

Význam Kombuchy a její biologicky aktivní látky

Bc. Radoslav Hrubý

Diplomová práce
2014



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav technologie potravin

akademický rok: 2013/2014

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Radoslav Hrubý**
Osobní číslo: **T11108**
Studijní program: **N2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Technologie, hygiena a ekonomika výroby potravin**
Forma studia: **prezenční**

Téma práce: **Význam Kombuchy a její biologicky aktivní látky.**

Zásady pro vypracování:

I. Teoretická část

1. Historie, mykologická charakteristika, technologické zpracování kombuchy.
2. Biologicky aktivní látky kombuchy.
3. Účinky biologicky aktivních látek kombuchy na lidský organismus.

II. Praktická část

1. Výroba kombuchového nápoje.
2. Stanovení antioxidační aktivity, celkových polyfenolů a antiproliferačního efektu u kombuchy.
3. Zpracování výsledků a vyhodnocení.

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná/elektronická**

Seznam odborné literatury:

- [1] WILLIAMS, B. W. a kol. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. LWT - Food Science and Technology, 1995, 28, s. 25-30, ISSN 1023-367.
[2] GUNTHER, W. F. Kombucha - Das Teepilz-Getränk - Praxisgerechte Anleitung zur Zubereitung und Anwendung. Berlin: Ennsthaler, 2008. 172 s. ISBN: 38-50683-04-4.
[3] WACHENDORFOVÁ, V. Čaj. Praha: Slovart, 2007. 96 s. ISBN: 978-80-7209-922-1.
[4] BATTIKH, H. a kol. Antibacterial and Antifungal Activities of Black and Green Kombucha Teas. Journal of Food Biochemistry, 2013, 37, s. 231-236, ISSN 0145-8884.
[5] HESSMAN-KOSARIS, A. Zázračná kombucha: Energetický nápoj s jemnou léčivou silou. Olomouc: Fontana, 2002. 160 s. ISBN: 80-86179-81-8.

Vedoucí diplomové práce:

Ing. Jiří Mlček, Ph.D.

Ústav technologie potravin

Datum zadání diplomové práce:

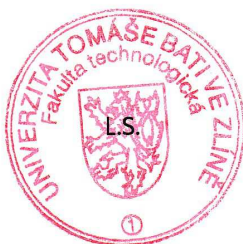
10. ledna 2014

Termín odevzdání diplomové práce:

25. dubna 2014

Ve Zlíně dne 15. dubna 2014


doc. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan




doc. Ing. František Buňka, Ph.D.
ředitel ústavu

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

- beru na vědomí, že odevzdáním diplomové/bakalářské práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, bez ohledu na výsledek obhajoby ¹⁾;
- beru na vědomí, že diplomová/bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému dostupná k nahlédnutí, že jeden výtisk diplomové/bakalářské práce bude uložen na příslušném ústavu Fakulty technologické UTB ve Zlíně a jeden výtisk bude uložen u vedoucího práce;
- byl/a jsem seznámen/a s tím, že na moji diplomovou/bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3 ²⁾;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 1 autorského zákona má UTB ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 2 a 3 mohu užít své dílo – diplomovou/bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- beru na vědomí, že pokud bylo k vypracování diplomové/bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tedy pouze k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové/bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- beru na vědomí, že pokud je výstupem diplomové/bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Ve Zlíně

.....

¹⁾ zákon č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, § 47 Zveřejňování závěrečných prací:

(1) Vysoká škola nevýdělečně zveřejňuje disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce, u kterých proběhla obhajoba, včetně posudků oponentů a výsledku obhajoby prostřednictvím databáze kvalifikačních prací, kterou spravuje. Způsob zveřejnění stanoví vnitřní předpis vysoké školy.

(2) Disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce odevzdané uchazečem k obhajobě musí být též nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněny k nahlížení veřejnosti v místě určeném vnitřním předpisem vysoké školy nebo není-li tak určeno, v místě pracoviště vysoké školy, kde se má konat obhajoba práce. Každý si může ze zveřejněné práce pořizovat na své náklady výpisy, opisy nebo rozmnoženiny.

(3) Platí, že odevzdáním práce autor souhlasí se zveřejněním své práce podle tohoto zákona, bez ohledu na výsledek obhajoby.

²⁾ zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 35 odst. 3:

(3) Do práva autorského také nezasahuje škola nebo školské či vzdělávací zařízení, užije-li nikoli za účelem přímého nebo nepřímého hospodářského nebo obchodního prospěchu k výuce nebo k vlastní potřebě dílo vytvořené žákem nebo studentem ke splnění školních nebo studijních povinností vyplývajících z jeho právního vztahu ke škole nebo školskému či vzdělávacímu zařízení (školní dílo).

³⁾ zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 60 Školní dílo:

(1) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení mají za obvyklých podmínek právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla (§ 35 odst. 3). Odpírá-li autor takového díla udělit svolení bez vážného důvodu, mohou se tyto osoby domáhat nahrazení chybějícího projevu jeho vůle u soudu. Ustanovení § 35 odst. 3 zůstává nedotčeno.

(2) Není-li sjednáno jinak, může autor školního díla své dílo užít či poskytnout jinému licenci, není-li to v rozporu s oprávněnými zájmy školy nebo školského či vzdělávacího zařízení.

(3) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení jsou oprávněny požadovat, aby jim autor školního díla z výdělku jím dosaženého v souvislosti s užitím díla či poskytnutím licence podle odstavce 2 přiměřeně přispěl na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložily, a to podle okolností až do jejich skutečné výše; přitom se přihlédne k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

ABSTRAKT

Tato diplomová práce je zaměřena na mykologickou charakteristiku kombuchy a na účinky biologicky aktivních látek kombuchy na lidský organismus. Cílem diplomové práce bylo zjistit množství celkových polyfenolů, stanovení antioxidační aktivity a antiproliferační efekt aktivity u kombuchy. Výsledné hodnoty byly porovnávány a vyhodnocovány. Celkový obsah polyfenolů byl stanoven spektrofotometricky a antioxidační aktivita pomocí metody DPPH. Stanovení antiproliferačního efektu bylo spektrometrickou metodou MTT.

Klíčová slova: kombucha, polyfenoly, antioxidanty, čaj, aktivita

ABSTRACT

This Master`s thesis is focuses on mycological characteristics of kombucha and the effects of biologically active substances of kombucha on the human organism. The aim of this thesis is to determine the amount of total polyphenols, antioxidant activity and antiproliferative effect of activity in kombucha. The resulting values were compared and evaluated. The total polyphenol content was determined spectrophotometric and antioxidant activity with help of using the DPPH. Determination of the antiproliferative effect was by spectrometric method of MTT.

Keywords: Kombucha, polyphenols, antioxidants, tea, activity

Na tomto místě bych velice rád poděkoval svému vedoucímu diplomové práce, panu Ing. Jiřímu Mlčkovi, Ph.D, za odborné vedení, cenné informace a poznámky k mé diplomové práci a také za čas, který mi věnoval. Dále děkuji své rodině za podporu během celého studia.

Prohlašuji, že odevzdaná verze diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou totožné.

OBSAH

ÚVOD	10
I TEORETICKÁ ČÁST	11
1 KOMBUCHOVÝ NÁPOJ	12
2 MYKOLOGICKÁ CHARAKTERISTIKA	14
2.1 SYMBIÓZA KVASINEK A BAKTERIÍ	14
2.1.1 Kvasný proces	15
2.1.2 Chuťové variace kombuchy	15
3 CHEMICKÉ SLOŽENÍ KOMBUCHY	16
4 TECHNOLOGICKÉ ZPRACOVÁNÍ KOMBUCHY	19
4.1 VHODNÝ ČAJ PRO VÝROBU KOMBUCHY.....	19
4.1.1 Zelený čaj	19
4.1.2 Černý čaj	20
4.1.3 Bylinkový čaj	21
4.2 PRO PŘÍPRAVU POUŽIJEME CUKR NEBO MED	24
4.2.1 Spotřeba cukru pro přípravu kombuchy.....	25
4.3 VODA PRO VÝROBY KOMBUCHY.....	25
5 ANTIOXIDANTY	26
5.1 ANTIOXIDAČNÍ LÉČBA	27
5.2 EFEKT ANTIOXIDANTŮ	28
6 POLYFENOLY	29
6.1.1 Flavonoidy.....	30
6.1.2 Fenolové kyseliny	31
6.1.3 Stilbeny a lignany.....	31
6.2 ANTIOXIDAČNÍ ÚČINKY POLYFENOLŮ	32
7 PROLIFERACE A ŽIVOTASCHOPNOST	33
7.1 BUNĚČNÉ LINIE	33
II PRAKTICKÁ ČÁST	34
8 CÍL PRÁCE	35
9 VÝROBA KOMBUCHOVÉHO NÁPOJE	36
9.1 NÁVOD NA PŘÍPRAVU ODVARU PRO VÝROBU KOMBUCHY	36
9.2 NÁVOD NA PŘÍPRAVU KOMBUCHOVÉHO NÁPOJE	37
10 METODIKA A MATERIÁL	38
10.1 MATERIÁL.....	38
10.2 PŘÍPRAVA VZORKŮ	38
10.2.1 Popis vzorku sypaných sušených čajů a bylin pro přípravu odvaru pro domácí výrobu kombuchového nápoje a samotné komerční vzorky	38
10.2.1.1 Černý čaj – English Breakfast Tea.....	38
10.2.1.2 Zelený čaj – Green Snail	39
10.2.1.3 Heřmánek	39
10.2.1.4 Meduňka.....	39
10.2.1.5 Měsíček	39
10.2.1.6 Kopřiva.....	40

10.2.1.7	Hloh.....	40
10.2.1.8	Šípek.....	40
10.2.1.9	Komerční vzorky kombuchového nápoje	41
10.3	STANOVENÍ ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITY METODOU DPPH.....	42
10.4	ANALÝZA CELKOVÝCH POLYFENOLŮ	42
10.5	STANOVENÍ ANTIPROLIFERAČNÍHO EFEKTU.....	43
11	VÝSLEDKY	45
11.1	STANOVENÉ ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITY.....	45
11.2	OBSAH CELKOVÝCH POLYFENOLŮ.....	47
11.3	ANTIPROLIFERAČNÍ EFEKT	49
12	DISKUZE	51
12.1	DISKUZE – ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITA	51
12.2	DISKUZE – OBSAH CELKOVÝCH POLYFENOLŮ.....	56
12.3	DISKUZE – ANTIPROLIFERAČNÍ EFEKT	60
	ZÁVĚR	62
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	64
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....	71
	SEZNAM OBRÁZKŮ	72
	SEZNAM TABULEK.....	73
	SEZNAM PŘÍLOH.....	74

ÚVOD

Kombucha se říká houbě pocházející z východní Asie, kde její blahodárné účinky byly známy již v roce 221 před n. l. Nejedná se o běžnou houbu, jak ji známe, ale o symbiotický útvar tvořený několika druhy kvasinek a bakterií. Může být náhradou mléčných výrobků pro lidi trpící alergií na mléčnou bílkovinu. Kombucha se běžně označuje jako čajová houba, což je biologicky nesprávné. Mínění vědců se může rozcházet. Někteří popisují kombuchu jako houbu, jiní jako symbiózu různých kvasných buněk, řas a jiných mikroorganismů typických pro lišejníky. Má tvar plochého gumovitého světlešedého nebo hnědého lívance. Kombucha je symbiózní kultura kvasinek a bakterií. Odborná literatura uvádí celou řadu příznivých účinků kombuchového nápoje na organismus. Působí na něj jako celek. Při pokusech na rostlinách se dokonce ukázalo příznivé působení na geny, a to bez vedlejších účinků. Všeobecně se dá říci, že obsahuje žádoucí látky v harmonickém složení. Celá řada výzkumů a anket potvrdila výrazné zlepšení zdravotního stavu a celkové kondice u všech dlouhodobých konzumentů tohoto nápoje. Také účinně podporuje imunitu, doplňuje ochranné látky a vitaminy. Jak nápoj, tak samotná kombuchová kultura mají mnohostranné využití – od obkladů při různých vyrážkách či popáleninách přes masáže proti bolesti svalů, tak v péči o pleť a vlasy. Přemnožená kultura se dá použít jako velmi výživné hnojivo pro rostliny nebo do kompostu. Z uvedených informací je zřejmé, že nápoj je všestranně použitelný. Jaké látky obsahuje a proč je tak cenná? Abychom byli schopni na tuto otázku odpovědět, je třeba se věnovat této problematice důkladněji. Proto se ve své práci zabývám historií kombuchy, její mykologickou charakteristikou, chemickým složením a v neposlední řadě rovněž příznivými účinky na lidský organismus. Naše tělo je už po staletí vystavováno účinkům volných radikálů, které vznikají v našem organismu a představují potenciaální nebezpečí. Mohou poškodit buněčnou membránu, ničit genetickou bázi buněk, urychlují proces degenerace a stárnutí buněk. Jedním ze způsobů, jak chránit lidský organismus před nežádoucími vlivy volných radikálů, je přísun antioxidantů, které mají schopnost volné radikály nejen blokovat, ale i ničit. Lidský organismus je schopen si produkovat vlastní účinné antioxidanty, ale jejich množství a složení není vždy tak účinné, a proto je nutné antioxidanty přijímat. Během průběhu času se dostaly do popředí zájmu, ať už u laické veřejnosti nebo odborníků, právě látky s antioxidačními účinky. Mezi tyto látky patří i kombucha anebo tolik potřebný čaj pro přípravu nápoje.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 KOMBUCHOVÝ NÁPOJ

Kombucha neboli čajová houba, není ničím novým [1]. Je prastarým lidovým a domácím lékem. Kombucha je v podstatě měkká pórovitá hmota a k výrobě kombuchového čaje potřebujeme dále oslazený čaj, cukrem nebo medem. Kombucha není jen nápojem k utišení žízně, ale i nápojem, který obsahuje velmi cenné bioaktivní látky [2]. Přesto, že je moderní, není tento zkvašený čaj nový, je znám již mnohá staletí. Kořeny sahají do různých kultur. Kdo kombuchu původně objevil a kdo ji nechal poprvé zkvasit, se neví. O vzniku se tradují různé pověsti z Číny, Japonka a Ruska [3,4].

Kombucha jako osvěžující nápoj byla objevena v posledních letech, přesněji řečeno, znovuobjevena. Vždyť již naši předkové používali nápoj s jemně kyselou chutí, který má svoji hlubokou tradici jako nejlepší lidový a přírodní prostředek zvláště v asijských zemích. Čajová houba se k nám dostala z Japonska přes Rusko, Baltik a Německo [4]. Houbu začali používat také v Jugoslávii, Maďarsku, Polsku a Německu. Již v roce 1913 byla tato houba podrobena vědeckému bádání. O kombuše bylo zveřejněno mnoho článků v odborných medicínských časopisech, ale o jejím původu se prakticky nic nevědělo. Během první světové války, jak již bylo řečeno, se v Polsku začal tento bioprodukt zkoumat z jiného pohledu: jako projímadlo a jako potravinářský ocet [4,5]. Ještě před druhou světovou válkou se perlivý lidový nápoj rozšířil i do vzdálenějších oblastí Střední Evropy. S kulturami, které dostávaly přímo fantastické názvy – „čínská houba“, „indická houba“, „Mo-Gu“ nebo „Fungojapon“, se začalo čile obchodovat. Dánové ji nazývali „Gichtgulle“ nebo „Wolgagualle“. V Praze se dal rovněž koupit lisovaný extrakt pod názvem „kombucha“. Pozdější recepty na přípravu čaje z kombuchy na nějakou dobu vymizely. Hlavním důvodem byla válka a přísná omezení přísunu základních potravin jako byl čaj a cukr. Bez toho „luxusního zboží“, které se na černém trhu v této době dostalo koupit opravdu za horentní sumy, se kombuše nemohlo dařit a přestala se prodávat. V Německu se v padesátých letech jen malé skupiny zájemců zabývaly pěstováním kombuchových kultur, zatímco labužníci ve Francii, Itálii a Španělsku si osvěžující nápoj z kombuchy vybírali z nápojových lístků v mnoha rekreačních oblastech a „vyšší společnost“ jej používala jako nealkoholickou náhradu za aperitiv pro jeho vynikající účinky proti zácpě. K jednomu ze stoupců tohoto nápoje patří také dr. Rudolf Sklenar, lékař z Oberhassenu. Jako vojenský lékař získal velké zkušenosti s kombuchou v Rusku a její kulturu přivezl také do své vlasti. Během své praxe doporučoval kvasný nápoj nejdříve pacientům, u kterých v důsledku žaludečních potíží došlo ke snížené produkci žaludečních

kyselin. Nakonec tento lékař doporučoval kombuchu jako léčivý prostředek proti nejrůznějším poruchám látkové výměny, dále při léčbě revmatizmu, dny, žaludečních a střevních potíží, při vysokém krevním tlaku, cukrovce a při zvýšené hladině cholesterolu v krvi [4].

V 60. letech došlo k prvnímu zveřejnění zpráv o kombuchových kulturách, které se staly počátečními impulsy k vědeckým diskuzím. O 30 let později, tedy v roce 1987, se dr. R. Sklenar aktivně zabýval možnou aplikací kombuchy při léčbě rakoviny. Tato léčba měla být založena mimo jiné na očištném působení kombuchy ve střevech a na koli-preparátech. Tímto způsobem dojde k zavedení potřebných bakterií do střev. Dr. Sklenar byl přesvědčen, že se posílí imunitní systém a rakovinové buňky se zničí. Dnes nejsou stále známy veškeré informace o kombuše, ale stále jich přibývá. Je známo, odkud asi pochází, jak vznikl a jaké účinky může vyvolat. Existují ověřené zprávy lékařů a vědců z Francie, Ruska, Číny, Japonska, Koreje, Indie, Indonésie, Brazílie, Mexika, USA a Kanady. V Německu se účinky kombuchy a její hodnotou z medicínského pohledu zabývá Karl Heinz Schmidt, primář preventivního oddělení Univerzity v Tübingenu. Například mnoho sportovních lékařů provádělo testy, jak dalece se zvýší výkonnosti sportovců při užívání přípravků z kombuchy. K nim patří i profesor G. Simon z Institutu sportovního lékařství ve Waredorfu a rakouský profesor W. Dungal. Mnozí vědci provádějí testy perlivého nápoje zvláštními metodami, například pomocí Kirilianovy elektrografie, speciálního typu vysoce citlivého fotografování, během něhož dochází k „zachycení“ aury ruky. Pomocí této metody bude viditelně zaznamenán i příliv energie po použití kombuchového přípravku. Velmi úspěšný je také tzv. „biorezonátorový test“ lékaře a biologa z Dolního Saska dr. Reinholda Wiesnera. Speciální metodou a postupem byly technicky změřeny „pohyby krve“ a proces byl srovnán po použití kombuchy. Na základě výsledků testů došel Wiesner k závěru, že perlivý nápoj (připravený podle receptury dr. Sklenara) velmi účinně aktivuje obranné síly nemocného organismu a do činnosti uvádí samoléčebný proces. Mnoho vědeckých publikací, výsledků z různých výzkumů a informace o zkušenostech poskytl v posledních letech mikrobiolog a přírodní léčitel Günther W. Frank z Birkenfeldu. Veškeré jeho poznatky vycházejí z vlastních zkušeností i z výzkumů jiných badatelů. Günther W. Frank získal mnoho cenných informací z ruského regionu, kde čajová houba byla velmi důkladně prozkoumána [4,6,7,8,9].

2 MYKOLOGICKÁ CHARAKTERISTIKA

Kombucha je kvasný čajový nápoj, v němž kultury kvasinek a bakterií vyrábějí během přirozeného kvasného procesu biologicky hodnotné látky. Podle receptur se k výrobě kvasného nápoje používá zelený nebo černý čaj, popř. bylinná směs a cukr (med) [1]. Základem pro kvasný proces je měkká, rosolovitá, houbovitá hmota, tzv. „houba kombucha“; podobá se gumovému, nahnědlému plátku a vypadá téměř jako tlustý, mastný lívanec. Ačkoliv, má mnoho podobností s houbou jako takovou, přesto je to docela něco jiného. Obvykle se „houba kombucha“ označuje za určitý živý organismus, složený z mnoha drobných organismů, vitálních kvasinkových buněk a potřebných bakterií. Svoji strukturou se tedy spíše podobá lišejníku. Lišejníky se na světě vyskytují už více než dvě miliardy let. Některé rody lišejníků, např. lišejník islandský, výborným způsobem léčí určitá onemocnění [2]. V současné době známe přes šestnáct tisíc různých druhů lišejníků. Kombucha je jedním z nich [3].



Obr. 1. Kombuchový lívanec [11]

2.1 Symbióza kvasinek a bakterií

Skutečností zůstává, že kombucha je živoucí společenství (symbióza) rozmanitých kvasinek, bakterií a jiných mikroorganismů. Bakterie potřebují pro svou činnost určité aktivní látky a vitamíny. Tyto substance nezbytné pro život dodávají bakteriím kvasinky a tyto přeměňují cukr na alkohol. Bakterie naopak produkují kyseliny, které zase kvasinky nutně potřebují pro svou vlastní ochranu. Pokud je zachováno kyselé prostředí, v němž aktivně pracují kvasinky a jiné mikroorganismy, nemohou zároveň škodit hnilobné bakterie a původci nemocí [3].

Následující kvasinky a bakterie pomáhají při produkci kombuchy:

- **Kvasinky** – *Saccharomyces ludwigii*, *Saccharomyces apiculatus*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Pichia fermentans*, *Mycoderma*, *Torula* [12].
- **Bakterie** – *Acetobacter xylinum*, *Acetobacter aceti*, *Acetobacter pasteurianum*, *Gluconobacter gluconicum*, *Acetobacter kerogenum* [12].

2.1.1 Kvasný proces

Jestliže čajová houba přijde do kontaktu s roztokem z čaje a cukru, dochází k rozmnožování mikroorganismů, a to ne výtrusy, jako u vlastních hub, ale většinou dělením (pučením). Tím po celé ploše povrchu tekutiny dorůstá plocha, rosolovitá hmota, do vrstev. Má stejné obrysy jako nádoba, v níž „žije“. Z její spodní části se do čajové směsi vylučují aktivní látky. Tím se také během kvasného procesu vlastně rozděluje a mění. To je pak velmi dobře znatelné na drobných bublinách, které se tvoří v živném roztoku. Během celého procesu, zvláště pak během procesu tvorby kyselin, probíhá tzv. inverze disacharidů, což je v podstatě štěpení disacharidů na monosacharidy (jako je glukóza, fruktóza, galaktóza). Toto štěpení vyvolávají enzymy a kyseliny. Kvasný proces pokračuje dále tak, že kvasinky mění cukr na alkohol. Dále část bakterií zpracovává cukr na celulózu, což také přispívá k postupnému růstu povrchové vrstvy čajové houby [5,12].

2.1.2 Chut'ové variace kombuchy

Látky, které vznikají během kvasného procesu, změní nápoj po všech stránkách. Nápoj pak ve srovnání s původní čajovou směsí vypadá a chutná zcela jinak. I chuť kombuchy není stejná. Zda-li budou v nápoji z čajové houby obsaženy substance a v jakém množství, závisí na druhu čaje, množství cukru, na délce a teplotě kvasného procesu. I jiné vlivy, jako například světelná intenzita, prostředí v místnosti a materiál kvasné nádoby hrají velmi důležitou roli při „tvorbě produktu“. Přitom je potřeba dávat pozor na to, jak probíhá samotný růst kombuchy. Čeledi mikroorganismů, pocházející z chladného severu, mají jiné vlastnosti a potřeby než jejich příbuzní ze slunného jihu. Proto, když je založen živný roztok s „odnožemi“ téže mateřské kombuchy, dochází u stejného živoucího produktu k přirozeným odchylkám. Může se jednat o kvantitativní a kvalitativní množství obsahových látek, čili se vlastně jedná jen o jakousi orientační pomůcku [9].

3 CHEMICKÉ SLOŽENÍ KOMBUCHY

Podrobnou chemickou analýzou bylo dokázáno, že kvasný nápoj obsahuje mnoho biologicky cenných obsahových látek, které z antibiotického pohledu mají očistné účinky (odstraňují jedy z těla): organické kyseliny, bílkovinné enzymy a enzymy štěpící sacharidy, vitaminy a minerální látky, kvasinky, polysacharidy, kofein a alkohol [1,2,3].

Nejdůležitější obsahové látky kvasného nápoje:

- **Kyseliny** - glukuronová, mléčná, octová, tříslová, gluonová, uhličitá, vinná, citrónová, oxalová, jantarová, malonová [2,3,5,6,13].
- **Vitaminy** - B_{1,2}, B₃, B₆, B₁₂, kyselina listová, C, D, E, K [2,3,5,6,13].
- **Enzymy** - invertáza, amyláza, kataláza, syřidlový enzym, sacharáza, proteolytické enzymy [2,3,5,6,13].
- **Prvky** - Sodík, draslík, magnesium, vápník, mangan, železo, kobalt, měď, zinek [2,3,5,6,13].
- **Další** - kvasinky, polysacharidy, kofein, alkohol [2,3,5,6,13].

Dlouhou dobu bylo jisté, že glukuronová kyselina a tzv. pravotočivá kyselina mléčná L(+) obsažená v kombuše, má jedny z nejdůležitějších účinků na naše zdraví [1]. Někteří odborníci popsali kromě toho pozitivní účinky enzymů (dříve označované jako fermenty) a vitaminů, které kvasný nápoj obsahuje také ve velkém množství. Pro mnoho konzumentů kombuchy nejsou klíčovým bodem jen živé prvky, ale i kyselina uhličitá a malé množství kofeinu a alkoholu (v průměru asi 0,5-1 %), které vznikají během kvasného procesu [8,13].

Kyselina glukuronová - vzniká složitým biochemickým dějem oxidací glukózy. U zdravého člověka se kyselina glukuronová tvoří v játrech. Její funkce spočívá v tom, že se propojí s odpadními produkty látkové výměny a cizími substancemi, které se do těla dostávají stravou, dýchacími cestami a skrze pokožku. V této nové alianci pak napomáhá vylučování škodlivých látek, jako jsou konzervační činidla, nikotin a škodlivé látky z okolního prostředí, jako je rtuť, olovo a benzol, především střevy a močovými cestami. Větší přísun kyseliny glukuronové má ideální pozitivní efekt, mimo jiné především na obranný systém organismu [4].

Polysacharidy - kyselina glukuronová je součástí mnoha biologicky významných polysacharidů, které tvoří jednu ze základních složek mezibuněčné hmoty – kyseliny hyaluronové a chondroitin sulfátů. U dalších podobných polysacharidů slouží jako prekurzor, který je krátce po zabudování do řetězce přeměněn na jiné sacharidy (např. kyselinu L-idunorovou u dermatan sulfátu, nebo kyselinu L-idunoro-2-sulfátovou u heparinu). O polysacharidech je známo, že mimo jiné udržují v aktivní činnosti buňky imunitního systému. Tyto molekuly cukru vytvářené ze sacharidů jsou z biologického pohledu velmi aktivní. Posilují imunitní systém a činnost makrofágů a dále činnost T-krvinkových buněk a výživových buněk [1,4].

Enzymy - jsou molekulární aktivní látky (bílkoviny), které aktivují, urychlují a vyvolávají chemické procesy látkové výměny, bez nichž by tyto procesy samy o sobě nemohly účinkovat. Na základě svého původu se enzymy účastní výstavby složitých vazeb, jiné se účastní strukturálních procesů v lidském organismu. V lidském těle bylo objeveno asi 3000 enzymů. Enzymy kombuchy podporují zatížený trávicí trakt a účastní se přitom štěpení výživových látek [4,14].

Vitaminy a minerální látky - vitaminy stejně jako enzymy účinkují jako katalyzátory. To znamená že, zpomalují a urychlují jejich průběh, aniž se samy těchto procesů účastní.

Kyselina mléčná - důležité místo zaujímá také kyselina mléčná, přesněji řečeno: pravotočivá kyselina mléčná L(+). Účinkuje, ve srovnání se svojí levotočivou formou D(-), pozitivně na celý lidský organismus. Proto tato organická kyselina díky svému lehce kyselému charakteru dbá ve střevech o to, aby se zde nerozmnožovaly hnilobné bakterie a mohly se zde snadno „usídlit“ bakterie potřebnější. Kyselina mléčná účinkuje kromě toho na střevní sliznici a peristaltiku střev, promíchává potravu a posunuje ji v trávicím traktu dále. To je také důkazem toho, že kombucha zmírňuje a odstraňuje zatížení ve střevech nebo střevní obsah bez použití projímadel vyprazdňuje. Pravotočivá kyselina mléčná se vyskytuje jako meziproduct energetické látkové výměny v lidském těle. Náš organismus potřebuje tuto kyselinu mimo jiné k tvorbě energie ve svalech, játrech a červených krvinkách. Levotočivá kyselina mléčná je pro získání energie nepotřebná. Tato kyselina neobsahuje potřebné složky ve formě enzymů, které jsou nezbytné k transportu do jater, červených krvinek a mozku [4].

Kvasinky - zvláštní roli hrají kvasinky kombuchových kultur. Kvasinky rodu *Pichia* označují biologové za velmi důležité pro jejich vlastní obranný systém. I jiné druhy

kvasinek v kombuchových kulturách jsou pro lidské tělo absolutně neškodné. Takové kvasinky se řadí k rodu, který působí velmi blahodárně na orgány střevního traktu a jejich aktivitou se při látkové výměně stabilizuje střevní flóra. Zabraňuje také bujnému kvašení, které způsobují škodlivé mikroorganismy. Některé složky těchto kvasinek mají očistný účinek na pokožku. Kvasinky však nesmí být zaměnitelné s cizopasníky rodu *Candida*, kteří mohou vyvolat záněty pokožky a sliznic a alergické reakce. Kromě toho mohou narušit i obranný systém. I jiné procesy, jako například prudký pokles cukru, nemůže tento druh kvasinek zastavit. Podle různých zpráv průzkumů by se při užívání přípravků z kombuchy měly odstranit některé infekce, způsobené bakteriemi *Candida*. Existuje, asi dvě stě druhů kvasinek čeledi *Candida*, ale jen některé naše tělo dobře snáší, jako například *Candida robota* v droždí nebo *Candida*, obsažená v kefiru [4,15].

Kyselina usnisová - různé studie, především z Ruska a USA, ukázaly, že mimořádně silný antibiotický účinek kombuchy ovlivňuje také kyselina usnisová. Tyto zcela běžné kyseliny získané z lišejníků jsou ve střevech potřebné nejen ke zničení bakterií, způsobujících nemoci, ale také k likvidaci virů [4,16].

Alkohol - množství 0,5 % alkoholu v kvasném nápoji z čajové houby je stejné jako například v jablečném moštu. Je to rovněž obvyklé množství, které je potřeba ke konzumaci moštu. Mezní hodnota pro vnímání alkoholu v organismu se obvykle pohybuje mezi 0,2-0,5 %. Protože kombucha by se měla užívat v rozdělených dávkách (denně tři až čtyři sklenice), nepředstavuje toto množství alkoholu žádný problém. Spíše naopak, pokud se alkohol užívá v takových malých dávkách, má příznivé, pozitivní účinky na organismus. Kombucha je vynikající náhradou za nápoje s vyšším obsahem alkoholu, jako jsou například šumivé víno nebo pivo, jen pouze s tou výjimkou, že kdo nemůže konzumovat alkohol, neměl by pít rovněž kombuchu [1,4,8].

4 TECHNOLOGICKÉ ZPRACOVÁNÍ KOMBUCHY

4.1 Vhodný čaj pro výrobu kombuchy

Jaký čaj si pro kombuchu zvolíme, závisí na vašich chuťových zálibách. Anebo na tom, jak má čaj působit na tělo. Za klasický nápoj se považuje kombucha s černým čajem a rafinovaným (bílým) cukrem. Existují i jiné představy, že lepší je směs čaje, jiní tvrdí, že místo cukru je vhodnější používat med. Rozhodující je však to, jaký druh čaje vám chutná a jaký záměr nápojem sledujete. Existuje nespočet čajových odrůd. A také v rámci jedné odrůdy se vyskytují zřetelné rozdíly – v chuti a kvalitě. Rozhodující jsou přitom podmínky půdy a klimatu, stáří rostliny a navíc ještě způsob zpracování, balení a uskladnění již hotového čaje [16,17].

4.1.1 Zelený čaj

Zelený čaj pochází z rostliny (*Camellia sinensis*), stejně jako černý čaj, jen s tím rozdílem, že během výroby nedochází k fermentaci čajových lístků. Po jeho sklizni se čajové lístky zpracovávají napařováním pod tlakem. Tím jsou také zachovány cenné obsahové látky čajových lístků. Černý čaj neobsahuje téměř žádný vitamin C, zatímco v usušených listech zeleného čaje je ho obsaženo velké množství [17].

Látky obsažené v zeleném čaji – vitamin A, B₁, B₂, C, E, rutin, minerální látky a stopové prvky jako F, Fe, Ge, K, Ca, Cu, Ni, Mg, Mn, Zn, kyselina fosforečná, tanin. Dále alkaloidy: kofein, teofylin, teobromin; různé třísloviny a esenciální oleje. Zelený čaj dále obsahuje speciální substance, jako epigallocatechin-3-galat, zkratka EGCG. Tato aktivní látka zabraňuje růstu rakovinných buněk a snižuje hladinu cholesterolu v krvi. EGCG náleží do skupiny katechinů, což jsou přirozené radikály, které se vyskytují v dřevnatých rostlinách, ale také v čajových lístcích. EGCG je obsažen pouze v zeleném čaji, v černém čaji tato substance není obsažena [17,18,23]. Kofein obsažený v čaji se nazývá tein, jedná se u tutéž povzbudivou látku jako u kávy s úžasným rozdílem: zatím co u kávy účinkuje silně povzbudivě, tein čaje má jemné zklidňující účinky. Vysvětlení je takové, že tein je vázán na třísloviny a velmi pomalu se dostává do krevního oběhu. Kofein v zeleném čaji účinkuje na nervový systém, což se zase odráží na náladě a koncentraci a schopnosti reagovat. Zelený čaj má kromě toho celou řadu jiných pozitivních vlastností [19,20,21,22,24].

Zelený čaj pro kombuchu – znalci kombuchy upřednostňují následující druhy zeleného čaje: Gunpowder – Střelný prach; název čaje je odvozen od jeho vzhledu [1]. Čajové lístky jsou poměrně malé a po stočení připomínají kuličky střelného prachu. Chen Mee, Hyson, nebo čaj Japan Bancha Tee: je to čaj s mimořádně nízkým obsahem kofeinu. Podstata nízkého obsahu kofeinu spočívá vtom, že listy a stonky z tohoto japonského čajovníku se sbírají během chladného ročního období. Sbírají se především tříleté listy čajovníku. Trhají se v zimě, kdy se čajovník nachází v období klidu a obsah kofeinu je tedy nejnižší. Dále jsou to čaje Kukicha a nebo přechodnou pozici mezi zeleným černým čajem, který se pěstuje v Tchajwanu je oolong [3].

4.1.2 Černý čaj

Černý čaj má regulační a stimulační účinky. To je také ovlivněno procesem fermentace po sklizni čaje. Z čerstvě natrhaných čajových listů se speciální metodou odejme voda. Potom se uvadlé lístky srolují a nakonec fermentují [17]. Během tohoto oxidačního procesu se uvolňuje velké množství kofeinu a esenciálních olejů, zatímco vitaminy a ostatní substance se během procedury nevyklučují. Povzbuzující účinek kofeinu čaje je u černého jiný než u čaje zeleného. Během procesu fermentace uvolňují čajové lístky mnoho tříslovin, takže se váže jen nízký obsah kofeinu. Účinek kofeinu černého čaje je mnohem trvalejší. Pokud necháme čajové lístky louhovat delší dobu, uvolní se také jiné obsahové složky čaje, jako taniny a zklidňující kyselina tříslová. Také černému čaji jsou přisuzovány velmi dobré vlastnosti, mimo jiné zlepšuje koncentraci a schopnost vnímání. Obsah fluoridů v černém čaji slouží jako prevence kazivosti zubů. Cyanidol, další velmi důležitá substance obsažená v černém čaji, napomáhá vylučování jedovatých látek z jater. Pokud se černý čaj pije pravidelně, měl by mít příznivý vliv na onemocnění, jako je arterioskleróza, srdeční infarkt a rakovina. K cenným obsahovým látkám černého čaje patří kofein, teofylin, třísloviny a esenciální oleje. I když má černý čaj léčivé účinky, není oficiálně pokládán za léčivý prostředek, nýbrž je to potravina [25,26].

Černý čaj pro kombuchy - v zásadě platí, že čaj z horských oblastí je jeden z nejkvalitnějších. Černý čaj pochází z Asie nebo Afriky, z Indie nebo Srí Lanky. Dále uvádím několik druhů černého čaje, vhodných pro přípravu kombuchového nápoje: Assam-Tee - severní Indie (nejrozšířenější plantáže na světě), barva velmi tmavá, aroma obzvláště silné a kořeněné [1].

Ceylon-Tee - Srí Lanka, nejčastěji z jejich horských oblastí, barva zlatá, s načervenalým třpytem, aroma jemně aromatické [1].

Darjeeling-Tee - horské oblastí různých zemí, barva z první sklizně velmi světlá, z druhé sklizně tmavší, aroma jemné až kořeněné a silné [1].

Nilgiri-Tee – jihoindické pohoří Nilgiri, barva zlatočervená, aroma jemně aromatické [1].

Pro přípravu nápoje z kombuchy jsou vhodné i čajové směsi jako například Anglická čajová směs z druhů čaje ze Srí Lanky a Indie a z východních zemí. Ruská směs je vyrobena z čínského čaje a nesmí se zaměňovat s Ruským čajem, který skutečně pochází z Ruska [3,4].

4.1.3 Bylinkový čaj

Mikroorganismům kultur kombuchy se nejlépe daří v černém čaji. Tento živný roztok je osvědčený a prakticky bez problémů k pěstování kombuchy. Je však mnoho lidí, kteří dávají přednost živnému roztoku z bylinkového čaje, ať už proto, že černý čaj ze svých zdravotních důvodů nesnášejí, nebo chtějí využít zároveň i léčivé síly bylin, či mají jiné důvody. Kdo však ještě nemá příliš mnoho zkušeností s pěstováním kombuchy, měl by raději dát přednost černému čaji. Pro přípravu nápoje z kombuchy nepoužívejte takové druhy bylinných čajů, které mají vysoký obsah esenciálních olejů, jako například fenykl, třezalka, heřmánek, máta peprná, rozmarýn, šalvěj a tymián. Esenciální oleje silně ničí bakterie a mohly by tak zabránit kvasnému procesu. Existují však také informace, kdy se kombuše velmi dobře daří v živném roztoku, připravením z heřmánkového nebo mátového čaje. Zkombinujte nejdříve tyto druhy bylinných čajů s černým nebo zeleným čajem, aby mikroorganismy rostlinných výtažků hrály jen vedlejší roli. Některé druhy bylinkových čajů mohou obsahovat vyšší procento hořčin, takže čajová houba se vyvíjí jen velmi obtížně. K těmto druhům bylin patří: hořec, puškvorec, zeměžluč, pelyněk a další [27]. Co je velmi důležité: v kombuše se léčivé účinky bylin v důsledku kvašení ještě zvýší. Proto se doporučuje měnit složení bylin pro přípravu živného roztoku z bylinkového čaje. Tím si organismus snadněji přivykne jemnému dráždění bylinek a nereaguje pak jiným způsobem. Je však otázkou, zdali se dosáhne požadovaného úspěchu, když použijeme více druhů bylinek k přípravě živného roztoku. Při použití bylinné směsi by se její jednotlivé složky měly doplňovat a posilovat. Každá rostlina obsahuje velké množství substancí, které účinkují společně nebo „vedle sebe“. Podle požadovaného výsledku se čajová směs může použít cíleně, neboť každá substance určité byliny udává svoji podstatu a smysl léčby.

Není však ještě přesně známo, které obsahové látky nesou skutečnou odpovědnost za svůj hlavní účinek. Příkladem může být třezalka. Ještě před několik lety u této byliny se zlatými květy platilo, že hypericin je látkou, která má zklidňující účinky: před krátkým časem však vědci objevili jinou látku, hyperforin, kterému jsou připisovány také podobné účinky. U všech bylinkových čajů platí, že byliny tvoří směs s mnoha komponenty, které ve své harmonické kombinaci účinkují na celkový organismus. Aby se mohly projevit charakteristické vlastnosti bylinkového čaje, mělo by být v čajovém zákvasu přítomno zvýšené množství nejdůležitějších obsahových látek, neboť léčivé byliny projevují skutečnou léčivou sílu jen v určité koncentraci. U tří nebo více druhů čajů při stejných substancích je vždy k dispozici jen určité množství jednotlivých substancí, což je nedostačující k tomu, aby organismu byl předán odpovídající impuls. To se týká především směsi různých čajů z několika léčivých bylin. Pokud použijeme jednotlivé druhy bylinných čajů jako základ pro přípravu živného roztoku, vypadá to pak zcela jinak. Kvasný nápoj je tím obohacen o určité léčivé komponenty. Kdo chce používat kombuchu jen jako čistě osvěžující nápoj, může si perlivý přípravek dochutit a „dobarvit“ přidáním bylinného nebo ovocného čaje, například ze slézu, ostružinového listí nebo šípku. Podle originálního receptu z oblastí, kde se kombucha původně pěstovala, se používal téměř vždy nálev z černého čaje. Činnost houby a její růst není sice vázaný na tento substrát, pokusy však dokázaly, že černý čaj přispívá k vytváření relativně nejvyšší koncentrace kyseliny mléčné a glukonové. Černý čaj má dle typické chuti a specifických léčivých účinků význam pro houbu jako zdroj živných solí. Zdá se tedy, že černý čaj poskytuje v tomto směru nejlepší předpoklady pro úspěšné pěstování houby. Například Bing (1928) pokládá obsah purinů v černém čaji za charakteristický znak živného roztoku, protože obsah purinů včetně kofeinu v rozmezí 2,108-4,108 % suché hmotnosti čaje je nejvyšší mezi všemi poživatinami [1]. V rostlinné a živočišné říši nacházíme puriny ve velkém množství jako fyziologicky důležité sloučeniny, například kyselina močová, základní stavební složky nukleových kyselin (guanin, adenin) a xantinové alkaloidy (kofein, teofylin a teobromin). Bing označuje čajovou houbu jako společenství živých organismů, přizpůsobených zejména živnému prostředí, které je bohaté na puriny, jež houba potřebuje k zajištění vlastní látkové výměny. Bing vysvětluje, že tímto způsobem, pomocí houbového čaje, se odbourávají puriny v látkové přeměně člověka, tedy i kyselina močová. Podle Binga má obsah tříslovin význam při tvorbě zoogley (povlak na povrchu živného roztoku). Při vhodném výběru tříslovin je možné podle Binga místo normálního, hladkého povrchu získat zoogley s vrásčitým

povrchem. Bing (1929) také píše, že konzumenti čaje ve snaze zlepšit jeho „léčivost“ používají místo dobrého ruského nebo čínského čaje, které jako jediné mají potřebný obsah purinů, například heřmánkový čaj či čaj z jiných bylin. Bing pokládá za samozřejmé, že za těchto okolností nemůže probíhat potřebné kvašení a nápoj nemůže mít potom žádoucí účinky. V roce 1987 sledoval Dr. Jürgen Reiss pomocí fotometrických enzymových testů tvorbu etanolu, kyseliny mléčné, glukonové, octové a dále rozklad glukózy (hroznový cukr). I tyto pokusy ukázaly, že čajová houba vytváří nejvyšší koncentraci kyseliny mléčné, kyseliny glukonové a etanolu, pokud se použije černý čaj. Pokud srovnáme Reissovy výsledky, dospějeme k závěru, že černý čaj je nepochybně nejlepším živným roztokem [1,3,5,27].

Tab. 1. Biochemické změny, způsobené pěstováním kombuchy na různých substrátech po dobu 14 dnů [27].

Substrát	Kyselina mléčná [g/l]	Kyselina glukonová [g/l]	Kyselina octová [g/l]	Etanol [g/l]
Černý čaj	2,94	2,52	0,08	1,07
Lipový čaj	0,07	0,06	0,30	0,04
Mátový čaj	0,14	0,04	0,01	0,15
Kola	0,07	0,46	0,01	0,15
Pivo	1,43	0,04	0,56	nebylo měřeno

I přes výše uvedené výsledky nemusí být ještě správně pochopeno, proč je nejlepší právě černý čaj. Dále uvádím některé důležité souvislosti pro srovnání:

Většina bylinkových čajů obsahuje vysoké procento esenciálních olejů a zvýšené množství fenolů, než obsahuje černý čaj. Tyto sloučeniny působí baktericidně, popř. bakteriostaticky a mohou ovlivnit bakteriální složku čajové houby. Esenciální oleje se shromažďují v horní vrstvě kvasného nálevu. Zde plave i kombucha, případně když poklesne, vytváří se v horní vrstvě nová houba. Esenciální oleje mohou tedy přímo působit na houbu, dlouhodobě ji ovlivňovat a potlačovat vývoj méně odolné složky membrány čajové houby [27].

V bylinkových čajích je bakteriální flóra bohatší než v černém čaji. V důsledku tepelných procesů během zpracování černého čaje a fermentace je bakteriální flóra černého čaje značně narušená. Naproti tomu bylinkový čaj obsahuje mnoho bakterií, zejména pokud je připravený z těch částí rostlin, rostoucích v těsné blízkosti půdy. Tyto části rostlin přebírají mnoho látek z půdy, které potom v teplém živném roztoku klíčí. Mikroorganismy se sice

větrům dostávají do vzduchu, ale jejich množství na listech černého čaje, které se sbírají z keřů ve výšce 1 až 1,5 m nad povrchem půdy, je mnohem nižší než na rostlinách a jejich částech, které rostou nad povrchem půdy. Kdokoli z nás by mohl odporovat, že „tato bakteriální flóra se určitě zničí při záparu bylinkového čaje!“ Částečně je to pravda. Většina bakterií a jejich zárodků se sice varem zničí, mnohé však až po dlouhém vaření. Kromě toho existují ještě trvanlivé formy, které se varem nezničí. Na závěr srovnání je tedy možné říci: černý čaj je neutrální. Malé množství bakteriální flóry kvašení prospívá [27].

4.2 Pro přípravu použijeme cukr nebo med

Mnozí konzumenti kombuchy se nemohou smířit, že do tak lahodného nápoje by se měl přidat bílý rafinovaný cukr. Místo toho používají původní třtinový cukr z cukrové třtiny. Jiní nahrazují cukr manou, sladkou rostlinnou hmotou. Mnozí dávají přednost medu před průmyslově zpracovaným cukrem. Protože medu byly vždy připisovány mimořádné léčivé účinky, je jasné, že tato výhoda je pro kombuchový nápoj více než potřebná. Přece však někteří léčitelé nedoporučují jeho užívání, protože přírodní látky, které jsou v medu obsažené, mohou také zastavit postup kombuchových kultur v jejich vývoji, a tak způsobit během kratší nebo delší doby zánik houby [1,3]. Během procesu kvašení by pokojová teplota měla být neustále nad dvacet stupňů, v žádném případě nižší. Pravidlem však je: 125 g medu na jeden litr vody. Med by měl být odstředěn pokud možno za studena a nesmí se zahřát na více než 40°C. Med dodáme až do vlažného čaje. To zaručí, že si zachová své látky. I když byste připravovali kombuchový nápoj častěji s medem, občas také připravte živný roztok s přidáním cukru. Cukr nezpůsobí žádné obtíže našemu zdraví, neboť v kvasném nápoji nezůstane, mikroorganismy jej spotřebují k vlastní látkové přeměně. Množství kalorií se v jednom litru kombuchy pohybuje kolem 60 – 150 kalorií [28]. Například jablečný mošt obsahuje asi 450 kcal/l. Mnoho lidí si dělá starosti a má pochybnosti, že při přípravě kombuchy používají cukr. V průběhu biologických forem látkové přeměny se cukr rozkládá na kyseliny, vitaminy, oxid uhličitý, antibiotické látky, vodu atd. Cukr však zároveň slouží jako zdroj energie k růstu a rozmnožování mikroorganismů čajové houby. Proto je cukr v kombuchovém nápoji neškodný – neboť původní forma bílého sacharóзовého cukru se na konci kvašení mění na jiné formy energie. Činností čajové houby se může spotřebovat téměř všechen cukr, pokud však kvašení nepřerušíme předčasně. Během deseti dnů probíhajícího kvasného procesu se cukr

prakticky spotřebuje. Umělá sladidla neposkytují žádnou energii, ale jen sladkou chuť. K přípravě kombuchového nápoje je nemůžeme v žádném případě použít [1,27,28].

4.2.1 Spotřeba cukru pro přípravu kombuchy

Autoři mnohých publikací a znalci kombuchy doporučují asi 50 g na litr živného roztoku. Toto množství by se mělo však používat tehdy, pokud bychom chtěli ukončit kvasný proces dříve. Optimální dávka je 70-100 g na jeden litr živného roztoku. Méně než 70 g by to nemělo být, neboť houba nemá dost energetických zdrojů pro svoji činnost. Jak již bylo řečeno, menší množství cukru má smysl použít tehdy, pokud kvasný proces chceme ukončit předčasně. Potom z menšího množství použitého cukru zůstává v nápoji také méně zbytkového cukru, který je pro mnoho lidí nežádoucí. Pokud však necháme nápoj vykvasit, logicky z toho vyplývá [3,27]:

Malé množství použitého cukru + krátký čas kvašení = málo energie = málo produktů látkové výměny + malé množství zbytkového cukru.

Malé množství použitého cukru + dlouhý čas kvašení = málo energie = málo produktů látkové přeměny + téměř žádný zbytkový cukr.

Dostatečné množství použitého cukru + krátký čas kvašení = mnoho energie = poměrně málo produktů látkové přeměny + větší množství zbytkového cukru (sladká chuť).

Dostatečné množství použitého cukru + dlouhý čas kvašení = mnoho energie = velké množství produktů látkové přeměny + málo zbytkového cukru (+ nakyslá chuť) [3,27,29].

4.3 Voda pro výroby kombuchy

S vodou je to podobné jako s medem. Někteří lidé se zásadně vyhýbají vodě z vodovodu a používají výhradně minerální vodu nebo vodu převařenou. Smysl to má pouze tehdy, jestli voda z vodovodu je silně chlorovaná nebo příliš tvrdá, či obsahuje velké množství vápníku. Z tohoto důvodu byste raději měli živný roztok připravit z převařené vody nebo přímo z přírodních zdrojů. Není doloženo, zdali naši předchůdci používali zvláštní vodu k přípravě svého čaje a zdali tato voda byla čistá nebo nějakým způsobem znečištěná ve srovnání s vodou z vodovodních zdrojů. Je však zcela jasné, že kultury kombuchy by se měly pěstovat v nejlepších podmínkách [27,28].

5 ANTIOXIDANTY

Antioxidační aktivita je definována jako schopnost sloučeniny nebo směsi látek inhibovat oxidační degradaci různých sloučenin (např. zabraňovat peroxidaci lipidů). Měly bychom rozlišovat dva pojmy, a to antioxidační kapacita a aktivita. Antioxidační kapacita poskytuje informaci o délce trvání antioxidačního účinku, zatímco aktivita charakterizuje počáteční dynamiku průběhu antioxidačního procesu při určité koncentraci antioxidantu [30,31,37,67].

Antioxidační chování je třeba posuzovat z více sledovaných parametrů, neboť některé antioxidanty mohou inhibovat nárůst primárních oxidačních produktů, zatímco jiné mohou bránit jejich rozkladu, který se projevuje především vznikem sensoricky nežádoucích látek udělujících potravině žluklé aroma. Důležitá je též přítomnost dalších látek v systému, které mohou působit synergicky, nebo antagonicky. Antioxidační účinek látek vyplývá z jejich specifické struktury. U látek fenolového typu (tokoferoly, flavonoidy, fenolové kyseliny) [40], které jsou schopné přerušit řetězovou radikálovou reakci, závisí antioxidační schopnost na počtu a poloze hydroxylových skupin i typu dalších substituentů (alkyl, alkoxykupina, allylové uskupení, glykosidická část). Tyto strukturní faktory podmiňují

snadnost odštěpení vodíku z molekuly antioxidantu, čímž se inaktivují radikály vzniklé oxidací lipidů nebo metabolickými pochody (např. hydroxylový radikál), dále ovlivňují míru stabilizace vzniklého radikálu antioxidantu, snadnost reakce s jiným radikálem či schopnost chelatovat kovy katalyzující oxidaci. Kromě struktury ovlivňuje antioxidační aktivitu antioxidantů i pH systému a stabilita sloučenin během zpracování suroviny (teplota, fermentace) [32,40,68].

O látky s antioxidačními účinky je velký zájem nejen v řadě oborů potravinářství, ale i lékařství, a to v souvislosti s pozitivními účinky na lidské zdraví. Kyslík je jedním ze základních prvků nezbytných pro udržení života, ale může mít škodlivé účinky, pokud množství jeho reaktivních sloučenin ve formě volných radikálů přesáhne potřebu buněk a není zablokováno. Volné radikály jsou nestálé reaktivní částice s oxidační účinností, které mají volný nepárový elektron. Typickým příkladem jsou velmi účinné hydroxylové radikály (OH^\cdot) či peroxid vodíku (H_2O_2), resp. jeho radikály. Volné radikály jsou vytvářeny při metabolických pochodech a podílejí se na syntéze pro organismus tak nezbytných látek, jako jsou bílkoviny, hormony či nukleové kyseliny. Vznikají také jako součást přirozené obrany proti mikrobům, virům a parazitům napadajícím lidský

organismus. Některé z radikálů mohou poškodit buňky, které však mají na obranu proti nim určité detoxikační, tj. antioxidantní, mechanismy. Jejich hlavní součástí jsou vitamíny E a C, tripeptid glutation a enzym superoxidismutáza. Oxidační/antioxidační rovnováha je organismem účinně regulována. Pokud však dojde k výrazné nadprodukci reaktivních sloučenin kyslíku, možnosti regulace jsou překročeny a organismus je vystaven oxidačnímu stresu. Na tvorbě volných radikálů se podílejí také vnější vlivy – působení toxických sloučenin včetně znečištěného životního prostředí, ultrafialové záření, jehož intenzita roste v důsledku narušování ochranného štítu ozónosféry, napadení mikroorganismy, cigaretový kouř a přílišná tělesná námaha [69].

Příliš agresivními oxidačními pochody je postižena řada klíčových složek buněk. Radikály reagují s deoxyribonukleovou kyselinou (DNA), s nenasycenými mastnými kyselinami v buněčných membránách, s bílkoviny. Oxidace DNA vyvolává mutace a zvyšuje riziko vzniku nádorů, oxidace bílkovin urychluje stárnutí a spolu s oxidací mastných kyselin vzrůstá rozsah aterosklerózy, komplikací při cukrovce a oslabuje se obranyschopnost. Významnou pomoc pro zvýšení obrany organismu vůči nadměrnému výskytu volných radikálů představují ty složky potravy, které volné radikály převádějí různými mechanismy na méně škodlivé formy. Tyto látky se označují jako antioxidanty. Rozpustné v tucích (lipofilní) a rozpustné ve vodě (hydrofilní). Nejvýznamnějšími látkami první skupiny jsou vitamín E a karotenoidy, skupiny druhé vitamín C a některé rostlinné fenoly [70].

Dostatek antioxidantů v potravě pomáhá snížit především riziko srdečně cévních chorob a některých typů rakoviny. Proto je jim věnována ve výzkumu potravin mimořádná pozornost. Hlavními zdroji jsou ovoce, zelenina, čaj, obiloviny a také kombucha. Kombucha jako čistě přírodní produkt je výborným zdrojem antioxidantů, má dokonce vyšší procento antioxidantů než některé druhy ovoce, obzvláště skupiny polyfenoly [34].

5.1 Antioxidační léčba

Mnoho experimentálních studií prokazuje příznivý vliv antioxidantů v různých kombinacích a modelech. Na celém světě proběhlo a stále probíhá mnoho klinických studií s antioxidantní terapií lidí. Jejich výsledky nejsou jednoznačné nejspíš proto, že oxidační stres je jen jedním z dějů probíhajících při těchto onemocněních. Sledované parametry jsou závislé i na dalších faktorech. Problémem při hodnocení je také srovnání dávky, délky podávání a načasování antioxidantní terapie v průběhu léčby nemoci, které může být významným faktorem úspěchu či neúspěchu antioxidantního efektu. Kombinace

antioxidantů též může zlepšit jejich vstřebávání ze střeva. Nejlépe se vstřebávají přirozené antioxidanty z ekologických přírodních látek. Na tuto formu je organismus dlouhým vývojem zvyklý a přirozené produkty obsahují ty nejúčinnější formy antioxidantů [33,35,36].

5.2 Efekt antioxidantů

Efekt antioxidantů lze shrnout do několika bodů. Antioxidanty převážně interferují s procesem oxidace lipidů a jiných oxylabilních sloučenin tak, že [26]:

1) reagují s volnými radikály (antioxidanty primární) nebo redukují vzniklé hydroperoxydy (antioxidanty sekundární),

- i. K primárním antioxidantům náleží všechny povolené látky (askorbová a erythorbová kyselina a jejich deriváty, tokoferoly, fenolové antioxidanty, galláty).
- ii. K sekundárním antioxidantům se řadí např. cystein, peptidy obsahující cystein, lipoová kyselina, metionin aj. přirozeně se vyskytují sloučeniny, které se však jako antioxidanty nepoužívají. Ze syntetických sloučenin se jako sekundární antioxidant používal dilaurylester 3,3'- thiodipropionové kyseliny.

2) váží do komplexů katalyticky působící kovy,

3) eliminují přítomný dusík [26].

6 POLYFENOLY

Za polyfenoly jsou obecně označovány organické fenolické látky s více než jednou hydroxylovou skupinou v molekule [41]. Po chemické stránce jsou polyfenoly třísloučiny s vysokou molekulovou hmotností, nejsou krystalické, zpravidla se rozpouštějí ve vodě nebo alkoholu na roztoky s kyselým pH. S bílkovinami, těžkými kovy a také s alkaloidy dávají nerozpustné sloučeniny. Jde o velmi diverzifikovanou skupinu látek, proto ne všechny polyfenolické látky a jejich vlivy na technologii výroby potravin a na zdraví člověka jsou popsány, a často jsou při výzkumu nalezeny nové. Nacházejí se v potravinách jako ořechy, zelený čaj, olivový olej, červené víno, grapefruity a v mnoha jiných druzích ovoce. Je prokázáno, že určité fenolické látky jsou pro určité druhy potravin typické [90].

Polyfenoly mají pozitivní vliv na zdraví člověka. Tyto látky mají silné antioxidační účinky, v organismu neutralizují nebezpečné volné radikály. Rostlinné polyfenoly jsou v naší potravě (z literatury lze uvést průměrný denní příjem 15 – 25 mg na osobu a den) nejvýznamnějšími přirozenými potravními antioxidanty po vitaminu C (jeho průměrný příjem potravou u nás činí 40 – 60 mg na osobu a den). Aktivní působení polyfenolů v různých fyziologických dějích je nepochybné, i když zatím není uspokojivě vysvětleno [42,43].

Dle některých autorů mají větší antioxidační a antiradikálové účinky než např. vitamin C a E. Navíc mají účinky antibiotické, protivirové a protizánětlivé. Polyfenoly zejména flavonoidy taky zlepšují vstřebávání některých minerálních látek a vitamínů. Mají schopnost přejít velice rychle ze střevního traktu do krve, kde fungují jako významný antioxidant, kdy snižují tvorbu okysličených lipoproteinů a tak zabraňují kornatění tepen, trombózám a dokonce dokáží již některé vzniklé krevní sraženiny rozpustit. Celý proces stimuluje přítomnost vitaminu C a způsobuje rychlé odbourávání škodlivé složky cholesterolu (LDL) [44,91].

Polyfenolické sloučeniny užívané jako doplněk stravy zahrnují zejména lignina (ořechy, celozrnné cereálie), proanthocyaniny (víno, borovicová kůra), anthocyaniny / anthocyanidiny (světlé ovoce a zelenina, borůvky), isoflavony – genistein / daidzein (soja), katechiny (čaj, víno), tanniny (čaj, oříšky), quercetin (hrozny, víno, cibule) či naringenin / hesperidin (citrusy) [45].

Polyfenoly jsou produkty sekundárního metabolismu rostlin. Do kombuchy se dostávají ze surovin, tedy čaje, cukru, medu, přičemž ovlivňují nejen trvanlivost, ale i její

organoleptické vlastnosti. Z chemického hlediska se jedná o široký soubor látek fenolické povahy. Vzhledem k jejich různorodosti však doposud nebyl vypracovaný jednotný systém jejich systematického dělení.

Polyfenoly jsou rozděleny do několika tříd podle počtu fenolových kruhů. Hlavní skupiny jsou:

- flavonoidy
- fenolové skupiny
- stilbeny a lignany [46,92]

6.1.1 Flavonoidy

Flavonoidy tvoří nejčastější skupiny polyfenolů. Jedná se o velice rozsáhlou skupinu obsahující v molekule dva benzenové kruhy spojené tříuhlíkovým řetězcem. Jedná se o uspořádání C₆-C₃-C₆. Běžně bývají všechny tři kruhy substituovány hydroxyskupinami nebo methoxyskupinami a jednotlivé deriváty se liší pouze stupněm substituce a oxidace. Bylo popsáno více než 5 000 různých flavonoidních látek a stále se nacházejí nové sloučeniny. Svými vlastnostmi se liší od jiných fenolových pigmentů, a proto jsou uváděny jako samostatná skupina rostlinných barviv. Flavonoidy jsou ve vodě rozpustné barevné sloučeniny uplatňující se v rostlinných systémech [47]. Nacházejí se jako barviva v zelenině, ovoci, zrninách, nápojích (čaj, káva, víno, kombucha) a v listech a kůře stromů. V přírodě se vyskytují jak ve formě volné, tak i glykosidicky vázané. Obě formy jsou barevné a téměř stejně stálé. S výjimkou anthokyanů jsou málo pestré a během technologických operací ani během skladování potravin se nemění do té míry, aby podstatným způsobem ovlivnily barvu zpracovávané potraviny. Barevná intenzita může být pozměněna tvorbou komplexních sloučenin flavonoidů s těžkými kovy [48]. Některé flavonoidní látky jsou rovněž důležitými antioxidanty. Pouze některé flavonoidy jsou důležité jako přírodní rostlinná barviva, jiné jsou významné pro svoji chuť (jsou to trpké nebo hořké látky nebo jejich prekurzory) nebo mají významné biologické účinky. Flavonoidy se vyskytují v různých koncentracích, ty které jsou biologicky aktivní, se nazývají bioflavonoidy. Některé mají až 50-krát větší antioxidační aktivitu než vitamin C a E [40,93].

Flavonoidy jsou rozděleny do 6 podtříd:

- Flavony (apigenin, luteolin)
- Flavonoly (quercetin, myricetin)
- Flavanony (naringenin, hesperidin)
- Flavanoly = katechiny (epikatechin, gallokatechin)
- Anthokyanidiny (kyanidin, pelargonidin)
- Isoflavony (genistein, diadzenin) [94]

6.1.2 Fenolové kyseliny

Fenolové kyseliny jsou aromatické sekundární rostlinné metabolity, vyskytující se v rostlinných potravinách [48]. Představují polyfenolické sloučeniny, které se dále rozdělují do dvou základních skupin, a to na deriváty kyseliny benzoové a deriváty kyseliny skořicové. Hydroxybenzoové kyseliny jsou součástí komplexních struktur, jako jsou hydrolyzovatelné taniny (gallotaniny a ellagotanniny) [50]. Hydroxyskořicové kyseliny jsou častější, a zahrnují kyseliny p-kumarovou, kávovou a ferulovou.

Ve volné formě se tyto kyseliny vyskytují zřídka. Fenolické kyseliny ve volné formě jsou obsaženy zejména v ovoci a zelenině. Ve vázané formě jsou fenolové kyseliny obsaženy v zrnech a semenech. Vázanou formu představují glykosylové deriváty nebo estery kyseliny chinové (chininové) [46,93].

6.1.3 Stilbeny a lignany

Stilbeny jsou skupinou substituovaných sekundárních metabolitů rostlin. Volné stilbeny se v malém množství nacházejí v několika druzích rostlin, kde doprovázejí příslušné glykosidy. Hlavním představitelem stilbenů je resveratrol. Je obsažen ve více než 70 druzích rostlin, například v podzemnici olejné, révě vinné. Má antimikrobní a antioxidační účinky [49,92].

Lignany jsou skupinou fenolových sloučenin. Vznikají spojením dvou fenylypropanových jednotek. Vyskytují se v přírodě převážně ve volné formě. V lidské stravě je obsaženo malé množství lignanů [51].

6.2 Antioxidační účinky polyfenolů

Antioxidační účinek polyfenolů je komplexní a lze jej přičíst několika mechanismům:

1. Řada flavonoidů i dalších polyfenolů inhibuje enzymy zodpovědné za produkci superoxidového anion-radikálu (např. xantinoxidasu, proteinkinasu C). Inhibují i další enzymy, které se podílejí na tvorbě volných radikálů (cyklooxygenasa, lipoxygenasa, atd.),
2. Mnohé polyfenoly vytváří chelátové vazby s kovy, především s mědí a dvojmocným železem. Volné ionty těchto kovů se účastní tvorby reaktivních kyslíkových forem např. při Fentonově reakci.
3. Řada polyfenolů je snadno oxidovatelná. Snadnost oxidace závisí na redoxním potenciálu. Látky s nízkou hodnotou redox potenciálu ($< 0,75$ V) jsou schopny redukovat některé volné radikály s oxidačními účinky např. superoxidový, peroxylový, alkoxylový a hydroxylový. Při reakcích poskytují vodík a samy se přitom většinou přeměňují na málo reaktivní fenoxyllový radikál (Fl-O) nebo neradikálové chinoidní struktury. Význam reakce spočívá v tom, že radikály jsou eliminovány dříve, než reagují s dalšími buněčnými komponentami [43].

7 PROLIFERACE A ŽIVOTASCHOPNOST

Polyfenoly mají mnoho chemických, biochemických či biologických vlastností. Mohou působit nejen protizánětlivě, antioxidačně, ale také antikarcinogenně. Buněčná proliferace je nárůst počtu buněk, které se v kultuře namnoží. Jedním ze způsobů měření tohoto parametru je provedení klonogenních testů. V těchto testech je definovaný počet buněk na příslušné matrici a počet kolonií, které vznikají po období růstu. Obvykle jedním z parametrů pro měření zdravých buněk je životaschopnost. Může být definována jako počet zdravých buněk ve vzorku. Využívá se pro stanovení optimálních podmínek v případě, že nejsou primární buňky izolovány a udržovány v kultuře. Nejjednodušší metodou pro stanovení životaschopnosti buněk je přímé počítání buněk [52,53].

7.1 Buněčné linie

Jedná se o kultury oddělené z původní tkáně. Buňky se oddělí (mechanicky nebo enzymaticky) do suspenze, která pak může být kultivována jako jednovrstevná na pevný podklad nebo jako suspenze na kultivačním médiu. Buněčné kultury mohou být charakterizovány a definovány populací a mohou být zakonzervovány zmrazením. Mohou být konečné nebo kontinuální, kde se buňky množí na dobu neurčitou za předpokladu, že jsou sériově pastovány do čerstvého média. Pro buněčné linie je třeba, aby nastala „nesmrtelnost“, aby se staly trvalými. To může nastat přirozeně v kultuře, virovou transformací nebo vyvolané jinou mutací či hybridizací. Tyto buněčné linie jsou často velmi užitečné, protože mohou být uloženy v tekutém dusíku a uchovány pro pozdější použití, aniž by bylo nutné získat jiný vzorek tkáně. Buněčné kultury mají velmi mnohostranné využití. Jejich kontinuálním sledováním je možno pozorovat řadu buněčných procesů včetně mitózy, cytokineze apod. Buněčné kultury dnes slouží jako referenční model pro studium toxického působení látek. Dále je možno sledovat působení látek chemických, ale i vnějších faktorů fyzikálních. V této diplomové práci při zjišťování životaschopnosti buněk byla použita buněčná linie lidských keratinocytů (HaCaT) [54].

II. PRAKTICKÁ ČÁST

8 CÍL PRÁCE

Diplomová práce je zaměřena na výrobu domácího kombuchového nápoje a na stanovení antioxidační aktivity, stanovení celkových polyfenolů a antiproliferačního efektu aktivity u kombuchového nápoje. Bylo zkoumáno celkem osm druhů komerčně zakoupené kombuchy a pak osm druhů kombuchy domácí výroby. Tato práce má za cíl pro provedení laboratorního měření zhodnotit výsledky a porovnat, zda se obsah liší vůči hodnotám naměřených v jiných pracích. Cílem práce je získání vzorků kombuchy, čaje a výroba kombuchového nápoje. Popsat metody použité při stanovení antioxidační aktivity, při stanovení obsahu celkových polyfenolů a antiproliferačního efektu u získaných vzorků kombuchového nápoje. Vyhodnotit zjištěné výsledky a porovnat je s dostupnými studiemi.

9 VÝROBA KOMBUCHOVÉHO NÁPOJE

9.1 Návod na přípravu odvaru pro výrobu kombuchy

Na analytických vahách bylo naváženo potřebné množství sušeného sypaného čaje, sušených bylin a bílého cukru (viz. tab. 2.). Pomocí odměrného válce bylo odměřeno potřebné množství pitné vody. Odměřené množství čaje a bylin bylo smícháno a vytvořena směs identická komerčně zakoupenému kombuchovému nápoji z důvodu snadnějšího srovnání naměřených hodnot. Vše bylo extrahováno horkou vodou o teplotě 90 °C, poté bylo přefiltrováno přes filtrační papír do kádinky o obsahu 2 l. V této fázi byl odebrán vzorek každého druhu odvaru pro pozdější měření.

Tab. 2. Složení směsi pro výrobu odvaru

Druh odvaru	Složení směsi [g]	Sladidlo [g]	Voda [l]	Doba extrahování [min]
Heřmánek	Sušený heřmánek 3,5 g Sušený zelený čaj 3,5 g	Bílý cukr 80 g	Pitná voda 1 l	7 minut
Meduňka	Sušena meduňka 3,5 g Sušený zelený čaj 3,5 g	Bílý cukr 80 g	Pitná voda 1 l	7 minut
Zelený čaj	Sušený zelený čaj 7 g	Bílý cukr 80 g	Pitná voda 1 l	7 minut
Měsíček	Sušený měsíček 3,5 g Sušený zelený čaj 3,5 g	Bílý cukr 80 g	Pitná voda 1 l	7 minut
Kopřiva	Sušená kopřiva 3,5 g Sušený černý čaj 3,5 g	Bílý cukr 80 g	Pitná voda 1 l	7 minut
Černý čaj	Sušený černý čaj 3,5 g	Bílý cukr 80 g	Pitná voda 1 l	7 minut
Hloh	Sušený hloh 3,5 g Sušený černý čaj 3,5 g	Bílý cukr 80 g	Pitná voda 1 l	7 minut
Šípek	Sušený šípek 3,5 g Sušený černý čaj 3,5 g	Bílý cukr 80 g	Pitná voda 1 l	7 minut

9.2 Návod na přípravu kombuchového nápoje

Připravený nálev necháme vychladnout na teplotu 25 – 35 °C. Po vychládnutí byla položena na hladinu nálevu zakoupená mateční kultura a přidán nálev asi 1 dcl, ve kterém byla mateční kultura. Kádinka byla zakryta prodyšným textilním ubrouskem, který byl připevněn pomocí gumičky. Kádinka byla umístěna na stinném místě s teplotou přibližně 21 – 24 °C a necháno kvasit. První vzorek kombuchového nápoje byl odebrán 7. den a druhý vzorek 10. den. Vzorky kombuchového nápoje byly přefiltrovány přes filtrační papír.



Obr. 2. Kombuchový nápoj [55]

10 METODIKA A MATERIÁL

10.1 Materiál

Pro analýzu bylo vybráno celkem 24 druhů kombuchového nápoje a čaje, z toho 8 druhů komerčně dostupného kombuchového nápoje, 8 druhů domácí kombuchy při sedmidenní fermentaci a 8 druhů domácí kombuchy po 10 dnů fermentace a 8 druhů extraktů z čaje. Vzorky komerční kombuchy byly získány přes pražského distributora německé firmy (XY), a dále poskytnul tzv. násada - mateční kultura pro domácí výrobu kombuchového nápoje. Vzorky bylin pro přípravu směsi na domácí výrobu nápoje byly získány v brněnské specializované firmě (AA), kde byly zakoupeny i dva druhy sypaného pravého černého a zeleného čaje pro přípravu odvaru na výrobu nápoje.

10.2 Příprava vzorků

Všechny druhy domácího kombuchového nápoje byly připraveny stejným způsobem. Na analytických váhách navážené množství sypaného čaje, cukru a sušených bylin bylo extrahováno horkou vodou, poté bylo přefiltrováno přes filtrační papír. Takto připravený odvar byl doplněn o mateční kultura a ponechám 7 a 10 dnů kvašení. Poté bylo přefiltrováno přes filtrační papír.

10.2.1 Popis vzorku sypaných sušených čajů a bylin pro přípravu odvaru pro domácí výrobu kombuchového nápoje a samotné komerční vzorky

10.2.1.1 Černý čaj – *English Breakfast Tea*

Je vydatná ranní směs černých čajů s vysokým podílem Assamu. Země původu Indie a cenou za 1 kg přibližně 1000 Kč. Mezi tradiční zástupce patří především čaje z Assamu a Darjeelingu. Assamské čaje jsou velice výrazné a nabízejí silnou sladovou chuť. Oproti tomu Darjeeling nabízí jemnější chuť, oba si však zamilujete na první doušek. Za jejich dokonalostí stojí čerstvý vzduch vysoce položených zahrad, ruční sběr a pečlivá další úprava [56].

10.2.1.2 Zelený čaj – Green Snail

Je jeden z nejcennějších čínských zelených čajů s limitovanou produkcí. Země původu Čína a cenou za 1 kg přibližně 1540 Kč. Vyrábí se z těch nejjemnějších jarních pupenů. Zelené lístky mají tvar malých klubíček. Světle žlutý nálev dává širokou škálu chutí i vůní od velmi lehké květinové až k jemným tónům ovoce [57].

10.2.1.3 Heřmánek

Je léčivá rostlina z čeledi hvězdnicovitých. Je to jednoletá vonná bylina s 15 až 50 cm vysokou rozkvětnou lysou a málo listnatou lodyhou. Listy jsou drobné a úzké. Bílé okvětní lístky vedle sebe mají válcovitý až kuželovitý tvar okolo žlutě zbarveného uprostřed uloženého klenutého květního lůžka, které je uvnitř duté. Kvete od června do srpna a plodem je drobná neochmýřená nažka asi 1 mm dlouhá. Aktivními látkami jsou především silice, které jsou zastoupeny 1-3 %. Heřmánek se hojně využívá v kosmetice a léčitelství. Dá se z něj udělat čaj nebo odvar. Působí jako antiflogistikum, karminativum, spasmolytikum a diaforetikum. Pomáhá od bolesti, při hojení ran, navozuje celkové uklidnění. Je účinný při zánětech ústní dutiny, očních spojivek a pohlavního ústrojí, při žaludečních a střevních potížích, pomáhá léčit žaludeční vředy, při bronchiálním astmatu, při léčbě infikovaných sliznic a kůže, při alergických reakcích na kůži, uvolňuje křeče zažívadel a střevní plyny. Může na něj být alergická reakce. Při nachlazení se pije čaj a slouží i k inhalacím i při rýmě a chorobách horních cest dýchacích [58].

10.2.1.4 Meduňka

Meduňka je léčivá rostlina z čeledi hluchavkovitých. Vytrvalá rostlina dorůstající výšky 70-150 cm. Aromatické listy voní po citrónu. Má bílé květy, kvete od června do srpna. Meduňkový čaj z listů snižuje stres, uklidňuje, uvolňuje, zpříjemňuje spánek a zajišťuje dobré zažívání. Nově se uznávají protivirové účinky, zvláště u herpesvirů. Z listů se rovněž připravuje meduňkový likér. Nať se používá v lidovém lékařství jako hypnotikum a sedativum. Používá se také jako koření. V kuchyni se pro svou citrusovou vůni za čerstva přidává do míchaných nápojů a ovocných salátů. Sbírá se list nebo celá nať - zásadně před květem [59].

10.2.1.5 Měsíček

Měsíček je léčivá rostlina původem z jihu Evropy a Orientu. Pěstuje se jako letnička. Přibližně 50 cm vysoká bylina. Lodyha přímá, obvykle větvená. Listy střídavé, chlupaté,

kopinaté až úzce obvejčité, dolní v řapík zúžené, horní na bázi uťaté nebo srdčité a přisedlé. Kvete v červnu až srpnu. Měsíček zvyšuje sekreci žluče, potlačuje růst bakterií, urychluje hojení hnisavých a špatně se hojících ran doprovázených záněty, užívá se proti plísním a proti bércovým vředům [60].

10.2.1.6 Kopřiva

Kopřiva dvoudomá je v Česku nejznámější a nejrozšířenější zástupce rodu kopřiva, dorůstající výšky 50-150 cm, výjimečně až 2 metrů. Lodyhy jsou přímé, nevětvené. Ve střední Evropě je v současné době vnímána jako expandující druh. Je ale také široce využívána jakožto léčivá bylina. Použití kopřivy je velmi rozmanité: Chlorofyl působí povzbudivě na metabolismus a zároveň působí proti chudokrevnosti, dále působí jako antirevmatikum, protizánětlivě, dezodoračně a urychluje hojení ran [61].

10.2.1.7 Hloh

Hloh je početný rod keřů a stromů z čeledi růžovité, které rostou v mírném pásmu severní polokoule. Květy jsou pětičetné, bílé, růžové nebo červené, plody jsou červené malvice. Počet druhů, které se mezi sebou snadno kříží, je odhadován na 200 až několik tisíc. Hlohové drogy se používají hlavně v léčivech ke snížení krevního tlaku a majících uklidňující účinek na nervovou soustavu. V lidovém léčitelství se hloh používá proti skleróze, vysokému krevnímu tlaku, nespavosti, předrážděnosti, bušení srdce, arytmiích, srdeční neuróze, klimakterických potíží, migrénách apod. Příznivě působí zejména při dlouhodobém užívání ve stáří svým tonizujícím účinkem při srdeční slabosti [62].

10.2.1.8 Šípek

Šípky jsou souplodí nažek. Patří do čeledi růžovitých, což patřičně dokládají jejich pichlavé, svědění vyvolávající štětiny přidržující nažky, které jsou uvnitř. Šípkový keř uvidíte v plném květu na začátku léta, v červnu a červenci, šípky se pak dostaví na podzim, obvykle během září. Z dužniny souplodí této rostliny připravíte oblíbený šípkový čaj, který je v zimním období cenným zdrojem vitamínu C. Z plodů lze vyrobit víno, šípkovou marmeládu anebo sirup. Sirup se dříve vyráběl i z korunních plátků růží, pomáhal prý při horečkách a ledvinových chorobách. Díky kombinaci vápníku, rutinu a vitamínu C jsou šípky nejlepším přírodním lékem proti paradentóze a onemocnění dásní [63].

10.2.1.9 Komerční vzorky kombuchového nápoje

Společnost XY byla založena na podzim roku 1999 a od svého začátku se zaměřila na výrobu produktů zdravé výživy. V dalším roce byl zakoupen areál bývalého pivovaru, který vhodně vyhovoval podmínkám pro další rozšiřování produkce. V prvních letech byl sortiment výroby rozšířen na 8 různých příchutí a kromě prodejen zdravé výživy a lékáren, zařadily některé druhy kombuchy do sortimentu i obchodní řetězce [64].

Tab. 3. Přehled vzorků kombuchy od společnosti (XY)

Číslo	Druhy	Průměrné nutriční hodnoty ve 100 ml	Složení
1.	Heřmánek (<i>Matricaria chamomila</i>)	Energetická hodnota 145 KJ / 34 kcal Bílkoviny 0,1 g Sacharidy 8,5 g Tuky 0,0 g Etanol 0,3	voda, odvar z heřmánku (50%) a ze zeleného čaje (50%), cukr, kvasinkové kultury a mléčné bakterie
2.	Meduňka (<i>Melissa officinalis</i>)		voda, odvar z meduňky (50%) a ze zeleného čaje (50%), cukr, kvasinkové kultury a mléčné bakterie
3.	Zelený čaj		voda, odvar ze zeleného čaje (50%), cukr, kvasinkové kultury a mléčné bakterie
4.	Měsíček (<i>Calendula officinalis</i>)		voda, odvar z květů měsíčku (50%) a ze zeleného čaje (50%), cukr, kvasinkové kultury a mléčné bakterie
5.	Kopřiva (<i>Urtica dioica</i>)		voda, odvar z kopřivy (50%) a ze zeleného čaje (50%), cukr, kvasinkové kultury a mléčné bakterie
6.	Černý čaj		voda, odvar z černého čaje (50%), cukr, kvasinkové kultury a mléčné bakterie
7.	Hloh (<i>Crataegus laevigata</i>)		voda, odvar z heřmánku (50%) a ze zeleného čaje (50%), cukr, kvasinkové kultury a mléčné bakterie
8.	Šípek (<i>Rosa cania</i>)		voda, odvar z heřmánku (50%) a ze zeleného čaje (50%), cukr, kvasinkové kultury a mléčné bakterie

10.3 Stanovení antioxidační aktivity metodou DPPH

Stanovení antioxidační aktivity v kombuchových extraktech bylo provedeno metodou DPPH. Tato metoda spočívá v reakci volného radikálu DPPH (2,2-digenyl-1-hydrazyl) s antioxidanty obsaženými ve vzorku. Během reakce dochází ke změně barvy a úbytku absorbance. Absorbance byla měřena při vlnové délce 515 nm. Nejdříve, stejně jako při stanovování obsahu celkových polyfenolů, byl připraven extrakt vzorku. Byl připraven zásobní roztok z 0,024 g DPPH a 100 ml metanolu. Z tohoto roztoku byl připraven pracovní roztok, který vznikl smícháním 10 ml zásobního roztoku s 45 ml metanolu. Byla proměřena absorbance. Byla vytvořena reakční směs přidáním 450 μ l zfiltrovaného vzorku s 8,55 ml pracovního roztoku a tato směs byla ponechána 1 hodinu ve tmě. Poté byla proměřena absorbance jednotlivých vzorků. Byla provedena vždy tři měření vedle sebe. Kalibrační řada byla vytvořena ze zásobního roztoku kyseliny askorbové o koncentracích 40, 80, 120, 160, 200 mg/l. Absorbance byla opět proměřena při vlnové délce 515 nm. Antioxidační aktivita byla vyjádřena z poklesu absorbance v % podle vztahu:

$$\% = \frac{A_0 - A}{A_0} \cdot 100$$

Výsledky byly vyneseny do grafu a získala se kalibrační křivka. Výsledky jsou pak vyjádřeny jako ekvivalent odpovídající antioxidační kapacitě, kterou by způsobilo množství kyseliny askorbové [65].

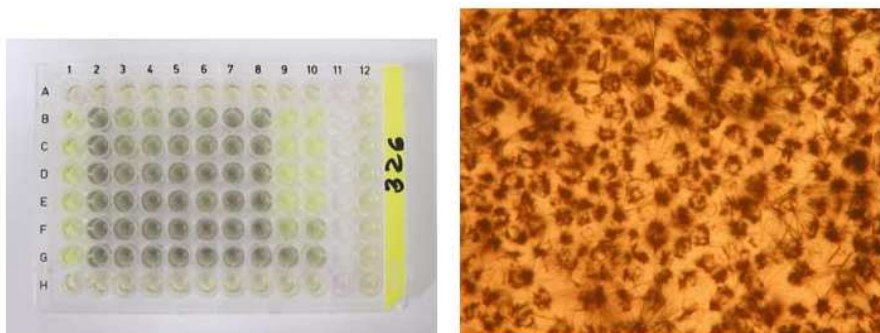
10.4 Analýza celkových polyfenolů

Stanovení celkového množství polyfenolů v kombuchových extraktech bylo provedeno spektrometrickou metodou s Folin-Ciocaltauovým činidlem. Do 10 ml odměrné baňky bylo vždy nepipetováno 0,1 ml vzorku, 0,5 ml Folin-Ciocaltauova činidla, 1,5 ml 20% Na_2CO_3 a obsah byl doplněn destilovanou vodou. Připravený roztok ve zkumavkách byl řádně promíchán. Zároveň byl také připraven slepý pokus (blanc), který obsahoval pouze destilovanou vodu, Folin-Ciocaltauova činidlo a 20% Na_2CO_3 . Proti němu byly pak měřeny ostatní vzorky při vlnové délce 765 nm. Měření bylo prováděno třikrát vedle sebe. Ze zásobního roztoku kyseliny gallové byla vytvořena kalibrační řada o koncentracích 50, 100, 200, 400, 600, 800 mg/l. Dále bylo přidáno 0,5 ml Folin-Ciocaltauova činidla, 1,5 ml

20% Na_2CO_3 . Absorbance byla opět proměřena při vlnové délce 765 nm. Pomocí sestavené kalibrační křivky kyseliny gallové bylo vypočítáno množství celkových polyfenolů ve vzorku [50].

10.5 Stanovení antiproliferačního efektu

Výsledkem práce bylo zjistit vliv polyfenolů extrahovaných z kombuchového nápoje na antiproliferační aktivitu. V první fázi bylo nutné z kombuchy extrahovat. Tyto koncentrované roztoky byly přidány k buňkám a nechaly se kultivovat za vhodných podmínek. Následně se proliferace vyhodnotila spektrometrickou metodou MTT. Antiproliferačnost buněk byla provedena pomocí buněčné linie – lidské keratinocyty (HaCaT; Human immortalized non-tumorigenic keratinocyty), které poskytla firma Cell Lines Service (Catalog No. 300493). Jako kultivační medium bylo použito Dulbeccos Modified Eagle Medium se zvýšeným obsahem glukózy s přidavkem 10% fetálního hovězího séra a obsahem antibiotik Penicillin/ Streptomycin, 100 U / ml (100 μg / ml; PAA Laboratorie GmbH, Rakousko). Buňky byly kultivovány v 96-ti jamkových testovacích destičkách při výchozí koncentraci 1×10^5 buněk/ml v mediu, v jedné jamce tak bylo 1×10^4 buněk. Buňky byly překultivovány 24 hodin. Po kultivaci bylo médium vyměněno za médium s extrakty v koncentraci 1:1. Jako kontrola byla použita kultivace buněk bez přidavku extraktu. Pro posouzení antiproliferačního efektu buněk byl po 24 hodinách použit MTT test (Invitrogen Corporation, USA). Tato testovací metoda je založena na redukci žlutého solubilního 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyl tetrazolium bromidu (MTT) na nerozpustný formazan (modré krystaly hvězdicovitého tvaru) [54].



Obr. 3. Ilustrační fotografie MTT testu [66]

Reakce probíhá na mitochondriální membráně živých buněk. Formazan se rozpustí přidáním silného detergentu a zbarvení se vyhodnocuje spektrofotometricky při vlnové délce 540 nm, pomocí Sunrice microplate absorbance reader (Tecan, Švýcarsko). Hodnota absorbance roztoku odpovídá množství živých buněk (čím tmavší barva a tedy vyšší absorbance, tím vyšší procento živých buněk). Kultivace buněk probíhala v inkubátoru s řízenou atmosférou CO₂ při teplotě 37°C a atmosféře 5% CO₂. K mikroskopování byl použit mikroskop s fázovým kontrastem (Olympus, CKX41). Všechny testy byly provedeny třikrát [54].

11 VÝSLEDKY

11.1 Stanovené antioxidační aktivity

Stanovení antioxidační aktivity v kombuchových extraktech bylo provedeno metodou DPPH. Na přípravu kombuchového extraktu byly zakoupeny komerční vzorky kombuchového nápoje a pak domácí výrobou připraveny odvary z čaje a kombuchový nápoje o různých dnech fermentace. Vzorky byly proměřeny postupem uvedeným v metodách (viz. 10.3 kapitola), každý extrakt byl proměřen třikrát a ze získaných hodnot byl vypočítán průměr a směrodatná odchylka. Výpočet celkového obsahu polyfenolů antioxidační aktivity byl proveden s použitím kalibrační křivky standardu kyseliny askorbové (viz. příloha II.).

$$\text{Rovnice kalibrace: } y = 0,4503x + 5,4779$$

Naměřená průměrná absorbance byla dosazena do rovnice a byla vypočtena koncentrace antioxidační aktivity. Hodnoty antioxidační aktivity kombuchového nápoje jsou uvedeny v tab. 4..

Množství naměřené antioxidační aktivity se pohybovalo v rozmezí 75,8949 – 198,1377 mg/100ml kombuchy. Pokud porovnáme jednotlivé skupiny kombuchových nápojů, tak jsou takřka identické nebo jen s nevelkým rozdílem. Jako nejlepší vzorek dopadl vzorek domácího kombuchového nápoje – fermentovaný po dobu 10 dnů – meduňka. Po prostudování naměřených hodnot u zbylých vzorku bylo zjištěno, že rozdíly jsou nepatrné a největší část vzorku je v naměřených hodnotách v rozmezí 165 – 195 mg/100ml kombuchy. Hodnoty antioxidační aktivity pro čaj se pohybovaly v rozmezí 119,5854 – 157,1637 mg/100ml.

Tab. 4. Průměrný obsah antioxidační aktivity

Číslo	Příchuť sledovaného vzorku	Obsah antioxidační aktivity [mg/100ml]			
		Komerční kombucha	Domácí kombucha 7. den	Domácí kombucha 10. den	Odvar z čaje
1.	Heřmánek	90,604 ± 0,23	182,975 ± 0,02	184,5551 ± 0,04	134,2998 ± 0,30
2.	Meduňka	187,724 ± 0,03	197,689 ± 0,01	198,1377 ± 0,01	127,9613 ± 0,07
3.	Zelený čaj	185,913 ± 0,02	189,309 ± 0,01	187,9508 ± 0,02	126,1503 ± 0,05
4.	Měsíček	170,067 ± 0,02	78,38512 ± 0,01	75,89499 ± 0,04	136,3372 ± 0,07
5.	Kopřiva	161,918 ± 0,01	159,2011 ± 0,07	95,81602 ± 0,07	119,5854 ± 0,05
6.	Černý čaj	185,461 ± 0,08	190,2145 ± 0,00	186,1398 ± 0,01	129,3196 ± 0,02
7.	Hloh	160,786 ± 0,01	170,2935 ± 0,01	168,7089 ± 0,02	135,4317 ± 0,06
8.	Šípek	178,896 ± 0,01	196,3267 ± 0,01	177,5375 ± 0,00	157,1637 ± 0,01

11.2 Obsah celkových polyfenolů

V diplomové práci byly celkové polyfenoly stanoveny spektrometricky. Na přípravu kombuchového extraktu byly zakoupeny komerční vzorky kombuchového nápoje a pak domácí výrobou připraveny odvary z čaje a kombuchový nápoje o různých dnech fermentace. Vzorky byly proměřeny postupem uvedeným v metodách, každý extrakt byl proměřen čtyřikrát a ze získaných hodnot byl vypočítán průměr a směrodatná odchylka. Výpočet celkového obsahu polyfenolů byl proveden s použitím kalibrační křivky standardu kyseliny gallové (viz. příloha I.).

$$\text{Rovnice kalibrace: } y = 0,0011x + 0,0124$$

Naměřená průměrná absorbance byla dosazena do rovnice a byla vypočtena koncentrace polyfenolů. Hodnoty celkových polyfenolů kombuchového nápoje jsou uvedeny v tab. 5.. Hodnoty celkových polyfenolů se pohybovaly v rozmezí 0,024 – 89,175 mg/100ml kombuchy. Hodnoty celkových polyfenolů u čaje se pohybovaly v rozmezí 32,145 – 88,266 mg/100ml čaje. Pokud porovnáme jednotlivé skupiny kombuchových nápojů, tak nejlépe můžeme hodnotit skupinu domácí kombucha – fermentovaná po dobu 10 dnů, kde nejvyšší hodnota byla u vzorku číslo 3. – zelený čaj a to 89,175 mg/100ml. Jako druhou v pořadí skupinou je domácí kombucha – fermentovaná po dobu 7 dnů, kde naměřené hodnoty byly takřka identické, anebo lišící se jen řádově v jednotkách. Ve skupině komerčně zakoupené kombuchy byly vzorky dosti rozdílných hodnot. A s porovnáním skupin domácí kombuchy u stejných vzorků se lišící někdy více než o polovinu.

Tab. 5. Průměrný obsah celkových polyfenolů

Číslo	Příchuť sledovaného vzorku	Obsah celkových polyfenolů [mg/100ml]			
		Komerční kombucha	Domácí kombucha 7. den	Domácí kombucha 10. den	Odvar z čaje
1.	Heřmánek	6,145 ± 0,19	64,933 ± 0,33	52,600 ± 0,22	66,630 ± 0,17
2.	Meduňka	29,266 ± 0,48	22,448 ± 0,04	28,054 ± 0,00	60,327 ± 0,07
3.	Zelený čaj	31,630 ± 0,63	79,781 ± 0,85	89,175 ± 0,34	88,266 ± 0,26
4.	Měsíček	13,478 ± 0,22	48,690 ± 0,46	49,115 ± 0,40	37,054 ± 0,14
5.	Kopřiva	10,903 ± 0,11	1,145 ± 0,00	0,024 ± 0,22	32,145 ± 0,19
6.	Černý čaj	27,842 ± 0,37	13,963 ± 0,07	14,539 ± 0,18	32,872 ± 0,14
7.	Hloh	16,024 ± 0,18	0,236 ± 0,07	0,478 ± 0,18	46,6303 ± 0,04
8.	Šípek	32,509 ± 0,70	23,327 ± 0,07	23,296 ± 0,26	61,812 ± 0,18

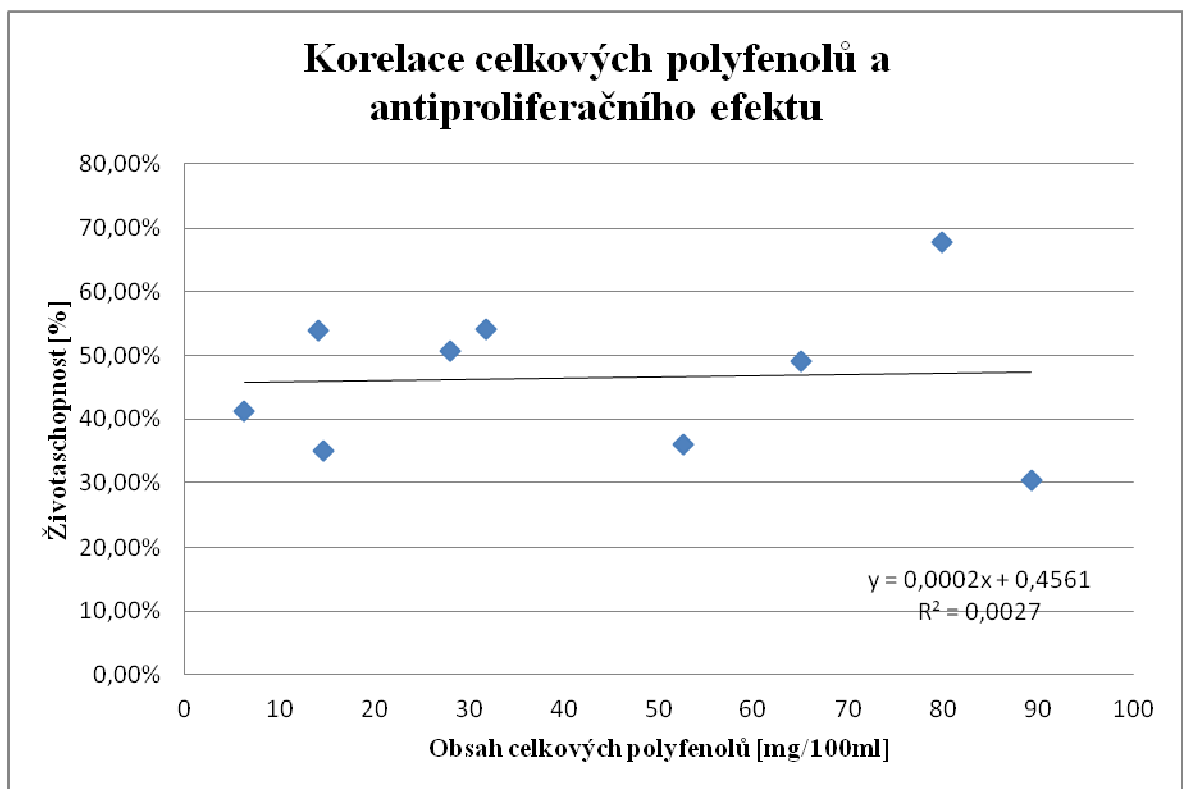
11.3 Antiproliferační efekt

V mojí diplomové práci byl sledován vliv polyfenolů z vybraných druhů kombuchového nápoje na jednom typu buňky. Bylo vybráno devět vzorků z důvodu finanční náročnosti testu a každý vybraný vzorek se nechal působit na buněčné linii lidských keratinocytů (HaCaT). Extrakty kombuchového nápoje ovlivňují antiproliferační efekt buněk v různé míře, přičemž porovnání s kontrolním měřením jí nejvíce snižuje vzorek číslo sedm a to domácí kombuchový nápoj ponechaný fermentačnímu procesu 10 dnů – zelený čaj a nejnižší vliv má paradoxně vzorek číslo čtyři domácí kombuchový nápoj ponechaný fermentačnímu procesu 7 dnů – zelený čaj. Ostatní vzorky ovlivňují antiproliferační aktivitu keratinocytů v podobné míře. Z tab. 6. je patrné, že o něco větší účinek v porovnání komerčně zakoupené a domácí výroby, má kombucha zakoupena komerčně.

Tab. 6. Přehled vlivů antiproliferačního efektu vybraných vzorků

Číslo	Druh kombuchy	Obsah celkových polyfenolů [mg/100ml]	Životaschopnost [%]
1.	Komerční kombucha zelený čaj	31,6303	54,03%
2.	Komerční kombucha černý čaj	27,84242	50,67%
3.	Komerční kombucha heřmánek	6,1454	41,34%
4.	Domácí kombucha 7. den – zelený čaj	79,7818	67,83%
5.	Domácí kombucha 7. den – černý čaj	13,9636	53,92%
6.	Domácí kombucha 7. den – heřmánek	64,9333	49,18%
7.	Domácí kombucha 10. den – zelený čaj	89,17576	30,34%
8.	Domácí kombucha 10. den – černý čaj	14,5393	34,92%
9.	Domácí kombucha 10. den – heřmánek	52,6	35,96%

Bylo zjištěno, že nejvyšší celkové množství polyfenolů nemusí mít vždy největší účinek na životaschopnost buněk. Přestože měl kombuchový nápoj vyrobený doma, vzorek číslo 4. obsah polyfenolických látek téměř nejvyšší, působení extraktu právě z tohoto vzorku ovlivnilo životaschopnost buněk nejméně. Polyfenoly tedy ovlivňují více nebo méně antiproliferační účinek. I nižší obsah celkových polyfenolů ve vzorku může mít vysoký účinek na životaschopnost buněk. Vyjadřuje nám to obrázek 4. Vzájemný vztah mezi obsahem celkových polyfenolů a životaschopností buněk je dána nízkou závislostí, kde korelační koeficient je roven 0,0027. Důvodem může být zastoupení jednotlivých dílčích polyfenolů ve směsi, které ale nebyly stanoveny, neboť toto již nebylo cílem diplomové práce.

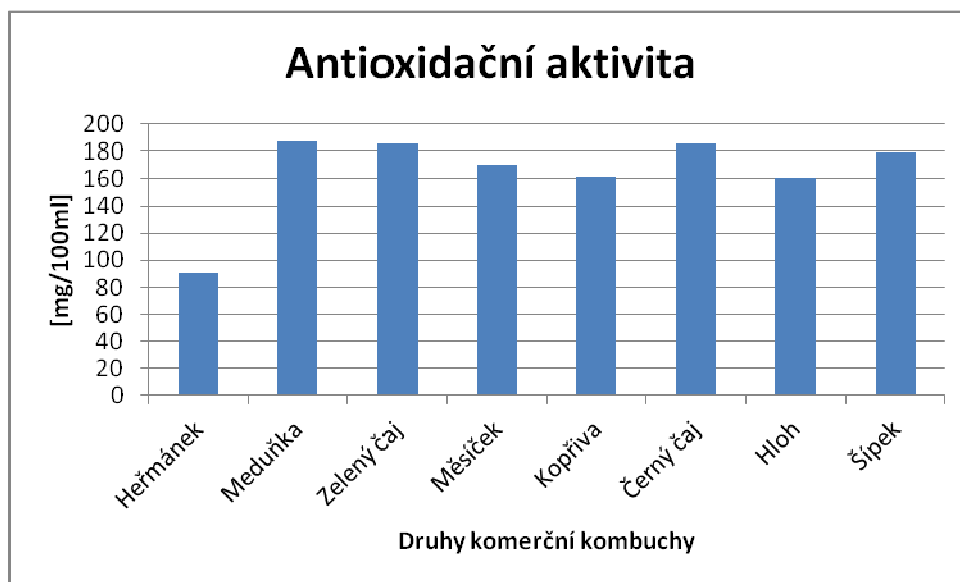


Obr. 4. Korelace celkových polyfenolů a antiproliferačního efektu

12 DISKUZE

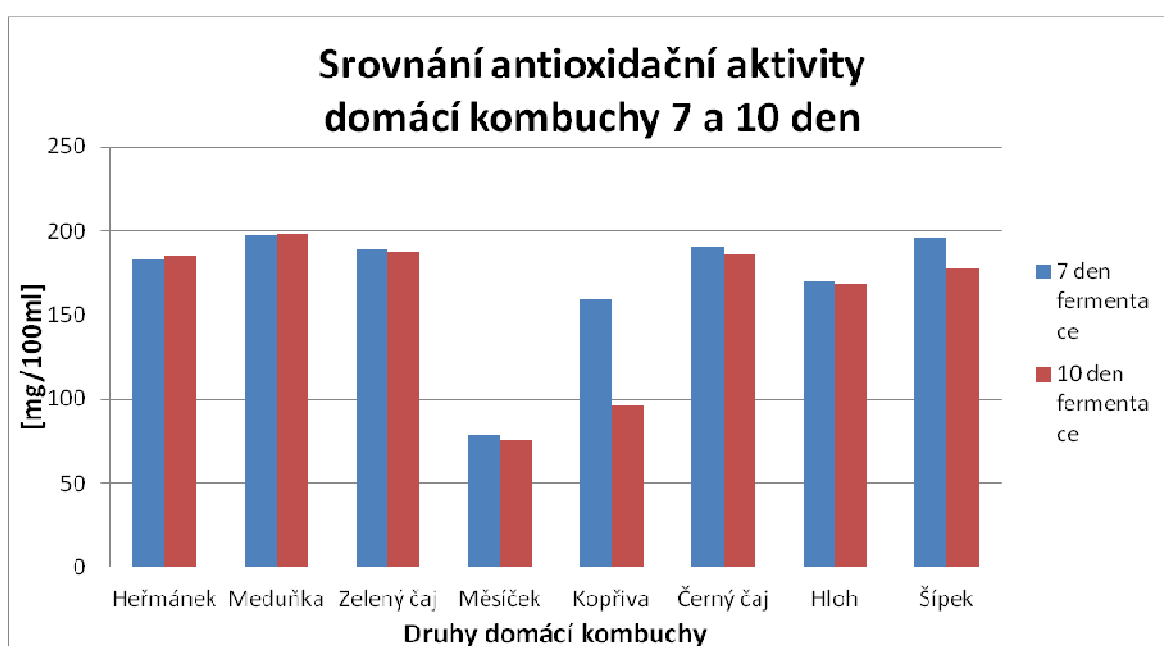
12.1 Diskuze – antioxidační aktivita

Z grafu (viz. obr. 5.) je zřetelné, že naměřená antioxidační aktivita u komerčně zakoupených druhů kombuchového nápoje je relativně vyrovnaná, až na jednu výjimku a to vzorek heřmánek, která je téměř o polovinu nižší než zbylé vzorky. Největší antioxidační aktivita u vzorků komerční kombuchy byla naměřena u kombuchy meduňka (187,724 mg/100ml), dále pak vzorky zelený čaj, černý čaj a šípek, které byly dosti podobných hodnot. Nejnižší hodnota u porovnávaných vzorků byla naměřena u kombuchy heřmánek (90,6094 mg/100ml). Výrobce těchto kombuchových nápojů nepřidává do nápoje žádné konzervanty, stabilizátory, antioxidanty, barviva, enzymy. A proto by naměřené hodnoty danou metodou měly být přesné a nijak nezkresleny. Poskytnuté vzorky kombuchy mají 6 ti měsíční dobu trvanlivosti, a proto se domnívám, že nápoj bude alespoň pasterizován z důvodu údržnosti nápoje. Tato konzervační metoda ale nebyla společností potvrzena.



Obr. 5. Antioxidační aktivita komerční kombuchy

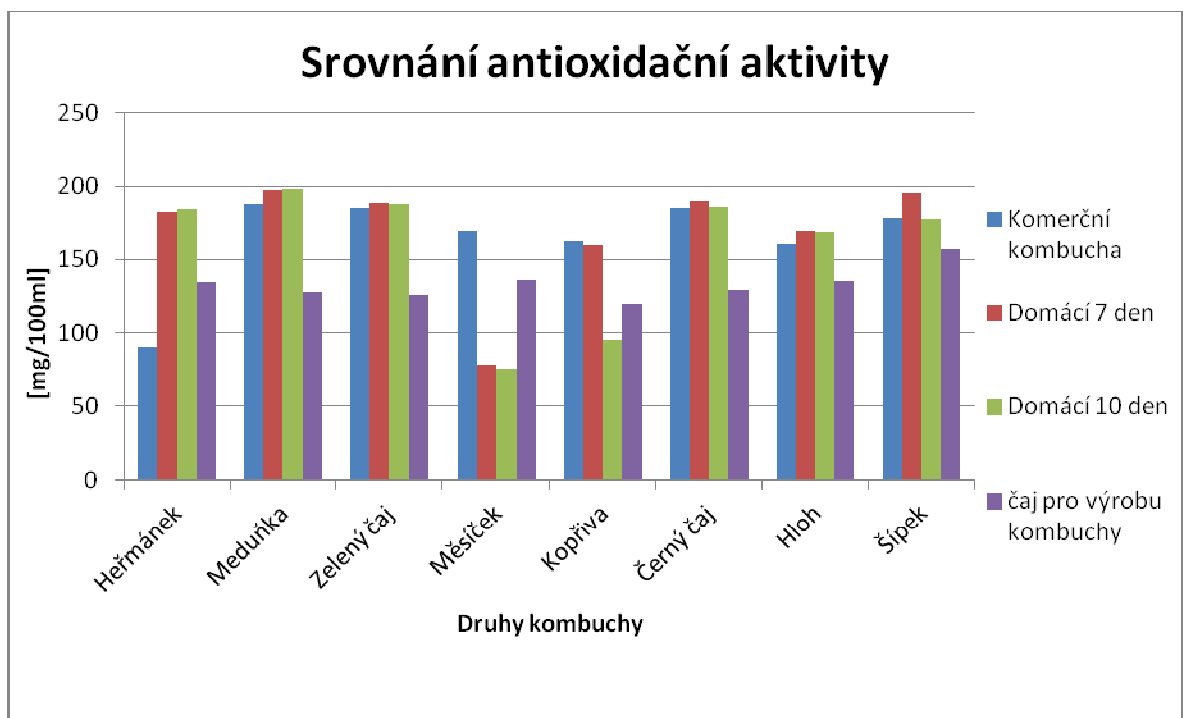
V grafu (viz. obr. 6.) můžeme sledovat srovnání antioxidační aktivity kombuchy, která byla vyrobena domácím způsobem a ponechána sedm a deset dnů fermentaci. V těchto dvou intervalech byly odebrány vzorky a proměřeny. Hodnoty jsou zde velmi vyrovnané až na jednu výjimku, a to vzorek kopřiva. Největší antioxidační aktivita byla naměřena u vzorku meduňka ponechaný 10 dnům fermentace – hodnota činila (198,1376 mg/100ml) a nejnižší u vzorku měsíček ponechaný 10 dnům fermentace (75,8949 mg/100ml). Z uvedených hodnot můžeme říci, že doba fermentování na hodnotu antioxidačního efektu nemá pravděpodobně až tak rozdílný vliv.



Obr. 6. Srovnání antioxidační aktivity domácích kombuchy

Z literatury, která se zabývala zjišťováním antioxidační aktivity u kombuchy, bylo zjištěno, že uvedené hodnoty, které byly naměřeny studiemi jsou v rozmezí od (50 – 450 mg/100ml). Žádná ze studií neuváděla, jaký konkrétní druh čaje byl použit pro výrobu kombuchy. Pouze byly rozděleny na zelené a černé čaje [70,71,72,73,74,75,76]. V mé práci jsou naměřené hodnoty v tom podobném rozmezí, co udávají ostatní studie. Jeden z možných faktorů ovlivňující tyto hodnoty je odvar z čaje, který byl použit pro výrobu kombuchového nápoje. Z literatury je známo, že čaj samotný už má velmi dobré antioxidační hodnoty a studií na toto téma bylo vypracováno hodně [75,76]. A tudíž záleží na tom, jakou odrůdu, kvalitu, zemi sběru čaje pro výrobu použijeme. Tudíž byl vložen

graf (viz. obr. 7.), kde můžeme porovnat veškeré naměřené hodnoty, a to i odvar z čaje, který byl použit při výrobě mé domácí kombuchy. Pokud budeme srovnávat, zda by bylo vhodné použít kupovanou nebo po domácku vyrobenou kombuchu, není prokazatelně jasné z uvedených hodnot, která je lepší pro konzumaci po stránce antioxidační aktivity. U šesti z osmi porovnávaných vzorků dosáhla antioxidační aktivita velmi podobných hodnot. Jedná se o vzorky meduňka, kopřiva, šípek, hloh, zelený a černý čaj. Téměř identické jsou právě hodnoty černého a zeleného čaje, které se pohybují v rozmezí (150 - 200 mg/100ml). U meduňky, kopřivy, hlohu a šípku nebyly zaznamenány větší rozdíly v hodnotách komerční a domácí kombuchy. Výraznější rozdíly v naměřených hodnotách můžeme pozorovat až u vzorků heřmánku a měsíček. U heřmánku se pro použití jeví jako výhodnější vzorek domácí kombuchy. U měsíčku je tomu naopak, zde dosáhl nejvyšších hodnot komerčně dostupný vzorek.



Obr. 7. Srovnání antioxidační aktivity

Pokud budeme porovnávat kombuchový nápoj z hlediska hodnot antioxidační aktivity s jinými nápoji, které nám udává dostupná literatura, dospějeme k tomu, že čaje zelené, černé, polofermentované, bílé, bylinkové a nečaje se pohybují v rozmezích (1,5 – 360 mg/100ml) [77,78]. Dále například u vína, kde ke studii bylo použito pět bílých odrůd (Müller-Thurgau, MOPR, Burgundské bílé, Ryzlink rýnský a Tramín červený) a čtyři modré odrůdy (Svatovavřínecké, Modrý portugal, Burgundské modré a Zweigeltrebe), naměřené hodnoty byly v rozmezí (35 – 350 mg/100ml) [79]. U dalšího nápoje jako je Britský alkoholický nápoj Cider byly hodnoty spíše nižších hodnot (0,225 - 25 mg/100ml) [80]. Poslední ze skupiny nápojů je srovnáním s pivem, kde byly proměřeny vzorky (tmavé speciální, světlé výčepní), hodnoty byly stanoveny na rozmezí (0,515 – 0,624 mg/100ml) [81].

Při porovnání mnou zjištěných výsledků s odbornou literaturou, z uvedených studií kde se zjišťovala antioxidační aktivitu můžeme konstatovat, že kombuchový nápoj by mělo být výhodnější používat než porovnávané nápoje. Ale musí brát velký ohled, že se zde projevuje velká mezidruhovná variabilita v porovnávaných vzorcích. Je třeba si také uvědomit, že na antioxidační aktivitě vzorků se podílí kromě obsahu polyfenolů i další složky (vitaminy, fenolické antioxidanty, antioxidanty na bázi aminokyselin, čisté sacharidy, atd.).

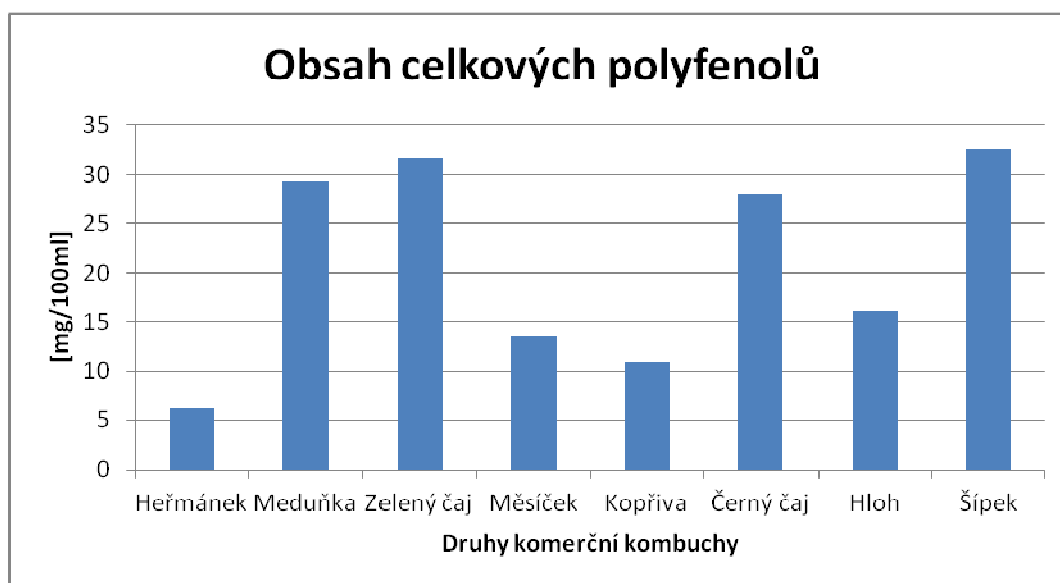
V tabulce č. 7 můžeme vidět srovnání antioxidační aktivity všech naměřených hodnot seskupené do čtyř sloupců od nejvyšších hodnot po nejnižší. V tabulce je možné sledovat zvýšení či snížení naměřených hodnot mezi 7. a 10. dnem fermentace domácí kombuchy. Výchozím dnem měření v tabulce byl 7. den fermentace, u kterého byly naměřeny hodnoty, které byly sestaveny sestupně do tabulky. Dalším dnem měření byl stanoven 10. den fermentace, kde jsme zjistili, zda se hodnoty změnily. První výrazná změna nastala u vzorku zelený čaj, u kterého došlo k výraznému zlepšení, jeho pořadí vzrostlo o 2 pozice v porovnání s ostatními vzorky. Díky tomu by bylo pro konzumenta vhodné použít tento vzorek až 10. den. Dalším vzorkem, který naznal změny, je heřmánek, který stoupl o jednu pozici nahoru. Naopak u šípku došlo k úbytku antioxidační aktivity a v pořadí klesl o 1 pozice níže. Ostatní vzorky nedosáhly výraznějších změn v naměřených hodnotách, tedy mezi 7. a 10. dnem nedošlo ke změně v jejich pořadí.

Tab. 7. Srovnání antioxidační aktivity od nejvyšších hodnot po nejnižší hodnoty a srovnání mezi 7. a 10. dnem fermentace

Číslo	Antioxidační aktivita			
	Komerční kombucha	Domácí kombucha 7. den	Domácí kombucha 10. den	Odvar z čaje
1.	Meduňka	Meduňka	Meduňka	Šípek
2.	Zelený čaj	Šípek	Zelený čaj ↑	Měsíček
3.	Černý čaj	Černý čaj	Černý čaj	Hloh
4.	Šípek	Zelený čaj	Heřmánek ↑	Heřmánek
5.	Měsíček	Heřmánek	Šípek ↓	Černý čaj
6.	Kopřiva	Hloh	Hloh	Meduňka
7.	Hloh	Kopřiva	Kopřiva	Zelený čaj
8.	Heřmánek	Měsíček	Měsíček	Kopřiva

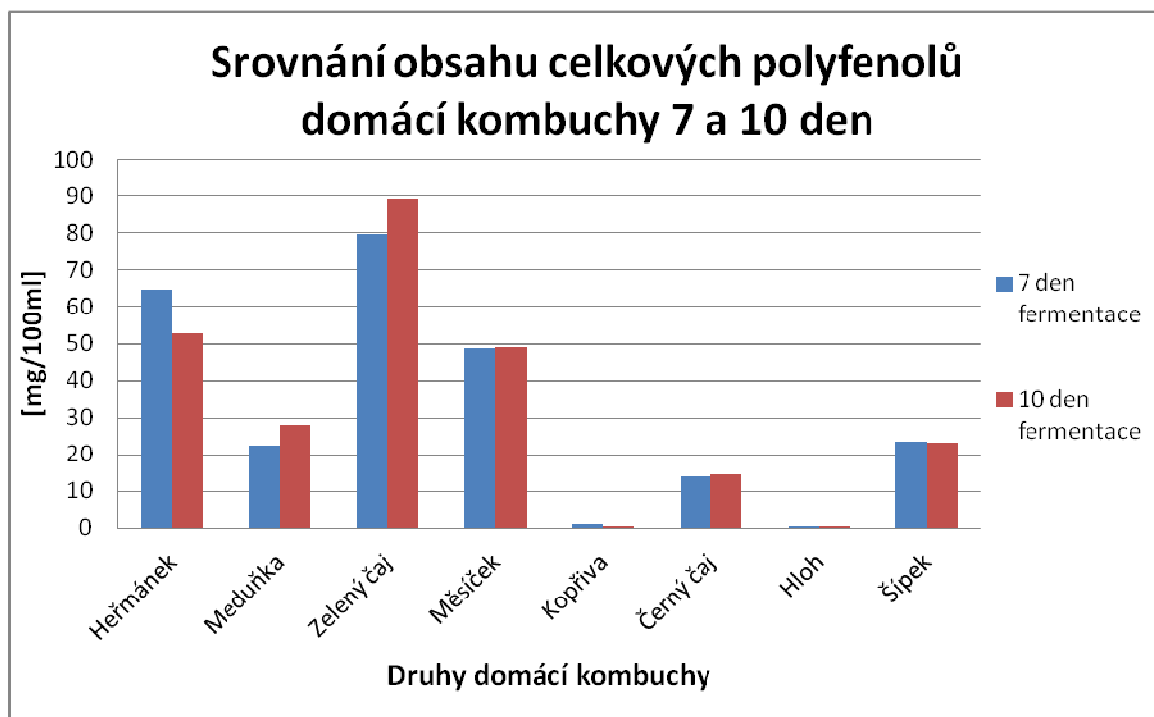
12.2 Diskuze – obsah celkových polyfenolů

V grafu (viz. obr. 8.) můžeme sledovat stanovený obsah celkových polyfenolů u komerčně zakoupených druhů kombuchového nápoje je dosti nevyrovnaná, můžeme říci, že se dají rozdělit na dvě poloviny o přibližných hodnotách. Nejvyšší obsah celkových polyfenolů byl zjištěn u vzorku zelený čaj (31,6303 mg/100ml), dále pak vzorky meduňka, černý čaj a šípek byly dosti podobných hodnot. Nejnižší hodnotu u porovnávaných vzorků měl heřmánek (6,1454 mg/100ml).



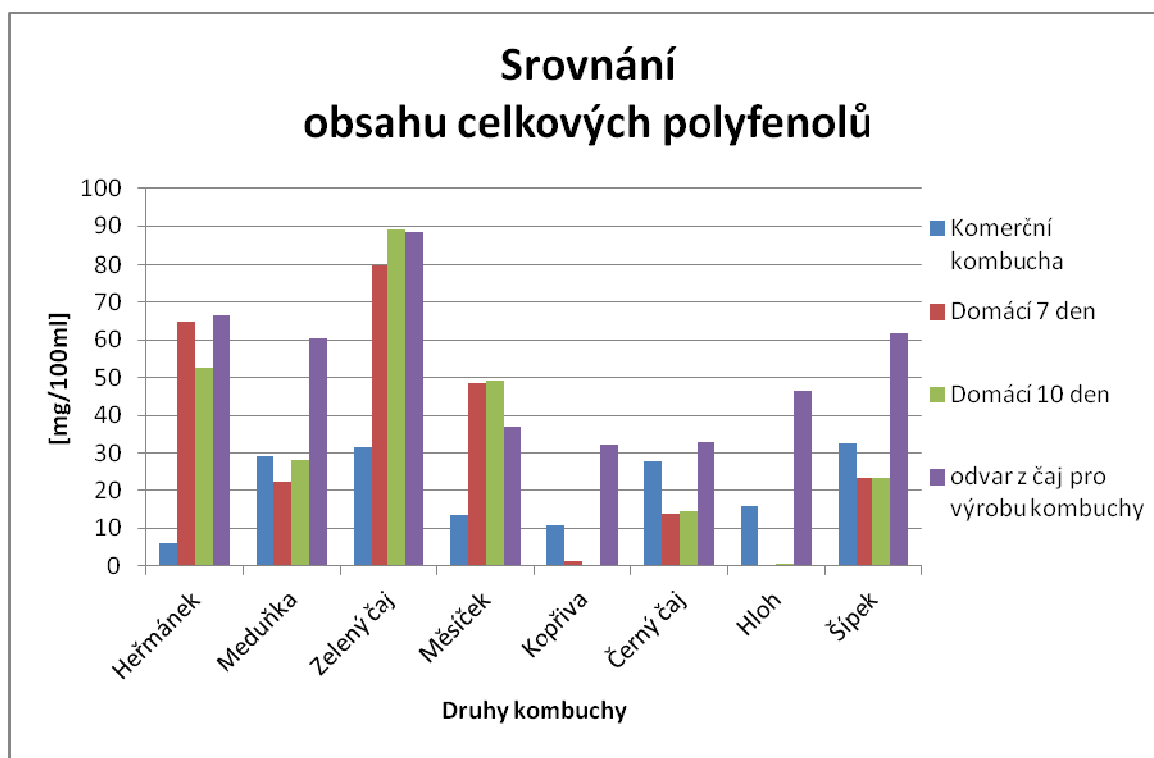
Obr. 8. Celkové polyfenoly komerční kombuchy

V grafu (viz. obr. 9.) můžeme sledovat srovnání obsahu celkových polyfenolů u domácí kombuchy, která byla ponechána sedm a deset dnů fermentaci. V těchto dvou intervalech byly odebrány vzorky a proměřeny. Hodnoty jsou zde velmi stejnoměrné až na malou odchylku a to u vzorků heřmánek, meduňka, zelený čaj. Největší obsah celkových polyfenolů byl naměřen u vzorku zelený čaj ponechaný 10 dnům fermentace – hodnota dosahovala (89,1757 mg/100ml) a nejnižší u vzorku kopřiva ponechaný 10 dnům fermentace (0,0242 mg/100ml). Z uvedených hodnot můžeme říci, že doba fermentování na hodnotu celkových polyfenolů nemá patrně až tak podstatný vliv.



Obr. 9. Srovnání celkových polyfenolů domácí kombuchy

Z literatury, která se zabývala obsahem celkových polyfenolů u kombuchy, bylo zjištěno, že naše uvedené hodnoty jsou přibližně stejné jako u hodnot naměřených daných studií. Autor Veličanski uvádí ve své studii hodnotu pro kombuchový zelený čaj 85,5047 mg/100ml. Není známo, jaký konkrétní druh zeleného čaje byl použit, ale s naší naměřenou hodnotou je velice podobná. V pracích jiných autorů, které byly k dispozici, se pohybuje rozmezí hodnot a to od (3,85 – 268,82 mg/100ml) [71,74,75,76]. V mé práci jsou naměřené hodnoty v tomto rozmezí, co udávají ostatní studie. Jeden z možných faktorů ovlivňující tyto hodnoty je odvar z čaje, který byl použit pro výrobu kombuchového nápoje. Dále by to mohla být metoda stanovení, která byla použita u dané studie. Z tohoto důvodu byl vložen graf (viz. obr. 10.), kde můžeme porovnat veškeré naměřené hodnoty a to i odvar z čaje, který byl použit při výrobě mé domácí kombuchy. Pokud budeme srovnávat, zda je výhodnější používat kupovanou nebo po domácku vyrobenou kombuchu, není věrohodně jasné, který kombuchový nápoj s uvedenými výsledky je vhodnější. Z osmi porovnaných vzorků jsou tři vzorky a to heřmáněk, zelený čaj, měsíček na tom lépe vzorky domácí výroby. A dalo by se říci, že je pro nás výhodnější používat tyto druhy kombuchy před komerčně dostupnými. U zbývajících vzorků není patrný tak rapidní rozdíl. Proto u těchto vzorků nebyl určen vhodnější vzorek pro konzumaci.



Obr. 10. Srovnání obsahu celkových polyfenolů

Pokud budeme porovnávat kombuchový nápoj z hlediska obsahu celkových polyfenolů s jinými nápoji a potravinami s hodnotami co nám udává dostupná literatura, dospějeme k tomu, že například čajová směs společnosti YZ má hodnotu 37,2 – 43,8 mg/100ml, Čínský zelený čaj 55,9 mg/100ml [82,83]. Pivo, ale u něj nebyl uvedený konkrétní druh má hodnotu 0,5 mg/100ml [81]. Červené víno Merlot v rozmezí 72 – 121 mg/100ml. Bílé víno Ryzling 28 – 83 mg/100ml [78]. Grepfruit má hodnotu 20 mg/100ml [84]. Francouzské šampaňské víno 24,5 mg/100ml [85]. Obsah polyfenolických látek u bezkofeinové pražené Arabica byl stanoven na 149 mg/100ml [86]. U pražené kávy Robusta na hodnotu 219,10 mg/100ml [87].

Rostlinné polyfenoly, zejména flavonoidy v ovoci a zelenině a katechiny v čaji a po-sléze v kombuše, se v přítomné době zařazují do kategorie přirozených látek, kterým se přisuzuje mimořádný a pozitivní zdravotní význam. V biologickém prostředí prokazatelně působí antioxidantně a zpomalují tak průběh patologických procesů, které u nás způsobují více než 80% úmrtí. I když ještě zbývá dořešit řadu dílčích otázek, je už dnes jisté, že význam polyfenolů je srovnatelný s významem vitamínu C a E i karotenů. Nápoje,

zejména nealkoholické, jsou přirozený a vhodný zdroj těchto látek. Jejich příjem je však u nás dosud nedostatečný. Je proto žádoucí obsah polyfenolů v nápojích uchovávat, popřípadě je do nápojů aplikovat, a tak zvyšovat jejich užitnou hodnotu. Takové výrobky by pak bylo možno prezentovat jako zdroje chemoprotektivních faktorů (před rakovinou, aterosklerózou) a právě kombucha je vhodná pro tyto záměry. Pochopitelně bychom měli brát ohled na nejvhodnější denní dobu pití kombuchy a pak množství, které je doporučené výrobcem. Pro srovnání společnost Stevikom s.r.o. udává doporučenou denní dávku: minimálně 0,2l a maximální není omezena. A dodává, že pití kombuchy není určeno pro děti do 3 let, protože obsahuje malé množství alkoholu [95]. Tato praxe se dnes ve světě již uplatňuje a ukazuje se, že je také komerčně i ekonomicky velmi zajímavá.

V tabulce č. 8 můžeme vidět srovnání obsahu celkových polyfenolů všech naměřených hodnot seskupené do čtyř sloupců od nejvyšších hodnot po nejnižší. V tabulce je možné sledovat zvýšení či snížení naměřených hodnot mezi 7. a 10. dnem fermentace domácí kombuchy. Výchozím dnem měření v tabulce byl 7. den fermentace, u kterého byly naměřeny hodnoty, které byly sestaveny sestupně do tabulky. Dalším dnem měření byl stanoven 10. den fermentace, kde jsme zjišťovali, zda se hodnoty změnily. První změna nastala u vzorku meduňka, u kterého došlo ke zlepšení, jeho pořadí vzrostlo o 1 pozici v porovnání s ostatními vzorky. Díky tomu by bylo pro konzumenta vhodné použít tento vzorek až 10. den. Dalším vzorkem, který naznal změny je hloh, který stoupl také o jednu pozici nahoru. Naopak u šípku došlo k úbytku obsahu polyfenolů a v pořadí klesl o 1 pozici níže. A dále pak stejná změna nastala u vzorku kopřiva, který klesnul o 1 pozici níže. Ostatní vzorky nedosáhly výraznějších změn v naměřených hodnotách, tedy mezi 7. a 10. dnem nedošlo ke změně v jejich pořadí.

Tab. 8. Srovnání obsahu celkových polyfenolů od nejvyšších hodnot po nejnižší hodnoty a srovnání mezi 7 a 10 dnem fermentace

Číslo	Obsah celkových polyfenolů			
	Komerční Kombucha	Domácí kombucha 7. den	Domácí kombucha 10. den	Odvar z čaje
1.	Šípek	Zelený čaj	Zelený čaj	Zelený čaj
2.	Zelený čaj	Heřmánek	Heřmánek	Heřmánek
3.	Meduňka	Měsíček	Měsíček	Meduňka
4.	Černý čaj	Šípek	Meduňka ↑	Šípek
5.	Hloh	Meduňka	Šípek ↓	Hloh
6.	Měsíček	Černý čaj	Černý čaj	Měsíček
7.	Kopřiva	Kopřiva	Hloh ↑	Černý čaj
8.	Heřmánek	Hloh	Kopřiva ↓	Kopřiva

12.3 Diskuze – antiproliferační efekt

Součástí této diplomové práce bylo zjistit vliv polyfenolů obsažených v kombuchovém nápoji na antiproliferační efekt eukaryotických buněk. U vybraných vzorků byl pozorován účinek na buněčné linii lidských keratinocytů (HaCaT). K posouzení antiproliferačního efektu buněk byl použit MTT test. Na buněčnou linii HaCaT byl zaznamenán největší účinek v případě vzorku – domácí kombuchový nápoj fermentovaný po dobu 7 dnů – příchut' zelený čaj. Výsledek testu nebyl zas tak překvapující, tento vzorek kombuchového nápoje se zeleného čaje byl podroben těmto testům už dříve i jinými vědci. V odborné literatuře bylo zjištěno, že naměřené hodnoty v této diplomové práci byly dosti podobné, co nám udává i odborná světová literatura a hodnoty se lišily do $\pm 24\%$ z porovnávaných hodnot dostupné literatury [88,89]. Fenolické sloučeniny a jejich protinádorové účinky jsou studovány již řadu let. Čaj, ovoce nebo hroznová jádra a slupky jsou považovány za bohatý zdroj těchto látek. Každá rostlina má nejen různé koncentrace fenolických sloučenin, ale i jejich složení a obsah je v každé části odlišný. Pozornost vědců z hlediska

vlivu na nádorové onemocnění byla většinou zaměřena na fenolické sloučeniny u vína nebo čaje. Druhý nejvyšší účinek byl u komerčního kombuchového nápoje – zelený čaj a další vzorky jen s nepatrných rozdílem jej následovaly. Proto byly v této diplomové práci vzorky jak komerční tak domácí kombuchy ze zeleného nebo černého čaje velmi dobře hodnoceny a může být tedy konstatováno, že by měly mít prokazatelný vliv na životaschopnost nádorových buněk. Nelze však s přesností říct, že nejvyšší koncentrace celkových polyfenolů je nejučinnější. Rozhodující zřejmě bude obsah jednotlivých polyfenolických látek ve vzorku, protože z každého odvaru čaje anebo delším působením mateční kultury kombuchy můžeme získat rozdílné zastoupení dílčích polyfenolů ve směsi. Z výsledků ale vyplývá pozitivní účinek polyfenolů kombuchy na snižování proliferace lidských keratinocytů.

Tab. 9. Rozmezí cytotoxicity

> 80% = žádná cytotoxicita
60 – 80% = slabá cytotoxicita
40 – 60% = střední cytotoxicita
< 40% = silná cytotoxicita

Tab. 10. Vyhodnocení vzorků od nejlepšího po nejhorší vliv na životaschopnost

Číslo	Životaschopnost
1.	Domácí kombucha 10. den – zelený čaj
2.	Domácí kombucha 10. den – černý čaj
3.	Domácí kombucha 10. den – heřmánek
4.	Komerční kombucha heřmánek
5.	Domácí kombucha 7. den – heřmánek
6.	Komerční kombucha černý čaj
7.	Domácí kombucha 7. den – černý čaj
8.	Komerční kombucha zelený čaj
9.	Domácí kombucha 7. den – zelený čaj

ZÁVĚR

Diplomová práce je zaměřena na mykologickou charakteristiku kombuchy a na účinky biologicky aktivních látek kombuchy. V teoretické části jsem se zaměřil na mykologickou charakteristiku kombuchy, její chemické složení a technologické zpracování, dále obecnou charakterizaci antioxidantu a polyfenolů. V praktické části byla stanovena antioxidační aktivita, obsah celkových polyfenolů a antiproliferační efekt. Celkový obsah polyfenolů byl stanoven spektrofotometricky a antioxidační aktivita pomocí metody DPPH. Stanovení antiproliferačního efektu bylo spektrometrickou metodou MTT. Struktura kombuchového nápoje je podřízena mnoha faktorům, převážně druhu zvoleného čaje, který je ovlivněn místem sběru, klimatickými podmínkami, ročním obdobím, stářím keře a v neposlední řadě i technologickým zpracováním výrobce. Dále pak dobou fermentace kombuchového nápoje, množstvím použité mateční kultury a čistotou prostředí.

O kombuše bylo napsáno mnoho vědeckých prací. Pojednávají o léčivých účincích kombuchy díky jejím složkám – kyselině glukónové, glukuronové, kyselině mléčné a kyselině octové, díky vitaminům, enzymům aj. Nejpodrobněji to vystihují ruské výzkumy, které prokázaly, že mnoho látek, obsažených v kombuše, má antibiotické a antioxidační účinky a hrají velmi důležitou úlohu během biochemických pochodů v lidském těle. Na rozdíl od mnohých léků a jejich často nepříjemným kontraindikačním účinkům, účinné látky v kombuše působí na tělesný systém jako celek svými blahodárnými vlastnostmi, během látkové výměny mohou obnovit stav buněčných membrán bez vedlejších účinků, a tak napomoci dobrému zdraví. A to je důležité v dnešní době, kdy jsme vystaveni mnohým vlivům ať už v samotných potravinách, v pitné vodě nebo v okolním prostředí. Proto se těmto, často škodlivým vlivům, nemůžeme bránit. Můžeme však našemu tělu pomoci tím, že budeme přijímat aktivní látky, které nám pomohou udržet, popř. obnovit normální stav.

Kombucha představuje možnost, jak reagovat a stabilizovat potřebnou obranyschopnost k udržení a obnovení zdraví a jak nám dodat vše, co potřebujeme k celkovému dobrému pocitu a zdraví. V tomto smyslu je možné kombuchu doporučit každému člověku.

Mé naměřené průměrné hodnoty antioxidační aktivity jsou v rozmezí 75,8949 – 198,1377 mg/100ml. Největší obsah byl naměřen u domácí kombuchy příchutě meduňka fermentovaný po dobu 10 dnů a naopak nejnižší množství u vzorku měsíček ponechaný fermentaci taktéž 10 dnů. Při porovnání komerčně zakoupených kombuchových nápojů a po domácímu vyrobených bylo zjištěno, že antioxidační aktivita se mezi sebou až na

výjimky zásadně neliší. A pokud budeme srovnávat antioxidační aktivitu mezi 7 a 10 dny fermentace, tak k rapidním změnám v naměřených hodnotách také nedošlo. A proto z uvedených výsledků není patrné, který druh kombuchy jak už komerčně zakoupený nebo vyrobený doma, bychom měli použít a byl pro náš zdravotní stav přínosnější.

Průměrné hodnoty celkových polyfenolů se pohybují 0,024 – 89,175 mg/100ml. Největší obsah celkových polyfenolů byl naměřen ve vzorku domácí kombuchy – zelený čaj fermentovaný po dobu 10 dnů. Při porovnání komerčních a domácích vzorků kombuchového nápoje jsou zjištěny hodnoty rozdílné. Proto se můžeme přiklánět ke vzorkům připravených domácí cestou, jako výhodnějším ke konzumaci nápoje z důvodů vyšších průměrných hodnot, a tudíž vyššího efektu zdravotních účinků pro člověka.

V diplomové práci byl také popsán vliv polyfenolů z různých druhů kombuchy na buněčnou linii lidských keratinocytů (HaCaT). Všechny použité vzorky ovlivňovaly antiproliferační efekt. Největší vliv vykázal vzorek domácí kombuchy – zelený čaj ponechaný fermentaci po dobu 10 dnů. Po zpracování výsledků můžeme říci, že testované vzorky kombuchy jsou dobrými zdroji fenolických sloučenin. Mé výsledky také prokázaly, že fenolové sloučeniny obsažené v kombuše mohou ovlivnit buněčnou proliferaci.

Celá řada výzkumů a anket potvrdila výrazné zlepšení zdravotního stavu a celkové kondice u všech dlouhodobých konzumentů kombuchového nápoje. A proto můžeme konstatovat, že jak kombuchový nápoj, tak samotná kombuchová kultura mají mnohostranné využití např. ve zdravotnictví, potravinářství, nápojařství, kosmetice nebo lidovém léčitelství.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] GUNTHER, W. F. Kombucha – Das Teepilz-Getränk – Praxisgerechte Anleitung zur Zubereitung und Anwendung. Berlin: Ennsthaler, 2008, 172 s. ISBN: 38-50683-04-4.
- [2] GOTY, G. Kombucha – der Wunderpilz, der Millionen Gesundheit schenkt. Hamburg: Heinrig Bauer, 1988.
- [3] HEHSLER, P. O. Alles über Kombucha. Stutensee, 1989.
- [4] HESSMANN / KOSARIS, A. Zázračná kombucha: Energetický nápoj s jemnou léčivou silou. Olomouc: Fontana, 2002. 160 s. ISBN: 80-86179-81-8.
- [5] Historie kombuchy [online]. [cit.2014-10-02]. Dostupný z [www: http://www.kombucha-praha.cz/historie-kombuchy](http://www.kombucha-praha.cz/historie-kombuchy).
- [6] HARMS, H. Der japanische Teepilz. Therapeutische Berichte. Leverkusen, 1927.
- [7] FRANK, R. Zuckerproblem beim Kombucha-Tee. Mnichov: Natur und Heilen, 1988.
- [8] Zázračná houba kombucha. Nevábná chuť, zato léčivé účinky [online]. [cit.2014-10-02]. Dostupný z [www: http://www.lidovky.cz/zazracna-houba-kombucha-nevabna-chut-zato-lecive-ucinky-pjq-/dobra-hut.asp?c=A100420_112755_dobra-chut_glu](http://www.lidovky.cz/zazracna-houba-kombucha-nevabna-chut-zato-lecive-ucinky-pjq-/dobra-hut.asp?c=A100420_112755_dobra-chut_glu).
- [9] MEIXER, A. Pilze selber züchten. Aarau, 1988.
- [10] GUNTHER, W. F. Kombucha: Nápoj z čajové houby. 6. vyd. Bratislava: Ikar, 1991. 134 s. ISBN: 80-7118-025-4.
- [11] Kombucha, zdraví v každé kapce [online]. [cit.2014-11-02]. Dostupný z [www: http://www.nutrisport-magazin.cz/kombucha-zdravi-v-kazde-kapce/kombucha/](http://www.nutrisport-magazin.cz/kombucha-zdravi-v-kazde-kapce/kombucha/).
- [12] MANDŽUKOVÁ, J. Potraviny pro zdravou výživu od A do Z. 1. vyd. Praha: Vyšehrad, 2007. 125 s. ISBN: 978-80-7021-865-5.
- [13] Kombucha [online]. [cit.2014-11-02]. Dostupný z [www: http://message.sk/text/kombucha/](http://message.sk/text/kombucha/).
- [14] What is Kombucha? [online]. [cit.2014-10-02]. Dostupný z [www: http://www.thekombuchadiet.com/](http://www.thekombuchadiet.com/).

- [15] Kombucha pomáhá [online]. [cit.2014-11-02]. Dostupný z [www: http://www.moda.cz/Kategorie/Zdrave_mlsani/20090113_Kombucha_Pomaha_Pr_i_Redukci_Telesne_Hmotnosti_I_V_Kosmetice.html](http://www.moda.cz/Kategorie/Zdrave_mlsani/20090113_Kombucha_Pomaha_Pr_i_Redukci_Telesne_Hmotnosti_I_V_Kosmetice.html).
- [16] FORŠT, J. Kapesní biolexikon: průvodce biotrhem a trhem zdravé výživy. Praha: IFP, 2007. 191 s. ISBN: 978-80-903997-0-9.
- [17] WACHENDORFOVÁ, V. Čaj. Praha: Slovart, 2007. 96 s. ISBN: 978-80-7209-922-1.
- [18] O čaji [online]. [cit.2014-11-02]. Dostupný z [www: http://www.cajovna.cz/cz/o-caji/caj-cajovnik/](http://www.cajovna.cz/cz/o-caji/caj-cajovnik/).
- [19] Co všechno se skrývá v šálku čaje [online]. [cit.2014-11-02]. Dostupný z [www: http://www.szpi.gov.cz/docDetail.aspx?docid=1000732&docType=ART&nid=11327](http://www.szpi.gov.cz/docDetail.aspx?docid=1000732&docType=ART&nid=11327).
- [20] Druhy čaje – čaj a složení [online]. [cit.2014-11-02]. Dostupný z [www: http://www.rodina-finance.cz/zdrava-vyziva.212/druhy-caje-caj-a-slozeni.20342.html](http://www.rodina-finance.cz/zdrava-vyziva.212/druhy-caje-caj-a-slozeni.20342.html).
- [21] WU, R. a kol.. Léčíme se čínskými čaji. Praha: Ivo Železný, nakladatelství a vydavatelství, spol. s. r. o., 2003. 117 s. ISBN: 80-237-3802-X.
- [22] Green, Black or Oolong? [online]. [cit.2014-13-02]. Dostupný z [www: http://www.greentealibrary.com/Green,%20Black%20or%20Oolong%20-%20Article.htm](http://www.greentealibrary.com/Green,%20Black%20or%20Oolong%20-%20Article.htm).
- [23] Van het Hof: Bioavailability of catechins from tea: the effect of milk. Europa, 1988. ISBN: 52:3563-7.
- [24] Skryté příznivé zdravotní účinky čaje [online]. [cit.2014-10-02]. Dostupný z [www: http://www.eufic.org/article/cs/page/FTARCHIVE/artid/skryte-zdravy-caje/](http://www.eufic.org/article/cs/page/FTARCHIVE/artid/skryte-zdravy-caje/).
- [25] CHOW, K. Všechny čaje Číny. 2. upr. vyd. Praha, 1998. 284 s. ISBN: 80-85905-54-X.
- [26] AUGUSTIN, J. Povídání o čaji: Čajovníkový list (*Camellia sinensis* L.), čaj, jako potravinářská pochutina, léčebný, mystický nápoj a jiné tonizující nápoje světa. Olomouc: Fontána, 2001. 217 s. ISBN: 80-86179-75-3.
- [27] REISS, J. Der Teepilz und seine Stoffwechselprodukte. Lebensmittel-Rundschau 83, 1987, s. 286-290.

- [28] Kombucha [online]. [cit.2014-11-02]. Dostupný z [www: http://cs.wikipedia.org/wiki/Kombucha](http://cs.wikipedia.org/wiki/Kombucha).
- [29] SESTERNHENN, B. Kombucha: nápoj pro výbornou kondici a elixír krásy. Praha: Cesty, 2001. 48 s. ISBN: 80-7171-556-X.
- [30] FIDLER, M. a kol.. Analýza antioxidantů v chmelu a pivu. *Chemické listy*, 2009, 103, s. 232-235.
- [31] YOUNGSON, R. *Antioxidanty-cesta ke zdraví*. 1. Vyd. Praha: Jota, 1995. 143 s. ISBN: 80-85617-56-0.
- [32] PAULOVÁ, H. a kol.. Metody stanovení antioxidační aktivity přírodních látek in vitro. *Chemické listy*, 2004, 98 s. 174-179.
- [33] *Volné radikály a antioxidanty* [online]. [cit. 2014-24-02]. Dostupný z [www: http://www.celostnimediceina.cz/volne-radikaly-a-antioxidanty](http://www.celostnimediceina.cz/volne-radikaly-a-antioxidanty).
- [34] *Antioxidanty* [online]. [cit. 2014-24-02]. Dostupný z [www: http://www.institutkavy.cz/kava-a-zdravi/clanek/antioxidanty-potraviny](http://www.institutkavy.cz/kava-a-zdravi/clanek/antioxidanty-potraviny).
- [35] ŠTÍPEK, S. *Antioxidanty a volné radikály ve zdraví a nemoci*. Praha: Grada, 2000. 314 s. ISBN: 80-7169-704-4.
- [36] VELÍŠK, J. *Chemie potravin II*. Tabor: OSSIS, 2009. s. 623. ISBN: 978-80-86659-16-9.
- [37] *Trendy použitých přírodních antioxidantů pro stabilizaci tuků a olejů proti oxidačnímu žluknutí* [online]. [cit. 2014-24-02]. Dostupný z [www: www.vitamins.cz/archiv/2003/doc/1/L_31.doc](http://www.vitamins.cz/archiv/2003/doc/1/L_31.doc).
- [38] LACHMAN, J. a kol.. *Červeně a modře zbarvené brambory významný zdroj antioxidantů v lidské výživě*. *Chemické listy*, 2005, 99, s. 474-482.
- [39] JORDÁN, V. *Antioxydanty zázračné zbraně*. Brno: Jota, 2001. s. 153.
- [40] DÁVÍDEK, J. *Chemie potravin*. Praha: SNTL Alfa, 1983. s. 632.
- [41] RAVEL, H. Nutritional contribution of cacao and tea phenolics to human health. *Journal of Consumer Protection and Food Safety*, 2007, 2, s. 399-406.
- [42] HARMATHA, J. Strukturální bohactví a biologický význam lignin a jim příbuzných rostlinných fenylypropanoidů. *Chemické listy*, 2005, 99, s. 622-632.
- [43] *Přírodní polyfenolové antioxidanty* [online]. [cit. 2014-25-02]. Dostupný z [www: www.med.muni.cz/biochem/seminare.rtf](http://www.med.muni.cz/biochem/seminare.rtf).

- [44] I. Kolouchová a kol.: Obsah resveratrolu v zelenině a ovoci. *Chemické listy*, 2005, 99. s. 492-495.
- [45] A. Lugasi a kol.: Antioxidant properties of commercial alcoholic and nonalcoholic beverages. *Nahrung/Food*, 2003, 47, s. 79-86.
- [46] MANACH, C. Polyphenols: food sources and bioavailability. *American Society for Clinical Nutrition*, 2004, 79, s. 727-747.
- [47] MANDELOVÁ, L. Antimutagenní aktivita obsahových látek v zelenině a ovoci, Disertační práce. Brno: MU, 2006.
- [48] MINDELL, E. *Nová vitaminová bible*. Praha, IKAR, 2010. 576 s. ISBN: 978-80-249-1419-0.
- [49] OLESZEK, W. Resveratrol and other phenolics from the bark of *Yucca schidigera* roezl. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2001, s. 747-752.
- [50] MRÁZOVÁ, E. *Stanovení fenolických látek a antioxidační activity u cereálií*. Zlín, 2011, Diplomová práce. Univerzita Tomáše Bati, technologická fakulta.
- [51] ELEFANTOVÁ, P. *Stanovení polyfenolických látek v rostlinách*. Brno, 2010. Bakalářská práce. Masarykova univerzita.
- [52] DARZYNKIEWICK, Z. Assay of cell viability discrimination of cells dying by apoptosis. *Methods Cell Biology*. 1994, 41, s. 15-38.
- [53] GESDES, J. Cell cycle analysis of a cell proliferation: associated human unclear antigen defined by the monoclonal antipol. *J Immunol*, 1984, 133, s. 1710-1715.
- [54] NEORALOVÁ, L. *Vliv polyfenolů obsažených v jedlých květech na eukaryotické buňky*, Diplomová práce, UTB Zlín, 2012.
- [55] *Kombuchový nápoj* [online]. [cit. 2014-25-03]. Dostupný z www: <http://es.wikipedia.org/wiki/Kombucha>.
- [56] *English Breakfast Tea* [online]. [cit. 2014-25-03]. Dostupný z www: <http://www.oxalis.cz/english-breakfast-teaanglicky-snidanovy-caj-1-kg/d-70891/>.
- [57] *Green Sanil* [online]. [cit. 2014-25-03]. Dostupný z www: <http://www.oxalis.cz/green-snailzeleny-snek/d-72743/>.
- [58] *Heřmánek pravý* [online]. [cit. 2014-25-03]. Dostupný z www: http://cs.wikipedia.org/wiki/He%C5%99m%C3%A1nek_prav%C3%BD.

- [59] *Meduňka* [online]. [cit. 2014-25-03]. Dostupný z [www: http://cs.wikipedia.org/wiki/Medu%C5%88ka_1%C3%A9ka%C5%99sk%C3%A1](http://cs.wikipedia.org/wiki/Medu%C5%88ka_1%C3%A9ka%C5%99sk%C3%A1).
- [60] *Calendula officinalis* [online]. [cit. 2014-25-03]. Dostupný z [www: http://botanika.wendys.cz/kytky/K131.php](http://botanika.wendys.cz/kytky/K131.php).
- [61] *Kopřiva* [online]. [cit. 2014-25-03]. Dostupný z [www: http://cs.wikipedia.org/wiki/Kop%C5%99iva_dvoudom%C3%A1](http://cs.wikipedia.org/wiki/Kop%C5%99iva_dvoudom%C3%A1).
- [62] *Hloh* [online]. [cit. 2014-25-03]. Dostupný z [www: http://cs.wikipedia.org/wiki/Hloh](http://cs.wikipedia.org/wiki/Hloh).
- [63] *Šípky* [online]. [cit. 2014-25-03]. Dostupný z [www: http://cs.wikipedia.org/wiki/%C5%A0%C3%ADpky](http://cs.wikipedia.org/wiki/%C5%A0%C3%ADpky).
- [64] *Stevikom* [online]. [cit. 2014-25-03]. Dostupný z [www: http://www.kombucha-praha.cz/](http://www.kombucha-praha.cz/).
- [65] BRAND-WILLIAMS, W. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Science Technology*, 1995, 28, s. 25-30.
- [66] *Mtt-test* [online]. [cit. 2014-25-03]. Dostupný z [www: http://lem.ocol.cz/cs/info/mtt-test](http://lem.ocol.cz/cs/info/mtt-test).
- [67] ŠULC, M. Antioxidants. *Chemické listy*, 2007, 101, s. 584-591.
- [68] PARKÁNYIOVÁ, J. *Rostliny jako zdroje přírodních antioxidantů*. Praha, 2008 VŠCHT.
- [69] CHOI, Y. Influence of heat treatment on the antioxidant activities and polyphenolic compounds of Shitake (*Lentinusedodes*) mushroom. *Food Science and Technology*, 2005, s. 361-763.
- [70] YANISHLIEVA, N. Inhibiting oxidation, Antioxidants in Food – Practical Applications. Cambridge, 2001, *Woodhead Publishing*, s. 21-70. ISBN 978-1-85573-463-0.
- [71] SHENG-CHE, CH. Effects of origins and fermentation time on the antioxidant activities of kombucha. *Food Chemistry*, 2006, 98, s. 502-507.
- [72] BLANC, P. J. Characterization of the tea fungus metabolites. *Biotechnology Letters*, 1996, 18, s. 139-142.
- [73] CHEN, C. Changes in major components of tea fungus metabolites during prolonged fermentation. *Journal of Applied Microbiology*, 2000, 89, s. 834-839.

- [74] DUFRESNE, C. Tea, Kombucha, and health: a review. *Food Research International*, 2000, 33, s. 409-421.
- [75] VELICANSKI, A. S. Antimicrobial and antioxidant activity of lemon balm Kombucha. *Acta Periodica Technologica*, 2007, 38, s. 165-172.
- [76] GREENWALT, C. Kombucha, the fermented tea: Microbiology, composition, and claimed health effects. *Journal of Food Protection*, 2000, 63, s. 976-981.
- [77] BALANTINE, D. A. *Tea and health. Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2003, 37, s. 691-692.
- [78] CAO, G. Antioxidant Capacity of Tea and Common Vegetables. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1996, 44, s. 3426-3431.
- [79] ŠULC, M. *Obsah polyfenolů a antioxidační aktivita vín v průběhu jejich výroby*. Brno, 2006, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita.
- [80] KOVÁČOVÁ, T. *Struktura antioxidantů a antioxidační aktivita cideru*. Zlín, 2013, Bakalářská práce, Univerzita Tomáše Bati, technologické fakulta.
- [81] MARTINKOVÁ, Z. *Stanovení antioxidační aktivity fenolických látek v pivu*. Pardubice, 2009, Diplomová práce, Univerzita Pardubice, Fakulta chemicko-technologická.
- [82] ANTONY, J. I. X. Polyphenols of green tea. *International Food Ingredients*, 1997, 5, s. 47-50.
- [83] BALENTINE, D. A. The chemistry of tea flavonoidů. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1997, 37, s. 693-704.
- [84] ZLOCH, Z. *Stanovení obsahu polyfenolů a celkové antioxidační kapacity v potravinách rostlinného původu*. Plzeň, 2004, Ústav hygieny Lékařské fakulty UK.
- [85] VAUZOUR, D. Potential Health Effects of Champagne Wine Consumption. *Journal of Wine Research*, 2011, 22, s. 175-180.
- [86] VIGNOLI, J. A. Antioxidant activity, polyphenols, caffeine and melanoidins in soluble coffee. The influence of processing conditions and raw material. *Food Chemistry*, 2011, 13, s. 863-868.
- [87] BUTT, M. Evaluating the effect of decaffeination on nutritional and antioxidant status of different coffee brands. *Internet Journal of Food Safety*, 2011, 13, s. 198-207.

- [88] DČETOJEVVIĆ-SIMIN, D. Bioactivity of Lemon Balm Kombucha. *Food and Bioprocess Technology*, 2012, 5, s. 1756-1765.
- [89] BOGDANOVIC, G. M. Antiproliferative and antimicrobial activity of traditional Kombucha and Satureja Montana L. Kombucha. *Journal of B.U.O.N.*, 2008, 13, s. 395-401.
- [90] CHINOY, J. J. *The Role of Ascorbic Acid in Growth*. Differentiation and Metabolism of Plants, Springer, 1984, s. 277, ISBN 9024729084.
- [91] WEBB, G. P. *Dietary Supplemets And Functional Foods*. Blackwell Publishing, 2006, s. 106-108, ISBN 1405119098.
- [92] LANDETE, J. M. Polyphenols: Functions, Bioavailability, Metabolism, and Health. *Critical reviexs in Food Science and Nutrition*, 2012, 52, s. 10.
- [93] DARCHIVIO, M. Polyphenols, dietary sources and biovailibility. *Instituto Superiore Di Santita*, 2007, 43, s. 4.
- [94] ROSS, J. A. Dietary flavonoids: Buovailability, metabolic effect and safety. *Annual Review of Nutricion*, 2002, 22, s. 19-34.
- [95] *Jak kombucha funguje* [online]. [cit. 2014-13-04]. Dostupný z www: <http://www.kombucha-praha.cz/jak-kombucha-funguje>.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

HaCaT	lidské keratinocyty
DPPH	2,2-difenyl-1-pikryl-hydrazyl
MTT	3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyl tetrazolium bromidu

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1. Kombuchový lívanec [11].....	14
Obr. 2. Kombuchový nápoj [55].....	37
Obr. 3. Ilustrační obrázek MTT testu [66].....	43
Obr. 4. Korelace celkových polyfenolů a antiproliferačního efektu.....	50
Obr. 5. Antioxidační aktivita komerční kombuchy.....	51
Obr. 6. Srovnání antioxidační aktivity domácí kombuchy.....	52
Obr. 7. Srovnání antioxidační aktivity.....	53
Obr. 8. Celkové polyfenoly komerční kombuchy.....	56
Obr. 9. Srovnání celkových polyfenolů domácí kombuchy.....	57
Obr. 10. Srovnání obsahu celkových polyfenolů.....	58

SEZNAM TABULEK

Tab. 1. Biochemické změny, způsobené pěstováním kombuchy na různých substrátech po dobu 14 dnů [27].....	23
Tab. 2. Složení směsi pro výrobu odvaru.....	36
Tab. 3. Přehled vzorků kombuchy od společnosti XY.....	41
Tab. 4. Průměrný obsah antioxidační aktivity.....	46
Tab. 5. Průměrný obsah celkových polyfenolů.....	48
Tab. 6. Přehled vlivů antiproliferačního efektu vybraných vzorků.....	49
Tab. 7. Srovnání antioxidační aktivity od nejvyšších hodnot po nejnižší hodnoty srovnání mezi 7 a 10 dnem fermentace.....	55
Tab. 8. Srovnání obsahu celkových polyfenolů od nejvyšších hodnot po nejnižší hodnoty a srovnání mezi 7 a 10 dnem fermentace.....	60
Tab. 9. Rozmezí cytotoxicity.....	61
Tab. 10. Vyhodnocení vzorků od nejlepšího po nejhorší vliv na životaschopnost.....	61

SEZNAM PŘÍLOH

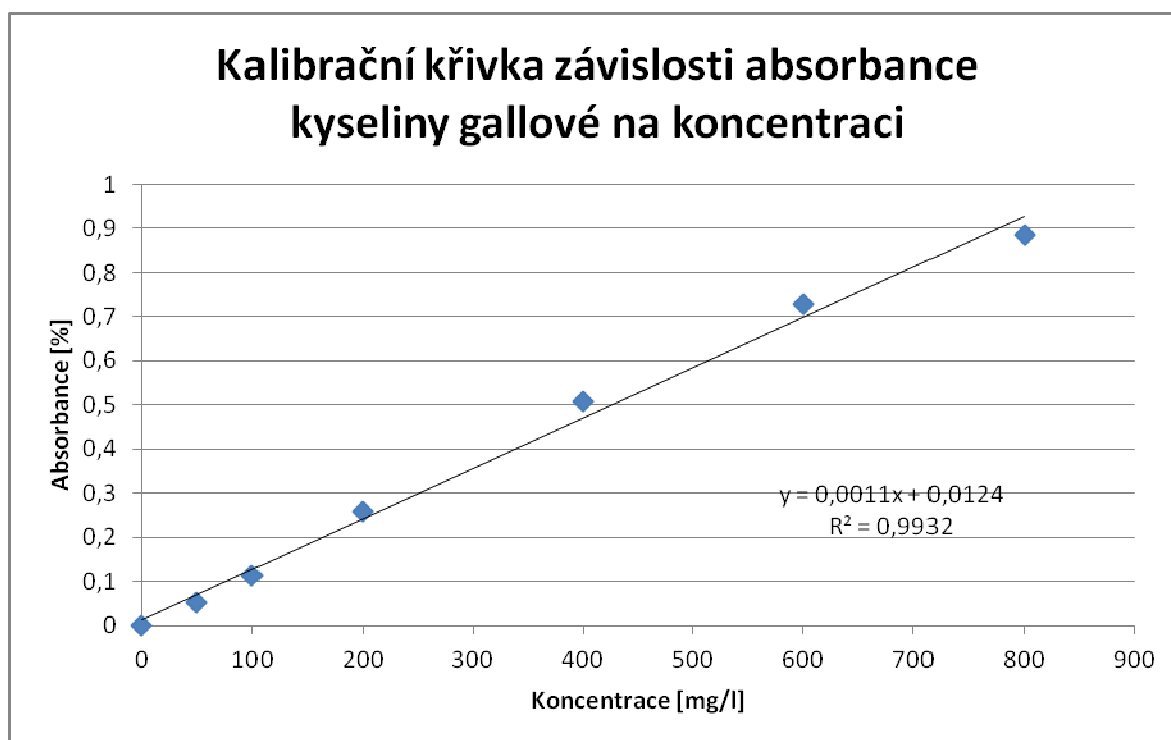
Příloha P I: Kalibrační křivka závislosti absorbance kyseliny gallové na koncentraci

Příloha P II: Kalibrační křivka závislosti absorbance kyseliny askorbové na koncentraci

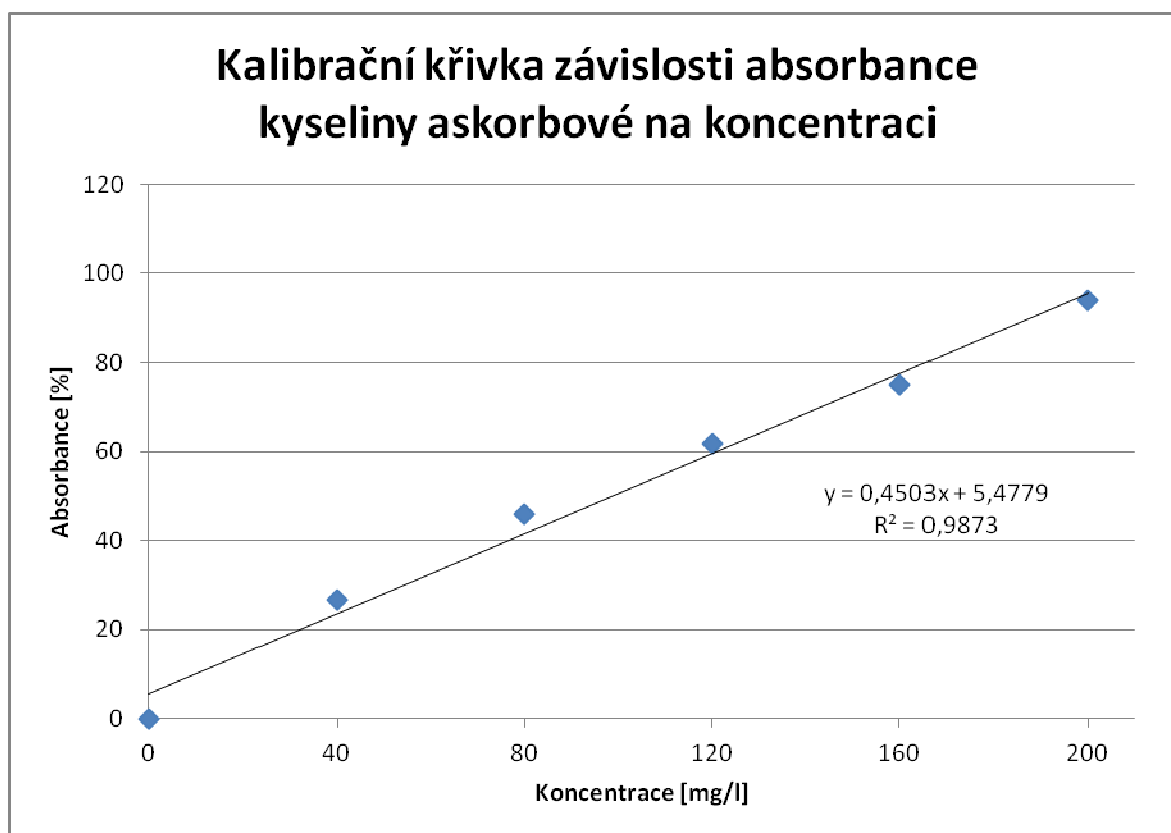
Příloha P III: Resumé – léčivé účinky kombuchového nápoje

Příloha P IV: Účinky jednotlivých biologicky aktivních látek na organismus

PŘÍLOHA P I: KALIBRAČNÍ KŘIVKA ZÁVISLOSTI ABSORBANCE Kyseliny gallové NA KONCENTRACI



**PŘÍLOHA P II: KALIBRAČNÍ KŘIVKA ZÁVISLOSTI ABSORBANCE
Kyseliny askorbové NA KONCENTRACI**



PŘÍLOHA P III: RESUMÉ – LÉČIVÉ ÚČINKY KOMBUCHOVÉHO NÁPOJE

Léčebné působení kombuchového nápoje je neobyčejně široké:

- Všeobecně posiluje imunitní systém,
- působí jako vynikající detoxikační prostředek,
- prohlubuje spánek,
- uklidňuje,
- zlepšuje činnost ledvin,
- má protialergické účinky,
- zlepšuje trávení,
- má protirevmatické účinky,
- příznivě ovlivňuje činnost srdce, celkový stav cév a funkci krevního oběhu,
- povzbuzuje mozkovou činnost,
- příznivě působí při kožních chorobách,
- má protisklerotické účinky,
- zlepšuje tvorbu krve a přispívá k normalizaci krevního obrazu,
- má prokazatelné antibiotické účinky proti bakteriím a virům,
- zlepšuje stav vaziv,
- je výživou chrupavčitých tkání a posiluje tvorbu nového kloubního mazu,
- zlepšuje stav sliznice a očního sklivce,
- zlepšuje látkovou výměnu,
- prohlubuje činnost žláz s vnitřní sekrecí, včetně žláz pohlavních,
- zlepšuje činnost základních smyslů,
- podporuje regeneraci nervové soustavy,
- zlepšuje stav a funkci prostaty,
- a mnoho dalších pozitivních účinků.

PŘÍLOHA P IV: ÚČINKY JEDNOTLIVÝCH BIOLOGICKÝCH AKTIVNÍCH LÁTEK NA ORGANISMUS

Kyseliny

- *Kyselina glukuronová* – Vylučování jedovatých (škodlivých) látek. Propojuje se s jedovatými látkami a cizími substancemi, které jsou v této vázané formě vylučovány močí skrze ledviny.
- *Kyselina mléčná* – Regenerace střevní flóry pomocí pravotočivé kyseliny mléčné. Podporuje růst potřebných bakterií v celém trávicím traktu a zlepšuje látkovou výměnu svalstva.
- *Ostatní kyseliny (kyselina octová, gluonová, uhličitá, usnisová, vinná, citrónová aj.)* – Různé funkce během procesů látkové výměny podporují resorpci (vstřebávání) aktivních látek z kombuchy ve střevech a částečně mají antibakteriální účinek (kyselina usnisová).

Enzymy

- *Invertáza, amyláza, kataláza, syřidlový enzym, sacharáza, proteolytické enzymy* – Důležité pro látkovou výměnu a trávení. Jako biokatalyzátory umožňují chemické reakce v těle.

Vitaminy

- *B₁ Thiamin* – Získání energie a látková výměna sacharidů, nervový systém, srdeční činnost, trávení, hojení ran.
- *B₂ riboflavin* – Přenos kyslíku, metabolismus bílkovin a energetická látková přeměna, podpora růstu kůže a vlasů.
- *B₃ Niacin (kyselina nikotinová)* – Buněčná látková výměna, získání energie, regulace tuků, bílkovin a uhlohydrátů, podpora trávení, účinky na pokožku a nervový systém.
- *B₆ Pyridoxin* – Zpracování bílkovin a nenasycených mastných kyselin, tvorba krve, hormonů, podpora imunitního systému, nervového systému.

- *B₁₂ Cobalamin* – Tvorba krve, podpora činnosti mozku a nervového systému, energetická látková výměna, aktivace činnosti svalstva, podpora při přísunu železa, regulace tuků.
- *Kyselina listová* – Dělení buněk a tvorba nových buněk, zrání červených krvinek, tvorba vaziva, podpora při produkci žaludečních šťáv, činnost jater, podpora činnosti mozku a nervového systému, těhotenství.
- *C kyselina askorbová* – Imunitní ochrana, zamezuje tvorbě nitrosaminu podporujícího vzniku rakoviny, dýchání buněk, tvorba vaziva, kostí a chrupavek, látková výměna vápníku, vstřebávání železa, hojení ran aj.
- *D Calciferol* – Tvorba kůže, kostí a chrupavek, látková přeměna vápníku, činnost svalů, tvorba hormonů, vylučování jedovatých látek z těla (olovo), srdeční činnost.
- *E Todofherol* – Kůže a kosti, cévní systém, činnost svalů, rozmnožovací orgány, oxidací zamezuje zničení nenasycených mastných kyselin během metabolismu tuků.
- *K Phyllochinon* – Kůže a kosti, srážení krve, funkce jater, ukládání sacharidů, vitalita.

Minerály

- *Železo* – Tvorba červených krvinek, doprava kyslíku do krve, tvorba enzymů.
- *Draslík* – Hospodaření s vodou, činnost ledvin, přenos impulsů nervového systému, činnost buněk a zásobování buněk, činnost srdce, činnost svalového systému zásobování mozku kyslíkem.
- *Vápník* – Zpevnění kostí a zubů, stabilizace buněčné membrány, nervový systém činnosti svalů, srážlivost krve, aktivace enzymů.
- *Kobalt* – Tvorba vitamínu B₁₂ (zrání červených krvinek), různé funkce během procesu látkové výměny (nelze uvést úplný výčet).
- *Měď* – Imunitní ochrana, tvorba krve, příjem železa, má protikřečové účinky, účastní se látkové výměny ve vazbách s jinými biolátkami.

- *Magnezium* – Aktivace enzymů při energetické látkové výměně, produkce hormonů, metabolismu sacharidů a bílkovin, růst kostí, činnost nervového systému, činnost svalstva, srdeční činnost.
- *Mangan* – Metabolismus bílkovin, sacharidů a tuků, produkce hormonů štítné žlázy, vstřebávání vitamínu B₁ a A, akomodace oka, aktivace enzymů.
- *Sodík* – Reguluje osmotický tlak tělesných tekutin a tím i napětí vaziva; spolu s draslíkem je velmi důležitý pro činnost svalstva a krevní tlak; kontroluje hodnotu pH v krvi.
- *Zinek* – Buněčná látková výměna, činnost mozku, nervový systém, aktivace enzymů, imunitní ochrana, tvorba krve, růst, rozmnožování, hojení ran.

Kvasinky

- *Cca 10 mil. buněk v 1 ml kombuchy* – Aktivace látkové výměny; obsahují lecitin a vitaminy skupiny B, podporují imunitní systém, ovlivňují hodnotu pH ve střevech.

Polysacharidy

- *Složité cukry* – Obranný systém organismu.

Kofein

- Povzbuzující složka (velký mozek, centrum dýchání, ledviny, krevní oběh).

Alkohol

- Povzbuzující složka, tonizuje činnost střev.