

ANTIMIKROBNA AKTIVNOST KOMBUHE OD RTANJSKOG ČAJA

Ispitana je antimikrobna aktivnost konzumnih kombuha napitaka od crnog i rtanjskog čaja modifikovanom disk difuzionom metodom. Kao test mikroorganizmi u ispitivanju su korišćeni: *Salmonella enteritidis*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus sp.*, *Sarcina lutea*, *Penicillium aurantiogriseum*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Rhodotorula sp.*, *Candida pseudotropicalis* i *Saccharomyces cerevisiae*. Značajnu antimikrobnu aktivnost prema svim bakterijama, osim *Sarcina lutea*, pokazali su kombuha napici i rastvor sirćetne kiseline. Kombuha napici i rastvor sirćetne kiseline su ispoljili granično inhibitorno delovanje prema nekim plesnima. Ispitani uzorci nisu uticali na rast ćelija kvasaca.

Kombuha je osvežavajući napitak koji se dobija fermentacijom zaslađenog čaja, fiziološkom aktivnošću čajne gljive. Na Istoku (Kina, Tajland, Rusija) kombuha je tradicionalni napitak već više od 2000 godina, a poslednjih decenija je zbog niza terapijskih efekata koji joj se pripisuju sve popularnija i na Zapadu. Smatra se da redovno konzumiranje kombuhe stimuliše imunološki i nervni sistem, digestivni trakt, da pozitivno deluje na artritis, arteriosklerozu i ulkus, da podstiče detoksikaciju organizma delujući tako preventivno i dr. [1,2].

Čajna gljiva je simbioza kvasaca (*Saccharomyces sp.*, *Zygosaccharomyces sp.*, *Torulopsis sp.*, *Pichia sp.*, *Brettanomyces sp.* [3,4] i bakterija sirćetnog vrenja (*Acetobacter xylinum*, *Acetobacter aceti*, *Gluconobacter oxydans*) [5]. Tačan mikrobni sastav čajne gljive je određen geografskim i klimatskim uslovima kultivacije kao i lokalnim vrstama divljih kvasaca i bakterija.

Statičnom kultivacijom čajne gljive na zaslađenom (70–100 g/l saharoze) crnom čaju, pod aerobnim uslovima, za 7–10 dana dobija se osvežavajući, slatkast, kiselkast i blago karbonizovan napitak – kombuha. Kvasci čajne gljive enzimski (invertazom) hidrolizuju saharozu u medijumu za kultivaciju čineći je time dostupnom bakterijama sirćetnog vrenja, koje u odsustvu enzima nisu u mogućnosti da usvoje navedeni disaharid. Etanol nastao fermentacijom glukoze i fruktoze u ćelijama kvasaca oksiduju do sirćetne kiseline bakterije sirćetnog vrenja. Dominantni metaboliti čajne gljive jesu sirćetna i glukonska kiselina (koja nastaje iz glukoze delovanjem bakterija sirćetnog vrenja) [1]. Kao sekundarni metaboliti čajne gljive u napitku se detektuju i mlečna, vinska, jabučna

kiselina, vitamini (B₁, B₂, B₆, B₁₂, C), etanol, glicerol, biogeni amini [6,7].

Crni čaj je tradicionalni izvor azotnih jedinjenja i mikroelemenata u medijumu za kultivaciju čajne gljive. Međutim, novija istraživanja pokazuju da se čajna gljiva uspešno može gajiti i na drugim čajevima – na zelenom čaju [5], čaju ehinacee ili rtanjskom čaju [8,9].

Rtanjski čaj (*Satureja montana* L.) je za kultivaciju čajne gljive odabran zbog svojih terapijskih svojstava koja su poznata tradicionalnoj medicini, a neka od njih i naučno dokazana. Ispitivanjima je dokazano prisustvo fenolnih jedinjenja u rtanjskom čaju koja obezbeđuju njegovo snažno antiseptično dejstvo [10]. Zato se ovaj čaj preporučuje u lečenju infekcija organa za disanje, varenje i mokrenje. Uspešnim se pokazao i u terapiji upala kože i sluznica [11].

Antimikrobna svojstva kombuhe su ispitana od nekolicine autora. Guttapadu i saradnici [12] su ispitali antimikrobnu aktivnost kombuhe od crnog čaja, sa sadržajem sirćetne kiseline od 8,5 g/l, na patogenim mikroorganizmima. Zaključili su da nosioci antimikrobne aktivnosti kombuhe nisu supstance proteinske prirode, već da je to prevashodno sirćetna kiselina. Ova kiselina je pokazala gotovo isti inhibitorni efekat kao i kombuha na deset od četrnaest sojeva bakterija (*Enterobacter cloacae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus*, *Helicobacter pylori*, *Listeria monocytogenes*...); u preostala četiri slučaja (*Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium* i *Shigella sonnei*) kombuha je pokazala snažniji antimikrobni efekat na koji nije uticala korekcija vrednosti pH ili termički tretman. Kombuha je za razliku od sirćetne kiseline inhibirala rast i *Candida albicans*. U istom istraživanju uzorci nefermentisanog crnog čaja (c=5g/l) su ispoljili antimikrobno dejstvo samo na *Campylobacter jejuni*.

Do sličnih rezultata došli su Stenkraus i saradnici [13] ispitujući *in vitro* antimikrobnu aktivnost kombuhe od crnog čaja sa sadržajem sirćetne kiseline od 10,5 g/l.

Rezultati ispitivanja Greenwalt i saradnika [14] su pokazali da nefermentisani čaj u koncentraciji od 70 g/l ne pokazuje antimikrobnu aktivnost na *Escherichia coli*,

* Rad je saopšten na VI Simpozijumu "Savremene tehnologije i privredni razvoj", Leskovac, Oktobar 21–22, 2005

Adresa autora: S. Markov, Tehnološki fakultet, Univerzitet u Novom Sadu, Bulevar Cara Lazara 1, 21000 Novi Sad, Srbija i Crna Gora

Rad primljen: Septembar 20, 2005

Rad prihvaćen: Oktobar 4, 2005

Salmonella choleraesuis, *Bacillus cereus*, *Candida albicans* i *Agrobacterium tumefaciens*. Nefermentisani crni čaj je pri minimalnoj koncentraciji čaja od 35 g/l inhibirao rast samo *Staphylococcus aureus*. Kombuhe od crnog i zelenog čaja u istraživanju istih autora su pokazale identičnu antimikrobnu aktivnost i pored očekivanja da zeleni čaj, zbog većeg sadržaja katehina, ima veću antimikrobnu aktivnost. Antimikrobno delovanje kombuhe su pripisali organskim kiselinama (pre svih sirćetnoj), koje se kao takvo gubi neutralizacijom napitka.

Mehanizam antimikrobnog delovanja slabih organskih kiselina (sirćetna, benzoeva, sumporasta) je takav da nedisosovani deo molekula kiseline penetrira u ćeliju za razliku od anjona koji je lipidno nerastvoran. Molekul kiseline u citoplazmi ćelije koja je neutralnog pH disocira oslobađajući proton. Ovo izaziva acidifikaciju ćelijske citoplazme i inhibiciju ćelije.

Antimikrobna svojstva kombuhe zavise od nekoliko faktora; dokazano je da se inhibitorski efekat kombuhe povećava sa porastom koncentracije čaja u podlozi za kultivaciju [14]; smanjenje dodirne površine podloge i vazduha doprinosi smanjenju antimikrobne aktivnosti napitka, a isti efekat imaju pojačana aeracija i mešanje podloge tokom kultivacije čajne gljive [15]. Čini se da je od značaja za antimikrobnu aktivnost kombuhe i ugljeni hidrat upotrebljen u podlozi za kultivaciju. Tako se kombuha snažnijeg antimikrobnog dejstva dobija na podlogama sa saharozom i glukozom nego u sredinama sa istim sadržajem fruktoze [16].

Cilj ovog rada bio je ispitivanje antimikrobne aktivnosti konzumnih kombuha napitaka od crnog i rtanjskog čaja, ukupne kiselosti od oko 3,5 – 4,0 g/l. Na osnovu dugogodišnjeg iskustva u pripremi i konzumiranju kombuhe i senzornih analiza, navedena kiselost napitka je od većine konzumenata i ocenjivača prepoznata kao optimalna. Izneti rezultati bi trebali da pomognu u proceni rizika od kontaminacije čajne gljive tokom kultivacije.

EKSPERIMENTALNI DEO

Kultivacija čajne gljive

Čajna gljiva je kultivisana na zaslađenom rtanjskom i crnom čaju. Podloga za kultivaciju čajne gljive pripremljena je rastvaranjem sahara (70 g/l) u česmenjskoj vodi i zagrevanjem ovog rastvora do ključanja. U prokuvan rastvor dodat je odgovarajući čaj u količini od 5 g/l. Nakon 15 min. koliko je trajala ekstrakcija čaja podloga je profiltrirana u staklene sudove ukupne zapremine 500-500 ml i otvorom prečnika 75 mm. Podloga ohlađena na oko 30°C je inokulirana celuloznom pelikulom čajne gljive, koja je kroz dve prethodne kultivacije adaptirana na dati supstrat (zaslađeni crni ili rtanjski čaj). Na otvor staklenog suda postavljena je sterilna gaza radi sprečavanja prodiranja insekata (sirćetne mušice) i kontaminacije podloge. Inokulirana podloga je inkubirana u termostatu na $t = 28^{\circ}\text{C}$.

Hemijske analize kombuha napitaka

Nakon što je iz uzoraka kombuhe uklanjen ugljen-dioksid vrednost pH je određena elektronskim pH-metrom (HI 9321), a ukupan sadržaj kiselina potencijometrijskom titracijom rastvorom NaOH ($c=0,1 \text{ mol/l}$) do pH vrednosti 7 (17).

Kontrolni uzorci ispitivanja antimikrobne aktivnosti kombuhe

Kontrolni uzorci ispitivanja bili su:

- rastvor sirćetne kiseline iste koncentracije kao odgovarajući kombuha napitak;
- kombuha pH=7 – pripremljena neutralisanjem kombuhe rastvorom NaOH ($c=0,1 \text{ mol/l}$);
- čaj – pripremljen dekokcijom 5 g/l crnog ili rtanjskog čaja;
- "model sistem" – sačinjen od sirćetne kiseline (količine kao u kombuhi), odgovarajućeg čaja ($c=5 \text{ g/l}$), glukoze ($c=20 \text{ g/l}$) i fruktoze ($c=29 \text{ g/l}$). Sadržaji glukoze i fruktoze u "model sistemu" definisani su na osnovu literaturnih podataka o preostaloj količini ovih ugljenih hidrata u kombuha napitku [9].

Uzorci kombuhe, neutralisane kombuhe i čaja su profiltrirani kroz membranske filtre prečnika pora $\phi = 0,2 \mu\text{m}$.

Test mikroorganizmi

Za ispitivanje antimikrobne aktivnosti kombuha napitaka upotrebljeni su sledeći sojevi bakterija, kvasaca i plesni: *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853, gram negativna), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923, gram pozitivna), *Bacillus sp.* (izolat iz prirodne sredine, gram pozitivna, sporogena), *Salmonella enteritidis* (ATCC 13076, gram negativna), *Proteus mirabilis* (ATCC 35659, gram negativna), *Escherichia coli* (ATCC 25922, gram negativna), *Sarcina lutea* (ATCC 9341, gram pozitivna), *Saccharomyces cerevisiae* (112, Hefebank Weihenstephan), *Candida pseudotropicalis* (klinički izolat), *Rhodotorula sp.* (izolat iz prirodne sredine), *Penicillium aurantiogriseum* (izolat iz prirodne sredine), *Aspergillus niger* (izolat iz prirodne sredine) i *Aspergillus flavus* (izolat iz prirodne sredine).

Navedeni sojevi se čuvaju u Muzeju kultura predmeta Mikrobiologija, na $+4^{\circ}\text{C}$, uz redovno presejavanje.

Priprema test mikroorganizama za ispitivanja podrazumevala je njihovo dvostruko pasažiranje presejavanjem kultura na kosi MHA (Miller Hinton agar), odnosno, SDA (Sabouraud 4%-dextrose agar). Bakterijske kulture su inkubirane 24 h na 37°C , kvasci 24 h na 30°C , a plesni na 22°C 72–96 sati. Od fiziološki aktivnih kultura pripremljena je osnovna suspenzija prenošenjem biomase sa kosog agara u epruvetu sa sterilnim fiziološkim rastvorom. Od ove osnovne suspenzije pripremljena je serija razređenja tako da je u poslednjoj epruveti serije broj

ćelija bio reda veličine 10^6 ćelija/ml (procena broja ćelija izvršena je Makfarlandovim nefelometrom).

Ispitivanje osetljivosti test mikroorganizama na referentne antimikrobne supstance

Ispitivanje osetljivosti test mikroorganizama na referentne antimikrobne supstance obavljeno je disk-difuzionom metodom [18], sa sledećim antibiogram diskovima ($\mu d = 6$ mm): Ketoconazole – koncentracije 100 μg /disc, Amphotericin-B – 100 units/disc, Nystatin – 100 units/disc, Penicilin – 10 units/disc, Ceftriaxone – 30 μg /disc, Imipenem – 10 μg /disc, Amoxicilin – 25 μg /disc i Amikacin – 30 μg /disc (Bioanalyse®).

Po 1 ml suspenzije sa brojem ćelija 10^7 i 10^6 ćelija/ml homogenizovan je sa 9 ml otopljene i na $45^\circ C$ ohlađene podloge (MHA za bakterijske kulture, a SDA za kvasce i plesni), koja je razlivena u Petri ploču. Nakon želiranja na podlogu su naneti antibiogram diskovi. Svako razređenje je urađeno u tri ponavljanja, a rezultati su očitani kao prečnik zone inhibicije rasta i izraženi kao srednja vrednost u milimetrima.

Ispitivanje antimikrobne aktivnosti kombuha napitaka

Po 1 ml suspenzija sa brojem ćelija 10^7 i 10^6 ćelija/ml homogenizovan je sa 9 ml otopljene i na $45^\circ C$ ohlađene podloge, koja je razlivena u Petri ploču. Nakon želiranja u podlozi su napravljeni "bunarčići" prečnika 9 mm, staklenom sterilnom cevčicom pomoću vakuum pumpe. U "bunarčiće" je mikropipetom naneto po 10 μl uzoraka. Petri ploče su inkubirane na $37^\circ C$ (bakterije), $28^\circ C$ (kvasci) i $22^\circ C$ (plesni). Prvo očitavanje zona inhibicije u slučaju kvasaca i bakterija je obavljeno nakon 24 h, a konačni su rezultati očitani nakon 48 h. U slučaju plesni očitavanje rezultata je obavljeno nakon 5 dana. Za svako razređenje urađeno je tri ponavljanja, a rezultati su izraženi kao srednja vrednost prečnika zone inhibicije rasta (u mm).

REZULTATI I DISKUSIJA

U cilju utvrđivanja osetljivosti u ovom istraživanju upotrebljenih sojeva bakterija, kvasaca i plesni urađeni

su antibiogram testovi sa referentnim antimikrobnim supstancama. U tabeli 1 prikazani su rezultati delovanja antibiotika – penicilina, ceftriaksona, imipenema, amoksisilina i amikacina – na sojeve bakterija koji su kao test mikroorganizmi upotrebljeni u ispitivanju antimikrobne aktivnosti kombuha napitaka.

Sedam ispitanih bakterijskih sojeva su ispoljili u različitoj meri osetljivost na upotrebljene antibiotike. Patogeni sojevi gram negativnih bakterija *Salmonella enteritidis* i *Escherichia coli* se na osnovu zone inhibicije oko diska (< 22 mm) mogu definisati kao rezistentni ili umereno osetljivi sojevi na upotrebljene antibiotike [19]. S druge strane, najveću osetljivost pokazali su gram pozitivne bakterije *Bacillus sp.* (sporogena bakterija) i *Sarcina lutea*.

Osetljivost upotrebljenih sojeva kvasaca i plesni na antimikotike ketokonazol, amfotericin-B i nistatin je različita (tabela 2). Najveću osetljivost su sojevi kvasaca i plesni ispoljili na polienski antibiotik nistatin koji je prvi izbor u terapiji površinskih mikoza.

Kultivacija čajne gljive na zaslađenom crnom čaju je trajala 8 dana nakon kojih dobijena kombuha željene kiselosti; ukupan sadržaj kiselina (izražen kao sirćetna kiselina) u ovom napitku bio je $3,55 \pm 0,03$ g/l. Rezultati ispitivanja antimikrobne aktivnosti kombuhe od crnog čaja i njoj odgovarajućih kontrolnih uzoraka prikazana je tabelom 3.

Kombuha od crnog čaja i rastvor sirćetne kiseline pokazali su najizraženiju antimikrobnu aktivnost. Stepent inhibitorynog delovanja ova dva uzorka je gotovo identičan na sve mikroorganizme iz tabele 3, osim na *Staphylococcus aureus* gde izostaje baktericidno delovanje rastvora sirćetne kiseline.

Ni jedan od uzoraka nije ispoljio bilo kakvo antimikrobno delovanje na *Sarcina lutea* uprkos osetljivosti ove bakterije na antibiotike kako su to pokazali antibiogram testovi.

Kombuha od crnog čaja i njoj odgovarajući kontrolni uzorci nisu delovali na mikroorganizme sa eukariotskim tipom ćelija – kvasce *Rhodotorula sp.*, *Candida pseudotropicalis*, *Saccharomyces cerevisiae*, i plesni *As-*

Tabela 1. Dejstvo antibiotika (izraženo kao $x_{sr} \pm sd$)
Table 1. Antibiotics effect (expressed as $x_{sr} \pm sd$)

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

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

Tabela 2. Dejstvo antimikotika (izraženo kao x_{sr})Table 2. Antifungal effect (expressed as x_{sr})

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

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

Tabela 3. Antimikrobno delovanje kombuhe od crnog čaja (izraženo kao $x_{sr} \pm sd$)

Table 3. Antimicrobial activity of kombucha obtained from black tea (mean ± sd)

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

A – mikrobicidno delovanje; B – mikrobiostatsko delovanje; ø – nema delovanja; +/- – granična antimikrobna aktivnost (zona inhibicije nije veća od 9 mm)

pergillus niger i *Aspergillus flavus*. *Penicillium aurantiogriseum* je jedini od ispitanih eukariota na koji su kombuha i rastvor sirćetne kiseline delovali ispoljavajući minimalnu inhibitornu aktivnost.

Neutralisana kombuha od crnog čaja pokazuje bakteriostatsko delovanje na *Salmonella enteritidis* i *Proteus mirabilis*, i baktericidno delovanje na *Bacillus sp.*, dok rastvor "model sistema" pokazuje bakteriostatsko

delovanje na *Salmonella enteritidis* i *Pseudomonas aeruginosa*.

I kod kombuhe od rtanjskog čaja (ukupne kiselosti od 3,94 ± 0,03 g/l) postoji gotovo identično delovanje kombuhe i rastvora sirćetne kiseline na bakterije i plesni *Penicillium aurantiogriseum* i *Aspergillus flavus* (tabela 4). Izostaje njihovo delovanje na bakteriju *Sarcina lutea* i plesan *Aspergillus niger*, na koje delovanje nisu pokazali ni rastvori ostalih kontrolnih uzoraka.

Tabela 4. Antimikrobno delovanje kombuhe od rtanjskog čaja (izraženo kao $x_{sr} \pm sd$)

Table 4. Antimicrobial activity of kombucha obtained from winter savory (mean ± sd)

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

Rastvor neutralisane kombuhe i "model sistema" pokazuju bakteriostatsko delovanje samo na *Salmonella enteritidis*. S obzirom da je slično delovanje neutralisane kombuhe i "model sistema" zapaženo i kod kombuhe od crnog čaja može se naslutiti da nosioci antimikrobne aktivnosti kombuhe nisu samo organske kiseline (pre svih sirćetna kiselina).

Kombuhe od rtanjskog i crnog čaja i njima odgovarajući kontrolni uzorci nisu delovali na ispitane vrste kvasaca. Ovakav rezultat je objašnjiv činjenicom da su kvasci generalno acidofilni mikroorganizmi, a neki od njih, poput *Saccharomyces cerevisiae*, simbionti u čajnoj gljivi.

Crni i rtanjski čaj (c = 5 g/l) su u ovom istraživanju delovali minimalno bakteriostatski samo na *Pseudomonas aeruginosa*. Istraživanja su pokazala da crni čaj u koncentracijama koje prevazilaze konzumne pokazuje antimikrobno delovanje prema nekim patogenim mikroorganizmima. Tako crni čaj u koncentraciji od 20 % (kao suvi čaj) inhibira *Staphylococcus aureus*, *Staph. epidermidis*, *Salmonella typhi*, *Salm. typhimurium*, *Salm. enteritidis*, *Shigella flexneri*, *Shig. dysenteriae*, *Vibrio sp.*, *Campilobacter sp.* i *Helicobacter pylori* [14]. Baktericidna aktivnost čaja objašnjava se delovanjem polifenola, posebno katehina. Katehinska frakcija crnog čaja u količini od 0,4 mg/ml deluje na uzročnika karijesa *Streptococcus mutans*.

U nama dostupnoj literaturi nema podataka o delovanju vodenog ekstrakta rtanjskog čaja na rast i razmnožavanje mikroorganizama. Poznato je da etanolni ekstrakt (1:1) uzorka vrste *Satureja montana ssp. montana* antimikrobno deluje na više vrsta bakterija i kvasaca [10].

Upoređujući iznete rezultate ispitivanja antimikrobne aktivnosti kombuhe od rtanjskog i crnog čaja sa rezultatima drugih autora koji su istraživali antimikrobna svojstva kombuhe [12, 14] može se konstatovati da uzorci ispoljavaju inhibirajuće delovanje na iste mikroorganizme (*Salmonella enteritidis*, *Echerichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* i *Bacillus sp.*). Upotreba znatno kiseliije kombuhe u dva citirana rada je razlog što su za iste mikroorganizme dobijene veće zone inhibicije, srazmerno koncentraciji sirćetne kiseline.

ZAKLJUČAK

Kombuhe od crnog i rtanjskog čaja pokazale su gotovo identično antimikrobno delovanje na ispitane bakterije. Na osnovu podataka o antimikrobnom delovanju kombuha i njima odgovarajućih kontrolnih uzoraka zaključuje se da je nosilac antimikrobne aktivnosti kombuhe prevashodno sirćetna kiselina.

Kombuhe nisu delovale niti na jedan od sojeva kvasaca – *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida pseudotropicalis*, *Rhodotorula sp.*, a pokazale su graničnu inhi-

bitornu aktivnost na *Penicillium aurantiogriseum*. Kombuha od rtanjskog čaja delovala je minimalno i na *Aspergillus flavus*.

LITERATURA

- [1] Frank G., Kombucha, Health Beverage and natural remedy from the Far East. Steyr., House Ennsthaler, **29** (1994).
- [2] Blanc P., Characterization of the tea fungus metabolites, Biotechnol. Lett., **18** (2) (1996) 139–142.
- [3] Mayser P., Fromme S., Leitzmann C., Gruender K., The yeast spectrum of tea fungus Kombucha, Mycoses **38** (7–8) (1995) 289–295.
- [4] Liu, C.-H., S.-H. Hsu, F.-L. Lee, and C.-C. Liao, The isolation and identification of microbes from a fermented tea beverage, Haipao, and their interactions during Haipao fermentation, Food Microbiol., **13** (1996) 407–415.
- [5] Greenwalt C.J., Steinkraus K.H., Ledford R.A., Kombucha, the Fermented Tea: Microbiology, Composition and Claimed Health Effects, Journal of Food Protection, **63**, 7 (2000) 976–981.
- [6] Reiss, J., Der Teepilz und seine Stoffwechselproducte. Deutsche Lebensmittel Rundschau, **9** (1994) 286–290.
- [7] Petrović S., Lončar E., Content of water-soluble vitamins in fermentative liquids of tea fungus, Mikrobiologija, **33**(2) (1996) 101–106.
- [8] Cvetković, D., Čanadanović–Brunet J., Markov S., Cultivation of kombucha on sweetened echinacea tea, 1st FEMS Congress, Ljubljana, 108 (2003) (R=72)
- [9] Cvetković D., Metabolička aktivnost čajne gljive na različitim supstratima, Magistarski rad, Tehnološki fakultet, Novi Sad (2003).
- [10] Pepelnjak S., Stanić G., Potočki P., Antimicrobial activity of the ethanol extract of *Satureja montana ssp. montana*, Acta Pharm. **49** (1999) 65–69.
- [11] Jančić R., Stošić D., Mimica Đukić N., Lakušić B., Aromatične biljke Srbije, Dečje novine, Beograd–Gornji Milanovac (1995).
- [12] Guttapadu S., Zhu Y., Knol W., Kombucha fermentation and its antimicrobial activity, Journal of Agricultural and Food Chemistry, Vol. **48**, (6) (2000) 2589–2594.
- [13] Steinkraus K.H., Shapiro K.B., Hotchkiss J.H., Mortlock R.P., Investigations into the Antibiotic Activity of Tea Fungus/Kombucha Beverage, Acta Biotechnologica **16** (1996) 199–205.
- [14] Greenwalt, C.J., Ledford, R.A., Steinkraus K.H., Determination and characterization of the anti-microbial activity of the fermented tea Kombucha, Lebensm.-Wiss. Technol. **31** (1998) 291–296
- [15] Stojanović M., Janković I., Gajenje čajne gljive-kombuhe, IGP SANBA (1996) Beograd.
- [16] Janković I., Određivanje međusobnih odnosa mikrobnih asocijacija i biohemijskih karakteristika čajne gljive, Magistarski rad, Poljoprivredni fakultet, Beograd (1995).
- [17] OIV, Recueil des methods internationales d'analyse des vins et des mots, OIV, Paris, (1990) 155–162.
- [18] Kavanagh F., Analytical Microbiology, Academic Press, New York and London (1963).
- [19] Suvajdzic Lj., Priručnik iz mikrobiologije sa vežbama za studente farmacije, Ortomedics, Novi Sad (2004).

SUMMARY

ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF KOMBUCHA MADE FROM RTANJ TEA

(Scientific paper)

Dragoljub Cvetković, Siniša Markov, Aleksandra Velićanski
Faculty of Technology, Novi Sad

Kombucha is a beverage with special therapeutic properties produced by the metabolic activity of yeasts and acetic acid bacteria in sweetened black tea (traditional cultivation medium). The antimicrobial activity of kombucha (for consumption) made from black tea and rtanj tea, as well as particular control samples, was examined by the modified disc diffusion method. *Salmonella enteritidis*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus sp.*, *Sarcina lutea*, *Penicillium aurantiogriseum*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Rhodotorula sp.*, *Candida pseudotropicalis* and *Saccharomyces cerevisiae* have been used as test organisms. Acetic acid and kombucha samples show significant antimicrobial activity against all bacteria except *Sarcina lutea*. The other control samples (neutralized kombucha, tea and a "model sistem") show less bacteriostatic activity. Kombucha and acetic acid solution show borderline inhibitory activity against some moulds, while was no activity against yeasts.

Key words: Kombucha • Tea fungus • Winter savory • Antimicrobial activity •

Ključne reči: Kombucha • Čajna gljiva • Rtanjski čaj • Antimikrobna aktivnost •