

ANTIOKSIDATIVNA AKTIVNOST KOMBUCHA FERMENTIRANOG MLIJEČNOG NAPITKA

Tijana Brčina¹, Milica Vilušić¹, Melisa Zahirović¹, Dijana Miličević¹

Originalan naučni rad - *Original scientific papers*

Rezime

Kombucha se odlikuje bogatim kemijskim sadržajem i zdravim svojstvima. Sadrži organske kiseline, minerale i vitamine koji potiču uglavnom iz čaja, aminokiseline i biološki aktivna jedinjenja - posebno polifenole, koji utječu na antioksidativnu aktivnost.

Cilj rada je bio ispitivanje sadržaja polifenola i antioksidativne aktivnosti proizvedenih fermentiranih mliječnih napitaka upotrebom čajne gljive Kombucha kao netradicionalne starter kulture i inokuluma, koji su dobiveni nacjepljivanjem gljive na crnom čaju i mlijeku, u ovisnosti o korištenoj starter kulturi i zaslađivaču.

Kao izvor ugljika korištena su dva zaslađivača, saharoza i med. Proizveden je i uzorak sa liofiziranim kulturom Lyofast Y 452 E. Eksperiment je pokazao da se čajna gljiva može uspješno koristiti za proizvodnju fermentiranih mliječnih napitaka i da se dobro razvija i na mlijeku. Sadržaj ukupnih fenola se kretao u intervalu od 24,48 do 75,08 mg GAK/L. Antioksidativni kapacitet kombucha fermentiranog mliječnog napitka je određen sa ABTS⁺ metodom i DPPH. Rezultati antioksidativnog kapaciteta određenog ABTS⁺ metodom kretali su se u intervalu od 16,29 do 104,58 IC₅₀, a DPPH metodom od 110,22 do 251,56 IC₅₀, i dobar su pokazatelj biološke vrijednosti napitka.

Ključne riječi: *fermentirani mliječni napitak, čajna gljiva Kombucha, fenoli, antioksidativni kapacitet.*

UVOD

Kombucha se u literaturi često naziva čajnom gljivom (Mo i sur., 2008), ali je zapravo simbiotska asocijacija bakterija octene kiseline (BOK) rodova *Acetobacter* i *Gluconobacter*, bakterija mliječne kiseline rodova *Lactobacillus* i autohtonih vrsta kvasaca rodova *Saccharomyces*, *Torulasporea*, *Zygosaccharomyces*, *Saccharomycodes*, *Candida*, *Kloeckera/Hanseniaspora*, *Pichia*, *Brettanomyces/Dekkera* (Sievers i sur., 1995; Yamada i sur., 1997; Chen i Liu, 2000; Wu i sur., 2004; Dutta i Gachhui, 2006; Trovatti i sur., 2011; Zhang i sur., 2011; El-Salam, 2012; Marsh i sur., 2014; De Filippis i sur., 2018). Kao podloga za fermentaciju čajne gljive najčešće se koriste crni ili zeleni čaj, koji se zaslađi sa saharozom (5-10% (w/v)), ohladi i inokulira sa inokulumom iz prethodne serije (10-20% u odnosu na ukupan

¹Tehnološki fakultet, Univerzitet u Tuzli, Odsjek za Prehrambenu tehnologiju,
korespondencija: tijana.brcina@untz.ba

volumen). Fermentacija se odvija na sobnoj temperaturi (20°C) na tamnom mjestu (Teoh i sur., 2004; Malbaša i sur., 2011; Jayabalan i sur., 2014). Osim čaja, i mlijeko može poslužiti kao supstrat za fermentaciju (Lončar i sur., 2001; Milanović i sur., 2002; Duraković i sur., 2008; Malbaša i sur., 2008; Malbaša i sur., 2009a,b). Fermentirani mliječni proizvodi obuhvataju veliku grupu proizvoda koji se međusobno razlikuju prema vrsti, tipu fermentacije, sadržaju mliječne masti, konzistenciji, vrsti dodataka i dr. (Carić, 1997; Tamime i Robinson, 2004). Svaka vrsta fermentiranog mlijeka uključuje specifične mikroorganizme, optimalne uvjete rasta starter kulture (mezofilne i termofilne), kao i određenu vrstu i kvalitetu mlijeka od kojeg su dobijeni (Suroño i Hosono, 2011). Upotreba kombuche kao nekonvencionalne starter kulture u tehnologiji fermentiranih mliječnih proizvoda je ispitivana sa aspekta utjecaja vrste čaja, temperature fermentacije, koncentracije i vrste inokuluma, utjecaja sadržaja mliječne masti i dr. (Kanurić i sur., 2011; Vitas i sur., 2013; Villarreal-Soto i sur., 2018; Vitas i sur., 2021; Iličić i sur., 2021; Kruck i sur., 2021). Fermentacija mlijeka kombuchom traje znatno duže nego pri proizvodnji klasičnog jogurta kao posljedica specifičnog mikrobiološkog sastava inokuluma i složenog sastava mlijeka (Milanović i sur., 2002; Malbaša i sur., 2009a).

Veliki broj studija su potvrdile da ishrana bogata antioksidansima doprinosi poboljšanju zaštite ljudskog organizma od prekomjerne proizvodnje i negativnog djelovanja slobodnih radikala (Ozyurt, 2020), te na taj način smanjuje rizik od mnogih bolesti, uključujući određene vrste raka, kardiovaskularne poremećaje i dr. (Chandan i Shah, 2006; Jayabalan i sur., 2008; Jiménez i sur., 2008; Cossu i sur., 2009; Jayabalan i sur., 2014; Najgebauer-Lejko i Sady, 2015). Primijećeno je da kombucha čaj ima veću antioksidativnu aktivnost nego nefermentirani čaj. Razlog tome je proizvodnja niskomolekularnih spojeva i strukturnih modifikacija polifenola iz čaja enzimima koje proizvode bakterije i kvasci tijekom fermentacije (Bhattacharya i sur., 2011). Rezultati istraživanja pokazuju da uvjeti prerade imaju značajno veći utjecaj na vrijednosti antioksidativnog djelovanja na DPPH i hidrosil radikale kao i na vitamin C u krajnjim proizvodima, zbog dobre metaboličke aktivnosti mikroorganizama u napitku (Malbaša i sur., 2009b).

Cilj rada je bio ispitivanje sadržaja polifenola i antioksidativne aktivnosti proizvedenih fermentiranih mliječnih napitaka upotrebom čajne gljive Kombucha kao netradicionalne starter kulture i inokuluma, koji su dobiveni naciepljivanjem gljive na crnom čaju i mlijeku, u ovisnosti o korištenoj starter kulturi i zaslađivaču.

MATERIJALI I METODE

Za proces fermentacije je korištena kultura kombuche koja je uzgajana na crnom čaju. Čaj je pripremljen tako što je 8 g čaja dodato u 2 L vode temperature 95°C. Nakon 5 minuta, čaj je filtriran, ohlađen na sobnu temperaturu i podijeljen u 2 jednaka dijela. U jedan dio je dodato 70 g/L šećera (saharoze), a u drugi dio 61,25 g/L livadskog meda, te dobro izmiješani. U oba dijela je dodato po 10 vol % startera (fermentiranog čaja) i

gljiva (tablica 1). Posude za fermentaciju su pokrivene tankom pamučnom tkaninom. Fermentacija je provedena na tamnom mjestu (7 dana/25°C) do formiranja novog biofilma kulture kombuche koji se kasnije odvojio. Nakon formiranja dovoljnog broja kombucha gljiva pristupilo se procesu fermentacije mlijeka.

Tablica 1. Uzorci fermentiranog mliječnog napitka

Table 1. Sample of fermented milk drink

Oznake uzoraka	Udio inokuluma netradicionalnog startera (%)	Starter kultura	Zaslađivač	Udio kombucha fermentiranog mliječnog napitka kao inokuluma (%)	
				kb1	kb2
kb1	10	-	saharozna	-	-
kb2	10	-	med	-	-
kb3	-	-	-	10	-
kb4	-	-	-	-	10
kb	-	Lyofast Y 452	-	-	-

Za proizvodnju fermentiranog mliječnog napitka korišteno je UHT mlijeko sa 2,8% m.m. proizvođača "Meggle" koje je naciyepljeno sa 10% inokuluma netradicionalne starter kulture u odnosu na ukupnu količinu mlijeka (kb1 i kb2) i naciyepljenog mlijeka (kb3 i kb4) sa 10% kombucha napitka.

Fermentirani mliječni napitak kb proizveden je pomoću liofizirane (FD-DVS, Frozen dried Direct Vat Set) kulture (proizvođača Sacco Clerici, Italija) Lyofast Y 452 E (u sastavu: *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* i *Streptococcus thermophilus*), uz poštivanje svih parametara proizvođača kulture.

Fermentacija uzoraka naciyepljenog mlijeka je provedena, uz ponavljanje tri puta, u vodenoj kupelji na 34°C, uz praćenje pH vrijednosti do 4,6. Potom su uzorci hlađeni u ledenoj vodi, pakirani u sterilnu staklenu ambalažu i skladišteni na temperaturi +4°C.

Određivanje ukupnih fenola

U postupku određivanja ukupnih fenola korištena je Folin-Ciocalteu-ova modifikovana metoda (Ozyurt, 2020).

U staklenu epruvetu otpipetira se redom 2,5 mL F.C. reagensa (10x razrijeđen destiliranom vodom), 2 mL 7,5%-tnog natrijeva karbonata i 0,5 mL uzorka fermentiranog mliječnog napitka (10x razrijeđen otapalom). Uzorci se promiješaju, zagriju u vodenoj kupelji 15 minuta pri temperaturi 45°C, te mjeri apsorbancija pri valnoj duljini 765 nm.

Na isti način se pripremi i slijepa proba, ali se umjesto uzorka fermentiranog mliječnog napitka uzima otapalo za ekstrakciju.

Iz izmjerenih vrijednosti apsorbancije nacrtava se baždarni pravac pomoću programa Microsoft Excel pri čemu su na apscisi nanesu koncentracije galne kiseline (mg/L), a na ordinati izmjerene vrijednosti apsorbancije pri 765 nm.

Određivanje antioksidativnog kapaciteta

Za određivanje antioksidativnih svojstava fermentiranih napitaka, korištene su dvije različite metode: DPPH (DPPH: Sigma-Aldrich. Inc. ST. Louise) i ABTS (ABTS: 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolin-sulfonska kiselina, Sigma-Aldrich CH-9471 Buchs, Germany)) metode kao spektrofotometrijske metode.

Antoksidativna aktivnost sa DPPH metodom

Antioksidativna aktivnost (DPPH) je određena prema modifikovanoj metodi (Živković i sur. (2009)). Kod DPPH testa, uklanjanje DPPH radikala je praćeno smanjenjem apsorbancije pri 515 nm, do koje dolazi zbog smanjenja količine antioksidansa ili reakcije sa radikalima (Brand-Williams i sur., 1995).

Postupak: otpipetira se 0,2 mL uzorka, 2 mL metanola i 1 mL otopine DPPH, dobro promiješa i reakcijska smjesa se ostavi mirovati 15 minuta. Nakon toga mjeri se apsorbancija pri 517 nm. Za slijepu probu umjesto uzorka korišten je metanol. Antioksidativna aktivnost je izračunata iz kalibracijske krive.

Antoksidativna aktivnost sa ABTS metodom

ABTS metodom prati se raspadanje radikala $ABTS^{+\cdot}$ koji nastaje oksidacijom 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazilin-6-sulfonat) djelovanjem fenolnih tvari. U odsustvu fenolnih tvari, $ABTS^{+\cdot}$ je relativno stabilan, ali brzo reaguje u prisustvu.

Koristi se za određivanje sposobnosti flavonoida i fenola da uklanjaju slobodne radikale. Osjetljivija je od DPPH metode. Primjenjuje se kod različitih pH u organskim i vodenim otopinama.

ABTS reagens se priprema od dva rastvora:

- 7 mM 2,2'-Azino-bis (3-ethyl benzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt
- 2,4 mM kalijpersulfat

Oba rastvora se prave sa destilovanom vodom.

Radni rastvor se priprema miješanjem jednakih zapremina ova dva rastvora. Nakon što se rastvori pomiješaju ostavi se na tamnom mjestu 16 sati. Dobiveni radni rastvor je tamnozeleno boje .

Zbog intenziteta boje potrebno ga je razblažiti tako da njegova absorbanca mjerena na 734 nm bude oko 0,7 do 0,9.

Postupak: pomiješa se 5 ml uzorka i 5 ml metanola i centrifugira se. Za analizu se koristi neonatant, prave se različite koncentracije. Volumen uzorka je od 0,1 ml do 0,5 ml a dopunjava se sa metanolom do 3 ml. Na svaki od ovih pripremljenih rastvora dodaje se

0,1 ml ABTS reagensa (kontrolnog), dobro se promućka i ostavi na tamnom mjestu 6 minuta. Nakon toga se očitava absorbanca na talasnoj dužini 734 nm.

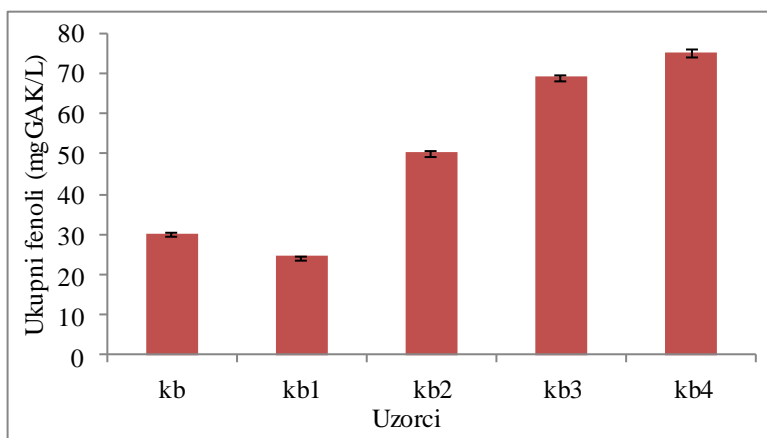
Statistička analiza

Korelacija i analiza varijance su urađene upotrebom SPSS softvera (verzija 22). Svi eksperimentalni rezultati su izraženi kao srednje vrijednosti s odgovarajućim standardnim devijacijama. Dunnett test je korišten za procjenu statističke značajnosti između grupa ($p < 0,05$).

REZULTATI I DISKUSIJA

Rezultati sadržaja ukupnih fenola u uzorcima fermentiranog mliječnog napitka prikazani su na dijagramu 1. Na dijagramima 2 i 3 su prikazani rezultati antioksidativne aktivnosti izražene kao aktivnost na ABTS⁺ radikale i antioksidativne aktivnosti izražene kao sposobnost hvatanja DPPH slobodnih radikala uzoraka fermentiranih kombucha mliječnih napitaka. Analiza varijance je pokazala da postoji statistički značajna razlika između grupa ($p < 0,05$) za ukupne fenole i antioksidativni kapacitet (DPPH i ABTS metoda).

Polifenoli su jedna od najbrojnijih i najprisutnijih spojeva biljnih metabolita u ljudskoj ishrani. Zadnjih godina interes za njima je znatno porastao zahvaljujući njihovoj antioksidativnoj aktivnosti, odnosno sposobnosti neutraliziranja (zasićenja) slobodnih radikala (Bravo, 1998). Polifenoli pokazuju i značajnu zaštitu od oksidativnog stresa in vitro (Weichselbaum i Buttriss, 2010).



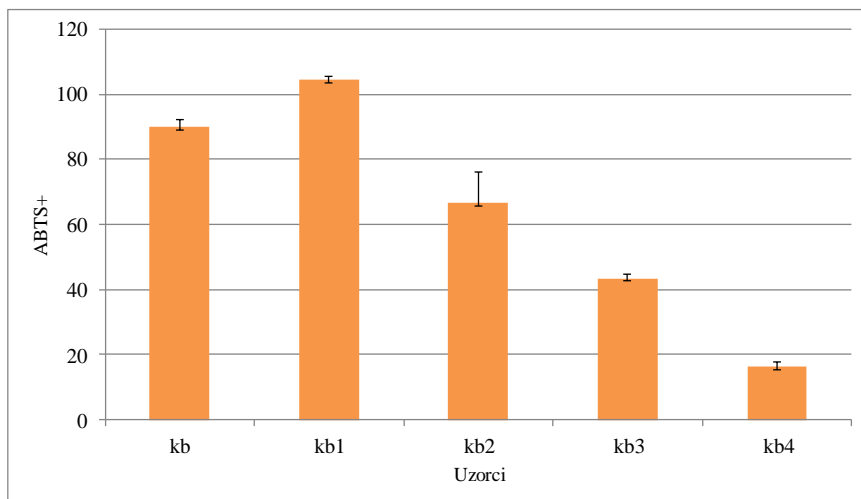
Dijagram 1. Sadržaj fenola u uzorcima fermentiranih kombucha mliječnih napitaka
Diagram 1. Phenol content in samples of fermented kombucha milk drinks

Dunnett-ov test je pokazao da postoji statistički značajna razlika u sadržaju fenola između i antioksidativne aktivnosti (ABTS i DPPH metoda) kontrolnog uzorka Kb i uzoraka kod kojih se korsitila kombucha kao netradicionlani starter (Kb1, Kb2, Kb3 i Kb4).

Kod uzorka Kb2 je korišten med kao zaslađivač, od kojeg i potječe veći sadržaj fenola sa utvrđenom koncentracijom od 50,21 mg/L. Med posjeduje snažno antioksidativno djelovanje, jer je bogat izvor fitokemikalija poput flavonoida i fenola. Antioksidativni kapacitet je mjera kojom se pokazuje sposobnost reduciranja i zaustavljanja štetnih oksidativnih reakcija, kako u hrani, tako i u organizmu. Za antioksidativna svojstva meda su uglavnom odgovorni fenolni spojevi (Al-Mamary i sur., 2002; Kesić i sur., 2009). Antioksidativne tvari meda vežu metalne ione u komplekse i time sprječavaju katalizu reakcija prilikom kojih nastaju slobodni radikali. Veliki dio protuupalnog djelovanja meda je sadržan u antioksidativnom djelovanju, ali i kad ne djeluje direktno na upalu, antioksidativni sastojci meda pronalaze postojeće slobodne radikale u tijelu, hvataju ih i time smanjuju količinu štetnog učinka (Manyi-Loh i sur., 2011). Antioksidativna aktivnost, odnosno sposobnost hvatanja jedinica slobodnih radikala vodenih ekstrakata fermentiranih mliječnih napitaka, ispitana je na ABTS⁺ i DPPH radikale. Obje analize ukazuju na mogućnost supstrata da donira elektrone ili H atome u reakcijama slobodnih radikala. Sposobnost kombucha čajnog napitka kao hvatača različitih slobodnih (hidroksi, superoksid anion, itd.) radikala pripisuje se polifenolnim spojevima, vitaminu C i vitaminima grupe B prisutnim u inokulumu (Jayabalan i sur., 2008).

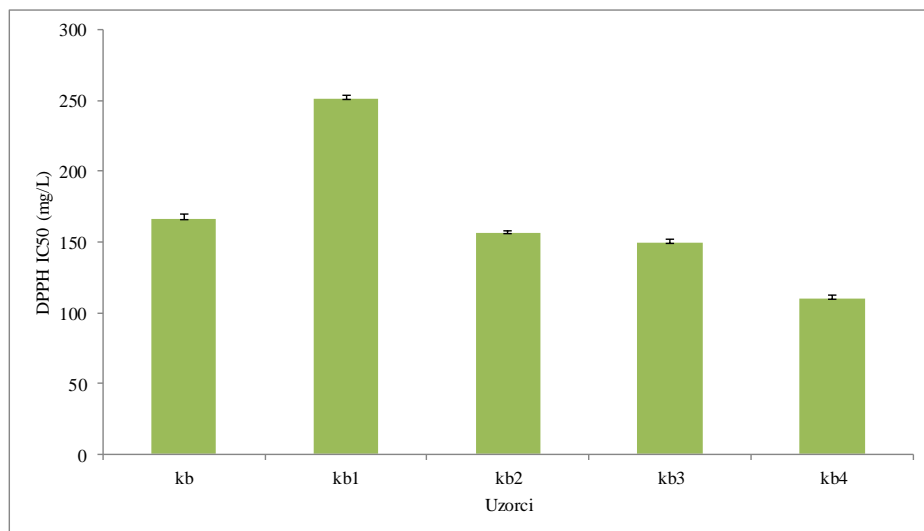
Razlika dobivena u rezultatima antioksidativne aktivnosti leži u činjenici da su primijenjene različite metode kod kojih se za određivanje antioksidativne aktivnosti koriste različiti slobodni radikali te dolazi do drugačijih reakcija između slobodnih radikala i antioksidanasa u uzorcima, što ovisi o strukturi fenolnih tvari (Singleton i Rossi, 1965). Rezultati istraživanja pokazuju da uzorci koji su imali manji sadržaj polifenola u datim uzorcima fermentiranog mliječnog napitka imali su više vrijednosti antioksidativne aktivnosti mjerene ABTS i DPPH metodom.

Rezultati dobiveni DPPH metodom izraženi su kao IC₅₀ (mg/L), tj. kao koncentracija potrebna za 50%-tno smanjenje početne vrijednosti DPPH. To znači da je antioksidativni kapacitet veći što je manja vrijednost IC₅₀ analiziranog uzorka. Čajna gljiva kombucha povećava sposobnost fermentiranog mliječnog napitka da stabilizira DPPH radikale tijekom skladištenja najvećim dijelom zahvaljujući sopstvenom antioksidativnom kapacitetu (Jayabalan i sur., 2008; Vitas i sur., 2013).



Dijagram 2. Antioksidativni kapacitet uzoraka fermentiranih kombucha mliječnih napitaka mjereno po ABTS⁺

Diagram 2. Antioxidant activity expressed as ability to capture ABTS⁺



Dijagram 3. Antioksidativni kapacitet uzoraka fermentiranih kombucha mliječnih napitaka mjereno po DPPH

Diagram 3. Antioxidant activity expressed as ability to capture DPPH free radicals

Najveću vrijednost antioksidativne aktivnosti nakon proizvodnje pokazali su uzorci fermentiranog kombucha mliječnog napitka sa saharozom kao zaslađivačem (Kb1), a potom slijedi uzorak Kb sa starter kulturom Lyofast Y 452E.

Dobijeni rezultati ukazuju na veću aktivnost na DPPH nego na ABTS slobodne radikale i to kod svih uzoraka.

Općenito, dobijeni rezultati antioksidativne aktivnosti fermentiranih mliječnih napitaka mjerene ABTS+ i DPPH metodom ukazuju na značajan utjecaj korištenog zaslađivača u procesu fermentacije mliječnog napitka. Antioksidativni kapacitet je veći što je manja vrijednost IC₅₀ analiziranog uzorka i veći sadržaj ukupnih fenola. Uzorak koji je imao najmanju sposobnost gašenja slobodnih radikala, a najveći antioksidativni potencijal je Kb4 koji je ujedno i imao najveći sadržaj ukupnih fenola. Analizirajući Pearsonov koeficijent korelacije uočena je veoma visoka negativna korelacija između sadržaja ukupnih fenola i antioksidativnog kapaciteta određen ABTS+ metodom ($r=-0,981$; $p<0,01$) i visoka negativna korelacija sa antioksidativnim kapacitetom određen DPPH metodom ($r=-0,834$; $p<0,05$).

ZAKLJUČAK

Na osnovu dobijenih rezultata, može se zaključiti da su uzorci fermentiranog kombucha napitka imali visok sadržaj ukupnih fenola, osobito uzorci inokulirani sa 10% inokuluma koji je dobiven fermentacijom mlijeka sa kombucha gljivom. Uzorci fermentiranog mliječnog napitka zaslađeni sa medom imali su statistički značajno najveći sadržaj fenola i antioksidativni kapacitet u odnosu na ostale uzorke. Kombinacija meda i kombucha gljive su povećali antioksidativno djelovanje fermentiranih mliječnih napitaka. Uzorak sa najvećim sadržajem fenola Kb4 je ujedno imao i najveći antioksidativni kapacitet bez obzira na korištenu metodu. Statistička obrada podataka je pokazala da postoji statistički signifikantna razlika između uzoraka i u sadržaju ukupnih fenola i antioksidativnog kapaciteta, u ovisnosti o upotrebljenom inokulumu i zaslađivaču.

LITERATURA

- Al-Mamary, M., Al-Meeri, A., Al-Habori, M. (2002). Antioxidant activities and total phenolics of different types of honey. *Nutrition Research*, 22: 1041-1047.
- 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(3): 221-234.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology* 28(1): 25-30.
- Bravo, L. (1998). Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance. *Nutrit Rev*, 56(11): 317-333.
- Carić, M. (1997). Savremeni razvoj tehnologije fermentisanih mlečnih proizvoda. U monografiji: Kvalitet mleka i fermentisanih proizvoda. Jugoslovenski mlekerski simpozijum, Zlatibor, 26-55.

- Chandan, R.C., Shah, N.P. (2006). Health Benefits. Part IV. U: Manufacturing Yogurt and Fermented Milks. Ur. R.C. Chandan. Blackwell Publishing. Oxford, 310-354.
- Chen, C., Liu, B. Y. (2000). Changes in major components of tea fungus metabolites during prolonged fermentation. *J Appl Microbiol*, 89(5): 834-839.
- Cossu, M., Juliano, C.C.A., Pisu, R., Alamanni, C.P. (2009). Effects of enrichment with polyphenolic extracts from Sardinian plants on physico-chemical, antioxidant and microbiological properties of yogurt. *Italian Journal of Food Science*, 21(4): 447-459.
- De Filippis, F., Troise, A.D., Vitaglione, P., Ercolini, D. (2018). Different temperatures select distinctive acetic acid bacteria species and promotes organic acids production during Kombucha tea fermentation. *Food Microbiology*, 73: 11-16.
- Duraković, K., Milanović, S., Carić, M., Iličić, M., Đurić, M., Tekić, M., Lendel, J. (2008). Funkcionalni niskoenergetski fernetisani mliječni napitak proizveden uz primjenu kombuhe. *Prehrambena industrija - Mleko i mlečni proizvodi*, 19(1-2): 66-73.
- Dutta, D., Gachhui, R. (2006). Novel nitrogen-fixing *Acetobacter nitrogenifigens* sp. nov., isolated from Kombucha tea. *Int J Syst Evol Microbiol*, 56(8): 1899-1903.
- El-Salam, S. S. A. (2012). 16S rRNA gene sequence detection of acetic acid bacteria isolated from tea kombucha. *New York Sci. J.*, 5: 55-61.
- Iličić, M., Milanović, S., Kanurić, K., Vukić, V., Vukić, D., Stojanović, B. (2021). Improving the texture and reology of set and stirred kombucha fermented milk beverages by addition of transglutaminase. *Mljekarstvo*, 71(3):155-164.
- 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., Subathradevi, P., Marimuthu, S., Sathishkumar, M., Swaminathan, K. (2008). Changes in free-radical scavenging ability of kombucha tea during fermentation. *Food Chem*, 109(1): 227-234.
- Jiménez, A. M., Murcia, M. A., Parras, P., Martínez-Tomé, M. (2008). On the importance of adequately choosing the ingredients of yoghurt and enriched milk for their antioxidant activity. *Int. J. Food Sci. Tech.*, 43(8): 1464-1473.
- Kanurić, K., Hrnjez, D., Ranogajec, M., Milanović, S., Iličić, M., Vukić, V., Milanović, M. (2011). The effect of fermentation temperature on the functional dairy product quality. *Acta Periodica Technologica*, 42: 63-70.
- Kesić, A., Mazalović, M., Crnkić, A., Čatović, B., Hadžidedić, Š., Dragošević, G. (2009). The Influence of L-Ascorbic Acid Content on Total Antioxidant Activity of Bee-Honey. *Eur J Sci Res*, 32(1): 95-101.
- Kruck, M., Trzaskowska, M., Ścibisz, I., Pokorski, P. (2021). Application of the “SCOBI” and Kombucha Tea for the Production of Fermented Milk Drinks. *Microorganism*, 9: 123-139.

- Lončar, E., Milanović, S., Carić, M., Malbaša, R., Panić, M. (2001). Metabolička aktivnost čajne gljive u mleku. *Prehrambena industrija - Mleko i mlečni proizvodi*, 12(1-2): 13-17.
- Malbaša, R., Lončar, E., Vitas, J., Čanadanović–Brunet, J. (2011). Influence of starter cultures on the antioxidant activity of kombucha beverage. *Food Chem*, 127: 1727-1731.
- Malbaša, R., Milanović, S., Lončar, E., Djurić, M., Carić, M., Iličić M., Kolarov, Lj. (2009a). Milk – based beverages obtained by Kombucha application. *Food Chem*, 112: 178-184.
- Malbaša, R., Lončar, E., Kolarov, Lj. (2009b). Određivanje vitamina C u fermentisanim mlečnim proizvodima od kombuhe. *Prehrambena industrija - Mleko i mlečni proizvodi*, 20(1-2): 31-34.
- Malbaša, R., Minić, S., Lončar, E., Kolarov, Lj. (2008). Uticaj inokuluma kombuhe na kvalitet fermentisanih mlečnih proizvoda. *Prehrambena industrija - Mleko i mlečni proizvodi*, 19(1-2): 43-46.
- 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 Microbiol*, 38: 171-178.
- Milanović, S., Carić, M., Lončar, E., Panić, M., Malbaša, R., Dobrić, D. (2002). Primena koncentrata čajne gljive u proizvodnji fermentisanih mlečnih napitaka. *Prehrambena industrija - Mleko i mlečni proizvodi*, 13(1-2): 8-13.
- Manyi-Loh, C.E., Ndip, R.N., Clarke, A.M. (2011). Volatile compounds in honey: a review on their involvement in aroma, botanical origin determination and potential biomedical activities. *International Journal of Molecular Science*, 12(12): 9514-9532.
- 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.
- Najgebauer-Lejko, D., Sady, M. (2015). Estimation of the antioxidant activity of the commercially available fermented milks. *Acta Sci. Pol. Technol. Aliment.*, 14(4): 387-396.
- Ozyurt, V.H. (2020). Changes in the content of total polyphenols and antioxidant activity of different beverages obtained by Kombucha “tea fungus”. *International Journal of Agriculture, Environment and Food Sciences*, 4(3): 255-261.
- 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.
- Singleton, V., Rossi, J. (1965). Colorimetry of Total Phenolic Compounds with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16: 144-158

- Surono, S., Hosono, A. (2011). Fermented milk - Types and Standards of Identify. In: Encyclopedia of Dairy Sciences. Vol. 2. Fuquay, J.W., Fox, P.F., McSweeney, P.L.H. (ed.). Elsevier Academic Press, London.
- Tamime, A.Y., Robinson, R.K. (2004). Yoghurt - Science and Technology. Pergamon Press, Oxford.
- Teoh, A.L., Heard, G., Cox, J. (2004). Yeast ecology of Kombucha fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 95: 119-126.
- Trovatti, E., Serafim, L. S., Freire, C. S. R., Silvestre, A. J. D., Neto, C. P. (2011). *Gluconacetobacter sacchari*: an efficient bacterial cellulose cell-factory. *Carbohydrate Polymers*, 86(3): 1417-1420.
- 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: 580-588.
- Vitas, J., Karadžić Banjac, M., Kovačević, S., Vukmanović, S., Jevrić, L., Malbaša, R., Podunavac-Kuzmanović, S. (2021). Chemometric approach to quality characterization. *Mljekarstvo*, 71(2): 83-94.
- Vitas, J., Malbaša, R., Grahovac, J., Lončar, E. (2013). The antioxidant activity of kombucha fermented milk products with stinging nettle and winter savory. *Chem Ind Chem Eng Quarterly*, 19(1): 129-139.
- Weichselbaum, E., Buttriss, J. (2010). Polyphenols in the diet. *Nutrition Bulletin*, 35(2): 157-164.
- Wu, W., Gai, B., Ji, B. (2004). Study on the Isolation and Identification of Microbes of Kombucha. *J. Food Sci*, 4: 010.
- Yamada, Y., Hoshino, K., Ishikawa, T. (1997). The phylogeny of acetic acid bacteria based on the partial sequences of 16S ribosomal RNA: the elevation of the subgenus *Gluconoacetobacter* to the generic level. *Biosci Biotechnol Biochem*, 61(8): 1244-1251.
- Zhang, H., Zhang, Z., Xin, X. (2011). Isolation and identification of microorganisms from kombucha fungus culture. *Journal of Beijing Union University (Natural Sciences)*, 2: 011.
- Živković, J., Sunarić, S., Trutić, N., Pavlović, R., Kocić, G., Nikolić, G., Jovanović, T. (2009). *Prehrambena industrija, Mleko i mlečni proizvodi*, (1-2): 45-47.

ANTIOXIDANT ACTIVITY OF KOMBUCHA FERMENTED MILK DRINK

Summary

The study aimed to produce a fermented milk beverage using Kombucha tea fungus as a non-traditional starter culture and inoculum, which were obtained by inoculating the fungus on black tea and milk. Two sweeteners, sucrose, and honey, were used as the carbon source. A control sample with lyophilized culture Lyofast Y 452 E was also produced. The study included testing the content of total phenols and antioxidant capacity depending on the starter culture and sweetener used. The experiment showed that tea fungus can be successfully used for the production of fermented milk beverages. The content of total phenols ranged from 24.48 to 75.08 mg GAK / L. The antioxidant capacity of kombucha fermented milk beverage was determined with ABTS + method and DPPH. The results of antioxidant capacity determined by the ABTS + method ranged from 16.29 to 104.58 IC₅₀, and the DPPH method from 110.22 to 251.56 IC₅₀, and are a good indicator of the biological value of the beverage.

Key words: fermented milk drink, tea mushroom Kombucha, phenols, antioxidant capacity.