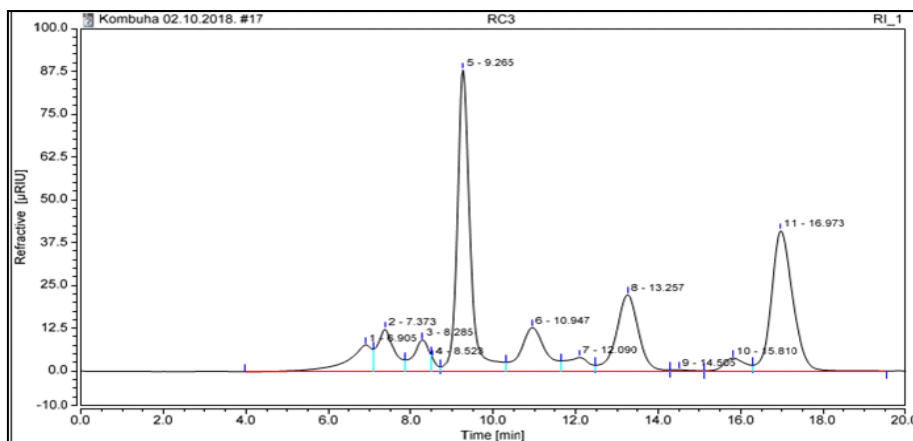
### T6 – 1. dan



Pik br.	Naziv	Retenciono vreme (min)	Površina (µRIU*min)
4	Saharoza	9,27	81,73
6	Glukoza	10,93	8,23
7	Fruktoza	13,25	11,05
12	Etanol	16,99	9,90

Grafik 8.13. Sadržaj saharoze, glukoze i fruktoze u kombuhi od gljive *C. versicolor*, 1. dan fermentacije.

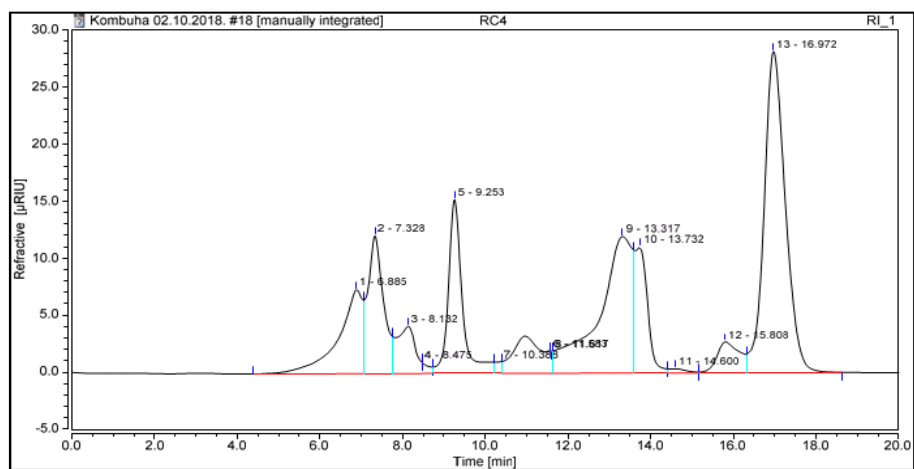
### T6 – 2.dan



Pik br.	Naziv	Retenciono vreme (min)	Površina (µRIU*min)
5	Saharoza	9,27	31,61
6	Glukoza	10,95	8,74
8	Fruktoza	13,26	13,91
12	Etanol	16,97	24,51

Grafik 8.14. Sadržaj saharoze, glukoze i fruktoze u kombuhi od gljive *C. versicolor*, 2. dan fermentacije.

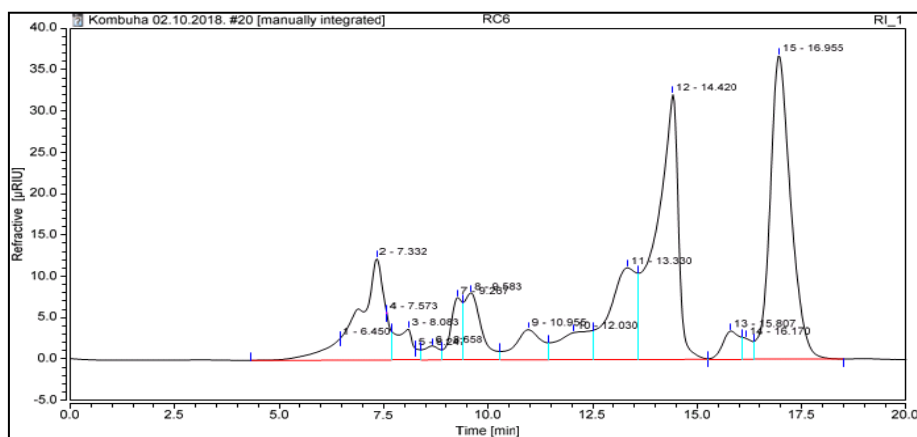
T6 – 3.dan



Pik br.	Naziv	Retenciono vreme (min)	Površina (µRIU*min)
5	Saharoza	9,25	5,93
9	Fruktoza	13,31	11,26
13	Etanol	16,97	16,71

Grafik 8.15. Sadržaj saharoze, glukoze i fruktoze u kombuhi od gljive *C. versicolor*, 3. dan fermentacije.

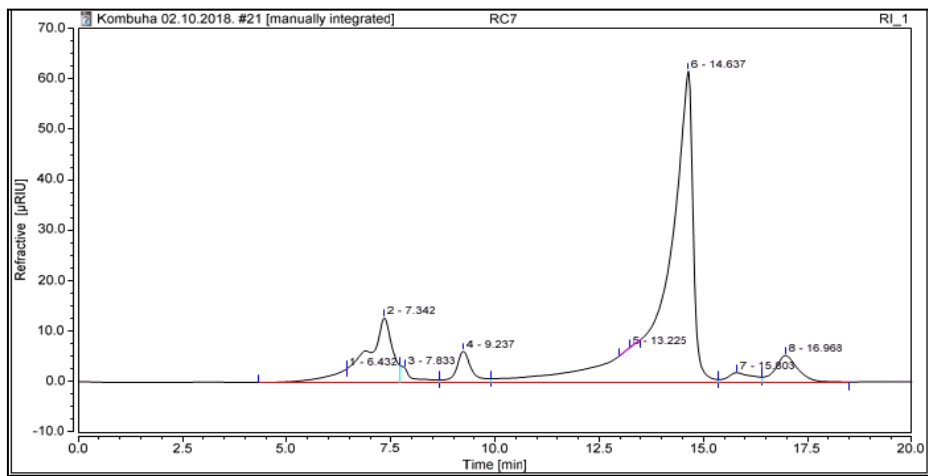
T6 – 7.dan



Pik br.	Naziv	Retenciono vreme (min)	Površina (µRIU*min)
7	Saharoza	9,27	2,4
9	Glukoza	10,96	2,6
11	Fruktoza	13,33	8,39
15	Etanol	16,96	21,11

Grafik 8.16. Sadržaj saharoze, glukoze i fruktoze u kombuhi od gljive *C. versicolor*, 7. dan fermentacije.

T6 – 11.dan



Pik br.	Naziv	Retenciono vreme (min)	Površina (µRIU*min)
4	Saharoza	9,24	2,65
5	Fruktoza	13,23	0,02
8	Etanol	16,97	3,40

Grafik 8.17. Sadržaj saharoze, glukoze i fruktoze i etanola u kombuhi od gljive *C. versicolor*, 11. dan fermentacije.



## BIOGRAFIJA AUTORA

Aleksandra S. Sknepnek je rođena 02.03.1984. godine u Pančevu, Republika Srbija. Osnovnu školu „Dositej Obradović” završila je u Oповu 1999. godine, a nakon toga, Petu beogradsku gimnaziju u Beogradu, 2003. godine. Diplomirala je na Poljoprivrednom fakultetu Univerziteta u Beogradu, 2010. godine sa prosečnom ocenom 8,50 (osam pedeset) i ocenom 10 (deset) na diplomskom ispitu. Diplomski rad „Antimikrobna svojstva gljive *Ganoderma lucidum*” odbranila je na Katedri za Tehnološku mikrobiologiju, Poljoprivrednog fakulteta, Univerziteta u Beogradu.

Doktorske akademske studije upisala je 2010. godine, smer Prehrambena tehnologija, uža oblast istraživanja Tehnološka mikrobiologija. Od 2011. godine učesnik je na projektu Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja: „Razvoj novih inkapsulacionih i enzimskih tehnologija za proizvodnju biološki aktivnih supstanci i drugih komponenti hrane u cilju povećanja njene konkurentnosti, kvaliteta i bezbednosti”, br. 46010. Takođe je, od 2013-2016. godine, bila angažovana i na međunarodnom projektu EU Commission project AREA, FP7-REGPOT-2012-2013-1, No. 316004, Advancing research in Agricultural and Food Sciences at Faculty of Agriculture, University of Belgrade. Zaposlena je na Poljoprivrednom fakultetu, gde je 2013. godine izabrana u zvanje istraživač saradnik.

Autor je i koautor četiri naučna rada sa ISI liste objavljenih u vodećim međunarodnim časopisima i više od deset saopštenja objavljenih u zbornicima radova sa međunarodnih i domaćih skupova.

Kao student demonstrator, bila je angažovana na Katedri za tehnološku mikrobiologiju, Poljoprivrednog fakulteta u Beogradu, u izvođenju vežbi iz predmeta Sanitacija pogona, tokom školske 2012/13. godine, dok je tokom školske 2018/19. godine bila angažovana na predmetu Osnovi mikrobiologije hrane i Sanitacija pogona. Na Ogladnom dobru „Radmilovac”, Poljoprivrednog fakulteta, Univerziteta u Beogradu, od 09/2013. do 09/2014. godine bila je angažovana kao rukovodilac prerade.

Dobitnik je nagrade Alltech Young scientists Competition, za osvojeno prvo mesto, 2011. godine. Član je Udruženja mikrobiologa Srbije od 2012. godine.

## Изјава о ауторству

Име и презиме аутора Александра  
Скнепнек

Број индекса 10/12

### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Карактеристике чајне гљиве – комбухе, ферментисане у присуству екстраката

одабраних врста медицинских гљива

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да дисертација у целини ни у деловима није била предложена за стицање друге дипломе према студијским програмима других високошколских установа;
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио/ла интелектуалну својину других лица.

**Потпис аутора**

У Београду, 27.08.2019.

\_\_\_\_\_

## **Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада**

Име и презиме аутора Александра Скнепнек

Број индекса 10/12

Студијски програм Прехрамбена технологија

Наслов рада Карактеристике чајне гљиве – комбухе, ферментисане у присуству екстракта одабраних врста медицинских гљива

Ментор Проф. др Миомир Никшић

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањења у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

**Потпис аутора**

У Београду, 27.08.2019.

---

## Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Карактеристике чајне гљиве – комбухе, ферментисане у присуству екстраката

---

одабраних врста медицинских гљива

---

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду и доступну у отвореном приступу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство (CC BY)

2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)

**3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)**

4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)

5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)

6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци.

Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

**Потпис аутора**

У Београду, 27.08.2019.

1. **Ауторство.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. **Ауторство – некомерцијално.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. **Ауторство – некомерцијално – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. **Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. **Ауторство – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. **Ауторство – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.