

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Monitorování obsahu fenolických látek s antioxidačními vlastnostmi v průběhu
kvašení nápoje kombucha
Bc. Michaela Javůrková

Diplomová práce

2025

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2024/2025

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Michaela Javůrková**
Osobní číslo: **C22335**
Studijní program: **N0531A130030 Hodnocení a analýza potravin**
Téma práce: **Monitorování obsahu fenolických látek s antioxidačními vlastnostmi v průběhu kvašení nápoje kombucha**
Zadávací katedra: **Katedra analytické chemie**

Zásady pro vypracování

- Vypracujte literární rešerši se zaměřením na analýzu významných biologicky aktivních látek s antioxidačními účinky obsažených v kvašeném nápoji kombucha pomocí kapalinové chromatografie a jejího spojení s hmotnostní spektrometrií. Dále se věnujte využití různých spektrofotometrických metod.
- Na základě literární rešerše zvolte vhodné spektrofotometrické metody pro určení celkového obsahu látek s antioxidačními vlastnostmi a metody optimalizujte.
- Dále optimalizujte HPLC/MS/MS metodu pro rychlou chromatografickou separaci katechinů a významných fenolických látek obsažených v černém a zeleném čaji.
- Optimalizované spektrofotometrické metody a HPLC/MS/MS metodu využijte pro sledování změny obsahu významných fenolických látek s antioxidačními vlastnostmi obsažených u frakcí odebíraných během kvašení nápoje kombucha připravovaného ze zeleného a černého čaje. Výsledky porovnejte a diskutujte vliv různého druhu čaje a vliv teploty kvašení na obsah jednotlivých sledovaných látek.

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

Seznam doporučené literatury:

Podle pokynů vedoucí práce.

Vedoucí diplomové práce: **prof. Ing. Lenka Česlová, Ph.D.**
Katedra analytické chemie

Datum zadání diplomové práce: **7. února 2025**

Termín odevzdání diplomové práce: **9. května 2025**

LS.

prof. Ing. Petr Němec, Ph.D.
děkan

doc. Ing. Petr Česla, Ph.D.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 20. února 2025

Prohlášení autora

Prohlašuji, že jsem práci s názvem Monitorování obsahu fenolických látek s antioxidačními vlastnostmi v průběhu kvašení nápoje kombucha 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 16. 5. 2025

Bc. Michaela Javůrková

PODĚKOVÁNÍ

Na tomto místě bych chtěla srdečně poděkovat své vedoucí diplomové práce, paní prof. Ing. Lence Česlové, Ph.D., za ochotné vedení, odborné rady, trpělivost i povzbuzení, které mi poskytovala po celou dobu zpracovávání této práce.

Dále bych ráda vyjádřila upřímné poděkování své rodině, která mě během studia neustále podporovala, věřila mi a byla mi oporou i ve chvílích, kdy jsem si sama nebyla jistá.

ANOTACE

Diplomová práce se zabývá sledováním změn v obsahu fenolických látek a flavonoidů s antioxidačními vlastnostmi v průběhu fermentace nápoje kombucha připraveného ze zeleného a černého čaje. Pro monitorování bylo využito několik spektrofotometrických metod – ABTS, DPPH, FRAP, stanovení celkového množství fenolických látek a flavonoidů. Dále byla provedena detailní analýza pomocí kapalinové chromatografie spojené s tandemovou hmotnostní spektrometrií, která umožnila identifikaci a kvantifikaci jednotlivých polyfenolů. Dále byly sledovány změny pH a barevnosti nápoje. Výsledky ukazují, jak různé čaje a podmínky fermentace ovlivňují antioxidační vlastnosti a chemické složení kombuchy.

KLÍČOVÁ SLOVA

Kombucha, Flavonoidy, Polyfenoly, Spektrofotometrie, Antioxidační Aktivita, HPLC-MS/MS, Fermentace

TITLE

Monitoring of phenolic compounds with antioxidant properties during Kombucha fermentation.

ANNOTATION

The thesis focuses on monitoring changes in the content of phenolic compounds and flavonoids with antioxidant properties during the fermentation of kombucha prepared from green and black tea. Several spectrophotometric methods were used for monitoring – ABTS, DPPH, FRAP, determination of total phenolic content, and flavonoids. Furthermore, a detailed analysis was carried out using liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry, which enabled the identification and quantification of individual polyphenols. Changes in pH and beverage color were also monitored. The results show how different types of tea and fermentation conditions affect the antioxidant properties and chemical composition of kombucha.

KEYWORDS

Kombucha, Flavonoids, Polyphenols, Spectrophotometry, Antioxidant Activity, HPLC-MS/MS, Fermentation

OBSAH

Seznam ilustrací a tabulek	10
Seznam zkratk	12
Úvod.....	13
1 TEORETICKÁ ČÁST	14
1.1 KOMBUCHA	14
1.1.1 Historie a původ.....	14
1.1.2 Mikrobiologické složení kombuchy	15
1.1.3 Chemické složení kombuchy	15
1.1.4 Proces fermentace	17
1.1.4.1 Fáze fermentace	17
1.2 FENOLICKÉ LÁTKY A JEJICH VÝZNAM	18
1.2.1 Fenolické kyseliny	18
1.2.2 Flavonoidy	19
1.3 SPEKTROFOTOMETRIE A STANOVENÍ ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITY	19
1.3.1 Stanovení antioxidační aktivity	19
1.3.1.1 Metoda ABTS	20
1.3.1.2 Metoda FRAP	20
1.3.1.3 Metoda DPPH.....	20
1.3.1.4 Stanovení celkového obsahu fenolických látek (TPC).....	20
1.3.1.5 Stanovení celkového obsahu flavonoidů	21
1.3.2 Měření barevnosti vzorků	21
1.4 VYSOKOÚČINNÁ KAPALINOVÁ CHROMATOGRRAFIE	23
1.4.1 Princip HPLC.....	23
1.5 HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE.....	23
1.5.1 Ionizace elektrosprejem	23
1.5.2 Chemická ionizace za atmosférického tlaku.....	24
1.5.3 Hmotnostní analyzátory	24

1.6	SPOJENÍ KAPALINOVÉ CHROMATOGRAFIE S HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIÍ.....	25
1.7	ANALÝZA KOMBUCHY	26
1.7.1	Katechiny a příprava vzorku.....	26
1.7.2	Stanovení antioxidační aktivity	27
1.7.3	Analýza fenolických látek pomocí separačních technik.....	27
2	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	29
2.1	Přístroje a zařízení.....	29
2.2	Použité chemikálie a materiály	30
2.2.1	Vlastní čajové nálevy.....	30
2.2.2	Komerčně dostupné kombuchy	30
2.2.3	Standardy	31
2.2.4	Ostatní chemikálie	31
2.3	Pracovní postupy.....	32
2.3.1	Vzorky a jejich příprava	32
2.3.2	Spektrofotometrické stanovení antioxidační aktivity	33
2.3.2.1	Metoda ABTS (metoda TEAC).....	33
2.3.2.2	Metoda FRAP	33
2.3.2.3	Metoda DPPH.....	34
2.3.2.4	Stanovení celkového množství fenolických látek.....	34
2.3.2.5	Stanovení celkového množství flavonoidů.....	35
2.3.3	Statistické vyhodnocení vyhodnocení kalibračních závislostí.....	36
2.3.4	Měření barevnosti	36
2.3.5	HPLC/MS analýza kombuchy	37
3	VÝSLEDKY A DISKUZE.....	38
3.1	Porovnání spektrofotometrických metod	42
3.2	Barevnost vzorků během fermentace	43
3.3	Senzorické hodnocení kombuchy	45
3.4	Změny pH během fermentace	47

3.5	Identifikace katechinů	49
3.5.1	Studium separačních podmínek a jejich optimalizace	49
3.5.2	Kvantifikace vybraných fenolických látek sv kombuše pomocí metody HPLC-MS/MS	50
4	ZÁVĚR	53
5	Bibliografie	55
6	Přílohy	60
6.1	Obrázky	60
6.2	Tabulky	64

SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK

Obrázek 1 Čajový nálev se SCOBY (foto autor).....	14
Obrázek 2 SCOBY (foto autor)	15
Obrázek 3 Chemická struktura kofeínu	16
Obrázek 4 Schéma metabolismu mikroorganismů[19]	17
Obrázek 5 Záznam LAB modelu[32]	22
Obrázek 6 Schéma ionizace elektrosprejem[37]	24
Obrázek 7 Ionizace za atmosferického tlaku[39]	24
Obrázek 8 HPLC/MS systém (foto autor)	29
Obrázek 9 UV/VIS spektrofotometr Shimadzu UV-2450 (foto autor).....	29
Obrázek 10 Spektrofotometr UltraScan VIS[56].....	30
Obrázek 11 Vlastní vzorky kombuchy vz1-vz4	32
Obrázek 12 Vlastní vzorky kombuchy vz5-vz8	32
Obrázek 13 Kalibrační křivka závislosti úbytku A na množství Troloxu pro metodu ABTS ...	33
Obrázek 14 Kalibrační křivka závislosti úbytku A na množství Troloxu pro metodu FRAP....	34
Obrázek 15 Kalibrační křivka závislosti úbytku A na množství Troloxu pro metodu DPPH ...	34
Obrázek 16 Kalibrační křivka závislosti úbytku A na množství kyseliny gallové	35
Obrázek 17 Kalibrační křivka závislosti úbytku A na množství kaempferolu.....	35
Obrázek 18 Kalibrační křivka závislosti úbytku A na množství katechinu	36
Obrázek 19 Antioxidační aktivita metodou DPPH v průběhu fermentace	38
Obrázek 20 Antioxidační aktivita metodou ABTS v průběhu fermentace	39
Obrázek 21 Celkový obsah fenolických látek stanovený metodou Folin-Ciocalteu (TPC).....	39
Obrázek 22 Antioxidační aktivita metodou FRAP v průběhu fermentace	40
Obrázek 23 Obsah flavonoidů stanovený metodou TFC s octanem hlinitým	41
Obrázek 24 Obsah flavonoidů stanovený metodou TFC s NaOH.....	41
Obrázek 25 Závislost hodnot ABTS na obsahu fenolických látek (TPC)	43
Obrázek 26 Rozdíl barevnosti vůči čajovým nálevům	44
Obrázek 27 Pokles pH v průběhu fermentace u kombuchy z černého čaje.....	48
Obrázek 28 Pokles pH v průběhu fermentace u kombuchy ze zeleného čaje	48
Obrázek 29 Separace směsi 23 fenolických látek (7. den fermentace,vzorek kombuchy ze zeleného čaje)	52
Obrázek 30 Separace směsi 23 fenolických látek (7. den fermentace,vzorek kombuchy z černého čaje)	52

Obrázek 31 Struktury 23 fenolických látek nalezených ve vzorcích kombuchy	63
Tabulka 1 Komerční vzorky kombuchy K1-K4	30
Tabulka 2 Komerční vzorky kombuchy K5-K9	31
Tabulka 3 Korelační matice mezi jednotlivými metodami (Pearsonovo r)	42
Tabulka 4 Změna barevnosti 8 vlastních vzorků kombuchy	43
Tabulka 5 Naměřené hodnoty L^* , a^* , b^* , C^* , h°	45
Tabulka 6 Senzorické hodnocení kombuchy v průběhu fermentace	45
Tabulka 7 pH komerčně dostupných vzorků kombuchy	48
Tabulka 8 Pořadí eluce fenolických látek	49
Tabulka 9 Monitorování poklesu pH v průběhu kvašení vlastních vzorků	64
Tabulka 10 MRM přechody 23 monitorovaných fenolických látek	64
Tabulka 11 Průměrné hodnoty TEAC a SD vzorků kombuchy- metoda DPPH	65
Tabulka 12 Průměrné hodnoty TEAC a SD vzorků kombuchy- metoda ABTS	66
Tabulka 13 Průměrné hodnoty obsahu fenolických látek a SD kombuchy- metoda stanovení TPC	67
Tabulka 14 Průměrné hodnoty TEAC a SD vzorků kombuchy- metoda FRAP	68
Tabulka 15 Průměrné hodnoty obsahu flavonoidů a SD kombuchy- metoda stanovení TFC s octanem	69
Tabulka 16 Průměrné hodnoty obsahu flavonoidů a SD kombuchy- metoda stanovení TFC s NaOH	70
Tabulka 17 Standardy- parametry kalibrační křivky, koeficient determinace (R^2), meze detekce (LOD) a meze stanovitelnosti (LOQ)	71
Tabulka 18 Kvantitativní zastoupení fenolických látek v čajových nálevech a po přidání startéru (0. den fermentace)	71
Tabulka 19 Kvantitativní zastoupení fenolických látek ve vlastních vzorcích kombuchy v průběhu fermentace	72
Tabulka 20 Kvantitativní zastoupení fenolických látek v komerčních vzorcích kombuchy	82

SEZNAM ZKRATEK

Zkratka Význam

ABTS	2,2'-azino-bis(3-etylbenzothiazolin-6-sulfonová) kyselina
CE	Collision Energy (kolizní energie)
CIELab*	Mezinárodní systém barevnosti definovaný Mezinárodní komisí pro osvětlování
CXP	Collision Cell Exit Potential (Výstupní potenciál kolizní cely)
DPPH	2,2-difenyl-1-pikrylhydrazyl
DP	Deklastrační potenciál
EGCG	Epigalokatechin-3-galát
FRAP	Ferric Reducing Antioxidant Power
HPLC	High Performance Liquid Chromatography (vysokoúčinná kapalinová chromatografie)
HPLC/MS	HPLC spojená s hmotnostní spektrometrií
LC/MS	Liquid Chromatography – Mass Spectrometry
MRM	Multiple Reaction Monitoring (Monitorování více přechodů)
SIM	Selected Ion Monitoring (Monitorování vybraných iontů)
SCOBY	Symbiotic Culture of Bacteria and Yeast
TFC	Total Flavonoid Content (obsah flavonoidů)
TPC	Total Phenolic Content (obsah fenolických látek)
TPTZ	2,4,6-tris(2-pyridyl)-1,3,5-triazin
TEAC	Trolox Equivalent Antioxidant Capacity
UV/VIS	Ultrafialová a viditelná oblast světelného spektra (spektrofotometrie)

ÚVOD

Kombucha je fermentovaný nealkoholický nápoj, který vzniká fermentací slazeného čaje pomocí symbiotické kultury kvasinek a bakterií (SCOBY). Tato kultura vytváří na hladině nápoje charakteristickou celulóзовou vrstvu a zajišťuje přeměnu cukrů na bioaktivní látky. Kombucha si v posledních letech získala oblibu jako funkční potravina díky svým potenciálně příznivým účinkům na zdraví, mezi které patří antioxidační, detoxikační, protizánětlivé a probiotické vlastnosti.

Chemické složení kombuchy se během fermentace významně mění. Výsledný obsah biologicky aktivních látek ovlivňuje nejen použitý typ čaje, ale také doba a podmínky fermentace, včetně teploty či pH prostředí. Právě sledování těchto změn umožňuje lépe porozumět procesům, které během kvašení probíhají.

Tato práce se zaměřuje na sledování změn obsahu flavonoidů a antioxidační aktivity kombuchy během fermentace. K hodnocení antioxidačních vlastností byly využity spektrofotometrické metody ABTS, DPPH, FRAP a stanovení celkových fenolických látek (TPC). Obsah flavonoidů byl stanoven pomocí dvou kolorimetrických metod na bázi komplexace s $AlCl_3$. Pro detailní identifikaci jednotlivých fenolických sloučenin byla použita metoda kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí (HPLC-MS/MS). Doplnkově byly během fermentace sledovány také změny pH a barevnosti nápoje.

1 TEORETICKÁ ČÁST

1.1 KOMBUCHA

Kombucha je fermentovaný mírně sycený a lehce kyselý nealkoholický nápoj, původem z Asie. Přípravuje se fermentací slazeného čaje, kde fermentaci zajišťuje symbiotická kultura bakterií a kvasinek: SCOBY (Symbiotic Culture of Bacteria and Yeast) [1, 2]. Nápoj může být připraven, jak z čaje zeleného, černého, oolong, tak i bylinného čaje. Nálev slazeného čaje i se symbiotickou kulturou je vyzobrazen na obrázku 1.



Obrázek 1 Čajový nálev se SCOBY (foto autor)

1.1.1 Historie a původ

První zmínky o tomto nápoji pocházejí z období zhruba 220 př. n. l. v oblasti Mandžuska, což je historická oblast na severovýchodě Číny. Kombucha se rychle rozšířila po celé Číně a byla oblíbená zejména během vlády dynastie Tsin pro své detoxikační a energizující vlastnosti. Považovala se za elixír zdraví a dlouhověkosti a byla užívána nejen v tradiční medicíně, ale také jako osvěžující nápoj v každodenním životě [3–5].

V roce **414 n.l.** ji lékař jménem Kombu přinesl do Japonska, kde ji použil k léčbě trávicích problémů císaře Inkyo. Na počest tohoto lékaře byl nápoj údajně pojmenován „Kombucha“. Některé zdroje ovšem naznačují, že název „kombu-cha“ v japonštině znamená čaj z mořských řas, což mohlo způsobit jazykové nedorozumění [1, 3–5].

Kombucha se následně rozšířila po celé Evropě, zejména v Rusku, Německu a Francii. Vědecké studie potvrzují její zdravotní přínosy, což přispělo k její popularitě, především v moderní době díky sociálním médiím a důrazu na zdravý životní styl [1, 3, 5, 6].

1.1.2 Mikrobiologické složení kombuchy

SCOBY, je tvořena dvěma hlavními typy mikroorganismů – kvasinkami a octovými bakteriemi. Mezi nejčastější kvasinky patří rody *Brettanomyces*, *Zygosaccharomyces*, *Saccharomyces* a *Pichia*, zatímco bakterie jsou zastoupeny hlavně rody *Acetobacter* a *Gluconobacter*. *Komagataeibacter xylinus* (dříve známý jako *Acetobacter xylinum*) je klíčová bakterie, která během fermentace vytváří celulóзовou vrstvu (biofilm), známou jako „čajová houba“ nebo „mateřská houba“, která poskytuje vhodné podmínky pro růst mikroorganismů [3–5].



Obrázek 2 SCOBY (foto autor)

Tato rosolovitá celulóзовá struktura plave na hladině fermentující tekutiny a zajišťuje přístup kyslíku potřebného pro růst octových bakterií, zatímco kvasinky, které se usazují ve spodní části biofilmu, se podílejí na anaerobní fermentaci [4, 5].

Během každého fermentačního cyklu dochází k obnově SCOBY vytvořením nové vrstvy, známé jako „dceřiná houba“, která je využívána pro další fermentační procesy [4, 5]. Celý tento symbiotický vztah mezi kvasinkami a bakteriemi umožňuje opakovatelný cyklus fermentace, při kterém vzniká kombucha – zdravý prospěšný kvašený nápoj [3–5].

1.1.3 Chemické složení kombuchy

Chemické složení kombuchy se liší v závislosti na použitých surovinách, délce a podmínkách fermentace, druhu čaje a mikrobiálním složení symbiotické kultury. Mezi hlavní složky patří polyfenoly, organické kyseliny, sacharidy, vitamíny, minerály, kofein, ethanol a enzymy [7]. Tyto látky ovlivňují nejen výslednou chuť a vůni nápoje, ale také jeho biologické a funkční vlastnosti [8].

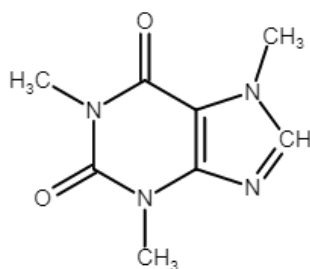
Polyfenoly, především katechiny a jejich deriváty, pocházejí z čajových lístků a patří k hlavním antioxidantům v kombuše. V zeleném čaji dominují katechiny jako epikatechin (EC),

epigalokatechin (EGC) nebo epigalokatechin galát (EGCG) a epikatechin gallát (ECG), které vykazují silnou antioxidační aktivitu. V čaji černém jsou hlavními polyfenoly theaflaviny a thearubiginy [1, 9–11]. Během fermentace dochází k jejich částečné přeměně, což může ovlivnit jejich účinnost i zastoupení.

Organické kyseliny, především kyselina octová, glukonová, mléčná a glukuronová, vznikají činností octových a mléčných bakterií. Kyselina octová je odpovědná za charakteristickou kyselou chuť, zatímco kyselina glukuronová se podílí na detoxikačních procesech v organismu [8, 12, 13].

Ethanol vzniká působením kvasinek v průběhu fermentace přeměnou sacharidů. Jeho koncentrace se v běžně připravované kombuše pohybuje pod hranicí 0,5 % obj., což odpovídá legislativnímu limitu pro nealkoholické nápoje [14].

Kofein se do nápoje uvolňuje z čajových lístků. Jeho obsah závisí na druhu použitého čaje, ale i po fermentaci zůstává zachován v nízké koncentraci. Kofein působí jako stimulant a přispívá ke zvýšení bdělosti a výkonu [15].



Obrázek 3 Chemická struktura kofeinu

Vitamíny, zejména vitamíny skupiny B (B1, B2, B6, B12) a vitamín C, jsou během fermentace částečně produkovány mikroorganismy. Jejich koncentrace se mění v závislosti na délce kvašení a přispívají k nutriční hodnotě nápoje [16].

Minerální látky, jako měď, železo, mangan, nikl a zinek, se přirozeně vyskytují v čajových lístcích nebo vznikají během fermentace. Jsou důležité pro enzymatické reakce a správné fungování metabolismu [1, 17].

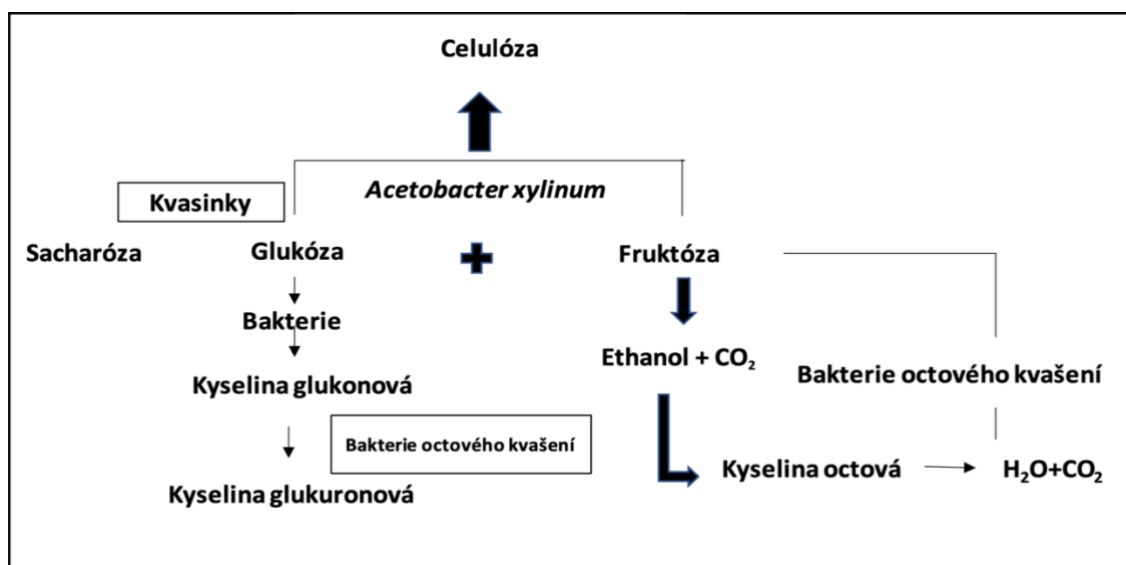
Enzymy, které jsou produkovány mikroorganismy během fermentace, se podílejí na rozkladu čajových polyfenolů a sacharidů. Jejich aktivita přispívá ke zlepšení stravitelnosti nápoje a podporuje zdravé trávení. Současně se podílejí na uvolnění bioaktivních látek, čímž zvyšují antioxidační účinek nápoje [18].

1.1.4 Proces fermentace

Fermentace kombuchy začíná aktivitou kvasinek, které štěpí sacharózu na glukózu a fruktózu pomocí enzymu invertázy. Oba vzniklé monosacharidy jsou dále metabolizovány – glukózu preferují kvasinky rodu *Saccharomyces*, zatímco fruktózu častěji využívají kvasinky rodu *Zygosaccharomyces*. Pomocí glykolýzy dochází k přeměně těchto cukrů na ethanol a oxid uhličitý. Tato fáze probíhá převážně v anaerobním prostředí, tedy bez přístupu kyslíku [1, 6].

Jakmile kvasinky vyprodukují ethanol, do procesu se zapojují octové bakterie, zejména rodu *Acetobacter*, které oxidují ethanol na kyselinu octovou. Zároveň využívají glukózu k produkci kyseliny glukonové. Tento krok probíhá za aerobních podmínek, protože octové bakterie vyžadují kyslík pro svůj metabolismus

Vznikající kyselina octová je hlavní látkou odpovědnou za charakteristickou kyselou chuť kombuchy a zároveň působí konzervačně. Kromě ní se během fermentace tvoří i další organické kyseliny, jako je kyselina glukonová a kyselina glukuronová, které ovlivňují výsledné chemické složení i sensorické vlastnosti nápoje [5, 6].



Obrázek 4 Schéma metabolismu mikroorganismů[19]

1.1.4.1 Fáze fermentace

Fermentace kombuchy se dělí na dvě hlavní fáze – primární a sekundární [3, 5].

Primární fermentace probíhá za přístupu kyslíku (aerobně), což je zásadní pro činnost octových bakterií, jako je *Acetobacter*, které oxidují ethanol na kyselinu octovou. Současně v této fázi dochází k činnosti kvasinek, které v anaerobním prostředí přeměňují sacharózu na glukózu

a fruktózu a následně produkují ethanol a oxid uhličitý. Tento proces probíhá po dobu 7 až 14 dní, v závislosti na podmínkách prostředí [1, 3].

Sekundární fermentace probíhá v uzavřených skleněných láhvích, bez přístupu kyslíku (anaerobně). Tento proces je často využíván k dosažení větší perlivosti nápoje, protože oxid uhličitý produkovaný kvasinkami zůstává uvnitř uzavřené nádoby. Ačkoli octové bakterie vyžadují kyslík, sekundární fermentace se zaměřuje hlavně na práci kvasinek, které pokračují ve výrobě oxidu uhličitého [3, 5].

1.2 FENOLICKÉ LÁTKY A JEJICH VÝZNAM

Fenolické látky tvoří rozsáhlou a strukturálně pestrou skupinu sekundárních metabolitů rostlin, které jsou známé především svým antioxidačním působením. Vyskytují se zejména v potravinách rostlinného původu, kde ovlivňují nejen jejich biologickou hodnotu, ale také senzorycké vlastnosti jako barvu, chuť a vůni [1, 3, 6]. Fenolické látky mohou neutralizovat volné radikály, a tím snižovat oxidační stres v organismu, čímž přispívají k prevenci chronických onemocnění, jako jsou kardiovaskulární choroby, cukrovka nebo rakovina [20, 21].

Z hlediska chemické struktury se jedná o sloučeniny s jedním nebo více aromatickými jádry, které nesou hydroxylové skupiny. V potravinách se fenolické látky obvykle nacházejí ve volné i vázané formě (např. jako glykosidy nebo estery), přičemž jejich biologická aktivita závisí na počtu a pozici hydroxylových skupin, stupni polymerace a dalších substituentech [9, 11].

1.2.1 Fenolické kyseliny

Fenolické kyseliny se dělí na dvě hlavní skupiny – hydroxybenzoové a hydroxyskořicové kyseliny. Tyto látky jsou běžně přítomné v čajových lístcích i fermentovaných produktech, jako je kombucha, kde vznikají jak extrakcí z čajového základu, tak biotransformací během fermentace [22, 23].

Hydroxybenzoové kyseliny, mezi něž patří například kyselina gallová, syringová nebo vanilová, mají jednoduchou strukturu vycházející z benzenového jádra a přispívají k antioxidační aktivitě nápojů [19].

Hydroxyskořicové kyseliny, jako jsou kyselina kávová, ferulová, *p*-kumarová a sinapová, se vyskytují především ve formě esterů s kyselinou chinovou nebo s cukernými zbytky a bývají hojně zastoupeny ve fermentovaných čajových nápojích [22].

1.2.2 Flavonoidy

Flavonoidy jsou nejvýznamnější skupinou fenolických látek přítomných v čaji a následně i v kombuše. Jsou tvořeny třemi spojenými kruhy (A, B a C), přičemž jejich základní struktura umožňuje vysokou variabilitu derivátů [4, 9].

Z chemického hlediska je možné flavonoidy dělit do několika podskupin:

- **Flavanoly** (např. katechin, epikatechin, epigalokatechin) – nejvíce zastoupené flavonoidy v zeleném čaji. Vykazují silné antioxidační účinky a jsou považovány za klíčové bioaktivní složky kombuchy připravené ze zeleného čaje[6].
- **Flavonoly** (např. kvercetin, kaempferol a jejich glykosidy jako rutin nebo isokvercetin) – mají rovněž antioxidační a protizánětlivé účinky, vyskytují se hlavně ve fermentovaných nápojích na bázi černého čaje[3].
- **Flavanony, flavony a další podskupiny** – jejich přítomnost bývá v čaji nižší, ale mohou být detekovány především v různých čajových směsích a bylinných variantách kombuchy.

Struktura a počet hydroxylových skupin zásadně ovlivňují jejich biologickou dostupnost a antioxidační aktivitu. V průběhu fermentace může docházet k částečnému rozkladu glykosidických vazeb, což mění profily přítomných flavonoidů [7, 21].

1.3 SPEKTROFOTOMETRIE A STANOVENÍ ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITY

1.3.1 Stanovení antioxidační aktivity

Antioxidační aktivita je schopnost látek neutralizovat volné radikály (reaktivní částice s nepárovým elektronem), které vznikají během běžných metabolických procesů či vnější expozicí (UV záření, znečištění apod.). Tyto radikály mohou vyvolávat oxidativní stres, který poškozuje buňky, DNA i bílkoviny, a je spojován s rozvojem řady civilizačních chorob [24].

K hodnocení antioxidační aktivity se používají spektrofotometrické metody, které jsou založeny na reakci antioxidantů přítomných ve vzorku s vhodným radikálem nebo redoxním činidlem. Jednotlivé metody se liší typem reagující látky i principem měření.

1.3.1.1 Metoda ABTS

Metoda ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonová kyselina)) patří mezi nejčastěji používané techniky pro stanovení antioxidační aktivity. Princip spočívá v neutralizaci radikálového kationtu ABTS^{•+}, který vzniká jednoelektronovou oxidací chromoforu ABTS, obvykle za přítomnosti peroxidodisíranu draselného. Vzniklý zelený roztok ztrácí při reakci s antioxidantem intenzitu zbarvení, přičemž pokles absorbance se měří spektrofotometricky při vlnové délce 734 nm [24].

Výsledky se přepočítávají na ekvivalent Troloxu a uvádějí se jako **TEAC** (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity). Díky své univerzálnosti je metoda vhodná i pro analýzu fermentovaných nápojů, jako je kombucha.

1.3.1.2 Metoda FRAP

FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) test měří schopnost antioxidantů redukovat železitý ion (Fe^{3+}) na železnatý (Fe^{2+}) v komplexu s činidlem TPTZ (2,4,6-tripyridyl-s-triazin). Při redukci vzniká modře zbarvený komplex, jehož intenzita se měří při 593 nm [24].

Metoda je ceněna pro svou jednoduchost, rychlost a nízké náklady, přestože měří pouze schopnost redukce kovových iontů, nikoliv přímo schopnost odstraňovat volné radikály.

1.3.1.3 Metoda DPPH

Metoda DPPH (2,2-difenyl-1-pikrylhydrazyl) je založena na reakci volného stabilního fialového radikálu DPPH[•] s antioxidanty. Dochází tak k redukci na bezbarvou formu DPPH, což je měřitelné poklesem absorbance při vlnové délce 515 nm [24–26].

Kvantifikace se provádí pomocí kalibrační křivky s využitím standardu **Trolox**, přičemž výsledky jsou uváděny jako TEAC (mmol/g nebo mmol/l). Výhodou metody je její jednoduchost a široké využití pro různé typy extraktů [25].

1.3.1.4 Stanovení celkového obsahu fenolických látek (TPC)

Kromě samotné antioxidační kapacity je důležité stanovit i celkové množství fenolických látek, které jsou hlavními přispěvateli k antioxidačním vlastnostem čaje a kombuchy. Nejčastěji

používanou metodou je **Folin-Ciocalteuův test**, který je založen na redukci heteropolykyselin fosfomolybdenové a fosfowolframové v zásaditém prostředí, což vede ke vzniku modrého zbarvení. Absorbance se měří při 750 nm a kvantifikace se provádí pomocí kyseliny gallové (GAE – gallic acid equivalent) [27].

1.3.1.5 Stanovení celkového obsahu flavonoidů

Metoda stanovení celkového obsahu flavonoidů je založena na tvorbě komplexů flavonoidních sloučenin s chloridem hlinitým přičemž vznikají stabilní chelátové komplexy, které jsou barevné a měřitelné spektrofotometricky. V závislosti na převažujícím typu flavonoidů ve vzorku, se měření provádí při rozdílné vlnové délce např. 415 nm pro quercetin, nebo při 510 nm pro katechin [28, 29]. V této práci byla vhodná vlnová délka ověřena proměřením absorpčního spektra komplexu vytvořeného se vzorkem.

Existuje více modifikací této metody, které využívají kombinaci dalších činidel (např. NaNO_2 , octan sodný, či NaOH). Jejich přítomnost ovlivňuje stabilitu a intenzitu výsledného komplexu, čímž dochází ke zlepšení citlivosti a selektivity metody. Zatímco metody s octanovým pufrům jsou vhodné pro quercetinové deriváty, kombinace $\text{NaNO}_2 + \text{AlCl}_3 + \text{NaOH}$ poskytuje stabilní a intenzivní odezvu pro katechinové flavonoidy, což je výhodné zejména při analýze čajových extraktů.

Kvantifikace se provádí na základě kalibrační křivky s využitím vhodného standardu (např. quercetin nebo katechin). Výsledky jsou vyjádřeny jako ekvivalentní množství standardu vztahované na hmotnost vzorku (např. mg/g).

1.3.2 Měření barevnosti vzorků

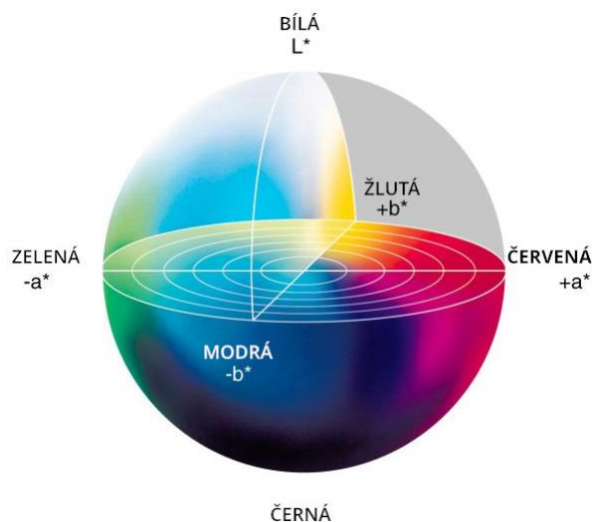
Barva je jedním z prvních parametrů, které spotřebitel u potravin vnímá. Vizuální vlastnosti ovlivňují nejen jeho rozhodování při nákupu, ale i celkové hodnocení kvality výrobku. V případě nápojů, jako je kombucha, může barevnost napovídat o stupni fermentace, typu použitého čaje a přítomnosti polyfenolických látek, zejména flavonoidů a jejich degradačních produktů [30].

K objektivnímu popisu barev se běžně používá kolorimetrický systém CIE Lab^* , který byl vytvořen Mezinárodní komisí pro osvětlování (CIE). Tento systém popisuje barvu pomocí tří ortogonálních souřadnic [31]:

- L^* vyjadřuje světlost (0 = černá, 100 = bílá),

- a^* udává pozici na zelenočervené ose ($-a^*$ = zelená, $+a^*$ = červená),
- b^* určuje pozici na modrožluté ose ($-b^*$ = modrá, $+b^*$ = žlutá).

Převodem hodnot Lab^* do válcového systému lze získat souřadnice C^* (chroma – sytost barvy) a h^* (hue – barevný tón). Tento tzv. CIE LCh* systém umožňuje detailnější interpretaci změn barevnosti v závislosti na chemickém složení nápoje[31].



Obrázek 5 Záznam LAB modelu[32]

Pro kvantifikaci rozdílů mezi dvěma barvami se používá celková barevná odchylka ΔE^* , která se počítá podle vztahu:

$$\Delta E^* = \sqrt{(L_2^* - L_1^*)^2 + (a_2^* - a_1^*)^2 + (b_2^* - b_1^*)^2} \quad (1)$$

Kde indexy 1 a 2 označují standard a porovnávaný vzorek. Hodnota ΔE^* vyjadřuje vnímatelnost rozdílu mezi dvěma barvami, přičemž rozdíly nad 3 jednotky jsou již pro většinu lidí zřetelně viditelné [31]. Interpretace výsledků ΔE^* může být následující:

- 0–1: rozdíl nepostřehnutelný
- 1–2: velmi slabý rozdíl
- 2–3,5: slabý až střední rozdíl
- 3,5: zřetelný rozdíl

1.4 VYSOKOÚČINNÁ KAPALINOVÁ CHROMATOGRAFIE

1.4.1 Princip HPLC

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) patří mezi separační techniky, které využívají rozdílnou míru interakce jednotlivých složek vzorku s mobilní a stacionární fází. Mobilní fází je kapalina, která je čerpána pod vysokým tlakem skrze chromatografickou kolonu naplněnou stacionární fází – obvykle tvořenou částicemi s přesně definovanou velikostí. Analyty se v koloně oddělují na základě rozdílů v jejich schopnosti vázat se ke stacionární fázi, čímž dochází k jejich postupné eluci v různých retenčních časech [33].

V současné praxi se nejčastěji používají chromatografické kolony s náplní o velikosti částic v rozmezí 3–5 μm . Při využití menších částic (pod 2 μm), typických pro techniku UHPLC, dochází ke zvýšení účinnosti separace, zkrácení doby analýzy a často i ke zlepšení rozlišení jednotlivých píků [34]. Díky své univerzálnosti je HPLC široce využívána při analýze složitých směsí, například v oblasti potravinářství, farmacie nebo biologických věd.

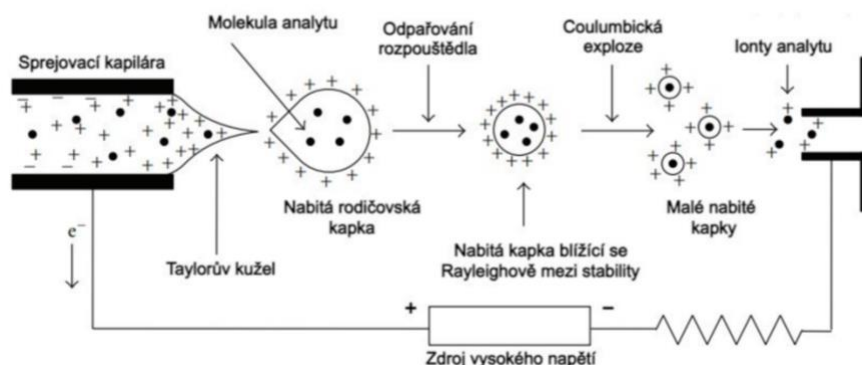
1.5 HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE

Hmotnostní spektrometrie (MS) představuje analytickou techniku, která umožňuje stanovení molární hmotnosti molekul a jejich fragmentů. Měření probíhá na základě separace iontů podle poměru hmotnosti a náboje (m/z). Přístroj se skládá ze tří základních částí – iontového zdroje, hmotnostního analyzátoru a detektoru. V iontovém zdroji dochází k ionizaci molekul a vzniku nabitých částic, které jsou následně analyzátozem separovány na základě jejich m/z a následně jsou pomocí detektoru detekovány [35, 36].

1.5.1 Ionizace elektrosprejem

Ionizace elektrosprejem (Electrospray Ionization – ESI) patří mezi měkké ionizační techniky, pracující za atmosférického tlaku. Molekula při ní získává pouze malé množství energie, díky tomu dochází k tvorbě iontů bez narušení její chemické struktury molekuly. Při detekci v kladném režimu vznikají především protonované molekuly $[M+H]^+$, popř. adukty s kationty kovů (Na^+ , K^+). V záporném režimu se tvoří deprotonované molekuly $[M-H]^-$ [35, 37].

Ionizace probíhá ve vysokonapěťové kapiláře. Na jejím výstupu vzniká vlivem elektrického pole tzv. Taylorův kužel, z něhož se uvolňují drobné nabitě kapky, které se rozpadají na menší částice vlivem coulombické exploze. Po postupném odpaření rozpouštědla se náboj přenáší na jednotlivé molekuly analytu, které následně vstupují do analyzátoru [35, 37].

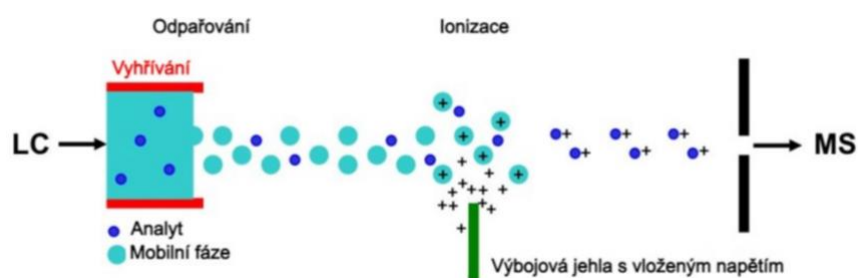


Obrázek 6 Schéma ionizace elektrosprejem[37]

1.5.2 Chemická ionizace za atmosférického tlaku

Chemická ionizace za atmosférického tlaku (Atmospheric Pressure Chemical Ionization – APCI) je další běžně používanou metodou pro spojení HPLC/MS. Výstupní kapilára z HPLC je vyhřívána, kapalina je rozprašována pomocí nosného plynu a následně ionizována koronovým výbojem. Při tomto procesu vznikají **protonované nebo deprotonované molekuly** v závislosti na polaritě vloženého napětí [35, 38].

Výhodou této techniky je menší citlivost na složení mobilní fáze a možnost analýzy jak vodných, tak organických roztoků [35].



Obrázek 7 Ionizace za atmosférického tlaku[39]

1.5.3 Hmotnostní analyzátory

Z iontového zdroje jsou vzniklé ionty vedeny do hmotnostního analyzátoru, kde dochází k jejich separaci na základě efektivních hmotností, tedy poměru hmotnosti a náboje (m/z). Mezi nejčastěji používané analyzátory patří kvadrupól, analyzátor doby letu (TOF), orbitrap, iontová cyklotronová rezonance (FT-ICR) nebo iontová past [36, 40].

Kvadrupólový analyzátor sestává ze čtyř hyperbolických tyčí, na které je přiváděno kombinované stejnosměrné a vysokofrekvenční střídavé napětí. Vzniklé elektrické pole umožňuje průchod pouze těm iontům, které oscilují stabilně a mají specifický poměr m/z . Ostatní ionty mají nestabilní trajektorii a jsou vychýleny z dráhy [36].

Analyzátor doby letu (TOF) pracuje na principu měření času, který iontům trvá průlet evakuovanou trubicí o definované délce. Lehčí ionty se pohybují vyšší rychlostí než ionty těžší, což umožňuje jejich rozlišení [36, 40].

K analyzátorům s vysokým rozlišením a přesností patří iontová cyklotronová rezonance (FT-ICR) a orbitrap. V obou případech se frekvence pohybu iontů přepočítává pomocí Fourierovy transformace (FT) na hodnotu m/z . FT-ICR dosahuje nejvyššího rozlišení ze všech dostupných analyzátorů a umožňuje detekci tisíců komponent bez potřeby jejich předchozí separace. Tyto přístroje jsou však velmi drahé a technologicky náročné [36, 40, 41]

Další variantou je iontová past, která umožňuje MS^n analýzu a studium struktury analytů. Lineární iontová past nabízí vyšší plnicí kapacitu a lepší detekční schopnosti než 3D past. Může být použita samostatně nebo jako součást hybridních systémů [36].

Tandemové uspořádání analyzátorů, často dvou kvadrupólů s kolizní celou mezi nimi, umožňuje hmotnostní spektrometrii v režimu MS/MS. V prvním kvadrupólu dochází k výběru prekurzorového iontu, který je následně fragmentován v kolizní reakci s plynem. Výsledné fragmenty jsou detekovány druhým kvadrupólem. Tato technika poskytuje vysoce specifické spektrum složené pouze z produktových iontů a je využívána pro cílenou analýzu látek i ve složitých maticích. V MS/MS se zpravidla využívají měkké ionizační techniky, jako je ESI nebo APCI [36, 42].

1.6 SPOJENÍ KAPALINOVÉ CHROMATOGRAFIE S HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIÍ

Spojení vysokoúčinné kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií (HPLC/MS) přináší synergii dvou výkonných analytických přístupů. HPLC zajišťuje kvalitní separaci složek i ve velmi složitých maticích, zatímco MS nabízí vysoce citlivou a selektivní detekci na základě m/z analyzovaných iontů. Jejich propojení umožňuje cílenou a přesnou identifikaci látek i v případech, kdy se vyskytují v nízkých koncentracích a v přítomnosti rušivých komponent.

Jednou z klíčových výhod tandemové hmotnostní spektrometrie (MS/MS) je schopnost sledovat specifické přechody mezi prekurzorovým a produktovým iontem. Tento režim, označovaný jako multiple reaction monitoring (MRM), umožňuje detekovat pouze vybraný analyt a potlačit interferenci jiných látek. Výsledkem je zlepšení poměru signálu k šumu, zvýšení spolehlivosti identifikace a výrazné snížení limitů detekce [35].

Díky těmto vlastnostem je HPLC-MS/MS oblíbenou metodou v oblastech, kde je vyžadována vysoká přesnost a selektivita, včetně farmaceutické analýzy, biomedicíny nebo hodnocení potravinářských produktů s obsahem přírodních antioxidantů [35].

1.7 ANALÝZA KOMBUCHY

1.7.1 Katechiny a příprava vzorku

Katechiny jsou hlavní polyfenolické složky kombuchy [16]. Do nápoje se dostávají extrakcí z čaje během přípravy nálevu, jejich obsah je ovlivněn druhem čaje, dobou louhování, teplotou vody a délkou fermentace [17, 22]. Nejvýznamnějšími zástupci jsou EGCG, EGC, EC a ECG. EGCG vykazuje nejsilnější antioxidační účinek a bývá nejvíce zastoupený v nápojích ze zeleného čaje [17, 22].

Během fermentace dochází k výrazným změnám obsahu katechinů. Mikroorganismy přítomné ve SCOBY metabolizují některé polyfenoly a současně mění pH a oxidačně-redukční podmínky prostředí [3, 7]. EGCG je náchylný k oxidaci, zejména za přístupu kyslíku a při vyšší teplotě, a může být přeměněn na epimerické nebo degradační produkty [13, 43]. Aktivita enzymů, jako jsou fenoloxidázy a peroxidázy, může rovněž přispívat k přeměnám katechinů na chinony nebo polymerní látky [44].

Katechiny slouží jako důležité ukazatele kvality nápoje. Přispívají k antioxidační aktivitě, chuti a bioaktivním vlastnostem kombuchy. Jejich sledování umožňuje hodnotit chemické změny během fermentace i vliv použitých surovin [12, 19].

Vývoj koncentrací jednotlivých katechinů během fermentace závisí na složení mikrobiální kultury, typu použitého čaje a délce kvašení [21]. V literatuře byly popsány poklesy obsahu EGCG a EGC až o 50 % během 10–14 dnů fermentace, zatímco koncentrace některých fenolických kyselin, vzniklých jejich rozkladem, naopak vzrostly [14, 45].

Pro analýzu katechinů je nutná standardizovaná příprava vzorku. Nejčastěji se fermentovaná kombucha před analýzou filtruje přes membránový filtr (0,22–0,45 μm) nebo se předfiltruje

a odstředí při 4000–10000 ot./min. po dobu několika minut. Takto upravený vzorek se může přímo analyzovat pomocí spektrofotometrických nebo chromatografických metod, případně se skladuje při teplotě 4 °C v temnu [8].

1.7.2 Stanovení antioxidační aktivity

Antioxidační aktivita kombuchy úzce souvisí s obsahem fenolických látek, zejména katechinů, flavonolů a fenolových kyselin. Tyto látky vykazují schopnost vychytávat volné radikály a chránit buňky před oxidačním stresem [6]. Míra antioxidační aktivity se mění v průběhu fermentace v závislosti na délce kvašení, typu čaje, počáteční koncentraci polyfenolů a složení mikrobiální kultury [46].

Pro hodnocení antioxidační aktivity se běžně používají kolorimetrické metody založené na reakcích s radikálovými nebo redoxními činidly. Mezi nejčastěji používané patří metody ABTS, DPPH a FRAP [47]. Tyto metody umožňují rychlé srovnání antioxidační kapacity různých vzorků a výsledky se vyjadřují obvykle jako ekvivalentní množství standardu Troloxu.

V průběhu fermentace kombuchy obvykle dochází k nárůstu antioxidační aktivity v prvních dnech kvašení. Tento nárůst je způsoben uvolňováním bioaktivních látek z čaje a tvorbou nových sloučenin mikroorganismy. Po dosažení maxima (nejčastěji mezi 7. a 10. dnem) může aktivita klesat v důsledku rozkladu a spotřeby antioxidantů.

Studie uvádějí, že kombucha vykazuje vyšší antioxidační účinek než nefermentovaný čajový nálev [22].

Antioxidační účinek závisí i na obsahu kofeinu, kyseliny glukuronové a dalších organických kyselin, které mohou působit synergicky. Fermentace zároveň přispívá ke zvýšení biologické dostupnosti některých fenolických složek a tím zvyšuje celkový zdravotní účinek nápoje.

1.7.3 Analýza fenolických látek pomocí separačních technik

Pro přesné stanovení fenolických sloučenin v kombuše se nejčastěji využívá vysokoúčinná kapalinová chromatografie [48]. Tato metoda umožňuje jak kvalitativní, tak i kvantitativní analýzu jednotlivých látek, včetně katechinů, flavonolů a fenolových kyselin [49]. Její hlavní výhodou je vysoká citlivost, dobrá reprodukovatelnost a schopnost analyzovat i složité matrice, jakou je fermentovaný nápoj [50].

Při analýze fenolických látek se nejčastěji používají systémy s obrácenými fázemi s využitím

oktadecylsilikagelové stacionární fáze (C18). Mobilní fázi pak tvoří směs methanolu nebo acetonitrilu s vodou, často okyselená kyselinou fosforečnou nebo octovou [51]. Na účinnost separace mají vliv různé parametry, jako je právě pH, dále teplota, rychlost toku a mobilní fáze či délka chromatografické kolony. Pečlivou optimalizací těchto podmínek lze dosáhnout účinného rozlišení i látek s velmi podobnými strukturami [33].

Detekce stanovených sloučenin probíhá nejčastěji pomocí UV/VIS detektoru nebo hmotnostního spektrometru [52]. Spojení HPLC s MS přináší výhodu vyšší specificity, a navíc umožňuje identifikaci i těch látek, pro které nejsou komerčně dostupné standardy [35].

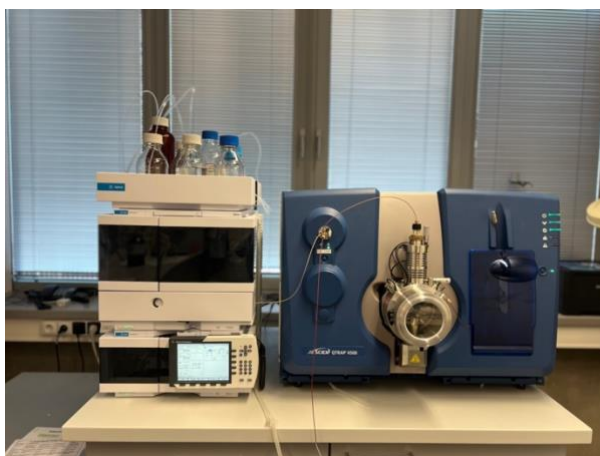
Při analýze kombuchy byly pomocí HPLC detekovány katechiny (EGCG, ECG, EGC, EC), kyselina gallová, kávová, ferulová, vanilinová a další fenolové kyseliny [53]. Jejich obsah se mění během fermentace v důsledku enzymatických a mikrobiálních biotransformací [53]. Kromě základních sloučenin byly rovněž zaznamenány deriváty polyfenolů vznikající oxidací a polymerací, jejichž přesná identifikace často vyžaduje pokročilé techniky HPLC/MS nebo MS/MS [54].

Jako alternativní separační metoda bývá v některých případech využívána kapilární elektroforéza (CE), která umožňuje separaci na základě rozdílů v jejich elektroforetické mobilitě [55]. CE je vhodná pro analýzu malých objemů a poskytuje vysoké rozlišení při krátkých časech separace. V některých studiích byla využita i micelární elektrokinetická chromatografie (MEKC), která rozšiřuje možnosti separace u látek s odlišnou polaritou [53].

2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

2.1 Přístroje a zařízení

K provedení analýzy fenolických látek metodou HPLC/MS byla využita chromatografická sestava Agilent 1260 Infinity II (Agilent Technologies, USA), která zahrnovala integrovaný termostat, degazér, autosampler a dvojitě čerpadlo mobilní fáze. Detekce byla zajištěna pomocí hmotnostního spektrometru QTRAP 4500 (AB SCIEX, USA).



Obrázek 8 HPLC/MS systém (foto autor)

Antioxidační aktivita byla stanovována pomocí UV/VIS spektrofotometru Shimadzu UV-2450 (Japonsko) viz obrázek 9.



Obrázek 9 UV/VIS spektrofotometr Shimadzu UV-2450 (foto autor)

Barevnost byla stanovována pomocí spektrofotometru UltraScan VIS (Hunter Associates Laboratory, Inc., USA)



Obrázek 10 Spektrofotometr UltraScan VIS[56]

pH bylo měřeno pomocí 913 pH metru (Metrohm, USA)

Pro separaci byla použita kolona Ascentis Express C18. Při přípravě vzorků a roztoků byly využity pipety značek Biohit-Proline a HandyStep, ultrazvuková lázeň (Kraintek), analytické váhy Kern 770, laboratorní chladnička, termostat a běžné vybavení pro manipulaci s vodou a chemikáliemi.

2.2 Použité chemikálie a materiály

2.2.1 Vlastní čajové nálevy





Pro přípravu vlastních extraktů byly použity dva druhy čajů v nálevových sáčcích běžně dostupných v maloobchodní síti – zelený čaj značky Lord Nelson (pyramidový sáček, 1,5 g; označení VZ-Z) a černý čaj Ahmad Tea – English Tea No. 1 (klasický sáček, 2,0 g; označení VZ-Č).

2.2.2 Komerčně dostupné kombuchy






K analýze byly dále použity zakoupené vzorky komerčně vyráběné kombuchy. Celkem bylo analyzováno 9 různých výrobků z různých čajových základů (zelený, černý, směsi, jasmín). Jejich přehled je uveden v tabulce 1..

Tabulka 1 Komerční vzorky kombuchy K1-K4

K1	K2	K3	K4
-----------	-----------	-----------	-----------

			
Stevikom	Nature Force	Nature Force	Country Life
zelený	černý	zelený	zelený

Tabulka 2 Komerční vzorky kombuchy K5-K9

K5	K6	K7	K8	K9
				
Nupreme	Captain Kombucha	Pragers	JZT	Bacilli
zelený	zelený	zelený	zelený/černý	zelený/jasmín

2.2.3 Standardy

Pro kvantitativní analýzu fenolických sloučenin byly použity standardy katechinu, epikatechinu, epigalokatechin-3-galátu, kyseliny gallové, kyseliny chlorogenové, rutinu, isokvercetin a K-glukosidu (vše Sigma Aldrich, USA). Pro stanovení antioxidační aktivity byl jako standard využit Trolox.

2.2.4 Ostatní chemikálie

Příprava roztoků a mobilních fází probíhala za použití deionizované vody (systém Milli-Q, Merck) a HPLC-grade metanolu (Sigma Aldrich, USA). Pro přípravu pufrů a činidel byly dále použity: kyselina mravenčí (pro úpravu pH mobilní fáze), 2M Folin-Ciocalteuovo činidlo (Sigma Aldrich, USA), ABTS, $K_2S_2O_8$, Na_2CO_3 (Sigma Aldrich, Lach-Ner, ČR).

2.3 Pracovní postupy

2.3.1 Vzorky a jejich příprava

Pro účely fermentace byly připraveny dva typy čajových nálevů – zelený a černý. Čajové sáčky byly nejprve zváženy a poté zality 3600 ml horké vody z vodovodního řadu. Doba louhování byla stanovena na 5 minut. Po ochlazení byl do každého nálevu přidán startér z předchozí fermentace v objemu 400 ml, dále 400 g sacharózy a kultura SCOBY. Objem každého připraveného fermentačního vzorku činil 1 litr (celkem 8 vlastních vzorků viz obrázek 11 a 12).



Obrázek 11 Vlastní vzorky kombuchy vz1-vz4



Obrázek 12 Vlastní vzorky kombuchy vz5-vz8

Vzorky byly fermentovány celkem ve dvou teplotních režimech – čtyři vzorky při teplotě 21 °C a čtyři při teplotě 25 °C. V obou skupinách byly fermentovány vždy dva vzorky zeleného a dva vzorky černého čaje. Fermentace probíhala po dobu 13 dnů, během níž bylo téměř každodenně odebíráno 10 ml vzorku ve stejnou denní dobu.

Odebrané vzorky byly analyzovány bez další úpravy. Nebyly tedy ředěny ani pro spektrofotometrická stanovení antioxidační aktivity, ani pro analýzu pomocí HPLC/MS.

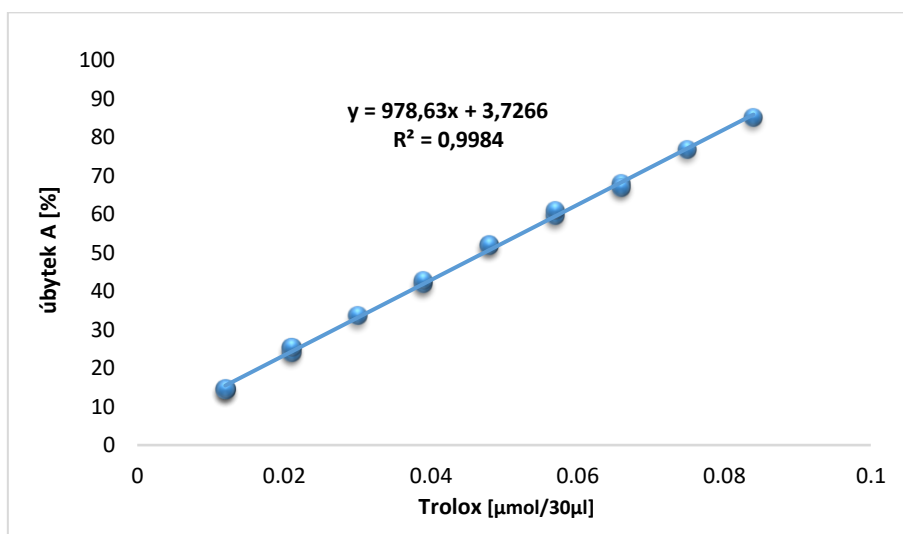
U spektrofotometrických metod bylo každé měření provedeno pětkrát, zatímco u HPLC/MS analýzy byly každé vzorky měřeny dvakrát.

2.3.2 Spektrofotometrické stanovení antioxidační aktivity

Bylo provedeno pět spektrofotometrických stanovení: metoda ABTS, FRAP, DPPH, stanovení celkového množství fenolických látek (TPC) a stanovení flavonoidů dvěma způsoby (TFC). Pro každou metodu byl před samotným měřením optimalizován objem dávkovaného vzorku, a to na základě závislosti absorbance na přidávaném objemu vzorku.

2.3.2.1 Metoda ABTS (metoda TEAC)

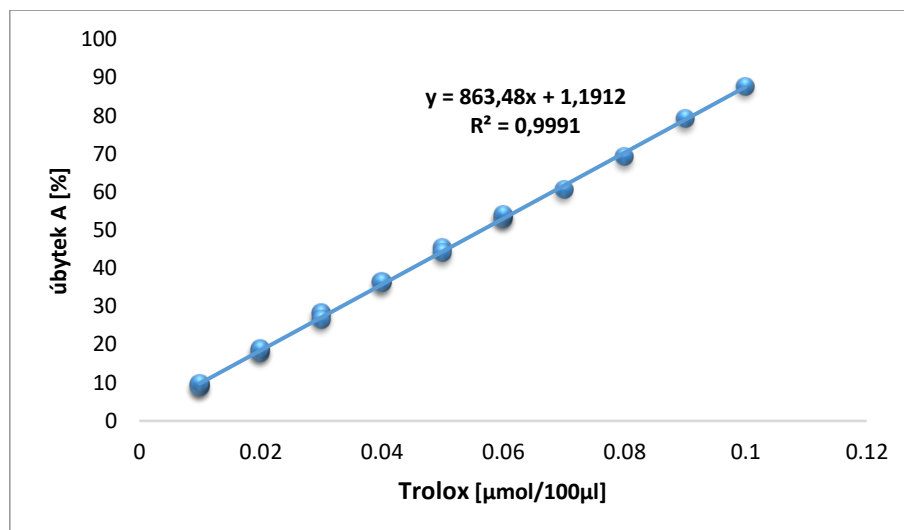
Kationtový radikál ABTS^{•+} byl připraven rozpuštěním 10 mg ABTS v 5 ml deionizované vody, ke které bylo přidáno 100 μ l roztoku K₂S₂O₈ (0,064 mol/l). Roztok byl uchovávan ve tmě při laboratorní teplotě po dobu 12–16 hodin. Poté byl ředěn deionizovanou vodou tak, aby jeho absorbance při 734 nm činila 0,8–0,9. Pro měření bylo do 3 ml tohoto roztoku přidáno 30 μ l vzorku, směs byla promíchána a ponechána reagovat po dobu 60 minut při pokojové teplotě. Kalibrační křivka je zobrazena na obrázku 13.



Obrázek 13 Kalibrační křivka závislosti úbytku A na množství Troloxu pro metodu ABTS

2.3.2.2 Metoda FRAP

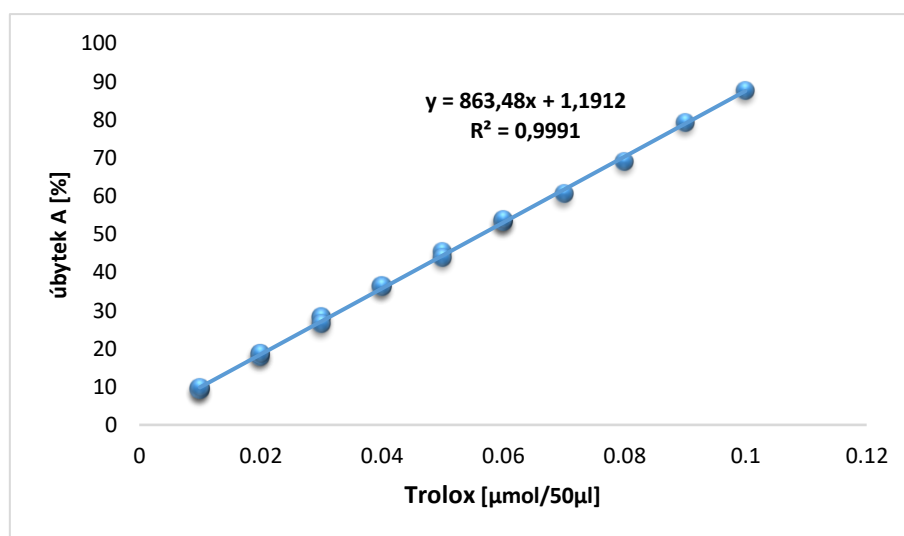
Pracovní roztok vznikl těsně před měřením smícháním roztoku TPTZ (rozpuštěného v 5 ml 40 mmol/l HCl a doplněného vodou na 10 ml), roztoku FeCl₃ (20 mmol/l) a acetátového pufru o pH 3,6 v poměru 1:1:10. Do 3 ml činidla bylo přidáno 100 μ l vzorku, směs byla promíchána a po 10 minutách byla měřena absorbance při 593 nm. Kalibrační křivka je uvedena na obrázku 14.



Obrázek 14 Kalibrační křivka závislosti úbytku A na množství Troloxu pro metodu FRAP

2.3.2.3 Metoda DPPH

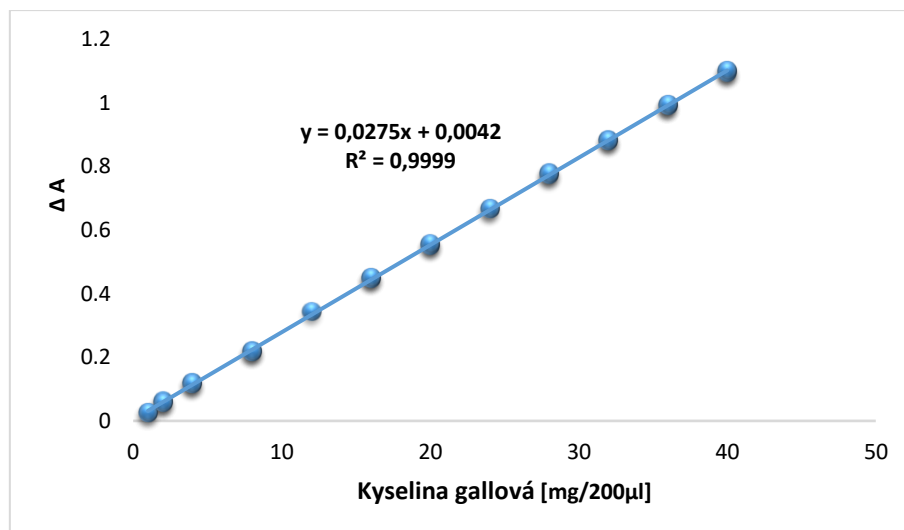
Roztok DPPH (0,004 g ve 25 ml methanolu) byl upraven na objem 50 ml a dále ředěn tak, aby jeho absorbance při 517 nm činila 0,8–0,9. Pro měření bylo do 3 ml DPPH roztoku přidáno 50 μl vzorku. Směs byla inkubována 30 minut ve tmě při laboratorní teplotě. Kalibrační křivka je zobrazena na obrázku 15.



Obrázek 15 Kalibrační křivka závislosti úbytku A na množství Troloxu pro metodu DPPH

2.3.2.4 Stanovení celkového množství fenolických látek

Do 2 ml ředěného Folin-Ciocalteuova činidla (1:20) bylo přidáno 200 μl vzorku, po promíchání byla směs ponechána 5 minut při laboratorní teplotě. Poté bylo přidáno 1 ml 7,5% Na_2CO_3 a po 30 minutách ve tmě byla měřena absorbance při 750 nm. Kalibrační křivka je zobrazena na obrázku 16.



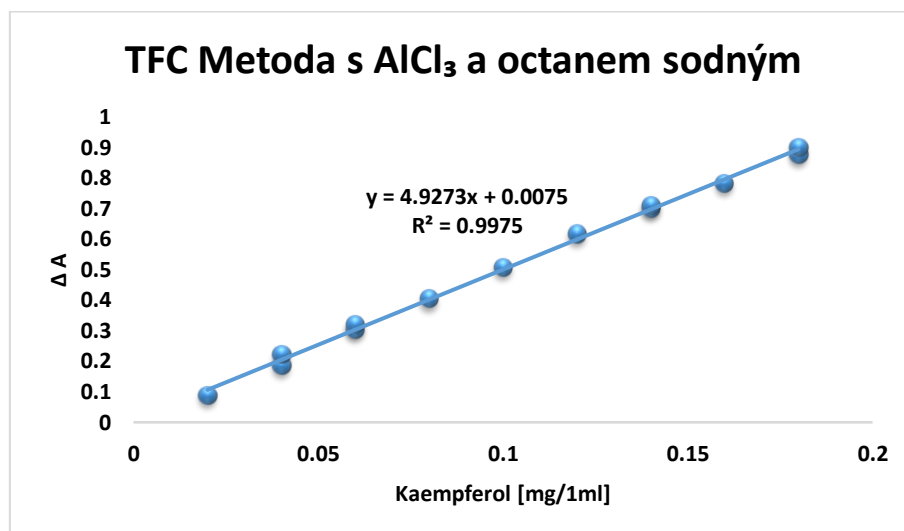
Obrázek 16 Kalibrační křivka závislosti úbytku A na množství kyseliny gallové

2.3.2.5 Stanovení celkového množství flavonoidů

Pro stanovení celkového množství flavonoidů ve vzorcích kombuchy byly zvoleny dvě kolorimetrické metody, obě založené na tvorbě komplexů s chloridem hlinitým. První metoda využívala kombinaci dusičnanu sodného, chloridu hlinitého a hydroxidu sodného. Druhá metoda spočívala v reakci flavonoidů s AlCl_3 s octanem sodným. Výběr dvou různých přístupů umožnil porovnat jejich citlivost a vhodnost pro různé typy vzorků.

Stanovení celkového množství flavonoidů – metoda s NaNO_2 , AlCl_3 a NaOH

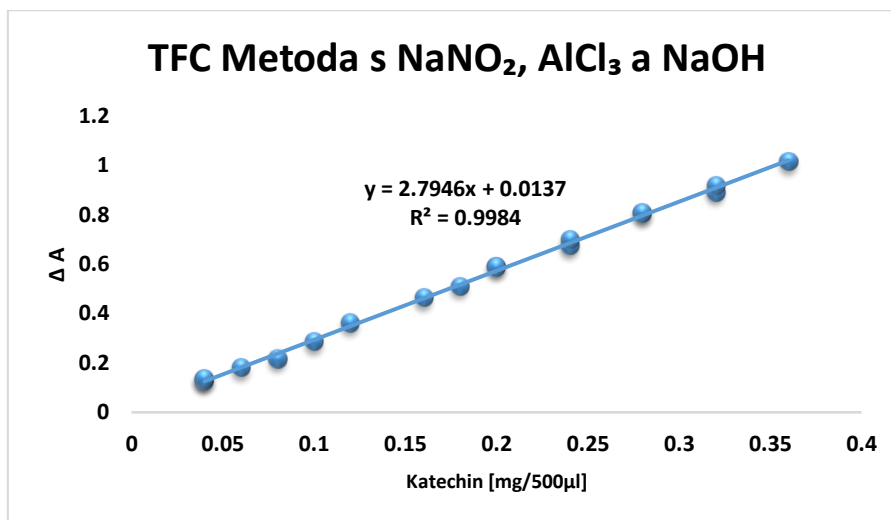
K 0,5 ml vzorku bylo přidáno 2 ml vody a 150 μl 5% NaNO_2 . Po 5 minutách byla přidána 150 μl 10% AlCl_3 , následně po 1 minutě 1 ml 1M NaOH . Objem byl doplněn na 5 ml a absorbance měřena při 500 nm. Kalibrační křivka je zobrazena na obrázku 17.



Obrázek 17 Kalibrační křivka závislosti úbytku A na množství kaempferolu

Stanovení celkového množství flavonoidů – metoda s AlCl_3 a octanem sodným

K 1 ml vzorku bylo přidáno 0,2 ml 10% AlCl_3 a 0,2 ml 1M octanu sodného. Objem byl doplněn na 7 ml a po 30 minutách při laboratorní teplotě byla měřena absorbance při 408 nm. Kalibrační křivka je zobrazena na obrázku 18.



Obrázek 18 Kalibrační křivka závislosti úbytku A na množství katechinu

2.3.3 Statistické vyhodnocení vyhodnocení kalibračních závislostí

Všechny kalibrační závislosti byly vyhodnoceny pomocí statistického programu QC Expert (verze 2.9, TriloByte). Byla provedena lineární regrese a identifikace odlehlých hodnot pomocí Jackknife reziduí, Pregibonova, William's a L-R grafu. Na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ byl testován význam parametrů pomocí Studentova t-testu. U metod ABTS, DPPH, TPC a jedné metody TFC byl prokázán významný absolutní člen (přímka neprochází počátkem). U metody FRAP byl absolutní člen nevýznamný (přímka prochází nulou).

2.3.4 Měření barevnosti

Vzorky kombuchy byly před měřením temperovány na laboratorní teplotu a přeneseny do 50ml zkumavek. Následně byly centrifugovány při 7000 ot./min po dobu 5 minut, aby došlo k odstranění usazenin a oxidu uhličitého.

Barevnost byla měřena pomocí spektrofotometru **HunterLab UltraScan VIS** vybaveného integrační koulí s geometrií $d/8^\circ$ a standardizovaným osvětlením D65. Pro měření byly použity skleněné kyvety o délce optické dráhy 50 mm, aby bylo dosaženo realistického vzhledu nápoje obdobného pozorování ve sklenici.

Před každým měřením byla provedena kalibrace přístroje – nejprve pomocí černé referenční destičky a následně na slepý vzorek tvořený destilovanou vodou.

U každého vzorku byly zaznamenány hodnoty barevnosti L^* , a^* , b^* , C^* a h° . Výsledky byly zpracovány v programu Microsoft Excel. Pro hodnocení rozdílu barev mezi jednotlivými vzorky a referenčním standardem byla vypočtena hodnota ΔE^* .

2.3.5 HPLC/MS analýza kombuchy

Vzorky fermentované kombuchy byly připraveny postupem uvedeným v kapitole 2.3.1. Vzorky pro HPLC/MS analýzu nebyly nijak ředěny.

Přímou infuzí standardů fenolických látek do hmotnostního spektrometru QTRAP 4500 a ionizací elektrosprejem byla nejprve provedena optimalizace MRM (Multiple Reaction Monitoring) přechodů pro kvantitativní analýzu vybraných fenolických látek přítomných v kombuše. Ze standardů byly sledovány především deriváty katechinů, chlorogenová a neochlorogenová kyselina, kryptochlorogenová a galová kyselina, rutin, isokvercetin a kaempferol glykosylované deriváty.

Jednotlivé retenční charakteristiky byly vyhodnoceny s využitím různých typů kolon popsaných v kapitole x. Mobilní fázi tvořila voda okyselená 0,1 % kyselinou mravenčí jako fáze A a čistý methanol jako fáze B. Teplota kolony byla nastavena na 40 °C a průtok mobilní fáze byl 0,4 ml/min. Jako nejvhodnější pro separaci katechinů se ukázala reverzní fáze Ascentis Express C18 o délce 5 cm, s částicemi o velikosti 2 μm a vnitřním průměrem 2,1 mm. Použitý gradient eluce byl 18–70 % methanolu během 2,5 minut.

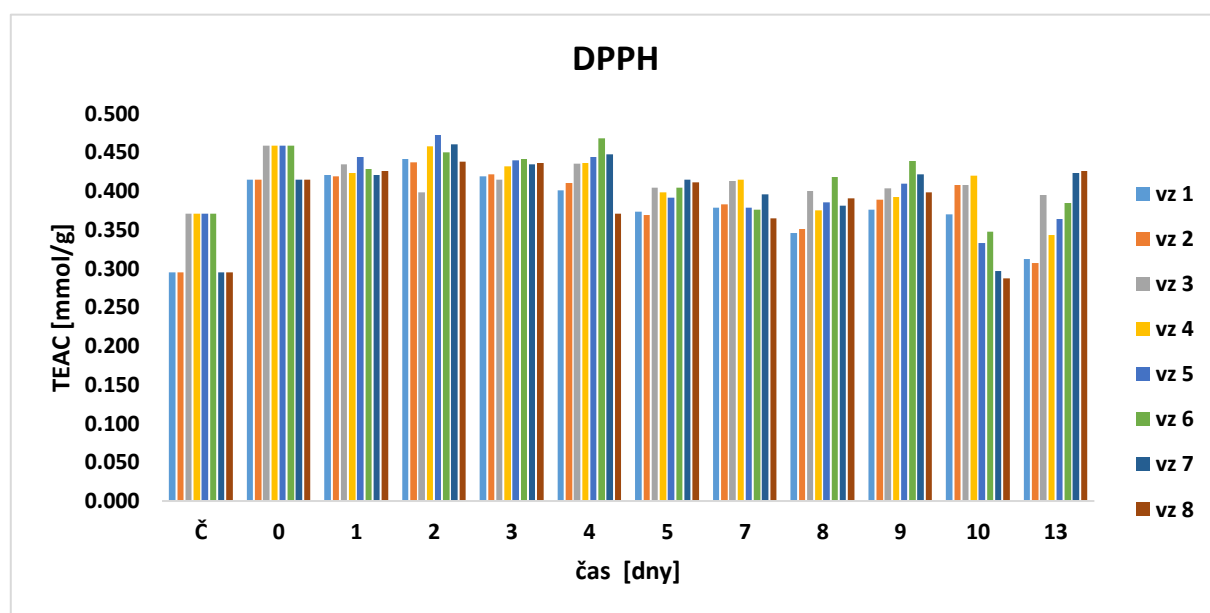
Pro přípravu kalibrační řady byl použit zásobní roztok o koncentraci 100 $\mu\text{g/ml}$ připravený v methanolu. Z tohoto roztoku byly odpipetovány příslušné objemy a doplněny 20% methanolem s přídavkem 0,1 % kyseliny mravenčí tak, aby vznikly kalibrační roztoky v koncentracích 10; 25; 50; 75; 100; 200; 400; 600; 800 a 1000 $\mu\text{g/l}$. Při měření byly dále vyhodnoceny meze detekce, stanovitelnosti a linearita odezvy jednotlivých analytů.

MRM přechody pro kvantitativní analýzu spolu s optimálními hodnotami deklastračního potenciálu (DP), kolizní energie (CE) a výstupního potenciálu kolizní cely (CXP) jsou uvedeny v příloze v tabulce 10.

3 VÝSLEDKY A DISKUZE

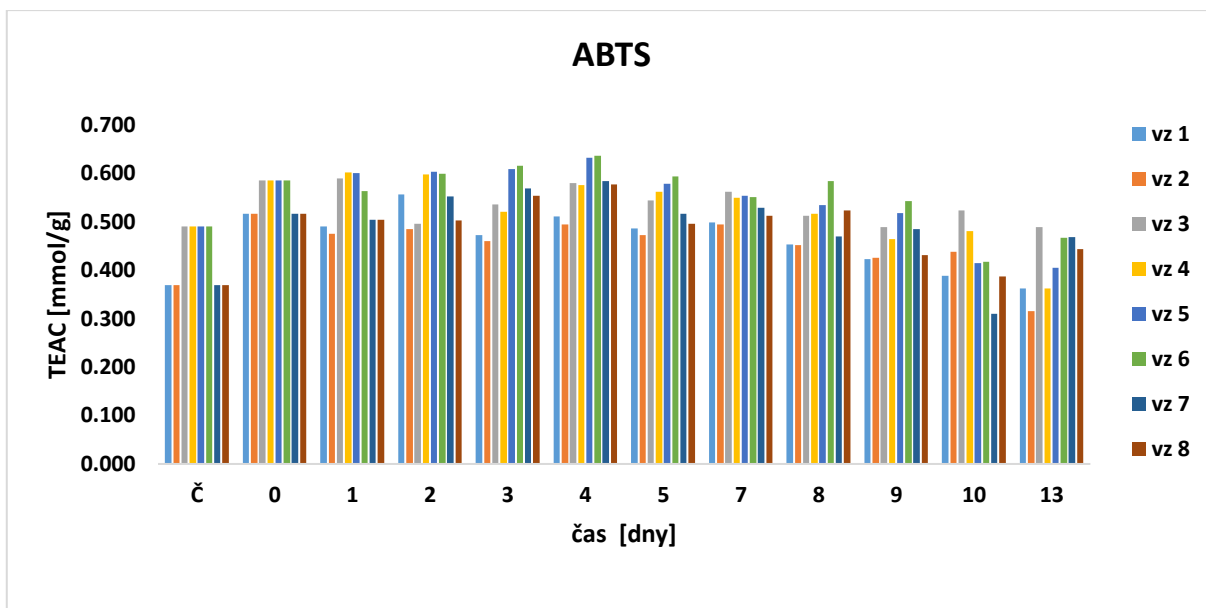
Výsledky stanovení antioxidantů ve vzorcích kombuchy v průběhu fermentace ukázaly, že antioxidační aktivita a obsah fenolických látek se liší nejen podle použité metody, ale také podle typu čaje (zelený vs. černý) a teploty fermentace. Vzorky vz1, vz2, vz7 a vz8 byly připraveny ze **zeleného čaje**, zatímco vzorky vz3–vz6 ze **černého čaje**. Fermentace probíhala po dobu 13 dní a hodnoty byly odečítány pro 12 časových bodů (č je označení pro samotný čajový nálev a následující dny jsou číslovány 0-13).

Výsledky metody DPPH (Obrázek 19) ukazují mírný nárůst antioxidační aktivity u většiny vzorků v prvních dnech fermentace (do 3.–4. dne), následovaný mírným poklesem. Nejvyšší hodnoty byly naměřeny u vzorku **vz6** (černý čaj, 25 °C), zejména mezi 3.–5. dnem. Vzorky ze zeleného čaje (např. vz2) vykazovaly celkově nižší aktivitu. U několika vzorků (např. vz8) dochází ke zvýšení hodnoty v poslední den fermentace, což může být důsledkem biologické variace



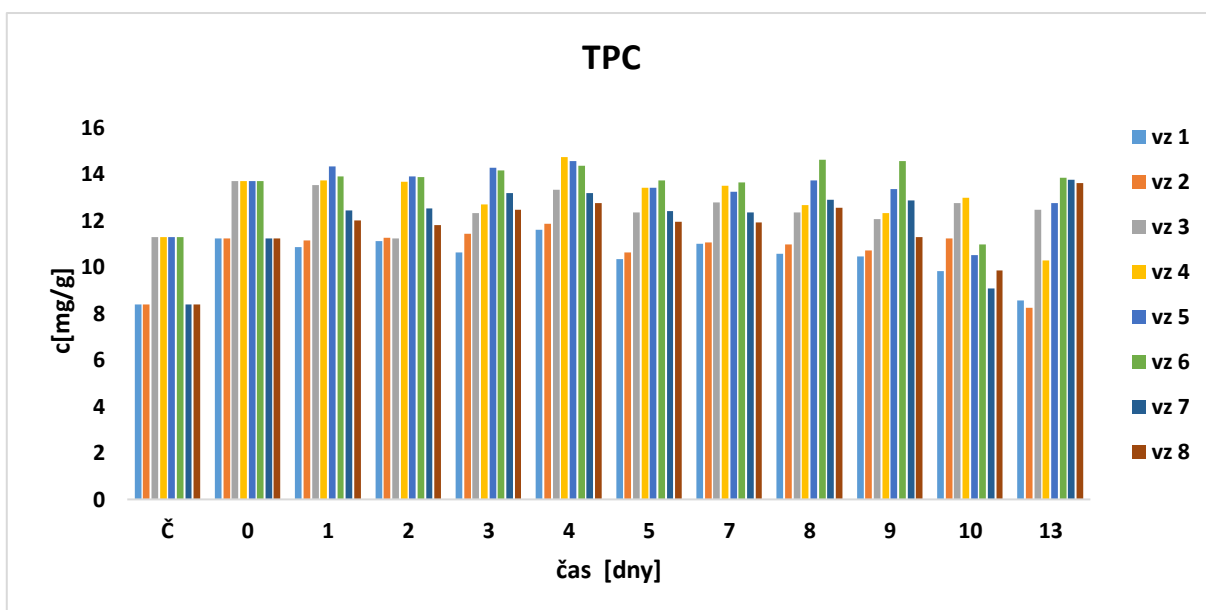
Obrázek 19 Antioxidační aktivita metodou DPPH v průběhu fermentace

U metody ABTS (Obrázek 20) je trend velmi podobný jako u DPPH – počáteční růst aktivity během prvních 3–5 dní a následný pokles. Nejvyšší hodnoty byly znovu pozorovány u vzorků vz6 a vz5 (černý čaj). U vzorků vz1 a vz2 (zelený čaj) byla aktivita stabilnější, ale nižší. Také zde se u některých vzorků objevuje opětovný nárůst v posledních dnech.



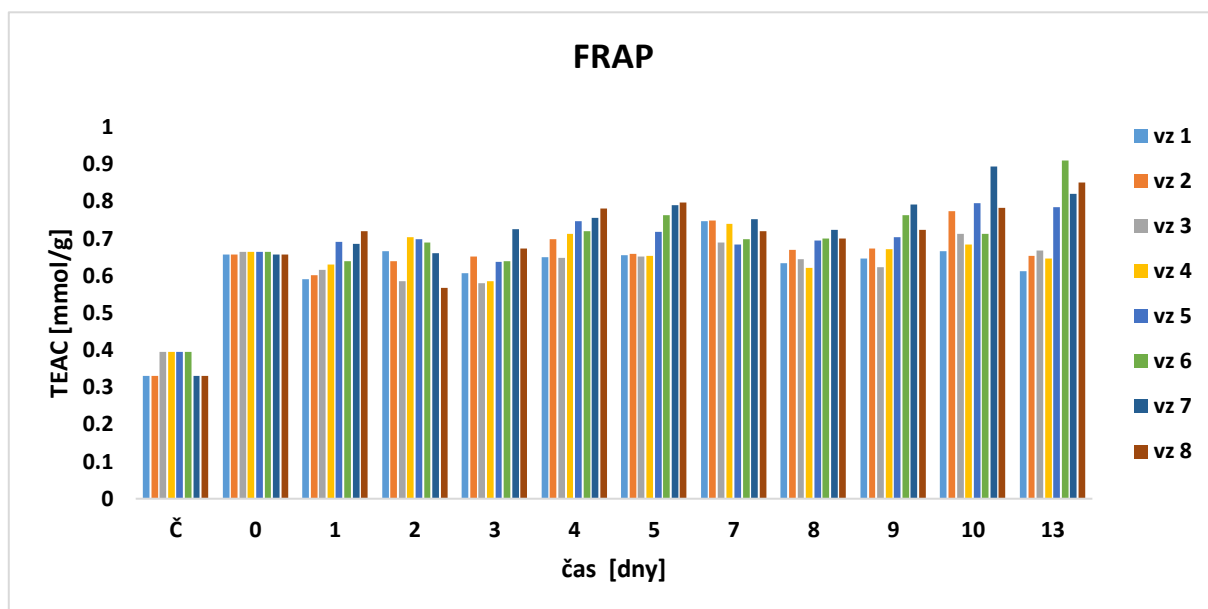
Obrázek 20 Antioxidační aktivita metodou ABTS v průběhu fermentace

Obsah celkových fenolických látek (TPC – Obrázek 21) rovněž rostl během prvních 4–5 dní, poté docházelo k poklesu. Nejvyšší hodnoty byly dosaženy u vzorků vz5 a vz6, které byly připraveny z černého čaje a fermentovány při vyšší teplotě. U zeleného čaje (vz1, vz2, vz7, vz8) byl celkový obsah fenolů nižší, ale stabilnější. Tento vývoj odpovídá očekávání, protože černý čaj má vyšší obsah polymerizovaných polyfenolů, které mohou být během fermentace rozkládány na jednodušší formy.



Obrázek 21 Celkový obsah fenolických látek stanovený metodou Folin-Ciocalteu (TPC)

Výsledky metody FRAP (Obrázek 22) vykazují odlišný trend než předchozí metody – redukční schopnost vzorků postupně narůstá po celou dobu fermentace. Tento rozdíl je pravděpodobně způsoben tím, že metoda FRAP není založena na zachycování volných radikálů, ale na donoru elektronů. Nejvyšší redukční schopnost byla naměřena u vzorku vz6 a vz5.



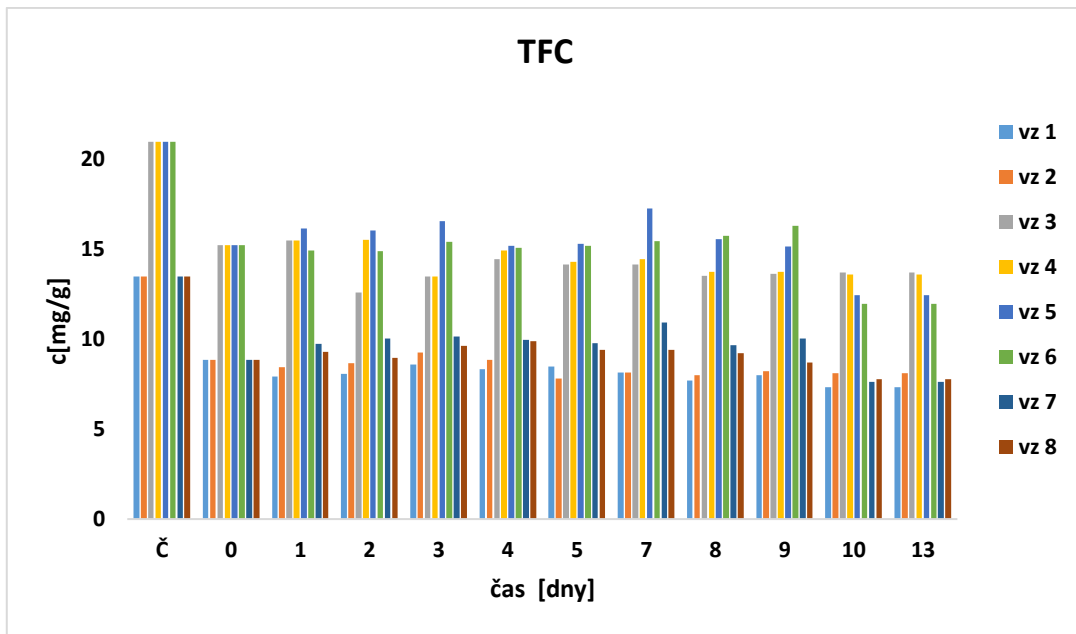
Obrázek 22 Antioxidační aktivita metodou FRAP v průběhu fermentace

Použití dvou kolorimetrických metod pro stanovení flavonoidů bylo zvoleno záměrně, neboť každá z metod vykazuje rozdílnou selektivitu vůči různým typům flavonoidních sloučenin. Metoda s AlCl_3 a octanem sodným (TFC 2) je obecně citlivější k flavonolům, jako jsou glykosidy kaempferolu a kvercetinu. Naproti tomu metoda s NaNO_2 , AlCl_3 a NaOH (TFC 1) lépe reaguje na katechiny a další flavanoly, které se vyskytují zejména v zeleném a černém čaji.

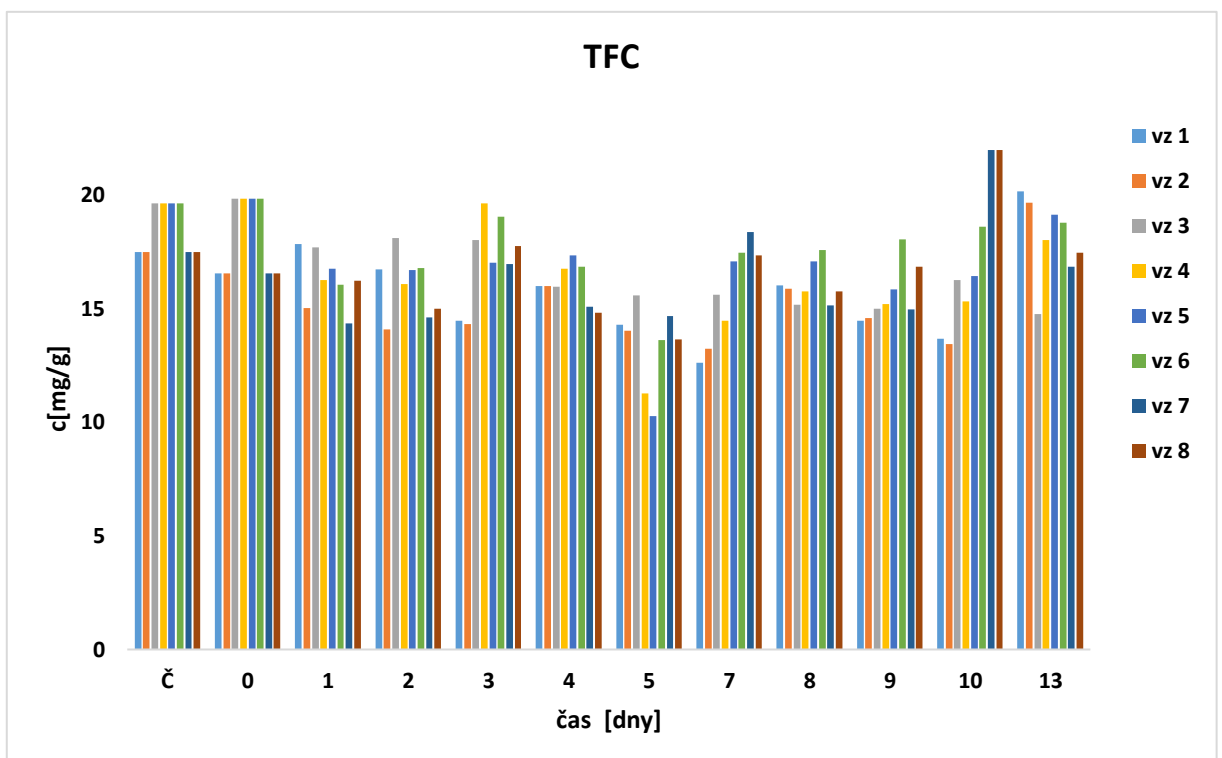
Tato specifita se odráží i ve výsledcích. Zatímco metoda TFC 2 (Obr. 23) vykazovala relativně stabilní hladiny flavonoidů po celou dobu fermentace, metoda TFC 1 (Obr. 24) prokázala vyšší variabilitu. To lze vysvětlit tím, že katechiny jsou biologicky aktivnější a během fermentace se přeměňují nebo rozkládají, což způsobuje fluktuace jejich koncentrací. Glykosidicky vázané flavonoly naproti tomu vykazují větší stabilitu a jejich koncentrace zůstávají víceméně konstantní.

Z těchto rozdílů je patrné, že jednotlivé metody zachycují jinou skupinu sloučenin a jejich kombinace poskytuje komplexnější pohled na vývoj flavonoidního profilu během fermentace.

Přítomnost výrazného výkyvu u vzorku vz7 v závěru fermentace (TFC 2) může být artefaktem, nebo odrazem nahromadění specifických metabolitů.



Obrázek 23 Obsah flavonoidů stanovený metodou TFC s octanem hlinitým



Obrázek 24 Obsah flavonoidů stanovený metodou TFC s NaOH

3.1 Porovnání spektrofotometrických metod

Pro porovnání jednotlivých spektrofotometrických metod byla z průměrných hodnot všech měření vypočtena korelační matice pomocí Pearsonova korelačního koeficientu. Vyhodnocení bylo provedeno v programu STATISTICA 14 a výsledky jsou uvedeny v tabulce 3.

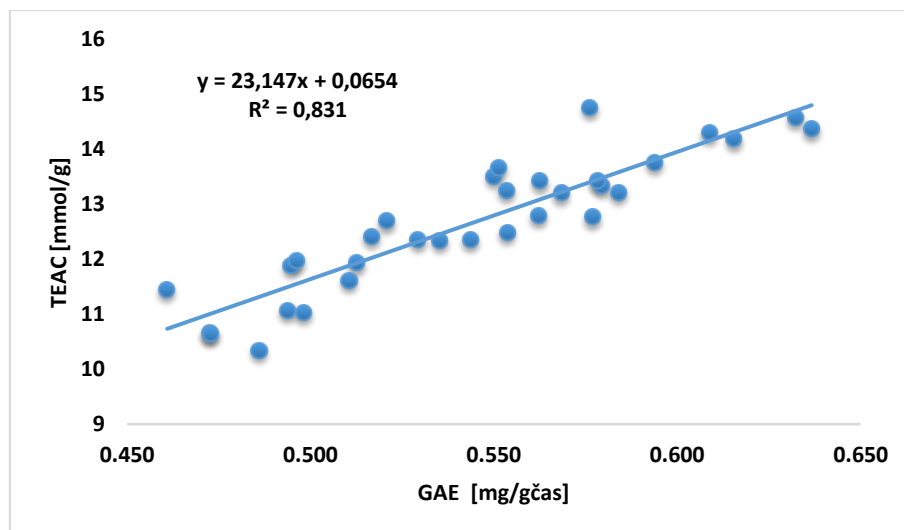
Pearsonův korelační koeficient nabývá hodnot v rozmezí od -1 do 1 . Hodnota blíží se 1 značí silnou pozitivní lineární závislost, hodnota blíží se -1 naopak silnou negativní lineární závislost. Hodnoty blíží se nule indikují velmi slabou nebo žádnou lineární závislost mezi proměnnými.

Tabulka 3 Korelační matice mezi jednotlivými metodami (Pearsonovo r)

	DPPH	ABTS	TPC	FRAP	TFC 408	TFC 500
DPPH	1	0,911252	0,15141	0,749863	0,262891	0,534473
ABTS	0,911252	1	0,145093	0,836977	0,307581	0,553293
TPC	0,15141	0,145093	1	-0,16057	-0,31548	-0,14213
FRAP	0,749863	0,836977	-0,16057	1	0,242264	0,32709
TFC 408	0,262891	0,307581	-0,31548	0,242264	1	0,38263
TFC 500	0,534473	0,553293	-0,14213	0,32709	0,38263	1

Nejvyšší korelace byla zaznamenána mezi metodami DPPH a ABTS ($r = 0,91$), což ukazuje na jejich podobný princip založený na schopnosti odchyvat volné radikály. Významná pozitivní korelace byla také mezi ABTS a FRAP ($r = 0,84$) a mezi DPPH a FRAP ($r = 0,75$), i když metoda FRAP sleduje spíše redukční schopnost než radikálovou aktivitu.

Metoda TPC, která stanovuje celkové fenoly, nevykazuje s ostatními testy výraznější korelaci. Hodnoty pro TFC (stanovení flavonoidů s octanem hlinitým a NaOH – TFC 408, a metoda bez NaOH – TFC 500) korelují se zbytkem metod spíše slabě ($r < 0,56$), což odpovídá jejich specifickému zaměření na užší skupinu fenolických látek.



Obrázek 25 Závislost hodnot ABTS na obsahu fenolických látek (TPC)

Ze všech analyzovaných kombinací spektrofotometrických metod vykázala nejvyšší míru korelace dvojice ABTS a TPC ($r = 0,91$), což ukazuje na silnou lineární závislost mezi antioxidační aktivitou měřenou metodou ABTS a obsahem fenolických látek stanoveným metodou Folin-Ciocalteu. Tato vazba naznačuje, že právě fenolické látky se výrazně podílejí na celkové antioxidační kapacitě kombuchy. Pro svoji vysokou vypovídací hodnotu byla tato dvojice zvolena k vizualizaci pomocí regresního grafu viz obrázek 25.

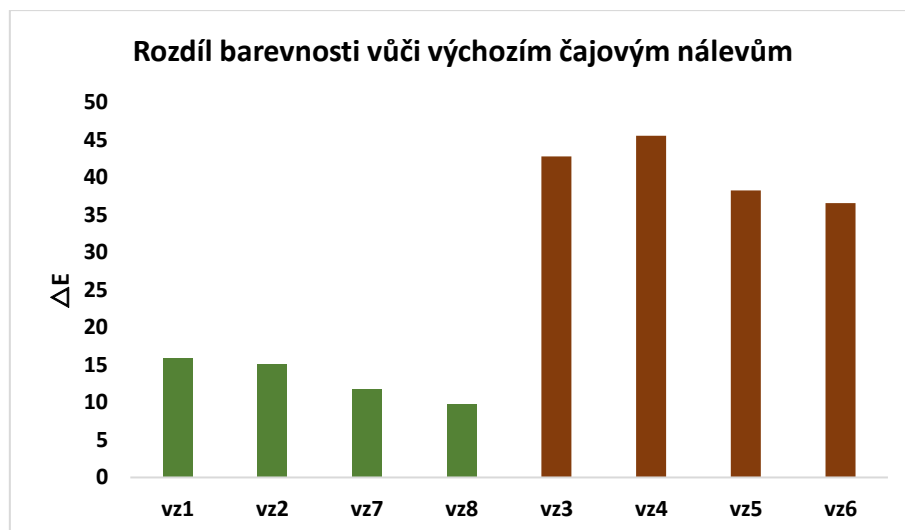
Ostatní metody vykazovaly korelace nižší či méně jednoznačné, a jejich zařazení by nepřispělo k lepší interpretaci vztahů mezi stanovenými parametry.

3.2 Barevnost vzorků během fermentace

Ve vzorcích připravených ze **zeleného čaje** (vz1, vz2, vz7, vz8) byly hodnoty ΔE obecně nižší, což ukazuje, že fermentace udržela barvu nálevu poměrně blízko původnímu vzhledu – ΔE se pohybovalo kolem 10–15 (viz tabulka 4). Nejnižší rozdíl byl zaznamenán u vzorku **vz8**, což značí téměř identickou světelnost a pouze mírný posun v barevném tónu.

Tabulka 4 Změna barevnosti 8 vlastních vzorků kombuchy

vzorek	Vz1	Vz2	Vz3	Vz4	Vz5	Vz6	Vz7	Vz8
ΔE^*	15,95	15,12	42,81	45,58	38,27	36,61	11,84	9,77



Obrázek 26 Rozdíl barevnosti vůči čajovým nálevům

Naopak vzorky z **černého čaje** (vz3, vz4, vz5, vz6) vykazovaly hodnoty ΔE kolem **35–45**, což představuje **výraznou změnu barevnosti** oproti výchozímu nálevu (viz obrázek 26). Tento rozdíl lze přisoudit tmavší výchozí barvě čaje, vyššímu obsahu polyfenolů a intenzivnějším fermentačním změnám, které ovlivnily jak světlost, tak odstín výsledného nápoje.

Největším komerčním vzorkem je k6 ($L = 99,50$), který se vyznačuje velmi vysokou světlostí a slabým žlutým tónem. Nejbližší k tomuto vzorku má fermentovaný vzorek *vz1 ($L = 101,56$), připravený ze zeleného čaje. Oba vzorky mají nízké hodnoty chromatičnosti ($C < 14$) a podobný barevný odstín ($h^\circ \approx 91-97$).

Nejtmavším komerčním vzorkem je k7 ($L = 91,21$)**, připravený z černého čaje. Má nejnižší hodnotu světlosti a zároveň jednu z nejvyšších sytostí ($C = 27,1$). Vlastní vzorky připravené z černého čaje (zejména vz5 a vz6) mají rovněž nižší L^* ($95,72$ a $94,66$) a vyšší sytost ($C^* > 29$), což odpovídá typickému vzhledu fermentovaných nápojů z černého čaje.

Vzorek k2, rovněž z černého čaje, má $L^* = 91,62$ a velmi podobný odstín jako vlastní vzorek vz3 ($h^\circ = 92,7$ vs. $85,98$). Oba vykazují sytě žlutohnědý tón.

Vzorek k8, připravený jako směs černého a zeleného čaje, má hodnoty L^* , C^* a h° velmi podobné vzorkům vz7 a vz8, které vznikly fermentací čistě zeleného čaje (viz tabulka 5). To naznačuje, že podíl zeleného čaje významně ovlivňuje výslednou světlost i barevný tón směsných nápojů.

Celkově lze konstatovat, že vlastní vzorky fermentované ze zeleného čaje (vz1, vz2, vz7, vz8) barevně odpovídají světlým komerčním kombuchám, zatímco vzorky z černého čaje (vz3, vz4,

vz5, vz6) vykazují podobné rysy jako tmavší komerční vzorky připravené ze stejného čajového základu (k2, k8).

Tabulka 5 Naměřené hodnoty L*, a*, b*, C*, h°

vzorek	L*	a*	b*	L*	C*	h
voda	102,99	-0,18	-0,1	102,99	0,21	210,07
černý čaj	75,84	11,305	59,77	75,84	60,83	79,29
zelený čaj	95,88	-0,28	20,61	95,88	20,61	90,775
vz1	101,56	-0,71	5,71	101,56	5,755	97,145
vz2	100,7	-0,605	6,285	100,7	6,32	96,005
vz3	96,83	-1,155	24,6	96,83	24,625	92,69
vz4	97,855	-1,015	21,805	97,855	21,83	92,685
vz5	95,715	-0,66	29,33	95,715	29,335	91,29
vz6	94,655	-0,45	30,65	94,655	30,66	90,84
vz7	99,895	-0,75	9,48	99,895	9,51	94,54
vz8	99,795	-0,895	11,685	99,795	11,72	94,395
k1	97,795	-0,195	15,115	97,795	15,115	90,74
k2	91,62	1,71	24,31	91,62	24,37	85,98
k3	98,115	0,075	10,73	98,115	10,73	89,59
k4	97,665	0,025	11,815	97,665	11,815	89,885
k5	95,725	-0,015	21,245	95,725	21,245	90,035
k6	99,495	-0,4	13,705	99,495	13,715	91,675
k7	91,21	1,69	27,045	91,21	27,095	86,42
k8	95,67	-0,65	18,835	95,67	18,845	91,975
k9	97,19	-0,69	18,975	97,19	18,99	92,09

3.3 Senzorické hodnocení kombuchy

Senzorické hodnocení probíhalo v několika fázích fermentace, konkrétně ve dnech 0, 1–2, 3–4, 5–7 a 8–13 a je shrnuté v tabulce 6.

Tabulka 6 Senzorické hodnocení kombuchy v průběhu fermentace

Vzorek	0. den	1.–2. den	3.–4. den	5.–7. den	8.–13. den
VZ1	K: žádná, P: žádné, A: neutrální	K: mírná, P: žádné, A: čajové	K: střední, P: jemné, A: čajové	K: vyšší, P: výrazné, A: ustálené	K: vysoká, P: silné, A: svěží
VZ2	K: žádná, P: žádné, A: květinové	K: mírná, P: žádné, A: ovocné tóny	K: střední, P: jemné, A: stabilní	K: vyšší, P: mírné, A: ustálené	K: vysoká, P: silné, A: ustálené
VZ3	K: žádná, P: žádné, A: neutrální	K: mírná, P: mírné, A: neutrální	K: střední, P: jemné, A: ustálené	K: vyšší, P: výrazné, A: stabilní	K: vysoká, P: silné, A: plné

VZ4	K: žádná, P: žádné, A: neutrální	K: mírná, P: první známky, A: čajové	K: střední, P: výrazné, A: stabilní	K: vyšší, P: silné, A: ustálené	K: vysoká, P: silné, A: ustálené
VZ5	K: žádná, P: žádné, A: neutrální	K: mírná, P: žádné, A: slabé	K: střední, P: mírné, A: ustupující	K: vysoká, P: výrazné, A: stabilní	K: velmi vysoká, P: silné, A: plné
VZ6	K: žádná, P: žádné, A: neutrální	K: mírná, P: žádné, A: čajové	K: střední, P: jemné, A: stabilní	K: vyšší, P: výrazné, A: svěží	K: vysoká, P: silné, A: osvěžující
VZ7	K: žádná, P: žádné, A: neutrální	K: mírná, P: žádné, A: neutrální	K: střední, P: jemné, A: vyvážené	K: vyšší, P: silné, A: stabilní	K: vysoká, P: silné, A: svěží
VZ8	K: žádná, P: žádné, A: neutrální	K: mírná, P: žádné, A: slabé	K: střední, P: jemné, A: ustupující	K: vyšší, P: výrazné, A: výrazné	K: vysoká, P: silné, A: svíravé

Kde K = kyselost, P = perlivost, A = aroma

Senzorické hodnocení bylo provedeno třemi hodnotiteli bez formálního školení v senzorce. Hodnotitelé sledovali tři základní parametry: kyselost, perlivost a aroma. Hodnocení probíhalo na základě organoleptického posouzení vzorků ve zmíněných fázích fermentace.

Všechny sledované vzorky na počátku vykazovaly sladký profil bez jakéhokoliv perlení a s převážně neutrálním aromatem. Už po dvou dnech došlo k patrné změně – sladkost začala ustupovat a objevila se mírná kyselost. Například u vzorků VZ1 a VZ2 se rozvinulo také čajové nebo květinové aroma.

Ve fázi 3.–4. dne převládala střední kyselost a jemné perlení, doprovázené stabilizací aroma. Tento vývoj odráží typický průběh fermentace kombuchy, kdy cukry kvasinkami přecházejí na kyseliny a oxid uhličitý.

V období 5.–7. dne byla chuť většiny vzorků charakterizována vyšší kyselostí, silnější perlivostí a stabilním nebo svěžím aromatickým profilem. Dochází k intenzivní produkci kyselin (zejména kyseliny octové, glukonové a mléčné), které se významně podílejí na chuti a vnímané svěžesti. Vzorky fermentované při vyšší teplotě (VZ1–VZ4, 25 °C) měly obecně rychlejší nástup kyselosti a intenzivnější perlivost než ty fermentované při nižší teplotě (VZ5–VZ8, 21 °C), což souvisí s vyšší aktivitou mikroorganismů při vyšších teplotách.

V závěrečných dnech fermentace (8.–13.) dosahovala kyselost vysokých hodnot, perlivost byla výrazná a aroma u většiny vzorků ustálené nebo svěží. Například u VZ6 a VZ7 byl sensorický profil hodnocen jako osvěžující, zatímco VZ8 měl svíravější dochuť. Vzorky ze zeleného čaje (VZ1, VZ2, VZ7, VZ8) měly častěji svěží a jemnější aroma, zatímco vzorky z černého čaje (VZ3–VZ6) měly plnější, výraznější aroma a vyšší kyselost. Zelený čaj tedy vedl spíše k lehčím a jemnějším chuťovým profilům, zatímco černý čaj poskytl robustnější a kyselější charakter. Rovněž se ukázalo, že zelený čaj má nižší schopnost vytvářet perlivost ve srovnání s černým čajem, což může souviset s odlišným složením fenolických látek a jejich fermentačním chováním.

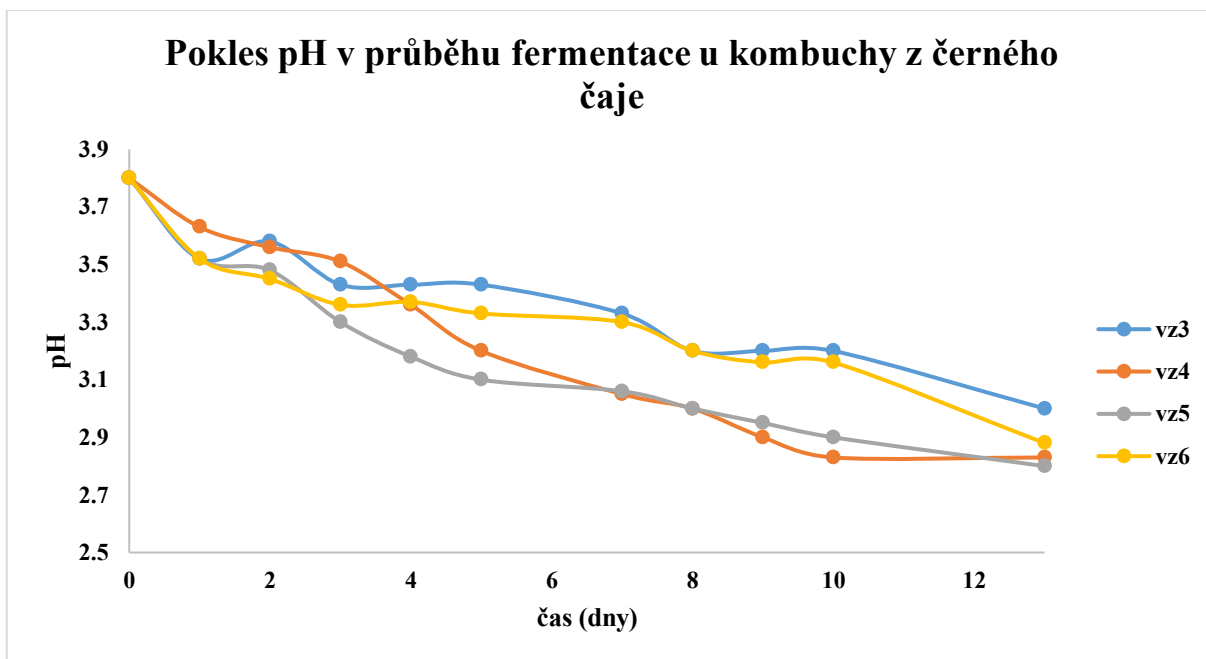
Celkově lze konstatovat, že sensorické vlastnosti se v průběhu fermentace měnily v očekávaném směru – se zvyšující se kyselostí a perlivostí, což souvisí s metabolickou aktivitou mikroorganismů a tvorbou organických kyselin. Typ čaje i teplota fermentace měly prokazatelný vliv na intenzitu a charakter výsledného sensorického profilu nápoje.

3.4 Změny pH během fermentace

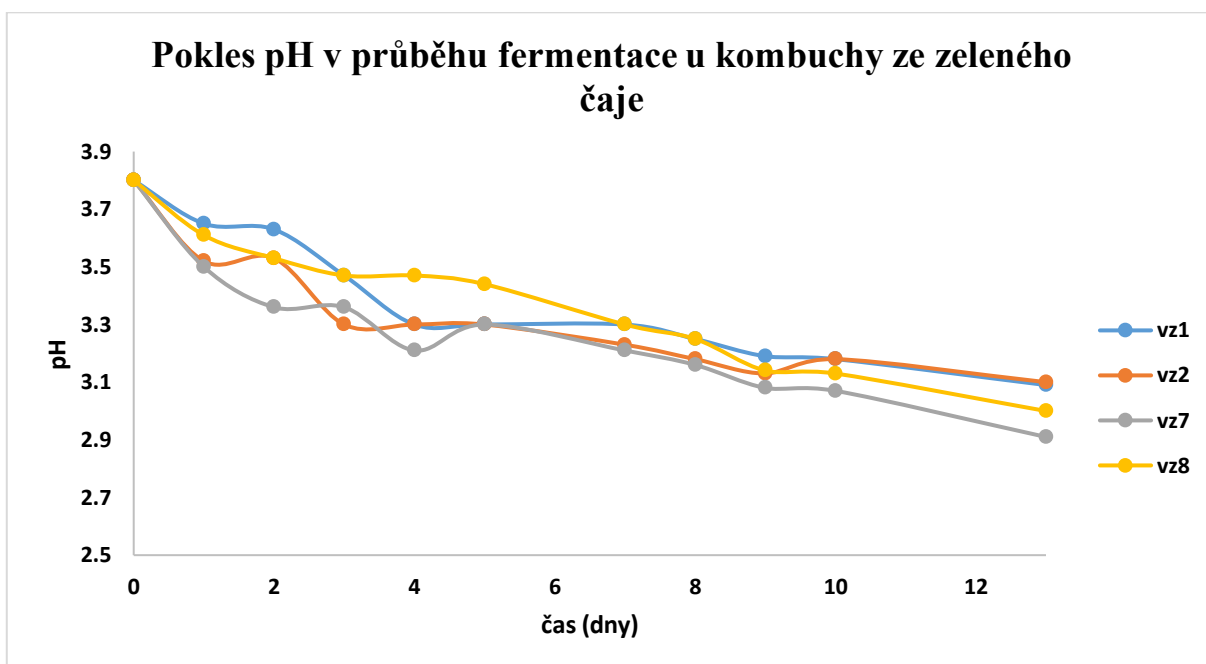
V průběhu fermentace byl pozorován očekávaný pokles hodnot pH, který souvisí především s produkcí kyseliny octové a dalších organických kyselin mikroorganismy. Největší pokles nastal bezprostředně po přidání startovací kultury – u zeleného čaje došlo k poklesu pH z přibližně 6,5 na 3,8 a u černého čaje z 6,7 rovněž na hodnotu kolem 3,8 (viz obrázek 27 a 28). Tento prudký pokles během prvního dne je typický a potvrzuje silnou acidifikační schopnost startéru.

Ve dnech následujících probíhal pokles pH pozvolněji. U vzorků černého čaje (vz3–vz6) bylo během prvního týdne (do 7. dne fermentace) zaznamenáno snížení hodnot pH přibližně o 0,5 jednotky. V následujících dnech pokračoval pokles pomaleji, a na konci fermentace (13. den) se hodnoty ustálily v rozmezí 2,8–3,0. Nejnižší hodnota pH (2,8) byla pozorována u vzorků vz4 a vz5.

U zeleného čaje (vz1, vz2, vz7, vz8) byl vývoj pH podobný, avšak s mírně vyššími koncovými hodnotami. I zde došlo k rychlému poklesu již po přidání startéru, následovaný pozvolným okyselením. Po 13 dnech se hodnoty pH pohybovaly v intervalu 2,9–3,1, přičemž nejnižší pH (2,9) bylo dosaženo u vzorku vzorku 7.



Obrázek 27 Pokles pH v průběhu fermentace u kombuchy z černého čaje



Obrázek 28 Pokles pH v průběhu fermentace u kombuchy ze zeleného čaje

Tabulka 7 pH komerčně dostupných vzorků kombuchy

vzorek	K1	K2	K3	K4	K5	K6	K7	K8	K9
pH	3,2	3,3	3,5	3,5	3,1	3,6	3,3	3,4	3,9

Pro doplnění byla pH změřena i u devíti komerčních vzorků kombuchy. Hodnoty se pohybovaly v rozmezí 3,1–3,9, přičemž většina se soustředila mezi 3,2 a 3,5. Nejnižší pH vykazoval vzorek k5 (3,1), naopak nejvyšší byl vzorek k9 s hodnotou pH 3,9. Ve srovnání s domácími vzorky

byly komerční kombuchy mírně méně kyselé, což pravděpodobně souvisí s kratší fermentací nebo cíleným ředěním hotového nápoje. Výsledky potvrzují, že fermentace proběhla u domácích vzorků úspěšně a dosáhla typických hodnot pro hotový nápoj.

3.5 Identifikace katechinů

3.5.1 Studium separačních podmínek a jejich optimalizace

Pro účely optimalizace HPLC analýzy byl použit vzorek zeleného čaje, který byl připraven extrakcí čajového sáčku horkou vodou o teplotě 100 °C po dobu 5 minut. Testována byla dříve využívaná metoda pro analýzu zeleného čaje [57], která musela být z důvodu pořízení nové instrumentace upravena. Optimalizován byl průběh gradientové eluce s cílem dosáhnout krátké separace přítomných fenolických látek v co nejkratší čas při co nejvyšším rozlišení. Výsledný gradientový profil je popsán v experimentální části práce.

Deprotonované molekuly byly monitorovány v režimu SIM, přičemž kvantifikace probíhala na základě MRM přechodů optimalizovaných pro jednotlivé fenolické látky. Následně byla provedena identifikace sloučenin podle odpovídajících standardů. Přehled všech sledovaných fenolických látek je uveden v tabulce 8.

Tabulka 8 Pořadí eluce fenolických látek

Č.	Fenolická látka	t _R	Č.	Fenolická látka	t _R
1	Kyselina galoylchinonová	0,37	13	Kyselina 4-p-kumaroylchinonová	1,65
2	Kyselina galová	0,40	14	Epikatechin-3-galát	2,85
3	Galokatechin	0,43	15	Katechin-3-galát	3,35
4	Kyselina neochlorgenová	0,53	16	Kaempferol-3-O-galaktosylrutinosid	3,79
5	Epigalokatechin	0,60	17	Kaempferol-3-O-glukosylrutinosid	3,85
6	Katechin	0,713	18	Quercetin-3-O-glukosylrutinosid	3,9
7	Kyselina chlorogenová	0,87	19	Isoquercitrin	3,95
8	Kyselina kryptochlorgenová	1,01	20	Rutin	3,96
9	Epigalokatechin-3-galát	1,09	21	Kaempferol-3-O-galaktosid	4,14
10	Kyselina 5-p-kumaroylchinonová	1,20	22	Kaempferol-3-O-glukosid	4,23
11	Epikatechin	1,47	23	Kaempferol-3-O-rutinosid	4,24
12	Galokatechin-3-galát	1,63			

3.5.2 Kvantifikace vybraných fenolických látek sv kombuše pomocí metody HPLC-MS/MS

Po optimalizaci přechodů v režimu MRM byl na základě kalibračních křivek standardů stanoven obsah fenolických látek ve vzorcích kombuchy. Parametry kalibračních křivek byly vyhodnoceny s využitím statistického programu QC Expert (verze 3.3, Trilobyte). Na základě testu významnosti parametrů (t-test) na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ byl pro většinu stanovených látek prokázán absolutní člen jako významný. Avšak u EGCG, katechinu, rutinu a ioquercitrinu byl absolutní člen vyhodnocen jako nevýznamný. Hodnoty parametrů lineární regrese, směrnice a úseku, spolu s jejich směrodatnými odchylkami, hodnotami pravděpodobnosti a koeficientem determinace jsou pro jednotlivé látky uvedeny v příloze v tabulce 17. V této tabulce jsou dále uvedeny meze detekce a stanovitelnosti, které byly vypočteny z výšek píků jako trojnásobek a desetinásobek odstupů signálu od šumu.

Obsah jednotlivých fenolických látek byl ve vzorcích kombuchy sledován během fermentace v několika časových bodech po dobu 13 dnů. Koncentrace jednotlivých fenolických látek a jejich změny v průběhu fermentace jsou uvedeny v příloze v tabulce 19 a koncentrace fenolických látek obsažených v komerčních vzorcích jsou v tabulce 20.

V rámci kvantifikace bylo sledováno 23 fenolických látek v průběhu fermentace domácích vzorků kombuchy a následně porovnáno s devíti komerčně dostupnými produkty. Nejvyšších koncentrací napříč celou fermentací dosahoval epigalokatechin gallát (EGCG), který byl dominantním katechinem zejména v prvních dnech. U některých vlastních vzorků ze zeleného čaje přesahovala jeho koncentrace 8 mg/l, ale s postupem fermentace mírně klesala, pravděpodobně vlivem oxidace nebo mikrobiální degradace. U komerčních vzorků se koncentrace EGCG výrazně lišila, zatímco některé obsahovaly jen nízké jednotky $\mu\text{g/l}$, jiné, jako například vzorek K6, vykazovaly extrémně vysoké hodnoty, což naznačuje možné obohacení extraktem nebo použití silně koncentrovaného čajového základu.

Podobný vývoj byl patrný i u dalších katechinů, jako jsou EGC, EC nebo GCG. U domácích vzorků docházelo v čase ke změnám koncentrací, což odpovídá biochemickým přeměnám během fermentace. Zatímco na začátku byl profil relativně homogenní, s postupem času se výrazněji začaly odlišovat vzorky připravené ze zeleného a černého čaje. Například u GCG byly hodnoty u černého čaje stabilnější, zatímco u zeleného došlo ke ztelnějšímu poklesu. U komerčních vzorků byly tyto látky v některých případech zastoupeny rovněž ve vysokých

koncentracích, v jiných byly spíše na úrovni pozdní fermentace, což může odrážet odlišné zpracování nebo recepturu.

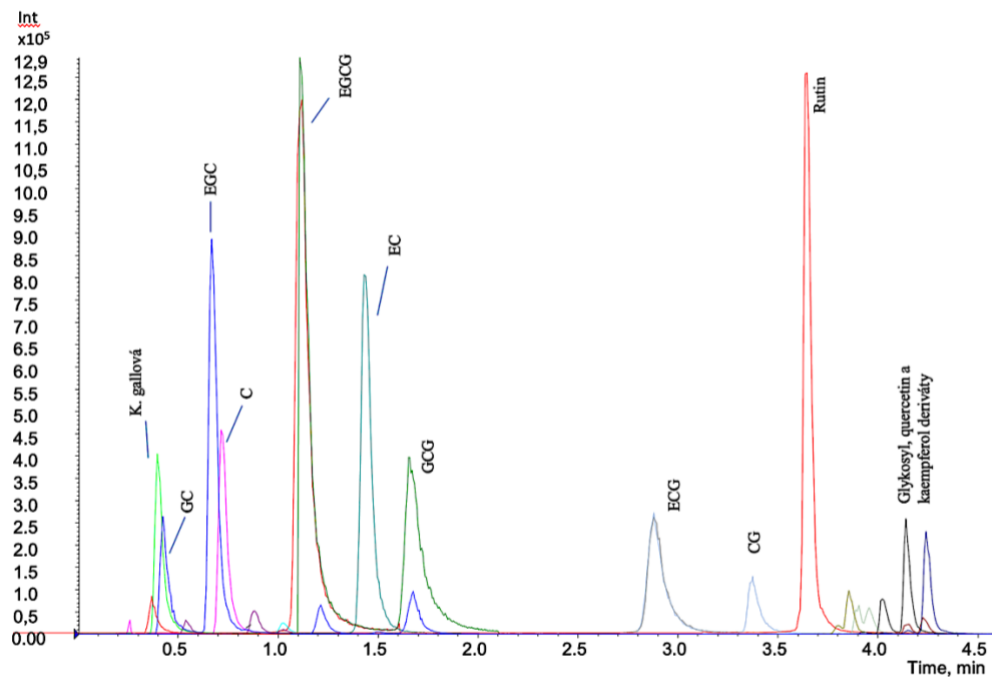
Zajímavé hodnoty byly naměřeny u kyseliny chlorgenové a jejích izomerů. Kombinace chlorgenové a kryptochlorgenové kyseliny dosahovala ve vlastních vzorcích, zejména u černého čaje, stabilně vysokých koncentrací nad 800 µg/l. U komerčních vzorků byly rozdíly výraznější – zatímco některé se pohybovaly v rozmezí hodnot běžných u domácích vzorků, jiné, jako vzorek K9, dosahovaly až trojnásobných koncentrací. Tento výkyv může souviset s použitím jiného druhu suroviny nebo přidáním extraktu čaje do výsledného nápoje.

Rutin, stejně jako ostatní flavonolové glykosidy, byl ve vlastních vzorcích výrazně zastoupen, a to po celou dobu fermentace. Jeho koncentrace často přesahovala 5 mg/l, obzvláště v černých čajích. V komerčních vzorcích byl naopak patrný široký rozptyl, od hodnot v řádu desetin mg/l až po více než 3,5 mg/l, což může být ovlivněno nejen výběrem čaje, ale také technologickým zpracováním či přítomností jiných bylinných složek.

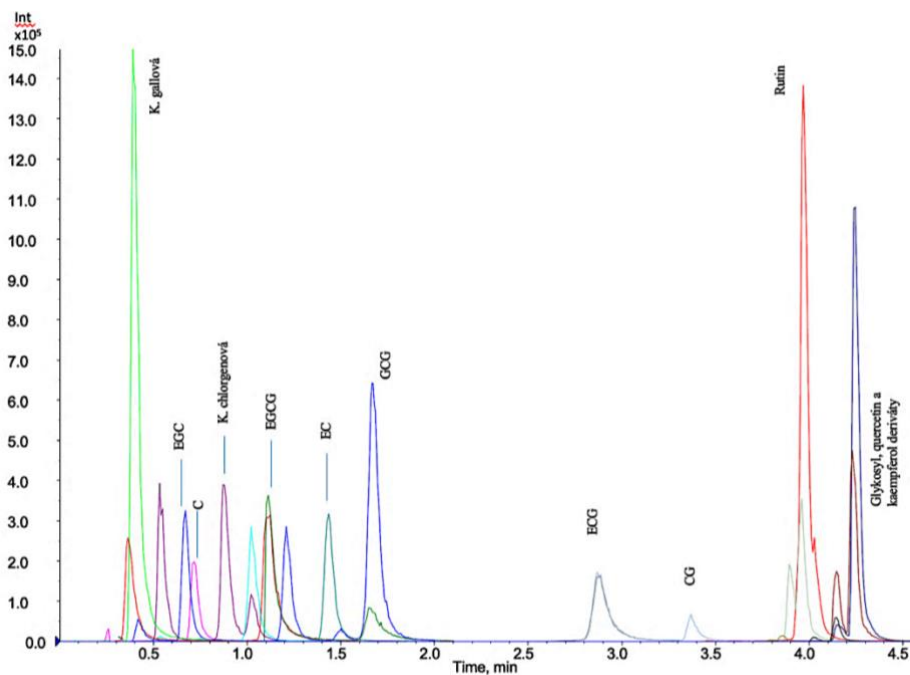
Další látkou s dynamickým vývojem byla kyselina gallová. U domácích vzorků její koncentrace postupně rostla, což může být způsobeno hydrolyzou gallových esterů během fermentace. U některých komerčních vzorků ale byly zjištěny velmi vysoké hodnoty už v „hotovém“ nápoji, např. přes 2,1 mg/l, což může naznačovat její přidavek jakožto přírodní antioxidant nebo stabilizátor.

Celkově lze říci, že domácí vzorky vykazovaly přirozený vývoj fenolických látek, zpravidla vyšší koncentrace nativních katechinů na počátku fermentace, následovaný jejich postupným poklesem a současným nárůstem některých stabilnějších derivátů. Komerční produkty byly z hlediska fenolického složení značně variabilní, některé byly velmi bohaté na antioxidanty, jiné měly profil blízký pozdní fázi fermentace nebo naopak zcela netypický. Tyto rozdíly mohou být výsledkem různých surovin, délky fermentace, obohacení extrakty nebo výrobní

standardizace



Obrázek 29 Separace směsi 23 fenolických látek (7. den fermentace, vzorek kombuchy ze zeleného čaje)



Obrázek 30 Separace směsi 23 fenolických látek (7. den fermentace, vzorek kombuchy z černého čaje)

4 ZÁVĚR

Cílem této diplomové práce bylo komplexně zhodnotit chemické, sensorické a vizuální vlastnosti fermentovaného nápoje kombucha připraveného ze zeleného a černého čaje. Pro splnění tohoto cíle byly provedeny laboratorní experimenty zahrnující spektrofotometrické stanovení antioxidační aktivity (ABTS, FRAP, DPPH, TPC a TFC), analýzu obsahu fenolických látek metodou HPLC/MS, sledování změn pH během fermentace, barevnosti pomocí systému CIELab*, a sensorické hodnocení chuti, vůně a perlivosti v jednotlivých dnech fermentace. Výsledky byly následně porovnány s vybranými komerčně dostupnými vzorky kombuchy.

Výsledky spektrofotometrických metod potvrdily výraznou antioxidační aktivitu všech analyzovaných vzorků, přičemž nejvyšší hodnoty byly zaznamenány přibližně v polovině fermentace, což odpovídá fázi optimálního mikrobiálního metabolismu. Hodnoty stanovené metodami ABTS, FRAP a DPPH navzájem korelovaly a podpořily celkový obraz antioxidačního potenciálu nápoje. Metodou HPLC/MS bylo kvantitativně stanoveno 23 fenolických látek, mezi nimiž byly zastoupeny jak jednoduché fenolické kyseliny (např. kyselina gallová, chlorgenová či *p*-kumaroylchinonová), tak i komplexnější flavonoidy jako katechin, epikatechin, epigalokatechin a jejich galáty, galokatechin, rutin či různé glykosidy kaempferolu a quercetinu. Vzorky kombuchy připravené ze zeleného čaje vykazovaly vyšší koncentrace katechinových derivátů, zatímco v černém čaji dominovaly některé transformované látky jako epikatechin či kyselina kryptochlorgenová. Během fermentace docházelo k výrazným změnám v koncentraci většiny těchto látek – některé fenolické kyseliny vykazovaly nárůst v důsledku mikrobiální degradace komplexnějších struktur, zatímco koncentrace některých flavonoidů postupně klesala vlivem jejich přeměny. Zjištěné rozdíly potvrzují, že složení čajového základu, délka fermentace a typ fermentační kultury zásadně ovlivňují výsledný profil bioaktivních látek v kombuše.

Hodnoty pH postupně klesaly v závislosti na délce fermentace, přičemž nejprudší pokles byl zaznamenán v prvních pěti dnech, kdy došlo k přeměně sacharidů na organické kyseliny. Tento pokles pH úzce souvisel s vývojem sensorických vlastností nápoje. Barevnost vzorků se rovněž měnila – nejvýrazněji u vzorků z černého čaje, kde se barevný odstín postupně posouval směrem k tmavějším tónům. Vzorky ze zeleného čaje si naopak uchovaly světlejší, zelenožlutý odstín. Výpočty ΔE ukázaly, že rozdíly v barevnosti jsou pro běžného konzumenta vnímatelné, a mohou tedy hrát roli při posuzování vizuální kvality nápoje.

Senzorické hodnocení potvrdilo, že chuťové vlastnosti kombuchy se výrazně mění během fermentace. Na počátku převládala sladkost, která později ustoupila výraznější kyselosti, doprovázené rostoucí perlivostí. U některých vzorků byla dochuť hodnocena jako svěží a vyvážená, u jiných se objevovala mírná svíravost. Mezi vzorky připravenými ze zeleného a černého čaje byly patrné rozdíly v aroma i v celkovém chuťovém profilu. Porovnání s komerčními vzorky kombuchy ukázalo, že vlastnoručně připravené nápoje často vykazovaly vyšší antioxidační aktivitu, komplexnější profil polyfenolických látek a výraznější sensorické vlastnosti. Naopak komerční vzorky měly nižší perlivost a často vyšší sladkost, což může souviset s úpravou produktů pro širší spotřebitelskou základnu.

Z výsledků práce vyplývá, že domácí fermentace kombuchy umožňuje ovlivnit finální vlastnosti nápoje a dosáhnout vyšší nutriční i sensorické kvality než u některých komerčně dostupných produktů. Zároveň byla potvrzena užitečnost kombinace různých analytických metod při hodnocení funkčních nápojů. Práce může sloužit jako základ pro další výzkum zaměřený na optimalizaci fermentačních podmínek a jejich vliv na bioaktivní složky nápojů připravovaných z různých druhů čaje.

5 BIBLIOGRAFIE

1. LEAL, J.M., SUÁREZ, L.V., JAYABALAN, R., et al. A review on health benefits of kombucha nutritional compounds and metabolites. *CyTA - Journal of Food*. 2018, 16(1), 390–399. <https://doi.org/10.1080/19476337.2017.1410499>
2. JAYABALAN, R., MALBAŠA, R.V., LONČAR, E.S., et al. A Review on Kombucha Tea—Microbiology, Composition, Fermentation, Beneficial Effects, Toxicity, and Tea Fungus. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2014, 13(4), 538–550. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12073>
3. BISHOP, P., PITTS, E.R., BUDNER, D., THOMPSON-WITRICK, K.A. Kombucha: Biochemical and microbiological impacts on the chemical and flavor profile. *Food Chemistry Advances*. 2022, 1, 100025. <https://doi.org/10.1016/j.focha.2022.100025>
4. CHAKRAVORTY, S., BHATTACHARYA, S., CHATZINOTAS, A., et al. Kombucha tea fermentation: Microbial and biochemical dynamics. *International Journal of Food Microbiology*. 2016, 220, 63–72. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.12.015>
5. GREENWALT, C.J., STEINKRAUS, K.H., LEDFORD, R.A. Kombucha, the Fermented Tea: Microbiology, Composition, and Claimed Health Effects. *Journal of Food Protection*. 2000, 63(7), 976–981. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-63.7.976>
6. JAYABALAN, R., SUBATHRADEVI, P., MARIMUTHU, S., et al. Changes in free-radical scavenging ability of kombucha tea during fermentation. *Food Chemistry*. 2008, 109(1), 227–234. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.12.037>
7. VILLARREAL-SOTO, S.A., BEAUFORT, S., BOUJILA, J., et al. Understanding Kombucha Tea Fermentation: A Review. *Journal of Food Science*. 2018, 83(3), 580–588. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.14068>
8. CHEN, C., LIU, B.Y. Changes in major components of tea fungus metabolites during prolonged fermentation. *Journal of Applied Microbiology*. 2000, 89(5), 834–839. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2000.01188.x>
9. MANACH, C., SCALBERT, A., MORAND, C., et al. Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2004, 79(5), 727–747. <https://doi.org/10.1093/ajcn/79.5.727>
10. WAY, T.D., LEE, H.H., KAO, M.C., LIN, J.K. 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. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2004.06.018>
11. SAJILATA, M.G., BAJAJ, P.R., SINGHAL, R.S. Tea Polyphenols as Nutraceuticals.

- Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2008, 7(3), 229–254.
<https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2008.00043.x>
12. VITAS, J.S., CVETANOVIĆ, A.D., MAŠKOVIĆ, P.Z., et al. Chemical composition and biological activity of novel types of kombucha beverages with yarrow. *Journal of Functional Foods*. 2018, 44, 95–102.
 13. DUFRESNE, C., FARNWORTH, E. Tea, Kombucha, and health: A review. *Food Research International*. 2000, 33(6), 409–421. [https://doi.org/10.1016/S0963-9969\(00\)00067-3](https://doi.org/10.1016/S0963-9969(00)00067-3)
 14. KOVACEVIC, Z., DAVIDOVIC, G., VUCKOVIC-FILIPOVIC, J., et al. A Toxic Hepatitis Caused the Kombucha Tea – Case Report. *OA Macedonian Journal of Medical Sciences*. 2014, 2(1), 128–131.
 15. ROMAN, M.C. Determination of catechins and caffeine in camillia sinensis raw materials, extracts, and dietary supplements by HPLC-UV: single-laboratory validation. *Journal of AOAC International*. 2013, 96(5), 933–941.
<https://doi.org/10.5740/jaoacint.10-488>
 16. MALBAŠA, R.V., LONČAR, E.S., VITAS, J.S., ČANADANOVIĆ-BRUNET, J.M. Influence of starter cultures on the antioxidant activity of kombucha beverage. *Food Chemistry*. 2011, 127(4), 1727–1731. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.02.048>
 17. KUMAR, S.D., NARAYAN, G., HASSARAJANI, S. Determination of anionic minerals in black and kombucha tea using ion chromatography. *Food Chemistry*. 2008, 111(3), 784–788. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.05.012>
 18. ABACI, N., DENIZ, F.S.S., ORHAN, I.E. Kombucha – An ancient fermented beverage with desired bioactivities: A narrowed review. *Food Chemistry: X*. 2022, 14, 100302.
<https://doi.org/10.1016/j.fochx.2022.100302>
 19. MIRANDA, J., RUIZ, L., SILVA, C., et al. Kombucha: A review of substrates, regulations, composition, and biological properties. *Journal of Food Science*. 2022, 87(2), 503–527. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.16029>
 20. WATAWANA, M.I., JAYAWARDENA, N., GUNAWARDHANA, C.B., WAISUNDARA, V.Y. Health, Wellness, and Safety Aspects of the Consumption of Kombucha. *Journal of Chemistry*. 2015, 2015, 591869.
<https://doi.org/10.1155/2015/591869>
 21. COELHO, R.M.D., DE ALMEIDA, A.L., DO AMARAL, R.Q.G., et al. Kombucha: Review. *International Journal of Gastronomy and Food Science*. 2020, 22, 100272.
<https://doi.org/10.1016/j.ijgfs.2020.100272>

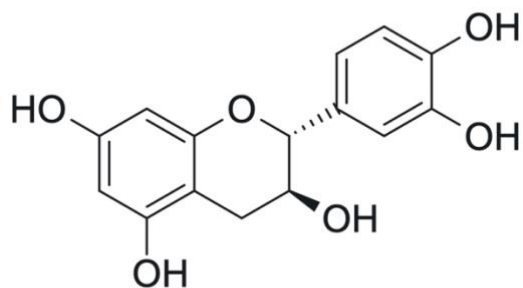
22. JAYABALAN, R., MARIMUTHU, S., SWAMINATHAN, K. Changes in content of organic acids and tea polyphenols during kombucha tea fermentation. *Food Chemistry*. 2007, 102(1), 392–398. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.05.032>
23. CHU, S.C., CHEN, C. Effects of origins and fermentation time on the antioxidant activities of kombucha. *Food Chemistry*. 2006, 98(3), 502–507. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.05.080>
24. SOCHOR, J., RYVOLOVÁ, M., KRYŠTOFOVÁ, O., et al. Fully Automated Spectrometric Protocols for Determination of Antioxidant Activity: Advantages and Disadvantages. *Molecules*. 2010, 15(12), 8618–8640. <https://doi.org/10.3390/molecules15128618>
25. KEDARE, S.B., SINGH, R.P. Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *Journal of Food Science and Technology*. 2011, 48(4), 412–422. <https://doi.org/10.1007/s13197-011-0251-1>
26. MILARDOVIĆ, S., IVEKOVIĆ, D., GRABARIĆ, B.S. A novel amperometric method for antioxidant activity determination using DPPH free radical. *Bioelectrochemistry*. 2006, 68(2), 175–180. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2005.06.005>
27. PUANGBANLANG, C., SIRIVIBULKOVIT, K., NACAPRICHA, D., SAMEENOI, Y. A paper-based device for simultaneous determination of antioxidant activity and total phenolic content in food samples. *Talanta*. 2019, 198, 542–549. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.02.048>
28. ELFIRTA, R.R., FERDIAN, P.R., SASKIAWAN, I., et al. Antioxidant Properties of Kombucha Beverage Infused. 2024. *Nezveřejněno*.
29. YIKMIŞ, S., TUĞGÜM, S. Evaluation of Microbiological, Physicochemical and Sensorial Properties of Purple Basil Kombucha Beverage. *Turkish Journal of Agriculture - Food Science and Technology*. 2019, 7(9), 1321–1327. <https://doi.org/10.24925/turjaf.v7i9.1321>
30. DANNHOFEROVÁ, J. *Velká kniha barev: kompletní průvodce pro grafiky, fotografy a designéry*. Brno: Computer Press, 2012. ISBN 9788025137857.
31. PANÁK, O. *Měření barevnosti*. Studijní materiál. 2015. <https://fcht.upce.cz/sites/default/files/public/luva3059/merenibarevnosti.pdf>
32. *Barevný prostor LAB*. Kopina.cz, 2018. <https://kopina.cz/terminologie/36958/lab/>
33. CHURÁČEK, J. a kolektiv. *Analytická separace látek*. 1. vyd. Praha: Státní nakladatelství technické literatury, 1990.
34. UPLC. [online]. Dostupné z: <http://www.hpcl.cz/UPLC>
35. HOLČAPEK, M. Spojení vysokoučinné kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie (HPLC/MS). Pardubice: Univerzita Pardubice, 2001. ISBN 80-7194-390-8.

36. FRIEDECKÝ, D., LEMR, K. Úvod do hmotnostní spektrometrie. *Klinická Biochemie a Metabolismus*. 2012, 20(2), 152–157.
37. BANERJEE, S., MAZUMDAR, S. Electrospray Ionization Mass Spectrometry: A Technique to Access the Information beyond the Molecular Weight of the Analyte. *International Journal of Analytical Chemistry*. 2012, 2012, 282574. <https://doi.org/10.1155/2012/282574>
38. LEMR, K., BOROVCOVÁ, L. Vznik iontů v hmotnostní spektrometrii: ionizace a fragmentace. *Chemické Listy*. 2020, 114(2), 96–100. <https://www.chemicke-listy.cz/ojs3/index.php/chemicke-listy/article/view/3535>
39. VERPLAETSE, R. Schematic overview of two ionization interfaces. *ResearchGate*. [online]. [cit. 2023-11-01]. https://www.researchgate.net/figure/Schematic-overview-of-two-ionization-interfaces-ESI-A-and-APCI-B-A-In-ESI_fig3_263205281
40. HAVLÍČEK, V., TUREČEK, F. Kvadrupólový analyzátor a iontové pasti. *Chemické Listy*. 2020, 114, 106–112.
41. ŠKRÍBA, A., HOUŠŤ, J., HAVLÍČEK, V. Iontová cyklotronová rezonance s Fourierovou transformací. *Chemické Listy*. 2020, 114, 119–125.
42. SADÍLEK, M. Úvod do tandemové hmotnostní spektrometrie. *Chemické Listy*. 2020, 114, 133–144.
43. RASTOGI, Y.R., THAKUR, R., THAKUR, P., et al. Food fermentation – Significance to public health and sustainability challenges of modern diet and food systems. *International Journal of Food Microbiology*. 2022, 371, 109666. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2022.109666>
44. ZOU, C., LI, R.-Y., CHEN, J.-X., et al. Zijuan tea-based kombucha: Physicochemical, sensorial, and antioxidant profile. *Food Chemistry*. 2021, 363, 130322. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130322>
45. PHAN, T.G., DUGGIN, G., ESTELL, J., et al. Lead poisoning from drinking Kombucha tea brewed in a ceramic pot. *Medical Journal of Australia*. 1998, 169, 644–646.
46. PAULOVÁ, H., BOCHOŘEKOVÁ, H. Metody stanovení antioxidační aktivity přírodních látek in vitro. *Chemické Listy*. 2004, 98, 174–179.
47. QUADROS, L., BRANDAO, I., LONGHI, R. Ascorbic acid and performance: A review. *Vitamins & Minerals*. 2016, 5(2), 136.
48. DALLUGE, J.J., NELSON, B.C. HPLC determination of catechins. *Journal of Chromatography A*. 2000, 881, 411–424.
49. ANANINGSIH, V.K., SHARMA, A., ZHOU, W. Effect of processing on tea polyphenols. *Food Research International*. 2013, 50, 469–479.
50. DAGLIA, M., ANTIOCHIA, R., SOBOLEV, A.P., MANNINA, L. Analysis of antioxidant compounds. *Food Research International*. 2014, 63, 275–289.

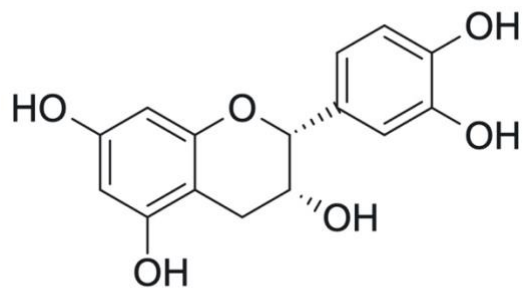
51. ARAYA-FARIAS, M., GAUDREAU, A., ROZOY, E., BAZINET, L. Analytical approaches in kombucha. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2014, 62, 4241–4250.
52. CHURÁČEK, J. a kolektiv. *Nové trendy v teorii a instrumentaci vybraných analytických metod*. 1. vyd. Praha: Academia, 1993.
53. SANG, S., LEE, M.J., HOU, Z., HO, C.T., YANG, C.S. Polyphenol metabolism in tea. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2005, 53, 9478–9484.
54. BAZINET, L., ARAYA-FARIAS, M., DOYEN, A., et al. Membrane processes in tea research. *Food Research International*. 2010, 43, 1692–1701.
55. DEL RIO, D., STEWART, A.J., MULLEN, W., et al. Polyphenol content in foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2004, 52, 2807–2815.
56. UltraScan VIS spectrophotometer. Hunter Associates Laboratory, Inc., 2022. [online]. Dostupné z: <https://www.hunterlab.com/en/solutions/color-measurement/ultra-scan-vis/>
57. HAVLOVÁ, D. Studium degradace katechinů v zeleném čaji pomocí HPLC s rychlými gradienty a hmotnostně spektrometrickou detekcí. Diplomová práce. Univerzita Pardubice, 2015. <https://hdl.handle.net/10195/60638>. [cit. 2025-05-17].

6 PŘÍLOHY

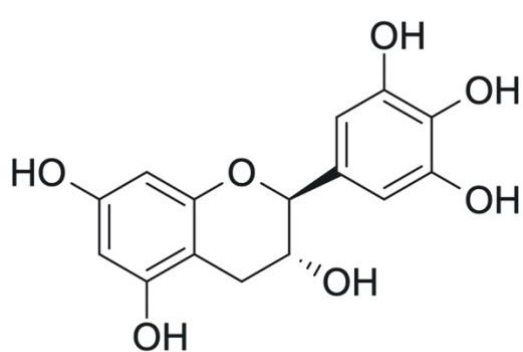
6.1 Obrázky



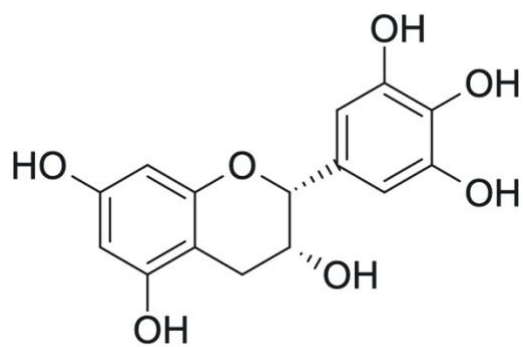
(+)-Katechin (C)



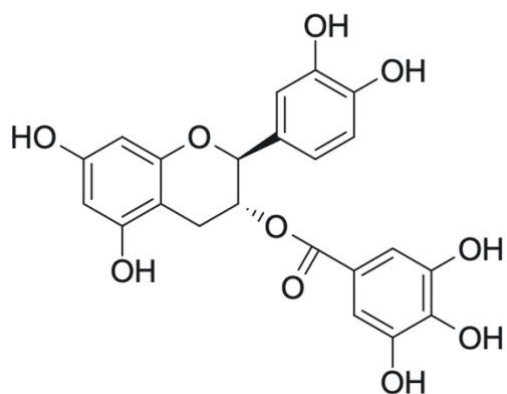
(-)-Epikatechin (EC)



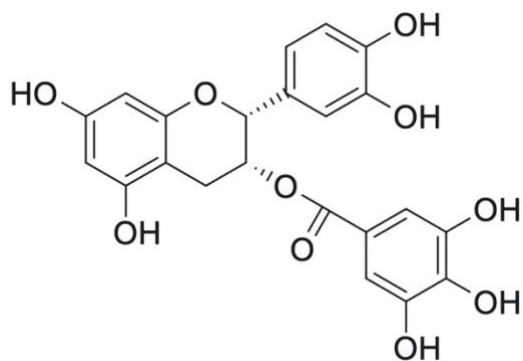
(-)-Galokatechin (GC)



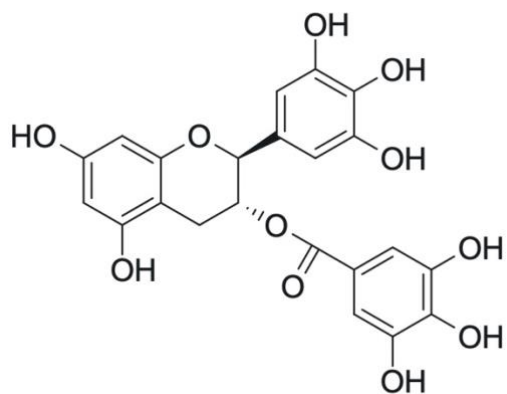
(-)-Epigalokatechin (EGC)



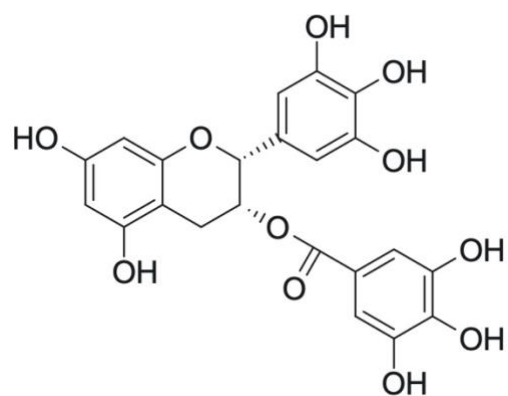
(-)-Katechin-3-galát (CG)



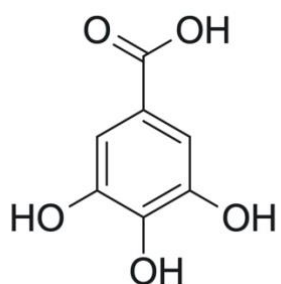
(-)-Epikatechin-3-galát (ECG)



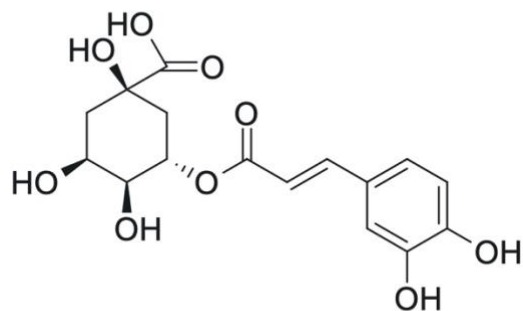
(-)-Galokatechin-3-galát (GCG)



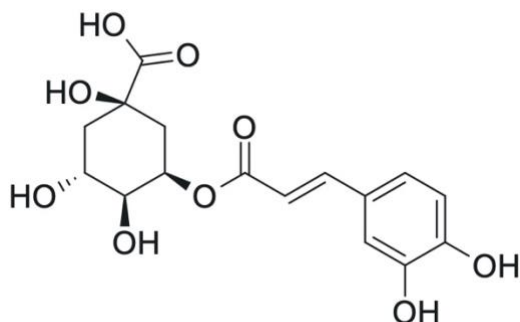
(-)-Epigalokatechin-3-galát (EGCG)



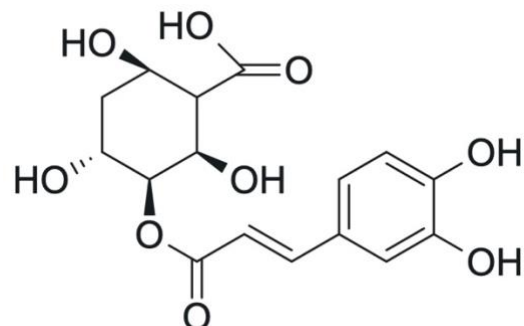
Kyselina galová



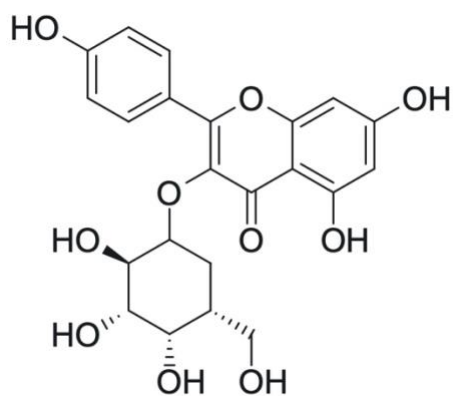
Kyselina chlorgenová



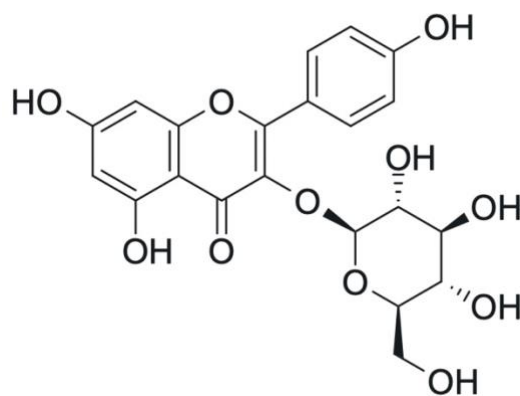
Kyselina neochlorgenová



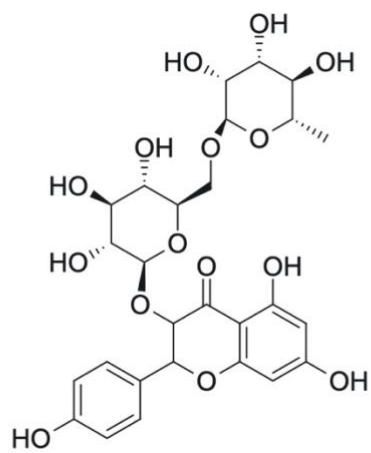
Kyselina kryptochlorgenová



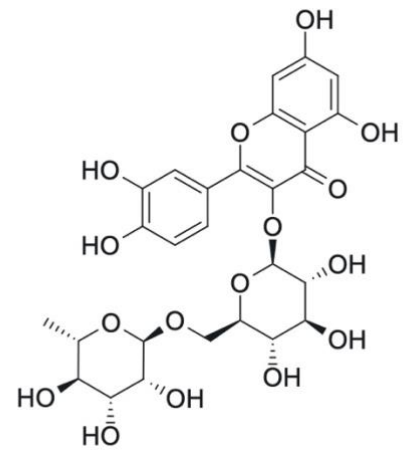
Kaemferol-3-O-galaktosid



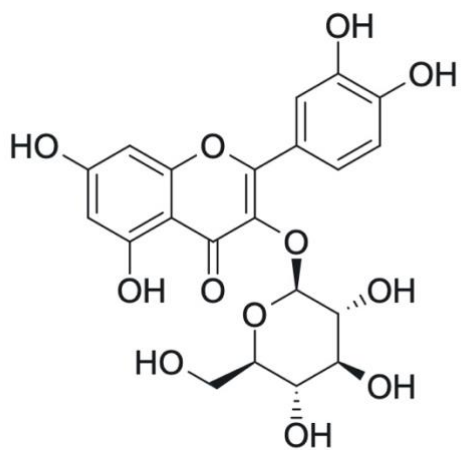
Kaemferol-3-O-glukosid



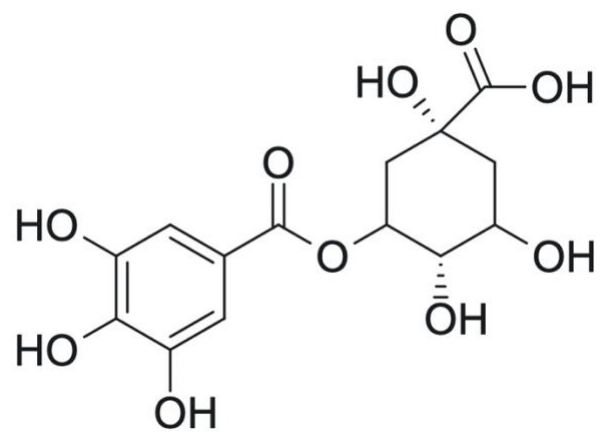
Kaempferol-3-O-rutinosid



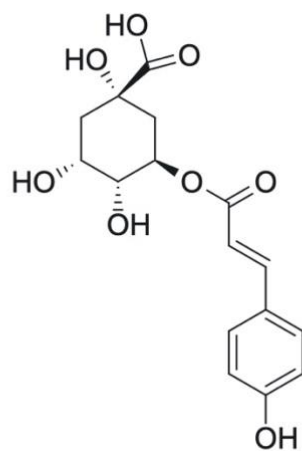
Rutin



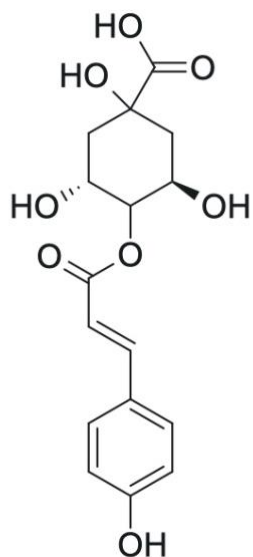
Isoquercitrin



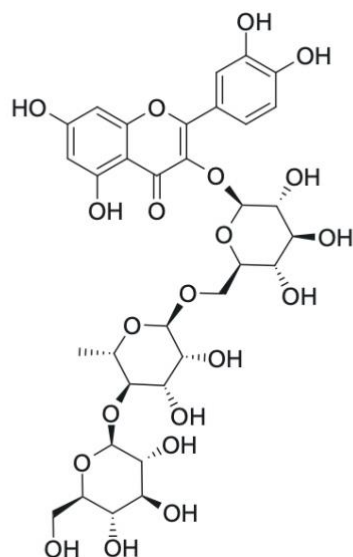
Kyselina 5-O-galoylchinová



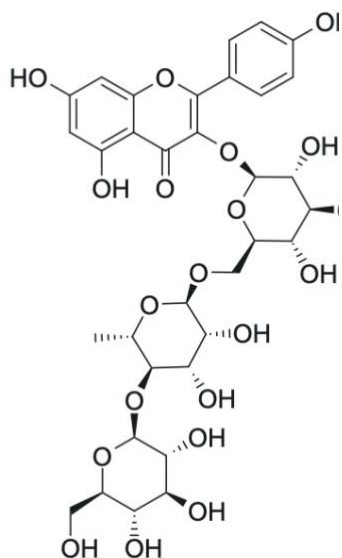
Kyselina 5-p-kumaroylchinová



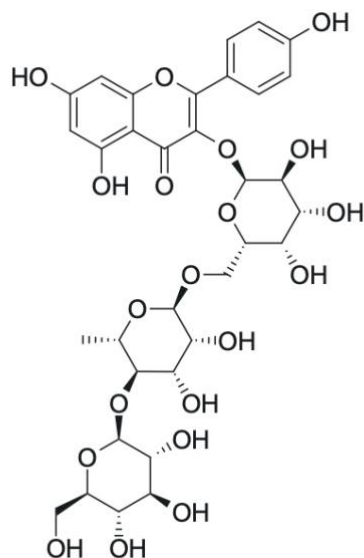
Kyselina 4-p-kumaroylchinová



Quercetin-3-O-glukosylrutinosid



Kaempferol-3-O-glukosylrutin



Kaempferol-3-O-galaktosylrutinosid

Obrázek 31 Struktury 23 fenolických látek nalezených ve vzorcích kombuchy

6.2 Tabulky

Tabulka 9 Monitorování poklesu pH v průběhu kvašení vlastních vzorků

	čaj	0.den	1.den	2.den	3.den	4.den	5.den	7.den	8.den	9.den	10.den	13.den
vzorek	pH											
vz1	6,5	3,8	3,7	3,6	3,5	3,3	3,3	3,3	3,3	3,2	3,2	3,1
vz2	6,5	3,8	3,5	3,5	3,3	3,3	3,3	3,2	3,2	3,1	3,2	3,1
vz3	6,7	3,8	3,5	3,6	3,4	3,4	3,4	3,3	3,3	3,3	3,3	3,3
vz4	6,7	3,8	3,6	3,6	3,5	3,4	3,2	3,1	3,0	2,8	2,8	2,8
vz5	6,7	3,8	3,5	3,5	3,3	3,2	3,0	3,1	3,0	3,0	2,9	2,8
vz6	6,7	3,8	3,5	3,5	3,4	3,4	3,3	3,3	3,2	3,2	3,2	2,9
vz7	6,5	3,8	3,5	3,4	3,4	3,2	3,3	3,2	3,2	3,1	3,1	2,9
vz8	6,5	3,8	3,6	3,5	3,5	3,5	3,4	3,3	3,3	3,1	3,1	3,0

Tabulka 11 uvádí optimalizované parametry pro kvantitativní analýzu fenolických látek. Obsahuje retenční čas (t_n), MRM přechod (prekurzorový/produktový iont), deklastrační potenciál (DP), kolizní energii (CE) a výstupní potenciál kolizní cely (CXP).

Tabulka 10 MRM přechody 23 monitorovaných fenolických látek

Č.	Fenolická látka	t_n (min)	MRM přechod	DP (V)	CE (V)	CXP (V)
1	Kyselina galoylchinonová	0,37	343/191	-75	-28	-7
2	Kyselina galová	0,40	169/125	-45	-22	-10
3	Galokatechin	0,43	305/125	-95	-30	-9
4	Kyselina neochlorgenová	0,53	353/179	-75	-28	-5
5	Epigalokatechin	0,60	305/125	-95	-30	-9
6	Katechin	0,713	289/245	-105	-22	-9
7	Kyselina chlorgenová	0,87	353/191	-75	-26	-7
8	Kyselina kryptochlorgenová	1,01	353/173	-90	-24	-7
9	Epigalokatechin-3-galát	1,09	457/169	-95	-24	-5
10	Kyselina 5-p-kumaroylchinonová	1,20	337/173	-55	-20	-15
11	Epikatechin	1,47	289/245	-105	-22	-9
12	Galokatechin-3-gallát	1,63	457/169	-95	-24	-5
13	Kyselina 4-p-kumaroylchinonová	1,65	337/173	-55	-20	-15
14	Epikatechin-3-galát	2,85	441/169	-100	-28	-5
15	Katechin-3-galát	3,35	441/169	-100	-28	-5
16	Kaempferol-3-O-galaktosylrutinosid	3,79	755/285	-185	-52	-9
17	Kaempferol-3-O-glukosylrutinosid	3,85	755/285	-185	-52	-9
18	Quercetin-3-O-glukosylrutinosid	3,9	771/300	-195	-62	-7
19	Isoquercitrin	3,95	463/300	-135	-38	-9
20	Rutin	3,96	609/300	-165	-50	-11
21	Kaempferol-3-O-galaktosid	4,14	447/285	-120	-38	-9
22	Kaempferol-3-O-glukosid	4,23	447/285	-120	-38	-9
23	Kaempferol-3-O-rutinosid	4,24	593/285	-160	-44	-9

Tabulka 11 Průměrné hodnoty TEAC a SD vzorků kombuchy- metoda DPPH

označení	čajový nálev		0.den		1.den		2.den	
	TEAC (mmol/g)	SD	TEAC (mmol/g)	SD	TEAC (mmol/g)	SD	TEAC (mmol/g)	SD
vz 1	0,295	0,011	0,414	0,008	0,421	0,011	0,441	0,012
vz 2	0,295	0,011	0,414	0,008	0,419	0,010	0,437	0,007
vz 3	0,371	0,011	0,459	0,009	0,435	0,012	0,398	0,008
vz 4	0,371	0,011	0,459	0,009	0,423	0,008	0,458	0,009
vz 5	0,371	0,011	0,459	0,009	0,444	0,008	0,472	0,005
vz 6	0,371	0,011	0,459	0,009	0,428	0,005	0,450	0,011
vz 7	0,295	0,011	0,414	0,008	0,421	0,008	0,461	0,009
vz 8	0,295	0,011	0,414	0,008	0,426	0,005	0,438	0,007

označení	3.den		4.den		5.den		7.den	
	TEAC (mmol/g)	SD	TEAC (mmol/g)	SD	TEAC (mmol/g)	SD	TEAC (mmol/g)	SD
vz 1	0,419	0,012	0,401	0,014	0,373	0,012	0,378	0,013
vz 2	0,422	0,008	0,411	0,011	0,369	0,013	0,383	0,014
vz 3	0,415	0,013	0,435	0,002	0,405	0,006	0,413	0,007
vz 4	0,432	0,007	0,436	0,007	0,398	0,005	0,415	0,011
vz 5	0,440	0,009	0,444	0,012	0,391	0,007	0,379	0,011
vz 6	0,441	0,007	0,468	0,011	0,404	0,002	0,376	0,007
vz 7	0,434	0,007	0,448	0,012	0,415	0,009	0,396	0,005
vz 8	0,436	0,014	0,371	0,004	0,411	0,009	0,365	0,007

označení	8.den		9.den		10.den		13.den	
	TEAC (mmol/g)	SD	TEAC (mmol/g)	SD	TEAC (mmol/g)	SD	TEAC (mmol/g)	SD
vz 1	0,346	0,005	0,376	0,011	0,370	0,011	0,312	0,010
vz 2	0,351	0,012	0,389	0,007	0,408	0,006	0,307	0,010
vz 3	0,400	0,007	0,404	0,012	0,408	0,008	0,395	0,010
vz 4	0,375	0,003	0,392	0,013	0,420	0,005	0,344	0,007
vz 5	0,386	0,010	0,410	0,010	0,333	0,009	0,364	0,009
vz 6	0,418	0,006	0,439	0,009	0,347	0,005	0,385	0,010
vz 7	0,381	0,010	0,422	0,006	0,297	0,004	0,423	0,009
vz 8	0,390	0,005	0,398	0,010	0,287	0,009	0,426	0,010

Tabulka 12 Průměrné hodnoty TEAC a SD vzorků kombuchy- metoda ABTS

označení	čajový nálev		0.den		1.den		2.den	
	TEAC (mmol/g)	SD	TEAC (mmol/g)	SD	TEAC (mmol/g)	SD	TEAC (mmol/g)	SD
vz 1	0,370	0,020	0,517	0,015	0,491	0,007	0,556	0,023
vz 2	0,370	0,020	0,517	0,015	0,476	0,017	0,485	0,015
vz 3	0,491	0,049	0,585	0,037	0,590	0,023	0,496	0,011
vz 4	0,491	0,049	0,585	0,037	0,602	0,027	0,598	0,020
vz 5	0,491	0,049	0,585	0,037	0,601	0,026	0,603	0,010
vz 6	0,491	0,049	0,585	0,037	0,564	0,027	0,599	0,018
vz 7	0,370	0,020	0,517	0,015	0,504	0,030	0,552	0,016
vz 8	0,370	0,020	0,517	0,015	0,504	0,020	0,503	0,006

označení	3.den		4.den		5.den		7.den	
	TEAC (mmol/g)	SD	TEAC (mmol/g)	SD	TEAC (mmol/g)	SD	TEAC (mmol/g)	SD
vz 1	0,473	0,010	0,511	0,039	0,486	0,017	0,498	0,010
vz 2	0,461	0,025	0,495	0,045	0,473	0,021	0,494	0,020
vz 3	0,535	0,008	0,580	0,019	0,544	0,021	0,562	0,025
vz 4	0,521	0,018	0,576	0,031	0,563	0,018	0,550	0,016
vz 5	0,609	0,019	0,632	0,007	0,578	0,014	0,554	0,013
vz 6	0,616	0,010	0,637	0,022	0,594	0,021	0,551	0,008
vz 7	0,568	0,022	0,584	0,034	0,517	0,020	0,529	0,018
vz 8	0,554	0,017	0,577	0,022	0,496	0,014	0,513	0,023

označení	8.den		9.den		10.den		13.den	
	TEAC (mmol/g)	SD	TEAC (mmol/g)	SD	TEAC (mmol/g)	SD	TEAC (mmol/g)	SD
vz 1	0,453	0,013	0,423	0,007	0,388	0,024	0,363	0,025
vz 2	0,452	0,019	0,426	0,023	0,438	0,028	0,316	0,007
vz 3	0,512	0,020	0,489	0,011	0,523	0,009	0,489	0,011
vz 4	0,516	0,024	0,464	0,018	0,481	0,008	0,363	0,013
vz 5	0,534	0,022	0,517	0,009	0,415	0,005	0,405	0,015
vz 6	0,584	0,032	0,543	0,014	0,418	0,020	0,467	0,012
vz 7	0,470	0,025	0,485	0,009	0,310	0,016	0,469	0,012
vz 8	0,524	0,015	0,432	0,021	0,388	0,021	0,444	0,003

Tabulka 13 Průměrné hodnoty obsahu fenolických látek a SD kombuchy- metoda stanovení TPC

označení	čajový nálev		0.den		1.den		2.den	
	c (mg/g)	SD	c (mg/g)	SD	c (mg/g)	SD	c (mg/g)	SD
vz 1	8,384	0,194	11,230	0,185	10,857	0,194	11,113	0,188
vz 2	8,384	0,194	11,230	0,185	11,158	0,170	11,276	0,117
vz 3	11,299	0,279	13,707	0,192	13,549	0,310	11,228	0,269
vz 4	11,299	0,279	13,707	0,192	13,736	0,227	13,690	0,154
vz 5	11,299	0,279	13,707	0,192	14,340	0,222	13,917	0,104
vz 6	11,299	0,279	13,707	0,192	13,923	0,136	13,896	0,114
vz 7	8,384	0,194	11,230	0,185	12,458	0,166	12,521	0,134
vz 8	8,384	0,194	11,230	0,185	12,020	0,211	11,817	0,183

označení	3.den		4.den		5.den		7.den	
	c (mg/g)	SD	c (mg/g)	SD	c (mg/g)	SD	c (mg/g)	SD
vz 1	10,652	0,072	11,603	0,082	10,340	0,188	11,023	0,145
vz 2	11,442	0,199	11,881	0,107	10,642	0,077	11,062	0,141
vz 3	12,337	0,113	13,330	0,141	12,352	0,255	12,785	0,081
vz 4	12,694	0,385	14,753	0,330	13,421	0,299	13,507	0,156
vz 5	14,284	0,291	14,571	0,103	13,421	0,134	13,245	0,211
vz 6	14,183	0,151	14,359	0,213	13,750	0,288	13,660	0,184
vz 7	13,198	0,142	13,208	0,166	12,414	0,241	12,355	0,065
vz 8	12,488	0,114	12,757	0,175	11,954	0,198	11,926	0,115

označení	8.den		9.den		10.den		13.den	
	c (mg/g)	SD	c (mg/g)	SD	c (mg/g)	SD	c (mg/g)	SD
vz 1	10,578	0,135	10,471	0,167	9,829	0,230	8,571	0,297
vz 2	10,990	0,131	10,713	0,140	11,250	0,109	8,248	0,141
vz 3	12,351	0,188	12,078	0,240	12,760	0,252	12,464	0,345
vz 4	12,684	0,324	12,320	0,192	12,990	0,239	10,287	0,252
vz 5	13,730	0,139	13,355	0,246	10,526	0,372	12,776	0,709
vz 6	14,619	0,229	14,573	0,358	10,995	0,168	13,845	0,083
vz 7	12,917	0,139	12,873	0,094	9,081	0,193	13,769	0,162
vz 8	12,570	0,143	11,297	0,118	9,861	0,581	13,632	0,209

Tabulka 14 Průměrné hodnoty TEAC a SD vzorků kombuchy- metoda FRAP

označení	čajový nálev		0.den		1.den		2.den	
	TEAC (mmol/g)	SD	TEAC (mmol/g)	SD	TEAC (mmol/g)	SD	TEAC (mmol/g)	SD
vz 1	0,3314	0,0049	0,6580	0,0211	0,5911	0,0105	0,6664	0,0123
vz 2	0,3314	0,0049	0,6580	0,0211	0,6013	0,0108	0,6400	0,0255
vz 3	0,3961	0,0187	0,6642	0,0100	0,6159	0,0203	0,5858	0,0061
vz 4	0,3961	0,0187	0,6642	0,0100	0,6309	0,0015	0,7040	0,0231
vz 5	0,3961	0,0187	0,6642	0,0100	0,6910	0,0022	0,6984	0,0236
vz 6	0,3961	0,0187	0,6642	0,0100	0,6386	0,0029	0,6895	0,0210
vz 7	0,3314	0,0049	0,6580	0,0211	0,6856	0,0067	0,6611	0,0096
vz 8	0,3314	0,0049	0,6580	0,0211	0,7197	0,0142	0,5671	0,0166

označení	3.den		4.den		5.den		7.den	
	TEAC (mmol/g)	SD	TEAC (mmol/g)	SD	TEAC (mmol/g)	SD	TEAC (mmol/g)	SD
vz 1	0,6063	0,0241	0,6497	0,0166	0,6552	0,0087	0,7476	0,0067
vz 2	0,6512	0,0225	0,6983	0,0116	0,6583	0,0136	0,7486	0,0160
vz 3	0,5807	0,0058	0,6479	0,0304	0,6529	0,0097	0,6899	0,0062
vz 4	0,5846	0,0258	0,7133	0,0280	0,6544	0,0059	0,7400	0,0294
vz 5	0,6372	0,0016	0,7479	0,0248	0,7175	0,0132	0,6838	0,0067
vz 6	0,6395	0,0169	0,7204	0,0212	0,7635	0,0239	0,6984	0,0273
vz 7	0,7255	0,0119	0,7553	0,0215	0,7904	0,0119	0,7527	0,0218
vz 8	0,6742	0,0194	0,7811	0,0160	0,7976	0,0177	0,7203	0,0182

označení	8.den		9.den		10.den		13.den	
	TEAC (mmol/g)	SD	TEAC (mmol/g)	SD	TEAC (mmol/g)	SD	TEAC (mmol/g)	SD
vz 1	0,6334	0,0024	0,6464	0,0133	0,6659	0,0124	0,6120	0,0076
vz 2	0,6695	0,0048	0,6732	0,0245	0,7748	0,0289	0,6537	0,0114
vz 3	0,6444	0,0197	0,6224	0,0119	0,7127	0,0187	0,6680	0,0123
vz 4	0,6223	0,0043	0,6715	0,0111	0,6836	0,0080	0,6465	0,0162
vz 5	0,6948	0,0077	0,7047	0,0094	0,7956	0,0235	0,7846	0,0092
vz 6	0,7001	0,0129	0,7628	0,0156	0,7127	0,0221	0,9101	0,0095
vz 7	0,7246	0,0134	0,7922	0,0088	0,8945	0,0181	0,8216	0,0276
vz 8	0,6996	0,0115	0,7238	0,0270	0,7836	0,0112	0,8507	0,0213

Tabulka 15 Průměrné hodnoty obsahu flavonoidů a SD kombuchy- metoda stanovení TFC s octanem

označení	čajový nálev		0.den		1.den		2.den	
	c (mg/g)	SD	c (mg/g)	SD	c (mg/g)	SD	c (mg/g)	SD
vz 1	13,456	0,194	8,829	0,194	7,901	0,264	8,048	0,305
vz 2	13,456	0,194	8,829	0,194	8,435	0,192	8,652	0,357
vz 3	20,940	0,373	15,226	0,206	15,480	0,287	12,564	0,176
vz 4	20,940	0,373	15,226	0,206	15,480	0,187	15,496	0,166
vz 5	20,940	0,373	15,226	0,206	16,119	0,177	16,014	0,317
vz 6	20,940	0,373	15,226	0,206	14,899	0,242	14,864	0,251
vz 7	13,456	0,194	8,829	0,194	9,733	0,088	10,013	0,231
vz 8	13,456	0,194	8,829	0,194	9,275	0,268	8,955	0,315

označení	3.den		4.den		5.den		7.den	
	c (mg/g)	SD	c (mg/g)	SD	c (mg/g)	SD	c (mg/g)	SD
vz 1	8,564	0,156	8,328	0,299	8,461	0,042	8,154	0,126
vz 2	9,237	0,150	8,846	0,323	7,802	0,296	8,154	0,042
vz 3	13,460	0,118	14,448	0,258	14,130	0,129	14,147	0,032
vz 4	13,460	0,269	14,898	0,298	14,297	0,161	14,422	0,146
vz 5	16,533	0,171	15,180	0,394	15,301	0,196	17,235	0,304
vz 6	15,395	0,118	15,067	0,142	15,189	0,243	15,415	0,276
vz 7	10,135	0,043	9,956	0,267	9,779	0,152	10,909	0,167
vz 8	9,611	0,229	9,882	0,299	9,413	0,147	9,386	0,377

označení	8.den		9.den		10.den		13.den	
	c (mg/g)	SD	c (mg/g)	SD	c (mg/g)	SD	c (mg/g)	SD
vz 1	7,709	0,271	7,981	0,205	7,333	0,226	6,419	1,692
vz 2	7,996	0,395	8,194	0,071	8,105	0,107	6,419	1,569
vz 3	13,505	0,363	13,630	0,174	13,695	0,092	13,122	0,784
vz 4	13,723	0,289	13,738	0,165	13,588	0,082	11,274	0,983
vz 5	15,524	0,745	15,141	0,082	12,414	1,416	13,914	1,188
vz 6	15,742	0,114	16,275	0,378	11,933	0,548	12,383	1,298
vz 7	9,645	0,149	10,038	0,148	7,613	1,027	10,236	0,472
vz 8	9,215	0,354	8,690	0,179	7,754	1,460	10,167	0,106

Tabulka 16 Průměrné hodnoty obsahu flavonoidů a SD kombuchy- metoda stanovení TFC s NaOH

označení	čajový nálev		0.den		1.den		2.den	
	c (mg/g)	SD	c (mg/g)	SD	c (mg/g)	SD	c (mg/g)	SD
vz 1	17,488	0,283	16,536	0,235	17,851	0,269	16,738	0,204
vz 2	17,488	0,283	16,536	0,235	15,025	0,206	14,074	0,277
vz 3	19,626	0,329	19,824	0,215	17,680	0,205	18,110	0,155
vz 4	19,626	0,329	19,824	0,215	16,246	0,313	16,082	0,203
vz 5	19,626	0,329	19,824	0,215	16,758	0,213	16,690	0,117
vz 6	19,626	0,329	19,824	0,215	16,041	0,177	16,792	0,101
vz 7	17,488	0,283	16,536	0,235	14,352	0,233	14,607	0,204
vz 8	17,488	0,283	16,536	0,235	16,236	0,155	15,006	0,154

označení	3.den		4.den		5.den		7.den	
	c (mg/g)	SD	c (mg/g)	SD	c (mg/g)	SD	c (mg/g)	SD
vz 1	14,458	0,349	16,005	0,856	14,289	0,325	12,605	0,369
vz 2	14,326	0,349	16,005	0,131	14,030	0,258	13,244	0,221
vz 3	18,025	0,265	15,952	0,860	15,590	0,150	15,620	0,717
vz 4	19,631	0,201	16,747	0,207	11,266	0,098	14,453	0,313
vz 5	17,022	0,323	17,343	0,099	10,283	0,300	17,079	0,245
vz 6	19,029	0,380	16,846	0,207	13,624	0,491	17,468	0,486
vz 7	16,963	0,201	15,092	0,399	14,676	0,342	18,356	0,256
vz 8	17,754	0,403	14,831	0,131	13,643	0,197	17,333	0,148

označení	8.den		9.den		10.den		13.den	
	c (mg/g)	SD	c (mg/g)	SD	c (mg/g)	SD	c (mg/g)	SD
vz 1	16,011	0,193	14,463	0,315	13,687	0,311	20,144	0,393
vz 2	15,884	0,263	14,588	0,125	13,440	0,124	19,655	0,122
vz 3	15,165	0,111	15,002	0,110	16,251	0,392	14,769	0,142
vz 4	15,743	0,294	15,193	0,436	15,310	0,237	18,028	0,420
vz 5	17,089	0,242	15,859	0,095	16,440	0,109	19,145	0,469
vz 6	17,571	0,444	18,048	0,198	18,605	0,249	18,773	0,246
vz 7	15,126	0,406	14,963	0,144	21,976	0,143	16,840	0,393
vz 8	15,758	0,193	16,839	0,402	21,976	0,327	17,452	0,187

Tabulka 17 Standardy- parametry kalibrační křivky, koeficient determinace (R²), meze detekce (LOD) a meze stanovitelnosti (LOQ)

Standard	Směrnice	Úsek	R ²	LOD (ng/ml)	LOQ (ng/ml)
Kyselina galová	4998,39 ± 24,11	54846,18 ± 8545,39	0,9997	0,596	1,99
Katechin	503,77 ± 3,45	N, p = 0,851	0,9992	4,11	13,7
Kyselina chlorogenová	2019,83 ± 8,27	908,29 ± 365,85	0,9996	3,83	12,8
Epigalokatechin-3-galát	830,35 ± 2,80	N, p = 0,162	0,9998	1,35	4,51
Epikatechin	565,23 ± 1,11	-1881,66 ± 764,84	0,9999	3,10	10,3
Isoquercitrin	1337,59 ± 9,55	N, p = 0,509	0,9988	1,02	3,41
Rutin	812,16 ± 1,61	N, p = 0,176	0,9999	0,773	2,58
Kaempferol-3-O-rutinosid	1116,56 ± 4,36	8932,32 ± 1514,74	0,9996	0,591	1,97
Kaempferol-3-O-glukosid	1441,57 ± 4,60	12458,39 ± 1804,29	0,9998	0,629	2,10

* N=úsek nevýznamný, P=pravděpodobnost (hladina významnosti $\alpha=0,05$)

Tabulka 18 Kvantitativní zastoupení fenolických látek v čajových nálevech a po přidání startéru (0. den fermentace)

Látka	0. den fermentace				Čajový nálev			
	c ZC [µg/l]	SD	c CC [µg/l]	SD	c ZC [µg/l]	SD	C CC [µg/l]	SD
EGC	4877,4	12,5	1290,4	6,3	20	0,2	887,9	12,5
GC	1428,2	9,8	241,2	7	18,8	0,2	258,1	11,2
EGCG	8538,5	17	2173,8	25,5	722	0,9	1740,2	8,5
GCG	3269,7	25,5	713	8,5	180	0,9	672	8,5
CG	738,2	1,7	421,5	0	106,8	0,7	376,3	9,4
ECG								
C	2838,6	0	1078,9	4,2	914,1	1,4	1112,6	1,4
EC	5868,2	62,5	1628,3	1,3	1683,2	3,8	1896,4	75,1
K. chlorogenová + kryptochlorogenová	104,3	2,5	868,4	3,5	43,8	0,2	670,4	3,5
K. neochlorogenová	33,8	0,5	502,1	3,5	17,2	0	403,5	4,9
Rutin	4112,5	24,6	5343,8	36,9	2992,0	18,5	4666,6	55,4
Isoquercitrin	287,6	3,7	1299,5	21,1	197,5	2,1	1011,6	37
K. gallová	165,6	7,2	676,2	15,6	22,3	0,7	383,2	0
K-3-O-rutinosid	514,6	3,2	2710,2	44,3	424,6	7,6	2271,3	57
K-3-O-glukosid	118,3	1	1496,7	58,9	92,3	2,5	1295,5	39,2
Q-3-O-glukosylrut. + K-3-O-galakt. rut.	733,6	21,5	149,6	0	659,2	2,5	225,3	7
K. 5.p-kum. Chinová	23,7	1,6	154,6	0,1	19,3	0,1	136,1	0,8
K. 4.p-kum. Chinová	66,9	2,8	524,2	7,1	66,8	0,4	476,2	12,7
K.galoylchinová	32,5	1	181,5	2	2,8	0,1	124,2	1

Tabulka 19 Kvantitativní zastoupení fenolických látek ve vlastních vzorcích kombuchy v průběhu fermentace

1. Den fermentace																
Látka	vz1		vz2		vz3		vz4		vz5		vz6		vz7		vz8	
	c [µg/l]	SD	c [µg/l]	SD	c [µg/l]	SD	c [µg/l]	SD	c [µg/l]	SD	c [µg/l]	SD	c [µg/l]	SD	c [µg/l]	SD
EGC	5257,8	150,1	5080,9	50,0	1497,4	16,3	1328,4	45,0	1311,6	8,8	1614,2	6,3	4399,7	12,5	4152,1	112,6
GC	1566,2	19,7	1698,2	15,4	302,7	12,6	282,9	15,4	259,0	7,0	329,5	11,2	1368,7	18,2	1409,4	11,2
EGCG	8074,9	59,6	7689,5	144,8	2179,8	17,0	2095,5	102,2	2179,8	85,2	2221,9	42,6	7472,7	25,5	7532,9	127,7
GCG	2956,6	59,6	2932,5	8,5	641,9	3,4	616,0	0,9	624,4	11,1	675,6	6,8	2745,8	68,1	2745,8	136,3
CG	626,2	8,5	652,1	2,6	340,2	7,7	361,9	4,3	332,4	1,7	343,2	5,1	625,6	6,0	678,6	2,6
ECG	2145	21,2	2125	7,1	1495	21,2	1540	14,1	1595	7,1	1505	21,2	2170	70,7	2280	56,6
C	2947,8	14,0	2888,2	70,2	1105,7	2,8	1057,0	4,2	1091,8	11,2	1168,2	1,4	2659,9	56,1	2729,4	14,0
EC	5567,4	37,5	5363,9	125,1	1674,3	3,8	1564,6	18,8	1567,3	2,5	1706,2	3,8	5125,1	12,5	5125,1	112,6
K. chlorgenová + K. kryptochlorgenová	103,0	1,4	102,8	1,1	818,9	3,5	814,0	17,5	861,0	14,0	821,4	0,0	170,6	0,4	150,3	2,5
K. neochlorgenová	37,9	0,3	39,1	1,3	504,5	7,0	531,8	17,5	556,5	3,5	514,4	7,0	82,0	3,2	67,1	1,8
Rutin	3829,3	52,2	3970,9	43,5	5165,3	8,7	5177,6	95,8	5306,9	52,2	5134,5	52,2	4075,6	17,4	3989,4	17,4
Isoqercitin	253,2	0,5	257,3	2,1	1168,6	26,4	1168,6	15,9	1254,6	21,1	1176,1	26,4	317,1	2,1	310,4	4,2
K. gallová	224,1	1,4	245,1	2,8	766,3	7,1	864,3	7,1	853,3	8,5	783,3	14,1	287,1	5,7	253,1	5,7
K-3-O-rutinosid	540,6	13,3	527,6	8,9	2701,2	44,3	2643,0	88,7	2804,2	25,3	2683,3	44,3	793,6	12,7	709,4	15,2
K-3-O-glukosid	114,1	6,9	112,8	2,9	1448,1	19,6	1479,3	14,7	1548,7	14,7	1451,6	24,5	244,6	13,7	219,2	4,4
Q-3-O-glukosylrut. + K-3-O-galakt. rut.	738,0	0,0	732,7	5,1	159,5	2,5	146,0	7,6	147,4	0,6	162,2	6,3	672,7	10,1	708,9	10,8
K. 5.p-kum. Chinová	26,3	0,1	25,5	0,4	148,8	1,6	147,6	1,8	159,3	1,1	155,2	1,0	39,4	1,1	34,6	0,8
K. 4.p-kum. Chinová	68,2	1,3	67,7	1,1	512,2	7,1	507,2	2,8	505,2	8,5	519,2	2,8	116,3	0,3	101,9	2,5
K.galoylchinová	37,7	0,7	37,4	0,8	181,9	4,2	223,1	8,5	210,1	1,4	176,3	3,1	48,6	1,1	44,7	4,7

2. Den fermentace																
Látka	vz1		vz2		vz3		vz4		vz5		vz6		vz7		vz8	
	c [µg/l]	SD	c [µg/l]	SD	c [µg/l]	SD	c [µg/l]	SD	c [µg/l]	SD	c [µg/l]	SD	c [µg/l]	SD	c [µg/l]	SD
EGC	5089,7	137,2	5346,3	100,8	1421,3	33,7	1386,8	20,0	1424,9	18,8	1657,5	35,0	4647,4	87,9	4417,4	137,3
GC	1550,3	16,9	1683,3	25,2	291,8	5,6	315,6	2,8	283,9	2,8	346,4	7,0	1447,1	16,3	1414,3	7,0
EGCG	7737,7	42,1	7930,4	8,5	1764,3	8,0	2125,6	42,7	2360,4	0,0	2456,8	17,0	7394,5	204,5	7394,5	0,0
GCG	2751,8	25,1	3028,8	42,2	540,1	9,3	650,9	6,0	647,3	0,9	737,0	3,4	2625,4	85,2	2751,8	8,5
CG	610,6	5,1	653,3	2,6	276,4	4,3	360,1	1,7	373,9	2,6	395,0	5,1	593,1	2,6	651,5	6,8
ECG	2105	7,1	2210	42,4	1230	14,1	1630	28,3	1710	28,3	1715	21,2	2165	91,9	2245	7,1
C	2908,1	13,9	3027,2	42,3	992,5	16,8	1112,6	7,2	1099,7	8,4	1239,7	5,0	2699,6	56,7	2739,3	28,0
EC	5505,5	50,0	5408,2	62,4	1492,1	1,3	1532,8	3,6	1680,5	12,5	1843,3	75,0	5257,8	100,8	5310,9	50,4
K. chlorgenová + K. kryptochlorgenová	99,8	1,8	104,0	0,0	677,8	9,9	848,6	10,4	875,9	20,9	846,2	21,6	201,6	9,1	153,8	3,1
K. neochlorgenová	33,8	0,1	39,6	0,2	432,0	0,4	544,2	20,1	556,5	10,8	531,8	3,5	169,6	7,4	66,6	1,8
Rutin	3890,9	17,5	3921,7	26,5	4272,6	121,7	5085,2	35,0	5430,0	87,3	5608,5	60,7	4395,7	191,7	4278,7	60,7
Isoquercitin	252,1	3,2	255,4	3,7	966,8	5,3	1168,6	15,9	1295,7	36,3	1224,7	21,2	351,1	1,6	305,2	3,2
K. gallová	213,1	0,0	237,1	0,0	692,3	1,4	887,3	0,0	912,3	12,0	826,3	1,4	320,1	9,9	248,1	1,4
K-3-O-rutinosid	519,1	12,0	511,0	3,2	2168,3	37,0	2607,2	25,8	2866,9	50,1	2849,0	76,8	880,0	10,8	706,3	1,9
K-3-O-glukosid	114,5	6,4	113,8	2,4	1153,3	24,7	1427,3	58,6	1569,5	34,0	1521,1	34,0	292,1	0,5	214,4	1,5
Q-3-O-glukosylrut. + K-3-O-galakt. rut.	715,7	3,8	713,9	3,8	127,2	5,1	139,3	5,4	149,2	5,7	173,8	1,3	660,6	13,4	697,7	1,3
K. 5.p-kum. Chinová	25,2	0,3	27,0	1,1	124,6	1,8	151,3	1,4	164,1	0,3	159,8	1,3	47,2	1,3	36,9	1,6
K. 4.p-kum. Chinová	69,6	0,4	68,2	1,0	444,2	4,2	524,2	4,3	576,2	4,3	573,2	5,7	137,2	0,7	109,7	0,6
K.galoylchinová	37,2	1,7	37,1	0,1	167,7	7,7	265,1	2,0	225,1	8,5	198,1	12,8	52,6	3,0	45,3	1,7

3. Den fermentace																
Látka	vz1		vz2		vz3		vz4		vz5		vz6		vz7		vz8	
	c [µg/l]	SD	c [µg/l]	SD	c [µg/l]	SD	c [µg/l]	SD	c [µg/l]	SD	c [µg/l]	SD	c [µg/l]	SD	c [µg/l]	SD
EGC	4992,4	150,0	5080,9	167,3	1411,6	15,9	1319,6	22,1	1405,0	18,9	1660,2	6,2	4957,0	150,0	4570,9	65,2
GC	1501,7	3,0	1588,0	10,7	293,8	9,0	336,5	3,0	295,8	8,4	334,5	12,9	1443,1	8,3	1431,2	13,3
EGCG	6912,7	85,7	7575,1	85,2	1692,1	76,2	1902,8	24,9	2258,1	54,2	2384,5	60,3	7358,3	136,8	7599,2	24,5
GCG	2547,1	8,5	3004,8	42,6	529,9	3,6	581,1	5,5	655,8	2,6	734,0	4,3	2565,2	24,1	2763,9	8,5
CG	554,0	8,5	640,1	0,6	272,2	2,4	313,7	12,0	364,9	6,8	378,8	2,6	567,2	3,4	630,5	2,6
ECG	1920	28,3	2150	28,3	1195	7,1	1435	35,4	1725	49,5	1650	14,1	2070	14,1	2230	14,1
C	2709,6	42,9	2937,8	79,7	1000,5	4,0	1061,0	9,6	1116,6	12,9	1238,7	5,6	2798,9	13,5	2828,7	69,6
EC	5151,6	8,4	5558,6	35,8	1569,9	1,3	1462,0	6,3	1686,7	6,4	1825,6	17,1	5328,6	100,8	5337,4	12,1
K. chlorgenová + K. kryptochlorgenová	96,8	0,4	108,0	0,0	759,5	12,4	762,0	7,0	913,0	3,5	858,5	10,6	205,3	1,1	158,0	0,7
K. neochlorgenová	36,5	0,2	37,0	0,2	456,8	0,3	516,9	2,5	588,7	29,7	524,4	5,0	90,2	1,5	68,6	0,3
Rutin	3835,5	235,4	4051,0	0,0	4642,0	111,5	4512,7	8,2	5374,6	113,6	5374,6	96,1	4438,8	43,1	4198,7	104,5
Isoqercitin	227,8	2,6	247,2	2,6	1004,2	5,3	1030,3	21,5	1269,1	7,5	1142,5	31,7	347,4	3,7	306,3	1,6
K. gallová	212,1	1,0	230,1	1,0	760,3	29,5	945,3	19,0	990,4	7,1	837,2	5,7	324,1	1,4	266,1	1,4
K-3-O-rutinosid	497,6	10,3	510,1	13,3	2334,0	44,6	2316,1	6,3	2795,3	58,7	2611,8	19,0	877,8	27,8	741,6	1,3
K-3-O-glukosid	107,9	0,7	113,1	1,7	1226,1	27,7	1271,2	14,4	1548,7	14,7	1410,0	14,9	283,8	10,3	212,6	2,9
Q-3-O-glukosylrut. + K-3-O-galakt. rut.	683,0	3,2	720,1	0,0	141,1	0,6	129,0	3,8	147,4	5,7	165,3	0,6	653,4	3,2	668,2	6,3
K. 5.p-kum. Chinová	24,1	1,3	27,9	1,3	133,5	1,4	140,4	0,4	166,5	0,9	163,4	0,7	47,4	0,1	40,1	3,0
K. 4.p-kum. Chinová	68,7	0,6	72,8	1,0	468,2	9,9	487,2	8,5	586,2	9,0	558,2	6,9	136,7	0,9	106,7	1,4
K.galoylchinová	34,3	0,7	36,1	2,1	171,3	0,3	256,1	3,0	246,1	4,2	189,1	0,0	53,3	1,6	45,8	0,7

4. Den fermentace																
Látka	vz1		vz2		vz3		vz4		vz5		vz6		vz7		vz8	
	c [µg/l]	SD	c [µg/l]	SD	c [µg/l]	SD	c [µg/l]	SD	c [µg/l]	SD	c [µg/l]	SD	c [µg/l]	SD	c [µg/l]	SD
EGC	5213,6	87,5	5417,0	175,3	1607,1	1,3	1439,9	0,0	1379,8	10,0	1665,5	6,3	4629,7	87,0	4559,0	62,5
GC	1594,0	33,6	1639,6	5,6	291,8	8,4	378,2	4,2	276,9	4,2	333,5	8,4	1405,4	22,5	1386,5	7,0
EGCG	7418,5	51,1	7810,9	8,6	1957,0	42,6	2077,4	76,6	2143,7	17,0	2342,4	93,3	6960,9	17,0	7593,2	93,8
GCG	2763,9	42,6	2968,6	93,7	585,9	7,5	610,0	2,6	602,2	10,2	696,7	2,6	2468,8	17,0	2727,8	59,6
CG	602,2	6,8	636,5	0,9	284,8	2,6	344,4	3,4	339,6	3,4	362,5	1,7	538,3	8,5	609,4	5,1
ECG	2095,0	35,4	2140,0	42,4	1310,0	42,4	1565,0	21,2	1585,0	7,1	1590,0	14,1	1980,0	0,0	2200,0	0,0
C	2828,7	42,1	2937,8	84,5	1161,2	11,2	1101,7	5,6	1136,4	4,2	1198,0	4,2	2640,1	28,0	2759,2	28,1
EC	5514,3	87,4	5408,2	62,3	1834,4	12,9	1668,1	10,0	1588,5	10,0	1869,8	12,5	5080,9	25,0	5408,2	62,3
K. chlorgenová + K. kryptochlorgenová	103,8	0,4	106,7	1,1	828,8	10,4	868,4	3,5	858,5	3,5	836,3	14,0	190,2	3,5	152,3	1,1
K. neochlorgenová	39,0	0,1	40,7	0,1	524,4	14,9	606,0	10,8	578,8	14,0	531,8	10,5	91,4	2,5	67,9	2,1
Rutin	3934,0	339,6	4087,9	139,1	5202,2	8,7	5226,8	130,1	5547,0	8,9	5620,9	95,9	4408,0	86,6	4475,8	95,2
Isoqercitin	234,5	1,6	228,1	2,1	1075,2	10,5	1142,5	21,2	1243,4	5,3	1194,8	10,5	354,9	1,6	314,1	1,1
K. gallová	222,1	1,4	244,1	1,4	792,3	1,4	1073,4	17,0	970,3	12,7	806,3	21,2	299,1	5,7	248,1	1,4
K-3-O-rutinosid	492,7	0,0	520,0	7,0	2593,8	31,2	2593,8	31,2	2790,8	57,5	2696,7	25,4	860,7	7,6	732,2	1,9
K-3-O-glukosid	104,4	4,9	113,1	7,4	1340,6	4,9	1458,5	14,3	1520,9	34,4	1465,4	34,4	276,5	9,8	208,1	10,3
Q-3-O-glukosylrut. + K-3-O-galakt. rut.	701,3	5,1	694,6	19,6	152,8	7,0	140,7	6,3	150,1	0,6	168,0	1,9	647,6	2,5	704,0	3,8
K. 5.p-kum. Chinová	26,8	1,1	27,2	0,6	155,7	0,8	156,2	1,0	173,9	1,7	165,8	6,7	46,9	1,7	38,1	0,7
K. 4.p-kum. Chinová	70,0	2,1	73,7	0,0	546,2	4,2	539,2	2,8	554,2	4,2	550,2	4,3	126,2	0,1	104,7	1,1
K.galoylchinová	37,4	2,0	39,8	1,7	181,8	13,0	340,1	7,1	254,1	1,4	197,1	8,5	51,7	0,0	45,7	0,0

5. Den fermentace																
Látka	vz1		vz2		vz3		vz4		vz5		vz6		vz7		vz8	
	c [µg/l]	SD	c [µg/l]	SD	c [µg/l]	SD	c [µg/l]	SD	c [µg/l]	SD	c [µg/l]	SD	c [µg/l]	SD	c [µg/l]	SD
EGC	4806,7	37,5	5151,6	125,1	1569,9	8,8	1497,4	1,3	1491,2	12,5	1716,8	1,3	4850,9	100,1	4789,0	37,5
GC	1553,3	21,1	1537,4	7,0	328,5	4,2	432,7	2,8	314,6	4,2	348,4	1,4	1394,5	32,3	1421,3	36,5
EGCG	7039,2	59,6	7081,3	34,1	1926,9	51,1	2011,2	17,0	2270,1	42,6	2282,2	59,6	6972,9	68,1	7418,5	51,1
GCG	2571,2	42,6	2745,8	17,0	564,2	6,0	607,6	11,1	655,8	11,1	689,5	2,6	2456,8	17,0	2739,8	93,7
CG	538,9	2,6	585,9	0,9	268,6	5,1	342,0	0,0	350,5	5,1	330,6	4,3	535,9	0,0	619,6	4,3
ECG	1945,0	21,2	2000,0	0,0	1265,0	49,5	1515,0	7,1	1620,0	14,1	1505,0	35,4	1980,0	28,3	2225,0	35,4
C	2888,2	98,3	2967,6	70,2	1123,5	2,8	1193,0	5,6	1138,4	1,4	1221,8	9,8	2749,3	14,0	2818,7	28,1
EC	5266,6	12,5	5319,7	12,5	1843,3	50,0	1622,1	2,5	1738,0	16,3	1931,7	0,0	5399,3	50,0	5434,7	75,1
K. chlorgenová + K. kryptochlorgenová	95,6	0,0	99,3	1,1	769,4	10,5	823,9	3,5	868,4	17,5	858,5	31,5	196,4	2,5	157,2	3,2
K. neochlorgenová	32,6	0,0	38,2	0,3	451,1	2,8	650,6	3,5	564,0	14,0	504,5	7,0	86,4	1,1	70,6	1,8
Rutin	4001,7	69,7	4155,6	26,1	4974,4	17,4	5159,1	34,8	5627,0	52,2	5787,1	0,0	4678,9	52,2	4586,6	26,1
Isoquercitin	239,4	3,2	234,5	0,5	1045,3	31,7	1168,6	5,3	1284,5	10,6	1228,5	5,3	344,8	3,2	321,2	1,6
K. gallová	222,1	4,2	241,1	2,8	791,3	2,8	1196,4	9,9	934,3	1,4	802,3	15,6	317,1	2,8	249,1	2,8
K-3-O-rutinosid	484,6	8,9	523,1	1,3	2553,4	76,0	2598,2	63,3	2808,7	19,0	2768,4	12,7	888,5	11,4	743,9	10,8
K-3-O-glukosid	99,2	2,5	105,5	2,5	1271,2	4,9	1430,8	4,9	1534,8	44,2	1406,5	9,8	270,6	7,4	207,8	4,9
Q-3-O-glukosylrut. + K-3-O-galakt. rut.	690,6	0,0	704,9	7,6	151,0	7,0	139,3	4,4	152,3	2,5	179,2	1,3	671,8	7,6	730,0	19,0
K. 5.p-kum. Chinová	29,3	1,8	29,5	2,4	158,1	2,6	166,0	0,4	183,3	0,0	182,3	0,9	53,2	1,3	43,9	1,0
K. 4.p-kum. Chinová	60,0	0,7	64,3	2,0	486,2	15,6	512,2	7,1	560,2	4,2	545,2	2,8	131,3	1,1	100,1	1,4
K.galoylchinová	39,0	0,9	39,5	0,1	179,3	6,5	398,2	1,4	246,1	7,1	191,6	5,0	55,4	1,8	44,4	0,7

7. Den fermentace																
Látka	vz1		vz2		vz3		vz4		vz5		vz6		vz7		vz8	
	c [µg/l]	SD	c [µg/l]	SD	c [µg/l]	SD	c [µg/l]	SD	c [µg/l]	SD	c [µg/l]	SD	c [µg/l]	SD	c [µg/l]	SD
EGC	5010,1	125,1	4780,1	125,1	1726,5	15,0	1530,1	17,5	1487,7	15,0	1714,1	7,5	4850,9	200,2	4382,1	187,6
GC	1569,2	18,2	1526,5	14,0	343,4	5,6	479,4	4,2	302,7	9,8	347,4	2,8	1372,6	1,4	1282,3	22,5
EGCG	7322,2	34,1	6979,0	42,6	1932,9	8,5	2077,4	25,5	2234,0	8,5	2390,6	25,5	6972,9	204,4	7286,1	136,3
GCG	2715,7	42,6	2661,5	34,1	573,3	3,4	607,6	9,4	616,6	8,5	751,5	5,1	2462,8	59,6	2559,2	25,5
CG	560,0	3,4	572,0	3,4	278,8	0,9	326,4	6,8	331,2	1,7	366,7	6,0	508,2	1,7	590,1	27,3
ECG	1990,0	42,4	2000,0	28,3	1270,0	14,1	1525,0	7,1	1660,0	42,4	1620,0	14,1	1985,0	49,5	2140,0	84,9
C	2957,7	56,1	2977,5	0,0	1265,5	1,4	1241,6	9,8	1166,2	7,0	1248,6	8,4	2789,0	14,0	2679,8	0,0
EC	5585,1	37,5	5523,2	25,0	2082,1	37,5	1725,6	3,8	1730,9	3,8	1993,7	37,5	5514,3	87,6	5682,4	50,0
K. chlorgenová + K. kryptochlorgenová	98,3	1,1	100,1	0,7	801,6	7,0	913,0	3,5	913,0	17,5	893,2	17,5	201,5	4,2	145,1	2,1
K. neochlorgenová	33,9	0,1	38,1	0,1	507,0	3,5	620,9	24,5	611,0	3,5	541,7	17,5	98,3	1,8	66,1	1,8
Rutin	4371,1	69,7	4192,5	60,9	5220,7	17,4	5331,5	0,0	5780,9	148,0	5904,0	26,1	4635,8	60,9	4531,2	52,2
Isoqercitin	240,9	2,1	230,4	3,2	1015,4	10,6	1239,7	21,1	1295,7	15,9	1221,0	15,9	364,2	3,2	314,1	3,2
K. gallová	230,1	7,1	248,1	1,4	866,3	1,4	1346,5	4,2	930,3	1,4	804,3	4,2	310,1	1,4	243,1	0,0
K-3-O-rutinosid	529,8	4,4	501,6	1,3	2629,6	31,7	2732,6	25,3	2871,4	69,7	2849,0	139,3	906,0	37,4	717,0	12,0
K-3-O-glukosid	104,8	1,5	105,8	1,0	1292,0	24,5	1437,7	4,9	1573,0	58,9	1458,5	14,7	282,4	2,5	202,2	7,8
Q-3-O-glukosylrut. + K-3-O-galakt. rut.	729,5	13,3	714,8	6,3	156,8	6,3	142,0	1,9	150,5	0,0	181,0	1,3	689,7	10,1	703,6	12,0
K. 5.p-kum. Chinová	32,5	0,1	31,5	0,1	175,1	0,8	184,5	6,5	186,5	0,8	185,5	7,9	48,9	1,6	40,7	1,6
K. 4.p-kum. Chinová	62,9	0,3	63,5	0,8	509,2	8,5	509,2	0,0	577,2	0,0	572,2	4,2	132,2	2,1	97,2	0,7
K.galoylchinová	40,9	0,4	38,6	0,6	184,8	1,6	516,2	21,2	264,1	1,4	195,1	5,7	52,3	0,4	47,3	1,3

8. Den fermentace																
Látka	vz1		vz2		vz3		vz4		vz5		vz6		vz7		vz8	
	c [µg/l]	SD	c [µg/l]	SD	c [µg/l]	SD	c [µg/l]	SD	c [µg/l]	SD	c [µg/l]	SD	c [µg/l]	SD	c [µg/l]	SD
EGC	4957,0	175,1	5249,0	37,5	1834,4	12,5	1526,6	25,0	1477,9	16,3	1784,0	33,8	5010,1	25,0	4789,0	12,5
GC	1462,0	1,4	1628,7	21,1	344,4	1,4	512,1	22,5	288,8	7,0	358,3	15,4	1392,5	4,2	1433,2	19,7
EGCG	7436,6	76,6	7231,9	93,7	1914,8	17,0	2017,2	8,5	2228,0	34,1	2517,0	17,0	7207,8	247,0	7502,8	68,1
GCG	2751,8	59,6	2715,7	25,5	566,6	2,6	597,9	4,3	607,0	0,0	771,4	2,6	2661,5	17,0	2775,9	25,5
CG	590,7	2,6	566,0	10,2	272,8	4,3	321,6	6,8	337,2	6,8	372,7	0,9	561,8	0,9	602,8	2,6
ECG	2060,0	28,3	2005,0	7,1	1245,0	7,1	1480,0	42,4	1590,0	14,1	1680,0	14,1	2085,0	63,6	2265,0	35,4
C	2808,8	42,1	3027,2	14,0	1292,3	5,6	1205,9	1,4	1193,0	2,8	1325,0	1,4	2818,7	84,2	2967,6	42,1
EC	5735,5	100,1	5682,4	50,0	2126,3	25,0	1628,3	8,8	1799,0	12,5	2170,6	37,5	5372,8	87,6	5850,5	62,6
K. chlorgenová + K. kryptochlorgenová	100,3	1,8	98,3	1,1	799,1	10,5	878,3	10,5	922,9	17,5	930,3	0,0	199,1	3,5	152,3	1,8
K. neochlorgenová	35,9	0,2	38,9	3,0	509,5	14,0	638,2	7,0	623,4	14,0	539,2	7,0	93,1	0,7	66,4	0,7
Rutin	4432,7	17,4	4291,1	130,6	5269,9	17,4	5337,7	78,4	5879,4	8,7	6119,5	121,9	4666,6	121,9	4734,3	26,1
Isoqercitin	242,3	1,1	235,6	4,2	1097,6	0,0	1183,6	5,3	1299,5	0,0	1243,4	15,9	344,0	0,0	324,2	3,7
K. gallová	229,1	5,7	244,1	7,1	842,3	7,1	1537,5	5,7	944,3	7,1	802,3	4,2	299,1	5,7	239,1	0,0
K-3-O-rutinosid	535,6	5,1	520,4	8,9	2625,1	50,7	2647,5	57,0	2920,6	12,7	2996,8	44,3	919,0	6,3	739,4	5,7
K-3-O-glukosid	105,5	2,5	104,8	2,5	1302,4	0,0	1434,2	68,7	1593,8	9,8	1534,8	34,3	279,2	5,9	199,1	3,4
Q-3-O-glukosylrut. + K-3-O-galakt. rut.	781,5	3,2	750,6	7,6	156,8	2,5	141,6	1,3	155,0	3,8	193,5	0,0	678,5	12,0	744,8	5,7
K. 5.p-kum. Chinová	31,0	0,8	30,6	0,3	160,1	0,6	166,6	0,1	178,8	0,4	184,9	0,8	50,1	1,0	43,9	1,0
K. 4.p-kum. Chinová	67,9	1,1	66,9	0,0	512,2	1,4	518,2	1,4	587,2	2,8	587,2	8,5	133,4	1,3	105,8	0,7
K.galoylchinová	39,9	0,1	40,3	3,0	183,5	2,3	713,3	0,0	284,1	4,2	202,1	7,1	53,6	2,5	47,7	3,3

9. Den fermentace																
Látka	vz1		vz2		vz3		vz4		vz5		vz6		vz7		vz8	
	c [µg/l]	SD	c [µg/l]	SD	c [µg/l]	SD	c [µg/l]	SD	c [µg/l]	SD	c [µg/l]	SD	c [µg/l]	SD	c [µg/l]	SD
EGC	5019,0	37,5	5195,9	37,5	1790,2	25,0	1585,9	3,8	1483,2	6,3	1806,1	52,5	4753,6	12,5	4895,1	12,5
GC	1537,4	15,4	1625,7	14,0	352,3	15,4	485,3	4,2	302,7	7,0	368,2	1,4	1382,6	1,4	1406,4	1,4
EGCG	7087,4	161,8	7310,1	68,1	1902,8	68,1	2005,2	42,6	2113,6	25,5	2474,9	25,5	7081,3	17,0	7936,4	187,3
GCG	2643,5	8,5	2794,0	34,1	555,8	7,7	578,7	6,0	581,7	8,5	797,9	4,3	2474,9	25,5	2932,5	42,6
CG	537,1	3,4	579,9	4,3	257,7	3,4	321,6	3,4	315,5	10,2	373,9	6,0	519,1	0,0	640,1	2,6
ECG	1955,0	7,1	2050,0	14,1	1230,0	14,1	1455,0	35,4	1565,0	21,2	1710,0	28,3	2025,0	35,4	2370,0	42,4
C	2898,1	0,0	3017,2	84,2	1289,3	7,0	1227,7	1,4	1189,0	5,6	1344,9	4,2	2868,4	14,0	3096,6	28,1
EC	5602,8	37,5	5700,1	0,0	2206,0	62,6	1723,0	5,0	1816,7	37,5	2179,4	50,0	5629,3	75,1	6301,6	75,1
K. chlorgenová + K. kryptochlorgenová	95,6	0,7	101,5	1,4	833,8	3,5	893,2	10,5	922,9	17,5	952,6	24,5	207,0	0,7	165,9	2,8
K. neochlorgenová	32,9	0,2	36,3	0,3	467,7	1,8	620,9	10,5	601,1	3,5	561,5	24,5	99,8	4,6	69,4	1,4
Rutin	4118,7	95,8	4192,5	43,5	5436,2	26,1	5380,7	0,0	5811,7	139,3	6353,5	87,1	4820,5	8,7	5140,6	26,1
Isoqercitin	224,0	1,6	229,3	0,5	1026,6	26,4	1194,8	31,7	1306,9	21,1	1310,7	15,9	371,7	2,1	339,2	2,6
K. gallová	231,1	2,8	243,1	2,8	881,3	22,6	1424,5	7,1	980,3	9,9	807,3	17,0	305,1	14,1	250,1	4,2
K-3-O-rutinosid	516,8	6,3	541,5	7,0	2750,5	12,7	2656,4	120,3	2871,4	31,7	3050,5	69,7	945,8	6,3	800,3	14,6
K-3-O-glukosid	98,9	2,0	106,2	0,5	1281,6	9,8	1475,8	78,5	1576,4	14,7	1545,2	9,8	290,0	4,4	208,8	1,5
Q-3-O-glukosylrut. + K-3-O-galakt. rut.	728,6	12,0	745,7	9,5	164,0	1,3	143,4	2,5	156,8	6,3	204,3	0,0	710,3	1,3	819,5	15,2
K. 5.p-kum. Chinová	30,1	0,7	32,9	0,1	173,9	3,1	188,5	0,8	195,1	2,8	200,1	7,1	58,7	2,0	50,9	0,4
K. 4.p-kum. Chinová	61,2	1,3	66,4	0,7	514,2	4,2	504,2	4,2	576,2	15,6	607,2	5,7	138,5	0,6	109,6	0,1
K.galoylchinová	38,1	0,4	41,2	0,3	189,7	2,0	615,2	56,6	291,1	2,8	211,1	19,8	56,2	2,0	48,3	1,6

10. Den fermentace																
Látka	vz1		vz2		vz3		vz4		vz5		vz6		vz7		vz8	
	c [µg/l]	SD	c [µg/l]	SD	c [µg/l]	SD	c [µg/l]	SD	c [µg/l]	SD	c [µg/l]	SD	c [µg/l]	SD	c [µg/l]	SD
EGC	5116,3	17,7	5284,3	12,4	1834,4	62,3	1447,9	3,8	1323,1	10,4	1714,1	2,5	4488,2	62,2	3798,2	12,2
GC	1523,5	9	1600,3	11,1	343,4	5,6	474,4	2,8	289,8	11,2	361,3	5,6	1376,6	4,2	1388,5	4,2
EGCG	6828,4	68,2	7292,1	55,7	1860,7	42	2107,5	102	1884,7	8,5	2258,1	76,7	6280,5	59,2	5720,5	85,8
GCG	2492,9	36,2	2721,7	0	531,1	8,5	599,1	9,4	529,3	2,5	708,1	5,1	2197,9	54,2	2065,4	76,5
CG	521,5	1,7	580,5	5,1	252,3	2,6	328,2	6	278,8	4,2	334,2	2,5	472,1	0	446,2	0,9
ECG	1920,0	28,3	2025,0	49,5	1205,0	35,4	1500,0	28,3	1355,0	21,2	1540,0	0,0	1825,0	21,2	1660,0	70,7
C	2888,2	42,8	3116,5	28,1	1329,9	0	1257,5	6,6	1095,7	2,8	1292,3	2,8	2640,1	84,2	2421,7	28,1
EC	5532	37,5	5700,1	35,2	2197,1	53,6	1799	12,3	1615,9	1,3	2029	26,7	5107,4	112,3	4585,5	25,1
K. chlorogenová + K. kryptochlorogenová	94,4	0,3	103,3	1,8	848,6	2,5	898,1	17,4	861	7	878,3	3,5	198,8	7,3	124,8	3,5
K. neochlorogenová	36	0	34,4	0,3	502,1	2,5	675,3	31,4	539,2	21,2	566,4	10,4	95,8	3,1	56	4,9
Rutin	4010,2	43,5	4254,1	95,9	5559,3	60	5571,6	95,8	5239,1	104,5	5860,9	51,6	4408	24,7	3558,4	0
Isoquercitin	222,2	0	235,2	2,6	1067,7	22,4	1202,3	21,2	1149,9	0	1213,5	18,8	337,7	5,8	246,5	0,5
K. gallová	238,1	15,6	255,1	2,8	908,3	25	1454,5	57,7	985,3	5,7	807,3	11,3	285,1	0	209,1	2,8
K-3-O-rutinosid	487,7	8,3	529,8	13,2	2714,7	37,1	2723,6	50,7	2611,7	19,2	2839	62,2	872,4	3,8	587,6	2,5
K-3-O-glukosid	96,8	6,9	100,3	2,1	1292	24,6	1486,3	24,4	1403	17,6	1427,3	13,9	271,6	0	166,5	8,2
Q-3-O-glukosylrut. + K-3-O-galakt. rut.	708	10,8	763,6	29,7	164,4	3,1	146,9	6,3	138,4	4,4	183,7	8,9	669,5	5,4	594,7	6,3
K. 5.p-kum. Chinová	29,2	0,6	33,2	0,4	172,4	2,4	181,8	0,1	182,1	1,4	196,1	4,2	54,4	1,1	34,3	0,1
K. 4.p-kum. Chinová	63,4	0,1	66,1	0,3	522,2	3	522,2	1,4	507,2	2,8	549,2	11,3	126,8	0,5	76,4	4,4
K.galoylchinová	40,4	1,1	40,3	1,3	181,9	7,2	671,2	2,8	295,1	2,8	199,1	2,8	55,1	1,3	41,1	1

13. Den fermentace																
Látka	vz1		vz2		vz3		vz4		vz5		vz6		vz7		vz8	
	c [µg/l]	SD	c [µg/l]	SD	c [µg/l]	SD	c [µg/l]	SD	c [µg/l]	SD	c [µg/l]	SD	c [µg/l]	SD	c [µg/l]	SD
EGC	4497,0	70,4	4904,0	25,7	1843,3	75,6	1606,2	13,7	1493,0	3,7	2214,8	24,3	5151,6	124,5	4921,7	74,1
GC	1498,7	9,4	1566,2	6,9	331,5	1,4	436,7	7,0	273,9	4,2	347,4	5,0	1330,0	6,5	1312,1	4,0
EGCG	5901,1	51,1	6491,2	94,2	1698,1	29,5	1878,7	76,5	1963,0	127,7	3191,4	51,1	7490,8	42,2	7912,3	33,2
GCG	2167,8	25,8	2492,9	0,0	482,9	14,9	572,0	7,7	597,3	6,0	1016,4	2,3	2794,0	17,3	2854,2	17,1
CG	443,2	0,0	504,6	4,3	210,8	5,1	278,2	4,6	302,3	6,8	476,9	3,4	619,0	1,7	610,6	0,0
ECG	1630,0	0,0	1790,0	28,3	1055,0	21,2	1395,0	49,5	1525,0	7,1	2155,0	49,5	2185,0	21,2	2320,0	0,0
C	2659,9	13,4	2898,1	14,9	1314,1	1,4	1314,1	2,0	1278,4	8,9	1653,5	5,5	3037,1	112,2	3156,2	14,2
EC	5063,2	87,8	5346,3	62,8	2338,6	12,3	1878,7	26,8	1843,3	37,5	2904,8	0,0	6018,5	88,0	6283,9	37,5
K. chlorgenová + K. kryptochlorgenová	84,2	2,5	93,6	1,0	821,4	10,9	900,6	3,5	950,1	42,2	1217,5	10,4	218,9	3,8	170,9	0,7
K. neochlorgenová	33,8	0,1	36,7	0,0	509,5	17,9	687,7	13,5	682,8	7,2	776,8	7,0	105,0	1,4	70,3	1,1
Rutin	3595,4	51,9	3903,2	43,3	5233,0	34,6	5294,6	104,9	5848,6	26,5	8151,2	43,2	5072,9	17,7	5208,4	0,0
Isoqercitin	194,5	1,1	204,2	1,6	985,5	5,3	1157,4	10,8	1299,5	10,8	1673,3	22,4	379,9	1,1	345,5	3,7
K. gallová	229,1	1,4	247,1	1,4	939,3	5,7	1335,5	7,1	979,3	5,7	879,3	18,0	295,1	4,3	239,1	1,4
K-3-O-rutinosid	454,1	3,2	473,8	2,6	2580,3	44,9	2652,0	13,0	2875,9	50,8	3870,0	31,4	968,2	31,7	787,3	5,7
K-3-O-glukosid	80,8	1,5	87,8	2,8	1212,2	4,5	1392,6	19,2	1559,1	29,9	1801,9	84,0	296,6	4,9	203,6	6,4
Q-3-O-glukosylrut. + K-3-O-galakt. rut.	632,4	17,1	689,7	10,6	158,6	2,6	153,2	1,9	156,8	4,6	262,5	3,2	782,8	15,7	833,0	9,2
K. 5.p-kum. Chinová	28,2	0,8	28,0	0,9	174,5	0,0	175,7	0,6	191,1	2,8	253,1	0,0	63,1	2,1	51,8	1,1
K. 4.p-kum. Chinová	52,2	1,4	56,0	0,6	513,2	1,4	515,2	12,9	577,2	8,6	785,3	12,0	142,1	0,3	112,3	0,6
K.galoylchinová	37,6	0,5	37,2	0,6	189,1	2,6	515,2	5,7	357,1	19,0	217,1	8,5	60,1	0,4	46,0	0,6

Tabulka 20 Kvantitativní zastoupení fenolických látek v komerčních vzorcích kombuchy

Látka	K1		K2		K3		K4		K5		K6		K7		K8		K9	
	c [µg/l]	SD	c [µg/l]	SD	c [µg/l]	SD	c [µg/l]	SD	c [µg/l]	SD	c [µg/l]	SD	c [µg/l]	SD	c [µg/l]	SD	c [µg/l]	SD
EGC	6301,6	200,2	266,1	1,3	5019	12,5	2382,9	37,5	58,1	2,4	21145	625,5	39102,2	1501,2	12812,2	125,1	19464,3	0
GC	746,2	266,1	1004,1	271,9	778,7	140,1	546	30,1	1066,5	159,6	1216,6	254,6	1103,6	546,9	963,2	282,7	889,5	521,7
EGCG	4955	106,1	13,3	0,1	5420	56,6	2070	14,1	28,8	0,8	40600	707,1	43550	919,2	16150	353,6	26250	212,1
GCG	2170	14,14	4,73	0,41	2290	99	983,5	7,78	5,14	0,04	575,5	4,95	611,5	3,54	824	21,21	988,5	4,95
CG	429,3	7,7	6,0	0,8	379,4	6,8	251,1	6,0	3,4	0,1	57,1	0,9	67,0	1,9	263,1	7,7	100,6	429,3
ECG	2053,3	59,6	20,7	2,4	1493,3	34,1	799,1	11,1	19,5	0,0	6659,8	85,2	6954,9	178,8	4895,5	8,5	3661,1	0,0
C	2272,9	126,3	1083,8	2,8	1360,7	7,0	1036,2	0,0	49,4	0,0	665,0	0,0	1669,4	2,8	1418,3	7,0	774,2	0,0
EC	5134	100,1	2497,9	50	2551	0	1603,6	13,8	101,9	0,7	5478,9	87,6	13157,2	87,6	6098,2	12,5	4665,1	12,5
K. chlorgenová + kryptochlorgenová	37,6	0,2	96,8	3,1	87,2	2,8	66,4	2,8	197,8	4,5	596,1	17,5	166,6	1,1	326,1	3,2	2576,5	3,5
K. neochlorgenová	40,1	0,2	213,4	4,9	52,3	1,8	39,4	0,3	117,1	3,2	78,5	2,5	45,7	0,2	158,7	1,8	235,2	1,4
rutin	1452,9	0,0	1742,3	8,7	720,3	8,7	596,6	2,6	548,5	0,9	1859,3	17,4	3570,8	34,8	2887,4	26,1	1391,4	0,0
Isoqercitin	262,9	3,7	313,7	3,7	112,3	2,1	100,3	3,2	82,4	1,1	353,4	1,6	462,5	3,7	383,7	0,0	264,0	3,2
K. gallová	1429,5	19,8	2159,7	127,3	1192,4	21,2	693,3	19,8	604,2	21,2	516,2	1,4	521,2	8,5	941,3	14,1	163,6	1,6
K-3-O-rutinosid	442,0	9,5	877,8	13,9	210,5	0,0	199,3	5,7	181,4	1,9	711,6	0,6	743,0	7,0	1053,3	6,3	769,4	2,5
K-3-O-glukosid	171,0	2,9	275,1	16,7	68,7	1,5	73,6	4,4	60,9	0,7	308,0	1,5	224,8	7,4	255,3	5,4	412,1	5,4
Q-3-O-glukosylrut. + K-3-O-galakt. rut.	1308,5	76,0	31,8	1,1	610,0	17,7	560,3	8,2	439,4	7,0	1747,4	38,0	1980,3	50,7	558,9	22,8	2105,6	25,3
K. 5.p-kum. Chinová	36,7	1,3	42,5	0,7	27,5	0,7	14,2	0,0	5,4	0,2	75,0	0,7	108,0	1,4	94,2	1,0	98,7	1,4
K. 4.p-kum. Chinová	106,0	2,8	93,0	1,6	103,0	1,4	51,8	1,4	37,7	0,1	215,0	5,7	307,0	14,1	279,0	5,7	360,0	4,2
K.galoylchinová	157,6	9,2	23,3	3,3	651,2	17,0	289,1	25,5	181,8	0,4	426,2	1,4	1665,6	99,0	311,1	5,7	395,2	2,8