

Uticaj promenjenih uslova pripreme supstrata *Cembuya orientalis* na sastav fermentisanog napitka

Cembuya orientalis ili čajna gljiva je simbioza četiri vrste bakterija i dve vrste kvasaca, čiji se fermentisani napitak u narodnoj medicini koristi kao lek i preventivno sredstvo protiv velikog broja oboljenja. Ovaj rad je nastavak istraživanja započetih 1994. godine. Obuhvatio je ispitivanje uticaja pojedinih sastojaka supstrata (čaj, sirće, šećer) na vrenje koje se u njemu vrši. Hemijskom i mikrobiološkom analizom utvrđeno je da nedostatak bilo kog od tih sastojaka bitno utiče na proces vrenja. Takođe dolazi i do promene hemijskog sastava preparata koji fermentacijom nastaje od supstrata. Ispitivano je baktericidno dejstvo preparata i smeše supstanci i poređeno sa zonama inhibicije antibiotika.

Uvod

Cilj rada bio je da se upotpune saznanja o čajnoj gljivi dobijena tokom istraživanja urađenih 1994. godine. Istraživanje je obuhvatilo 4 uzorka. Prvi je bio pripremljen standardno (u 1 dm³ ruskog čaja dodato je 150 g šećera, 8 ml alkoholnog sirćeta (11%), 100 cm³ već fermentisanog napitka i želatinozna masa koja se kao jedan od produkata metabolizma simbioze stvara na vrhu). Uzorak br. 2 bio je pripremljen tako što je ruski čaj zamenjen vodom; uzorak br. 3 – bez dodatka sirćeta, a uzorak br. 4 – bez dodatka šećera. U okviru hemijskih analiza kvantitativno su određivani: CO₂, redukujući i neredukujući šećeri, sirćetna kiselina tanini, etanol, ukupni proteini, i mikroelementi Na, K i Fe.

Ispitivano je baktericidno dejstvo preparata na tri soja bakterija: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* i *Pseudomonas aeruginosa* i upoređeno sa dejstvom smeše onih supstanci (sirćetna kiselina, etanol, glukoza i saharoza) koje su identifikovane 1994. godine u istim količinama kao u kombuhi. Baktericidno dejstvo preparata i smeše supstanci upoređeno je, takođe, i sa dejstvom antibiotika: streptomycin, chloramphenicol i gentamicin.

Marija Sajić (1976),
Ljig, 7. juli, lamela 2/7,
učenica 4. razreda Gimnazije „Branislav Petronijević” u Ljigu

Vladimir Pavlović
(1976), Pančevo,
Moravska 4/11, učenik
4. razreda Gimnazije
„Uroš Predić” u
Pančevu

Zasejavanjem preparata na hranjive podloge urađena je identifikacija bakterija i kvasaca koji čine simbiozu.

Urađen je mikrobiološki pregled preparata.

Metode

Ugljen dioksid je određivan sledećom metodom. Zagrevanjem uzorka (20 minuta na vodenom kupatilu $T = 80^{\circ}\text{C}$) došlo je do isparavanja CO_2 i vode. Količina CO_2 može se odrediti na osnovu mase uzorka pre i posle zagrevanja. Voda koja je isparila apsorbirana je na koloni punjenoj sumpornom kiselinom kako ne bi uticala na promenu mase [1].

Redukujući i neredukujući šećeri su taložno-volumetrijskom metodom permanganometrijski [1]. Sirćetna kiselina određena je gasnom hromatografijom. Etil ester sirćetne kiseline ima nižu tačku ključanja od sirćetne kiseline, pa je ona esterizovana u etanolu koji je sadržao 1% H_2SO_4 . Analiza je rađena pod sledećim uslovima:

- inicijalna temperatura: 60°C
- inicijalno vreme: 0 minuta
- temperaturni režim: $5^{\circ}\text{C}/\text{min}$.
- finalna temperatura: 200°C
- finalno vreme: 3 minuta
- temperatura injektora: 200°C
- temperatura detektora (FID): 200°C
- kolona: Crosslinked Methyl Silicone Gum $25\text{ m} \times 0.32\ \mu\text{m}$
Film Thickness U. S. Patent No = 4.293.415
- gasovi: H_2 , N_2 , vazduh
- količine injektiranih uzoraka: $3\ \mu\text{l}$

Tanini su određivani gravimetrijski [2]. Ukupni proteini su određivani standardnom biuretskom metodom [4]. Mikroelementi natrijum i kalijum određivani su plamenofotometrijski, a gvožđe atomskom apsorpcionom spektrofotometrijom [5]. pH vrednosti određivane su potenciometrijski osmog dana vrenja.

Baktericidnost je ispitivana tako što su Müller-Hinton-ove podloge zasejane bakterijskim sojevima. Na podloge su postavljeni filter-diskovi koji su prethodno natopljeni preparatima ili smešom supstanci, kao i antibiogram tablete. Poređene su zone inhibicije koje su merena nakon 24 časa.

Identifikacija je rađena zasejavanjem preparata na Saburo-maltozni agar (za kvasce) i pravljenjem mikroskopskih preparata (bojenje po Giemsa-i). Takvi preparati pravljeni su i od fermetisanog napitka kombuhe, a pri tome su bojeni po Giemsa-i i kristal-violetom (za bakterije).

Rezultati

Organoleptički pregled. Uzorak zasejan standardnom metodom, **uzorak broj 1**, imao je sve odlike karakteristične za kombuhu: bistar, sa приметnim mehurićima gasa, narandžaste boje, reskog mirisa i ukusa mladog vina. **Uzorak broj 2** – bleđožute boje, blago zamućen, reskog slatkog mirisa i slatkog ukusa. **Uzorak broj 3** – tamnomrke boje, slatkastog mirisa sa crnom skramom na površini i gotovo bez ukusa. **Uzorak broj 4** – blago zamućen, tamnonarandžaste boje, mirisa koji podseća na pivo i ukusa mladog vina.

Rezultati hemijskih analiza dati su u tabeli 1.

Tabela 1. Rezultati hemijskih analiza

	CO ₂ [%]	reduk. šećerj [g/dm ³]	nered. šećerj [g/dm ³]	CH ₃ COOH [g/dm ³]	ukupni proteini [g/dm ³]	etanol [%]	tanini [g/dm ³]	Na [mg/dm ³]	K [mg/dm ³]	Fe [mg/dm ³]	pH
1	0.2	44.1	21.5	6.5	39.1	7.02	1.84	11.6	16.4	0.20	2.91
2	0.1	32.2	15.5	0.0	2.9	4.14	0.00	64.5	11.0	0.25	4.11
3	0.1	17.9	51.7	0.0	14.2	3.34	1.55	84.3	130.5	0.20	6.79
4	0.1	0.7	0.5	0.0	17.2	4.49	1.76	77.0	112.7	0.14	3.71

Rezultati ispitivanja baktericidnosti, odnosno prečnici zona inhibicije, dati su u tabelama 2-4. Treba napomenuti da uzorak broj 5 predstavlja smešu supstanci CH₃COOH, etanola, glukoze i saharoze u onom odnosu koji je utvrđen u standardnom preparatu kombuhe.

Tabela 2. Prečnici zona inhibicije antibiotika i uzoraka na soj *Pseudomonas aeruginosa*

Uzorak	Prečnik zone inhibicije [mm]			Uzorak
	Hloramfenikol	Streptomicin	Gentamicin	
1	3	0	0	7
1	3	0	0	7
2	3	0	0	4
2	2	0	0	4
3	1	0	0	4
3	1	0	0	4
4	2	0	0	5
4	2	0	0	5
5	3	0	0	4
5	3	0	0	4

Tabela 3. Prečnici zona inhibicije antibiotika i uzoraka na soj *Staphylococcus aureus*

Uzorak	Prečnik zone inhibicije [mm]			Uzorak
	Hloramfenikol	Streptomycin	Gentamicin	
1	12	17	10	0
1	13	20	18	0
2	12	18	12	0
2	13	19	11	0
3	15	17	13	0
3	15	18	13	0
4	15	18	14	0
4	15	20	15	0
5	15	18	14	0
5	15	20	14	0

Tabela 4. Prečnici zona inhibicije antibiotika i uzoraka na soj *Escherichia Coli*

Uzorak	Prečnik zone inhibicije [mm]			Uzorak
	Hloramfenikol	Streptomycin	Gentamicin	
1	5	10	1	0
1	5	12	1	0
2	6	10	2	0
2	7	10	0	0
3	6	10	0	0
3	6	10	0	0
4	5	15	2	0
4	6	13	1	0
5	3	11	0	0
5	3	11	0	0

Opis mikroskopskih preparata

I Mikroskopski preparat kvasaca dobijen zasejavanjem preparata kombuhe Saburo-maltozni agra (bojen po Giemsa-i). Razlikuju se dve grupe kvasaca. Za jednu grupu je karakteristično potpuno obojenje citoplazme i ovalan oblik, dok drugu grupu odlikuje izdužen oblik i obojeno jedro. Obe grupe kvasaca nalaze se u kolonijama od 15 do 20 ćelija i ravnomerno su raspoređeni po preparatima. Veći broj je u fazi pupljenja.

Svi preparati daju jednake, gusto raspoređene kolonije, bledožućkaste boje na Saburo podlozi.

II Preparat pravljen direktno iz standardnog uzorka. Kvasci su dosta ređi nego u prethodnom preparatu. Bojenjem kristal-violetom mogu se primetiti i bakterije, neravno raspoređene, u obliku koka i streptokoka. Identifikacija nije izvršena.

III Preparat napravljen iz uzorka broj 2. Čelije kvasaca su raspoređene neravnomerno, a po obliku su veoma slične ćelijama prethodnog preparata. Kolonije se sastoje od 15 do 30 ćelija u fazi popljenja. Bakterije su primetne, ali veoma retke streptokoke.

IV Preparat napravljen iz uzorka broj 3. Čelije kvasaca ravnomerno su raspoređene, ali u malom broju (od 3 do 6). Bakterije su neravnomerno raspoređene streptokoke.

V Preparat napravljen iz uzorka broj 4. Obe forme kvasaca su vidljive i grupisane su u veće kolonije. Streptokoke su veoma česte.

Diskusija i zaključak

Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da uklanjanje bilo kog od sastojaka supstrata utiče na proces vrenja. Tako svi uzorci (sem uzorka broj 1) pokazuju smanjenu količinu karakterističnih produkata kombuhe (etanol, ugljen dioksid, sirćetna kiselina). Kod uzorka broj 2 najočljivija je mala količina ukupnih proteina i kalijuma. Uzorak broj 3 ima veliku količinu kalijuma, a malu količinu etanola, dok u uzorku broj 4 nema ekstremnih vrednosti izuzev odsustva sirćetne kiseline. Za očekivati bi bilo da taj uzorak ima nizak sadržaj produkata metabolizma. Sa druge strane, u uzorku broj 3 gotovo da nema promene pH vrednosti i pored velike količine šećera od koga nastajuprodukti metabolizma. Dobijeni rezultati mogli bi se objasniti različitim uticajem promenjenog sastava supstrata na članove simbioze.

Postoji mogućnost da jedan od članova simbioze tokom razvoja stvara sirćetnu kiselinu, a drugi je koristi (redukuje do etanola) za ostvarivanje svojih životnih procesa. Svako pomeranje ravnoteže uslovljava, u ovom slučaju, promenu koncentracije etanola ili sirćetne kiseline.

Baktericidno dejstvo preparata na sojeve *Escherichia coli* i *Staphylococcus aeruginosa* potpuno je izostalo. Preparat kombuhe na soj *Pseudomonas aeruginosa* ima jače dejstvo od antibiotika (*Chloramphenicola*, *Gentamicina* i *Streptomicina*). Podaci dobijeni analizom antibiograma ukazuju da u preparatu kombuhe, sem sirćetne kiseline (jedina antibakterijska supstanca u smeši), postoji još neka supstanca sa antibakterijskim dejstvom. Ovo je zaključeno na osnovu toga što uzorci broj 2, 3 i 4, premda ne sadrže sirćetnu kiselinu pokazuju izvesno baktericidno dejstvo. Mikroskopskim pregledom preparata potvrđeno je da postoje dve različite

vrste kvasaca (na osnovu razlike u bojenju ćelija), a svakako i prisustvo određenih sojeva bakterija.

Buduća istraživanja trebalo bi usmeriti u pravcu ispitivanja međusobnih odnosa organizama u simbiozi.

Literatura

- [1] Baras J. et al. 1986. *Analiza životnih namirnica*. Beograd: Savremena administracija.
- [2] Lukić P. 1979. *Farmakognozija*. Beograd: Farmaceutski fakultet univerziteta u Beogradu.
- [3] ***. 1972. *Praktikum iz organske hemije*. Beograd: Naučna knjiga
- [4] Majkić Singh N. 1989. *Praktikum iz medicinske biohemije*. Beograd: Naučna knjiga.
- [5] Mišović J., Ast T. 1989. *Instrumentalne metode hemijske analize*. Beograd: Naučna knjiga.
- [6] Savić Z. 1984. *Opšta mikrobiologija*. Beograd: Naučna knjiga.
- [7] Marković B. 1987. *Praktikum iz mikrobiologije*. Beograd: Zavod za udžbenike i nastavna sredstva.
- [8] Marković B. 1986. *Mikrobiologija sa parazitologijom*. Beograd: Zavod za udžbenike i nastavna sredstva.

Marija Sajić, Vladimir Pavlović

Influence of variable conditions of *Cembuya orientalis* substrate preparation on fermented liquid composition

Cembuya orientalis or tea fungus is actually symbiosis of four species of bacteria and two species of yeast. Fermented liquid that originates from this fungus is used, in traditional medicine, as a cure and preventive remedy against large number of diseases.

This research is addition to the paper made in 1994. It included the examination of the influence of some substances (tea, sugar, vinegar) on fermentation. By chemical and microbiological analyses it was found that missing of any of those substances had great influence on fermentation process as well as on chemical composition of fermented liquid. Antibacteriological influence of liquid and mixture of substances (in the quantities that were found in previous exploration) was examined, and compared with areas of inhibition of some commercial antibiotics.

