

## Ispitivanje sadržaja flavonoidnih i fenolnih komponenti tokom fermentacije kombuha čaja (*Cembuya orientalis*)

---

U radu je ispitivan i međusobno poređen sadržaj fenolnih i flavonoidnih komponenti u zelenom, crnom i belom čaju, kao različitim medijumima, tokom fermentacije čajne gljive kombuhe. Rezultati su pokazali da sva tri čaja sadrže ove komponente. Koncentracije fenola u uzorcima zelenog, crnog i belog čaja su redom iznosile:  $(0.065 \pm 0.004)$ ,  $(0.032 \pm 0.001)$  i  $(0.059 \pm 0.003)$  mg/mL, dok su koncentracije flavonoida istim redom iznosile  $(0.59 \pm 0.02)$ ,  $(0.32 \pm 0.03)$  i  $(0.47 \pm 0.01)$  mg/mL. Utvrđeno je da statistički značajna razlika u koncentracijama fenola i flavonoida, postoji između zelenog i crnog čaja (u korist zelenog), kao i između belog i crnog čaja (u korist belog). Najveća koncentracija teaflavina je skoncentrisana u belom čaju  $(0.113 \pm 0.009)$ , dok je u crnom čaju detektovana najveća koncentracija tearubigina  $(2.44 \pm 0.03)$ . Pokazano je da su se zeleni i beli čaj pokazali kao najbolji medijumi sa najvećim koncentracijama ovih antioksidantnih komponenti, za koje je dokazano protektivno dejstvo kod različitih vrsta kancera, i ta činjenica ukazuje na široku mogućnost njihove primene.

---

### Uvod

Kombuha je japanska čajna pečurka sastavljena od želatoidne membrane u obliku diska. Za vreme procesa fermentacije, ona deluje različitim kompleksnim reakcijama i stvara mlečnu i glukuronsku kiselinu, vitamine C i B, aminokiseline i antibiotičke sastojke koji joj daju lekovito svojstvo, blagotvorno za čovečiji organizam. Kombuha je poznata i pod nazivom čajna gljiva. Potrebno je razjasniti da ne

predstavlja gljivu u pravom smislu te reči, nego simbiozu različitih vrsta bakterija sirćetnog vrenja (*Acetobacter xylinum*, *Acetobacter aceti*, *Gluconobacter oxidans*) i autohtonih vrsta kvasaca (*Saccharomyces cerevisiae*, *Zygosaccharomyces bailii*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Candida stellata*, *Torulasporea delbrueckii*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Bretanomyces bruzzellensis*). (Markov *et al* 2003.) Sam napitak nastaje fermentacijom čaja (*Camelia sinensis* L. (*Thea sinensis*) zaslađenog saharozom u najvećem broju slučajeva, mada se kao izvor ugljenika može primeniti i neki drugi šećer. Dokazano je prisustvo vitamina (B1, B2, B6, B12, C), enzima (invertaza, amilaza, katalaza) i komponenti ekstrahovanih iz crnog čaja (katehini, teaflavini, flavonoli). Teaflavini i tearubigini predstavljaju derivate polifenola prisutne u crnom čaju za koje je dokazano protektivno dejstvo ovih polifenolnih jedinjenja kod različitih vrsta kancera. (Stoner i Mukhtar 1995; Yang *et al.* 2002.; Yang *et al.* 2001; Yang i Wang 1993; Mattila *et al.* 2004)

Cilj ovog rada je određivanje koncentracija flavonoidnih i fenolnih (teaflavina i tearubigina) komponenti tokom fermentacije čajne gljive kombuhe, kao i njihovo poređenje u različitim medijumima (crni, zeleni i beli čaj) u kojima je gljiva gajena.

### Materijal i metode

Medijumi u kojima je kombuha gajena su bili zeleni, crni i beli čaj koji pripadaju biljki *Camellia sinensis* (*Thea sinensis*).

**Priprema kombuha čaja.** 1.2% čaja je dodato u 1 L vrele vode, gde je nakon 5 min. ključanja sadržaj proceden kroz sterilnu gazu. Nakon toga, 10% rastvor saharoze pomešan je sa toplim čajem i tako dobijena smeša je ostavljena da se hladi. Sadržaj je sipan u tegle koje su prethodno sterilisane 60 min. na 100°C. U ohlađene čajeve su stavljene gljive, a tegle

---

Anka Jevremović (1993), Trg Bratstva i jedinstva 1, učenica 4. razreda gimnazije Srednje škole „Sveti Ahilije” u Arilju

MENTOR: Aleksandar Đurić, student Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu

su pažljivo poklopljene sterilnim gazama. Proces fermentacije se odvijao na tamnom mestu inkubirajući se 11 dana.

Prekidom procesa fermentacije, sadržaj je proceđen i centrifugiran 30 min. na 3000 obrtaja.

**Kvantifikacija fenola.** Kvantifikacija fenola je vršena spektrofotometrijski. Kao standard je korišćena galna kiselina u opsegu koncentracija od 1 do 0.0625 mg/mL. U 125  $\mu$ L ekstrakta je dodato 0.5 mL destilovane vode, nakon čega je smeša dodato 125  $\mu$ L Folin-Čikolte (Folin-Ciocalteu) reagensa (FCR), nakon čega je smeša inkubirana u mraku 6 minuta. Zatim je dodato 1.25 mL 7% natrijum karbonata. Da bi se dobila zapremina od 3 mL dodato je još 1 mL destilovane vode. Cela reakciona smeša je zatim inkubirana u mraku, na sobnoj temperaturi 90 minuta. Nakon toga svaki uzorak je razblažen 10 puta i rađeno je po pet ponavljanja za svaki. Za slepu probu je korišćena destilovana voda umesto odgovarajuće zapremine uzorka. Apsorbanca je merena na 760 nm (Määttä-Riihinen *et al.* 2004).

**Kvantifikacija flavonoida.** Kvantifikacija flavonoida je vršena spektrofotometrijski. Kao standard je korišćen kvercetin u opsegu koncentracija od 1 do 0.0625 mg/mL. 250  $\mu$ L ekstrakta je razblaženo sa 1250  $\mu$ L destilovane vode. Zatim je dodato 75  $\mu$ L 5% rastvora NaNO<sub>2</sub>, nakon čega je smeša inkubirana 6 minuta na sobnoj temperaturi. Redom je dalje dodavano 150  $\mu$ L 10% rastvora AlCl<sub>3</sub> × 6H<sub>2</sub>O, 500  $\mu$ L 1M NaOH i 275  $\mu$ L destilovane vode. Za svaki uzorak je rađeno po pet ponavljanja. Za slepu probu korišćena je destilovana voda. Apsorbance su merene na 510 nm. (Määttä-Riihinen *et al.* 2004).

**Određivanje teaflavina (TF) i tearubigina (TR).** 25 mL fermentisanog čaja je ekstrahovano sa 25 mL izobutil metil ketona (IBMK) na sobnoj temperaturi. Nakon faze separacije (koja je vršena u levku za odvajanje), 1 mL IBMK-a je izmikovano sa 9 mL 45% etanola i apsorbancija je merena na 380 nm (A), a vodena faza je ostavljena za određivanje tearubigina. Nakon toga, 10 mL IBMK faze je ekstrahovano sa 10 mL 2.5% dinatrijum hidrogen fosfata. Posle ekstrakcije i separacije faza, 1 mL IBMK-a je izmikovano sa 9 mL 45% etanola i apsorbancija je merena na 380 nm (B).

10 mL vodene faze iz prvog koraka je ekstrahovano sa 10 mL n-butanola. Posle separacije faza, 1 mL sloja n-butanola je izmikovano sa 9 mL 45% etanola i apsorbancija je merena na 380 nm (C). Neposredno pred određivanje TF-a i TR-a, uzorci su

centrifugirani 30 min. na 3000 obrtaja. Proces je ponavljen tri puta za svaki čaj, dok je za svaku fazu odrađeno po pet ponavljanja. Koncentracije TF-a i TR-a su preračunate na osnovu vrednosti apsorbanci dobijenih za faze A, B i C pomoću formula (Jaya-balan *et al.* 2007):

$$TF (\%) = 4.313 \times B \quad (1)$$

$$TR (\%) = 13.643 \times (A + C - B) \quad (2)$$

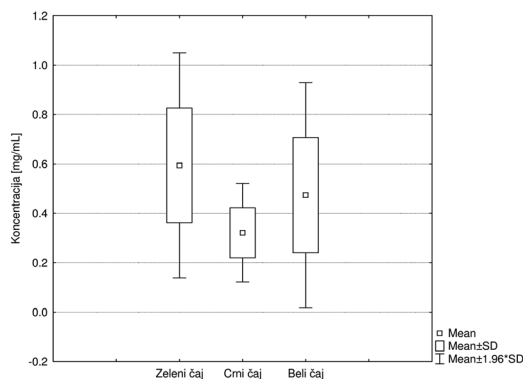
**Statistička obrada.** Podaci su obrađeni analizom varijanse.

## Rezultati i diskusija

Koncentracije fenola i flavonoida su izračunate na osnovu prethodno napravljenih standardnih pravi, dok su koncentracije teaflavina i tearubigina izračunate na osnovu formula (1) i (2).

Koncentracije fenola u uzorcima zelenog, crnog i belog čaja su iznosile (0.065 ± 0.004), (0.032 ± 0.001) i (0.059 ± 0.003) mg/mL, respektivno, dok su koncentracije flavonoida istim redom iznosile (0.59 ± 0.02), (0.32 ± 0.03) i (0.47 ± 0.01) mg/mL.

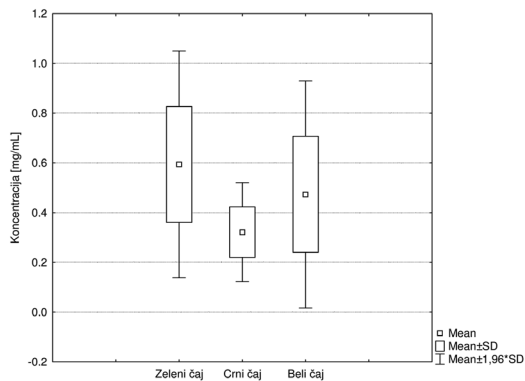
Statistički značajna razlika, u koncentracijama fenola, prisutna je između koncentracija zelenog i crnog čaja, pri čemu je razlika u korist zelenog čaja (p < 0.001), kao i između koncentracija crnog i belog čaja, u korist belog čaja (p < 0.001) (slika 1).



Slika 1. Koncentracije fenola u uzorcima čaja

Figure 1. Concentrations of phenols in tea samples

Kod koncentracija flavonoida, statistički značajna razlika je prisutna između zelenog i crnog čaja, u korist zelenog ( $p < 0.001$ ), kao i između crnog i belog čaja, u korist belog čaja, ( $p < 0.005$ ) (slika 2).



Slika 2. Koncentracije flavonoida u uzorcima čaja

Figure 2. Concentrations of flavonoids in tea samples

Procentne koncentracije teaflavina u uzorcima zelenog, crnog i belog čaja su redom iznosile: ( $0.068 \pm 0.006$ ), ( $0.093 \pm 0.001$ ) i ( $0.113 \pm 0.009$ ), dok su koncentracije tearubigina istim redom iznosile: ( $1.08 \pm 0.02$ ), ( $2.44 \pm 0.03$ ) i ( $1.68 \pm 0.03$ ).

Što se tiče teaflavina, najveća koncentracija je detektovana u belom čaju, najniža je zabeležena u zelenom čaju, dok je najveća koncentracija tearubigina skoncentrisana u crnom čaju, a najniža takođe u zelenom. Kako teaflavini i tearubigini pripadaju grupi antioksidantnih polifenola, njihova koncentracija u datim čajevima upućuje na antioksidantnu aktivnost koju ostvaruju. Dobijena koncentracija teaflavina u zelenom čaju pokazuje da se oni stvaraju u toku fermentacije čajne gljive kombuhe u ovom medijumu, jer ih inače u običnom zelenom čaju nema.

## Zaključak

Sva tri čaja sadrže flavonoide i fenole, kao i teaflavine i tearubigine. Za crni čaj je već dokazano da sadrži u većim koncentracijama TF-e i TR-e, dok ih čist zeleni čaj ne sadrži, sa čim je upoređen i ekspe-

rimentalno dobijeni podatak. Dobijeno je da fermentisani zeleni čaj sadrži TF-e i TR-e, čiji je sadržaj određen procentnim koncentracijama, dok je crni čaj detektovan sa najmanjom koncentracijom flavonoida i fenola tokom fermentacije, u odnosu na zeleni i beli. U belom čaju, koji je nedovoljno istražen na ovom polju, utvrđene su solidne koncentracije ovih flavonoidnih i fenolnih jedinjenja približne crnom čaju, sa kojim se pretpostavlja da ima više sličnosti nego sa zelenim. U nedostatku literarnih podataka bliža poređenja nisu moguća, za šta su potrebna detaljnija istraživanja.

**Zahvalnost.** Zahvaljujem se Milošu Rokiću, diplomiranom biohemičaru, na stručnoj pomoći, kao i Vedrani Savić i Aleksandru Đuriću, studentima Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, na pomoći u toku izrade eksperimentalnog dela projekta.

## Literatura

- Jayabalan R., Marimuthu S., Swaminathan K. 2007. Changes in content of organic acids and tea polyphenols during kombucha tea fermentation. *Food Chemistry*, **102**: 392.
- Määttä-Riihinen K. R., Kamal-Eldin A. Törrönen A. R. 2004. Identification and quantification of phenolic compounds in berries of *Fragaria* and *Rubus* species (Family Rosaceae). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **52**: 6178.
- Markov S. L., Jerinić V. M., Lončar E., Malbaša R. 2003. Kobuha – funkcionalni napitak: sastav, karakteristike i proces biotransformacije. Pregledni rad. *Hemijska industrija*, **57** (10): 456.
- Mattila P. H., Gonzales-Paramas, A.M., Törrönen, A.R. 2004. Distribution and content of phenolic compounds in eighteen scandinavian berry species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **52**: 4477.
- Stoner D. G., Mukhtar H. 1995. Polyphenols as cancer chemopreventive agents. *Journal of Cellular Biochemistry*, **22**: 169-180.
- Yang S. C., Maliakal P., Meng X. 2002. Inhibition of carcinogenesis by tea. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, **42**: 25.
- Yang S. C., Prabhu S., Landau J. 2001. Prevention of carcinogenesis by tea polyphenols. *Drug Metabolism Reviews*, **33** (3): 237.

Yang S. C., Wang Z. 1993. Tea and cancer. *Journal of National Cancer Institute*, **85** (13): 1038-1049.

Yavari N., Assadi M. M., Larijani K., Moghadam M. B. 2010. Response Surface Methodology for Optimization of Glucuronic Acid Production Using Kombucha Layer on Sour Cherry Juice. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, **8**: 3250.

---

Anka Jevremović

### Testing the Content of Flavonoid and Phenolic Components During the Fermentation of Kombucha Tea (*Cembuya orientalis*)

The mushroom kombucha (symbiotic culture of binary yeasts) is a jelly-like membrane that floats in a nutrient solution of tea and sugar exposed to oxygen. Epidemiological studies suggest a protective effect of tea consumption on human cancer. Polyphenolic compounds present in tea are capable of protecting against cancer. Theaflavin and thearubigins are polyphenolic derivatives present in black tea. The protective effects of tea polyphenolic compounds against various types of cancer were reviewed by several authors (Stoner & Mukhtar 1995; Yang *et al.* 2002; Yang *et al.* 2001; Yang & Wang 1993).

The aim of the project is the determination and comparison of phenolic and flavonoid compounds

during the fermentation of kombucha in three different types of tea, as different mediums.

The project was done in two main stages. The first was the determination of the concentration of phenolics and flavonoids. The quantification of phenols was carried out spectrophotometrically with the FC reagent and gallic acid in concentrations ranging from 1 to 0.0625 mg/mL used as a standard. The absorbance was measured at 760 nm. Quantification of flavonoids was also carried out spectrophotometrically. Quercetin in concentrations ranging from 1 to 0.0625 mg/mL was used as a standard. The absorbance was measured at 510 nm at GBS UV-VIS Cintra 10 (Määttä-Riihinen *et al.* 2004). The second stage was the determination of concentrations of theaflavin (TF) and thearubigins (TR), the amount of which was calculated based on the following form:

$$TF (\%) = 4.313 \times B$$

$$TR (\%) = 13.643 \times (A + C - B)$$

It was determined that there is a statistically significant difference between the value of the concentration of phenol between green and black tea, as well as white and black tea. The highest concentration of theaflavin was in white tea, and the highest concentration of thearubigins in black tea. The research shows that green and white tea are the best (contain the highest concentration of antioxidant components). More detailed research is needed, because this fact indicates the wide possibilities of usage and under-researched features and effects of white tea. ☺