

Autohtone probiotičke kulture - visoko vrijedni promotori metabiotika

Lozica, Karmen

Undergraduate thesis / Završni rad

2023

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:544370>

Rights / Prava: [Attribution-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-17**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



**Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Sveučilišni prijediplomski studij Biotehnologija**

Karmen Lozica
0058217066

**AUTOHTONE PROBIOTIČKE KULTURE – VISOKO
VRIJEDNI PROMOTORI METABIOTIKA**

ZAVRŠNI RAD

Predmet: Biotehnologija 2
Mentor: Prof. dr. sc. Sunčica Beluhan

Zagreb, 2023.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Sveučilišni prijediplomski studij Biotehnologija

Zavod za Biokemijsko inženjerstvo
Laboratorij za biokemijsko inženjerstvo, industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju slada i piva

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija

Autohtone probiotičke kulture – visoko vrijedni promotori metabiotika

Karmen Lozica, 0058217066

Sažetak: Autohtone mikrobne kulture (vodena i mliječna kefirna zrnca, te *kombucha*), koje predstavljaju spontane probiotičke konzorcije, vrijedni su promotori metabiotika (prebiotika, probiotika, postbiotika i paraprobiotika). Mikrobna raznolikost takvih konzorcija omogućava im izvanrednu sposobnost zaštite od mikrobioloških kontaminanata i jedinstveno ponašanje tijekom fermentacije. Osim što konzorcij ima vlastite koristi, ta je mikrobna raznolikost poželjna i za ljude jer takve kulture proizvode mnoge bioaktivne i zdrave metabolite. Zbog nužnosti proizvodnje bioaktivnih spojeva i njihove upotrebe kao metabiotika u suvremenom zdravom načinu života, autohtone kulture su savršeni izvori složenih funkcionalnih metabolita (bioaktivni peptidi, antimikrobni spojevi, polisaharidi, enzimi, vitamini i komponente stanične stijenke). Autohtone kulture se mogu koristiti kao starter kulture na različitim supstratima ovisno o biotehnološkim procesima fermentacije. Ovaj rad pokazuje da mikrobna sinergija između bakterija i kvasaca/ili bakterija nudi novu perspektivu razvoja funkcionalnih proizvoda i uvelike utječe na kvalitetu života.

Ključne riječi: zrnca vodenog kefira, zrnca mliječnog kefira, *kombucha*, metabiotici

Rad sadrži: 33 stranice, 12 slika, 1 tablicu, 45 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: prof. dr. sc. Sunčica Beluhan

Datum obrane: 14. rujna 2023.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Undergraduate thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
University undergraduate study Biotechnology

Department of Biochemical Engineering
Laboratory for biochemical engineering, industrial microbiology, malting and brewing Technology

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Food Technology or Biotechnology or Nutrition

Artisanal probiotic cultures – high-value promoters of metabiotics

Karmen Lozica, 0058217066

Abstract: Artisanal microbial cultures (water and milk kefir grains and *kombucha*), representing spontaneous probiotic consortia, are valuable promoters of metabiotics (prebiotics, probiotics, postbiotics, and paraprobiotics). The microbial diversity of such consortia gives them extraordinary protection capacity against microbiological contaminants and unique fermentation behavior. In addition to the fact that the consortium benefits itself, this microbial diversity is also desirable for humans. Namely, such cultures produce many bioactive and healthy metabolites. Due to the necessity of bioactive compounds production and their use as metabiotics in a modern healthy lifestyle, artisanal cultures are perfect sources of complex functional metabolites (bioactive peptides, antimicrobial compounds, polysaccharides, enzymes, vitamins, and cell wall components). Artisanal cultures can be used as starter cultures on different substrates depending on the biotechnological fermentation processes. This work shows that the microbial synergy between bacteria and yeasts/ or bacteria offers a new perspective on functional product development and greatly impacts life quality.

Keywords: water kefir grains, milk kefir grains, *kombucha*, metabiotics

Thesis contains: 33 pages, 12 figures, 1 table, 45 references

Original in: Croatian

Thesis is deposited in printed and electronic form in the Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: prof. dr. sc. Sunčica Beluhan

Thesis defended: September 14, 2023

SADRŽAJ

1.UVOD.....	1
2.TEORIJSKI DIO.....	2
2.1.OPĆENITO.....	2
2.2..DEFINICIJE I POVEZNICE IZMEĐU METABIOTIKA I AUTOHTONIH KULTURA.	4
2.2.AUTOHTONE KULTURE.....	8
2.3.POTENCIJAL AUTOHTONIH KULTURA ZA PROIZVODNJU KORISNIH METABOLITA OVISNO O FERMENTACIJSKIM SUBSTRATIMA	18
2.4..FUNKCIONALNI METABOLITI AUTOHTONIH STARTER KULTURA	20
2.5.DOBIVANJE PARAPROBIOTIKA I NJIHOVA PRIMJENA	21
3.ZAKLJUČCI.....	24
4.POPIS LITERATURE	25

1. UVOD

Jedan od najučinkovitijih pristupa aktivnom pridonnošenju fizičkom i psihičkom zdravlju jest pojačavanje imuniteta pomoću funkcionalne hrane (Ashaolu, 2020). Naime, prehrana ima veliki utjecaj na mnoge čimbenike zdravlja, a otkriveno je da većina tih čimbenika započinje interakcijom unesene hrane sa crijevnom mikrobiotom, koja zatim pokreće niz posljedičnih reakcija. Zbog toga se prehrana može koristiti i za održavanje zdravlja, ali i za ublažavanje bolesti. U crijevima žive bilijuni mikroorganizama koji imaju temeljne uloge u metabolizmu, endokrinom, neuronskom, imunološkom i mnogim drugim aspektima funkcioniranja tijela (Su i Liu, 2021).

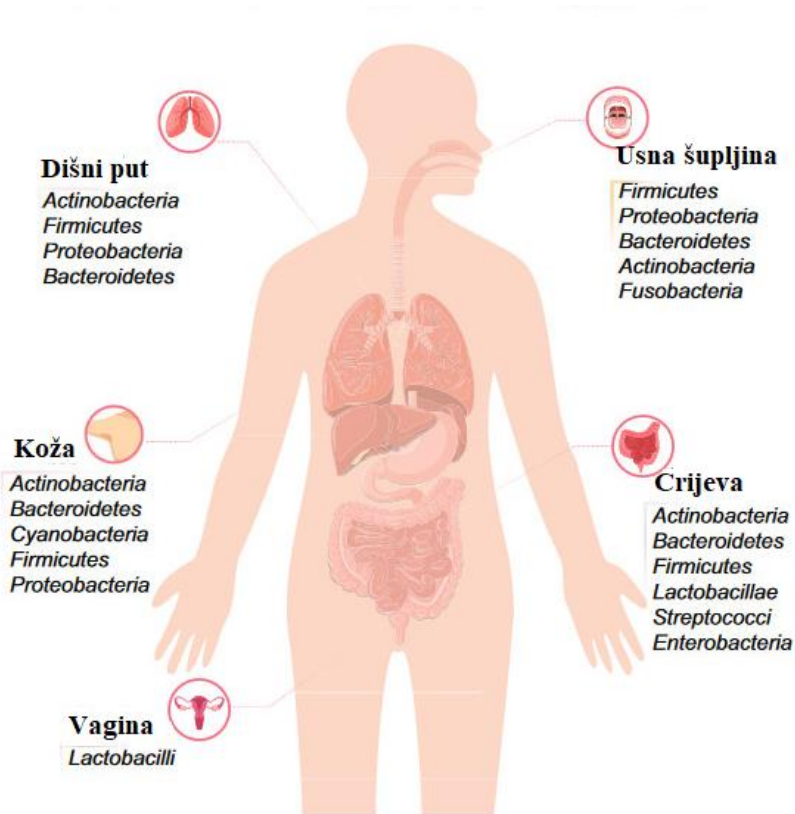
Prema globalnoj procjeni tržišta imunostimulirajuće hrane (funkcionalna hrana i sastojci), predviđa se da će se do ove, 2023. godine svjetsko tržište ove vrste hrane proširiti s 830 milijardi dolara godišnje na 1 bilijun dolara (Pihurov i sur., 2021). Probiotički mikroorganizmi zahtijevaju složene uvjete rasta, visoke troškove održavanja, osjetljivi su na gastrointestinalnu okolinu, prijenos patogenih gena, lizu stanica pri ekstremno kiselom pH, imaju široko rasprostranjenu otpornost na antibiotike i nižu vitalnost bakterija zbog nedostatka spora. Biološki rizici povezani su s dugom i nekontroliranom uporabom klasičnih probiotika (Shenderov i Gabrichevsky, 2017). U tom kontekstu, za održavanje složenog i raznolikog mikrobnog konzorcija crijeva koji sadrži razne bakterije, arheje, viruse i kvasce, novim konceptom probiotičkih staničnih komponenti, metabolita i signalnih molekula razvijena je stabilnija i učinkovitija alternativa probioticima. "Skriveni vojnici" za jačanje cjelokupne vojske imunološkog sustava domaćina nazvani su metabiotici, a obuhvaćaju prebiotike, probiotike (nutribiotike, farmakobiotike), sinbiotike, paraprobiotike i postbiotike (Singh i sur., 2018). Izvor koncepta metabiotika koji se trenutno ne upotrebljava u punom kapacitetu predstavljaju autohtone kulture, koje se nazivaju i spontani konzorciji mikroorganizama, kao što su zrnca mliječnog i vodenog kefira, te *kombucha*.

U ovom radu je iz različitih perspektiva analizirana i objašnjena povezanost između metabiotika i autohtonih probiotičkih kultura.

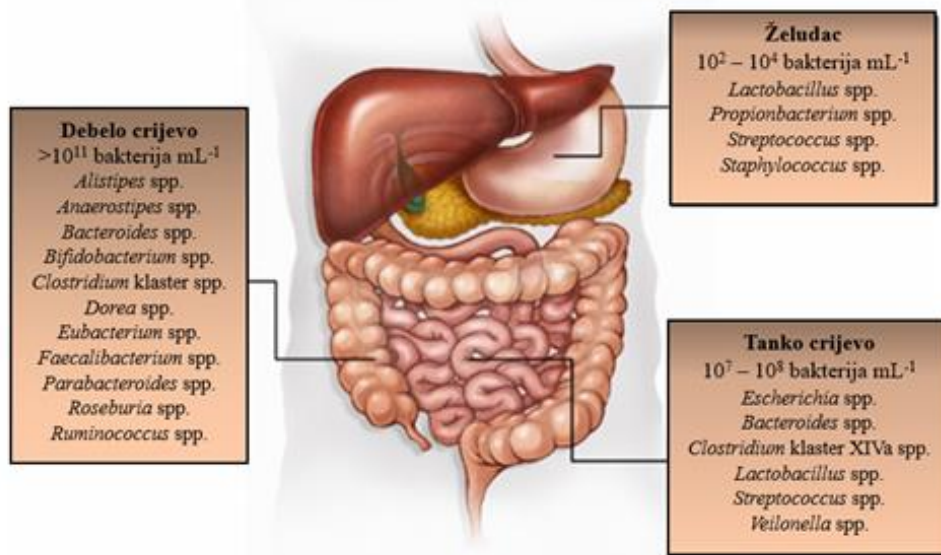
2. TEORIJSKI DIO

2.1. OPĆENITO

Fermentirana hrana se proizvodi stoljećima na temelju empirijskog znanja koje se prenosi s koljena na koljeno u različitim zemljama diljem Zemlje. Fermentacija se koristi ne samo zato što je ekonomičan način očuvanja hrane, nego i zato što je fermentirana hrana dio kulture različitih društvenih zajednica i konvencionalno je pripremana za vrijeme svetkovina i vjerskih obreda, a koristi se i u tradicionalnoj medicini (Ashaolu i sur., 2020). Ovi proizvodi se općenito proizvode u malim količinama za lokalno stanovništvo, te na razini kućanstva za potrošnju pojedinaca ili obitelji. Većina ove hrane priprema se zanemarujući sastav mikroorganizama prisutnih tijekom procesa, uključujući mikroorganizme koji koloniziraju sirovine, posuđe koje se koristi i okoliš. Ovi takozvani "spontani" procesi fermentacije obično uključuju složene interakcije između različitih kombinacija kvasaca i/ ili bakterija. Ljudsko tijelo je domaćin velikog broja mikroorganizama koji imaju značajan utjecaj na mnoge aspekte stanja samog domaćina. Naime, tijelo čovjeka sadrži više stanica raznih mikroorganizama nego vlastitih, ljudskih, eukariotskih stanica. Najveća koncentracija ljudskog mikrobioma jest u debelom crijevu, a najčešći „stanovnici“ probavnog trakta sisavaca su četiri porodice bakterija, a to su *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actionobacteria* i *Proteobacteria*, koje predstavlja 500 do 1000 različitih bakterijskih vrsta (Bradley i Pollard, 2017). Interakcija između mikrobiote i organizma domaćina ima velik utjecaj na komunikacijske signale i funkcionalnost, a također je pod utjecajem vanjskih čimbenika. Mikroorganizmi proizvode različite signalne molekule kao što su peptidi, aminokiseline, kratkolančane masne kiseline i plinoviti spojevi. Oni reagiraju na signale svojih domaćina, čime se održava veza između živčanog sustava domaćina i njegovog organizma kroz osovinu crijevo-mozak (Rutsch i sur., 2020). Naravno, konzorciji mikroorganizama se nalaze i u drugim dijelovima našeg tijela i obzirom na to gdje se nalaze, zajednice su različitog sastava. Slika 1 prikazuje udjele određenih mikroorganizama u različitim dijelovima tijela, a Slika 2 prikazuje najzastupljenije mikroorganizme u probavnom traktu te njihovu koncentraciju.



Slika 1. Zastupljenost određenih mikroorganizama u i na različitim dijelovima ljudskog tijela (prema Singh i sur., 2018)



Slika 2. Prostorna distribucija i koncentracija bakterija duž gastrointestinalnog trakta ljudi (prema Riviere i sur., 2016)

Svaka pojedina osoba ima različitu mikrobiotu na čiji sastav utječu dob, prehrana, način života, hormonalne promjene, naslijeđeni geni i slično. Prisutna mikrobiota ima veliki utjecaj na imunost sustava domaćina, psihičko zdravlje, probavu, cjelokupnu genetsku i metaboličku signalizaciju i interakciju te mnoge druge funkcije tijela. Značajno doprinosi prehranbenim potrebama domaćina tako što ti organizmi aktivno razgrađuju složene prehranbene sastojke koji bi inače bili neprobavljivi za domaćina (npr. složeni ugljikohidrati), čineći ih lako dostupnim za apsorpciju i asimilaciju. Još jedna bitna uloga mikrobiote, i to one u debelom crijevu, jest da štiti debelo crijevo od raka tako što proizvodi butirate fermentacijom složenih sastojaka. Osim toga, mikrobiota debelog crijeva također služi za opskrbu domaćina vitaminima potrebnih za razvoj. Tu se ističu bakterije kao što su *Bifidobacterium* spp., *Bacteroides* spp. i enterobakterije koje su odgovorne za proizvodnju vitamina K (Ogunrinola i sur., 2020). Zbog tako velike i važne uloge, bitno je održavanje mikroflore. Bilo zbog stresa, korištenja antibiotika, loše prehrane ili slično, u našem organizmu se može smanjiti broj dobrih mikroorganizama te narušiti cjelokupna mikrobiota. Kako se to ne bi dogodilo, ili nakon što se to već dogodilo, kako bi obnovili probiotske kulture u našem probavnom traktu, razvijeni su raznorazni preparati koji mogu sadržavati samo mikroorganizme, supstrat za poželjne mikroorganizme, te metabolite koji su rezultat njihovog djelovanja kao i njihove razne kombinacije (Singh i sur., 2018).

2.2. DEFINICIJE I POVEZNICE IZMEĐU METABIOTIKA I AUTOHTONIH KULTURA

Sinbiotik jest funkcionalna kombinacija probiotika (živih mikroorganizama s povoljnim učinkom na zdravlje domaćina) i prebiotika (selektivno fermentiranih ugljikohidrata koji služe kao hrana probioticima, a ne mogu se apsorbirati i razgraditi u probavnom traktu domaćina), dok je simbiotik kombinacija dva ili više probiotička soja.

Najčešće istraživani i dobro klasificirani prebiotici koji trenutačno dominiraju tržištem su galaktani (galaktooligosaharidi) i fruktani (fruktooligosaharidi, oligofruktoza i inulin), tj. polimeri molekula fruktoze odnosno galaktoze. Međutim, zbog želje za dobivanjem zajednice mikroorganizama s više različitih vrsta, počeli su se istraživati i neki drugi spojevi kao kandidati prebiotika. Tu je prvenstveno riječ o tvarima na bazi ugljikohidrata dobivenih iz biljaka (lignin, celuloza i hemiceluloza, te škrob, polidekstroza, ksilooligosaharidi i pektin), ali se istražuju i spojevi koji bi oponašali supstrate životinjskog podrijetla (npr. oligosaharidi prisutni u mlijeku), te tvari na bazi kvasca, ali i mnoge tvari osim ugljikohidrata (npr. polifenoli,

masne kiseline i slično) (Cunningham i sur., 2021). Predviđa se proizvodnja prebiotika iz novih izvora u budućnosti, a glavni razlog tome jest održivost, smanjeni troškovi i veća raznolikost. Tu se prvenstveno razmatraju otpadci hrane kao bogat i održiv izvor prirodnih bioaktivnih sastojaka. Osim što potiču rast „dobrih“ mikroorganizama, mješavina prebiotika različitih duljina lanaca ili specifičnih mehanizama isporuke omogućuje njihovu isporuku bez značajnih strukturnih promjena prema ciljanom dijelu debelog crijeva. To potiče selektivnu stimulaciju sojeva koji razgrađuju ugljikohidrate čime posljedično smanjuju lokalnu proteolizu i proizvodnju nepoželjnih metabolita. Poznato je da mnoge od strukturnih karakteristika nekog prebiotika određuju koji mikroorganizmi ih mogu koristiti za rast, kao što su npr. stupanj polimerizacije i grananje te povezivanje i dodavanje modifikacija (npr. funkcionalnih skupina). Zbog toga možemo ciljano promovirati rast nekih manje zastupljenih mikroorganizama ili suprimirati rast onih neželjenih (Cunningham i sur., 2021).

Probiotici su živi i nepatogeni mikroorganizmi koji služe za poboljšanje mikroflore domaćina, naročito u probavnom traktu. Oni utječu na sveukupno stanje domaćina u kojem se nalaze na mnoge načine kao što su snižavanje crijevnog pH, konkuriranje patogenim organizmima za vezanje na crijevni epitel, te modificiranje imunološkog odgovora domaćina. Pozitivno djelovanje probiotika na zdravlje dokazano je mnogo puta, a najbolji dokaz kliničke učinkovitosti jest onaj pri liječenju akutnog proljeva. Probiotski preparat trebao bi sadržavati nekoliko milijardi mikroorganizama kako bi se mogla povećati mogućnost odgovarajuće kolonizacije crijeva. Terapija takvim preparatima relativno uspješno se koristi za bolesti gastrointestinalnog trakta, Crohnovu bolest, sindrom iritabilnog crijeva i *Helicobacter pylori*. Mogu smanjiti i simptome netolerancije laktoze. Osim za ublažavanje simptoma gastrointestinalnih bolesti koriste se i za tretiranje urogenitalnih problema, pa čak i za liječenje infekcija gornjih dišnih puteva. Međutim, za dobivanje probiotika potrebni su vrlo složeni uvjeti te visoki troškovi za održavanje. Također je teško predvidjeti kakve će biti njihove interakcije sa domaćinom i drugim mikroorganizmima u probavnom traktu. Osim toga postoji opasnost od lize stanica pri ekstremno niskim pH vrijednostima koje prevladavaju u želucu zbog čega vrlo mali broj stanica na putu do crijeva ostaje živ i funkcionalan. Problemi su još i široko rasprostranjene otpornosti na antibiotike te činjenice da probiotici najčešće ne sporuliraju, a postoji i opasnost povezana s dugom i nekontroliranom uporabom klasičnih probiotika (Cunningham i sur., 2021).

Postbiotici su metaboliti topljivi u vodi ili komponente lizirane stanice čija je molekularna masa između 10 i 100 kDA (Aguilar-Toalá i sur., 2018). To su, točnije rečeno, rezultati djelovanja

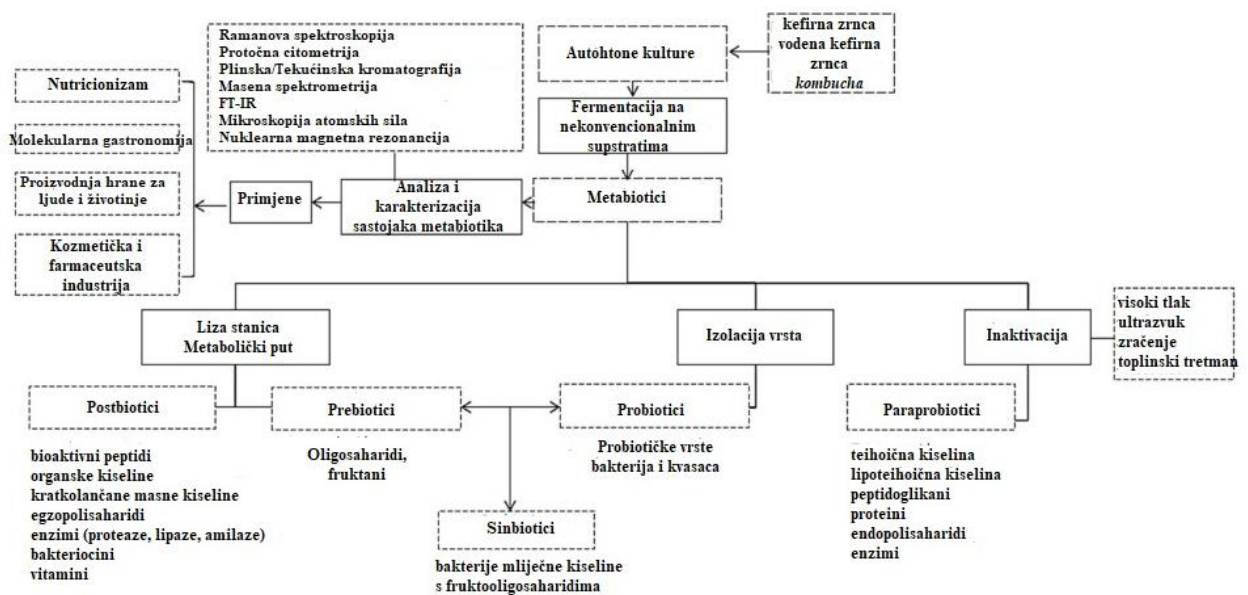
probiotskih mikroorganizama u probavnom traktu. U njih se svrstavaju kratkolančane masne kiseline, aminokiseline, proteini i peptidi, organske kiseline, enzimi, ekstracelularni polisaharidi, lizati stanica i vitamini. Postbiotički spojevi imaju visoku antimikrobnu aktivnost i otpornost na visoke temperature.

Parabiotici, nazvani „duhovima“ ili „ubijenim probioticima“ su inaktivirane mikrobne stanice, lizati stanica ili njihovi fragmenti koji potječu od probiotičkih mikroorganizama (teihonična kiselina, peptidoglikani, hitin, bakterijska DNA), a domaćinu omogućavaju fiziološka svojstva probiotika bez potencijalne opasnosti od njihove pretjerane uporabe (Singh i sur., 2018). Smatraju se sigurnijom alternativom probioticima za prerano rođenu djecu (Nataraj i sur., 2020), a također izazivaju protuupalni i pozitivan imunološki odgovor kod životinja i ljudi. Probiotički mikroorganizmi (kao što su *L. acidophilus*, *Bifidobacterium bifidum*, *Streptococcus thermophilus*) s nutritivnim funkcijama koje proizvode i održavaju vitaminsku ravnotežu ljudskog domaćina mogu se nazvati nutribioticima. Njihovo djelovanje temelji se na proizvodnji specifičnih metabolita kao što su tiamin (B₁), riboflavin (B₂), niacin (B₃), pantotenska kiselina (B₅), piridoksin (B₆), biotin (B₇), folat (B₉₋₁₁), kobalamin (B₁₂) i vitamin K, te konjugirana linolna kiselina. Nutribiotici se mogu koristiti za nutraceutske dijete i za obogaćivanje hrane, osobito fermentirane. Probiotici s farmakološkim djelovanjem za prevenciju ili liječenje bolesti (infektivni proljev, upalne bolesti crijeva, pretilost i dijabetes) nazivaju se farmabiotici. Sojevi poput *L. salivarius* i *Lactococcus lactis* primjer su farmabiotika zbog svoje sposobnosti da proizvode antimikrobne peptide i proteine kao što su bakteriocini koji su poznati kao inhibitori patogena i za liječenje malignih karcinoma (Lee i sur., 2018).

Metabiotici su molekule niske molekularne mase koje imaju raznovrsna kemijska svojstva te sposobnost interakcije s okolinom i time kontroliranja gena za različite biokemijske, fiziološke i genetske funkcije održavanja homeostaze. Ovom definicijom su obuhvaćeni različiti biološki aktivni metaboliti, signalne molekule i stanice (i žive i mrtve, te njihovi dijelovi). Glavne komponente metabiotika su kratkolančane masne kiseline, peptidi, peptidoglikanski derivati muropeptida, enzimi, polisaharidi, vitamini, teihoične kiseline (bakterijski kopolimeri glicerol fosfata ili ribitol fosfata i ugljikohidrata povezanih preko fosfodieterskih veza) i proteini. Iako su metabiotici metaboliti koje proizvodi mikrobiota domaćina, oni su vrlo strukturno slični malim molekulama koje sintetiziraju stanice samog domaćina i imaju njima sličnu funkcionalnost. Mogu se koristiti kao lijekovi, bioaktivni dodaci hrani ili kao sastojci funkcionalne hrane za obnavljanje crijevne mikrobiote. Očite prednosti metabiotika u odnosu na probiotike su što se mogu točno dozirati jer pri pH koji vlada u želudcu ne dolazi do njihovog

raspada kao što se događa sa stanicama probiotika te doza koju se pripremi bit će ona koja će biti aktivna u probavnom traktu. Naime, 95-97 % metabiotika dolazi do debelog crijeva u netaknutom obliku i ne interferiraju s ljudskom mikrobiotom. Ulaskom u probavni trakt odmah postaju aktivni. Osim toga, imaju dugi rok trajanja što olakšava njihovo skladištenje. Osim što imaju pozitivne učinke na probavni sustav, sadrže i mnoge spojeve čije djelovanje pridonosi drugim aspektima ljudskog zdravlja (Singh i sur., 2018).

Najpoznatije, proučavane i uporabljane autohtone kulture kao višestruki promotori metabiotika su zrnca mliječnog kefir, *kombucha* i zrnca vodenog kefir. Dobiveni fermentirani proizvodi smatraju se probiotičkim pićima ili prehranbenim napicima zbog implikacije probiotičkih sojeva. Na temelju složene metaboličke aktivnosti ovih mikroorganizama može se dobiti širok spektar spojeva koji imaju složene funkcije (slika 3).



Slika 3. Autohtone kulture kao višestruki promotori metabiotika (prema Pihurov i sur., 2021)

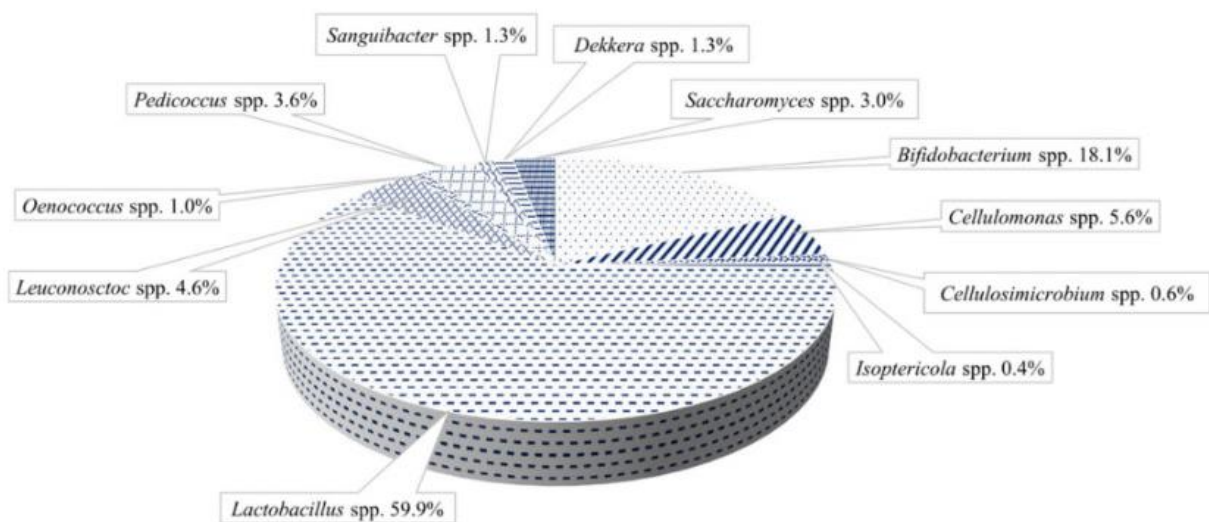
2.2. AUTOHTONE KULTURE

Autohtone kulture su simbiotske zajednice bakterija i kvasaca inkapsulirane u matricu koja je izgrađena od različitih egzopolisaharida, proteina, lipida, ugljikohidrata, aminokiselina i nukleinskih kiselina. Šećer u tim zajednicama djeluje kao imobilizator strukture i pruža zaštitu stanicama. Takve kulture su vrijedni promotori metabotika, između ostalog zato što su u takvom okruženju mikroorganizmi aktivniji jer djeluju sinergijski. Osim toga su otporni na različite nepoželjne unutarnje uvjete (kao što su sadržaj hranjivih tvari, pH, sadržaj vlage, temperaturu, različiti plinovi, itd.) te biološke uvjete (prisutnost drugih mikroorganizama i interakcije među njima). Organizmi u ovakvim kulturama imaju raznolike i složene prehrambene zahtjeve zbog čega mogu metabolizirati i neke neuobičajene supstrate. To ih čini zahvalnim biotehnološkim radnim organizmima u procesima dobivanja bioaktivnih komponenti u sklopu funkcionalne hrane, stočne hrane, lijekova ili kozmetičkih proizvoda. Najpoznatije autohtone kulture su zrnca mliječnog i zrnca vodenog kefir te *kombucha* (Pihurov i sur., 2021). Definiranje mikrobiotskog sastava autohtonih kultura je vrlo zahtjevno jer mnogi autohtoni sojevi rastu u kontroliranim uvjetima. Naime, sastav mikroorganizama je pod izravnim utjecajem geografskog područja ili sredine iz kojih su kulture izolirane, tj. gdje se one prirodno formiraju (Kalamaki i Angelidis, 2020).

2.2.1. ZRNCA VODENOG KEFIRA

Zrnca vodenog kefir sastoje se od polisaharidnog matriksa u kojem se nalazi konzorcij mikroorganizama u kojem prevladavaju bakterije mliječne i octene kiseline te određeni kvasci. Egzopolisaharidni matriks izgrađen je od dekstrana koji nastaje kao rezultat mikrobne fermentacije saharoze. Ova zrnca su dostupna širom svijeta no i dalje nije poznato njihovo pravo podrijetlo. Postoji pretpostavka da potječu iz lišća meksičke biljke kaktusa *Opuntia*. U literaturi zrnca se nalaze pod mnogim imenima. U zapadnoj Europi poznata su kao „žitarice vodenog kefir“, ali uporabljaju se još i nazivi kao što su „Tibi žitarice“, „afričke pčele“, „slatka zrna kefir“, „ale orasi“ i dr. Koriste se za pripremu vodenog kefir, fermentiranog proizvoda na bazi šećerne otopine s različitim suhim i svježim voćem. Tradicionalno piće se priprema inokulacijom 8 % -tne otopine saharoze zrnima vodenog kefir uz dodatak smokve i kriška limuna. Fermentacija se provodi jedan do dva dana na sobnoj temperaturi nakon čega kao produkt dobivamo mutno gazirano piće boje slame koje je kiselkastog okusa s malim udjelom alkohola i šećera. Najvažnije prisutne mikrobne vrste su bakterije roda *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Acetobacter* i *Gluconobacter* te kvasci *Saccharomyces cerevisiae* i *Dekkera*

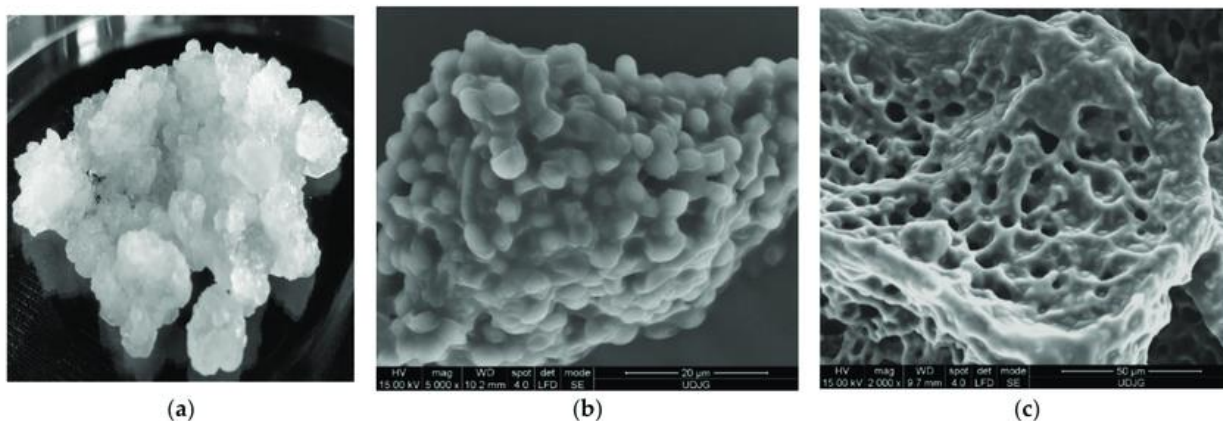
bruxellensis. Slika 4 predstavlja prosječne udjele određenih mikroorganizama u konzorciju. U već provedenim znanstvenim studijama uspješno su identificirane bakterijske vrste *Lactobacillus casei*, *L. hordei*, *L. nagelii*, *L. hilgardii*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Leuconostoc citreum*, *Acetobacter fabarum* i *A. orientail*. Identifikacija se provodi pomoću RAPD-PCR metode kojom su analizirane 16S rDNA. Kvasci koji su pronađeni u konzorciju su *Saccharomyces cerevisiae*, *Lachancea fermentati*, *H. valbyensis* i *Zygorulaspora florentia* i identificirani su metodom FTIR. Također, 57 različitih bakterija mliječne kiseline iz rodova *L. casei*, *L. hordei*, *L. hilgardii* i *Lb. mesenteroides* uspjelo je proizvesti egzopolisaharide iz saharoze (Gulitz i sur., 2011).



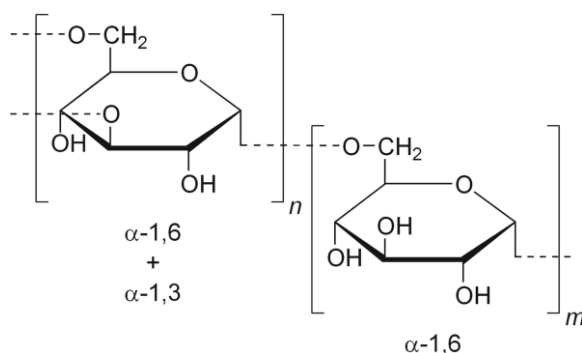
Slika 4. Udjel mikrobnih kultura u zrnima vodenog kefira (prema Pihurov i sur., 2021)

Stvaranje samog stabilnog konzorcija je na molekularnoj razini i dalje nepoznato te cjelovit sastav mikroflore nije još znanstveno potpuno definiran, ali znamo da je zajednica mikroorganizama inkapsulirana u glukoznom polimeru dekstranu. To je linearni polimer građen od jedinica glukoze povezanih α -1,6- i α -1,3-glikozidnom vezama koji formira prozirni, želatinozni matriks. Pronađeno je nekoliko sojeva bakterija mliječne kiseline koji proizvode izvanstanični enzim glukoziltransferazu koji je ključan u reakciji sinteze polisaharida iz saharoze. Identificiran je soj *Lactobacillus hilgardii* kao proizvođač velike količine dekstrana koji stvara granule. Za sad su zrnca vodenog kefira kao izvor egzopolisaharida vrlo slabo istražena, ali postaju vrlo interesantna kao alternativni i obnovljivi izvor prirodnog materijala.

Slika 5 prikazuje zrnca vodenog kefira te mikroskopske slike njihove površine pri različitim povećanjima, a Slika 6 prikazuje kemijsku strukturu dijela lanca dekstrana (Gulitz i sur., 2011).



Slika 5. a) zrnca vodenog kefira; b) mikroskopska slika površine vodenog zrnca kefira uvećana 5000 x; c) mikroskopska slika površine zrnca vodenog kefira uvećana 2000 x (Pihurov i sur. 2021)



Slika 6. Strukturna formula dvije povezane glukoze u dekstranu

Vodeni kefir se može smatrati funkcionalnom hranom zbog svog probiotskog i antimikrobnog djelovanja. Mikroorganizmi iz kulture tijekom fermentacije povećavaju bioraspoloživost hranjivih sastojaka, proizvode biokonzervanse (prirodnu ili kontroliranu mikrobiotu ili antimikrobne spojeve koji mogu poslužiti za konzerviranje proizvoda i produljenje roka trajanja), poboljšavaju senzorna svojstva (okus, aromu i teksturu) i proizvode bioaktivne tvari koje promiču zdravlje osobe koja konzumira napitak. Nažalost, za sad nije proveden velik broj istraživanja na vodenom kefiru, ali i dalje su dokazani mnogi pozitivni učinci napitka na zdravlje. Najpoznatiji blagotvorni učinak, i razlog mnogih ljudi za konzumiranje vodenog kefira, jest pozitivno djelovanje na gastrointestinalni trakt, tj. na mikrofloru koja su u njemu nalazi. Međutim ovaj pripravak može djelovati na još mnogo drugih aspekata zdravlja svojim antioksidacijskim, protuupalnim i antimikrobnim djelovanjem. Kontinuirana konzumacija

vodenog kefir dokazano pozitivno utječe na regulaciju krvnog tlaka, glukoze u krvi i kolesterola. Osim toga poboljšavaju funkciju jetre pomažući joj sa regeneracijom i detoksifikacijom. Vodeni kefir dobra je nadopuna i tretmanu protiv raka te generalno poboljšava imunitet osobe koja ga pije. Također se može koristiti za vanjsku uporabu i tako pomoći pri zacjeljenju rana (Guzel-Seydim i sur., 2021). Romero-Luna i suradnici (2020) su istraživali svojstva bakterije *Lactobacillus paracasei* CT12 izolirane iz zrnca vodenog kefir. To je bakterija mliječne kiseline koja pokazuje probiotska svojstva. Soj se pokazao relativno otporan za ekstremne uvjete želuca simuliranih *in vitro*. Stopa preživljavanja kulture bakterija bila je čak 60 %. Tablica 1 prikazuje stopu preživljenja bakterije *Lactobacillus paracasei* CT12 ovisno o vremenu i „mjestu djelovanja“ koji su simulirani. Može se vidjeti da veliki udio bakterija ne preživi niski pH želuca dok je pad udjela živih stanica mnogo manji kad su u pitanju uvjeti koji vladaju u crijevima. Osim toga provedeno je *in vitro* testiranje adhezije bakterija na unutarnju površinu crijeva i rezultat je pokazao 85 % uspješno vezanje. To znači da se nakon prolaska kroz želudac i crijeva mogu dobro vezati za površinu debelog crijeva te ga kolonizirati.

Tablica 1. Ovisnost stope preživljenja bakterije *L. paracasei* o vremenu provedenom u određenim simuliranim uvjetima (Romero-Luna i sur., 2020)

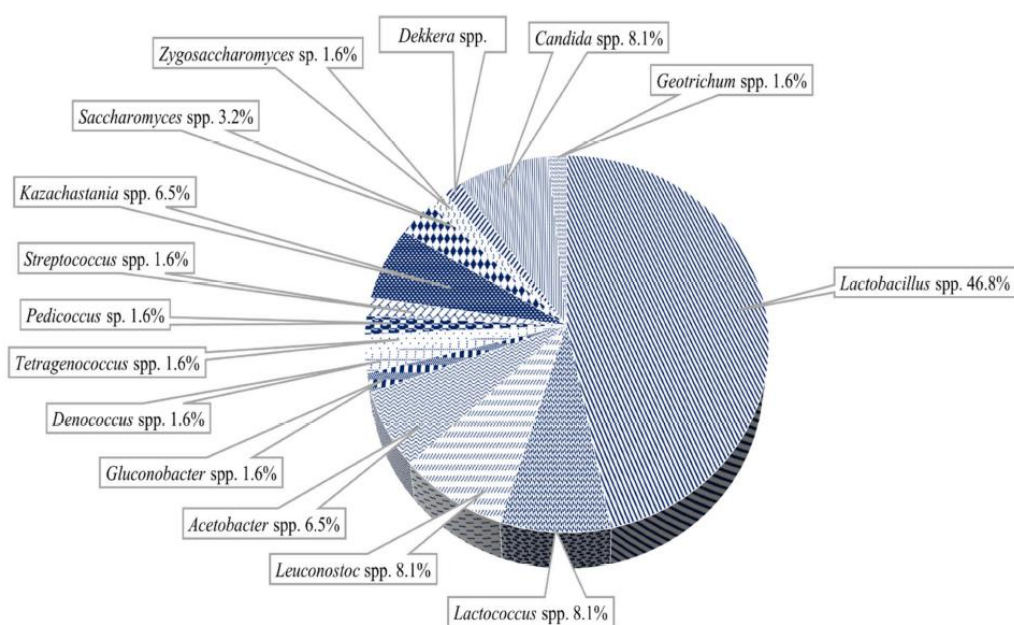
Simulacija	Vrijeme [min]	Postotak preživljenja bakterije <i>L. paracasei</i> CT12 [%]
Želudac	30	97.19±3.98A
	60	57.61±8.17B
Crijeva	30	42.12±9.61B
	90	43.48±9.60B
	180	40.08±4.81B

L. paracasei CT12 je također testirana na potencijalne antimikrobne i antifungalne aktivnosti. Rezultati su pokazali da ovaj soj sintetizira određene antimikrobne metabolite te da je u stanju, do neke mjere, inhibirati rast patogenih bakterija i plijesni kao što su *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria innocua* i *Salmonella enterica*. Nije u potpunosti poznat mehanizam antimikrobnog i antifungalnog djelovanja, ali pretpostavlja se da su za to odgovorne organske kiseline koje soj sintetizira. Osim toga *L. paracasei* CT12 može

sintetizirati i metabolite koji imaju antioksidacijsko djelovanje (Romero-Luna i sur., 2021).

2.2.1. ZRNCA MLIJEČNOG KEFIRA

Mliječni kefir se dobiva fermentacijom mlijeka uz pomoć zrnca mliječnog kefira. To je fermentirani mliječni napitak blago kiselkastog okusa koji se tradicionalno koristi kao izvor probiotika i općenito promiče zdravlje. Potječe iz regije Kavkaz te samo ime potječe od turske riječi *keyif* koja znači „dobar osjećaj“. Kulture bakterija mliječne i octene kiseline, te kvasci inkapsulirani su u matriks građen od polisaharida i proteina. Takav konzorcij je izuzetno stabilan i održava svoju aktivnost godinama ako se čuva u primjerenim uvjetima. Mikrobiološki sastav ovakvih zrnaca uvelike ovisi o geografskom području iz kojeg potječu, uvjetima kultivacije i supstratu fermentacije. Najčešći bakterijski sojevi su *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* i *Streptococcus* i *Acetobacter*, a najčešće detektirana konkretna bakterija je *Lactobacillus kefir* (Gao i Li, 2016). Slika 7 prikazuje prosječni mikrobiološki sastav ovakvih zrnaca.

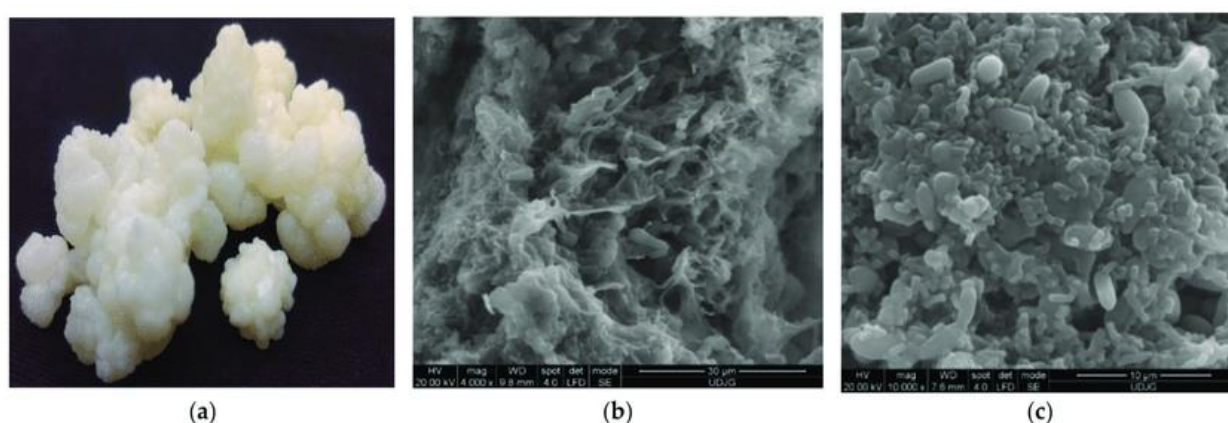


Slika 7. Prisutni mikroorganizmi u mikrobioti zrnca mliječnog kefira (prema Pihurov i sur., 2021)

Osim bakterija i kvasca, u ovom konzorciju su još detektirani i bakteriofagi. Fagi i bakterije dijele životni prostor i žive u ravnoteži. Mali broj faga koji se nalazi u zajednici poboljšava očuvanje fermentiranog proizvoda. Za zrnca mliječnog kefira i proizvode dobivene koristeći ih za fermentaciju tipični su bakteriofagi *Siphoviridae* tipa B1 koji čine 60 % poznatih

Lactobacillus faga (Gao i Li, 2016).

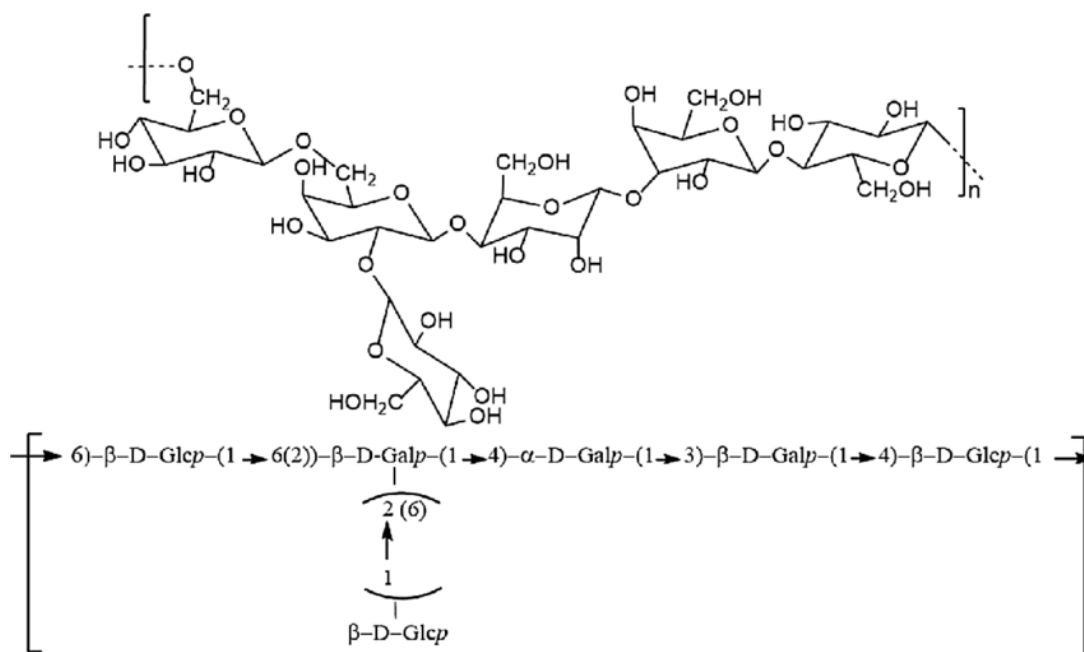
Zrnca mliječnog kefira su bijele do žućkaste boje i izgledom podsjećaju na cvjetaču (slika 8a). Elastična su, nepravilna, želatinozna, boje slonovače ili bijele boje, promjera od 1 do 5 cm. Sadrže 45 % mukopolisaharida, 34 % ukupnih proteina (od čega je 27 % netopivih, a 1-6 % topivih i uz to 5-6 % slobodnih aminokiselina), 12% pepela, 44 % masti, vitamine B i K, triptofan, kalcij, fosfor i magnezij. Kefirna zrnca sastoje se polisaharidne matrice (slika 8b), nazvane kefiran koja povezuje bakterije i kvasce (Slika 8c) (Gao i Li, 2016). Na slici 8b,c, mogu se uočiti pričvršćene bakterije (štapićaste/koki) i kvasci (kuglaste/ovalne stanice) u matrici.



Slika 8. a) zrnca mliječnog kefira; b) mikroskopska slika površine zrnca mliječnog kefira uvećana 4000 x; c) mikroskopska slika površine zrnca vodenog kefira uvećana 10000 x (Pihurov i sur. 2021)

Kefiran je razgranati polisaharid kojeg proizvode nekoliko vrsta bakterija mliječne kiseline, kao što su *Lactobacillus kefiranofaciens*, *Lactococcus plantarum*, *Lactobacillus kefirgranum*, *Lentilactobacillus parakefiri* i *Lactobacillus bulgaricus*. Sadrži približno jednake količine D-glukoze i D-galaktoze (slika 9). Obzirom na sve veću zabrinutost oko zagađenja okoliša, postaje sve zanimljiviji kao biorazgradivi, netoksični polimer. Različite vrste veza u njegovoj strukturi utječu na njegova fizikalna i kemijska svojstva. Općenito, ovaj polisaharid je jestiv, topiv u vodi, ima učinak emulgatora te stabilizirajući učinak, otporan je na hidrolizu i ima dobra mehanička svojstva, pozitivno utječe na bakterije roda *Bifidobacterium*, a suprimira rast nekih nepoželjnih mikroorganizama, tj. ima antimikrobno djelovanje. Može se koristiti za inkapsuliranje lijekova ili za proizvodnju filmova za pakiranje hrane igrajući ulogu sredstva za

stvaranje filma. Osim toga može se koristiti i kao aditiv za hranu zato što ima slična svojstva poželjna za zdravlje kao i sam kefir (npr. antimikrobno, antioksidacijsko, protuupalno, antikancerogeno djelovanje i sl.) te se može upotrijebiti kao sredstvo za želiranje i teksturu. Nažalost, zbog toga što nije vodonepropustan postoje ograničenja kod korištenja kefirana kao prirodne barijere. Međutim, obzirom na napredak nanotehnologije i otkrivanje novih nanomaterijala, kefiran je moguće modificirati kako bi ga učinili nepropusnim za vodu (npr. modifikacija hidrofobnim spojevima kao što su masne kiseline) (Moradi i Kalampour, 2019).



Slika 9. Strukturna formula polisaharida kefirana

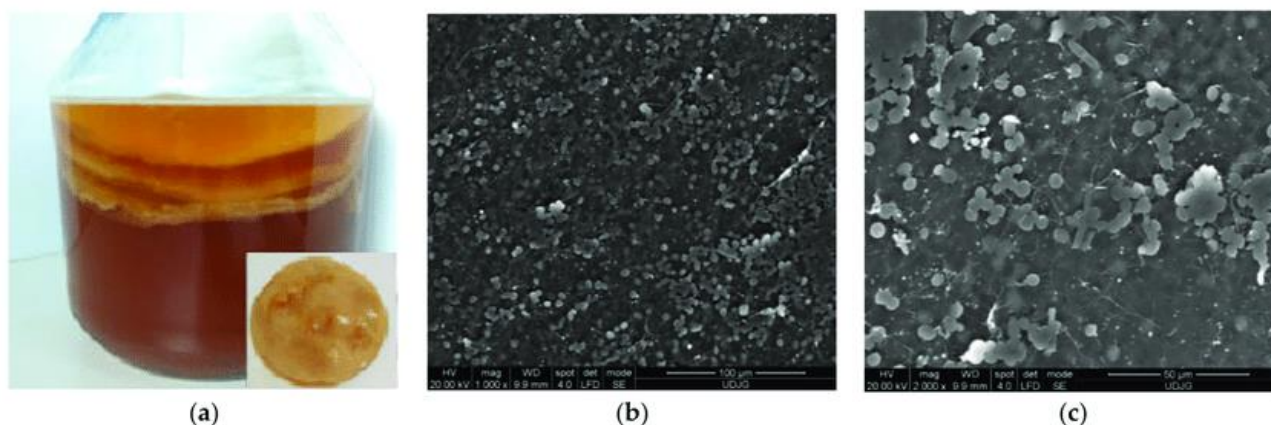
Mliječni kefir se primarno smatra izvorom probiotika (mnoge izolirane vrste su se ispostavile otporne na izuzetno niski pH koji vlada u želucu i sposobne vezati se za površinu crijeva te tamo kolonizirati), ali njegovi pozitivni utjecaji na zdravlje ne staju na tome. Konzumacija kefirana dokazano olakšava probavu laktoze osobama s intolerancijom. Otkriveni su i mehanizmi kojima neki sojevi iz konzorcija zrnca mliječnog kefirana mogu pozitivno utjecati na razinu kolesterola i glukoze u krvi. Osim toga neki mikroorganizmi proizvode mliječnu kiselinu, antibiotike te bakteriocine čime inhibiraju rast patogenih bakterija kao što su *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Helicobacter*, *Shingella*, *Staphylococcus*, *Salmonella*, *Proteus vulgaris*, *Enterobacter aerogenes*, *Micrococcus luteus*, *Streptococcus pyrogenes* i druge. Dokazano je i da kombinacija nekih od mikroorganizama izoliranih iz kefirana može spriječiti proljev izazvan bakterijom *Clostridium difficile*. Pored antibakterijskih sposobnosti konzorcij pokazuje i

antifungalnu aktivnost (uspješno inhibira spore plijesni *Aspergillus flavus*). Također, mnoge vrste laktobacila u zrnima imaju tzv. S-sloj proteina kojima mogu između ostalog inhibirati rast bakterije *Salmonella enterica* i *C. difficile*. Mikroorganizmi koji čine zrnca mliječnog kefira također mogu sintetizirati i druge važne bioaktivne metabolite koji mogu djelovati antitumorski, protuupalno, antimikrobno, imunoregulatorno, antialergentski, antimutageno, antitoksikogeno i dr. (Prado i sur., 2015).

2.2.2. **KOMBUCHA**

Kombucha je još jedan primjer funkcionalne hrane, tj. funkcionalni čaj koji se dobiva fermentacijom uz pomoć SCOBY kulture (eng. *Symbiotic Culture of Bacteria and Yeast*). Ovo piće je podrijetlom iz Kine, ali se danas konzumira u cijelome svijetu, posebno u Rusiji, Njemačkoj, bliskom Istoku i naravno, u Kini. Smatra se dobrom zamjenom za slatka i energetska pića zato što uz prihvatljiva senzorska svojstva sadrži vitamine, proteine, vlakna i druge dobre bioaktivne metabolite i nutrijente (kao npr. flavonoidi, katehini, tanini i esencijalna ulja). Za proizvodnju se najčešće koristi zaslađeni zeleni ili crni čaj, a fermentacija traje 7-14 dana. Kompleksna zajednica bakterija i kvasaca (SCOBY), koji fermentiraju šećer u čaju istovremeno proizvodi biofilm, odnosno bakterijsku nanocelulozu (BNC) na površini tekućine. BNC zajednici služi kao zaštita od kontaminacija, pomoć pri pričvršćivanju stanica, zaštita od nepovoljnih uvjeta i mjesto za pospremanje resursa, također povećavajući dostupnost kisika za mikroorganizme koji se nalaze u njemu, a služi kao starter kultura za novu fermentaciju (slika 10).

Najzastupljenije mikrobne vrste u SCOBY biofilmu su bakterije octene kiseline i kvasci. *Kombucha* napitak nastaje kao rezultat međusobne interakcije mikroorganizama iz stabilnog konzorcija. Često su sojevi bakterija octene kiseline (eng. *Acetic Acid Bacteria*; AAB) i kvasaca koji fermentiraju zašećereni čaj odgovorni za proizvedene funkcionalne metabolite, ali ponekad su i sojevi bakterija mliječne kiseline (eng. *Lactic Acid Bacteria*; LAB) uključeni u proces fermentacije, što rezultira nastajanjem octene, glukonske i glukuronske kiseline. Supstrat za fermentaciju, poput infuzije zaslađenog crnog ili zelenog čaja, može osigurati potrebne hranjive tvari za pravilan razvoj specifičnih mikroorganizama. Kvašćeva invertaza pretvara saharozu u glukozu i fruktozu koje se dalje koriste za alkoholnu fermentaciju i završavaju proizvodnjom etanola. Putem oksidativnog metabolizma, AAB pretvaraju glukozu u glukonsku kiselinu i etanol u octenu kiselinu, čime se dokazuju simbiotski odnosi koji pridonose poboljšanju osjetilnih i antimikrobnih svojstava *kombuche* (Tran i sur., 2020).



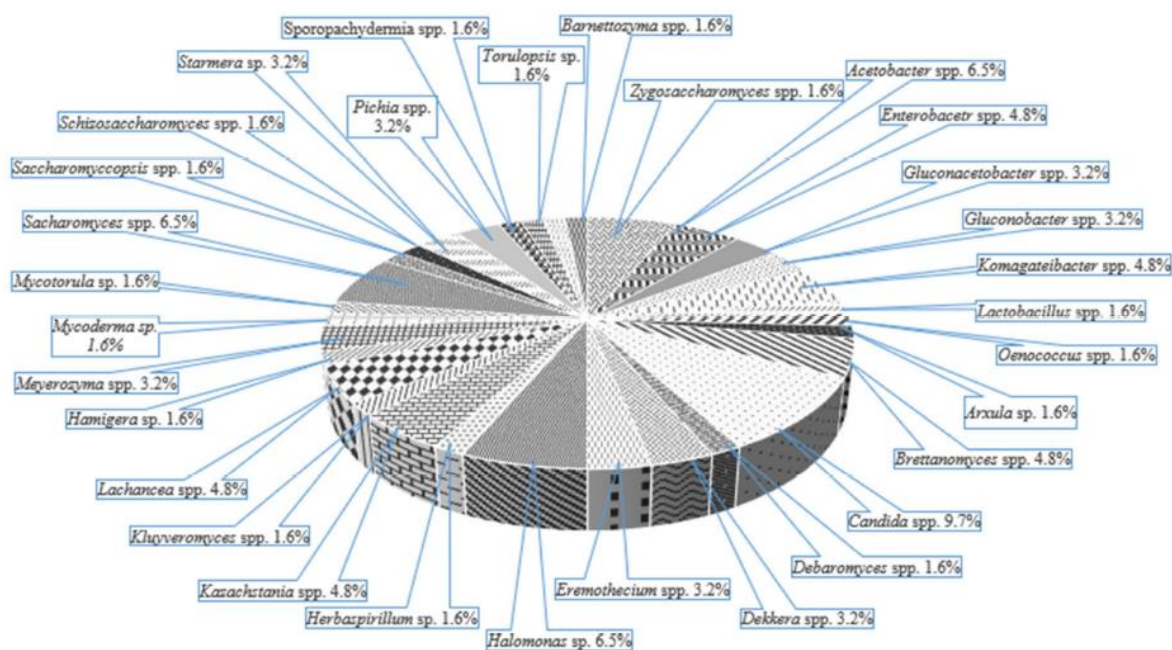
Slika 10. a) *kombucha* BNC; b) SEM slika biofilma *kombuche* uvećana 1000x ; c) SEM slika biofilma *kombuche* uvećana 2000x (Pihurov i sur. 2021)

U različitim fazama fermentacije, sastav mikrobioma *kombuche* može varirati (Senguin i Kirmizigul, 2020), te prisutne bakterije mogu pripadati porodicama *Rhodospirillales*, *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Actinobacteria* i *Acetobacteraceae*, a dominantni kvasci su iz porodica *Saccharomycetaceae* i *Schizosaccharomycetaceae*. Metagenomičko ispitivanje *kombuche* pokazalo je da biofilm sadrži više bakterijskih vrsta (*Acetobacter xylinum*, *A. indonesiensis*, *A. papaya*, *Komagataeibacter saccharivorans*, *Gluconobacter* spp., *Microbacterium* spp., *Bacillus licheniformis*), dok fermentirana tekućina sadrži više vrsta kvasca kao npr. *Saccharomyces cerevisiae*, *S. ludwigi*, *Zygosaccharomyces* sp., *Brettanomyces (Dekkera) bruxellensis*, *Hanseniaspora valbyensis*, *H. opuntiae*, *Pichia fermentans* i *Galactomyces geotrichum* (Villarreal-Soto i sur., 2020; Torán-Pereg i sur., 2021).

Među bakterijama octene kiseline se po brojnosti najviše ističu *Komagataeibacter*, *Gluconacetobacter* i *Gluconobacter*. Najzastupljeniji kvasci su *Brettanomyces* i *Schizosaccharomyces*. Pronađeni su i neki osmotolerantni mikroorganizmi kao što su *Zygosaccharomyces* spp., *Torulaspota delbrueckii* i *Schizosaccharomyces pombe* te organizmi tolerantni na kiselinu *Dekkera* sp. i *Candida stellata*. Kako fermentacija napreduje tako osmotolerantni mikroorganizmi polako odumiru, a organizmi koji toleriraju kiselinu se umnožavaju (Laavanya i sur., 2021).

Zbog interakcije između mnogih LAB, AAB i kvasaca (tolerantnih na kiselinu i osmofilnih) u mikrobnom konzorciju, *kombucha* se može smatrati probiotičkim napitkom i učinkovitim izvorom probiotičkih mikroorganizama i kandidata za taj status (slika 11). *Pediococcus*

pentosaceus i *P. acidilactici* potječu iz *kombuche*, pridonose ugodnom okusu *kombuche*, proizvode bakteriocine i pokazuju otpornost na visoke koncentracije žučnih soli (0,5% w/v), antioksidans potencijal (56–58%), te visoku inhibitornu aktivnost bakterija koje se prenose hranom (*Salmonella enterica* Typhimurium, *Listeria monocytogenes*, *L. ivanovii*, *Bacillus cereus*, *Proteus hauseri*) i gljivica (*Penicillium expansum* i *P. digitatum*) (Diguta i sur., 2020).



Slika 11. Raznolikost mikroorganizama u *kombuchi* (prema Soares i sur., 2021)

Kombucha napitak također ima dokazana antimikrobna i antifungalna svojstva prema širokom rasponu mikroorganizama kao što su *Pseudomonas aeruginosa*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Helicobacter pylori*, *Enterobacter cloacae*, *Salmonella enteritidis*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*, *Shingella sonnei*, *Staphylococcus aureus* i mnoge druge. Pretpostavlja se da je za antimikrobni utjecaj odgovorna octena kiselina u SCOBY-u te niski pH. Osim toga, tijekom fermentacije nastaju proteini, katehini i slične supstance koje mogu inhibirati rast patogenih mikroba. *Kombucha* sadrži i neke antibiotske spojeve koji pridonose antimikrobnom utjecaju. Uzevši sve to u obzir *kombucha* se može koristiti za suzbijanje patogena koji su povezani sa ljudskim bolestima, tj. kao „pojačanje“ uobičajenim tretmanima za postizanje boljih rezultata. Pei i suradnici (2020) su objavili studiju čiji je glavni predmet istraživanja bio bakteriocin SLG10 izoliran iz tradicionalne *kombuche* kojeg proizvodi bakterija mliječne kiseline *Lactobacillus plantarum*. Bakteriocini su antimikrobni bakterijski peptidi niske molekulske

mase koji imaju veliki potencijal kao prirodni prezervativi hrane. Otkriven je veliki broj bakteriocina no za većinu mehanizam djelovanja nije poznat. Iako SLG10 nije jedini bakteriocin koji se može izolirati iz SCOBY kulture, bio je zanimljiv za istraživanje jer može inhibirati rast i Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija (većina bakteriocina inhibira samo Gram-pozitivne bakterije). Njegova antimikrobna aktivnost testirana je na kulturama *Escherichia coli* i *Staphylococcus aureus*. Rezultati su pokazali uspješnu inhibiciju tih sojeva i još mnogih drugih, kao što su *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus megaterium*, *Micrococcus luteus*, *Brochothrix thermosphacta*, *Clostridium butyricum* i *Listeria innocua*. Spoj je zadržao svoju antimikrobnu aktivnost pri 37 °C 14 dana, a pri 4 °C aktivnost zadržava čak do dva mjeseca. Također je stabilan u relativno širokom rasponu pH od 2 do 7 te aktivnost počinje gubiti oko pH 8. Ta svojstva ga čine pogodnim za korištenje u biokonzerviranju obzirom na to da može ostati stabilan pri procesiranju hrane. Još je zanimljivo da nije osjetljiv na proteolitičke enzime pepsin i tripsin za razliku od mnogih drugih bakteriocina. Razlog tome, pretpostavlja se, jest kratkoća samog peptidnog lanca i rijetka učestalost određenih aminokiselina koje služe kao indikator mjesta za cijepanje tim enzimima (Pei i sur., 2020).

2.3. POTENCIJAL AUTOHTONIH KULTURA ZA PROIZVODNJU KORISNIH METABOLITA OVISNO O FERMENTACIJSKIM SUBSTRATIMA

Sve zajednice mikroorganizama, pa tako i autohtone kulture, imaju specifične prehrambene zahtjeve koji najviše ovise o njihovom porijeklu i hranjivim tvarima koji su im općenito dostupni. Postoje mnogi supstrati s kojima u prirodi ove kulture ne stupaju u kontakt, ali njihovom fermentacijom mogu nastati vrlo cijenjeni i visoko vrijedni proizvodi. Danas se sve više ispituju različiti nekonvencionalni supstrati kako bi dobili fermentirane proizvode sa značajnim funkcionalnim obilježjima (Francisco i sur., 2021).

Raznolikost izvora hranjivih tvari osigurava složeni sastav prebiotika i postbiotika. Tako na primjer, probiotske bakterije u kulturi zrnca mliječnog kefira trebaju hranjive tvari kao izvore ugljika i dušika kako bi mogle rasti, razmnožavati se i sintetizirati sekundarne metabolite kao što su organske kiseline ili esteri, koje osiguravaju proizvod specifičnog okusa i mirisa, te aminokiseline, kratkolančane masne kiseline, bakteriocine i druge bioaktivne spojeve koji poboljšavaju prehrambenu kakvoću i mikrobiološku stabilnost i sigurnost finalnog proizvoda. Permeat sirutke kao supstrat za uzgoj zrnaca kefira rezultira fermentiranim proizvodom povećane antifungalne aktivnosti i ubrzane kinetike rasta mikroorganizama. Supernatant bez stanica iz tako fermentirane tekućine, uporabljen kao hrana za perad i za proizvodnju kruha,

povećava otpornost potrošača na gljivične infekcije (Gamba i sur., 2016).

Provedena je studija koja je ispitala sastav fermentiranih kefira od ovčjeg i kravljeg mlijeka. U njima su identificirani bioaktivni peptidi i to ponajviše u ovčjem mlijeku koje je prikladno za proizvodnju bioaktivnih peptida s antioksidativnim i antibakterijskim svojstvima (Azizi i sur., 2021).

Palmin sok dobiven iz *Borassus aethiopum* još je jedan dobar primjer nekonvencionalnog supstrata za fermentaciju zrnica vodenog ili mliječnog kefira kako bi se dobio proizvod sa dobrim funkcionalnim svojstvima. Naime, dobiveni napitak mogu konzumirati ljudi koji ne toleriraju laktozu ili ne konzumiraju proizvode animalnog podrijetla (Zongo i sur., 2020).

Zrnca kefira mogu biti i dobar dodatak pri pravljenju kruha od kiselog tijesta kao starter kultura ili prirodni konzervansi. Ona usporavaju proces u kojem kruh postaje ustajao i poboljšava njegovu otpornost na kvarenje. Također, korištenje liofiliziranih zrnaca poboljšava senzorska svojstva kruha dajući mu blagi miris na mlijeko (Filipčev i sur., 2007).

Rekonstituirano obrano mlijeko je najbolji medij za proizvodnju antioksidativnih metabolita fermentacijom uz pomoć zrnaca mliječnog kefira. Sinteza antioksidansa u obranom mlijeku povezana je s proizvodnjom peptida kao rezultat proteolitičke aktivnosti prisutnih mikroorganizama, a prvenstveno utječe na kazein. Dobiveni bioaktivni peptidi imaju različite aktivnosti kao što su imunomodulatorna, antioksidativna i antimikrobna (Yusuf i sur., 2021).

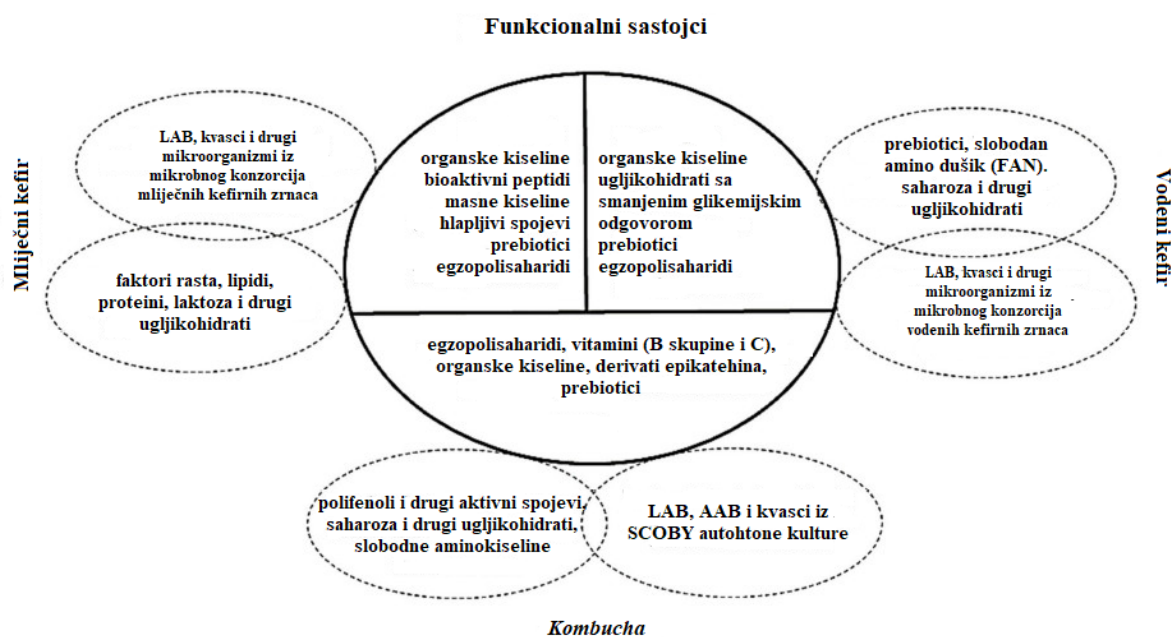
Što se tiče *kombuche*, provedena je fermentacija 10% (vol/vol) ekstrakta ploda guave (*Psidium guajava*). Dobiveni supernatant pokazivao je antifungalno i antibakterijsko djelovanje prema *Pseudomonas* spp., *Klebsiella* spp. i *Staphylococcus* spp. Pretpostavlja se da je antifungalno i antibakterijsko djelovanje posljedica prisutnosti polifenola i flavonoida (Khaleil i sur., 2020).

Postoji još mnogo načina kako se mogu iskoristiti ove kulture za dobivanje funkcionalnih proizvoda, ali kemijski sastav tih napitaka najviše ovisi o samoj autohtonj kulturi. Tako mliječni kefir uglavnom sadrže osim probiotičkih mikroorganizama faktore rasta, lipide, laktozu i druge ugljikohidrate, proteine, organske kiseline, bioaktivne peptide, masne kiseline, prebiotike i egzopolisaharide. Vodeni kefir imaju vrlo sličan sastav, ali ne identičan. U ovom napitku prevladavaju saharoza i drugi ugljikohidrati, slobodne aminokiseline, organske kiseline, prebiotici i egzopolisaharidi. *Kombucha* ima ipak nešto drugačiji sastav. Ona sadrži flavonoide i druge polifenole, mali udjel neprevrele saharoze ili drugih ugljikohidrata, slobodne aminokiseline, prebiotike, organske kiseline, vitamine iz B grupe i C, derivate epikatehina i egzopolisaharide (Singh i sur., 2018).

2.4. FUNKCIONALNI METABOLITI AUTOHTONIH STARTER KULTURA

Simbiotska zajednica *kombuche* uključuje LAB i bifidobakterije, njihov sinergizam proizvodi mnoge postbiotike poput organskih kiselina, polifenolnih spojeva i vitamina topljivih u vodi. Posebice udjel vitamina B kompleksa pridonosi uravnoteženju pH krvi i koncentracije mliječne kiseline. Dokazano je da je dopuna probiotičke prehrane na bazi pšenice s 20% *kombucha* fermentiranog napitka poboljšala performanse i rast brojlera. Nadalje, probiotička dijeta pomaže u povećanju omjera visine/kripte i dubine resica crijevne sluznice (Afsharmanesh i Sadaghi, 2014). Ključni metaboliti, uključujući octenu, mliječnu, jabučnu i jantarnu kiselinu, nastaju u fazi fermentacije *kombuche* zbog interakcije kvasaca i bakterija. Pod optimalnim uvjetima fermentacije, glukonska kiselina jedna je od metabolita prisutnih u *kombuchi* zaslužna za promicanje zdravstvenog statusa (Tran i sur., 2020).

Mliječni i vodeni kefir, kao i *kombucha*, karakteriziraju različiti funkcionalni spojevi koji su sažeti na slici 12. Stoga ti metaboliti mogu imati pozitivne zdravstvene učinke za potrošače, te se intenzivno proučavaju mehanizmi odgovorni za ove korisne učinke. Divlji konzorciji mliječnih i vodenih kefirnih zrnaca, odnosno *kombuche*, može se koristiti kao predjelo kokultivacijom na optimiziranim fermentacijskim supstratima kako bi se maksimizirala funkcionalna svojstva konačnog proizvoda.



Slika 12. Funkcionalni metaboliti unutar mliječnog i vodenog kefir, odnosno *kombucha* napitaka (prema Pihurov i sur., 2021)

Mliječna kefirna zrnca sadrže značajne količine proteina, galaktooligosaharida i izvanstaničnih enzima. Laktoza i proteini se biotransformiraju tijekom fermentacije i proizvode ugljični dioksid, mliječnu kiselinu, acetaldehid, acetoin, manje količine etanola i 50 različitih aromatskih spojeva (Frag i sur., 2020). Za usporedbu, zrnca vodenog kefira fermentiraju saharozu, glukozu, fruktozu i/ili manitol i proizvode mliječnu kiselinu, octenu kiselinu, etanol, ugljični dioksid, hlapljive spojeve - metil estere i drugih 30 različitih sastojaka (Guzel-Seydim i sur., 2021). Osim kefirnih zrnaca, proces fermentacije *kombuche* SCOBY kulturom rezultira mnogim bioaktivnim spojevima kao što su polifenoli, flavonoidi, saharoza, glukozu i fruktoza, vitamini B₁, B₂, B₆, B₁₂, C, aminokiseline, purini, pigmenti, lipidi, proteini, neki hidrolitički enzimi, octena, glukonska, glukuronska, limunska, jantarna, jabučna, vinska, malonska, oksalna i L-mliječna, pirogroždana i usninska kiselina (Antolak i sur., 2021).

2.5. DOBIVANJE METABIOTIKA I NJIHOVA PRIMJENA

Metabiotici se smatraju prikladnijima i praktičnijima za dugotrajno skladištenje funkcionalnih proizvoda, te ih je lakše dozirati ili kontrolirati njihovu sigurnost u usporedbi s drugim tradicionalnim probioticima (Vallejo-Cordoba i sur., 2020). Snagu metabiotika predstavlja njihova visoka bioraspodivnost jer od metabiotičkih tvari koje dopijaju u debelo crijevo, njih 95-97% ostaje nepromijenjeno (ne ometaju ljudski mikrobiom). Aktivni su i počinju djelovati odmah nakon primjene i uglavnom su odgovorni za pozitivne učinke na probavni trakt. Nadalje, metabiotici obuhvaćaju širok spektar funkcionalnih spojeva s različitim blagotvornim učincima za potrošače (Molae Parvarei i sur., 2021).

Širok raspon čimbenika, poput sastava konzorcija, tipova dominantnih bakterija i sojeva kvasca, vremena fermentacije, sastava fermentacijskog supstrata, značajno utječe na proizvodnju postbiotika, probiotika, prebiotika i paraprobiotika. Učinkovitost staničnih lizata, egzopolisaharida, teihoične i lipoteihoične kiseline, lipopolisaharida, peptidoglikana izvorište ima u podrijetlu LAB sojeva (*Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp.) i kvasaca (*Saccharomyces* spp.). Na učinkovitost utječu doza i vrijeme primjene kako bi se postigli zadovoljavajući učinci u pogledu poboljšanja nekih bolesti (Vallejo-Cordoba i sur., 2020). Tehnike za dobivanje metabiotika vrlo su različite, ovisno o spoju koji se želi dobiti i njegovom budućem odredištu. Na primjer, metabiotičke potklase poput paraprobiotika, postbiotika ili prebiotika trebaju napredne tehnike za razaranje, inaktivaciju stanica ili ekstrakciju bioaktivnih spojeva, te zahtjevne analize kojima se dokazuju učinci spojeva na promicanje zdravlja.

Najčešće tehnike koje se koriste za razbijanje stanica su: mehaničko razbijanje, često smrzavanje i odmrzavanje, enzimski liza staničnih stijenki, membrana ili unutarstaničnih struktura mikroorganizama, mikrovalno, ionizirajuće i ultraljubičasto zračenje, ekstrakcija superkritičnom vodom, visoki hidrostatski tlak, ultrazvučni tretman, oštećenje stanica kiselinama ili lužinama, centrifugiranje, dijaliza, ionska izmjena; tehnike ultrafiltracije koje se primjenjuju za suspenzije cijelih ili djelomično razorenih stanica, inaktivacija mikroorganizama iz suspenzije i ekstrakcija staničnih komponenti i metabolita pomoću CO₂ (Shenderov i sur., 2020). S obzirom na prirodu tretmana koji se primjenjuje za razaranje stanica, mogu se identificirati dvije glavne skupine: (i) postupci razaranja koji zahtijevaju mehaničku silu - visokotlačna homogenizacija, hidrodinamička kavitacija, mehaničko miješanje (zrnca, mlin, tarionik i tučak, tucanje kuglica) i (ii) fizikalno-kemijske tehnike (ekstremne temperature i pH vrijednosti, osmotski šok, isušivanje, dekompresija plina, ultrazvuk, hidrodinamička kavitacija, deterdženti, otapala, antibiotici, kelirajuća sredstva, kaotropi, egzogeni enzimi za lizu stanične stijenke, autoliza i inducirana liza, inhibitori stanične stijenke). Nakon razaranja staničnih membrana oslobađaju se topljivi međustanični proteini, plazmidna DNA i polimerni spojevi (Shenderov i sur., 2020).

U autohtonim kulturama postoje tri osnovne strukture: kefiran je specifičan za zrnca mliječnog kefira, dekstran za zrnca vodenog kefira, a BNC za *kombuchu* čija razgradnja/denaturacija daje korisne spojeve.

Prvo, iz kefirnih zrnaca se može ekstrahirati heteropolisaharid, nazvan kefiran s molekularnom masom u rasponu od 2,4 · 10⁶ Da do 1,5 · 10⁷ Da. Kefiran, koji ima GRAS (eng. *Generally Recognized as Safe*) status, spoj je s antibakterijskim, antifungalnim i antitumorski svojstvima. Kefiran i njegovi derivati mogu se koristiti za proizvodnju materijala za pakiranje hrane i materijala za kapsuliranje, kao nosači lijeka i prebiotici, emulgatori ili sredstva za želiranje u funkcionalnoj hrani (Tan i sur., 2020).

Drugo, iz zrnaca vodenog kefira može se ekstrahirati vrlo veliki polisaharid dekstran, s molekularnom masom od 4 · 10⁵ Da do 10 · 10⁶ Da (Santos i sur., 2005)). Obično se njegova razgradnja provodi ionizirajućim zračenjem vodenih otopina dekstrana. Točnije, T-zračenje u rasponu između 0–0,32 MGy je primijenjeno na vodenu otopinu H₂SO₄ za razgradnju makromolekula dekstrana u produkte hidrolize do frakcija niže molekulske mase (Kovalev i sur., 2000). Dekstran niske molekularne mase (LMWD) prikladan je za farmaceutske primjene i često je koristi kao nosač lijekova. LMWD se može dobiti nakon produljene enzimске hidrolize makromolekula dekstrana korištenjem citrat-fosfatnog pufera (0,1 M, pH 4,5) i

dekstranaze (250 U) na 50 C tijekom 72 h, nakon čega slijedi membranska filtracija (Iqbal i sur., 2017).

Konačno, izvanstanični polisaharidi koje proizvodi *Gluconobacter* spp. i *Acetobacter* spp. formiraju nanocelulozne fibrile biofilma *kombuche*. Nanoceluloza koja nastaje fermentacijom *kombuche* može se koristiti u industriji nanokompozita (Oliver-Ortega i sur., 2021). BNC *kombuche* bogata je glikozaminoglikanima, glikoproteinima i glikolipidima te se koristi kao polimer za stvaranje nosača za tkivni inženjering, transplantaciju stanica i mogući lijek za dijabetes (Mathew i sur., 2021).

3. ZAKLJUČCI

Na temelju ovog rada može se zaključiti sljedeće:

1. Istraživanje autohtonih kultura omogućuju znanstvenicima uporabu simbiotskih spontanih kultura mikrobnih konzorcija za proizvodnju inovativnih, zdravih i funkcionalnih prehrambenih proizvoda i sastojaka bogatih metabiotcima.
2. Autohtone kulture su bogati izvor metabiotika, te se fermentirani proizvodi (vodeni i mliječni kefir, te *kombucha*) dobiveni pomoću autohtonih kultura mogu uporabiti kao oblik alternativnog liječenja ili dopuna klasičnoj terapiji.
3. U spontanim autohtonim kulturama mikroorganizmi imaju složene prehrambene zahtjeve i proizvode brojne metabolite koji mogu biti prebiotici, postbiotici i metabiotici.
4. Istraživanja autohtonih mikrobnih populacija mliječnih kefirnih zrnca primjenom suvremenih mikrobioloških i molekularnih metoda ukazala su na složenosti mikrobnog sustava s više od 50 identificiranih mikrobnih vrsta.
5. Vodeni kefir predstavlja alternativni izvor probiotika za osobe s intolerancijom na laktozu, osobe s alergijskim reakcijama na mliječne proizvode ili one koje ne konzumiraju mlijeko i mliječne proizvode.
6. *Kombucha* je izvor probiotičkih bakterija i kvasaca, kao i prebiotika (BNC) koji potiču rast korisnih mikroorganizama u probavnom traktu, stoga se može smatrati sinbiotičkim pripravkom.

4. POPIS LITERATURE

- Aguilar-Toalá JE, Garcia-Varela R, Garcia HS, Mata-Haro V, González-Córdova AF, Vallejo-Cordoba B, Hernández-Mendoza A (2018) Postbiotics: An evolving term within the functional foods field. *Trends Food Sci Technol* **75**, 105–114. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.03.009>
- Afsharmanesh M, Sadaghi B (2014) Effects of dietary alternatives (probiotic, green tea powder, and Kombucha tea) as antimicrobial growth promoters on growth, ileal nutrient digestibility, blood parameters, and immune response of broiler chickens. *Comp Clin Path* **23**, 717–724. <https://doi.org/10.1007/s00580-013-1676-x>
- Antolak H, Piechota D, Kucharska A (2021) Kombucha tea-a double power of bioactive compounds from tea and symbiotic culture of bacteria and yeasts (SCOBY). *Antioxidants* **10**, 1541. <https://doi.org/10.3390/antiox10101541>
- Ashaolu TJ (2020) Immune boosting functional foods and their mechanisms: A critical evaluation of probiotics and prebiotics. *Biomed Pharmacother* **130**, 110625. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110625>
- Azizi NF, Kumar MR, Yeap SK, Abdullah JO, Khalid M, Omar AR, Osman MA, Mortadza SAS, Alitheen NB (2021) Kefir and its biological activities. *Foods* **10**, 1210. <https://doi.org/10.3390/foods10061210>
- Bradley PH, Pollard KS (2017) Proteobacteria explain significant functional variability in the human gut microbiome. *Microbiome* **5**, 36. <https://doi.org/10.1186/s40168-017-0244-z>
- Cunningham M, Azcarate-Peril MA, Barnard A, Benoit V, Grimaldi R, Guyonnet D, Holscher HD, Hunter K, Manurung S, Obis D et al. (2021) Shaping the Future of Probiotics and Prebiotics. *Trends in Microbiology* **29**, 667–685. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2021.01.003>
- Farag MA, Jomaa SA, El-Wahed AA, El-Seedi HR (2020) The many faces of kefir fermented dairy products: Quality characteristics, flavour chemistry, nutritional value, health benefits, and safety. *Nutrients* **12**, 364. <https://doi.org/10.3390/nu12020346>
- Filipčev B, Šimurina O, Bodroža-Solarov M (2007) Effect of native and lyophilized kefir grains on sensory and physical attributes of wheat bread. *J Food Process Preserv* **31**(3), 367 – 377. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4549.2007.00134.x>

- Francisco ÁR, de la Rosa M, Igor H (2021) Development of a no added sugar kombucha beverage based on germinated corn. *Int J Gastron Food Sci* **24**, 100355. <https://doi.org/10.1016/j.ijgfs.2021.100355>
- Gamba RR, Moure C, Diosma G, Giannuzzi L, De Antoni GL, León Peláez ÁM (2016) Application of Whey Permeate Fermented with Kefir Grains for the Shelf-Life Improvement of Food and Feed. *Adv Microbiol* **6**, 650-661. <http://dx.doi.org/10.4236/aim.2016.69064>
- Gao X, Li B (2016) Chemical and microbiological characteristics of kefir grains and their fermented dairy products: A review. *Cogent Food Agric* **2**, 1272152. <http://dx.doi.org/10.1080/23311932.2016.1272152>
- Gulitz A, Stadie J, Wenning M, Ehrmann MA, Vogel RF (2011) The microbial diversity of water kefir. *Int J Food Microbiol* **151**(3), 284–288. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.09.016>
- Guzel-Seydim ZB, Gökırmaklı Ç, Greene AK (2021) A comparison of milk kefir and water kefir: Physical, chemical, microbiological and functional properties. *Trends Food Sci Technol* **113**(4), 42-53. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.04.041>
- Iqbal S, Marchetti R, Aman A, Silipo A, Qader SAU, Molinaro A (2017) Enzymatic and acidic degradation of high molecular weight dextran into low molecular weight and its characterizations using novel Diffusion-ordered NMR spectroscopy. *Int J Biol Macromol* **103**, 744–750. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.05.073>
- Kalamaki MS, Angelidis AS (2020) High-throughput, sequence-based analysis of the microbiota of Greek kefir grains from two geographic regions. *Food Technol. Biotechnol* **58**, 138–146. <https://doi.org/10.17113/ftb.58.02.20.6581>
- Khaleil MM (2020) A Bioprocess development study of polyphenol profile, antioxidant and antimicrobial activities of kombucha enriched with *Psidium guajava* L. *J Microbiol Biotechnol Food Sci* **9**, 1204-1210. <https://doi.org/10.15414/jmbfs.2020.9.6.1204-1210>
- Kovalev GV, Sinitsyn AP, Bugaenko LT (2000) Degradation and crosslinking of dextran in aqueous solutions by γ -radiolysis: The effect of hydrogen ions. *High Energy Chem* **34**, 74–79. <https://doi.org/10.1007/BF02761833>

- Laavanya D, Shirkole S, Balasubramanian P (2021) Current challenges, applications and future perspectives of SCOBY cellulose of Kombucha fermentation. *J Cleaner Prod* **295**, 126454. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2021.126454>
- Lee ES, Song EJ, Nam YD, Lee SY (2018) Probiotics in human health and disease: From nutraceuticals to pharmaceuticals. *J Microbiol* **56**, 773–782. <https://doi.org/10.1007/s12275-018-8293-y>
- Mathew A, Joykutty L (2021) Article Developing “ Off the Shelf ” Pancreases for Diabetic Patients Using Bacterial and Kombucha Tea Waste. *Emerg Investig* **4**, 1–6. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9112184>
- Mei J, Gao X, Li Y (2016) Kefir Grains and their Fermented Dairy Products. *JSM Biotechnol Bioeng* **3**(1), 104. <https://doi.org/10.3390/fermentation9040388>
- Molae Parvarei M, Khorshidian N, Fazeli MR, Mortazavian AM, Sarem Nezhad S, Mortazavi SA (2021) Comparative effect of probiotic and paraprobiotic addition on physicochemical, chemometric and microstructural properties of yogurt. *LWT* **144**(7), 111177. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111177>
- Moradi Z, Kalanpour N (2019) Kefiran, a branched polysaccharide: Preparation, properties and applications: A review. *Carbohydr Polym* **223**, <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115100>
- Nataraj BH, Ali SA, Behare PV, Yadav H (2020) Postbiotics-parabiotics: The new horizons in microbial biotherapy and functional foods. *Microb Cell Fact* **19**, 168. <https://doi.org/10.1186/s12934-020-01426-w>
- Ogunrinola GA, Oyewale JO, Oshamika OO (2020) The Human Microbiome and Its Impact on Health. *Int J Microbiol*, Article ID 8045646. <https://doi.org/10.1155/2020/8045646>
- Oliver-Ortega H, Geng S, Espinach FX, Oksman K, Vilaseca F (2021) Bacterial cellulose network from kombucha fermentation impregnated with emulsion-polymerized poly(Methyl methacrylate) to form nanocomposite. *Polymers* **13**, 664. <https://doi.org/10.3390/polym13040664>
- Pei J, Jin W, Abd El-Aty AM, Baranenko DA, Gou X, Zhang H, Geng J, Jiang L, Chen D, Yue T (2020) Isolation, purification, and structural identification of a new bacteriocin made by *Lactobacillus plantarum* found in conventional kombucha. *Food Control* **110**, 106923. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.106923>

- Pihurov M, Păcularu-Burada B, Cotârleț M, Vasile MA, Bahrim GE (2021) Novel Insights for Metabiotics Production by Using Artisanal Probiotic Cultures. *Microorganisms* **9**, 2184. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9112184>
- Prado MR., Blandón LM, Vandenberghe LPS, Rodrigues C, Castro Guillermo R, Thomaz-Soccol V, Soccol CR (2015) Milk kefir: composition, microbial cultures, biological activities, and related products. *Front Microbiol* **6**, 1177. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01177>
- Rivière A, Selak M, Lantin D, Leroy F, De Vuyst L (2016) Bifidobacteria and Butyrate-Producing Colon Bacteria: Importance and Strategies for Their Stimulation in the Human Gut. *Front Microbiol* **7**, 979. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00979>
- Romero-Luna HE, Peredo-Lovillo A, Hernández-Mendoza A, Hernández-Sánchez H, Cauich-Sánchez PI, Ribas-Aparicio RM, Dávila-Ortiz G (2020) Probiotic Potential of *Lactobacillus paracasei* CT12 Isolated from Water Kefir Grains (Tibicos). *Curr Microbiol* **77**, 2584–2592. <https://doi.org/10.1007/s00284-020-02016-0>
- Rutsch A, Kantsjö JB, Ronchi F, Tay TL, Wekerle H, Rojas OL (2020) The Gut-Brain Axis: How Microbiota and Host Inflammation Influence Brain Physiology and Pathology. *Article* **11**, 604179. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.604179>
- Santos M, Rodrigues A, Teixeira JA (2005) Production of dextran and fructose from carob pod extract and cheese whey by *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B512(f). *Biochem Eng J* **25**, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2005.01.022>
- Shenderov BA, Sinitsa AV, Zakharchenko MM, Lang C (2020) Metabiotics: Present state, challenges and perspectives, Springer, Berlin
- Singh A, Vishwakarma V, Singhal B (2018) Metabiotics: The Functional Metabolic Signatures of Probiotics: Current State-of-Art and Future Research Priorities—Metabiotics: Probiotics Effector Molecules. *Adv Biosci Biotechnol* **9**, 147–189. <http://www.scirp.org/journal/abb>
- Soares MG, de Lima M, Reolon Schmidt VC (2021) Technological aspects of kombucha, its applications and the symbiotic culture (SCOBY), and extraction of compounds of interest: A literature review. *Trends Food Sci Technol* **110**, 539-550. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.02.017>
- Su Q, Liu Q (2021) Factors Affecting Gut Microbiome in Daily Diet. *Front Nutr* **8**, 644138. <https://doi.org/10.3389/fnut.2021.644138>

- Tan KX, Chamundeswari VN, Loo SCJ (2020) Prospects of kefir as a food-derived biopolymer for agri-food and biomedical applications. *RSC Adv* **10**, 25339–25351. <https://doi.org/10.1039/D0RA02810J>
- Torán-Pereg P, Del Noval B, Valenzuela S, Martínez J, Prado D, Perisé R, Carlos Arboleya J (2021) Microbiological and sensory characterization of kombucha SCOBY for culinary applications. *Int J Gastron Food Sci* **23**, 100314. <https://doi.org/10.1016/j.ijgfs.2021.100314>
- Tran T, Grandvalet C, Verdier F, Martin A, Alexandre H, Tourdot-Mar'échal R (2020) Microbial dynamics between yeasts and acetic acid bacteria in kombucha: impacts on the chemical composition of the beverage. *Foods* **9**, 963. <https://doi.org/10.3390/foods9070963>
- Vallejo-Cordoba B, Castro-López C, García HS, González-Córdova AF, Hernández-Mendoza A (2020) Postbiotics and Paraprobiotics: A Review of Current Evidence and Emerging Trends, *Advances in Food and Nutrition Research* **94**, 1-34. <https://doi.org/10.1016/bs.afnr.2020.06.001>
- Villarreal-Soto SA Bouajila J, Pace M, Leech J, Cotter PD, Souchard JP, Taillandier P, Beaufort S (2020) Metabolome-microbiome signatures in the fermented beverage, Kombucha. *Int. J Food Microbiol* **333**, 108778. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108778>
- Yusuf D, Nuraida L, Dewanti-Hariyadi R, Hunaefi D (2021) In vitro Antioxidant and α -Glucosidase Inhibitory Activities of *Lactobacillus* spp. Isolated from Indonesian Kefir Grains. *Appl Food Biotechnol* **8**(1), 39-46. <https://doi.org/10.22037/afb.v8i1.30367>
- Zongo O, Cruvellier N, Leray F, Bideaux C, Lesage J, Zongo C, Traoré Y, Savadogo A, Guillouet S (2020) Physicochemical composition and fermentation kinetics of a novel Palm Sap-based Kefir Beverage from the fermentation of *Borassus aethiopum* Mart. fresh sap with kefir grains and ferments. *Sci African* **10**, e00631. <https://doi.org/10.1016/j.sciaf.2020.e00631>

Izjava o izvornosti

Ja Karmen Lozica izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio/la drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Karmen Lozica
Vlastoručni potpis