



# VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

## FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

## ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

# STUDIUM CHEMICKÝCH PROCESŮ PŘI VÝROBĚ KOMBUCHY

STUDY OF THE CHEMICAL PROCESSES DURING KOMBUCHA TECHNOLOGY

## DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

## AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Markéta Chludilová

## VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Jaromír Pořízka, Ph.D.

BRNO 2018

## Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1137/2017  
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie  
Studentka: **Bc. Markéta Chludilová**  
Studijní program: Chemie pro medicínské aplikace  
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace  
Vedoucí práce: **Ing. Jaromír Pořízka, Ph.D.**  
Akademický rok: 2017/18

### Název diplomové práce:

Studium chemických procesů při výrobě kombuchy

### Zadání diplomové práce:

1. zpracovat rešerši na dané téma
2. vyvoj a optimalizace analytických technik pro stanovení organických kyselin, ethanolu a fenolických látek v kombuše
3. analýza vzorků kombuchy v různých fázích výroby
4. zpracování naměřených výsledků

### Termín odevzdání diplomové práce: 14.5.2018

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí diplomové práce.

-----  
Bc. Markéta Chludilová  
student(ka)

-----  
Ing. Jaromír Pořízka, Ph.D.  
vedoucí práce

-----  
prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.  
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2018

-----  
prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.  
děkan

## **Abstrakt:**

Kombuchový nápoj je označován výluh čaje s přidanou houbou kombucha nazývanou *scoby*. Takto se získá nízkoalkoholický nápoj, který získává značnou popularitu, a to zejména díky údajným prospěšným vlastnostem na lidské zdraví. Mikrobiální složení tohoto nápoje je velmi bohaté, skládající se s bakterií a kvasinek žijících v vzájemné symbióze [11]. Mikrobiální složení nápoje a jeho příznivé účinky na lidské zdraví spolu velmi úzce souvisí. Tato práce se zabývá analýzou chemického složení kombuchového nápoje, a to zejména se zaměřením na obsah majoritních složek jako jsou organické kyseliny, sacharidy a ethanol. Tyto analyty patří mezi nejčastěji a nejhojněji se nacházející látky v kombuchovém nápoji a jsou velmi úzce propojeny s mikrobiálním složením *scoby* samotné [3]. Vzorky kombuchového nápoje byly dodány firmou RebornFood, která se jako jedna z mála zabývá komerční výrobou tohoto nápoje na českém trhu. Zároveň si tato firma zakládá na čistě přírodní fermentaci nápoje, tudíž do procesu výroby není nijak zvláště zasahováno. Výsledky této diplomové práce poukazují na vliv používané *scoby* a s tím spojený výskyt analytů v nápoji a zároveň je potvrzen výrobní proces, spojený se vznikem analytů, který je popsán v několika článcích. Předpokládá se, že tato práce poskytne informace jak z hlediska výrobních podmínek, tak chemických vlastností vyrobeného nápoje související se stavem *scoby*, které budou využity dále, jak pro firmu RebornFood, tak jako materiál k vyřešení technických problémů výroby tohoto nápoje.

## **Klíčová slova:**

Kombucha, Fermentace, HPLC, Kvasinky, Bakterie, *Scoby*

**Abstract:**

The kombucha drink is referred to as leavened tea with added sponge called a scobie. In this way, a low-alcohol beverage is obtained, which gains considerable popularity, especially due to the alleged beneficial properties for human health. The microbial composition of this beverage is very rich, consisting of bacteria and yeasts living in a beneficial symbiosis [11]. The microbial composition of the drink and its beneficial effects on human health are very closely related. This work deals with the analysis of the chemical composition of the commodity beverage, especially with regard to the content of major components such as organic acids, carbohydrates and ethanol. These analytes are among the most common and most profoundly found substances in the carbohydrate beverage and are very closely related to the microbial composition of the *scoby* itself [3]. Combo beverage samples were supplied by RebornFood, one of which is the commercial production of this drink on the Czech market. At the same time, this company bases itself on purely natural fermentation of beverages, and therefore it is not particularly involved in the production process. The results of this diploma work point to the effect of the *scoby* used and the associated occurrence of analytes in the beverage, as well as the production process associated with the formation of analytes, which is described in several articles. It is expected that this work will provide information both on the production conditions and on the chemical properties of the beverage related to the condition of the *scoby*, which will be used further, both for RebornFood and the material used to solve the technical problems of this beverage production.

**Keywords:**

Kombucha, Fermentation, HPLC, Yeast, Bacteria, *Scoby*

CHLUDILOVÁ, M. *Studium chemických procesů při výrobě kombuchy*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2018.52 s. Vedoucí diplomové práce Ing. Jaromír Pořízka, Ph.D

Prohlášení Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

.....

Podpis studenta

*Poděkování: Na tomto místě bych ráda poděkovala vedoucímu mé diplomové práce Ing. Jaromíru Pořízkovi Ph.D. za jeho čas, ochotu, rady a odborné vedení práce. Děkuji Fakultě chemické za vytvoření pracovních podmínek a možnost realizovat tuto práci. V neposlední řadě chci poděkovat své rodině a mým přátelům za podporu, bez které by tato práce nemohla vzniknout.*

## Obsah

Abstrakt: .....	3
Klíčová slova: .....	3
Abstract: .....	4
Keywords: .....	4
1 Úvod .....	8
2 Teoretická část .....	9
2.1 Historie kombuchy .....	9
2.2 Výroba kombucha nápoje .....	10
2.2.1 Čaj vhodný pro přípravu kombucha nápoje .....	10
2.2.2 Jasmínový čaj .....	11
2.2.3 Zelený čaj .....	11
2.2.4 Vytvoření čajového nálevu .....	12
2.2.5 Primární fermentace .....	13
2.2.6 Sekundární fermentace .....	14
2.3 Složení a vlastnosti kombuchy .....	15
2.3.1 Mikrobiální složení <i>scoby</i> .....	15
2.3.2 Chemické složení kombuchového nápoje .....	18
2.3.3 Vitaminy .....	19
2.3.4 Minerály .....	21
2.3.5 Fenolické látky .....	21
2.3.6 Ethanol .....	21
2.3.7 Organické kyseliny .....	21
2.3.8 Sacharidy .....	22
2.4 Nutriční význam kombuchového nápoje - metabolismus cukrů .....	23
2.4.1 Glykolýza .....	23
2.4.2 Fáze glykolýzy .....	24
2.5 Příznivé účinky kombucha čaje na lidský organismus .....	24
2.6 Teoretické základy použitých metod .....	25
2.6.1 Bioreaktor .....	25
2.6.2 Kapalinová chromatografie .....	25
3 Cíle práce .....	27
4 Experimentální část .....	28
4.1 Použité materiály a přístroje .....	28
4.1.1 Chemikálie .....	28
4.1.2 Vybavení laboratoře .....	28
4.2 Výroba kombuchového nápoje v laboratorních a provozních podmínkách .....	29

4.2.1	Výroba kombuchového nápoje v bioreaktoru .....	29
4.2.2	Výroba kombuchového nápoje firmou RebornFood.....	30
4.3	Studium stavu <i>scoby</i> na obsah vybraných látek v kombuchovém nápoji.....	31
4.3.1	Příprava vzorků a interval odběrů pro HPLC analýzy .....	31
4.4	Vytvoření kultivačního média pro mikrobiální analýzu.....	32
4.5	Optimalizace a validace metody HPLC.....	32
4.5.1	Příprava kalibračních roztoků pro HPLC analýzu .....	33
5	Výsledky a diskuze.....	35
5.1	Studium chemických procesů během výroby kombuchového nápoje.....	35
5.1.1	Studium řízené primární fermentace-bioreaktor .....	35
5.1.2	Studium teplotně neřízené primární fermentace v provozu RebornFood .....	38
5.1.3	Vliv stavu <i>scoby</i> na produkci vybraných chemických látek v kombuchovém nápoji .....	43
5.1.4	Mikrobiologická charakteristika kombuchového nápoje z různých <i>scoby</i> .....	43
5.1.5	Studium procesu sekundární fermentace na obsah vybraných látek v kombuchovém nápoji .....	40
6	Závěr.....	45
7	Seznam použitých zkratk a symbolů .....	47
8	Přílohy .....	52

# 1 Úvod

Jako kombucha je označován jak nápoj, tak i houba pocházející z orientu, kde byly její blahodárné účinky známe již v roce 197 před. n. l., kdy zdejší doktor použil kombuchu k léčbě trávicího traktu japonského císaře. Ve skutečnosti je označení kombuchy jako houby, které známe nesprávné, jedná se o symbiózu kvasinek a bakterií. Pro kombuchovou houbu se používá mnoho názvů, z nichž nejčastěji užívaný je název *scoby*. Vzhled *scoby* je také poněkud netradiční má tvar plochého gumovitého hnědého nebo světlešedého lívance. O kombuchovém nápoji je známo mnoho příznivých účinků na lidský organismus, a tak je tato houba používána jako lék i jako potravina. Mezi hlavní příznivé účinky pití kombuchového nápoje patří podpora imunity, doplnění důležitých vitamínů a ochranných látek. Tento nápoj nemusí být určen pouze k pití, ale můžeme jej využít k obkladům při popáleninách, vyrážkách, ale také k péči o tělo, vlasy a pleť [12]. Výroba kombuchového nápoje je jednou z nejjednodušších fermentací, které můžeme uskutečnit i v domácím prostředí.

Vzhledem ke stoupajícímu nebezpečí účinku volných radikálů, které vznikají v našem těle a dalších látek z okolního prostředí, které zde představují potenciální nebezpečí jako je poškození buněčné membrány, či ničení genetické informace nebo stárnutí buněk, se kombuchový nápoj jeví jako vhodný způsob ochrany před těmito volnými radikály a to díky obsahu antioxidantů, vitamínů a dalších látek, které jsou schopny volné radikály a škodliviny nejen blokovat ale i ničit [32].

Kombuchový nápoj, který byl zkoumán v této diplomové práci pocházel z nové firmy RebornFood s.r.o., která jako svůj první projekt zvolila právě výrobu kombuchového nápoje. Kombuchový nápoj byl vyráběn z výluhu čaje, který byl následně oslazen a nalit na *scoby* (kombuchovou houbu), tím byla zahájena fermentace tohoto nápoje. Jejich výroba se oproti ostatním komerčním výrobám liší, hlavně přístupem, chutí i samotnou výrobou. Firma RebornFood s.r.o. se potýkala s určitými problémy v technologii výroby a také potřebovala zjistit množství chemických sloučenin ve finálním nápoji, čemuž se věnuje tato práce.

## 2 Teoretická část

### 2.1 Historie kombuchy

Názvem kombucha je označován starodávný nápoj mírně sladké a trochu kyselé chuti, který má mnoho zdravotních přínosů. Je zveřejněno velké množství informací o účincích tohoto nápoje, a to hlavně díky jeho účinkům na lidské zdraví. Kombuchový nápoj je konzumován v mnoha zemích po staletí a v dnešní době se setkáváme s rostoucím zájmem, díky vědeckým poznatkům z posledních let [3].

První zmínka o kombuchové houbě neboli *scoby* pochází ze severovýchodní Číny zhruba kolem roku 220 př.nl. Název dostala na základě jména korejského lékaře Komba, který jako první přivezl do Japonska léčivý čaj, který byl fermentovaný touto houbou, aby uzdravil císaře Inkyo, který trpěl trávicími obtížemi. S rozšiřováním obchodních cest za Dálným východem se kombucha postupně rozšířila do Ruska a východní Evropy [4]. První dohledatelný záznam z historie o pití kombuchového nápoje pochází z Ruska a Ukrajiny ke konci 19. století. Kdy se kombucha šířila po Evropě, během první světové války díky zajatcům se dostala do nových zemí. Zhruba do 20. let 20. století byl kombuchový nápoj velice oblíbený v celém Německu, kde se používal jako domácí a lidový lék proti žaludečním potížím, hemeroidům a revmatismu. Samotnou kombuchovou kulturu lze označit několika názvy z kterých je nejčastěji používán: matka (nebo dítě), *scoby* (symbiotická kultura bakterií a kvasinek) nebo kombuchová houba [1,2].

Recept, jak vyrobit kombuchový nápoj byl předáván z generace na generaci a jedná se o výsledek fermentačního procesu, který kombinuje houbu *scoby*, čaj, cukr a vodu. Autentické *scoby* se samy rozmnožují, což z nich dělá udržitelný, příjemný a ekonomický nápoj, který je možné si připravit i v domácích podmínkách. Kombuchový nápoj se pyšní velké oblíbě po celém světě. V roce 2009 se tento nápoj řadil mezi jeden z nejoblíbenějších produktů v Americe. Od té doby tento nápoj provází velký nárůst prodeje a stal se komerčně dostupným v řadě obchodů. V komerční výrobě kombuchového nápoje se ovšem setkáváme s problémem, který firmy stále řeší, a to je způsob zastavení fermentace v lahvi. Toho lze docílit několika způsoby při čemž firmy nejčastěji vybírají potlačení přirozené kombuchové kultury. Ačkoliv je *scoby* spojována se slovem houba, o houbu se nejedná. Tento název označuje živý organismus žijící v symbióze, který je složený z mnoha bakterií, kvasinek a drobných organismů [3,4,5].

Dalo by se říci, že *scoby* je více lišejník než houba, jelikož typické organismy vyskytující se v kombaše jsou také typické pro lišejníky. I po vzhledové stránce je tato „houba“ podobná světle hnědému lišejníku. Lišejníky mají v přírodním léčitelství velmi dobrou pověst a na zemi se vykytují přes 2 miliardy let. V současnosti je známo cca 16 000 druhů lišejníku, mezi které se řadí i kombucha (*scoby*). *Scoby* je ta část celé kombucha houby, která přeměňuje obyčejný slazený čaj na nápoj kombucha. Jedná se o šedavě bílou nebo běžovou hmotu, která plave na povrchu a je zodpovědná za charakteristickou mírně octovou chuť a obsah alkoholu [6,5].

## 2.2 Výroba kombucha nápoje

Příprava kombuchového nápoje se řadí mezi jednu z nejjednodušších fermentací, které můžeme uskutečnit doma. Základem takové fermentace je kombuchový plát, který se většinou skládá ze dvou vrstev. *Scoby*, která se přidává do čajového nálevu je také označována jako mateřská a na této vrstvě dochází v průběhu fermentace k růstu vrstvy nové, tedy dceřiné. Jedná se o proces omlazování kombuchové kultury [4].

### 2.2.1 Čaj vhodný pro přípravu kombucha nápoje

Během vývoje lidské civilizace byla spousta potravin a nápojů užívána zejména díky jejich příznivým účinkům na lidské zdraví. Čaj je jeden z nejstarších známých léčiv, objeveným v Číně již před 5 000 lety, kde byl používán při odstraňování alkoholu a toxinů z těla, zlepšení průtoku krve a moči, zmírnění bolesti kloubů, zlepšení odolnosti vůči nemocem. Do Evropy byl čaj poprvé zaveden z Číny portugalskými a holandskými průzkumníky jako léčivá bylina. Během let se konzumace čaje začala propojovat nejen s jeho léčebnými účinky, ale stal se z něj životní návyk, stejně jako z kávy. V dnešní době je pěstován ve více než 30 zemích světa a hned po vodě se jedná o nejvíce konzumovaný nápoj na celém světě. Čaj je vyráběn jako zelený nebo černý, přičemž černý čaj představuje přibližně 80 % všech čajových výrobků. Složení a vlastnosti čaje jsou velmi dobře prozkoumány, což z něj činí vhodný výchozí bod pro pochopení potenciálu kombuchy. Volbou použitého čaje můžeme ovlivnit chuť výsledného nápoje, nebo zvýšit jeho příznivé účinky na náš organismus. Jako klasický kombuchový nápoj je považován černý čaj s kombuchovou kulturou a rafinovaným cukrem [7].

#### 2.2.1.1 Černý čaj

Tento typ čaje představuje největší světovou spotřebu a preferují jej především západní populace.



Obrázek 1 Šálek černého čaje[33]

Výroba černého čaje probíhá třemi hlavními kroky, a to zpracováním listů z čajovníku *Camellia sinensis*:

- **Vadnutí nebo sušení** – v prvním kroku je odstraněna z listů čaje voda, která tvoří asi 75% celkové hmotnosti čajového listu. To může být uskutečněno několika způsoby např. vystavení listů slunečnímu záření.

- **Válcování** – dalším krokem je rozkládání listové tkáně, čímž je usnadněn odtok lymfy a tím je podpořena následná enzymatická oxidace polyfenolů. Jedná se o krok, který je nezbytný pro vytvoření chuti, vůně a barvy černého čaje.
- **Oxidace** – jedná se o poslední etapu při zpracovávání černého čaje a je klíčovým faktorem při určování kvality čaje. Dochází zde k enzymatické oxidaci asi 90 – 95 % polyfenolů spolu s dalšími změnami [7,33].

### 2.2.1.2 Chemické složení černého čaje

V černém čaji jsou stejně jako v čaji zeleném obsaženy flavonoidy, kterých je zde méně než v čaji zeleném. Dále je zde obsažen kofein, který má rozdílné účinky než například v kávě kofein obsažený v černém čaji se váže ještě na další obsažené látky, díky tomu má schopnost snižovat krevní tlak. Rovněž katechiny vyskytující se v tomto čaji jsou označovány jako velmi silné antioxidační látky, které jsou schopny bojovat proti nádorům, snižují hladinu cukru v krvi a zabraňují angiogenezi. V neposlední řadě je zde obsažen např. fluor, který pomáhá bránit sklovinu našich zubů [8].

### 2.2.2 Jasmínový čaj

Jasmínový čaj je čaj s plnou vůní jasmínových květů a díky tomu se také někdy označuje jako vonící čaj. Typicky se jedná o čaj, který má základ zeleného čaje, ale může se také použít čaj černý nebo bílý. I přes základ těchto čajů je výsledná chuť jasmínového čaje jemně sladká. Listy tohoto čaje se sklízí a počátku jara a skladují až do pozdního léta, kdy dojde k rozkvetení čerstvých jasmínových květů, ty se sbírají brzy ráno, dokud nedojde k jejich otevření. Během noci se jasmínové květy rozevírají a uvolňují do čaje svou typickou vůni. Existují dvě metody používané k výrobě jasmínového čaje. Jedna metoda zahrnuje umístění čaje a jasmínových listů ve střídavých vrstvách, oproti tomu v druhé metodě dochází k promíchání čaje i listů a následné skladování přes noc. Tento proces může být opakován až sedmkrát pro dosažení nejlepší kvality [9,34].



Obrázek 2 Listy čaje s jasmínem[9]

### 2.2.3 Zelený čaj

Je vyroben stejně jako čaj černý z listků rostliny *Camellia sinensis*, která se pěstuje v různých zemích subtropického pásu a zasahuje až do pásu mírného. Největší produkce tohoto čaje je zejména v Asii a Africe. Existuje několik odrůd zeleného čaje, které se liší podmínkami pěstování a následného zpracování, což má zásadní vliv na charakter na výsledný čaj. Nejlepší podmínky pro pěstování čajovníku jsou při teplotním rozmezí od 18 °C do 28 °C.

Stejně jako pěstování čajovníků je důležitá sklizeň kdy se sklízí pouze dva horní listy a listový pupen. Celá sklizeň zeleného čaje se provádí ručně. Sběr se obvykle provádí ve čtyřech etapách:

- First Flush – od března do poloviny dubna
- In between – od dubna do poloviny května
- Second flush – od května do června
- Autumnal – od října do listopadu



*Obrázek 3 Listy zeleného čaje [36]*

Zelený čaj obsahuje fytochemikálie jako jsou polyfenoly a kofein. Polyfenoly, které se vyskytují v zeleném čaji, mají antioxidační, protizánětlivý a antikarcinogenní účinky. Díky zdravotním benefitům zeleného čaje je tento nápoj populární v mnoha zemích po celém světě. Katechiny zeleného čaje jsou užitečné díky svým protirakovinotvorným a antioxidačním vlastnostem [35,36].

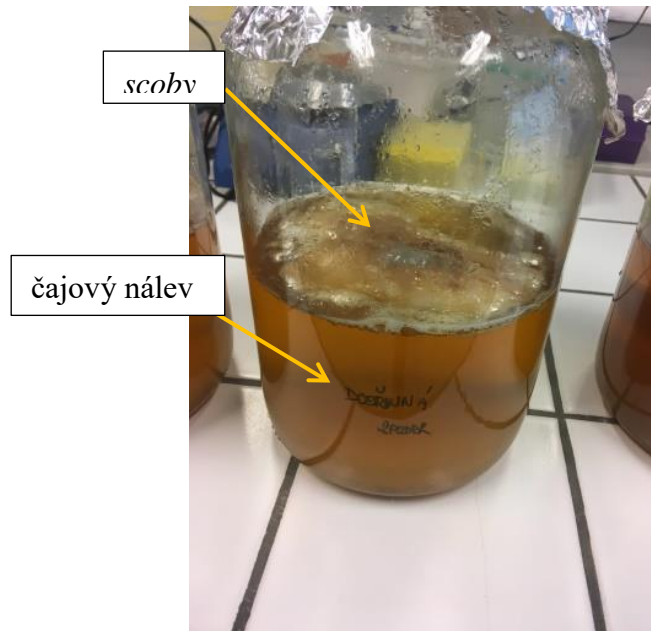
#### **2.2.3.1 Chemické složení zeleného čaje**

Čerstvý čajový list je bohatý na flavanolovou skupinu polyfenolů, která je známá jako katechiny. Suché listy mohou obsahovat až 30 % katechinu. Čajové listy obsahují i jiné polyfenoly zahrnující flavonoly a jejich glykosidy a depsidy, jako je kyselina chlorogenová a kumarylchinová kyselina. Dále je zde asi v 3 % obsažen kofein spolu s velmi malými množstvími ostatních methylxantinů, teofilinu a teobrominu. Pro zelený čaj je také jedinečná aminokyselina theanin (5-Methylglutamin). Zelený čaj kromě normálních složení enzymů obsahuje čajový list aktivní polyfenol oxidasu, která katalyzuje aerobní oxidaci katechinů [36,7].

#### **2.2.4 Vytvoření čajového nálevu**

Kombuchový nápoj se typicky připravuje z černého nebo zeleného čaje, který je oslazený cukrem. Pro přípravu nápoje, ale můžeme použít i čaje bylinné nebo ovocné, také sacharóza může být do nálevu přidávána ve formě cukru nebo medu. Do připraveného oslazeného čajového nálevu je vložena *scoba*, takto připravený nálev obsahující *scobu* je ponechán při pokojové teplotě zhruba 10 dní. Chuť výsledného kombucha nápoje je ovlivněna jak množstvím použitého cukru a druhu čaje, tak původem *scoby*. Některé čaje jako je například čaj bílý a zelený mají jemné chuťové tóny, a tudíž mohou vést k nevýrazné chuti výsledného nápoje z toho důvodu je nejpoužívanějším čajem čaj černý. Důležitým faktorem při výrobě

kombuchy je i správná doba louhování čaje. Pokud čaj louhujeme déle, než je doporučená doba, má to za následek extrakci více hořkých sloučenin, které vytvoří ve výsledném nápoji hořčejší chuť, kratší doba louhování má zase za následek méně aromatických sloučenin v nápoji a tudíž je výrazná chuť mdlá. Proto jsou pro přípravu nejvhodnější čajové listy určené k vícenálečovému použití, kde můžeme koncentrovat chuť čaje bez rizika nadměrné extrakce hořkých sloučenin [10,11,4].



Obrázek 4 Připravený čajový nálev se *scooby*

### 2.2.5 Primární fermentace

Jakmile je připraven slazený čajový nálev, odstraní se z něj čajové listy či sáčky. Následně se ochladí na optimální teplotu minimálně pod 32 °C a poté se přidá *scooby*, jelikož horký nálev by zničil mikroorganismy v houbě obsažené, což by mělo za následek neúplnou fermentaci. Optimální teplota nálevu pro přidání *scooby* je mezi 25 °C – 32 °C, což odpovídá teplotnímu optimu, kdy bakterie *Acetobacter* a kvasinky rostou nejlépe. Hrdlo nádoby obsahující nálev s čajovou houbou je nutné ponechat uzavřené plátnem či pevně tkanou látkou, tak aby byla umožněna dostatečná výměna plynu, zajišťující přežití mikroorganismů. Následně je kultura ponechána kvasit po dobu 7 až 10 dní při pokojové teplotě. Během tohoto primárního kvašení musí být pro rostoucí bakterie přítomen kyslík v dostatečném množství. Na druhou stranu však nelze ponechat kombuchový nápoj bez uzávěru, protože zde dochází k ohrožení kontaminací např. všudypřítomnými ovocnými muškami a nežádoucími kulturami mikroorganismů. Čím delší je doba této primární fermentace, tím více vyniká octová chuť výsledného nápoje a snižuje se obsah cukru [10,6].

Bakterie obsažené ve *scooby* řadíme mezi acidofilní mikroorganismy, což znamená, že tyto bakterie potřebují ke svému životu kyselé prostředí. S výjimkou bylinných čajů, všechny čaje, které se pro výrobu nápoje využívají, mají pH v rozmezí od 2,9 do 6,3. Hodnota pH v kombuchovém nápoji klesá během fermentačního procesu. Tento jev je způsoben zejména bakteriemi, které do média vylučují organické kyseliny a další látky. Nízké pH umožňuje zároveň růst pouze těch mikroorganismů, které jsou schopné vydržet výklenky pH, a tak mohou poskytnout určitou ochranu proti invazivním kontaminujícím látkám. Pro ukončení

primární fermentace stačí pouze vyjmout *scoby* z čajového nálevu, aby nedošlo k jejímu poškození. Vyjmutou houbu lze opětovně použít nebo skladovat v čajovém nálevu, a to po dobu tří týdnů. *Scoby* lze uchovávat i delší dobu, v tomto případě je potřeba uložit kulturu do chladu, ve kterém se mikroorganismům přítomným ve *scobě* zpomalí metabolické procesy a buněčné dělení se zastaví [10,12].

### 2.2.6 Sekundární fermentace

Po primární fermentaci následuje přefiltrování nápoje přes plátno a jeho následné stočení do lahví. V tomto kroku lze do připraveného nápoje přidat požadovanou chuť či aroma. Obvyklý proces vyjmutí *scoby* z nápoje neodstraní všechny mikroorganismy. To má za následek, že po stočení a uzavření nádoby zbylé mikroorganismy dále fermentují v tomto uzavřeném systému. Mikroorganismy produkují oxid uhličitý, který v lahvi nemůže unikát, tak jak tomu je při primární fermentaci. To má za následek saturaci kombuchového nápoje v lahvi. Zároveň během sekundární fermentace můžeme také pozorovat růst pH, což může způsobovat také tvorba oxidu uhličitého během této fermentace [6].

Organismy obsažené ve *scoby*, které zbyly v nápoji i přes jeho přefiltrování budou i nyní metabolizovat jakýkoli zbývající cukr a převádět jej na kyselinu mléčnou, octovou, ethanol a oxid uhličitý, díky tomu je výsledný nápoj perlivý a méně sladký. Tomuto kroku lze alespoň částečně zabránit umístěním lahví do chladu, čímž se fermentace a karbonace zastaví, jelikož se díky nízké teplotě mikroby dostanou do klidového stavu [6].



**Obrázek 5** Stočený kombuchový nápoj v lahvích[6]

## 2.3 Složení a vlastnosti kombuchy

V této kapitole bude podrobněji rozebráno společenství mikroorganismů, kvasinek a bakterií, které se ve *scoby* nacházejí i chemické vlastnosti, jak *scoby*, tak výsledného kombuchového nápoje.

### 2.3.1 Mikrobiální složení *scoby*

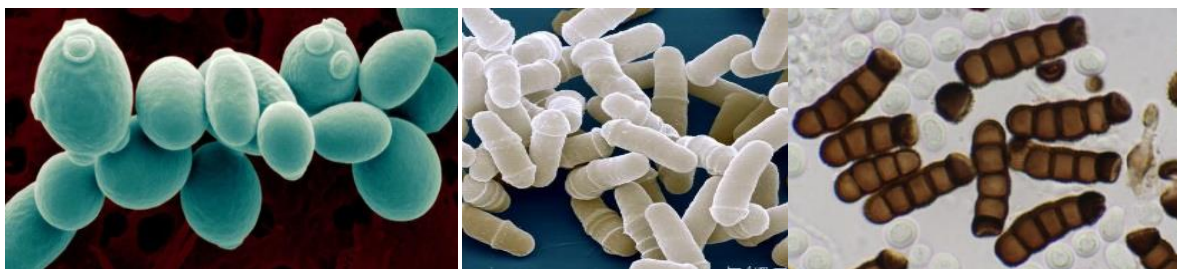
Fermentovaný čaj kombucha se vyrábí za pomoci plovoucí mikrobiální kolonie (*scoby*) sestávající se z kmenů aerobních bakterií a kvasinek žijících v symbióze a tvořící biofilm. Vzhled této kolonie většinou připomíná plovoucí houbu, ale jedná se o plovoucí celulózovou vrstvu. Tato celulózová vrstva, která se vytvoří během fermentace, se objeví jako tenká membrána na povrchu čajového výluhu, kde je buněčná hmota bakterií a kvasinek propojena a udržována pohromadě. Tato směs celulózy a mikroorganismů je nejspíše důvodem názvu čajová houba. Tato vrstva připravená z pelikulí *Acetobacter xylinum* má výbornou mechanickou pevnost a jedinečné vlastnosti z hlediska chemické stability a molekulární struktury [3].

Celulózová síť, která je vyrobena čistou kulturou *Acetobacter xylinum* se používá k léčbě popálenin kůže a jiných kožních poranění. Z různých výzkumů vyplývá, že kofein a jeho příbuzné sloučeniny jako je teobromin a teofylin stimulují schopnost bakterií produkovat tuto celulózovou vrstvu. Kofein obsažený v čaji tudíž podporuje tvorbu této vrstvy. Problém nastává při zvýšené koncentraci kofeinu asi na čtyřnásobek běžné hodnoty, kdy kofein začne inhibovat fermentaci kombuchy. Proces výroby této plovoucí celulózové vrstvy usnadňuje provzdušňování média nutné pro správný růst a proliferaci aerobních organismů. Tudíž s každou nově založenou várkou kombuchy vzniká nový film a tento nový film, lze následně použít pro přípravu dalšího kombuchového nápoje [3,10].

Bakterie, které se vyskytují v kombuchové kultuře a produkují kyselinu octovou a glukonovou jsou převládající heterotrofní druhy. Primární bakterií v kolonii je *Acetobacter xylinum*, který produkuje kyselinu octovou, glukonovou a celulózu z uhlíkových zdrojů jako je ethanol a glukóza. Za tento proces jsou zodpovědné enzymy alkoholdehydrogenáza a aldehyddehydrogenáza, enzymy, které produkují kyselinu octovou, ta poté vstupuje do Krebsova cyklu, jehož konečným produktem je oxid uhličitý. Rod *Gluconobacter* přítomný v kombuše není schopen oxidovat acetát přes Krebsův cyklus, protože postrádá enzymy jako je sukcinát dehydrogenáza a alfa-ketoglutarát dehydrogenáza, které jsou nezbytné pro oxidační proces, což vede k akumulaci produktů jako je glukonát v médiu. Bylo prokázáno, že kvasinková kolonie nacházející se v kombuše je velice variabilní, přesto ale některé druhy jako jsou: *Brettanomyces*, *Zygosaccharomyces* a *Saccharomyces* se vyskytují ve všech typech kombuchy. Výskyt druhů kvasinek se liší dle historického původu kombuchy např:

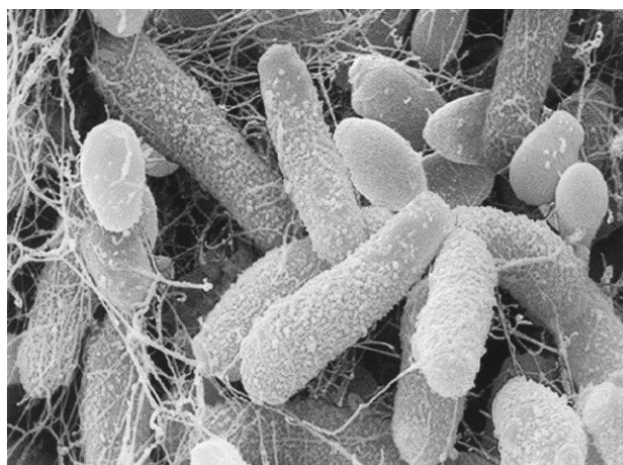
- Taiwan – *Saccharomyces cerevisiae*, *Zygosaccharomyces bailii* a *Brettanomyces bruzellens*
- Mexiko – *Brettanomyces intermedius*, *Candida famata*, *Pichia membranaefaciens*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Zygosaccharomyces bailii* a *Zygosaccharomyces delbrueckii*

Obecně platí, že kvasinky *Saccharomyces*, *Torulopsis*, *Mycotorula*, *Schizosaccharomyces*, *Pichia*, *Torula*, *Mycoderma* a rod *Candida* jsou nejhojněji zastoupeny ve všech druzích kombuchy, avšak kmenové zastoupení kvasinek v koloniích je proměnné a závisí dle původu kombuchy [13,14,15,16].



**Obrázek 6** Kvasinky *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces* a *Torula* [13,14,15,16]

Výhodou přípravy kombuchového nápoje je velmi nízké riziko kontaminace patogenními mikroorganismy vycházející z vlastností media, tudíž výroba takového nápoje je jednoduše proveditelná a nepotřebuje žádné speciální opatření. Poměrná kyselost produktu (pH 2,5) omezuje schopnost mnoha jiných mikroorganismů a možných kontaminantů na takovém substrátu růst. Celá mikrobiální symbióza v celulózové vrstvě je velmi složitá. Bakterie a kvasinky, které se zde nacházejí, jsou uspořádány v pásmech uvnitř celulózové sítě [3].



**Obrázek 7** Uspořádání kvasinek a bakterií ve scoby[3]

Organismy obsažené v kombuše mají mezi sebou příznivé vztahy, kvasinky, které jsou producenty ethanolu, pomáhají bakteriím k produkci kyseliny octové. Navíc produkce kyseliny octové může dále napomáhat ke stimulaci kvasinek a tvorbě ethanolu. V konečném důsledku současná výroba ethanolu a kyseliny octové brání kontaminaci jinými mikroorganismy. Zároveň je zajištěna konverze oxidu uhličitého během fermentace, která začíná kvasinkami rozkládajícími použitý cukr na glukózu a fruktózu. Vzniklá glukóza je primárně vyčerpána kvasinkami za vzniku ethanolu. Ethanol se následně oxiduje bakteriemi na acetaldehyd a následně kyselinu octovou. Vedlejší biochemická aktivita bakterií *Acetobacter* přeměňuje glukózu na kyselinu glukonovou, naopak fruktóza zůstává součástí fermentačního nálevu a je využívána mikroorganismy k méně významným přeměnám. Z výše uvedeného tedy vyplývá, že v průběhu fermentace jsou hlavními produkty bakterií především kyselina octová, glukonová a celulóza [3,16].

### 2.3.1.1 Kvasinky

Kvasinky jsou eukaryotní chemoheterotrofní jednobuněčné organismy patřící do říše nižších hub. V přírodě jsou tyto organismy velmi rozšířené a lze je nalézt prakticky po celém světě. V současné době je známo více než 500 druhů, které tvoří přibližně 37 rodů. Nejznámějším a zároveň nejprostudovanějším zástupcem je kvasinka *Saccharomyces cerevisiae*, která je využívána už po celá staletí k výrobě piva, vína, kombuchy a řady dalších nápojů. Buňky kvasinek a kvasinkových organismů mají velmi různorodý tvar buňky, který se mění v závislosti na podmínkách vnějšího prostředí a také souvisí s funkcí dané buňky. Kvasinková buňka mění svůj tvar i v průběhu růstu a vývoje. Obecně u kvasinek pozorujeme oválné, kulovité či elipsoidní tvary buňky. Kvasinky rozdělujeme do dvou hlavních tříd, a to *Ascomycetes* a *Basidiomycetes*. Kvasinky se rozmnožují zejména nepohlavně a to dělením, nebo pučením. Kvasinky jsou primárně využívány v potravinářství, biotechnologii a farmaceutickém průmyslu [13,16].

### 2.3.1.2 Bakterie

Bakterie jsou jednobuněčné prokaryotické organismy mající kokovitý či tyčinkovitý tvar a zpravidla dosahují velikosti v řádech mikrometrů. Jedná se o nejrozšířenější skupinu organismů na světě a lze je najít v půdě, vodě i ovzduší, kde žijí v symbióze s mnohobuněčnými mikroorganismy. Vzhledem k tomu, že se jedná o nejrozšířenější organismus na planetě, vyvinuly si bakterie různé požadavky, které jsou adaptovány na prostředí, v němž žijí. Dle tohoto předpokladu, můžeme bakterie rozdělit dle jednotlivých parametrů [37,16]:

- teplota: *Psychrofilní* – teplota do 20 °C  
*Mezofilní* – teplota v rozmezí 20-40 °C  
*Termofilní* – teplota 40 °C a více
- pH prostředí: *Alkalofilní* – pH 8 a výše  
*Neutrofilní* – pH 6-8  
*Acidofilní* – pH 6 a níže
- potřeby kyslíku: *Aerobní* – vyžadující kyslík  
*Mikroaerofilní* – kyslík ve velmi nízké koncentraci  
*Fakultativně anaerobní* – rostou lépe v přítomnosti kyslíku, ale dokáží růst i bez něj  
*Striktně anaerobní* – jen bez kyslíku).

### 2.3.1.3 Enzymy

Enzymy jsou obvykle proteiny nebo molekuly s charakteristickou sekvencí z aminokyselin urychlující chemické procesy látkové výměny v buňce. Jedná se o chemické látky, které jsou produkovány buňkami a složí k urychlení biochemické reakce, tudíž se jedná o přirozené biokatalyzátory, bez nichž by procesy nemohly samy o sobě probíhat. Jejich pojmenování většinou vyplývá z reakce, kterou katalyzují:

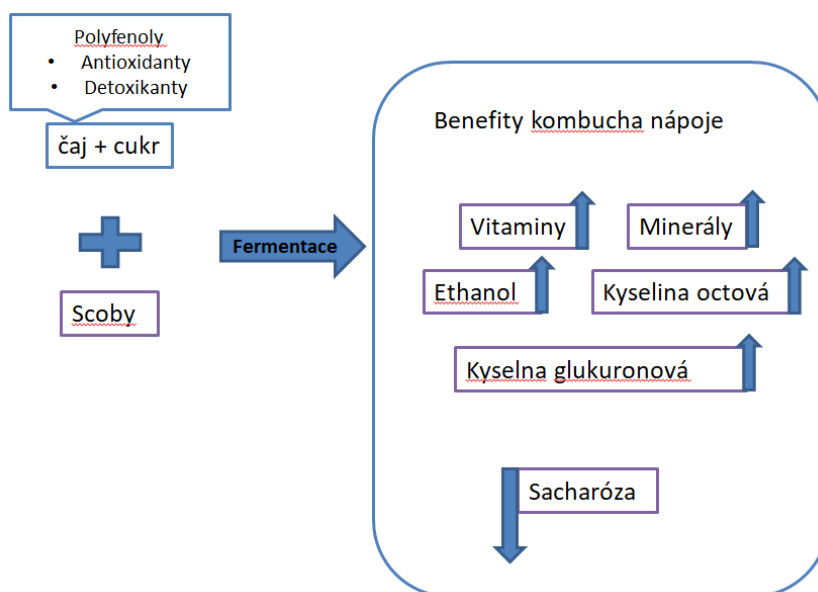
1. Oxidoreduktázy – katalyzují oxidační a redukční reakce
2. Transferázy – převádějí funkční skupiny
3. Hydrolázy – katalyzují hydrolýzu různých vazeb
4. Lyázy – štěpí různé vazby jinými mechanismy, než je hydrolýza a oxidace
5. Izomerázy – katalyzují izomerní změny uvnitř jedné molekuly
6. Ligázy – spojují dvě molekuly pomocí kovalentní vazby

Enzymy obsažené ve *scoby* se účastní štěpení výživových látek, a tak podporují zatížený trávicí trakt [21].

### 2.3.2 Chemické složení kombuchového nápoje

Při výrobě kombuchy dochází k progresivní modifikaci čajových složek a sacharózy. Hlavními metabolity identifikovanými ve fermentovaném nápoji jsou kyselina mléčná, octová, glukonová, glukuronová, ethanol a glycerol. Složení a koncentrace metabolitů v nápoji je závislá na zdroji použitého čaje, koncentraci cukru a celém průběhu fermentace. Obecně platí, že při použití 50 g/l sacharózy jsou výsledné koncentrace ethanolu a kyseliny mléčné v optimu pro přijatelné konzumování nápoje. Bakterie a kvasinky v čajové houbě spotřebovávají substrát různými doplňkovými způsoby.

Enzymová invertáza, která je získána z kvasinek, katalyzuje hydrolýzu sacharózy na glukózu a fruktózu, přičemž je produkován glykolýzou ethanol. Na druhou stranu *Gluconobacter* a *Acetobacter* využívají glukózu k produkci kyseliny glukonové a ethanolu za vzniku kyseliny octové, ta inhibuje patogenní růst mikroorganismů. V Kombuše je prokázána přítomnost různých sloučenin, a to včetně širokého spektra organických kyselin (citronová, glukonová, glukuronová, octová, jantarová, listová, vinná, malonová, mléčná), vitaminů (B1, B2, B6, B12, C), aminokyselin, biogenních aminů, pigmentů, proteinů, lipidů, purinů a minerálů (mangan, kobalt, chrom, kadmium). Přítomnost výše zmíněných chemických složek v kombuchovém nápoji je velmi proměnlivá v závislosti na použití kultury pro fermentaci, teplotě a době fermentace [7,3].



**Obrázek 8** Chemické sloučeniny vznikající při tvorbě kombuchového nápoje [7]

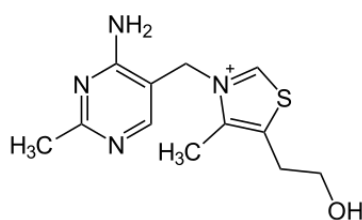
Chemické složení kombuchového nápoje, koncentrace zbytkového cukru, oxidu uhličitého a organických kyselin, je tím, co určuje konečnou chuť nápoje. Je prokázáno, že kombuchový nápoj obsahující vyšší koncentrace kyseliny octové má ve výsledku výraznější kyselou chuť. Oproti tomu kyselina glukonová vytváří chuť méně výraznou [7,3].

### 2.3.3 Vitaminy

Vitaminy jsou nízkomolekulární látky, nezbytné pro život. V lidském organismu mají katalytickou funkci biochemických reakcí. Obecně se vitaminy podílejí na metabolismu sacharidů, bílkovin a tuků. Vitaminy mohou být rozpustné buď v tucích (vitamin A, vitamin D, vitamin E a vitamin K) nebo ve vodě (vitamin H, vitamin B, vitamin C). Všechny vitaminy, které se v kombuchovém nápoji vyskytují, jsou rozpustné ve vodě a jejich koncentrace v nápoji se liší dle použité mikrobiální kultury.

#### 2.3.3.1 Vitamin B<sub>1</sub>

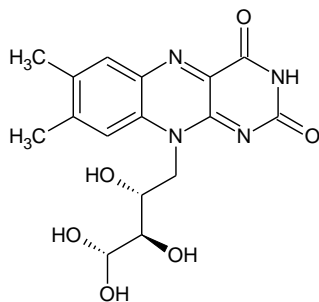
Vitamin B<sub>1</sub> neboli thiamin je nezbytnou součástí lidské výživy. Pokud se nacházíme ve velkém stresu nebo velké fyzické námaze, jeho spotřeba strmě stoupá. Thiamin musí být neustále doplňován z potravy, protože se v těle neukládá a jeho zásoba vydrží zhruba na 4 až 10 dní. Vitamin B<sub>1</sub> působí pozitivně proti únavě a na nervový systém [38,39].



Obrázek 9 Chemický vzorec thiaminu[39]

#### 2.3.3.2 Vitamin B<sub>2</sub>

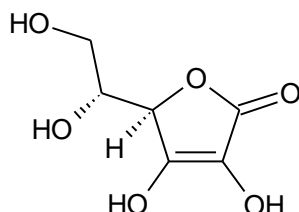
Riboflavin je důležitým vitaminem, který udržuje dobrý stav očí, kůže, funkce srdce a dalších orgánů. Vzhledem k jeho vlivu na metabolismus cukrů, aminokyselin a tuků ovlivňuje příznivě celkovou energetickou přeměnu v organismu. S pokročilým věkem stoupá úbytek vitamínu B<sub>2</sub> a ten je provázen ztrátou i ostatních vitamínů z této skupiny [41,40].



Obrázek 10 Chemická struktura riboflavinu[40]

### 2.3.3.3 Vitamin C

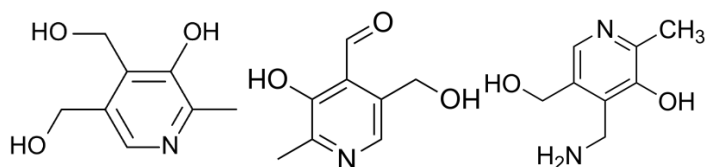
Vitamin C neboli kyselina askorbová je důležitý pro správnou funkci všech buněk lidského těla. Tento vitamin má v lidském těle tři významné hlavní role, které jsou: enzymový kofaktor, redukční činidlo a antioxidant. Mimo jiné se podílí na tvorbě mezibuněčné hmoty a tím pomáhá ke správné stavbě kostí, svalů, šlach, cév a kůže. Díky tomu, že se jedná o antioxidant, chrání buňky před poškozením volnými radikály [17,42].



Obrázek 11 Chemická struktura vitaminu C[42]

### 2.3.3.4 Vitamin B<sub>6</sub>

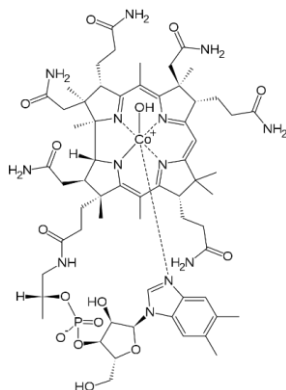
Tímto názvem se označují pyridinové deriváty (pyridoxol, pyridoxam a pyridoxamin), které jsou účinnými vitaminy a účastní se metabolismu sacharidů a aminokyselin. Vitamin B<sub>6</sub> je široce rozšířen v potravinách, zejména v mase, celozrnných výrobcích, zelenině a oříšcích. Jedná se o kofaktor pro velké množství enzymů používaných v metabolismu aminokyselin. Aktivní formou všech derivátů tohoto vitaminu je pyridoxal-5-fosfát, který se pevně váže na bílkovinné části celé řady enzymů a tím umožňuje jejich katalytickou aktivitu [18].



Obrázek 12 Struktury: Pyridoxol, Pyridoxal, Pyridoxamin[43]

### 2.3.3.5 Vitamin B<sub>12</sub>

Vitamin B<sub>12</sub>, známý také jako kobalamin má poměrně složitou strukturu, kdy centrálním atomem je kobalt se čtyřmi atomy dusíku. Jedná se o důležitý kofaktor živočišných bílkovin, který je nezbytný pro zrání erytroblastů. Přísnost tohoto vitaminu do těla je zajištěn potravou, kdy jeho hlavním zdrojem jsou játra. Nedostatek kobalaminu má významné účinky na lidský organismus, a to zejména na metabolismus buněk, mozek a nervový systém [19].



### 2.3.4 Minerály

Minerály jsou anorganické látky potřebné v malých množstvích pro normální tělesné funkce a růst. V kombuchovém nápoji se vyskytují v nižších koncentracích a jsou to hlavně měď, železo, kobalt, mangan, nikl a zinek.

### 2.3.5 Fenolické látky

Jedná se o látky představující nejhojnější antioxidanty, které jsou přítomné ve stravě. Důležitou roli mají fenolické látky při prevenci několika onemocnění souvisejících s oxidačním stresem, jako jsou rakovina a neurodegenerativní onemocnění. Podílejí se na modelaci aktivity různých enzymů a buněčných receptorů jako prostředek obrany před oxidačním stresem způsobeným reaktivními druhy kyslíku. Polyfenoly a flavanoidy, přítomné v čaji jsou zodpovědné za antioxidační vlastnosti tohoto čaje. Během fermentace kombuchového nápoje dochází ke zvýšení celkového obsahu polyfenolů a flavanoidů. Toto zvýšení může mít za následek degradaci komplexních čajových polyfenolů a flavanoidů na menší molekuly některými enzymy uvolněnými z mikroorganismů nacházejících se ve *scooby*. Takovéto přeměny umožňují například mikroorganismy jako je *Candida tropicalis*, která má schopnost degradovat různé polyfenoly. Výsledný fermentovaný kombuchový nápoj má vyšší redukční sílu oproti klasickému čaji, což může být způsobeno právě zvýšením těchto fenolických látek [29,21].

### 2.3.6 Ethanol

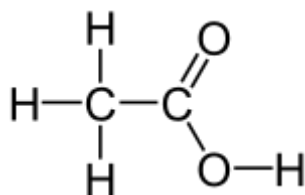
Koncentrace ethanolu je zvyšována s dobou fermentace, poté následuje snížení koncentrace, které je způsobeno působením octových bakterií využívajících ethanol k tvorbě kyseliny octové. Uvádí se, že mírná konzumace alkoholu má ochranný účinek pro lidské tělo před volnými radikály [3,21].

### 2.3.7 Organické kyseliny

Výskyt organických kyselin v kombuše je závislý na druhu použitého čaje. Profily organických kyselin se mění v průběhu kvašení v závislosti na použití černého nebo zeleného čaje. Bylo prokázáno, že některé z těchto kyselin obsažených v nápoji mají in vitro antimikrobiální aktivitu a zlepšují spánek [21].

#### 2.3.7.1 Kyselina octová

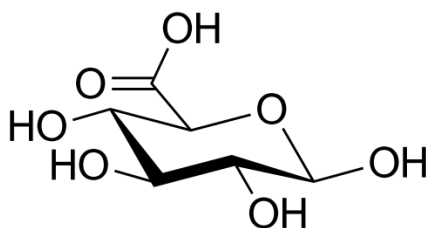
Jedná se o chemickou sloučeninu zodpovědnou za kyselou chuť a tradiční octový zápach. Kyselina octová má tendenci v kombuchovém nápoji stoupat až na 11 g/l při 30 dnech fermentace, následně potom postupně klesá až na 8 g/l při 60 dnech fermentace. Snížení obsahu kyseliny octové v nápoji je způsobeno jejím pozdějším využitím, kdy ji bakterie využívají jako zdroj uhlíku. Koncentraci kyseliny octové v nápoji můžeme ovlivnit druhem použitého cukru, kdy při použití melasy je produkce této kyseliny značně nižší [21,32].



Obrázek 14 Chemický vzorec kyseliny octové[45]

### 2.3.7.2 Kyselina glukuronová

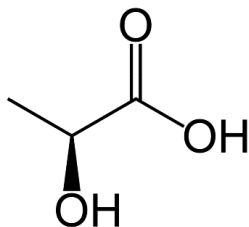
Jedná se o jednu z nejprospěšnějších organických kyselin obsažených v kombuchovém nápoji. Přirozeně se vyskytuje v lidském těle, kde je produkována zdravými játry v relativně dostatečném množství. Zde hraje velkou roli při xenobiotické detoxikaci jater, neboť má schopnost se navázat na molekulu toxinu a tím upřednostňovat jejich eliminaci z organismu. Problémem nastává to, že kyselina glukuronová je v těle atakována velkou dávkou škodlivin, které tělo nedokáže vlastními silami odbourat. Škodliviny, které naše tělo absorbuje, a jsou ukládány v tukových tkáních. Kyselina glukuronová na sebe váže škodlivé a odpadní látky, které jsou nahromaděné v našem těle a napomáhá jejich přeměně na konečné produkty látkové výměny, které jsou následně odváděny močí z těla ven. Kromě toho se také jedná o prekurzor kyseliny L-askorbové (vitamin C) v kombuchovém nápoji [7].



Obrázek 15 Chemický vzorec kyseliny glukuronové[47]

### 2.3.7.3 Kyselina mléčná

Kyselina mléčná je jednou z nejčastěji používaných kyselin v potravinách, kde se vyskytuje buď přirozeně, nebo jako produkt fermentace (zelí, jogurt a mnoho dalších). Jedná se o hlavní metabolický meziprodukt ve většině živých organismů. Kyselina mléčná, která je přidávána do potravin se získává buď fermentací sacharidů, nebo chemickým postupem. Oba tyto postupy jsou velmi konkurence schopné s podobnými výrobními náklady [22].



Obrázek 16 Chemický vzorec kyseliny mléčné[46]

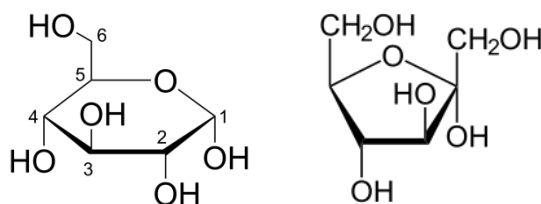
## 2.3.8 Sacharidy

Sacharidy, označovány také jako glycidy a nepřesně cukry nebo karbohydráty. Jsou hlavním palivovým zdrojem pro činnost mozku a svalů. Jedná se o polyhydroxylové aldehydy nebo ketony, vyskytující se jako monosacharidy, disacharidy, oligosacharidy a polysacharidy [23].

### 2.3.8.1 Monosacharidy

Monosacharidy se nacházejí např. v ovoci a medu jako glukóza a fruktóza. Tyto dva jednoduché cukry se mohou vstřebat ze stravy běžně v trávicím traktu. Monosacharidy jsou rozděleny dle tří různých charakteristik: polohy karbonylové skupiny, počtu atomů uhlíku a

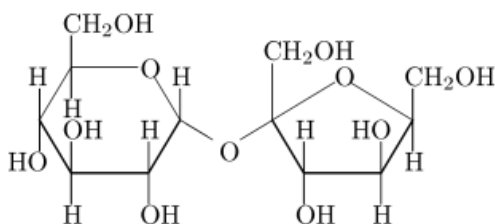
chirálních vlastností. V závislosti na počtu uhlíků monosacharidu je dále dělíme: triózy, tetřózy, pentózy, hexózy atd...[23]



Obrázek 17 Chemická struktura glukózy a fruktóza[50,49]

### 2.3.8.2 Disacharidy

Disacharidy jsou tvořeny dvěma monosacharidy spojenými glykosidickou vazbou mezi anomerním centrem jedné monosacharidové jednotky a atomem hydroxylového kyslíku druhé jednotky. Běžně se vyskytují v cukrové třtině, ovoci, zelenině a jako laktóza v mléčných výrobcích [23].



Obrázek 18 Chemický vzorec sacharózy [48]

## 2.4 Nutriční význam kombuchového nápoje – metabolismus cukrů

Sacharidy jsou pro heterotrofní organismy významným zdrojem rychlé energie. Spolu se sacharidy se do těla dostává i vláknina, tedy neenergetická složka. Sacharidy přijímané potravou mohou být mono-, di- i polysacharidy. Proces trávení sacharidů je založen na hydrolytickém štěpení glykosidové vazby. Glykosidová vazba je štěpena enzymem amyláza, který je obsažen ve slinách ve formě ptyalinu a štěpí tak polysacharidy postupně na disacharidy. Produktem metabolismu sacharidů jsou monosacharidy, tedy jednoduché cukry jako je fruktóza, galaktóza, glukóza atd... Následné vstřebávání sacharidů se děje přes stěnu tenkého střeva. Hexózy se přeměňují v játrech na glukosu, která je dále unášena krevním řečištěm, krví je dále glukosa transportována do tkání. Všechny monosacharidy jsou převáděny na glukosu. Hladinu glukosy v krvi upravuje inzulín, který ji snižuje a glukagon, který ji zvyšuje. Pokud dojde k přebytku glukosy je přeměněna na glykogen nebo tuk. Pro některé tkáně jako jsou sítnice, mozek nebo kůra nadledvinek je glukosa jediným zdrojem energie [51].

### 2.4.1 Glykolýza

U většiny buněk probíhá glykolýza v cytoplazmě. Jedná se o nejdůležitější anaerobní odbourávací proces, který je složen z několika dílčích kroků. Nejprve dochází k přeměně glukosy na pyruvát (sůl kyseliny pyrohroznové), za vzniku dvou molekul pyruvátu a dvou

molekul ATP z jedné molekuly glukosy. Při procesu glykolýzy je zapotřebí vzniku glukosa-6-fosfátu, jakožto vstupní suroviny, který je připraven fosforylací glukosy vzniklé z jiných monosacharidů při trávení potravy [51].

#### **2.4.2 Fáze glykolýzy**

Během první fáze, označované jako investiční, dochází k převodu monosacharidu glukózy enzymem hexokinázou na glukózu-6-fosfát, a tedy její energetickou aktivaci pro vstup do glykolýzy. V druhém kroku je glukóza-6-fosfát enzymem izomerázou převeden na fruktozu-6-fosfát. Posledním krokem první fáze glykolýzy je druhá fosforylace za vzniku fruktóza-1,6-bisfosfát za využití druhé molekuly ATP. V druhé delší části glykolýzy poté dochází mechanismem obrácené aldolové kondenzace k přeměně D-fruktosy-6-fosfátu na glycerinaldehydu-3-fosfát a dihydroxyacetonfosfát. Následně dochází k přeměně glycerinaldehydu-3-fosfátu na pyruvát sérií oxidačních reakcí. Při těchto reakcích se substrátovou fosforylací z jedné molekuly glycerinaldehydu-3-fosfátu uvolní 2 molekuly ATP a oxidací jedna molekuly  $\text{NADH}^+$  [51].

### **2.5 Příznivé účinky kombucha čaje na lidský organismus**

Bylo prokázáno mnoho pozitivních účinků při pití kombuchového nápoje. Byla provedena řada nehumánních studií o antimikrobiálních, protirakovinových, hepatoprotektivních a antioxidačních vlastnostech. Účinky kombuchy, dle pravidelných konzumentů kombuchového nápoje:

- Detoxifikace krve
- Snížení hladiny cholesterolu
- Snížení aterosklerózy regenerací buněčných stěn cév
- Snížení krevního tlaku
- Podpora funkce jater
- Snížení obezity a úprava chuti k jídlu
- Zlepšení zraku
- Zbavení se bolestí hlavy
- Snížení stresu, nervových poruch a nespavosti
- Zlepšení zdraví vlasů, pokožky a nehtů
- Zlepšení imunitního systému
- Ochrana před diabetem

Nicméně i přes to, že nebyly dosud provedeny žádné humánní studie, můžeme vycházet z prověřených účinků čaje na lidské zdraví, jako jsou: antimikrobiální, protinádorové, antiateratogenní, antioxidační a protizánětlivé účinky [54].

## 2.6 Teoretické základy použitých metod

V následujících kapitolách budou teoreticky popsány metody, které byly použity pro splnění cílů této diplomové práce.

### 2.6.1 Bioreaktor

Jedná se o součást biochemických procesů, kdy je možno sledovat průběh celého systému. Hlavním úkolem tohoto zařízení je poskytnout řízené prostředí pro dosažení optimálního růstu a tvorby produktu v konkrétním systému. V současnosti existují tři skupiny bioreaktorů používaných pro průmyslovou výrobu:

- Nemíchaný, nevodivý systém – cca 70 % všech bioreaktorů
- Nemíchaný provzdušněný systém – cca 10 % všech bioreaktorů
- Míchané a provzdušněné systémy – cca 20 % všech bioreaktorů

Nemíchané, provzdušněné bioreaktory se tradičně využívají při tradičních výrobcích vína, piva a sýrů.

Aerobní bioreaktory jsou rozděleny do čtyř kategorií podle toho, jak je plyn distribuován. Průmyslové bioreaktory odolávají tlakům až do tří atmosfér. Jsou vybaveny osvětleným vertikálním sklíčkem, díky kterému je možno mít obsah stále pod kontrolou. V bocích jsou místa pro senzory měřící pH, teplotu a rozpuštěný kyslík, což jsou minimální požadavky. Dále je součástí míchadlo umístěné na horní nebo dolní straně nádrže, aby bylo dosaženo konstantního míchání celého objemu [24].



Obrázek 19 Bioreaktor [24]

### 2.6.2 Kapalinová chromatografie

Kapalinová chromatografie se řadí mezi kolonové chromatografické techniky. Základní separační mechanismus chromatografie je založen na rozdělování jednotlivých složek vzorku mezi dvě vzájemně nemísitelné fáze, které jsou označovány jako mobilní a stacionární fáze, a to na základě rozdílné afinity k těmto fázím. Nejmodernější chromatografickou technikou je

HPLC technika, kde je kolona obsahující stacionární fázi zapojená ve vysokotlakém systému, ve kterém je mobilní fáze se vzorkem čerpána na kolonu. V chromatografii existuje celá řada různých detektorů, které se navzájem liší svojí specifitou, limity detekce a samotným detekčním principem. Nejrozšířenějšími detektory jsou poté spektrofotometrické detektory, pro svoji univerzálnost, nízké provozní náklady a robustnost. Na druhou stranu mají tyto detektory nižší limity detekce. Spektrofotometrické detektory fungují na principu absorpce světelného záření vzorkem, které se řídí Bougert-Lambert-Beerovým zákonem, jehož znění je zobrazeno na rovnici níže [25].

$$A = \varepsilon \cdot l \cdot c \qquad 1.1$$

### 2.6.2.1 Detektory

Detektory v kapalinové chromatografii monitorují změny složení mobilní fáze, tím že měří fyzikální nebo chemické veličiny. Můžeme je rozdělit do tří základních skupin [25]:

- Univerzální detektor – reaguje na všechny analyty
- Selektivní detektor – reaguje pouze na určitou změnu látek
- Specifický detektor – reaguje pouze na jediný analyt, případně na velmi malou skupinu látek s velmi podobnými vlastnostmi

#### UV-VIS detektor

Jeden z nejpoužívanějších detektorů v kapalinové chromatografii. Jeho funkce je založena na principu absorpce záření vzorkem v měřicí cele, které je vysílané ze zdroje záření. Absorpce záření je ve zředěných roztocích přímo úměrná koncentraci látky ve vzorku. Nejmodernější formou detektoru je tzv. detektor diodového pole: Tento detektor je osazen řadou fotodiod, kde každá je nastavena na jednotlivou vlnovou délku. Díky této konstrukci je detektor schopen zaznamenávat spojitě absorpční spektrum ve zvoleném intervalu každou vteřinu chromatografického záznamu [25].

#### RI detektor

RI detektor neboli detektor indexu lomu je univerzálním a nejstarším detektorem pro kapalinovou chromatografii. Principem detekce je měření změny v optickém indexu lomu mezi vzorkem a mobilní fází v referenční cele. RI detektor je široce užíván k analýze cukrů, organických kyselin a triglyceridů. Nejběžnější konstrukcí tohoto detektoru je refraktometr, na který je nasměřováno světlo z lampy, dále je zde jedna měřicí a jedna srovnávací cela. Jak světlo prochází celami, odlišně se láme a měří se pomocí dvou fotodiod, které ho převedou na měřitelný signál [25].

### 3 Cíle práce

Cílem této diplomové práce bylo studium procesů probíhajících při výrobě kombuchového nápoje. Nejprve bylo potřeba dané téma důkladně prostudovat a na základě poznatků vypracovat literární rešerši.

V experimentální části byla nejprve potřeba se zaměřit na optimalizaci metody pro stanovení námi hledaných analytů jako je kyselina octová, kyselina mléčná, ethanol, sacharóza, glukóza a fruktóza. Následně byla provedena příprava kombuchového nápoje v bioreaktoru za řízené teploty. Vzorky odebírány během primární fermentace v bioreaktoru byly analyzovány pomocí HPLC techniky. Následně probíhala analýza primární fermentace kombuchového nápoje, který byl připraven firmou RebornFood. Vzhledem k tomu, že je žádoucí, aby byl výsledný kombuchový nápoj perlivý byla provedena taktéž analýza sekundární fermentace kombuchového nápoje dodaného touto firmou.

## 4 Experimentální část

### 4.1 Použité materiály a přístroje

Pro provedení experimentů, bylo využito vybavení laboratoří fakulty. Použité chemikálie, přístroje a laboratorní pomůcky, jsou popsány níže.

#### 4.1.1 Chemikálie

- Glukóza  $\geq 99,5$  % (GC), Sigma
- Fruktóza  $\geq 99$  %, Sigma
- Sacharóza  $\geq 99,5$  %, Sigma
- Kyselina octová 99,8 %, Lachner
- Kyselina mléčná 80 %, Lachner
- Ethanol p.a., Penta
- MiliQ voda
- Destilovaná voda
- Kyselina sírová 96 %, Penta

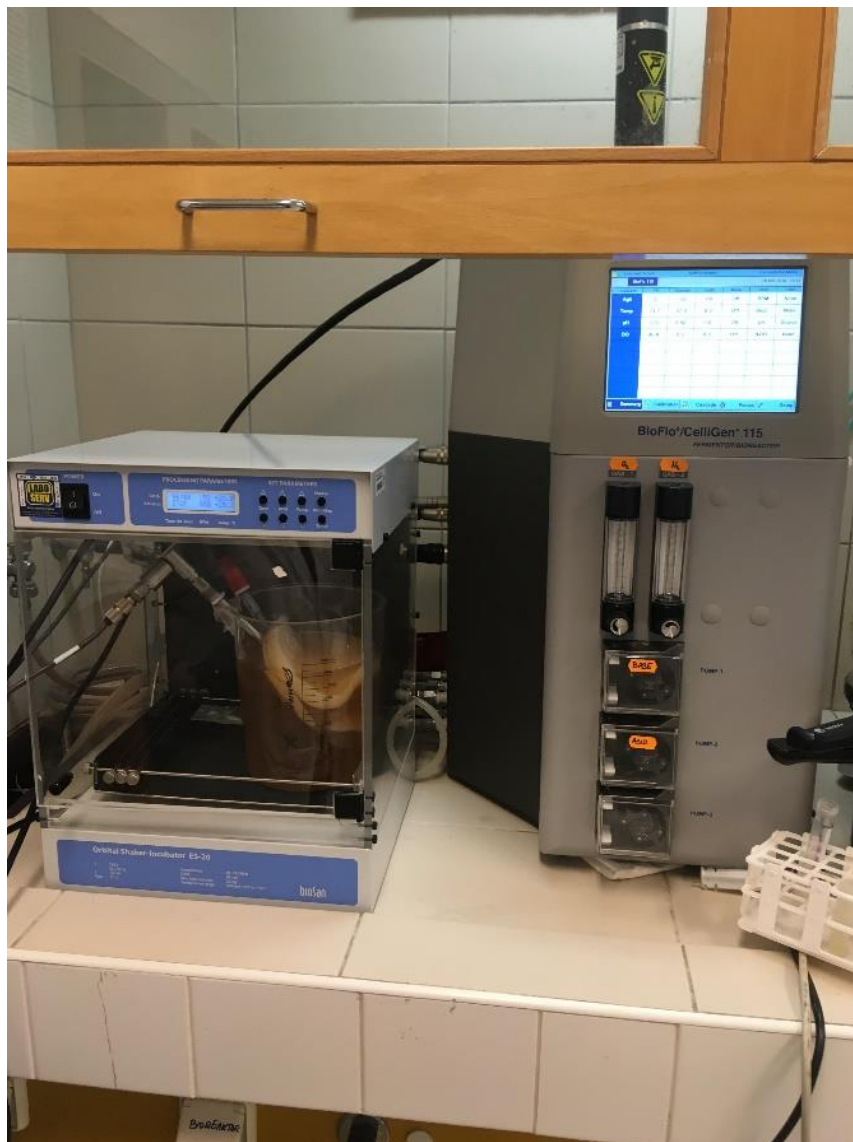
#### 4.1.2 Vybavení laboratoře

- Centrifuga – eppendorf 5417R
- Dávkovací stříkačka Hamilton
- Box pro mikrobiologii – Bioair aura mini
- Ultrazvuk – Elmasonic S 30
- Bioreaktor – BioFlo\*/CelliGen\* 115, New Brunswick
- HPLC – Shimadzu
- Termostat – Memmert
- Kolona pro kapalinovou chromatografii – Phenomenex
- Automatické pipety – Biohit
- Autokláv
- Detektor – RID-10A, Shimadzu
- Detektor – SPD-M10AVP, Shimadzu
- Kolona – Watrex se stacionární polymerní fází H forma 250×8 cm
- Kolona – Phenomenex rezex roa organic acid H<sup>+</sup>
- Skleněná stříkačka Hamilton
- Stříkačkové mikrofiltry

## 4.2 Výroba kombuchového nápoje v laboratorních a provozních podmínkách

### 4.2.1 Výroba kombuchového nápoje v bioreaktoru

Pro experiment řízené fermentace byl zvolen bioreaktor od firmy Brunswick. Vzhledem k povaze *scoby*, která je v čajovém nálevu umístěna na povrchu, musel být bioreaktor této fermentaci uzpůsoben. Standartní reakční nádoba bioreaktoru byla odebrána a nahrazena termostatem, do kterého byla umístěná skleněná nádoba obsahující slazený čajový nálev a *scoby*. Pro primární fermentaci byla zvolena teplota 25 °C, tato teplota se dle studií jevila jako optimální pro produkci metabolitů mikroorganismy obsaženými ve *scoby*.



**Obrázek 20** *Improvizovaný bioreaktor při primární fermentaci kombuchového nápoje*

Jako první byl do skleněné nádoby připraven čajový nálev ze sypaného čaje Pu-erh, který je také používán k fermentaci kombuchového nápoje firmou RebornFood. Po vyluhování čaje byl tento výluh oslazen 70 g/l sacharózy a do takto připraveného nálevu byla umístěna *scoby*, která byla dceřinou, tedy omlazenou vrchní částí *scoby*, využívanou k výrobě kombuchového nápoje ve firmě. Takto připravený čajový nálev se *scoby* byl umístěn do bioreaktoru.

Následně byly do skleněné nádoby navedeny elektrody pro sledování pH a teploty v průběhu fermentace. Elektrody byly navedeny tak, aby se nedotýkaly dna nádoby a zároveň příliš nenarušovaly *scoby*. Primární fermentace v bioreaktoru byla monitorována po dobu 7 dní, kdy byly každý den ve stejnou dobu odebrány vzorky kombuchového nápoje pro HPLC analýzu změny koncentrace metabolitů a sacharidového substrátu.

#### 4.2.2 Výroba kombuchového nápoje firmou RebornFood

Jako základ používá firma RebornFood pravý čaj a cukr, což jsou složky nezbytné pro život *scoby*. Z čajů kombinují čaj zelený s květy jasmínu, Pu-Erh s citronovou trávou a Darjeeling s Tulsi, posvátnou bazalkou. Pro experiment sledování primární neřízené fermentace byl zvolen čaj Pu-Erh. Po vyluhování čaje je přidávána v množství 70 g/l sacharóza. V kvasných kádích, ve kterých je umístěna *scoby* o mocnosti cca 7 cm je přidán slazený čajový nálev a tím je započata primární fermentace. Teplota v místnosti, kde probíhalo kvašení nápoje, se pohybovala v rozmezí od 20–24 °C. Nádoby během fermentace byly nehermeticky uzavřeny víkem. Doba fermentace byla 7 dní. Tato firma si zakládá na tom, že do nápoje nijak nezasahuje, a to ani řízením teploty po dobu primární fermentace. Jediným zásahem do procesu výroby po primární fermentaci je filtrace kombuchového nápoje přes tkané plátno. Tak zachovávají kombuchový nápoj „živý“ [52]. Firma RebornFood přidává do čajového nálevu zákvas (určité množství média z předešlé várky) před začátkem primární fermentace.

Pro stanovení vlivu sekundární fermentace kombuchového nápoje byly vzorky stočeny do lahví a transportovány na pracoviště na Fakultě Chemické VUT v Brně, kde byly umístěny v lednici o teplotě 7° C a průběžně analyzovány po dobu 35 dní.

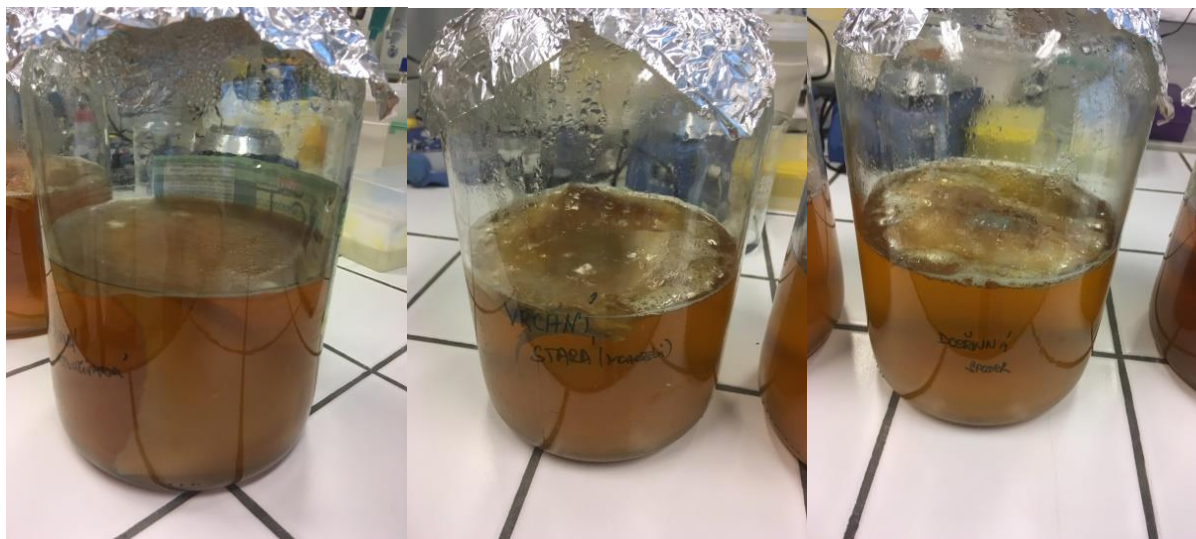


Obrázek 21 Čajový nálev obsahující *scoby*, připravený k fermentaci [52]

### 4.3 Studium stavu *scoby* na obsah vybraných látek v kombuchovém nápoji

Vzhledem k tomu, že je požadováno sycení kombuchového nápoje, které firma RebornFood provádí přirozeně sekundární fermentaci. Byl zvolen experiment sledování změny obsahu vybraných látek během této fáze.

Ve firmě vyrábějící kombuchový nápoj byly odebrány tři vzorky kombuchové houby, a to její vrchní vrstva, spodní vrstva a vrstva, kterou majitel vyřadil a neomlazoval. Pro tyto odebrané vzorky byl připraven čajový nálev čaje Pu-Erh v koncentraci 8 g/l, který byl následně oslazen sacharózou 70 g/l. Tento čajový nálev byl připraven do skleněných nádob, po vychladnutí na teplotu 25 °C byla přidána *scoby* do každé z nádob a zakryta alobalovou folií, tak aby byl zabezpečen průnik vzduchu do nádoby. Připravené nádoby se *scoby* a nálevem byly umístěny v laboratoři na místo se stabilními podmínkami teploty, tak aby na ně nepůsobilo přímé sluneční záření a ponechány fermentaci po dobu sedmi dnů. Po uplynutí sedmi dnů byly z nádob odebrány vzorky jak pro analýzu na kapalinové chromatografii, tak byly porovnány senzorycké vlastnosti všech kultur a připraven křížový roztěr pro sledování mikrobiální aktivity každé *scoby*. Po odebrání vzorků byl opět připraven další čajový nálev, do kterého byla uložena *scoby* pro uchování k dalšímu použití.



**Obrázek 22** Kombuchová fermentace za laboratorních podmínek. Zleva: Nepoužívaná kombuchová kultura, Vrchní plát kombuchové kultury, stále používán k fermentaci a dceřiný plát.

#### 4.3.1 Příprava vzorků a interval odběrů pro HPLC analýzy

Cílem diplomové práce bylo analyzovat průběh primární i sekundární fermentace kombuchového nápoje. Tyto lahve z primární fermentace byly uchovány v chladícím boxu a vzorky byly odebrány od počátku až do konce fermentace každý den ve stejnou dobu, po dobu sedmi dnů a následně analyzovány. Po ukončení primární fermentace, následovalo zfiltrování kombuchového nápoje přes plátno a stočení kombuchového nápoje do lahví. Láhve s kombucha nápojem byly uchovávány v lednici o teplotě 7 °C a pravidelně dvakrát týdně analyzovány. Z důvodu potenciální variability vzorků byl pro časový experiment zvolen náhodný výběr láhve obsahující kombuchový nápoj.

Před celkovou analýzou bylo potřeba vzorky vhodně upravit. Vzhledem k tomu, že se do lahví během jejich odebírání dostaly části *scoby*, byly vzorky nejdříve centrifugovány po dobu 10 minut a 16 000 rpm, následně byl odebrán supernatant, který byl zfiltrován pomocí injekční stříkačky přes nylonový mikrofiltr (0,45 $\mu$ m). K potlačení matričních efektů a snížení koncentrací studovaných analytů byly vzorky kombuchového nápoje pětkrát naředěny deionizovanou vodou.

#### 4.4 Vytvoření kultivačního média pro mikrobiální analýzu

Pro sledování bakterií a kvasinek v různých *scoby* bylo vytvořeno medium dle tabulky 1. Agar potřebný k vytvoření media byl sterilizován pomocí autoklávu po dobu 10 min a teploty 115°. Připravené medium o pH 7,2 bylo nalito do petriho misek.

Tabulka 1 Složení kultivačního media

<b>kvasničný extrakt</b>	5 g
<b>Pepton</b>	5 g
<b>Glukóza</b>	10 g
<b>Agar</b>	20 g
<b>destilovaná voda</b>	1 l

#### 4.5 Optimalizace a validace metody HPLC

Nejprve bylo potřeba optimalizovat metodu na stanovení cukrů, organických kyselin a ethanolu. Optimalizace byla zaměřená na dosažení co nejlepšího rozlišení a citlivosti pro všechny studované analyty. Pro účely této diplomové práce byla jako první zvolena kolona Watrex se stacionární polymerní fází H forma 250 $\times$ 8 cm. Z důvodů vysokého tlaku v systému na této koloně byly zvoleny dvě teploty, 60 °C a 40 °C. U těchto zvolených teplot docházelo k hydrolyze sacharózy na glukózu a fruktózu. Z tohoto důvodu nebylo možné sacharózu přesně a správně stanovit. Další fází vývoje metody byl přechod na kolonu Phenomenex rezeroa organic acid H<sup>+</sup>. Tato kolona svým složením stacionární fáze umožňovala separace analytů při nižších teplotách. Na této koloně byla nastavena teplota 30 °C, při které byl vliv hydrolyzy sacharózy minimalizován. V rámci ladění metody byly testovány rozdílné průtoky mobilní fáze. Při průtoku 1 ml/min a teplotě 30 °C bylo dosahováno limitních tlaků doporučených pro danou kolonu, bylo tedy potřeba průtok snížit. Byl zkoušen průtok 0,5 ml/min, který ale výrazně prodloužil dobu separace a také zhoršil rozlišení mezi jednotlivými píky díky vlivu difuze. Jako ideální průtok z hlediska doby analýzy, tlaků na koloně a rozlišení byl zvolen průtok 0,7 ml/min. Dalším krokem byl v rámci optimalizace studován vliv různého složení mobilní fáze. Byly testovány koncentrace v rozsahu 1 mM – 20 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a jejich vliv na rozlišení a separaci. Jako ideální složení mobilní fáze v rámci poměru času a rozlišení byla vybrána 9 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

Takto optimalizovaná metoda (viz. tabulky 2) byla validována. Byly testovány základní validační parametry pro chromatografické stanovení. Mezi tyto testované parametry patří testování linearity, které probíhalo na připravených standardech v rozsahu od 0,1 g/l – 1 g/l. Pro všechny studované analyty bylo v tomto studovaném rozsahu dosaženo korelačního koeficientu většího než 0,999. Zároveň byla testována výtěžnost metody, a to na vzorcích kombuchového nápoje obohacených jednotlivými standardy. Výtěžnost pro jednotlivé analyty se pohybovala od 95 % do 104 %. Dále byla testována opakovatelnost metody, a to

opakovaným měřením směsných standardů (n=5). Jednotlivá stanovení byla opakovatelná s relativní směrodatnou odchylkou do 0,8 %.

**Tabulka 2** *Finální parametry nastavení HPLC*

<b>Název přístroje</b>	Shimadzu LC10
<b>Kolona</b>	Phenomenex rezex roa organic acid H <sup>+</sup>
<b>Složení mobilní fáze</b>	9 mM H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
<b>Průtok mobilní fáze</b>	0,7 ml/min
<b>Objem nástřiku vzorku</b>	100 μl
<b>Teplota cely detektoru</b>	40°C
<b>Typ detektoru</b>	RID-10A, SPD-M10AVP
<b>Doba analýzy</b>	35 min

Pro měření byl používán detektor RID-10A a UV-VIS detektor ( $\lambda=210$  nm). Vzorky byly do přístroje dávkovány pomocí skleněné stříkačky Hamilton (100 μl).

#### 4.5.1 Příprava kalibračních roztoků pro HPLC analýzu

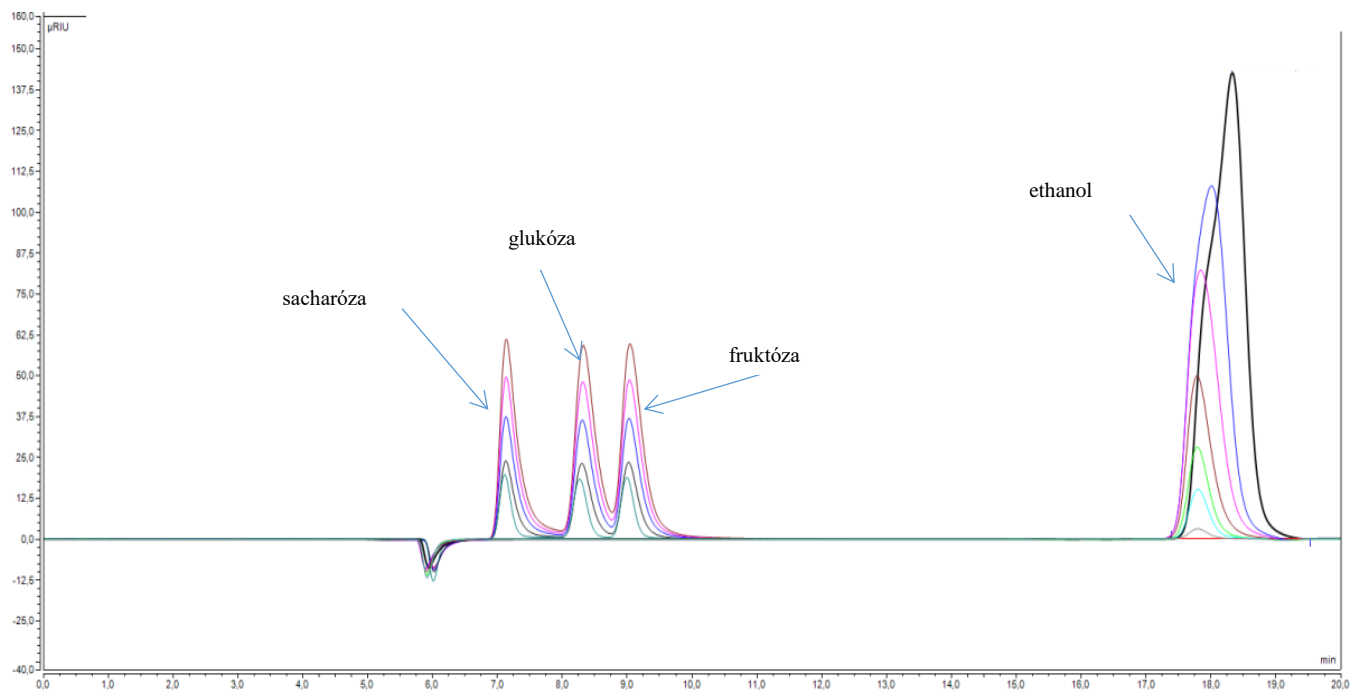
Kalibrační roztoky glukózy, fruktózy, sacharózy, kyseliny octové, kyseliny mléčné a ethanolu byly připraveny tak, že nejdříve byl namíchán roztok o koncentraci 1 g/l, který byl následně ředěn do koncentrací nižších, dle tabulky 3.

**Tabulka 3** *Kalibrační řada jednotlivých složek*

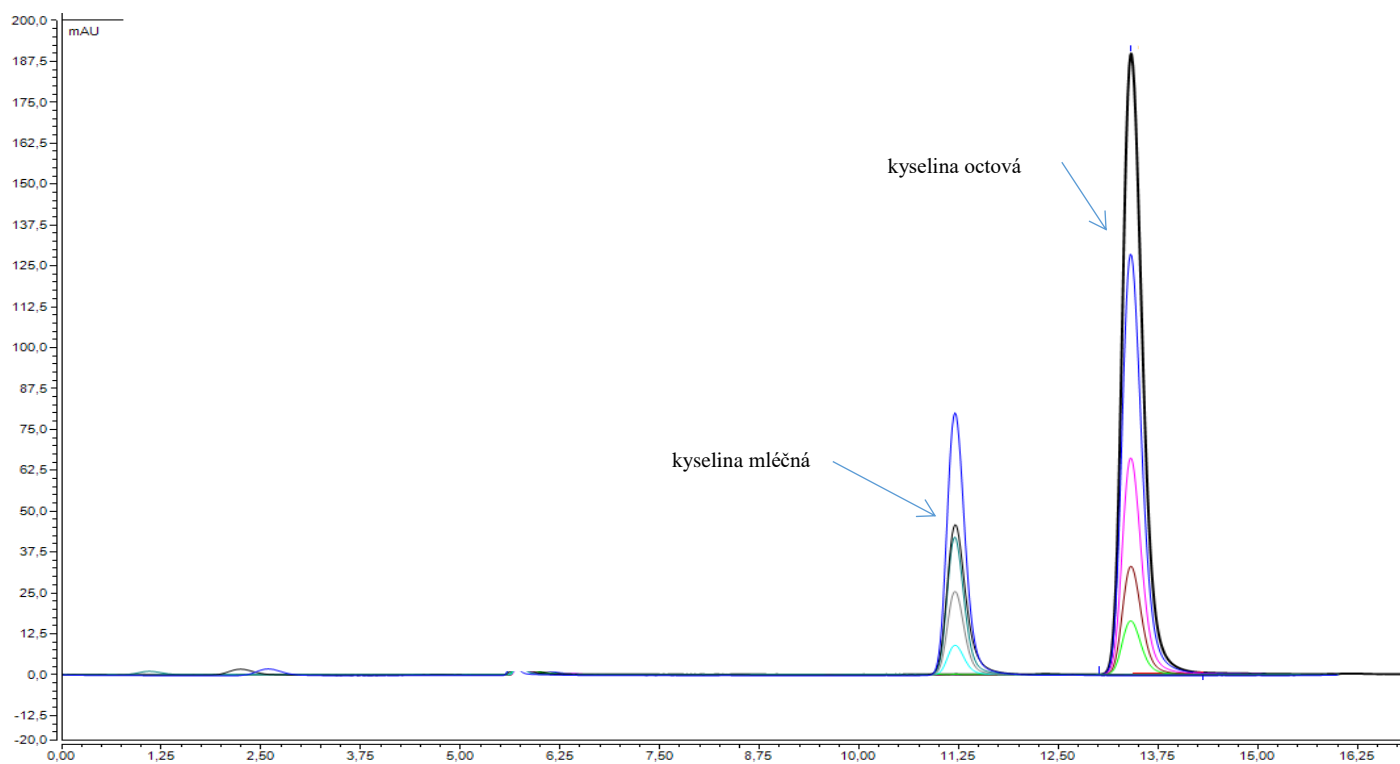
	<b>c [g·l<sup>-1</sup>]</b>				
<b>Glukóza</b>	0,1	0,3	0,5	0,8	1
<b>Fruktóza</b>	0,1	0,3	0,5	0,8	1
<b>Sacharóza</b>	0,1	0,3	0,5	0,8	1
<b>Kyselina mléčná</b>	0,1	0,3	0,5	0,8	1
<b>Kyselina octová</b>	0,1	0,3	0,5	0,8	1
<b>Ethanol</b>	0,1	0,3	0,5	0,8	1

**Tabulka 4** *Retenční časy sledovaných složek*

	<b>retenční čas (min)</b>
<b>Sacharóza</b>	7,3
<b>Glukóza</b>	8,7
<b>Fruktóza</b>	9,5
<b>Kyselina mléčná</b>	12,03
<b>Kyselina octová</b>	14,19
<b>EtOH</b>	17,9



*Graf 1 Chromatogram standartů sacharózy, glukózy, fruktózy a ethanolu*



*Graf 2 Chromatogram kalibračních standartů kyseliny mléčné a kyseliny octové*

## 5 Výsledky a diskuze

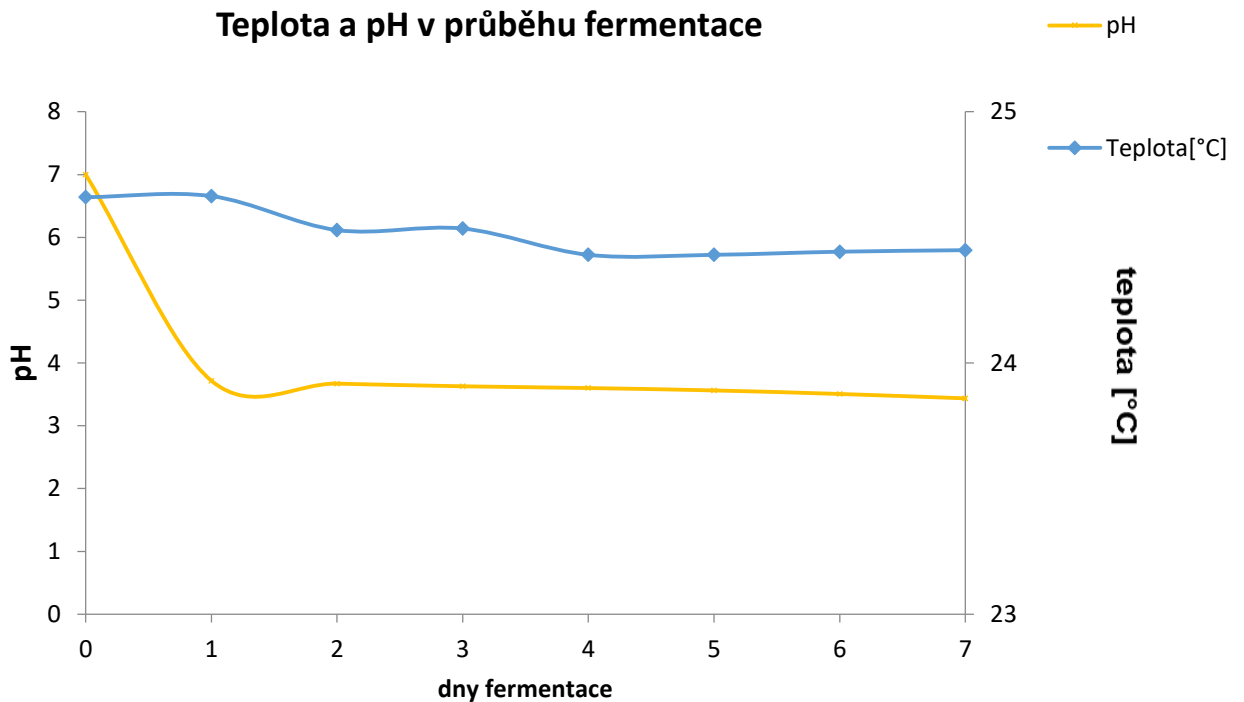
### 5.1 Studium chemických procesů během výroby kombuchového nápoje

V této kapitole jsou prezentovány výsledky HPLC analýz kombuchového nápoje z řízené fermentace v laboratoři, tak přímo z výroby RebornFood. Vzorové chromatogramy reálných vzorků z primární i sekundární fermentace jsou prezentovány v příloze (Příloha 1, Příloha 2). Kapitola je rozdělena na sledování, jak primární, tak sekundární fermentace.

#### 5.1.1 Studium řízené primární fermentace-bioreaktor

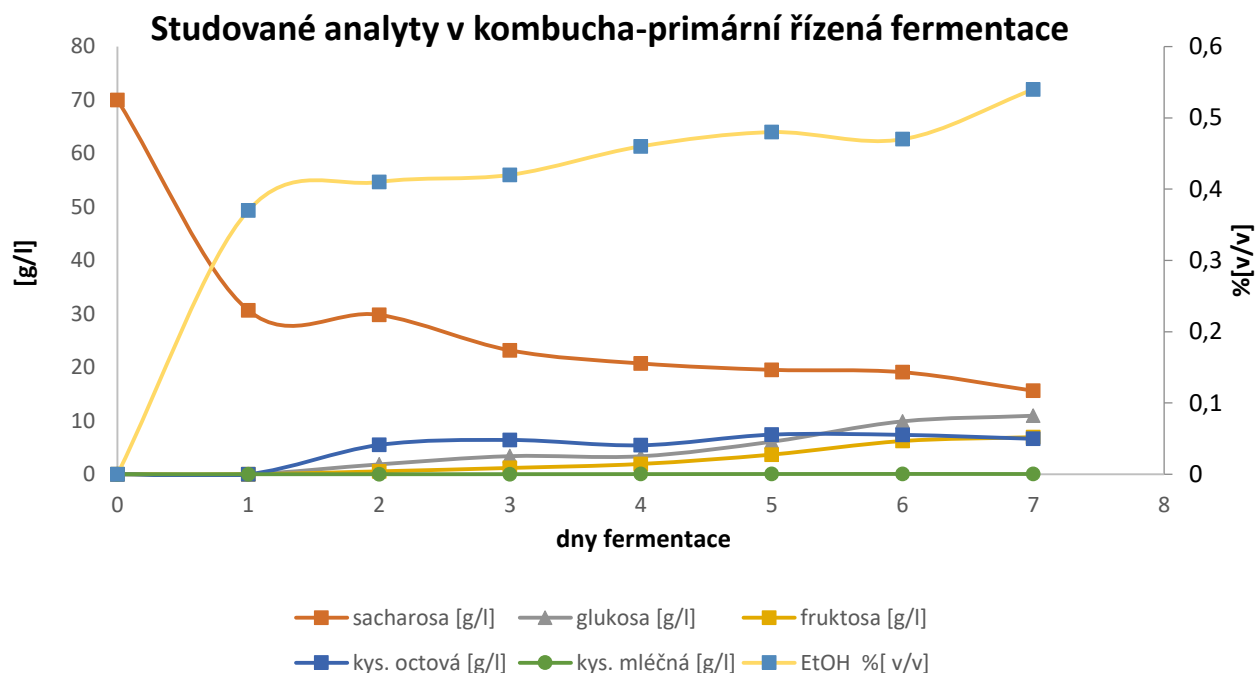
Tento experiment řízené fermentace kombuchového nápoje vycházel z navrhované technologie firmy RebornFood, která nám také poskytla *scoby* pro přípravu nápoje. Vzhledem k tomu, že ve výrobě RebornFood neovlivňují při fermentaci nápoje teplotu žádnými klimatizacemi, je teplota v jejich výrobě kolem 22 °C. V provedeném experimentu byla udržována stabilní teplota od 24,5 °C – 25 °C, což je optimální teplota pro mikroorganismy obsažené ve *scoby* [16]. Během tohoto experimentu byly odebírány každý den ve stejnou dobu vzorky kombuchového nápoje pro následnou HPLC analýzu a zároveň, zde byly v průběhu celé primární fermentace monitorovány hodnoty pH a teploty (graf 5). Vzhledem k tomu, že při procesu výroby kombuchového nápoje vzniká velká řada metabolitů, dochází také ke změnám pH v průběhu fermentace. Tato změna úzce souvisí zejména s tvorbou organických kyselin, kdy se hodnota pH během této fermentace snižovala, a to z důvodu hydrolýzy sacharózy a následnou tvorbou organických kyselin. Pokles hodnoty pH může být také spojen s účinky vyrovnávacího pufru vznikajícího z reakcí mezi syntetizovanými organickými kyselinami a minerály substrátu (Loncar, Petrovic, Malbasa, & Verac, 2000) [54].

V našem experimentu byla hodnota pH v čase  $t=0$  stanovena na pH 7, tato hodnota se změnila již během prvního dne, kdy můžeme pozorovat rychlý pokles na hodnotu pH 3,67. Tato rychlá změna hodnoty pH je nejspíše důsledkem použitého čaje k fermentaci. Čaj, který byl použit pro řízenou fermentaci kombuchového nápoje byl čaj Pu-erh, což je fermentovaný čaj a jeho pH bylo stanoveno na hodnotu pH 4. R.Malbaša a kol. (2007) studovali také změnu pH v průběhu primární fermentace [54]. Jejich výsledky se shodují s našimi, tudíž byl také pozorován pokles pH v čase fermentace, kdy z hodnoty pH 7 byl pozorován zhruba ve 3. dnu pokles na pH 5,2. Tým R.Malbaša a kol. (2007) zjistili vliv počáteční koncentrace sacharózy na vývoji pH v čase a potvrdili, že čím nižší je koncentrace sacharózy, tím vyšší je finální hodnota pH [56]. V jejich případě byla použita sacharóza o koncentraci 50 g/l, kdy pH v prvním dnu bylo pH 7, následoval pokles, kdy v 7. dnu fermentace byla hodnota pH 4,5. Tuto pomalou změnu hodnoty pH v případě týmu R.Malbaša a kol. (2007) může mít za následek také nižší aktivita mikroorganismů obsažených ve *scoby*. Díky bioreктору bylo možné sledovat teplotu v průběhu celé fermentace, což je vyobrazeno na grafu 5, kde je možné pozorovat změny teploty při řízené fermentaci (od 24,4 °C do 24,6 °C).



*Graf 3 změny hodnoty pH a teploty během primární řízené fermentace v bioreaktoru*

Během této řízené fermentace byly studovány změny koncentrací majoritních analytů vyskytujících se v kombuchovém nápoji, a to zejména sacharóza, fruktóza, glukóza, organické kyseliny a ethanol. Množství sacharózy, která byla do čajového nálevu přidávána v koncentraci 70 g/l byla po prvním dnu hydrolyzována a její hodnota klesla na koncentraci 30,66 g/l. V sedmém dni, který byl zároveň posledním dnem prováděné řízené fermentace, byla hodnota sacharózy stanovena na 15,62 g/l. Tato fermentace byla ukončena z důvodu technologických postupů ve firmě RebornFood. Obsah koncentrace fruktózy a glukózy se postupně zvyšoval z počáteční koncentrace 0 g/l, kdy během druhého dne se tyto hodnoty koncentrace zvýšily na 0,54 g/l (fruktóza) a na 0,54 g/l (glukóza). Na konci primární fermentace byla koncentrace těchto dvou monosacharidů stanovena na 10,94 g/l pro glukózu a 6,93 g/l pro fruktózu. Hodnoty zbytkových sacharidů po ukončené fermentaci byly vcelku vysoké, a tudíž by tento nápoj měl sladkou chuť. Zároveň z koncentrace sacharidů můžeme říci, že tato fermentace nebyla ještě zcela u konce.



**Graf 4** koncentrace jednotlivých analytů v průběhu primární řízené fermentace v bioreaktoru

**Tabulka 5** koncentrace jednotlivých analytů v průběhu primární řízené fermentace v bioreaktoru

Dny fermentace	EtOH % [v/v]	Sacharóza [g/l]	Glukoza [g/l]	Fruktóza [g/l]	kys. octová [g/l]	kys. mléčná [g/l]
1	0,37	30,66	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
2	0,41	29,82	1,84	0,54	5,47	<LOD
3	0,42	23,18	3,38	1,17	6,41	0,01
4	0,46	20,72	3,36	1,92	5,41	0,02
5	0,48	19,53	6,08	3,67	7,40	0,04
6	0,47	19,08	9,88	6,21	7,36	0,05
7	0,54	15,62	10,94	6,93	6,62	0,04

Koncentrace organických kyselin v námi připraveném nápoji byla v 7. dni fermentace 6,62 g/l kyseliny octové a 0,047 g/l kyseliny mléčné. Koncentrace organických kyselin a ethanolu úzce souvisí se vznikem monosacharidů, a proto zde můžeme vidět podobný trend ve vzrůstu koncentrací těchto analytů. Koncentrace kyseliny octové byla v 7. dni fermentace stanovena na 6,62 g/l. Z této výstupní koncentrace je možné usuzovat vyšší obsah bakterií *Acetobacter* v použité *scooby*. Kombuchový nápoj se řadí jako nízko alkoholický, a tudíž musí být hodnota alkoholu v nápoji maximálně do 1,2 % (v/v). V prováděném experimentu za pomoci řízené teploty byla tato podmínka splněna a celkový obsah alkoholu byl stanoven na hodnotu 0,54 % (v/v). Vzhledem k nízké hodnotě ethanolu, která splňuje definici nízko alkoholového nápoje, by se mohl kombuchový nápoj ihned konzumovat a prodávat

Z porovnání naměřených výsledků z primární řízené fermentace je možné usuzovat, že dle navržené technologie firmou RebornFood nebyly laboratorně připravené vzorky ještě kompletně prokvašené. V takto klimatizované laboratoři by bylo možné ve fermentaci pokračovat i déle, ale z důvodu srovnávací podstaty této práce byly dodrženy předem

stanovené technologické podmínky. Tyto výsledky mohou být zapříčiněny zejména tím, že *scoby* byla před jejím následným použitím omyta vodou, což se standardně ve provozním měřítku neprovádí.

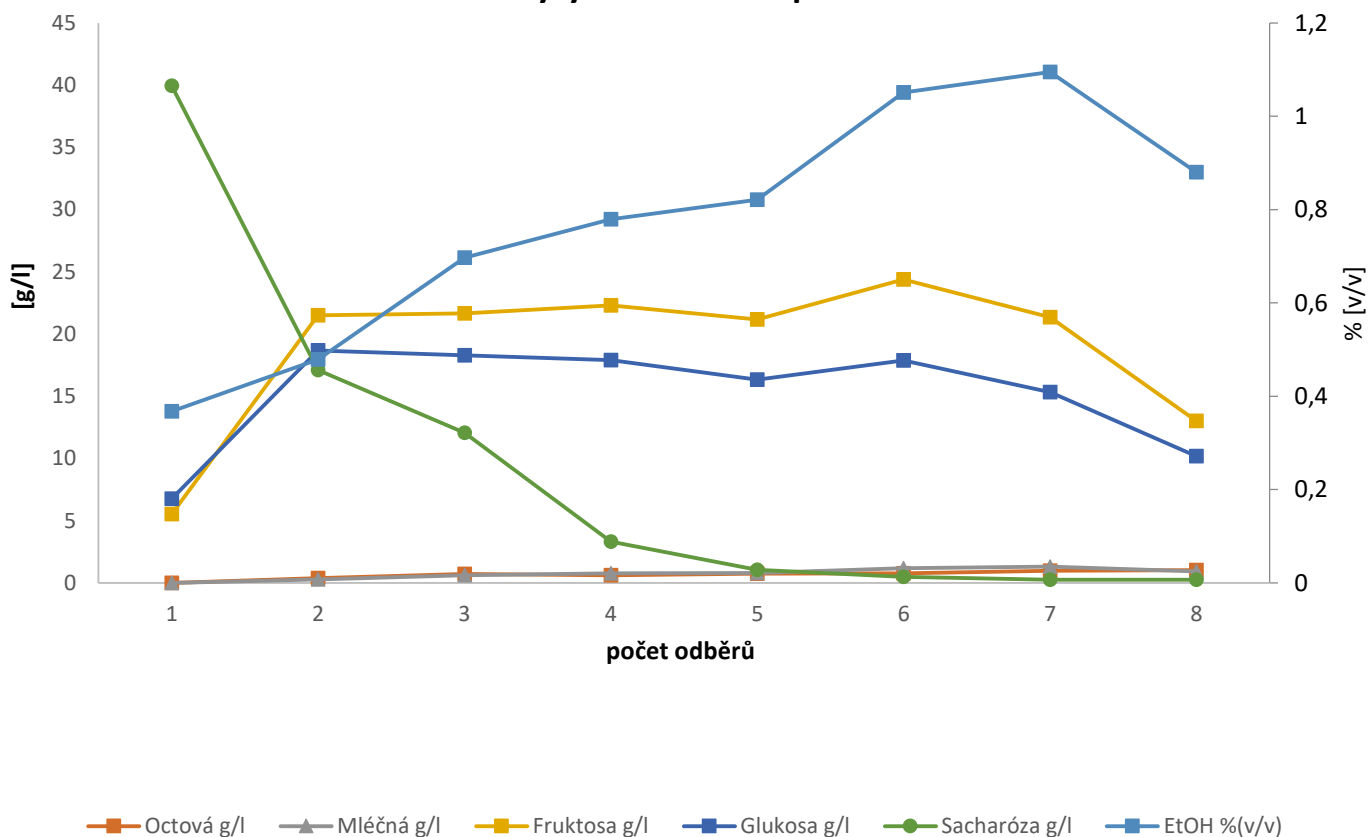
### 5.1.2 Studium teplotně neřízené primární fermentace v provozu RebornFood

Jak už bylo zmíněno v této diplomové práci, kvasinky a bakterie obsažené ve *scoby* nápoji se podílejí na tvorbě a změnách obsahu různorodých analytů během výroby kombuchového nápoje. Sacharóza, která slouží jako výchozí substrát je převáděna metabolickou aktivitou buněk kvasinek a bakterií na glukózu, fruktózu a dále na ethanol, kyselinu octovou, kyselinu mléčnou a velký počet dalších sloučenin. V rámci posouzení bilance sacharidů, v grafu (5) a Tabulka 6), můžeme vidět lineární pokles koncentrace sacharózy v čase, který je převážně patrný v prvních 3 dnech fermentace. Z počáteční koncentrace 70 g/l sacharózy, přidávané do čajového nálevu, byla ve vzorku z 3. dne kvašení stanovena koncentrace 12,07 g/l. V dalších dnech byl i nadále sledován lineární pokles, který ovšem nebyl již tak rychlý jako v prvních 3 dnech. Tento pokles je možné využít také jako měřítko rychlosti fermentace kombuchového nápoje. Dále můžeme vidět, že kvasinky a bakterie obsažené ve *scoby* během prvních 6 dní přemění téměř všechnu sacharózu z média na glukózu a fruktózu. Nárůst koncentrace glukózy a fruktózy je přímo úměrný snižování koncentrace sacharózy, což můžeme vidět v grafu (6) a Tabulka 6), kdy se koncentrace těchto dvou monosacharidů zvýšila mezi prvním a druhým dnem fermentace z 6,76 g/l (glukóza) a 5,52 g/l (fruktóza) na 18,66 g/l (glukóza) a 21,50 g/l (fruktóza). Koncentrace těchto dvou sacharidů byla relativně stabilní v období od druhého do pátého dne fermentace (jak je vidět v Tabulka 6 i grafu 7). To poukazuje na plynulý průběh kvašení nápoje. Z grafu také vyplývá, že glukóza je přednostně využívána před fruktózou, to je nejspíše zapříčiněno mikrobiálním složením námi použité *scoby*. Dle studie Sievers a kol. (1995), bylo zjištěno, že tvorba glukózy a fruktózy velmi úzce souvisí s mikrobiálním složením *scoby* samotné [51]. Bakterie *Acetobacter xylinum* vykazují preferenční využití glukózy k produkci kyseliny glukuronové a ethanolu za vzniku kyseliny octové. Mikroorganismy *scoby* také využívají glukózu k tvorbě nové celulózové sítě na povrchu. Vzhledem k výsledkům námi proměřených vzorků můžeme soudit, že *scoby* použita pro fermentaci kombuchového nápoje obsahovala více bakterií *Acetobacter xylinum*, proto byla glukóza rychleji spotřebována.

Tabulka 6 Koncentrace sledovaných analytů v průběhu primární fermentace

Dny fermentace	EtOH % [v/v]	Sacharóza [g/l]	Glukóza [g/l]	Fruktóza [g/l]	Kys. octová [g/l]	Kys. mléčná [g/l]
0	0	70	0	0	0	0
1	0,37	30,66	0	0	0	0
2	0,41	29,82	1,84	0,54	5,47	0
3	0,42	23,18	3,38	1,17	6,41	0,01
4	0,46	20,72	3,36	1,92	5,41	0,02
5	0,48	19,53	6,08	3,67	7,4	0,04
6	0,47	19,08	9,88	6,21	7,36	0,05
7	0,54	15,62	10,94	6,93	6,62	0,04

## Studované analyty v kombucha-primární fermentace



Graf 8 koncentrace jednotlivých analytů v průběhu primární fermentace

Co se týče organických kyselin vznikajících v kombuchovém nápoji, v průběhu fermentace byl sledován obsah dvou majoritních kyselin, a to kyseliny octové a kyseliny mléčné. Zatímco kyselina octová vzniká jako majoritní kyselina působením bakterií octového kvašení a její přítomnost je v kombuchových nápojích běžná a žádoucí, kyselina mléčná je obsažena pouze vzácně v určitých druzích *soby* (obsahující bakterie *Lactobacillus*). Během primární fermentace bylo ve sledovaných vzorcích kombuchového nápoje stanoveno 0,38 g/l kyseliny octové a 0,27 g/l kyseliny mléčné ve druhém dni fermentace. Koncentrace těchto dvou kyselin pomalu vzrůstala, až dosáhla hodnoty 1,02 g/l kyseliny octové a 0,91 g/l kyseliny mléčné v 8. dnu primární fermentace. Bylo publikováno celá řada výzkumů na obsah kyseliny octové, přičemž Chen a Liu (2000) sledovali rozšířenou primární fermentaci kombuchy a to až do 30. dne, kdy stanovili největší množství této kyseliny na 1,1g/l [55]. Dle jejich výzkumu byl vývoj produkce kyseliny octové pomalý, s postupným nárůstem, kdy bylo dosaženo maximální hodnoty 1,1 g/l ve 30. dnu fermentace. Poté následoval lineární pokles až na hodnotu 0,8 g/l v 60. dnu fermentace, který byl zároveň posledním sledovaným dnem touto skupinou. Lineární nárůst kyseliny octové, který popsal Chen a Liu (2000) byl zaznamenán i v případě našich sledovaných vzorků [55]. Obdobný experiment monitoringu obsahu kyseliny octové byl proveden také Jayabalanem a kol. (2007), kteří sledovali primární fermentaci do 18.dne [29].

V rámci této studie byla ve vzorcích kombuchového nápoje stanovena nejvyšší koncentrace kyseliny octové 9,5 g/l v 15. dnu fermentace. Po tomto období docházelo k pomalému poklesu koncentrace této kyseliny, kdy v 18. den fermentace byl naměřen obsah kyseliny octové na 4,69 g/l. [29]. Nárůst koncentrace kyseliny octové závisí na receptuře daného výrobce kombuchového nápoje, použité *scoby* a je přímo úměrný délce trvání fermentace i obsahu uhlíku jako zdroje. Kyselina octová jakožto majoritní kyselina obsažená v kombuchovém nápoji má zásadní vliv na jeho senzorycké vlastnosti. V analyzovaných vzorcích byla koncentrace kyseliny octové 1,02 g/l v 8. den primární fermentace. Vzhledem k takovému obsahu této kyseliny by bylo možné nápoj ihned konzumovat bez toho, aniž by měl výrazně octovou chuť.

Kyselina mléčná, která nepatří mezi charakteristické složky kombuchového nápoje byla také zjištěna v námi sledovaných vzorcích. Zvýšení obsahu kyseliny mléčné souvisí s dobou trvání fermentačního procesu. Jayabalan a další (2007) zkoumali koncentraci kyseliny mléčné, a to na kombuchovém nápoji připraveném ze zeleného čaje [29]. Stanovili maximální koncentraci této kyseliny, a to na hodnotu 0,54 g/l ve 3. dnu fermentace. V našich vzorcích byl nejvyšší obsah kyseliny mléčné stanoven na 1,31 g/l v 7. dnu fermentace (Tabulka 6 a graf 9). Jedná se o obsah zhruba třikrát větší, než naměřila skupina Jayabalan a další (2007) [29]. Vysoký obsah kyseliny mléčné ve výsledném kombuchovém nápoji mají za následek mikroorganismy obsažené ve *scoby* zejména bakterie *Lactobacillus*. Zároveň zde hraje roli i kvalita, druh a země původu použitého čaje k výrobě kombuchového nápoje.

Významným produktem metabolismu mikroorganismů ve *scoby* je ethanol. Vzhledem k tomu, že kombuchový nápoj připravovaný firmou RebornFood je prezentován jako nízkoalkoholický, musí dosahovat hodnoty 1,2 % (v/v) a proto je nutné tuto hodnotu sledovat [31]. Koncentrace ethanolu ve studovaných vzorcích v průběhu primární fermentace postupně narůstala. Z původní koncentrace 0,36 % (v/v) v první den fermentace na 1,9 % (v/v) v 6. dnu fermentace, kdy dosáhla maxima. Poté začala klesat a v 8. dnu kvašení můžeme pozorovat koncentraci ethanolu 0,88 % (v/v), tento trend nárůstu i poklesu obsahu ethanolu zaznamenal také Martin Sievers a spol. (1995) [52]. Zmíněný pokles ethanolu je způsoben jeho biologickou oxidací na kyselinu octovou. Z výše uvedeného můžeme říci, že fermentace a vznik analytů u námi studovaného kombuchového nápoje probíhal dle trendů popsanych v několika studiích zabývajících se touto problematikou. Z námi prováděné analýzy vyplývá, že kombuchový nápoj po 8. dnech fermentace zcela splňuje definici nízkoalkoholického nápoje, tudíž by byl možný prodej neperlivého produktu z primární fermentace.

### **5.1.3 Studium procesu sekundární fermentace na obsah vybraných látek v kombuchovém nápoji**

Kombuchový nápoj je možno konzumovat ihned po primární fermentaci, ale z důvodu žádoucího naperlení nápoje se provádí buď sekundární fermentace, nebo se nápoj uměle sytí. Sekundární fermentace prováděna při výrobě kombuchového nápoje je standardně chemicky upravována, tak aby nedocházelo ke zvyšování organických kyselin a ethanolu v lahvích. Firma RebornFood si jako jedna z mála na trhu zakládá na čistě přírodní fermentaci tohoto nápoje, tudíž do něj nijak během celého procesu nezasahuje. Z důvodu zjištění změn koncentrace analytů v průběhu neřízené sekundární fermentace byla provedena následující analýza tohoto nápoje. V rámci studia průběhu sekundární fermentace byly vzorky kombuchového nápoje odebírány po dobu 35 dnů po stočení.

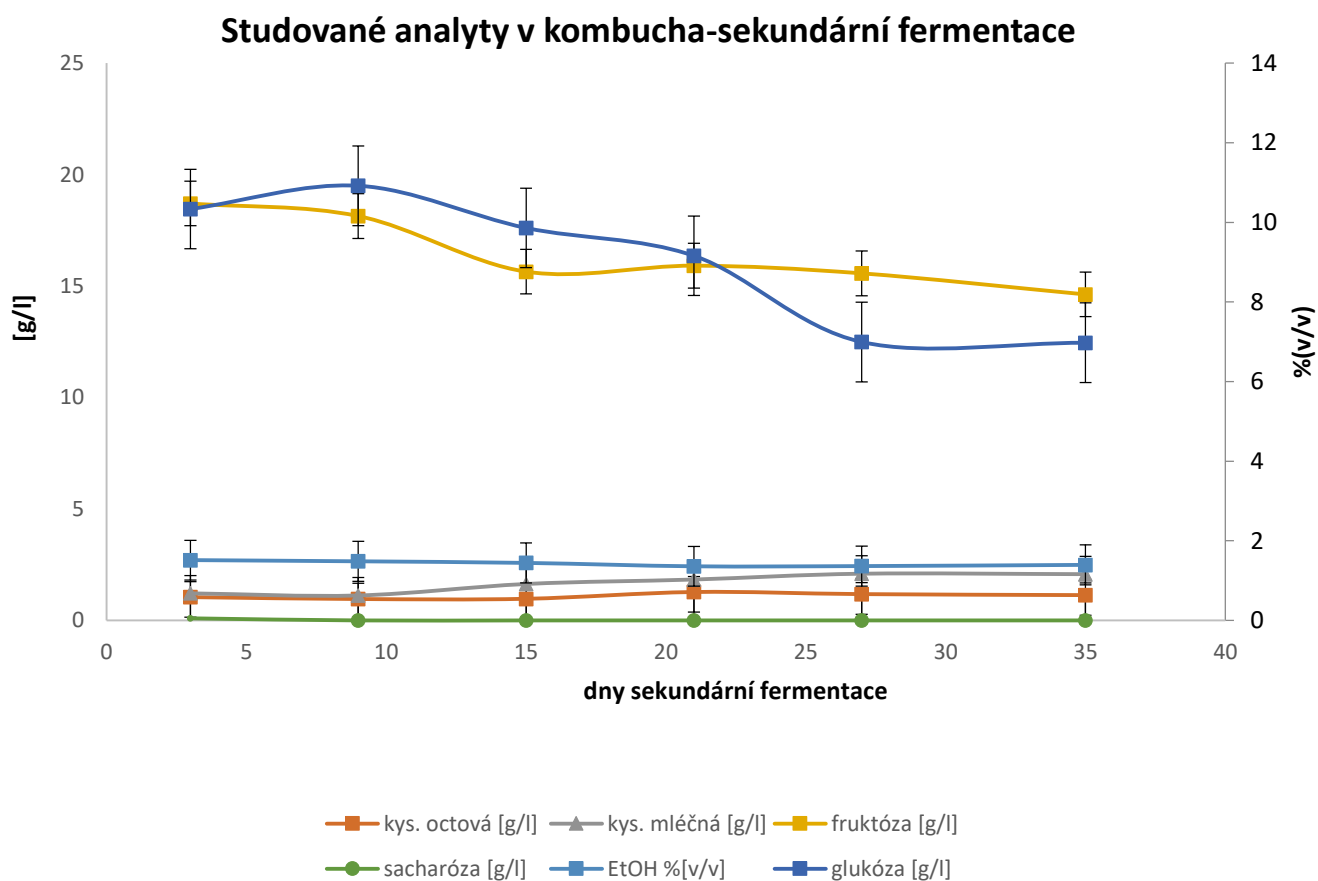
Vzhledem k potenciální variabilitě vzorků v rámci jednotlivých lahví byly testovány vždy dvě láhve kombuchového nápoje ve stejném čase. Hlavní motivací sekundární fermentace kombuchového nápoje je jeho nasycení oxidem uhličitým, který dotváří jemně perlivý nápoj s osvěžující chutí. Tento proces je také využíván v případě nutnosti snížit zbytkové množství sacharidů z primární fermentace (dia produkt).

Z grafu 10 a tabulky Tabulka 6 vyplývá, že po stočení nápoje dochází i nadále k poklesu koncentrace zbytkové sacharózy, a tím ke vzniku glukózy a fruktózy, což mají za následek anaerobní bakterie obsažené ve *scoby*. Mikroorganismy obsažené v médiu se nerovnoměrně dostávají při stáčení do lahví. Tyto lahve jsou následně uzavřeny a ochlazeny, čímž se změní prostředí. V lahvích je i po uzavření obsažen zbývající kyslík, který je i nadále využíván k aerobnímu metabolismu mikroorganismů obsažených v médiu. Jakmile klesne hladina kyslíku pod kritickou úroveň, v mikroorganismech dochází k anaerobním metabolickým procesům. Jako hlavní produkty sekundární fermentace jsou ethanol a oxid uhličitý.

Po primární fermentaci kombuchového nápoje byla hodnota sacharózy vstupující do sekundární fermentace 0,24 g/l. Toto zbývající množství sacharózy bylo během prvních tří dnů sekundární fermentace hydrolyzováno na glukózu a fruktózu. Po 9 dnech sekundární fermentace bylo množství sacharózy pod limitem detekce dané instrumentace. Výchozí koncentrace glukózy a fruktózy po stočení nápoje po primární fermentaci byly 13,027 g/l (fruktóza) a 10,194 g/l (glukóza). Během stočení a 3. dne sekundární fermentace stoupla koncentrace těchto dvou analytů na 18,698 g/l fruktózy a 12,506 g/l glukózy. Tento vzestup má za následek nejen neustále se rozkládající sacharóza v nápoji, ale rovněž další zdroje sacharidů, jako je například celulózový materiál, stočený po primární fermentaci. Hodnoty sacharidů v nápoji velmi pomalu klesaly až do 35. dne sekundární fermentace, kdy byla naměřena průměrná koncentrace glukózy na 6,97 g/l a fruktózy na 14,62 g/l. Vzhledem k tomu, že v námi analyzovaných vzorcích převládala koncentrace fruktózy, můžeme soudit, že výsledný nápoj bude mít příjemně sladkou chuť, která je následkem právě větší koncentrace tohoto monosacharidu. Během sekundární fermentace probíhá biosyntéza ethanolu a oxidu uhličitého díky kvasinkám a bakteriím, které *scoby* obsahuje. Během prvních tří dnů po stočení došlo k nárůstu koncentrace EtOH z původní koncentrace po první fermentaci 0,88 % (v/v) na koncentraci 1,51 % (v/v) po sekundární fermentace. Tento nárůst mají za následek kvasinky *Saccharomyces*, které se řadí do fakultativně anaerobních, tudíž za nedostatku kyslíku pracují efektivněji. Z uvedené tabulky 8 a grafu 11 lze vidět, že vzorky, které byly odebírány náhodně z důvodu variability jednotlivých lahví, vykazují rozdíly v hodnotách koncentrací studovaných analytů. Tento rozdíl bude nejspíše způsoben tím, že se do každé láhve dostal při stočení jiný počet mikroorganismů ze *scoby*, uvolněných v médiu. Zároveň vidíme, že v průměru se obsah ethanolu v lahvích pohybuje kolem 1,4 % ± 0,65 % (v/v), což nespĺňuje definici nízko alkoholového nápoje. Z důvodu rozdílů naměřených hodnot ve zkoumaných vzorcích byla data zprůměrována pomocí excelu. Tyto data byla následně vynesena do grafu (viz. graf 4).

Tabulka 7 Koncentrace jednotlivých analytů v průběhu sekundární fermentace

Den po stočení	odběr	EtOH % [v/v]	kys. octová [g/l]	kys. mléčná [g/l]	Fruktóza [g/l]	Glukóza [g/l]	Sacharóza [g/l]
3.	1/1	1,56	1,11	1,35	18,69	12,50	0,08
3.	1/2	1,47	0,98	1,08	18,72	8,17	0,11
9	2/1	1,48	0,89	1,15	17,53	11,84	<LOD
9	2/2	1,49	1,03	1,09	18,75	10,00	<LOD
15.	3/1	1,43	0,91	1,75	15,27	11,45	<LOD
15.	3/2	1,46	1,03	1,52	16,02	8,27	<LOD
21.	4/1	1,32	1,19	2,15	16,53	7,52	<LOD
21.	4/2	1,40	1,36	2,09	15,30	10,80	<LOD
27.	5/1	1,32	1,10	2,08	16,01	5,97	<LOD
27.	5/2	1,41	1,26	2,11	15,13	8,02	<LOD
35.	6/1	1,39	1,04	2,08	14,45	9,30	<LOD
35.	6/2	1,40	1,23	2,07	14,80	4,65	<LOD



Graf 12 koncentrace jednotlivých analytů v průběhu sekundární fermentace

#### 5.1.4 Vliv stavu *scoby* na produkci vybraných chemických látek v kombuchovém nápoji

Pomocí HPLC byly také proměřeny kombuchové nápoje připravené v laboratoři z různých částí *scoby*. Toto měření probíhalo pouze v sedmý den fermentace a výsledky jsou uvedeny v tabulce Tabulka 8. Jako části *scoby* byla odebrána spodní vrstva, která byla ve firmě RebornFood produkční. Dále byla použita vrchní část, tedy dceřiná nově vytvořená *scoby* a následně i *scoby*, kterou majitel vyřadil a již neomlazoval (její růst probíhal zhruba 2 týdny bez většího přísunu substrátu).

Tabulka 8 Koncentrace jednotlivých analytů v 7. den fermentace s použitím různých částí *scoby*

	Vrchní část	Nepoužívaná	Spodní část
EtOH %[v/v]	1,11	0,51	0,80
kys. octová [g/l]	2,07	0,81	4,97
kys. mléčná [g/l]	0,97	0,38	0,62
Sacharóza [g/l]	<b>2,04</b>	<b>15,42</b>	<b>0,50</b>
Glukóza [g/l]	20,95	18,43	23,73
Fruktóza [g/l]	28,79	21,19	22,31

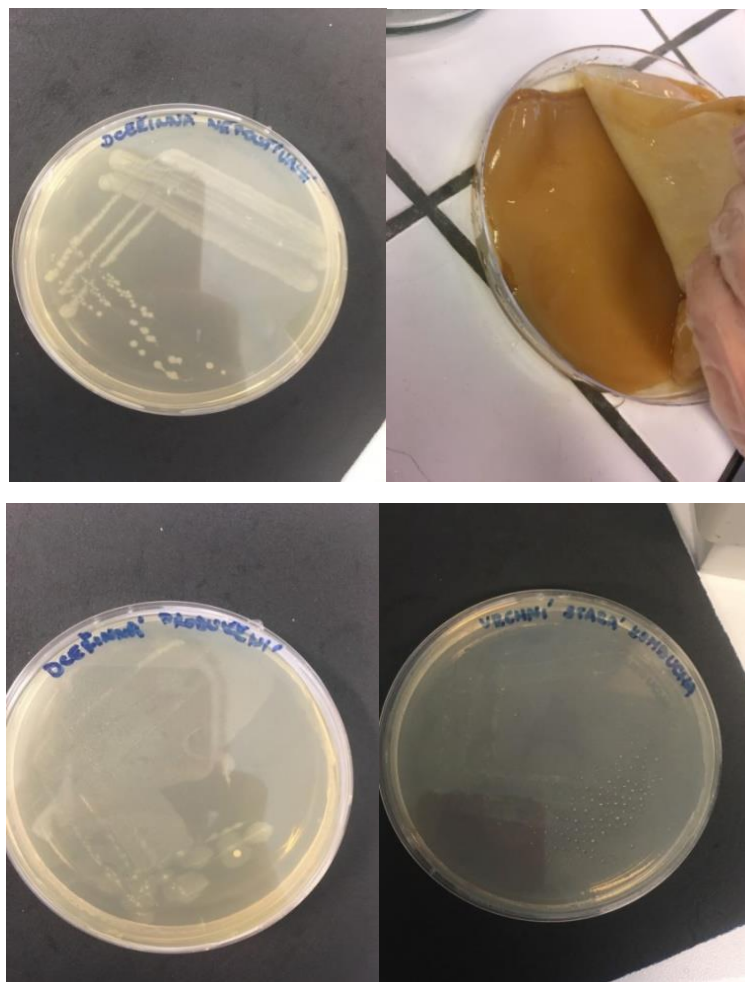
Z tabulky 7 můžeme vidět, že každá část *scoby* využívá substrát jinou rychlostí. Zatímco spodní nejstarší část, která byla ve firmě zároveň produkční, hydrolyzovala sacharózu nejrychleji (0,5 g/l), u vrchní dceřiné *scoby* byla koncentrace sacharózy stanovena na 2,04 g/l. V nápoji vyrobeném z části *scoby*, kterou majitel vyřadil a neomlazoval, byla sacharóza štěpena nejpomaleji a její koncentrace v 7. dni byla 15,42 g/l. Tato pomalá spotřeba výchozího substrátu je nejpravděpodobněji zapříčiněna úhynem mikroorganismů obsažených ve *scoby*. Aby mikroorganismy mohly produkovat analyty do nápoje, musí nejprve dojít k opětovnému nárůstu biomasy. Z hlediska spotřeby výchozího substrátu se jako nejlepší zdá být spodní produkční část *scoby*. Ovšem v nápoji, který vznikl kvašením touto částí, se vyskytuje poměrně vysoká koncentrace kyseliny octové, která zde byla stanovena na 4,97 g/l. Z takto vysoké koncentrace této kyseliny je možno usuzovat na špatné senzorycké vlastnosti. Oproti tomu nápoj připravený z vrchní dceřiné části obsahoval v 7. dni fermentace koncentraci 2,07 g/l kyseliny octové, ovšem zároveň zde stoupla koncentrace ethanolu na 1,11 % (v/v) ve srovnání s nápoji připravených ze spodní části a nepoužívané *scoby*. Spodní část *scoby* se proto jeví vhodným kandidátem pro přípravu nápoje ve firmě RebornFood. Z výše uvedené tabulky můžeme říci, že *scoby* odebrána jako vrchní je nejlepší pro tvorbu kombuchového nápoje. Z těchto experimentů lze vidět, že stav a kvalita použité *scoby* je zásadní pro výsledný kombuchový nápoj.

#### 5.1.5 Mikrobiologická charakteristika kombuchového nápoje z různých *scoby*

Na petriho miskách, které obsahovaly připravené médium (kapitola 4.3.1), byl proveden křížový roztěr kombuchového nápoje vzniklého po fermentaci z různých částí *scoby* (z experimentu 5.1.4). Takto připravené misky byly následně ponechány v termostatu o teplotě 25 °C po dobu 7 dní. Teplota termostatu byla volena dle optimální teploty, při které dochází k produkci biomasy pomocí mikroorganismů obsažených ve *scoby*. Byla nalezena korelace mezi výsledky mikrobiologické charakterizace *scoby* a analýz produktů fermentace pomocí HPLC. Výsledky analýzy nápojů fermentovaných z různých částí *scoby* jsou uvedeny v kapitole 5.1.4. Na obrázcích 23 lze vidět porovnání výskytu bakterií a kvasinek v jednotlivých nápojích vyrobených z různých částí *scoby*. Na prvním obrázku je vidět velký

výskyt biomasy v mediu u nepoužívané *scoby*, což je způsobeno přizpůsobováním mikroorganismů mediu a tvoření nové celulózové vrstvy, což potvrzují i hodnoty organických kyselin z Tabulka 8 (kapitola 5.1.4.). Oproti tomu křížový roztěr vrchní a spodní části *scoby* ukazuje velmi malé množství mikroorganismů. Tento výsledek může být způsoben špatným provedením tohoto roztěru. Vzhledem k tomu, že byl křížový roztěr připravován z kombuchového nápoje, a ne přímo ze *scoby*, mohlo dojít k tomu, že došlo k sedimentaci mikroorganismů obsažených v mediu, a tudíž nebyly přeneseny na kultivační misku v potřebném množství tak, jak tomu bylo u nápoje připraveného z nepoužívané *scoby*.

V rámci křížového roztěru můžeme říci, že kvasinky a bakterie vyskytující se ve *scoby* jsou zde obsaženy v koloniích. Tyto kolonie mají stejnou barvu i tvar, a tak je nemůžeme od sebe odlišit. Zároveň zde můžeme vyloučit přítomnost plísní, které jsme zde ani neočekávali, tudíž se nám tento předpoklad potvrdil.



**Obrázek 23** Křížový roztěr kombuchového nápoje vytvořeného z různých částí *scoby* a ukázka *scoby* mateřské a nově vyprodukované celulózové vrstvy (dceřiné *scoby*).

## 6 Závěr

Nápoj kombucha je konzumován po celém světě jako osvěžující nápoj, který je možné si připravit doma, tak i komerčně zakoupit. Při výrobě tohoto nápoje se klade důraz na různé odrůdy čajových listů a přesné množství cukru. Tyto techniky si každá firma zabývající se výrobou pečlivě střeží.

Základem této diplomové práce bylo zjištění chemických procesů během výroby kombuchového nápoje. Ten byl připravený jak řízenou fermentací v bioreaktoru, kdy byla použita *scoby* z firmy RebornFood zabývající se komerční výrobou přírodního kombuchového nápoje, tak nápojem vyrobeným přímo v této firmě. Vzhledem k požadovanému perlivému charakteru kombuchového nápoje byla provedena také studie průběhu změn během sekundární fermentace.

Cílem analýz prováděných během primární i sekundární fermentace, bylo stanovení vznikajících metabolitů v průběhu kvašení v závislosti na čase. Při srovnání složení kombuchového nápoje v médiu po primární fermentaci, tj. v 7. dnu, lze pozorovat změnu analytů oproti prvnímu dni. Z výsledků porovnávajících primární fermentaci se zákvasem a bez zákvasu (v bioreaktoru) můžeme jasně vidět, že rychlost hydrolýzy sacharózy v případě primární fermentace s obsaženým zákvasem je asi o polovinu rychlejší. Vstupní koncentrace sacharózy u obou měřených fermentací byla 70 g/l, avšak v 7. dni primární fermentace kombuchového nápoje se zákvasem činila tato koncentrace 1,09 g/l sacharózy. Proti tomu při řízené primární fermentaci v bioreaktoru (bez zákvasu) byla v 7. dni naměřena koncentrace 15,62 g/l. Výsledky koncentrací naměřené sacharózy při primární fermentaci se zákvasem jsou hlavním důvodem, že po stočení do lahví zde již nedochází k nijak významné změně chemických sloučenin. Zároveň byla v nápoji analyzována kyselina mléčná, která se v kombuchovém nápoji vyskytuje spíše vzácně. Ve vzorcích z primární fermentace za použití zákvasu byla naměřena koncentrace této kyseliny v 7. dni 0,9 g/l. Oproti tomu v primární řízené fermentaci byla koncentrace kyseliny mléčné v 7. dni fermentace naměřena 0,04 g/l. Takto velký rozdíl v hodnotách kyseliny je nejspíše opět způsoben přidáním zákvasu do nálevu. Dále byl sledován obsah ethanolu v kombuchovém nápoji připraveném jak řízenou, tak neřízenou fermentací. Po primární fermentaci prováděné firmou RebornFood byl stanoven obsah ethanolu v 7. dni na koncentraci 1,09 % (v/v), po stočení do lahví, a tím pádem spuštění sekundární fermentace, byla koncentrace ethanolu v nápoji stanovena na 1,4 % ± 0,65 % (v/v), což nesplňuje legislativu o nízko alkoholickém nápoji. Vzhledem k tomu, že tato firma nechce nápoj uměle sytit ani do něj nijak zasahovat, vzniká technologický problém, který bude třeba vyřešit v rámci dalšího výzkumu a vývoje.

Část experimentálního času v rámci této diplomové práce bylo věnováno studiu *scoby* samotné. Bylo prokázáno, že *scoby*, která nebyla nikterak omlazována několik týdnů po naložení do čajového nálevu, začala využívat sacharózu jako zdroj uhlíku. Ovšem vzhledem k jejímu vyhladovění nebyla schopna produkovat metabolity do média jako primární produkt. Nejprve se zaměřila na znovuoobnovení své mikrobiální struktury a tvorbu nové celulózové sítě.

Tato diplomová práce také poukazuje na unikátní mikrobiální složení každé *scoby*, která je vkládána do čajového nálevu. Původ *scoby* je hlavní a určující složkou výsledného

chemického složení kombuchového nápoje. Zároveň byla prokázána unikátnost každé lahve vyrobené ve firmě RebornFood, díky zcela přírodní fermentaci.

## 7 Seznam použitých zkratk a symbolů

HPLC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie

RI – refraktometrický detektor

UV–VIS – ultrafialově-viditelná spektroskopie

EtOH – ethanol

$\varepsilon$  – molární absorpční koeficient [ $\text{l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ]

$l$  – délka [cm]

$c$  – koncentrace [ $\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ]

$A$  – absorbance

## 8 Použitá literatura

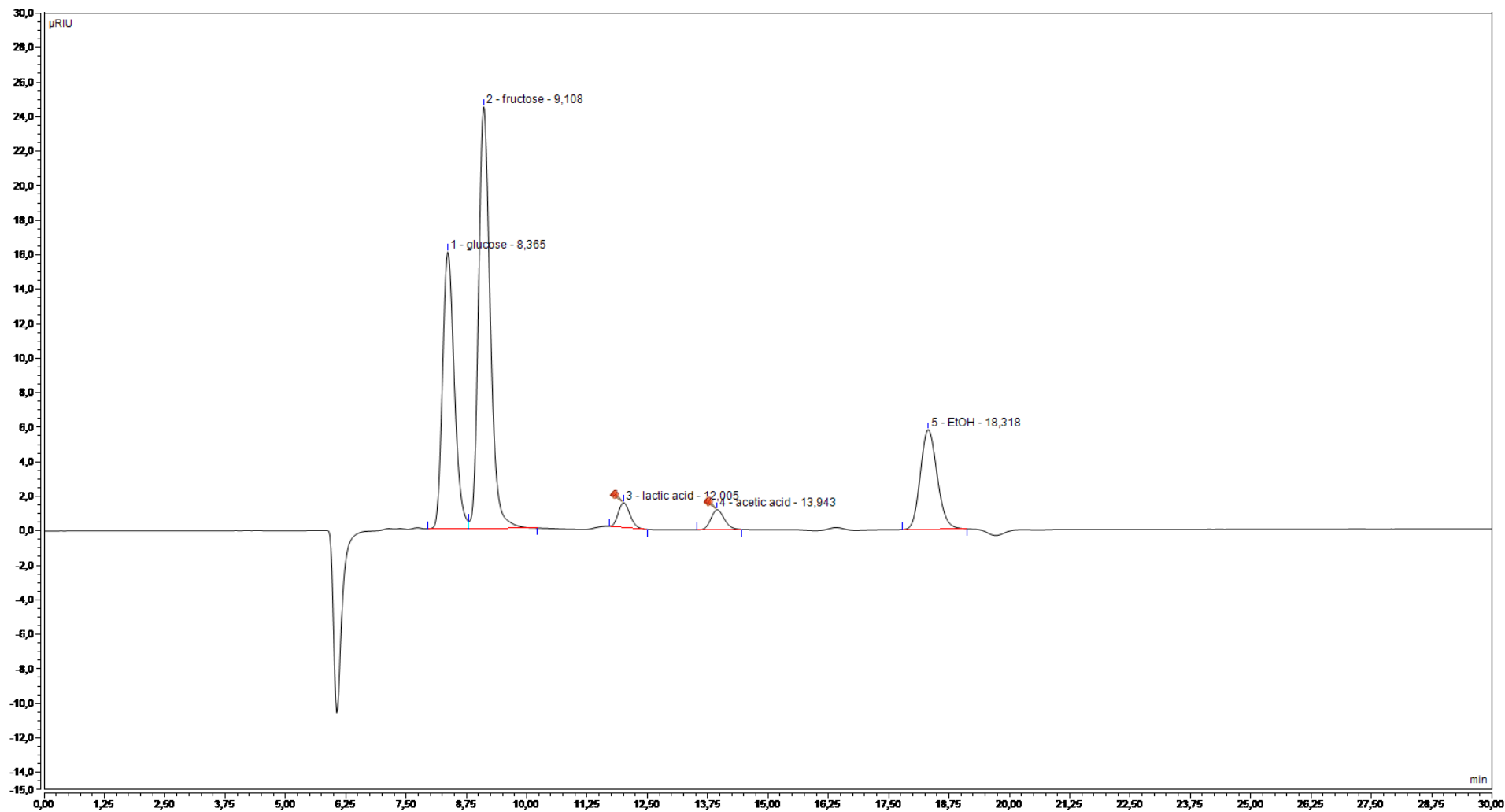
1. *Wikipedia: SCOBY* [online]. [cit. 2018-04-30]. Dostupné z: <https://en.wikipedia.org/wiki/SCOBY>
2. *Wikipedia: Kombucha* [online]. [cit. 2018-04-30]. Dostupné z: <https://en.wikipedia.org/wiki/Kombucha>
3. GREENWALT, C. J. Kombucha, the Fermented Tea: Microbiology, Composition, and Claimed Health Effects. *Journal of Food Protection*. 2000, **63**(7), 6.
4. *Yemoos: Kombucha overview* [online]. [cit. 2018-04-30]. Dostupné z: <https://www.yemoos.com/pages/kombucha-overview>
5. *Kombucha* [online]. [cit. 2018-04-30]. Dostupné z: <http://www.kombucha.wbs.cz/Co-je-to-kombucha.html>
6. CHI PHUNG, ALICE CHI PHUNG. *Kombucha Brewing: The Ingredients* [online]. 03/05/2015 [cit. 2018-04-30]. Dostupné z: <https://scienceandfooducla.wordpress.com/2015/11/03/kombucha-brewing-the-ingredients/>
7. TAZZINI, Nicola. *BLACK TEA: DEFINITION, PROCESSING AND POLYPHENOLS* [online]. 22/06/2014 [cit. 2018-04-30]. Dostupné z: <http://www.tuscany-diet.net/2014/06/22/black-tea-definition-processing-polyphenols/>
8. NAVEED, Muhammad, Jannat BIBI, Asghar Ali KAMBOH, et al. *Pharmacological values and therapeutic properties of black tea ( Camellia sinensis ): A comprehensive overview*. 2018, **100**, 521-531. DOI: 10.1016/j.biopha.2018.02.048. ISSN 07533322. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0753332217362194>
9. *Jasmine tea* [online]. [cit. 2018-04-30]. Dostupné z: [https://en.wikipedia.org/wiki/Jasmine\\_tea](https://en.wikipedia.org/wiki/Jasmine_tea)
10. DUFRESNE, C. a E. FARNWORTH. Tea, Kombucha, and health: a review. *Food Research International*. 2000, **33**(6), 409-421. DOI: 10.1016/S0963-9969(00)00067-3. ISSN 09639969. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0963996900000673>
11. JAYABALAN, Rasu, Radomir V. MALBAŠA a Muthuswamy SATHISHKUMAR. *Kombucha. Reference Module in Food Science*. Elsevier, 2016, 2016. DOI: 10.1016/B978-0-08-100596-5.03032-8. ISBN 9780081005965.
12. SREERAMULU, Guttapadu, Yang ZHU a Wieger KNOL. Kombucha Fermentation and Its Antimicrobial Activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2000, **48**(6), 2589-2594. DOI: 10.1021/jf991333m. ISSN 0021-8561.
13. *Saccharomyces cerevisiae (S. cerevisiae) Cell Lines* [online]. [cit. 2018-04-30]. Dostupné z: <http://fungi.myspecies.info/all-fungi/torula-herbarum>
14. *Schizosaccharomyces pombe* [online]. [cit. 2018-04-30]. Dostupné z: <https://www.eurekalert.org/multimedia/pub/33687.php>
15. *Torula herbarum* [online]. [cit. 2018-04-30]. Dostupné z: <http://fungi.myspecies.info/all-fungi/torula-herbarum>
16. *Kvasny Prumysl.* 2016, **62**(7). ISSN 00235830. Dostupné také z: <http://kvasnyprumysl.cz/doi/10.18832/kp2016025.html>
17. GRANGER, Matthew a Peter ECK. Dietary Vitamin C in Human Health. *New Research and Developments of Water-Soluble Vitamins*. Elsevier, 2018, 2018, , 281-310. Advances in Food and Nutrition Research. DOI: 10.1016/bs.afnr.2017.11.006. ISBN 9780128118030.
18. ROSENBERG, Jonathan, Till ISCHEBECK a Fabian M. COMMICHAU. Vitamin B6 metabolism in microbes and approaches for fermentative production. *Biotechnology Advances*. 2017, **35**(1), 31-40. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2016.11.004. ISSN 07349750

19. PAUL, Ligi a Jacob SELHUB. Interaction between excess folate and low vitamin B12 status. *Molecular Aspects of Medicine*. 2017, **53**, 43-47. DOI: 10.1016/j.mam.2016.11.004. ISSN 00982997.
20. CHAKRAVORTY, Somnath, Semantee BHATTACHARYA, Antonis CHATZINOTAS, Writachit CHAKRABORTY, Debanjana BHATTACHARYA a Ratan GACHHUI. Kombucha tea fermentation: Microbial and biochemical dynamics. *International Journal of Food Microbiology*. 2016, **220**, 63-72. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2015.12.015. ISSN 01681605.
21. JAYABALAN, R., S. MARIMUTHU a K. SWAMINATHAN. Changes in content of organic acids and tea polyphenols during kombucha tea fermentation. *Food Chemistry*. 2007, **102**(1), 392-398. DOI: 10.1016/j.foodchem.2006.05.032. ISSN 03088146.
22. EŞ, Ismail, Amin MOUSAVI KHANEGHAH, Francisco J. BARBA, Jorge A. SARAIVA, Anderson S. SANT'ANA a Seyed Mohammad Bagher HASHEMI. Recent advancements in lactic acid production - a review. *Food Research International*. 2018, **107**, 763-770. DOI: 10.1016/j.foodres.2018.01.001. ISSN 09639969.
23. ROBERT V. STICK. *Carbohydrates the sweet molecules of life*. [Online-Ausg.]. San Diego, Calif: Academic, 2001. ISBN 978-012-6709-605.
24. NAJAFPOUR, Ghasem D. *Biochemical engineering and biotechnology*. Boston, MA: Elsevier B. V., 2007. ISBN 978-0-444-52845-2.
25. FANALI, Salvatore a Leonida ROSINO. *Liquid chromatography: fundamentals and instrumentation*. [Online-Ausg.]. Waltham: Elsevier, c2013. Memorie della Societa astronomica Italiana, vol. 39, fasc. 3. ISBN 978-0-12-415807-8.
26. BOOTHROYD, Peter. a Xuân Nam. PHẠM. *Socioeconomic renovation in Viet Nam: the origin, evolution, and impact of doi moi*. 2000. DOI: doi.org/10.1016/S0723-2020(11)80420-0.
27. TEOH, Ai Leng, Gillian HEARD a Julian COX. Yeast ecology of Kombucha fermentation. *International Journal of Food Microbiology*. 2004, **95**(2), 119-126. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2003.12.020. ISSN 01681605.
28. MAYSER, P., Stephanie FROMME, G. LEITZMANN a K. GRÜNDER. The yeast spectrum of the 'tea fungus Kombucha'. *Mycoses*. 1995, **38**(7-8), 289-295. DOI: 10.1111/j.1439-0507.1995.tb00410.x. ISSN 09337407
29. CHAKRAVORTY, Somnath, Semantee BHATTACHARYA, Antonis CHATZINOTAS, Writachit CHAKRABORTY, Debanjana BHATTACHARYA a Ratan GACHHUI. Kombucha tea fermentation: Microbial and biochemical dynamics. *International Journal of Food Microbiology*. 2016, **220**, 63-72. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2015.12.015. ISSN 01681605.
30. KALLEL, Lina, Véronique DESSEAUX, Moktar HAMDI, Pierre STOCKER a El Hassan AJANDOUZ. Insights into the fermentation biochemistry of Kombucha teas and potential impacts of Kombucha drinking on starch digestion. *Food Research International*. 2012, **49**(1), 226-232. DOI: 10.1016/j.foodres.2012.08.018. ISSN 09639969.
31. *Sbírka zákonů české republiky*. In: . ČR, ročník 1997, 335/1997 Sb.
32. DUFRESNE, C. a E. FARNWORTH. Tea, Kombucha, and health: a review. *Food Research International*. 2000, **33**(6), 409-421. DOI: 10.1016/S0963-9969(00)00067-3. ISSN 09639969.
33. Black tea. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001- [cit. 2018-05-03]. Dostupné z: [https://en.wikipedia.org/wiki/Black\\_tea#/media/File:Black-tea.jpg%20%E2%80%93](https://en.wikipedia.org/wiki/Black_tea#/media/File:Black-tea.jpg%20%E2%80%93)
34. ZHANG, Anqi, Qin Yan ZHU, Yan Shun LUK, Ka Yan HO, Kwok Pui FUNG a Zhen-Yu CHEN. Inhibitory effects of jasmine green tea epicatechin isomers on free radical-induced lysis of red

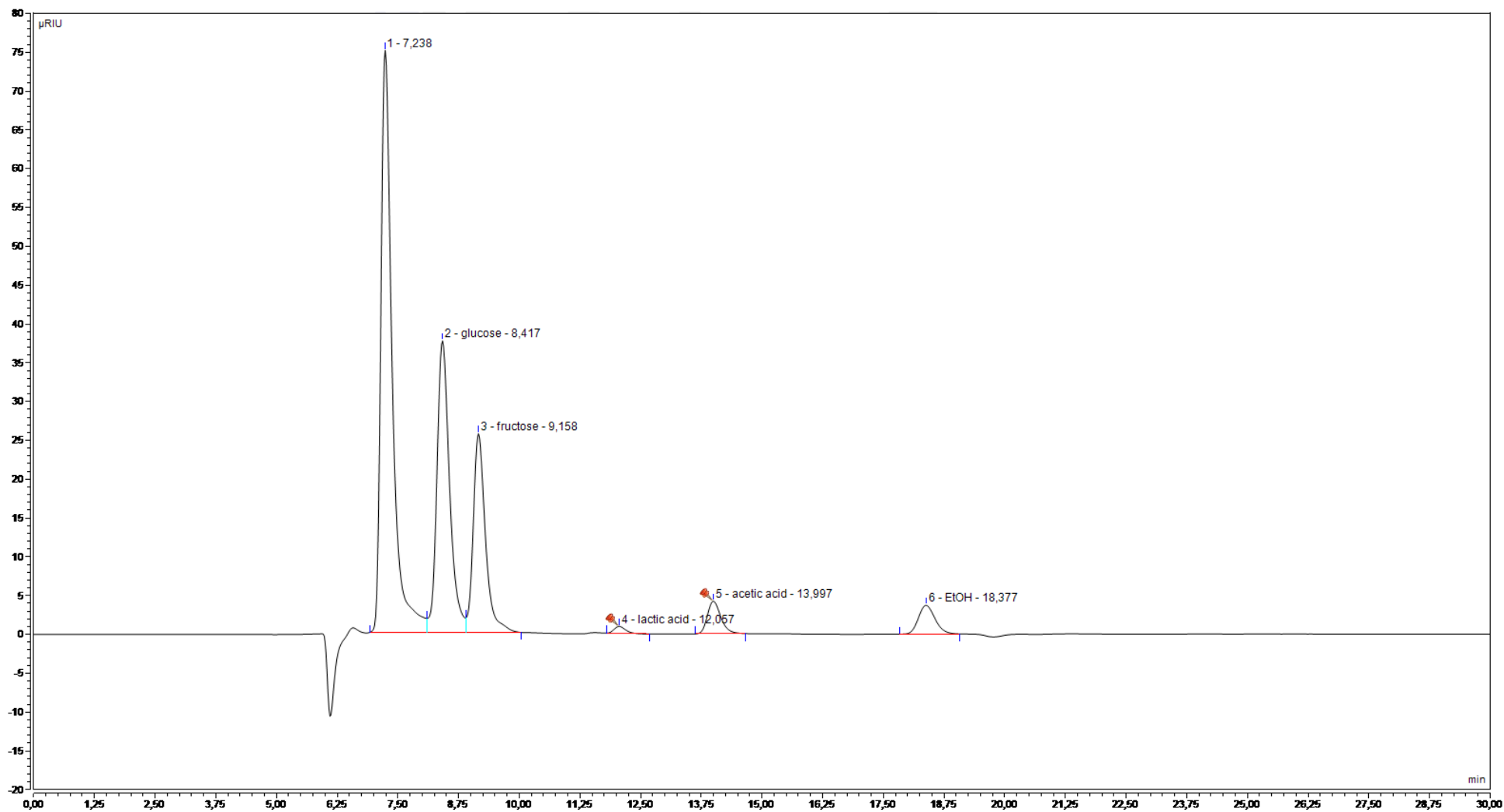
- blood cells. *Life Sciences*. 1997, **61**(4), 383-394. DOI: 10.1016/S0024-3205(97)00395-0. ISSN 00243205. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0024320597003950>
35. ZHENG, Xin-Xin, Yan-Lu XU, Shao-Hua LI, Rutai HUI, Yong-Jian WU a Xiao-Hong HUANG. Effects of green tea catechins with or without caffeine on glycemic control in adults: a meta-analysis of randomized controlled trials. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2013, **97**(4), 750-762. DOI: 10.3945/ajcn.111.032573. ISSN 0002-9165. Dostupné také z: <https://academic.oup.com/ajcn/article/97/4/750/4577040>
36. Green tea. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001- [cit. 2018-01-18]. Dostupné z: [https://en.wikipedia.org/wiki/Green\\_tea](https://en.wikipedia.org/wiki/Green_tea)
37. Bacteria - The Role Of Bacteria In Fermentation Read more: Bacteria - The Role Of Bacteria In Fermentation - Acid, Pasteur, Heating, and Beer - JRank Articles <http://science.jrank.org/pages/710/Bacteria-role-bacteria-in-fermentation.html#ixzz5ER2hIThk>. *Acteria - Physical And Chemical Requirements For Bacterial Growth Read more: Bacteria - The Role Of Bacteria In Fermentation - Acid, Pasteur, Heating, and Beer - JRank Articles* <http://science.jrank.org/pages/710/Bacteria-role-bacteria-in-fermentation.html#ixzz5ER2qXVIS> [online]. [cit. 2018-05-03]. Dostupné z: <http://science.jrank.org/pages/710/Bacteria-role-bacteria-in-fermentation.html>
38. Vitamin B1. *Sciencedirect* [online]. [cit. 2018-05-03]. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/topics/biochemistry-genetics-and-molecular-biology/vitamin-b1>
39. Thiamin. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001- [cit. 2018-05-03]. Dostupné z: <https://cs.wikipedia.org/wiki/Thiamin>
40. Riboflavin. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001- [cit. 2018-05-03]. Dostupné z: <https://cs.wikipedia.org/wiki/Riboflavin>
41. LANDOR, J.V. DEFICIENCY OF VITAMIN B2. *The Lancet*. 1939, **233**(6042), 1368-1370. DOI: 10.1016/S0140-6736(00)77394-6. ISSN 01406736. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673600773946>
42. Vitamin C. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001- [cit. 2018-05-03]. Dostupné z: [https://cs.wikipedia.org/wiki/Vitam%C3%ADn\\_C](https://cs.wikipedia.org/wiki/Vitam%C3%ADn_C)
43. Vitamin B6. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001- [cit. 2018-05-03]. Dostupné z: [https://cs.wikipedia.org/wiki/Vitam%C3%ADn\\_B6](https://cs.wikipedia.org/wiki/Vitam%C3%ADn_B6)
44. Vitamin B12. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001- [cit. 2018-05-03]. Dostupné z: [https://cs.wikipedia.org/wiki/Vitam%C3%ADn\\_B12](https://cs.wikipedia.org/wiki/Vitam%C3%ADn_B12)
45. Acetic acid. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001- [cit. 2018-05-03]. Dostupné z: [https://en.wikipedia.org/wiki/Acetic\\_acid](https://en.wikipedia.org/wiki/Acetic_acid)
46. Lactic acid. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001- [cit. 2018-05-03]. Dostupné z: [https://en.wikipedia.org/wiki/Lactic\\_acid](https://en.wikipedia.org/wiki/Lactic_acid)
47. Kyselina glukuronová. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001- [cit. 2018-05-03]. Dostupné z: [https://cs.wikipedia.org/wiki/Kyselina\\_glukuronov%C3%A1](https://cs.wikipedia.org/wiki/Kyselina_glukuronov%C3%A1)
48. Sacharóza. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001- [cit. 2018-05-03]. Dostupné z: <https://cs.wikipedia.org/wiki/Sachar%C3%B3za>
49. Fruktóza. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001- [cit. 2018-05-03]. Dostupné z: <https://cs.wikipedia.org/wiki/Frukt%C3%B3za>

50. Glukóza. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001- [cit. 2018-05-03]. Dostupné z: <https://cs.wikipedia.org/wiki/Gluk%C3%B3za>
51. *Clinical Biochemistry*. 2013, **46**(15). ISSN 00099120. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0009912013001677>
52. SIEVERS, Martin, Cristina LANINI, Adrien WEBER, Ursula SCHULER-SCHMID, Michael TEUBER a Ratan GACHHUI. Microbiology and Fermentation Balance in a Kombucha Beverage Obtained from a Tea Fungus Fermentation: Microbial and biochemical dynamics. *Systematic and Applied Microbiology*. 1995, **18**(4), 590-594. DOI: 10.1016/S0723-2020(11)80420-0. ISSN 07232020. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0723202011804200>
53. Projekt kombucha. *Projekt kombucha* [online]. [cit. 2018-05-03]. Dostupné z: <http://projektkombucha.cz/>
54. JAYABALAN, Rasu, Radomir V. MALBAŠA, Eva S. LONČAR, Jasmina S. VITAS a Muthuswamy SATHISHKUMAR. A Review on Kombucha Tea-Microbiology, Composition, Fermentation, Beneficial Effects, Toxicity, and Tea Fungus. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2014, **13**(4), 538-550. DOI: 10.1111/1541-4337.12073. ISSN 15414337. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1111/1541-4337.12073>
55. CHEN, C., B.Y. LIU, Eva S. LONČAR, Jasmina S. VITAS a Muthuswamy SATHISHKUMAR. Changes in major components of tea fungus metabolites during prolonged fermentation. *Journal of Applied Microbiology*. 2000, **89**(5), 834-839. DOI: 10.1046/j.1365-2672.2000.01188.x. ISSN 1364-5072. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1365-2672.2000.01188.x>
56. MALBAŠA, R., E. LONČAR, M. DJURIĆ a I. DOŠENOVIĆ. Effect of sucrose concentration on the products of Kombucha fermentation on molasses. *Food Chemistry*. 2008, **108**(3), 926-932. DOI: 10.1016/j.foodchem.2007.11.069. ISSN 03088146. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814607012319>

## 9 Přílohy



Příloha 1: ukázkový chromatogram reálného vzorku kombuchového nápoje po sekundární fermentaci



**Příloha 2:** ukázkový chromatogram reálného vzorku kombuchového nápoje z primární fermentace