

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická

Kvašený nápoj kombucha a jeho účinky na lidské zdraví

Michaela Javůrková

Bakalářská práce

2022

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická  
Akademický rok: 2021/2022

# ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Michaela Javůrková**  
Osobní číslo: **C19117**  
Studijní program: **B2901 Chemie a technologie potravin**  
Studijní obor: **Hodnocení a analýza potravin**  
Téma práce: **Kvašený nápoj kombucha a jeho účinky na lidské zdraví**  
Téma práce anglicky: **Fermented kombucha drink and its effects on human health**  
Zadávací katedra: **Katedra analytické chemie**

## Zásady pro vypracování

1. Vypracujte literární rešerši se zaměřením na přípravu kvašeného nápoje kombucha a jeho účinky na lidské zdraví. Dále se věnujte analytickému stanovení biologicky aktivních látek, které se v nápoji vyskytují. Zaměřte se především na spektrofotometrické metody pro sledování antioxidační kapacity a na separační techniky v kapalné fázi.
2. Výsledky prezentované v literatuře porovnejte a kriticky zhodnoťte.

Rozsah pracovní zprávy:  
Rozsah grafických prací:  
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:  
Podle pokynů vedoucí práce.

Vedoucí bakalářské práce: **doc. Ing. Lenka Česlová, Ph.D.**  
Katedra analytické chemie

Datum zadání bakalářské práce: **7. února 2022**  
Termín odevzdání bakalářské práce: **1. července 2022**

**prof. Ing. Petr Kalenda, CSc. v.r.**  
děkan

LS.

**prof. Ing. Karel Ventura, CSc. v.r.**  
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 21. února 2022

## Prohlášení autora

Prohlašuji, že jsem práci s názvem Kvašený nápoj kombucha a jeho účinky na lidské zdraví vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 9/2012, bude práce zveřejněna v Univerzitní knihovně a prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 30.6.2022

Michaela Javůrková

## **PODĚKOVÁNÍ**

Na tomto místě bych ráda poděkovala své vedoucí bakalářské práce doc. Ing. Lence Česlové Ph.D. za cenné rady a srdečný přístup při vypracování práce. Zároveň bych ráda poděkovala mé mamince za inspiraci pro napsání bakalářské práce na toto téma a celé mé rodině za podporu a trpělivost, kterou mi poskytovala v průběhu celého studia.

## **ANOTACE**

Tato bakalářská práce se zabývá analýzou biologicky aktivních sloučenin obsažených v kvašeném nápoji kombucha. Na začátku práce je popsán postup přípravy nápoje a chemické složení. Dále jsou uvedeny jeho blahodárné i nežádoucí účinky na lidský organismus. Závěrem je pozornost zaměřena na samotnou analýzu bioaktivních látek v kombuše především pomocí kapalinové chromatografie.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

Kombucha, Fermentace, HPLC, Kvasinky, Bakterie, SCOBY

## **TITLE**

Fermented kombucha drink and its effects on human health

## **ANNOTATION**

This bachelor thesis deals with the analysis of biologically active compounds contained in the fermented kombucha drink. The process of preparation of beverages and chemical composition is described at the beginning of the thesis. In addition, its positive and side effects on the human organism are mentioned. The last part of the thesis is devoted to the analysis of bioactive substances of kombucha by liquid chromatography.

## **KEYWORDS**

Kombucha, Fermentation, HPLC, Yeast, Bacteria, SCOBY

# Obsah

Seznam ilustrací a tabulek .....	9
Seznam zkratk .....	10
Úvod .....	11
1 Kvašený nápoj Kombucha .....	12
1.1 Historie kombuchy .....	12
1.2 Kvašení .....	13
1.3 Příprava kombuchy .....	13
1.3.1 Výběr čaje pro výrobu kombuchy .....	13
1.3.2 První a druhá fermentace .....	14
1.3.3 Hygiena a bezpečnost při výrobě kombuchy .....	16
2 Složení kombuchy a jeho vliv na zdraví .....	17
2.1 Mikrobiologické složení kombuchy .....	17
2.2 Chemické složení kombuchy .....	18
2.2.1 Ethanol .....	19
2.2.2 Kofein .....	20
2.2.3 Polyfenoly .....	20
2.2.4 Organické kyseliny .....	21
2.2.4.1 Kyselina octová .....	21
2.2.4.2 Kyselina mléčná .....	22
2.2.4.3 Kyselina glukonová .....	22
2.2.4.4 Kyselina glukuronová .....	23
2.2.5 Sacharidy .....	23
2.2.6 Vitamíny .....	24
2.2.6.1 Vitamín B1 .....	24
2.2.6.2 Vitamín B2 .....	24
2.2.6.3 Vitamín B6 .....	25
2.2.6.4 Vitamín B12 .....	26
2.2.6.5 Vitamín C .....	26
2.2.7 Minerální látky .....	27
2.2.8 Enzymy .....	27
3 Účinky kombuchy na lidské zdraví .....	28
3.1 Antioxidační aktivita .....	28
3.2 Antimikrobiální aktivita .....	28
3.3 Detoxikační účinky .....	29
3.4 Probiotické účinky .....	29
3.5 Protirakovinné účinky .....	29

3.6	Jiné terapeutické účinky .....	30
3.7	Nežádoucí účinky .....	30
4	Stanovení biologicky aktivních látek v kombuše .....	31
4.1	Extrakce .....	31
4.1.1	Extrakce kapalina-kapalina .....	31
4.1.2	Disperzní kapalinová mikroextrakce .....	31
4.2	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie .....	32
4.2.1	Chromatografické kolony .....	32
4.2.2	Detektory .....	33
4.2.2.1	Spektrofotometrický detektor .....	33
4.2.2.2	Fluorescenční detektor .....	33
4.2.2.3	Konduktometrický detektor .....	33
4.3	Iontově výměnná chromatografie .....	34
4.4	Stanovení polyfenolů .....	34
4.5	Stanovení organických kyselin a kofeinu .....	35
4.6	Stanovení minerálů .....	36
4.7	Stanovení vitamínů rozpustných ve vodě .....	37
4.8	Stanovení antioxidační aktivity .....	38
4.8.1	Metody stanovení antioxidační aktivity založené na eliminaci radikálů .....	38
4.8.1.1	Metoda využívající DPPH .....	38
4.8.1.2	ABTS metoda .....	38
4.8.1.3	ORAC metoda .....	39
4.8.1.4	Metoda založená na vychytávání OH radikálů .....	39
4.8.1.5	Metoda využívající galvinoxyl .....	39
4.8.2	Metody založené na hodnocení redoxních vlastností látek .....	39
4.8.2.1	FRAP metoda .....	39
4.9	Příklady stanovení antioxidační aktivity .....	40
4.10	Stanovení antimikrobiální aktivity .....	41
4.10.1	Disková difúzní metoda .....	41
4.10.2	Agarová diluční metoda .....	42
4.10.3	E-test .....	42
5	ZÁVĚR .....	43
6	Bibliografie .....	44



## SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK

Obrázek 1: Čajový nálev po přidání symbiotické kultury „SCOBY“ (Foto autor).....	12
Obrázek 2: Kvašený nápoj kombucha připravený ke konzumaci (Foto autor) .....	13
Obrázek 3: Kvašený nápoj po první fermentaci (Foto autor).....	15
Obrázek 4: Schéma procesu první fermentace .....	15
Obrázek 5: Kvašený nápoj po druhé fermentaci (Foto autor) .....	16
Obrázek 6: SCOBY: celulózová membrána (Foto autor).....	17
Obrázek 7: Schéma metabolismu mikroorganismů [18] .....	18
Obrázek 8: Chemická struktura ethanolu.....	19
Obrázek 9: Chemická struktura kofeinu .....	20
Obrázek 10: Chemická struktura EGCG .....	21
Obrázek 11: Chemická struktura kyseliny octové .....	21
Obrázek 12: Chemická struktura kyseliny mléčné .....	22
Obrázek 13: Chemická struktura kyseliny glukonové.....	22
Obrázek 14: Chemická struktura kyseliny glukuronové.....	23
Obrázek 15: Chemická struktura sacharózy .....	24
Obrázek 16: Chemická struktura vitamínu B1 .....	24
Obrázek 17: Chemická struktura vitamínu B2 .....	25
Obrázek 18: Chemická struktura pyridoxinu.....	25
Obrázek 19: Chemická struktura vitamínu B12 .....	26
Obrázek 20: Chemická struktura vitamínu C .....	27
Obrázek 21: Jednotlivé kroky disperzní kapalinové mikroextrakce [46].....	32
Obrázek 22: HPLC chromatogram aniontů kombuchy [43].....	37
Obrázek 23: Disková difuzní metoda [56].....	41
Obrázek 24: E-test [57].....	42
Tabulka 1: Chemické složení kombuchy [16] .....	19

## SEZNAM ZKRATEK

ABTS+	2,2'-azinobis(3-ethyl-2,3-dihydrobenzothiazol-6-sulfonát)
BTK	kombucha připravená z černého čaje
DLLME	disperzní kapalinová mikroextrakce
DPPH	1,1-difenyl-2-(2,4,6-trinitrofenyl)hydrazyl
DPPH-H	difenylpikrylhydrazin
EC	epikatechin
EGC	epigalokatechin
EGCG	epigalokatechin galát
ECG	epikatechin galát
GlcUa	kyselina glukuronová
GTK	kombucha připravená ze zeleného čaje
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
LAB	bakterie mléčného kvašení
MIC	minimální inhibiční koncentrace
SCOBY	symbiotická kultura bakterií a kvasinek
TSA	trypton sojový agar
TSB	trypton sojový bujon
WTK	kombucha připravená z čajového odpadu

## ÚVOD

Kombucha, je fermentovaný mírně sycený a lehce kyselý nealkoholický nápoj původem z Asie. Získává se fermentací slazeného čaje symbiotickou kulturou kvasinek a bakterií, která je uložena v celulóзовém biofilmu (SCOBY). Tradičně se vyrábí z černého čaje, ale k přípravě je možné použít také čaj zelený, oolong nebo čaj bylinný.

Tento nápoj si v poslední době získal obrovskou popularitu, díky tomu, že obsahuje velké množství bioaktivních látek, a proto se kvalifikuje jako funkční potravina s mnoha zdravotními výhodami. Získal si oblibu především díky svým terapeutickým účinkům, jako jsou antimikrobiální, antioxidační, antikarcinogenní, detoxikační, hepatoprotektivní a probiotické účinky [1]. Předpokládá se, že léčebné účinky tohoto nápoje jsou způsobeny přítomností probiotických mikroorganismů a chemickým složením tohoto nápoje, zejména polyfenoly, aminokyselinami, organickými kyselinami a vitamíny rozpustnými ve vodě [2].

Výskyt a množství chemických složek v nápoji je variabilní, závisí především na druhu a množství mikroorganismů obsažených v symbiotické kultuře, dále na podmínkách fermentace, jako je čas a teplota, obsahu sacharózy a druhu použitého čaje. [3].

Stejně tak, jak může být kombucha pro člověka prospěšná, tak pokud nebudou dodrženy hygienické podmínky pro výrobu, může být dokonce i toxická, z důvodu přítomnosti plísní či zvýšeného obsahu těžkých kovů např. olova [4].

# 1 KVAŠENÝ NÁPOJ KOMBUCHA

Kombucha je název pro nealkoholický sladkokyselý mírně sycený nápoj vzniklý fermentací především slazeného černého čaje (*Camellia sinensis*). K fermentaci je využívána symbiotická kultura bakterií a kvasinek, známá také pod zkratkou: SCOBY [3]. Čajový nálev se symbiotickou kulturou kombuchy je zobrazen na obrázku č. 1.



Obrázek 1: Čajový nálev po přidání symbiotické kultury „SCOBY“ (Foto autor)

## 1.1 Historie kombuchy

Tento sladkokyselý kvašený nápoj vznikl na území Mandžuska (historická oblast na severovýchodě Číny) před 2500 lety a ihned se rozšířil po celé Číně, kde byl přijat během vlády dynastie Tsin pro svou detoxikační a energizující vlastnosti [5]. V roce 414 n.l. lékař jménem Kombu dovezl tento produkt do Japonska a použil jej k léčbě trávicích problémů císaře Inkya. Po tomto lékaři byl nápoj údajně pojmenován Kombucha [5; 6].

Nápoj byl nejprve představen orientálními obchodníky v Rusku a poté se přes východní Evropu a Německo v 50. letech dostal do Francie. Konzumace nápoje zde byla tak populární, že způsobila nedostatek čajových lístků a cukru. Z tohoto důvodu se nápoj přestal konzumovat.

O pár let později vědci potvrdili, že konzumace kombuchy byla zdraví prospěšná stejně jako jogurt díky přítomnosti kyselin. V tento moment se popularita kvašeného nápoje opět zvýšila a na trh byl uveden i s řadou nových příchutí. Následně i sociální média zpopularizovaly tento nápoj zejména ve Spojených státech tím, že zdůrazňují pozitivní zdravotní přínosy, které lze získat jeho pravidelnou konzumací [5; 6].

Kombucha během své expanze do dalších zemí získala hned několik dalších názvů, jako Čajová houba, Kargasokský čaj, Mandžuská houba a Haipao. Jedna etymologická teorie uvádí, že název „Kombucha“ se v japonštině překládá jako „čaj z mořských řas“ nebo „kombu-cha“ [6].

## 1.2 Kvašení

Kvašení či fermentace je technologický proces, který využívá růst a metabolické aktivity mikroorganismů pro konzervaci a přeměnu potravinářských materiálů. Dodává potravinám charakteristické aroma, chuť, texturu a nutriční profil (obrázek č. 2).



Obrázek 2: Kvašený nápoj kombucha připravený ke konzumaci (Foto autor)

Z historického hlediska byla fermentace vyvinuta za účelem uchování potravin, které rychle podléhají zkáze. Během procesu kvašení dochází k inhibici růstu patogenních organismů, čímž se oddaluje proces kažení a je tak následně prodloužena trvanlivost potravin. Tato technologie se rozvinula a nyní již není používána výhradně pro konzervaci, ale je využívána i jako nástroj pro vytváření organoleptických profilů v potravinách a zlepšování jejich chutnosti [7].

Během spontánní fermentace se v rostlinách a v mléčných výrobcích uplatňuje komunita bakterií mléčného kvašení (LAB) skládající se z rodů *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus* a *Streptococcus*, které se podílí na produkci kyseliny mléčné. Při alkoholovém kvašení dominují kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* a při kvašení sýra jsou přítomny rody *Penicillium* spolu s bakteriemi *Propionibacterium spp.* a LAB. Při kyselém octovém kvašení, které je využíváno pro výrobu kombuchy dominují bakterie rodu *Acetobacter* a *Gluconobacter* [8].

## 1.3 Příprava kombuchy

### 1.3.1 Výběr čaje pro výrobu kombuchy

K přípravě kombuchy se tradičně používá černý, oolong a zelený čaj. Rozdíl mezi jednotlivými typy čajů je způsoben různým technologickým zpracováním listů čajovníku, a to především různým stupněm fermentace. Zelené čaje jsou nefermentované, oolong jsou polofermentované a černé čaje jsou plně fermentované. Při fermentaci čaje dochází k enzymatické oxidaci přítomných polyfenolů kyslíkem.

Černý čaj je fermentován zcela, to znamená, že proces oxidace je zde nejvýraznější a proto černý čaj mívá silnější vůni než ostatní čaje. Vlivem enzymatické oxidace dochází ke změně ve struktuře katechinů a vznikají dimerní a polymerní formy: theaflaviny a thearubiginy.

K výrobě zeleného čaje se využívá proces zahřívání. Tento postup inaktivuje enzymy katalyzující oxidaci, což zabraňuje procesu fermentace. Jelikož zelený čaj není fermentovaný je pozorováno velmi odlišné složení mezi jednotlivými odrůdami, a tedy i účinky na zdraví jsou u každého druhu jiné. Ukázalo se, že zelený čaj má mnohem lepší vliv na průběh kvašení kombuchy než čaj černý, proto je kombucha ze zeleného čaje připravena ke konzumaci rychleji. [9; 3].

U oolong čaje lze jeho zpracování rozdělit do sedmi kroků, které zahrnují slunění, vadnutí, fermentaci, rýžování, rolování, vypalování, konečné vypalování a balení. Stupeň oxidace je v rozmezí od 10 do 70 %. Chuť je na přechodu mezi černým a zeleným čajem a je také známý díky svému ovocnému a květinovému aroma. Obsah hlavních katechinů v listech čaje oolong je nižší než v zeleném čaji, protože katechiny jsou během fermentačního procesu částečně oxidovány polyfenoloxidázou [10]. K přípravě kombuchy lze také použít například čaj meduňkový, jasmínový a mátový. [9].

### **1.3.2 První a druhá fermentace**

Přesný recept na přípravu kombuchy neexistuje, jelikož se poměr surovin může upravovat podle požadované výsledné chuti. Nejčastěji se však připravuje rozpuštěním 50 - 150 g sacharózy (nejlépe nerafinovaný tzv. hnědý cukr) v 1 litru čerstvě převařené vody. Ve sladkém nálevu necháme poté vyluhovat 5 g lístků černého nebo zeleného čaje po dobu 10 minut. Po vyjmutí čajových lístků se čaj nechá vychladit na pokojovou teplotu (20-25 °C) a až potom je do čaje přidána SCOBY (celulósová membrána obsahující konsorcium bakterií a kvasinek) společně se 100 ml kombuchy z předchozí fermentace (startovací kultura) [9].

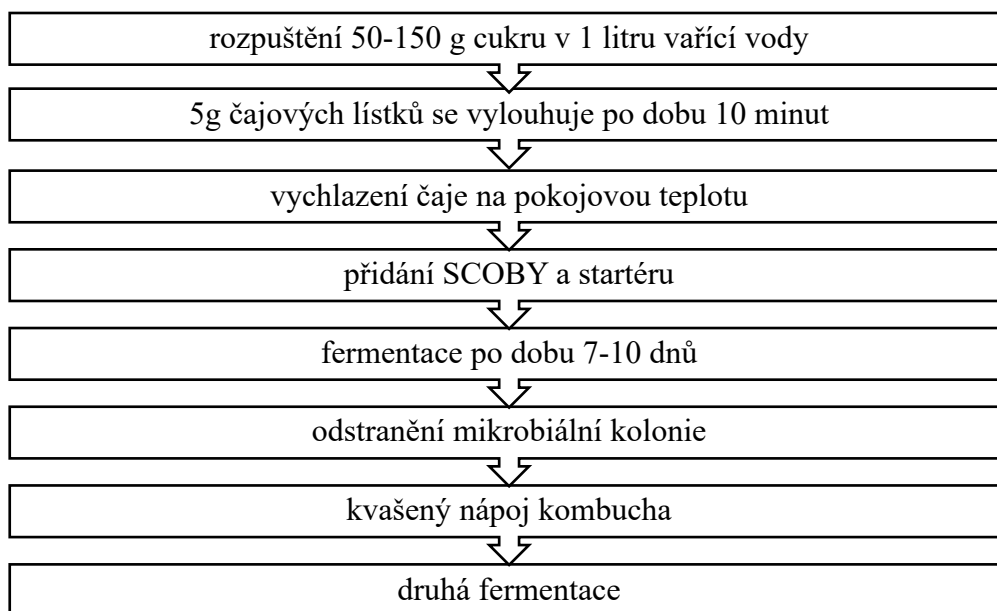
Následně se nádoba přikryje bavlněnou látkou, která chrání nápoj před prachem, hmyzem, sporami a nežádoucí kontaminací. Takto se nechá inkubovat při pokojové teplotě nejlépe na místě, kam přímo nesvítí slunce po dobu 7 až 10 dnů. Nedoporučuje se překračovat dobu fermentace, neboť kyselost může stoupnout na úroveň potenciálně škodlivou ke konzumaci. Během fermentace se doporučuje kontrolovat pH a proces kvašení zastavit při pH 4,2 (v domácích podmínkách lze ukončit fermentaci pomocí postupného ochutnávání, nápoj by neměl být ani příliš sladký ani kyselý) [9].

Po této první fermentaci je nutné oddělit SCOBY od nově vniklého kvašeného nápoje. SCOBY lze skladovat na chladném místě společně s 20 % již fermentované kombuchy pro pozdější opětovné použití. V tento moment je možné kombuchu naplnit do lahví a vychlazenou ji konzumovat (obrázek č. 3). [9]



**Obrázek 3: Kvašený nápoj po první fermentaci (Foto autor)**

Po první fermentaci je možné provést tzv. druhou fermentaci za účelem zvýšení charakteristické chutě čaje a tvorby plynu. Do stočené zkvašené kombuchy se přidá nový slazený čaj nebo ovocná šťáva, káva, ovoce (obrázek č.5) nebo kokosová voda a v tomto stavu je udržována při pokojové teplotě po dobu 2 až 3 dnů [11]. Zjednodušené schéma procesu kvašení kombuchy je znázorněno na obrázku č.4.



**Obrázek 4: Schéma procesu první fermentace**

Konečným produktem je nápoj složený z organických kyselin, vitamínů, minerálů a čajových složek, připomínající chuť cideru. Doporučená spotřeba je 100 až 300 ml denně [5].



**Obrázek 5: Kvašený nápoj po druhé fermentaci (Foto autor)**

### **1.3.3 Hygiena a bezpečnost při výrobě kombuchy**

Pro přípravu kombuchy je velmi důležité používat nekovové nástroje a skleněné nádoby. Pokud by byl použit jiný materiál, mohlo by dojít k uvolnění nežádoucích látek do nápoje a k jeho kontaminaci. Například pokud by byla pro fermentaci použita keramická nádoba mohlo by dojít k uvolnění olova [12].

Nádoby je nutné udržovat čisté a dezinfikované, aby se zabránilo růstu patogenních mikroorganismů [9]. Tomu napomáhá přirozeně nízké pH nápoje a nedostatek kyslíku, které inhibuje růst nežádoucích bakterií. Během fermentace je nutné kontrolovat pH, aby nekleslo pod hodnotu pH 4,2, protože při nižším pH může být v nápoji obsažena kyselina octová v tak vysoké koncentraci, že by konzumace nápoje mohla být zdraví škodlivá. [13].



## 2 SLOŽENÍ KOMBUCHY A JEHO VLIV NA ZDRAVÍ

### 2.1 Mikrobiologické složení kombuchy

Symbiotická kultura kombuchy neboli SCOBY (obrázek č. 6) je tvořena dvěma typy organismů: kvasinkami (*Brettanomyces*, *Zygosaccharomyces*, *Saccharomyces* a *Pichia*) a octovými bakteriemi (rod *Acetobacter* a *Gluconobacter*). [14]. Je ve formě rosolovité šedé až hnědé vícevrstvé celulózové membrány, a právě díky tomuto vzhledu, podobnému klobouku houby, je označována jako Čajová houba [13]. Tato makroskopická želatinová hmota je velmi podobná „octové matce“, která vzniká během kvašení octa [15]. Její hlavní funkcí je fermentace, tedy získání kvašeného nápoje (kombuchy). Tím, že plave na hladině slazené tekutiny zajišťuje dostatečný přísun kyslíku pro octové bakterie. Naopak kvasinky chrání před působením kyslíku, tím, že jsou ve spodní části biofilmu. Má tedy jak funkci krycí tak ochranou před UV zářením a jinými mikroorganismy [13].

Celulózový biofilm, který se na počátku výroby přidává do slazeného nápoje se označuje jako „mateřská čajová houba“. Během jednoho cyklu fermentace se nad tímto biofilmem vytvoří nová tenká vrstva biofilmu označována jako „dceřiná čajová houba“. Ta je vytvořena při každém úspěšném fermentačním kroku a je poté využívána pro výrobu nové šarže nápoje [9].



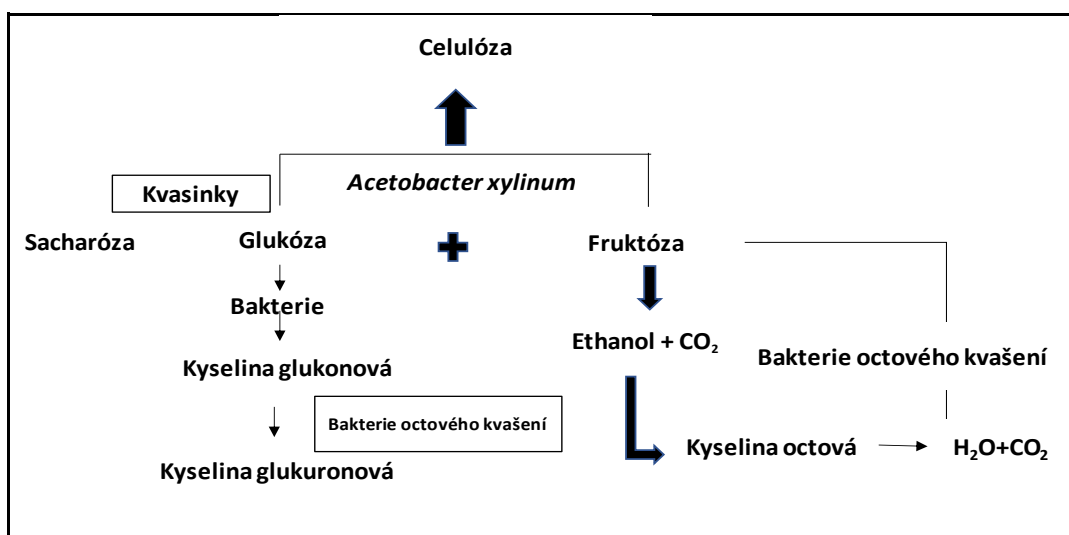
**Obrázek 6: SCOBY: celulózová membrána (Foto autor)**

Metabolismus mikroorganismů v průběhu fermentace kombuchy je složitý a není zcela objasněn. Některé bakterie a kvasinky mají svou funkci dobře definovanou, ale role některých mikroorganismů jsou neznámé [16].

Na počátku fermentace kvasinky hydrolyzují sacharózu na glukózu a fruktózu intervenázou a produkují glykolýzou ethanol. Při tom kvasinky z rodu *Saccharomyces* preferují glukózu, zatímco kvasinky rodu *Zygosaccharomyces* preferují fruktózu. Glukóza je následně využita bakteriemi kyseliny octové k produkci kyseliny glukonové a ethanol k produkci kyseliny octové. Přítomnost kyseliny octové stimuluje kvasinky k produkci většího množství ethanolu,

který je následně rodem *Acetobacter* využíván k růstu a k další produkci právě této kyseliny [11; 13].

*Acetobacter xylinum* se během procesu kvašení podílí na tvorbě celulózového filmu, který spojuje bakterie a kvasinky. Syntéza celulózy je ukončena, když se vrstva stane dostatečně hustou, až je ponořena do kapaliny. V celulózovém biofilmu se tak zachycují mikroorganismy a octové bakterie zůstávají neaktivní v důsledku nedostatečného přísunu kyslíku. Oproti tomu kvasinky, které jsou umístěny ve spodní části biofilmu pokračují v anaerobní fermentaci, generují ethanol a látky důležité pro typické aroma kombuchy [16]. Zjednodušené schéma metabolismu mikroorganismů v průběhu kvašení kombuchy je zobrazeno na obrázku č. 7.



Obrázek 7: Schéma metabolismu mikroorganismů [18]

## 2.2 Chemické složení kombuchy

Chemické složení kombuchy se může lišit, v závislosti na době fermentace, teplotě, obsahu sacharózy, typu použitého čaje a také na druhu symbiotických mikroorganismů, které jsou přítomné v použitém inokulu. Látky, které jsou prokazatelně přítomny ve většině vzorků kombuchy jsou polyfenoly, organické kyseliny, sacharidy, vitamíny rozpustné ve vodě, minerály, enzymy, anionty, aminokyseliny, ethanol, oxid uhličitý a kofein [16].

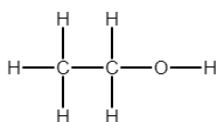
Celé chemické složení nápoje určuje jeho chuť [17]. Vybrané základní a esenciální látky obsažené v nápoji i s jejich koncentrací, jsou sepsány přehledně v tabulce č.1.

**Tabulka 1: Chemické složení kombuchy [16]**

skupina	sloučenina	Průměrné složení	Počáteční množství cukru	Doba fermentace (dny)
Organické kyseliny	Kyselina octová	5,6 g/l	70 g/l	15
	Kyselina octová	8,36 g/l	100 g/l	18
	Kyselina octová	11 g/l	100 g/l	30
	Kyselina glukonová	39 g/l	100 g/l	60
	Kyselina glukonová	0,0160 g/l	70 g/l	21
	Kyselina mléčná	0,18 g/l	100 g/l	18
Vitamíny	Vitamín B <sub>1</sub>	0,74 mg/ml	70 g/l	15
	Vitamín B <sub>2</sub>	0,08 mg/ml	70 g/l	10
	Vitamín B <sub>6</sub>	0,52 mg/ml	70 g/l	15
	Vitamín B <sub>12</sub>	0,084 mg/ml	70 g/l	15
	Vitamín C	0,03 mg/ml	70 g/l	10
Ostatní	Ethanol	5,5 g/l	100 g/l	20
	Bílkoviny	3 g/l	100 g/l	12
	Polyfenoly	7,8 mM GAE*	100 g/l	15
Minerály	Cu, Fe, Mn, Ni, Zn	0,1-0,4 µg/ml	70 g/l	15
Anionty	F <sup>-</sup> , Cl <sup>-</sup> , Br <sup>-</sup> , I <sup>-</sup> , NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> , HPO <sub>4</sub> <sup>-</sup> , SO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	0,04-3,2 mg/g	100 g/l	7

### 2.2.1 Ethanol

Ethanol, jehož chemická struktura je na obrázku č. 8, produkují kvasinky přeměnou z cukru. Ve výsledném produktu je obsažen jen v malém množství, protože je využit jako zdroj energie pro bakterie [13].



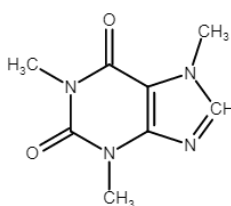
**Obrázek 8: Chemická struktura ethanolu**

Maximální limit ethanolu pro nealkoholické nápoje, včetně nápojů kombucha, je 0,5 % (v/v). Pokud má produkt obsah alkoholu vyšší než 0,5 % (v/v), musí být klasifikován jako alkoholický nápoj [18].

### 2.2.2 Kofein

Kofein je methylxantinový alkaloid (obrázek č.9), bílé barvy a hořké chuti, který se do kombuchy uvolňuje z čajových lístků. Přírodně se vyskytuje v semenech, listech a plodech několika rostlin a stromů a působí jako přírodní pesticid. Kofein je hlavní složkou kávy, čaje a čokolády. U lidí působí jako stimulant centrálního nervového systému.

Nachází se v energetických nápojích, produktech pro zlepšení výkonu při sportu, úlevu od bolesti, snížení únavy a zlepšení pozornosti. Dále je také obsažen v kosmetických produktech jako jsou mýdla a šampony [19].

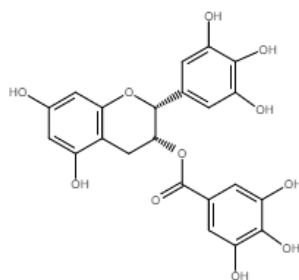


Obrázek 9: Chemická struktura kofeinu

### 2.2.3 Polyfenoly

Polyfenoly jsou aktivní sloučeniny s více než jednou strukturální jednotkou fenolu na molekulu, které představují největší skupinu fytochemikálií a nejhodněji se vyskytující antioxidanty ve stravě, které inhibují volné radikály [3]. Jsou to látky, které se nacházejí v mnoha léčivých rostlinách a do kombuchy se uvolňují z čajového nálevu. Dají se rozdělit na fenolové kyseliny, flavonoidy (flavonoly, isoflavonoly, flavanoly, antokyany), stilbeny a lignany.

V kombuše připravené ze zeleného čaje jsou obsaženy převážně katechiny, jako jsou epikatechin (EC), epigalokatechin (EGC), epikatechin galát (ECG) a epigalokatechin galát (EGCG) a díky jejich vysoké koncentraci má kombucha připravená ze zeleného čaje větší antioxidační aktivitu než z čaje černého. Tyto katechiny jsou dokonce účinnějšími antioxidanty než vitamín C [20]. Některé studie vyšší antioxidační aktivitu zeleného čaje kromě katechinů připisují i kvercetin [21]. Hlavní katechin zeleného čaje je EGCG (obrázek č. 10), který je z polyfenolů nejsilnějším antioxidantem a má mnoho pozitivních účinků na lidské zdraví, například oddaluje únavu, má zklidňující účinek a dokáže bojovat proti rakovině [22].



**Obrázek 10: Chemická struktura EGCG**

V kombuše připravené z černého čaje jsou hlavní skupinou polyfenolů theaflaviny, které napomáhají spalování tuků, snižují hladinu cholesterolu a krevního cukru, chrání kardiovaskulární systém a inhibují volné radikály [23].

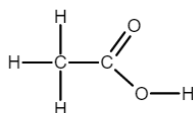
Celkově pití čaje a kombuchy může inhibovat rozvoj rakoviny kůže, plic, jícnu, žaludku, jater, dvanáctníku, tenkého střeva, slinivky břišní, tlustého střeva, močového měchýře, prostaty, vaječníků, ústní dutiny a mléčné žlázy [23].

## 2.2.4 Organické kyseliny

Organické kyseliny přítomné v kombuše jsou zapojeny do metabolických drah jednak jako meziproducty nebo konečné producty a tak hrají důležitou roli v různých biologických procesech [24].

### 2.2.4.1 Kyselina octová

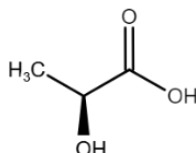
V kombuše je kyselina octová (obrázek č.11) produkována bakteriemi octového kvašení. Dodává nápoji jeho specifickou kyselou vůni a chuť, která připomíná ocet. Koncentrace kyseliny octové se v průběhu fermentace zvyšuje. K jejímu poklesu dochází až po cca 30 dnech kvašení, v momentu, kdy jsou cukry v čaji spotřebovány a kyselina octová se stává alternativním zdrojem uhlíku pro bakterie. Kombucha s vyšším obsahem kyseliny octové má velmi štiplavou kyselou chuť [17].



**Obrázek 11: Chemická struktura kyseliny octové**

#### 2.2.4.2 Kyselina mléčná

Kyselina mléčná neboli kyselina 2-hydroxypropionová (obrázek č.12), byla objevena v roce 1780 švédským chemikem Scheele, který ji izoloval z kyselého mléka. Je to bezbarvá až slabě žlutá hydrokopická kapalina s jemnou kyselou chutí, která nepřebíjí slabší aromatické chutě.



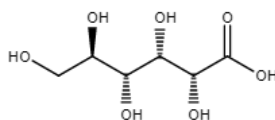
Obrázek 12: Chemická struktura kyseliny mléčné

Kyselina mléčná se vyrábí průmyslově fermentací sacharidů nebo synteticky hydrolýzou laktonitrilu. Používá se v různých nápojích, cukrovinkách, mase a omáčkách jako okyselovadlo či konzervační činidlo.

V kombuše je produkována bakteriemi mléčného kvašení. Nápoji dodává příjemně kyselou chuť a efektivně ho konzervuje, takže může být v lednici uchován i několik měsíců [25].

#### 2.2.4.3 Kyselina glukonová

Kyselina glukonová je karboxylová kyselina odvozená od glukózy oxidací aldehydové skupiny na karboxylovou. Její struktura se skládá z šestiuhlíkatého řetězce s navázanými pěti hydroxylovými skupinami a karboxylovou skupinou umístěnou na konci (obrázek č.13) [20].



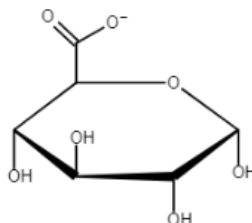
Obrázek 13: Chemická struktura kyseliny glukonové

Kyselina glukonová společně s kyselinou octovou jsou hlavní organické kyseliny obsažené v kombuše. Jsou to klíčové sloučeniny, které přispívají k utváření kvality chuti kombuchy. Kyselina glukonová přispívá k příjemně kyselé chuti nápoje, zatímco kyselina octová způsobuje velmi trpkou kyselou pachut'. Jejich koncentrace je závislá na konkrétních bakteriích kyseliny octové a kvasinkách [3].

Kyselina glukonová je hojně dostupná v rostlinách, ovoci a dalších potravinách, jako je rýže, maso, mléčné výrobky, víno (až 0,25 %), med (až 1 %) a ocet [26].

#### 2.2.4.4 Kyselina glukuronová

Kyselina glukuronová (GlcUa) je derivátem glukózy, u kterého je šestý uhlík oxidován na karboxylovou skupinu (obrázek č. 14) [27].



Obrázek 14: Chemická struktura kyseliny glukuronové

GlcUa je produkována zdravými játry a je nejvýznamnějším detoxikátorem v lidském těle [28; 29]. Díky její schopnosti reagovat s toxiny napomáhá jejich vyloučení z organismu a podporuje správnou funkci jater [27]. Proces silné vazby mezi molekulami kyseliny glukuronové a toxinem je známý jako glukuronidace. GlcUa může být přeměněna na glukosamin a chondroitin-sulfát, které jsou spojeny s kolagenem a také s tekutinou, která působí jako lubrikant v kloubech.

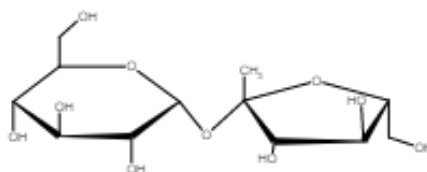
Kyselina glukuronová vzniká v kombuše oxidací glukózy během fermentačního procesu a její komplex s kyselinou máselnou, která je produkována mikrobiálním konsorciem v procesu fermentace, má schopnost posilovat stěny střeva a poskytovat ochranu proti parazitům [30]. GlcUa zlepšuje biologickou dostupnost polyfenolů, a prodlužuje jejich přítomnost v těle, kde aplikují svou antioxidační aktivitu a chrání organismus před nemocemi způsobenými oxidačním stresem [31].

#### 2.2.5 Sacharidy

Sacharidy jsou polyhydroxylové aldehydy nebo ketony. Dělí se dle počtu cukerných jednotek na monosacharidy, oligosacharidy a polysacharidy. V kombuše jsou hnací silou pro fermentaci, která je založená na zkvašování cukrů.

Pro přípravu kombuchy je nezbytný disacharid sacharóza, který je tvořen dvěma cukernými jednotkami, které jsou spojené glykosidickou vazbou (obrázek č. 15). Na počátku fermentace

je hydrolyzována kvasinkami na monosacharidy glukózu a fruktózu, které jsou využity jako zdroj energie bakteriemi při octovém kvašení [32].



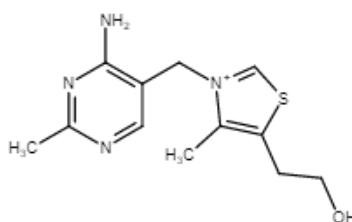
Obrázek 15: Chemická struktura sacharózy

## 2.2.6 Vitamíny

Z vitamínů se v kombuše vyskytují převážně vitamíny rozpustné ve vodě, převážně vitamíny skupiny B (B1, B2, B6, B12) a vitamín C, jehož koncentrace během fermentace roste [33].

### 2.2.6.1 Vitamín B1

Vitamín B1 neboli thiamin (obrázek č.16), je bezbarvá krystalická sloučenina, rozpustná ve vodě a nerozpustná v alkoholu. Tento vitamín byl objeven japonským biochemikem Umetarem Suzuki, který se zabýval léčbou nemoci Beri-beri. Zjistil, že tato nemoc je vyvolána právě nedostatkem vitamínu B1 ve stravě. Tento vitamín hraje klíčovou roli v intracelulárním metabolismu glukózy a předpokládá se, že inhibuje účinek glukózy a inzulínu na proliferaci buněk hladkého svalstva tepen. Napomáhá tělu přeměňovat sacharidy a tuky na energii. Je nezbytný pro normální růst a vývoj a přispívá k udržení správné funkce srdce a nervového a trávicího systému [34].



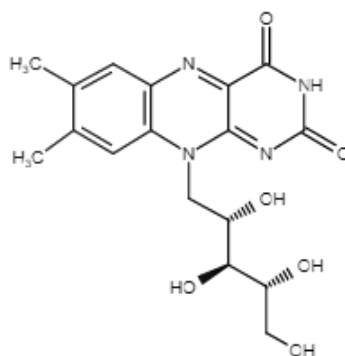
Obrázek 16: Chemická struktura vitamínu B1

### 2.2.6.2 Vitamín B2

Vitamín B2 neboli riboflavin (obrázek č.17), je tepelně stabilní a ve vodě rozpustný flavin. Je prekurzorem koenzymů flavinmononukleotidu a flavinadenindinukleotidu, které jsou životně



důležité pro normální tkáňové dýchání, aktivaci pyridoxinu, konverzi tryptofanu na niacin a detoxikaci zprostředkovanou glutathionreduktázou.

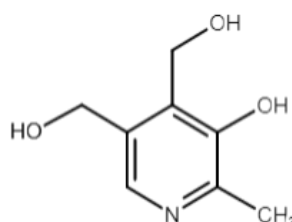


**Obrázek 17: Chemická struktura vitamínu B2**

Stejně jako ostatní vitamíny B podporuje produkci energie tím, že pomáhá při metabolismu tuků, sacharidů a bílkovin. Je nezbytný pro zdravou kůži, nehty, růst vlasů a celkový dobrý zdravotní stav, včetně regulace činnosti štítné žlázy. Také dále napomáhá při prevenci nebo léčbě mnoha typů očních poruch, včetně některých případů šedého zákalu [35].

### 2.2.6.3 Vitamín B6

Vitamín B6 je souhrnné označení pro skupinu tří příbuzných sloučenin: pyridoxin, pyridoxal a pyridoxamin a jejich fosforylované deriváty: pyridoxin 5'-fosfát, pyridoxal 5'-fosfát a pyridoxamin 5'-fosfát. Ačkoli by všech šest těchto sloučenin mělo být technicky označováno jako vitamin B6, termín vitamín B6 se běžně používá zaměnitelně pouze s jednou z nich, a to pyridoxinem (obrázek č. 18) [36].

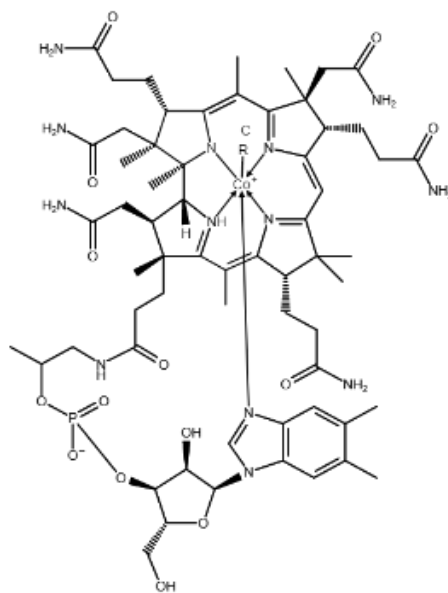


**Obrázek 18: Chemická struktura pyridoxinu**

Dostatečný přísun vitamínu B6 ve stravě by si měli hlídat především sportovci, ženy, které užívají hormonální antikoncepci, osoby trpící celiakií a někteří chronicky nemocní lidé. Větší dávky napomáhají v léčbě chudokrevnosti a při nervových potížích [37].

#### 2.2.6.4 Vitamín B12

Vitamín B12 (kobalamin), je esenciální vitamín, který ve své struktuře obsahuje kobalt (obrázek č. 19). Je přirozeně produkován bakteriemi a je nezbytný pro syntézu DNA a produkci buněčné energie, používá se při léčbě perniciózní anémie, snižuje riziko vzniku srdečních chorob a zlepšuje paměť [38]. Kobalaminu se vyskytuje několik forem, přičemž kyanokobalamin je méně aktivní než metylkobalamin, ale díky jeho nízké ceně je nejrozšířenější formou kobalaminu ve výživových a potravinových doplňcích a lécích.

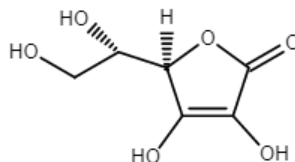


Obrázek 19: Chemická struktura vitamínu B12

#### 2.2.6.5 Vitamín C

Vitamín C neboli kyselina L-askorbová (obrázek č. 20) je jedním z nejznámějších vitamínů s antioxidačními účinky. Je to esenciální mikroživina s mnoha důležitými biologickými funkcemi a kofaktorem pro biosyntézu kolagenu, karnitinu, neurotransmiterů a peptidových hormonů. Má antikatabolický účinek a také urychluje regeneraci svalů. Díky antioxidačním vlastnostem inhibuje volné radikály, čímž bojuje proti nemocem způsobenými oxidačním stresem, jako je rakovina, srdeční choroby, šedý zákal či artritida.

Doporučená denní dávka vitamínu C je přibližně v rozmezí 75-90 mg pro dospělého zdravého muže i ženu.



**Obrázek 20: Chemická struktura vitamínu C**

Strava s vysokým obsahem vitamínu C je založena převážně na ovoci nebo jejich šťávách (třešeň, pomeranč, ananas, mango, mučenka, citrón). Dále je obsažen v zelené a červené paprice, rajčatech, brokolici a listové zelenině, jako je např. špenát [39]. V kombuše je obsažen ve vysokém množství a v průběhu fermentace kontinuálně roste [33].

### **2.2.7 Minerální látky**

Kombucha obsahuje řadu minerálních látek, například měď, železo, mangan, nikl a zinek, přičemž se jejich koncentrace v průběhu fermentace zvyšuje [3]. Dále jsou v nápoji přítomny fluoridy, chloridy, bromidy, jodidy, dusičnany, fosfáty a sírany. Z těchto aniontů jsou v nejvyšší koncentraci obsaženy fluoridy [40].

### **2.2.8 Enzymy**

Enzymy jsou proteiny, které katalyzují procesy látkové výměny probíhající v buňce a bez kterých by tyto procesy ani neprobíhaly. Enzymy, které jsou obsaženy v kombuše díky přidavku SCOBY, se účastní štěpení výživových látek, a tím podporují správnou funkci trávicího traktu.

Polyfenolické látky v čaji jsou mikrobiálními enzymy rozkládány na menší fenolické látky v biofilmu tvořeném bakteriemi a kvasinkami během fermentace a tím stoupá celková antioxidační aktivita kvašeného nápoje [41].

## **3 ÚČINKY KOMBUCHY NA LIDSKÉ ZDRAVÍ**

### **3.1 Antioxidační aktivita**

Antioxidant je látka, která zpomaluje nebo inhibuje oxidaci substrátu i ve velmi nízkých koncentracích. Volné radikály v těle vznikají při oxidačních reakcích a mají schopnost spustit několikanásobné řetězové reakce, které mohou vést k poškození nebo až k smrti postižené buňky. Když se antioxidant dostane do kontaktu s volnými radikály, získají schopnost se samy oxidovat a inhibovat další oxidační reakce, které vedou ke škodlivým řetězovým reakcím. Oxidační stres a nadbytek volných radikálů vede ke vzniku mnoha lidských onemocnění, jako je Parkinsonova choroba, kardiovaskulární onemocnění, rakovina a předčasné stárnutí [42; 14; 43].

Během fermentace kombuchy se ze samotných čajových lístků uvolňuje mnoho sloučenin s antioxidačními účinky, především se jedná o fenolické sloučeniny, z nichž nejvíce zastoupenou skupinou jsou katechiny, které tvoří asi 30 % celkové suché hmotnosti čerstvých čajových lístků [33; 2; 43].

### **3.2 Antimikrobiální aktivita**

O kombuše je známo, že vykazuje také antimikrobiální aktivitu proti široké škále mikroorganismů, přičemž antimikrobiální aktivita kombuchy připravené ze zeleného čaje je vyšší než z černého čaje [44]. Na toto téma bylo provedeno mnoho vědeckých studií a byla prokázána inhibiční aktivita jejího nálevu proti mnoha patogenním mikroorganismům jak grampozitivního, tak gramnegativního původu [30].

Antimikrobiální aktivita kombuchy je připisována nízké hodnotě pH, díky přítomnosti kyseliny octové a řady dalších organických kyselin. Navíc kyselina octová a rovněž i katechiny, které jsou v nápoji obsaženy, inhibují řadu grampozitivních a gramnegativních mikroorganismů.

Některé studie prokázaly, že vykazuje nejen antibakteriální aktivitu, ale i aktivitu antifungální, která je připisována rovněž kyselině octové. Dále bylo prokázáno, že kombucha může obsahovat i látky s antibiotickými účinky [45].

### 3.3 Detoxikační účinky

Detoxikace je komplexní proces odstraňování toxických látek z lidského těla, který je prováděn především játry. Enzymy, bakteriální kyseliny a další sekundární metabolity produkované mikroorganismy během fermentačního procesu, prokázaly schopnost detoxikace lidského organismu [11].

Proto začleněním tohoto nápoje, či jiných fermentovaných výrobků, do jídelníčku může vést ke snížení detoxikační zátěže na játra. To je způsobeno především schopností kyseliny glukuronové vázat se s toxickými molekulami, které vstupují do těla, a také schopností zvýšit vylučování těchto molekul pomocí ledvin a střev [46].

### 3.4 Probiotické účinky

Probiotika jsou živé mikroorganismy, které mohou mít pozitivní vliv na zdraví, pokud jsou podávány v přiměřeném množství. Nejčastěji je bakteriální složka probiotické směsi tvořena z *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* anebo směsi těchto dvou kmenů, ve které může být také několik běžných typů kvasinek, jako je *Saccharomyces boulardii* a *S. cerevisiae*. Probiotické mikroorganismy posilují imunitní systém, pomáhají zlepšit trávení, bojují proti přemnožení škodlivých bakterií a napomáhají v boji proti úzkosti a depresi [9].

Mnoho studií potvrdilo, že kombucha je nejen probiotikum, ale také symbiotikum (kombinace prebiotik a probiotik). Prebiotikum selektivně napomáhá růstu a aktivitě konsorcia prospěšných mikrobů přítomných v lidském střevě. Bakterie a kvasinky přítomné v tomto nápoji působí jako probiotika a přítomná mikrocelulóza může pomoci při růstu prospěšných mikrobů přítomných ve střevě [47].

### 3.5 Protirakovinné účinky

Díky přítomnosti čajových polyfenolů a sekundárních metabolitů produkovaných během fermentačního procesu má kombucha protirakovinné účinky. Čajové polyfenoly inhibují genové mutace či proliferaci rakovinných buněk a mají schopnost ukončit metastázy. Konzumace kombuchy může pomoci pacientům s rakovinou znovu vyrovnat pH krve, které se v průběhu nemoci obvykle zvyšuje. Mnoho sloučenin, které byly identifikovány v nápoji, jako jsou např. polyfenoly, kyselina glukonová, glukuronová, mléčná a také vitamín C mají schopnost snižovat výskyt rakoviny žaludku [11].

### 3.6 Jiné terapeutické účinky

Bylo provedeno i několik studií kde se ukázalo, že kombucha vykazuje hepatoprotektivní aktivitu. Přičemž hepatoprotekce je schopnost zabránit poškození jater toxickými látkami [48; 49].

Kombucha připravená z černého čaje projevila pozitivní vliv na rychlost tvorby pojivové tkáně a krevních kapilár v oblasti poranění a také na snížení infekcí u potkanů Wistar albino. [50]

### 3.7 Nežádoucí účinky

Je známo několik případů, kdy měla konzumace kombuchy nežádoucí účinky na lidské zdraví. Nejčastějšími případy jsou alergické reakce u lidí, kteří jsou velmi citliví na kyseliny, dále nevolnost, dušnost, bolesti hlavy a závratě. U těchto případů se ale neprokázalo, zda jsou tyto příznaky způsobeny toxiny, které se vyskytují pouze v konkrétní šarži [4].

Velmi nízké pH nápoje způsobené fermentací může vést k vyluhování některých chemických kontaminantů z fermentační nádoby. Existují důkazy o těžké otravě olovem způsobené pravidelnou konzumací kombuchy, která fermentovala v keramické nádobě. Většina keramiky obsahuje velmi nízké množství olova, což nepředstavuje žádné nebezpečí. Pokud je však v těchto nádobách po delší dobu kyselý nápoj, může dojít k chemickým reakcím a následnému uvolnění velkého množství olova. Z toho důvodu je velmi důležité při fermentaci používat skleněné nádoby [12].

Především u domácího pěstování kombuchy, kdy se kombucha předává z jednoho domu do druhého, může nastat kontaminace patogenními bakteriemi a plísněmi. Proto je potřeba věnovat pozornost neobvyklému vývoji zápachu nebo barevné změně čaje, aby se předešlo nežádoucím účinkům konzumací kontaminovaného výrobku. U domácí kombuchy může dojít ke kontaminaci plísněmi, především druhy *Penicillium* a *Aspergillus*, které mají toxické a karcinogenní účinky [4]. V nápoji fermentovaném za nehygienických podmínek může dojít k výskytu *Bacillus anthrax* [51]. Možnost nakažení toxiny je vyšší, když se nápoj konzumuje ve velkém množství. Proto je důležité být obezřetný při podávání kombuchy jedincům s oslabenou imunitou nebo u těhotných a kojících žen [52].

Používání čistého a dezinfikovaného nádobí při přípravě kombuchy je tedy klíčový parametr z zabránění kontaminace produktu. [13].

## 4 STANOVENÍ BIOLOGICKY AKTIVNÍCH LÁTEK V KOMBUŠE

V současnosti je většina biologicky aktivních látek obsažených v kombuše stanovena především pomocí vysokoučinné kapalinové chromatografie (HPLC) ve spojení se spektrofotometrickým detektorem [53]. Pro stanovení aniontů (fluoridů, chloridů, bromidů, jodidů, dusičnanů, fosforečnanů a síranů) je zpravidla využíván iontový chromatograf s konduktometrickou detekcí [40].

Biologicky aktivní látky se stanovují buď bez předchozí úpravy, pouhým naředěním kombuchy, nebo se před samotnou analýzou provádí izolace sledovaných analytů z matrice jednou z dostupných extrakčních technik.

### 4.1 Extrakce

Extrakce je základní analytická separační metoda, při které dochází k oddělení analytu od ostatních složek analyzované látky. V průběhu této metody přechází analyt z jedné fáze do druhé a to, z kapaliny do kapaliny nebo z tuhé fáze do kapalné. [54; 55].

#### 4.1.1 Extrakce kapalina-kapalina

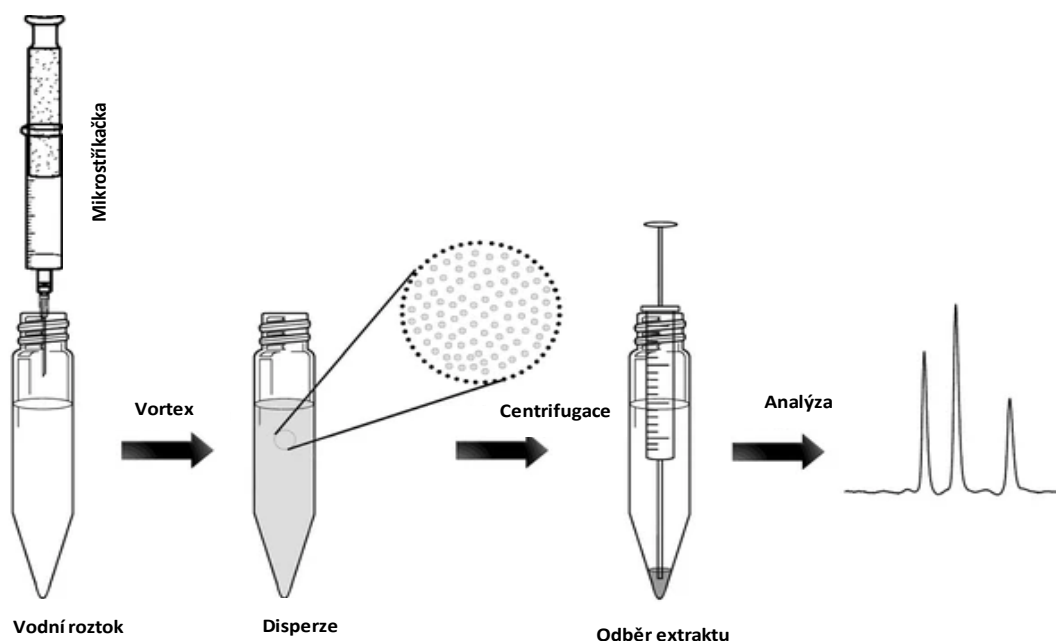
Tato separační metoda je jednou z nejstarších technik využívaných pro izolaci analytů v analytické chemii. Požadovaná látka nebo skupina látek přechází z jedné kapalné fáze do druhé, přičemž tyto dvě fáze jsou navzájem nemísitelné. Zpravidla se tento typ extrakce používá u vodných roztoků, ze kterých se látky extrahují vhodným s vodou nemísitelným organickým rozpouštědlem. Tato tradiční separační technika je stále využívána i přes řadu nevýhod, jako např. velké množství rozpouštědel (ve většině případů toxických) nebo častá tvorba emulzí. Avšak při zvolení vhodného extrakčního činidla je tato metoda vysoce účinná [54].

#### 4.1.2 Disperzní kapalinová mikroextrakce

Disperzní kapalinová mikroextrakce (DLLME), jejíž jednotlivé kroky jsou zobrazeny na obrázku č. 21, je nová, účinná a jednoduchá metoda s vysokou výtěžností a s krátkou dobou extrakce, která se používá ke stanovení široké škály organických a anorganických sloučenin. Při DLLME se využívá tvorba disperze extrakčního rozpouštědla ve vodném roztoku vzorku,

kteřá je podpořena použitím disperzního rozpouštědla. Následně je roztok odstředěn, čímž dochází k rozrušení disperze a oddělení rozpouštědel [54].

Tato metoda byla využita k extrakci xenobiotických kontaminantů (alkylfenolů, bisfenolů a alkylfenoletoxylátů) v kombuše [56], jejich přítomnost však prokázána nebyla.



Obrázek 21: Jednotlivé kroky disperzní kapalinové mikroextrakce [46]

## 4.2 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) je analytická separační metoda, která se využívá k separaci široké škály analytů. V průběhu analýzy dochází k distribuci látek mezi mobilní a stacionární fází v závislosti na afinitě analytu k dané fázi. Látky s nízkou afinitou ke stacionární fázi jsou zadržovány méně a jsou eluovány dříve, zatímco látky s vysokou afinitou jsou zadržovány déle a elují tak později. Dle relativní polaritě stacionární a mobilní fáze se fázové systémy HPLC dělí na systémy s normálními fázemi (polární sorbent, méně polární mobilní fáze) a systémy s obrácenými fázemi (nepolární sorbent, polární mobilní fáze). Další méně běžný fázový systém je iontově výměnná chromatografie [57].

### 4.2.1 Chromatografické kolony

V analytické chemii jsou využívány kolony o délce 50–250 mm s vnitřním průměrem 2 - 4,6 mm. U přírodních vzorků se složitější matricí, které obsahují velké množství různých látek



se před kolonu většinou zařazuje předkolumna. Její cena je oproti separační koloně nižší a jejím použitím a včasnou výměnou chráníme dražší separační kolonu. Kolony pro kapalinovou chromatografii jsou v současnosti plněny porézními nebo povrchově porézními sorbenty s velikostí zrn 2–7  $\mu\text{m}$  [58].

## **4.2.2 Detektory**

Mezi nejběžnější detektory používané u HPLC se řadí spektrofotometrický detektor, dále je možné využít fluorescenční, konduktometrický, refraktometrický, coulometrický detektor či detektor rozptylu světla. Stále častěji se pro separaci biologicky aktivních látek využívá spojení s hmotnostním spektrometrem [58].

### **4.2.2.1 Spektrofotometrický detektor**

V kolonové chromatografii je nejvíce rozšířen spektrofotometrický detektor. Eluent vytéká z kolony do měrné cely. Přístroj je vybaven deuteriovou výbojkou a mřížkovým monochromátorem. Pracuje při vlnové délce 220-600nm. Jednou z jeho nevýhod je neschopnost zaznamenávat složky, které neabsorbují UV záření. Moderní přístroje jsou vybaveny spektrofotometrickými detektory s proměnlivou a programově měnitelnou vlnovou délkou tzv. diode array detektorem, schopným proměřit celé UV/VIS spektrum složky, kde získaná informace je kvalitativním údajem o stanovované složce [57].

### **4.2.2.2 Fluorescenční detektor**

Fluorescenční detektor je založen na měření emisního záření, které látka vydává po absorpci primárního excitačního záření. U těchto detektorů se jako zdroj záření využívají rtuťové či xenonové výbojky nebo deuteriové lampy. Pro výběr vhodné vlnové délky excitačního a emisního záření lze využít interferenční filtr nebo u dražších přístrojů monochromátor. U monochromátoru lze tyto vlnové délky současně programovat v průběhu eluce za účelem dosažení maximální citlivosti, což je největší předností tohoto detektoru společně s jeho značnou selektivitou [57].

### **4.2.2.3 Konduktometrický detektor**

Konduktometrický detektor zaznamenává elektrickou vodivost eluátu v průtokové cele mezi dvěma elektrodami, které jsou napájeny střídavým napětím, za účelem zabránění jejich polarizace. Uplatňují se nejvíce v iontové chromatografii, kdy se používají kolony plněné

ionexy s nízkou kapacitou, které umožňují použití mobilní fáze s nízkým obsahem elektrolytů. [57].

### **4.3 Iontově výměnná chromatografie**

Je to analytická metoda určena pro separaci iontů a nabitých částic. Pokud nedojde k uplatnění jiných separačních mechanismů, tak částice bez náboje procházejí kolonou bez jakéhokoliv zadržení. K separaci dochází na měničích iontů, které mají na svém povrchu vázané iontové skupiny s protiionty. Separovány a vyměňovány mohou být záporné i kladné ionty v závislosti na použité stacionární fázi – katex nebo anex.

Základem stacionárních fází je nosič např. porézní silikagel nebo tuhá částice na bázi styrendivinylnbenzenového kopolymeru. Na něm jsou chemicky vázaná iontová místa, která s sebou nesou i příslušný protiiont. Iontové měniče se rozdělují na silně/slabě kyselé katexy nebo na silně/slabě zásadité anexy. Pokud jsou navázány sulfonové kyseliny jedná se o silný katex, pokud karboxylové kyseliny je to slabý katex. Silně bazický anex obsahuje jako funkční skupinu kvarterní dusíkatou bázi, slabě bazické anexy obsahují primární nebo sekundární amin.

Mobilní fáze jsou zpravidla tvořeny vodným roztokem kyselin, zásad nebo solí a jsou charakterizovány koncentrací iontů a jejich nábojem. Ionty s větším nábojem jsou zadržovány více než ionty s nábojem menším. Pokud jsou náboje stejné, větší retenci má iont s větší hmotností. U iontově výměnné chromatografie se k detekci využívá konduktometrický detektor, který je tvořený dvěma elektrodami napájenými střídavým napětím a který registruje změny vodivosti eluentu. Při separaci kladných iontů lze k eluci využít HCl a při separaci záporných iontů se jako mobilní fáze používá roztok  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  či  $\text{NaHCO}_3$  [57].

### **4.4 Stanovení polyfenolů**

Čajové katechiny jsou velkou skupinou bioaktivních látek obsažených v kombuše. Jejich analýza se provádí zpravidla pomocí HPLC v systémech s obrácenými fázemi kde jako stacionární fáze se používá chemicky vázaný oktadecylsilikagel a jako mobilní fáze směs kyseliny ortofosforečné a acetonitrilu [46]. Čajové polyfenoly jsou většinou detekovány spektrofotometricky při vlnové délce 280 nm. Kvantifikace se nejčastěji provádí metodou vnějšího standardu pomocí kalibračních závislostí.

Izomery epikatechinu byly degradovány až do 9. dne fermentace a 12. den byl pozorován výrazný nárůst. Obsah EGC a EC byl 12. den vyšší než počáteční koncentrace. Biotransformace EGCG na EGC a ECG na EC enzymy vylučovanými mikroorganismy v kultuře kombuchy a uvolňování katechinů z buněk citlivých na kyseliny by mohly být důvodem zvýšené koncentrace čajových polyfenolů 12. den fermentace. Tato studie odhalila možnost využití čajového odpadního materiálu pro výrobu čajového nápoje kombucha [46]

Celkové množství fenolických sloučenin v kombuše se může stanovit spektrofotometrickou metodou s využitím Folin–Ciocalteu činidla, které v prostředí uhličitanu sodného reaguje za vzniku modrého komplexu, jehož absorbance se měří při 760 nm. Celkový obsah fenolických sloučenin se vyjadřuje jako ekvivalentní množství kyseliny gallové a zvyšuje se s dobou fermentace [2], avšak komplexní fenolické sloučeniny v čajových nálevech mohou podléhat degradaci v kyselém prostředí kombuchy a enzymy uvolňovanými ze SCOBY [2].

#### **4.5 Stanovení organických kyselin a kofeinu**

K analýze organických kyselin, jako jsou kyseliny D-glukuronová, octová, mléčná a citrónová, lze využít HPLC v systémech s obrácenými fázemi se spektrofotometrickou detekcí při 210 nm [46]. Pro analýzu se jako stacionární fáze používá chemicky vázaný oktadecylsilikagel a jako mobilní fáze směs  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  a methanolu. Kyselina octová a kyselina glukuronová dosahují maximální koncentrace 15. den fermentace v kombuše připravené ze zeleného čaje (GTK) a 12. den v kombuše připravené z černého čaje (BTK) [53].

V jiné studii se ukázalo, že koncentrace kyseliny octové se lineárně zvyšuje jako funkce doby fermentace a dosahuje maximální hodnoty 21. den z 21denního období fermentace [53].

Koncentrace kofeinu v kombuše se také stanovuje pomocí HPLC v systémech s obrácenými fázemi s využitím spektrofotometrického detektoru (273 nm). Pro separaci se opět využívá chemicky vázaný oktadecylsilikagel a k eluci se využívá gradientová eluce s mobilní fází 0,1 %  $\text{H}_3\text{PO}_4$  v  $\text{H}_2\text{O}$  [53].

V důsledku zvýšené koncentrace organických kyselin produkovaných během fermentačního procesu bakteriemi a kvasinkami ze SCOBY se hodnota pH snižuje z 5,0 na 3,0. Fermentační bujón má zjevně určitou pufrovací kapacitu. Během fermentačního procesu se  $\text{CO}_2$  uvolňuje nejprve pomalu a mnohem rychleji po 2–3 dnech. Získaný vodný roztok oxidu uhličitého disociuje a vytváří  $\text{HCO}_3^-$ , který snadno reaguje s  $\text{H}^+$  z organických kyselin, zabraňuje dalším

změněnám koncentrace  $H^+$  a přispívá k pufráčnickému charakteru systému. To je důvod pro mírné snížení pH po 3 dnech [2].

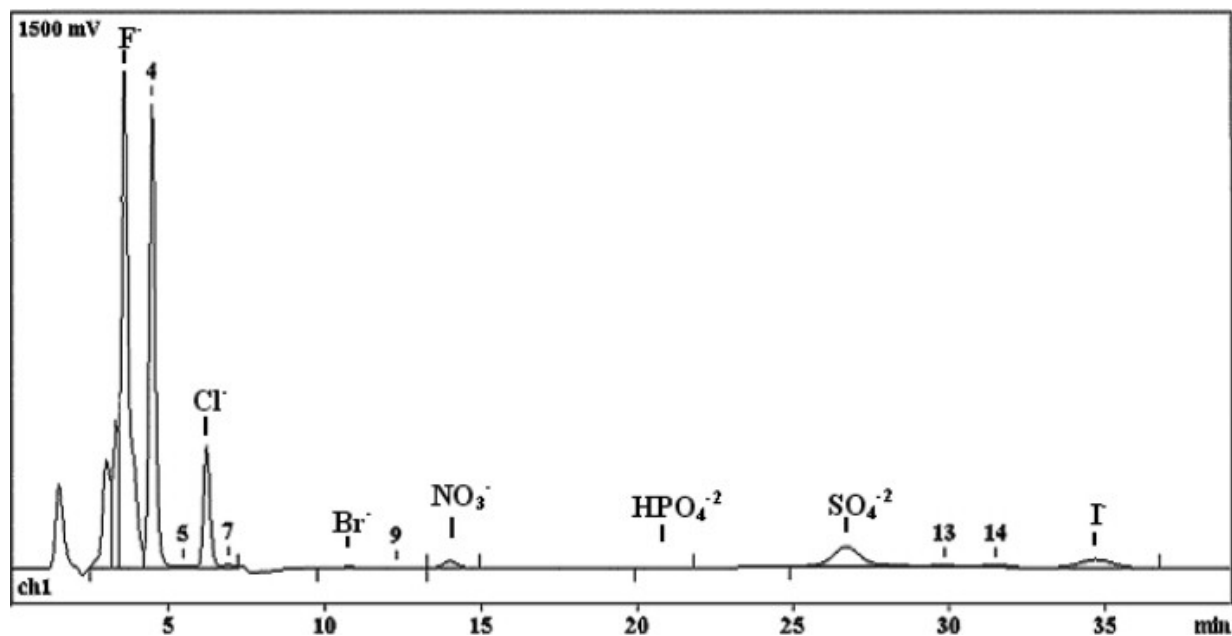
#### 4.6 Stanovení minerálů

Minerály jsou anorganické látky potřebné v malých množstvích pro správný chod organismu. Jak již bylo řečeno kombucha obsahuje řadu z nich, například měď, železo, mangan, nikl a zinek. Dále jsou v nápoji přítomny anorganické anionty jako fluoridy, chloridy, bromidy, jodidy, dusičnany, fosfáty a sírany.

Stanovení minerálů ve SCOBY (celulózném biofilmu) je založeno na analýze popela, získaného suchým zpopelněním při 400°C. Klasická forma suchého rozkladu probíhá za atmosférického tlaku a v otevřeném systému. Tento druh rozkladu je jednoduchý, finančně nenáročný a umožňuje rozkládat větší množství vzorků současně. Nutričně a toxikologicky významné minerální prvky (Cu, Fe, Cd, Co, Mn, Ni, Pb, Cr a Zn) obsažené v celulózném biofilmu kombuchy byly po rozkladu stanoveny atomovou absorpční spektrometrií. Obsah minerálů (Cu, Fe, Mn, Ni a Zn) nezbytných pro normální fyziologické procesy v organismu se zvyšuje v důsledku fermentace. Dále jsou v nápoji obsaženy prvky jako kobalt a chrom. Ke zvýšení obsahu kobaltu v nápoji nedochází pravděpodobně kvůli jeho začlenění do vitamínu B12, přítomnost kadmia v kombuše zjištěna nebyla [59].

Pro stanovení aniontů v kvašeném nápoji se využívá iontová chromatografie s konduktometrickým detektorem a separace aniontů je prováděna v supresorovém režimu na analytické koloně zapojené do série s ochrannou kolonou. Tato metoda je jednoduchá, rychlá a přesná pro kvantitativní stanovení fluoridů, bromidů, jodidů, dusičnanů, fosforečnanů a síranů. Jako mobilní fázi lze využít roztok obsahující směs uhličitanu a hydrogenuhličitanu sodného. Pro srovnávací účely lze fluor stanovit fluoridovou iontově selektivní elektrodou [40]. Hlavní charakteristickou složkou čaje jsou polyfenoly, kofein a organické kyseliny, které při stanovení aniontů mohou způsobovat řadu problémů, jako je kontaminace kolony, špatné rozlišení a snížení citlivosti. K odstranění těchto rušivých látek byl vyvinut jednoduchý a rychlý postup využívající komerčně dostupné kazety On Guard-P a On Guard-RP, které mají velmi vysokou selektivitu pro fenolické a jiné aromatické sloučeniny (On Guard-P) a dále pro uhlovodíky, karboxylové kyseliny a další hydrofobní složky (On Guard-RP). Navržená metoda má oproti jiným metodám několik výhod. Je možné stanovit všechny aniontové minerály současně s desetinásobně nižšími detekčními limity a lepším rozlišením. Anionty

identifikované v kombuše byly fluorid, chlorid, bromid, jodid, dusičnan, fosfát a síran. Přičemž jodid má velmi vysokou afinitu k aneksu, a proto je z kolony eluován jako poslední což je vidět na obrázku č.22, kde je znázorněn chromatografický záznam separace aniontů přítomných v kombuše [40].



Obrázek 22: HPLC chromatogram aniontů kombuchy [43]

#### 4.7 Stanovení vitamínů rozpustných ve vodě

Vitamíny rozpustné ve vodě (B1, B6, B12 a C) se v kombuše dají separovat Stahlovou metodou pomocí vzestupné chromatografie na tenké vrstvě na silikagelové desce za použití vody jako vyvíjecího rozpouštědla. Vizualizace separovaných látek se provádí pod UV světlem [59]. Pomocí této metody byl stanoven vitamín B1 (0,74 mg ml<sup>-1</sup>), vitamín B6 (0,52 mg ml<sup>-1</sup>), vitamín B12 (0,84 mg ml<sup>-1</sup>) a vitamín C (1,51 mg ml<sup>-1</sup>). Po fermentaci dochází ke zvýšení obsahu vitamínů hodnot oproti stavu před fermentací, což znamená, že fermentační proces zvyšuje obsah vitamínů rozpustných ve vodě, a to činí z nápoje kombucha vynikající prostředek pro zlepšení zdraví člověka [59].

## 4.8 Stanovení antioxidační aktivity

Pro stanovení antioxidační aktivity existuje mnoho metod, které lze rozdělit do dvou základních kategorií na metody založené na eliminaci radikálů a metody založené na hodnocení redoxních vlastností látek [60].

### 4.8.1 Metody stanovení antioxidační aktivity založené na eliminaci radikálů

Tyto metody jsou založené na hodnocení schopnosti testovaného vzorku vychytávat volné radikály, které mohou v reakční směsi vznikat nebo do ní mohou být v průběhu reakce přidávány. Jedná se o kyslíkové (hydroxyl, peroxy, superoxidový anion-radikál) nebo syntetické stabilní radikály (DPPH, ABTS, galvinoxyl) [60].

#### 4.8.1.1 Metoda využívající DPPH

Metoda DPPH je řazena mezi nejjednodušší metody pro stanovení antioxidační aktivity v potravinách. Spočívá v reakci testované látky se stabilním dusíkovým radikálem difenylpicrylhydrazylem (DPPH<sup>•</sup>) za současné redukce na DPPH-H. Tato reakce je sledována spektrofotometricky a pokles absorbance je měřen při vlnové délce 515-517 nm, která odpovídá absorpčnímu maximu DPPH radikálu v metanolu. Původně fialový roztok DPPH se vlivem reakce s látkami s antioxidačními účinky odbarvuje až na žlutě zbarvený zcela redukovaný roztok DPPH. Úbytek absorbance v procentech se zpravidla přepočítává a vyjadřuje se jako ekvivalent standardu Trolox nebo kyseliny askorbové. Ke sledování reakce lze kromě spektrofotometrie využít metodu elektronové spinové rezonance nebo HPLC [33; 2; 60].

#### 4.8.1.2 ABTS metoda

Tato metoda je nejčastěji používanou spektrofotometrickou metodou pro stanovení antioxidační aktivity. Je založena na schopnosti antioxidantů pohlcovat volné radikálové kationty ABTS<sup>•+</sup> (2,2'-azinobis(3-ethyl-2,3-dihydrobenzothiazol-6-sulfonát)). Často se označuje jako metoda TEAC (Trolox equivalent antioxidant capacity), jelikož výsledná antioxidační aktivita je vyjádřena jako ekvivalentní množství standardu Trolox. Reakce antioxidantů s radikálovým kationtem ABTS je sledována opět spektrofotometricky při vlnové délce 734 nm, kdy původně zbarvený zelený roztok se působením antioxidantů odbarvuje [14; 60].

#### **4.8.1.3 ORAC metoda**

Během testu ORAC (oxygen radical absorbance capacity) se generují kyslíkové radikály, kdy je měřena schopnost látky zpomalit či úplně ukončit radikálovou reakci neboli schopnost chránit protein před poškozením peroxylovými radikály. Pro vygenerování peroxylových radikálů lze použít AAPH (2,2'-azobis(isobutyrimidamid)-dihydro-chlorid), a pro hydroxylové radikály pak  $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Cu}^{2+}$ . Detekuje se úbytek fluorescence  $\beta$ -fykoerytrinu po ataku radikály [60].

#### **4.8.1.4 Metoda založená na vychytávání OH radikálů**

Při metodě založené na vychytávání  $\text{OH}^\bullet$  jsou tyto radikály generovány několika postupy a to UV fotolýzou peroxidu vodíku nebo syntetických derivátů a Fentonovou reakcí. Detekce je založena na vychytávání radikálů látkami, jejichž reakční produkty lze snadno stanovit. Antioxidanty vychytávající  $\text{OH}^\bullet$  snižují tvorbu těchto produktů. Jeden způsob je vychytávání radikálů kyselinou salicylovou. Vznikají hydroxylované produkty této kyseliny, jejichž detekce a kvantifikace se provádí pomocí HPLC se spektrofotometrickou detekcí [60].

#### **4.8.1.5 Metoda využívající galvinoxyl**

Metoda využívající galvinoxyl je další spektrofotometrická metoda, která je založená na podobném principu jako DPPH metoda. Při této metodě dochází k redukci stabilního radikálu galvinoxylu látkami, tím, že poskytují vodík. Reakce je sledována spektrofotometricky při vlnové délce 428 nm [60].

### **4.8.2 Metody založené na hodnocení redoxních vlastností látek**

U těchto metod mohou být neenzymové antioxidanty charakterizovány jako redukční činidla, která redukují vhodná činidla a tím je inaktivují.

#### **4.8.2.1 FRAP metoda**

Metoda FRAP (ferric reducing antioxidant potential) je právě založena na principu redoxní reakce. Antioxidanty při této metodě redukují ze vzorku komplexy železitých iontů s TPTZ (2,4,6-tri(2-pyridyl-1,3,5-triazin) a monitoruje se nárůst absorbance při 593 nm odpovídající vznikajícímu komplexu  $\text{Fe}^{2+}$ -TPTZ. Tato metoda popisuje schopnost vzorku redukovat iont

$\text{Fe}^{3+}$  a vždy nesouhlasí s výsledky ostatních metod pro stanovení celkové antioxidační aktivity vzorku [60].

#### 4.9 Příklady stanovení antioxidační aktivity

Antioxidační aktivita kombuchy připravené z různých zdrojů byla testována pomocí ABTS a dalších metod, jako DPPH a inhibice peroxidace kyseliny linolové, přičemž antioxidační vlastnosti kombuchy byly po fermentaci zvýšeny [14]. Celkový obsah fenolických látek byl po fermentaci zvýšen až na 98 %, což naznačovalo, že thearubigin může být během fermentace podroben biologické degradaci, která vede k uvolňování menších molekul s vyšší antioxidační aktivitou [14].

U kombuchy byl maximální nárůst vychytávání DPPH radikálů pozorován 3. den fermentace s pozoruhodným poklesem 6. den. Po 6. dni se schopnost vychytávání DPPH dále zvyšovala až do 18. dne. Zelený čaj vykazoval nejvyšší schopnost vychytávání DPPH (88 %) 18. den fermentace [2]. Tato studie prokázala, že čaj kombucha připravený ze zeleného čaje, černého čaje a čajového odpadu má vynikající antioxidační účinky. Rozsah aktivity závisí na době fermentace, typu čajového materiálu a mikrobiálním složením kultury kombuchy [2]

Maximální vychytávací efekt  $\text{OH}^{\bullet}$  byl pozorován 3. den fermentace u GTK (67,7 %), BTK (60,5 %) a kombuchy připravené z čajového odpadu (TWK) (46,9 %). Zdá se, že schopnost kombuchového čaje zhaset  $\text{OH}^{\bullet}$  přímo souvisí s prevencí šíření procesu peroxidace lipidů. Je dobrým lapačem aktivních forem kyslíku, čímž snižuje rychlost řetězové reakce [2]

U kombuchy byl dále zjištěn vliv rozdílných startovacích kultur na antioxidační aktivitu vůči DPPH radikálům a  $\text{OH}^{\bullet}$  [33]. Celkem byly studovány tři startovací kultury - smíšená kultura *AAB* a *Zygosaccharomyces sp.* (SC1), smíšená kultura *AAB* a *Saccharomyces cerevisiae* (SC2) a domácí místní kombucha. Nápoj kombucha z černého čaji prokázal nejvyšší antioxidační aktivitu vůči oběma typům radikálů se startovací kulturou SC1, zatímco nápoj ze zeleného čaje vykazoval nejvyšší aktivitu s domácí kombuchou. Hlavní důvod rozdílných antioxidačních aktivit, kromě složení čaje, byl připisován rozdílné produkci vitamínu C a organických kyselin [33].

Fenolické sloučeniny, které se vyskytují v kombuše ve vysokém množství, jsou antioxidanty na vysoké úrovni, protože mají schopnost vychytávat volné radikály a aktivní formy kyslíku, jako je singletový kyslík, superoxidové volné radikály a  $\text{OH}^{\bullet}$  [2].



## 4.10 Stanovení antimikrobiální aktivity

### 4.10.1 Disková difúzní metoda

Disková difúzní metoda (obrázek č. 23) se používá pro vyšetření citlivosti u rychle rostoucích a nenáročných bakterií. Hodnocení se provádí na základě měření rozměrů inhibičních zón okolo disků s antimikrobiální látkou a dle jejich velikosti jsou vyšetřované kmeny mikroorganismů zařazeny do kategorií: citlivý nebo rezistentní k jednotlivým antimikrobiálním látkám [61].



Obrázek 23: Disková difúzní metoda [56]

Pro sledování růstu bakterií produkujících kyselinu octovou obsažených v kombuše byly tekuté vzorky nanесeny na WL živný agar, pro počítání kvasinek byly stejné vzorky nanесeny na médium OGYA (agar s oxytetracyklinem a glukózou a kvasinkovým extraktem) obsahujícím oxytetracyklin. Vzorky byly také analyzovány na přítomnost bakterií jiných než bakterií produkujících kyselinu octovou nanесením vzorků na misky s médiem TSA (trypton sojový agar) [62].

Cílové kmeny byly *Staphylococcus aureus*, *Shigella sonnei*, *Escherichia coli*, *Aeromonas hydrophila*, *Yersinia enterocolitica*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus epidermidis*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium*, *Bacillus cereus* a *Listeria monocytogenes*, které byly kultivovány na TSB (trypton sojový bujón) médiu. *Zygosaccharomyces bailii* a *Candida albicans* byly kultivovány na médiu OGYA. *Helicobacter pylori* a *Campylobacter jejuni* byly kultivovány na HIBA (bujón pro srdeční infuzi) [62].

Antimikrobiální aktivita u kombuchy byla prokázána agarovým difúzním testem. Vzorky nefermentovaného čaje neměly téměř žádnou antimikrobiální aktivitu proti cílovým mikroorganismům kromě *Cm. jejuni*. Kyselina octová byla inhibiční vůči všem bakteriím, ale ne kvasinkám. Ve skutečnosti kyselina octová vykazovala stejnou inhibici jako kombucha vůči 10 ze 14 bakterií. V dalších čtyřech případech (*E. coli*, *Sal. enteritidis*, *Sal. typhimurium*

a *Sh. sonnei*) měla kombucha nejsilnější antimikrobiální účinky, které se projevily také při pH 7,0 a po zahřátí. Kromě toho, ačkoli kyselina octová neměla žádný inhibiční účinek na kvasinky, kombucha inhibovala růst *Cn. albicans*. Tato zjištění tedy naznačují přítomnost antimikrobiální sloučeniny jiné než kyselina octová, velké proteiny a katechiny v kombuše. Antimikrobiální aktivita se zvyšovala s dobou fermentace ve všech testovaných případech kromě *Cm. jejuni* a *Z. bailii*. To také znamená, že aktivní antimikrobiální složky jsou velmi pravděpodobně metabolity produkované bakteriemi anebo kvasinkami odpovědnými za fermentaci kombuchy [62].

#### 4.10.2 Agarová diluční metoda

Agarová diluční metoda je určena ke stanovení nejnižší testované koncentrace daného antibiotika MIC (minimální inhibiční koncentrace), která inhibuje viditelný růst mikroorganismu. Jako živné médium se používá Mueller-Hinton agar obohacený o testovanou antimikrobiální látku, který necháme inkubovat a následně odečteme pro každý testovaný bakteriální kmen hodnotu MIC [61].

#### 4.10.3 E-test

E-test (obrázek č.24) je moderní metoda, která kombinuje principy diskové difúzní a agarové diluční metody. Je vhodný ke stanovení MIC u náročných bakterií a anaerobů.



Obrázek 24: E-test [57]

Jedná se o plastový proužek, na jehož spodní straně je imobilizovaný předdefinovaný koncentrační gradient daného antibiotika ve vysušeném stavu. Na klasické Petriho misky se umísťují pomocí automatického dispensoru nebo ručně 1 až 2 E-testy. Kdy po umístění na povrch, dochází k uvolňování antibiotika do agaru a po inkubaci se odečte hodnota MIC v místě křížení eliptické inhibiční zóny se stupnicí gradientu [61].

## 5 ZÁVĚR

Cílem této bakalářské práce je zhodnotit účinky kvašeného nápoje kombucha na lidské zdraví. Nejprve je popsán původ, historie a proces přípravy nápoje. Především je vysvětlen proces kvašení a jaké druhy čaje jsou vhodné pro jeho přípravu. Pozornost je věnována složení nápoje z mikrobiologického i chemického hlediska. Je zde vysvětlena vzájemná symbióza kvasinek a bakterií a jejich metabolismus v průběhu fermentace.

Kombucha je bohatým zdrojem organických kyselin, polyfenolů, sacharidů, vitamínů, enzymů a minerálů. Pro analýzu většiny z těchto biologicky aktivních látek se využívá především vysokoúčinná kapalinová chromatografie ve spojení se spektrofotometrickým detektorem. Pro analýzu minerálů lze využít atomovou absorpční spektrometrii a k analýze aniontů iontově výměnná chromatografie. Dále obsahuje látky, které mají antioxidační a antimikrobiální účinky, které jsou v práci diskutovány a popsány metody pro jejich testování. Mezi další pozitivní účinky na lidské zdraví patří detoxikace krve, snížení krevního tlaku a hladiny cholesterolu, snížení stresu a bolesti hlavy a napomáhá v boji proti stárnutí. Ovšem pro dosažení těchto účinků je nutné dodržovat doporučenou denní dávku, která se pohybuje mezi 100-300 ml, a bezpečnostní a hygienické podmínky při přípravě. Pokud nebudou tyto podmínky dodrženy může mít kombucha toxické i karcinogenní účinky, z důvodu přítomnosti plísní a těžkých kovů v nálevu.

Z vlastní zkušenosti a širokého spektra zkušeností rodinných příslušníků a přátel, mohu uvést, že užívání kombuchy je velice prospěšné. Cítila jsem se méně unavená, zmírnily se mi bolesti hlavy a zlepšilo se trávení. U některých starších osob v mé rodině se snížila hodnota cholesterolu a rovněž pití nápoje přispělo ke zvýšení životní energie.

## 6 BIBLIOGRAFIE

- [1] CHAKRAVORTY, S., S. BHATTACHARYA, A. CHATZINOTAS, W. CHAKRABORTY, D. BHATTACHARYA a R. GACHHUI. Kombucha tea fermentation: Microbial and biochemical dynamics. *International Journal of Food Microbiology*. 2016, **220**, 63-72 doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2015.12.015
- [2] JAYABALAN, R., P. SUBATHRADEVI, S. MARIMUTHU, M. SATHISHKUMAR a K. SWAMINATHAN. Changes in free-radical scavenging ability of kombucha tea during fermentation. *Food Chemistry* 2008, **109**(1), 227-234 doi:10.1016/j.foodchem.2007.12.037
- [3] MARTÍNEZ LEAL, J., L. VALENZUELA SUÁREZ, R. JAYABALAN, J. HUERTA OROS a A. ESCALANTE-ABURTO. A review on health benefits of kombucha nutritional compounds and metabolites. *CyTA - Journal of Food*. 2018, **16**(1), 390-399 doi:10.1080/19476337.2017.1410499
- [4] KOLE, A., H. JONES, R. CHRISTENSEN a J. GLADSTEIN. A case of kombucha toxicity. *Chest* 2008, **134**(4) doi:10.1378/chest.134.4\_MeetingAbstracts.c9001
- [5] GREENWALT, C., K. STEINKRAUS a R. LEDFORD. Kombucha, the Fermented Tea: Microbiology, Composition, and Claimed Health Effects. *Journal of Food Protection* 2000, **63**(7), 976-981 doi:10.4315/0362-028X-63.7.976
- [6] BISHOP, P., E. PITTS, D. BUDNER a K. THOMPSON-WITRICK. Kombucha: Biochemical and microbiological impacts on the chemical and flavor profile. *Food Chemistry Advances* 2022, **1** doi:10.1016/j.focha.2022.100025
- [7] TEREFE, N.S. Food Fermentation. *Reference Module in Food Science* Elsevier, 2016 ISBN 9780081005965. doi:10.1016/B978-0-08-100596-5.03420-X
- [8] RASTOGI, Y., R. THAKUR, P. THAKUR et al. Food fermentation – Significance to public health and sustainability challenges of modern diet and food systems. *International Journal of Food Microbiology* 2022, **371** doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2022.109666
- [9] WATAWANA, M., N. JAYAWARDENA, Ch. GUNAWARDHANA a V. WAISUNDARA. Health, Wellness, and Safety Aspects of the Consumption of Kombucha. *Journal of Chemistry* 2015, **2015**, 1-11 doi:10.1155/2015/591869
- [10] WANG, S., T. ZENG, S. ZHAO et al. Multifunctional health-promoting effects of oolong tea and its products. *Food Science and Human Wellness* 2022, **11**(3), 512-523 doi:10.1016/j.fshw.2021.12.009
- [11] COELHO, R., A. ALMEIDA, R. AMARAL, R. MOTA a P. SOUSA. Kombucha: Review. *International Journal of Gastronomy and Food Science*. 2020, **22**. doi:10.1016/j.ijgfs.2020.100272
- [12] PHAN, T., G. DUGGIN, J. ESTELL, I. BEER, D. SMITH a M. FERSON. Lead poisoning from drinking Kombucha tea brewed in a ceramic pot. *Medical Journal of Australia* 1998, **169**(11-12), 644-646 doi:10.5694/j.1326-5377.1998.tb123448.x
- [13] KOVACEVIC, Z., G. DAVIDOVIC, J. VUCKOVIC-FILIPOVIC, M. JANICIJEVIC-PETROVIC, K. JANICIJEVIC a A. POPOVIC. A Toxic Hepatitis Caused the Kombucha Tea- Case Report. *Macedonian Journal of Medical Sciences* 2014, **2**(1), 128-131 doi:10.3889/oamjms.2014.023
- [14] CHU, S. a Ch. CHEN. Effects of origins and fermentation time on the antioxidant activities of kombucha. *Food Chemistry*. 2006, **98**(3), 502-507 doi:10.1016/j.foodchem.2005.05.080

- [15] JARRELL, J., T.CAL a J.W. BENNETT. The Kombucha consortia of yeasts and bacteria. *Mycologist* 2000, **14**(4), 166-170 doi:10.1016/S0269-915X(00)80034-8
- [16] VILLARREAL-SOTO, S., S. BEAUFORT, J. BOUJILA, J. SOUCHARD a P. TAILLANDIER. Understanding Kombucha Tea Fermentation: A Review. *Journal of Food Science* 2018, **83**(3), 580-588 doi:10.1111/1750-3841.14068
- [17] CHEN, C. a B.Y. LIU. Changes in major components of tea fungus metabolites during prolonged fermentation. *Journal of Applied Microbiology* 2000, **89**(5), 834-839. doi:10.1046/j.1365-2672.2000.01188.x
- [18] MIRANDA, J., L. RUIZ, C. SILVA, T. UEKANE, K. SILVA, A. GONZALEZ, F. FERNANDES a A. LIMA. Kombucha: A review of substrates, regulations, composition, and biological properties. *Journal of Food Science* 2022, **87**(2), 503-527 doi:10.1111/1750-3841.16029
- [19] Caffeine. *PubChem Compound* National Center for Biotechnology Information, 2022
- [20] LI, R., Y. XU, J. CHEN, F. WANG, Ch. ZOU a J. YIN. Enhancing the proportion of gluconic acid with a microbial community reconstruction method to improve the taste quality of Kombucha. *LWT* 2022, **155** doi:10.1016/j.lwt.2021.112937
- [21] MANACH, C., A. SCALBERT, Ch. MORAND, Ch. RÉMÉSY a L. JIMÉNEZ. Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American Journal of Clinical Nutrition* 2004, **79**(5), 727-747 doi:10.1093/ajcn/79.5.727
- [22] WAY, T., H. LEE, M. KAO a J. LIN. Black tea polyphenol theaflavins inhibit aromatase activity and attenuate tamoxifen resistance in HER2/neu-transfected human breast cancer cells through tyrosine kinase suppression. *European Journal of Cancer* 2004, **40**(14), 2165-2174. doi:10.1016/j.ejca.2004.06.018
- [23] SAJILATA, M.G., P. BAJAJ a R.S. SINGHAL. Tea Polyphenols as Nutraceuticals. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2008, **7**(3), 229-254. doi:10.1111/j.1541-4337.2008.00043.x
- [24] VITAS, J., A. CVETANOVIĆ, P. MAŠKOVIĆ, J. ŠVARC-GAJIĆ a R. MALBAŠA. Chemical composition and biological activity of novel types of kombucha beverages with yarrow. *Journal of Functional Foods* 2018, **44**, 95-102 doi:10.1016/j.jff.2018.02.019
- [25] WESTHOFF, G. a J. STARR. Lactic Acids. In: *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*. Weinheim: Wiley-VCH, 2012, s. 1-8. doi:10.1002/14356007.a15\_097.pub3
- [26] RAMACHANDRAN, S., P. FONTANILLE, A. PANDEY a Ch. LARROCHE. Gluconic Acid: Properties, Applications and Microbial Production. *Food Technology & Biotechnology* 2006, **44**(2), 185-195
- [27] YAVARI, N., M. ASSADI, M. MOGHADAM a K. LARIJANI. Optimizing glucuronic acid production using tea fungus on grape juice by response surface methodology. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences* 2011, **5**(11), 1788-1794 ISSN 1991-8178
- [28] VIJAYARAGHAVAN, R., M. SINGH, P. RAO, R. BHATTACHARYA, K. SUGENDRAN, O. KUMAR, S. PANTH a R. SINGH. Subacute (90 days) oral toxicity studies of Kombucha tea. *Biomedical and Environmental sciences*. India, 2000, **13**(1), 293-299
- [29] NEFFE-SKOCIŃSKA, K., B. SIONEK, I. ŚCIBISZ a D. KOŁOŻYN-KRAJEWSKA. Acid contents and the effect of fermentation condition of Kombucha tea beverages on physicochemical, microbiological and sensory properties. *CyTA - Journal of Food* 2017, **15**(4), 601-607 doi:10.1080/19476337.2017.1321588

- [30] DUFRESNE, C. a E. FARNWORTH. Tea, Kombucha, and health: a review. *Food Research International* 2000, **33**(6), 409-421 doi:10.1016/S0963-9969(00)00067-3
- [31] VINA, I., P. SEMJONOV, R. LINDE a A. PATETKO. Glucuronic acid containing fermented functional beverages produced by natural yeast and bacteria associations. *International Journal of Recent Research and Applied Studies* Institute of Microbiology and Biotechnology, 2013, **14**(1), 17-25
- [32] STICK, R. *Carbohydrates: the sweet molecules of life* 1. New York: Academic press, 2001, s. 1-256 ISBN 9780126709605
- [33] MALBAŠA, R., E. LONČAR, J. VITAS a J. ČANADANOVIĆ-BRUNET. Influence of starter cultures on the antioxidant activity of kombucha beverage. *Food Chemistry*. 2011, **127**(4), 1727-1731 doi:10.1016/j.foodchem.2011.02.048
- [34] *Thiamine PubChem Compound* National Center for Biotechnology Information, 2004
- [35] *Riboflavin PubChem Compound*. National Center for Biotechnology Information, 2022
- [36] *Pyridoxine PubChem Compound* National Center for Biotechnology Information, 2022
- [37] PRASAD, J. P. Conceptual Pharmacology. PRASAD, Jagadish. *Conceptual Pharmacology* 1. India: Universities Press, 2010, s. 671-679 ISBN 978-817371679-0.
- [38] *Cyanocobalamin PubChem compound* National Center for Biotechnology Information, 2004
- [39] DE QUADROS, L.. *Ascorbic Acid and Performance: A Review*. 2016, **05**(1) doi:10.4172/2376-1318.1000136
- [40] KUMAR, S., G. NARAYAN a S. HASSARAJANI. Determination of anionic minerals in black and kombucha tea using ion chromatography. *Food Chemistry* 2008, **111**(3), 784-788 doi:10.1016/j.foodchem.2008.05.012
- [41] ABACI, N., Fatma SENOL DENIZ a I. ORHAN. Kombucha – An ancient fermented beverage with desired bioactivities: A narrowed review. *Food Chemistry: X* [online]. 2022, **14** doi:10.1016/j.fochx.2022.100302
- [42] SHEBIS, Y., D. ILUZ, Y. KINEL-TAHAN, Z. DUBINSKY a Y. YEHOSHUA. Natural Antioxidants: Function and Sources. *Food and Nutrition Sciences* 2013, **4**(6), 643-649 doi:10.4236/fns.2013.46083
- [43] SRIHARI, T. a U. SATYANARAYANA. Changes in Free Radical Scavenging Activity of Kombucha during Fermentation. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research* 2012, **4**(11), 1978-1981 ISSN 0975-1459.
- [44] BATTIKH, H., K. CHAIEB, A. BAKHROUF a E. AMMAR. Antibacterial and antifungal activities of black and green kombucha teas. *Journal of Food Biochemistry* 2013, **37**(2), 231-236 doi:10.1111/j.1745-4514.2011.00629.x
- [45] Antiproliferative and antimicrobial activities of kombucha tea. *African Journal of Microbiology Research* 2013, **7**(27), 3466-347: doi:10.5897/AJMR12.1230
- [46] JAYABALAN, R., S. MARIMUTHU a K. SWAMINATHAN. Changes in content of organic acids and tea polyphenols during kombucha tea fermentation. *Food Chemistry*. 2007, **102**(1), 392-398. doi:10.1016/j.foodchem.2006.05.032
- [47] SILVA, K., S. RODRIGUES, L. FILHO a Á. LIMA. Antimicrobial Activity of Broth Fermented with Kefir Grains. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 2009, **152**(2), 316-325 doi:10.1007/s12010-008-8303-3
- [48] ADEWUSI, E. a A. AFOLAYAN. A review of natural products with hepatoprotective activity. *Journal of Medicinal Plants Research* 2010, **4**(13), 1318-1334 doi:10.5897/JMPR09.472

- [49] JAYABALAN, R., BASKARAN, S. MARIMUTHU a K. YUN. Effect of kombucha tea on aflatoxin B1 induced acute hepatotoxicity in albino rats-prophylactic and curative studies. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry* 2010, **53**(4), 407-416 doi:10.3839/jksabc.2010.063
- [50] BARATI, F., J. JAVANBAKHT, F. ADIB-HASHEMI et al. Histopathological and clinical evaluation of Kombucha tea and Nitrofurazone on cutaneous full-thickness wounds healing in rats. *Diagnostic Pathology*. 2013, **8**(1) doi:10.1186/1746-1596-8-120
- [51] Herbal Product Contamination and Toxicity. *Journal of Pharmacy Practice* 2005, **18**(3), 188-208 doi:10.1177/0897190005277217
- [52] *Food safety assessment of Kombucha tea recipe and food safety plan: Food Issue, Notes from the Field, BC Centre for Disease Control, An Agency of the Provincial Health Services Authority, 2020*
- [53] MIRANDA, B., N. LAWTON, S. TACHIBANA, N. SWARTZ a W. HALL. Titration and HPLC Characterization of Kombucha Fermentation: A Laboratory Experiment in Food Analysis. *Journal of Chemical Education*. 2016, **93**(10), 1770-1775 doi:10.1021/acs.jchemed.6b00329
- [54] SARAJI, M. a M. BOROJENI. Recent developments in dispersive liquid-liquid microextraction. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2014, **406**(8), 2027-2066 doi:10.1007/s00216-013-7467-z
- [55] RAJAPAKSHA, S. a N. SHIMIZU. Pilot-scale extraction of polyphenols from spent black tea by semi-continuous subcritical solvent extraction. *Food Chemistry: X*. 2022, **13** doi:10.1016/j.fochx.2021.100200
- [56] BAUTE-PÉREZ, D., Á. SANTANA-MAYOR, A. HERRERA-HERRERA, B. SOCAS-RODRÍGUEZ a M. RODRÍGUEZ-DELGADO. Analysis of alkylphenols, bisphenols and alkylphenol ethoxylates in microbial-fermented functional beverages and bottled water: Optimization of a dispersive liquid-liquid microextraction protocol based on natural hydrophobic deep eutectic solvents. *Food Chemistry* 2022, **377** doi:10.1016/j.foodchem.2021.131921
- [57] KŘÍŽENECKÁ, S. a V. SYNEK. *Základy analytické chemie* Ústí nad Labem, 2014 Univerzita JE Purkyně, Fakulta životního prostředí.
- [58] KŘÍŽEK, M. a J. ŠÍMA. *Analytická chemie*. České Budějovice: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta, 2015 ISBN 978-80-7394-486-5
- [59] BAUER-PETROVSKA, B. a L. PETRUSHEVSKA-TOZI. Mineral and water soluble vitamin content in the Kombucha drink. *International Journal of Food Science and Technology*. 2000, **35**(2), 201-205. doi:10.1046/j.1365-2621.2000.00342.x
- [60] PAULOVÁ, H., H. BOCHOŘÁKOVÁ a E. TÁBORSKÁ. Metody Stanovení antioxidační aktivity přírodních látek in vitro. *Chemické Listy*. 2004, 174-179
- [61] BURSOVÁ, Š., M. DUŠKOVÁ, L. NECIDOVÁ, R. KARPÍŠKOVÁ a P. MYŠKOVÁ. Mikrobiologické laboratorní metody. *Fakulta veterinární hygieny a ekologie* 2014, 1-80 ISSN 978-80-7305-676-6.
- [62] SREERAMULU, G., Y. ZHU a W. KNOL. Kombucha Fermentation and Its Antimicrobial Activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2000, **48**(6), 2589-2594 doi:10.1021/jf991333m