

Vliv vybraných faktorů na mikrobiotu kombuchy

Bc. Adéla Pančochová

Diplomová práce
2025



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav technologie potravin

Akademický rok: 2024/2025

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení:	Bc. Adéla Pančochová
Osobní číslo:	T23279
Studijní program:	N0721A210004 Technologie potravin
Forma studia:	Kombinovaná
Téma práce:	Vliv vybraných faktorů na mikrobiotu kombuchy

Zásady pro vypracování

I. Teoretická část:

Vypracujte literární rešerši zaměřenou na výskyt mikroorganismů v kombuše, případně podobných nápojích. Zaměřte se na symbiotickou mikrobiotu a faktory, které mohou ovlivňovat její růst.

II. Praktická část:

Z kombuchy izolujte mikroorganismy a dostupnými metodami je identifikujte.

Sledujte působení vybraných faktorů na mikroorganismy kombuchy.

Výsledky vyhodnotte, diskutujte a formulujte závěry práce.

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

Seznam doporučené literatury:

- [1] JAYABALAN, Rasu, Radomir V. MALBASA, Eva S. LONČAR, Jasmina S. VITAS a Muthuswamy SATHISHKUMAR, 2014. A Review on Kombucha Tea – Microbiology, Composition, Fermentation, Beneficial Effects, Toxicity, and Tea Fungus. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 13(4), 538-550. Dostupné z: doi:10.1111/1541-4337.12073
- [2] AUNG, Thinzar a Mi Jeong KIM, 2024. A comprehensive review on kombucha biofilms: A promising candidate for sustainable food product development. Trends in Food Science & Technology, 144. Dostupné z: doi:10.1016/j.tifs.2024.104325
- [3] CHONG, Ann Qi, Siew Wen LAU, Nyuk Ling CHIN, Rosnita A. TALIB a Roseliza Kadir BASHA, 2023. Fermented Beverage Benefits: A Comprehensive Review and Comparison of Kombucha and Kefir Microbiome. Microorganisms, 11(5). Dostupné z: doi:10.3390/microorganisms11051344
- [4] GUPTA, Kalpana, Yogita MALHOTRA a Priyanka CHOUDHARY, 2024. Natural Carbonated Drink (Kombucha Tea) and its Health Benefits: A Review. Journal of Natural Remedies, 2024-02-01, 255-269. Dostupné z: doi:10.18311/jnr/2024/34587
- [5] Elektronické zdroje dostupné z knihovny UTB ve Zlíně

Vedoucí diplomové práce: **prof. RNDr. Leona Buňková, Ph.D.**
Ústav inženýrství ochrany životního prostředí

Datum zadání diplomové práce: **1. ledna 2025**
Termín odevzdání diplomové práce: **9. května 2025**

L.S.

prof. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan

Ing. Robert Gál, Ph.D.
ředitel ústavu

Ve Zlíně dne 14. února 2025

PROHLÁŠENÍ AUTORA DIPLOMOVÉ PRÁCE

Beru na vědomí, že

- odevzdáním diplomové práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb., v platném znění bez ohledu na výsledek obhajoby;
- diplomová práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému a bude dostupná k nahlédnutí;
- jedno vyhotovení diplomové práce v listinné podobě bude ponecháno Univerzitě Tomáše Bati ve Zlíně k uložení;
- na moji diplomovou 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;
- podle § 60 odst. 1 autorského zákona má Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- podle § 60 odst. 2 a 3 mohu užít své dílo – diplomovou 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);
- pokud bylo k vypracování diplomové práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tj. k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové práce využít ke komerčním účelům;
- pokud je výstupem diplomové 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.

Prohlašuji, že

- jsem na diplomové práci pracoval(a) samostatně a použitou literaturu jsem řádně citoval(a); v případě publikace výsledků budu uveden(a) jako spoluautor;
- odevzdaná verze diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou obsahově totožné.

Ve Zlíně, dne

.....
podpis autora

ABSTRAKT

Diplomová práce se zabývá problematikou vlivu vybraných faktorů na mikrobiotu kombuchy, jako je například doba fermentace anebo druh použitého substrátu. V mém výzkumu jsem se zaměřila konkrétně na tři skupiny mikroorganismů – kvasinky, octové a mléčné bakterie. V první části je obecně charakterizována kombucha, její chemické složení a potenciální účinky na zdraví organismu. Dále je popsán technologický proces výroby kombuchového nápoje a jaké další fermentované nealkoholické nápoje existují. Třetí část je zaměřena na mikrobiologické složení kombuchy a jiných nealkoholických nápojů. Posledním tématem teoretické části je vliv různých faktorů na mikroorganismy v kombuše.

Při samotném experimentu bylo z izolovaných mikroorganismů vybráno 47 kmenů k identifikaci. V první řadě byla izolována DNA, která byla namnožena pomocí reakce PCR touch-down a před sekvenací ještě purifikována. Výsledné sekvence byly srovnávány s databází NCBI (The National Center for Biotechnology Information; National Library of Medicine) v programu nBLAST. 29 kmenů bylo identifikováno jako kvasinky a 15 kmenů mělo shodu se sekvencí některých druhů bakterií. Většina bakterií patřila do čeledi *Acetobacteraceae*. Mezi identifikovanými vzorky se nevyskytoval ani jeden ze skupiny mléčných bakterií. Nejčastěji identifikovanými izoláty kvasinek z analyzovaných kombuch byly rody *Brettanomyces* a *Zygosaccharomyces*.

Klíčová slova: kombucha, fermentace, identifikace, kvasinky, octové bakterie

ABSTRACT

This diploma thesis deals with the issue of selected factors on the microbiota of kombucha, such as fermentation time and the type of substrate. The research specifically focused on three groups of microorganisms – yeasts, acetic acid bacteria, and lactic acid bacteria. The first part provides a general overview of kombucha, its chemical composition, and its potential health effects. It also describes the technological process of kombucha beverage production and presents other types of fermented non-alcoholic drinks. The third section focuses on the microbiological composition of kombucha and other non-alcoholic beverages. The final part of the theoretical section addresses the impact of various factors on the microorganisms present in kombucha.

In the experimental part, 47 strains of isolated microorganisms were selected for identification. DNA was first extracted and amplified using touch-down PCR and subsequently purified before sequencing. The resulting sequences were compared with the NCBI (The National Center for Biotechnology Information; National Library of Medicine) database using the nBLAST program. 29 strains were identified as yeasts, and 15 matched sequences of various bacterial species. Most of the bacteria belonged to the *Acetobacteraceae* family. No strains from the lactic acid bacteria group were identified among the samples. *Brettanomyces* and *Zygosaccharomyces* were the most abundant yeast genera.

Keywords: kombucha, fermentation, identification, yeasts, acetic bacteria

Tímto bych ráda poděkovala všem, kteří mě během zpracování diplomové práce podporovali a pomáhali mi. V první řadě děkuji vedoucí mé práce, prof. RNDr. Leoně Buňkové, PhD., za odborné vedení, užitečné rady a mimo jiné i trpělivost a čas, který mi věnovala. Dále chci poděkovat laborantkám z Ústavu inženýrství ochrany životního prostředí za ochotu a praktickou pomoc během laboratorního výzkumu mé práce.

Velké díky patří také mému manželovi a celé rodině za jejich neustálou podporu, pochopení a motivaci po celou dobu magisterského studia. V neposlední řadě děkuji i svým přátelům za oporu a povzbuzení v tomto náročném období.

OBSAH

ÚVOD.....	13
I TEORETICKÁ ČÁST	14
1 KOMBUCHA.....	15
1.1 PŮVOD.....	15
1.2 CHEMICKÉ SLOŽENÍ KOMBUCHOVÉHO ČAJE	16
1.2.1 Vitaminy.....	16
1.2.2 Minerální látky	17
1.2.3 Polyfenoly	17
1.2.4 Organické kyseliny.....	18
1.2.5 Aminokyseliny a biogenní aminy	19
1.2.6 Kofein.....	19
1.2.7 Etanol	20
1.3 ÚČINKY NA ZDRAVÍ ORGANIZMU.....	20
1.3.1 Potenciální zdravotní přínosy kombuchy	21
1.3.2 Negativní účinky (potenciální rizika spojená s konzumací kombuchy)	23
2 TECHNOLOGICKÝ PROCES VÝROBY KOMBUCHY	24
2.1 SUROVINY PRO VÝROBU KOMBUCHY	24
2.1.1 Tradiční čajové substráty	24
2.1.2 Alternativní substráty	25
2.2 POSTUP VÝROBY KOMBUCHY	27
2.2.1 Příprava substrátu pro fermentaci	27
2.2.2 Inokulace mikrobiální kulturou – přidání SCOBY	27
2.2.3 Fermentace	27
2.2.4 Analýza rizik při výrobě kombuchy.....	29
2.3 JINÉ NEALKOHOLICKÉ KVAŠENÉ NÁPOJE	30
2.3.1 Vodní kefír	30
2.3.2 Ginger beer („zázvorové pivo“)	31
2.3.3 Rejuvelac.....	31
2.3.4 Boza.....	31
2.3.5 Jun	32
2.3.6 Koji amazake.....	32
2.3.7 Tepache	33
3 VÝSKYT MIKROORGANISMŮ V NEALKOHOLICKÝCH FERMENTOVANÝCH NÁPOJÍCH	34
3.1 BIOFILM KOMBUCHY – SCOBY	34
3.1.1 Mechanismus tvorby biofilmu	34
3.2 MIKROBIOTA KOMBUCHY (KOMBUCHOVÁ KULTURA)	36
3.2.1 Bakterie	36
3.2.2 Kvasinky	38

3.3	MIKROBIOTA JINÝCH KVAŠENÝCH NEALKOHOLICKÝCH NÁPOJŮ	38
4	FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ MIKROBIOTU KOMBUCHY.....	40
4.1	FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ MIKROBIOTU A FERMENTACI KOMBUCHY	40
4.1.1	Doba fermentace a její vliv na výsledný nápoj	40
4.1.2	Vliv teploty na fermentaci a mikrobiální diverzitu	40
4.1.3	Vliv pH na fermentaci	41
4.1.4	Vliv použitého substrátu na mikrobiotu nápoje	41
4.1.5	Vliv dalších podmínek na fermentaci a mikrobiotu kombuchy	41
II	PRAKTICKÁ ČÁST	43
5	CÍL PRÁCE	44
6	MATERIÁL	45
6.1	PRACOVNÍ POMŮCKY A PŘÍSTROJE	45
6.2	KULTIVAČNÍ PŮDY.....	45
6.2.1	Příprava vybraných živných médií	45
6.3	ANALYZOVANÉ VZORKY KOMBUCHY A SUROVINY PRO JEJICH PŘÍPRAVU	46
7	METODIKA.....	48
7.1	PŘÍPRAVA NÁPOJE KOMBUCHA	48
7.2	IZOLACE VYBRANÝCH MIKROORGANIZMŮ Z KOMBUCHY	49
7.3	IDENTIFIKACE VYBRANÝCH KOLONIÍ	50
7.3.1	Izolace DNA.....	50
7.3.2	PCR reakce	51
7.3.3	Agarózová gelová elektroforéza.....	54
7.3.4	Purifikace DNA	55
8	VÝSLEDKY A DISKUZE	57
8.1	IZOLACE MIKROORGANIZMŮ Z KOMBUCH	57
8.1.1	Hodnocení nárůstu mikroorganismů kombuch z černého čaje	58
8.1.2	Hodnocení nárůstu mikroorganismů kombuch ze zeleného čaje	62
8.1.3	Výsledky izolace DNA.....	71
8.1.4	Vyhodnocení PCR reakce a elektroforézy	72
8.1.5	Identifikované mikroorganismy	74
	ZÁVĚR.....	87
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	89
	SEZNAM OBRÁZKŮ	99
	SEZNAM TABULEK.....	101
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	102

ÚVOD

Kombucha je fermentovaný nealkoholický nápoj původem z Číny. Nápoj se vyrábí ze slazeného čaje (nejčastěji černého a zeleného). Tvorby fermentovaného čaje se účastní společenství bakterií a kvasinek (SCOBY). Kombucha se stala populární díky potenciálním zdravotním účinkům. Pravděpodobně přispívá ke zdraví gastrointestinálního traktu, zmírnění bolesti hlavy a snížení hladiny cholesterolu. Mimo jiné působí jako antioxidant díky přítomnosti polyfenolických látek. Nicméně tyto pozitivní účinky nejsou zatím dostatečně vědecky podloženy.

Hlavní problematikou této práce je zkoumání vlivu vybraných faktorů (doba fermentace, druh substrátu) na mikrobiotu kombuchy, se zaměřením na octové bakterie a kvasinky. Faktory ovlivňující mikrobiotu výsledného nápoje jsou variabilní. Během fermentačního procesu se mění totiž chemické složení, které je závislé i na použitém substrátu, na jeho množství a podmínkách vnějšího prostředí (př. teplota okolí). S prodlužující se dobou fermentace se zvyšuje produkce organických kyselin, především kyseliny octové, a tím se snižuje pH nápoje. Pro většinu mikroorganismů je kyselé prostředí limitující a nejsou schopny růstu. Mezi běžnou kombuchovou kulturu řadíme kvasinky rodu *Brettanomyces*, *Zygosaccharomyces*, *Torulaspora* a bakterie *Acetobacter* sp., *Komagataeibacter* sp. a *Gluconacetobacter* sp.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 KOMBUCHA

Fermentované potraviny a nápoje představují vhodný modelový systém pro studium mikrobiálních společenství a jejich vzájemných interakcí. Kombucha, často označovaná také jako "kombuchový čaj" se v poslední době stává stále více zkoumaným příkladem fermentovaného nápoje vznikajícího v důsledku spolupráce komplexních mikrobiálních komunit. [1]

Kombucha si svoji popularitu získala svými pravděpodobnými pozitivními účinky. Prokázalo se například, že je účinná při léčbě žaludečních vředů, snižuje vysokou hladinu cholesterolu anebo slouží jako prevence proti rakovině. Navíc u tohoto nápoje je známo, že má antioxidační vlastnosti. [2] Jedná se o mírně kyselý, šumivý nealkoholický nápoj, avšak množství alkoholu se může lišit v závislosti na typu fermentačního procesu a délky jeho trvání. Tvorby kombuchového čaje se účastní jak kmeny bakterií, tak i kvasinek, které pracují v symbióze. [3]

Kombucha je známá i pod dalšími názvy, např. čajová houba se jí říká v Indonésii a Japonsku, Kargasok čaj v severní části Kamerunu anebo Mandžuská houba v Číně. [3]

1.1 Původ

První zmínky o tomto nápoji sahají až do doby kolem roku 200 př.n.l. Poprvé byl nápoj užíván v Asii, konkrétně v severovýchodní Číně (Mandžusko), kdy byl vyráběn pro tehdejšího císaře. Věřil, že pití čaje ho udrží déle mladého. Nápoji se začalo říkat "elixír života", nebo "čaj nesmrtelnosti". Čaj byl také oblíbený mezi bojovníky (samuraji), kteří ho pili kvůli zvýšení energie a síly před bitvami. [2] Původ názvu je také spojován s korejským doktorem Kombu. Měl za úkol přinést tento zázračný nápoj japonskému císaři. [4]

Během 1. světové války ji ruští rolníci používali k pomoci poraněným vojákům. Po válce tento "zázračný" nápoj údajně používal německý vědec k léčbě pacientů s rakovinou. Avšak během 2. světové války značně poklesla výroba, a tedy i užívání kombuchového čaje kvůli nižší dostupnosti surovin. [4]

O několik let později švýcarští vědci zjistili, že konzumace kombuchy je prospěšná pro podporu růstu potřebných bakterií ve střevech. Ačkoli se jedná o nápoj s dlouhou historií, v poslední době se stává stále populárnějším, začal se šířit po celém světě a na trh se dokonce dostává v různých příchutích. [2] [5]

1.2 Chemické složení kombuchového čaje

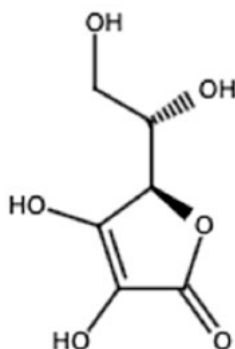
Kombucha je fermentovaný nápoj, který vzniká fermentací sladkého čaje za přítomnosti kvasinek a bakterií, které spolupracují na přeměnách cukrů a dalších složek. Výsledkem je nápoj s velmi komplexním chemickým složením, jehož složky se vyvíjejí a mění v závislosti na celé řadě proměnných faktorů, jako jsou druh a koncentrace vstupních surovin, zdroj inokula, doba fermentace, teplota a rovněž mikrobiální společenství.

Chemické složení kombuchy zahrnuje širokou škálu bioaktivních látek, jejichž koncentrace je přímo ovlivněna těmito faktory. Mezi hlavní složky patří vitaminy, minerální látky, polyfenoly, organické kyseliny, aminokyseliny a biogenní aminy, které mají významné biologické účinky. Kromě toho kombucha obsahuje i kofein a etanol. Porozumění těmto složkám je klíčové pro pochopení toho, jak kombucha ovlivňuje lidské zdraví, a také pro optimalizaci technologických postupů při její výrobě s cílem dosáhnout vyšší nutriční hodnoty a konzistence konečného produktu. [3] [6]

1.2.1 Vitaminy

Vitaminy jsou pro správné fungování těla nezbytné, jelikož se podílejí na celé řadě biochemických a fyziologických procesů. Lidský organizmus si je však nedokáže sám vytvářet, a proto je nutné je získávat ze stravy. [7]

V kombuše byly detekovány ve vodě rozpustné vitaminy, zejména vitaminy skupiny B (B1, B2, B6, B9 a B12) a vitamin C, který je zobrazen na Obrázek 1 (kyselina askorbová). Tyto vitaminy hrají klíčovou roli v imunitním systému a energetickém metabolismu organismu. Vitaminy přispívají také k celkové nutriční hodnotě nápoje a k jeho antioxidační ochraně. [3] [6]



Obrázek 1: Vitamin C – chemický vzorec [5]

1.2.2 Minerální látky

Jedná se o anorganické živiny, které jsou sice potřebné pouze ve stopovém množství, ale pro správné fungování organismu jsou naprosto nezbytné. [5]

Minerální složení kombuchy je rovněž velmi rozmanité. Základním zdrojem těchto látek jsou čajové lístky, ať již černého či zeleného čaje, jež obsahují esenciální kationty jako draslík (K), hořčík (Mg), mangan (Mn), kobalt (Co), měď (Cu) a železo (Fe), a také anionty, například fluoridů (F). Tyto látky se uvolňují při přípravě čaje, a pak během fermentačního procesu. Mají významný vliv na metabolické funkce v lidském těle. [3]

Fermentace má vliv na mnohé složky kombuchy, např. na pokles cukru, vznik etanolu a kyseliny octové. Nicméně o tom, jak se během fermentace mění obsah iontů – konkrétně třeba fluoridů – se zatím ví málo. Během výzkumu z roku 2021 [8] se zaměřili právě na sledování fluoridu během fermentace. Analyzovány byly čtyři různé druhy čajových nálevů – bílý, červený, zelený a černý. Ukázalo se, že nejnižší obsah fluoridu měl nápoj z bílého čaje, zatímco nejvyšší byl zaznamenán u kombuchy ze zeleného čaje.

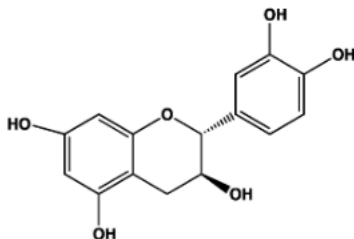
Je však třeba upozornit, že kromě těchto prospěšných prvků může být v kombuše přítomno i malé množství toxických kovů. Je nutné kontrolovat kvalitu surovin a výrobní podmínky, aby byla zachována kvalita i bezpečnost finálního produktu. [3]

1.2.3 Polyfenoly

Polyfenoly představují klíčovou skupinu bioaktivních sloučenin v čaji, které zásadně ovlivňují jeho organoleptické vlastnosti a přispívají ke zdravotním účinkům nápoje. V čerstvých čajových listech se tyto látky objevují zejména jako flavonoidy – například flavanoly, flavanol-galáty a flavanol-glykosidy. Díky své schopnosti neutralizovat volné radikály a regulovat buněčné enzymy se polyfenoly řadí mezi klíčové látky, které mohou pomoci při prevenci onemocnění spojených s oxidačním stresem, například rakoviny, kardiovaskulárních chorob nebo neurologických poruch. [3]

Během fermentace čaje, zejména u výroby černého čaje, dochází k oxidaci základních zástupců polyfenolů – katechinů (Obrázek 2). Při oxidaci se tvoří komplexnější sloučeniny, například theaflavinů, thearubiginů a dalších derivátů. Tento transformační proces způsobuje pokles původního obsahu katechinů až o 85 %. Výsledkem je tmavší barva finálního nápoje a upravený chuťový profil, kdy se výrazně snižuje hořkost.

V zeleném čaji zůstávají katechiny, jako je α -epigalokatechin-3-galát, α -epikatechin, α -epigalokatechin, α -epikatechin-3-galát, α -galokatechin a β -katechin, zachovány ve vysokých koncentracích, což přispívá k jejich hořké a svíravé chuti. [9]



Obrázek 2: Katechin – chemický vzorec [10]

Polyfenoly také ovlivňují aktivitu buněčných receptorů a enzymů, čímž posilují obranné mechanismy organismu proti škodlivým účinkům reaktivních kyslíkových radikálů. Jejich přítomnost v čaji ovlivňuje nejen organoleptické vlastnosti nápoje, ale také výrazně přispívá k prevenci a zmírnění patologických procesů spojených s oxidačním stresem. Tato mnohostranná funkce polyfenolů zdůrazňuje jejich zásadní význam v chemickém složení nápoje a poukazuje na jejich široký potenciál nejen v potravinářství, ale i v prevenci chronických onemocnění. [3]

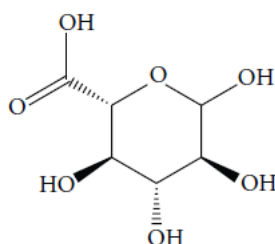
1.2.4 Organické kyseliny

Během fermentace kombuchy vzniká řada organických kyselin, mezi nejdůležitější patří octová, glukuronová, glukonová, mléčná, jablečná, citronová, vinná a listová kyselina. [3]

Octová kyselina dodává kombuše charakteristickou kyselou vůni a chuť připomínající ocet. Její koncentrace se během fermentace postupně zvyšuje, přičemž po 30 dnech dosahuje maxima 11 g/l. Následně klesá na 8 g/l po 60 dnech, protože bakterie začínají octovou kyselinu využívat jako zdroj uhlíku, jakmile se vyčerpají zásoby cukru a etanolu. [2] [5]

Obsah kyseliny mléčné je závislý na druhu čaje. Více se vyskytuje v nápojích připravených ze zeleného čaje než z černého. [2]

Glukuronová kyselina (Obrázek 3) vzniká oxidací glukózy během fermentace a hraje klíčovou roli v detoxikaci organismu. Váže se na toxické látky v játrech a usnadňuje jejich vylučování ledvinami. Kromě toho je prekurzorem při biosyntéze vitamínu C. [2]



Obrázek 3: Glukuronová kyselina – chemický vzorec [11]

1.2.5 Aminokyseliny a biogenní aminy

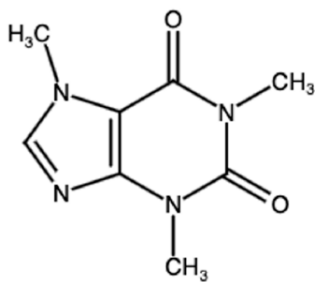
Kombucha obsahuje několik aminokyselin, které jsou důležité pro lidský organizmus. Během fermentace může docházet k jejich přeměně na biogenní aminy prostřednictvím mikrobiální dekarboxylace. Některé z těchto aminů jsou nezbytné pro buněčný metabolismus, zatímco jiné mohou být v nadměrném množství škodlivé. [3] [6]

V průběhu fermentace dochází také ke změnám v obsahu bílkovin a enzymů v kombuše. Bylo zjištěno, že koncentrace proteinů se během prvních 12 dnů fermentace postupně zvyšuje a pohybuje se v rozmezí 0,1 až 3,0 mg/ml. Po tomto období dochází k jejich poklesu, což je pravděpodobně způsobeno snižováním extracelulárních proteinů mikroorganismy. [6]

Přítomnost aminokyselin a biogenních aminů v kombuše je důsledkem metabolických procesů probíhajících během fermentace. Tento faktor podtrhuje význam řízení fermentačního procesu, aby byla zachována optimální kvalita finálního nápoje. [3] [6]

1.2.6 Kofein

Kofein je přírodní alkaloid ze skupiny xanthinů, který se vyskytuje v rostlinách jako jsou čajovník, kávovník nebo kakaovník. V rostlinách má kofein obrannou funkci – působí jako pesticid proti škůdcům. Kofein je známý svými povzbuzující účinky na centrální nervovou soustavu primátů a přispívá ke zvýšení energie organismu. [12] V čajových listech tvoří kofein přibližně 3 % jejich hmotnosti, přičemž konkrétní množství závisí na způsobu pěstování a zpracování. [9] Chemický vzorec kofeinu je znázorněn na Obrázek 4.



Obrázek 4: Kofein – chemický vzorec [5]

Při výrobě kombuchy hraje kofein specifickou roli – slouží jako zdroj dusíku, který je nezbytný pro metabolické procesy a buněčnou obnovu mikroorganismů zúčastňujících se fermentace – kvasinek a bakterií. Kromě toho jim kofein poskytuje energetickou podporu, díky níž mohou efektivně fermentovat čajový nálev. [12]

1.2.7 Etanol

Etanol je vedlejším produktem fermentace kvasinek a vyskytuje se tedy i v kombuše. Tradičně vyráběná kombucha obsahuje malé množství alkoholu. Běžně se pohybuje mezi 0,7 a 1,3 % a jeho koncentrace v průběhu fermentace postupně narůstá. Nejvyšší obsah alkoholu je kolem 20. dne fermentace a poté následuje pozvolný pokles. [5]

1.3 Účinky na zdraví organismu

Konzumenti kombuchy z celého světa tvrdí, že tento čaj má mnoho pozitivních účinků na zdraví člověka. Mezi nejčastější potenciální účinky patří:

- detoxikace krve,
- snížení hladiny cholesterolu i krevního tlaku,
- redukce zánětů, zmírnění příznaků revmatických onemocnění,
- podpora funkce jater, prevence a léčba infekcí močových cest,
- redukce hmotnosti, regulace chuti k jídlu,
- prevence proti *diabetes mellitus* 2. typu,
- ochrana proti rakovině,
- prevence vypadávání vlasů,

- zmírnění bolestí hlavy,
- zlepšení zraku,
- snížení stresu a nespavosti,
- působení proti stárnutí organismu a celková podpora metabolismu. [6]

Předpokládá se, že příznivé účinky tohoto nápoje mohou souviset s přítomností probiotických kultur a bioaktivních látek, jako jsou polyfenoly, aminokyseliny, organické kyseliny a vitaminy ve vodě rozpustné. [13]

Nicméně většina těchto účinků byla zkoumána jen experimentálně na modelech. Výše uvedený seznam účinků vychází ze zkušeností uživatelů a z neoficiálních studií. Vědecké důkazy ze studií na lidech zatím nejsou dostatečné nebo potvrzují tyto přínosy jen zřídka a nejsou plně prokazatelné. [6]

Vědci prokázali, že kombucha má především tyto biologické aktivity: antimikrobiální, antioxidační, probiotické, protizánětlivé, a dokonce hepatoprotektivní účinky. [6]

K ověření zdravotních benefitů kombuchy bylo provedeno několik studií *in vivo* (na zvířatech) a *in vitro*. [14] Výsledky těchto výzkumů ukazují široké spektrum potenciálních účinků na zdraví, včetně gastroprotektivních, antioxidačních, protinádorových a metabolických účinků. Například gastroprotektivní účinky byly sledovány na myších modelech se žaludečními vředy. Během studie [15] byla kombucha připravena z borůvkového nápoje. Výsledný fermentovaný nápoj vykazoval zvýšený obsah fenolických látek, tríslovin a antokyanů. Navzdory tomu však měl nižší antioxidační aktivitu. U části zvířat se objevilo poškození žaludeční sliznice, a proto autoři studie doporučují zkrátit dobu fermentace, což by mohlo přispět ke zvýšení antioxidačního potenciálu a snížení kyselosti nápoje. [16]

1.3.1 Potenciální zdravotní přínosy kombuchy

Jak bylo zmíněno v textu předchozí kapitoly, mezi základní potenciální pozitivní účinky patří antimikrobiální aktivita. Kombucha má antimikrobiální účinky hlavně díky vyššímu množství organických kyselin, jako je například kyselina octová. [11] Kombucha obsahuje kromě kyseliny octové i polyfenoly, které posilují její antibakteriální účinky. [17] Například v zeleném čaji zvláště dominuje epigalokatechingalát, který kromě prokázaných antibakteriálních účinků přispívá i ke snížení hladiny LDL (low density lipoprotein neboli v překladu lipoprotein s nízkou hustotou cholesterolu) a podporuje posílení imunitního

systému. [12] Avšak antimikrobiální aktivita kombuchy je dána především díky samotné fermentaci. [18] Některé studie prokázaly, že antimikrobiální vlastnosti jsou způsobené také výskytem bakterií mléčného kvašení a jejich biologicky aktivními složkami, jako jsou bakteriociny. [19]

Vědci zkoumali inhibiční vlastnosti kombuchového čaje a byla zjištěna účinnost na mnohé patogenní mikroorganismy. [6] Tyto antimikrobiální vlastnosti ale nijak neovlivňují probiotické mikroorganismy v kombuše. Podle některých studií má tento nápoj antimikrobiální vliv například na *Escherichia coli* a *Klebsiella pneumoniae*, které patří mezi gramnegativní bakterie ve tvaru tyčinek. Kombucha působí také proti růstu mnohých grampozitivních bakterií, mezi které řadíme koky *Staphylococcus aureus* nebo tyčinky *Listeria monocytogenes*. [20]

Pro stanovení antimikrobiální aktivity se používají například difuzní testy s disky. Antimikrobiální vlastnosti se zjišťují také pomocí minimální inhibiční koncentrace (MIC), která viditelně inhibuje růst mikroorganismu. Testy na MIC mají výhody v tom, že poskytují přehled o tom, jak daná látka ovlivňuje růst bakterií v závislosti na čase. [14] [21]

Antioxidační aktivita kombuchy je způsobena především přítomností polyfenolů a katechinů z čaje, kyseliny askorbové a kyseliny D-glukuronové (DSL). [6] Polyfenoly tvoří téměř 15-35 % sušiny čajových listů v závislosti na typu čaje přičemž mezi nejvýznamnější patří epigalokatechin a epikatechin, jak už bylo zmíněno v části o polyfenolech 1.2.3. [22] Kombucha vykazuje silné antioxidační vlastnosti, projevující se snížením oxidace tuků a zabraňuje fragmentaci DNA. [23] Navíc odborníci zjistili, že antioxidační aktivita kombuchy převyšuje účinky vitaminů C a E, což naznačuje její potenciál při léčbě chronických onemocnění spojených s oxidačním stresem, například v prevenci poškození buněk, zánětlivých stavů, selhání imunitního systému či vzniku nádorových buněk. [22]

Kombucha byla zkoumána pro své možné protirakovinné účinky spojené s obsahem zmíněných polyfenolů a jejich degradačních produktů vznikajících při fermentaci. Tyto látky mohou působit jako chemopreventivní sloučeniny – ochrana organismu před nádorovými buňkami. Už v roce 1951 vědecké studie v Rusku naznačily, že čaj má ochranný vliv proti rakovině. [2] [3] Některé výzkumy také ukázaly, že kombucha připravená z černého čaje a saturejky má silnější antiproliferativní účinky než kombucha vyrobená pouze z černého čaje. Tento efekt souvisí s blokováním vzniku mutací, se zpomalením růstu nádorových buněk a také potlačením šíření metastáz. [24]

Na laboratorních zvířatech bylo také prokázáno, že kombucha má i hepatoprotektivní účinky. Tento účinek je přisuzován D-glukaro-1,4-laktonu, produkovanému bakteriemi *Gluconacetobacter* sp., který podporuje detoxikační procesy v játrech. [25]

Kombucha je považována za probiotický nápoj díky vyššímu obsahu živých a aktivních mikroorganismů – probiotickým bakteriím. Probiotika příznivě ovlivňují střevní mikrobiotu, podporují imunitní systém, syntézu vitaminů a vstřebávání minerálů. Pravidelná konzumace nápojů s probiotickými účinky může přispět ke snížení celkového cholesterolu a sloužit jako prevence střevních potíží. [5]

Fermentovaný nápoj kombucha vykazuje také protizánětlivé a imunomodulační účinky, které jsou spojovány s obsahem polyfenolů, organických kyselin a antioxidantů. Tyto látky přispívají ke snížení hladin zánětlivých cytokinů, jako jsou TNF- α a IL-6, jejichž nadměrná aktivita obvykle souvisí s chronickými zánětlivými onemocněními. [18]

Některé výzkumy ukazují [26], že katechin obsažený v kombuše může potlačit aktivaci makrofágů a tím snížit uvolnění TNF- α až o desítky procent podle dávky. Kombucha tak může přispívat ke zmírnění zánětlivých stavů, jako je např. artritida. Kyselina glukuronová může navíc přispět k výživě kloubní chrupavky prostřednictvím přeměny na glukosamin a chondroitin sulfát. [18]

1.3.2 Negativní účinky (potenciální rizika spojená s konzumací kombuchy)

Kombucha jakožto fermentovaný nápoj může přinášet řadu zdravotních benefitů, avšak při jeho nadměrné konzumaci anebo nevhodné přípravě může způsobit nežádoucí účinky. Mezi nepříznivé reakce patří závratě, nevolnost, bolesti hlavy a ve vážnějších případech dokonce jaterní potíže a laktátová acidóza. Domácí výroba kombuchy navíc s sebou nese riziko kontaminace plísněmi nebo patogenními mikroorganismy, které mohou mít toxické a karcinogenní účinky. Konzumace příliš kyselého nápoje po dlouhém fermentačním procesu může více zatěžovat organismus a je nevhodná pro těhotné a kojící ženy jak kvůli obsahu alkoholu, tak i potenciálnímu vlivu na srážlivost krve. [2] [3]

2 TECHNOLOGICKÝ PROCES VÝROBY KOMBUCHY

Tento nápoj se tradičně vyrábí fermentací, tj. kvašením slazeného čaje. Nejčastěji se k přípravě kombuchy používá černý a zelený čaj, ale mohou být použity i jiné typy čajů. K fermentaci čaje je zapotřebí tzv. čajová houba. Jedná se o celulózový biofilm nazývaný SCOBY (Symbiotic Culture Of Bacteria and Yeast), neboť ho tvoří symbiotická kolonie bakterií a kvasinek. [2]

2.1 Suroviny pro výrobu kombuchy

2.1.1 Tradiční čajové substráty

Kombucha se tradičně vyrábí z extraktu černého nebo zeleného čaje, které pocházejí ze stejné rostliny *Camellia sinensis*, patřící do čeledi *Theaceae*. Tato rostlina je původem z jihovýchodní Asie a její listy se používají k výrobě různých druhů čaje v závislosti na způsobu zpracování. [27] Poskytuje nezbytné živiny pro mikrobiální kultury, především dusík, minerální látky a polyfenoly. Správné slazení čajového nálevu je základem pro podporu fermentačního procesu. Optimální koncentrace sacharózy se pohybuje mezi 5-8 %. [6]

Zelený čaj pochází z čerstvě sklizených listů rostliny *C. sinensis* a proces výroby nezahrnuje fermentaci. To umožňuje zachování vyššího množství bioaktivních látek, například polyfenolů. [28] Klíčovým krokem je inaktivace enzymu polyfenoloxidázy pomocí zahřátí nebo napaření čajových lístků, a tím zůstávají katechiny nezoxidované. [29] V porovnání s černým čajem má zelený čaj jemnější chuť a světlejší zelenou barvu. Pro jeho přípravu se používá nižší teplota louhování (66-85 °C), aby se zmírnilo vylouhování tříslovin, díky kterým by nápoj mohl zhořknout. [12]

Černý čaj je nejrozšířenější a nejvíce oblíbený na světě. Mezi nejuznávanější producenty patří zejména Srí Lanka a Indie. [30] Získává se z listů, které prochází intenzivní fermentací a oxidací. Během fermentace se přeměňují katechiny na theaflaviny a thearubiginy, které jsou jedny z hlavních polyfenolových složek černého čaje. [28] Tradiční recepty na kombuchu často doporučují právě černý čaj, jelikož jeho úplná oxidace posiluje intenzitu chuti a celkovou sílu nápoje. [12]

Dalším typem je oolong čaj. Název oolong pochází z čínského výrazu znamenajícího "černý drak" [4]. Stejně jako většina tradičních čajů má i oolong své kořeny v Číně, která patří mezi jeho hlavní producenty společně s Tchaj-wanem. Oolong čaj je částečně

fermentovaný a jeho zpracování zahrnuje sušení na slunci a následnou oxidaci před tvarováním listů. Stupeň oxidace se u něj může pohybovat v širokém rozmezí od 10 % do 80 %, což udává ve výsledném nápoji širokou škálu chutí – od jemných, sladkých a ovocných tónů až po intenzivní, tmavé a kouřové aroma. [5] [27]

Kromě výše uvedených je možné pro výrobu kombuchy použít bílý čaj. [12] Bílý čaj byl původně pěstován výhradně v Číně. Dnes se pěstuje i v dalších zemích, zejména v Indii a na Srí Lance. V Číně se bílý čaj rozlišuje podle odrůdy, ze které pochází – konkrétně *C. sinensis* var. *bhenghe bai hao* a *C. sinensis* var. *fudin bai hao*. [29] Tento druh čaje se sklízí ve velmi rané fázi, kdy mají lístky a pupeny ještě velmi jemné bílé chloupky, podle kterých byl i pojmenován. Na rozdíl od ostatních čajů, které procházejí různým stupněm oxidace, se listy bílého čaje zpracovávají velmi šetrně – prochází pouze sušením. Díky tomu si čaj zachovává mírnější chuť a také vysoké množství antioxidantů, neboť je bohatý na obsah katechinů. [12]

2.1.2 Alternativní substráty

Kromě tradičního čaje se však ve výzkumech prokázalo, že kombucha může být fermentována i na alternativních substrátech, jako jsou bylinné nálevy, ovocné šťávy, mléčné produkty, nebo dokonce i vedlejší průmyslové produkty např. melasa. [6] [27] Použití těchto alternativních substrátů může vést ke vzniku nových fermentačních produktů s lepšími organoleptickými vlastnostmi a zdravotními účinky. [31]

Bylinné nálevy jsou tradičně konzumovány pro své zdravotní přínosy a některé studie ukázaly, že jejich bioaktivní účinnost může být fermentací kombuchy ještě zesílena. [32] Při experimentu z roku 2013 [33] bylo dokázáno, že fermentace kombuchy může být úspěšná na čajovém nálevu z máty peprné a tymiánu. Doba fermentace byla dokonce kratší než na tradičních substrátech.

Jedním z úspěšných substrátů pro fermentaci kombuchy byl extrakt z hlíz topinamburu (Jeruzalémského artyčoku). Tento substrát je zajímavý především z důvodu nižšího obsahu glukózu a fruktózy. Naopak má vyšší množství inulo-oligosacharidů, které mají funkci jako vláknina a podporují růst bifidobakterií ve střevní mikrobiotě. Výzkumy také naznačují, že fermentace na substrátu z topinamburu zvyšuje obsah kyseliny L-mléčné, L-askorbové a celkových organických kyselin, což zlepšuje nutriční hodnotu výsledného nápoje. [6]

Další alternativou je využití melasy, která je vedlejším produktem hlavně při zpracování cukrové řepy. Je nutričně bohatá na různé minerální látky, vitaminy i organické

sloučeniny, které podporují fermentační proces. Studie z roku 2008 [34] prokázala, že melasa může být použita jako levnější zdroj uhlíku pro fermentaci. Navíc fermentace kombuchy na melasovém substrátu vede k větší produkci kyseliny mléčné a biomasy. Je to zapříčiněno především vyšším obsahem dusíkatých látek v melase. Výzkumem bylo navíc potvrzeno, že optimální koncentrace sacharózy z melasy se pohybuje kolem 7 %, což umožňuje produkci s nižším obsahem nežádoucí kyseliny octové a vyšším obsahem fyziologicky významné kyseliny L-mléčné. [6] [14]

Pro získání nápoje s atraktivnějšími organoleptickými vlastnostmi je možné použít rooibos. Jedná se o bylinný nálev, který pochází z jihoafrické rostliny *Aspalathus linearis*. [35] Rooibos čaj se liší tím, že neobsahuje katechiny, takže finální kombuchový nápoj bude mít nižší antioxidační aktivitu v porovnání s kombuchou z černého nebo zeleného čaje. I přesto má vysoký obsah kyseliny glukuronové a jiných významných látek s antioxidační aktivitou – rutinou, aspalatinu, orientinu a isoorientinu. [36]

Dalším příkladem je fermentace kombuchy na extraktu z guavy. Guava je stálezelený keř pocházející z Jižní a Střední Ameriky. Sušené listy z guavy se využívají v tradiční medicíně díky jejím protizánětlivým, hypoglykemickým, antioxidačním a antibakteriálním účinkům. [37] Některé výzkumy ukázaly, že hlavním polyfenolem obsaženým v listech guavy je kvercetin, přičemž v menších koncentracích jsou přítomny i další flavonoidy, jako je kempferol. [32]

Kromě bylinných infuzí byly testovány i různé ovocné šťávy, které ovlivňují výsledný obsah organických kyselin a fenolických sloučenin. Například byla prováděna studie se šťávou z opuncie. Byly prokázány především antibakteriální účinky proti bakterii *Escherichia coli*. [38]

Během studie [39] byla prováděna fermentace na sójovém extraktu, která vedla ke zvýšení obsahu fenolických sloučenin a vitaminů. Současně došlo ke snížení obsahu oligosacharidů, které mohou způsobovat zažívací potíže, což naznačuje, že mikroorganismy v kombuše produkují enzym α -galaktosidázu.

Co se týče sladidel, je možné použít různé zdroje cukru, přičemž to také může znatelně ovlivnit výsledné vlastnosti fermentovaného nápoje. Při studii [40] bylo zjištěno, že kombucha fermentovaná za použití cukru z kokosové palmy vykazovala *in vitro* vyšší antioxidační aktivitu ve srovnání s nápoji fermentovanými pomocí bílého rafinovaného cukru nebo melasy. [41]

2.2 Postup výroby kombuchy

2.2.1 Příprava substrátu pro fermentaci

Pro přípravu čajového základu se obvykle používá zelený nebo černý čaj. Čajové lístky nebo čajové sáčky se přidávají do horké vody a louhují po dobu 5–20 minut, poté se odstraní pomocí filtrace. [14] Při přípravě kombuchy z černého čaje se obvykle lístky louhují při vyšších teplotách (90–100 °C) po dobu 2 až 5 minut, což umožňuje vzniku optimální chuti, aniž by se čaj stal příliš hořkým. V horkém čajovém nálevu se rozpustí cukr – sacharóza. Čajový nálev se nechává zchladnout na pokojovou teplotu (kolem 25 °C). [14]

Sacharóza je nejběžnějším zdrojem uhlíku pro fermentaci kombuchy. Je schopna poskytovat glukózu a fruktózu, které jsou potřebné pro metabolické dráhy mikroorganismů. Většinou se uvádí, že optimální koncentrace sacharózy pro fermentaci kombuchy se nachází v rozmezí 5 až 10 % hmotnostně na objem (w/v). Právě v tomto rozmezí dochází nejčastěji k efektivní fermentaci, neboť poskytuje mikroorganismům dostatečné množství cukru pro jejich metabolickou aktivitu a zároveň nezpůsobuje nadměrné osmotické zatížení, které by mohlo inhibovat růst kvasinek a bakterií. [42]

Podle metody ze studie [6] se 50 až 70 g sacharózy rozpustí v 1 litru vroucí vody, poté se přidají lístky černého nebo zeleného čaje a po 5 minutách se odstraní filtrem. Jedná se o standardní přidané množství cukru do čajového nálevu. [43] Přesné množství čaje a cukru se však může v jednotlivých postupech lišit. Uvádí se například použití 20 g cukru na litr vroucí vody s 10 g/l čajových lístků [44], nebo zase při jiném výzkumu [45] bylo použito 100 g sacharózy a 12 g lístků zeleného anebo černého čaje na 1 litr vody. [46]

2.2.2 Inokulace mikrobiální kulturou – přidání SCOBY

Do ochlazeného čajového roztoku se přidává SCOBY spolu se startovacím čajem, obvykle se jedná o část fermentovaného nápoje z předchozí várky. Přidání startovacího čaje je nezbytné pro optimalizaci počátečního pH ($\leq 4,6$), které tak zabraňuje množení nežádoucích mikroorganismů. Pokud je naměřená vyšší pH hodnota, je nutné přidat větší objem startovacího čaje pro jeho úpravu. [3]

2.2.3 Fermentace

Fermentace představuje jednu z nejstarších a nejtradičnějších metod konzervace potravin. Během fermentačního procesu dochází k různým biochemickým reakcím, které mohou

ovlivňovat nutriční složení a tím i výsledné vlastnosti produktu – bioaktivitu, trvanlivost, nebo organoleptické vlastnosti a stravitelnost. [47]

Fermentace se v domácích podmínkách nejčastěji provádí ve skleněných nádobách se širokým hrdlem, které zajišťují dostatečný přístup vzduchu. Nádoba se zakrývá sterilní prodyšnou tkaninou (např. bavlněnou látkou), která umožňuje výměnu plynů, ale zároveň chrání fermentovaný nápoj před kontaminací z vnějšího prostředí. [46]

V průmyslové výrobě se fermentace provádí ve velkoobjemových nádržích s velkou povrchovou plochou, která zajišťuje dostatečný přístup kyslíku, potřebného zejména pro octové bakterie. [48] Kvůli nízkému pH nejsou vhodné některé materiály – mosaz či hliník. S kyselým prostředím by tyto materiály mohly korodovat anebo uvolňovat látky, které by ovlivnily chuť, kvalitu i zdravotní nezávadnost produktu. Z tohoto důvodu je nejvhodnější sklo nebo nerezová ocel. [12]

Fermentační proces kombuchy probíhá ve dvou fázích – primární (aerobní) a sekundární (anaerobní). První fáze začíná po přidání symbiotické kultury SCOBY a startovacího čaje do vychlazeného a slazeného čajového nálevu. Fermentace obvykle probíhá za aerobních podmínek při pokojové teplotě po dobu 7 až 14 dnů, přičemž délka fermentace se odvíjí od požadovaného chuťového profilu a senzorických vlastností nápoje. [27]

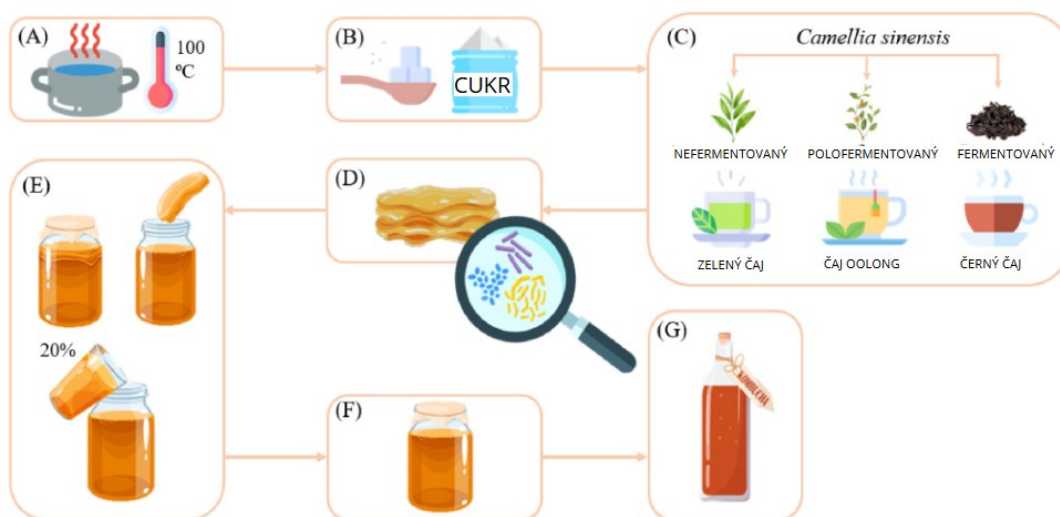
V průběhu primární fermentace dochází na povrchu roztoku k tvorbě nové vrstvy mikrobiálního biofilmu. Tato vrstva může během dvoutýdenního cyklu dosáhnout tloušťky až 8–12 mm. S růstem tloušťky biofilmu roste i jeho hmotnost, díky které začne postupně klesat ke dnu fermentační nádoby. Po ukončení fermentačního cyklu je možné tuto nově vzniklou kulturu oddělit a uložit do fermentovaného nálevu pro další použití. [49]

Kvalitativní vývoj nápoje během fermentace zahrnuje přechod od sladké chuti k jemně perlivé kyselosti, což je způsobeno tvorbou organických kyselin a oxidu uhličitého. Fermentaci je vhodné ukončit nejpozději po 14 dnech, neboť po této době může docházet ke zvýšené produkci kyseliny octové, která negativně ovlivňuje senzorickou přijatelnost nápoje. [6]

Po ukončení primární fermentace se kombucha obvykle přefiltruje, aby se odstranily zbytky ze SCOBY a dalších pevných částic. V tuto chvíli se může přejít k druhé fermentační fázi. Ta probíhá typicky v uzavřených lahvích po dobu 2–5 dnů. Jejím hlavním účelem je karbonizace nápoje prostřednictvím přirozené tvorby CO₂. Během této fáze je možné

kombuchu dochutit přímo ovocem, nebo se do ní často přidávají ovocné šťávy, bylinky nebo koření, které nejen zlepšují organoleptické vlastnosti, ale rovněž ovlivňují mikrobiální aktivitu. [27] [46]

V průmyslových výroбах se po první fermentaci kombucha přečerpává do tlakových nádob, kde dochází k umělé karbonizaci. Následně se nápoj přefiltruje a plní do láhví. Hotový výrobek je skladován při teplotě kolem 4 °C za účelem zpomalení až zastavení fermentace. [46] Mikroorganismy v kombuše jsou stále životaschopné a napomáhají současně zachovat stabilitu produktu. [27] Schéma technologického procesu výroby kombuchového nápoje je znázorněné na Obrázek 5.



Obrázek 5: Schéma přípravy kombuchového nápoje (Upraveno podle [50])

(A) Přivedení vody k varu, (B) přidání cukru, (C) louhování čajových lístků, (D) a (E) vložení SCOBY do čajového nálevu, (F) fermentace a (G) přefiltrování zfermentovaného nápoje.

Další nezbytnou součástí při výrobě kombuchy je dodržování hygienických zásad, například používání čistých a dezinfikovaných pomůcek a přístrojů, aby se minimalizovalo riziko kontaminace nežádoucími mikroorganismy. [11]

2.2.4 Analýza rizik při výrobě kombuchy

Při výrobě kombuchy lze efektivně využívat principy systému HACCP (Hazard Analysis and Critical Control Points = Systém analýzy rizika a stanovení kritických kontrolních bodů), které jsou běžně využívány v potravinářském průmyslu. Nejčastěji identifikovaná rizika mají biologický charakter. [14]

Přestože čaj sám o sobě není typicky spojován s onemocněním z potravin, nicméně černý i zelený čaj mohou obsahovat až 10^5 CFU/ml mikroorganismů včetně druhů *Aspergillus*, *Shigella* či *Pseudomonas*. [51] [52]

K eliminaci těchto rizik je doporučeno používat převařenou vodu a do nálevu vložit kombuchový biofilm ihned po vychladnutí. Domácí výroba často zahrnuje i sdílení SCOBY mezi domácnostmi, čímž se zvyšuje možnost kontaminace plísněmi rodu *Aspergillus* a *Penicillium*, jejichž mykotoxiny mohou být zdraví škodlivé. [11] Z tohoto důvodu je doporučováno zahájit výrobu komerční kulturou. [14]

2.3 Jiné nealkoholické kvašené nápoje

2.3.1 Vodní kefir

Vodní kefir je šumivý, mírně kyselý kvašený nápoj. Vyrábí se fermentací roztoku sacharózy s vodou za přítomnosti kefirových zrn (tibi). Nápoj je známý pod různými názvy, jako například „Tibetská houba“. [53] Kefirová zrna (Obrázek 6) hrají klíčovou roli v procesu fermentace kefiru, obdobně jako SCOBY u kombuchy. Zrna se skládají z gelovité polysacharidové matrice obsahující symbiotickou kulturu bakterií a kvasinek známou jako kefiran.



Obrázek 6: Tibetský vodní kefir [54]

Fermentace probíhá po dobu 18 až 24 hodin při teplotě mezi 8 a 25 °C v částečně uzavřených nádobách, tudíž jde o rychlejší proces v porovnání s výrobou kombuchy. Po dokončení fermentace se zrna oddělují od kapaliny pomocí filtrace a lze je opakovaně využít pro přípravu dalších šarží kefiru, přičemž si zachovávají své charakteristické vlastnosti. [18]

2.3.2 Ginger beer („zázvorové pivo“)

Zázvorové pivo neboli „ginger beer“, je fermentovaný nápoj ze zázvoru, vody, cukru a v některých případech i kvasinek. Nápoj má běžně jemně pikantní chuť a aromatickou vůni, díky přítomnosti bioaktivních látek – gingerolů, shogaolů a zingeronů. [55] [56] Může být nealkoholický i alkoholický, podle typu fermentace.

Tradičně se vyrábí přirozenou fermentací za účasti mikroorganismů přítomných v zázvoru, nebo řízenou, kdy se cíleně přidávají kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* (zázvorový kvásek). [55]

Zázvor si získal oblibu nejen díky své specifické chuti, ale také pro své zdravotní přínosy. Přispívá ke zmírnění nevolnosti, příznaků nachlazení, artritidy, bolestí svalů a kloubů. Kromě toho je známý svými antimikrobiálními vlastnostmi. Mnohé fermentované potraviny, včetně zázvorového piva, mají zdravotní přínosy díky produktům fermentačního procesu, jako jsou například vitaminy skupiny B, a hodně konzumentů mezi pozitivní účinky řadí i probiotické vlastnosti. Avšak aby bylo možné tvrdit, že zázvorové pivo má probiotické účinky nebo přínos pro zdraví, je nezbytné analyzovat jeho mikrobiální složení. [57]

2.3.3 Rejuvelac

Rejuvelac je fermentovaný nealkoholický nápoj vyráběný z naklíčených obilovin, nejčastěji z quinoi a pšenice. [58] Tento nápoj byl vyvinut původně v 60. letech 20. století jako ozdravné tonikum. [59]

Proces klíčení hraje zásadní roli při přípravě rejuvelacu. Dle metodiky z vědeckého článku z roku 2021 [58] se zrna pšenice nejprve namočí ve vodě, a následně se nechají klíčit při teplotě 20 ± 2 °C po dobu 12 až 24 hodin. Po naklíčení se zrna krátce promyjí sterilní vodou a nechají se fermentovat za účasti bakterie *Lactobacillus acidophilus* po dobu 24 hodin při teplotě 25 °C. [59] Kromě *L. acidophilus* převažují v rejuvelacové startovací kultuře i bakteriální rody *Pediococcus* a *Weissella*. [60]

2.3.4 Boza

Tradiční fermentované nápoje na bázi pšenice se v různých částech světa konzumují již po staletí. Mezi nejvýznamnější zástupce patří také boza (někdy označována jako *bosa*). Tento nápoj je původem z Turecka a připravuje se z různých obilovin, především z prosa, kukuřice, pšenice anebo rýžové krupice. K hotovému nápoji se obvykle přidává cukr nebo sacharin, čímž se zjemňuje jeho chuť. [59]

Fermentace bozy je výsledkem kooperace mezi bakteriemi mléčného kvašení a kvasinkami, které přeměňují sacharidy na organické kyseliny a další vedlejší produkty. Mezi hlavní zástupce bakterií mléčného kvašení identifikované z bozy patří *Lactobacillus* a další mléčné tyčinky, *Lactococcus* a *Leuconostoc*. [61] Z kvasinek byly nejčastěji izolované druhy *Saccharomyces carlsbergensis* a *Saccharomyces cerevisiae*. [62]

Proces výroby bozy zahrnuje hned několik fází:

- odstranění plev a otrub ze surovin (čištění),
- vaření za stálého míchání po dobu 1 až 2 hodin,
- ochlazení a přefiltrování směsi,
- přidání cukru,
- fermentace po dobu asi 24 hodin při teplotě 15-25 °C a skládá se ze dvou fází:
 1. alkoholová fermentace, při níž vzniká oxid uhličitý,
 2. mléčná fermentace, které dodává charakteristickou kyselou chuť,
- následné chlazení produktu před distribucí. [59]

2.3.5 Jun

Jun čaj je fermentovaný nápoj, který je svým charakterem podobá kombuše, avšak odlišuje se použitými surovinami – sladidlem je med. Během fermentace dochází působením symbiotické čajové kultury k rozkladu cukrů na glukózu a fruktózu, což vede ke vzniku etanolu a oxidu uhličitého, tak jako tomu je při výrobě kombuchy. Mezi hlavní metabolity produkované během tohoto procesu patří například kyselina glukonová, citronová, glukuronová, vinná, šťavelová, listová, jantarová a pyrohroznová. [63]

2.3.6 Koji amazake

Koji amazake je tradiční japonský nealkoholický nápoj bílé barvy a sladké chuti, připravovaný z rýžového koji a vody, případně s přídavkem vařené rýže. Fermentace probíhá při 50–60 °C, kdy enzym amyláza produkovaný plísní *Aspergillus oryzae* rozkládá rýžový škrob na glukózu – což odlišuje koji amazake od ostatních sladkých nápojů, které běžně obsahují sacharózu nebo fruktózu. [64]

2.3.7 Tepache

Tepache je tradiční fermentovaný nápoj pocházející z Mexika. Tradičně se připravoval z kukuřice, dnes se vyrábí převážně z ananasových slupek, cukru a vody, případně s přídavkem skořice nebo pepře. Fermentace probíhá přirozeně za účasti nativní mikrobioty, typicky ve dřevěných sudech po dobu 4 dnů při pokojové teplotě. [65]

Z tepache byly izolovány mikroorganismy s probiotickým potenciálem, např. *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*, *Enterococcus faecium* nebo *Lactiplantibacillus pentosus*, které produkují antimikrobiální peptidy a jsou schopné přežít trávicí trakt. Tudíž má prospěšný vliv na střevní mikrobiotu a slouží jako prevence gastrointestinálních obtíží. [66]

3 VÝSKYT MIKROORGANISMŮ V NEALKOHOLICKÝCH FERMENTOVANÝCH NÁPOJÍCH

3.1 Biofilm kombuchy – SCOBY

Biofilm je shluk mikroorganismů, který je obklopen vlastní extracelulární polymerní maticí. Tato matrice je tvořena převážně polysacharidy, proteiny, lipidy, enzymy a extracelulární DNA. Slouží jako ochrana před nepříznivými vlivy vnějšího prostředí a umožňuje adhezi k různým povrchům. [67]

Biofilmy hrají klíčovou roli v mnoha přirozených i průmyslových procesech, přičemž mohou být jak prospěšné, tak nežádoucí. [68] Mohou přispívat i například k čištění vody. V medicíně jejich přítomnost často vede ke vzniku chronických infekcí a v potravinářství mohou způsobovat kontaminaci a kažení potravin. [67]

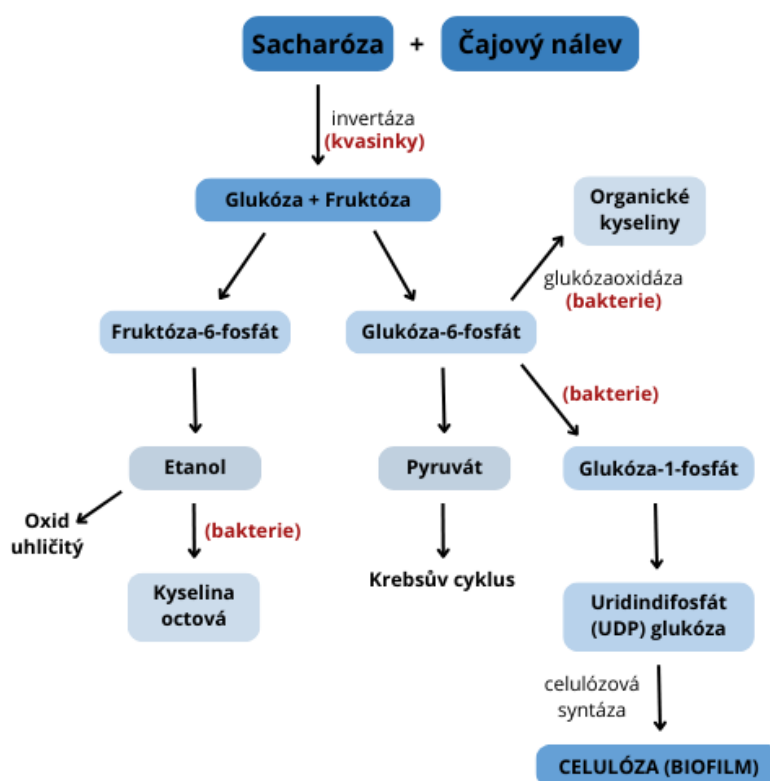
Nicméně biofilmy hrají významnou roli při fermentačním procesu kombuchy. Biofilm kombuchy produkuje během fermentace nové celulózové vrstvy, které lze odebrat a využít v dalším fermentačním cyklu. Tvorba a charakteristiky biofilmu kombuchy závisí na podmínkách fermentace, včetně použitých surovin, teploty, doby fermentace, přítomnosti kyslíku, druhu mikroorganismů a v neposlední řadě i na zdroji uhlíku. [69] Biofilm kombuchy je tvořen především symbiotickou kulturou bakterií a kvasinek (SCOBY), které společně přeměňují oslazený čajový nálev na fermentovaný nápoj obsahující organické kyseliny, enzymy a další bioaktivní látky (viz 1.2). [67]

3.1.1 Mechanismus tvorby biofilmu

Tvorba biofilmu během fermentace je výsledkem spolupráce kvasinek a bakterií, které jsou obsaženy v SCOBY. Hlavním zdrojem uhlíku pro tyto mikroorganismy je sacharóza a zároveň metabolizují složky čajového extraktu, které poskytují mikroorganismům potřebný dusík pro jejich růst. [67] [70]

V první fázi fermentace se sacharóza přeměňuje na fruktózu a glukózu za přítomnosti enzymu invertázy, který je produkován kvasinkami. Bakterie následně využívají glukózu k produkci organických kyselin. [71] Kvasinky současně z těchto monosacharidů vytvářejí etanol a oxid uhličitý. Vzniklý etanol je dále oxidován bakteriemi na kyselinu octovou, a to vede ke snížení pH. Toto kyselé prostředí podporuje aktivitu kvasinek a zároveň se vytváří optimální podmínky pro růst bakterií produkujících poly- β -[1–4]-D-glukózu a celulózový biofilm z glukózových jednotek. Mezi tyto bakterie patří především

Acetobacter xylinus, *Komagataeibacter xylinus* a *Gluconacetobacter xylinus*. [67] Bakterie vylučují enzymy syntázy, které katalyzují přeměnu hexóz, glycerolu, dihydroxyacetonu, pyruvátu a dikarboxylových kyselin na celulóзовé řetězce, čímž dochází k tvorbě nové celulóзовé sítě. [72] Na Obrázek 7 je uvedeno schéma mechanismu tvorby biofilmu.



Obrázek 7: Mechanismus vzniku biofilmu kombuchy (upraveno podle [67])

Celulóza se skládá z vnitřní membrány propojené s peptidoglykanovým řetězcem a vnější membránou, což přispívá k její stabilitě a pevnosti. Chrání mikroorganismy před vnějšími vlivy a umožňuje jim adherovat k povrchu. Na stabilitě a vlastnostech biofilmu se podílejí také další faktory – teplota, pH, nebo koncentrace živin. [67]

3.2 Mikrobiota kombuchy (kombuchová kultura)

Mikrobiologické složení kombuchy do značné míry závisí na původu startovací kultury, jelikož klimatické a environmentální podmínky v konkrétní oblasti mohou ovlivnit růst a převahu určitých kmenů, čímž se v daném regionu vyvíjejí odlišné fermentační procesy.

Složení těchto fermentovaných nápojů se často liší v závislosti na různých faktorech, jako je množství a druh použitých surovin, nebo teplota. Nicméně jak bylo již zmíněno v této diplomové práci, hlavními mikroorganismy v kombuše jsou kvasinky a bakterie. [18] [71]

Na počátku fermentačního procesu převažují osmotolerantní mikroorganismy. Mezi ně patří například *Zygosaccharomyces* sp., *Torulaspora delbrueckii* a *Schizosaccharomyces pombe*. Po octovém kvašení začínají dominovat mikroorganismy odolné vůči kyselému prostředí – *Dekkera* sp. a *Candida stellata*. [46]

Během studie [73] bylo k analýze odebráno celkem 23 vzorků kombuchy z různých míst USA. Pomocí sekvenování metagenomu metodou shotgun se ukázalo, že nejčastěji se vyskytujícími mikroorganismy byly bakterie *Komagataeibacter rhaeticus* a kvasinky *Brettanomyces bruxellensis*.

3.2.1 Bakterie

Bakteriální společenství v kombuše je tvořeno hlavně octovými bakteriemi a v menší míře i bakteriemi mléčného kvašení (BMK). Ty se spolu s kvasinkami podílejí na fermentačním procesu. [47]

Octové bakterie

V kombuchovém čaji dominují octové bakterie. Řadíme je mezi gramnegativní aerobní mikroorganismy. Obvykle jsou ve tvaru tyčinek nebo jejich buňky mohou být oválné. [74] Většina těchto bakterií je kataláza-pozitivní, ale neprodukuje oxidázu. Nejlépe rostou při teplotách v rozmezí 25 až 30 °C, avšak některé teplu odolné kmeny dokážou tolerovat i vyšší teploty až do 42 °C. [75] Určité druhy octových bakterií rovněž vykazují schopnost přežívat a růst v kyselém prostředí s hodnotami pH okolo 3,5. [76]

Octové bakterie patří z taxonomického hlediska do čeledi *Acetobacteraceae*, který zahrnuje několik rodů. Za nejvýznamnější rody pro potravinářský průmysl se považují *Acetobacter*, *Gluconobacter*, *Gluconacetobacter* a *Komagataeibacter*. [77]

Jejich hlavní funkcí je oxidace etanolu na kyselinu octovou a další organické kyseliny. Jedním z hlavních druhů v rámci octových bakterií je *Komagataeibacter xylinus*, který hraje důležitou roli při syntéze celulóзовého biofilmu. [2] [3]

Vědci během výzkumu [78] zjistili, že během celého fermentačního procesu tvoří bakterie rodu *Gluconacetobacter* většinu celkové bakteriální populace. Naopak podíl *Acetobacter* postupně klesal s dobou fermentace.

Mezi konkrétní druhy octových bakterií, které mohou být izolovány z kombuchy kromě výše uvedeného *Komagataeibacter xylinus*, patří:

- *Acetobacter xylinus*,
- *A. pasteurianus*,
- *A. aceti*,
- *Gluconobacter oxydans*. [47]

Bakterie mléčného kvašení

Kromě octových bakterií se v tomto fermentovaném nápoji mohou vyskytovat i bakterie mléčného kvašení (BMK). Do této skupiny patří například rody *Lactobacillus* a *Leuconostoc*. [47]

BMK přeměňují glukózu na kyselinu mléčnou pomocí Embden-Meyerhof-Parnasovy dráhy. Dalšími metabolickými produkty kromě kyseliny mléčné jsou etanol a oxid uhličitý, které vznikají pentózafosfátovou dráhou. Některé druhy BMK mohou syntetizovat kyselinu glukuronovou, která má antioxidační, detoxikační, a hlavně antimikrobiální účinky. [3]

Jak již bylo zmíněno v kapitole o pozitivních účincích kombuchy (1.3.1), různými druhy bakterií mléčného kvašení jsou produkovány antimikrobiální látky – bakteriociny. Tyto látky například poškozují membránu patogenů a mohou způsobit selhání rovnováhy intracelulárního pH buňky. [19]

Kmeny *Pediococcus pentosaceus* a *Pediococcus acidilactici* izolované z kombuchy, prokázaly výrazné antimikrobiální účinky. Byly účinné proti celé řadě patogenních mikroorganismů, včetně *Salmonella* sp., *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Proteus hauseri* a *Staphylococcus aureus*. Kromě bakterií vykazovaly tyto kmeny inhibiční

aktivitu také vůči potravinovým plísním, jako jsou *Penicillium expansum* a *Penicillium digitatum*. [79]

3.2.2 Kvasinky

Kvasinky v kombuše jsou obvykle tvořeny osmofilními druhy, které jsou schopny růstu v prostředí s vyšším osmotickým tlakem, např. díky vysokému obsahu cukru.

V kombuše bylo identifikováno široké spektrum rodů i druhů kvasinek:

- *Starmerella* sp.,
- *Galiella rufa*,
- *Hanseniaspora* sp.,
- *Zygosaccharomyces microellipsoides*, [80] [81]
- *Candida*,
- *Torulaspora*,
- *Pichia*,
- *Lachancea* a další. [47]

Během studie [82] prokázali, že v kombuchovém čaji převládal výskyt kvasinek rodu *Zygosaccharomyces*. Nicméně při jiném výzkumu [83] vypožorovali, že dominantním rodem byl rod *Candida*. Po sedmi dnech fermentace se však množství *Candida* sp. výrazně snížilo a více se vyskytovaly kvasinky *Lachancea* sp. [46]

Kvasinky se podílejí především na přeměně cukrů na alkohol a další metabolity, které poté využívají výše zmíněné bakterie (3.2.1) k produkci organických kyselin. Mnoho procesů alkoholové fermentace je zahájeno často osmotolerantními kvasinkami druhu *Saccharomyces cerevisiae*, *Zygosaccharomyces* spp., nebo *Torulaspora delbrueckii*. [2] [47]

3.3 Mikrobiota jiných kvašených nealkoholických nápojů

Kromě kombuchy existuje mnoho dalších nealkoholických fermentovaných nápojů vyráběných přirozenou fermentací (viz teoretická část práce). Jedním z příkladů nápoje je vodní kefir.

Mikrobiální složení zrn vodního kefíru se skládá především z mléčných bakterií, mezi které patří zástupci rodů *Lactococcus*, *Leuconostoc* a dále obsahuje i bakterie rodu *Lacticaseibacillus*, kvasinky *Kluyveromyces* a *Saccharomyces* a také určité druhy octových bakterií. Přestože mléčné bakterie, jako *Lacticaseibacillus* a *Leuconostoc* sp., lze příležitostně nalézt i v nápoji kombucha, nejsou tam tak dominantní jako v kefíru. Celkově lze říci, že kombucha je bohatší na octové bakterie, zatímco vodní kefír obsahuje větší množství mléčných bakterií. [18]

4 FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ MIKROBIOTU KOMBUCHY

4.1 Faktory ovlivňující mikrobiotu a fermentaci kombuchy

Všechny mikroorganismy přítomné v kombuše se nacházejí jak v samotném fermentovaném čaji, tak v SCOBY biofilmu. [43] Jejich složení se však může lišit také podle regionu. [48]

Nicméně mezi nejčastější faktory ovlivňující fermentaci a mikrobiotu kombuchy patří teplota, substrát, obsah kyslíku a pH prostředí. [3] Jakákoli úprava těchto podmínek může mít vliv na rychlost fermentace, výslednou chuť i vůni nápoje a také chemické složení. Různé druhy substrátů a množství cukru významně ovlivňuje složení i biologickou aktivitu finálního nápoje. [84]

4.1.1 Doba fermentace a její vliv na výsledný nápoj

Doba fermentace se obvykle pohybuje mezi 7 až 60 dny, přičemž vlastnosti nápoje se v průběhu procesu mění. Přestože delší fermentace může zvýšit antioxidační aktivitu, příliš dlouhá doba fermentace se nedoporučuje, protože vede k hromadění organických kyselin, které mohou dosáhnout úrovně nevhodné pro přímou konzumaci. Navíc se může oxid uhličitý hromadit mezi biofilmem a tekutinou, což omezuje přenos živin a vytváří prostředí s omezenými podmínkami pro růst mikroorganismů. [47]

Avšak volba doby fermentace se liší podle požadovaných senzorických vlastností. Obecně platí, že čím delší fermentace, tím více můžeme očekávat octovou chuť. Většinou se doporučuje fermentovat kombuchu maximálně po dobu 10 dnů, pokud je určena k lidské konzumaci. [47] [85]

Během studie [86] se ukázalo, že vývoj mikrobiální populace byl různý v průběhu fermentačního procesu. Z počátku se vyskytovaly ve větší míře octové bakterie v celulóзовém biofilmu než v kombuchovém čaji. Až po uplynutí 8 dnů fermentace se jejich počet postupně dorovnal. Počet kvasinek nebyl nijak znatelně ovlivňován průběhem a dobou fermentace.

4.1.2 Vliv teploty na fermentaci a mikrobiální diverzitu

Optimální teplota fermentace podporuje růst mikroorganismů a enzymatickou aktivitu, což vede k lepší fermentaci a vyšším zdravotním přínosům nápoje. [47] Většinou se fermentace provádí při teplotě v rozmezí 20–30 °C, neboli přibližně při pokojové teplotě. [27] Zjistilo se, že teplota je klíčovým faktorem ovlivňujícím délku fermentace, přičemž nejvyšší

antioxidační aktivita byla dosažena v rozmezí 37–42 °C a byla i prokázána vyšší produkce organických kyselin a dalších metabolitů při vyšších teplotách vnějšího prostředí. [47] [87]

Teplota během fermentace udává, které mikroorganismy budou dominovat. To má především vliv na složení organických kyselin v nápoji. [88]

Podle studie [89] bakterie rodu *Gluconacetobacter* byly přítomny ve všech fázích fermentačního procesu bez ohledu na teplotní podmínky. Vyšší teploty však podpořily růst méně zastoupených bakteriálních druhů, které jsou často spojovány s kontaminanty z prostředí – *Acinetobacter*, *Propionibacterium* anebo také bakterie mléčného kvašení (*Lactocaseibacillus* a další BMK). [46]

4.1.3 Vliv pH na fermentaci

Hodnota pH je jedním z klíčových faktorů ovlivňujících fermentační proces kombuchy. Některé kyseliny, jako jsou kyselina octová a glukonová, které vznikají během fermentace často mají vliv na výsledné biologické vlastnosti nápoje. Růst mikroorganismů je rovněž ovlivňován pH prostředím, tak jako změny ve struktuře fytochemických sloučenin. To může mít vliv i na antioxidační aktivitu. [90] Nejnižší doporučená hodnota pH by neměla klesnout pod 3, neboť to odpovídá přirozené kyselosti lidského trávicího traktu. [47]

4.1.4 Vliv použitého substrátu na mikrobiotu nápoje

Jedním z hlavních faktorů je mimo jiné také použitý substrát. Pro výrobu kombuchy se nejčastěji používají čajové nálevy, a to konkrétně z černého a zeleného čaje. Jak již bylo zmíněno v části o substrátech pro výrobu kombuchového nápoje, kromě tradičních čajových substrátů je možné použít i jiné alternativní zdroje (2.1.2). [27]

Například během výzkumu [36] srovnávali fermentační proces a výsledné složení kombuch z černého, zeleného i rooibos čaje. Zjistili, že nejhojněji se vyskytoval druh mikroorganismu *Komagataeibacter intermedius* v nápojích z černého a zeleného čaje. Z kombuch vyrobených z rooibos nálevu převažovaly izoláty *Gluconacetobacter entanii*.

4.1.5 Vliv dalších podmínek na fermentaci a mikrobiotu kombuchy

Velký vliv na výsledný nápoj má velikost a tloušťka biofilmu. Tloušťka SCOBY by měla být kolem 6 až 12 mm. Pokud je biofilm příliš tenký, zvyšuje se riziko kontaminace. V opačném případě, když je biofilm příliš silný, může bránit přístupu kyslíku potřebného pro fermentaci. [12]

Dalším faktorem jsou vzájemné interakce mezi mikroorganismy, díky kterým dochází k fermentaci. Bakterie a kvasinky spolupracují a vzájemně si poskytují substráty pro jejich metabolismus. Kvasinky produkují etanol, který pak využívají octové bakterie k tvorbě organických kyselin, především kyseliny octové, a celulóзовého biofilmu. [46]

V jedné studii z roku 2017 [91] bylo zjištěno, že zelený čaj umožňoval růst a množení bakterií druhu *Oenococcus oeni*. Tento bakteriální druh však chyběl u varianty s černým čajem.

II. PRAKTICKÁ ČÁST

5 CÍL PRÁCE

Cílem mé diplomové práce v rámci praktické části bylo vyrobit nápoje kombucha a následně z nich izolovat vybrané mikroorganismy a poté je identifikovat.

Dalším cílem bylo zkoumání vlivu vybraných faktorů (doba fermentace, druh čajového substrátu) na tyto mikroorganismy, které mohou přispět k lepšímu pochopení mikrobiálního složení a dynamiky kombuchy. Následně bylo třeba získané výsledky vyhodnotit a analyzovat s cílem jejich interpretace a diskuze. Na základě provedených experimentů poté formulovat závěry práce.

6 MATERIÁL

6.1 Pracovní pomůcky a přístroje

- Fermentační skleněné nádoby (zavařovací sklenice) – objem 3 l,
- Eddy Jet – automatický Spiral Plater,
- Petriho misky s živnou půdou, fyziologický roztok,
- pipety, etanol pro sterilaci,
- Biohazard box,
- Vortex Mixer,
- termostatická skříň (30 °C),
- exikátor (pro kultivaci anaerobních mikroorganismů),
- spektrofotometr Tecan,
- autokláv, a další.

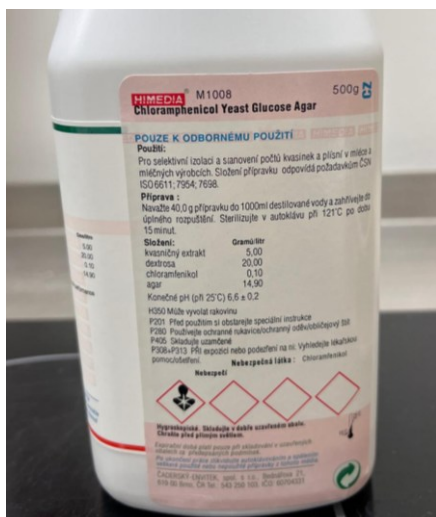
6.2 Kultivační půdy

V rámci práce jsem se zaměřila na izolaci a identifikaci především octových bakterií a kvasinek. Také jsem testovala přítomnost probiotických kultur v kombuše. Pro selektivní kultivaci těchto vybraných skupin mikroorganismů a následné jejich vyhodnocení jsem použila specifické kultivační půdy:

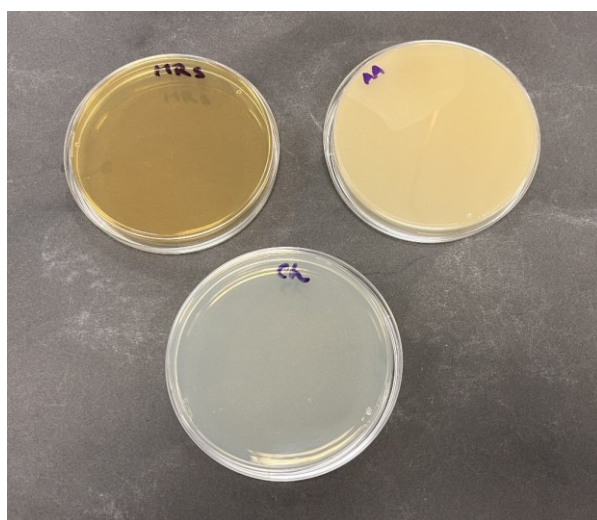
- Acetobacter agar pro glukosa pozitivní druhy rodu *Acetobacter*,
- CHYGA (Chloramphenicol Yeast Glucose Agar) pro izolaci kvasinek,
- MRS (De Man–Rogosa–Sharpe) agar pro bakterie mléčného kvašení.

6.2.1 Příprava vybraných živných médií

Kultivační média byla připravena podle postupu na obalech nádob s konkrétní přípravnou směsí (Obrázek 8). Dané množství směsi bylo rozpuštěno v destilované vodě a následně sterilizováno v autoklávu při teplotě 121 °C po dobu 15 minut. Po částečném ochlazení byla připravená média nalita do sterilních Petriho misek (Obrázek 9).



Obrázek 8: Směs na přípravu agarů pro kvasinky a plísně



Obrázek 9: Petriho misky s připravenými kultivačními pevnými půdami

6.3 Analyzované vzorky kombuchy a suroviny pro jejich přípravu

Počáteční násady pro produkci kombuchy jsem získala ze tří různých zdrojů – webových stránek:

- Tvořivý svět [92],
- Fermentárium [93],
- Vital Country [94].

K přípravě fermentovaného nápoje kombucha byly použity následující suroviny:

- **čaj** – pravý zelený čaj čínský (Obrázek 10) a černý cejlonský čaj v sypané formě



Obrázek 10: Použitý zelený sypaný čaj

- **sladidlo** – bílý krystalický cukr,
- **voda** – pitná voda, zahřátá na požadovanou teplotu.

Množství jednotlivých surovin bylo stanoveno na základě doporučených poměrů pro přípravu kombuchy a uvedeno v tabulce níže (Tabulka 1).

Tabulka 1: Množství použitých surovin

Surovina	Množství na 1 litr vody
sypaný čaj	6 g = 4 lžičky
bílý cukr	80 g

7 METODIKA

7.1 Příprava nápoje kombucha

Kombuchy byly vyráběny v domácím prostředí. Při přípravě fermentovaného nápoje kombucha je důležité dodržovat správné technologické postupy, které zajistí optimální podmínky pro fermentaci a růst symbiotické kultury bakterií a kvasinek (SCOBY). Proces probíhá následovně:

1) Příprava čaje

- Nejprve bylo požadované množství vody přivedeno k varu.
- Následně bylo do horké vody přidáno odpovídající množství černého čaje. Zelený čaj byl vložen do nevroucí vody o teplotě cca 80 °C.
- Čaj byl extrahován po dobu 10 minut, čímž došlo k uvolnění aromatických a dalších složek.
- Vylouhovaný čaj byl scezen přes sítko.

2) Slazení čajového výluhu

- Do scezeného čajového výluhu bylo přidáno potřebné množství cukru, který slouží jako substrát pro mikrobiální fermentaci.
- Cukr bylo nutné pomocí míchání zcela rozpustit.

3) Fermentace

- Čaj bylo nutné nechat zchladit na teplotu kolem 40–50 °C, aby mohl být přidán ke kombuchové „houbě“ (SCOBY).
- Pro fermentaci byly použity skleněné nádoby. Nádoba byla zakryta papírovým kuchyňským ubrouskem. Fermentace probíhala při pokojové teplotě a mimo sluneční záření po dobu 5 dnů (Obrázek 11).

Po pěti dnech fermentace byly odebrány vzorky kombuchového nápoje k mikrobiologickému rozboru. Po této době byla také odebrána většina zfermentovaného nápoje a nahrazena nově připraveným oslazeným čajem. Ten sloužil jako čerstvý substrát pro další fermentační cyklus. Ihned po přidání nového slazeného čaje byly odebrány další vzorky, které sloužily k analýze změn mikrobiologického složení nápoje v časných fázích fermentace.

Při odebírání zfermentované tekutiny je důležité vždy ponechat její část pro další cykly. Tato zfermentovaná část z předchozí várky podporuje funkci SCOBY, slouží jako inokulum, neboť obsahuje živé kvasinky a bakterie v aktivním stavu, a navíc působí jako stabilizátor pH – díky kyselému prostředí se zpomaluje množení nežádoucích mikroorganismů.



Obrázek 11: Modelový vzorek kombuchy

7.2 Izolace vybraných mikroorganismů z kombuchy

Pro izolaci byly vybrány následující rody mikroorganismů – octové bakterie, mléčné tyčinky (probiotické bakterie) a kvasinky.

Pro izolaci mikroorganismů byly provedeny odběry vzorků kombuch vždy po 5 dnech fermentace a po přidání nového substrátu (slazeného čaje). Tyto odebrané vzorky sloužily jako výchozí suspenze. Suspenze byly následně podle potřeby naředěny metodou desetinásobného ředění. Připravené ředěné vzorky byly následně aplikovány na Petriho misky s vhodnými kultivačními půdami pomocí přístroje Spiral plater. Přístroj byl nastaven na log mode 50μl. Misky byly inkubovány za specifických podmínek dle typu cílových mikroorganismů s cílem získat izolované kolonie.

Kultivace kvasinek probíhala na půdě CHYGA při laboratorní (pokojové) teplotě po dobu 5 dnů. Pro izolaci bakterií mléčného kvašení (zejména mléčných tyčinek) bylo třeba kultivovat na MRS agaru v anaerobní atmosféře při teplotě 30 °C po dobu 2–3 dnů.

Pro izolaci octových bakterií byla nutná kultivace na Acetobacter agaru za aerobních podmínek při teplotě 30 °C po dobu 2 dnů.

7.3 Identifikace vybraných kolonií

Po úspěšné kultivaci a získání jednotlivých kolonií následoval výběr vhodných mikroorganismů k identifikaci. V první fázi bylo nezbytné získat čisté kultury, a proto byly vybrané kolonie opakovaně přeočkovávány na čerstvé půdy.

Pro zjištění typu mikroorganismu a ověření čistoty bylo provedeno Gramovo barvení. Obarvení izolátů umožnilo rozlišit bakterie (grampozitivní a gramnegativní) a kvasinky. Na základě mikroskopické morfologie (tvar, velikost, typ buněk) a makroskopického vzhledu kolonií (barva, struktura, povrch, okraje) byly vybrány reprezentativní kolonie pro další analýzu.

7.3.1 Izolace DNA

Z vybraných čistých kultur byla následně provedena eluce DNA. K izolaci byl použit komerčně dostupný kit (DNeasy Blood & Tissue Kit) s pracovním postupem.

1. Do zkumavky Eppendorf bylo napipetováno 200 µl pufru PBS, do kterého bylo pomocí sterilní kličkou nanесeno dostatečné množství kultury za účelem vytvoření suspenze.
2. Do každé zkumavky se suspenzí bylo přidáno 20 µl proteinázy K a následně i 200 µl pufru AL. Směs byla promíchána na vortexu a poté inkubována při 56 °C po dobu 10 minut. Tato inkubace umožnila proteináze K proteolyticky narušit buněčné stěny, což umožnilo uvolnění DNA do extracelulárního prostoru.
3. Po inkubaci bylo ke směsi přidáno 200 µl 96 % etanolu a opět následovalo promíchání na vortexu.
4. Celý obsah zkumavky byl přenesen do DNeasy Mini spin kolony s filtrační membránou, která byla umístěna do sběrné nádoby. Vzorky byly centrifugovány při 10 000 ot. /min po dobu 1 minuty.
5. Roztok, který protekl do sběrné zkumavky (s obsahem zbytkových nečistot), byl odstraněn. Kolona s filtrační membránou byla vložena do nové sběrné nádoby.

6. Za účelem odstranění zbylých nečistot a proteinových částic, bylo přidáno 500 μ l promývacího pufru AW1, následovalo centrifugování po dobu 1 minuty. Průtok opět byl odstraněn a spin kolona přenesena do nové sběrné zkumavky.
7. K druhému promytí bylo použito 500 μ l pufru AW2, a poté byla kolona centrifugována po dobu 3 minut. Průtok byl opět odstraněn.
8. Kolona byla přenesena do sterilní mikrocetrifugační Eppendorf zkumavky. Pro eluci DNA bylo použito 50 μ l AE pufru předem zahřátého na 60 °C. Po přidání pufru následovala inkubace při laboratorní teplotě po dobu 5 minut.
9. Následovalo finální centrifugování, během kterého došlo k získání eluátu s DNA, která byla zachycena ve spodní části zkumavky.

Po extrakci byla u každého vzorku změřena koncentrace izolované DNA pomocí přístroje Tecan. Pro měření byly použity mikrodestičky (Obrázek 12), do jejichž jednotlivých jamek bylo nanášeno 2 μ l AE pufru (10 mM Tris-Cl, 0.5 mM EDTA, pH 9.0), který sloužil jako blank. Po změření blanku byly do jednotlivých jamek pipetovány vzorky DNA rovněž v objemu 2 μ l. Následně byla změřena koncentrace pomocí vlnové délky 260 nm a 280 nm.



Obrázek 12: Destička k měření koncentrace DNA na přístroji Tecan

7.3.2 PCR reakce

Izolovanou DNA sloužila jako templát pro polymerázovou řetězcovou reakci (touch-down PCR). Cílem bylo amplifikovat úseky DNA pro následnou sekvenační analýzu.

V první řadě bylo třeba připravit reakční směs, která obsahovala primery (forward a reverse), master mix a PCR vodu (nukleázově čistou). Pro bakterie a kvasinky byly použity

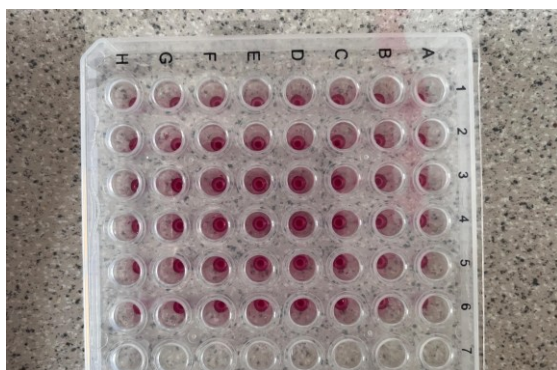
odlišné specifické páry primerů, které umožňují cílené pomnožení vybraných sekvencí. U bakterií byly použity primery forward FD1 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG) a reverse RD1 (5'-AAGGAGGTGATCCAGCC). [95] Pro kvasinky sloužily následující primery: NL1 (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG) jako forward [96] a LR6 jako reverse (5'-CGCCAGTTCTGCTTACC) [97].

Do jamky mikrotitrační destičky (Obrázek 13) bylo napipetováno vždy celkem 24 μ l reakční směsi:

- 0,5 μ l forward primer,
- 0,5 μ l reverse primer,
- 12,5 μ l PCR master mix,
- 10,5 μ l PCR voda.

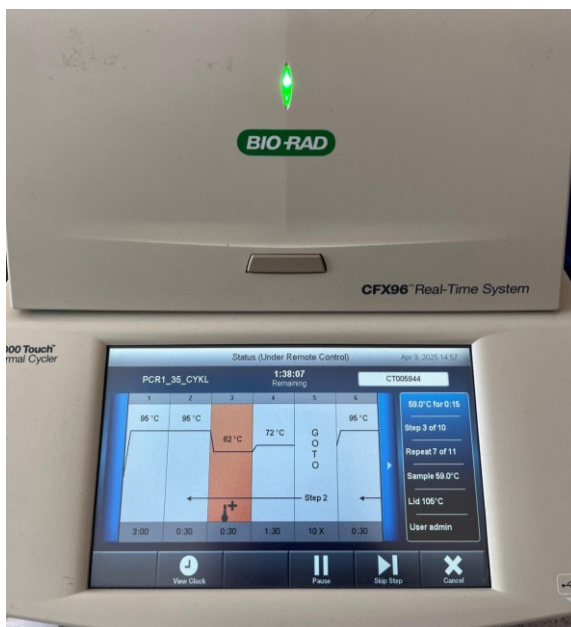
Pro PCR reakci byl použit konkrétně VWR® Red Taq DNA Polymerase Master Mix. Tento mix je předem namíchaný roztok s potřebnými složkami pro PCR. Obvykle obsahuje dNTPs (deoxynukleotid trifosfát), enzym Taq polymerázu, $MgCl_2$, stabilizátory a zesilovače reakce (enhancery) v reakčním pufru. [98] V tomto master mixu se vyskytuje optimalizovaný pufr: Tris-HCl (pH 8,5), $(NH_4)_2 SO_4$ a 1 % Tween® 20. $MgCl_2$ je nezbytný kofaktor pro aktivitu Taq polymerázy, koncentrace $MgCl_2$ ve směsi je obvykle 1,5 mM. Taq polymeráza je termostabilní enzym izolovaný z bakterie *Thermus aquaticus*, který katalyzuje syntézu DNA během PCR cyklů.

Ke každé napipetované směsi bylo přidáno 1 μ l izolované DNA. Jedna jamka zůstala bez přidání DNA a sloužila jako negativní kontrola reakce, která měla detekovat případnou kontaminaci.



Obrázek 13: Mikrotitrační destička se směsí pro PCR s izolovanými vzorky DNA

PCR reakce byla provedena na příslušném termocykleru (BIO-RAD CFX96 Real-Time Systém, 1000 Touch) s programem optimalizovaným pro použité primery a podmínky reakce. Amplifikační reakce trvala přibližně dvě hodiny.



Obrázek 14: Termocykler BIO-RAD pro polymerázovou řetězcovou reakci

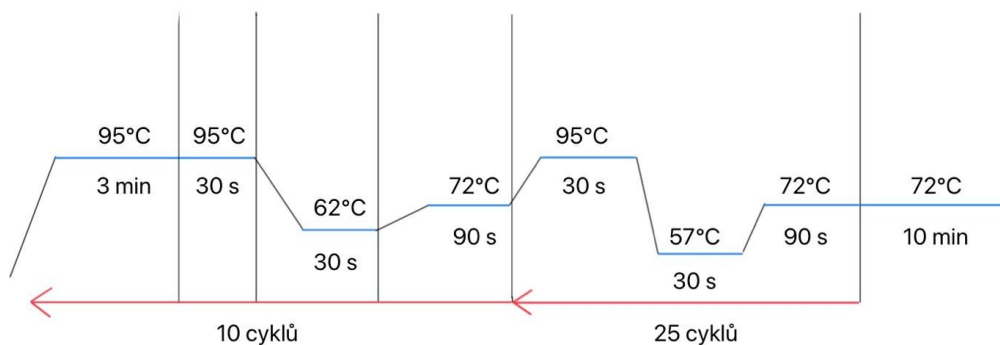
V první fázi byla spuštěna úvodní denaturace při teplotě 95 °C na 180 sekund. Ta zajistila rozvolnění dvoušroubovice DNA. Poté následovalo 10 cyklů těchto kroků:

- denaturace při teplotě 95 °C po dobu 30 s,
- nasedání primerů (annealing) při teplotě 62 °C po dobu 30 s, přičemž při každém cyklu se tato teplota snížila o 0,5 °C,
- následovalo prodloužení (elongace) při 72 °C po dobu 90 s.

Po těchto 10 cyklech následovalo 25 amplifikačních cyklů, které sestávaly z:

- denaturace při 95 °C po dobu 30 s,
- annealingu při 57 °C po dobu 30 s,
- a elongace při 72 °C po dobu 90 s.

Nakonec proběhla závěrečná elongace při stejné teplotě po dobu 10 minut.



Obrázek 15: Schéma nastavení jednotlivých kroků PCR programu

7.3.3 Agarózová gelová elektroforéza

Pro provedení elektroforézy bylo potřeba připravit gel. Na 250 ml pufru TAE (Tris-acetát-EDTA) bylo naváženo 3,75 g agarózy (Obrázek 16). Směs byla rozpouštěna při záhřevu v mikrovlnné troubě. Po mírném zchlazení roztoku bylo přidáno 5 kapek barvy fluorescenčního barviva Red gel na zviditelnění frakcí v gelu. Roztok byl nanesen do formy s hřebínky, které po ztuhnutí gelu vytvořily jamky.



Obrázek 16: Agarózová směs pro přípravu gelu na elektroforézu

Do jamek v gelu (Obrázek 17) byly nanесeny po 5 μ l PCR produkty jednotlivých vzorků a molekulární markery (100 bp DNA ladder), které slouží k určení délky fragmentů. Gelová elektroforéza probíhala přibližně 1 hodinu při 120 V. Výsledky byly pozorovány v transluminátoru pod UV světlem o vlnové délce 365 nm, čímž bylo možné ověřit přítomnost specifických amplikonů.



Obrázek 17: Gel s nanесenými PCR vzorky (před elektroforézou)

7.3.4 Purifikace DNA

Amplifikovaná DNA byla následně podrobena purifikaci. Cílem purifikace je dočištění, odstraňují se zbytkové nečistoty (např. enzymy), které by mohly negativně ovlivnit sekvenaci. [99]

Existuje celá řada metod purifikace DNA, v práci jsem používala konkrétně kit SPRIselect reagent využívající metodu na principu magnetické separace. Postup byl následovný:

1. K 20 μ l vzorku bylo přidáno 16 μ l roztoku s magnetickými kuličkami. Magnetické kuličky mají schopnost se navázat na DNA.
2. Celé množství bylo přeneseno do nové destičky, která byla vložena na magnet. Dojde k oddělení kuliček s navázanou DNA a supernatantu, který je třeba odstranit.
3. Vzorky byly promývány 180 μ l 85 % etanolu, aby došlo k odstranění zbylých kontaminantů. Po chvíli byl etanol odstraněn a jeho zbytky vysušit v 60 °C po dobu 5 minut.

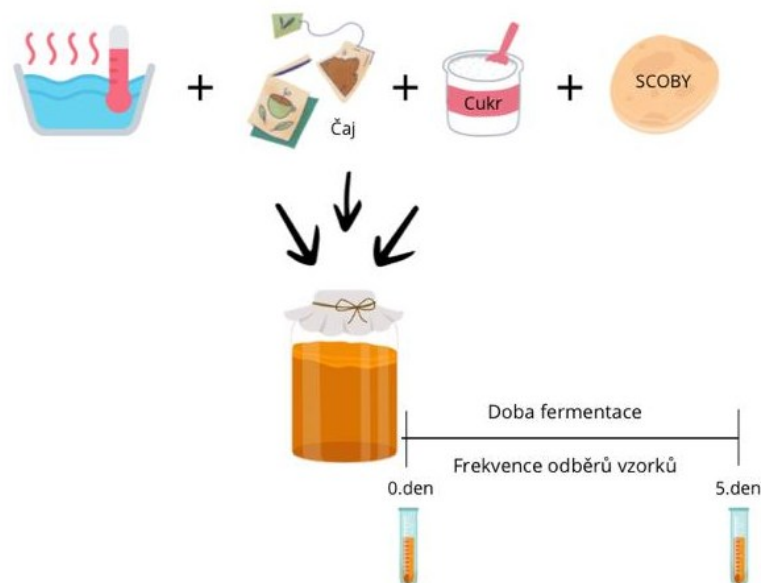
4. K finálnímu uvolnění DNA z kuliček bylo přidáno 20 μ l PCR vody, která byla předem zahřátá na 60 °C. Směs bylo třeba promíchat.
5. Výsledný supernatant s DNA byl uchován pro identifikaci.

Vzorky byly odeslány k sekvenaci do specializované laboratoře SEQme. Výsledná sekvence DNA posloužila k finální identifikaci mikroorganismů na základě porovnání s databázemi. Konkrétně byl používán program Nucleotide BLAST z databáze National Library of Medicine – National Center for Biotechnology Information (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

8 VÝSLEDKY A DISKUZE

8.1 Izolace mikroorganismů z kombuch

Odběry vzorků kombuch byly prováděny 0. den (tj. po přidání nového slazeného čaje) a po 5 dnech fermentace (Obrázek 18). První kombuchy byly vyráběny z černého čaje, po 30 dnech byly "celulózové houby" fermentovány v nálevu ze zeleného čaje.



Obrázek 18: Schéma frekvence odběrů vzorků

Po příslušné kultivaci narostly na požadovaných pevných půdách kolonie s různými morfologickými vlastnostmi (Obrázek 19) – např. různým zbarvením, velikostí apod.



Obrázek 19: Nárůst kolonií na Acetobacter agaru (vlevo) a CHYGA (vpravo) inokulovaných pomocí Spiral plateru



Obrázek 20: Nárůst kolonií na *Acetobacter* agaru – viditelné precipitační zóny

Na agaru pro izolaci octových bakterií se vyskytovaly také kolonie s precipitační zónou (Obrázek 20). Některé bakterie rodu *Acetobacter* jsou schopny vytvářet zónu precipitace díky produkci extracelulárních polymerních látek anebo při reakci např. kyseliny octové s látkami obsaženými v médiu, jako jsou vápenaté soli. [100]

8.1.1 Hodnocení nárůstu mikroorganismů kombuch z černého čaje

Počet narostlých kolonií byl odečten pomocí přístroje Sphere Flash, který umožňuje automaticky spočítat kolonie narostlých mikroorganismů. Zároveň byla také vyhodnocena hodnota CFU/ml (Colony Forming Units) a byly vypočteny příslušné průměry. CFU udává počet životaschopných mikroorganismů ve vzorku, které jsou schopné vytvořit kolonii na živné půdě. Tyto zmíněné hodnoty jsou uvedeny v tabulce níže Tabulka 2).

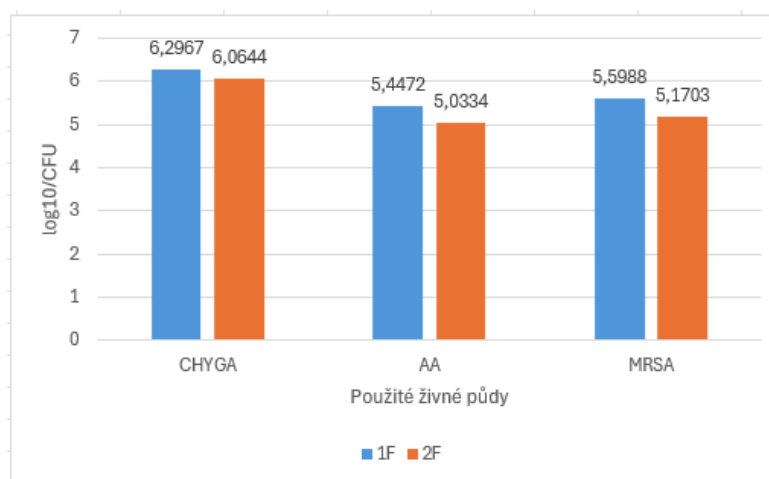
Vzorky byly odebrány vždy po 5 dnech fermentace (označení 1*) a poté v nultém dni fermentace (označení 2*), tj. po odebrání části zkvašeného nápoje a přidání nového substrátu. Vzorky byly odebírány z tekuté části kombuchy po dostatečném promíchání. Ještě je potřebné zmínit, že ve většině případů měl biofilm tloušťku kolem 2 cm. Výjimkou byly počáteční fáze násady získané z e-shopu Vital Country. Tento biofilm zesílil až po několika fermentačních cyklech.

Tabulka 2: Průměrné hodnoty CFU/ml u jednotlivých vzorků kombuch – černý čaj

	CFU/ml		
Vzorek*	CHYGA	AA	MRSA
1F	$1,98 \cdot 10^6$	$2,80 \cdot 10^5$	$3,97 \cdot 10^5$
2F	$1,16 \cdot 10^6$	$1,08 \cdot 10^5$	$1,48 \cdot 10^5$
1TS	$5,03 \cdot 10^6$	$9,98 \cdot 10^4$	$6,97 \cdot 10^6$
2TS	$1,25 \cdot 10^6$	$1,43 \cdot 10^3$	$1,14 \cdot 10^6$
1VC	$1,88 \cdot 10^6$	ND	$1,86 \cdot 10^6$
2VC	$1,28 \cdot 10^6$	ND	$3,30 \cdot 10^5$

*F = Fermentárium, TS = Tvořivý svět, VC = Vital Country, 1 = po 5 dnech fermentace, 2 = nultý den fermentace, ND = nárůst nedetekován

Z dostupných vypočtených hodnot CFU byly vypočteny průměry počtu mikroorganismů vyrostených na jednotlivých půdách pro každý vzorek zvlášť. Průměry pro sadu vzorků z kombuch z černého čaje jsou uvedeny v Tabulka 2, přičemž nejvyšší průměrné hodnoty jsou v tabulce zvýrazněny. Na půdě CHYGA bylo v průměru nejvíce kolonií kultivováno ze vzorku 1TS*, byla vypočtena průměrná hodnota $5,03 \cdot 10^6$ CFU/ml. Z téhož vzorku bylo nejvíce izolovaných kolonií také na půdě MRSA. Byla získána nejvyšší hodnota CFU/ml, a to $6,97 \cdot 10^6$. Co se týče živné půdy AA, nejvíce izolátů bylo ze vzorku 1F* – $2,80 \cdot 10^5$ CFU/ml.

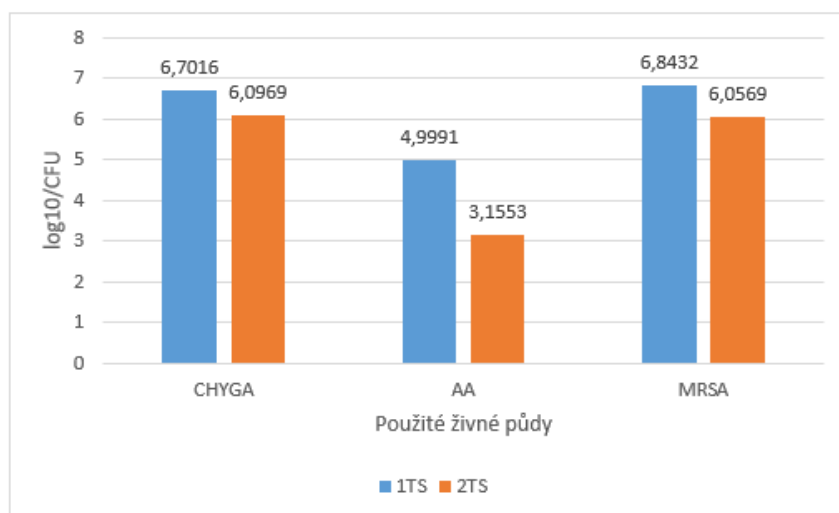


Obrázek 21: Počty mikroorganismů vyrostené v kombuše z černého čaje – F*

Na Obrázek 21 výše jsou znázorněny výsledné počty kolonií vypočtené z průměrů CFU/ml, které byly získány ze vzorku kombuchy připraveného z černého čaje s biofilmem pocházejícím z e-shopu Fermentárium [93], jak z odběrů na počátku fermentačního procesu, tak i po 5 dnech fermentace.

Po 5 dnech fermentace byl zaznamenán nejvyšší počet kolonií na půdě CHYGA pro izolaci kvasinek. Celkově více mikroorganismů bylo získáno u vzorků odebraných 5. den fermentace. Je to zapříčiněno pravděpodobně tím, že v pátém dni dochází k aktivní fermentaci, kvasinky produkují etanol, které je následně zpracováván octovými bakteriemi a tvoří se kyselina octová a celulózový biofilm.

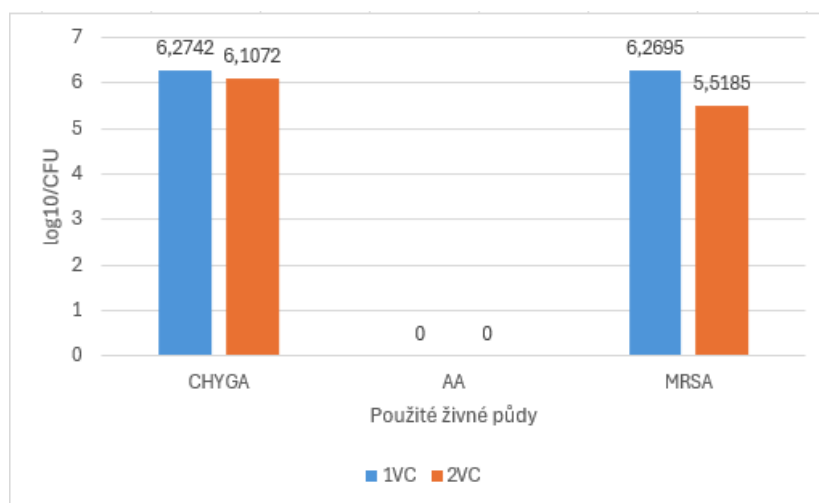
Po vypočtených průměrech CFU/ml si lze všimnout, že nejvyšší hodnota byla pozorována na půdě CHYGA - $1,98 \cdot 10^6$ CFU/ml pro vzorek 1F*. Co se týče vzorku 2F* odebraného 0. den, tak nejvyšší počty kolonií byly zaznamenány také na půdě pro kvasinky, přičemž průměrná hodnota CFU/ml činila $1,16 \cdot 10^6$. Mikroorganismy byly přítomny již od začátku fermentace, protože do každého nového fermentačního procesu byla přidána část zfermentovaného nálevu z předchozí várky.



Obrázek 22: Počty mikroorganismů vyrostené v kombuše z černého čaje – TS*

V případě kombuchy pocházející ze internetového zdroje Tvořivý svět [92] byl nejvyšší nárůst zaznamenán na pevné půdě MRS u vzorku 1TS*, jak lze vidět z grafu (Obrázek 22). Nejvíce mikroorganismů, konkrétně $6,97 \cdot 10^6$ CFU/ml, bylo odečteno z tohoto agaru se vzorkem odebraným po fermentaci.

Na Petriho miskách s pevnou půdou AA byl zaznamenán nižší nárůst v porovnání s ostatními agary, přičemž hodnoty 1TS a 2TS se nejvíce lišily.



Obrázek 23: Počty mikroorganismů vyrostené v kombuše z černého čaje – VC*

Na Obrázek 23 jsou uvedeny vypočtené hodnoty CFU/ml, přičemž jsou srovnány odběry nápojů 0. a 5. den fermentace. Celulózový biofilm pocházel ze zdroje Vital Country [94]. Největší nárůst mikroorganismů se ukázal na půdě CHYGA. Na miskách s *Acetobacter* agarem s izoláty ze vzorku odebraného 0. den bylo zaznamenáno pouze několik málo kolonií, nicméně při zohlednění programu očkovaní pomocí Spiral plateru se počet CFU/ml pohyboval řádově v jednotkách tisíců.

Tato absence růstu může být vysvětlena několika faktory souvisejícími s podmínkami fermentace a biologickými vlastnostmi octových bakterií. V první řadě mohl být použitý objem násady malý a fermentace během 5 dnů nestihla proběhnout – nálev zůstal stále sladký. Dá se tedy předpokládat, že fermentace nebyla dostatečně pokročilá, a tedy podmínky pro rozvoj octových bakterií nebyly vhodné. Pravděpodobně se nevytvořilo dostatek etanolu, který je potřebný pro aktivitu octových bakterií.

Dalším odůvodněním, proč neproběhla fermentace může být to, že byla houba vložena do většího objemu připraveného čajového nálevu s cukrem. Mikroorganismy nebyly dostatečně aktivní pro přeměnu většího množství substrátu.

Při porovnání počtu izolovaných kolonií z grafu (Obrázek 23) bylo opět potvrzeno, že větší nárůst mikroorganismů byl po kultivaci vzorků odebraných po 5 dnech fermentace. Z grafu navíc vyplývá, že více se lišily počty narostlých kolonií na půdě MRSA.

8.1.2 Hodnocení nárůstu mikroorganismů kombuch ze zeleného čaje

Vzorky kombuchy vyrobené z nálevu ze zeleného čaje byly odebírány za stejných podmínek jako u kombuch z černého čaje – 5. a 0. den fermentace. Označení vzorků je také totožné jako u izolátů kombuch z černého čaje – F*, TS*, a VC*.

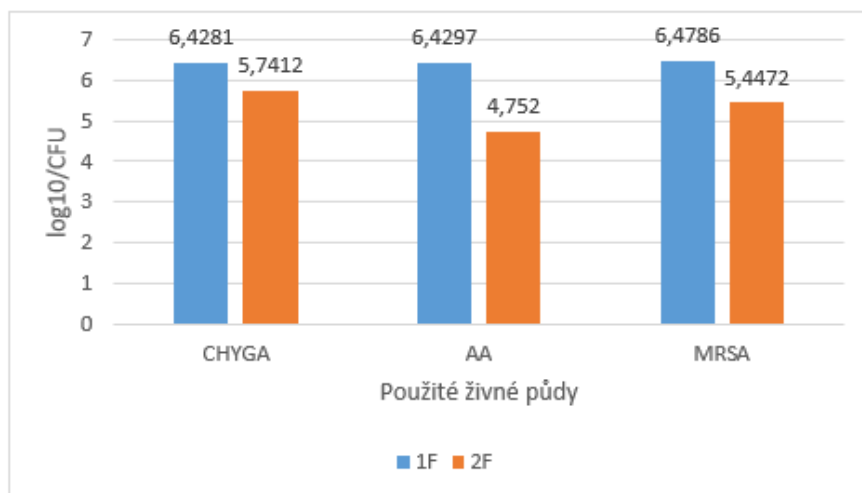
Tabulka 3: Průměrné hodnoty CFU/ml u jednotlivých vzorků kombuch – zelený čaj

	CFU/ml		
Vzorek*	CHYGA	AA	MRSA
1F	$2,68 \cdot 10^6$	$2,69 \cdot 10^6$	$3,01 \cdot 10^6$
2F	$5,51 \cdot 10^5$	$5,65 \cdot 10^4$	$2,80 \cdot 10^5$
1TS	$2,47 \cdot 10^6$	$3,89 \cdot 10^5$	$1,60 \cdot 10^6$
2TS	$7,58 \cdot 10^5$	$8,51 \cdot 10^4$	$4,40 \cdot 10^6$
1VC	$1,61 \cdot 10^6$	$1,44 \cdot 10^6$	$2,03 \cdot 10^6$
2VC	$2,73 \cdot 10^5$	ND	$1,91 \cdot 10^6$

*F = Fermentárium, TS = Tvořivý svět, VC = Vital Country, 1 = po 5 dnech fermentace, 2 = nultý den fermentace, ND = nárůst nedetekován

V Tabulka 3 jsou uvedeny průměrné hodnoty CFU/ml spočítané pro dané vzorky kombuchových nápojů vyrobených z nálevu zeleného čaje. Největší nárůst kolonií byl pozorován na půdách pro kvasinky a pro octové bakterie konkrétně u vzorku 1F*. Jednalo se o téměř stejné hodnoty CFU/ml: $2,68 \cdot 10^6$ a $2,69 \cdot 10^6$. Na půdě MRSA byl zaznamenán nejvyšší nárůst mikroorganismů $4,40 \cdot 10^6$ CFU/ml – izolované ze vzorku 2TS*. Současně je to i největší počet kolonií získaný ze všech vzorků se zeleným čajem.

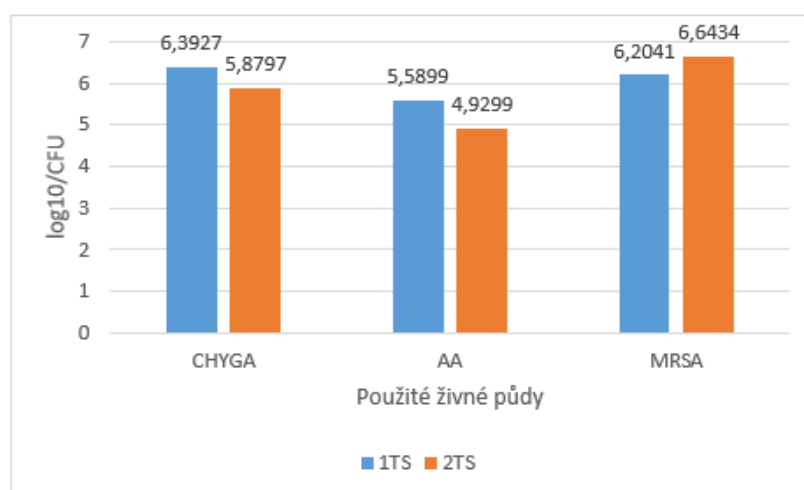
Celkově bylo více mikroorganismů izolováno ze vzorků kombuchy ze zeleného čaje, pravděpodobně to je zapříčiněno tím, že všechny biofilmy byly silnější, tudíž bylo nejspíš přítomno více aktivních mikroorganismů. Jak bylo psáno na začátku této kapitoly (8.1), první probíhala výroba kombuch a fermentace v nálevu z černého čaje, až poté ze zeleného čaje.



Obrázek 24: Počty mikroorganismů vyrostené v kombuše ze zeleného čaje – F*

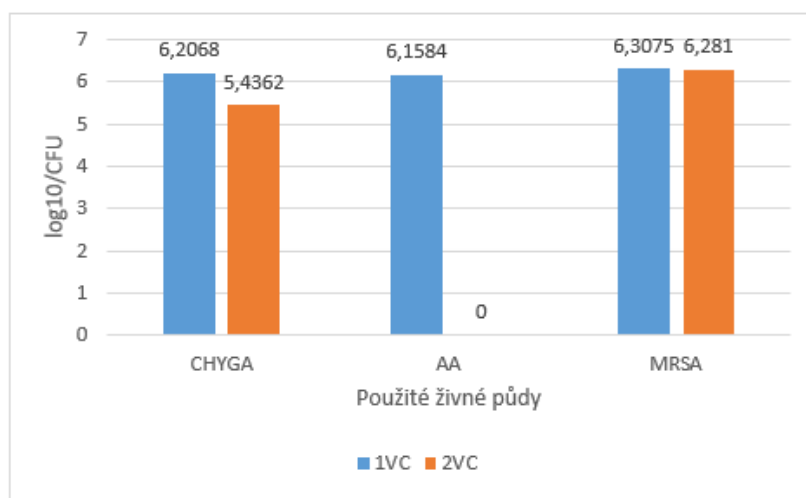
V grafu na Obrázek 24 jsou vyznačeny vypočtené průměrné hodnoty počtu narostlých mikroorganismů (vyjádřené jako log CFU/ml) získaných z kombuchy vyrobené ze zeleného čaje. Původní násada pochází ze zdroje F*.

U analyzovaného vzorku 1F* si lze všimnout, že na všech 3 půdách byl nárůst podobný, zatímco vzorek 2F* ukazuje odlišné hodnoty, jak lze vyčíst z přiloženého grafu. U vzorku 2F* byl největší nárůst mikroorganismů pozorován na půdě CHYGA s nejvyšší hodnotou $5,51 \cdot 10^5$ CFU/ml. Při srovnání se vzorkem 1F* bylo zaznamenáno méně izolátů, neboť neprošel procesem fermentace (byl odebrán 0. den).



Obrázek 25: Počty mikroorganismů vyrostené v kombuše ze zeleného čaje – TS*

Obrázek 25 znázorňuje výsledky z analýzy počtu mikroorganismů ve vzorku kombuchy původem z Tvořivého světa, připravené ze zeleného čaje. Na půdách CHYGA a AA převyšoval dle očekávání počet narostlých kolonií ze vzorku odebraného 5. den fermentace počet mikroorganismů v odběru 0. den. Nicméně na půdě MRSA tomu bylo naopak a vyšší počet narostlých kolonií bylo zjištěn ve vzorku 2TS*, který byl odebrán ještě před počátkem fermentačního procesu. Vyšší počet mikroorganismů může být vysvětlen tak, že při nanášení na půdy pomocí Spiral plateru mohlo dojít například ke kontaminaci.



Obrázek 26: Počty mikroorganismů vyrostené v kombuše ze zeleného čaje – VC*

Poslední analyzovaný vzorek byl získán z webové stránky Vital Country. Na Obrázek 26 je uveden graf, v němž jsou znázorněny počty izolovaných kolonií na jednotlivých půdách. Byly srovnávány odběry před a po fermentaci (1VC* a 2VC*).

Průměrné množství narostlých kolonií izolovaných ze vzorku 1VC* byl na všech půdách poměrně srovnatelný. Ve vzorku 2VC* se počet izolovaných mikroorganismů lišil v závislosti na použitém živném agaru. Nejvíce izolátů bylo získáno na půdě MRSA. Identifikace vybraných mikroorganismů a její vyhodnocení. Oproti tomu na půdě pro octové bakterie nebyla nalezena žádná kolonie, tudíž nebylo možné vypočítat CFU/ml.

Některé z narostlých kolonií byly vybrány pro další analýzu a byly přeočkovány na nové půdy pomocí křížového roztěru. Zvoleny byly kolonie o různých morfologických vlastnostech, např. zbarvení – některé měly růžové zbarvení, jiné byly bílé, velikost, konzistence apod.

Jak bylo psáno v metodické části 7.3 bylo nutné vícekrát tento proces zopakovat pro zajištění co nejvyšší čistoty kultury. Výsledkem křížového roztěru byl nárůst vybraných mikroorganismů s cílem získání jednotlivých přečištěných kolonií (Obrázek 27 a Obrázek 28).

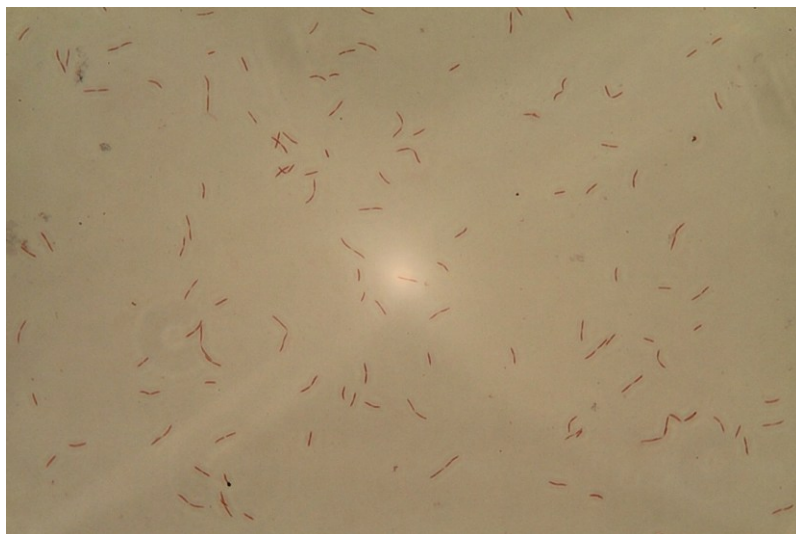


Obrázek 27: Vybrané izolované kmeny na půdě CHYGA

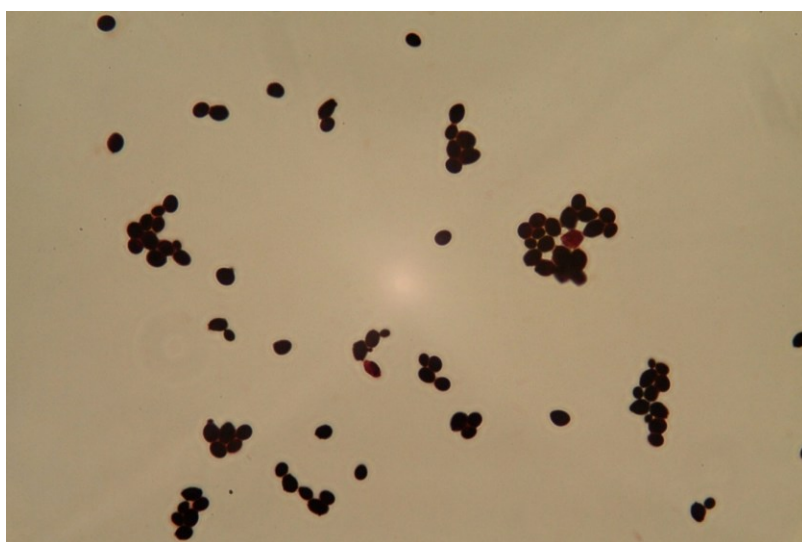


Obrázek 28: Vybraný izolovaný kmen na Acetobacter agaru

Pomocí Gramova barvení byla následně prokázána dostatečná čistota izolátů. Navíc díky obarvení a zmikroskopování bylo možné rozeznat, zda se jedná o bakterie nebo kvasinky. Na obrázcích níže můžeme vidět příklady přečištěné kultury gramnegativních tyčinek (Obrázek 29) a kvasinek (Obrázek 30), které byly pozorovány pod mikroskopem.



Obrázek 29: Gramnegativní tyčinky po obarvení pozorované mikroskopem



Obrázek 30: Kvasinky pozorované mikroskopem

Z izolovaných a přečištěných kolonií bylo vybráno celkem 47 mikroorganismů pro další analýzu – izolaci DNA a její následnou sekvenaci. 22 izolátů pocházelo ze vzorků kombuch ze zeleného čaje a zbylých 25 izolátů bylo z kombuch připravených z nálevu černého čaje.

V tabulkách níže (Tabulka 4 až Tabulka 6) jsou uvedeny izoláty kombuch z černého čaje vybrané k následné identifikaci. Jsou zde znázorněny konkrétní vzorky kombuchových nápojů a na jakých půdách byly kmeny izolovány. První kombuchy byly vyráběny z černého čaje a později ze zeleného.

Tabulka 4: Izoláty vybrané k identifikaci z kombuchy z černého čaje – zdroj Fermentárum

Vzorek kombuchy*	Půda	Označení izolátu
1F	CHYGA	C06
2F	CHYGA	C07
1F	MRSA	C09
2F	MRSA	C13
1F	AA	C17
1F	CHYGA	C65
1F	AA	C68
2F	CHYGA	C72
2F	MRSA	C78

*F = zdroj Fermentárum, 1 = vzorky kombuch z 5. dne fermentace, 2 = vzorky z 0. dne fermentace

V tabulce výše jsou vypsány izolované kmeny z kombuchy z černého čaje s původem ze zdroje Fermentárum. K další analýze bylo vybráno celkem 9 kmenů – 5 vzorků bylo izolováno z kombuchy po 5 dnech fermentace a 4 vzorky byly odebrány na počátku fermentačního procesu. V tabulce jsou uvedeny u každého vzorku také půda, na které byla kolonie kultivována. Z půdy CHYGA byly izolovány 4 kmeny, z půdy MRSA byly vybrány 3 izolované kmeny a z půdy AA byly kultivovány a zvoleny 2 kmeny.

Tabulka 5 ukazuje izoláty kombuch z černého čaje z Tvořivého světa. Vybráno bylo 8 kmenů, z toho 4 izoláty jsou z fermentované kombuchy a 4 izolované kmeny jsou z počátku fermentace. Nejvíce vybraných izolátů bylo z půdy CHYGA, 2 kmeny byly kultivovány na agaru pro octové bakterie a poslední 2 kmeny jsou z půdy MRSA.

Tabulka 5: Izoláty vybrané k identifikaci z kombuchy z černého čaje – zdroj Tvořivý svět

Vzorek kombuchy*	Půda	Označení izolátu
1TS	AA	C19
1TS	CHYGA	C20
2TS	CHYGA	C25
2TS	AA	C32
1TS	MRSA	C47
1TS	CHYGA	C49
2TS	CHYGA	C57
2TS	MRSA	C59

*TS = Tvořivý svět, 1 = po 5 dnech fermentace, 2 = odběry z 0. dne fermentace

V Tabulka 6 jsou uvedeny zbylé vybrané kmeny k následné analýze. Kmeny byly izolovány z kombuchy z černého čaje s původní násadou ze zdroje Vital Country.

Tabulka 6: Izoláty vybrané k identifikaci z kombuchy z černého čaje – zdroj Vital Country

Vzorek kombuchy*	Půda	Označení izolátu
1VC	CHYGA	C14
2VC	CHYGA	C33
2VC	CHYGA	C34
2VC	AA	C38
2VC	AA	C40
2VC	AA	C41
1VC	CHYGA	C44
1VC	CHYGA	C45

*VC = Vital Country, 1 = 5. den fermentace, 2 = 0. den fermentace

Ze vzorku 1VC byly izolovány, a tedy i vybrány pouze 3 kmeny, neboť násada byla zatím tenká a nárůst mikroorganismů nebyl dostatečný. 5 kmenů bylo vybráno z půdy CHYGA a 3 kmeny z půdy Acetobacter agar.

V tabulkách níže jsou zaznamenány izoláty z kombuch ze zeleného čaje, které byly vybrány pro další analýzu. V Tabulka 7 jsou uvedeny vzorky kombuch z nálevu zeleného čaje, přičemž původní houba byla z e-shopu Fermentárum. Tři kmeny pocházely z odběrů po 5 dnech fermentace a 5 izolátů bylo z odběrů hned po výměně nového substrátu. Nejvíce kmenů bylo kultivovaných na půdě CHYGA (2 kmeny 1F a 2 kmeny 2F). Z půdy AA byly vybrány 2 izoláty pro další analýzu. Z půdy MRSA byl vybrán po předchozím morfologickém vyhodnocení pouze 1 izolovaný kmen.

Tabulka 7: Izoláty vybrané k identifikaci z kombuchy ze zeleného čaje – zdroj Fermentárum

Vzorek kombuchy*	Půda	Označení izolátu
1F	CHYGA	Z107
1F	CHYGA	Z108
1F	MRSA	Z113
2F	AA	Z139
2F	AA	Z141
2F	CHYGA	Z142
2F	CHYGA	Z143
2F	MRSA	Z146

*F = Fermentárum, 1 = 5. den fermentace, 2 = 0. den fermentace

Tabulka 8 udává sedm vybraných kolonií izolovaných z kombuch ze zeleného čaje původem z Tvořivého světa. Čtyři kmeny byly izolovány z kombuchy po 5 dnech fermentace a 3 kmeny pocházely z kombuchy z počátku fermentace.

Tabulka 8: Izoláty vybrané k identifikaci z kombuchy ze zeleného čaje – zdroj Tvořivý svět

Vzorek kombuchy*	Půda	Označení izolátu
1TS	AA	Z80
1TS	CHYGA	Z83
1TS	CHYGA	Z84
1TS	MRSA	Z89
2TS	AA	Z115
2TS	CHYGA	Z120
2TS	MRSA	Z123

* TS = Tvořivý svět, 1 = 5. den fermentace, 2 = 0. den fermentace

Opět nejvíce mikroorganismů bylo izolovaných na půdě CHYGA – 3 kmeny, jak lze vidět v tabulce 8. Z půdy pro octové bakterie byly vybrány pro analýzu 2 kmeny – jeden kmen z odběru po 5 dnech fermentace a jeden na počátku fermentačního procesu. To samé platí pro izoláty z MRSA.

Tabulka 9: Izoláty vybrané k identifikaci z kombuchy ze zeleného čaje – zdroj Vital Country

Vzorek kombuchy*	Půda	Označení izolátu
1VC	CHYGA	Z95
1VC	CHYGA	Z96
1VC	MRSA	Z99
2VC	AA	Z127
2VC	AA	Z129
2VC	CHYGA	Z131
2VC	MRSA	Z134

*VC = Vital Country, 1 = 5. den fermentace, 2 = 0. den fermentace

V tabulce 9 výše jsou uvedeny zbylé izoláty z kombuch ze zeleného čaje původem z Vital Country, které byly vybrány pro finální identifikaci. Tři kmeny byly izolované z kombuchy 5. den fermentace – 2 izoláty byly z půdy CHYGA a 1 z MRSA. Čtyři kmeny jsou vybrané izoláty z kombuchy se zeleným čajem, které byly odebrány na počátku fermentace po výměně nového substrátu.

8.1.3 Výsledky izolace DNA

Po extrakci DNA z vybraných vzorků, jejíž postup je podrobně popsán v metodické části této práce, byla spektrofotometricky změřena koncentrace izolované DNA pomocí přístroje Tecan. Přístroj následně automaticky detekoval absorbanci při 260 nm a přepočítal ji na koncentraci DNA. Zároveň bylo možné ověřit čistotu eluované DNA při absorbanci 280 nm. Získané koncentrace a informace o čistotě byly programem zobrazeny v excelu.

Nauvedeném Obrázek 31 je znázorněno vyhodnocení z měření koncentrace a čistoty na přístroji Tecan. Tyto změřené vzorky pocházejí z izolátů z kombuch z černého čaje. Jednotka ng/μl je pro změřenou koncentraci a ratio je čistota izolované DNA, tedy poměr absorbance 260/280 nm.

	1				2			
A	Abs		Value		Abs		Value	
	260	0,0143 OD	14,3	ng/μl	260	0,0499 OD	49,9	ng/μl
B	280	0,0069 OD	2,07	ratio	280	0,0233 OD	2,14	ratio
	Abs		Value		Abs		Value	
C	260	0,0076 OD	7,6	ng/μl	260	0,0494 OD	49,4	ng/μl
	280	0,0037 OD	2,05	ratio	280	0,0245 OD	2,02	ratio
D	Abs		Value		Abs		Value	
	260	0,0141 OD	14,1	ng/μl	260	0,0099 OD	9,9	ng/μl
E	280	0,0071 OD	1,99	ratio	280	0,0043 OD	2,3	ratio
	Abs		Value		Abs		Value	
F	260	0,0085 OD	8,5	ng/μl	260	0,0096 OD	9,6	ng/μl
	280	0,0038 OD	2,24	ratio	280	0,0045 OD	2,13	ratio
	Abs		Value		Abs		Value	
	260	0,0638 OD	63,8	ng/μl	260	0,0308 OD	30,8	ng/μl
	280	0,0314 OD	2,03	ratio	280	0,0143 OD	2,15	ratio
	Abs		Value		Abs		Value	
	260	0,0165 OD	16,5	ng/μl	260	0,0077 OD	7,7	ng/μl
	280	0,0077 OD	2,14	ratio	280	0,0039 OD	1,97	ratio

Obrázek 31: Vyhodnocení změřené koncentrace a čistoty vybraných izolovaných DNA

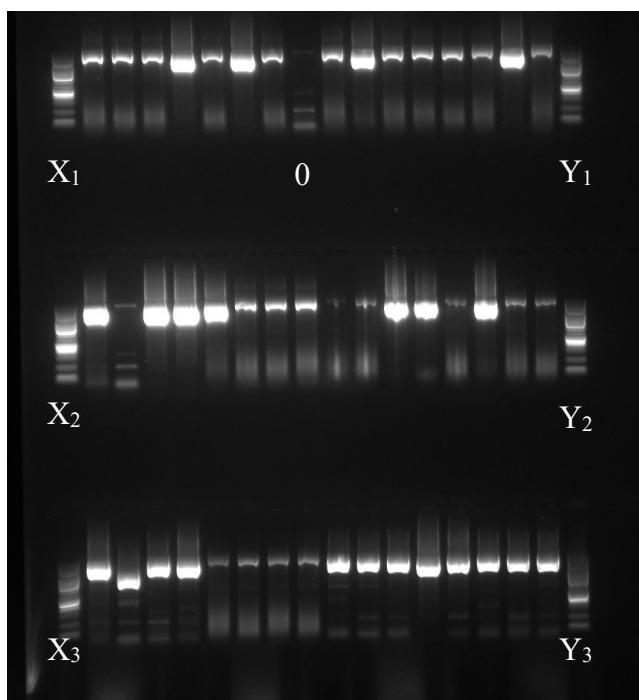
Legenda: A1 = C06, A2 = C09, B1 = C14, B2 = C17, C1 = C19, C2 = C20, D1 = C44, D2 = C45, E1 = C47, E2 = C49, F1 = C65, F2 = C68

Dle uvedených výsledků byl nejvíce koncentrovaný vzorek s číslem C47. Na druhou stranu nejmenší naměřená koncentrace byla u vzorku označeném C14. U všech vzorků se čistota pohybovala kolem 2,00, což ukazuje na dostatečnou kvalitu DNA pro následující PCR.

8.1.4 Vyhodnocení PCR reakce a elektroforézy

Pro potvrzení správně provedené PCR byla provedena elektroforéza. Níže je uveden Obrázek 32 z první elektroforézy, kdy byly použity primery pro bakterie (FD1 a RD1), u nichž byl očekáván produkt o velikosti přibližně 1500 bp (párů bází). Vzorky s méně výraznými frakcemi byly podrobeny i PCR s druhým párem primerů (tj. pro kvasinky), kde byla předpokládána velikost ampliconu 3 400–5 000 bp.

Do gelu byly nanášely pro ohraničení markery, které jsou vždy na okrajích řádku (X,Y). Pro kontrolu čistoty a správného provedení byla provedena negativní kontrola bez DNA obsahující stejný objem sterilní vody. Kontrola je označena na obrázku číslem 0.



Obrázek 32: Vyhodnocení elektroforézy po PCR s primery FD1 a RD1

Nanášené vzorky do jamek v gelu: X₁ – C44, C20, C19, C17, C14, C09, C06, 0 (kontrolní vzorek), C45, C47, C49, C65, C68, C07, C13, C25 – Y₁; X₂ – C59, C57, C41, C40, C38, C34, C33, C32, C72, C78, Z80, Z83, Z84, Z89, Z95, Z96 – Y₂; X₃ – Z127, Z123, Z120, Z115, Z113, Z108, Z107, Z99, Z129, Z131, Z134, Z139, Z141, Z142, Z143, Z146 – Y₃

Za účelem zajištění dostatečné čistoty vzorku byla provedena purifikace DNA. Přechištěné vzorky byly následně sekvenovány externí firmou. Od každého vzorku byly provedeny dvě sekvenace, jedna s primerem forward a druhá s primerem reverse.

U některých sekvenovaných DNA se objevily nejednoznačné části, chyby, které bylo nutné ručně opravit pomocí programu DNA Baser Assembler.



Obrázek 33: Oprava sekvenace s primerem reverse – kmen C13

Na Obrázek 33 je znázorněna část získané sekvenace izolovaného kmene C13. Jedná se konkrétně o řetězec s primerem reverse RD1. Na obrázku lze vidět, že bázi na pozici 1003 nebylo možné jasně určit, ani program ji nerozpoznal automaticky, tudíž bylo nutné opravit chybu v Assembleru ručně před samotným spojením řetězců reverse s forward.

Descriptions								
Sequences producing significant alignments								
Download Select columns Show 100								
select all 100 sequences selected								
GenBank Graphics Distance tree of results MSA Viewer								
Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
☒ Gluconobacter sp. R75690.16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Gluconobacter sp. R...	2499	2499	100%	0.0	100.00%	1480	MT355094.1
☒ Gluconobacter potus strain LMG 1764.16S ribosomal RNA, partial sequence	Gluconobacter potus	2499	2499	100%	0.0	100.00%	1472	NR_181154.1
☒ Gluconobacter oxydans strain MH2.16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Gluconobacter oxydans	2492	2492	100%	0.0	100.00%	1368	OK178239.1

Obrázek 34: Vyhodnocení sekvenace kmene C13 pomocí programu nBLAST

Na Obrázek 34 je vyhodnocení finální sekvenace v programu nBLAST. Sekvence byla srovnávána s příslušnou databází a byla nalezena 100 % shoda se sekvencemi uloženými v databázi. Jelikož nebylo jasné, o který druh se jedná, tak byl kmen identifikován na rodové úrovni – *Gluconobacter* sp.

8.1.5 Identifikované mikroorganismy

Z celkových 47 mikroorganismů odeslaných k sekvenaci DNA bylo možné identifikovat 44 kmenů. Z tohoto počtu bylo 29 kmenů zařazených mezi kvasinky:

- 10 kmenů *Brettanomyces bruxellensis*,
- 9 kmenů náležících do rodu *Zygosaccharomyces*,
- 3 kmeny *Starmerella davenportii*,
- 4 kmeny *Rhodotorula mucilaginosa*,
- 2 kmeny *Saccharomyces cerevisiae*,
- 1 kmen *Filobasidium wieringae*.

Zbýlých 15 kmenů náleželo mezi bakterie:

- 7 kmenů do rodu *Gluconobacter* sp.,
- 2 zástupci druhu *Komagataeibacter rhateicus*,
- 1 izolát do rodu *Micrococcus*,
- 2 zástupci do rodu stafylokoků – *S. haemolyticus* a *S. pasteurii*,
- 1 kmen druhu *Stenotrophomonas maltophilia*,
- 1 kmen *Corynebacterium falsenii*,
- 1 kmen byl označen jako nekultivovaný bakteriální klon.

Z celkových 47 vzorků DNA nebylo možné identifikovat 3 kmeny (Z108, Z141 a Z115). Sekvence nebyly dostatečně čisté, tudíž je nebylo možné rozeznat ani programem BLAST.

V následujících čtyřech tabulkách jsou uvedeny jednotlivé identifikované kmeny z konkrétních vzorků kombuch, jak z černého, tak i ze zeleného čaje a k nim i příslušná identifikační skóre.

Tabulka 10: Identifikované mikroorganismy z kombuchy z černého čaje – odběry 5. den fermentace

Označení kmene*	Identifikovaný mikroorganismus	Identifikační %
C06-F	<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	93,02
C65-F	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	96,34
C09-F	<i>Gluconobacter oxydans</i>	99,93
C17-F	<i>Gluconobacter</i> sp.	98,25
C68-F	<i>Micrococcus</i> sp.	91,72
C14-VC	<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	96,37
C44-VC	<i>Brettanomyces bruxellensis</i>	99,88
C45-VC	<i>Zygosaccharomyces kombuchaensis</i>	98,28
C47-TS	<i>Komagataeibacter rhateicus</i>	99,75
C49-TS	<i>Starmerella davenportii</i>	100
C19-TS	<i>Brettanomyces bruxellensis</i>	99,88
C20-TS	<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	93,08

*F = Fermentárium, TS = Tvořivý svět, VC = Vital Country

V tabulce 10 jsou vypsány identifikované mikroorganismy ze vzorků kombuch z černého čaje, které byly odebrány po 5 dnech fermentace. Označení vzorku obsahuje také informaci, z jaké násady byla kombucha vytvořena. U každého mikroorganismu je také uveden uvedeno skóre identifikace v % neboli procentuální shoda sekvenované DNA s mikroorganismy v databázi. Jinými slovy se dá říct, že se jedná o % podobnosti sdílené se sekvencemi uloženými v databázi nBLAST.

Z kombuchového nápoje z nálevu černého čaje bylo celkem izolováno a identifikováno 12 mikrobiálních kmenů, z čehož 8 kmenů byly kvasinky a 4 kmeny bakterie (zvýrazněny oranžově).

Z kombuchy s nálevem černého čaje bylo 5 kmenů identifikováno ze zdroje Fermentárum (3 bakteriální a 2 kvasinkové kmeny). Čtyři izoláty byly z kombuchy původem ze zdroje Tvořivý svět (1 kmen bakterie, 3 kmeny kvasinek) a z násady Vital Country byly identifikovány 3 kmeny kvasinek.

Identifikační skóre s hodnotou vyšší než 99 % může být považována za jednoznačnou identifikaci. V tabulce jsou tyto hodnoty vyznačeny tučně. Při nižším procentu identifikace je možné, že izolované kmeny mikroorganismů nebyly dostatečně čisté, výsledky sekvenace obsahovaly nepřesnosti, což vyžadovalo dodatečné úpravy. Se 100 % byla přesná identifikace kmene C49 a jednalo se o kvasinku *Starmerella davenportii*. Naopak s nejnižší přesností byl identifikován kmen s označením C68, který patří mezi bakterie a s identifikačním skóre 91,7 % byl zařazen do rodu *Micrococcus*.

Starmerella davenportii je méně známý, ale významný druh kvasinky, který byl identifikován v několika studiích zabývajících se mikrobiální diverzitou kombuchy. Výsledky některých výzkumů ukázaly, že má tento druh potenciál při tvorbě aroma a zároveň přispívá k unikátní chuti fermentovaného nápoje. Navíc některé kmeny tohoto rodu byly zkoumány pro své probiotické vlastnosti, včetně schopnosti přežít v gastrointestinálním traktu a potenciálně přispívat k zdraví střevního mikrobiomu. [101]

Ve vzorku kombuchy z černého čaje, který byl odebrán po 5 dnech fermentace byly nalezeny mikroorganismy, které se běžně vyskytují v kombuchovém nápoji. [46] [77] Avšak výjimkou je rod *Micrococcus*. Tento rod není typickou součástí mikrobiálního společenství SCOBY. Jedná se spíše o kontaminant z vnějšího prostředí. Jeho přítomnost může být důsledkem nedostatečné hygieny během přípravy nebo fermentace.

V případě izolátů z kombuchy z černého čaje odebrané 0. den (Tabulka 11) byly identifikované mikroorganismy různorodější v porovnání s izoláty z prvního odběru (Tabulka 10). Dokonce více kmenů bylo dle veřejně dostupné databáze identifikováno se skóre vyšším než 99 %. Izolováno bylo 13 kmenů, z toho 5 řadíme mezi bakterie, 8 kmenů bylo identifikováno jako kvasinky.

Nejvíce identifikovaných kmenů bylo z kombuchy ze zdroje Vital country. Další 4 kmeny byly z kombuchy s houbou z Tvořivého světa a zbylé 4 kmeny pocházely z kombuchy ze zdroje Fermentárum.

Tabulka 11: Identifikované mikroorganismy z kombuchy z černého čaje – odběry 0. den fermentace

Označení kmene*	Identifikovaný mikroorganismus	Identifikační %
C07-F	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	97,15
C72-F	<i>Filobasidium wieringae</i>	100
C78-F	<i>Brettanomyces bruxellensis</i>	100
C13-F	<i>Gluconobacter</i> sp.	100
C25-TS	<i>Starmerella davenportii</i>	99,80
C32-TS	<i>Brettanomyces bruxellensis</i>	100
C57-TS	<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	98,66
C59-TS	<i>Komagataeibacter rhateicus</i>	99,84
C38-VC	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	99,84
C40-VC	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	99,77
C41-VC	<i>Staphylococcus pasteurii</i>	97,51
C33-VC	<i>Zygosaccharomyces kombuchaensis</i>	98,53
C34-VC	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	99,89

*F = Fermentárium, TS = Tvořivý svět, VC = Vital Country

Se 100% přesností byl identifikován kmen označen C13, který byl zařazen do rodu *Gluconobacter*. Další identifikovanou bakterií byl *Komagataeibacter rhateicus*, s podobností sekvence 99,84 %. Většinou se jedná o dominující bakterie podílející se na fermentaci kombuchy. [46]

Ze vzorku odebraného hned po výměně nového substrátu byly kromě běžné kombuchové mikrobioty izolovány také bakterie, které často nejsou schopny přežít v kyselém prostředí. Například byly identifikovány některé druhy rodu *Staphylococcus*. Tyto bakterie by se neměly vyskytovat v kombuše, neboť se jedná o kvašený nápoj, který obsahuje kyselinu octovou a další organické látky. Díky těmto látkám má antimikrobiální vlastnosti a patogeny se v ní zpravidla dlouho neudrží. Jak je uvedeno v publikaci o bakteriálních patogenech ve fermentovaných čajích [102], kontaminace může nastat v počátečních fázích

fermentace, než dojde k dostatečnému snížení pH na úroveň pro inhibici patogenů. Jelikož byl odběr vzorku prováděn na počátku fermentace, je výskyt těchto mikroorganismů teoreticky možný. Navíc konkrétně *Staphylococcus pasteurii*, izolát C41, je běžně se vyskytující druh stafylokoka, např. v půdě, vodě, potravinách, nebo může být součástí mikrobioty lidí a zvířat. [103]

Kromě výše zmiňovaných byl izolován také bakteriální druh *Stenotrophomonas maltophilia*. Jedná se o oportunní patogen, gramnegativní aerobní tyčinky, vyskytuje se v půdě, vodě nebo v nemocničním prostředí a může být původcem infekcí. [104] Jeho výskyt v kombuše jako finálním produktu není žádoucí a výskyt naznačuje kontaminaci z prostředí, například ze surovin nebo nedostatečné hygieny během přípravy.

I když nejsou známy výzkumy zabývající se přímo výskytem této bakterie v kombuše, některé studie se však zaměřily na antimikrobiální účinky bioaktivních látek obsažených v zeleném čaji, především epigallokatechin-3-galátu (EGCg). Jedna ze studií, publikovaná v časopise *PLOS ONE*, prokázala výraznou antibiotickou aktivitu EGCg vůči izolátům *Stenotrophomonas maltophilia*. [104]

Dalším izolovaným mikroorganizmem byla kvasinka *Rhodotorula mucilaginosa*. Tento druh kvasinky se běžně vyskytuje v prostředí, díky obsahu karotenoidních pigmentů tvoří do růžova zbarvené kolonie. [105] Pro svůj růst potřebuje kyslík a není příliš limitovaná substrátem. V této práci byla izolována na všech třech půdách – CHYGA, AA i MRSA (Obr. 35).



Obrázek 35: *Rhodotorula mucilaginosa* na živných půdách MRSA, AA a CHYGA

V rané fázi fermentace, ještě při vyšším pH kolem 5, neboli po přidání čerstvého oslazeného čaje, je prostředí příznivější pro růst různých druhů mikroorganismů, včetně *R. mucilaginosa*. Jejich růst s klesajícím pH a také aktivitou jiných mikroorganismů podílejících se na fermentaci bývá inhibován. Samozřejmě důsledná hygiena a čistota pracovních pomůcek, fermentačních nádob, je klíčová pro eliminaci kontaminantů. [105]

Mezi dominující kvasinky, které byly v naší studii izolovány z kombuch z černého čaje patří *Brettanomyces bruxellensis* a zástupci rodu *Zygosaccharomyces* reprezentované druhy *Z. bailii*, *Z. rouxii* a *Z. kombuchaensis*. V rámci hodnocení kvasinkové složky mikrobioty byly v námi analyzovaných vzorcích kombuchy z černého čaje odebraných na počátku fermentace identifikovány 2 kmeny druhu *B. bruxellensis* a 3 kmeny rodu *Zygosaccharomyces*. Přítomnost těchto druhů je v souladu s výsledky z jiných studií [106], které poukazují na hojné zastoupení rodu *Brettanomyces* v prostředí fermentace kombuchy, a to především díky jejich schopnosti přežít v kyselém prostředí a při nízké dostupnosti živin. Druh *B. bruxellensis* je známý svými metabolickými schopnostmi produkovat kyselinu octovou a etanol, čímž významně ovlivňuje jak organoleptické vlastnosti nápoje, tak dynamiku mikrobiálních interakcí. Kmeny *Zygosaccharomyces* sp. jsou také schopny adaptovat se na kyselé prostředí a je tolerantní k obsahu etanolu. Díky těmto vlastnostem jsou schopny přežívat i v pozdějších fázích fermentace. [106]

V počátečních fázích fermentačního procesu byl z kombuchy z černého čaje izolován také druh *Filobasidium wieringae*. Tento druh není běžně uváděn jako součást mikrobioty kombuchy [46], což naznačuje, že jeho výskyt může souviset s kontaminací z vnějšího prostředí. Možným zdrojem kontaminace může být pravděpodobně nedostatečná čistota nádoby nebo případně kontaminace čajových lístků během skladování. Jelikož jsem pracovala v domácích podmínkách, kde nebylo možné dokonale zajistit sterilní prostředí, je taková kontaminace možná.

Vzhledem k tomu, že v počátečních fázích fermentace je dostupnost cukru vysoká a množství aktivních mikroorganismů nízké, může *F. wieringae* dočasně kolonizovat fermentační prostředí. Později bývá konkurenčními mikroorganismy, jako jsou *Brettanomyces* a *Komagataeibacter*, vytlačen, [77]. Takže by jeho výskyt měl být pouze přechodný, než se začnou prosazovat mikroorganismy, které se významněji podílejí na fermentaci kombuchového nápoje.

V tabulkách níže (Tabulka 12 a Tabulka 13) jsou uvedeny identifikované kmeny mikroorganismů, které byly izolovány ze vzorků kombuch ze zeleného čaje.

V kombuchách odebraných po 5 dnech fermentace (Tabulka 12) pocházely 2 kmeny ze zdroje Fermentárum, 3 kmeny z Vital Country a z posledního zdroje bylo izolováno nejvíce kmenů, konkrétně 4 izoláty.

Tabulka 12: Identifikované kmeny z kombuchy ze zeleného čaje – odběry po 5 dnech fermentace

Označení kmene*	Identifikovaný mikroorganismus	Identifikační %
Z80-TS	<i>Gluconobacter</i> sp.	99,84
Z83-TS	<i>Gluconobacter</i> sp.	99,76
Z89-TS	<i>Gluconobacter oxydans</i>	99,92
Z84-TS	<i>Brettanomyces bruxellensis</i>	100
Z95-VC	<i>Zygosaccharomyces kombuchaensis</i>	98,53
Z96-VC	<i>Brettanomyces bruxellensis</i>	100
Z99-VC	<i>Brettanomyces bruxellensis</i>	100
Z107-F	<i>Brettanomyces bruxellensis</i>	99,46
Z113-F	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	95,90

*F = Fermentárum, TS = Tvořivý svět, VC = Vital Country

Celkem bylo identifikováno 9 kmenů, z nichž byly 3 kmeny bakteriální a 6 kmenů kvasinek. Všechny bakterie patřily do rodu *Gluconobacter*. U kvasinek převažoval druh *B. bruxellensis*. Se 100 % přesností byla identifikována sekvence celkem 3 izolátů tohoto druhu. Dále byly izolovány druhy *Z. kombuchaensis* a *Saccharomyces cerevisiae*. Avšak tyto kmeny byly identifikovány s podobností sekvence nižší než 99 %.

V odebraných vzorcích Z80-Z113 byly identifikovány všechny mikroorganismy, které bývají běžnou součástí společenství kombuchy [46] [77].

V Tabulka 13 jsou uvedeny identifikované mikroorganismy, které byly izolovány z kombuch ze zeleného čaje na počátku fermentace. Čtyři kmeny byly ze vzorku kombuchy Fermentárum, další 4 z Vital Country a pouze 2 kmeny byly izoláty původem ze zdroje Tvořivý svět.

Tabulka 13: Identifikované kmeny z kombuchy ze zeleného čaje – odběry 0. den fermentace

Označení kmene*	Identifikovaný mikroorganismus	Identifikační %
Z120-TS	<i>Starmerella davenportii</i>	100
Z123-TS	uncultured compost bacterium clone	99,45
Z127-VC	<i>Corynebacterium falsenii</i>	97,41
Z129-VC	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	100
Z131-VC	<i>Brettanomyces bruxellensis</i>	100
Z134-VC	<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	97,02
Z139-F	<i>Gluconobacter</i> sp.	99,76
Z142-F	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	100
Z143-F	<i>Brettanomyces bruxellensis</i>	100
Z146-F	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	100

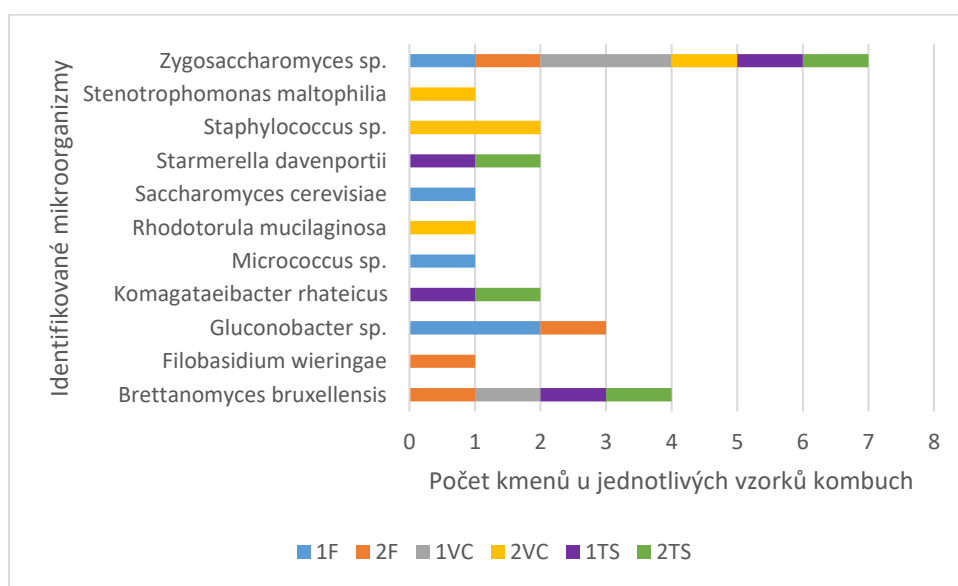
*F = Fermentárium, TS = Tvořivý svět, VC = Vital Country

Identifikované druhy z těchto rozborů byly více rozmanité. U těchto odběrů bylo identifikováno nejvíce kmenů se 100 % shodou sekvence s kmeny uloženými v databázi. Mezi ně patřily 3 kmeny *R. mucilaginosa*, 2 kmeny *B. bruxellensis* a 1 kmen *Starmerella davenportii*. Naopak s nejmenšími identifikačními procenty byly rozpoznány 2 izolované kmeny: bakteriální kmen *Corynebacterium falsenii* a kvasinka *Z. bailii*.

V některých studiích zabývajících se mikrobiologickým složením kombuchy [107] byly detekovány sekvence patřící do rodu *Corynebacterium*. Avšak nález tohoto druhu je neobvyklý. Jeho přítomnost může být důsledkem kontaminace z prostředí, surovin nebo vybavení používaného během přípravy nápoje.

Mezi identifikovanými kmeny označenými Z120-Z146 náležely 3 do skupiny bakterií a zbylých 7 patřilo mezi kvasinky. Ze všech vzorků byl jeden kmen identifikován jako nekultivovatelná bakterie přiřazena neboli „uncultured compost bacterium clone“ – sekvence vykazovala shodu s nekultivovaným bakteriálním klonem pocházejícím z kompostu.

Nicméně jak dokazují některé studie [108], v kombuše je běžný i výskyt mléčných tyčinek – laktobacilů a nově vytvořených rodů původem zařazených mezi laktobacily. Většinou jsou přítomny v nižších počtech na počátku fermentace a později, v průběhu času, může jejich populace vzrůstat. V analyzovaných vzorcích se však mezi vybranými mikroorganismy nevyskytovaly žádné kmeny náležící mezi mléčné tyčinky. Pravděpodobně 5 dnů nebyla dostatečně dlouhá doba pro jejich růst. Mléčné bakterie se spíše vyskytují a stávají se dominantnějšími až v pozdějších fázích fermentace, kdy se sníží dostatečně pH prostředí. [109]

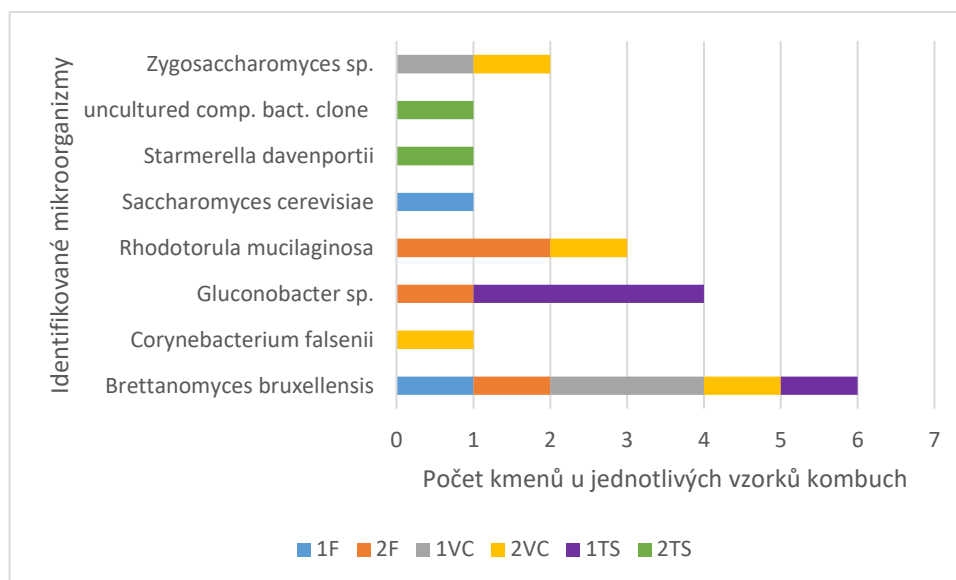


Obrázek 36: Zastoupení identifikovaných kmenů mikroorganismů v kombuchách z černého čaje

Legenda: F = Fermentárium, TS = Tvořivý svět, VC = Vital Country, 1 = odběr po 5 dnech fermentace, 2 = odběr na počátku fermentace

Na obrázku 36 je znázorněno grafické zastoupení všech identifikovaných mikroorganismů v jednotlivých vzorcích kombuch z černého čaje. Z grafu lze vyčíst, že identifikované kmeny kvasinek rodu *Zygosaccharomyces* se vyskytovaly ve všech třech vzorcích kombuch. Dva kmeny tohoto rodu byly izolovány z analyzovaného vzorku 1VC. Mikroorganismy *Stenotrophomonas maltophilia*, *Rhodotorula mucilaginosa* a 2 kmeny z rodu stafylokoků byly identifikovány pouze u vzorku 2VC.

Celkově si lze všimnout, že mikrobiota se poměrně liší u jednotlivých vzorků. Výjimkou jsou vzorky 1TS a 2TS, jejichž mikrobiologické složení je dle rozborů velmi podobné a v průběhu fermentačního procesu došlo jen k minimálním změnám.

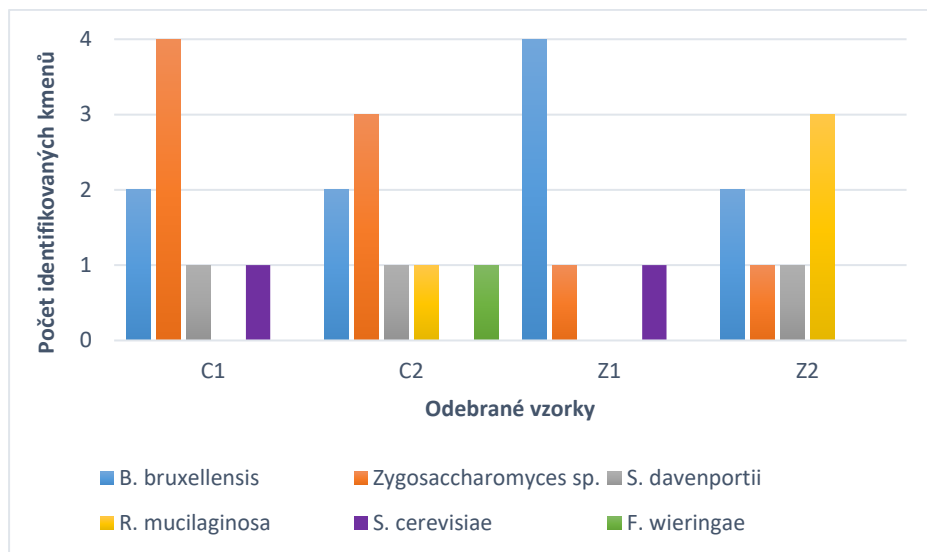


Obrázek 37: Zastoupení identifikovaných kmenů mikroorganismů v kombuchách ze zeleného čaje

Legenda: F = Fermentárium, TS = Tvořivý svět, VC = Vital Country, 1 = odběr po 5 dnech fermentace, 2 = odběr na počátku fermentace

Obrázek 37 představuje graf s identifikovaným počtem mikroorganismů u konkrétních vzorků kombuch ze zeleného čaje. Jedním z hlavních rozdílů v porovnání s předchozím grafem je, že nejvíce kmenů bylo identifikovaných jako druh *Brettanomyces bruxellensis*. Ze vzorku 2TS byly vybrány k identifikaci pouze 2 kmeny, z nichž pouze 1 byl zařazen k druhu *Starmerella davenportii* a druhý kmen nebyl přesně identifikován. Nejvíce kmenů *Gluconobacter* sp. bylo identifikováno ze vzorku 1TS. Další mikroorganizmus se shodnou sekvencí také s rodem *Gluconobacter* byl izolován ze vzorku kombuchy 2F.

Na Obrázek 38 je znázorněn graf všech identifikovaných kmenů kvasinek u jednotlivých odebraných vzorků kombuch. Osa y udává přesný počet identifikovaných kmenů od daných taxonů kvasinek. Při studii z roku 2021 [46] bylo na počátku fermentačního procesu izolováno více osmotolerantních kvasinek kvůli vyššímu obsahu cukru, např. *Zygosaccharomyces* sp., po octovém kvašení začínaly převažovat kmeny odolnější vůči kyselému prostředí, jako je *Brettanomyces* sp. Dle výsledků naší studie se toto tvrzení nepodařilo potvrdit, ani vyvrátit. Je možné, že v případě vyššího počtu identifikovaných kmenů by byly výsledky více jednoznačné.

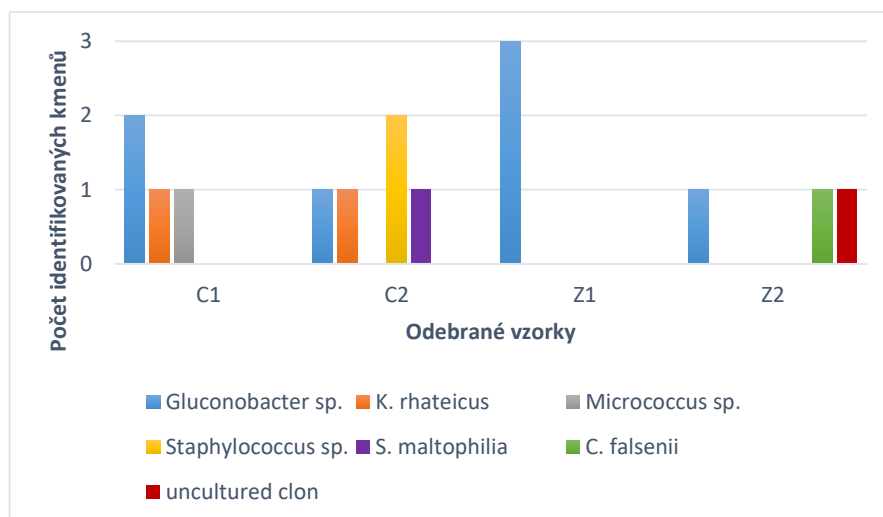


Obrázek 38: Výskyt kvasinek v analyzovaných vzorcích kombuch

Legenda: C = kombuchy z černého čaje, Z = kombuchy ze zeleného čaje, 1 = po 5 dnech fermentace, 2 = po 0 dnech fermentace

Z Obrázek 38 lze také vyčíst, že kvasinky *B. bruxellensis* a *Zygosaccharomyces* sp. byly identifikovány ve všech vzorcích kombuch. U odběrů C1, C2 a Z2 se vyskytovaly vždy po jednom kmenu izoláty druhu *Starmerella davenportii*. U vzorků kombuch odebraných 0. den fermentace se vyskytly kmeny *Rhodotorula mucilaginosa*. Více kmenů tohoto druhu převažovalo však u vzorků ze zeleného čaje. Kvasinka *S. cerevisiae* byla identifikovaná pouze ze vzorků, které prošly procesem fermentace (C1 a Z1).

Nejvíce rozmanitá kvasinková mikrobiota byla u odebraného vzorku C2. Z něj bylo identifikováno 5 různých druhů kvasinek. Naopak pouze 3 různé druhy byly identifikovány ze vzorku Z1, kde dominoval druh *Brettanomyces bruxellensis*.



Obrázek 39: Výskyt bakterií v analyzovaných vzorcích kombuch

Legenda: C = kombuchy z černého čaje, Z = kombuchy ze zeleného čaje, 1 = po 5 dnech fermentace, 2 = po 0 dnech fermentace

Výše (Obrázek 39) jsou znázorněny počty identifikovaných kmenů bakterií u jednotlivých vzorků. Při srovnání je možné říci, že nejméně rozmanitou mikrobiotu vykazoval vzorek Z1, ze které byly izolovány a identifikovány pouze kmeny rodu *Gluconobacter* (3 kmeny). Ze vzorku kombuch z černého čaje odebraného po 5 dnech bylo detekováno více druhů. Kromě *Gluconobacter* sp. navíc *Komagataeibacter rhateicus* a 1 kmen rodu *Micrococcus*.

Jak již bylo uvedeno na obrázcích výše (Obrázek 38 a Obrázek 39), mikrobiota vzorku C2 byla nejvíce odlišná, neboť se skládala z více různých druhů mikroorganismů. Celkově více rozmanité byly vzorky odebrané na počátku fermentačního procesu. Více druhů bylo tedy identifikováno ze vzorků z nápoje z černého čaje ještě před počátkem fermentace oproti nápoji ze zeleného čaje odebraného 0. den fermentace. Je to pravděpodobně zapříčiněno i tím, že zelený a černý čaj mají mírně odlišné chemické složení díky jiné technologické přípravě. Zelený čaj je bohatý především na katechiny, které se v černém čaji vyskytují zřídka díky zpracování listů oxidací. V černém čaji mají naopak převahu oxidační produkty teaflaviny a tearubiginy. [28] Tyto rozdíly mohou mít vliv kromě antimikrobiálního působení i na dostupnost živin, což následně ovlivňuje druhovou skladbu mikroorganismů v nápoji.

Vyšší druhová rozmanitost mikroorganismů ve vzorcích může být také ovlivněna přítomností kyseliny octové ve fermentované kombuše, která tak má větší antimikrobiální aktivitu a ovlivňuje tím i mikrobiologické složení. V prostředí s nízkým pH je schopné přežít jen omezené spektrum mikroorganismů. [28]

Zatímco během tohoto výzkumu převažovaly kmeny bakterií zařazených k rodu *Gluconobacter*, jiné studie [36] však poukazují na dominantní výskyt *Komagataeibacter* sp. u kombuch jak ze zeleného, tak i z černého čaje. Ve studii Kaashyap et al. [110] byl dominantním rodem *Acetobacter*. Zajímavým zjištěním v našem výzkumu byla absence identifikovaných kmenů rodu *Acetobacter*, přestože právě tyto bakterie jsou považovány za hlavní producenty kyseliny octové. [110] Nelze však vyloučit, že se kmeny tohoto rodu mohly nacházet mezi neidentifikovanými mikroorganismy.

Celkově bylo identifikováno omezené množství druhů octových bakterií. U rodu *Komagataeibacter* se jednalo pouze o druh *K. rhaeticus*. Dříve byl identifikován např. v ovocných šťávách. [83] Tento druh je charakteristický vysokou tolerancí k etanolu a kyselině octové, schopností produkovat kyselinu glukuronovou a intenzivní syntézou celulózy. [36]

Kvasinkové populace se mezi jednotlivými studiemi výrazně liší [83] [111], což poukazuje na variabilní dominanci různých rodů v závislosti na konkrétních podmínkách výzkumu. Dominantní rody v naší studii jsou *Brettanomyces* a *Zygosaccharomyces*, které bývají typickou mikrobiotou kombuchy. [112] Rod *Brettanomyces* se lehce adaptuje na podmínky, které jsou limitující pro většinu mikroorganismů, např. nízké pH, a kromě toho je často spojován s prostředím s vysokým obsahem etanolu. [113]

V práci bylo celkově identifikováno více kvasinek než bakterií. Převaha izolovaných kvasinek oproti bakteriím může být vysvětlena hned několika faktory, které souvisí s podmínkami fermentace. Kvasinky obecně lépe tolerují kyselé prostředí, které se během fermentace vytváří v důsledku produkce organických kyselin. To může inhibovat růst některých bakteriálních druhů. [114] V neposlední řadě kvasinky vykazují vyšší adaptační schopnost na přítomnost fenolických sloučenin, které jsou běžně obsažené v čaji a některé bakterie mohou být negativně nimi ovlivňovány. Kvasinkové druhy v kombuše jsou obecně variabilnější než bakteriální, což také může zvýšit pravděpodobnost jejich izolace během laboratorního výzkumu. [111]

ZÁVĚR

V diplomové práci jsem se zabývala problematikou vlivu vybraných faktorů na mikrobiotu kombuchy. Kombuchové nápoje byly připraveny ze tří různých komerčně dostupných násad (Fermentárium, Tvořivý svět a Vital Country), které byly fermentovány nejprve ve slazeném černém čaji a následně v zeleném čaji. Odběry vzorků byly provedeny vždy 0. a 5. den fermentačního procesu. Při výzkumu jsem se zaměřila na 3 hlavní skupiny mikroorganismů, které jsou běžně izolovány z fermentovaných čajů (kombuch) – octové bakterie, mléčné bakterie a kvasinky.

Ze získaných vzorků se podařilo izolovat zástupce octových bakterií a kvasinek, zatímco přítomnost mléčných bakterií se nepodařilo prokázat. Na základě morfologických znaků bylo k identifikaci vybráno celkem 47 reprezentativních kolonií. Z těchto izolátů byla nejprve izolována DNA, která byla následně amplifikována pomocí touch-down PCR a před samotnou sekvenací přečištěna purifikací.

Ze vzorků bylo identifikováno 29 kmenů kvasinek a 15 bakteriálních kmenů. U zbylých 3 kmenů nebyla sekvenace/identifikace úspěšná. Mezi kvasinkami se nejhojněji vyskytoval druh *Brettanomyces bruxellensis*. Z bakterií bylo nejvíce zástupců z rodu *Gluconobacter*.

Více rozmanitá mikrobiota byla zjištěna u odběrů provedených na počátku fermentačního procesu po výměně nového substrátu (slazeného čaje). Bylo to pravděpodobně zapříčiněno tím, že ze začátku jsou příznivější podmínky pro růst většiny mikroorganismů. S dobou fermentace klesá hodnota pH a prostředí se stává kyselejší díky tvorbě organických kyselin, především kyseliny octové. Ve vzorcích ze zeleného čaje převažoval výskyt kvasinek *B. bruxellensis*, zatímco ze vzorků kombuch z nálevu černého čaje bylo nejvíce izolováno zástupců kvasinek rodu *Zygosaccharomyces*.

Z výsledků práce vyplývá, že nápoj kombucha nemá přesné mikrobiologické složení. Obecně se dá říct, že zastoupení mikroorganismů ve fermentovaných čajích je proměnné v závislosti jak na čase fermentace a fyzikálních a chemických změnách v prostředí, tak i na použitém substrátu.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] TRAN, Thierry , et al. Microbial Dynamics between Yeasts and Acetic Acid Bacteria in Kombucha: Impacts on the Chemical Composition of the Beverage. online. *Foods*. 2020, roč. 9, č. 7, s. 1-25. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/foods9070963>. [cit. 2025-03-28].
- [2] COELHO, Raquel; LEITE DE ALMEIDA, Aryelle; GURGEL DO AMARAL, Rafael; NASCIMENTO DA MOTA, Robson a M. DE SOUSA, Paulo. Kombucha. online. *International Journal of Gastronomy and Food Science*. 2020, roč. 22, s. 1-12. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijgfs.2020.100272>. [cit. 2024-10-23].
- [3] MALHOTRA, Yogita; CHOUDHARY, Priyanka a GUPTA, Kalpana. Natural Carbonated Drink (Kombucha Tea) and its Health Benefits. online. *JOURNAL OF NATURAL REMEDIES*. 2024, roč. 24, č. 2, s. 255-269. ISSN 2320-3358. Dostupné z: <https://doi.org/10.18311/jnr/2024/34587>. [cit. 2024-10-26].
- [4] SUHRE, Taís. *Kombuchas produzidas e comercializadas no Brasil: características físico-químicas e composição microbiana*. online, Závěrečná práce, vedoucí Prof. Dr. Jeverson Frazzon. Porto Alegre: UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL, 2020. Dostupné z: <https://lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/211888/001115269.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. [cit. 2024-10-26].
- [5] BISHOP, Peyton, et al. Chemical Composition of Kombucha. online. *Beverages*. 22, roč. 8, s. 1-17. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/beverages8030045>. [cit. 2025-04-05].
- [6] JAYABALAN, Rasu; MALBAŠA, Radomir; LONČAR, Eva; VITAS, Jasmina a SATHISHKUMAR, Muthuswamy. A Review on Kombucha Tea—Microbiology, Composition, Fermentation, Beneficial Effects, Toxicity, and Tea Fungus. online. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2014, roč. 13, č. 4, s. 538-547. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12073>. [cit. 2024-11-04].
- [7] CHAMBIAL, Shailja, et al. Vitamin C in Disease Prevention and Cure: An Overview. online. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*. 2013, roč. 28, s. 314–328. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s12291-013-0375-3>. [cit. 2025-04-06].
- [8] JAKUBCZYK, Karolina, et al. Evaluation of Fluoride and Selected Chemical Parameters in Kombucha Derived from White, Green, Black and Red Tea. online. *Biological Trace Element Research*. 2021, roč. 199, s. 3547–3552. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s12011-020-02445-9>. [cit. 2025-04-06].
- [9] SHARMA, V.K.; BHATTACHARYA, A. a KUMAR, A. Health Benefits of Tea Consumption. online. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. 2007, roč. 6, č. 3, s. 785-792. Dostupné z: file:///C:/Users/Adela/Downloads/ajol-file-journals_80_articles_14660_submission_proof_14660-949-152008-1-10-20070927.pdf. [cit. 2025-03-11].
- [10] Catechin in Human Health and Disease. online. *Molecules*. 2019, roč. 24, č. 3, s. 1. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/molecules24030528>. [cit. 2025-04-17].
- [11] WATAWANA, Mindani; JAYAWARDENA, Nilakshi; GUNAWARDHANA, Chaminie a WAISUNDARA, Viduranga. Health, Wellness, and Safety Aspects of the Consumption of Kombucha. online. *Journal of Chemistry*. 2015, roč. 2015, č. 1,

- s. 1-11. ISSN 2090-9063. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.1155/2015/591869>. [cit. 2024-11-08].
- [12] CRUM, Hannah a LAGORY, Alex. *The Big Book of Kombucha*. 1. Storey Publishing LLC, 2016. ISBN 9781612124339.
- [13] JAVŮRKOVÁ, Michaela. *Kvašený nápoj kombucha a jeho účinky na lidské zdraví*. online, Bakalářská práce. Pardubice: Univerzita Pardubice - Fakulta chemicko-technologická, 2022. Dostupné z: <https://hdl.handle.net/10195/80273>. [cit. 2025-04-12].
- [14] NYHAN, Laura; LYNCH, Kieran; SAHIN, Aylin a ARENDT, E.K. Advances in Kombucha Tea Fermentation. online. *Appl. Microbiol.* 2022, roč. 2, č. 1, s. 73-103. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/applmicrobiol2010005>. [cit. 2024-11-04].
- [15] BARBOSA, E.L., et al. Kombucha fermentation in blueberry (*Vaccinium myrtillus*) beverage and its in vivo gastroprotective effect: Preliminary study. online. *Future Foods*. 2022, roč. 5, s. 1-9. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.fufo.2022.100129>. [cit. 2025-04-16].
- [16] VIERA DE OLIVEIRA, Patricia, et al. Kombucha benefits, risks and regulatory frameworks. online. *Food Chemistry Advances*. 2023, roč. 2, s. 1-10. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.focha.2023.100288>. [cit. 2025-04-16].
- [17] AL-MOHAMMADI, Abdul-Raouf; ISMAIEL, Ahmed; IBRAHIM, Rehab; MOUSTAFA, Ahmed; ZEID, Azza et al. Chemical Constitution and Antimicrobial Activity of Kombucha Fermented Beverage. online. *Molecules*. 2021, roč. 26, č. 16, s. 1-18. Dostupné z: <https://www.mdpi.com/1420-3049/26/16/5026>. [cit. 2024-11-09].
- [18] QI CHONG, Ann; WEN LAU, Siew a LING CHIN, Nyuk. Fermented Beverage Benefits: A Comprehensive Review and Comparison of Kombucha and Kefir Microbiome. online. *Microorganisms*. 2023, roč. 11, č. 5, s. 1-34. Dostupné z: <https://www.mdpi.com/2076-2607/11/5/1344>. [cit. 2024-11-09].
- [19] HOU, Jie; LUO, Rong; NI, Hui; LI, Ke; C MGOMI, Fedrick et al. Antimicrobial potential of kombucha against foodborne pathogens. online. *Quality Assurance and Safety of Crops & Foods*. 2021, roč. 13, č. 3, s. 53-61. Dostupné z: <https://pdfs.semanticscholar.org/9cc8/08f3485b09fbe02258cc75130fc8a583a835.pdf>. [cit. 2024-11-09].
- [20] SHAHBAZI, Hossein; GAHRUIE, Hadi; GOLMAKANI, Mohammad-Taghi a ESKANDARI, Mohammad. Effect of medicinal plant type and concentration on physicochemical, antioxidant, antimicrobial, and sensorial properties of kombucha. online. *Food science and nutrition*. 2018, roč. 6, č. 8, s. 1983-2577. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/fsn3.873>. [cit. 2024-11-08].
- [21] ANDREWS, Jennifer. Determination of minimum inhibitory concentrations. online. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2001, roč. 48, č. 1, s. 5-16. Dostupné z: https://academic.oup.com/jac/article/48/suppl_1/5/2473513?login=true. [cit. 2024-11-13].
- [22] MASSOUD, Ramona; JAFARI-DASTJERDEH, Reyhaneh; NAGHAVI, Nafisesadat a DARANI, Kianoush. All Aspects of Antioxidant Properties of Kombucha Drink. online. *Biointerface Research in Applied Chemistry*. 2022, roč. 12, č. 3, s. 4018-4027. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.33263/BRIAC123.40184027>. [cit. 2024-11-18].

- [23] CHAKRAVORTY, Somnath; BHATTACHARYA, Semantee; BHATTACHARYA, Debanjana a SARKAR, Soumyadev. Kombucha: A Promising Functional Beverage Prepared From Tea. online. *Non-alcoholic beverages: The Science of Beverages*. 2019, roč. 6, s. 285-327. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/B9780128152706000104?via%3Dihub>. [cit. 2025-02-23].
- [24] SRIHARI, Thummala; ARUNKUMAR, Ramachandran; ARUNAKARAN, Jagadeesan a SATYANARAYANA, Uppala. Downregulation of signalling molecules involved in angiogenesis of prostate cancer cell line (PC-3) by kombucha (lyophilized). online. *Biomedicine & Preventive Nutrition*. 2013, roč. 3, č. 1, s. 53-58. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S221052391200044X?via%3Dihub>. [cit. 2025-02-23].
- [25] JAYABALAN, Rasu; MALBAŠA, Radomir a SATHISHKUMAR, Muthuswamy. Kombucha. online. *Reference Module in Food Science*. 2016. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.03032-8>. [cit. 2025-02-23].
- [26] GURUVAYOORAPPAN, Chandrasekharan a KUTTAN, Girija. (+)-Catechin inhibits tumour angiogenesis and regulates the production of nitric oxide and TNF-alpha in LPS-stimulated macrophages. online. *Innate Immun*. 2008, roč. 14, č. 3, s. 160-174. Dostupné z: <https://doi.org/10.1177/1753425908093295>. [cit. 2025-04-16].
- [27] FERREIRA DE MIRANDA, Jeniffer, et al. Kombucha: A review of substrates, regulations, composition, and biological properties. online. *Food Science*. 2022, roč. 87, č. 2, s. 503-527. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/1750-3841.16029>. [cit. 2025-03-22].
- [28] CARDOSO, Rodrigo Rezende , et al. Kombuchas from green and black teas have different phenolic profile, which impacts their antioxidant capacities, antibacterial and antiproliferative activities. online. *Food Research International*. 2020, roč. 128, s. 1-10. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108782>. [cit. 2025-03-22].
- [29] NAMAL SENANAYAKE, S.P.J. , et al. Green tea extract: Chemistry, antioxidant properties and food applicati. online. *Journal of Functional Foods*. 2013, roč. 5, č. 4, s. 1529-1541. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jff.2013.08.011>. [cit. 2025-04-06].
- [30] NIE, Xiao-Cui, et al. Meta-Analysis of Black Tea Consumption and Breast Cancer Risk. online. *Nutrition and cancer*. 2014, roč. 66, č. 6, s. 1009-1014. Dostupné z: <https://doi.org/10.1080/01635581.2014.936947>. [cit. 2025-04-06].
- [31] JU, Jingqian, et al. Research progress on alternative kombucha substrate transformation and the resulting active components. online. *Front. Microbiol*. 2023, roč. 14, s. 1-17. Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1254014>. [cit. 2025-04-10].
- [32] EMILJANOWICZ, Katarzyna a MALINOWSKA-PAŃCZYK, Edyta. Kombucha from alternative raw materials – The review. online. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2019, roč. 60, č. 19, s. 3185-3194. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1679714>. [cit. 2025-03-23].
- [33] VELIĆANSKI, Aleksandra. Characteristics of kombucha fermentation on medicinal herbs from Lamiaceae family. online. *ROMANIAN BIOTECHNOLOGICAL*

- LETTERS. 2013, roč. 18, č. 1, s. 8034-8042. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/267032775_Characteristics_of_kombucha_a_fermentation_on_medicinal_herbs_from_Lamiaceae_family. [cit. 2025-03-23].
- [34] MALBAŠA, Radomir, et al. Comparison of the products of Kombucha fermentation on sucrose and molasses. online. *Food Chemistry*. 2008, roč. 106, č. 3, s. 1039-1045. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/248510664_Comparison_of_the_products_of_Kombucha_fermentation_on_sucrose_and_molasses. [cit. 2025-03-23].
- [35] KOCH, I.S., et al. Sensory characterization of rooibos tea and the development of a rooibos sensory wheel and lexicon. online. *Food Research International*. 2012, roč. 46, č. 1, s. 217-228. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.11.028>. [cit. 2025-03-24].
- [36] GAGGiA, Francesca, et al. Kombucha Beverage from Green, Black and Rooibos Teas: A Comparative Study Looking at Microbiology, Chemistry and Antioxidant Activity. online. *Nutrients*. 2018, roč. 11, č. 1, s. 1-22. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/nu11010001>. [cit. 2025-03-24].
- [37] MORENO-JIMÉNEZ, Martha Rocío. Polyphenolic Profile, Sugar Consumption and Organic Acids Generation along Fermentation of Infusions from Guava (*Pisidium guajava*) by the Kombucha Consortium. online. *Recent Research in Science and Technology*. 2018, roč. 10, s. 16-22. ISSN 2076-5061. Dostupné z: <https://updatepublishing.com/journal/index.php/rrst/article/view/3399>. [cit. 2025-03-24].
- [38] AYED, Lamia a HAMDI, Moktar. Manufacture of a beverage from cactus pear juice using “tea fungus” fermentation. online. *Annals of Microbiology*. 2015, roč. 65, s. 2293–2299. Dostupné z: <https://link.springer.com/article/10.1007/s13213-015-1071-8>. [cit. 2025-03-24].
- [39] XIA, Xiudong , et al. Kombucha fermentation enhances the health-promoting properties of soymilk beverage. online. *Journal of Functional Foods*. 2019, roč. 62, s. 1-13. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jff.2019.103549>. [cit. 2025-03-24].
- [40] MUHIALDIN, B.J., et al. Effects of sugar sources and fermentation time on the properties of tea fungus (kombucha) beverage. online. *International Food Research Journal*. 2019, roč. 26, č. 2, s. 481-487. Dostupné z: <http://www.ifrj.upm.edu.my>. [cit. 2025-03-29].
- [41] PRIKHODKO, Karina. *Antioxidační aktivita nápoje Kombucha z různých druhů čajů*. online, diplomová práce. Praha: Česká zemědělská univerzita, 2022. Dostupné z: https://theses.cz/id/wruxfm/zaverecna_prace.pdf?lang=cs. [cit. 2025-03-29].
- [42] GOH, W.N. , et al. Fermentation of black tea broth (Kombucha): I. Effects of sucrose concentration and fermentation time on the yield of microbial cellulose. online. *International Food Research Journal*. 2012, roč. 19, č. 1, s. 109-117. Dostupné z: databáze Research Gate. [cit. 2025-03-29].
- [43] PALUDO, Natália. *Desenvolvimento e caracterização de kombucha obtida a partir de chá verde e extrato de erva-mate: processo artesanal e escala laboratorial*. online, Závěrečná práce. Porto Alegre: UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL, 2017. Dostupné z: <chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/https://lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/174899/001061869.pdf?sequenc>. [cit. 2025-03-26].

- [44] EBRAHIMI PURE, Ali a EBRAHIMI PURE, Monir. Antioxidant and Antibacterial Activity of Kombucha Beverages Prepared using Banana Peel, Common Nettle and Black Tea Infusions. online. *APPLIED FOOD BIOTECHNOLOGY*. 2016, roč. 3, č. 2, s. 125-130. ISSN 2423-4214. Dostupné z: <https://doi.org/10.22037/afb.v3i2.11138>. [cit. 2025-03-29].
- [45] KALLEL, Lina. Insights into the fermentation biochemistry of Kombucha teas and potential impacts of Kombucha drinking on starch digestion. online. *Food Research International*. 2012, roč. 49, s. 226–232. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.08.018>. [cit. 2025-03-29].
- [46] SOARES, Marcelo; DE LIMA, Marieli a REOLON SCHMIDT, Vivian. Technological aspects of kombucha, its applications and the symbiotic culture (SCOBY), and extraction of compounds of interest: A literature review. online. *Trends in Food Science & Technology*. 2021, roč. 110, s. 539-550. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0924224421001187?via%3Dihub>. [cit. 2025-03-15].
- [47] VILLARREAL-SOTO, Silvia a BEAUFORT, Sandra,. Understanding Kombucha Tea Fermentation. online. *Journal of Food Science*. 2018, roč. 83, č. 3, s. 580-588. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/1750-3841.14068>. [cit. 2025-03-16].
- [48] JAYABAN, R. a WAISUNDARA, Viduranga. Kombucha as a Functional Beverage. online. *Functional and Medicinal Beverages: The Science of Beverages*. 2019, roč. 11, s. 413-446. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816397-9.00012-1>. [cit. 2025-03-26].
- [49] SHENOY, C.K., et al. Kombucha (Bio-Tea): An Elixir for Life?. online. *Nutrients in Beverages*. 2019, roč. 12, s. 591-616. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816842-4.00016-2>. [cit. 2025-03-29].
- [50] Kombucha: Formulation, chemical composition, and therapeutic potentialities. online. *Current Research in Food Science*. 2022, roč. 5, s. 2. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.crfs.2022.01.023>. [cit. 2025-04-17].
- [51] OSSOWSKI, Mateusz, et al. Evaluation of Microbiological Contamination of Black and Green Teas. online. *Advance Journal of Food Science and Technology*. 2019, roč. 17, č. 4, s. 65-71. Dostupné z: <https://doi.org/10.19026/ajfst.17.6016>. [cit. 2025-04-04].
- [52] CARRATURO, Federica, et al. Comparative assessment of the quality of commercial black and green tea using microbiology analyses. online. *BMC Microbiology*. 2018, roč. 18, č. 4, s. 1-12. Dostupné z: <https://doi.org/10.1186/s12866-017-1142-z>. [cit. 2025-04-04].
- [53] LYNCH, Kieran M. , et al. An update on water kefir: Microbiology, composition and production. online. *International Journal of Food Microbiology*. 2021, roč. 345, s. 1-18. Dostupné z: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160521000878?ref=pdf_download&fr=RR-2&rr=922ea50dfe336e94. [cit. 2025-03-19].
- [54] Tibetský vodní kefir. online. In: *Recepty.cz*. Dostupné z: <https://ms1.ostium.cz/instance/web-recepty/jbrpCd7a/h389w574t.jpg>. [cit. 2025-04-17].
- [55] NUTAKOR, Christabel, et al. Ginger Beer: An Overview of Health Benefits and Recent Developments. online. *Fermentation*. 2020, roč. 6, č. 4, s. 1-23. Dostupné z: <https://www.mdpi.com/2311-5637/6/4/102#B92-fermentation-06-00102>. [cit. 2025-03-21].

- [56] SRINIVASAN, Krishnapura. Ginger rhizomes (*Zingiber officinale*): A spice with multiple health beneficial potentials. online. *PharmaNutrition*. 2017, roč. 5, č. 1, s. 18-28. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.phanu.2017.01.001>. [cit. 2025-03-21].
- [57] SRI CANAKAPALLI, Sushumna. *Analysis of the Microbiome of Homebrewed Ginger Beer for Detection of Probiotics and Determination of Safety*. online, Bakalářská práce. Oregon State University: Honors College, 2019. Dostupné z: https://ir.library.oregonstate.edu/concern/honors_college_theses/73666b11h. [cit. 2025-03-21].
- [58] PEÑARANDA, Jerson Duvan. Sprouted grains in product development. Case studies of sprouted wheat for baking flours and fermented beverages. online. *International Journal of Gastronomy and Food Science*. 2021, roč. 25, s. 1-9. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ijgfs.2021.100375>. [cit. 2025-03-29].
- [59] AUNG, Thinzar a KIM, Mi. Wheat and Wheat-Derived Beverages: A Comprehensive Review of Technology, Sensory, Biological Activity, and Sustainability. online. *Prev. Nutr. Food Sci.* 2023, roč. 28, č. 4, s. 401-410. ISSN 2287-8602. Dostupné z: <https://doi.org/10.3746/pnf.2023.28.4.401>. [cit. 2025-03-29].
- [60] CHEN, Jennifer M., et al. Nutritional, Microbial, and Allergenic Changes during the Fermentation of Cashew ‘Cheese’ Product Using a Quinoa-Based Rejuvelac Starter Culture. online. *Nutrients*. 2020, roč. 12, č. 648, s. 1-12. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/nu12030648>. [cit. 2025-03-29].
- [61] UCAK, Samet, et al. Identification of bacterial communities of fermented cereal beverage Boza by metagenomic analysis. online. *LWT*. 2022, roč. 153, s. 1-9. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112465>. [cit. 2025-03-29].
- [62] ARICI, Muhammet a DAGLIOGLU, Orhan. Boza: A lactic acid fermented cereal beverage as a traditional Turkish food. online. *Food Reviews International*. 2007, roč. 18, č. 1, s. 39-48. Dostupné z: <https://doi.org/10.1081/FRI-120003416>. [cit. 2025-03-29].
- [63] NEFFE-SKOCIŇSKA, Katarzyna , et al. Acid contents and the effect of fermentation condition of Kombucha tea beverages on physicochemical, microbiological and sensory properties. online. *CyTA - Journal of Food*. 2017, roč. 15, č. 4, s. 601-607. Dostupné z: <https://doi.org/10.1080/19476337.2017.1321588>. [cit. 2025-03-29].
- [64] KURAHASHI, Atsushi. Ingredients, Functionality, and Safety of the Japanese Traditional Sweet Drink Amazake. online. *Journal of Fungi*. 2021, roč. 7, č. 6, s. 1-10. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/jof7060469>. [cit. 2025-03-29].
- [65] LARA-HIDALGO, C., et al. Yeasts in Fermented Foods and their Probiotic Potential. online. *Austin Journal of Nutrition & Metabolism*. 2017, roč. 4, č. 1, s. 1-8. Dostupné z: databáze Research Gate. [cit. 2025-03-29].
- [66] GUTIÉRREZ-SARMIENTO, Wilbert. Microbial community structure, physicochemical characteristics and predictive functionalities of the Mexican tepache fermented beverage. online. *Microbiological Research*. 2022, roč. 260, s. 1-12. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.micres.2022.127045>. [cit. 2025-03-29].
- [67] AUNG, Thinzar a KIM, Mi. A comprehensive review on kombucha biofilms: A promising candidate for sustainable food product development. online. *Trends in Food Science & Technology*. 2024, roč. 144. Dostupné z:

- <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0924224424000013?via%3Dihub>. [cit. 2025-03-10].
- [68] FLEMMING, Hans-Curt; WINGENDER, Jost; SZEWZYK, Ulrich a STEINBERG, Peter. Biofilms: an emergent form of bacterial life. online. *Nature Reviews Microbiology*. 2016, roč. 14, s. 563–575. Dostupné z: <https://www.nature.com/articles/nrmicro.2016.94>. [cit. 2025-03-10].
- [69] AUNG, Thinzar; LEE, Won-Heong a EUN, Jong-Bang. Metabolite profiling and pathway prediction of laver (*Porphyra dentata*) kombucha during fermentation at different temperatures. online. *Food Chemistry*. 2022, roč. 397. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.133636>. [cit. 2025-03-10].
- [70] TAPIAS, Yuly; DI MONTE, Victoria; PELTZER, Mercedes a SALVAY, Andrés. Bacterial cellulose films production by Kombucha symbiotic community cultured on different herbal infusions. online. *Food Chemistry*. 2022, roč. 372, s. 1-11. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814621023529?via%3Dihub>. [cit. 2025-03-11].
- [71] LAAVANYA, D.; SHIRKOLE, Shivanand a BALASUBRAMANIAN, P. Current challenges, applications and future perspectives of SCOBY cellulose of Kombucha fermentation. online. *Journal of Cleaner Production*. 2021, roč. 295, s. 1-20. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2021.126454>. [cit. 2025-03-11].
- [72] CHAWLA, Prashant; BAJAJ, Ishwar a SURVASE, Shrikant. Microbial Cellulose: Fermentative Production and Applications. *Food Technology and Biotechnology*. 2009, roč. 47, č. 2, s. 107–124. ISSN 1330-9862.
- [73] LANDIS, Elizabeth A. , a kol. Microbial Diversity and Interaction Specificity in Kombucha Tea Fermentations. online. *ASM Journals*. 2022, roč. 7, č. 3, s. 1-15. Dostupné z: <https://doi.org/10.1128/msystems.00157-22>. [cit. 2025-03-16].
- [74] MALIMAS, T., et al. *Systematics of Acetic Acid Bacteria*. online. 1. CRC Press, 2017. ISBN 9781315153490. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/345535770_Systematics_of_Acetic_Acid_Bacteria. [cit. 2025-03-28].
- [75] LYNCH, Kieran M., et al. Physiology of Acetic Acid Bacteria and Their Role in Vinegar and Fermented Beverages. online. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2019, roč. 18, č. 3, s. 587-625. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12440>. [cit. 2025-03-28].
- [76] WANG, B., et al. Kombucha: Production and Microbiological Research. online. *Foods*. 2022, roč. 11, s. 1-18. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/foods11213456>. [cit. 2025-03-28].
- [77] TEYSSIER, Corinne a HAMDOUCHE, Yasmine. *Fermented Foods: Biochemistry and Biotechnology*. online. 1. CRC Press, 2016. ISBN 9780429183768. Dostupné z: <https://www.taylorfrancis.com/chapters/edit/10.1201/b19872-5/acetic-acid-bacteria-prospective-applications-food-biotechnology-corinne-teyssier-yasmine-hamdouche>. [cit. 2025-03-19].
- [78] MARSH, Alan J. et al. Fermented beverages with health-promoting potential: Past and future perspectives. online. *Trends in Food Science & Technology*. 2014, roč. 38, č. 2, s. 113-124. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0924224414001058?via%3Dihub>. [cit. 2025-03-19].

- [79] DIGUTA, C.F., et al. The Biotechnological Potential of *Pediococcus* spp. Isolated from Kombucha Microbial Consortium. online. *Foods*. 2020, roč. 9, č. 12, s. 1-15. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/foods9121780>. [cit. 2025-04-19].
- [80] ARIFF, Rafidah Mohd , a kol. Recent trends in Kombucha: Conventional and alternative fermentation in development of novel beverage. online. *Food Bioscience*. 2023, roč. 53, s. 1-16. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2212429223003656?via%3Dihub>. [cit. 2025-03-16].
- [81] GONG, Chuanjie, a kol. Biofilms in plant-based fermented foods: Formation mechanisms, benefits and drawbacks on quality and safety, and functionalization strategies. online. *Trends in Food Science & Technology*. 2021, roč. 116, s. 940-953. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.08.026>. [cit. 2025-03-16].
- [82] WATAWANA, M. et al. Enhancement of the antioxidant and starch hydrolase inhibitory activities of king coconut water (*Cocos nucifera* var. *aurantiaca*) by fermentation with kombucha 'tea fungus'. online. *International Journal of Food Science and Technology*. 2016, roč. 51, č. 2, s. 490–498. Dostupné z: <https://academic.oup.com/ijfst/article/51/2/490/7739569>. [cit. 2025-03-19].
- [83] CHAKRAVORTY, Somnath, et al. Kombucha tea fermentation: Microbial and biochemical dynamics. online. *International Journal of Food Microbiology*. 2016, roč. 220, s. 63-72. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160515301951?via%3Dihub>. [cit. 2025-03-19].
- [84] WOLFE, Benjamin a DUTTON, Rachel. Fermented foods as experimentally tractable microbial ecosystems. online. *Cell*. 2015, roč. 161, č. 1, s. 49-55. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.02.034>. [cit. 2025-03-24].
- [85] NUMMER, Brian. Kombucha Brewing Under the Food and Drug Administration Model Food Code: Risk Analysis and Processing Guidance. online. *Journal of Environmental Health*. 2013, roč. 76, č. 4, s. 8-11. Dostupné z: databáze Research Gate. [cit. 2025-03-26].
- [86] COTON, Monika, et al. Unraveling microbial ecology of industrial-scale Kombucha fermentations by metabarcoding and culture-based methods. online. *FEMS Microbiology Ecology*. 2017, roč. 93, č. 5, s. 1-16. Dostupné z: <https://doi.org/10.1093/femsec/fix048>. [cit. 2025-03-26].
- [87] VITAS, Jasmina, et al. THE ANTIOXIDANT ACTIVITY OF KOMBUCHA FERMENTED MILK PRODUCTS WITH STINGING NETTLE AND WINTER SAVORY. online. *Chemical Industry & Chemical Engineering Quarterly*. 2013, roč. 19, č. 1, s. 129-139. Dostupné z: <https://doi.org/10.2298/CICEQ120205048V>. [cit. 2025-03-26].
- [88] DE FILIPPIS, Francesca, et al. Different temperatures select distinctive acetic acid bacteria species and promotes organic acids production during Kombucha tea fermentation. online. *Food Microbiology*. 2018, roč. 73, s. 11-16. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.01.008>. [cit. 2025-03-27].
- [89] ZHAO, Zhen-jun, et al. Flavour chemical dynamics during fermentation of kombucha tea. online. *Emirates Journal of Food and Agriculture*. 2018, roč. 30, č. 9, s. 732-741. Dostupné z: <https://doi.org/10.9755/ejfa.2018.v30.i9.1794>. [cit. 2025-03-26].

- [90] HUR, Sun Jin, et al. Effect of fermentation on the antioxidant activity in plant-based foods. online. *Food Chemistry*. 2014, roč. 160, č. 1, s. 346-356. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.03.112>. [cit. 2025-03-27].
- [91] TRAN, Thierry , et al. Microbiological and technological parameters impacting the chemical composition and sensory quality of kombucha. online. *COMPREHENSIVE REVIEWS IN FOOD SCIENCE AND FOOD SAFETY*. 2020, roč. 19, s. 2050–2070. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12574>. [cit. 2025-03-28].
- [92] *Tvořivý svět - Kombucha*. online. 2009. Dostupné z: <https://www.tvorivy-svet.cz/kombucha-startovaci-sada>. [cit. 2025-04-19].
- [93] *Fermentárum*. online. 2025. Dostupné z: <https://www.fermentarum.cz/kombucha>. [cit. 2025-04-19].
- [94] *Vital Country: Kombucha násada*. online. 2025. Dostupné z: <https://www.vitalcountry.cz/kombucha-nasada-velka-200-ml/>. [cit. 2025-04-19].
- [95] WEISBURG, W. G.; BARNS, S. M.; PELLETIER, D. A. a LANE, D. J. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. online. *Journal of Bacteriology*. 1991, roč. 173, č. 2, s. 697-703. Dostupné z: <https://doi.org/10.1128/jb.173.2.697-703.1991>. [cit. 2025-05-01].
- [96] LEAW, Shiang Ning, et al. Identification of Medically Important Yeast Species by Sequence Analysis of the Internal Transcribed Spacer Regions. online. *J Clin Microbiol*. 2006, roč. 44, č. 3, s. 693–699. Dostupné z: <https://doi.org/10.1128/JCM.44.3.693-699.2006>. [cit. 2025-05-01].
- [97] DUKE UNIVERSITY. *Conserved primer sequences for PCR amplification and sequencing from nuclear ribosomal RNA*. online. In: DUKE UNIVERSITY. Vilgalys lab. 1992. Dostupné z: <https://sites.duke.edu/vilgalyslab/files/2017/08/rDNA-primers-for-fungi.pdf>. [cit. 2025-05-01].
- [98] *Excedr.: PCR Master Mix: Definition, Types, & More*. online. 2022. Dostupné z: <https://www.excedr.com/resources/pcr-master-mix-definition-types-and-more>. [cit. 2025-04-21].
- [99] JING, M.; ROSARIO, W.; WATLER, E. a CALHOUN, D. H. Development of a large-scale HPLC-based purification for the urease from *Staphylococcus leei* and determination of subunit structure. online. *Protein Expression and Purification*. 2004, roč. 34, č. 1, s. 111-117. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.pep.2003.10.012>. [cit. 2023-02-02].
- [100] NETRUSOV, Alexander , et al. Exopolysaccharides Producing Bacteria. online. *Microorganisms*. 2023, roč. 11, č. 6. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/microorganisms11061541>. [cit. 2025-05-07].
- [101] TU, Ch., et al. Isolation and identification of *Starmerella davenportii* strain Do18 and its application in black tea beverage fermentation. online. *Food Science and Human Wellness*. 2020, roč. 9, č. 4, s. 355-362. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.fshw.2020.04.010>. [cit. 2025-05-03].
- [102] *Bacterial Pathogens in Fermented Tea (Kombucha)*. online. In: Canadian Food Inspection Agency. 2019. Dostupné z: <https://inspection.canada.ca/sites/default/files/legacy/DAM/DAM-food-aliments/STAGING/text->

- texte/bacterial_pathogens_in_fermented_tea_txt_1577123587055_eng.pdf. [cit. 2025-05-02].
- [103] HONG, Jisoo, et al. A New Antimicrobial Substance Produced by *Staphylococcus pasteurii* Isolated from Vegetables. online. *Food Sci. Biotechnol.* 2014, roč. 23, č. 3, s. 983-990. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s10068-014-0133-1>. [cit. 2025-05-02].
- [104] VIDIGAL, Pedrina G., et al. Effects of Green Tea Compound Epigallocatechin-3-Gallate against *Stenotrophomonas maltophilia* Infection and Biofilm. online. *PLOS ONE*. 2014, roč. 9, č. 4, s. 1-8. Dostupné z: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0092876>. [cit. 2025-05-02].
- [105] TEOH, Ai Leng; HEARD, Gillian a COX, Julian. Yeast ecology of Kombucha fermentation. online. *International Journal of Food Microbiology*. 2004, roč. 95, s. 119–126. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2003.12.020>. [cit. 2025-05-02].
- [106] SAAD, Emna Ben. Comprehensive survey of kombucha microbial communities of diverse origins and fermentation practices. online. *FEMS Yeast Res.* 2025, roč. 25, s. 1-10. Dostupné z: <https://doi.org/10.1093/femsyr/foaf005>. [cit. 2025-05-02].
- [107] SOTO, S. A. V., et al. Metabolome-microbiome signatures in the fermented beverage, Kombucha. online. *International Journal of Food Microbiology*. 2020, roč. 333, s. 1-13. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108778>. [cit. 2025-05-04].
- [108] SOGIN, Jonathan H. Primary Metabolites and Microbial Diversity in Commercial Kombucha Products. online. *Fermentation*. 2024, roč. 10, č. 8, s. 1-20. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/fermentation10080385>. [cit. 2025-05-03].
- [109] PUSPAWATI, N., et al. Viability of Lactic Acid Bacteria Isolated from Kombucha Tea Against Low pH and Bile Salt. online. *MITP*. 2016, roč. 3, č. 1, s. 18–25. ISSN 2407-3814. [cit. 2025-05-07].
- [110] KAASHYAP, M. et al. Microbial Diversity and Characteristics of Kombucha as Revealed by Metagenomic and Physicochemical Analysis. online. *Nutrients*. 2021, roč. 13, č. 12. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/nu13124446>. [cit. 2025-05-04].
- [111] MARSH, Alan, et al. Sequence-based analysis of the bacterial and fungal compositions of multiple kombucha (tea fungus) samples. online. *Food Microbiol.* 2014, roč. 38, s. 171-178. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2013.09.003>. [cit. 2025-05-04].
- [112] NGUYEN, K. et al. Screening the optimal ratio of symbiosis between isolated yeast and acetic acid bacteria strain from traditional kombucha for high-level production of glucuronic acid. online. *LWT - Food Science and Technology*. 2015, roč. 64, č. 2, s. 1149-1155. Dostupné z: [10.1016/j.lwt.2015.07.018](https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.07.018). [cit. 2025-05-04].
- [113] Identification of *Dekkera bruxellensis* as a major contaminant yeast in continuous fuel ethanol fermentation. online. *J Appl Microbiol.* 2007, roč. 102, č. 2, s. 538-47. Dostupné z: [10.1111/j.1365-2672.2006.03082.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.03082.x). [cit. 2025-05-04].
- [114] SULLIVAN, Erin et al. Viability and Diversity of the Microbial Cultures Available in Retail Kombucha Beverages in the USA. online. *Foods*. 2024, roč. 13, s. 1-16. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/foods13111707>. [cit. 2025-05-04].

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Vitamin C – chemický vzorec [5]	16
Obrázek 2: Katechin – chemický vzorec [10]	18
Obrázek 3: Glukuronová kyselina – chemický vzorec [11]	19
Obrázek 4: Kofein – chemický vzorec [5]	20
Obrázek 5: Schéma přípravy kombuchového nápoje (Upraveno podle [50])	29
Obrázek 6: Tibetský vodní kefir [54]	30
Obrázek 7: Mechanismus vzniku biofilmu kombuchy (upraveno podle [67])	35
Obrázek 8: Směs na přípravu agarů pro kvasinky a plísně	46
Obrázek 9: Petriho misky s připravenými kultivačními pevnými půdami	46
Obrázek 10: Použitý zelený sypaný čaj	47
Obrázek 11: Modelový vzorek kombuchy	49
Obrázek 12: Destička k měření koncentrace DNA na přístroji Tecan	51
Obrázek 13: Mikrotitrační destička se směsí pro PCR s izolovanými vzorky DNA	52
Obrázek 14: Termocykler BIO-RAD pro polymerázovou řetězcovou reakci	53
Obrázek 15: Schéma nastavení jednotlivých kroků PCR programu	54
Obrázek 16: Agarózová směs pro přípravu gelu na elektroforézu	54
Obrázek 17: Gel s nanesenými PCR vzorky (před elektroforézou)	55
Obrázek 18: Schéma frekvence odběrů vzorků	57
Obrázek 19: Nárůst kolonií na Acetobacter agaru (vlevo) a CHYGA (vpravo) inokulovaných pomocí Spiral plateru	57
Obrázek 20: Nárůst kolonií na Acetobacter agaru – viditelné precipitační zóny	58
Obrázek 21: Počty mikroorganismů vyrostené v kombuše z černého čaje – F*	59
Obrázek 22: Počty mikroorganismů vyrostené v kombuše z černého čaje – TS*	60
Obrázek 23: Počty mikroorganismů vyrostené v kombuše z černého čaje – VC*	61
Obrázek 24: Počty mikroorganismů vyrostené v kombuše ze zeleného čaje – F*	63
Obrázek 25: Počty mikroorganismů vyrostené v kombuše ze zeleného čaje – TS*	63
Obrázek 26: Počty mikroorganismů vyrostené v kombuše ze zeleného čaje – VC*	64
Obrázek 27: Vybrané izolované kmeny na půdě CHYGA	65
Obrázek 28: Vybraný izolovaný kmen na Acetobacter agaru	65
Obrázek 29: Gramnegativní tyčinky po obarvení pozorované mikroskopem	66
Obrázek 30: Kvasinky pozorované mikroskopem	66
Obrázek 31: Vyhodnocení změřené koncentrace a čistoty vybraných izolovaných DNA ..	71
Obrázek 32: Vyhodnocení elektroforézy po PCR s primery FD1 a RD1	72
Obrázek 33: Oprava sekvence s primerem reverse – kmen C13	73

Obrázek 34: Vyhodnocení sekvence kmene C13 pomocí programu nBLAST	73
Obrázek 35: <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> na živných půdách MRSA, AA a CHYGA	78
Obrázek 36: Zastoupení identifikovaných kmenů mikroorganismů v kombuchách z černého čaje	82
Obrázek 37: Zastoupení identifikovaných kmenů mikroorganismů v kombuchách ze zeleného čaje	83
Obrázek 38: Výskyt kvasinek v analyzovaných vzorcích kombuch.....	84
Obrázek 39: Výskyt bakterií v analyzovaných vzorcích kombuch.....	85

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Množství použitých surovin	47
Tabulka 2: Průměrné hodnoty CFU/ml u jednotlivých vzorků kombuch – černý čaj	59
Tabulka 3: Průměrné hodnoty CFU/ml u jednotlivých vzorků kombuch – zelený čaj	62
Tabulka 4: Izoláty vybrané k identifikaci z kombuchy z černého čaje – zdroj Fermentárum	67
Tabulka 5: Izoláty vybrané k identifikaci z kombuchy z černého čaje – zdroj Tvořivý svět	68
Tabulka 6: Izoláty vybrané k identifikaci z kombuchy z černého čaje – zdroj Vital Country	68
Tabulka 7: Izoláty vybrané k identifikaci z kombuchy ze zeleného čaje – zdroj Fermentárum	69
Tabulka 8: Izoláty vybrané k identifikaci z kombuchy ze zeleného čaje – zdroj Tvořivý svět	70
Tabulka 9: Izoláty vybrané k identifikaci z kombuchy ze zeleného čaje – zdroj Vital Country	70
Tabulka 10: Identifikované mikroorganismy z kombuchy z černého čaje – odběry 5. den fermentace.....	75
Tabulka 11: Identifikované mikroorganismy z kombuchy z černého čaje – odběry 0. den fermentace.....	77
Tabulka 12: Identifikované kmeny z kombuchy ze zeleného čaje – odběry po 5 dnech fermentace.....	80
Tabulka 13: Identifikované kmeny z kombuchy ze zeleného čaje – odběry 0. den fermentace	81

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

AA	Acetobacter agar
BMK	bakterie mléčného kvašení
CFU	Colony Forming Units
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EGCg	epigallokatechin-3-gallát
F	Fermentárum
HACCP	Hazard Analysis and Critical Control Points
CHYGA	Chloramphenicol Yeast Glucose Agar
LDL	low density lipoprotein
MIC	minimální inhibiční koncentrace
MRSA	De Man–Rogosa–Sharpe Agar
PCR	polymerázová řetězcová reakce
SCOBY	symbiotic colony of bacteria and yeast
sp.	species
TAE	Tris-Acetát-EDTA
TS	Tvořivý svět
VC	Vital Country

