

**Česká zemědělská univerzita v Praze**

**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů**

**Katedra chemie**



**Tibicos – symbiotická kultura**

**Bakalářská práce**

**Tomáš Bělohradský**

**Pěstování rostlin**

**Vedoucí práce Ing. Matyáš Orsák, Ph.D.**

**© 2019 ČZU v Praze**

### **Čestné prohlášení**

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci „*Tibicos – symbiotická kultura*“ jsem vypracoval samostatně pod vedením vedoucího bakalářské práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autor uvedené bakalářské práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne \_\_\_\_\_

### **Poděkování**

Děkuji všem, kteří byli účastni při psaní této práce. Velký dík patří mému školiteli Ing. Matyášovi Orsákovi, Ph.D. za podnětné připomínky k textu, přátelské seriózní jednání a další náměty pro studium, kterému by se má práce mohla do budoucna věnovat.

Děkuji paní Aleně Hudákové za vytvoření a zpracování fotografií Tibi a za pomoc s pozorováním mikrobioty. Rovněž tak děkuji biochemičce paní Anně Havránkové za možnost diskusí nad zpracovávanými tématy.

Děkuji členům mé rodiny, přátelům a kolegům, kteří mi poskytli nejen technické zázemí, ale i klid a prostor pro pěstování mých vlastních kultur Tibi, kombuchy a tibetského kefiru.

# Tibicos – symbiotická kultura

## Souhrn

Tato práce zpracovaná na základě studia literatury zahrnuje informace o fermentovaných nápojích typu Tibi, kombucha, tibetský a brazilský kefír, mikrobiální diverzitě těchto kultur, metabolismu jednotlivých komponent a chemickém složení výsledného nápoje.

*Tibicos* (syn. Tibi, vodní kefír) je mikrobiální kultura používaná po celém světě k výrobě kvašeného, sladkokyselého, perlivého, mírně alkoholického nápoje. Kultura Tibi je vložena do uzavíratelné nádoby s cukernatým roztokem a sušeným či čerstvým ovocem, kde je ponechána po dobu dvou až tří dnů.

Typická kultura Tibi (nejpřesněji popsána metodou PCR) je složena z kvasinek, jako jsou *Saccharomyces cerevisiae* a *Zygorulasporea florentiana*, které produkují ethanol, a bakterií mléčného kvašení (převážně *Lactobacillus* sp. a *Leuconostoc* sp.) a také bakterií octového kvašení *Acetobacter fabarum*, které oxidují vznikající ethanol na acétát. Mikrobiota žije v těsné blízkosti, čímž je zajištěna mezidruhová výměna metabolitů. Strukturou, ve které kultura žije, je polysacharidový matrix, v tomto případě dextran, průsvitné až mléčně bílé barvy, nepravidelného tvaru o průměru 8-10 mm připomínající pevnou rozvařenou rýži či nahrubo rozemletý rosol.

S cílem zajistit přesné výsledky chemického složení nápoje vědci v uvedených studiích používají vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii (HPLC). Sledovanými obsaženými látkami jsou sacharidy, jako je fruktóza, glukóza, mannitol, a organické kyseliny, jako je kyselina mléčná a octová. Dále byl sledován obsah ethanolu, jehož koncentrace nepřekročila 3,6 g/l. Koncentrace výsledných látek v nápoji se liší v závislosti na množství sacharidů, přidaném druhu ovoce, množství zrn kultury a teplotě, což jsou hlavní faktory, pomocí nichž je sledována variabilita nápojů.

Kultura Tibi byla porovnána s jinými kvasnými kulturami, které se stejně jako Tibi těší oblibě pro své blahodárné účinky na lidský organismus. Porovnáním bylo zjištěno různorodé mikrobiální složení kultur a produktů metabolismu.

Jedním z pozitivních účinků je osídlování trávicího traktu probiotickou mikrobiotou z nápoje, která se během fermentace namnoží a oddělí od matrix.

Tato práce zmiňuje důležité poznatky o složení mikrobioty *Tibicos*, chemickém složení nápoje a možnostech ovlivnění kultivace.

**Klíčová slova:** fermentovaný nápoj, vodní kefír, symbiotická kultura, *Lactobacillus*, *Saccharomyces*, probiotika

# Tibicos – symbiotic culture

## Summary

This thesis was compiled on the basis of studies and literature aiming at fermented beverages including information about beverages such as Tibi, Kombucha, Tibetan and Brazilian kefir. This thesis utilized information about the microbial diversity of these cultures and the metabolisms of individual chemical components resulting from created beverages. *Tibicos* (Tibi, Water kefir) is a microbial culture used throughout the world for brewing a fermented, sweet, acidic and slightly alcoholic beverage. Tibi culture is inserted into a sealable container along with a sugar solution and dried or fresh fruit where it is left for two to three days.

Typical Tibi culture (most accurately analyzed by PCR) contains yeast such as *Saccharomyces cerevisiae*, *Zygorulasporea florentiana*, and lactic acid bacteria - mostly *Lactobacillus* sp. and *Leuconostoc* sp. and also acetic acid bacteria like *Acetobacter fabarum* that oxidize the emerging ethanol into acetate.

Microbial culture grows in close proximity, that enables an interspecific exchange of metabolites. The structure in which this culture grows is a polysaccharide matrix, particularly dextran, translucent, almost milk like white, irregularly shaped with an average size of 8-10 millimeters reminding boiled rice or coarsely grounded jelly.

High-performance liquid chromatography was used by scientists to secure the beverage's precise chemical composition results. Analyzed substances were saccharides such as fructose, glucose, mannitol, and organic acids like lactic acid and acetic acid. Further off, ethanol content was observed, its concentration did not exceed 3,6 g/l. The concentration of resulting substances in the beverage differ in relation to the number of saccharides, added types of fruit, amount of the culture grains and temperature which are the leading factors that enable us to observe diversity among the beverages.

Tibi culture was compared with other yeast cultures, that also affect the human body in a healthy and beneficial way. The comparison determined the diversity of the microbial composition of cultures and metabolism products.

One of the positive effects are probiotic colonization of the microbiotics in the digestive tract. These microbiotics derived from the beverage proliferated during the fermentation process and separated from the matrix.

This thesis mentions important knowledge about the composition of the microbiota *Tibicos*, the chemical composition of the derived beverage and options for influencing its cultivation.

**Keywords:** Fermented beverage, Water kefir, symbiotic culture, *Lactobacillus*, *Saccharomyces*, probiotics

# Obsah

<b>1</b>	<b>Úvod.....</b>	<b>7</b>
<b>2</b>	<b>Cíl práce.....</b>	<b>8</b>
<b>3</b>	<b>Literární rešerše.....</b>	<b>9</b>
<b>3.1</b>	<b>Tibicos neboli vodní kefír .....</b>	<b>9</b>
3.1.1	Mikrobiální složení vodního kefíru (Tibi) .....	11
<b>3.2</b>	<b>Fermentace.....</b>	<b>17</b>
3.2.1	Přínosy fermentace.....	17
3.2.2	Historie využívání fermentačních procesů .....	18
3.2.3	Historie využívání Tibi .....	18
<b>3.3</b>	<b>Biochemie a fyziologie kultury Tibi .....</b>	<b>19</b>
3.3.1	Metabolismus .....	19
3.3.2	Metabolismus cukrů vodního kefíru BMK .....	19
3.3.3	Metabolismus cukrů vodního kefíru BOK.....	22
3.3.4	Bifidobakterie .....	23
3.3.5	Kvasinky .....	25
3.3.6	Exopolysacharidy .....	25
3.3.7	Symbióza.....	27
<b>3.4</b>	<b>Chemické složení koncového produktu.....</b>	<b>29</b>
3.4.1	Hodnota pH.....	29
3.4.2	Koncentrace metabolitů během fermentace .....	30
3.4.3	Změna parametrů fermentace vodního kefíru.....	32
<b>3.5</b>	<b>Podobné kultury pro výrobu fermentovaných nápojů.....</b>	<b>34</b>
3.5.1	Brazilský kefír .....	34
3.5.2	Kombucha .....	37
3.5.3	Tibetský kefír.....	40
<b>3.6</b>	<b>Metoda kultivace vodního kefíru.....</b>	<b>42</b>
3.6.1	Výsledky pozorování .....	42
3.6.2	Růst Tibi krystalků.....	43
3.6.3	Doporučení k dosažení chutného výsledného nápoje.....	45
<b>3.7</b>	<b>Zdravotní přínosy a rizika konzumace.....</b>	<b>48</b>
<b>3.8</b>	<b>Analytické prostředky .....</b>	<b>50</b>
3.8.1	PCR-DGGE .....	50
3.8.2	Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC).....	50
<b>4</b>	<b>Závěr .....</b>	<b>51</b>
<b>5</b>	<b>Literatura.....</b>	<b>53</b>
<b>6</b>	<b>Seznam použitých zkratk a symbolů.....</b>	<b>62</b>
<b>7</b>	<b>Samostatné přílohy.....</b>	<b>I</b>

# 1 Úvod

Existují různé mikrobiální kultury, které se používají k výrobě fermentovaných nápojů. Jsou rozšířené po celém světě. K běžným patří například keřírová kultura a kombucha. Tyto mikrobiální kultury pocházejí z Asie a postupně se rozšířily do dalších zemí. Je známo, že konzumace nápojů, které tyto kultury produkují, může pozitivně ovlivňovat trávení a další metabolické děje v organismu (Qin 2010). Kromě známých mikrobiálních kultur existuje ještě kultura *Tibicos*, neboli vodní keřír, který jsem se rozhodl učinit předmětem mé bakalářské práce. Nápoj připravený fermentací Tibi v roztoku sacharidů s přidáním dalšího ovoce (fíků, rozinek, křížal a citrónu) je sladkokyselý, šumivý a mírně alkoholický.

Vodní keřír jsem začal pěstovat jako chutný nápoj, po jehož konzumaci jsem vnímal svůj dobrý fyzický i psychický stav. Nápoj jsem si brzy oblíbil a začal nabízet ostatním lidem ve svém okolí. Reakce na konzumaci nápoje Tibi byly různorodé; tak jako každému chutná něco jiného, ani můj vodní keřír se nestal ideálním pitím pro všechny. Někdo chtěl sladší, kyselejší, šumivější, barevnější, ovocnější či více alkoholický, až mě to vedlo k různým experimentům v chuti výsledného nápoje. Většina konzumentů se shodla, že by chuť měla být sladkokyselá, mírně perlivá a co možná nejméně alkoholická. Otázkou pro mne jsou účinky nápoje na zdraví při dlouhodobé konzumaci. Zkousím sledovat, jak na něj bude reagovat alergik či astmatik, člověk s otoky či ulcerózní kolitidou, Crohnovou chorobou. Čím více bude pěstitelů nápoje, tím lépe bude možné vysledovat, jak nápoj působí. Také skutečnost, že se jedná o starou mikrobiální kulturu, napovídá o její kvalitě ověřené časem.

Své poznatky jsem rozšířil o poznání četných výzkumů, které byly a jsou dále prováděny. Ve své práci jsem shrnul mikrobiální složení kultury Tibi a chemické složení nápoje. Při zkoumání jsem nabyl přesvědčení, že by bylo dobré porovnat kulturu s dalšími kulturami používanými pro výrobu kvašených nápojů. V následující diplomové práci bych rád pokračoval s výzkumem potenciálně pozitivního vlivu konzumace vodního keříru na lidský metabolismus.

## 2 Cíl práce

1) zjistit z vědeckých literárních zdrojů informace o symbiotické kultuře mikroorganismů pod názvem Tibi (syn. *Tibicos*, vodní kefir), zpracovat přehled o způsobech použití kultury za účelem výroby kvašeného nápoje

2) z relevantních zdrojů zajistit dostatečný počet informací k možnostem ovlivnění kvality výsledného nápoje s použitím kultury Tibi

3) seznámit se s analytickými metodami vhodnými pro posouzení kvality kvašeného nápoje s využitím kultury Tibi



## 3 Literární rešerše

### 3.1 Tibicos neboli vodní kefir

Tibi je název pro symbiotickou mikrobiální kulturu a nápoj jimi produkovaný. Je to nápoj na bázi vody a sacharózy fermentovaný symbiotickou kulturou kvasinek a bakterií, které zabezpečují jeho chuťovou lahodnost. Je lehce šumivý, mírně kyselý s nízkým obsahem alkoholu. Mikroorganismy vodního kefiru jsou přisedlé na tzv. zrnech, která se skládají z polysacharidové matrice dextranu (EPS = exopolysacharid) (Neve 2002). Tato zrna jsou průsvitná až bělavá, nepravidelného tvaru a velikosti o průměru 8-10 mm, připomínající rosolovitou, na jemno nakrájenou hmotu (Reiß 1990).

Mikrobiální složení vodního kefiru a zrn Tibi bylo studováno mnoha autory. Kvasinky identifikované v zrnech byly *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces florentinus*, *Saccharomyces pretoriensis*, *Hanseniaspora valbyensis*, *Hanseniaspora vineae*, *Candida lambica* a *Candida valida* (Leroi & Pidoux 1993; Galli et al. 1995; Franzetti et al. 1998). Bakteriální populace zrn se skládá hlavně z různých hetero-fermentativních a homofermentativních laktobacilů, leukonostoků, pediokoků a někdy z enterokoků (Leroi & Pidoux 1993; Galli et al. 1995; Franzetti et al. 1998). Bylo prokázáno, že kvasinky *Saccharomyces florentinus* stimulují růst a produkci kyseliny mléčné bakteriemi *Lactobacillus hilgardii* (Leroi & Pidoux 1993). Jako faktory stimulující růst byly popsány CO<sub>2</sub>, pyruvát a několik dalších organických kyselin (tj. propionát, acetát a sukcinát). Rozložení sacharózy na glukózu a fruktózu kvasinkami na počátku smíšené fermentace bylo prokázáno jako prospěšné pro růst laktobacilů a produkci kyseliny mléčné. Teplota a pH byly identifikovány jako hlavní vnější faktory ovlivňující produkci kyseliny mléčné pomocí *Lb. hilgardii* ve smíšené kultuře s kvasinkami. Také zjistili, že vysoké množství buněk *Lb. hilgardii* inhibovalo růst kvasinek. Proto zrnová mikrobiota představuje stabilní a vzájemně interagující symbiotickou komunitu potřebnou pro optimální průběh drah smíšené fermentace. V matrici dextranu existuje symbiotický vztah mezi kvasinkami *Saccharomyces cerevisiae* a bakteriemi mléčného kvašení (*Lactobacillus brevis* a *Streptococcus lactis*) (Reiß 1990) a dle novějších poznatků bakteriemi octového kvašení (např. *Acetobacter fabarus*) (Gulitz et al. 2011).

Nezávisle na kultuře, která byla testována moderní metodou, byly zjištěny rody bakterií mléčného kvašení a bakterií octového kvašení. Analýza kvasinkových složek prokázala, že se skládala z rodů *Dekkera*, *Hanseniaspora*, *Saccharomyces*, *Saccharomyces*, *Torulaspora* a *Lachancea*. Tato informace pomůže při konečné identifikaci mikroorganismů odpovědných za vlastnosti těchto nápojů, které mohou podporovat zdraví. Skenováním zrn elektronovým mikroskopem bylo zjištěno nerovnoměrné rozložení mikroorganismů. Kvasinky a bakterie se častěji vyskytují na vnější kompaktní vrstvě než ve vnitřní houbovitě matrici (Neve 2002). Zrna jsou dutá pravděpodobně akumulací oxidu uhličitého, který se vytváří během kvašení.

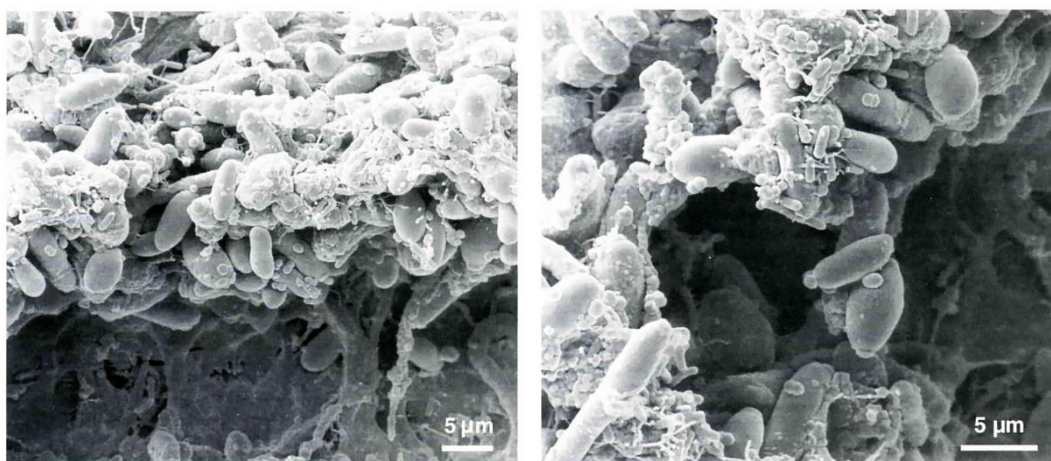
Tradičně se Tibi inkubují v cukernatém roztoku při pokojové teplotě za nesterilních podmínek. K růstu nežádoucích mikroorganismů obvykle nedochází. Za těchto podmínek zrna rostou a množí se ve velkém množství, což způsobuje rozpad matrice a tím uvolnění vázaného oxidu uhličitého. Po 1-3 dnech můžeme vzniklý nápoj konzumovat. Po scezení a propláchnutí vodou je kultura připravena pro další kvašení. Produkt je vhodný k okamžité spotřebě, protože při dalším skladování pokračuje fermentace. Podle délky fermentace má nápoj různou chuť a působí odlišně na trávení (Kaufmann 2007).

Na rozdíl od studií zabývajících se složením a produkcí kefíru a kombuchy, kterých bylo provedeno mnoho, studií zabývajících se fyziologickými a biochemickými procesy během fermentace Tibi existuje méně (Neve 2002). Mikroflóra Tibi se viditelně liší od mikroflóry mléčného kefíru. Všechny tyto kultury se skládají z podobného komplexu kvasinek a bakterií mléčného kvašení, bakterií octového kvašení a bifidobakterií, které mají nižší nároky na prostředí než kultury mléčného kefíru (Reiß 1990).

### 3.1.1 Mikrobiální složení vodního kefíru (Tibi)

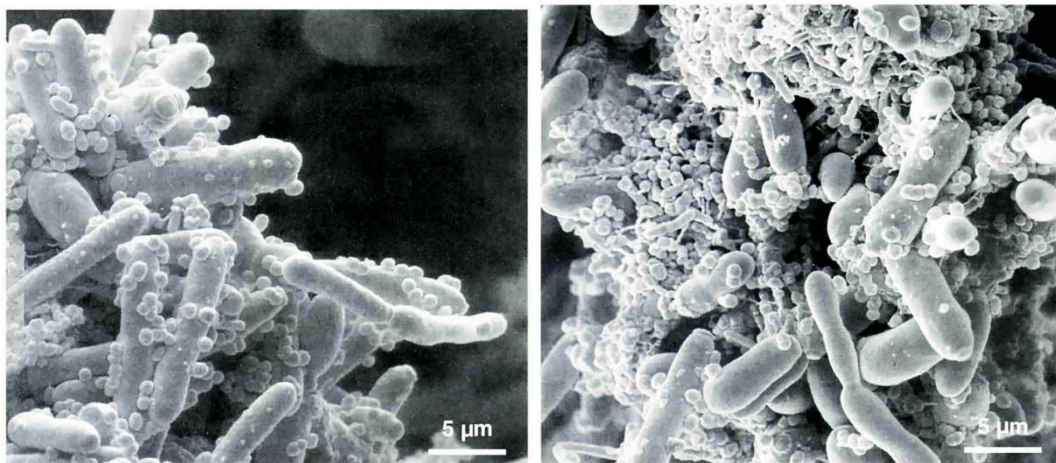
Zrna tvořící polysacharidovou matrix byla produkována symbiotickou kulturou bakterií za pomoci kvasinek. Tibi bylo možné pozorovat jako jeden organismus pouhým okem, zatímco jeho složení z několika organismů bylo možné zjistit až pod mikroskopem. Zkoumáním různých kultur Tibi několika autory bylo prokázáno jejich různorodé mikrobiotické složení. Rozdílly se vyskytly v druhovém i procentuálním složení kultur. (Zatímco všechny kultury obsahovaly kvasinky druhu *Saccharomyces* sp. a bakterie druhu *Lactobacillus* sp. a *Leuconostocs* sp., jen v některých se vyskytovaly i jiné druhy). Bez ohledu na to všechny kultury vykazovaly stabilní růst.

Dřívější studie prováděné skenovacím elektronovým mikroskopem (např. Neve 2002) se staly podkladem pro další zkoumání přesnější metodou, a to polymerázovou řetězovou reakcí (PCR). Bylo zjištěno, že vnitřní části zrn tvořených nestrukturovanou houbovitou maticí obsahují velké množství děr, jen málo kolonizovaných mikrobiotou. Povrch zrn byl pokryt tlustou a hustou vrstvou kvasinek a bakterií (obr. 1).

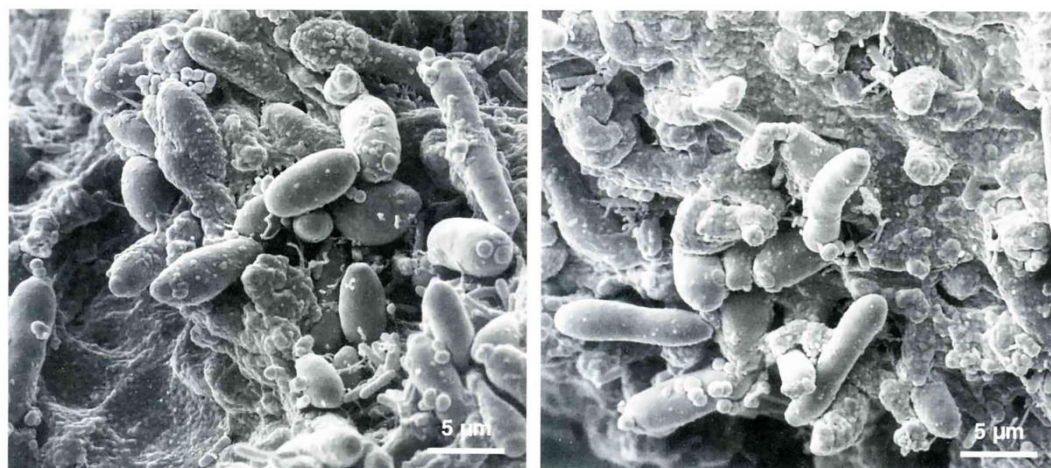


Obr. 1: Snímek z elektronového mikroskopu mikrobiologické populace na povrchu zrn vodního kefíru (měřítko = 5 $\mu$ m) dle (Neve 2002)

Na mikrofotografiích kvasinky jasně dominovaly v pozorované mikroflóře vodního kefíru. Převážně byly nalezeny dva různé tvary těl kvasinek, část buněk byla prodloužena a vykazovala různá stigmata po stranách jako výsledek dělení (obr. 2 a 3).



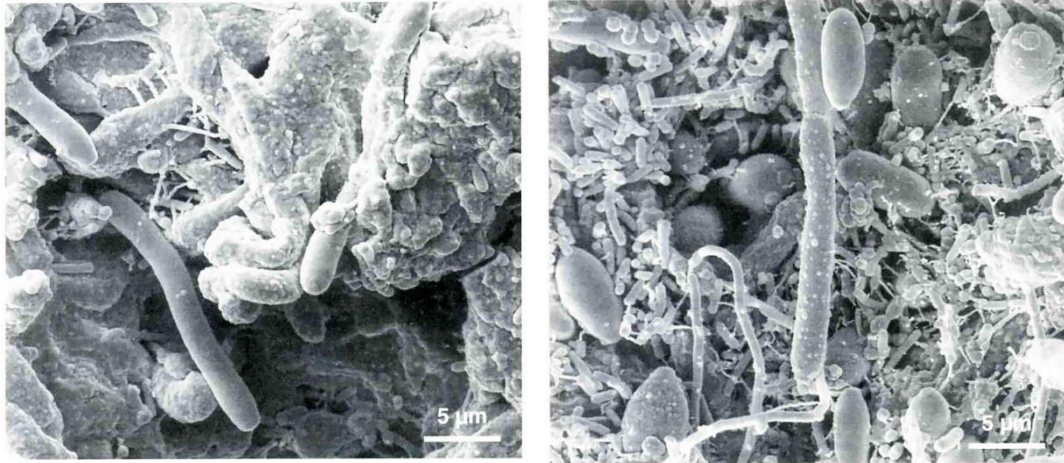
Obr. 2: Snímek z elektronového mikroskopu mikroflóry zrn vodního kefíru s velkým podílem kvasinek a koků (měřítko = 5µm) dle (Neve 2002)



Obr. 3: Snímek z elektronového mikroskopu mikroflóry zrn vodního kefíru s velkým podílem populace kvasinek v tuhé struktuře zrn (měřítko = 5µm) dle (Neve 2002)

Tyto kvasinky byly schopny tvořit filamenty. Velmi dlouhé kvasinkové buňky jsou znázorněny na mikrofotografiích 4 a 5.

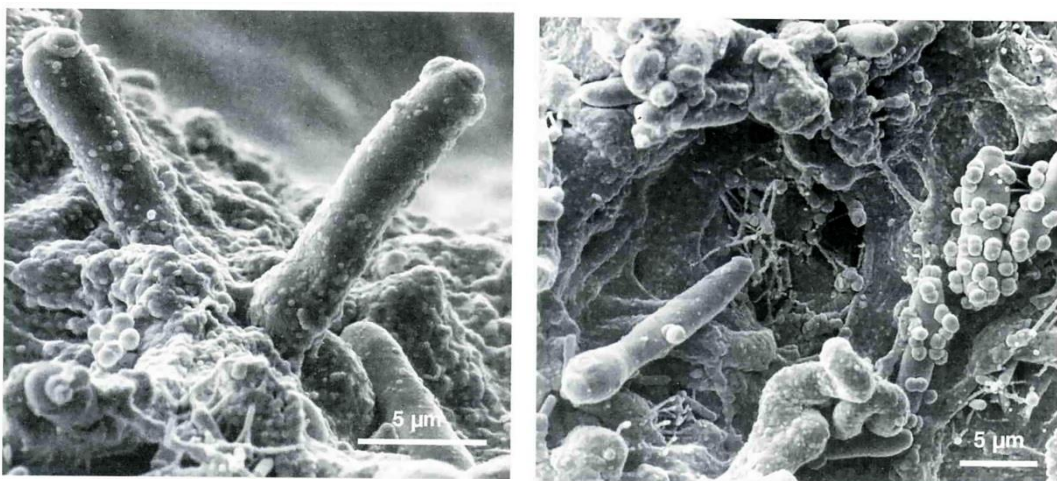




**Obr. 4: Snímek z elektronového mikroskopu mikroflóry zrn vodního kefiru s kvasinkami různých morfortypů a polysacharidy produkujícími laktobacily (měřítko = 5µm) dle (Neve 2002)**

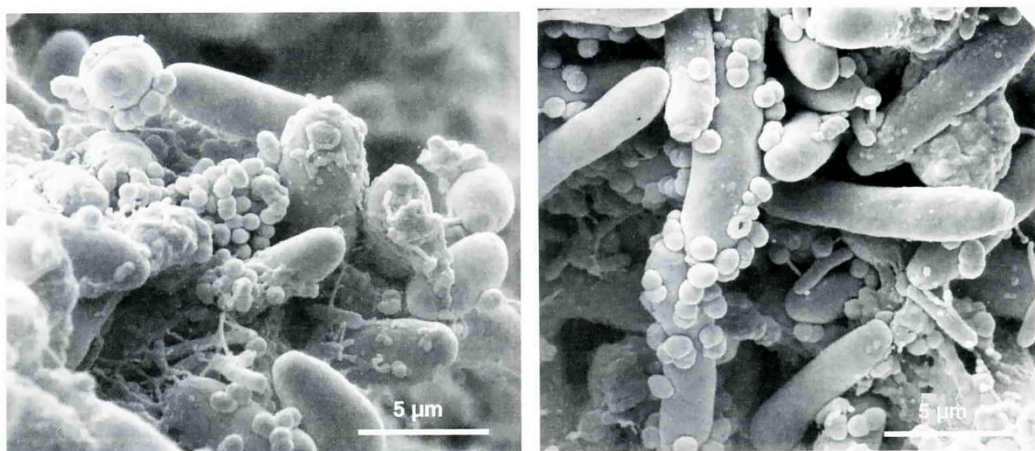
Dlouhé buňky byly připoutány jedním buněčným pólem k matici (zrnům). Druhý typ kvasinek byl reprezentován buňkami ve tvaru citronu s jedním či bez polárního stigmatu. Většina kvasinkových buněk byla buď přilnutá k vrstvě matrix, nebo byla součástí husté matrice (obr. 3 a 4). Kvasinkové buňky nacházející se na povrchu matrix často vykazovaly čisté povrchy buněčných stěn (obr. 1 a 2). Oba tvary kvasinek jsou znázorněny při vyšším zvětšení na obr. 6 a 7.

Když byla zrna vodního kefiru pozorována v roce 1995, podařilo se izolovat kvasinky, které byly identifikovány jako *Saccharomyces florentinus* a *Hanseniaspora valbyensis* (Engel, nepublikované). Tyto mikrobiologické výsledky dobře korelují s dvěma morfologicky odlišnými druhy kvasinek, které byly pozorovány elektronovým skenovacím mikroskopem. Z toho vyplývá, že se tato kvasinková populace lišila od kvasinkové mikrobioty nalezené v zrnech mléčného kefiru (Neve 2002).



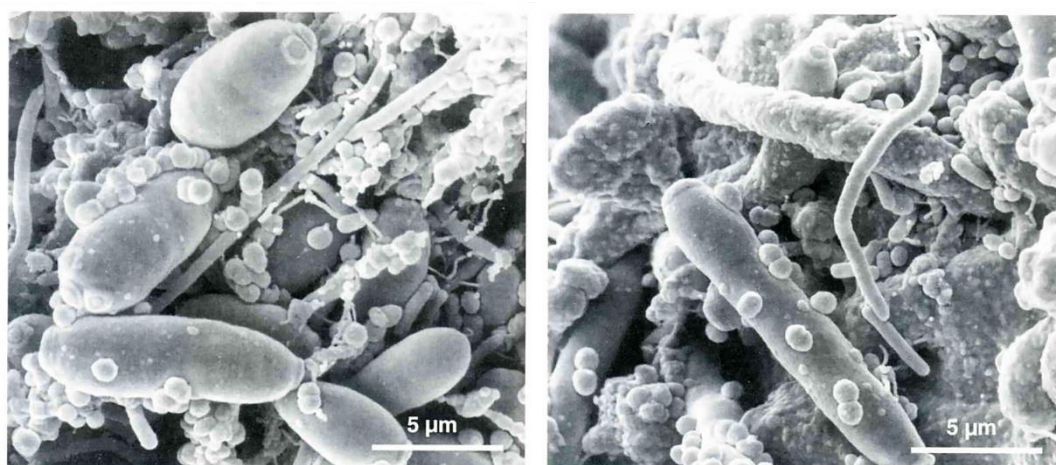
**Obr. 5: Snímek z elektronového mikroskopu mikroflóry zrn vodního kefiru s charakteristickými filenty (měřítko = 5µm) dle (Neve 2002)**

Bakteriální koky, kterých je velký počet a které se vyskytují buď jednotlivě, v párech nebo v krátkých řetězcích, byly úzce spojeny s kvasinkami; rostou buď přímo na povrchu kvasinek, nebo v mikrokoloniích mezi nimi (obr. 2 a 6).



Obr. 6: Snímek z elektronového mikroskopu zobrazující rozmanitost mikroflóry zrn vodního kefiru, složených z kvasinek, koků a krátkých tyčinkových bakterií ve velkém zvětšení (měřítko = 5µm) dle (Neve 2002)

Koky byly identifikovány jako *Streptococcus* sp. a v jiných oblastech byla koková bakteriální mikroflóra přítomna v poměrně nízkých počtech (obr. 3). V porovnání s koky se objevily výrazně nižší počty tyčinkovitých bakterií (laktobacily). Tyčinky měly buď krátkou, nebo výrazně delší délku (obr. 4, 6 a 7). Jelikož koková populace nevytvářela fibrilární polymery, tyčinkovité laktobacily odhalily dlouhá filamenta vystupující na povrch, která vytvářela mosty mezi produkčními buňkami, kvasinkovými buňkami a amorfni dextranovou maticí (obr. 4, 5 a 6). Obrázky 6 a 7 ilustrují, že tyčinkovité bakterie rostly přednostně v oblastech mezi kvasinkovými buňkami a nikoliv na jejich povrchu, jak bylo patrné u kokových bakterií (Neve 2002).



Obr. 7: Snímek z elektronového mikroskopu zobrazující rozmanitost mikroflóry zrn vodního kefiru, složených z kvasinek, koků, krátkých a dlouhých tyčinkových bakterií ve velkém zvětšení (měřítko = 5µm) dle (Neve 2002)

Mikrobiální složení vodního kefiru a zrn Tibi bylo již dříve studováno několika autory. V zrnech byly identifikovány kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces florentinus*, *Saccharomyces pretoriensis*, *Hanseniaspora valbyensis*, *Hanseniaspora vineae*, *Candida lambica* a *Candida valida* (Leroi & Pidoux 1993; Galli et al. 1995). Kvasinky izolované Franzettim z vodních kefirových nápojů byly identifikovány jako *Saccharomyces cerevisiae*, *Kloeckera* sp. a *Hansenula yalbensis* (1998). Bakteriální populace žijící na zrnech se skládala hlavně z různých heterofermentativních a homofermentativních rodů *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* a někdy z *Enterococcus* (Leroi & Pidoux 1993; Galli et al. 1995; Franzetti et al. 1998).

Výzkum zaměřený na složení mikrobioty provedl také Gulitz (2011) na třech různých vzorcích vodního kefiru (I, II, III) analytickými způsoby zkoumání DNA.

Složení mikrobioty všech třech vzorků vodního kefiru bylo rozdílné. Hlavní flóra vodního kefiru I a II byla složena třemi hlavními druhy, ale v odlišném zastoupení. Převládajícím rodem ve vzorku I a II byl *Lactobacillus hordei* (Lb), který představoval 57,4 % ve vzorku I a 25,2 % ve vzorku II. Hlavním komponentem ve vzorku II byl

*Lb. nagellii* s 39,9 %, zatímco ve vzorku I jen 14,2 %. *Lc. mesenteroides* byl přítomen v zastoupení 14,7 % (I) a 18,1 % (II). Třetí vzorek vodního kefiru byl převážně složen z rodu *Leuconostocs* (Lc), *Lc. citreum* 24,3 % a *Lc. mesenteroides* 24,3 % a *Acetobacter fabarum* s 17,8 % vedle laktobacilů, *Lb. hordei* 11,2 % a *Lb. nagellii* 14 %. *Lb. hilgardii* byl nalezen pouze ve vzorku I (2,6 %) a *Lb. casei* nebyl nalezen ve vzorku III., *Ac. orientalis* a *Lc. citreum* byly nalezeny jen ve vzorku III (4,7 % a 24,3 %) (Tab č.1).

Nově detekované bakterie byly identifikovány jako *Acetobacter fabarum* a *Ac. orientalis*, které byly zastoupeny nejhojněji ve vzorku III.

Tab. č. 1: Přehled bakteriálního zastoupení ve vzorcích v procentech (Gulitz et al. 2011, upraveno)

Přehled bakteriálního zastoupení ve vzorcích v procentech (Gulitz et al. 2011, upraveno)			
Druh	Vodní kefir I	Vodní kefir II	Vodní kefir III
<i>Lb. casei</i>	7,9	7,0	
<i>Lb. hilgardii</i>	2,6		
<i>Lb. hordei</i>	57,4	25,2	11,2
<i>Lb. nagellii</i>	14,2	39,9	14
<i>Lc. citreum</i>			24,3
<i>Lc. mesenteroides</i>	14,7	18,1	28
<i>Ac. fabarum</i>	3,2	9,8	17,8
<i>Ac. orientalis</i>			4,7

Dále byly dvěma metodami identifikovány kvasinky: 1) porovnáním částečné sekvence 26s rDNA, což je metoda PCR zabezpečující citlivější a mnohonásobně přesnější určení odlišného druhu oproti metodě 16S rDNA a 2) metodou FTIR (infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací) *Saccharomyces cerevisiae*, *Lachancea fermentati*, *Hanseniaspora valbyensis* a *Zygorulasporea florentina*. Zatímco identifikovat kvasinku *H. valbyensis* bylo přesné, zastoupení *S. cerevisiae* a *Z. florentina* bylo obtížné stanovit, protože jejich kolonie mají stejnou morfologickou stavbu. V součtu byly zastoupeny 94 % (I), 92 % (II) a 93 % (III) ve vzorcích. Vzorek III byl podroben přesnějšímu zkoumání, přičemž bylo identifikováno 16 kolonií *S. cerevisiae* a 25 kolonií *Z. florentina* ze 44 napočítaných kolonií. *L. fermentati* byl zastoupen ve vzorcích I 6 % a II 8 %. *H. valbyensis* byl zastoupen ve vzorku III 7 % (Gulitz et al. 2011). Celkem 57 bakterií mléčného kvašení náležející k druhům *Lb. casei*, *Lb. hordei*, *Lb. nagelii*, *Lb. hilgardii* a *Lc. mesenteroides* bylo schopno produkovat exopolysacharidy (EPS) ze sacharózy (Gulitz et al. 2011).

Bylo prokázáno, že struktura dextranu zrn Tibi je tvořena nerozpustným polysacharidem sestávající se převážně z 1,6- $\alpha$ -D-glukanu. Tvorba extracelulárních polymerních látek polysacharidem, který produkuje *Lactobacillus hilgardii*, byla potvrzena elektronovou mikroskopií (Pidoux 1989). Konjugát fluoresceinu lektin-konkavalin byl použit jako marker pro barvení úseků zrn Tibi (Moinas 1980) a ukázalo se, že vnější, hustě obsypané zrnité vrstvy obsahovaly méně dextranu než vnitřek, který byl silně zabarven.



## 3.2 Fermentace

Výraz „fermentace“ neboli kvašení je odvozen od latinského slovesa *fervere* „k varu“, což popisuje vzhled kvašeného nápoje při jeho výrobě z ovoce nebo sladového zrna. Vzhled varu je způsoben tvorbou bublin oxidu uhličitého vyvolaných anaerobním katabolismem sacharidů přítomných v extraktu. Pojem fermentace přináší různé významy pro biochemiky a inženýry mikrobiologie - biochemický význam fermentace se týká výroby energie katabolismem organických sloučenin, zatímco její význam v průmyslové mikrobiologii je mnohem širší.

Fermentace je proces přeměny energie, při kterém se za účasti mikroorganismů rozkládají látky energeticky bohaté na látky energeticky chudší. Při tom se uvolňuje energie ve formě ATP, kterou je možné dále využít. Toto kvašení probíhající v anaerobním prostředí je jednodušší přeměna energie, než je dýchání, ale zároveň je energeticky méně výhodné.

V mikrobiologickém světě vodního keříru se uplatňuje především alkoholové a mléčné kvašení. Alkoholové kvašení je biochemický proces, při kterém jsou sacharidy pomocí kvasinek a jejich enzymů rozkládány přes meziproducty na ethanol, CO<sub>2</sub> a energii.

Výroba ethanolu působením kvasinek na slad nebo ovocné extrakty se provádí ve velkém měřítku po mnoho let, byla prvním „průmyslovým“ procesem mikrobiálního metabolismu. Průmysloví mikrobiologové tak rozšířili termín kvašení na popsání jakýchkoliv procesů pro produkci výrobku kulturou mikroorganismů (Stanbury 2017b).

Mléčná fermentace je anaerobní proces, při němž bakterie rozkládají sacharidy za vzniku kyseliny mléčné a energie. Podle přítomného kmene mikroorganismu vznikají i jiné produkty. Rozlišujeme homofermentativní a heterofermentativní kmeny. Rozdělení je patrné v tabulce č. 1 (viz str. 21). Využívání mléčného kvašení je v potravinářství a zemědělství často zmiňovaný proces (Magalhães 2011).

### 3.2.1 Přínosy fermentace

Fermentace je přírodní způsob uchování potravin, především je to však energeticky nenáročný proces přípravy chutného pokrmu s pozitivním vlivem na střevní trakt. Takto zpracované potraviny jsou označovány jako probiotika. Při fermentování se změní složení a tím i chuť produktu v důsledku vytváření organických kyselin. Ty jsou tělu prospěšné. Bylo provedeno mnoho výzkumů zabývajících se pozitivním přínosem procesu fermentace na lidské zdraví. Mezi nejznámější a nejpoužívanější probiotika patří bakterie mléčného kvašení (BMK) produkující laktát jako výsledný produkt (Jayabalan et al. 2011).

### 3.2.2 Historie využívání fermentačních procesů

Proces fermentace je znám lidstvu od pradávna. Samotné slovo fermentace bylo zaznamenáno ve 14. století. Po celém světě byly objeveny nádoby běžně používané na víno a jiné alkoholické nápoje; nálezy se datují až do roku 1500 př. n. l. Historici se shodují na tom, že úplně první surovinou pro fermentaci, se kterou člověk přišel do styku, byl med - konkrétně při výrobě medoviny nebo medového vína. Ve 14. století byla fermentace prvně popsána a využívána hlavně v alchymii. V 16. století se toto slovo začalo používat ve spojení s produkcí vína a piva. Dále se proces fermentace začal uplatňovat při konzervaci potravin. V 19. století Louis Pasteur popsal proces kažení mléka, objevil způsob konzervace - pasterizaci a podrobněji popsal fermentaci. Byl také první, kdo vědecky popsal proces fermentace, což byl pro vědu veliký krok kupředu (Stanbury 2017a).

### 3.2.3 Historie využívání Tibi

Původ zrn vodního kefiru zůstává neobjasněný. Existují popisy podobných zrn nazývaných „ginger beer plant“ na výrobu zázvorového piva, které přinesli angličtí vojáci z krymské války roku 1855 (Reiß 1990). Další názvy poukazující na místo pěstování a důvod použití uvádí Kebler (1921): California bees, African bees, Ale nuts, Australian bees, “Balm of Gilead,” Beer bees, Beer seeds, Beer plant, Bees, Ginger Beer Plant, Ginger bees, Japanese Beer Seeds a Vinegar bees. Kromě toho se zmiňuje o využívání nápojové v tehdejší medicíně. Například jako stimulant, laxativum, proti střevnímu nadýmání, poruch filtrace ledvin a zmírnění revmatismu kloubů.

Tibi zrna pocházející z Mexika se vyskytují v podobě tvrdých granulí v listech kaktusu rodu *Opuntia*. Tato zrna byla a stále jsou používána domorodci pro přípravu nápojů. Na konci minulého století byla Tibi zrna známa v Paříži pod názvem „zrna vivanta“ a asi od roku 1930 jsou dobře známa ve Švýcarsku pod názvem „fer-ment de raisins“. Podle Stadelmanna jsou Tibi zrna používána ve švýcarském městě Beromünster pro přípravu osvěžujících nápojů (1961). Předpokládá se, že zrna Tibi jsou shodná s jinými kombinacemi kvasinek a bakterií používaných v různých částech světa pro přípravu fermentovaných nápojů, např: ginger beer plant, California bees a další (Gulitz et al. 2011).

### 3.3 Biochemie a fyziologie kultury Tibi

#### 3.3.1 Metabolismus

Základem pro fungování života je správná organizace molekul za vzniku polyfázového systému. Mezi sloučeninami dominují biopolymery. Přes veškeré snahy konstrukce souboru správných molekul, který by byl totožný s organismem, nebude organismus jevit známky života. Další podmínkou je schopnost přijímat energii a stavební substrát. Za tímto účelem příroda vytvořila systém chemických dějů, síť reakcí, která umožňuje přijímat energii a stavební substrát z okolí pro svou existenci. Všechny děje se označují jako látková přeměna neboli metabolismus. Zahrnuje škálu přeměn všech látek, které do organismu vstoupily a neustále probíhající přeměnu látek, které se v organismu vytvořily. Metabolismus má tedy dvě nerozlučitelné složky „jinjang“ - látkovou a energetickou. Zajišťuje přeměnu energie a výrobu stavebního materiálu organismů.

Existuje jen několik studií zabývajících se biochemickými procesy v průběhu fermentační aktivity Tibi. V nich je zkoumána symbióza, metabolismus glukózy, tvorba ethanolu a působení různých druhů ovoce jako přísad substrátu (Stadie et al. 2013). Reißova studie (1990) poskytuje další informace týkající se metabolismu zrn Tibi za použití moderních enzymatických testovacích systémů. Ve vodním kefiru byly nalezeny bakterie mléčného kvašení, bakterie octového kvašení, bifidobakterie a kvasinky. Jejich metabolismus cukrů je rozdílný a jeho popsání je klíčové k pochopení interakcí mezi jednotlivými druhy, proto jsou zde uváděny.

#### 3.3.2 Metabolismus cukrů vodního kefiru BMK

Bakterie mléčného kvašení (BMK) jsou grampozitivní bakterie, které využívají sacharidy jakožto zdroj energie při tvorbě kyseliny mléčné. Sem patří druhy jako *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactococcus* a *Vagococcus* (Jay 1992). Ve vodním kefiru najdeme zástupce z rodů *Lactobacillus* a *Leuconostoc* (Gulitz et al. 2013). Metabolismus cukrů je rozdělen do dvou skupin bakterií, homofermentativní a heterofermentativní BMK. Homofermentativní BMK rozkládají glukózu podle Emden-Meyerhofovy metabolické cesty s výsledným produktem laktátem. Je zde minimálně 85% výtěžek laktátu z celkového množství při přeměně glukózy. Během heterofermentačního procesu se vytváří různé hmotnostní množství laktátu, acetátu, ethanolu, oxidu uhličitého a aromatických sloučenin, tedy nositelů chuti a vůně (diacetyl, ethery). To je popsáno pentoso-fosfátovou cestou. Během reakce vznikne z jednoho molu glukózy 1 mol ATP, přičemž homofermentativní proces vykazuje 2 moly ATP. V přítomnosti elektronových akceptorů jako fruktóza, citrát, malát, fumarát, kyslík nebo nenasycené mastné kyseliny (Stolz et al. 1995) a přidaných enzymů acetát kinázy pak mohou být tvořeny acetát a ATP namísto ethanolu (viz Schéma č. 1, str. 22). Při těchto podmínkách

heterofermentativní proces končí s výsledkem 2 molů ATP. Fakultativně heterofermentační *Lactobacillus* kvasí hexózy na laktát jako homofermentativní bakterie, ale zároveň jsou schopné produkce ethanolu a laktátu, aniž by produkovaly plyny z pentóz. Tento typ nebyl zatím ve vodním kefiru pozorován. Tab. č. 1 zobrazuje homo- a heterofermentační druhy BMK obsažené ve vodním kefiru. Transport sacharózy do buněk je povětšinou prováděn fosfotransferázovým systémem (PTS) se současně probíhající fosforylací sacharózy na sacharóza-6-fosfát, donorem fosfátové skupiny je fosfoenolpyruvát (PEP) (Kaditzky 2008).

Tab. č. 1: **Homo- a heterofermentativní druhy ve vodním kefiru**  
(Gulitz et al. 2013, upraveno)

Homofermentativní BMK ve vodním kefiru	Heterofermentativní BMK ve vodním kefiru
<i>Lb. hordei</i>	<i>Lc. mesenteroides</i>
<i>Lb. nagelii</i>	<i>Lc. citreum</i>
<i>Lb. casei</i>	<i>Lb. hilgardii</i>
<i>Lb. satsumensis</i>	

Schéma č. 1: Fermentace mléčné kyseliny homofermentativními bakteriemi mléčného kvašení (Doenecke et al. 2005; Goyal 1999, upraveno)

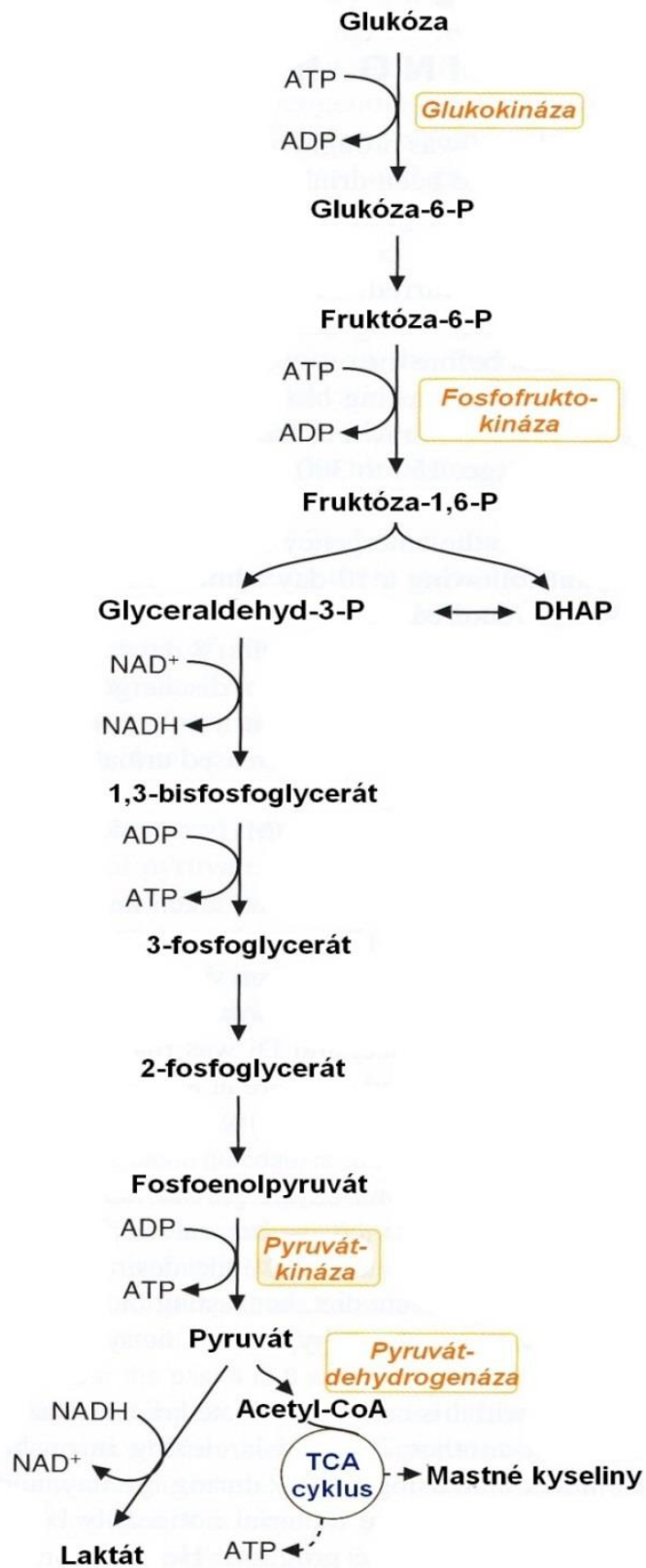
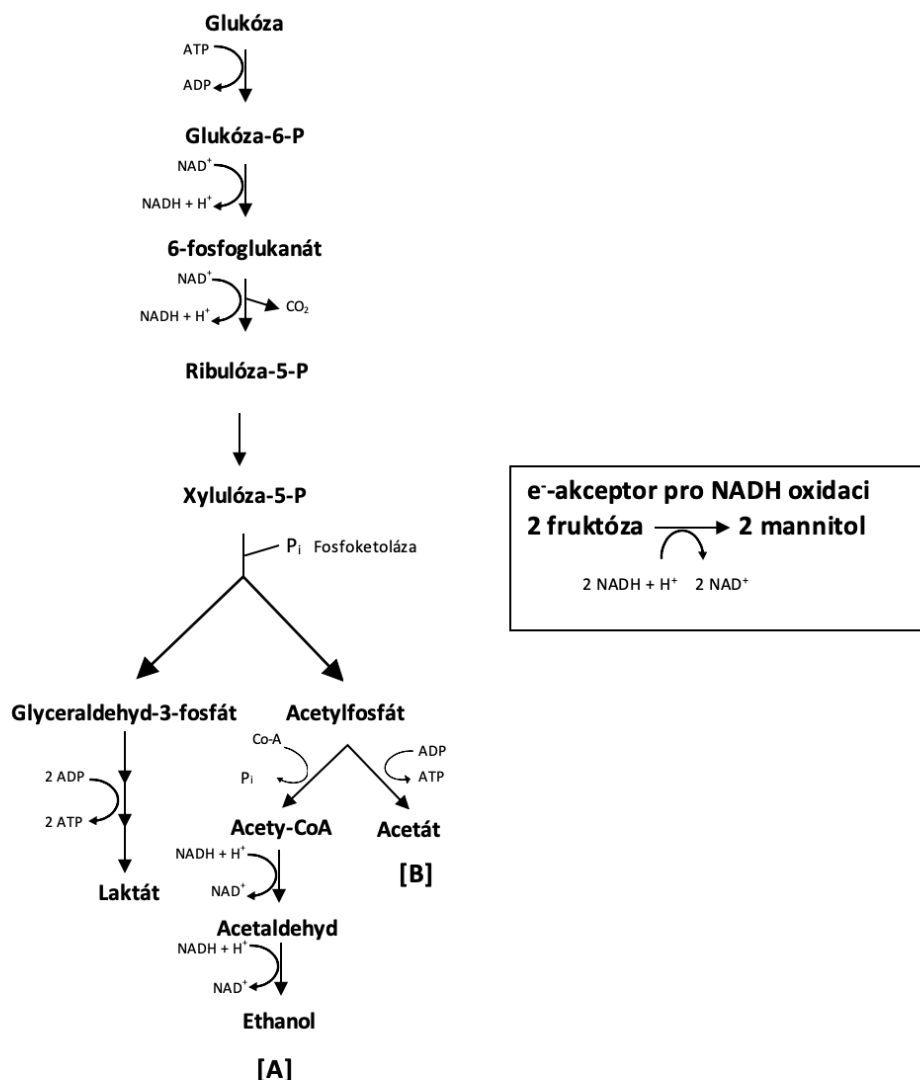


Schéma č. 2: Fermentace kyseliny mléčné heterofermentativními bakteriemi mléčného kvašení (Goyal 1999, upraveno)



<b>[A]</b> glukóza + ADP + P <sub>i</sub>	→ laktát + ethanol + CO <sub>2</sub> + ATP
<b>[B]</b> glukóza + 2 fruktóza + 2 ADP + 2 P <sub>i</sub>	→ laktát + acetát + CO <sub>2</sub> + 2 ATP + 2 mannitol

### 3.3.3 Metabolismus cukrů vodního kefíru BOK

Bakterie octového kvašení (BOK) jsou gramnegativní, pH rezistentní (až do 2,6 pH) a obligátně aerobní. Zahrnují rody *Acetobacter* a *Gluconobacter*. *Gluconobacter* generuje energii neúplnou oxidací sacharidů či alkoholů s výslednou kyselinou (kyselina glukonová z glukózy a kyselina octová z ethanolu) (Krämer 2010; Jakob et al. 2012). *Acetobacter* sp. je následně schopen dále oxidovat kyselinu octovou na CO<sub>2</sub> a H<sub>2</sub>O. BOK se

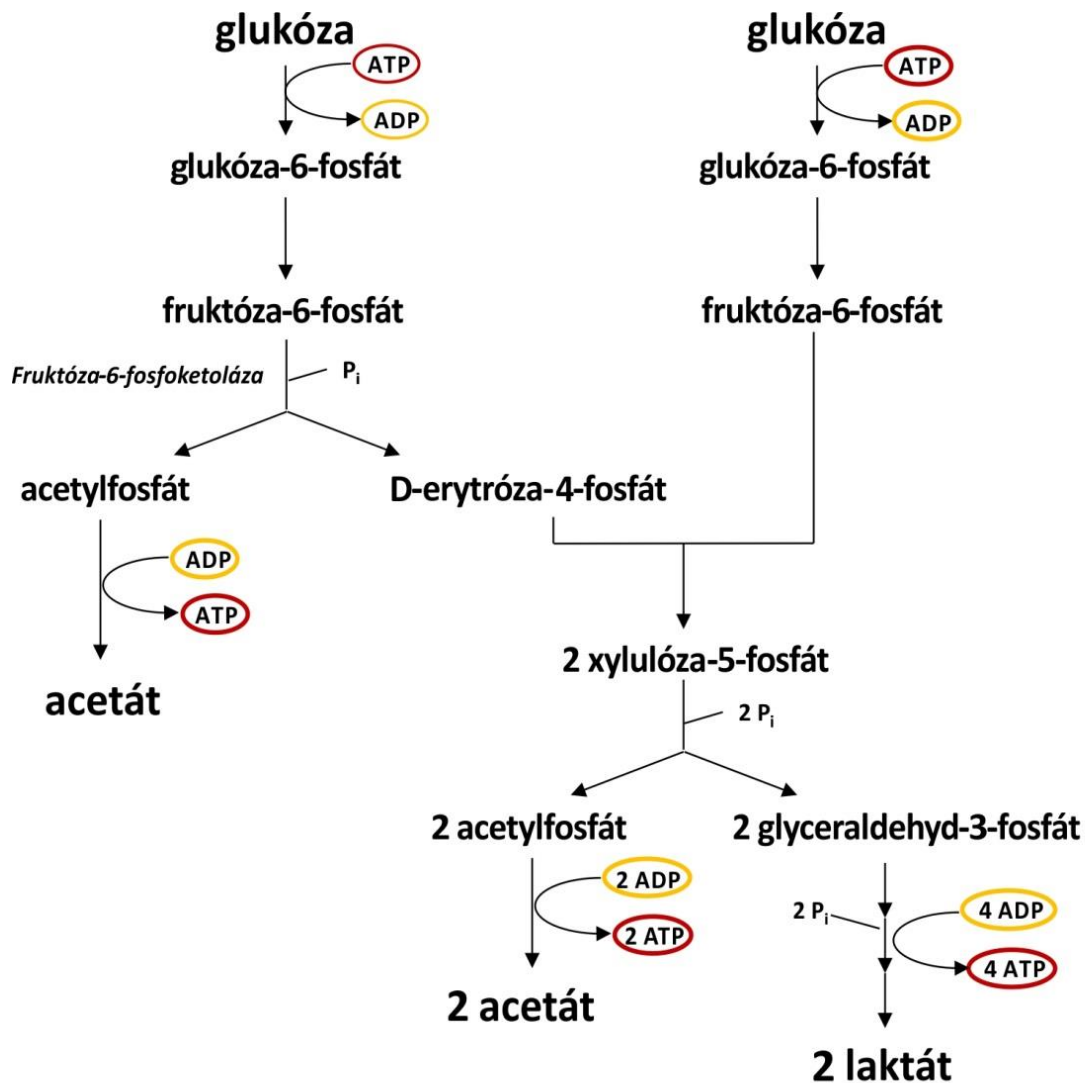
přirozeně vyskytují v rostlinách bohatých na sacharidy či ethanol. Dnes jsou tyto bakterie stěžejní při výrobě kyseliny octové (Krämer 2010) a to je důvod, proč jsou nežádoucí při výrobě vína. Několik BOK kmenů může být identifikováno jako producent fruktanu (polymeru složenému ze samých fruktóz) (Jakob et al. 2012, 2013). Během kvašení ve vodním kefiru hrají BOK malou roli, protože jsou zastoupeny v malém počtu. Děje se tak pravděpodobně proto, že prostředí (uzavřená pěstební nádoba) je limitováno množstvím, respektive nedostatkem kyslíku, který se ke kultuře dostane jen při otevření nádoby a novém založení kultury k fermentaci (Gulitz et al. 2013).

### 3.3.4 Bifidobakterie

Bifidobakterie jsou grampozitivní bakterie, které energii získávají štěpením sacharidů. Kyselina mléčná je jedním z jejich hlavních produktů, proto byly dlouze klasifikovány jako BMK. Následně díky jejich fylogenetické a metabolické odlišnosti byly taxonomicky přezařazeny roku 1974 (Ballongue 1993). Monosacharidy jsou metabolizovány takzvaným bifido přenosem, který je rozdílný ve srovnání s homo – a heterolytickým štěpením BOK (Schéma č. 3). Namísto aldolázy a glukóza-6-fosfátdehydrogenázy bifidobakterie produkují fruktóza-6-fosfátfosfoketolázu, což je klíčový enzym v jejich štěpném řetězci a marker pro *Bifidobacteriaceae* (Kaditzsky 2008). Na základě schopnosti používat různé typy oligosacharidů jsou bifidobakterie přizpůsobeny specifickému prostředí - právě proto jsou schopny přežívat extrémní podmínky stanoviště. Bifidobakterie jsou součástí bakteriální kolonizace lidského a zvířecího trávicího traktu. Zvláště velké množství může být nalezeno v exkrementech kojenců, kteří nedokáží strávit oligosacharidy mateřského mléka. Vedle jejich schopnosti štěpit oligosacharidy tvoří kyselinu mléčnou, která díky svému nízkému pH inhibuje patogeny v prostředí výrobou bakteriocinů, a navíc blokuje přichycení toxinů na stěnu střev. Díky tomu jsou bifidobakterie zmiňovány jako zdraví prospěšné a často využívané jako probiotika (de Vries & Stouthamer 1968).

Většina druhů bifidobakterií by mohla být izolována z lidského a zvířecího střeva. Nejvíce rostou při teplotě 37 °C v anaerobním prostředí, což odpovídá střevu. S použitím kulturově nezávislé metody je možné detekovat *Bifidobacterium* sp. v kefiru a vodním kefiru (Gulitz et al. 2013). *Bifidobacterium psychraeolophylum* je druh, který bylo možné kultivovat z vodního kefiru, je neobvyklým druhem mezi bifidobakteriemi. Je to kvůli jeho schopnosti růstu při nízkých teplotách v aerobním prostředí. Stále však vykazuje optimální růst při zmíněných vhodných podmínkách (Simpson et al. 2004).

Schéma č. 3: **Metabolismus glukózy bifidobakterií tzv. bifidus shunt**  
(Stadie et al. 2013, upraveno)



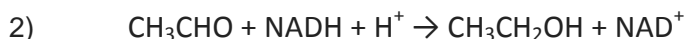


### 3.3.5 Kvasinky

Kvasinky získávají většinu energie katabolytickým rozkladem glukózy (glykolýza). Jsou schopné využít glukózu anaerobně či aerobně, při anaerobním alkoholovém kvašení za vzniku ethanolu. Ve vodním kefiru je přítomna fakultativně anaerobní kvasinka *Saccharomyces cerevisiae*. Roztok, ve kterém je vodní kefir pěstován, obsahuje glukózu a fruktózu, ale nejhojněji zastoupeným cukrem je sacharóza. Disacharid sacharóza je kvasinkami mimobuněčně hydrolyzovaný za vzniku fruktózy a glukózy (Dickinson & Krucberg 2006).

Kvasinky jsou zodpovědné za produkci ethanolu v nápoji. Proces kvašení se děje tedy v současné přítomnosti sacharidů. Kvasný proces probíhá ve dvou krocích, v prvním se pyruvát dekarboxyluje na acetaldehyd a  $\text{CO}_2$ . Tato reakce je umožněna enzymem pyruvátdekarboxilázou. Ve druhém kroku je acetaldehyd redukován na ethanol enzymem alkoholdehydrogenázou. Ve druhém kroku je NADH přeměněn zpět na  $\text{NAD}^+$ , a tím se v buňce obnoví oxidovaná forma.

Chemický vzorec:



*Saccharomyces* sp. jsou osmotolerantní kvasinky, a proto jsou schopné růst na substrátu s velkou koncentrací cukru. Roztok s vodním kefirem má velký obsah cukru 80-90 g/l a nízkou koncentraci aminokyselin, což je náročné prostředí pro mikroorganismy. Právě *Zygorulaspora florentina*, dominující kmen kvasinek ve studovaném vodním kefiru, je znám svou osmotickou tolerancí. A hlavně o tomto druhu je známo, že způsobuje kažení potravin, což je ovšem při fermentaci ve vodním kefiru svým způsobem žádoucí (Dickinson & Krucberg 2006).

### 3.3.6 Exopolysacharidy

Polysacharidy jsou vysokomolekulární sloučeniny skládající se z glykosidicky vázaných monosacharidů. V přírodě jsou tyto látky široce rozšířené (např. celulóza nebo chitin) jako rezervní materiály, jako škrob či glykogen a jako vodu vázající agar či pektin. Funkční vlastnosti se odvíjejí z rozdílných vazeb (napojení) na velikosti a typ monomerů (Belitz et al. 2001). První popis mikrobiálních polysacharidů byl pořízen roku 1839, kdy Kircher pozoroval mikroorganismy rostoucí na cukerném substrátu (Jay 1992). Mikrobiální polysacharidy, které jsou vylučovány vně buňky, se nazývají exopolysacharidy (EPS). EPS byly považovány za skladiště výživných látek, ale ukázalo se, že většina bakterií není schopná metabolizovat jejich vlastní EPS (Cerning 1990). Pravděpodobně slouží jako prevence před vyschnutím, proti působení toxinů, antibiotik či makrofágům a osmotickými změnami. Další funkce

spočívá v tom, že mikroorganismy přilnou k pevným substrátům s EPS a vytvoří biofilmovou formaci (de Vuyst & Degeest 1999). Např. zubní plak je komplexní biofilm různých EPS tvořený bakteriemi, fruktany a glukany (Russel 2009). EPS, které jsou srostlé s buněčným povrchem, jsou kapsovité, zatímco volné EPS je spíše slizovité. V určitých případech mohou mikroorganismy produkovat oba typy (Cerning 1990).

Dále známe heteropolysacharidy tvořené různými cukernatými složkami s opakující se jednotkou. Tyto jednotky jsou syntetizovány uvnitř buněk a polymerázovány vně. To je energeticky závislý proces. Příkladem je kefiran skládající se napůl z glukózy a galaktózy (de Vuyst & Degeest 1999).

Energie potřebná pro reakci cukernatých monomerů se odpoutá z glykosidických vazeb sacharózy. Transferázní reakce glykosyltransferázy vede k tvorbě EPS, jelikož jsou cukernaté monomery transportovány k rostoucímu polysacharidnímu řetězci (Kaditzky 2008). Za syntézu EPS jsou dle Gulitzova et al. (2011) pozorování zodpovědné *Lb. hilgardii*, *Lc. mesenteroides*, *Lc. citreum*, *Lb. hordei*, *Lb. nagelii*, *Lb. casei*. Podle pozorování Stadie byl hodnocen obsah vyprodukované EPS na agarovém podkladě a v nápoji. Dominantní druhy vytvářející EPS v nápoji jsou *Lb. hilgardii*, *Lb. nagelii*, *Lc. citreum*. Kultura je schopna života jen na polysacharidové matrix, kterou si sama vytváří. Funkce EPS v kultuře vodního kefiru je udržení mikrobioty pohromadě a tím umožnění probíhání celého komplexu metabolických dějů (Stadie et al. 2013).

### 3.3.7 Symbióza

Symbióza je vztah dvou různých organismů. V základu definujeme mutualismus, komensalismus a parazitismus. Organismy žijí mutualicky, když oba mají ze soužití prospěch, ale zároveň jsou schopny žít samy. Komensalismus je označení vztahu, kdy jeden má zjevný benefit a druhý nevykazuje výraznou změnu. Během parazitického vztahu jeden vykazuje benefity (parazit) a druhý je poškozován (hostitel). Navíc propojené vztahy dvou a více populací jsou založeny na náročných potřebách a mohou se přeměnit z mutualismu na komensalismus či úplně zrušit v případě nedostatku potravy v prostředí. Interakce mezi různými organismy budou různé, například změnou svého prostředí, úpravou pH, výměnou metabolitů či tvorbou látek zcela nových, které ani jeden nedokáže vyrobit samostatně, dále vylučování bílkovin a přenosem genů (Frey - Klett et al. 2011). Z toho plyne, že spolupracovat se všeobecně vyplatí.

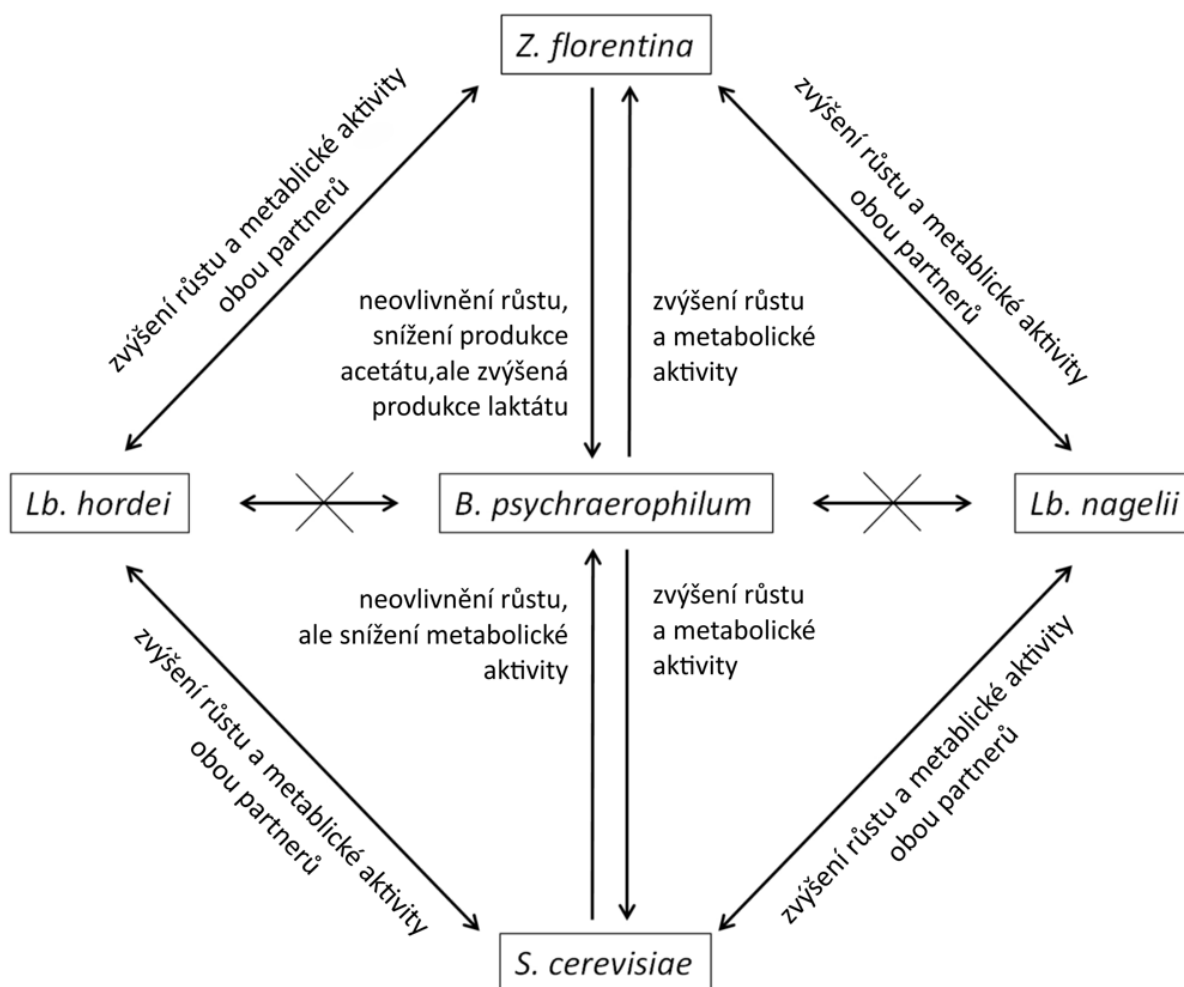
Níže jsou popsány vzájemné interakce mezi jednotlivými druhy, které byly identifikovány. Jde o vztahy symbiotické i mutualistické. O kultuře se dá tvrdit, že je vyvážená, jelikož vypadá zdravě a populace roste. V první studii od Leroie a Pidoux (1993) jsou definovány vztahy mezi *Lb. hilgardii* a *Zygorulaspóra florentiana*, v kultuře byl *Lb. hilgardii* podporován v tvorbě kyseliny mléčné, ale růst *Zygorulaspory* byl značně zpomalen, takže byl jejich vztah definován jako parazitická interakce. Ukázalo se, že CO<sub>2</sub>, pyruvát, propionát, acetát a sukcinát, totiž metabolity kvasinek, jsou zodpovědné za pozitivní vliv kultury *Lb. hilgardii*. Také autoři odkazují na fakt, že kombinace *Lb. hilgardii* a *Candida lambica* neprokazuje stimulaci, ba naopak, vznikající alginát vápenatý blokuje produkci kyseliny mléčné inhibicí bakterií (Leroi & Pidoux 1993).

Bylo prokázáno, že kvasinky *Saccharomyces florentinus* stimulují růst a produkci kyseliny mléčné bakteriemi *Lactobacillus hilgardii* (Leroi & Pidoux 1993). Jako faktory stimulující růst byly popsány CO<sub>2</sub>, pyruvát a několik dalších organických kyselin (tj. propionát, acetát a sukcinát). Rozložení sacharózy na glukózu a fruktózu kvasinkami na počátku smíšené fermentace bylo prokázáno jako prospěšné pro růst laktobacilů a produkci kyseliny mléčné. Teplota a pH byly identifikovány jako hlavní vnější faktory ovlivňující produkci kyseliny mléčné pomocí *Lb. hilgardii* ve smíchané kultuře s kvasinkami. Naproti tomu vysoké množství buněk *Lb. hilgardii* inhiboval růst tyčinkových bakterií, který dobře koreloval se zjištěním, že tyčinkovité bakterie byly detekovány v nižších počtech (Leroi & Pidoux 1993). Proto zrnová mikroflóra představuje stabilní a vyváženou symbiotickou komunitu potřebnou pro optimální průběh drah smíšené fermentace

Pro zjištění míry symbiózy byla zrna rozmixována a ponechána fermentaci po dobu tří měsíců. Tibi zrna nebyla schopna opětovně narůst. Bylo zjištěno, že mikrobiota musí být v blízkosti, aby stavěla zrna. Dále byly testovány vlivy na růst jednodruhovou a vícedruhovou kultivací.

Každá testovaná a společná kultivace kvasinek a laktobacilů prokázala zlepšení růstu v porovnání s jednodruhovou kultivací individuálních organismů. Oba laktobacily ukázaly srovnatelně pozitivní účinky na růst obou druhů kvasinek, zatímco společná kultivace *Lb. hordei* a *Z. florentina* ukázala znatelnější zlepšení než kultivace se *S. cerevisiae*. Stacionární fáze *Lb. nagelii* byla podobná jak u společné, tak u jednodruhové kultivace, ale rychlost růstu v exponenciální fázi byla vyšší v kultivaci společné. Společná kultivace jiných druhů Lactobacilů a Leuconostoců prokázala srovnatelné výsledky. Společná kultivace kvasinek a *Bifidobacterium psychraerophilum* prospěla v růstu kvasinkám, přičemž růst *B. psychraerophilum* nebyl ovlivněn. Společná kultivace kvasinek *S. cerevisiae* a *Z. florentina* společně s *B. psychraerophilum* vykazují nižší metabolickou aktivitu oproti jednodruhové kultivaci. Vliv na kvasinky byl naopak pozitivní ve smyslu zvýšení růstu a metabolické aktivity. Ukázalo se, že je to kvůli soupeření o stejné živné látky. Limitující živinou byly bílkoviny. Společná kultivace laktobacilů a *B. psychraerophilum* neprokázala odlišnosti oproti jednodruhové kultivaci (Stadie et al. 2013). Vztahy jsou shrnuty a vyjádřeny ve schématu č. 5 dle Stadie et al. (2013, upraveno).

Schéma č. 5: Shrnutí výsledků experimentu interakcí mezi mikrobiotou vodního kefiru dle Stadie et al. (2013, upraveno)



### 3.4 Chemické složení koncového produktu

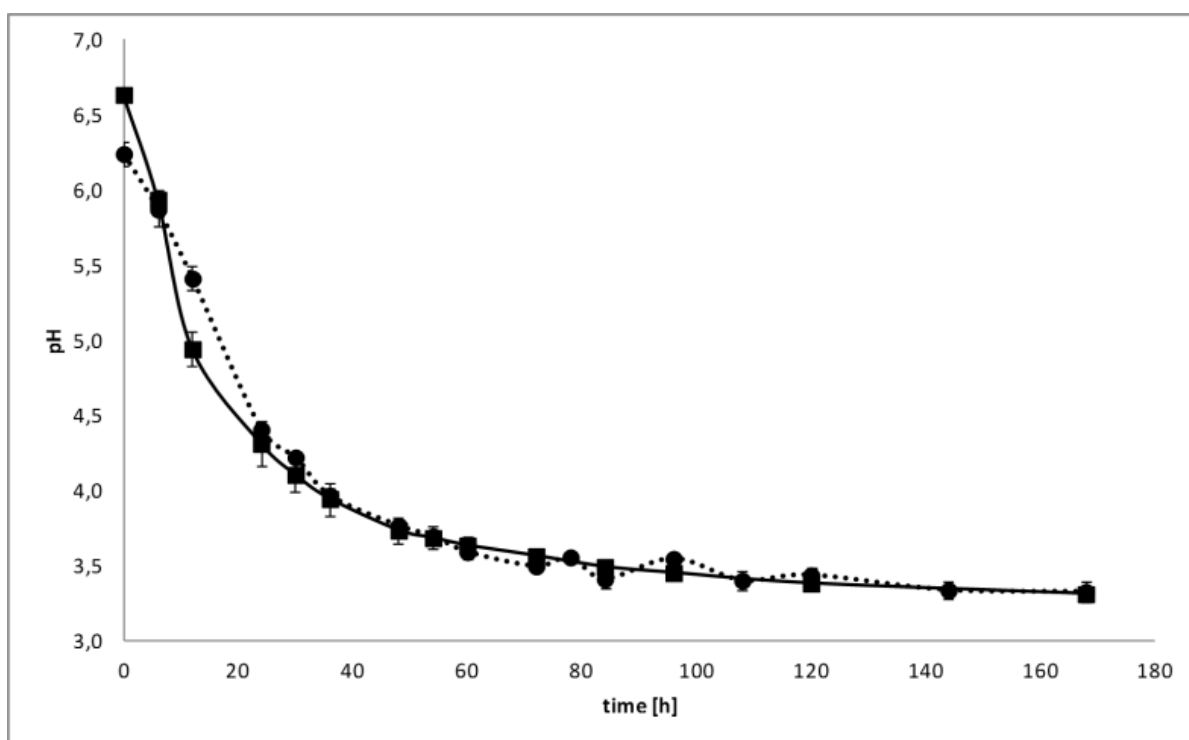
Byly zkoumány dvě kultury pocházející z různých zdrojů. Obě byly kultivovány ve stejných podmínkách. Ty tvořil roztok vodního keříru (RVK) 10 ml fíkového extraktu, 80 g sacharidů na litr čisté vody. Fíkový extrakt je tvořen ze 48 g fíků, které byly louhovány 20 minut ve vodě a následně byly velké kusy vybrány a menší rozmixovány. Vzorky byly značeny písmeny A a B. Kultura vážící 80 g ve vlhké formě byla vložena do 2 l láhve na 72 hodin při teplotě 21 °C. Dále byly pozorovány varianty v 12 °C a 37 °C. V určitých časových intervalech byly odebírány vzorky na analýzu. PH bylo měřeno elektrodou a metabolity metodou HPLC a IEC.

#### 3.4.1 Hodnota pH

Během kvašení se hodnota pH snížila z 6,5 na 3,5 za 48 hodin. Nápoj je normálně konzumován po 2 až 3 dnech, kdy pH klesá velmi pomalu, tedy zcela zanedbatelně.

#### Graf č. 1: Změna pH v průběhu fermentace

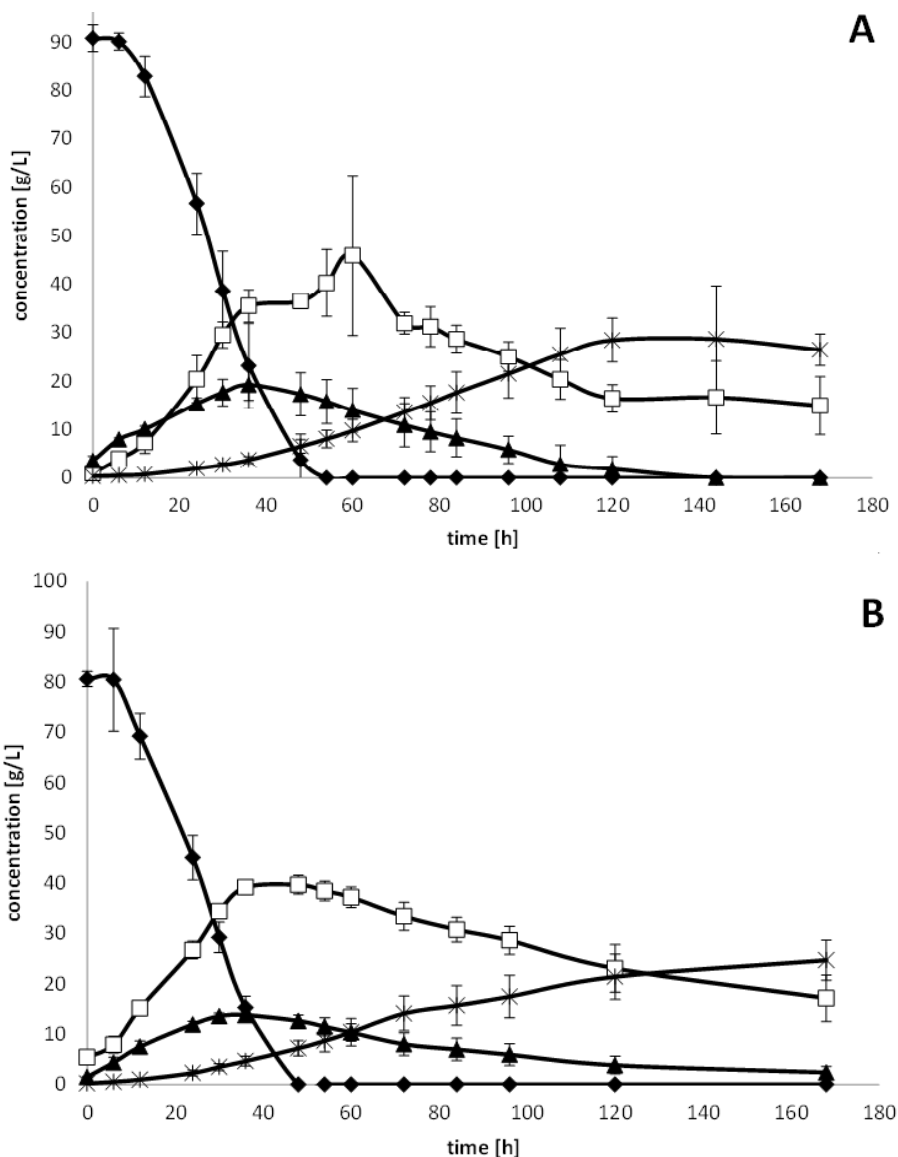
Čtverečky značí vzorek A a kolečka vzorek B. (Stadie et al. 2013)



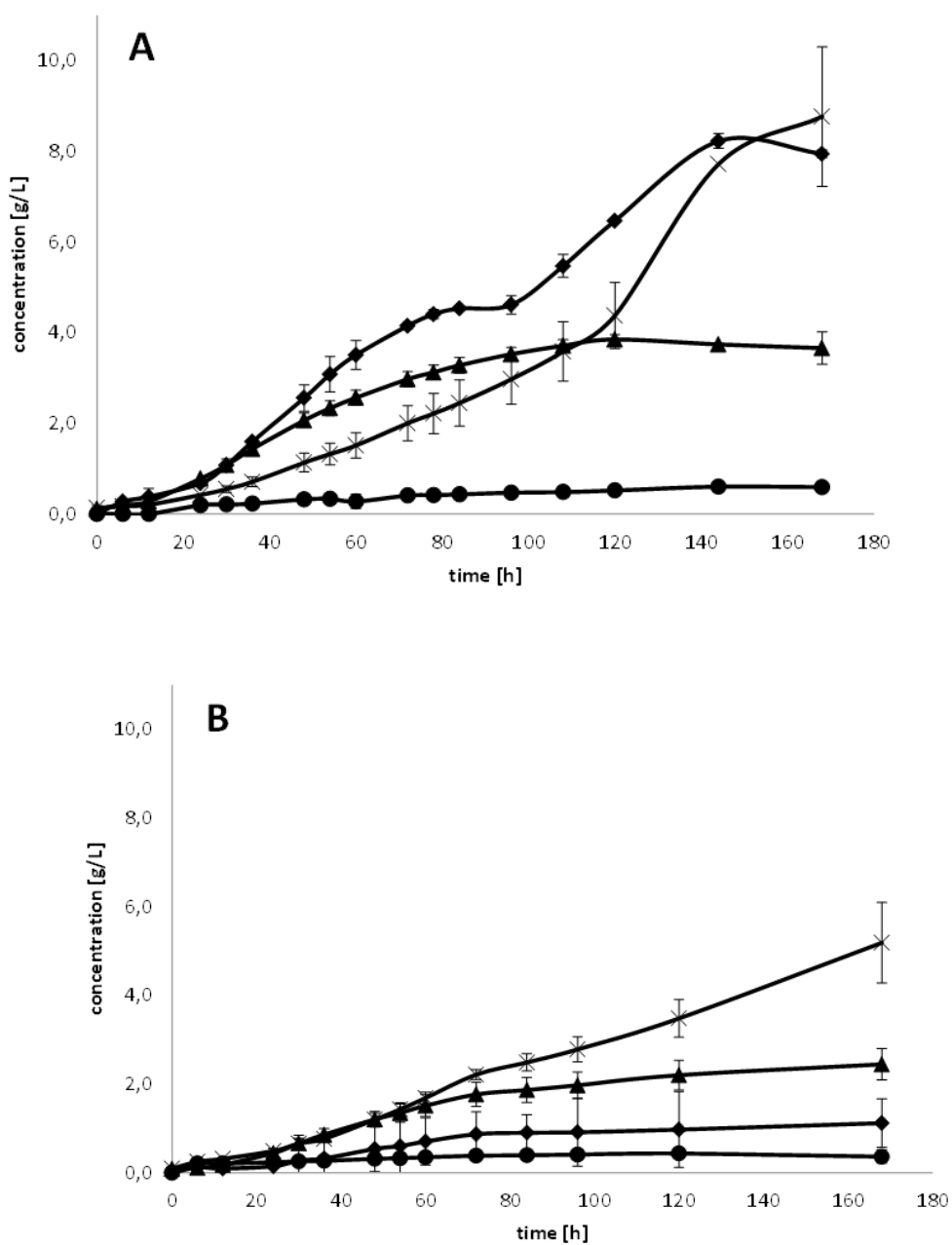
### 3.4.2 Koncentrace metabolitů během fermentace

Roztoky dvou různých kefírů byly podrobeny zkoumání v návaznosti na zjištění stupně metabolismu cukrů, ethanolu a organických kyselin. Během 48 hodin fermentace je sacharóza rozložena na fruktózu, glukózu a mannitol. Koncentrace glukózy se sníží po 36 hodinách a koncentrace fruktózy po 60 hodinách. Metabolismus cukrů a jejich přeměna stejně jako výroba sukcinátu a ethanolu probíhala v obou vzorcích podobně. Rozdíly byly pozorovány v čase, kdy po 96 hodinách začala stoupat koncentrace kyseliny mléčné ve vzorku A na 3.7 g/l, zatímco vzorek B stagnoval na 2 g/l po 72 hodinách fermentace. Zajímavý je výsledek mannitolu, jehož koncentrace ve vzorku A stoupla na 8 g/l, ale produkce mannitolu v supernatantu B stagnovala po 72 hodinách na 1 g/l. (Znázorněno v grafu č. 2 a č. 3).

Graf č. 2: **Koncentrace cukrů a ethanolu v průběhu fermentace vodního kefíru** Supernatanty vodních kefírů A a B byly analyzovány a koncentrace zakresleny: sacharózy (diamanty), glukózy (trojúhelníky), fruktózy (čtverce) a ethanolu (kříže). (Stadie et al. 2013)



Graf č. 3: Metabolická produkce v průběhu fermentace vodního kefíru

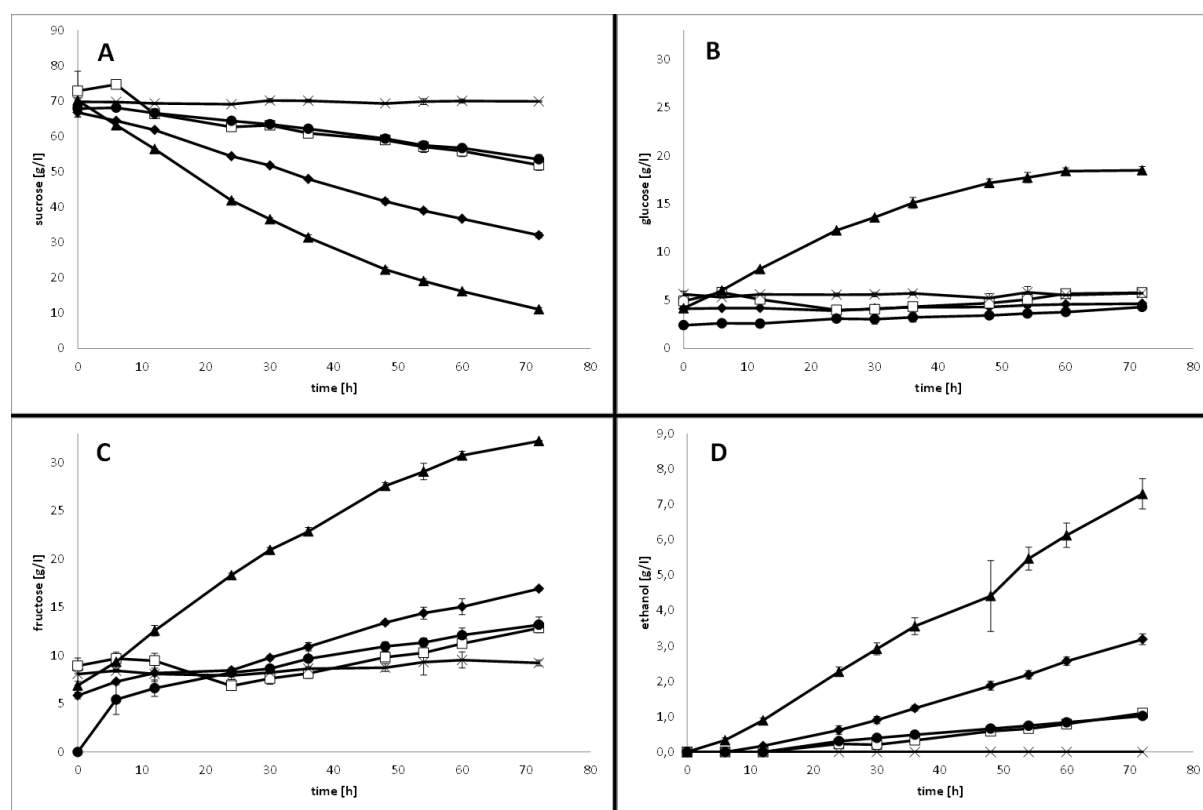


Supernatanty vodních kefírů A a B byly analyzovány a zakresleny koncentrace laktátu (trojúhelníky), acetátu (kříže), sukcinátu-aniont jantarové kyseliny (kruhy) a mannitol (diamanty) (Stadie et al. 2013).

### 3.4.3 Změna parametrů fermentace vodního keříru

Vliv fermentačních parametrů byl pozorován v závislosti na metabolismu cukrů a produkci koncových produktů jako ethanol a organické kyseliny. Roztok vodního keříru se standardními podmínkami (21 °C, fíkový extrakt) byl porovnán s roztoky vodního keříru rozdílných podmínek (12 °C, 37 °C, rozinky a meruňky).

Graf č. 4: Srovnání koncentrace cukrů a ethanolu v rozdílných podmínkách (Stadie et al. 2013)

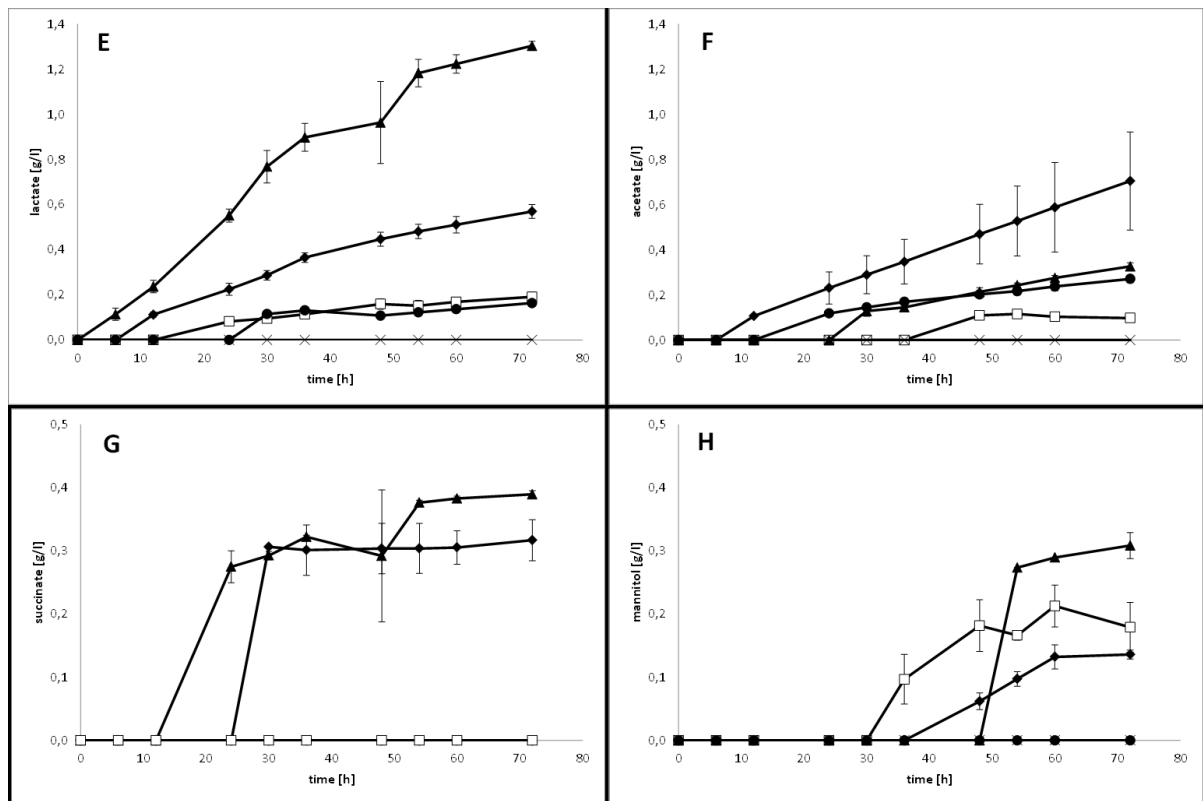


Roztok vodního keříru byl analyzován za standardních podmínek (21 °C, fíkový extrakt: diamanty), za odlišných teplot 12 °C (čtverečky) a 37 °C (trojúhelníky) a odlišných ovocných extraktů, rozinky (21 °C, křížky) a meruňky (21 °C, kolečka). Grafy zobrazují jejich změnu koncentrace sacharózy (A), glukózy (B), fruktózy (C) a ethanolu (D) během fermentace.

Obsah sacharózy poklesl ve všech podmínkách až na supernatant s extraktem rozinek. Nejvyšší spotřeba sacharózy byla detekována při 37 °C (okolo 70 g/l během 72 h), při ostatních teplotách okolo 40 g/l během 72 h (A). Obsah glukózy rostl od začátku fermentace v podmínkách 37 °C, v ostatních podmínkách se během 72 h nezměnil (B). Podobné pozorování proběhlo na obsah ethanolu a fruktózy. Tyto složky také mírně narůstaly při 12 °C a v roztoku s meruňkovým extraktem. Koncentrace značně narostly ve standardních podmínkách (C, D).



Graf č. 5: Srovnání obsahu organických kyselin a mannitolu v rozdílných podmínkách (Stadie et al. 2013)



Roztok vodního keříru byl analyzován za standardních podmínek (21 °C, fíkový extrakt: diamanty), za odlišných teplot 12 °C (čtverečky) a 37 °C (trojúhelníky) a odlišných ovocných extraktů, rozinky (21 °C, křížky) a meruňky (21 °C: kolečka) zobrazující jejich změnu koncentrace laktátu (E), acetátu (F), sukcinátu (G) a mannitolu (H) během fermentace.

Množství laktátu obzvláště vzrostlo během fermentace při 37 °C. Srovnatelný nárůst laktátu a acetátu může být determinován ve standardních podmínkách. Produkce laktátu při 12 °C začala po 10 h, ale produkce acetátu nezačala během 36h fermentace.

V roztoku s meruňkovým extraktem při 21 °C začala produkce acetátu po 12 h a laktátu po 24 h (E, F). Obsah sukcinátu je vyšší v případě standardního roztoku a podmínek 37 °C v obou případech 0,3 g/l. První v produkci mannitolu je roztok kultivovaný při 12 °C po 30 h, ve standardních podmínkách produkce začala po 36 h a při 37 °C až po 48 h (G, H). V případě použitých rozinek při 21 °C nebyly pozorovány žádné změny pozorovaných látek.

### 3.5 Podobné kultury pro výrobu fermentovaných nápojů

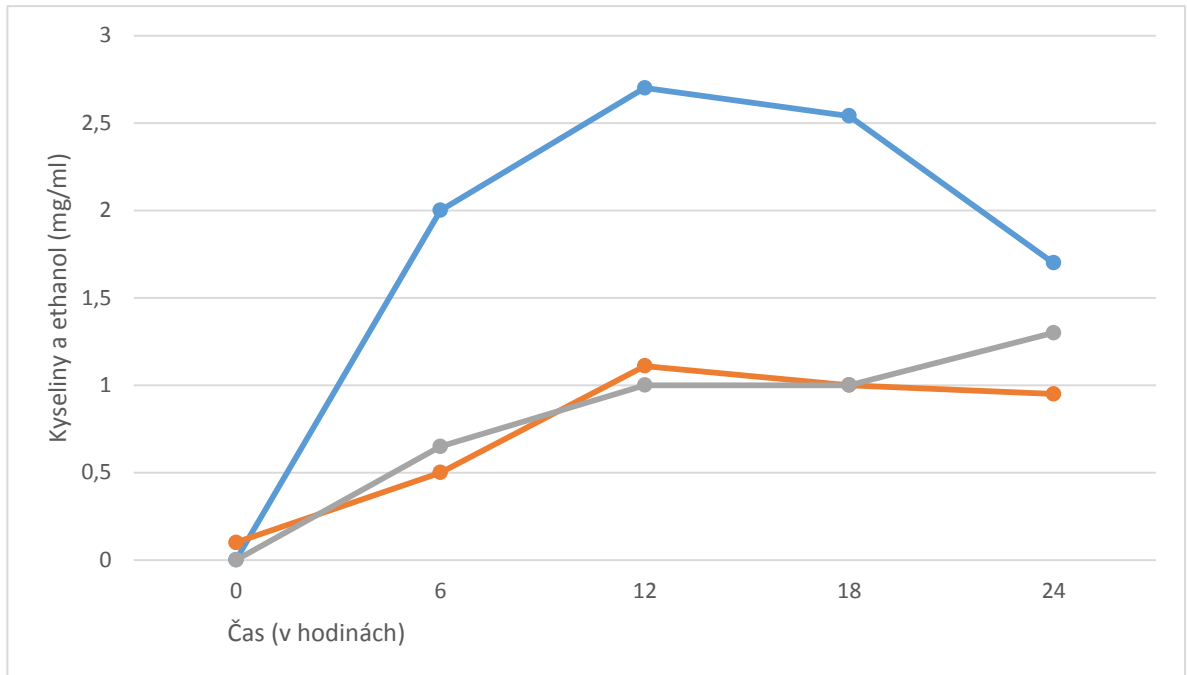
Při studiu literatury o vodním kefiru upoutaly mou pozornost i další kultury mikroorganismů vykazující podobné složení; protože literárních zdrojů bylo hodně, rozhodl jsem se věnovat se jim pro srovnání a vymezení kultury Tibi také. Všechny mají společný proces, kterým je kvašení. Výsledné produkty, které fermentací vznikají, se uvolní do výsledného nápoje. Kultury byly popsány z mikrobiologického hlediska, výsledky jsem shrnul v tabulce č. 4 (uvedena je na konci této kapitoly).

#### 3.5.1 Brazilský kefir

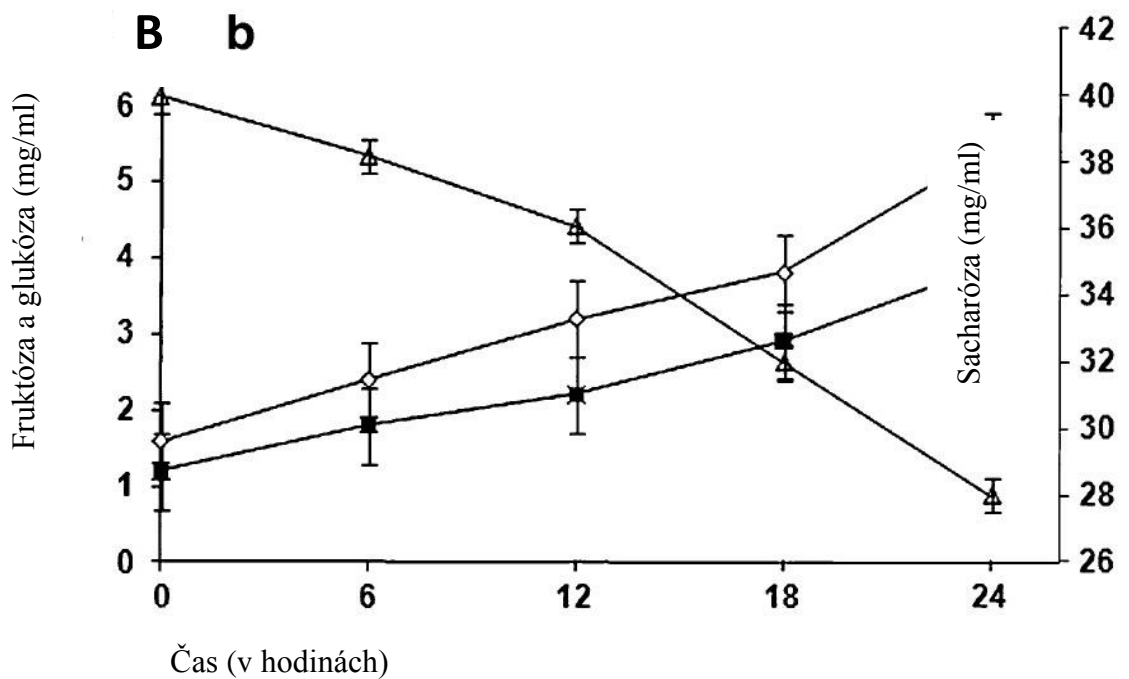
Nápoj produkovaný obdobnou kulturou v Brazílii a Mexiku byl poprvé zkoumán v Brazílské univerzitě v Lavrasu roku 2010 za použití metody PCR-DGGE zkoumající mikrobiologické a chemické složení pomocí sekvencování 16S rDNA. Kefír může být kultivován v cukernatém roztoku vody nebo v mléce. Při studii bylo analyzováno 21 vzorků, dohromady 250 g od každého vzorku při teplotě 25 °C, každých 6 hodin byl hodnocen vzorek, přičemž byly 4 vzorové procesy ve stejných podmínkách. Vzorky pocházely z brazilského města Lavras a byl hodnocen obsah ethanolu, organických kyselin (kyselina mléčná a octová) a sacharidů (sacharóza, glukóza a fruktóza). Při analýzách se zjistilo, že obsah kyseliny mléčné se snížil v průběhu 24 h fermentace. Koncentrace ethanolu se zvýšila během iniciační neboli lag fáze, kdy dosáhla svého maxima za 12 hodin. Druhy *Saccharomyces*, *Candida*, *Kluveromyces* a *Torulasporea* se zdají být nejvíce zodpovědné za produkci ethanolu v kefiru. Ovšem někteří zástupci heterofermentačního kvašení, jako *Lactobacillus* a homofermentační *Lactococcus*, mohou též vyprodukovat malé množství ethanolu. Produkce kyseliny mléčné se zvýšila a dosáhla hodnoty 1,4 mg/ml. To odpovídá skutečnosti, že současný proces zcukernatění a alkoholové kvašení je následován tvorbou kyseliny octové. Část alkoholu je heterolyticky fermentována rodem *Acetobacter* po 12 hodinách fermentace. Tyto bakterie produkují enzymy, které převádějí ethanol na acetaldehyd (Pidoux 1989, 1990; Beshkova et al. 2003). Nízká hodnota pH na konci fermentace je připisována působení rodu *Lactobacillus* jakožto hlavnímu činiteli po 24 hodinové fermentaci. Zvýšená koncentrace jednoduchých sacharidů glukózy a fruktózy koreluje s úbytkem koncentrace sacharózy na konci procesu. Za to jsou zodpovědné kvasinky. Hmotnost proteinů se zvýšila po 24 hodinách fermentace, což odpovídá nárůstu biomasy mikroorganismů a což souvisí s jejich výživovou hodnotou. V následujícím grafu je přehled pozorování a jejich procentuální podíl hmotnosti na začátku a během 24 hodin fermentace (Simova 2002, 2006) - graf č. 6A, 6B dle Miguela et al. (2011).

Graf č. 6A: **Chemické parametry fermentačního procesu**

Kyselina mléčná (modrá), kyselina octová (šedá) a ethanol (oranžový) (Miguel et al. 2011)



Graf č. 6B: fruktóza (kosočtverec), glukóza (černý čtverec) a sacharóza (trojúhelník) (Miguel et al. 2011)



Vlhkost, sušina a popelovina nevykazovaly po 24 hodinách fermentace žádné hmotnostní rozdíly v nápoji. Nicméně zvýšení vlhkosti a sušiny byly pozorovány u keřírových zrn. Zrno je tvořeno dextranem, což je polymer glukózy, který zadržuje vodu a je hostitelem pro mikroorganismy. Nárůst biomasy vysvětluje zvýšení hmotnosti sušiny keřírových zrn (Giraffa 2004).

Tab. č. 2: **Fyzikálně-chemické charakteristiky zrn a cukernatosti brazilských keřírových nápojů** (Miguel et al. 2011)

Charakteristiky nápoje	Čas fermentace (v hodinách)	
	0	24
Celková titrační kyselina (g/100 ml)	0.02 ± 0.01	0.07 ± 0.01
pH	5.6 ± 0.1	4.1 ± 0.1
Celkově rozpuštěné pevné látky	5.2 ± 0.2	4.1 ± 0.1
Protein (%)	0.2 ± 0.1	0.4 ± 0.1
Vitamin C (%)	-	-
Tuky (%)	2.4 ± 0.2	2.5 ± 0.2
Obsah vody (%)	95.3 ± 0.1	95.3 ± 0.1
Sušina (%) a popelovina (%)	4.7 ± 0.1	4.7 ± 0.1
Polysacharidová matrix	0.2 ± 0.1	0.2 ± 0.1
Vlhkost (%)	80.5 ± 0.1	91.5 ± 0.5
Sušina (%)	13.1 ± 0.2	22.1 ± 0.3

Výsledky zkoumání značí, že bakterie jako *Lactobacillus paracesei*, *Lactobacillus keřiri*, *Lactobacillus parabuchneri*, *Saccharomyces cerevisiae* a *Kleyveromyces lactis* byly mikroorganismy převládajícími v nápoji. Podle mínění autora jsou první, kdo takovouto analýzu zaměřenou na mikrobiální a chemické složení provedli. Byly nalezeny rody *Acetobacter lovaniensis* a *Kazachstania aerobia*. Dále autor poukazuje na vhodnost používání metody PCR-DGGE pro popisování mikrobiální flóry spojené s keřirem (Miguel et al. 2011).

### 3.5.2 Kombucha

Kombucha neboli kombuchový čaj je tradiční zdravý nápoj připravovaný v běžných domácích podmínkách, jedná se o fermentující slazený černý čaj se symbiotickou kulturou kvasinek a bakterií. Výsledkem výrobního procesu je syčený sladkokyselý čajový nápoj připomínající chuť šampaňského vína. Je konzumována po celém světě, ale nejvíce v Číně, Rusku a Německu. Staletími využívaná výroba nápoje podporuje všeobecné přesvědčení o pozitivním ovlivnění zdraví – snižuje krevní tlak, zmírňuje artritidu, posiluje imunitní systém organismu, léčí chronické záněty. Tyto účinky na zdraví vyvolaly zvýšený zájem o kombuchu – lékařskou vědou stále ještě prokázány nebyly. Stadelmann (1961) se věnoval výzkumu mnohého využití kombuchy na základě evropských neoficiálních lékařských pramenů z let 1952–1961 (podrobněji níže). S rostoucím zájmem společnosti o fermentované výrobky a zdravou stravu se i výzkum posouvá dál. Kombucha se konzumovala již během dynastie Tsin v Manchurii (severní provincie dnešní Číny v r. 220 př. n. l.), čaj byl popíjen pro jeho magické účinky. Jako obchodní artikl se kombucha rozšířila do Ruska a Evropy. V Rusku se čaj z ní těšil velké oblibě pro blahodárné účinky na zažívání (od překyselení organismu až po hemeroidy či revmatické bolesti). Většina literatury pochází právě z Ruska z období po válce, kde regiony, ve kterých lidé pili kombuchu, vykazovaly výrazně méně případů rakoviny než regiony bez pití kombuchové čaje. Dále se šířila přes Evropu až do severní Afriky, kde byla vnímána jako detoxikační nápoj, který čistí krev přes střeva a játra. Získala synonyma jako „Čajová houba“, „Manschourinská houba“, japonsky Haipao. Nicméně se jeví, že nesprávný proces přípravy může vést k intoxikaci a různým nemocem (Jayabalan et al. 2014).

Kombucha se připravuje na substrátu oslazeného zeleného či černého čaje. Na podkladě analýzy zastoupených látek vyplynulo, že zelený čaj je pro zdraví hodnotnější, avšak více se používá čaj černý, protože doba fermentace je u něj kratší (7 - 10 dnů u čaje černého oproti 14 dnům čaje zeleného).

Stejně jako vodní kefír i kombucha je označením pro společenství symbiotických bakterií. Zde se jeví jako dominantní vztah *Acetobacter* a různých druhů kvasinek. Výslednými produkty je stejně jako ve vodním kefiru fruktóza, kyselina octová a kyselina glukuronová (Greenwalt et al. 2000). Jméno „Čajová houba“ bylo odvozeno na základě toho, že EPS vytvářený kombuchou je podobný povlaku tvořeném kvasinkami (Jayabalan et al. 2014).

V mikrobiálním složení čajové kombuchy se kultura od kultury liší v závislosti na geografické poloze, podmínkách prostředí, místních druzích bakterií a kvasinek a zdroji naočkování (Jayabalan et al. 2011). Stejně je tomu i u Tibi a kefirů. Kombuchová čajová kultura je symbiózou bakterií octového kvašení (BOK) - dle abecedního pořádku, nikoli četnosti: *Acetobacter aceti*, *Acetobacter pasteurianus*, *Acetobacter xylinum*, *Acetobacter xylinoides*, *Acetobacter peroxydans*, *Gluconobacter oxidans*, *Gluconobacter europaeus*, *Gluconobacter saccharivorans* a kvasinek: *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces ludwigii*, *Saccharomyces bailii*, *Kloeckera apiculata*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Brettanomyces bruxellensis*, *Brettanomyces lambicus*,

*Brettanomyces custersii*, *Torulaspora delbrueckii*, *Candida stellata*, *Candida stellimalicola*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, *Lachancea thermotolerans*, *Lachancea fermentati*, *Lachancea kluyveri*, *Torulopsis* sp., *Pichia mexicana*, *Eremothecium cymbalariae*, *Eremothecium ashbyii*, *Kluyveromyces marxianus*, *Debaryomyces hansenii*, *Meyerozyma caribbica*, *Meyerozyma guilliermondii*, *Hanseniaspora uvarum*, *Hanseniaspora meyeri*, *Hanseniaspora vineae*, *Zygowilliopsis californica*, *Saccharomycopsis fibuligera*, *Merimbla ingelheimense*, *Sporopachydermia lactativora*, *Kazachstania telluris*, *Kazachstania exigua*, *Starmera amethionina*, *Starmera caribae* (Teoh et al. 2004; Chakravorty et al. 2016; Coton et al. 2017; Sinir et al. 2019). Také byly z některých kultur izolovány BMK (Marsh et al. 2014; Hrnjez et al. 2014; Coton et al. 2017). Marsh et al. (2014) zmiňuje, že *Lactobacillus* je hlavní složkou kombuchy, zejména v pozdějších fázích fermentace. Byl stanoven *Lactobacillus kefiranofaciens* subsp. kefirgranum jako dominující druh BMK kombuchové kultury. Petrušić et al. (2011) prokázal přítomnost *Lactobacillus plantarum*, *Streptococcus thermophilus*, *Streptococcus bovis*, *Streptococcus lutetiensis*, *Brevibacterium* sp. na substrátu černého čaje. Osmotolerantní druhy začínají fermentaci a kyselotolerantní druhy dominují na konci fermentace (Teoh et al. 2004). Bylo vyzorováno, že rozdílné kultury mají odlišné antioxidačně aktivní dráhy na stejném substrátu (Malbasa et al. 2011).

Kombucha zahrnuje dvě části, bio – celulózní matici (EPS) a tekutý roztok. Celulózní matrice plovoucí na povrchu je produkována BOK a osídlena kvasinkami a bakteriemi, mezi nimiž jsou silné symbiotické vztahy, které zabraňují růstu nežádoucích mikroorganismů (Jayabalan et al. 2011). Kvasinky produkují ethanol ze sacharózy. Glukóza a fruktóza je přeměněna na kyselinu glukonovou a octovou pomocí BOK. Kvasinky jsou stimulovány k produkci ethanolu kyselinou octovou. Ethanol na oplátku podporuje růst BOK a jejich produkci kyseliny octové. Ethanol i kyselina octová působí proti nežádoucím mikroorganismům (Sievers et al. 1995; Liu et al. 1996). Po přírůstu populace BMK a jejich kyselin kleslo pH kombuchy (Liu et al. 1996). BMK mají navíc imunizační schopnosti na svého hostitele (Marteau & Rambaud 1993). Čaj jako substrát nabízí mikroorganismům potřebné dusíkaté látky. Kofein a xantiny obsažené v čaji stimulují růst celulózy produkované bakteriemi (Dufresne & Farnworth 2000). Mnoho studií prokázalo probiotické účinky. Lidé, kteří jsou vystavováni stresovým, náročným situacím a dlouhodobě se špatně stravují, mohou trpět zažívacími potížemi. To může vést k vymizení pozitivní střevní mikroflóry a střevní sliznice může být sekundárně poškozována příležitostnými mikroorganismy. Je obecně známo, že pak dochází ke vzniku autoimunitních chorob, jako je ulcerózní kolitida, Crohnova nemoc, roztroušená skleróza, alergie a další. Obnovení mikroflóry střeva může být dosaženo i pomocí kombuchy. Dle tohoto zjištění je doporučována jako potravinový doplněk i astronautům (Dufresne & Farnworth 2000; Kozyrovska et al. 2012). Kombuchový čaj byl podrobně studován i pro své LDL cholesterol snižující účinky na zvířatech a lidech, přičemž částečný vliv byl potvrzen. Kombucha obsahuje vysoký podíl glukuronové kyseliny, která poutá nepolární látky, jako je LDL cholesterol, a odvádí je z těla ven. Podle studií je odstraněno až 52 % LDL cholesterolu z krevní plazmy (Suhartatik et al. 2011). Odstraněním hlenu v podobě LDL cholesterolu se

snižuje krevní tlak (Danielian 2005). Potlačení oxidačního stresu se ukázalo jako cesta k potlačení hypercholesterolemické arterosklerózy (Dufresne & Farnworth 2000; Yang et al. 2009). Kombuchový čaj obsahuje více polyfenolů než čaj nefermentovaný, také obsažené vitaminy E a C jsou považovány za silné antioxidanty (Yang et al. 2009; Kallel et al. 2012). Bylo potvrzeno, že kombucha snižuje arterosklerotický plak skrze regeneraci buněčných stěn (Dufresne & Farnworth 2000). Byl studován a zjištěn úzký vztah mezi kornatěním srdečních tepen a snižováním cholesterolu (Dufresne a Farnworth 2000; Yang et al. 2009). Studie provedené na psech a kočkách dokazují posílení srdce po konzumaci kombuchového čaje (Danielian 2005). Energizační schopnosti kombuchového čaje vyplývají i z vázaného železa, které je vázáno chelátovým komplexem s glukonovou kyselinou. To zvyšuje hladinu hemoglobinu v krvi a přísun kyslíku buňkám, což podporuje tvorbu ATP. Slabé organické kyseliny a vitamin C syntetizované kombuchou mohou podpořit efekt vstřebávání železa, které pochází z rostlin, nikoli hemu, a tím podpořit vitalitu. Vitaminy skupiny B poskytují enzymatickou aktivitou lipidů a bílkovinného metabolismu regenerační energii (Adriani et al. 2011).

### 3.5.3 Tibetský kefír

Z různých mikroorganismů složená zrna Tibetského kefíru (dále jen TK) jsou startovací kulturou pro fermentaci mléka v Tibetu, Číně a dalších zemích. Mléko fermentované TK se stává tekutým jogurtem, který je tradiční potravinou Tibetčanů. U různých národů jde o domácí jídlo s dlouhou historií, která se tvořila nejen v Tibetu, ale i na Taiwanu, v Rusku, Turecku, Brazílii, Argentině a tak dále (Abraham & Antoni 1999; Chen et al. 2008; Magalhães et al. 2011; Kesmen & Kacmaz 2011). Statistiky ukazují, že konzumace TK přináší dlouhověkost. Je dokázáno, že probiotika kultury působící ve střevě, bohatá kvalitativně i kvantitativně jsou spojené s vlivem na zdraví (Eckburg et al. 2005; Balzola et al. 2010). TK může být považován za probiotický zdroj, protože obsahuje vhodné živiny. Mnoho studií, jak je patrné se zabývalo otázkou účinků a přineslo to své výsledky jako jsou: antimikrobiální, protizánětlivé, protinádorové, imunologické a pozitivní působení. Proto by mohl být TK označen jako funkční potravina (Diniz et al. 2003; Vinderola et al. 2005). Zhou (2009) analyzoval mikroflóru TK a zjistil, že byla tvořena bakteriemi a kvasinkami jako jsou *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus kefir*, *Lactobacillus casei*, *Kluyveromyces marxianus*, *Saccharomyces unisporus*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida humilis*, a dalšími nekulturními mikroorganismy. Složení se různilo podle původu a vývoje jednotlivých společenstev napříč kontinenty. Také bylo zjištěno, že komplex mikroorganismů nemá takovou fermentační stabilitu, která je nutná pro tovární velkovýrobu a komercializaci. K tomuto zajištění je zapotřebí znát přesné složení a funkci jednotlivých mikroorganismů. TK je možné od ostatních podobných kultur jako je Kombucha či vodní kefír odlišit mikrobiotou, morfologickou strukturou a obsahem látek (Diniz et al. 2003).



Tab č. 4: Mikrobiologické složení kultur kvasných nápojů

Rod	Vodní kefir	Brazilský kefir	Tibetský kefir	Kombucha
<b>Bakterie</b>				
<i>Acetobacter</i>	+	+		+
<i>Acetobacter lovaniensis</i>		+		
<i>Bacterium gluconicum</i>				+
<i>Bacterium xylinum</i>				+
<i>Bifidobacterium psychraeophylum</i>	+			
<i>Lactobacillus brevis</i>	+	+	+	+
<i>Lactobacillus casei</i>	+		+	
<i>Lactobacillus hilgardii</i>	+		+	
<i>Lactobacillus kefiri</i>		+	+	
<i>Lactobacillus parabuchneri</i>		+		
<i>Lactobacillus paracasei</i>		+		
<i>Lactococcus lactis</i>			+	
<i>Streptococcus lactis</i>	+			
<b>Kvasinky</b>				
<i>Candida humilis</i>			+	
<i>Dekkera</i>	+			
<i>Hanseniaspora</i>	+			+
<i>Kazachstania aerobia</i>	+			
<i>Kluveromyces</i>			+	
<i>Lachancea meyersii</i>				+
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>			+	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	+		+	+
<i>Saccharomyces florentinus</i>	+			
<i>Saccharomyces pretoriensis</i>	+			
<i>Saccharomyces unisporus</i>			+	
<i>Torulaspora</i>	+	+		+
<i>Zygorulaspora florentina</i>	+			

### 3.6 Metoda kultivace vodního kefiru

Zrna Tibicos jsou symbionty kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* a bakterií mléčného kvašení (*Lactobacillus brevis* a *Streptococcus lactis*) a dalších, jak již bylo zmíněno. V tradičním postupu kvasí zrna Tibi s roztokem sacharózy a fíků za vzniku šumivého, lehce alkoholického nápoje. Celý proces kvašení trvá 1-3 dny.

Použitím enzymatických testů s fotometrem při fermentaci byla studována hladina glukózy, kyseliny mléčné, kyseliny octové a ethanolu po dobu 18 dní. Hladina glukózy se neustále snižovala; hladina kyseliny mléčné byla po 14 dnech nejvyšší; octová kyselina dosáhla maximální hladiny po 6 dnech a ethanol byl syntetizován až do 3,6 g/L po 6 dnech. Hodnota pH klesla ze 4,5 na 3,0 pH.

Vynecháním fíků nebo přidáním rozinek, datlí či švestek dochází ke změně v kvasícím procesu.

Další studie (Neve 2002, Stadie et al. 2013) ukázaly, že fíky jsou nezbytné pro optimální kvašení Tibi zrn a obsahují podpůrný růstový faktor pro symbiotické organismy, které se nacházejí v kultuře. Tyto látky podporující růst můžou být extrahovány i studenou vodou a za tepla jsou jen mírně stabilní (Reiß 1990). Jürgen Reiß intenzivně studoval chemismus koncového nápoje, uvedená metodika kultivace je považována za standartní. V podstatě se smíchá 30 g sacharózy, 20 g fíků a 20 g Tibi na 1 litr vody. Část fíků 10 g byla v tomto experimentu nahrazena jiným ovocem. Na konci kvašení byla zrna oddělena vlasovým sítím, propláchnuta vodou a vysušena na papírovém tácku. Následně jsou zrna opět použitelná k fermentaci.

#### 3.6.1 Výsledky pozorování

**Metabolické procesy.** Ve standartním médiu s fíky začala fermentace po 24 h. Tibi krystalky klesly na dno nádoby a fíky plavaly na hladině. Barva roztoku se zbarvila vlivem fíků. Výsledky metabolických aktivit jsou shrnuty v tabulce č. 3 (viz přílohy).

**Glukóza.** V přítomnosti fíků byla glukóza rychle metabolizována. Po 17 dnech inkubační doby nebyla zjištěna žádná glukóza. Vynechání fíků vedlo k velmi rychlému poklesu obsahu glukózy v prvních 6 dnech následovaných pomalejším metabolickým úbytkem v následujícím inkubačním čase. Když byly fíky nahrazeny rozinkami, datlemi nebo sušenými švestkami, koncentrace glukózy v prvních 10 dnech klesala rychleji než ve standartním médiu. Po 18 dnech byla zjištěna glukóza 1,5 g/l v roztoku s rozinkami, ve standartním roztoku bez fíků 2,5g/l, zatímco v médiích s datlemi či švestkami nebyla glukóza detekována.

**Kyselina mléčná.** Tvorba kyseliny mléčné byla zanedbatelná během prvních 14 dnů v roztoku obsahujícím fíky. Následně se obsah kyseliny mléčné rychle zvýšil až do maximální 2,8 g/L po 18 dnech, hodnota je nejvyšší ve všech testech. Opomenutí fíků zvýšilo

syntézu kyseliny mléčné v prvních 14 dnech, následně se mírně snížila. Švestky, datle a zejména rozinky urychlily syntézu kyseliny mléčné.

**Kyselina octová.** Nejnižší koncentrace kyseliny octové byly nalezeny ve standardním roztoku obsahujícím fíky. Po 6 dnech byla maximální hodnota stanovena na 1,1 g/l. Tato hodnota zůstala víceméně neměnná po celou inkubační dobu. Pokud byly vynechány fíky (kontrola), syntéza kyseliny octové se průběžně zvyšuje až na 7,5 g/l na konci inkubační doby. Přidávky jako rozinky, datle a zejména švestky urychlují tvorbu kyseliny octové ve srovnání se standardním roztokem.

**Ethanol.** Ve všech roztocích se biosyntéza ethanolu zvýšila na maximální hodnotu a následně snížila při dlouhodobé inkubaci. Maximální úroveň 3,6 g/l byla ve standardním roztoku obsahujícím fíky po 6 dnech. V jiných roztocích bylo vytvořeno pouze do 0,3-0,7 g/l ethanolu. Výroba ethanolu byla opožděna v těchto roztocích a bylo dosaženo maxima až po 8-12 dnech. Z toho vyplývá maximální hladina ethanolu 0,36 %.

**Hodnota pH.** Složení roztoku nemělo velký vliv. Všechny roztoky klesly z hodnoty pH 4,5 na pH 3,0 během fermentace.

### 3.6.2 Růst Tibi krystalků

**Standartní roztok.** Po 4hodinové inkubaci se Tibi ležící na dně začaly zvětšovat. S nástupem fermentace se mnoho zrn zvětšilo a následně rozdělilo na více menších částí, které klesly na dno nádoby. Váha krystalů vzrostla až o 70 % po 18 dnech.

**Roztok bez fíků.** Nárůst hmoty je zanedbatelný, dosahuje pouze 0,1 % celkové váhy.

**Roztoky s rozinkami, datlemi a švestkami.** Přidávky sice přírůstek zvýšily, avšak jen o 4 %. Přírůstek se projevil ve velikosti krystalků.

**Roztoky s různými částmi fíků.** Jak předchozí výsledky odhalily, zrna Tibi optimálně rostou ve standardním médiu s fíky, další pokusy byly provedeny s cílem prokázat, že určité části fíků a některé vlastnosti jsou faktory podporujícími růst. Přidání pouze buničiny fíků zvýšila růst Tibi zrn více, avšak slupka měla jen drobné účinky. Při vaření fíků ve vodě měly vařené fíky pozitivní vliv na růst zrn, zatímco převařený fíkový roztok měl výrazně slabší vliv. Nicméně přidání vody, ve které byly fíky ponořeny a louhovány po dobu 12 hodin do cukernatého roztoku, podporovalo nárůst zrn Tibi až o 70 % hmotnosti (Reiß 1993).

Zrna Tibi se mohou lišit ve velikost od 1 mm. Dávka vodního kefiru má rozmanitou škálu velikostí zrn. Čím jsou zrna menší, tím větší je povrch pro kontakt s okolím. Menší mají sklon k vyšší konzistenci zrn a produkují lepší chuť nápoje. Zdá se, že lámání a drcení zrn není ku prospěchu, je lepší nechat zrna narůst své přirozené velikosti.

Velikost zrn souvisí s teplotou, ročním obdobím, časem fermentace, kvalitě vody, receptem, a dalšími podmínkami.

Teplejší prostředí vytváří zrna menší a chladnější prostředí naopak větší. Zdá se, že zrna poznají, jaké je roční období, nehledě na teplotu prostředí, neboť v létě produkují menší krystaly ve větším množství.

**Čas fermentace.** Čím delší je čas mezi jednotlivými přípravami, tím jsou krystalky menší.

**Stres.** Pokud je kultura vystavená náhlým změnám ve svém prostředí, budou zrna menší (Kaufmann 2007).

Přítomnost fíků v standartním roztoku sacharózy představuje typický způsob kvašení. Obsah glukózy se neustále snižoval a klesl na nulu po 18 dnech. Bylo vytvořeno pozoruhodné množství kyseliny mléčné pouze po 14 dnech inkubace. Výroba ethanolu se zvýšila na maximum 3,6 g/l po 6 dnech a následně se snížila. Po 6 dnech je nejvyšší úroveň kyseliny octové, která byla naměřena v koncentraci 1,1 g/l. V důsledku vzniku kyselin klesla hodnota pH z 4,5 na 4,0, respektive na 3,0 po 12 dnech fermentace.

Vynechání fíků vedlo k pomalejšímu metabolismu glukózy, vyššímu množství kyseliny mléčné a octové a nižší hladině ethanolu. Když byly fíky nahrazeny rozinkami, datlemi nebo švestkami, byla míra kvašení glukózy obdobná s fíky. Více kyseliny mléčné a méně ethanolu bylo nakvašeno ve srovnání se standardním roztokem. Maximální hodnoty kyseliny octové jsou podobné těm, které byly nalezeny v roztoku s fíky (švestky výrazně zvýšily konečnou koncentraci), ale bylo dosaženo pouze na konci inkubačního období.

Podobné výsledky studia biochemických změn během Tibi kvašení byly popsány několika autory. Blumer roku (1934) zjistil zřetelný pokles hladiny glukózy z 10 % na počátku kvasného období na 2,5 % po 15 dnech. Hodnota pH klesla z 6,0 na 4,0 po 4 dnech. Po 12 h začal proces produkce ethanolu.

Současný pokus odhalil, že přidání fíků do roztoku sacharózy je nezbytné pro optimální růst Tibi zrn. Substituce 10 g fíků jinými sušenými plody vedla k výrazně sníženému růstu zrn. Tyto výsledky jsou podporovány Blumerovým studiem. Pouze fíky zvýšily čerstvou hmotnost zrn (až 12,3 %) po fermentačním procesu.

Opomenutí fíků nebo substituce hrozkami způsobily jen velmi malý růst. Porchet (1934) počítal počet zrn Tibi po 3 dnech kvašení v médiích různého složení. Zjistil, že počet zrn se značně zvýšil v přítomnosti fíků a datlí. Střední přírůstek s banány, rozinkami, švestkami, meruňkami, bramborami a mrkví. Žádný nárůst v případě jablka, mléka, syntetického živného roztoku, kvasnicové vody a pasterované hroznové šťávy.

Z výše popsaných výsledků vyplývá, že nejvíce podporují růst fíky. Růst podporující faktor je zřejmě umístěn ve vláknině, zdá se být extrahovatelný studenou vodou, je lehce teplu odolný. Přesná povaha této sloučeniny může být zkoumána podrobněji v budoucnu (Reiß 1990).

### 3.6.3 Doporučení k dosažení chutného výsledného nápoje

Z kultivace Tibi jsou uváděny následující poznatky (srv. Kaufmann 2007).

Efektivitu pěstování a kultivace organismů Tibi lze dobře sledovat díky tomu, že dochází k viditelnému růstu krystalů, který signalizuje celkový dobrý stav kultury.

**Voda.** Nejlepší voda je voda bohatá na minerály, nabízí se možnost zdravotně nezávadné vody z přírody (vyvěrající prameny se zjištěnou chemickou analýzou kvality vody).

Chlorovaná voda zabíjí organismy, proto je dobré vodu převařit a nechat odstát. Tím se také zbavíme těkavých látek, které jsou v kohoutkové vodě přítomny. Filtrovaná voda bude vhodná, ale jelikož je chudá na minerály, je vhodné nějaké dodat (můžeme přidat například himalájskou sůl či Schindlerovy minerály).

Není dobré používat zásaditou vodu, vodní kefir vytváří kyselé prostředí a nadměrná alkalita by fermentaci znemožnila.

**Živný substrát.** Pro přípravu nápoje používáme sezónní čerstvé nebo sušené ovoce. V ideálním případě má být bez siřičitanů a ostatních konzervantů. Každá konzervace oslabuje organismy a znemožňuje správné trávení ovoce.

Čerstvé ovoce musí být dobře omyté (nejlépe ve slabém roztoku octa a jedlé sody), protože jeho povrch často obsahuje pesticidy a herbicidy, které také poškozují život vodního kefiru.

**Teplota.** Na základě výzkumů (například Stadie 2013) se jako optimální teplota ukazují hodnoty 21 °C–37 °C.

**Povlak povrchu a barva.** Bílý či krémový povlak na hladině je běžný, vzniká důsledkem kontaktu se vzduchem. Povlak není zdraví škodlivý, je způsoben aerobní kvasinkou „Kahm yeast“. Povlak je přesto vhodné odstranit a nápoj lépe izolovat od přístupu nadměrného množství kyslíku. Průsvitný povrch zrn je způsoben nerovnováhou mikroflóry. Ta nastane po dlouhé pauze, kdy se kultura nevyužívá a je uložena v chladu. Znovunastolení rovnováhy je dosaženo vyváženým pěstováním v průběhu několika týdnů.

Další změny barvy na černou, modrou, zelenou či hnědou mohou být projevem plísně. Takovou kulturu je lepší zlikvidovat vhozením do bioodpadu či správně založeného kompostu. Nádobí je zapotřebí umýt a začít znova s kultivací.

**Vhodný stupeň kyselosti.** Kefírová kultura by měla být kyselá v rozmezí pH 4 - pH 5. Přidáním plátků citronu se kyselost snižuje (na chuť kyselý citron patří mezi zásadotvorné ovoce). Ovšem pokud by vodní kefir nebyl dostatečně kyselý, hrozilo by naočkování nechtěnými druhy mikroorganismů.

Základní **test kvality** je proveden čichem. Vůně by měla být nakyslá, zemitá, ovocná, vínová a libá, nikoli však nepříjemná. Chuť nápoje by měla napovědět na druh použitého ovoce.

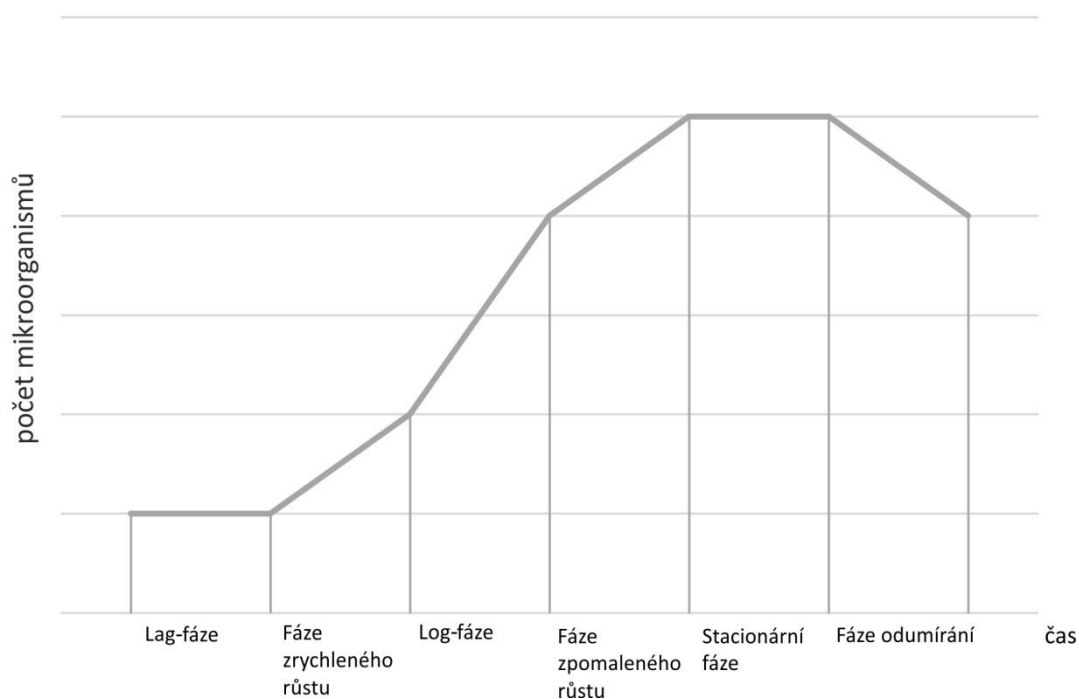
**Rychlokvašení méně než 24 h.** Pokud je nápoj hotový během 24 h a je velmi šumivý, pravděpodobně obsahuje velké množství kvasinek. Než bude možno přikročit k další přípravě, je důležité zkontrolovat, zdali je dodržen postup výroby a zda nebylo přidáno nadměrné množství cukru. Pro příští fermentaci se použije cukru méně. Rychlokvašený perlivý kvasný nápoj obsahuje více alkoholu, a tudíž nebude tak vhodný, jak by mohl být s vyváženým komplexem kyselin a probiotických bakterií.

**Pracovní náčiní.** Vodní kefir kvůli své kyselé podstatě reaguje s kovy, což také vede k inhibici mikrobioty. Proto je pro manipulaci s kulturou lépe používat sklo, dřevo či nerezové pomůcky. Používat lze jen čisté nádoby. Mycí a prací prostředky mikroorganismy inhibují.

**Použití cukru.** Sacharóza je disacharid složený z glukózy a fruktózy. Bakterie a kvasinky vodního kefiru preferují glukózu nad fruktózou. Konvertují glukózu na kyselinu glukuronovou a další kyseliny, všechny s antibakteriálními a jinými prospěšnými vlastnostmi. Fruktóza je konvertována na kyselinu octovou a další organické kyseliny. Díky preferenci glukózy je tato rychle zkonsumována, ve vodním kefiru hlavně zbývá fruktóza. Čím déle vodní kefir fermentuje, tím více je zbytkové fruktózy spotřebováno. Toto je důležité pro konzumenta Tibi, protože na rozdíl od ostatních cukrů je fruktóza metabolizována v játrech. Při nedostatečné činnosti jater je třeba omezit její příjem na minimum, což znamená vyhnout se přeslazeným nápojům, džusům a velkému množství sladkého ovoce.

Vodní kefir je zdrojem fruktózy, a proto by měl být konzumován v přiměřeném množství – například jednu sklenku denně. Pak bude zdraví prospěšný. Další možností je přidat do výsledného nápoje malé množství extraktu z rostliny Stevie sladké (*Stevia rebaudiana*).

Graf č. 7: **Obecná růstová křivka mikroorganismů** (Stanbury 2017a, upraveno)



**Lag-fáze** (latentní=prizpůsobovací) - mikroorganismy si přivykají na nové prostředí, ještě se nemnoží

**Fáze zrychleného růstu** - mikroorganismy se přizpůsobily prostředí a začínají se množit

**Log-fáze** (logaritmická) - fáze nejrychlejšího množení

**Trofofáze** (fáze zpomaleného růstu) - nastává úbytek živin a hromadí se sekundární metabolity

**Stacionární fáze** - počet nově vzniklých mikroorganismů je shodný s počtem odumřelých

**Fáze odumírání** - převažuje počet odumřelých mikroorganismů

### 3.7 Zdravotní přínosy a rizika konzumace

Připomeňme si kuchyni průměrného člověka. České kysané zelí a okurky rychlokvašky, plísňové sýry, moravské víno, plzeňské pivo a další jsou součástí české kuchyně. Z toho, co do sebe vkládáme, se tvoří obraz toho, jak působíme. Všude okolo nás probíhá neustálá změna. A tak se mění i mikrobiální složení v těle, protože tělo je neustále vystaveno kontaktu s okolím. Pozitivní vliv na lidskou mikroflóru má právě konzumace živé, mikrobiálně a enzymaticky bohaté stravy (Kraske 2015). Dnes je moderní konzervovat, pasterizovat a neprodyšně uzavírat, aby potraviny vydržely déle, a přitom se zdály být čerstvé. Před mikroorganismy však není úniku – a to ani za použití mýdel, zubní pasty, antibiotik či antimykotik. Jsou všudypřítomné. Na základě vývoje a proměny civilizace se paradoxně uměním stává to, co bylo před časem běžné. Toto umění spočívá ve schopnosti rozlišit, co tělu dělá skutečně dobře a co jen způsobuje chuťové potěšení. Uměním je naučit se žít s okolím v rovnováze. Mikroorganismy mohou být smyslům a tělu prospěšné, neutrální i negativní, záleží jen na jejich vzájemném poměru (Katz 2015).

Ve střevě existují dva druhy bakterií – hnilobné, produkující amoniak, sulfan, fenoly podobné hormonům, a kvasné, jež produkují metan a oxid uhličitý.

Jedním z hlavních faktorů, které ovlivňují mikrobiální zastoupení v těle, je strava. Změna stravy má zásadní vliv na střevní bakterie a jejich metabolismus. Byly zjištěny rozdíly v druhovém složení mikroflóry u populací různých kultur v návaznosti na jejich jídelníčky. U obyvatel západní kultury, konzumující stravu bohatou na tuk a sacharidy, bylo zjištěno vyšší zastoupení bakteroidů, klostridií, bifidobakterií a peptokoků. V populaci, kde převažuje nízkotučná dieta s vyšším příjmem vlákniny, byly zjištěny vyšší počty laktobacilů a klebsiel (*Enterobacteriaceae*). Také přechod z vařené na nevařenou stravu výrazně ovlivní střevní mikroflóru. Velká změna byla zaznamenána v případě osob konzumujících probioticky bohatou fermentovanou stravu (Ling 1995; Zbořil 2005).

Význam probiotické výživy spočívá v preventivních účincích. Již od dětství hrají zásadní úlohu při vytváření přirozené imunity. První probiotická výživa je přijímána v mateřském mléku. Usídí se ve střevech a udržují systém v rovnováze. Laktobacily osídlují střevní epitel a snižují riziko pomnožení patogenních bakterií a vzniku onemocnění (viz kapitola mikrobiální složení, tab. č. 2). Žijí s buňkami v symbióze, neboť produkují mnoho výživových látek, hlavně krátké mastné kyseliny, aminokyseliny a peptidy. Také mírní nadýmání a hnilobné procesy trávení (Quilien 2002; Nevoral 2005; Frič 2007).

V tabulce č. 2 jsou uvedeny prokázané účinky probiotických rodů.



Tab. č. 2: **Pozitivní vlivy probiotických druhů**

Popsané účinky	Rod
Posílení imunitního systému	<i>Lactobacillus</i> sp.
Navození rovnováhy mezi mikrobiotou	<i>Lactobacillus</i> sp., <i>Bifidobacterius</i> sp.
Snížení tvorby karcinogenů	<i>Lactobacillus</i> sp., <i>Bifidobacterius</i> sp.
Prevence průjmových potíží z cestování	<i>Saccharomyces</i> sp., <i>Lactobacillus</i> sp.
Prevence ostatních průjmových stavů	<i>Lactobacillus</i> sp., <i>Bifidobacterius</i> sp.

Velkým přínosem pro imunitu jsou právě glukany, což jsou přírodní polymery, které se nacházejí v rostlinách a mikroorganismech. Jejich biologická aktivita spočívá v protinádorové aktivitě, ve zvýšení odolnosti vůči bakteriálnímu, virovému, plísňovému a parazitickému onemocnění, ke snížení LDL cholesterolu a ke snížení glukózy a inzulínu v krvi při diabetu.  $\beta$ -glukany se vyskytují ve formě 1,3 nebo 1,6- $\beta$ -glukanů ve kvasinkách (Misaki et al. 1968; Smetanová 2007).

Nejvhodnější způsob konzervace pro tělo je právě kvašení, protože produkty fermentace jsou bohaté na probiotika, která regenerují tkáň. Sám Louis Pasteur, objevitel pasterizace, se na sklonku života vyjádřil, že bakterie nejsou nic, ale tkáň, ve které rostou, je všechno. Podobně prohlásil významný patolog Rudolph Virchow, že kdyby měl znovu žít, věnoval by svůj život tomu, aby dokázal, že bakterie hledají přirozené prostředí, nemocnou tkáň, místo aby byly příčinou onemocnění tkání – tak jako komáři hledají stojaté vody, ale nezpůsobili vznik rybníků (Modra 2013).

## 3.8 Analytické prostředky

### 3.8.1 PCR-DGGE

Polymerázová řetězová reakce – elektroforéza v gradientovém denaturačním gelu je metoda zařazená do potravinářské biologie. Používá se například k identifikaci mikroorganismů izolovaných z potravin, k hodnocení mikrobiální rozmanitosti během fermentace potravin, lze ji využít k hodnocení kvality potravin (Miguel et al. 2011). Popis fungování této metody je detailně popsán v samostatné příloze. Touto metodou zjišťoval např. Gulitz et al. (2011) kvantitativní i kvalitativní složení mikrobioty ve třech různých vzorcích vodního kefiru (srv. k tomu kapitolu o mikrobiálním složení vodního kefiru).

### 3.8.2 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)

Chromatografie je souhrnné označení pro skupinu fyzikálně chemických separačních metod. Účelem kapalinové chromatografie je kvantitativní i kvalitativní stanovení přítomnosti jednotlivých složek analytu. (Popis fungování metody je podrobně rozepsán a vložen do samostatné přílohy.)

Vzorky vodních kefirů a produkty fermentace byly podrobeny chromatografickým analýzám pro stanovení změn koncentrací cukrů a metabolitů. Před analýzou cukernatých složek je potřeba odstranit proteiny ze vzorků. Vzorky se skládaly z 500  $\mu$ l roztoku. Toho bylo dosaženo pomocí přidání 250  $\mu$ l 0,1 M  $ZnSO_4$  a následně mixováno 1 minutu. Poté bylo přidáno 250  $\mu$ l 0,1 M NaOH, smícháno a ponecháno stát po dobu 20 minut. To vedlo k vysrážení proteinů, které byly ze vzorků odebrány. Roztok po rozmixování a přefiltrování byl použit pro analýzu chromatografií.

Mono-, disacharidy a cukernaté alkoholy byly kvantifikovány pomocí iontově výměnné HPLC kolony Rezex RPM-Monosacharide  $Pb^{2+}$  (8% síťovaná celulóza).

Pro kvantifikaci organických kyselin a ethanolu byly vzorky vystaveny působení kyseliny chloristé (50  $\mu$ l/ml na vzorek) a inkubovány přes noc při 4 °C pro vysrážení bílkovin. Poté byly vzorky důkladně odstředěny a roztok byl přefiltrován přes RC membránu. Organické kyseliny a ethanol byly kvantifikovány iontově výměnnou HPLC kolony Rezex ROA-Organic Acid H+ (8% síťovaná celulóza) (Stadie et al. 2013).

Kvalitativní analýzy se dosáhlo porovnáním retenčního času vrcholů ve vzorku s hodnotami známých standardů. Kvantitativní analýzy je dosahováno měřením ploch nebo výšky vrcholů píků na chromatogramu (Bartušek & Pazourek 2000).

## 4 Závěr

Cíle, které jsem si vytyčil na začátku práce, se pro mne v průběhu studia literatury prohloubily. Zjistil jsem, že je nutné důkladné porozumění fungování mikrobioty, aby mohl být celý proces fermentace korigován vnějšími faktory. Snažil jsem se zjistit, podle jakých vědou ověřených principů je vhodné postupovat, aby výsledný nápoj byl při zachování co nejjednoduššího postupu výroby co nejchutnější a zároveň co nejprínosnější lidskému organismu.

Provedl jsem rozsáhlou literární rešerši s úkolem zjistit vědecky verifikované informace o kultuře Tibi krystalů. Překvapilo mne, že nejstarší - současnými vědci citované - literární zdroje, které se mi dostaly do rukou, pocházejí již ze začátku 20. století, tedy z doby před 100 lety.

Fermentovaný nápoj Tibi je po staletí konzumován v mnoha částech světa (zejména v Asii, ve střední a jižní Americe). Konzumenti na základě vlastních zkušeností nepochybují o blahodárném vlivu pití nápoje na jejich organismus, a proto jsou zrna Tibi dále a dále mezi lidmi šířena. (V Rusku je takto oblíbena kombucha, v Tibetu a Brazílii kefir.)

Mikrobiální složení je sledováno mnoha autory – ze studií, které jsem našel, se přímo mikrobiotě věnuje minimálně 7 výzkumných prací. Výzkumy byly a jsou prováděny zejména elektronovým mikroskopem a metodou polymerázové řetězové reakce (PCR). Ve všech zkoumaných vzorcích vodního kefiru jsou nacházeny kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* a *Zygorulaspora florentina*. Kvasinky ve svých stěnách obsahují betaglukany, které aktivují imunitní systém. Bakteriální složení je vždy různorodé, ale bakterie *Lb. hordei* a *Lb. nagelli*, známé svými probiotickými účinky, jsou vždy přítomné. Nově (2011) detekovaná *Acetobacter fabarum* je bakterie octového kvašení zodpovědná za oxidaci ethanolu na acetát. Mezi těmito kvasinkami a bakteriemi byla prokázána symbióza.

Při výzkumu chemického složení nápoje vědci během fermentace nápoje odebírali vzorky, které byly podrobeny chromatografické analýze s vysokou přesností. Ve všech zkoumaných vzorcích byl hodnocen obsah kyselin mléčné a octové a alkoholu. Po 3 dnech fermentace za standardních podmínek nepřesahují obsahy kyselin 0,5 g/l a obsah alkoholu 3,6 g/l. Z řady pozorování vyplynulo, že čím déle fermentace probíhala, tím byla koncentrace sledovaných látek vyšší a pH kleslo až na hodnotu pH 3,0, což je už velmi nízká hodnota, která by mohla při dlouhodobé konzumaci poškozovat sliznice. Výsledný nápoj je nejlépe konzumovat po dvou až třech dnech fermentace, kdy je výsledné pH 4,2 – 4,5 a nápoj je nejlahodnější.

Zajímavým se jeví fakt zjištěný a průběžně potvrzovaný všemi výzkumníky: jako nejvhodnější živný substrát pro růst Tibi v domácích podmínkách doporučují sušené fíky. Shodují se na prokázané hypotéze, že je tomu proto, že fíky obsahují vysoké procento monosacharidů. Proč ovšem Tibi krystaly neprosplívají tak dobře při pěstování na živném substrátu ze sušených švestek, jejichž obsah monosacharidů je ještě vyšší než u fíků, to jsem v rešeršované literatuře nezjistil. Domnívám se, že řešení spočívá ne (respektive nejen) v obsahu cukrů, ale možná v poměrech jednotlivých složek u různých druhů sušeného ovoce,

možná v obsahu minerálů, snad je některý z nich v určité výši zastoupení dominantní a těžko nahraditelný. Domnívám se, že tímto minerálem by mohl být hořčík (Mg), kterého fíky hodně obsahují. Bylo by zajímavé a prospěšné zaměřit se v dalších testech právě na tyto posuny množství sacharidů a minerálů a jejich výskytu a použití u různých druhů ovoce jak v čerstvém, tak v sušeném stavu.

S cílem vymezit kulturu Tibi mezi různými druhy fermentovaných nápojů jsou literaturou sledovány podobné kultury využívané pro přípravu kvašených nápojů. Výzkumníci zjistili značnou druhovou rozmanitost mikrobioty (viz tab. č. 4 kapitole 3.5 Podobné kultury pro výrobu fermentovaných nápojů).

Z výsledků provedených testů vyplývá značný potenciál využívání nápojů pro podporu zdraví psychického i fyzického. Zejména vysoký podíl Laktobacilů u všech zkoumaných fermentovaných nápojů vytváří pozitivní zdravotní efekt. A to blahodárny efekt nezastupitelný tehdy, když si pravidelně a systematicky ničíme a likvidujeme správné poměry mikroorganismů ve střevech svou překyselenou a přechemizovanou stravou.

Z poznatků dosavadních výzkumů i na základě mé vlastní tříleté kultivace Tibi vyplývá seznam doporučení pro trvale udržitelnou kulturu Tibi. Začal jsem pěstovat i kombuchu a tibetský kefír. Do budoucna bych chtěl vypracovat metodiku produkce zdraví prospěšných nápojů pro trh a případně i realizovat distribuci Tibi krystalů dál než jen mezi členy své rodiny, přátele a známé.

## 5 Literatura

Abraham A, De Antoni G. 1999. Characterization of kefir grains grown in cows' milk and in soya milk. *Journal of Dairy Research* **66**(2):327-333. Available from <https://www.cambridge.org/core/journals/journal-of-dairy-research/article/characterization-of-kefir-grains-grown-in-cows-milk-and-in-soya-milk> (accessed March 2019).

Adamcová G. 2010. Mikroflóra trávicího systému člověka. [BSc Thesis]. Available from [digilib.k.utb.cz/bitstream/handle/10563/13276/adamcová\\_2010\\_bp.pdf?sequence](https://digilib.k.utb.cz/bitstream/handle/10563/13276/adamcová_2010_bp.pdf?sequence).

Adriani L, Mayasari N, Angga A, Kartasudjana R. 2011. The effect of feeding fermented Kombucha tea on HLD, LDL and total cholesterol levels in the duck bloods. *Biotechnology in animal Husbandry* **27**(4):1749–1755. <https://DOI.org/10.2298/bah1104749a>.

Ballongue J. 1993. Bifidobacteria and probiotic action. In Salminen S, Wright A. (Eds.). *Lactic acid bacteria* (pp. 357–428). Dekker, Marc, New York.

Balzola F, Bernstein C, HO GT, Lees C. 2010. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing: Commentary. *Inflammatory Bowel Disease Monitor* **11**(1):28. ISSN 14667401. Available from DOI:10.1038/nature08821 (accessed March 2019).

Bartušek M, Pazourek J. 1997. *Základy metod analytické chemie, Pro bakalářské studijní programy [skripta]*. Brno. Available from [http://www.sci.muni.cz/~analchem/files/pdf/bartusek\\_skripta.pdf](http://www.sci.muni.cz/~analchem/files/pdf/bartusek_skripta.pdf) (accessed March 2019).

Belitz H-D, Grosch W, Schieberle P. 2001. *Kohlenhydrate. Lehrbuch der Lebensmittelchemie* (5th ed.). Springer-Verlag, Berlin.

Beshkova DM, Simova ED, Frengova GI, Simov ZI, Dimitrov ZHO. 2003. Production of volatile aroma compounds by kefir starter cultures. *International Dairy Journal* **13**:529–535. Available from DOI:10.1016/S0958-6946(03) 00058-X.

Blumer S. 1934. *Zentralbl Bakt II abt* 91:39-46.

Bu'Lock JD, Hamilton D, Hulme MA, Powell AJ, Shepherd D, Smalley HM, Smith GN. 1965. Metabolic development and secondary biosynthesis in *Penicillium urticae*. Canadian Journal of Microbiology **11**:765–778. Available from <https://DOI.org/10.1139/m65-104> (accessed March 2019).

Cerning J. 1990. Exocellular polysaccharides produced by lactic acid bacteria. FEMS Microbiology Reviews **87**:113–130.

Chakravorty S, Bhattacharya S, Chatzinotas A, Chakravorty W, Bhattacharya D, Gachhui R. 2016. Kombucha tea fermentation: Microbial and biochemical dynamics. International Journal of Food Microbiology **220**:63–72. <https://DOI.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.12.015>.

Chen HC, Wang SY, Chen MJ. 2008. Microbiological study of lactic acid bacteria in kefir grains by culture-dependent and culture – independent methods. Food Microbiol **25**:492–501. DOI:10.1016/j.fm.2008.01.003.

Coton M, Pawtowski A, Taminiau B, Burgaud G, Deniel F. (n.d.). Unravelling microbial ecology of industrial-scale Kombucha fermentations by metabarcoding and culture based methods 1–41.

Danielian LT. 2005. Kombucha and its biological features. Meditsina, Moscow.

Dickinson JR, Kruckeberg AL. 2006. Carbohydrate Metabolism. In Querol A, Fleet GH (Eds.). Yeasts in Food and Beverages (pp. 215–242). Berlin.

Diniz RO, Garla LK, Schneedorf JM, Carvalho JCT. 2003. Study of anti-inflammatory activity of Tibetan mushroom, a symbiotic culture of bacteria and fungi encapsulated into a polysaccharide matrix. Pharmacological Research [online]. **47**(1):49–52. ISSN 10436618. Available from: DOI:10.1016/S1043-6618(02)00240-2.

Doenecke D, Koolman J, Fuchs G, Gerok W. 2005. Karlsons Biochemie und Pathobiochemie (15th ed., pp. 245–250). Georg Thieme Verlag, Stuttgart.

Dufresne C, Farnworth E. 2000. Tea, Kombucha, and health: a review. Food Research International **33**(6):409–421. [https://doi.org/10.1016/S0963-9969\(00\)00067-3](https://doi.org/10.1016/S0963-9969(00)00067-3).

Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN, Purdom E, Dethlefsen L, Sargent M, Gill SR, Nelson KE, Relman DA. 2005. Diversity of the human intestinal microbial flora // Science **308**, N 5728.– P. 1635–1638.

Fliegerová K, J. Šimůnek I, Koppová J, Kopečný A, Mrázek J. 2010. PCR-DGGE-based study of fecal microbial stability during the long-term chitosan supplementation of humans. *Folia Microbiologica* [online] **55**(4):352–358. ISSN 0015-5632. Available from DOI:10.1007/s12223-010-0057-y.

Francesse G, Mennella G, D'Alessandro A. 2010. HPLC analysis of aminoacids, Peptides and Proteins. 10.1201/b10320-21.

Franzetti L, Galli A, Pagani MA, Noni I de. 1998. Microbiological and Chemical Investigations on „Sugar Kefir" Drink. *Annals of Microbiology* [online]**48**(1):67–80. Available from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0038307398&partnerID=40&md5=ada30b899f9dee502be48c7d94180967>.

Frey-Klett P, Burlinson P, Deveau A, Barret M, Tarkka M, Sarniguet A. 2011. Bacterial-fungal interactions: hyphens between agricultural, clinical, environmental, and food microbiologists. *Microbiology and molecular biology reviews, MMBR* **75**(4):583–609.

Frič P. 2007. Probiotika a prebiotika v praxi. *Medicína po promoci* **6**:57-59. Available from [vos.mills.cz/\\_mdocs-file%5914](http://vos.mills.cz/_mdocs-file%5914) (accessed March 2019).

Galli A, Fiori E, Franzetti L, Pagani MA, Ottogalli G. 1995. Microbiological and chemical composition of "sugar" Kefir grains. *Annali di Microbiologia ed Enzimologia* **45**:85-95

Giraffa G. 2004. Studying the dynamics of microbial populations during food fermentation. *FEMS Microbiology Reviews* **28**:251–260. DOI:10.1016/j.femsre.2003.10.005.

Goyal RK. 1999. Biochemistry of Fermentation. In Joshi VK, Pandey A.(Eds.). *Biotechnology: Food Fermentation Volume 1 (Vol. 99)*. New Delhi.

Gray MW. 1989. The evolutionary origins of organelles. *Trends in Genetics* **5**:294–299. DOI:10.1016/0168-9525(89)90111-x.

Greenwalt CJ, Steinkraus KH, Ledford RA. 2000. Kombucha, the Fermented Tea: Microbiology, Composition, and Claimed Health Effects. *Journal of Food Protection*, **63**(7):976–981. Review. PubMed PMID: 10914673. Available from <https://DOI.org/10.4315/0362-028X-63.7.976> (accessed March 2019).

Gulitz A, Stadie J, Wenning M, Ehrmann M, Vogel RF. 2011. The microbial diversity of water kefir. *International Journal of Food Microbiology* **151**(3):284-288. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2011.09.016. ISSN 01681605. Available from <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168160511005344> (accessed March 2019).

Jakob F, Steger S, Vogel RF. 2012. Influence of novel fructans produced by selected acetic acid bacteria on the volume and texture of wheat breads. *European Food Research and Technology* **34**(3):493–499. DOI:10.1007/s00217-011-1658-7.

Jakob F, Pfaff A, Novoa-Carballal R, Rübsam H, Becker T, Vogel RF. 2013. Structural analysis of fructans produced by acetic acid bacteria reveals a relation to hydrocolloid function. *Carbohydrate Polymers* **92**(2):1234–1242.

Belitz H-D, Grosch W, Schieberle P. 2001. Kohlenhydrate. *Lehrbuch der Lebensmittelchemie* (5th ed.). Springer-Verlag, Berlin.

Jay JM. 1992. Fermented Foods and Related Products of Fermentation. *Modern Food Microbiology* **45**:371–409. Van Nostrand Reinhold, New York.

Available from <https://epdf.tips/queue/modern-food-microbiology7037772aa02d50ae71dac9e01ec0ed3783658.html>.

Jayabalan R, Chen PN, Hsieh YS, Prabhakaran K, Pitchai P, Marimuthu S, Yun SE. 2011. Effect of solvent fractions of Kombucha tea on viability and invasiveness of cancer cells-characterization of dimethyl 2-(2-hydroxy-2-methoxypropylidine)malonate and vitexin. *Indian Journal of Biotechnology* **10**(1):75–82.

Jayabalan R., Malbaša RV, Lončar ES, Vitas JS, Sathishkumar M. 2014. A review on Kombucha tea-microbiology, composition, fermentation, beneficial effects, toxicity, and tea fungus. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* **13**(4),538–550. Available from <https://DOI.org/10.1111/1541-4337.12073> (accessed March 2019).

Kaditzky SB. 2008. Sucrose metabolism in lactobacilli and bifidobacteria. Technische Universität München.

Kallel L, Desseaux V, Hamdi M, Stocker P, Ajandouz EH. 2012. Insights into the fermentation biochemistry of Kombucha teas and potential impacts of Kombucha drinking on starch digestion. *Food Research International* **49**(1):226–232. Available from <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.08.018> (accessed March 2019).

Katz SE. 2015. *Síla přírodní fermentace*. ISBN 978-80-247-5214-3. Grada, Praha.

Kaufmann K, Schoneck A. 2007. *Making sauerkraut and pickled vegetables at home: creative recipes for lactic-fermented food to improve your health*. Alive Books, Vancouver, Canada. ISBN isbn978-1-55312-037-7.

Kebler LF. 1921. California bees. *Journal of the American Pharmaceutical Association* [online] **10**(1887):939–943. ISSN 0898140X. Available from DOI:10.1002/jps.3080101206.



Kesmen Z, Kacmaz N. 2011. Determination of lactic microflora of kefir grains and kefir beverage by using culture-dependent and culture-independent methods. *Journal of Food Science* **76**:276–283.

Kozyrovska NO, Reva OM, Goginyan VB, Devera JP. 2012. Kombucha microbiome as a probiotic: a view from the perspective of post-genomics and synthetic ecology. *Biopolymers and Cell* **28**(2):103–113. Available from <https://doi.org/10.7124/bc.000034> (accessed March 2019).

Kraske E-M. 2015. *Acidobazická rovnováha*. Noxi. ISBN: 978-80-8111-257-7.

Krämer J. 2010. *Lebensmittelmikrobiologie*. In: Frede W. (eds) *Handbuch für Lebensmittelchemiker*. Springer, Berlin, Heidelberg. Available from [https://doi.org/10.1007/978-3-642-01685-1\\_19](https://doi.org/10.1007/978-3-642-01685-1_19). Print ISBN978-3-642-01684-4. Online ISBN978-3-642-01685-1.

Liu CH, Hsu WH, Lee FL, Liao CC. 1996. The isolation and identification of microbes from a fermented tea beverage, Haipao, and their interactions during Haipao fermentation. *Food Microbiology* **13**(6):407–415. Available from <https://doi.org/10.1006/fmic.1996.0047> (accessed 2019).

Ling WH. 1995. Diet and colonic microflora interaction in colorectal cancer. *Nutrition Research* **15**: 439-454.

Malik S, Beer M, Megharaj M, Naidu R. 2007. The use of molecular techniques to characterize the microbial communities in contaminated soil and water. *Environment International* **34**:265–276.

Marsh AJ, O’Sullivan O, Hill C, Ross RP, Cotter PD. 2014. Sequence-based analysis of the bacterial and fungal compositions of multiple Kombucha (tea fungus) samples. *Food Microbiology*, **38**:171–178. <https://DOI.org/10.1016/j.fm.2013.09.003>.

Marteau P, Rambaud JC. 1993. Potential of using lactic acid bacteria for therapy and immunomodulation in man. *FEMS Microbiology Reviews* **12**(1–3):207–220. [https://DOI.org/10.1016/0168-6445\(93\)90064-G](https://DOI.org/10.1016/0168-6445(93)90064-G).

Miguel MG da CP, Cardoso PG, Magalhães KT, Schwan RF. 2011. Profile of microbial communities present in Tibico (sugary kefir) grains from different Brazilian States. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* [online]. **27**(8):1875–1884. ISSN 09593993. DOI:10.1007/s11274-010-0646-6.

- Misaki A, Johnson J, Kirkwood S, Scaletti JV, Smith F. 1968. Structure of the cell-wall glucan of yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). Carbohydrate Research **6**(2):150-164. DOI:10.1016/s0008-6215(00)81505-0.
- Modra R. Pasteur vs. Béchamp. 2013. Available from <http://materialdenmg.com/pasteur-vs-bechamp/> (accessed March 2019)
- Moinas M, Horisberger M, Bauer H. 1980. Archives of Microbiology **128**:157. Available from <https://DOI.org/10.1007/BF00406153>. Publisher Springer-Verlag. Print ISSN0302-8933. Online ISSN1432-072X.
- Muyzer G, Waal ECDE, Uitertlinden AG. 2008. Muyzer1993\* [online]. **59**(3):1–6. Available from <papers2://publication/uuid/01BB9958-3AA3-4757-883C-24AA3D92B4B7>.
- Neve H, Heller K. 2002. The microflora of water kefir: a glance by scanning electron microscopy. Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte **54**:337-349. Available from [https://www.researchgate.net/publication/275885260\\_The\\_microflora\\_of\\_water\\_kefir\\_A\\_glance\\_by\\_scanning\\_electron\\_microscopy](https://www.researchgate.net/publication/275885260_The_microflora_of_water_kefir_A_glance_by_scanning_electron_microscopy) (accessed March 2019)  
**180**:401–435.
- Nevoral J 2005. Prebiotika, probiotika a synbiotika. Pediatrie pro praxi **2**:59-65.
- Petrušić M, Radulovic Z, Paunovic D, Obradovic D. 2011. In: Isolation and identification of lactic acid bacteria from kombucha tea. Conference Join Event, Proceedings, pp.180–186.
- Pidoux M. 1989. The microbial flora of sugary kefir grain (the gingerbeer plant): biosynthesis of the grain from *Lactobacillus hilgardii* producing a polysaccharide gel. World Journal of Microbiology and Biotechnology **5**:223–238. DOI:10.1007/BF01741847.
- Pidoux M, Marshall VM, Zanoni P, Brooker B. 1990. Lactobacilli isolated from sugary kefir grains capable of polysaccharide production and minicell formation. Journal of Applied Microbiology **69**:311–320. DOI:10.1111/j.1365-2672.1990.tb01521.x.
- Porchet B. 1934. Mitteilungen aus Lebensmitteluntersuchung und Hygiene **25**:235-244.
- Quilien G. 2002 Probiotika – Syntetická zpráva [online], available from <http://flairflow4.vscht.cz/> (accessed March 2019).
- Reiß J. 1987. Deutsch Lebensmittel Rundschau **83**:286-290.

Reiß J. 1990. Metabolic activity of Tibi grains. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung Lebensm Unters Forch* (1990) **191**:462. Available from <https://DOI.org/10.1007/BF01193095> (accessed March 2019).

Russel RRB. 2009. Bacterial polysaccharides in dental plaque. In M. Ullrich (Ed.), *Bacterial Polysaccharides*. Caister Academic Press, Norfolk.

Sievers M, Lanini C, Weber A, Schuler-Schmid U, Teuber M. 1995. Microbiology and Fermentation Balance in a Kombucha Beverage Obtained from a Tea Fungus Fermentation. *Systematic and applied Microbiology* **18**(4):590–594. [https://DOI.org/10.1016/S0723-2020\(11\)80420-0](https://DOI.org/10.1016/S0723-2020(11)80420-0).

Simova E, Beshkova D, Angelov A, Hristozova T, Frengova G, Spasov Z. 2002. Lactic acid bacteria and yeasts in kefir grains and kefir made from them. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* **28**:1–6. DOI:10.1038/sj/jim/7000186.

Simova E, Simov Z, Beshkova D, Frengova G, Dimitrov Z, Spasov Z. 2006. Amino acid profiles of lactic acid bacteria, isolated from kefir grains and kefir starter made from them. *International Journal of Food Microbiology* **107**:112–123. DOI:10.1016/j.ijfoodmicro.2005.08.020.

Simpson PJ, Ross RP, Fitzgerald GF, Stanton C. 2004. *Bifidobacterium psychraerophilum* sp. nov. and *Aeriscardovia aeriphila* gen. nov., sp. nov., isolated from a *porcine caecum*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **54**(2):401–406.

Sinir GÖ, Tamer CE, Suna S. 2019. Kombucha Tea: a Promising Fermented Functional Beverage. *Fermented Beverages*. <https://DOI.org/10.1016/B978-0-12-815271-3.00010-5>.

Smetanová K. 2007. Beta-glukany. [BSc Thesis]. Masarykova univerzita, Brno.

Stadelmann E. 1961. Der Teepilz und Seine Antibiotische Wirkung. *Zentbl. Bakteriol. Parasitenkd. Infektkrankh. Hyg. Parasit. Inf. Hyg.*

Stadie J, Gulitz A, Ehrmann MA, Vogel, RF. 2013. Metabolic activity and symbiotic interactions of lactic acid bacteria and yeasts isolated from water kefir. *Food Microbiology* **35**(2), 92–98. <https://DOI.org/10.1016/j.fm.2013.03.009>.

Stanbury PF, Whitaker A, HALL SJ. 2017a. ed. *Principles of Fermentation Technology* (Third Edition) [online]. Chapter 2 - Microbial growth kinetics. Third Edition. Oxford: Butterworth-Heinemann, s. 21–74. ISBN 978-0-08-099953-1. Available from DOI:<https://DOI.org/10.1016/B978-0-08-099953-1.00002-8>.

Stanbury PF, Whitaker A, HALL SJ. 2017b. ed. Principles of Fermentation Technology (Third Edition) [online]. Chapter 1 - an introduction to fermentation processes. Third Edition. Oxford: Butterworth-Heinemann, s. 1–20. ISBN 978-0-08-099953-1. Available from DOI:<https://doi.org/10.1016/B978-0-08-099953-1.00001-6>.

Stolz P, Böcker G, Hammes WP, Vogel, RF. 1995. Utilization of electron acceptors by *Lactobacilli* isolated from sourdough. I. *Lactobacillus sanfransiscensis*. Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung und Forschung **201**:91–96.

Suhartatik N, et al. 2011. Kombucha as anti hypercholesterolemic agent (in vitro study using SD rats). In: Proceedings of the 3rd International Conference of Indonesian Society for Lactic acid Bacteria (3rd IC-ISLAB): Better Life with Lactic acid Bacteria: Exploring Novel Functions of Lactic acid Bacteria.

Teoh AL, Heard G, Cox J. 2004. Yeast ecology of Kombucha fermentation. International Journal of Food Microbiology **95**(2):119–126. <https://DOI.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2003.12.020>.

Vinderola CG, Duarte J, Thangavel D, Perdigón G, Farnworth E, Matar C. 2005. Immunomodulating capacity of kefir. Journal of Dairy Research **72**(2):195-202.

Vodrážka Z. 2002. Biochemie. 2. opr. vyd. ISBN 80-200-0600-1. Academia, Praha.

Vries W de, Stouthamer AH. 1968. Fermentation of glucose, lactose, galactose, mannitol and xylose by Bifidobacteria. Journal of Bacteriology **96**(2):472–478.

Vuyst L de, Degeest B. 1999. Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. FEMS microbiology reviews **23**(2):153–177.

Xu D, Bechtner J, Behr J, Eisenbach L, Geißler AJ, Vogel RF. 2019. Lifestyle of *Lactobacillus hordei* isolated from water kefir based on genomic, proteomic and physiological characterization. International Journal of Food Microbiology **290**:141-149, ISSN 0168-1605, <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.10.004>. (<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S016816051830758X>).

Yang CS, Maliakal P, Meng X. 2002. Inhibition of C arcinogenesis By T Ea. Annual Review of Pharmacology and Toxicology **42**(1):25–54. <https://DOI.org/10.1146/annurev.pharmtox.42.082101.154309>.

Zbořil V. 2005. Mikroflóra trávicího traktu: klinické souvislosti. ISBN 80-247-0584-2. Grada, Praha.

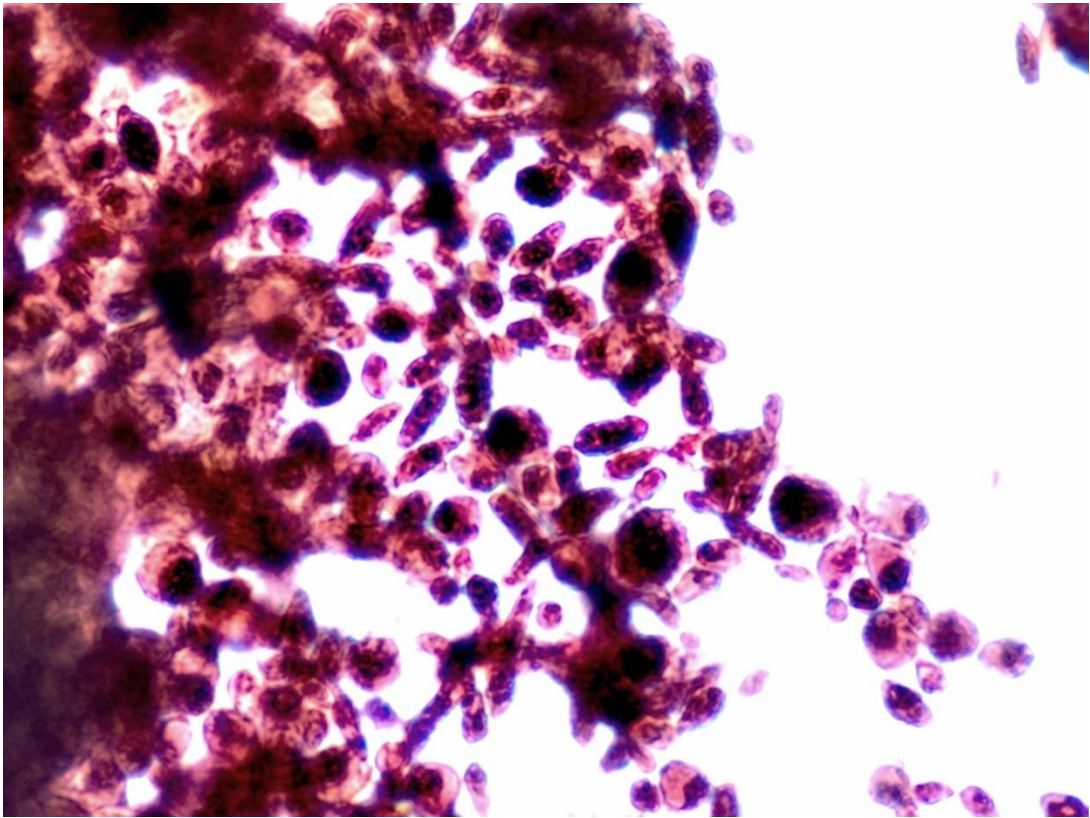
Zhou J, Liu X, Jiang H, Dong M. 2009. Analysis of the microflora in Tibetan kefir grains using denaturing gradient gel electrophoresis. *Food Microbiology* [online]. **26**(8):770–775. ISSN 07400020. Available from DOI:10.1016/j.fm.2009.04.009.

Zhu XY, Lubeck J, Kilbane JJ. II 2003. abergeretal96.Pdf [online] **69**(9):5354–5363. Available from DOI:10.1128/AEM.69.9.5354.

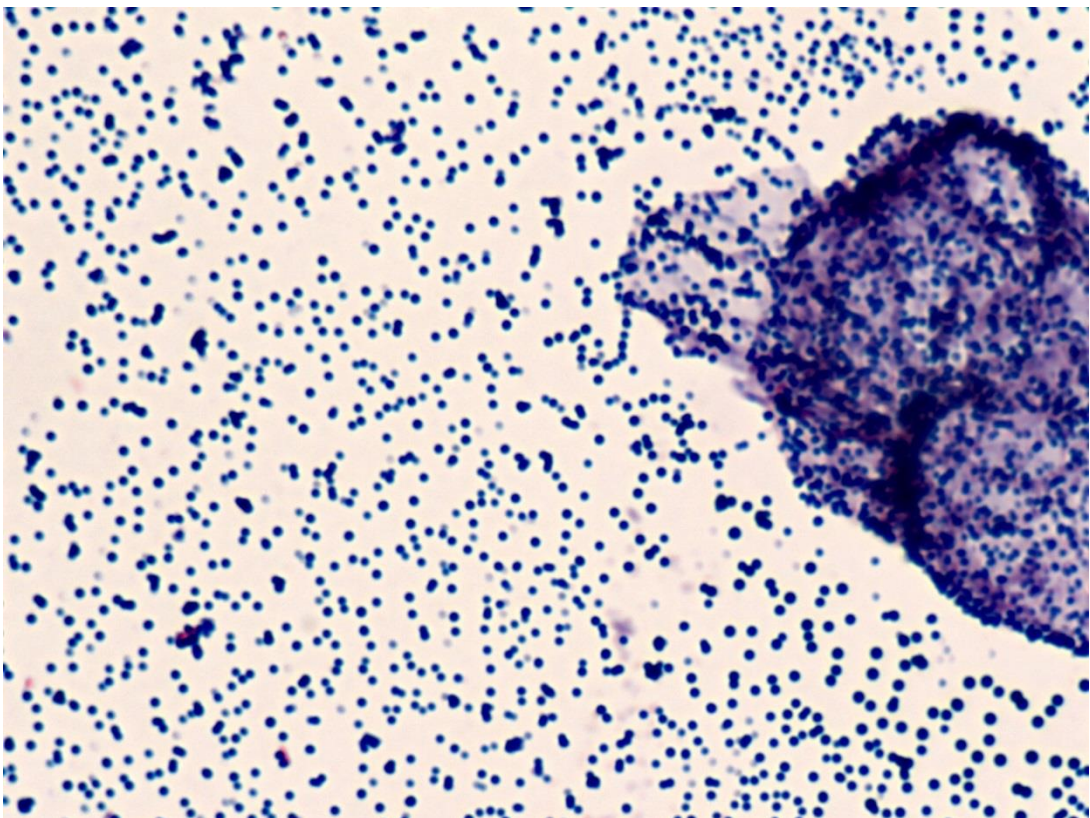
## 6 Seznam použitých zkratek a symbolů

16S	Malá ribosomální podjednotka
26S	velká ribosomální podjednotka
Ac.	<i>Acetobacter</i>
ATP	adenosintrifosfát
B.	<i>Bifidobacterium</i>
BMK	bakterie mléčného kvašení
BOK	bakterie octového kvašení
EPS	Exopolysacharidy
FTIR	infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací
H.	<i>Hanseniaspora</i>
HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie
IEC	iontově výměnná chromatografie
Lb.	<i>Lactobacillus</i>
Lc.	<i>Leuconostoc</i>
NADH	Nikotinamidadenindinukleotid
NADPH	Nikotinamidadenindinukleotidfosfát
Obr	obrázek
PCR-DGGE	Polymerázová řetězová reakce – elektroforéza v gradientovém denaturačním gelu
PEP	fosfofenylpyruvátu
PTS	fosfotransferázový systém
RAPD-PCR	náhodná amplifikace polymorfní DNA
RC	regenerovaná celulóza
RVK	roztok vodního kefíru
srv.	srovněj
St.	<i>Streptococcus</i>
Tab.	tabulka
Z.	<i>Zygorulaspora</i>

## 7 Samostatné přílohy

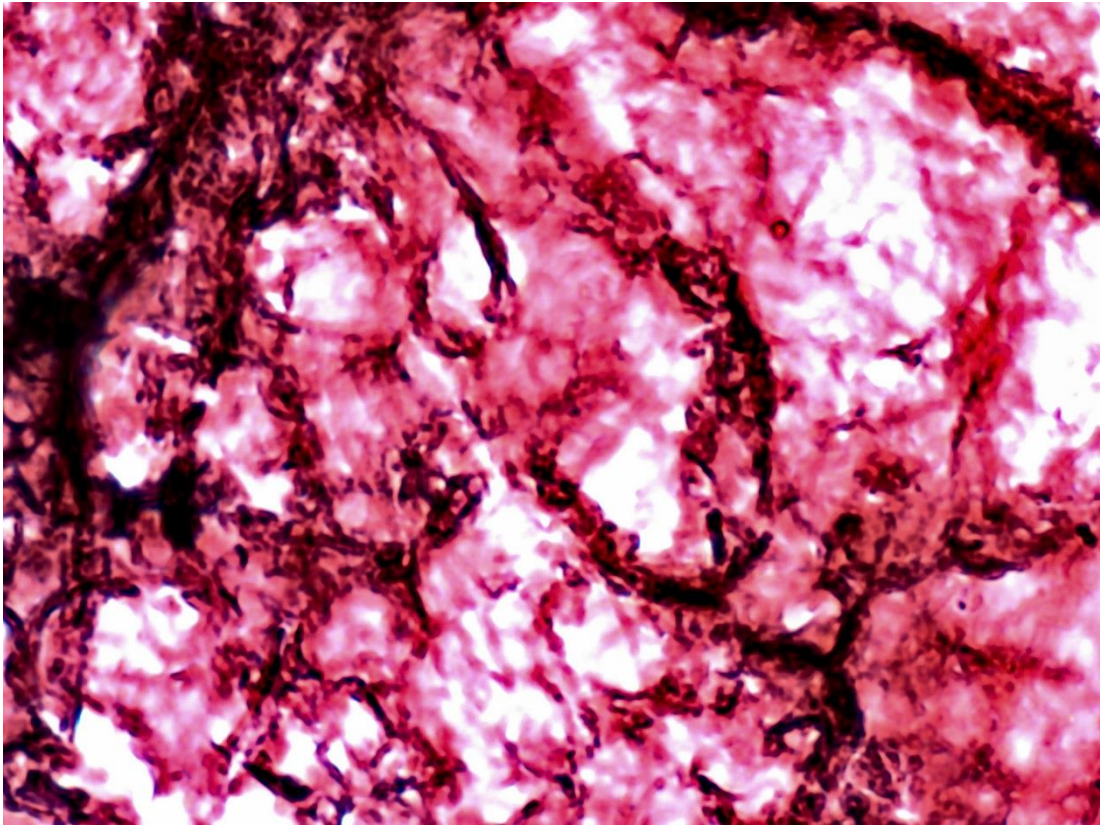


Obr. 8: Kvasinková populace vodního kefiru, 100x

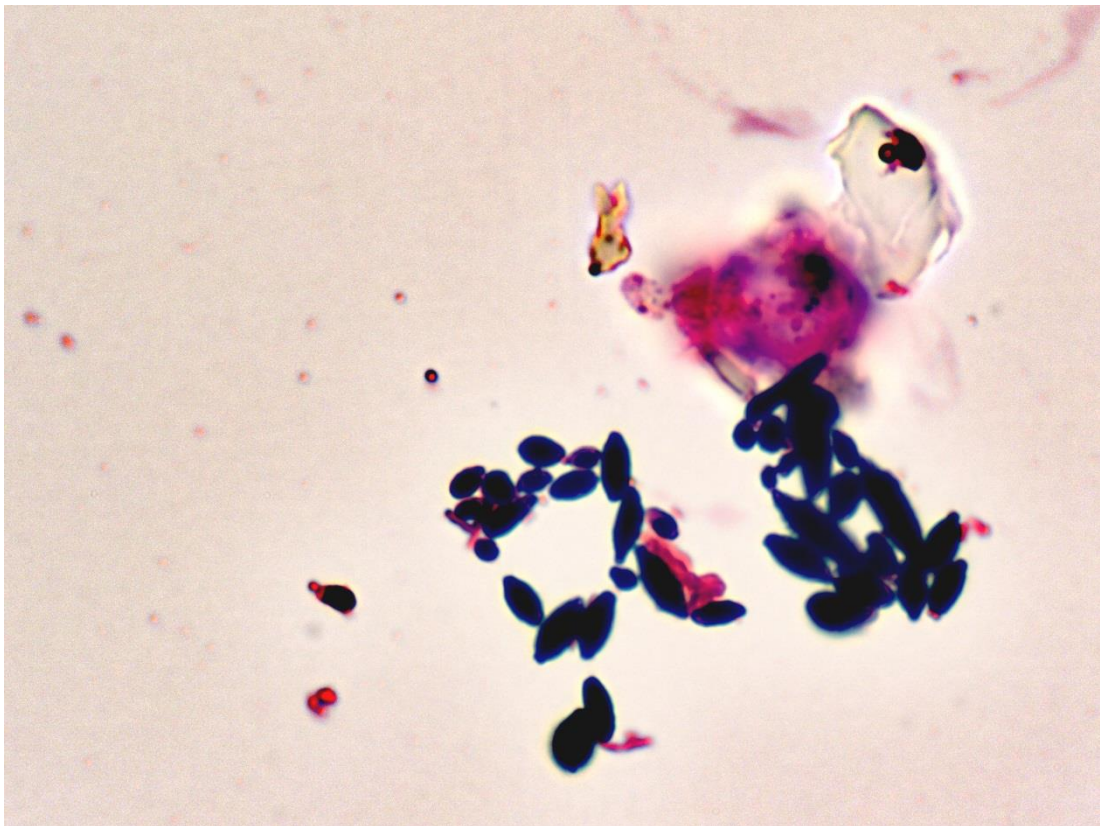


Obr. 9: Populace koků se zrnem Tibi, 100x





Obr. 10: Polysacharidová matrix, 100x



Obr. 11: Populace kvasinek, 100x



Tab. č. 3: **Metabolická aktivita Tibi zrn na médiích různého složení** (Reiß 1990)

		Standartní médium s fíky 20 g	Standartní médium bez fíků	Média s		
				rozinkami 10 g	datlemi 10 g	švestkami 10 g
Glukóza						
po	2 dnech	14.2	13.0	13.5	13.4	12.0
	4 dnech	12.5	9.6	10.8	11.5	9.6
	6 dnech	11.0	6.8	8.2	10.5	8.5
	8 dnech	9.4	6.2	7.8	7.0	4.5
	12 dnech	2.3	4.0	5.7	2.5	1.0
	14 dnech	0.4	2.7	4.3	1.2	0.3
	18 dnech	0	2.5	1.5	0	0
kyselina mléčná						
po	2 dnech	0.02	0.02	0.16	0.05	0.16
	4 dnech	0.02	0.05	0.24	0.20	0.26
	6 dnech	0.02	0.12	0.30	0.36	0.50
	8 dnech	0.01	0.18	0.38	0.32	0.50
	12 dnech	0.02	0.55	0.40	0.40	0.46
	14 dnech	0.02	0.60	0.58	0.50	0.58
	18 dnech	2.8	0.48	1.12	0.76	0.86
kyselina octová						
po	2 dnech	0.2	0	0.2	0.2	0.2
	4 dnech	0.1	0.6	0.3	0.4	0.4
	6 dnech	1.1	1.2	0.4	0.8	0.7
	8 dnech	1.0	1.2	1.2	0.8	1.0
	12 dnech	1.0	3.9	1.0	1.0	3.5
	14 dnech	1.0	6.7	1.0	1.1	4.5
	18 dnech	1.0	7.0	1.3	1.2	5.2
Hodnota pH						
po	2 dnech	4.5	4.5	Nedetkováno		
	6 dnech	3.7	4.0	4.0	4.5	4.0
	12 dnech	3.0	3.5	3.0	3.0	3.0
	18 dnech	3.0	3.0	3.0	3.1	3.0

## Látková přeměna

Uvedená příloha poskytuje informace klíčové k pochopení fungování živé kultury, tedy i Tibi krystalů.

Metabolismus zahrnuje dvě nerozlučitelné „jinjang“ složky – látkovou a energetickou.

Katabolismus produkuje chemickou energii a ukládá ji do ATP, poskytuje prekursory, což je stavební materiál pro biosyntetické procesy a vyrábí energeticky bohaté redukční činidlo NADPH.

Anabolismus představuje výrobní fázi metabolismu nazývanou též biosyntéza. Pro syntézu sloučenin je potřebná energie ve formě ATP, a protože z chemického hlediska jde většinou o redukční děje, vyžadují i na energii bohaté redukční činidlo NADPH. Kromě těchto dvou zmíněných drah existují další, které plní obě funkce - označujeme je jako amfibiotecké dráhy (citrátový cyklus).

Další dráhy jsou anaplerotické reakce (z řečtiny „naplnit se“), které slouží k doplnění vyčerpaných meziproductů metabolických drah. Je známo, že jednotlivé meziproducty metabolických drah jsou propojeny, stačí doplnit jediný z nich přeměnou některého z přebývajících obecných metabolitů. Příkladem je anaplerotická reakce doplňování oxalacetátu v citrátovém cyklu karboxylací pyruvátu.

Namísto dělení metabolismu na katabolické a anabolické děje se v mikrobiologii používá dělení z energetického hlediska: na energetický (neboli energii získávající) metabolismus a biosyntetický (neboli energii spotřebovávající) metabolismus. Energetický metabolismus zahrnuje děje, při kterých se z degradujících živin uvolňuje energie, a reakce umožňující využívat světelnou energii (fotonů) při fotosyntéze. Intenzita látkové výměny není ve všech organismech stejná ani v rámci jednoho organismu. Různí se podle jeho stáří a fáze růstu. Samozřejmě v závislosti na okolních podmínkách.

Mezi obecné metabolické dráhy patří odbourávání energie z glukózy za vzniku dvou pyruvátů neboli glykolýza, která je zdrojem energie od počátku a probíhala i ve vývojově nejmladších organismech, jako jsou mikroorganismy. Dalším univerzálním procesem je zpracování kyseliny octové v citrátovém cyklu aerobů.

Charakter metabolismu sestává z několika dílčích reakcí, které podléhají stejným zákonitostem (zákon o zachování energie a hmoty, zákon o chemické rovnováze, princip akce a reakce apod.). Organismy můžeme členit dle jejich metabolismu z hlediska trofiky (z řeckého „trofé“ - výživa), tedy způsobu výživy podle dvou hlavních kritérií:

A: podle zdroje přijímání energie na fototrofy a chemotrofy (látkoživné) získávající energii oxidací již existujících živin organických či anorganických.

B: podle zdroje stavebního materiálu, autotrofy, které mohou syntetizovat všechny organické sloučeniny z anorganických zdrojů (například  $\text{CO}_2$ ,  $\text{NH}_3$ , dusičnanový a síranový anion) a heterotrofy používající organické látky, které jsou současně zdrojem energie.

Takovéto rozdělení je v podmínkách mikrobiologie nedostatečné. Liší se také způsobem, jakým probíhá přenos elektronů od donorů (redukčních činidel) na jejich vhodné akceptory (oxidační činidla) tj. redoxní dráha. Podle donorů elektronů rozlišujeme organotrofy, dehydrogenující organické látky, jako jsou sacharidy, mastné kyseliny, a litotrofy, u nichž jsou donoři elektronů jednoduché anorganické sloučeniny, jako  $H_2$ ,  $H_2O$ ,  $H_2S$ ,  $NH_3$  a další.

Podle konečných akceptorů elektronů dělíme mikrobiotu na aeroby, kde je kyslík finálním akceptorem, a anaeroby, kteří využívají jiné molekuly.

Z metabolického hlediska tedy rozdělujeme mikroorganismy do čtyř hlavních skupin lišících se trofikou a redoxními ději.

Respirace neboli dýchání je proces, při kterém organismy prostřednictvím „biochemické baterie“ složené z oxidoreduktáz předávají elektron svému terminálnímu akceptoru a při tom získávají hlavní podíl energie. Aerobové mají  $O_2$  jako konečný článek své baterie, zatímco anaerobové mají jinou anorganickou látku a jako zdroj kyslíku používají vodu. To je hlavní rozdíl mezi aerobním a anaerobním metabolismem. Mnohé biochemické děje jsou v podstatě identické u aerobů i anaerobů. Z hlediska potřeby kyslíku rozlišujeme striktní (obligátní, přísné) aeroby, kteří se bez kyslíku neobejdou. Obdobně rozlišujeme striktní anaeroby, kteří mají jen anaerobní metabolismus a v přítomnosti kyslíku hynou. Střední cestou se vydali fakultativní aerobové, kteří umějí využívat anaerobní i aerobní metabolismus. V přítomnosti kyslíku využívají aerobní, protože je energeticky výhodnější. V jeho nepřítomnosti použijí některé organické meziprodukty metabolismu jako finální akceptor elektronů. To je valná většina heterotrofních organismů. Některé anaerobní buňky nedovedou využívat aerobní respiraci, ale nízká koncentrace kyslíku v jejich prostředí podporuje jejich rozmnožování, těm říkáme mikroaerofilní.

Při fermentaci se nepoužívá transport elektronů systémem oxidoreduktáz s externím akceptorem jako konečným článkem. Elektrony uvolněné oxidací organických sloučenin jsou přímo přijímány jinými organickými sloučeninami, které jsou meziprodukty probíhajících metabolických drah. Při fermentaci tedy nejde o pravou oxidaci, ale pouze o přesun atomů vodíku mezi různými organickými sloučeninami. Substráty se neoxidují úplně jako při respiraci. Například degradace sacharidů končí u kyseliny mléčné, ethanolu či jiných metabolitů, zatímco při aerobním metabolismu jsou tyto látky oxidovány až na  $H_2O$  a  $CO_2$  (Vodrážka 2002).

## Popis fungování PCR-DGGE

Polymerázová řetězová reakce (PCR) je technika umožňující snadné a rychlé namnožení daného kusu DNA *in vitro*, replikací nukleonových kyselin. Její velkou výhodou je vysoká citlivost přepisu a fakt, že stačí velmi malé množství DNA. Metoda se skládá ze tří hlavních kroků: denaturace, hybridizace a elongace. Při denaturaci je celá směs zahřáta na teplotu 94–96 °C, při které se narušují vodíkové vazby a oddělují se molekuly DNA. Při hybridizaci je směs zchlazena na 60 °C, při které jsou krátké oligonukleotidy (primery) schopny navázání spojení podle komplementarity. Funkcí primerů je označit začátek a konec probíhající amplifikace. Při elongaci je směs opět zahřáta na teplotu 72 °C, při níž dochází k syntéze nové molekuly DNA k původní molekule DNA. Výsledkem jsou tedy dvě molekuly DNA. Tento cyklus se opakuje, většinou stačí 30 cyklů (Malik 2007).

Separace namnožených fragmentů DNA (16S rDNA) probíhá pomocí DGGE, která je založena na klesající pohyblivosti fragmentů v polyakrylamidovém gelu vlivem rostoucí denaturační síly. Pohyblivost DNA je určena počtem vodíkových můstků, jejich rozmístění a poměru bází. V praxi pozorujeme putující DNA elektrickým polem do okamžiku, kdy se vlákna začnou oddělovat. Řetězce s vyšší koncentrací AT se oddělují rychleji. Úseky bohaté na CG jsou stabilnější a dojdou dál.

Každý pruh vzniklý na vzorku gelu ukazuje na dominantní druh mikroorganismů (Zhu 2003).

Pro přesnější určení jsou vybrané pruhy s vyšší intenzitou vyříznuty, očištěny a opět namnoženy pomocí PCR s fluorescenčně značenými nukleotidy a sekvenovány. Získané sekvence se porovnávají s databází genové banky pomocí BLASTn algoritmu, který podle podobnosti sekvencí přiřadí konkrétní či nejpodobnější druh (Muyzer et al. 2008; Fliegerová et al. 2010).

Real-time PCR umožňuje kvantitativní stanovení jednotlivých druhů mikroorganismů ve vzorku na rozdíl od klasické metody. Princip je stejný, jen v rozdílu reakční směsi, která obsahuje fluorescenční barvu (nejčastěji SYBR green), jež se váže na vznikající dvoušroubovici DNA. Přitom je zaznamenána probíhající fluorescence přístrojem. Rychlost vzniku fluorescence odpovídá množství vzniklého produktu a je přímo úměrná původnímu množství DNA vzorku. Kvantifikace je provedena buď porovnáním s kontrolní skupinou či z kalibrační křivky standartu (Malik et al. 2007).

Elektroforéza v gradientovém denaturačním gelu (DGGE) působí tak, že aplikujete malý vzorek DNA (nebo RNA) na elektroforézní gel, který obsahuje denaturační činidlo. Vědci zjistili, že některé denaturační gely jsou schopny přimět DNA tát v různých fázích. V důsledku tohoto tavení se DNA šíří gelem a mohou být analyzovány jednotlivé komponenty, dokonce i malé obsahující jen 200-700 základních párů (Muyzer 2008).

Unikátní na technice DGGE je, že DNA je podrobena stále extrémním podmínkám denaturace a rozpustí fragmenty zcela do jednotlivých pramenů. To umožňuje rozeznat rozdíly v sekvencích DNA nebo mutacích různých genů: rozdílné sekvence

ve fragmentech stejné délky často způsobují jejich částečné roztavení na různých pozicích v gradientu, a proto se v gelu zastaví v různých pozicích. Porovnáním chování při tavení polymorfních fragmentů DNA vedle sebe na gradientních gelech při denaturaci je možné odhalit fragmenty, které mají mutace (Gray 1989). Umístěním dvou vzorků vedle sebe na gel umožnění jejich identifikování. Následně mohou výzkumníci snadno vidět i ty nejmenší rozdíly ve dvou vzorcích nebo fragmentech DNA.

### Popis fungování HPLC

HPLC (vysokoučinná kapalinová chromatografie) a IEC (iontově-výměnná chromatografie) jsou vyspělé a zavedené techniky s vestavěnou pružností pro izolaci, detekci a měření miliard sloučenin (analytů) v široké škále vzorových matic. Tyto techniky se používají v různých typech laboratoří analytické chemie například v odvětvích: patologie, farmaceutiky, biotechnologií, v oblastech agrochemikálií, testování potravin a nápojů, v nemocnicích a veterinárních klinikách...

Hlavní části HPLC jsou zásobník mobilní fáze, pumpa, dávkovač vzorku, kolona a detektor spojený se zapisovačem. Pumpa vstříkne látku pod tlakem několik MPa na kolonu s velkým odporem, odpor je zprostředkován malými částicemi velikosti setin mm. Píst pumpy, řízený elektromotorem je připojen do kolony kudy proudí kapalina. Smíchaný roztok naplní dávkovací smyčku o známém objemu. Po otočení ventilu se objem smyčky zařadí do mobilní fáze, která vzorek dopraví do kolony.

Kolona je trubice se stacionární fází, ta je tvořena částicemi velikosti 5-10  $\mu\text{m}$ . Zde probíhá chromatografické dělení. Plynová chromatografie má kolonu prázdnou. Kolona musí mít malý průměr, aby došlo k rovnováze co možná nejrychleji (Francesse 2010).

Schéma č. 6: (Bartušek a Pazourek 2000)

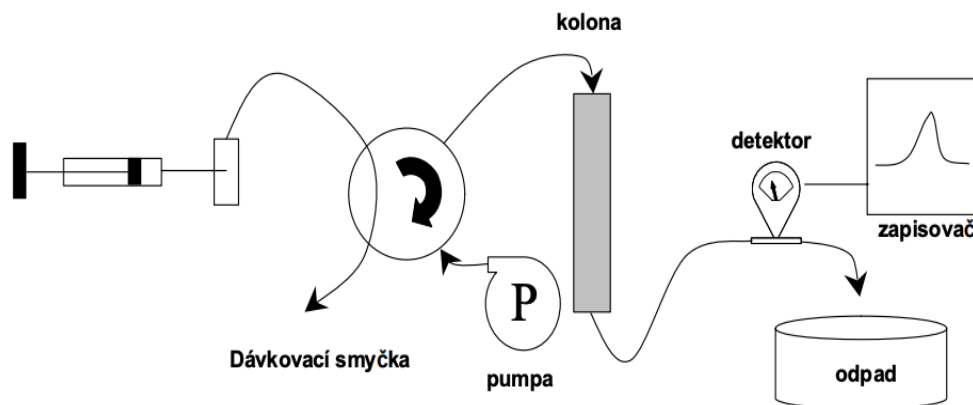
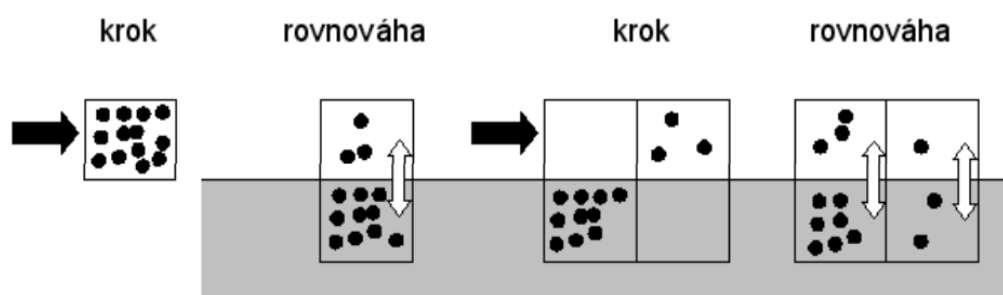


Schéma zařízení pro HPLC

Detektor analyzuje složky při výstupu z kolony. Přítomnost analytů je vidět na píkách v chromatografu. Používáme detektor neselektivní, ten umí identifikovat kterékoli cizí látky v mobilní fázi. Detektor selektivní detekuje pouze určitý okruh analytů. Příkladem neselektivním je detektor pracující na vlnové délce 254 nm, což je vlna rtuťové výbojky. Je to hodnota, při které se většina organických molekul absorbuje. Konduktometrický detektor umí selektovat ionty, dává nulový signál v přítomnosti nenabitých částic. Hmotnostně spektrální detektor detekuje hmotnost molekul v každém chromatografickém píku mobilní fáze a ten zaregistruje. V iontové chromatografii je stacionární fáze vyměňovač iontů, eluující mobilní fáze je roztok s obsaženými ionty. Dnes je chromatograf plně řízen počítačem, který obstará dávkování vzorku, průtokovou rychlost, složení mobilní fáze, teplotu, postkolonovou derivatizaci a protokol o chromatografické anlyze.

V praxi to funguje tak, že kapalina či plyn (mobilní fáze) pomalu teče okolo látky pevné (stacionární fáze). Plocha kontaktu je co možná největší, tím je prostor k výměně látek maximální. Tomu říkáme retence. Dochází k výměně látek z jedné fáze do druhé. Řádově jsou částice velké 0,01 mm. V praxi protéká tekutina trubicí což je kolonové uspořádání anebo mezi celulóзовými vlákny.

Schéma č. 7 dle Bartušek & Pazourek (2000)



*Vysvětlení chromatografického procesu, pojmu chromatografické patro*

Na obrázku jsou vidět patra, ve kterých se stanovuje rovnováha. Při kontaktu dvou fází se fáze promíchávají. Následně mobilní fáze pokračuje dále v proudění a nese s sebou nesorbované analyty. Přiteče do druhého patra stacionární fáze a nastaví rovnováhu koncentrace na povrchu mezi stacionární a mobilní fází. Čím více je látka sorbována, tím pomaleji postupuje ve směru toku. Látky, které se pohybují stejnou rychlostí mají nulovou retenci, a tudíž se nesorbují. I malé rozdíly ve velikosti několika analytů, které při míchání těžko postřehneme, stačí pro jejich rozdělení a následné analyzování (Bartušek & Pazourek 2000).

HPLC a IEC jsou prováděny injektováním malého množství kapalné směsi do pohybujícího se proudu kapaliny (mobilní fáze), která prochází sloupcem naplněným částicemi ze stacionární fáze, vše probíhá za vysokého tlaku.

Například komponent A má stejnou interakci se stacionární fází jako s mobilní fází. Komponent B má silnější interakci se stacionární fází než s mobilní fází.

Poté, co byla směs A i B injektována do sloupce, tyto komponenty s mobilní fází byly hnány přes sloupec proudem. Molekuly složky A budou interagovat se stacionární fází a budou jí absorbovat stejným způsobem, jako mobilní fází. Proto se složka A pohybuje nebo eluuje přes sloupec stejnou rychlostí, jako mobilní fáze.

Přítomnost každé složky je po jejím průchodu sloupcem detekována detektorem. Detektor je zařízení, které snímá přítomnost komponentů odlišných od kapalně mobilní fáze a přeměňuje tuto informaci na elektrický signál. V případě HPLC/IEC lze použít různé typy detektorů, což závisí na tom, která fyzikální / chemická vlastnost analytů může být využita. Z tohoto důvodu sloučeniny A a B budou opouštět sloupec v různých časech, to znamená, že mají různé retenční časy. Retenční čas je čas mezi injekcí a detekcí. Detektor informaci zpracuje a pošle ji do počítače na vyhodnocení.

Graf detekovaného analytu proti retenčnímu času je chromatogram (Francese 2010).

## **Doporučení, kterak pěstovat Tibi krystalky:**

**Pomůcky:** Skleněná láhev vhodného objemu (osvědčila se třílitrová), umělohmotný cedník, trychtýř, nůž, dřevěné prkénko, dřevěná vařečka

**Poměry složek:** obsah krystalků = obsah cukru

Na objem jednoho litru vody vystačí čtyři polívkové lžičky krystalků.

Ovoce přidejte v přiměřeném množství (osvědčila se mi hrst křížal, dva fíky, zhruba dvacet rozinek a tři plátky citronu).

Vodní kefir nepotřebuje k životu příliš. Stačí mu jen převařená nebo odstátá voda, cukr a čerstvé nebo lépe **přírodně sušené ovoce** – tzn. ovoce, u kterého nebyly ke konzervaci použity siřičitany nebo jiná škodlivá „éčka“.

Do vychladlé převařené nebo odstáté vody nasypeme cukr a mícháme do rozpuštění. Přidáme ovoce (ideálně fíky, švestky, rozinky, křížaly z jablek, hrušek, třešní, meruněk..., Tibi krystalky a půlku citronu či limetky.

Zamícháme a uzavřeme víčkem. (Pozor, nenechávejte dlouho – nebezpečí výbuchu.) Pokud víte, že nebudete moci nápoj pravidelně slévat, s pěstováním nezačínajte nebo používejte místo uzavíratelného víka na přikrytí čistou textilií, kterou přichytíte gumičkou, aby se pod ni nedostaly octomilky. Nádobu umístíme na klidné, poloslunné místo.

Při běžné pokojové teplotě trvá výroba nápoje **2-3 dny, ale při letních vedrech stačí krystalkům k práci i 24 hodin**. Krystalky pokud možno ráno či večer promícháme vařečkou, aby se uvolnil oxid uhličitý.

Hotový nápoj slijeme a pijeme. Krystalky vrátíme do lahve a proces fermentace opakujeme.

**Jedenkrát týdně krystalky propláchneme ve studené vodě.** Snažíme se vyhnout používání kovových předmětů, protože kov Tibi krystalkám škodí.

Hotový nápoj můžeme ihned vypít nebo ho uložit na 2 - 3 dny do chladničky do uzavíratelné nádoby. Po 24 hodinách v chladu se díky dozrívajícím kvasným procesům stane příjemně perlivým.

### Poznámky:

Krystalky rostou a přibývají tempem 10 % krystalků za tři dny.

Při odjezdu na více dní doporučuji nechat odpočívat krystalky v chladničce ve sladkém nálevu ve sklenici s látkou místo uzávěru.

Hotový nápoj se dobře skladuje v uzavíratelných skleněných láhvích.