

# Analiza minerala u napitcima od kombuche i njihova uloga u organizmu

---

Vrdoljak-Colo, Iva

Master's thesis / Diplomski rad

2023

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:778360>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-02-27**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



Iva Vrdoljak-Colo

*Analiza minerala u napitcima od kombuche i  
njihova uloga u organizmu*

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2023

Ovaj diplomski rad prijavljen je na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, na Zavodu za Medicinsku biokemiju i hematologiju. Eksperimentalni dio diplomskog rada izrađen je u laboratoriju tvrtke „Sample Control d.o.o.“ pod stručnim vodstvom izv. prof. dr. sc. Donatelle Verbanac te suvoditeljstvom Anamarije Ilijaš, mag. ing. biotechn. u sklopu projekta FoodForensics.

*Zahvaljujem mentorici izv. prof. dr. sc. Donatelli Verbanac na strpljenju i dobroti, na svim vrijednim savjetima i otvorenosti. Zahvaljujem Lei Jocić, mag. ing. oecoining na dostupnosti i velikoj pomoći pri svakom koraku izrade i pisanja diplomskoga rada te Martinu Štekoviću, mag. ing. biotechn, na pomoći pri izvođenju eksperimentalnog dijela diplomskog rada.*

*Također želim zahvaliti prijateljicama Fani, Lari, Pavli i Ani što su bile uz mene kroz najljepše i najteže trenutke i obogatile cijelo iskustvo studiranja.*

*Na kraju zahvaljujem svojoj obitelji koja mi je pružila sve kako bih došla do ovoga trenutka i zbog koje ne bih bila tko jesam danas.*

## Sadržaj

1. UVOD .....	1
1.1. KOMBUCHA NAPITAK ili JEDNOSTAVNO - KOMBUCHA .....	1
1.2. BIOLOŠKI VAŽNI METALI U KOMBUCHI .....	2
1.2.1. Kalcij .....	2
1.2.2. Željezo .....	5
1.2.3. Magnezij .....	8
1.2.4. Cink .....	11
1.2.5. Mangan .....	17
2. OBRAZLOŽENJE TEME .....	20
3. MATERIJALI I METODE .....	21
3.1 UZORCI KORIŠTENI ZA ANALIZU .....	21
3.2. KORIŠTENA OPREMA I INSTRUMENTI .....	21
3.3. KORIŠTENE KEMIKALIJE I REAGENSI .....	22
3.4. PRINCIP KORIŠTENE METODE .....	22
3.5. PRIPREMA STANDARDA ZA KALIBRACIJU .....	23
3.6. PRIPREMA UZORKA .....	23
3.7. MJERENJE .....	24
4. REZULTATI I RASPRAVA .....	25
4.1. REZULTATI .....	25
4.1.1. Sadržaj kalcija u kombucha napitcima .....	26
4.1.2. Sadržaj željeza u kombucha napitcima .....	27
4.1.3. Sadržaj magnezija u kombucha napitcima .....	28
4.1.4. Sadržaj cinka u kombucha napitcima .....	29
4.1.5. Sadržaj mangana u kombucha napitcima .....	30
4.2. RASPRAVA .....	30
4.2.1. ZAČINI I ZAČINSKO BILJE .....	32

4.2.2. MED.....	34
4.2.3. KAVA.....	35
4.2.4. KOMBUCHA NAPITAK U ULOZI SIMBIOTIKA .....	36
5. ZAKLJUČCI.....	38
6. POPIS KRATICA, OZNAKA I SIMBOLA.....	40
7. LITERATURA.....	42
8. SAŽETAK/SUMMARY .....	50
8.1. SAŽETAK.....	50
8.2. SUMMARY .....	51
9. PRILOZI.....	52
10. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA / BASIC DOCUMENTATION CARD1	

## 1. UVOD

Modernizacija u svijetu i razvoj tehnologije pružili su ljudima mogućnosti proširenja djelovanja u raznim segmentima društva i života kao nikada prije. Međutim, s dostupnim širokim opsegom prilika i informacija veže se vrlo užurban, stresan i poprilično nezdrav životni stil koji je doveo do neravnoteže organizma i pojave stanja povezanih sa smanjenjem učinkovitosti i vitalnosti organizma pa sve do razvoja novih vrsta bolesti. Zbog uočenih posljedica ovakvog životnog stila, posljednjih godina razvija se svijest o održavanju zdravlja i općeg blagostanja organizma korištenjem funkcionalnijih namirnica. Funkcionalna namirnica je ona koja posjeduje znanstveno dokazane blagotvorne učinke na organizam, čime osigurava uspostavu ravnoteže metabolizma i održavanje zdravlja (Kapp i Sumner, 2018). Funkcionalnim namirnicama smatraju se i tradicionalni fermentirani napitci, poput napitka dobivenog iz gljive kombuche, korišteni stoljećima prije. Kombucha napitak je trenutno u svijetu jedan od najpopularnijih napitaka.

### 1.1. KOMBUCHA NAPITAK ili JEDNOSTAVNO - KOMBUCHA

Kombucha je drevni napitak nazvan po korejskom liječniku Kombu, koji je 414. god. pr.n.e. kombucha napitkom liječio tadašnjega japanskog cara (da Silva Júnior i sur., 2022). U to doba napitak se koristio kao lijek za probavne tegobe jer se vjerovalo u njegova energetska i detoksikacijska svojstva. Napitak od kombuche koristio se i u području sjeveroistočne Kine 220 god. pr.n.e. Kasnije se putem trgovinskih puteva korištenje napitka proširilo na područje Rusije i istočne Europe (da Silva Júnior i sur., 2022; Kapp i Sumner., 2018). Kombucha se izvorno dobiva fermentacijom čaja uz dodatak šećera, kvasca i kulture bakterija i gljivica (engl. *Symbiotic Culture of Bacteria and Yeast*, SCOBY) kao podloge za vrenje (Jakubczyk i sur., 2020). Osim crnog čaja, kao osnova se također koriste zeleni ili oolong čaj, a moguće je pronaći i varijante napitka napravljene od infuzije metvice, matičnjaka ili jasmína (Martínez Leal i sur., 2018). Dodatkom SCOBY-a zašećerenom čaju pokreće se fermentacija koja se provodi na sobnoj temperaturi 7-14 dana. Zbog različitih bakterija i kvasca koji koegzistiraju u samom mediju, odvijaju se alkoholna, mliječna i octena fermentacija (Villarreal-Soto i sur., 2018). U završnici, kombucha napitak sadrži različite bioaktivne spojeve kao produkte brojnih reakcija i metaboličkih puteva. Produkti uključuju polifenole, organske kiseline, vlakna, etanol, aminokiseline, vitamine (C, E i B) te važne biogene elemente kao što su Cu, Fe, Mn, Ni i Zn,

antibiotske tvari i hidrolitički enzimi (Jakubczyk i sur., 2020; Kapp i sur., 2018). Okus konačnog produkta blago je kiseo i voćni te nježno pjenušav, ali nakon nekoliko dana skladištenja postane sličan okusu vinskog octa (Villarreal-Soto i sur., 2018). Prisutnost i količina kemijskih spojeva ovisi o mikroorganizmima simbiotske kulture korištenim za fermentaciju kombuche, o vremenu i temperaturi fermentacije, o sadržaju šećera i vrsti korištenog čaja (Martínez Leal i sur., 2018). Popularnost kombuche kao funkcionalne namirnice potaknuta je njezinim potencijalnim zdravstvenim dobrobitima. Potencijalne dobrobiti uključuju antibakterijska i antioksidativna svojstva, sposobnost snižavanja krvnog tlaka i koncentracije kolesterola, podupiranje imunskog sustava i gastrointestinalnih funkcija te sposobnost detoksifikacije jetre (Jakubczyk i sur., 2020; Kapp i Sumner, 2018).

## **1.2. BIOLOŠKI VAŽNI METALI U KOMBUCHI**

### **1.2.1. Kalcij**

Kalcij je najzastupljeniji mineral u ljudskom tijelu te ujedno i jedan od minerala čija se važnost za ljudsko zdravlje najviše proučava. Više od 99% kalcija u ljudskom tijelu pohranjeno je u koštanom tkivu i zubima u obliku hidroksiapatita, minerala s ključnom strukturnom ulogom osiguravanja čvrstog koštanog sustava. Preostali kalcij nalazi se u mekim tkivima i tjelesnim tekućinama, tj. krvi i izvanstaničnim tekućinama, gdje sudjeluje u mnoštvu vitalnih funkcija poput oplodnje, zgrušavanja krvi, mišićne kontrakcije, prijenosa živčanih impulsa, sekretorne aktivnosti, stanične smrti, imunskog odgovora, diferencijacije stanica i aktivacije enzima (Shkempi i Huppertz, 2021). U mekim tkivima kalcij je uglavnom pohranjen u različitim citoplazmatskim organelama. U krvi je prisutan u tri različita oblika: u slobodnom kationskom  $\text{Ca}^{2+}$  obliku, vezan za proteine plazme te otopljen i u kompleksu s drugim ionima, poput citrata i laktata (Shkempi i Huppertz, 2021). Ionizirani kalcij predstavlja fiziološki aktivan oblik. U ulozi sekundarnog glasnika regulira stanične funkcije, a u krvnom je serumu kod zdrave osobe prisutan u koncentracijama 2,14-2,53 mmol/L (Čvorišćec i sur., ured., 2009). Najbogatiji izvor kalcija predstavljaju mliječni proizvodi mlijeko, jogurt i sir. Ostale namirnice bogate kalcijem su orašasti plodovi i sjemenke, posebno bademi, sezam i chia sjemenke te povrće poput kelja, brokule i potočarke (Cormick i Belizán, 2019).

Referentne prehrambene vrijednosti (engl. *Dietary Reference values*, DRVs) predstavljaju skup referentnih vrijednosti hranjivih tvari koje uključuju vrijednosti poput raspona populacijskog referentnog unosa (engl. *Population Reference Intake*, PRI), prosječne potrebe (engl. *Average Requirement*, AR), preporučenog unosa (engl. *Adequate Intake*, AI) i

referentnog unosa (engl. *Reference intake*, RI) za nutrijente. Navedene vrijednosti pokazuju nužnu količinu nutrijenta koju je potrebno unijeti kako bi se održalo zdravlje inače zdrave osobe ili populacije. DRV također uključuje vrijednost zvanu gornja granica unosa (engl. *Tolerable Upper Intake Level*, UL), koja predstavlja maksimalnu prosječnu dnevnu razinu unosa hranjivih tvari za koje se smatra da nije vjerojatno da će predstavljati rizik od štetnih učinaka na zdravlje (EFSA (European Food Safety Authority), 2017).

U nastavku su navedene referentne prehrambene vrijednosti kalcija za Europsku Uniju (Tablica 1.).

**Tablica 1.** Referentne prehrambene vrijednosti kalcija za Europsku Uniju prema EFSA smjericama (mg/dne) (EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies, 2015a)

Dob	Spol	Preporučeni unos AI	Prosječna potreba AR	Referentni unos stanovništva PRI
7-11 mjeseci	M/Ž	280		
1-3 godine	M/Ž		390	450
4-10 godina	M/Ž		680	800
11-17 godina	M/Ž		960	1150
18-24 godine	M/Ž		860	1000
≥ 25 godina	M/Ž		750	950

### 1.2.1.1. Homeostaza kalcija

Kalcij je ključan za mnoge temeljne stanične funkcije, a izvanstanična homeostaza kalcija strogo je regulirana (Hassan-Smith i Gittoes, 2021). U održavanju stalne koncentracije kalcija u krvnom serumu i odnose njegovih frakcija ključne su paratireoidne žlijezde, crijeva i bubrezi, kosti te kalcitropni hormoni (Shkempi i Huppertz, 2021; Čvorišćec i sur., ured., 2009). Kalcij se apsorbira u gastrointestinalnom traktu u ioniziranom  $\text{Ca}^{2+}$  obliku. Intestinalna apsorpcija kalcija bitan je proces uključen u održavanje homeostaze  $\text{Ca}^{2+}$ , a odvija se u tankom crijevu kroz dva različita transportna mehanizma: transcelularni aktivni saturabilni transport i paracelularni pasivni nesaturabilni transport (Shkempi i Huppertz, 2021). Relativna važnost oba transporta ovisi o unosu kalcija u organizam. Kada je unos kalcija nizak prevladava transcelularni aktivni transport. Paracelularna pasivna difuzija kalcija pretežito se odvija nakon povećanog unosa kalcija kroz čvrste spojeve (engl. *tight junction*) u međustaničnom prostoru



između enterocita. Čvrsti spojevi su međustanične strukture prisutne u apikalnoj regiji enterocita, koje reguliraju paracelularni transport iona i molekula. Paracelularna apsorpcija kalcija neovisna je o vitaminu D (Fleet, 2022; Shkemi i Huppertz, 2021). Transcelularni transport odvija se u duodenumu i gornjem jejunumu, stimulira ga vitamin D, a ulazak kalcija u stanicu odvija se putem pozitivnog elektrokemijskog gradijenta većinom pomoću TRPV6 transportera (engl. *Transient receptor potential cation channel vanilloid family member 6*) (Shkemi i Huppertz, 2021). Promjenu koncentracije kalcija u serumu detektiraju receptori za osjet kalcija (CaSR). Navedene receptore sadrže paratireoidne žlijezde koje pomoću njih moduliraju sintezu i izlučivanje paratireoidnog hormona (PTH) (Shkemi i Huppertz, 2021; Hassan-Smith i Gittoes, 2021). Paratireoidni CaSR osjeća smanjenje  $Ca^{2+}$ , što dovodi do brzog porasta lučenja PTH. Povećani cirkulirajući PTH djeluje preko PTH1-receptora (PTH1R) u bubrežima i kostima (Hannan i sur. 2016). Kostii predstavljaju glavni izvor ukupnog tjelesnog kalcija te su ključni za puferiranje kratkoročnih promjena u koncentracijama serumskog kalcija (Shkemi i Huppertz, 2021). PTH stoga djeluje na kosti tako da pojačava resorpciju kostiju poticanjem otpuštanja kalcijevog fosfata iz kostiju. PTH potiče reapsorpciju kalcija u bubrežima i bubrežnu sintezu 1,25-dihidroksivitamina  $D_3$  i time pojačava intestinalnu apsorpciju kalcija. (Hannan i sur. 2016). Organizam vitamin D prvenstveno sintetizira u koži, a unos hranom čini mali doprinos. Sinteza kolekalciferola (vitamina  $D_3$ ) u koži iz prekursora zahtijeva izlaganje ultraljubičastom (UVB) svjetlu, međutim kolekalciferol nije biološki aktivan, već u jetri metabolizmom prelazi u 25-hidroksi-vitamin D koji se dalje u bubrežima pod stimulacijom PTH hidrosilira u glavni metabolit 1,25-dihidroksi-vitamin D (Hassan-Smith i Gittoes, 2021). 1,25-dihidroksi-vitamin D regulira intestinalnu apsorpciju kalcija poticanjem transkripcije gena za TRPV6 transporter vežući se na receptor vitamina D (VDR), nuklearni receptor i transkripcijski faktor aktiviran ligandom. Na taj način vitamin D stimulira apsorpciju kalcija u tankom crijevu i povisuje serumsku koncentraciju kalcija (Fleet, 2022; Čvorišćec i sur., ured., 2009). Kalcitonin ili tireokalcitonin djeluje antagonistički na PTH smanjujući koncentraciju kalcija u serumu tako što utječe na aktivnost osteoblasta. Luči se iz štitnjače, kao odgovor na visoku koncentraciju kalcija u krvi. Također smanjuje resorpciju kostiju i sintezu 1,25-dihidroksivitamina D čime dodatno smanjuje koncentraciju serumskog kalcija (Čvorišćec i sur., ured., 2009).

### **1.2.1.2. Nedostatak kalcija i hipokalcemija**

Loša kvaliteta prehrane te manjak unosa namirnica bogatim kalcijem može dovesti do značajnog gubitka kalcija u organizmu. Malapsorpcija kalcija dovodi do smanjene serumske

koncentracije kalcija i time s vremenom patofiziološke pojave poput sekundarnog hiperparatiroidizma, povećanog gubitka koštane mase i osteoporoze (Bhattarai i sur., 2020). Osteoporoza je globalno najčešća bolest kostura povezana sa starenjem. Karakterizira progresivno smanjenje koštane mase i poremećaj mikroarhitekture kosti, što rezultira povećanim rizikom od fragilnih prijeloma (Fischer i sur., 2018). Hipokalcemija je jedan od najčešćih elektrolitičkih poremećaja čija dijagnoza i liječenje zahtijevaju pažljivu procjenu od strane kliničara. Definira se kao korigirana razina ukupnog kalcija u serumu manja od 2,12 mmol/L. Niske razine kalcija u serumu mogu potencijalno utjecati na bilo koji organ i sustav (Pepe i sur., 2020). Kliničke značajke hipokalcijemije posredovane su neuromuskularnom ekscitabilnošću i uključuju trzanje mišića, grčeve tetive i ukočenost. Razvoj neuromuskularne ekscitabilnosti ovisi o apsolutnoj koncentraciji kalcija u serumu i o tome koliko brzo ona pada. Brzi padovi kalcija često su povezani sa simptomima, dok pacijenti s hipokalcemijom postupnog početka mogu biti bez simptoma. Kronična hipokalcemija može biti povezana s neuropsihijatrijskim simptomima, stvaranjem katarakte i povremeno povišenim intrakranijalnim tlakom (Hassan-Smith i Gittoes, 2021). Zabilježeni simptomi su neuropsihijatrijski poremećaji, poput depresije i bipolarnog poremećaja (Pepe i sur., 2020). Ioni kalcija igraju ključnu ulogu u neurotransmisiji tako i u patofiziologiji epileptičnog napadaja, ali sami mehanizmi napadaja su nepoznati. Predloženo je da niske razine kalcija, kroz učinak modulacije mijenjaju površinski naboj neurona čime se povećava dotok natrija kroz naponske natrijeve kanale. Dotok natrija rezultira oslobađanjem glutamata sa sekundarnim intenzivnim povećanjem aktivnosti neuronskih stanica, što pojačava epileptogenezu (Pepe i sur., 2020).

### **1.2.2. Željezo**

Željezo je esencijalni biogeni metal koji se nalazi u živim organizmima u obliku trovalentnog ili dvovalentnog kationa. Tijelo čovjeka sadrži 3,5-4,5 g željeza. Najveći dio toga (65-70%) ugrađen je u porfirinski prsten za stvaranje hema, koji je potreban za transport kisika eritrocitima, 20-30% uskladišteno je u retikuloendotelnom sustavu, u jetri, bubrezima, slezeni i koštanoj srži, 3-5% u mioglobinu, a krvni serum sadrži 0,1% ukupnog željeza u tijelu (Kafina i Paw, 2017; Čvorišćec i sur.,ured., 2009). Krvni serum zdravih muškaraca sadrži 11-32  $\mu\text{mol/L}$  željeza, a zdravih žena 8-30  $\mu\text{mol/L}$  (Čvorišćec i sur.,ured., 2009). Željezo je neophodno za stanične procese poput proizvodnje energije, biosinteze aminokiselina, masnih kiselina, detoksikacije, prijenosa i skladištenja kisika, sinteze neurotransmitera i imunskog odgovora (Haschka i sur., 2021). Standardni redukcijski potencijal željeza je nizak, što ga čini korisnim

za reakcije prijenosa elektrona. Divalentno željezo ( $\text{Fe}^{2+}$ ) djeluje kao donor elektrona te je topljivo u vodenim otopinama. Međutim, iako je neophodno za život, slobodno željezo je potencijalno toksično. Trovalentno željezo ( $\text{Fe}^{3+}$ ) sudjeluje u redoks reakciji tipa Fenton, generirajući reaktivne hidroksilne radikale, štetne za većinu makromolekula uključujući DNA i proteine. Stoga je stroga regulacija metabolizma željeza neophodna za žive organizme (Haschka i sur.,2021).

U nastavku su navedene referentne prehrambene vrijednosti željeza za Europsku Uniju (Tablica 2.)

**Tablica 2.** Referentne prehrambene vrijednosti željeza za Europsku Uniju prema EFSA smjericama (mg/dne) (EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies, 2015b)

Dob	Spol	Prosječna potreba AR	Referentni unos stanovništva PRI
7-11 mjeseci	M/Ž	8	11
1-6 godina	M/Ž	5	7
7-11 godina	M/Ž	8	11
12-17 godina	M	8	11
	Ž	7	13
≥ 18 godina	M	6	11
≥ 18 godina	Ž (premenopauza)	7	16
	Ž (postmenopauza)	6	11

### 1.2.2.1 Homeostaza željeza

Homeostazu željeza reguliraju mnogi mehanizmi, a njegov sadržaj u tijelu uglavnom je kontroliran sadržajem u hrani, crijevnom apsorpcijom i recikliranjem (Mahadea, i sur., 2021). Željezo se većim dijelom apsorbira u dvanaesniku, a manje u želucu, ileumu i kolonu. Apsorpcija željeza ovisi o čimbenicima poput eritropoetičke aktivnosti koštane srži,  $p\text{O}_2$ , promjene skladišta u retikuloendotelnom sustavu, valencije željeza i pH na mjestu apsorpcije (Čvorišćec i sur. ured., 2009). Željezo se može apsorbirati u obliku hem željeza preko hem transportera, hem nosača proteina 1 (engl. *Haem carrier protein 1*, HCP1) ili u obliku nehem

željeza preko dvovalentnog metalnog transportera 1 (engl. *Divalent metal transporter 1*, DMT1). Luminalno ne-hem željezo, uglavnom u trovalentnom obliku, prvo se reducira duodenalnim citokromom B (DCYTB) u dvovalentno željezo prije nego što ga DMT1 transportira kroz staničnu membranu (Lanser i sur., 2021).  $Fe^{2+}$  ulazi u peritelne stanice crijevne mukoze te se oksidira u trovalentni oblik i veže za apoferitin. Trovalentno željezo stvara ferihidroksid-fosfat te spojen s apoferitinom tvori kompleksni spoj feritin (Čvorišćec i sur., ured., 2009). Željezo se skladišti u obliku feritina u endotelnim stanicama duodenuma ili se prenosi dalje u krvotok pomoću feroportina 1 (FPN1). FPN1 je jedini poznati stanični transporter željeza odgovoran za izvoz željeza iz duodenalnih enterocita i za mobilizaciju željeza iz hepatocita i makrofaga koji recikliraju eritrocite (Lanser i sur., 2021). Nakon što FPN1 izveze  $Fe^{2+}$ , hefestin (HEPH) ga oksidira u trovalentni oblik na bazolateralnoj membrani duodenalnih enterocita i veže ga za apotransferin. Apotransferin je transportni protein koji u plazmi prenosi željezo do organa (Lanser i sur., 2021; Čvorišćec i sur., ured., 2009). Razine željeza u krvi regulirane su hepcidin/feroportin sustavom. Hepcidin je peptidni hormon koji se sintetizira u jetri. Cirkulira u plazmi i veže se za izvozni protein željeza feroportin, potičući njegovu razgradnju. Feroportin je, osim u endotelnim stanicama duodenuma, ekspimiran u stanicama jetre i makrofagima. On posreduje u regulaciji apsorpcije željeza iz hrane (1-2 mg na dan), otpuštanja željeza iz jetre prema potrebi i recikliranja željeza u makrofagima (20-25 mg na dan). Kada je željezo u krvi u dovoljnim količinama, jetra proizvodi hepcidin, koji blokira daljnju apsorpciju željeza iz hrane. U slučaju smanjene zalihe željeza, proizvodnja hepcidina je inhibirana, tako da se izvoz željeza iz endotelnih stanica duodenuma posredovan feroportinom i prijenos željeza u transferin može odvijati nesmetano (Gattermann i sur., 2021). U zdravih odraslih osoba, željezo se gubi putem ljuštenja epitelnih stanica crijevne sluznice, bilijarnog trakta, urinarnog trakta i kože te kod žena u obliku menstrualnog gubitka krvi. Dnevni gubitak željeza iznosi oko 1-2 mg dnevno, međutim regulirana eliminacija željeza ne postoji (Mahadea, i sur., 2021; Lanser i sur., 2021).

#### **1.2.2.2. Nedostatak željeza**

Diljem svijeta oko 40% trudnica i djece do 5 godina te približno 30% žena koje nisu trudne pati od nedostatka željeza zbog pothranjenosti i posljedične anemije. Nedostatak željeza također je najčešći uzrok anemije u Europi (Gattermann, i sur., 2021). Anemija uzrokovana nedostatkom željeza karakterizirana je smanjenom sintezom hemoglobina što dovodi do stvaranja hipokromnih i mikrocitnih crvenih krvnih zrnaca (Elstrott, i sur., 2020). Ovisno o intenzitetu manjka željeza razlikuju se tri stadija. U prvom stadiju negativna ravnoteža željeza

dovodi do pražnjenja uskladištenog željeza, što još nije štetno, odnosno ne manifestira se na krvnoj slici. U drugom stadiju nedostatak željeza postaje klinički značajan. Tada željezo u organizmu ne zadovoljava potrebe eritropoetskih prekursora u koštanoj srži što dovodi do trećeg stadija, smanjenja vrijednosti hemoglobina ispod donje granice referentnog intervala te vidljive promjene u veličini i morfologiji eritrocita (Gattermann, i sur., 2021). Glavni simptomi nedostatka željeza su bljedilo i umor, a osobe s teškim nedostatkom željeza mogu imati oralne fisure, difuznu alopeciju i atrofični glositis, a ponekad i kompulzivno gutanje neprehrambenih predmeta, poput zemlje (Gattermann, i sur., 2021). U slučaju većih nedostataka željeza može doći do poremećaja rada krvožilnog sustava s poremećajima srčanog ritma i sistoličkim šumom na srcu, dispnejom u mirovanju te simptomima angine. Osim toga, nedostatak željeza s popratnom anemijom može dovesti do nehematoloških simptoma kao što su poremećena kognitivna sposobnost, disfunkcija hormona štitnjače, disfunkcija kateholamina, povećan rizik od infekcije; povećana izloženost stresu i depresiji kod postporođajne anemije, poremećaji u radu neurotransmitera te lošiji kognitivni i motorički razvoj djece (Mahadea i sur., 2021).

### **1.2.3. Magnezij**

Magnezij je četvrti najzastupljeniji element u ljudskom tijelu i, nakon kalija, drugi najzastupljeniji kation unutar tjelesnih stanica. Ukupna tjelesna količina magnezija varira između 20 i 28 g (Fiorentini i sur., 2021). Više od 99% ukupnog tijela nalazi se u unutarstaničnom prostoru, uglavnom pohranjen u kostima (50-65%), gdje zajedno s kalcijem i fosforom sudjeluje u konstituciji kostiju. Osim u kostima, 34-39% ukupnog magnezija prisutno je u mišićima, zatim u jetri, bubregu, slezeni, mozgu i drugim organima (Fiorentini i sur., 2021; Čvorišćec i sur., ured., 2009). Samo 1% ukupnog magnezija prisutno je u ekstracelularnim tekućinama, a od toga 0,3% u serumu (Kostov, 2019). Koncentracija ukupnog magnezija u serumu odrasle osobe iznosi 0,65-1,05 mmol/L, a ioniziranog magnezija 0,43-0,59 mmol/L (Čvorišćec i sur., ured., 2009). Magnezij je uključen u praktički sve glavne metaboličke i biokemijske procese unutar stanice. Prisutan je kao kofaktor u više od 300 enzimskih sustava koji reguliraju različite biokemijske reakcije u tijelu, uključujući metabolizam glukoze, lipida i proteina, neuromuskularno provođenje, signalne putove, regulaciju krvnog tlaka te je ključan faktor u sintezi i održavanju strukturne stabilnosti proteina, DNA i RNA te u staničnoj proliferaciji (Fiorentini i sur., 2021; Gröber i sur., 2015). Mnoge prirodno uzgojene namirnice sadrže magnezij, međutim njegova se potrošnja u posljednjih nekoliko desetljeća znatno smanjila zbog promjena u prehranbenim navikama te uklanjanjem magnezija tijekom obrade hrane. Namirnice s visokim udjelom magnezija su

bademi, banane, crni grah, brokula, smeđa riža, indijski orah, laneno sjeme, zeleno povrće poput špinata, orašasti plodovi, zobene pahuljice, sjemenke (bundeve, sezam, suncokret), soja, slatki kukuruz, tofu i cjelovite žitarice (Razzaque, 2018).

U nastavku su navedene referentne prehrambene vrijednosti magnezija za Europsku Uniju (Tablica 3.).

**Tablica 3.** Referentne prehrambene vrijednosti magnezija za Europsku Uniju prema EFSA smjericama (mg/dne) (EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies, 2015c)

Dob	Spol	Preporučeni unos
		AI
7-11 mjeseci	M/Ž	80
1-2 godine	M/Ž	170
3-9 godina	M/Ž	230
10-17 godina	M	300
	Ž	250
≥ 18 godina	M	350
	Ž	300

### 1.2.3.1. Homeostaza magnezija

Sadržaj magnezija u tijelu fiziološki je reguliran kroz tri glavna mehanizma: crijevnu apsorpciju, bubrežnu reapsorpciju i izlučivanje te izmjenu iz tjelesnog bazena magnezija, tj. kostiju (Fiorentini i sur., 2021.). Magnezij se poput kalcija većim dijelom apsorbira u gornjem dijelu tankog crijeva, a manji se dio apsorbira duž cijelog tankog crijeva do kolona (Čvorišćec i sur., ured., 2009). Postoje dva poznata transportna sustava za ionizirani magnezij, pasivni paracelularni mehanizam i transcelularni transport namjenskim kanalima i transporterima (Fiorentini i sur., 2021.). Većina magnezija apsorbira se pomoću pasivnog paracelularnog mehanizma, aktiviranog elektrokemijskim gradijentom uzrokovanim visokom koncentracijom magnezija u lumenu. Paracelularna apsorpcija magnezija odgovorna je za 80%–90% intestinalnog unosa magnezija. Manji dio magnezija apsorbira se aktivnim transportom preko TRPM 6 i TRPM 7 transportera (engl. *Transient Receptor Potential-Melastatin Channel*, TRPM) (Gröber i sur., 2015). Magnezij se iz organizma izlučuje većinom putem stolice (50-80%), a ostalih 20-50% izlučuje se mokraćom. Razina bubrežnog izlučivanja ioniziranog magnezija uglavnom ovisi o koncentraciji u serumu. Pri niskoj koncentraciji magnezija serum

se filtrira putem bubrežnih glomerula, a zatim se iz glomerularnog filtrata magnezij reapsorbira u proksimalnim tubulima i uzlaznom dijelu Henleove petlje. U slučaju povišene koncentracije magnezija u krvi, ulogu u metabolizmu magnezija ima PTH, koji potiče se jače bubrežno izlučivanje magnezija te smanjuje crijevnu apsorpciju. Bubrežno izlučivanje također se povećava i pod utjecajem aldosterona, hormona štitnjače i inzulina (Čvorišćec i sur., ured., 2009).

### **1.2.3.2. Hipomagnezijemija**

Raspon magnezija u serumu odrasle osobe iznosi 0,65-1,05 mmol/L. Koncentracije magnezija u krvi strogo su regulirane kako bi se održao normalan raspon čak i ako je unos magnezija hranom nizak ili ako dođe do prekomjernog izlučivanja magnezija, stoga su slučajevi nedostatka magnezija zbog prehrane rijetki (Čvorišćec i sur., ured., 2009). Hipomagnezijemija je stanje u kojem je serumska koncentracija magnezija u tijelu niža od donje granice referentnog intervala. Rani znakovi hipomagnezijemije su nespecifični i uključuju gubitak apetita, letargiju, mučninu, povraćanje, umor i slabost. Izraženiji nedostatak magnezija može izazvati različite komplikacije poput povećane neuromuskulturne ekscitabilnosti manifestirane kroz tremor, grčeve mišića, tetaniju i generalizirane napadaje. Također može uzrokovati srčane aritmije, osteoporozu i migrene. Stanja koja osim malapsorpcije mogu dovesti do hipomagnezijemije uključuju alkoholizam, loše kontrolirani dijabetes, endokrinološke poremećaje poput hipertireoze ili hiperparatireoidizma, bolesti bubrega i uporabu različitih lijekova (Razzaque, 2018; Gröber i sur., 2015). Kronični deficit magnezija povećava količinu slobodnih radikala koji su uključeni u razvoj raznih kroničnih poremećaja te može biti barem jedan od patofizioloških čimbenika koji bi mogao pomoći u objašnjenju odnosa između upalnog stanja i oksidativnog stresa s procesom starenja i mnogim bolestima povezanim sa starenjem, uključujući aterosklerozu, kardiovaskularne bolesti, hipertenziju i moždani udar, depresiju i druge bolesti (Escobedo-Monge i sur., 2022). Mnoga su istraživanja pokazala da nedostatak magnezija kod ljudi može izazvati kroničnu upalu niskog stupnja ili pogoršati upalni stres uzrokovan drugim čimbenicima. Upala niskog stupnja potiče izlučivanje proupalnih citokina, koji stimuliraju resorpciju kosti poticanjem diferencijacije osteoklasta. Također je uočeno da su kosti životinja s nedostatkom magnezija krhke i lomljive zbog mikrofrakture trabekula te narušenih mehaničkih svojstava kostiju. Magnezijev ion inače povećava topljivost kalcija i fosfata, minerala koji tvore kristale hidroksiapatita, čime utječe na formiranje i veličinu kristala. Dokazano je da žene s osteoporozom i nedostatkom magnezija imaju veće kristale u trabekularnoj kosti od kontrolne skupine, čineći kost osjetljivijom na

prijelome (Fiorentini i sur., 2021). U mozgu, fiziološki magnezij smanjuje aktivnost N-metil-D-aspartat (NMDA) receptora, bitnog za ekscitatorni sinaptički prijenos i neuronsku plastičnost u učenju i pamćenju. Vezanjem glutamata NDMA receptor omogućava dotok kationa ključnih za podraživanje neurona. Magnezijev ion veže se za kalcijev kanal u NMDA receptoru i blokira njegovu aktivnost. Niske razine magnezija u serumu smanjuju broj blokiranih NMDA receptora čime se posljedično povećava priljev kalcijevih i natrijevih iona te s njima i hiperekscitabilnost neurona, što dovodi do oksidativnog stresa i smrti neuronskih stanica. Patološka neurotransmisija povezana je s mnogim neurološkim i psihijatrijskim poremećajima, uključujući epilepsiju, Alzheimerovu, Parkinsonovu bolest, depresiju i anksioznost (Fiorentini i sur., 2021; Maier i sur., 2020). Nedostatak magnezija se također povezuje s kortikalnom širenjem depresije (CSD), za koju se smatra da je odgovorna za auru povezanu s migrenama, neuravnoteženim otpuštanjem neurotransmitera, aktivnošću trombocita i vazokonstrikcijom. U CSD-u, kao rezultat nedostatka magnezija oslobađa se supstanca P, neuropeptid koji djeluje kao neurotransmiter i neuromodulator djelujući na senzorna vlakna čime izaziva glavobolju (Maier i sur., 2020).

#### **1.2.4. Cink**

Cink je esencijalan element u tragovima za sve žive organizme i njihove biološke procese. U tijelo se unosi hranom, vodom te čak i zrakom, a ne može se akumulirati u tijelu zbog čega je potrebno ovaj element stalno unositi prehranom. Visoke količine cinka nalaze se u žitaricama i brašnu, šećeru, mesu, ribi, masti, orašastim plodovima. Međutim, rafiniranjem brašna i šećera gubi se velika količina cinka. Iako razine cinka u prehrani znatno variraju, eukariotske stanice moraju održavati unutarstaničnu homeostazu cinka kako bi osigurale svoju pravilnu funkciju (Sanna i sur., 2018; Čvorišćec i sur. ured., 2009). Referentne vrijednosti cinka u krvnom serumu ili plazmi iznose 9,9-17,9  $\mu\text{mol/L}$  (Čvorišćec i sur. ured., 2009). Cink ima ključnu strukturnu i katalitičku ulogu u više od 300 enzima te je uključen u sve razine prijenosa staničnog signala. Cink je uključen u staničnu komunikaciju, staničnu proliferaciju, diferencijaciju i preživljavanje. Ovaj metal sudjeluje u regulaciji kroničnog upalnog statusa kroz smanjenje upalnih citokina te smanjuje oksidativni stres sudjelujući u sintezi antioksidativnih enzima. Djeluje kao katalizator enzima, sudjelujući u metabolizmu lipida, ugljikohidrata i proteina (Olechnowicz i sur., 2018; Sanna i sur., 2018). Ioni cinka također su sastavni dijelovi strukturnih i regulatornih proteina, uključujući transkripcijske faktore, te tvore „cinkove prste“, sekvence koje omogućuju vezanje transkripcijskih faktora na DNK. Ioni cinka



trajno su vezani u tim biološkim sustavima i tako tvore stabilan bazen uključen samo u specifične funkcije proteina u kojima su prisutni (Skrajnowska i Bobrowska-Korczak, 2019). U nastavku su navedene referentne prehrambene vrijednosti cinka za Europsku Uniju (Tablica 4.).

**Tablica 4.** Referentne prehrambene vrijednosti cinka za Europsku Uniju prema EFSA smjernicama (mg/dne) (EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies, 2014)

Dob	Spol	Razina unosa fitinske kiseline (mg/dne)	Referentni unos stanovništva PRI
7-11 mjeseci	M/Ž		2,9
1-3 godine	M/Ž		4,3
4-6 godina	M/Ž		5,5
7-10 godina	M/Ž		7,4
11-14 godina	M/Ž		10,7
15-17 godina	M		14,2
	Ž		11,9
≥ 18 godina	M	600	11,7
	Ž	600	9,3
Trudnice	Ž		+1,6
Dojilje	Ž		+2,9

#### 1.2.4.1. Homeostaza cinka

Budući da nedostatak cinka disregulira staničnu funkciju, a višak cinka je toksičan za stanice, razine cinka nužno su strogo regulirane. Cink iz hrane apsorbira se u dvanaesniku i jejunumu u ionskom obliku, gdje se transportira iz lumena u enterocite. Cinkov kation se zatim izlučuje na bazolateralnoj strani enterocita kako bi se oslobodio u portalnu krv, koja distribuira cink u tijelu (Wan i Zhang, 2022; Kambe i sur., 2015). Cink se uglavnom skladišti u skeletnim mišićima (60%) i kostima (30%), a samo mali dio tjelesnog cinka cirkulira u krvi. Najveći dio cinka koji se nalazi u krvnoj plazmi je kovalentno vezan za albumin (75-85%) i β2 makroglobulin (10-20%), a manji dio (2%) se može vezati za aminokiseline, organske anione, histidin, cistein i citrat (Mammadova-Bach i Braun, 2019). Apsorpcija cinka u tankom crijevu odvija se na dva načina: pasivni transport kroz ionske kanale i aktivni transport ovisan o transporterima cinka. Transporteri cinka kodirani su s 24 različita SLC30A i SLC39A gena

(engl. *solute-linked carrier genes*) i grupirani su u dvije obitelji proteina nazvane ZIP i ZnT. Transporteri iz ZIP (Zrt-, Irt-srodan protein) obitelji kodirane su SLC39A genima, a uloga im je prijenos cinka iz izvanstaničnog prostora i unutarstaničnih organela u citoplazmu stanice. Neke ZIP izoforme nisu striktno specifične za cink, već mogu transportirati metale poput željeza, bakra, kadmija ili mangana, ovisno o patofiziološkom statusu stanice. Članovi obitelji ZnT kodirani su SLC30A genima te im je uloga prijenos cinka iz citoplazme u izvanstanični prostor ili organele pri čemu se smanjuje citoplazmatska koncentracija cinka. Koordinacija aktivnosti članova dviju obitelji transportera održava homeostazu unutarstaničnog cinka (Wan i Zhang, 2022; Mammadova-Bach i Braun, 2019). Intestinalna apsorpcija cinka uglavnom je posredovana ZnT1, ZnT2, ZnT5, ZnT6 i ZnT7 iz obitelji ZnT te ZIP1, ZIP4, ZIP5, ZIP10 i ZIP14 iz obitelji ZIP. ZIP4 transporter lokaliziran je na apikalnoj membrani enterocita te je glavni prijenosnik cinka iz lumena u enterocite. Pri nedostatku cinka ZIP4 se pojačano translocira na apikalnu membranu, povećavajući tako unos cinka u enterocite. U slučaju povišenje koncentracije cinka, ZIP4 se brzo endocitozira s površine membrane i degradira pri čemu se apsorpcija cinka smanjuje. ZIP5 transporter lokaliziran je na bazolateralnoj membrani enterocita te sudjeluje u staničnom izlučivanju cinka. U slučaju deficijencije cinka, ZIP5 se na bazolateralnoj membrani enterocita endocitozira i razgrađuje kako bi se smanjio unos cinka iz cirkulacije u enterocite. ZnT1 transporter nalazi se na bazolateralnoj membrani enterocita i odgovoran je za transport cinka iz enterocita u izvanstanični prostor. Ekspresija ZnT1 transportera u crijevima na razini mRNA i proteina povećava se kada je cinka dovoljno, a smanjuje se tijekom nedostatka cinka (Wan i Zhang, 2022.). Nakon cirkulacije u tijelu, cink se izlučuje u lumen tankog crijeva zajedno sa sekretima gušterače i žuči. Velik dio cinka se reapsorbira u tankom crijevu, a preostali dio se izlučuje izmetom. Ostali mogući putevi izlučivanja su urinom te ljuštenjem stanica sluznice i kože (Kambe i sur., 2015). U stanicama cink postoji u tri oblika: cink vezan za proteine, cink pohranjen u vezikulama i citoplazmatski slobodni cink. U citoplazmi su posebno važni metalotioneini (MTs), mali proteini bogati cisteinom, koji svojom tiolnom skupinom mogu vezati dvovalentne katione poput bakra i cinka. Metalotioneini su najvažniji proteini koji vežu cink. Ovisno o vrsti i aktiviranom stanju stanica, približno 5-15% citoplazmatskog cinka može se vezati na MT čime oni čine unutarstanični bazen cinka. Kroz sposobnost vezanja i otpuštanja kationa cinka, MT posjeduju brojne funkcije. Predstavljaju receptore za cink i donore cinka, koji mogu regulirati apsorpciju, distribuciju, skladištenje i otpuštanje cinka u stanicama, detoksikaciju teških metala te sudjelovanje u oksidativnom stresu, apoptozi i imunskim odgovorima (Mammadova-Bach i Braun, 2019; Read i sur., 2019).

#### 1.2.4.2. Uloga cinka u regulaciji imunskog sustava

Imunosni sustav posebno je osjetljiv na promjene koncentracije cinka u organizmu. Velike promjene u koncentraciji cinka mogu na različite načine disruptirati specifični (stečeni) i nespecifični (urođeni) imunitet (Skrajnowska i Bobrowska-Korczak, 2019). Cink je prepoznat kao jedan od čimbenika, čija je homeostaza neophodna protiv upalnih bolesti za regulaciju različitih aspekata imunskog sustava, kao što su napredovanje staničnog ciklusa, sazrijevanje i diferencijacija stanica (Sanna i sur., 2018). U kontekstu urođenog imunskog odgovora, cink ima središnju ulogu u aktivnosti enzima nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (NADPH) oksidaze neutrofilnih granulocita (Weyh i sur., 2022). NADPH oksidaza je protein koji prenosi elektrone preko bioloških membrana pri čemu je akceptor elektrona kisik, a produkt reakcije prijenosa elektrona je superoksid. Drugim riječima uloga NADPH oksidaze je stvaranje reaktivnih vrsta kisika (Bedard i Krause, 2007). Nedostatkom cinka, smanjuje se stvaranje reaktivnih kisikovih vrsta (ROS) i time sposobnost ubijanja patogena od strane granulocita. Brojne su studije pokazale da nedostatak cinka smanjuje sposobnost adhezije monocita na endotel i njihovu kemotaksiju kao i kemotaksiju granulocita. Također smanjuje fagocitozu makrofaga te može izazvati smanjeni broj NK (engl. *Natural Killers*) stanica u perifernoj krvi. NK stanice ključne su u staničnom imunskom odgovoru te njihovim smanjenjem, smanjena je liza virusom zaraženih stanica ili tumorskih stanica (Weyh i sur., 2022; Skrajnowska i Bobrowska-Korczak, 2019). Najveći učinak na imunski sustav cink ima preko T limfocita, točnije T pomoćnih (engl. *T helper*, Th) stanica. T pomoćne stanice sudjeluju u aktivaciji B limfocita izlučivanjem specifičnih tvari zvanih limfokinima (Guyton i Hall, 2006). Th limfociti uključuju Th1 i Th2 stanice. Smanjeni sadržaj cinka u stanici remeti ravnotežu između Th1 i Th2 stanicama prema povećanoj diferencijaciji Th2 limfocita. Th1 stanice luče interleukin 2 (IL-2) i interferon  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), čime pomažu u diferencijaciji citotoksičnih T limfocita i aktivaciji makrofaga te potiču imunski odgovor na intracelularne patogene. Th2 stanice proizvode IL-4, IL-5, IL-6 i IL-10 te su učinkovite u poticanju proliferacije B limfocita i proizvodnju IgG i IgE antitijela. Stoga prvenstveno funkcioniraju kao zaštita od izvanstaničnih mikroorganizama (Skrajnowska i Bobrowska-Korczak, 2019; Male i sur., 2012). Cink potiče oslobađanje IFN- $\gamma$  iz mononuklearnih stanica periferne krvi čime posljedično potiče diferencijaciju Th1 limfocita. IFN- $\gamma$  ima antivirusna, imunoregulacijska i antikancerogena svojstva. Nedostatkom cinka ravnoteža imunskog odgovora se ruši jer se diferencira veći broj Th2 stanica i posljedično se smanjuje izlučivanje IFN- $\gamma$  (Skrajnowska i Bobrowska-Korczak, 2019). Sazrijevanje T limfocita odvija se u timusu i ovisi o timulinu, peptidnom hormonu koji luče endotelne stanice

timusa. Cink upravo djeluje kao kofaktor u stvaranju aktivnog timulina (ZnF<sub>2</sub>) koji oslobađaju stanice te na taj način uvjetuje morfološku i fiziološku cjelovitost timusa. Timulin regulira diferencijaciju T limfocita u timusu i funkciju zrelih T limfocita u perifernoj krvi. Pri nedostatak cinka dolazi do atrofije timusa i posljedičnog poremećaja razvoja limfocita (Skrajnowska i Bobrowska-Korczak, 2019). Osim značajnog utjecaja na T limfocite, nedostatak cinka može rezultirati smanjenim sazrijevanjem B stanica i, posljedično, smanjenom proizvodnjom protutijela (Weyh i sur., 2022). Cink može utjecati i na proizvodnju i na signalizaciju brojnih upalnih citokina. Pokazalo se da pacijenti sa sustavnim upalnim bolestima, kao što je reumatoidni artritis, i istodobnim nedostatkom cinka, mogu imati povećanu ekspresiju IL-1, IL-1 $\beta$  i IL-6 u usporedbi s pacijentima s većim unosom cinka. Također se pokazalo da izloženost stanica proupalnim citokinima kao što su IL-17 i TNF- $\alpha$  (faktor nekroze tumora alfa), povećava ekspresiju transportera cinka, što rezultira pojačanim intracelularnim unosom cinka, dodatnim smanjenjem serumske koncentracije cinka i daljnjim povećanjem upale i proizvodnje IL-6 (Weyh i sur., 2022; Sanna i sur., 2018). Najistaknutiji utjecaj cinka jest regulacija signalnih puteva NF- $\kappa$ B receptora koji je ključan u regulaciji gena koji kontroliraju apoptozu, imunski odgovor i upalne procese. NF- $\kappa$ B signalnim putem regulirana je i ekspresija proupalnih citokina poput TNF- $\alpha$ , IL-1 i IL-6. Glavni inhibitor aktivnosti NF- $\kappa$ B signalnog puta je protein cinkovog prsta (A20). A20 je protuupalni protein poznat kao zaštitnik stanica od toksičnosti izazvane TNF- $\alpha$  i IL-1 $\beta$ , smanjujući njihovu razinu (Weyh i sur., 2022; Olechnowicz i sur., 2018).

Međutim, sva navedena neuravnotežena stanja mogu se obnoviti integracijom cinka. U nekoliko studija primijećeno je da se u mišjem modelu, zahvaćenom eksperimentalnim autoimunim encefalomijelitisom (EAE), jačina simptoma smanjuje, čak i povlači nakon tretmana cinkom zbog pozitivnog utjecaja cinka na proliferaciju regulatornih T stanica i inhibitorynog djelovanja na proupalne stanice (Sanna i sur., 2018).

#### **1.2.4.3. Uloga cinka u oksidativnom stresu**

Oksidativni stres predstavlja stanje neravnoteže između proizvodnje slobodnih radikala, nusprodukata staničnog disanja, i stope njihovog uklanjanja antioksidativnim obrambenim mehanizmima. Nakupljanje slobodnih radikala dovodi do oštećenja stanica i tkiva, tako da se povećava oksidativno oštećenje DNK, proteina i lipida. Oksidativni stres odgovoran je za razvoj mnogih kroničnih bolesti kao što su rak, kardiovaskularne bolesti, ateroskleroza, hipertenzija, dijabetes melitus i neurodegenerativne bolesti (Choi i sur., 2018; Gammoh & Rink, 2017). Cink se u fiziološkim uvjetima javlja kao dvovalentni kation, koji nije redoks

aktivan. Međutim, uključen je u razne sustave koji reguliraju ravnotežu staničnih oksidansa. Naime, cink inhibira proizvodnju reaktivnih vrsta kisika (engl. *Reactive oxygen species*, ROS), kao što je superoksidni anion ( $\cdot\text{O}^-$ ), vodikov peroksid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) i hidroksilni radikal ( $\text{OH}\cdot$ ) kao i reaktivne vrste dušika uključujući peroksinitrit (Choi i sur., 2018; Olechnowicz i sur., 2018). Antioksidativni učinak cinka može biti posredovan izravnim djelovanjem cinkovog iona, njegovom strukturnom ulogom u antioksidativnim proteinima i modulacijskom indukcijom metalotioneina (Olechnowicz i sur., 2018). Naime, redoks aktivni metali poput bakra i željeza tvore komplekse sa staničnim komponentama poput lipidnog dvosloja i nukleotida. U kompleksu ti metali su zarobljeni i reagiraju s vodikovim peroksidom pri čemu proizvode ROS, koji su sposobni oksidirati i oštetiti te iste stanične komponente. Cink se natječe s redoks aktivnim metalima za negativne naboje u staničnim komponentama i, vezanjem za njih, sprječava stvaranje ROS (Choi i sur., 2018; Gammoh i Rink, 2017). Izravno antioksidativno djelovanje iona cinka povezano je s njegovim vezanjem na tiolne ili sulfhidrilne skupine u proteinima i peptidima, čime ih štiti od oksidacije. Vezanjem cinka na tiolnu skupinu, stvara se sterička smetnja koja dovodi do konformacijskih promjena u proteinu, čime se sprječava stvaranje intramolekularnog disulfida. (Choi i sur., 2018; Olechnowicz i sur., 2018; Gammoh i Rink, 2017). Osim toga, cink može ubrzati sintezu metalotioneina putem aktiviranja metalnog regulatornog transkripcijskog faktora 1 (engl. *Metal regulatory transcription factor 1*, MTF-1). Metalotioneini u citosolu služe kao izvrsni čistači ROS-a zbog visokog sadržaja cisteina (Choi i sur., 2018; Gammoh & Rink, 2017). Cink također štiti stanice od oksidativnog stresa povećanjem biosinteze glutationa (engl. *Glutathione*, GSH), proteina odgovornog za održavanje staničnog redoks stanja (Choi i sur., 2018). Uz ostalo, cink je prisutan kao kofaktor u antioksidativnim enzimima poput Cu/Zn- superoksid dismutaze ili superoksid dismutaze 1 (engl. *Superoxide dismutase 1*, SOD1). SOD1 katalizira reakciju dismutacije superoksidnog radikala na elementarni kisik i vodu. U slučaju nedostatka cinka, SOD1 podvrgnut je konformacijskim promjenama zbog disocijacije cinka zbog čega se smanjuje katalitička aktivnost, a povećava stanje oksidativnog stresa (Choi i sur., 2018). Cink regulira ekspresiju i transkripciju nuklearnog faktora eritroid v2 povezanog s faktorom 2 (Nrf2). Nrf2 jedan je od ključnih transkripcijskih faktora koji reguliraju aktivnost antioksidativnog sustava. Djeluje na način da štiti od oksidativnog stresa u ranoj fazi, uklanjajući reaktivne kisikove i dušikove vrste. Nedostatkom cinka smanjena je Nrf2 ekspresija (Li i sur., 2014).

Vrijedno je spomenuti da cink ne djeluje uvijek kao antioksidans. U slučaju jako visokih intracelularnih razina cinka, on može imati prooksidativna svojstva. Pokazano je da

nanočestice cinkovog oksida značajno povećavaju oksidativni stres u adipocitima, iako povećavaju ekspresiju antioksidativnih enzima (Olechnowicz i sur., 2018).

### 1.2.5. Mangan

Mangan je dvanaesti najzastupljeniji element i peti najrasprostranjeniji metal na zemlji, prisutan u spojevima u dvovalentnom, trovalentnom i sedmerovalentnom obliku. U živim organizmima najčešći su dvovalentni ( $Mn^{2+}$ ) i trovalentni oblik ( $Mn^{3+}$ ).  $Mn^{2+}$  je najstabilniji oblik, a  $Mn^{3+}$  predstavlja snažan oksidans, koji redoks reakcijom prelazi u  $Mn^{2+}$  i  $Mn^{4+}$ , ili tvori komplekse s proteinima, kao što je transferin (Tf). Mangan predstavlja bitan nutrijent za unutarstanične aktivnosti, djelujući kao kofaktor za razne enzime uključene u metabolizmu glukoze i lipida, u oksidacijskoj fosforilaciji te drugim metaboličkim procesima (Čvorišćec i sur., ured., 2009; Chen i sur., 2018). U tijelu se nalazi u tkivima čije su stanice bogate mitohondrijima, a najviše je prisutan u kostima, jetri i gušterači. Koncentracije mangana u serumu zdrave osobe iznose do 14,6 nmol/L (Čvorišćec i sur., ured., 2009). Mangan igra ključnu ulogu u razvoju, probavi, reprodukciji, antioksidativnom procesu, proizvodnji energije, imunosnom odgovoru i regulaciji neuronskih aktivnosti. Konzumacija hranom primarni je način unosa mangana za većinu ljudi. U svakodnevnoj ljudskoj prehrani riža, orašasti plodovi, cjelovite žitarice i mahunarke sadrže najveću količinu mangana, a namirnice koje su također dobar izvor su lisnato zeleno povrće, čaj, čokolada i plodovi mora (školjke) (Chen i sur., 2018). U nastavku su navedene referentne prehrambene vrijednosti mangana za Europsku Uniju (Tablica 5.).

**Tablica 5.** Preporučeni dnevni unos mangana za Europsku Uniju prema EFSA smjernicama (mg/dne) (EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies, 2013)

Dob	Spol	Preporučeni unos
		AI
7-11 mjeseci	M/Ž	0,02-0,05
1-3 godine	M/Ž	0,5
4-6 godina	M/Ž	1
7-10 godina	M/Ž	1,5
11-14 godina	M/Ž	2
15-17 godina	M/Ž	3
≥ 18 godina	M/Ž	3

### **1.2.5.1. Homeostaza mangana**

Sustavna homeostatska kontrola mangana predstavlja ravnotežu između apsorpcije mangana i eliminacije u jetri (Balachandran i sur., 2020). Mangan se u tijelo unosi gutanjem, inhalacijom i dermalnim prodiranjem te se može primijeniti u obliku intravenske injekcije. Glavni putevi unosa su preko gastrointestinalnog trakta i pluća, nakon čega se mangan distribuira cirkulacijom u različita tkiva (Chen i sur., 2018). Progutani mangan ima stopu apsorpcije od 3-5% kroz gastrointestinalni trakt. Nekoliko čimbenika koji utječu na stupanj apsorpcije su status željeza, prehrambeni matriks, bioraspoloživost i postojeće tjelesno opterećenje mangana (Balachandran i sur., 2020). U crijevima mangan se može apsorbirati pasivnom difuzijom ili aktivnim transportom, na sličan način kao željezo i kalcij. Divalentni metalni transporter 1 (DMT1), kodiran SLC11A2 genom smatra se odgovornim za aktivni prijenos mangana u enterocite (Katz i Rader, 2019; Chen i sur., 2018). Većina mangana iz krvi distribuira se u mekim tkivima (60%), ostatak se dostavlja u jetru (30%), bubreg (5%), gušteraču (5%), debelo crijevo (1%), kosti (0,5%), mokraćni sustav (0,2%), mozak (0,1%) i eritrocite (0,0,2%). Kako krv prolazi kroz jetru, mala količina mangana potrebna za fiziološke funkcije ostaje u plazmi. Višak magnezija prelazi u jetrene stanice i konjugira se u žuč (Chen i sur., 2018). ZIP14, kodiran SLC39A14 genom, ključan je transporter koji se nalazi na bazolateralnoj membrani hepatocita i enterocita. Uloga ZIP14 transportera je unos mangana iz krvi u stanice hepatocita i enterocita čime pridonosi eliminaciji mangana fecesom. Izlučivanje mangana iz hepatocita u žuč posredovano je ZN10 proteinom, kodiranim SLC30A10 genom na kanalikularnoj membrani hepatocita. Bilijarni mangan izlučuje se u lumen crijeva i, ako se ne reapsorbira, izlučuje se fecesom. U slučaju deficita, mangan se iz žuči prenosi natrag u hepatocite pomoću ZIP8 transportera, kodiranog SLC39A genom (Katz i Rader, 2019).

### **1.2.5.2. Neurotoksičnost mangana**

Budući da se dovoljna količina mangana lako unosi zdravom prehranom, nedostatak mangana je rijedak. S druge strane, preopterećenje mangana događa se poprilično često čime postaje javnozdravstveni problem. Manganizam je poremećaj uzrokovan viškom mangana u organizmu karakteriziran ozbiljnim i nepovratnim neurološkim simptomima sličnim onima kod Parkinsonove bolesti. Većina klinički prijavljenih slučajeva trovanja mangana posljedica je profesionalne izloženosti kao naprimjer u rudarstvu, zavarivanju i proizvodnji suhih baterija (McCabe i Zhao, 2021; Chen i sur., 2018). Udisanje mangana u zraku glavni je način izlaganja kod trovanja manganom na radnom mjestu. Inhalirani Mn ulazi u krvožilni sustav kroz nosnu sluznicu, zaobilazi jetru i može prijeći krvno-moždanu barijeru (KMB) preko nekoliko putova,

uključujući olakšanu difuziju i aktivni transport od olfaktornog bulbusa do cerebralnog korteksa (Balachandran i sur., 2020). KMB se smatra fizičkom barijerom zbog nedostatka propusnosti za velike molekule, a sastoji se od endotelnih stanica moždanih krvnih žila koje podupiru periciti, proteini bazalne membrane i astrociti. Aktivni transport mangana kroz KMB odvija se pomoću ZIP8 i ZIP14 transportera lokaliziranih na obje strane polariziranih endotelnih stanica moždanih krvnih žila (Katz i Rader, 2019). Mangan se akumulira u područjima mozga bogatim željezom u bazalnim ganglijima: kaudatusu, putamenu, globus pallidusu, supstanciji nigri i subtalamičkim jezgrama mozga. Nakupljanjem u određenim regijama mozga mangan selektivno mijenja neurofiziologiju. Naime, bazalni gangliji uključuju kompleksnu mrežu neurotransmitera čija se ekspresija potencijalno mijenja i uzrokuje odstupanja u optimalnoj fiziologiji i ponašanju.  $\gamma$ -aminomaslačna kiselina (GABA) inhibitorni je neurotransmiter koji se u izobilju nalazi u globus pallidusu i supstanciji nigri. Pri izloženosti mangana, čak i pri netoksično visokim razinama, dolazi do rane i duboke promjene u duljini i cjelovitosti neurotransmitora, čime se smanjuju razine GABA. Manja ekspresija GABA uzrokuje smanjenu inhibiciju ekscitatornih neurotransmitera. Glutamat je primarni ekscitatorni neurotransmiter i kritična signalna molekula. Visoke razine mangana stimuliraju oslobađanje prekomjernih količina glutamata u izvanstaničnom prostoru, što dovodi do povećane podražljivosti neurona. Mangan se također veže na transporter kolina čime smanjuje unos kolina i posljedično inhibira sintezu neurotransmitora acetilkolina. Izloženost mangana može dovesti i do smanjenja razine dopamina u bazalnim ganglijima i umanjiti učinkovitost dopaminergične neurotransmisije, što uzrokuje promjene u ponašanju uključujući hipoaktivnost, kognitivna oštećenja i promijenjenu senzomotornu funkciju (Balachandran i sur., 2020).



## 2. OBRAZLOŽENJE TEME

Napitak od kombuche jedan je od drevnih napitaka koji je u posljednje vrijeme razvio veliku popularnost. Popularnost kombuche potaknuta je uočenim zdravstvenim dobrobitima poput antibakterijskih i antioksidativnih svojstava, podupiranja imunskog sustava i sposobnosti detoksifikacije jetre. Zdravstvena dobrobit kombuche direktno je povezana s njezinim kemijskim sastavom. Kombucha napitak sadrži razne minerale, vitamine, aminokiseline, katehine, flavonoide i druge bioaktivne spojeve koji nastaju kao rezultat fermentacije čaja. Sadržaj napitka od kombuche i koncentracija bioaktivnih spojeva ovise o parametrima kao što su: vrsta čaja, vrijeme fermentacije, sadržaj SCOBY kolonija i temperatura (Jakubczyk i sur., 2020). Zbog popularizacije kombuche, počele su se istraživati varijacije ne samo koncentracije sastojaka njezine izvorne formulacije, već i novih sirovina i procesa, koje bi povećale samu funkcionalnost napitka (da Silva Júnior i sur., 2022).

Cilj ovoga rada bio je detaljno proučiti utjecaj bioaktivnih komponenti kombucha napitka na opće zdravlje ljudi i njihovu ulogu u fiziološkim funkcijama organizma, s naglaskom na biogene minerale, te odrediti koncentracije istih u pet kombucha napitaka različitog sastava tehnikom masene spektrometrije s induktivno spregnutom plazmom (engl. *Inductively coupled plasma mass spectrometry*, ICP-MS).

### 3. MATERIJALI I METODE

Koncentracije kalcija, željeza, magnezija, cinka i mangana određene su tehnikom induktivno spregnute plazme s masenom spektrometrijom u uzorcima pet različitih kombucha napitaka. Mjerenje je provedeno u tvrtki „Sample Control d.o.o.“ na ICP-MS Agilent 7800 analizatoru.

#### 3.1 UZORCI KORIŠTENI ZA ANALIZU

U nastavku navedeni uzorci od broja 1-4 dobrovoljan su prilog tvrtke Cidrani d.o.o., a uzorak broj 5 predstavlja klasičnu kombuchu, koju na tržište stavlja tvrtka Ekipa Products d.o.o. i u našim ispitivanjima predstavlja kontrolni uzorak prisutan na tržištu koji služi za usporedbu s našim ispitivanim uzorcima tvrtke Cidrani d.o.o. Sastav korištenih uzoraka detaljno je opisan u nastavku.

Sastojci uzorka broj 1 su simbiotička kultura bakterija i kvasaca\*, agavin inulin\*, korijen sladića\*, komorač\*, đumbir\*, cimet štapić\*, anis\*, klinčić\*, sljez\*, korijandar sjemenke\*, kardamom\*.

Sastojci uzorka broj 2 su simbiotička kultura bakterija i kvasca\*, med\*, Assam crni čaj\*, đumbir\*, cimet štapić\*, narančina kora\*, naranča prah\*, đumbir prah\*, cimet prah\*, topivi ekstrakt cold brew kave.

Sastojci uzorka broj 3 su simbiotička kultura bakterija i kvasaca\*, med\*, jabuka\*, bazga\*, šipak\*, divlja borovnica\*, sljez\*, crveni ribiz\*, list kupine\*, crni ribiz\*, kupina\*.

Sastojci uzorka broj 4 su simbiotička kultura bakterija i kvasaca\*, med\*, metvica\*, komorač\*, anis\*, metvica list\*, kim\*, timijan\*, šišarke hmelja\*, stolisnik\*, kardamom\*, kardamom prah\*.

Sastojci uzorka broj 5 su voda, šećer\*, zeleni čaj\* (0,1%), crni čaj\* (0,1%), ugljikov dioksid i mikrobna kombucha kultura.

Sastojci označeni \* oznakom predstavljaju sastojke iz ekološkog uzgoja.

#### 3.2. KORIŠTENI OPREMA I INSTRUMENTI

- Analitička vaga (Sartorius Croatia, Zaprešić, Hrvatska)
- Pipeta (Mettler Toledo, Columbus, SAD)
- Odmjerne tikvice
- Mikrovalna peć *Ethos Up* (Milestone, Sorisole, Italija)
- *Inductive Coupled Plasma Mass Spectrometer Agilent 7800* (Agilent, California, SAD)

- Kivete (Falcon, Arizona, SAD)

### 3.3. KORIŠTENE KEMIKALIJE I REAGENSI

- 69%-tna dušična kiselina (VWR International BVBA, Pennsylvania, SAD)
- 30%-tni vodikov peroksid (Honeywell, North Carolina, SAD)
- *TraceSELECT* 34-37%-tna klorovodična kiselina (Honeywell, North Carolina, SAD)
- Standard zlata sastavljen od  $1001 \pm 5 \mu\text{g/mL}$  Au u 10% HCl (Inorganic Ventures, Virginia, SAD)
- Mješavina standarda –  $10 \mu\text{g/mL}$  Ag, Al, As, Ba, Be, Ca, Cd, Co, Cr, Cs, Cu, Fe, Ga, K, Li, Mg, Mn, Na, Ni, Pb, Rb, Se, Sr, Tl, U, V, Zn u 5% HNO<sub>3</sub> (Inorganic Ventures, Virginia, SAD)

### 3.4. PRINCIP KORIŠTENE METODE

ICP-MS je analitička metoda koja omogućuje vrlo osjetljivu analizu više elemenata u tragovima i ultra-tragovima te određivanje izotopskih omjera za one elemente koji posjeduju više od jednog izotopa (Bulska i Wagner, 2016). ICP-MS analizator koristi inertni plin argon kao izvor plazme za generiranje stanja ionizacije za elemente te maseni spektrometar (MS) koji se koristi paralelno s kvadrupolnim masenim filtrom za odvajanje proizvedenih iona za detekciju i istraživanje. Općenito, ICP-MS sastoji se od sustava za uvođenje uzorka koji se sastoji od raspršivača i komore za raspršivanje, ICP-baklje i radiofrekventne (engl. *radiofrequency*, RF) zavojnice, sustava vakuumnog sučelja, sustava za uklanjanje smetnji, ionske optike koja radi na fokusiranju snopa iona uklanjanjem neutralnih vrsta i fotona, sustava filtracije masenog spektrometra te detektora i sustava za kontrolu podataka. Funkcija raspršivača je uvođenje uzorka u komoru za raspršivanje u finim kapljicama kroz peristaltičku pumpu. U komori za raspršivanje velike se kapljice aerosola iz raspršivača filtriraju zato što velike kapljice mogu ugasiti plamenik. Plazma je električki vodljiva plinovita smjesa, mješavina pozitivnog naboja iona argona i elektrona, koja se stvara kroz niz koncentričnih kvarcnih cijevi poznatih kao ICP-baklje. Plazma se nalazi u središtu bakrene RF zavojnice koja generira temperaturu od 6000–10 000 K. Sudari između plina argona i ubrzanih elektrona potiču stvaranje plazme visoke temperature. Pri ulasku aerosola iz komore za raspršivanje, aerosol se razgrađuje u atmosferi plazme dajući atome analita koji se potom ioniziraju i stvaraju katione. Proizvedeni kationi ekstrahiraju se iz plazme, područja visoke temperature plazme od 7000 K i atmosferskog tlaka, u vakuumski sustav, područje temperature oko 300 K i visokog

vakuuma. U plazmi se, uz katione, stvaraju i fotoni koji predstavljaju interferenciju pri detekciji analita. Za njihovo uklanjanje koristi se ploča za zaustavljanje fotona, koja reflektira fotone od detektora (Al Hakkani, 2019). Za detekciju analita koristi se kvadrupolni maseni spektrometar. Kvadrupolni maseni spektrometar koristi oscilirajuća električna polja za selektivnu stabilizaciju iona koji prolaze kroz radiofrekventno (RF) kvadrupolno polje. Naime, variranjem RF-a moguće je odabrati pojedinačne vrijednosti omjera mase i naboja jer će svi ostali ioni biti izgubljeni. Selektirani kationi dolaze do detektora, gdje se bilježi odklon svakog iona, a ti se podaci zatim koriste za izračunavanje omjera mase i naboja, generirajući maseni spektar, koji omogućuje identifikaciju elemenata. Detektor se temelji na elektronskom multiplikatoru koji pretvara kretanje pristiglih čestica u električne signale, koji se pomoću softvera na računalu preračunavaju u koncentracije i pohranjuju kao rezultati (Gault i McClenaghan, 2009).

### **3.5. PRIPREMA STANDARDA ZA KALIBRACIJU**

Prije pripreme uzorka, iz literature je korišten podatak o prosječnom koncentracijskom rasponu pojedinih analita u kombuchi. Raspon analita koji je primijenjen na osnovu literaturnih podataka, iznosio je od 0,1 do 0,4  $\mu\text{g/mL}$  (Villarreal-Soto i sur., 2018). Na temelju tih informacija definirano je pet koncentracijskih točaka (25, 50, 100, 200, 300, 400  $\mu\text{g/L}$ ) za kalibraciju analizatora. Za izradu koncentracijskih točaka korištena je mješavina standarda s koncentracijom od 10  $\mu\text{g/mL}$  Ag, Al, As, Ba, Be, Ca, Cd, Co, Cr, Cs, Cu, Fe, Ga, K, Li, Mg, Mn, Na, Ni, Pb, Rb, Se, Sr, Tl, U, V, Zn u 5%  $\text{HNO}_3$  (Inorganic Ventures, Virginia, SAD) i otopina za razrjeđivanje (6%  $\text{HNO}_3$ , 0,5%  $\text{HCl}$ ). Otopina za razrjeđivanje dobivena je miješanjem 60 mL 69%-tne dušične kiseline (VWR International BVBA, Pennsylvania, SAD), 14 mL *TraceSELECT* 34-37%-tne klorovodične kiseline (Honeywell, North Carolina, SAD) i 5 mL standarda zlata sastava 1001  $\mu\text{g/mL}$  Au u 10%  $\text{HCl}$  (Inorganic Ventures, Virginia, SAD). Klorovodična i dušična kiselina koriste se kao pogodan matriks za ICP-MS analizu, a zlato se dodalo kako bi oksidiralo živu i iniciralo stvaranje živinog (II) klorida, blokirajući interferenciju žive. Standard se razrijedio u različitim omjerima s otopinom za razrjeđivanje u odmjernim tikvicama volumena 50 mL (). Iz odmjernih tikvica sadržaj je prebačen u *Falcon* kivete te su s time pripreme za kalibraciju završene.

### **3.6. PRIPREMA UZORKA**

Za pripremu uzoraka odvagano je po 1 gram svakog uzorka kombuche na analitičkoj vagi (Sartorius Croatia, Zaprešić, Hrvatska). Za vaganje tekućina korištene su teflonske kivete sa

zapreminom volumena od 100 mL mikrovalne peći *Ethos Up* (Milestone, Sorisole, Italija). Prije unosa analita u mikrovalnu peć, za digestiju i homogenizaciju uzorcima je dodano 1 mL 30%-tnog vodikovog peroksida (Honeywell, North Carolina, SAD) i 3 mL 69%-tne dušične kiseline (VWR International BVBA, Pennsylvania, SAD). Teflonske kivete s tretiranim uzorcima stavljene su u smeđi plašt, poklopljene teflonskim poklopcem na koji dolazi smeđi sigurnosni ventil. Sve se to stavlja u bijeli element i učvršćuje zatezanjem. Bijeli elementi su potom stavljani u mikrovalnu peć te je uključen program spaljivanja u trajanju od 70 minuta pri temperaturi od 99°C i tlaku 70 bara. Program je osmišljen tako da se zadana temperatura, postignuta postupnim zagrijavanjem, održava do 60-te minute.. Zadnjih 10 minuta predodređeno je za hlađenje mikrovalne peći. Nakon digestije uzoraka, potrebno je 45 minuta da se uzorci temperiraju. Kada su se uzorci temperirali sadržaj iz teflonskih kiveta prebacio se u *Falcon* kivete volumena 50 mL (Falcon, Arizona, SAD), te kivete su se naknadno isprale destiliranom vodom. Svakom uzorku se, zatim, dodalo 250 µL standarda zlata sastava 1001 µg/mL Au u 10% HCl (Inorganic Ventures, Virginia, SAD) i 700 µL *TraceSELECT* 34-37%-tna klorovodične kiseline (Honeywell, North Carolina, SAD). Budući da je ukupni volumen potreban za analizu 50 mL, ostatak volumena do 50 mL nadopunjen je destiliranom vodom. Uzorci kombuche tada su bili spremni za analizu ICP-MS metodom.

### **3.7. MJERENJE**

Mjerenje koncentracije analita provedeno je u duplikatu na ICP-MS Agilent 7800 analizatoru (Agilent, California, SAD). Prije samog mjerenja provedena je kalibracija na način da su izmjerene koncentracije pripremljenih otopina mješavine standarda u koncentracijama od 25, 50, 100, 200, 300 i 400 µg/L te je na temelju izmjerenih podataka stvorena kalibracijska krivulja ključna za točno i precizno preračunavanje intenziteta signala analita u koncentraciju. *Falcon* kivete s uzorcima stavljene su u analizator te je intenzitet svakog analita izmjeren u *parts per bilion* koji se pomoću kalibracijske krivulje pretvara u µg/L. Za kvantificiranje signala i preračunavanje u koncentracije korišten je „*MassHunter Quantitative Analysis*“ softver. Dobiveni rezultati su potom obrađeni u *Excel* programu.

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

### 4.1. REZULTATI

Dobiveni rezultati mjerenja izraženi su u jedinici CPS (engl. *Counts per second*), stoga su se trebali preračunati u obliku srednje vrijednosti koncentracija i standardne devijacije dvaju mjerenja. Rezultati analita, izmjerenih u svakom uzorku kombuche posebice, izraženi su u  $\mu\text{g/L}$  i  $\text{mg/L}$ .

Koncentracije elemenata u tragovima izmjerene su u pet različitih uzoraka kombucha napitka tehnikom masene spektrometrije s induktivno spregnutom plazmom. Sastav uzoraka 1-5 prethodno je detaljno opisan. Mjerenje analita u uzorcima provedeno je u duplikatu, a dobiveni rezultati prikazani su u tablici (Tablica 6.) u obliku srednjih vrijednosti sa standardnom devijacijom zajedno s literaturnim podacima.

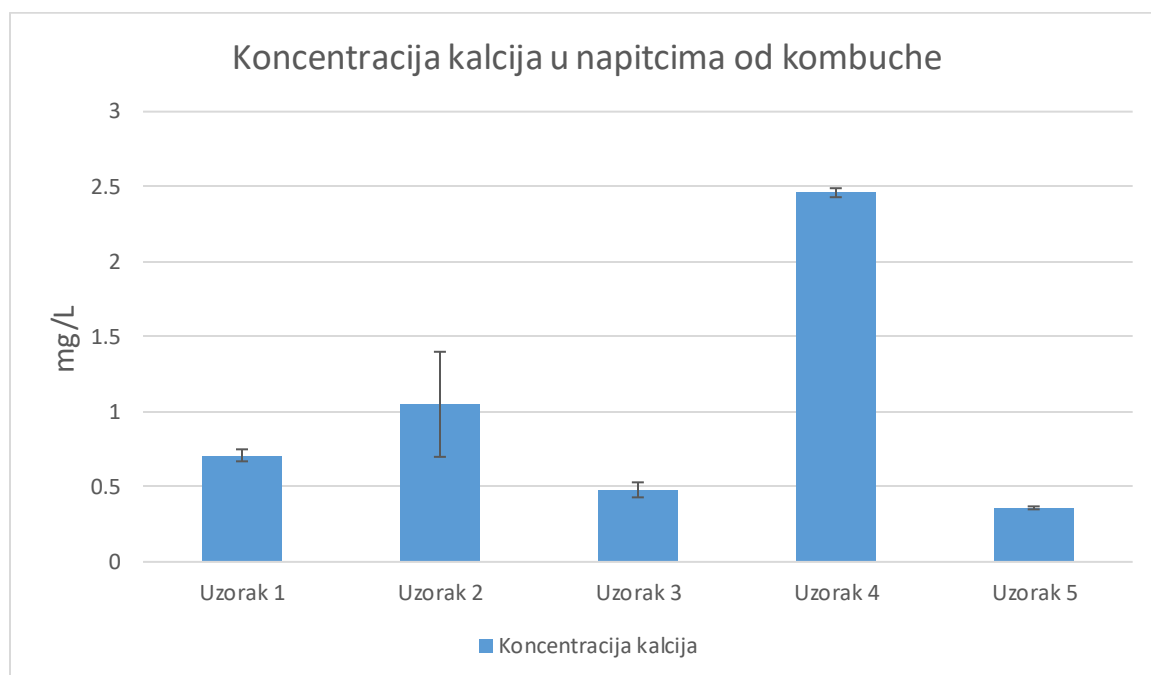
**Tablica 6.** Prikaz srednjih vrijednosti koncentracija i standardnih devijacija elemenata kalcija, željeza, magnezija, cinka i mangana u uzorcima kombucha napitaka, u usporedbi s vrijednostima iz literature (Villarreal-Soto i sur., 2018)

	Uzorak 1	Uzorak 2	Uzorak 3	Uzorak 4	Uzorak 5	Literaturni podaci
<b>Ca</b> (mg/L)	$0,71 \pm 0,04$	$1,05 \pm 0,03$	$0,48 \pm$ $0,05$	$2,46 \pm$ $0,03$	$0,36 \pm$ $0,01$	N/A
<b>Fe</b> ( $\mu\text{g/L}$ )	$15,00 \pm$ $1,14$	$14,51 \pm$ $0,84$	$22,94 \pm$ $1,54$	$35,19 \pm$ $0,39$	0	100 – 400
<b>Mg</b> (mg/L)	$2,22 \pm 0,1$	$25,32 \pm$ $2,49$	$1,47 \pm$ $0,04$	$3,59 \pm$ $0,07$	$0,32 \pm$ $0,02$	N/A
<b>Zn</b> ( $\mu\text{g/L}$ )	$19,65 \pm$ $1,77$	$34,21 \pm$ $4,60$	$16,42 \pm$ $7,59$	$25,35 \pm$ $2,99$	$12,22 \pm$ $0,11$	100 – 400
<b>Mn</b> ( $\mu\text{g/L}$ )	$35,32 \pm$ $1,42$	$351,60 \pm$ $10,78$	$27,21 \pm$ $0,19$	$34,01 \pm$ $0,16$	$6,02 \pm$ $0,23$	100 – 400

#### 4.1.1. Sadržaj kalcija u kombucha napitcima

Koncentracije kalcija u svih pet uzoraka kombucha napitaka prikazane su vertikalnim stupčastim dijagramom (Slika 1.). Najmanja koncentracija kalcija izmjerena je u uzorku 5 te iznosi 0,36 mg/L. Najviša koncentracija kalcija prisutna je u uzorku 4 te iznosi 2,46 mg/L. Prosječna potreba za kalcijem kod odrasle osobe neovisno o spolu iznosi 750 mg/dne (EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies, 2015a).

To bi značilo da se u 100 mL napitka od kombuche s najvećom količinom kalcija nalazi 0,033% kalcija potrebnog za adekvatan dnevni unos.

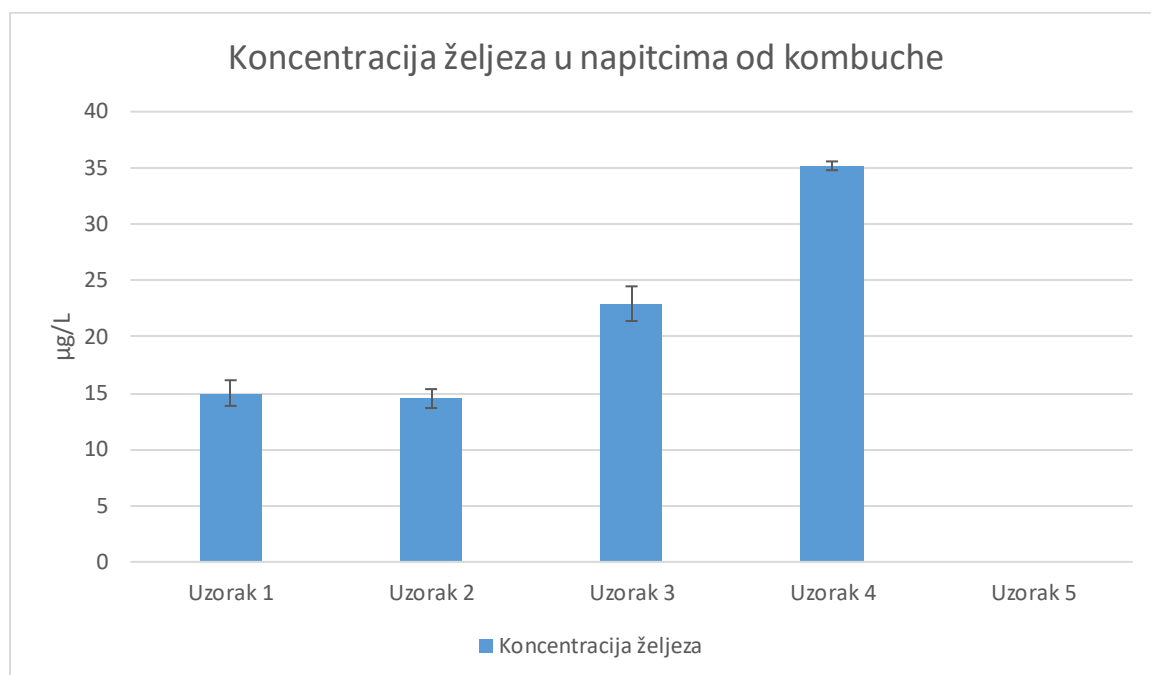


Slika 1. Grafički prikaz koncentracije kalcija prisutne u uzorcima kombucha napitaka 1-5 izražene u mg/L.

#### 4.1.2. Sadržaj željeza u kombucha napitcima

Koncentracije željeza izmjerene u pet uzoraka kombucha napitaka prikazane su vertikalnim stupčastim dijagramom (Slika 2.). U uzorku 5 koncentracija željeza nije detektabilna, a najviša koncentracija željeza prisutna je u uzorku 4 i iznosi 35,19  $\mu\text{g/L}$ . Prosječna potreba za željezom kod odrasle muške osobe iznosi 6 mg/dne, a kod odrasle ženske osobe 7 mg/dne (EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies, 2015b).

Prema tome, u 100 mL napitka od kombuche nalazi se 0,059% željeza potrebnog za adekvatan dnevni unos kod muškaraca, a kod odraslih žena 0,050%.



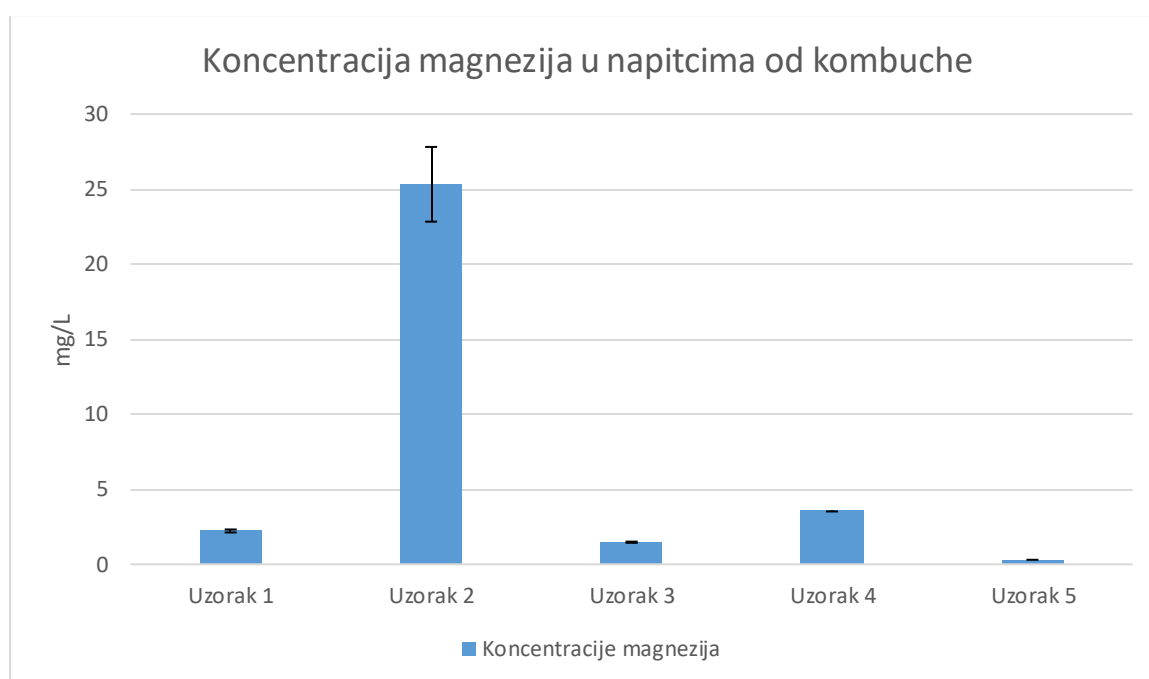
Slika 2. Grafički prikaz koncentracije željeza prisutne u uzorcima kombucha napitaka 1-5 izražene u  $\mu\text{g/L}$ .



### 4.1.3. Sadržaj magnezija u kombucha napitcima

Izmjerene vrijednosti koncentracije magnezija u pet uzoraka kombucha napitaka prikazane su vertikalnim stupčastim dijagramom (Slika 3.). U uzorku 5 određena je najniža koncentracija magnezija (0,32 mg/L). Najviša koncentracija magnezija detektirana je u uzorku 2 i iznosi 25,32 mg/L. Preporučeni unos magnezija za odrasle muške osobe iznosi 350 mg/dne, a za odrasle ženske osobe 300 mg/dne (EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies, 2015c).

Prema navedenim podacima, u 100 ml napitka od kombuche nalazi se 0,723% magnezija potrebnog za preporučeni unos kod muškaraca. Prema preporučenom dnevnom unosu magnezija kod žena, u 100 ml napitka od kombuche prisutno je 0,844% magnezija.

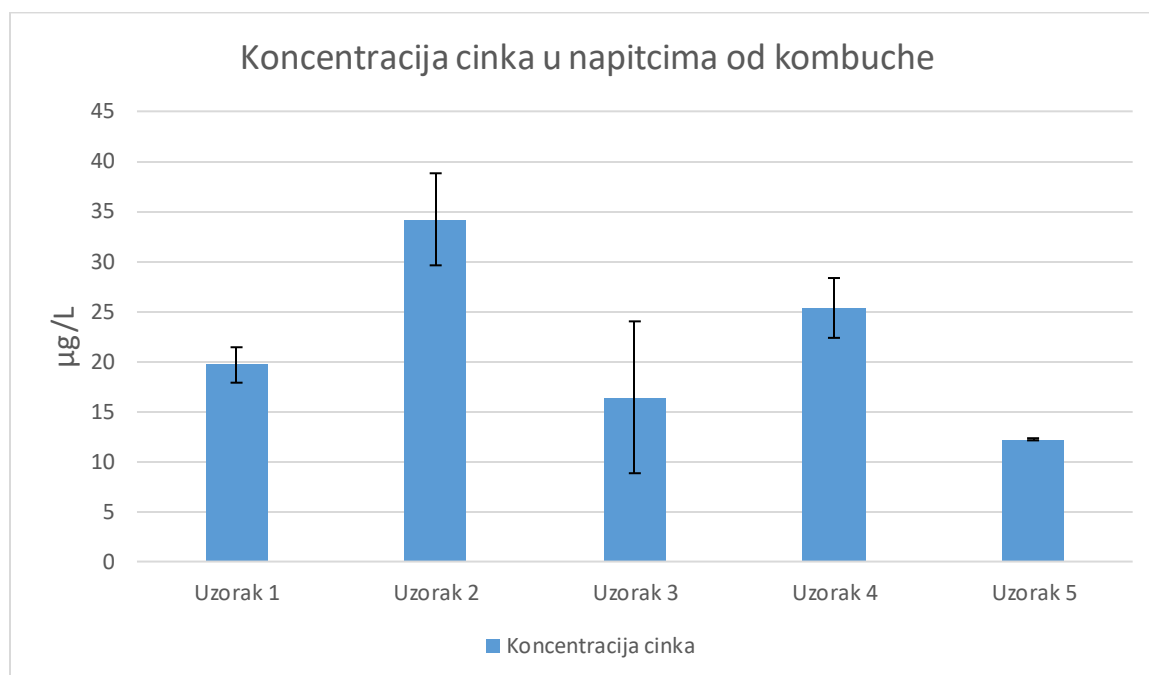


Slika 3. Grafički prikaz koncentracije magnezija prisutne u uzorcima kombucha napitaka 1-5 izraženih u mg/L.

#### 4.1.4. Sadržaj cinka u kombucha napitcima

Vrijednosti koncentracije cinka u pet uzoraka kombucha napitaka prikazane su vertikalnim stupčastim dijagramom (Slika 4.). Uzorak 5 sadrži najnižu koncentraciju cinka, koja iznosi 12,22  $\mu\text{g/L}$ . Uzorak 2 sadrži najvišu koncentraciju cinka u iznosu od 34,21  $\mu\text{g/L}$ . Referentni unos stanovništva za cink ovisi o količini fitinske kiseline unesene u organizam. Naime, fitinska kiselina inhibira apsorpciju cinka stvarajući netopljive komplekse, čime onemogućuje vezanje cinka za nosač preko kojeg se cink apsorbira (Čvorišćec i sur. ured., 2009). U slučaju unosa fitinske kiseline u iznosu od 600 mg/dne, referentni unos zinka kod odraslih muškaraca je 11,7 mg/dne, a kod žena 9,3 mg/dne (EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies, 2014).

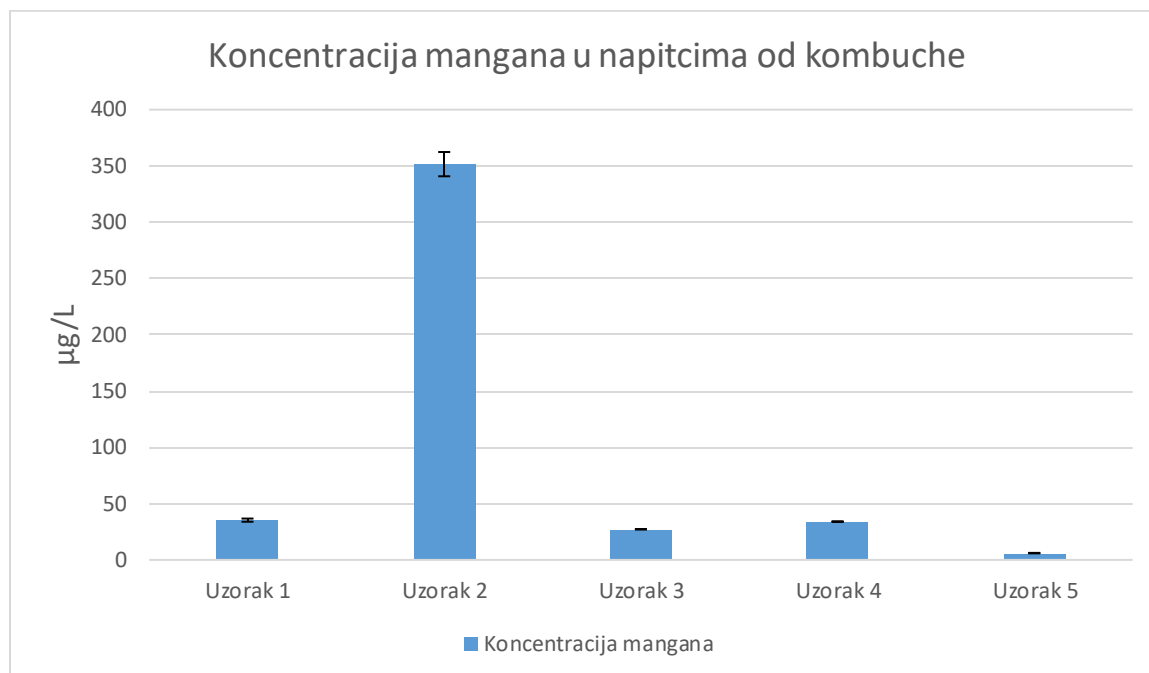
U 100 ml napitka od kombuche s najvišom koncentracijom cinka nalazi se 0,029% preporučenog dnevnog unosa cinka za muškarace te 0,037% preporučenog dnevnog unosa za žene.



Slika 4. Grafički prikaz koncentracije cinka prisutne u uzorcima kombucha napitaka 1-5 izražene u  $\mu\text{g/L}$ .

#### 4.1.5. Sadržaj mangana u kombucha napitcima

Koncentracije mangana u uzorcima kombucha napitaka prikazane su vertikalnim stupčastim dijagramom (Slika 5.). Najniža koncentracija mangana prisutna je u uzorku 5 i iznosi 6,02  $\mu\text{g/L}$ . U uzorku 2 prisutna je najviša koncentracija mangana i ona iznosi 351,60  $\mu\text{g/L}$ . Preporučeni dnevni unos mangana za odrasle osobe, neovisno o spolu, iznosi 3 mg/dne, što znači da je u 100 mL kombucha napitka prisutno 1,172% preporučenog dnevnog unosa mangana za odrasle osobe (EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies, 2013).



Slika 5. Grafički prikaz koncentracije mangana prisutne u uzorcima kombucha napitaka 1-5 izražene u  $\mu\text{g/L}$ .

#### 4.2. RASPRAVA

Prema podacima iz tablice 6. i grafičkim prikazima (slika 1.-5.) vidljivo je da se vrijednosti minerala u uzorcima kombuche dobivene ICP-MS analizom razlikuju od literaturnih vrijednosti, ali i međusobno. Kao što je već spomenuto, napitci od kombuche po svome su kemijskom sastavu različiti i ovisе o brojnim čimbenicima, čime se usporedba njihovog sastava otežava. Ovisno o pH, temperaturi, duljini fermentacije, početnim količinama i vrstom sastojaka koncentracija minerala i drugih dobrobitnih aktivnih sastojaka uvelike varira. Prema tome, važno je naglasiti da su literaturni podaci vezani uz drugačiji tip kombuche. Analiza uzoraka korištenih u ovome radu do sada nije provedena te trenutno ne postoje podaci o

koncentracijama minerala. U ovome radu prvi su puta izmjerene koncentracije minerala kalcija, magnezija, željeza, cinka i mangana u kombucha napitcima preuzetih od Cidrani d.o.o. tvrtke. U literaturnom navodu prosječne koncentracije u napitcima od kombuche za minerale kalcij i magnezij nisu navedene, a za željezo, cink i mangan izražene su u  $\mu\text{g/L}$ .

U uzorcima kombucha napitaka dobiven je koncentracijski raspon kalcija u vrijednosti 0,36-2,46  $\text{mg/L}$ . Zbog nedostatka literaturnog podatka o koncentraciji kalcija, usporedba dobivenih rezultata s literaturnim nije moguća. Prema uzorku s najvećom koncentracijom kalcija, 100 mL kombucha napitka sadrži 0,033% vrijednosti prosječne dnevne potrebe za kalcijem kod odrasle osobe (EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies, 2015a).

Napitci od kombuche prema literaturi sadrže prosječno 100 – 400  $\mu\text{g/L}$  željeza (Villarreal-Soto i sur., 2018). U kontrolnom uzorku 5 željezo nije detektabilno, a u uzorcima pod brojem 1-4 koncentracijski raspon željeza iznosi 14,51-35,19  $\mu\text{g/L}$ . Vrijednosti željeza u analiziranim uzorcima kombucha napitaka znatno su niže od prosječnog koncentracijskog raspona navedenog u literaturi. Prema uzorku s najvišom koncentracijom željeza (uzorak broj 4), u 100 ml kombucha napitka nalazi se 0,059% željeza potrebnog za adekvatan dnevni unos kod muškaraca te 0,050% kod odraslih žena (EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies, 2015b).

U literaturi prosječna koncentracija magnezija prisutna u kombuchi nije navedena. Dobiveni rezultati analize uzoraka kombucha napitaka čine koncentracijski raspon magnezija 0,32-25,32  $\text{mg/L}$ . Prema uzorku s najvećom koncentracijom magnezija (uzorak broj 2) u 100 ml napitka od kombuche prisutno je 0,723% vrijednosti preporučenog dnevnog unosa magnezija kod odraslih muškaraca te 0,844% kod odraslih žena (EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies, 2015c).

Kombucha napitci prema literaturi sadrže 100-400  $\mu\text{g/L}$  cinka (Villarreal-Soto i sur., 2018). Dobivene koncentracije cinka u uzorcima napitaka od kombuche čine raspon 2,22-34,21  $\mu\text{g/L}$ . Koncentracije analiziranih uzoraka kombuche znatno su niže od vrijednosti iz literature. U 100 ml napitka od kombuche s najvišom koncentracijom cinka (uzorak broj 2) prisutno je 0,029% preporučenog dnevnog unosa cinka kod muškaraca te 0,037% kod žena (EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies, 2014).

Prema literaturi, prosječna koncentracija mangana u kombucha napitku iznosi 100-400  $\mu\text{g/L}$ . Dobiveni koncentracijski raspon analiziranih uzoraka napitaka od kombuche iznosi 6,02-351,60  $\mu\text{g/L}$ . Uzorci pod brojem 1,3,4 i 5 sadrže znatno nižu koncentraciju mangana u usporedbi s koncentracijskim rasponom iz literature. Uzorak broj 2 (351,60  $\mu\text{g/L}$ ) kompatibilan je literaturnom koncentracijskom rasponu te po prisutnosti mangana pripada gornjem dijelu

raspona. U 100 ml napitka od kombuche s najvišom koncentracijom mangana (uzorak broj 2) prisutno je 1,172% preporučenog dnevnog unosa mangana za odrasle osobe (EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies, 2013).

Prema grafičkim prikazima (slika 1.-5.) može se uočiti razlika u koncentraciji minerala kontrolnog uzorka pod brojem 5 i ostalih uzoraka pod brojem 1-4. Naime, koncentracija minerala u uzorku broj 5 primjetno je niža od ostalih uzoraka. Posebice je razlika vidljiva u sadržaju željeza pri čemu u uzorku 5 željezo nije detektabilno. Kao što je spomenuto, jedan od čimbenika koncentracijske varijabilnosti napitaka od kombuche je vrsta sastojka korištenog u proizvodnji. Prisutnost različitog bilja poput metvice, đumbira te drugih dodataka kao što su med, inulin i ekstrakt kave, potencijalno utječe na odstupanje koncentracija uzoraka kombucha napitaka pod brojem 1-4. Osim potencijalnog utjecaja na koncentracije minerala, različiti sastojci imaju i dodatan povoljan učinak na ljudski organizam. Nastavak rasprave donosi komentare na utjecaj različitih dodataka u kombucha napitcima na zdravlje organizma.

#### **4.2.1. ZAČINI I ZAČINSKO BILJE**

Začini (engl. *spices*) i začinsko bilje (engl. *herbs*) po definiciji su aromatične biljne tvari prisutne u cijelini, izlomljene ili u mljevenom obliku, s primarnom funkcijom obogaćenja okusa hrane. Glavna razlika između začina i začinskog bilja jest taj da začin može biti bilo koji dio biljke osim listova, dok začinsko bilje uvijek predstavlja listove biljke (Vázquez-Fresno i sur., 2019.). Iako se u prehrani koriste u svrhu obogaćenja okusa hrane, a ne u nutritivne svrhe, začini i začinsko bilje pokazali su različite pozitivne utjecaje na zdravlje ljudskog organizma. Dokazana su snažna antioksidativna, antimikrobna i protuupalna svojstva brojnih začina i začinskog bilja te je u skladu s njima primjećen pozitivan učinak protiv kardiovaskularnih bolesti, neurodegenerativnih stanja, dijabetesa tipa 2, kronične upale i karcinoma (Vázquez-Fresno i sur., 2019.). Djelovanje začina i začinskog bilja temelji se na bioaktivnim sastavnicama koje su uključene u različite protuupalne putove djelujući na specifične receptore ili enzime. Bioaktivni spojevi u začinskom bilju i začinima zovu se fitokemikalije, od kojih su posebno istaknuti jednostavni fenoli, fenolne kiseline, kumarini, terpenoidi i alkaloidi (Vázquez-Fresno i sur., 2019., Kaefer i Milner, 2008). Začini i začinsko bilje s protuupalnim djelovanjem su timijan, mravinac (origano), ružmarin, kadulja, bosiljak, paprena metvica, kurkuma, kopar, peršin, cimet, klinčić, muškatni orah, limunska trava, đumbir, čili paprika i papar (Vázquez-Fresno i sur., 2019.).

#### 4.2.1.1. METVICA

Metvica predstavlja rod biljke koja pripada porodici Lamiaceae. Ova porodica obuhvaća približno 7285 vrsta u 250 rodova rasprostranjenih diljem svijeta od čega je većina prisutna u Sredozemlju (Sierra i sur., 2022.). Metvice su specifične su po blago oporom, svježem okusu s učinkom hlađenja za koji je zaslužan mentol (Vázquez-Fresno i sur., 2019.). Mentol je ciklički monoterpenski alkohol koji, osim aktiviranja receptora za hladnoću u sluznici i koži, pokazuje protuupalno, antimikrobno, analgetsko i antikancerogeno djelovanje. Najzastupljeniji je spoj paprene metvice (lat. *Mentha × piperita* L.), autohtone vrste Europe i Bliskog Istoka (Zhao i sur., 2022.; Vázquez-Fresno i sur., 2019.). Glavni mehanizam djelovanja mentola uključuje aktivaciju kationskog kanala prijelaznog receptorskog potencijala melastatina 8 (engl. *transient receptor potential melastatin 8*, TRPM8) te posljedično inhibiciju kemijskih i mehanosenzornih odgovora nociceptivnih TRP kanala i smanjeno otpuštanje proupalnih medijatora iz živčanih završetaka (Zhao i sur., 2022.). Osim mentola, paprena metvica sadrži i druge bioaktivne molekule poput mentona, flavonoida, fenolnih kiselina i lignana (Vázquez-Fresno i sur., 2019.). Navedene molekule pripadaju skupini polifenola, molekula koje proizvode biljke za različite funkcije, uključujući zaštitu protiv stresa, UV (engl. *ultra-violet*, UV) zračenja i nametnika (Williamson i Sheedy, 2020.). U prehrani polifenoli dokazano djeluju blagotvorno na razne aspekte ljudskog organizma. Osim što imaju protuupalni, antioksidativni, antimikrobni, antiproliferativni i proapoptotički učinak, pokazalo se da smanjuju rizik od dijabetesa tipa 2 te djeluju kardioprotektivno. Naime, nakon obroka, polifenoli mogu usporiti pretvorbu ugljikohidrata u jednostavne šećere, što rezultira manjim porastom šećera u krvi nakon jela i posljedično manjim rizikom od dijabetesa tipa 2 i srčanih bolesti (<https://joinzoe.com/learn/what-are-polyphenols>, pristupljeno 22.3.2023.; Del Bo' i sur., 2019.). Listovi paprene metvice najčešće se primjenjuju sami ili s drugim biljkama u obliku čaja. Od njih se proizvodi eterično ulje, a metvica se može koristiti kao dodatak u raznim drugim namirnicama (Sierra i sur., 2022.; Vázquez-Fresno i sur., 2019.).

#### 4.2.1.2. ĐUMBIR

Đumbir (lat. *Zingiber officinale*) je zeljasta biljka iz porodice Zingiberaceae. koja potječe iz jugoistočne Azije te se stoljećima koristi u obliku mirisnog začina i biljnog lijeka za ublažavanje boli, mučnine i povraćanja (Vázquez-Fresno i sur., 2019.; Anh i sur., 2020). Đumbir je u raznim istraživanjima pokazao protuupalno, antibakterijsko, antipiretičko, antilipidemičko, antitumorsko i antiangiogeno djelovanje (Vázquez-Fresno i sur., 2019). Blagotvorno djelovanje na ljudsko zdravlje temelji se na glavnim bioaktivnim vrstama spojeva

đumbira poput đinđerola, šogaola, zingiberena, zingerona i kurkumina, a bogat je i drugim važnim spojevima poput terpena, vitamina i minerala (Anh i sur., 2020.). Primarni i najzastupljeniji bioaktivni spoj u svježem đumbiru je 6-đinđerol. Đinđerol je fitokemijska sastavnica fenola koja aktivira receptore začina na jeziku te je odgovorna za ljuti okus đumbira (Alharbi i sur., 2022). Zbog fenolne strukture, 6-đinđerol ima sposobnost primanja elektrona, pri čemu u organizmu hvata slobodne radikale i stvara stabilan fenoksilni radikal. Neutraliziranjem slobodnih radikala đinđerol inhibira oksidativni stres te djeluje protektivno na organe. Protektivna uloga 6-đinđerola temelji se na sposobnosti inhibicije ekspresije proupalnih citokina poput IL-6, IL-1, TNF- $\alpha$  i proupalne signalne molekule NF- $\kappa$ B te vaskularnog endotelnog faktora rasta (engl. *Vascular endothelial growth factor*, VEGF). Među ostalim, 6-đinđerol pozitivno utječe na regulaciju unutarstaničnog prometa glukoze u stanicama skeletnih mišića. Naime, on povećava aktivnost glikogen sintaze 1, enzima zaslužnog za skladištenje glukoze u obliku glikogena, te aktivira ekspresiju GLUT4 (engl. *Glucose transporter type 4*) transportera na površini stanice, što rezultira smanjenjem koncentracije glukoze u krvi (Alharbi i sur., 2022). Termičkom obradom đinđeroli se lako pretvaraju u šogaole, vaniloide s elektrofilnom nezasićenom karbonilnom skupinom, temeljem biološke aktivnosti. 6-šogaol je derivat šogaola koji predstavlja glavnu bioaktivnu sastavnicu osušenog đumbira. 6-šogaol također ima protuupalni učinak. U raznim istraživanjima dokazana je značajna inhibicija znakova upale, kao što je infiltracija leukocita ili stvaranje edema, te je uočen neuroprotektivan učinak (Bischoff-Kont i Fürst, 2021).

#### **4.2.2. MED**

Med je slatki tekući produkt pčela i po sastavu jedna od najsloženijih prirodnih namirnica. Stoljećima je korišten u drevnim civilizacijama Egipta, Grčke, Kine i Rimskog Carstva u svrhu liječenja rana i bolesti crijeva te za liječenje kašlja, grlobolje i uhobolje. Med predstavlja snažnu funkcionalnu namirnicu bogatu hranjivim tvarima za održavanje optimalnog stanja vitalnih organa u tijelu (Pasupulet i sur., 2017). U svome sastavu med prosječno sadrži više od 200 različitih sastavnica, međutim kemijski sastav uvelike ovisi o geografskom porijeklu i o vrsti biljaka tog podneblja, zajedno s drugim čimbenicima, kao što su klimatski uvjeti (Valverde i sur., 2022). Najzastupljenije molekule u medu su različite vrste šećera i oligosaharida, od kojih je najdominantnija fruktoza, zatim glukoza. Uz šećere, med sadrži širok spektar enzima, organskih kiselina, polifenola, vitamina i minerala. Od minerala najzastupljeniji su željezo i cink (Zaid i sur., 2021). Dosada su istraživanja pokazala ljekovite učinke meda koji uključuju antioksidativno, hepatoprotektivno, kardioprotektivno,

antibakterijsko, protuupalno i antitumorsko djelovanje. Antimikrobna aktivnost meda temelji se na proizvodnji vodikovog peroksida preko enzima glukoza oksidaze, kiselosti meda, prisutnosti pčelinjeg defenzina-1, malog kationskog proteina bogatog cisteinom, i osmolarnosti (Zaid i sur., 2021). Name, visok sadržaj šećera i nizak pH u medu rezultat su oksidacije glukoze u glukonsku kiselinu pomoću enzima glukoza-oksidaze pri čemu se kao nusprodukt oslobađa vodikov peroksid, spoj koji djeluje kao antibakterijsko sredstvo. Uz to, enzim glukoza oksidaza djeluje na fibroblaste i aktivatore epitelnih stanica i na taj način potiče zacjeljivanje tkiva (Pasupuleti i sur., 2017). Antioksidativan učinak u medu imaju polifenoli te određeni vitamini i minerali. Flavonoidi, sekundarni metaboliti polifenola prisutni u medu, dodatno potiču koronarnu vazodilataciju, uspostavljanje vaskularne homeostaze, smanjuju mogućnost stvaranja tromba te regulaciju lipidnog statusa. Njihovom potrošnjom smanjuje se rizik od kardiovaskularnih bolesti (Pasupuleti i sur., 2017). Nadalje, sastav fruktoze i glukoze u medu ima pozitivno djelovanje na kontrolu glikemije, hormona koji reguliraju unos glukoze i tek te posljedično na samu potrošnju energije. Fruktoza stimulira glukokinazu u hepatocitima, enzim odgovoran za unos i skladištenje glukoze u jetri, a glukoza pospješuje apsorpciju fruktoze i potiče njezino djelovanje u jetri. Zbog hipoglikemijskog učinka, a i ostalih blagotvornih učinaka meda, sve se učestalije koristi kao sladilo u zamjenu za rafinirani šećer koji se sastoji od gotovo 100% saharoze (Bobiš i sur., 2018).

#### **4.2.3. KAVA**

Kava je u svijetu vrlo popularan kuhani napitak koji se priprema od prženih sjemenki biljaka roda *Coffea* L. Dvije glavne komercijalne vrste kave su Arabica (*Coffea arabica* L.) i Robusta (*Coffea canephora* Pierre ex A.Froehner). Posljednjih godina počela su se ispitivati svojstva kave koja pozitivno utječu na održavanje zdravlja. Naime, nova istraživanja pokazuju da potrošnja kave može pomoći u prevenciji nekoliko kroničnih bolesti, uključujući dijabetes melitus tipa 2 i bolesti jetre (Olechno i sur., 2021.; Nieber, 2017.). Korisni učinci kave temelje se na aktivnim sastojcima prisutnim u kavi poput polifenola. Od polifenola glavna fenolna kiselina u kavi je 5-kafeoilkininska kiselina koja posjeduje antioksidativna svojstva (Olechno i sur., 2021.). Osim toga, kava je bogata mikroelementima kalijem, magnezijem, cinkom i manganom. Oni su važni za održavanje biokemijskih procesa u tijelu optimalnim. Također podržavaju različite mehanizme važne za suzbijanje oksidativnog stresa (Nieber, 2017.). Ostali sastojci prisutni u sjemenkama kave su ugljikohidrati, bjelančevine, masti, alkaloidi, diterpeni, slobodne aminokiseline, niacin i prekursor vitamina B3. Međutim, važno je napomenuti da je učinak kave na ljude individualan. Neki su ljudi osjetljiviji na učinke od drugih.



Intraindividualne razlike djelomično se temelje na toleranciji, a potencijalno postoji i genetska osnova (Olechno i sur., 2021.).

#### **4.2.4. KOMBUCHA NAPITAK U ULOZI SIMBIOTIKA**

Za optimalnu funkciju ljudskog organizma vrlo je važna prisutnost mikrobiote. Naime, na epitelnim sluznicama tijela poput kože, gastrointestinalnog trakta, respiratornog trakta i ženskog reproduktivnog trakta obitavaju trilijuni mikroba iz domene bakterija, eukariota, arheja i virusa. Najveći broj mikroorganizama prisutan je u gastrointestinalnom sustavu te oni, zajedno s pojedinim metabolitima, pružaju zaštitnu, strukturnu i razne metaboličke funkcije koje pridonose razvoju imunskog sustava i efikasnom korištenju energije u organizmu (Matijašić i sur., 2020; Antal i sur., 2019). Sastav crijevne mikrobiote razlikuje se između pojedinaca te ovisi o različitim čimbenicima kao što su prehrana, konzumiranje lijekova, dob i zemljopisni položaj. Najzastupljenije bakterije u gastrointestinalno sustavu su roda Bacteroidetes i Firmicutes, a u manjem broju prisutne su *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Verrucomicrobia* i *Fusobacteria* (Čipčić Paljetak i sur., 2022; Antal i sur., 2019). Od eukariota, u gastrointestinalnom sustavu prisutne su tri vrste gljivica, *Ascomycota*, *Basidiomycota* i *Zygomycota* koje među ostalim uključuju rodove poput *Candide*, *Saccharomyces*, *Penicillium*, *Malassezia* i *Cladosporium* (Matijašić i sur., 2020). Zbog neizostavnih uloga kojima mikrobiota pridonosi homeostazi organizma, smatra se "esencijalnim organom" ljudskog tijela. Poremećaj dinamike mikroorganizama u domaćinu utječe na optimalnu funkciju organizma i time na razvoj mnogih bolesti, uključujući neurodegenerativne, kardiovaskularne, metaboličke i gastrointestinalne bolesti (Chen i sur., 2021).

Za održavanje uravnotežene dinamike mikrobiote u prehrani se koriste probiotici i prebiotici. Probiotici su, prema definiciji Organizacije za prehranu i poljoprivredu Ujedinjenih Naroda (engl. *The Food and Agriculture Organization of the United Nations*, FAO), živi sojevi strogo odabranih mikroorganizama koji, kada se daju u odgovarajućim količinama, pozitivno utječu na zdravlje domaćina (Food and Agriculture Organization (FAO), 2002). Prebiotici predstavljaju neodrživu komponentu hrane koja pruža domaćinu zdravstvene dobrobiti povezane s modulacijom mikrobiote (Food and Agriculture Organization, 2007). Po strukturi većina identificiranih prebiotika su oligosaharidi uključujući fruktooligosaharide i galaktosaharoidne, te polisaharidi poput inulina, refluks škroba, celuloze, hemiceluloze ili pektina. Svaki prebiotik ima posebnu fiziološku ulogu te je vezan za određenu vrstu mikroorganizama koji ga koriste kao izvor energije i ugljika. Uz prebiotike i probiotike postoje

namirnice koje sadrže oboje te se one stoga zovu simbiotici. Oni daju sinergistički učinak probiotika i prebiotika te su stvoreni kako bi probiotici imali veću šansu preživljenja u gastrointestinalnom traktu (Markowiak i Slizewska, 2017).

Temeljno obilježje kombucha napitka je SCOBY, kultura bakterija i gljivica koje su ujedino i sastavni dio ljudske crijevne mikrobiote. SCOBY tipično uključuje bakterije octene kiseline (*Acetobacter*, *Gluconobacter*), bakterije mliječne kiseline (*Lactobacillus*, *Lactococcus*) i kvasce (*Saccharomyces*, *Zygosaccharomyces*). Nakon fermentacije od gljivica naprisutnijima su se pokazali rodovi *Candida* i *Zygosaccharomyces*, a od bakterija *Komagataeibacter*, *Lyngbya*, *Gluconobacter*, *Lactobacilli* i *Bifidobacteria* (Dimidi i sur., 2019). Kultura bakterija i gljivica ima ulogu probiotika. Dobrobiti probiotika uključuju proizvodnju antimikrobnih metabolita, natjecanje s patogenima za adheziju na epitel te inhibiciju proizvodnje bakterijskih toksina (Markowiak i Slizewska, 2017). Određene vrste bakterija prisutne u kombucha napitcima proizvode celulozu. Neke od njih su *Aerobacter*, *Agrobacterium*, *Azotobacter*, *Rhizobium*, *Salmonella* i *Gluconacetobacter* (Villarreal-Soto i sur., 2018). Celuloza sintetizirana od bakterija po strukturi je linearni polimer koji se sastoji od molekula glukoze povezanih  $\beta$ -1,4 glikozidnim vezama. Bakterije sintetiziraju vlakna celuloze izuzetne čistoće i visokog stupnja čvrstoće. Stvorena vlakna sadrže pore različitih veličina u koje se mogu ukomponirati drugi polimeri poput ostalih metabolita mikroorganizama, ali i same stanice mikroorganizama. Zbog navedenih svojstava celuloza ima ulogu matrice ostalih probiotika i prebiotika te na taj način pospješuje preživljenje povoljnih mikroorganizama u gastrointestinalnom sustavu (Zhantlessova i sur., 2022.). Prisutnost probiotika i prebiotika u kombucha napitku čini ga simbiotikom. U ulozi simbiotika kombucha napitci imaju potencijalan blagotvoran učinak na održavanje ravnoteže crijevne mikrobiote te s time i na poboljšane imunomodulacijske sposobnosti mikrobiote. Održavanjem ravnoteže crijevne mikrobiote, simbiotici inhibiraju proizvodnju nepoželjnih metabolita, a stimuliraju metabolizam na način da se povećava razina kratkolančanih masnih kiselina, ketona, ugljikovih disulfida i metil acetata. Simbiotici djeluju antibakterijski, antikancerogeni i antialergijski te se pokazalo da mogu biti učinkoviti u prevenciji osteoporoze i u smanjenju razine šećera u krvi (Markowiak i Slizewska, 2017).

#### **4.2.4.1. AGAVIN INULIN**

Agavin inulin je dijetalno vlakno koje spada u tip fruktana, ugljikohidratnog polimera sastavljenog od molekula fruktoze. Po strukturi je polisaharid koji čine linearni i razgranati

lanci fruktoze, povezani  $\beta$ -2,1 i  $\beta$ -2,6 glikozidnim vezama. Inulin se izravno u gastrointestinalnom sustavu ne može razgraditi i apsorbirati, međutim mogu ga fermentirati mikroorganizmi mikrobiote. Prema navedenim karakteristikama u prehrani se koristi u ulozi prebiotika. U studijama se pokazalo da inulin agave lako fermentiraju bakterije roda *Lactobacillus* i *Bifidobacteria* što pozitivno utječe na njihov rast. Osim toga, bakterije poput *Akkermansia* i *Ruminococcus* mogu u debelom crijevu hidrolizirati inulin i proizvoditi kratkolančane masne kiseline. Stvaranjem kratkolančanih kiselina inulin pomaže u ublažavanju blagih upalnih odgovora te pomaže u regulaciji razine kolesterola i glukoze u krvi (Guo i sur., 2021.; Holscher i sur., 2015.). Inulin je jedini prebiotik koji je zbog dobrobiti na gastrointestinalni sustav odobren od strane Europske agencije za sigurnost hrane. U prehrani se koristi kao dodatak za ublažavanje metaboličkih poremećaja, poput pretilosti i dijabetesa (Guo i sur., 2021.).

## 5. ZAKLJUČCI

1. U ovome je radu po prvi puta analizirano 5 vrsta napitaka od kombuche, 4 domaćeg proizvođača „CIDRANI“ i 1 kontrolni uzorak tvrtke Ekipa d.o.o., s različitim sastavom i dodacima koji pridonose unosu nekih mikroelemenata, često nazivanih biogeni elementi te pojedinih biološki aktivnih tvari koje pomažu u održavanju zdravlja ljudskog organizma.

2. U uzorcima su tehnikom masene spektrometrije s induktivno spregnutom plazmom određene koncentracije kalcija, željeza, magnezija, cinka i mangana. Dobiveni rezultati izraženi u  $\mu\text{g/L}$  i  $\text{mg/L}$  pokazali su se niskima. Na temelju niskih vrijednosti koje su izmjerene, može se zaključiti da analizirani napitci od kombuche ne predstavljaju bogat izvor analiziranih biogenih elemenata. Međutim, redovitim korištenjem takvih napitaka možemo utjecati na njihovo sinergističko djelovanje sa sastojcima prisutnim u hrani s ciljem održavanja homeostaze organizma. Minerali kalcij, željezo, magnezij, cink i mangan ključni su kofaktori u velikom broju enzima aktivnim u raznim biokemijskim procesima u tijelu od metabolizma lipida i glukoze te stanične signalizacije do regulacije sinteze deoksiribonukleinske kiseline.

3. Najniže koncentracije analiziranih biogenih elemenata prisutne su u kontrolnome uzorku 5, koji je po sastavu najjednostavniji jer ne sadrži dodatne sastojke. Prema tome, dodatni sastojci prisutni u kombucha napitcima, poput začinskog bilja i meda, pozitivno utječu na razine minerala koje su dostupne u napitcima od kombuche.

4. Kombucha u svome sastavu, osim minerala, sadrži kulturu bakterija i gljivica te komponente s prebiotičkom aktivnosti. Prema tome, u ulozi simbiotika, kombucha napitak vrlo je

blagotvoran za održavanje optimalne dinamike mikrobiote u gastrointestinalnom sustavu i sukladno s time podržava rad gastrointestinalnog sustava, imunskog sustava, živčanog i kardiovaskularnog sustava.

5. Napitak od kombuche s minimalom koncentracijom sladila predstavlja kvalitetan funkcionalni napitak s mnogim dobrobitima za održavanje vitalnosti i zdravlja ljudskog organizma.

## 6. POPIS KRATICA, OZNAKA I SIMBOLA

AI	preporučeni unos (engl. <i>Adequate Intake</i> )
AR	prosječna potreba (engl. <i>Average Requirement</i> )
CPS	engl. <i>Counts per second</i>
CSD	kortikalno širenje depresije
DCYTB	duodenalni citokrom B
DMT1	dvovalentni metal transporter 1 (engl. <i>Divalent metal transporter 1</i> )
DRVs	referentne prehrambene vrijednosti (engl. <i>Dietary Reference values</i> )
EAE	eksperimentalni autoimuni encefalomijelitis
GABA	$\gamma$ -aminomaslačna kiselina
GLUT4	engl. <i>Glucose transporter type 4</i>
GSH	glutation (engl. <i>Gluthatione</i> )
HCP1	hem transporter hem nosača proteina 1 (engl. <i>Haem carrier protein 1</i> )
HEPH	hefestin
ICP-MS	tehnika masene spektrometrije s induktivno spregnutom plazmom (engl. <i>Inductively coupled plasma mass spectrometry</i> )
IFN- $\gamma$	interferon $\gamma$
IL-2	interleukin 2
KMB	krvno-moždana barijera
mg/L	miligram po litri
MS	maseni spektrometar
MTs	metalotioneini
MTF-1	metalni regulatorni transkripcijski faktor 1 (engl. <i>Metal regulatory transcription factor 1</i> )
NADPH	nikotinamid adenin dinukleotid fosfat
NF- $\kappa$ B	engl. <i>Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
NMDA	N-metil-D-aspartat receptor
Nrf2	nuklearni faktor eritroid v2 povezan s faktorom 2
PRI	raspon populacijskog referentnog unosa (engl. <i>Population Reference Intake</i> )
pr.n.e.	prije nove ere
PTH	paratireoidni hormon
PTH1R	PTH1 receptor
RF	radiofrekvencija (engl. <i>Radiofrequency</i> )

RI	referentni unos (engl. <i>Reference intake</i> )
ROS	reaktivne kisikove vrste (engl. <i>Reactive oxygen species</i> )
SCOPY	kultura bakterija i gljivica (engl. <i>Symbiotic Culture of Bacteria and Yeast</i> )
SLC30	engl. <i>Solute-linked carrier genes</i>
SOD1	Cu/Zn- superoksid dismutaza
Tf	transferin
Th stanice	T pomoćne stanice (engl. <i>T helper cells</i> )
TNF- $\alpha$	faktor nekroze tumora alfa
TRPM	engl. <i>Transient Receptor Potential-Melastatin Channel</i>
TRPV6	engl. <i>Transient receptor potential cation channel vanilloid family member 6</i>
UL	gornja granica unosa (engl. <i>Tolerable Upper Intake Level</i> )
UVB	ultraljubičasto zračenje (engl. <i>ultraviolet</i> )
VEGF	vaskularni endotelni faktor rasta (engl. <i>Vascular endothelial growth factor</i> )
VDR	receptor vitamina D
ZIP	Zrt-, Irt-srodan protein
ZnFTS	kofaktor u stvaranju aktivnog timulina
ZnT	engl. <i>Zinc transporter</i>
$\mu\text{g/L}$	mikrogram po litri

## 7. LITERATURA

Al Hakkani MF. Guideline of inductively coupled plasma mass spectrometry “ICP MS”: fundamentals, practices, determination of the limits, quality control, and method validation parameters. *SN Applied Sciences*, 2019,

Alharbi K, Nadeem M, et al. Gingerol, a Natural Antioxidant, Attenuates Hyperglycemia and Downstream Complications. *Metabolites*, 2022, 12, 1274-1291.

Anh N, Kim S, Long N., Min, J., Yoon, Y., Lee, E., Kwon, S. Ginger on Human Health: A Comprehensive Systematic Review of 109 Randomized Controlled Trials. *Nutrients*, 2020, 12, 157-185.

Antal I, Jelić M, et al. Ljudska mikrobiota i mikrobiom. *Acta Med Croatica*, 2019, 73, 3-11

Balachandran RC, Mukhopadhyay S, et al. Brain manganese and the balance between essential roles and neurotoxicity. *J Biol Chem*. 2020, 295, 6312–6329.

Bedard K, Krause, KH. The NOX Family of ROS-Generating NADPH Oxidases: Physiology and Pathophysiology. *Physiol rev*. 2007, 87, 245-313.

Bhattarai HK, Shrestha S, Rokka K, Shakya R. Vitamin D, Calcium, Parathyroid Hormone, and Sex Steroids in Bone Health and Effects of Aging. *J Osteoporos*, 2020, vol.2020., 1-10.

Bischoff-Kont I, Fürst R. Benefits of Ginger and Its Constituent 6-Shogaol in Inhibiting Inflammatory Processes. *Pharmaceuticals*, 2021, 14, 571- 590.

Bobiş O, Dezmirean DS, Moise AR. Honey and Diabetes: The Importance of Natural Simple Sugars in Diet for Preventing and Treating Different Type of Diabetes. *Oxid Med Cell Longev*. 2018, vol. 2018, 1-12.

Bouyahya A, Mechchate H, et al. Health Benefits and Pharmacological Properties of Carvone. *Biomolecules*. 2021, 11, 1803-1829.

Bulska E, Wagner B. Quantitative aspects of inductively coupled plasma mass spectrometry. *Phil. Trans. R. Soc. A*, 2016, 374, 18 str.

Chen P, Bornhorst J, Aschner M. Manganese metabolism in humans. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2018, 23, 1655-1679.

Chen Y, Zhou J, Wang L. Role and Mechanism of Gut Microbiota in Human Disease. *Front Cell Infect Microbiol*. 2021, 11

Choi S, Liu X, Pan Z. Zinc deficiency and cellular oxidative stress: prognostic implications in cardiovascular diseases. *Acta Pharmacol Sin*. 2018, 39, 1120–1132.

Čipčić Paljetak H, Barešić A, et al. Gut microbiota in mucosa and feces of newly diagnosed, treatment-naïve adult inflammatory bowel disease and irritable bowel syndrome patients. *Gut Microbes*. 2022, 14, 21.str.

Cormick G, Belizán JM. Calcium Intake and Health. *Nutrients*, 2019, 11, 1606-1622.

Čvorišćec D, Čepelak I. Štrausova medicinska biokemija. Zagreb. *Medicinska naklada.*, 3.izd. 2019, 743 str.

da Silva Júnior JC., Mafaldo IM, de Lima Brito I, Tribuzy de Magalhaes Cordeiro AM. Kombucha: Formulation, chemical composition, and therapeutic potentialities. *Current Research in Food Science*, 2022, 5, 360-365.

Del Bo' C, Bernardi S, et al. Systematic Review on Polyphenol Intake and Health Outcomes: Is there Sufficient Evidence to Define a Health-Promoting Polyphenol-Rich Dietary Pattern? *Nutrients*. 2019, 11, 1355- 1410.

Dimidi E, Cox SR, Rossi M, Whelan K. Fermented Foods: Definitions and Characteristics, Impact on the Gut Microbiota and Effects on Gastrointestinal Health and Disease. *Nutrients*. 2019, 11, 1806-1832.



EFSA (European Food Safety Authority). Dietary Reference Values for nutrients Summary report. *EFSA supporting publication*. 2017, 14, 1-98.

EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies. Scientific Opinion on Dietary Reference Values for manganese. *EFSA Journal*. 2013, 11, 3419-3463.

EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies. Scientific Opinion on Dietary Reference Values for zinc. *EFSA Journal*. 2014, 12, 3844-3920.

EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies. Scientific Opinion on Dietary Reference Values for calcium. *EFSA Journal*. 2015a, 13, 4101-4183.

EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies. Scientific Opinion on Dietary Reference Values for iron. *EFSA Journal*. 2015b, 13, 4254-4369.

EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies. Scientific Opinion on Dietary Reference Values for magnesium. *EFSA Journal*. 2105c, 13, 4186-4249.

Elstrott B, Khan LO, Raghunathan V, De Loughery T, Shatzel J. (2020). The role of iron repletion in adult iron deficiency anemia and other diseases. *Eur J Haematol*. 2020, 104, 153-161.

Escobedo-Monge MF, Barrado E, et al. Magnesium Status and Ca/Mg Ratios in a Series of Children and Adolescents with Chronic Diseases. *Nutrients*, 2022, 14, 2941-2972.

Fiorentini D, Cappadone C, Farruggia G, Prata C. Magnesium: Biochemistry, Nutrition, Detection, and Social Impact of Diseases Linked to Its Deficiency. *Nutrients*. 2021, 13, 1136-1180.

Fischer V, Haffner-Luntzer M, Amling M, Ignatius A. Calcium and vitamin D in bone fracture healing and post-traumatic bone turnover. *Eur Cell Mater*. 2018, 35, 365-385.

Fleet JC. Vitamin D-Mediated Regulation of Intestinal Calcium Absorption. *Nutrients*. 2022, 14, 3351-3565.

Food and Agriculture Organization (FAO). Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. *Report of a Joint FAO/WHO Working Group on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food*. 2002.

Food and Agriculture Organization. FAO Technical Meeting on Prebiotics: Food Quality and Standards Service (AGNS), Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). *FAO Technical Meeting Report*. 2007.

Gammoh NZ, Rink L. Zinc in Infection and Inflammation. *Nutrients*. 2017, 9, 624-649.

Gattermann N, Muckenthaler MU, Kulozik AE, Metzgeroth G, Hastka J. The Evaluation of Iron Deficiency and Iron Overload. *Dtsch Arztebl Int*. 2021, 118, 847-856.

Gault VA., McClenaghan NH. Understanding Bioanalytical Chemistry Principles and applications. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2009, 395, 1941-1942.

Gröber U, Schmidt J, Kisters K. Magnesium in Prevention and Therapy. *Nutrients*. 2015, 7, 199-226.

Guo Y, Yu Y, Li H, et al. Inulin supplementation ameliorates hyperuricemia and modulates gut microbiota in Uox-knockout mice. *Eur J Nutr*. 2021, 60, 2217-2230..

Guyton AC, Hall JE. Textbook of Medical Physiology. Philadelphia. *Elsevier Inc*. 2006, 11th edition. 1152 str.

Hannan FM, Babinsky VN, Thakker RV. Disorders of the calcium-sensing receptor and partner proteins: insights into the molecular basis of calcium homeostasis. *J Mol Endocrinol*. 2016, 57, 127-142.

Haschka D, Hoffmann A, Weiss G. Iron in immune cell function and host defense. *Semin Cell Dev Biol*. 2021, 115, 27-36.

Hassan-Smith Z, Gittoes N. Hypocalcaemia. *Medicine*, 2021, 45, 562-566.

Holscher HD, Bauer LL, Gourineni V, Pelkman CL, Fahey GC Jr, Swanson KS. Agave Inulin Supplementation Affects the Fecal Microbiota of Healthy Adults Participating in a Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Crossover Trial. *J Nutr.* 2015, 14, 2025-2032.

Jakubczyk K, Kałduńska J, Kochman J, Janda K. Chemical Profile and Antioxidant Activity of the Kombucha Beverage Derived from White, Green, Black and Red Tea. *Antioxidants.* 2020, 9, 447-462.

Kaefer CM, Milner JA. The role of herbs and spices in cancer prevention. *J Nutr Biochem.* 2008, 19, 347-361.

Kafina MD, Paw BH. Intracellular iron and heme trafficking and metabolism in developing erythroblasts. *Metallomics.* 2017, 9, 1193-1203.

Kambe T, Tsuji T, Hashimoto A, Itsumura N. The Physiological, Biochemical, and Molecular Roles of Zinc Transporters in Zinc Homeostasis and Metabolism. *Physiol Rev.* 2015, 95, 749–784.

Kapp JM, Sumner W. Kombucha: a systematic review of the empirical evidence of human health benefit. *Ann Epidemiol.* 2019, 30, 66-70.

Katz N, Rader DJ. Manganese homeostasis: from rare single-gene disorders to complex phenotypes and diseases. *J Clin Invest.* 2019, 129, 5082-5085.

Kostov K. Effects of Magnesium Deficiency on Mechanisms of Insulin Resistance in Type 2 Diabetes: Focusing on the Processes of Insulin Secretion and Signaling. *Int J Mol Sci.* 2019, 20,1351- 1366.

Lanser L, Fuchs D, Kurz K, Weiss G. Physiology and Inflammation Driven Pathophysiology of Iron Homeostasis-Mechanistic Insights into Anemia of Inflammation and Its Treatment. *Nutrients.* 2021, 13, 3732- 3761.

Li B, Cui W, et al. Zinc is essential for the transcription function of Nrf2 in human renal tubule cells in vitro and mouse kidney in vivo under the diabetic condition. *J Cell Mol Med.* 2014, 18, 895–906.

Mahadea D, Adamczewska E, et al. Iron Deficiency Anemia in Inflammatory Bowel Diseases- A Narrative Review. *Nutrients.* 2021, 13, 4008- 4021.

Maier JA, Pickering G, Giacomoni E, Cazzaniga A, Pellegrino P. Headaches and Magnesium: Mechanisms, Bioavailability, Therapeutic Efficacy and Potential Advantage of Magnesium Pidolate. *Nutrients.* 2020, 12, 2660- 2674.

Male D, Brostoff J, Roth DB, Roitt IM. Immunology. New York, *Elsevier*, 2012, 432 str.

Mammadova-Bach E, Braun A. Zinc Homeostasis in Platelet-Related Diseases. *Int J Mol Sci.* 2019, 20. 5258-5274.

Markowiak P, Śliżewska K. Effects of Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics on Human Health. *Nutrients.* 2017, 9, 1021-1051.

Martínez Leal J, Suárez LV, Jayabalan R, Oros JH, Escalante-Aburto A. A review on health benefits of kombucha nutritional compounds and metabolites. *CyTA - Journal of Food*, 16 2018. 390-399.

Matijašić M, Meštrović T, Paljetak HČ, Perić M, Barešić A, Verbanac D. Gut Microbiota beyond Bacteria-Mycobiome, Virome, Archaeome, and Eukaryotic Parasites in IBD. *Int J Mol Sci.* 2020, 21, 2668- 2679.

McCabe SM, Zhao N. The Potential Roles of Blood-Brain Barrier and Blood-Cerebrospinal Fluid Barrier in Maintaining Brain Manganese Homeostasis. *Nutrients.* 2021, 13,1833-1846.

Nieber K. The Impact of Coffee on Health. *Planta Med.* 2017, 83, 1256-1263.

Silva BN, Cadavez V, Ferreira-Santos P, Alves MJ, Ferreira ICFR, Barros L, Teixeira JA, Gonzales-Barron U. Chemical Profile and Bioactivities of Extracts from Edible Plants Readily Available in Portugal. *Foods*. 2021, 10, 673-693.

Olechno E, Puścion-Jakubik A, Socha K, Zujko ME. Coffee Infusions: Can They Be a Source of Microelements with Antioxidant Properties? *Antioxidants*. 2021, 10, 1709-1738.

Olechnowicz J, Tinkov A, Skalny A, Suliburska J. Zinc status is associated with inflammation, oxidative stress, lipid, and glucose metabolism. *J Physiol Sci*. 2018, 68, 19-31.

Pasupuleti VR, Sammugam L, Ramesh N, Gan SH. Honey, Propolis, and Royal Jelly. A Comprehensive Review of Their Biological Actions and Health Benefits. *Oxid Med Cell Longev*. 2017, vol.2017, 1-22.

Pepe JC, Biamonte F, et al. Diagnosis and management of hypocalcemia. *Endocrine*. 2020, 69, 485-495.

Razzaque MS. Magnesium: Are We Consuming Enough? *Nutrients*. 2018, 10, 1863-1871.

Read SA, Obeid S, Ahlenstiel C, Ahlenstiel G. The Role of Zinc in Antiviral Immunity. *Adv Nutr*. 2019, 10, 696-710.

Sanna A, Firinu D, Zavattari P, Valera P. Zinc Status and Autoimmunity: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Nutrients*. 2018, 10, 68- 99.

Sierra K, Naranjo L, Carrillo-Hormaza L, Franco G, Osorio E. Spearmint (*Mentha spicata* L.) Phytochemical Profile: Impact of Pre/Post-Harvest Processing and Extractive Recovery. *Molecules*. 2022, 27, 2243- 2257.

Skrajnowska D, Bobrowska-Korczak B. Role of Zinc in Immune System and Anti-Cancer Defense Mechanisms. *Nutrients*. 2019, 11, 2273- 2301.

Valverde S, Ares AM, Stephen Elmore J, Bernal J. Recent trends in the analysis of honey constituents. *Food Chem*. 2022, 387, 1-14.

Vázquez-Fresno R, Rosana ARR, Sajed T, Onookome-Okome T, Wishart NA, Wishart DS. Herbs and Spices- Biomarkers of Intake Based on Human Intervention Studies - A Systematic Review. *Genes Nutr.* 2019, 14, 1-27.

Villarreal-Soto SA, Beaufort S, et al. Understanding Kombucha Tea Fermentation: A Review. *J Food Sci.*, 2018, 83, 580-588.

Wan Y, Zhang B. The Impact of Zinc and Zinc Homeostasis on the Intestinal Mucosal Barrier and Intestinal Diseases. *Biomolecules.* 2022, 12, 900-915.

Weyh C, Krüger K, Peeling P, Castell L. The Role of Minerals in the Optimal Functioning of the Immune System. *Nutrients.* 2022, 14, 644-659.

Williamson G, Sheedy K. Effects of Polyphenols on Insulin Resistance. *Nutrients.* 2020, 12, 3135-3153.

Zaid SSM, Ruslee SS, Mokhtar MH. Protective Roles of Honey in Reproductive Health: A Review. *Molecules.* 2021, 26, 3322-3337.

Zhantlessova S, Savitskaya I, Kistaubayeva A, Ignatova L, Talipova A, Pogrebnyak A, Digel I. Advanced "Green" Prebiotic Composite of Bacterial Cellulose/Pullulan Based on Synthetic Biology-Powered Microbial Coculture Strategy. *Polymers.* 2022, 14, 3224-3239.

## **8. SAŽETAK/SUMMARY**

### **8.1. SAŽETAK**

Napitak od kombuche predstavlja popularni napitak od fermentiranog čaja, funkcionalnu namirnicu s raznim dobrobitima poput antibakterijskog i antioksidativnog svojstva te podupiranja imunskog sustava i metabolizma. Dobrobiti kombucha napitka kriju se u bioaktivnim komponentama koje sadrži, a one uključuju aminokiseline, vitamine, polifenole, vlakna i organske kiseline. Među njima, prisutni su i važni biogeni elementi kao što su željezo, mangan i cink. Ti elementi neophodan su dio enzima ključnih u održavanju različitih biokemijskih procesa u organizmu, stoga je njihova dnevna potrošnja važna za optimalno zdravlje čovjeka. Zbog načina proizvodnje i vrste početnih sastojaka korištenih u proizvodnji, kombucha napitci su po svome sastavu raznoliki. U ovome radu prvi su se puta tehnikom masene spektrometrije s induktivno spregnutom plazmom (ICP-MS) analizirali minerali kalcija, željeza, magnezija, cinka i mangana u pet različitih uzoraka kombucha napitka, od kojih je jedan bio kontrolni uzorak. Analiza uzoraka omogućila je praćenje promjena koncentracija minerala u svakome uzorku te uvid u utjecaj različitih dodataka u uzorcima na koncentraciju samih minerala.

## **8.2. SUMMARY**

Kombucha drink is a popular drink made of fermented tea. This functional food has various health benefits including antibacterial and antioxidant properties and a role in supporting the immune system and metabolism. The benefits of the kombucha drink are founded on the bioactive components it contains, which include amino acids, vitamins, polyphenols, fibers, and organic acids. Among them, important biogenic elements such as iron, manganese, and zinc are also present. As a functional part of various enzymes, these elements are crucial in maintaining various biochemical processes in the body, therefore their daily consumption is important for optimal human health. Kombucha drinks are diverse in their composition due to differences in the production method and the type of used ingredients. In this paper, the minerals calcium, iron, magnesium, zinc, and manganese were, for the first time, analyzed with the inductively coupled plasma mass spectrometry method (ICP-MS) in five different samples of a kombucha drink, one of which was used as a control sample. The sample analysis enabled the monitoring of the change in mineral concentrations in each sample and observing the influence of different additives in the samples on the concentration of the minerals themselves.



## 9. PRILOZI

**Tablica 7.** Rezultati mjerenja koncentracije kalcija u kombucha napitcima u duplikatu zajedno sa srednjom vrijednosti i standardnom devijacijom izraženi u mg/L

	<b>Uzorak 1</b>	<b>Uzorak 2</b>	<b>Uzorak 3</b>	<b>Uzorak 4</b>	<b>Uzorak 5</b>
<b>Mjerenje 1</b>	0,74	1,30	0,51	2,49	0,35
<b>Mjerenje 2</b>	0,68	0,81	0,44	2,44	0,37
$\bar{x}$	0,71	1,05	0,48	2,46	0,36
<b>SD</b>	0,04	0,03	0,05	0,03	0,01

**Tablica 8.** Rezultati mjerenja koncentracije željeza u kombucha napitcima u duplikatu zajedno sa srednjom vrijednosti i standardnom devijacijom izraženi u  $\mu\text{g/L}$

	<b>Uzorak 1</b>	<b>Uzorak 2</b>	<b>Uzorak 3</b>	<b>Uzorak 4</b>	<b>Uzorak 5</b>
<b>Mjerenje 1</b>	15,80	15,11	24,03	34,92	0
<b>Mjerenje 2</b>	14,19	13,92	21,85	35,47	0
$\bar{x}$	15,00	14,51	22,94	35,19	0
<b>SD</b>	1,14	0,84	1,54	0,39	0

**Tablica 9.** Rezultati mjerenja koncentracije magnezija u kombucha napitcima u duplikatu zajedno sa srednjom vrijednosti i standardnom devijacijom izraženi u mg/L

	<b>Uzorak 1</b>	<b>Uzorak 2</b>	<b>Uzorak 3</b>	<b>Uzorak 4</b>	<b>Uzorak 5</b>
<b>Mjerenje 1</b>	2,29	27,08	1,50	3,54	0,30
<b>Mjerenje 2</b>	2,15	23,56	1,44	3,64	0,33
$\bar{x}$	2,22	25,32	1,47	3,59	0,32
<b>SD</b>	0,1	2,49	0,04	0,07	0,02

**Tablica 10.** Rezultati mjerenja koncentracije cinka u kombucha napitcima u duplikatu zajedno sa srednjom vrijednosti i standardnom devijacijom izraženi u  $\mu\text{g/L}$

	<b>Uzorak 1</b>	<b>Uzorak 2</b>	<b>Uzorak 3</b>	<b>Uzorak 4</b>	<b>Uzorak 5</b>
<b>Mjerenje 1</b>	18,40	30,96	21,78	27,46	12,14
<b>Mjerenje 2</b>	20,90	37,46	11,05	23,23	12,30
$\bar{x}$	19,65	34,21	16,42	25,35	12,22
<b>SD</b>	1,77	4,60	7,59	2,99	0,11

**Tablica 11.** Rezultati mjerenja koncentracije mangana u kombucha napitcima u duplikatu zajedno sa srednjom vrijednosti i standardnom devijacijom izraženi u  $\mu\text{g/L}$

	<b>Uzorak 1</b>	<b>Uzorak 2</b>	<b>Uzorak 3</b>	<b>Uzorak 4</b>	<b>Uzorak 5</b>
<b>Mjerenje 1</b>	36,32	359,22	27,34	34,13	6,18
<b>Mjerenje 2</b>	34,32	343,98	27,08	33,90	5,86
$\bar{x}$	35,32	351,60	27,21	34,01	6,02
<b>SD</b>	1,42	10,78	0,19	0,16	0,23

**10. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA / BASIC DOCUMENTATION  
CARD**

## Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu  
Farmaceutsko-biokemijski fakultet  
Studij: Medicinska biokemija  
Zavod za medicinsku biokemiju i hematologiju  
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

### Analiza minerala u napitcima od kombuche i njihova uloga u organizmu

Iva Vrdoljak-Colo

#### SAŽETAK

Napitak od kombuche predstavlja popularni napitak od fermentiranog čaja, funkcionalnu namirnicu s raznim dobrobitima poput antibakterijskog i antioksidativnog svojstva te podupiranja imunskog sustava i metabolizma. Dobrobiti kombucha napitka kriju se u bioaktivnim komponentama koje sadrži, a one uključuju aminokiseline, vitamine, polifenole, vlakna i organske kiseline. Među njima, prisutni su i važni biogeni elementi kao što su željezo, mangan i cink. Ti elementi neophodan su dio enzima ključnih u održavanju različitih biokemijskih procesa u organizmu, stoga je njihova dnevna konzumacija važna za optimalno zdravlje čovjeka. Zbog načina proizvodnje i vrste početnih sastojaka korištenih u proizvodnji, kombucha napitci su po svome sastavu raznoliki. U ovome radu prvi su se puta tehnikom masene spektrometrije s induktivno spregnutom plazmom (ICP-MS) analizirali minerali kalcija, željeza, magnezija, cinka i mangana u pet različitih uzoraka kombucha napitka, od kojih je jedan bio kontrolni uzorak. Analiza uzoraka omogućila je praćenje promjena koncentracija minerala u svakome uzorku te uvid u utjecaj različitih dodataka u uzorcima na koncentraciju samih minerala.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 53 stranice, 5 grafičkih prikaza, 11 tablica i 79 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Kombucha, ICP-MS, kalcij, željezo, magnezij, cink, mangan, začinsko bilje, začini, med, kava, mikrobiota, simbiotik, inulin

Mentor: **Izv.prof.dr. sc. Donatella Verbanac**, *izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Ocjenjivači: **Prof. dr. sc. Željko Maleš**, *redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*  
**Prof. dr. sc. Lidija Bach Rojecky**, *redovita profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen:

## Basic documentation card

University of Zagreb  
Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
Study: Medical Biochemistry  
Department of Medical Biochemistry and Hematology  
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

### Mineral analysis in Kombucha drinks and their function in the organism

Iva Vrdoljak-Colo

#### SUMMARY

Kombucha drink is a popular drink made of fermented tea. This functional food has various health benefits including antibacterial and antioxidant properties and a role in supporting the immune system and metabolism. The benefits of the kombucha drink are founded on the bioactive components it contains, which include amino acids, vitamins, polyphenols, fibers, and organic acids. Among them, important biogenic elements such as iron, manganese, and zinc are also present. As a functional part of various enzymes, these elements are crucial in maintaining various biochemical processes in the body, therefore their daily consumption is important for optimal human health. Kombucha drinks are diverse in their composition due to differences in the production method and the type of used ingredients. In this paper, the minerals calcium, iron, magnesium, zinc, and manganese were, for the first time, analyzed with the inductively coupled plasma mass spectrometry method (ICP-MS) in five different samples of a kombucha drink, one of which was used as a control sample. The sample analysis enabled the monitoring of the change in mineral concentrations in each sample and observing the influence of different additives in the samples on the concentration of the minerals themselves.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 53 pages, 5 figures, 11 tables and 79 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Kombucha, ICP-MS, calcium, iron, magnesium, zinc, manganese, herbs, spices, honey, coffee, microbiota, symbiotic, inulin

Mentor: **Donatella Verbanac, Ph.D.** *Associate Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Željko Maleš, Ph.D.** *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

**Lidija Bach Rojecky, Ph.D.** *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted:

