

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky



**Fakulta agrobiologie,
potravinových a přírodních zdrojů**

**Antioxidační aktivita nápoje Kombucha
z různých druhů čajů**

Diplomová práce

Autor práce: Bc. Karina Prikhodko

Obor studia: Výživa a potraviny

Vedoucí práce: doc. Ing. Boris Hučko, CSc.

© 2022 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Antioxidační aktivita nápoje Kombucha z různých druhů čajů" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 11. 4. 2022 _____

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala svému vedoucímu práce, panu doc. Ing. Borisovi Hučkovi, CSc., za vstřícný přístup, cenné rady a věnovaný čas při konzultacích. Poděkování také patří panu Ing. Ivo Doskočilovi, Ph.D. za pomoc při laboratorních měřeních a odborných konzultacích s nimi spojenými.

Antioxidační aktivita nápoje Kombucha z různých druhů čajů

Souhrn

Volné radikály jsou dobře známy jak pro své prospěšné, tak ale i škodlivé účinky. Jejich nadprodukce má za následek oxidační stres, škodlivý proces, který může být důležitý mediátor poškození buněčných struktur, včetně lipidů, membrán, proteinů a DNA. Mechanismy obrany organismu proti nadměrné produkci volných radikálů jsou zajištěny působením tzv. antioxidantů. O mnoha potravinářských produktech je známo, že obsahují bioaktivní složky, které mají vysokou antioxidační aktivitu. Mezi takové potraviny patří i kombucha – tradičně vyráběný nápoj, získaný fermentací slazeného čaje symbiotickou kulturou octových bakterií a kvasinek. Antioxidační aktivita nápoje je připisována především polyfenolům, sloučeninám produkovaným během fermentace a synergickému účinku různých sloučenin nacházejících se v černém a zeleném čaji. Čaje jsou považovány za standardní substráty pro pěstování kombuchy, nicméně ve snaze získat nápoj s atraktivnějšími a vylepšenými vlastnostmi se používají i alternativní materiály, jako například bylinkové nálevy.

Cílem diplomové práce bylo stanovit antioxidační aktivitu a obsah fenolických sloučenin kombuchy vyráběné ze zeleného, černého, rooibos a lipového čaje a dále také ve vzorcích nefermentovaného čaje. Testování bylo provedeno pomocí Folin-Ciocalteuové (TPC) a DPPH metod. Nejlepší výsledky antioxidační aktivity a obsahu fenolických sloučenin prokázal vzorek kombuchy z černého čaje 12. den fermentace: $1546,78 \pm 58,64$ mg GAE/l (TPC) a $IC_{50} 6,12 \pm 1,81$ μ l/ml (DPPH). Bylo námi potvrzeno, že antioxidační aktivita a obsah fenolických sloučenin v kombuše se progresivně zvyšuje s dobou fermentace. Obsah fenolů kombuchy z černého, zeleného, rooibos a lipového čaje se od 5. do 12. dne fermentace zvýšil o 48, 41, 23 a 22 %, a hodnoty IC_{50} klesly o 80, 47, 32 a 27 % ve stejném pořadí. Bylo provedeno porovnání naměřených výsledků mezi vzorky kombuchy v závislosti na druhu použitého čaje. Výstupem bylo nalezení statisticky významného rozdílu mezi všemi variantami kombuchy. Výjimku představovaly vzorky kombuchy ze zeleného a černého čaje k 5. dni fermentace, mezi kterými se podle obsahu fenolů rozdíl neprokázal. Spolu s tím byla testována hypotéza, že obsah fenolických sloučenin a antioxidační aktivita u nefermentovaného čaje bude nižší než u kombuchy vyrobené ze stejného čaje. Hypotéza se potvrdila ve všech porovnávaných variantách, kromě hodnot IC_{50} vzorků kombuchy ze zeleného čaje a nálevu zeleného čaje, mezi kterými rozdíl prokázán nebyl.

Výsledky naznačují, že nápoj kombucha je velice perspektivní funkční potravina. Její výroba je však stále převážně soustředěna v řemeslném sektoru. Podle literatury neexistují téměř žádné záznamy o systematických pokusech, zkoumajících vliv konzumace kombuchy na lidský organismus. Proto by analýza výhod a nevýhod konzumace tohoto nápoje mohla být oblast, na kterou je vhodné budoucí výzkum zaměřit. Měly by se objasnit zdraví prospěšná tvrzení, což by následně mohlo pomoci při propagaci tohoto nápoje mezi spotřebiteli.

Klíčová slova: Kombucha, antioxidační aktivita, čaj, *scoby*, DPPH, TPC

Antioxidant activity of kombucha drinks from different types of teas.

Summary

Free radicals are well known for both their beneficial and harmful effects. Their overproduction results in oxidative stress, a damaging process that can be an important mediator of damage to cellular structures, including lipids, membranes, proteins and DNA. The body's defence mechanisms against excessive free radical production are provided by the action of so-called antioxidants. Many food products are known to contain bioactive ingredients that have high antioxidant activity. Among such foods is kombucha, a traditionally produced beverage obtained by fermenting sweetened tea with a symbiotic culture of vinegar bacteria and yeast. The drink's antioxidant activity is attributed mainly to polyphenols, compounds produced during fermentation, and the synergistic effect of various compounds found in black and green tea. Teas are considered standard substrates for growing kombucha, however, alternative materials such as herbal infusions are also used in an attempt to obtain a drink with more attractive and improved properties.

The aim of the thesis was to determine the antioxidant activity and phenolic compound content of kombucha produced from green, black, rooibos and lime tea and also in samples of unfermented tea. The testing was carried out using Folin-Ciocalteu (TPC) and DPPH methods. The best results for antioxidant activity and phenolic compound content were shown by the black tea kombucha sample on day 12 of fermentation: 1546.78 ± 58.64 mg GAE/l (TPC) and $IC_{50} 6.12 \pm 1.81$ μ l/ml (DPPH). It was confirmed by us that the antioxidant activity and phenolic compound content of kombucha increased progressively with fermentation time. The phenolic content of black, green, rooibos and lime tea kombucha increased by 48, 41, 23 and 22%, respectively, from the 5th to the 12th day of fermentation, and the IC_{50} values decreased by 80, 47, 32 and 27%, respectively. A comparison of the measured results was made between kombucha samples depending on the type of tea used. The result was the finding of a statistically significant difference between all kombucha variants. The exception was the green and black tea kombucha samples at day 5 of fermentation, which showed no difference in phenolic content. Along with this, the hypothesis that the phenolic compound content and antioxidant activity of the unfermented tea would be lower than that of kombucha made from the same tea was tested. The hypothesis was confirmed in all variants compared, except for the IC_{50} values of 50 samples of kombucha from green tea and green tea infusion, between which no difference was demonstrated.

The results suggest that kombucha drink is a very promising functional food. However, its production is still largely concentrated in the artisanal sector. According to the literature, there are almost no records of systematic trials investigating the effects of kombucha consumption on the human body. Therefore, analyzing the advantages and disadvantages of consuming this beverage could be an area where future research should focus. Health claims should be clarified, which could then help in promoting the drink among consumers.

Keywords: Kombucha, antioxidant activity, tea, scoby, DPPH, TPC

Obsah

1	Úvod	7
2	Vědecká hypotéza a cíle práce	8
3	Literární rešerše	9
3.1	Volné radikály a antioxidanty	9
3.2	Antioxidační aktivita	14
3.2.1	Metody stanovení antioxidační aktivity	14
3.3	Kombucha	15
3.3.1	Kombuchový nápoj	15
3.3.2	Zdravotní přínosy pro lidský organismus	15
3.3.3	Mikrobiální složení <i>scoby</i>	16
3.3.4	Chemické složení a bioaktivní látky	18
3.3.4.1	Organické kyseliny	19
3.3.4.2	Vitamíny	20
3.3.4.3	Minerály	21
3.3.4.4	Bakteriociny	21
3.3.4.5	Ethanol	21
3.3.4.6	Polyfenoly	22
3.3.5	Výroba kombucha nápoje	24
3.3.6	Faktory ovlivňující fermentaci a vlastnosti kombuchy	26
3.3.7	Potenciální zdravotní riziko	26
3.4	Vhodné substráty pro výrobu kombuchy	27
3.4.1	Čaj	27
3.4.1.1	Zelený čaj	28
3.4.1.2	Černý čaj	29
3.4.2	Bylinné nálevy	29
3.4.2.1	Rooibos	29
3.4.2.2	Lipový květ	30
4	Materiál a metodika	31
4.1	Materiál	31
4.2	Příprava vzorků	31
4.3	Stanovení obsahu fenolických sloučenin	31
4.4	Stanovení antioxidační aktivity	32
4.5	Statistické vyhodnocení	32
5	Výsledky	33
5.1	Celkový obsah fenolických sloučenin	33
5.2	Antioxidační aktivita	35
6	Diskuse	38
7	Závěr	42
8	Literatura	43
9	Seznam použitých zkratk a symbolů	54

1 Úvod

Během života probíhá v lidském těle spousta chemických reakcí a produkce volných radikálů probíhá stále ve všech buňkách jako součást normální buněčné funkce, která je nezbytná. Často pod vlivem různých nepříznivých faktorů se však počet volných radikálů začne zvyšovat nad nezbytnou míru. Mechanismy obrany organismu proti nadměrné produkci volných radikálů jsou zajištěny působením látek zvaných antioxidanty, které mají schopnost svou aktivitou snížit množství volných radikálů, přeměnit je na méně škodlivé nebo úplně zabránit jejich vzniku. Nerovnováha mezi volnými radikály a antioxidační obranou organismu představuje pojem oxidační stres a vede k poškození buněk a rozvoji různých patologických stavů.

Oxidační stres se podílí v patogenezi valné většiny lidských chorob, jako je například ateroskleróza, Parkinsonova nemoc, srdeční selhání, infarkt myokardu, Alzheimerova choroba a mnoho dalších. Lidský organismus je schopen si produkovat vlastní účinné antioxidanty, ale jejich množství a složení není vždy dostačující, a proto se také doporučuje příjem antioxidantů s exogenních zdrojů. Nadměrná a nekontrolovaná konzumace některých antioxidantů v podobě doplňků stravy může vést k opačnému efektu a vznik volných radikálů dokonce vyvolat, a proto je nejlepší přijímat antioxidanty v jejich přirozené podobě ze stravy.

V dnešní době se zvýšilo povědomí lidí o úloze stravy při udržování dobrého zdraví. Spotřebitelé očekávají, že jim potraviny dodají nejen základní živiny, ale budou také zdrojem biologicky aktivních látek, které jsou prospěšné pro organismus. Proto je pozorován neustálý nárůst poptávky po potravinách, které mají žádoucí účinky na tělo, což ovlivňuje rychlý rozvoj nového trhu s potravinami. Jednou z takových potravin je kombucha, čajový nápoj s vysokým antioxidačním potenciálem, získaný činností bakterií octového kvašení a osmoofilních kvasinek. Kombucha získaná z čaje se vyznačuje svými zdravými prospěšnými vlastnostmi a udávají se slibné výsledky studií *in vitro*, což také přimělo výzkumné skupiny z celého světa k hledání alternativních surovin pro fermentaci kombuchového nápoje. Probíhají pokusy získat funkční nápoje z bylinných nálevů, ovocných šťáv nebo například mléka.

Z výše zmíněných důvodů jsme v této práci provedli stanovení antioxidační aktivity a obsahu fenolických sloučenin nápoje kombucha pěstovaného na různých druzích substrátů v kombinaci s odlišnou dobou fermentace.

2 Vědecká hypotéza a cíle práce

Cíle práce:

- Stanovit celkový obsah fenolických sloučenin a antioxidační aktivitu nápoje Kombucha z černého, zeleného, rooibos a lipového čaje při různé době kultivace.

- Stanovit obsah fenolických sloučenin a antioxidační aktivitu černého, zeleného, rooibos a lipového čaje.

- Porovnat výsledky a vyhodnotit možný statisticky významný rozdíl v antioxidační aktivitě a obsahu fenolických sloučenin mezi:

a) vzorky kombuchy při různé době kultivace,

b) vzorky kombuchy v závislosti na druhu použitého čaje,

c) vzorky nefermentovaných roztoků čaje a kombuchy.

Hypotézy:

- Antioxidační aktivita a celkový obsah fenolických sloučenin v kombuše se progresivně zvyšuje s dobou fermentace.

- Antioxidační aktivita a celkový obsah fenolických sloučenin nápoje kombucha se liší v závislosti na druhu použitého čaje.

- Obsah fenolických sloučenin a antioxidační aktivita nefermentovaného čaje bude nižší než u kombuchy vyrobené ze stejného čaje.

3 Literární rešerše

3.1 Volné radikály a antioxidanty

3.1.1 Vznik a působení volných radikálů

Z chemického hlediska volnými radikály jsou nazývány jakékoliv molekuly, atomy nebo ionty s nepárovými elektrony ve valenční sféře, které jsou schopné samostatné existence po omezenou dobu. Díky nepárovému elektronu volné radikály vykazují velmi vysokou aktivitu, která spočívá ve snaze získat další elektron k doplnění elektronového páru nebo naopak nepárový elektron odevzdat. Jsou to velmi nestabilní sloučeniny, tudíž chemicky vysoce reaktivní. Volné radikály velmi snadno a rychle (v řádech mikro – nebo milisekund) oxidují nebo redukují jiné atomy či molekuly, čímž se stabilizují, proto je doba života většiny volných radikálů velmi krátká (Valko et al. 2007; Halliwell & Gutteridge 2015).

K nejznámějším reaktivním sloučeninám patří reaktivní formy kyslíku (ROS, Reactive Oxygen Species), reaktivní formy dusíku (RNS, Reactive Nitrogen Species), a také atomy uhlíku, chlóru nebo síry. ROS a RNS, často označované jako RONS, zahrnují jak volné radikály, tak neutrální molekuly a anionty, které nejsou radikály, ale též vykazují oxidační efekt (Opletal et al. 2013). Zástupci ROS a RNS jsou uvedeni v tabulkách č.1 a č.2.

Tabulka č.1: Reaktivní formy kyslíku (ROS) (Rahman et al. 2012).

Radikál	Látky, které nejsou radikály
Superoxid: $O_2^{\cdot-}$	Peroxid vodíku: H_2O_2
Hydroxyl: OH^{\cdot}	Kyselina chlorná: $HClO$
Peroxy: RO_2^{\cdot}	Kyselina bromná: $HBrO$
Alkoxy: RO^{\cdot}	Ozon: O_3
Hydroperoxy: HO_2^{\cdot}	Singletový kyslík: 1O_2

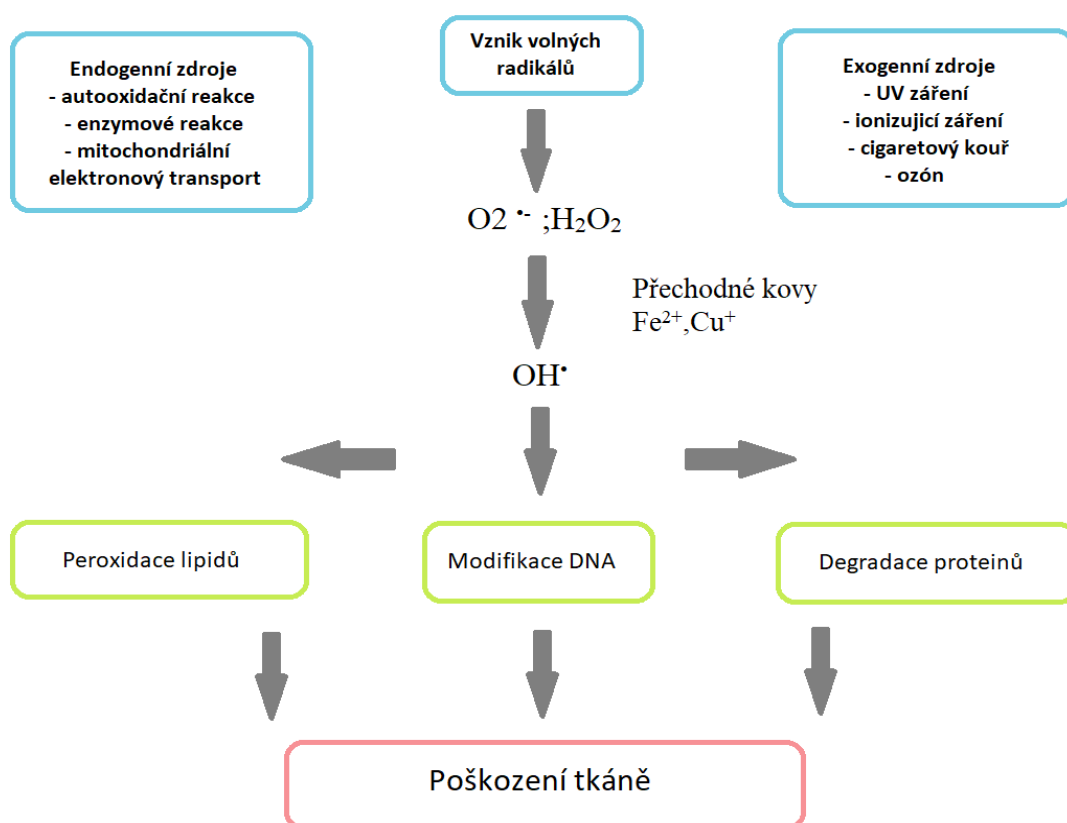
Tabulka č.2: Reaktivní formy dusíku (RNS) (Rahman et al. 2012).

Radikál	Látky, které nejsou radikály
Oxid dusnatý: NO^{\cdot}	Oxid dusičitý: NO_2
Kyselina dusitá: $HNO^{\cdot 2}$	Nitrosyl kation: NO
	Nitrosyl anion: $NO^- NO^{\cdot}$
	Oxid dusitý: N_2O_3
	Dinitrogen tetroxid: N_2O_4
	Peroxyinitrit: $ONOO$
	Alkylperoxyinitrit: $ROONO$

Volné radikály vznikají homolytickým štěpením kovalentní vazby, redukcí nebo oxidací výchozí sloučeniny, popřípadě se mohou do těla dostat ze zevního prostředí. Jejich vznik může být vyprovokován řadou chemických a fyzikálních jevů (viz obrázek č.1) (Opletal et al. 2013). Za exogenní zdroje volných radikálů jsou považovány například UV a ionizující záření, cigaretový kouř či ozón, který způsobuje zánětlivé reakce zejména v plicích (Fang et al. 2002).

Endogenně reaktivní částice mohou vzniknout například při rozpadu fagocytů a makrofágů, což způsobuje různé záněty nebo sepsi. Mohou se také tvořit během hyperglykémie, při syntéze prostaglandinu nebo methemoglobinu a při mitochondriálním transportu elektronů (Pokorný et al. 2001).

Proces oxidace hraje podstatnou roli v mnoha důležitých biologických procesech například fagocytóze, při buněčné signalizaci, během oxidační fosforylace probíhající v mitochondriích, tvorbě enzymů a dalších významných biologických molekul (Ray et al. 2012; Halliwell & Gutteridge 2015). I když RONS jsou pro organismus nezbytné, stále se o nich mluví kvůli jejich škodlivosti. RONS reagují s důležitými proteiny, mastnými kyselinami, lipidy, nukleovými kyselinami a řadou nízkomolekulárních sloučenin plnící v metabolismu buňky signální funkce. Po jejich působení dochází ke ztrátě dvojných vazeb esenciálních nenasycených mastných kyselin a poškození fosfolipidů v buněčných membránách lipidů. Při poškození proteinů se mění jejich sekundární a terciární struktura, tím pádem se mění reaktivita s některými enzymy a transport iontů. Důsledkem poškození DNA jsou zlomy řetězců s následnými mutacemi, translačními chybami a inhibicí proteosyntézy. Jejich vlivem může také často dojít k nekrotické nebo apoptické smrti buňky (Opletal et al. 2013; Müllerová 2014).



Obrázek č.1: Vznik volných radikálů a důsledky jejich poškození (upraveno podle Young & Woodside 2001).

3.1.2 Antioxidanty

Vystavení organismu volným radikálům z různých zdrojů vedlo k tomu, že lidský organismus si vyvinul řady obranných mechanismů: preventivní, reparační, fyzickou obranu a antioxidační (Fang et al. 2002; Valko et al. 2007). V dřívějších publikacích Halliwell & Gutteridge (1989; 1992) uvádějí pojem antioxidant jako „jakákoliv látka, která, když je přítomna v nízkých koncentracích ve srovnání s oxidovatelným substrátem, inhibuje nebo významně zpomaluje oxidaci tohoto substrátu“. Avšak v pozdějších publikacích Halliwell & Gutteridge (2010, 2018) definují antioxidant jako „látku, která přímo vychytává ROS nebo nepřímo působí na zvýšení antioxidační obrany nebo inhibuje produkci ROS“. Molekuly s antioxidačními vlastnostmi mohou být produkovány endogenně nebo požitý exogenně dietou a potravinovými doplňky.

Antioxidanty mohou inhibovat nebo zpomalovat oxidaci řadou mechanismů, včetně vázání kovových iontů, zachycování reaktivních forem kyslíku, přeměny hydroperoxidů na neradikálové druhy a pohlcování UV záření (Gulcin 2020). Aktivita antioxidantů závisí nejen na jejich strukturních vlastnostech, ale také na mnoha dalších faktorech, jako je koncentrace, teplota, úroveň osvětlení, typ substrátu, fyzikální stav systému, stejně jako na mnoha mikroložkách působících jako prooxidanty nebo synergisty (Gulcin et al. 2012).

Stále více se předpokládá, že výživa může hrát zásadní roli při obraně proti oxidativnímu stresu a poškozením vyvolaných volnými radikály. Proto jsou pro ochranu důležité určité živiny a složky stravy s antioxidačními vlastnostmi. Obecně platí, že na antioxidanty jsou bohaté zelenina a ovoce, obilné cereálie, luštěniny, ořechy atd. Bylo také identifikováno více než 3100 antioxidantů v potravinách, jako jsou nápoje, koření, bylinky a doplňky, které jsou pravidelně konzumovány různými kulturami (Rajendran et al. 2014).

Mnoho syrových potravin obsahuje přírodní antioxidanty, včetně enzymů jako jsou superoxidodismutáza (SOD), glutathionperoxidáza (GPx) a kataláza (CAT), a neenzymových antioxidantů, jako například karotenoidy, β -karoten, lutein, lykopen, tokoferol a další sloučeniny v rostlinách. Každá skupina těchto antioxidantů se skládá z řady strukturně odlišných sloučenin, např. dosud bylo identifikováno více než 600 různých karotenoidů a asi 50 z nich se může vyskytovat v lidské stravě (Rajendran et al. 2014; Gulcin 2020). V tabulce č.3 jsou uvedené zdroje některých přírodních antioxidantů.

Tabulka č.3: Vybrané zdroje přírodních antioxidantů (Chib et al. 2020).

Sloučeniny	Přírodní zdroje
Kyselina askorbová	Citrusové plody, zelená paprika, listová zelenina
Tokoferol	Rostlinné oleje, vlašské ořechy, arašídy, mandle, semínka
β -karoten	Mango, papája, dýně, paprika
Antokyan	Třešně, červená cibule, červené brambory
Lykopen	Mrkev, dýně, hrozny, meloun
Extrakt	Extrakt ze zeleného čaje, rozmarýnu, šalvěže, hřebíčku, oregana, tymiánu, ovsa, rýžových otrub

SOD katalyzuje jedoelektronovou dismutaci superoxidu na peroxid vodíku a kyslík. Kataláza je enzym obsahující porfyrin, který katalyzuje dvouelektronovou dismutaci peroxidu vodíku na kyslík a vodu. GPx se podílí nejen na odstraňování peroxidu vodíku, ale také na přeměně lipidových hydroperoxidů na jejich odpovídající alkoholy. α -Tokoferol je široce přítomen v membránách a může být regenerován ze své oxidované formy redukcí vitamínu C, ale zda je tento mechanismus aktivně funkční *in vivo* není stále jisté. β -Karoten kromě toho, že působí jako prekurzor vitamínu A je účinným zhášedčem singletového kyslíku. (Serafini 2006). Několik minerálů, v malých množstvích, je také nezbytných pro některé enzymatické antioxidační aktivity. Proto jsou samy o sobě někdy považovány za antioxidanty. Například selen je nezbytnou součástí GPx, zatímco měď, zinek a mangan jsou zásadní pro aktivitu SOD (Sharifi-Rad et al. 2020).

Antioxidanty také lze rozdělit do dvou kategorií v závislosti na jejich rozpustnosti: rozpustné ve vodě a rozpustné v tucích. Antioxidanty rozpustné ve vodě jsou nejlépe absorbovány do těla, protože zelenina a ovoce, které takové antioxidanty obsahují, také obsahují vodu. Na druhou stranu jsou rychle vyloučeny z těla močí. Mezi ve vodě rozpustné antioxidanty patří například polyfenoly a vitamín C. Lipofilní antioxidanty jsou ty, které jsou absorbovány v přítomnosti tuků. Proto při nedostatku tuků nemůže tělo tyto antioxidanty vstřebat a využít. Je však důležité poznamenat, že nejsou snadno odstranitelné z těla a mohou se časem hromadit a překračovat nezbytnou úroveň. Vitamín E je příkladem antioxidantu rozpustného v tucích (Lazzarino et al. 2019; Sharifi-Rad et al. 2020).

Syntetické antioxidanty se záměrně přidávají do potravin, aby zabránily nebo oddálily nástup oxidace lipidů během zpracování a skladování tuků, olejů a potravin obsahujících lipidy. Potravinářský průmysl je používá již zhruba 70 let. Téměř všechny zpracované potravinářské produkty (viz tabulka č.4) obsahují syntetické antioxidanty, o kterých se uvádí, že jsou bezpečné, ačkoli existují studie naznačující pravý opak (Carocho & Ferreira 2013). Nejpopulárnější používané syntetické antioxidanty jsou fenolické sloučeniny, jako butylovaný hydroxyanisol (BHA), butylovaný hydroxytoluen (BHT), terc-butyhydrochinon (TBHQ), propylgalát (PG) a oktylgalát (OG) (Gulcin et al. 2012).

Tabulka č.4: Zdroje některých syntetických antioxidantů (Chib et al. 2020).

Sloučeniny	Zdroje
BHA ¹	Pekařské výrobky, masné výrobky, koření, obiloviny, rostlinné oleje, nápojové směsi, dezertní směsi, ořechy
PG ²	Sádlo, rostlinné oleje, obiloviny, krmiva
BHT ³	Snídaňové cereálie, pečivo, bramborové lupínky, rostlinné oleje, máslo, margarín, mražené mořské plody, základ žvýkaček
TBHQ ⁴	Suché cereálie, jedlé tuky, polevy na pizzu, bramborové lupínky, drůbež, maso

BHA¹ – butylovaný hydroxyanisol, PG² – propylgalát, BHT³ – butylovaný hydroxytoluen, TBHQ⁴ – terc-butyhydrochinon.

Použití syntetických antioxidantů je omezeno a regulováno, což vyžaduje hledání účinných antioxidantů z přírodních zdrojů, a proto se zvyšuje zájem o přírodní a bezpečnější

antioxidanty pro potravinářské aplikace a roste trend spotřebitelských preferencí vůči přírodním antioxidantům (Gulcin 2020).

Rovnováha mezi oxidací a antioxiací je kritická pro udržení zdravého biologického systému. Nízké dávky antioxidantů mohou být pro tento systém příznivé, ale velká množství mohou rovnováhu narušit (Rajendran et al. 2014). V důsledku poruchy rovnovážného stavu mezi produkcí volných radikálů a antioxičnou obranou dochází k nadměrné produkci ROS a k vyvolání takzvaného oxidačního stresu, který inhibuje normální funkce buněčných lipidů, proteinů, DNA a RNA (Buldurun et al. 2020).

Prostřednictvím monitorování biomarkerů (reaktivní formy kyslíku a dusíku, a antioxičnou obrana) je naznačeno, že v patogenezi mnoha chronických onemocnění jako je rakovina, Alzheimerova a Parkinsonova choroba, srdeční onemocnění, může být zahrnuto oxidační poškození (Rahman et al. 2012). Antioxidanty mohou chránit lidské tělo před volnými radikály a účinky ROS, proto se řada vědeckých studií stále zabývá různými zdravotními přínosy antioxidantů (Sindhi et al. 2013). Například Ganceviciene et al. (2012) popsali různé strategie v léčbě stárnutí vyvolaného vnitřními a vnějšími příčinami. Tu & Tawata (2015) analyzovali *in vitro* esenciální oleje pro antioxičnou aktivitu. Petyaev (2016) studoval vliv lykopenu, který snižuje oxid dusnatý, ROS a lipidový peroxylový radikál. Xiong et al. (2017) diskutovali o potenciálním účinku methylenové modři, což je mitochondriálně zacílený antioxidant působící jako činidlo proti stárnutí. Li et al. (2015) studovali oxidační stres a antioxičnou terapii u jaterních poruch. Trujillo et al. (2013) hodnotili terapeutickou aktivitu kurkuminu při chronickém selhání ledvin, diabetické nefropatii a ischemii. Různé studie týkající se volných radikálů, oxidačního stresu a antioxičnou aktivity již odhalily významně prospěšnou roli antioxidantů a jejich specifickou roli vůči různým onemocněním (viz tabulka č.5).

Tabulka č.5: Účinky na zdraví spojené s příjmem antioxidantů
(Upraveno podle Rajendran et al. (2014))

Antioxidanty	Vliv na zdraví
Vitamín C	Chrání před rakovinou a srdečními chorobami. Zlepšuje zdraví chrupavky, kloubů a kůže. Udržuje zdraví imunitního systému a zlepšuje tvorbu protilátek. Zvyšuje vstřebávání živin a ochranu proti H_2O_2 indukovaným zlomům řetězce DNA.
Vitamín E	Předchází ischemické chorobě srdeční a tvorbě krevních sraženin. Snižuje dlouhodobě riziko demence a Parkinsonovy choroby ale také výskyt rakoviny prsu a prostaty.
Polyfenoly	Inhibují oxidaci LDL ¹ a agregaci krevních destiček. Snižují riziko infarktu myokardu a mají antikarcinogenní účinky. Používají se k prevenci neurodegenerativních onemocnění, osteoporózy a diabetu. Působí jako ochrana před neurotoxickými léky. Inhibují absorpci nehemového železa.
Cu, Zn, Mn, Se	Jsou to kofaktory antioxičnou enzymů Cu/Zn-SOD ² , Mn-SOD a GPx ³ . Působí jako ochrana proti oxidaci lipidů, LDL, proteinů a DNA.

LDL¹ – nízkodenzitní lipoprotein. SOD² – superoxid dismutáza. GPx³ – glutathion peroxidáza.

3.2 Antioxidační aktivita

Princip antioxidační aktivity je založen na schopnosti elektronů neutralizovat případné volné radikály. Antioxidační aktivita také souvisí s počtem a povahou hydroxylačního vzoru na aromatickém kruhu. Obecně se předpokládá, že schopnost působit jako donor vodíku a inhibice oxidace jsou zesíleny zvýšením počtu hydroxylových skupin ve fenolovém kruhu (Gulcin 2020).

V současné době stále roste zájem o látky s antioxidačními vlastnostmi, které jsou do lidského organismu dodávány jako složky potravy nebo jako specifická preventivní léčiva (Watawana et al. 2015). Efektivní výzkum přírodních zdrojů antioxidačních sloučenin vyžaduje spolehlivé metody hodnocení antioxidační aktivity. Tyto metody se od sebe liší z hlediska mechanismu antioxidační reakce, typu substrátu, oxidantu a cílového druhu, reakčních podmínek, iniciátoru oxidace, a snadnosti ovládnutí (Gulcin 2020).

3.2.1 Metody stanovení antioxidační aktivity.

Různé metody hodnocení antioxidační aktivity spadají do tří odlišných kategorií, jmenovitě spektrometrie, elektrochemické testy a chromatografie (Moharram & Youssef 2014). Na základě způsobu účinku lze antioxidační testy rozdělit do dvou hlavních skupin, a to testy přenosu atomů vodíku (HAT) a testy přenosu jednoho elektronu (SET). Dané testy jsou dostupné, rychlé a typicky automatizované. Testy založené na HAT (ORAC, LPIC, IOC, ABTS) měří schopnost antioxidantu uhasit volné radikály (obecně peroxylové radikály považované za biologicky relevantnější) darováním atomu H. Antioxidační aktivitu lze určit z kinetiky kompetice měřením křivky rozpadu fluorescence sondy v nepřítomnosti a přítomnosti antioxidantů, integrováním oblasti pod těmito křivkami a hledáním rozdílu mezi nimi. Spektrofotometrické testy založené na SET (TEAC, DPPH, TPC) měří kapacitu antioxidantu při redukci oxidantu, který při snížení mění barvu. Stupeň barevné změny (buď zvýšení nebo snížení absorbance sondy při dané vlnové délce) koreluje s koncentrací antioxidantů (Munteanu & Apetrei 2021).

Je třeba zdůraznit, že aktivita nesmí být hodnocená na základě testování pouze jednou metodou. Pro stanovení antioxidační aktivity sledovaného vzorku by mělo být použito několik metod, i když prakticky je obtížné porovnávat jednu metodu s jinou. Volba vhodné metody nebo kombinace metod je důležitá pro validní posouzení antioxidační aktivity.

3.3 Kombucha

3.3.1 Kombuchový nápoj

Fermentace je jednou z nejstarších metod zpracování potravin. Je to chemický proces přeměny přírodních látek za účasti mikroorganismů (bakterií a kvasinek) a jejich enzymů na látky jednodušší, tedy snadněji využitelné pro lidské trávení. Mnoho biochemických změn, které mohou ovlivnit vlastnosti konečného produktu jako je například obsah bioaktivních látek, nastávají během fermentace. Tento proces se úspěšně používá pro výrobu a extrakci bioaktivních sloučenin v potravinářském a nápojovém průmyslu (Villarreal-Soto et al. 2018).

Kombucha je nápoj získaný fermentací slazeného čaje symbiotickou kulturou octových bakterií a kvasinek, konzumovaný pro své blahodárné účinky na lidské zdraví. Tento nápoj se v mnoha zemích konzumuje již velmi dlouhou dobu a zájem o něj stále roste, protože vědecké zprávy naznačují jeho prospěšnost pro zdraví a schopnost pomoci předcházet různým chronickým onemocněním (Dufresne & Farnworth 2000). Některé jeho příznivé účinky již byly prokázány: antimikrobiální, antioxidační, antikarcinogenní (Jayabalan et al. 2011), antidiabetický (Aloulou et al. 2012; Bhattacharya et al. 2013), léčba žaludečních vředů (Banerjee et al. 2010) a vysokého cholesterolu (Yang et al. 2009).

Kombucha pochází z Číny, kde byla ceněna ještě 220 př. n. l. během dynastie Tsin pro své detoxikační a energizující vlastnosti. Samotnou kombuchovou kulturu lze označit několika názvy: *scooby* (symbiotické spojení bakterií a kvasinek), mateční kultura anebo tak zvaná „čajová houba“. Název kombucha pochází ze jména korejského lékaře Komba, který v roce 414 přivezl fermentovaný čaj do Japonska z Koreje, pro léčení zažívacích potíží císaře Inkyo. S rozšiřováním obchodních cest kombucha byla zavezena do Ruska a poté do východní Evropy, kolem 20. století se dostala i do Německa. V 50. letech se nápoj dostal do Francie a severní Afriky, kde se jeho konzumace stala velmi populární (Dufresne & Farnworth 2000; Coelho et al. 2020).

O několik desítek let později švýcarští vědci konstatovali, že konzumace kombuchy je stejně prospěšná jako jogurt díky přítomnosti kyselin, které podporovaly růst prospěšných bakterií ve střevě (Frank 1995). Od té doby se popularita nápoje zvýšila a kombucha byla uvedena na trh s řadou nových příchutí. Tento osvěžující nápoj chutnající jako šumivý jablečný mošt se často vyrábí v domácnosti fermentací čaje pomocí „čajové houby“ přenášené z domova do domova. *Scooby* je možné zakoupit na různých webových stránkách nebo fyzických maloobchodních prodejnách (Coelho et al. 2020).

3.3.2 Zdravotní přínosy pro lidský organismus

Je známo, že nápoj Kombucha má mnoho profylaktických a terapeutických výhod. Uvádí se, že pomáhá při trávení, ulevuje při artritidě, působí jako projímadlo, předchází mikrobiálním infekcím, bojuje proti stresu a rakovině, poskytuje úlevu při hemoroidech, má pozitivní vliv na hladinu cholesterolu a usnadňuje vylučování toxinů i čištění krve (Dufresne & Farnworth 2000; Malbaša et al. 2011; Jayabalan et al. 2014).

Tento nápoj je spojován s ovlivněním gastrointestinální mikrobiální flóry člověka tím, že působí jako probiotický nápoj a pomáhá vyrovnávat střevní flóru, čímž do určité míry usnadňuje normalizaci střevních činností (José Santos Júnior et al. 2009; Jayabalan et al. 2014).

Dufresne & Farnworth (2000) a Jayabalan et al. (2014) uvádějí, že kombucha má schopnost zlepšit zdraví vlasů, kůže a nehtů, snížit stres a nervové poruchy, snížit nespavost, zmírnit bolesti hlavy, snížit touhu po alkoholu a zabránit vzniku infekcí močového měchýře. Příznivým účinkem tohoto nápoje je také snížení kalcifikace ledvin.

Snížení menstruačních poruch a menopauzálních návalů horka, zlepšení zraku, buněčná regenerace, stimulace žláзовých systémů v těle, zmírnění bronchitidy a astmatu a zlepšení celkového metabolismu je několik dalších zdravotních výhod, o kterých se tvrdí, že jsou spojeny s konzumací kombuchy (Jayabalan et al. 2014). Příznivé účinky tohoto nápoje jsou připisovány přítomnosti metabolických produktů uvolňovaných do nálevu během fermentace. Předpokládá se, že většina zdravotních přínosů je způsobena jeho potenciálem zachycovat radikály.

V nedávné době vědci poskytli vědecké důkazy objasňující terapeutické účinky nápoje ze studií *in vitro*. Nicméně, na rozdíl od počtu studií provedených na jiných fermentovaných produktech, jako je fermentované mléko, množství studií provedených na tomto nápoji je stále velmi malé a existuje vážný nedostatek vědeckých důkazů prospěšného vlivu na lidský organismus (Watawana et al. 2015; Soares et al. 2021).

3.3.3 Mikrobiální složení *scoby*

Scoby (Symbiotic Culture of Bacteria and Yeast) je trojrozměrná celulózová vrstva, sestávající se z kmenů bakterií a kvasinek žijících v symbióze. Dříve byla kombucha označována jako společenství kvasinek a octových bakterií. Pozdější výzkumy prokázaly přítomnost bakterií mléčného kvašení a jejich vysoké koncentrace v posledních fázích fermentace (Zhang et al. 2011). Několik studií ukázalo, že mikrobiální složení *scoby* se může mezi fermentacemi celosvětově lišit podle regionu a dostupnosti růstu bakterií a kvasinek (Bhattacharya et al. 2016; Coton et al. 2017). V tabulce č.6 jsou uvedené některé nejčastěji vyskytující se mikroorganismy v kombuše.

Tabulka č.6: Výběr hlavních mikroorganismů *scoby*
(Upraveno podle Soares et al. (2021); Laavanya et al. (2021))

Kvasinky	Bakterie
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	<i>Acetobacter aceti</i>
<i>Saccharomycodes ludwigii</i>	<i>Acetobacter pasteurianus</i>
<i>Kloeckera apiculata</i>	<i>Bacterium gluconicum</i>
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Komagataeibacter xylinus</i>
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	<i>Komagataeibacter rhaeticuse</i>
<i>Brettanomyces lambicus</i>	<i>Lactobacillus fermentum</i>
<i>Brettanomyces claussenii</i>	<i>Enterobacter cancerogenus</i>
<i>Pichia fermentans</i>	<i>Oenococcus oeni</i>
<i>Torulopsis</i>	<i>Gluconacetobacter europaeus</i>
<i>Candida kefir</i>	<i>Gluconobacter saccharivorans</i>
<i>Candida krusei</i>	
<i>Lachancea thermotolerans</i>	
<i>Lachancea fermentati</i>	

Interakce mezi mikroorganismy *scoby* je velice složitý a důležitý proces. Kvasinkové buňky uvolňují vitamíny a další živiny, které stimulují růst důležitých bakterií. Většina mikrobiálních druhů vylučuje metabolické produkty, které mohou buď stimulovat nebo inhibovat specifickou rychlost růstu jiných druhů, čímž se vytvářejí komenzalisticke nebo amensalisticke interakce. Některé skupiny bakterií, jako jsou bakterie mléčného a octového kvašení, stejně jako druhy kvasinek, jako je *Saccharomyces cerevisiae*, mají dobře zavedené úlohy ve fermentaci. Dodnes však existuje mnoho dalších druhů, jejichž role nebyly obšírně charakterizovány, ani interakce mezi nimi. V případě kombuchy působí různé druhy kvasinek a bakterií paralelně a vytvářejí dva různé konečné produkty: fermentovaný čaj a biofilm (Villarreal-Soto et al. 2018).

Bakterie *Komagataeibacter xylinus* vytváří celulózový biofilm, který je považován za sekundární metabolit fermentace a je jednou z důležitých charakteristik tohoto procesu. Název „houba“ je zavádějící termín používaný pro biofilm. Vzhledem k tomu, že tenká membrána na povrchu čajového nálevu připomíná plavoucí houbu a jsou tam přítomné různé druhy kvasinek, biofilm získal název „čajová houbička“. Tento biofilm pomáhá při ochraně buněk před extrémně nepříznivými podmínkami, jako je ultrafialové záření nebo vysoký hydrostatický tlak a jakékoli jiné environmentální výzvy. Pomáhá také při neustálém vystavování bakterií aerobnímu prostředí, které je nezbytné pro fermentaci. Celulóza produkovaná bakteriemi je sestavená z mikrofibril, které jsou 100krát menší ve srovnání s rostlinnou celulózou. Mikrofibrily vytvářejí 3D strukturu asi 1 000 jednotlivých glukánových řetězců, které mohou pojmout až 200krát více vody ze své suché hmoty a mají vysokou přizpůsobivost a velkou elasticitu (Soares et al. 2021; Laavanya et al. 2021; Antolak et al. 2021).

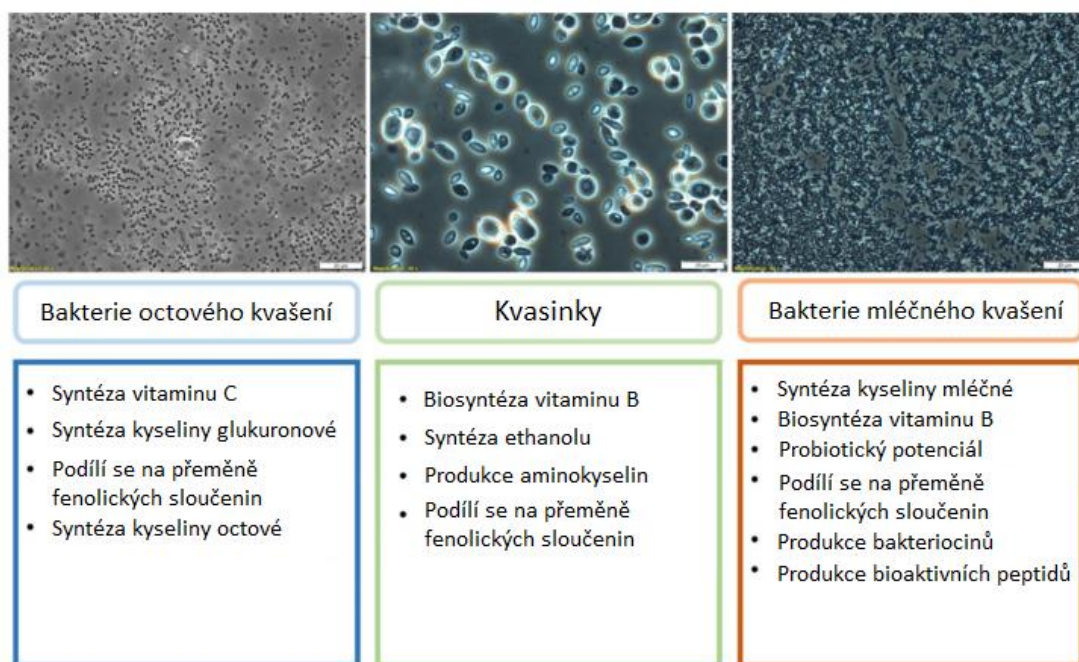
Celulóza, která je primárně tvořena bakteriemi v kapalině, spotřebovává veškerý rozpuštěný kyslík. Následně se zvýší na rozhraní vzduch-kapalina a přítomné mikroby začnou využívat atmosférický kyslík k výrobě nové celulózové vrstvy, která překrývá vytvořenou primární vrstvu. Jak se čas prodlužuje, tloušťka biofilmu se také zvyšuje a zůstává jako suspendovaná struktura v nálevu, dokud je dostatek kyslíku. Při nedostatku kyslíku se proces zastaví a bakterie zůstávají v klidovém stavu jak v biofilmu, tak v tekutině, který lze aktivovat pomocí slazeného čajového extraktu nebo lze použít jako inokulum pro po sobě jdoucí šarže fermentace. Výhodou této formy výroby celulózy je, že bakterie rychle roste za kontrolovaných podmínek a může produkovat celulózu z různých zdrojů uhlíku, včetně glukózy, ethanolu, sacharózy a glycerolu (Esa et al. 2014; Laavanya et al. 2021).

Několik vědeckých studií prokázalo, že počet kvasinek v kombuše převyšuje počet bakterií. Jak fermentace postupuje, kyselost nápoje se zvyšuje. V důsledku hladovění kyslíkem způsobeného vysokou kyselostí se také snižuje počet životaschopných mikrobiálních buněk přítomných v čaji kombucha. Uvádí se, že počet kvasinek a bakteriálních buněk v nálevu je vyšší než počet buněk v celulózovém biofilmu (Chen & Liu 2000; Goh et al. 2012).

Navzdory obvyklým mikrobiologickým rozdílům *scoby*, několik fyzických charakteristik naznačuje kvalitní kulturu. Biofilm musí mít tloušťku mezi 6 a 12 mm. Pokud je příliš tenký, může být kontaminován, ale zároveň může bránit vstupu kyslíku potřebného k jeho výrobě, je-li příliš hustý. Zdravé *scoby* vždy produkuje nové kultury a barva se mění od bílé až po světle hnědou (Crum & LaGory 2016).

3.3.4 Chemické složení a bioaktivní látky

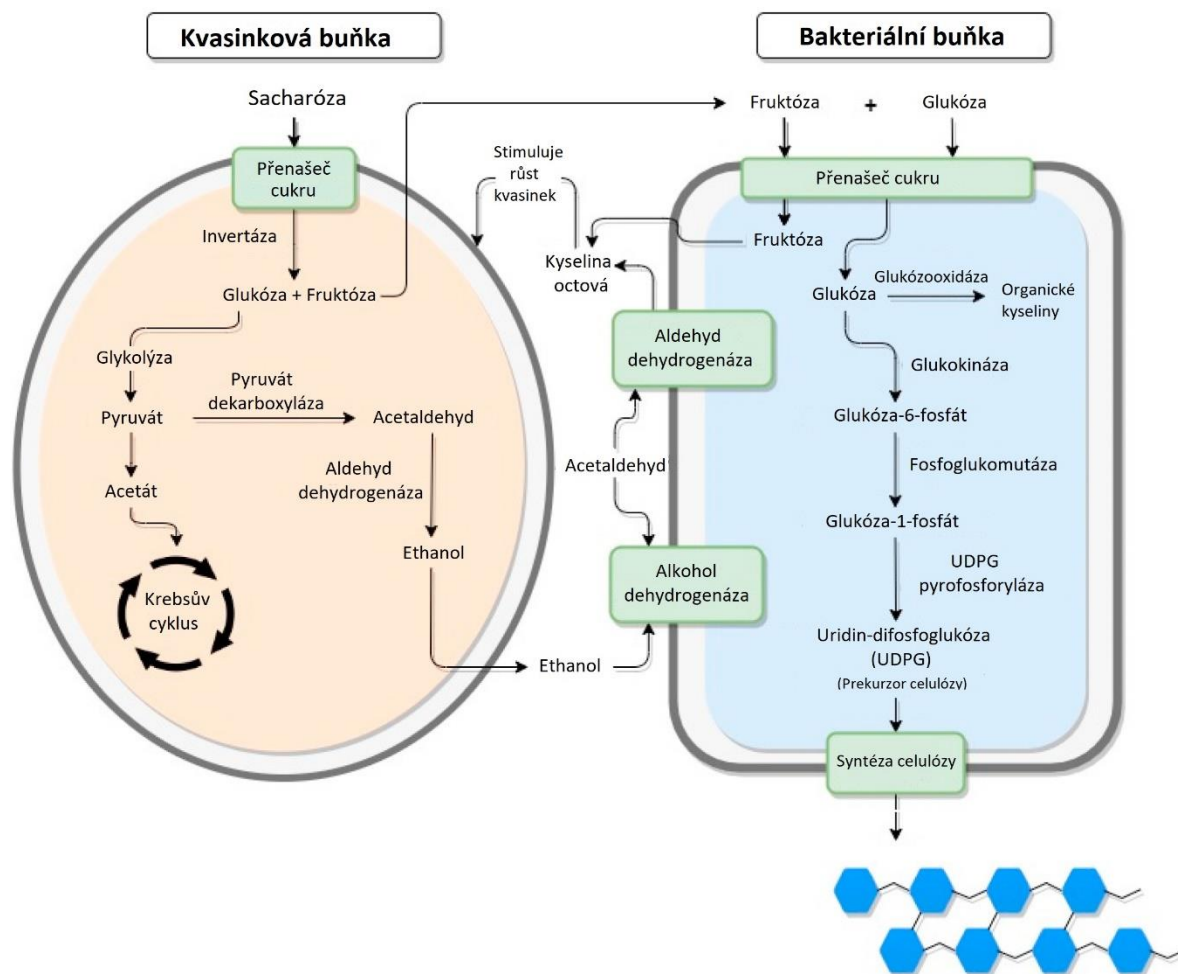
Bioaktivní látky obsažené v kombuše mohou pocházet jak z čaje (fenolické sloučeniny, polysacharidy, vitamíny, minerály, aminokyseliny), tak z metabolické aktivity mikroorganismů podílejících se na fermentaci tohoto nápoje. Mezi bioaktivní sloučeniny získané za účasti mikroorganismů patří polyfenoly (vyplývající z metabolické aktivity *scoby*), organické kyseliny, vitamíny, enzymy, proteiny, jako jsou bakteriociny (viz obrázek č.2) (Antolak et al. 2021).



Obrázek č.2: Bioaktivní látky v kombuše (upraveno podle Antolak et al. (2021))

Přítomnost a množství chemických složek jsou variabilní, především v závislosti na mikroorganismech symbiotické kultury používané pro fermentaci kombuchy, době fermentace, obsahu sacharózy a druhu použitého čaje. Jakákoli změna podmínek fermentace může ovlivnit konečný produkt (Martínez Leal et al. 2018; Villarreal-Soto et al. 2018).

Na obrázku č.3 je představen metabolismus substrátů symbiotickou kulturou bakterií a kvasinek. Na začátku fermentace komunita kvasinek metabolizuje sacharózu přítomnou v médiu na glukózu a fruktózu a produkuje ethanol. Molekuly glukózy se v důsledku oxidace glukózooxidázou stávají substrátem pro octové bakterie k produkci organických kyselin, jako je kyselina octová, glukonová, glukuronová a další, a molekuly fruktózy se přeměňují na kyselinu octovou. Vzniklá kyselina octová působí jako stimulant pro kvasinky, aby produkovaly více ethanolu a tento ethanol zase může být nápomocný bakteriím k růstu a produkci kyseliny octové. Tento proces vede k akumulaci ethanolu a kyseliny octové v médiu a působí jako antimikrobiální činidlo zabraňující kontaminaci patogenními mikroby. Kofein a sloučeniny jako teofylin a teobromin, které jsou přítomné v čajovém extraktu, také pomáhají stimulovat produkci celulózy bakteriemi aktivací celulogenních komplexů. Bakteriální buňky jsou také stimulovány vitamíny a dalšími živinami, které se uvolňují v důsledku smrti a autolýzy kvasinkových buněk (Dufresne & Farnworth 2000; Laavanya et al. 2021).



Obrázek č.3: Metabolismus substrátů kulturou *scoby* (upraveno podle Laavanya et al. 2021).

3.3.4.1 Organické kyseliny

Mezi hlavní organické kyseliny v kombuse patří kyselina octová, mléčná, glukonová a glukuronová. V menším množství jsou tam také přítomné citrónová, jablečná, vinná, malonová, šťavelová, jantarová a pyrohroznová kyseliny (Miranda et al. 2022). Zdravotní přínosy přítomnosti organických kyselin v kombuse jsou antimikrobiální aktivita, detoxikace organismu, zvýšená biologická dostupnost fenolických sloučenin a také vliv na hormonální rovnováhu (Kaewkod et al. 2019).

Kyselina octová je syntetizována bakteriemi octového kvašení z ethylalkoholu alkoholdehydrogenázou a poté aldehyddehydrogenázou a je zodpovědná za kyselou vůni a chuť nápoje. Vyrábí se v nejvyšší koncentraci a bylo prokázáno, že konzumace kyseliny octové v mírném množství zpomaluje vyprazdňování žaludku, blokuje účinek disacharidáz a zvyšuje vychytávání glukózy játry a svaly, což snižuje její hladinu v krvi. Navíc může také inhibovat lipogenezi a dráhu cholesterologeneze v játrech, takže je zodpovědná za snížení celkového cholesterolu, LDL cholesterolu a triglyceridů v séru (Zubaidah et al. 2019). Obsah sacharózy určuje aktivitu kvasinek a bakterií mléčného kvašení, obou skupin mikroorganismů odpovědných za tvorbu ethylalkoholu při fermentaci nálevů. Ovlivňuje to také koncentraci kyseliny octové. Nakonec při dlouhodobé fermentaci, po plném využití sacharidů a etanolu,

začnou octové bakterie oxidovat kyselinu octovou, což má za následek postupný pokles koncentrace této organické kyseliny (Martínez Leal et al. 2018; Antolak et al. 2021).

Kyselina glukonová je přirozeně se vyskytující sloučenina, která zlepšuje senzorycké vlastnosti vína, octů a medu. Je produktem oxidace D-glukózy bakteriemi octového kvašení, zejména *Gluconobacter oxydans*, a také kmeny *Komagataeibacter xylinus*. Obecně se má za to, že fermentace začíná oxidací glukózy na kyselinu glukonovou *K. xylinus* (Coelho et al. 2020).

Kyselina glukuronová se vyrábí oxidací glukózy octovými bakteriemi patřícími do rodu *Komagataeibacter*. Mezi kyselinami nacházejícími se v kombuše je to kyselina s nejsilnějšími detoxikačními vlastnostmi. Sloučenina váže toxiny přítomné v játrech, což umožňuje jejich účinné vylučování. Kyselina glukuronová je navíc prekurzorem vitamínu C. Podílí se na glukuronizaci, zvyšuje dostupnost fenolických sloučenin, které následně způsobují neutralizaci volných radikálů a zabraňují oxidaci polynenasycených mastných kyselin. Glukuronizace navíc hraje významnou roli také při hormonálním deficitu nebo nadbytku steroidních hormonů: zvýšená rozpustnost steroidů ve vodě zlepšuje jejich biologickou dostupnost při nízkých koncentracích v těle, zatímco v případě vysokých hladin steroidních hormonů vazba umožňuje jejich vylučování (Coelho et al. 2020; Antolak et al. 2021).

Kyselina mléčná je produktem homo nebo hetéro metabolismu bakterií mléčného kvašení. K produkci kyseliny mléčné z hexózy a pentózy homofermentativními kmeny (např. *Lactococcus spp.*) dochází cestou glykolýzy a pentózofosfátové dráhy, zatímco heterofermentativní kmeny (např. *Oenococcus spp.*, *Leuconostoc spp.*, *Levilactobacillus brevis*) používají fosfoglukonátové cesty (Abedi & Hashemi 2020). Kyselina mléčná snižuje pH kombuchy, což přispívá k antimikrobiální schopnosti. Má také pozitivní vliv na lidské zdraví, zlepšuje krevní oběh a zabraňuje tvorbě krevních sraženin (Dufresne & Farnworth 2000).

3.3.4.2 Vitamíny

Vitamíny přítomné v čajových nálevech jsou především nízké hladiny vitamínů skupiny B, vitamínů E, K a A, a také vitamínu C (Dufresne & Farnworth 2000). Podobně jako fenolické sloučeniny vykazují vitamíny silné antioxidační vlastnosti. Vitamín E zabraňuje nebo oddaluje výskyt onemocnění koronárních tepen a zabraňuje šedému zákalu. Vitamín C zvyšuje biologickou dostupnost železa, zabraňuje zubnímu kazu a zlepšuje obranyschopnost organismu. Vitamíny B zase působí proti celkové únavě a také předchází problémům s koncentrací a pamětí (Ivanišová et al. 2020). Během fermentace čaje se obsah vitamínů výrazně zvyšuje v důsledku metabolické aktivity bakterií octového kvašení, bakterií mléčného kvašení (pokud jsou přítomné) a kvasinek.

Vitamín C je uznáván jako hlavní vitamín v kombuše. Tento silný antioxidant pochází z metabolismu glukózy, zejména kmenů rodu *Gluconobacter*. Obecně syntéza vitamínu C z D-glukózy zahrnuje šest chemických kroků a jednu fermentaci (oxidace D-sorbitolu) (Sievers et al. 1995). Malbaša et al. (2011) zkoumali vliv kultury izolované ze symbiotické kultury kombuchy na antioxidační aktivitu zeleného a černého čaje a zjistili, že obsah vitamínů C a B2 se zvýšil během doby fermentace; to umožnilo korelovat antioxidační aktivitu nápoje k množství vitamínu C. Obsah vitamínu C v kombuchovém čaji před a po fermentaci je přibližně 0,71-1,51 mg/ml, v daném pořadí.

Během fermentace kombuchy mohou být vitamíny B-komplexu syntetizovány vybranými kmeny bakterií mléčného kvašení a také kvasinkami. Riboflavin (vitamín B2) je prekurzor flavinmononukleotidu a flavinadeninukleotidu, který působí jako nosič vodíku v biologických redoxních reakcích. Může být syntetizován kmeny *Limosilactobacillus fermentum*, *Lactiplantibacillus plantarum*, a také *Lactococcus lactis*. Thiamin (vitamín B1) se podílí především na výrobě energie a má také příznivý vliv na nervový systém. *L. brevis* a *L. plantarum* jsou schopny produkovat intracelulární a extracelulární vitamín B1 (Teran et al. 2021). Folát (vitamín B9) se podílí na buněčném metabolismu jako je například replikace DNA, syntéza nukleotidů a aminokyselin. Mezi bakterie mléčného kvašení, které produkují různé formy folátů, patří mimo jiné vybrané kmeny *Lactococcus lactis*, *Lactiplantibacillus plantarum* a *Limosilactobacillus reuteri fermentum* (LeBlanc et al. 2011). Obecně jsou kvasinky zdrojem vitamínů B-komplexu jako B1, B2, B5, B6, B7, B9, B12 a také ergosterolu, který lze přeměnit na vitamín D2. Jako v případě bakterií mléčného kvašení mohou tyto bioaktivní sloučeniny produkovat vybrané kmeny kvasinek patřící k *Z. bailii*, *S. cerevisiae* (Villarreal-Soto et al. 2018).

3.3.4.3 Minerální látky

Minerály jsou anorganické látky potřebné v malých množstvích pro normální tělesné funkce a růst, jakožto i pro údržbu jeho tkání. Podle Bauer-Petrovska & Petrushevskaja-Tozi (2000) jsou měď, železo, mangan, nikl a zinek minerály, jejichž množství se zvyšuje v důsledku metabolické aktivity kombuchy. Kumar et al. (2008) zjistili přítomnost fluoridu, chloridu, bromidu, jodidu, dusičnanu, fosforečnanu a síranu po sedmi dnech fermentace kombuchy připravené z černého čaje; fluorid byl stanoven jako anion s nejvyšší koncentrací.

3.3.4.4 Bakteriociny

Vzhledem k přítomnosti bakterií mléčného kvašení jsou v kombuše přítomné bakteriociny. Jsou to malé proteinové struktury, vykazující antagonistický a preventivní účinek proti patogenním a kazícím mikroorganismům. Vysoce ceněnou vlastností bakteriocinů je jejich bezpečnost, nepřítomnost cytotoxicity a aktivita proti specifické skupině mikroorganismů. Kmeny *Pediococcus spp.*, *Lactococcus spp.* a *Leuconostoc spp.* jsou považovány za hlavní producenty bakteriocinů mezi bakteriemi mléčného kvašení. Bakteriocin, který je nejrozšířenější v potravinářském průmyslu, je nisin – sloučenina aktivní proti grampozitivním bakteriím, jako jsou *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium spp.* a *Micrococcus luteus* (Deegan et al. 2006; Voidarou et al. 2020).

3.3.4.5 Ethanol

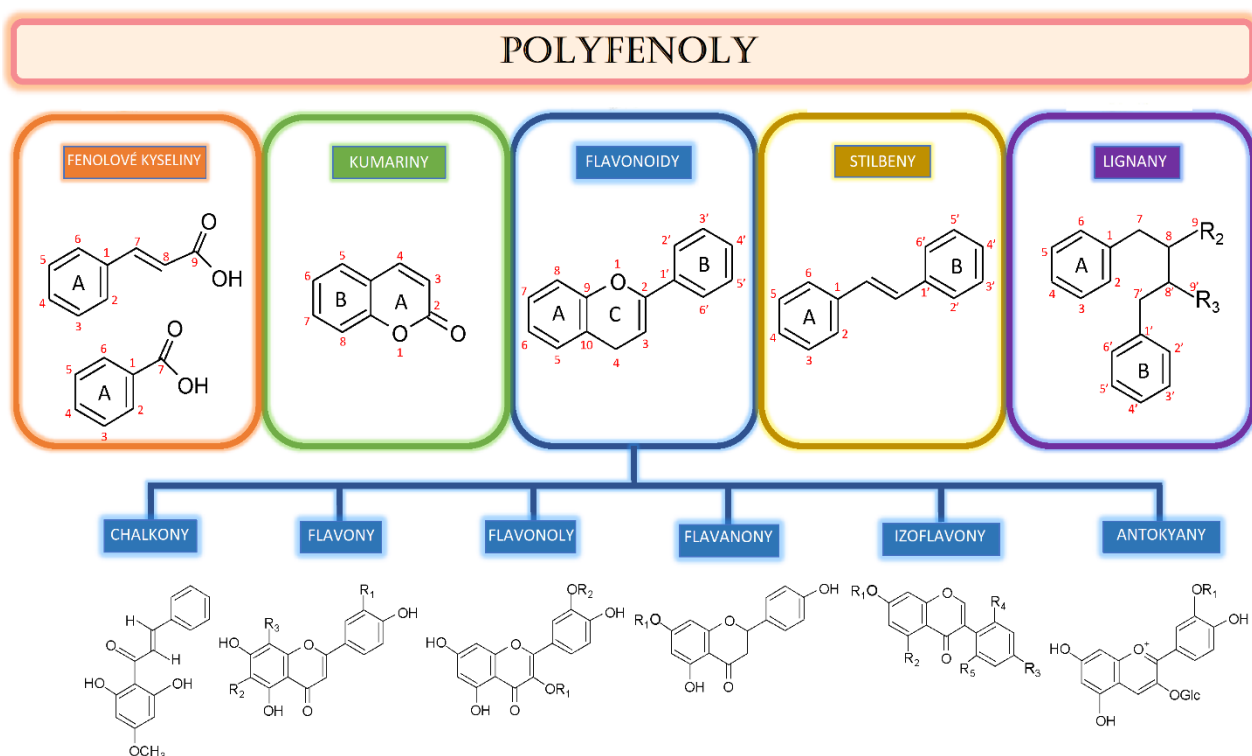
Ethanol vzniká v kombuše během fermentačního procesu. Výsledný produkt může obsahovat 0,1–2 % alkoholu v závislosti na koncentraci použitého cukru, době a teplotě fermentace a podmínkách skladování (Bhattacharya et al. 2016; Neffe-Skocińska et al. 2017; Talebi et al. 2017).

Vzhledem k obsahu ethanolu kombucha je kontraindikována u těhotných žen a u lidí s významným onemocněním ledvin, plic nebo jater (Martínez Leal et al. 2018). Avšak Ferrieres

(2004) uvádí, že mírná konzumace alkoholu má ochranný účinek proti ischemické chorobě srdeční, protože zvyšuje koncentraci cholesterolu s vysokou hustotou lipoproteinů. Proto by mohla hrát roli v prevenci i konzumace kombuchy, která má nízkou koncentraci etanolu.

3.3.4.6 Polyfenoly

Polyfenoly jsou účinné látky s více než jednou strukturální jednotkou fenolu na molekulu. Představují největší skupinu fytochemikálií a jsou nejhodněji zastoupenými antioxidanty přítomnými ve stravě. Jsou klasifikovány jako fenolové kyseliny a fenolové alkoholy. V závislosti na síle fenolického kruhu mohou být polyfenoly klasifikovány do mnoha tříd (viz obrázek č.4), ale hlavními třídami jsou fenolové kyseliny, flavonoidy, stilbeny, fenolické alkoholy a lignany (Scalbert et al. 2005; Abbas et al. 2017).



Obrázek č.4: Polyfenoly (upraveno podle Hazafa et al. (2022)).

Hydroxyskořicové a hydroxybenzoové kyseliny jsou dvě třídy fenolových kyselin. Jsou to aromatické kyseliny s fenolovým kruhem, který má alespoň jednu karboxylovou skupinu. Hlavními zástupci hydroxybenzoových kyselin jsou kyselina gallová, benzoová, protokatechová a swingová. Hydroxyskořicové kyseliny jsou kyselina kávová, ferulová, kumarová a kaftarová (O'Leary et al. 2004).

Flavonoidy jsou tvořeny dvěma benzenovými kruhy, které mohou být spojeny se třemi uhlíkovými řetězci z blízkého pyranového kruhu. Šest tříd flavonoidů se liší od ostatních, především na základě oxidačního stavu centrálního uhlíku, mezi tyto třídy patří flavanony, flavanoly, flavonoly, izoflavony, flavony a antokyanidiny. Z rostlinných zdrojů bylo identifikováno více než 4000 flavonoidů. Většinu flavonoidů v různých zdrojích potravy představují flavonoly (Abbas et al. 2017).

Lignany jsou difenolické rostlinné sloučeniny, které vznikají dimerizací dvou zbytků kyseliny skořicové. Obsahují různé aktivní sloučeniny, jako je sesamin, secoisolariciresinol diglukosid, matairesinol a enterodiol. Studie *in vitro* a *in vivo* naznačují, že lignany mají protinádorové vlastnosti prostřednictvím mnoha mechanismů, včetně antioxidačních, proapoptozových, antiestrogenních a antiangiogenních vlastností (Webb & McCullough 2005; Milder et al. 2005).

Stilbeny jsou přírodní polyfenolové sloučeniny, které se nachází v mnoha rostlinných čeledích. Dělí se na resveratrol, piceatannol a pterostilben a mají antimikrobiální a ochranné vlastnosti v rostlinách. Studie poukazují, že stilbeny mají protinádorové, antioxidační, neuroprotektivní a kardioprotektivní vlastnosti (King et al. 2006; Anekonda 2006).

Polyfenoly tvoří podstatnou část lidské stravy a jsou velmi zajímavé díky svým biologickým vlastnostem. Během několika posledních desetiletí různé studie zkoumaly jejich zdravotní přínosy. Polyfenolové sloučeniny modulují aktivitu různých enzymů a buněčných receptorů jako prostředek obrany proti oxidativnímu stresu způsobenému reaktivními formami kyslíku a hrají roli v prevenci několika onemocnění souvisejících s oxidačním stresem (Tsao 2010). Uvádí se, že fenolové sloučeniny také zvyšují množství probiotik, udržují střevní homeostázu a zabráňují infekcím způsobeným alimentárními patogeny (Faria et al. 2014). Polyfenoly jsou zvláště zajímavé pro vědce, díky jejich cytoprotektivnímu účinku na zdravé buňky a současně cytotoxickému účinku na rakovinné buňky (Brglez Mojzer et al. 2016).

Ochranný účinek nápoje Kombucha je způsoben především aktivitou polyfenolů, sloučeninami produkovanými během fermentace a synergickým účinkem různých sloučenin nacházejících se v čaji. Počáteční obsah bioaktivních sloučenin se může změnit v důsledku metabolické aktivity mikroorganismů během fermentace (Antolak et al. 2021).

Může to být působením mikrobiálních enzymů, které vedou k rozkladu komplexních čajových polyfenolů na jednodušší molekuly, což vede ke zvýšení antioxidační aktivity nápoje ve srovnání s nefermentovaným čajem. Hydrolýzu polyfenolů během fermentace pravděpodobně způsobuje tannáza – enzym extracelulárně produkovaný kvasinkami a bakteriemi. V důsledku aktivity tannázy se epigalokatechin, kyselina gallová a glukóza uvolňují z epigalokatechin galát gallotaninů, esterů kyseliny galové a epikatechin galátu. Produkty této enzymatické reakce mají vyšší antioxidační kapacitu než nehydrolyzované sloučeniny (de las Rivas et al. 2019). Další extracelulární enzymy jako jsou fytázy a b-galaktosidáza, mohou také modifikovat čajové polyfenoly. Během fermentace „čajové houby“, část thearubiginů z čaje mohou být převedeny na theaflaviny, které mění barvu nápoje z červenohnědé na světle hnědou (Emiljanowicz & Malinowska-Pańczyk 2020). Kromě čajových polyfenolů v kombuše byl detekován derivát kvercetinu isorhamnetin, který v nefermentovaném čaji není přítomný. To naznačuje, že fermentace čaje *scoby* vede ke vzniku této sloučeniny. Isorhamnetin vykazuje bakteriostatickou a baktericidní aktivitu (Bhattacharya et al. 2016).

Ukázalo se, že různé zdroje uhlíku ovlivňují celkový obsah fenolů v produktu. Aspartam inhiboval mikrobiální růst a v důsledku toho fermentační proces nepokračoval. Aplikace bílého nebo hnědého cukru jako zdroje uhlíku při fermentaci způsobovala intenzivní růst *scoby* a to vedlo k vysokému obsahu polyfenolů v konečném produktu. Použití medu jako zdroje uhlíku mělo za následek bohatší chemické složení konečného produktu s vysokým obsahem

organických kyselin, éterických olejů, alkoholu, esterů a také polyfenolů (Watawana et al. 2017).

Bylo prokázáno, že některé kmeny, zejména bakterie mléčného kvašení, jsou schopny degradovat fenolické sloučeniny. Jayabalan et al. (2007) zaznamenali degradaci epikatechinu na kyselinu vanilovou během fermentace černého čaje. Podle Edlin et al. (1998) kyselina ferulová, kyselina p-kumarová a kyselina kávová mohou být transformovány *Brettanomyces anomalus* dekarboxylázou kyseliny hydroxyskořicové na hydroxystyreny.

3.3.5 Výroba kombucha nápoje

Kombucha se tradičně vyrábí ze zeleného nebo černého čaje. Přítomnost čaje v kultivačním médiu poskytuje mikroorganismům dusík nezbytný pro jejich metabolismus. Hlavní složky přítomné v čaji, které působí jako zdroj dusíku, pocházejí z purinu (kofein a teofylin). Několik studií však ukazuje, že *scoby* také roste správně na substrátech, které ve svém složení neobsahují kofein, což naznačuje, že mikroorganismy kombuchy mohou využívat různé zdroje dusíku (Velicanski et al. 2013). Existují různé studie s jinými surovinami použitými jako substrát pro výrobu tohoto nápoje, jako například bylinné nálevy (Battikh et al. 2012), ovocná šťáva (Ayed et al. 2017), mléko (Kanurić et al. 2018), sója (Tu & Tawata 2015). Fermentované nápoje vyrobené s těmito substráty přinesly uspokojivé výsledky s ohledem na jejich kinetiku a biologické vlastnosti.

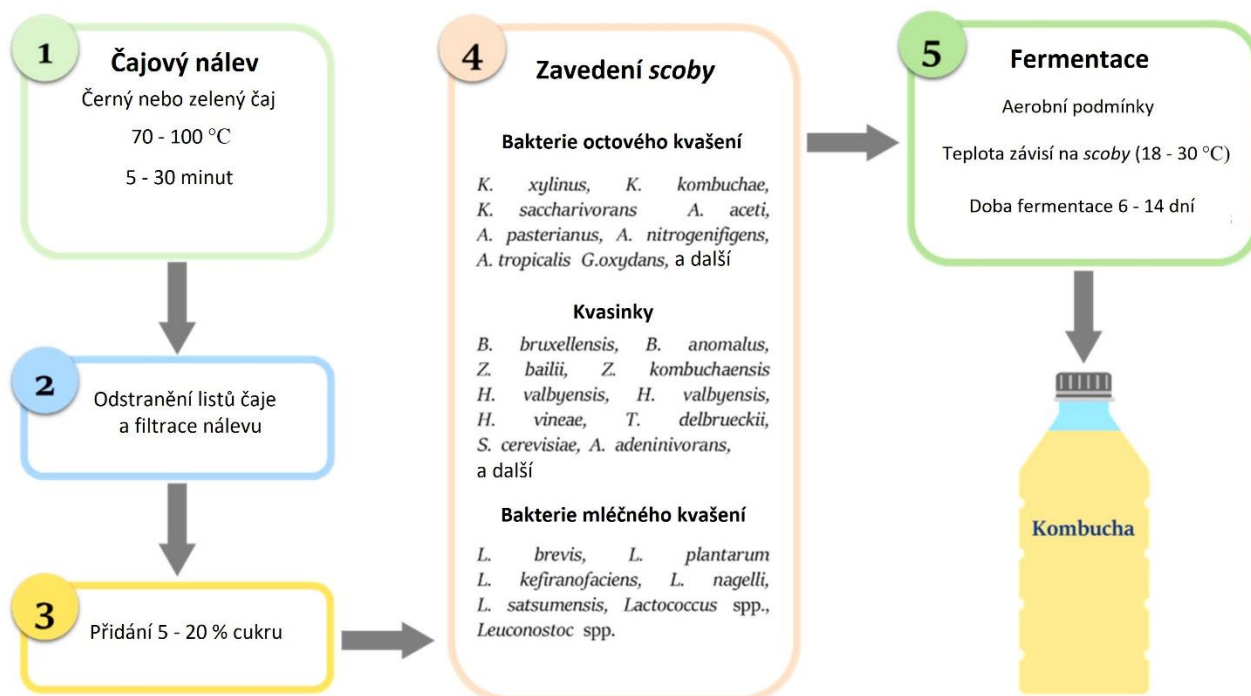
Navíc lze vybrat různé zdroje cukru a tato skutečnost může ovlivnit vlastnosti výsledného fermentovaného nápoje. Například Muhialdin et al. (2019) pozorovali, že kombucha fermentovaná cukrem z kokosové palmy vykazovala vyšší antioxidační aktivitu *in vitro* než s bílým rafinovaným cukrem nebo melasou. Tito autoři také zdůraznili důležitost doby fermentace a naznačili, že prodloužené procedury delší než 14 dnů se nedoporučují, protože vedly ke snížení antioxidační aktivity. Laktóza byla také použita jako zdroj uhlíku ve studii Chu & Chen (2006) a několik parametrů, jako je pH, počet kvasinek a bakteriálních buněk v médiu a *scoby*, byly porovnány s fermentací neslazeného média. Mezi těmito dvěma případy však nebyl nalezen žádný významný rozdíl. Avšak rychlost fermentace se ve srovnání s tradiční metodou přípravy snížila a obsah kyselin se také podstatně změnil. Počet bakterií metabolizujících kyselinu mléčnou byl v kapalině také nižší a ve *scoby* nebyl žádný.

Goh et al. (2012) doporučují optimální koncentraci cukru, která je nutná pro maximální výtěžek celulózy rovnou 90 g/l v médiu čajového extraktu. V důsledku vyšší koncentrace cukru vzniká větší množství metabolického produktu, jako je kyselina glukonová, a to způsobuje inhibici syntézy celulózy.

Množství substrátu, cukru a symbiotické kultury *scoby* použité při fermentaci se liší podle oblasti a podmínek přípravy. Obecně, čaj nebo nálevy lze připravit v širokém rozsahu koncentrací v rozmezí 1,0 až 100 g/l. Sacharózu lze použít v koncentraci 1–20 % jako hlavní zdroj uhlíku pro růst mikroorganismů. *Scoby* a kapalina z předchozí fermentace, v koncentracích kolem 0,25–10 % a 3–30 % respektive, by měla být použita jako startovací kultura pro fermentaci. Přídavek předchozí fermentované kapaliny má funkce napomáhající aktivaci octových bakterií ke snížení pH (Martínez Leal et al. 2018).

Při standardním způsobu přípravy kombuchy (viz obrázek č.5) výroba se začíná přípravou čajového nálevu. Do 1 l vroucí vody se obvykle přidá 5 g lístků černého nebo zeleného čaje

a nechá se vyluhovat s počáteční teplotou 70 až 95 °C. Po odstranění listů filtrací se v horkém čaji rozpustí 50 až 150 g sacharózy. Před nasazením kultury *scoby* se nálev ochladí přibližně na 20 °C. Do roztoku se přidá matečná kultura a část kapaliny z předchozí fermentaci. Překryje se čistou látkou a ponechá se na tmavém místě, aby došlo k úplné fermentaci (Jayabalan et al. 2014; Antolak et al. 2021).



Obrázek č.5: Schématický postup výroby nápoje kombucha (upraveno podle Antolak et al. (2021)).

Během fermentačního období se na povrchu vytvoří nový mikrobiální biofilm, který se na konci fermentace odstraní a může být skladován odděleně ponořený do fermentovaného nápoje. Chuť kombuchy se během fermentace mění a konečný produkt při konzumaci má příjemnou sladkokyselou chuť. Pro dosažení potřebných sensorických vlastností by fermentace měla být přerušena po 14 dnech, jinak může nápoj získat příliš kyselou octovou chuť.

Když doba fermentace skončí, výsledný nápoj lze přefiltrovat, aby se odstranily zbytky *scoby*, a podstoupit výrobek druhé fermentaci. Tento proces naopak trvá 2–3 dny v uzavřené nádobě, jejímž cílem je produkce oxidu uhličitého v kombuše, s možností přidání přísad jako je ovoce nebo bylinky pro zvýraznění chuti. Mezi metody bezpečnosti patří pasterizace konečného produktu, aby se zabránilo nadprodukcí alkoholu a oxidu uhličitého, stejně jako přidání 0,1 % benzoátu sodného a 0,1 % sorbanu draselného jako konzervačních látek a skladování v chlazeném prostředí při 4 °C (Watawana et al. 2015; Miranda et al. 2022).

V opačném případě může dojít k dalším změnám ve složení metabolickou aktivitou mikroorganismů. V důsledku toho může být významně snížena antioxidační aktivita a pro zdraví prospěšné vlastnosti kombuchy. Nejnovější výsledky výzkumu získané Torre et al. (2021) ukazují, že po čtyřech měsících skladování kombuchy z černého čaje v chladničce se obsah fenolů výrazně snížil z počáteční hodnoty $234,1 \pm 1,4 \mu\text{GAE/ml}$ na $202,9 \pm 2,1 \mu\text{GAE/ml}$, zatímco pH se zvýšilo z 2,82 na 3,16.

3.3.6 Faktory ovlivňující fermentaci a vlastnosti kombuchy.

Fermentaci ovlivňuje mnoho faktorů, jako je teplota, pH, množství kyslíku, rozpuštěný CO₂, povaha a složení média (Marsh et al. 2014). Jakákoliv změna těchto faktorů může ovlivnit rychlost fermentace, organoleptické vlastnosti, nutriční a fyzikálně-chemické vlastnosti konečného produktu. Různé druhy a množství použitého substrátu, koncentrace cukru, doba fermentace a složení čajové houby také mohou odpovídat za rozdíly ve složení a odlišnou aktivitu nápoje (Wolfe & Dutton 2015).

Kurtzman (2001) zjistil, že když koncentrace čajových lístků překročí 6 g/l, bude to inhibovat růst bakterií octového kvašení a tím se sníží produkce celulózy. Gargey et al. (2019) pozorovali vyšší produkci biofilmu kombuchy při použití listů zeleného čaje ve srovnání s černým čajem a čajem oolong. Experimentovalo se s porovnáním čerstvých čajových lístků a použitých čajových lístků a byly pozorovány téměř stejné hodnoty produkce biofilmu. Použité čajové lístky jsou proto také považovány za vhodnou volbu suroviny pro získání vysokého výnosu se sníženými výrobními náklady (Sharma & Bhardwaj 2019).

Fermentace čaje kombucha se běžně pohybuje od 7 do 60 dnů. I když antioxidační aktivita se zvyšuje během doby fermentaci, prodloužená fermentace se nedoporučuje kvůli hromadění organických kyselin, které by mohly dosáhnout škodlivých úrovní. Kromě toho se může začít produkovaný CO₂ hromadit na rozhraní biofilmu a nálevu, což může blokovat přenos živin a vytvářet tak hladovějící prostředí (Chu & Chen 2006). Výběr délky doby fermentace také závisí na očekávaných senzoryckých vlastnostech.

Udržování optimální teploty po celou dobu fermentace má za následek lepší mikrobiální růst a aktivitu enzymů. Obecně se teplotní hodnoty fermentace kombuchy pohybují mezi 22 °C a 30 °C. Nicméně Vitas et al. (2013) provedli fermentaci při teplotách: 37 °C, 40 °C a 43 °C a nejvyšší hodnoty antioxidační aktivity byly získány během teplotního rozmezí 37 °C a 42 °C. Podle Lončar et al. (2006) větší množství produkovaných kyselin a metabolitů, stejně jako vitamínu C, bylo získáno ve vzorcích fermentovaných při vyšších teplotách.

Jedním z nejdůležitějších environmentálních parametrů ovlivňujících fermentaci kombuchy je také pH, protože některé kyseliny jako octová a glukonová jsou zodpovědné za biologickou aktivitu výsledného nápoje. Samotné pH také úzce souvisí s mikrobiálním růstem a strukturálními změnami fytochemických sloučenin, které mohou ovlivnit antioxidační aktivitu (Hur et al. 2014).

Pro složení získaných nálevů je důležitá i kvalita vody použité pro extrakci bioaktivních sloučenin z čaje. Ve studiích provedených Xu et al. (2017) byly koncentrace katechinů významně ovlivněny používanou vodou. Aplikace horské pramenité vody a čištěné vody vedla k vyšším koncentracím katechinu než v případě minerální vody a vody z vodovodu. Je známo, že stabilita fenolických sloučenin je závislá na pH a katechiny jsou nestabilní ve vodních roztocích s pH > 6. Extrakty získané s čištěnou vodou se navíc vyznačovaly vyššími koncentracemi kofeinu a aminokyselin.

3.3.7 Potenciální zdravotní riziko

Vzhledem k tomu, že *scoby* je komplexní směs mikroorganismů, je nezbytné zmínit i bezpečnostní rizika nápoje kombucha při jeho konzumaci. Jak již bylo zmíněno dříve, bakterie a kvasinky jsou schopny vytvořit v biofilmu silnou symbiózu, která může inhibovat růst

kontaminujících bakterií. Přesto mohou patogenní mikroorganismy kontaminovat nápoj po celou dobu přípravy. Díky fermentaci kombucha dosahuje pH v hodnotě 4,2, dokud toho však nebude dosaženo, existuje vysoká pravděpodobnost výskytu kontaminace (Watawana et al. 2015).

Denní konzumace 110 ml kombuchy pro zdravé jedince nepředstavuje žádné zdravotní riziko. Možná rizika však mohou souviset s nadměrným příjmem, respektive konzumací jednotlivců s již existujícími zdravotními problémy (Nummer 2013). Proto je důležité být obezřetný při podávání nápojů jedincům s oslabenou imunitou. Účinnost čaje kombucha na lidský organismus jako terapeutického nápoje je nedostatečně prokázána klinickými studiemi (Ernst 2003). Alergické reakce a zažívací potíže jsou důsledkem konzumace kombuchy u lidí s přecitlivělostí na kyseliny a renální insuficiencí (SungHee Kole et al. 2009). Několik studií potvrdilo, že kombucha může způsobit nevolnost, dušnost, svírání hrdla, bolesti hlavy, závratě a žloutenku (Vijayaraghavan et al. 2000; Ernst 2003). Nebylo však vysvětleno, zda jsou tyto příznaky důsledkem neobvyklých toxinů vyvinutých v konkrétní šarži čaje kombucha.

Příliš dlouhá fermentace může zvýšit koncentraci kyseliny octové, což může vést k vylouhování některých chemických kontaminantů z fermentační nádoby nebo obalových materiálů. Existují důkazy, že těžká otrava olovem může být způsobena pravidelným příjmem čaje kombucha, který byl připraven v keramické nádobě. Většina keramiky obsahuje velmi nízké množství olova, což by při přípravě čaje kombucha nepředstavovalo žádné nebezpečí. Pokud se v nich však kombucha fermentuje dlouhou dobu, může se v čaji rozpustit velké množství olova. Proto je pro přípravu a skladování čaje kombucha je doporučeno používat skleněné nádoby (Bolle et al. 2011).

Z tohoto hlediska je nezbytné věnovat pozornost abnormálnímu vývoji zápachu nebo barvy v kombuše, aby se předešlo nežádoucím vedlejším účinkům. Domácí příprava kombuchy je jedním z nejběžnějších způsobů kontaminace patogenními bakteriemi a kvasinkami. Jelikož se tato čajová houba pěstuje za aseptických podmínek a šíří se z jednoho domu do druhého, možnost přenosu kontaminace je vysoká (Velićanski et al. 2013). Všechny tyto případy, i když ojedinělé, se týkaly omezeného počtu jedinců. Rovněž neexistují žádné prokazatelné důkazy, které by potvrdily toxicitu kombuchy nebo výskyt onemocnění v předchozích studiích (Coelho et al. 2020).

3.4 Vhodné substráty pro výrobu kombuchy

3.4.1 Čaj

Čaj je jedním z nejrozšířenějších nápojů na světě a je druhým nejkonzumovanějším nápojem po vodě. Vyrábí se z listů, pupenů nebo jemných stonků rostlin rodu *Camellia* čeledi *Theaceae*. Nejpoužívanějším rostlinným druhem pro čaj je *Camellia sinensis*. Podle dostupné literatury byl čaj poprvé konzumován jako nápoj či lék čínským obyvatelstvem kolem roku 2737 př. n. l. V současnosti se čaj konzumuje téměř ve všech zemích světa a Čína, Indie a Keňa jsou hlavními producenty čaje, i když se pěstuje na šesti kontinentech (Vuong et al. 2011). Černý čaj se primárně používá v západních zemích a také v různých asijských zemích, zatímco zelený čaj se primárně konzumuje v Japonsku, Číně, Indii a také v několika oblastech Středního východu a severní Afriky (Hayat et al. 2015). Podle Singh et al. (2017) tvoří 78 % z celkového

množství vyrobeného a spotřebovaného čaje na světě černý čaj, 20 % zelený čaj a < 2 % žlutý čaj nebo čaj oolong.

Kvalita a složení čaje se liší podle druhu, ročního období, stáří listů, klimatu a agrotechnických postupů, což bezprostředně ovlivňuje složení polyfenolů v čajích a následně i ve fermentovaném produktu (Gaggia et al. 2018). Při zpracování čajových lístků dochází k biotransformaci katechinů, načež se dá čaj klasifikovat do tří druhů: zelený (nefermentovaný), černý (zcela fermentovaný) a oolong (polofermentovaný). Čaj se skládá hlavně z polyfenolů, kofeinu, minerálů a stopových množství vitamínů, aminokyselin a sacharidů. Typ polyfenolů přítomných v čaji se bude lišit v závislosti na úrovni fermentace, kterou prošel (Prasanth et al. 2019).

Ve starověké asijské lidové medicíně byl čaj považován za účinný lék na léčbu různých onemocnění (Wierzejska 2014). Je obecně známý pro své množství antioxidantů. V současnosti četné výzkumy naznačují roli čaje při zprostředkování správné funkce kardiovaskulárního systému, redukci tělesné hmotnosti, a dokonce i snižování rizika rakoviny a neurodegenerativních onemocnění (Yang & Hong 2013). Čaj je považován za funkční potravinu, protože kromě nutričního obsahu může poskytnout mnoho fyziologických výhod (Hayat et al. 2015). Jeho antioxidační vlastnosti z něj činí převládající regulátor při zprostředkování volných radikálů, což má významné využití ve zdravotnictví.

3.4.1.1 Zelený čaj

Zelený čaj se skládá hlavně z polyfenolů, aminokyselin, theaninu, proanthokyanidinů a kofeinu. V čaji se mohou také hromadit hliník a mangan. Mezi různými polyfenoly jsou hlavními složkami katechiny a flavonoly: myricetin, kaemferol, kvercetin, kyselina chlorogenová, kyselina kumarylchinová a theogallin. Katechin (C), epikatechin (EC), gallokatechin (GC), epigalokatechin (EGC), epikatechin galát (EKG), epigalokatechin galát (EGCG) a galokatechin galát (GCG) jsou hlavní katechiny přítomné v zeleném čaji. Mezi nimi tvoří EGCG, EKG a EGC 80 % všech katechinů (Lee et al. 2014). EGCG je nejrozšířenějším katechinem, který představuje 50–80 % celkových katechinů v zeleném čaji. Je také považován za hlavního přispívatele různých zdravotních benefitů zeleného čaje (Li et al. 2018). Zelený čaj je považován za nejpřevládající zdroj katechinů ze všech zdrojů potravy, před čokoládou, červenými hroznými víny a jablky (Cabrera et al. 2006).

Kvalita zeleného čaje závisí především na době sklizně a stáří listů. Bylo zjištěno, že mladé listy mají vyšší množství kofeinu, EGCG, EKG a dalších katechinů ve srovnání se staršími listy. Předpokládá se, že k tomu dochází v důsledku procesu chřadnutí (Chen et al. 2003).

Optimální konzumace zeleného čaje s antioxidanty přináší mnoho zdravotních výhod, jako je prevence rakoviny (Mukhtar & Ahmad 2000) a kardiovaskulárních onemocnění (Nagao et al. 2007; Moore et al. 2009), regulace cholesterolu (Zheng et al. 2011), zprostředkování hubnutí (Roberts et al. 2015), zmírnění projevů stárnutí, snížení zánětlivých procesů a kontrola neurodegenerativních onemocnění (Mao et al. 2017). Bylo také pozorováno, že polyfenoly zeleného čaje vykazují potenciální účinky při inhibici zubního kazu a snižování krevního tlaku spolu s antibakteriálními, antioxidačními a protinádorovými vlastnostmi (Lambert & Elias 2010; Coentrão et al. 2011; Yu et al. 2014). EGCG hraje roli v chemoprevenci rakoviny

(Chikara et al. 2018). Ačkoliv toto tvrzení není široce přijímáno, mnoho vědců se domnívá, že zelený čaj může mít pozitivní účinky na diabetes (Wu et al. 2003; Iso et al. 2006). Dále zelený čaj snižuje hladinu oxidačního stresu (Martin et al. 2017) a inhibuje vychytávání glukózy (Pastoriza et al. 2017).

3.4.1.2 Černý čaj

Černý čaj má mnoho složek, jako jsou flavonoidy (katechiny, thearubiginy (TR) a theaflaviny (TF)), fenolové kyseliny (kyselina kávová, kyselina gallová, kyselina chlorogenová a kyselina kauramová), methylxantiny (kofein), aminokyseliny (theanin), sacharidy, lipidy, proteiny, β -karoten, fluorid a také stopy vitamínů C, K, A, a také folátu. Sklizený výhonek pocházející z čajovníku, který se skládá z apikálního pupenu a 2–3 jemných lístků, obsahuje 10 až 30 procent fenolických sloučenin (Li et al. 2013; Hayat et al. 2015).

Během macerace lístků zeleného čaje dochází k oxidační polymeraci a také ke kondenzaci katechinů, které vedou k tvorbě TR a TF působením peroxidázy a polyfenoloxidázy. Tyto sloučeniny mají za následek černou barvu čajového nálevu a řadu terapeutických výhod (Santesso & Manheimer 2014). Vznik chuti a vůně černého čaje je výsledkem degradace theaninu. Některé další aminokyseliny jako alanin a arginin přispívají k hořkosti čaje (Naveed et al. 2018).

Mnoho vědeckých zdrojů připisuje farmakologické účinky černého čaje jeho fenolickému obsahu. TR a TF jsou hlavní polyfenoly, které hrají klíčovou roli potenciálních antioxidantů v regulaci apoptózy, buněčné proliferace a stárnutí v buněčných liniích lidské rakoviny (Henning et al. 2011; Butt et al. 2014). V některých klinických studiích byly rovněž prokázány příznivé účinky na krevní tlak (Mousavi et al. 2013). V jiném výzkumu bylo oznámeno, že flavonoidy obsažené v černém čaji mohou hrát roli při zlepšování koronární cirkulace (Hirata et al. 2004) a pomáhají zmírňovat endoteliální dysfunkci (Duffy et al. 2001), i když ta může být ovlivněna individuálním rozdílem v metabolismu flavonoidů (Hodgson et al. 2006). V rámci dvojité zaslepené randomizované studie černý čaj významně snížil celkový cholesterol a LDL po 3 měsících příjmu (Fujita & Yamagami 2008). Prospektivní kohortová singapursko čínská zdravotní studie s 36 908 účastníky (ve věku 45–74 let) ukázala, že pravidelná konzumace 1 šálku černého (ale ne zeleného) čaje denně, potenciálně snížila rizikové faktory diabetu 2. typu (Odegaard et al. 2008). Černý čaj byl také uveden pro svůj významný potenciál zmírňovat orální (Hashemipour et al. 2017) a žaludeční vředy (Adhikary et al. 2011).

3.4.2 Bylinné nálevy

Obecně platí, že černý, oolong a zelený čaj jsou hlavními čaji používanými při fermentaci kombuchy. Avšak k získání nápoje s atraktivnějšími sensorickými hodnotami nebo zlepšenými vlastnostmi podporujícími zdraví a také k vývoji nových produktů se používají alternativní materiály jako jsou jiné druhy čaje a bylinkové nálevy.

3.4.2.1 Rooibos

Rooibos je oblíbený domorodý jihoafrický bylinný čaj, užívány pro svou výjimečnou chuť a vůni. Moderní použití rooibosu, většinou používaného jako alternativa k orientálnímu

čaji, vzniklo na začátku minulého století. Konzumoval se jako silný, horký nálev s mlékem a cukrem. V dřívějších letech se k výrobě čaje používaly různé druhy a ekotypy *Aspalathus*, přirozeně se vyskytující v horské oblasti Cederberg. Dnes má komerční význam pouze tzv. červený typ nebo typ Rocklands, původně z oblasti Pakhuis Pass. Čaj se také někdy vyrábí z malého množství blízkého příbuzného druhu *A. pendula* a několika divokých typů *A. linearis* (van Heerden et al. 2003).

Rooibos je ceněn jako bylinný čaj bez kofeinu. Přestože je dobře známý jako čaj s nízkým obsahem taninu, asi 50 % pevných látek rozpustných v horké vodě tvoří látky podobné taninu (Joubert et al. 2008). Flavonoidní složení rooibosu je jedinečné v tom, že obsahuje aspalathin, aspalalinin (dosud izolovaný pouze z *A. linearis*) a nothofagin (obecně přítomný v jádrovém dřevě *Nothofagus fusca*). Mezi další hlavní fenolické sloučeniny patří flavony (orientin, isoorientin, vitexin, isovitexin, luteolin, chrysoeriol), flavanony (dihydro-orientin, dihydro-isorientin, hemiflorin) a flavonoly (quercetin, hyperosid, isoquercitrin, rutin). Fenolové kyseliny, lignany, kumarin, minerální látky (železo, draslík, vápník, měď, zinek, hořčík, fluor, mangan, sodík), vitamín C jsou také složkou čaje (Joubert & de Beer 2011). Potenciální zdravotní přínosy čaje rooibos jsou spojeny hlavně s jeho obsahem fenolů. Podle různých studií působí příznivě na kardiovaskulární systém (Smith & Swart 2018), má neuroprotektivní (López et al. 2022) a antidiabetický účinek (Sasaki et al. 2018), snižuje riziko nádorových onemocnění (Huang et al. 2019) a dalších problémů provázejících stárnutí.

3.4.2.2 Lipový květ

Lipový čaj, známý jako lipové květenství *Tilia spp.*, má širokou aplikaci v lidovém léčitelství a výživě po celém světě. *Tilia spp.* (*Tiliaceae*) jsou listnaté stromy a keře pocházející z mírných oblastí severní polokoule. Jsou zdrojem potravinářských produktů a lékopisného rostlinného materiálu zvaného *Tiliae flos* (lipové květy).

Lipový čaj má složité chemické složení, které zahrnuje několik tříd fenolických sloučenin, zejména glykosidy kvercetinu (rutin, kvercitrin a isokvercitrin), glykosid kaempferolu (tilirosid), prokyanidiny a fenolové kyseliny (kyselina kávová, kyselina p-kumarová a kyselina chlorogenová). Dále byly identifikovány polysacharidy, kondenzované taniny a terpenoidy (Toker et al. 2001; Karioti et al. 2014).

V tradiční medicíně se květy lípy používají ve formě nálevu k léčbě horečnatých nachlazení, kataru, kašle a chřipky (Heinrich et al. 2017). Používá se také proti zánětům, migréně, hysterii, hypertenzi a má sedativní účinek (Karioti et al. 2014). Lípa je hepatoprotektivum (Matsuda et al. 2002), anxiolytikum (Herrera-Ruiz et al. 2008) a byl prokázán protinádorový účinek (Kim et al. 2012).

4 Materiál a metodika

V experimentální části diplomové práce byla stanovována antioxidační aktivita (pomocí radikálové metody DPPH) a celkový obsah fenolických sloučenin (metoda Folin–Ciocalteu): nálevu zeleného, černého, rooibos a lipového čaje; kombuchy z uvedených druhů čaje při různé době kultivace.

4.1 Materiál

K testování byly použity 4 druhy čaje. Vzorek lipového čaje v sáčcích byl zakoupen u firmy Dr.Max Pharma s.r.o. (Praha, Česká republika), zelený čaj sypaný u PRO-BIO s.r.o. (Praha, Česká republika), bylinný čaj rooibos v sáčcích u LEROS s.r.o. (Strážnice, Česká republika) a černý čaj sypaný od výrobce Winston Tea Company LTD (Hamburg, Německo). Pro přípravu nápoje kombuchy byly zakoupeny 4 mateční kultury s nálevem od výrobce Stevikom s.r.o. (Praha, Česká republika).

2,2-difenyl-1-pikrylhydrazyl (DPPH), kyselina gallová a Folin-Ciocalteu (F-C) činidlo byly zakoupeny od Sigma-Aldrich (Praha, Česká republika). Metanol (MeOH) a uhličitán sodný (Na_2CO_3) byly obdrženy od Lach-Ner (Praha, Česká republika). 96-jamkové mikrotitrační destičky byly dodány firmou Gama Group (České Budějovice, Česká republika).

4.2 Příprava vzorků

Pro stanovení antioxidační aktivity čaje byly připraveny vzorky čajových nálevů. Byly naváženy 2 g každého druhu čaje a zality 200 ml horké vody. Zelený čaj byl zaléván vodou o teplotě 70 °C a vylouhován po dobu 3 minut. Černý, rooibos a lipový čaj se zalévaly vodou o teplotě 90 °C a louhovaly se 5 minut (černý) a 15 minut (bylinkové). Po louhování byly nálevy přefiltrovány a následně ochlazené na pokojovou teplotu. Pro analýzu byly odebrány vzorky čajových nálevů z každé kádinky.

Čajové nálevy pro výrobu kombuchy byly připraveny zvlášť. Do kádinek bylo naváženo potřebné množství každého čaje (7 g/l) a bílého cukru (80 g/l). Směsi čaje a cukru byly extrahovány horkou vodou (2 l) o teplotě 80 °C po dobu 7 minut. Po vyluhování se nálevy přefiltrovaly a byly ponechány chladnout na pokojovou teplotu. Po vychladnutí byly na hladinu nálevu přidány mateční kultury a 10 ml nálevu, ve kterém mateční kultura původně byla. Kádinky se zakryly prodyšným textilním ubrouskem připevněným pomocí gumičky a byly umístěny na stinné místo s teplotou přibližně 21-25 °C pro následnou fermentaci. Pro analýzu byly odebrány vzorky kombuchového nápoje z každé kádinky 5., 7. a 12. den fermentace.

4.3 Stanovení obsahu fenolických sloučenin

Celkový obsah fenolických sloučenin byl stanoven spektrometrickou metodou TPC pomocí F-C činidla, dříve popsanou Singleton et al. (1999). Do mikrotitrační destičky se nejdříve napipetovalo na všechny pozice 100 μl destilované vody, následně se přidala na první pozici 100 μl testovaného vzorku a postupně se vzorek pomocí dvojnásobného ředění (A-E) naředit na požadovanou koncentraci. Byl připraven standardní roztok gallové kyseliny s destilovanou vodou o koncentraci 200 $\mu\text{g/l}$. Na pozice G a H se přidalo 100 μl gallové

kyseliny a pomocí dvojnásobného ředění se kyselina také naředila. Poté se do každé jamky nanoslo 25 μl F-C činidla a destička se nechala na orbitální třepačce 10 minut třepat při otáčkách 50 rpm/min. Po protřepání se do každé jamky přidalo 75 μl 12% Na_2CO_3 a destička se dala v temnu inkubovat na dobu 1h při teplotě 37 °C. Nakonec byla absorbance změřena při 700 nm za pomoci spektrofotometru (Tecan Infinite M200, Männedorf, Švýcarsko). Stejným způsobem byly celkem testovány 4 vzorky nálevů čaje a 4 vzorky kombuchy z 5., 7., a 12. dne fermentace. Pro každý vzorek byla provedena celkem 3 paralelní opakování. Výsledky byly vyjádřeny pomocí ekvivalentů kyseliny gallové (mg GAE/l nálevu).

4.4 Stanovení antioxidační aktivity

Celková antioxidační aktivita byla změřena pomocí metody založené na zachytávání DPPH radikálu dle Sharma & Bhat (2009). Nejdříve se připravil 1 mM roztok DPPH rozpuštěním 4 mg DPPH v 10 ml methanolu. Dále se připravily testovací vzorky, které byly naředěny v poměru 1:1 s methanolem (pro poloviční výchozí koncentraci vzorků).

Do všech jamek mikrotitrační destičky se kromě první řady napipetovalo 100 μl methanolu. Do první řady se napipetovalo 200 μl připravených vzorků, které se pomocí dvojnásobného ředění následně naředily na požadovanou koncentraci. Řada H pouze s methanolem sloužila jako negativní kontrola (blank). Poté se do všech jamek přidalo 75 μl methanolu a 25 μl DPPH. Připravená destička se nechala inkubovat 30 minut ve tmě. Absorbance byla měřena při 517 nm pomocí spektrofotometru (Tecan Infinite M200, Männedorf, Švýcarsko). Stejným způsobem byly testovány všechny vzorky a pro každý vzorek byla provedena celkem 3 paralelní opakování. Výsledky byly vyjádřeny pomocí 50% inhibičních koncentrací (IC_{50}) v $\mu\text{l/ml}$, která určuje množství testované látky potřebné k inhibici 50 % DPPH. Nižší hodnota ukazuje na vyšší účinnost vychytávání radikálů.

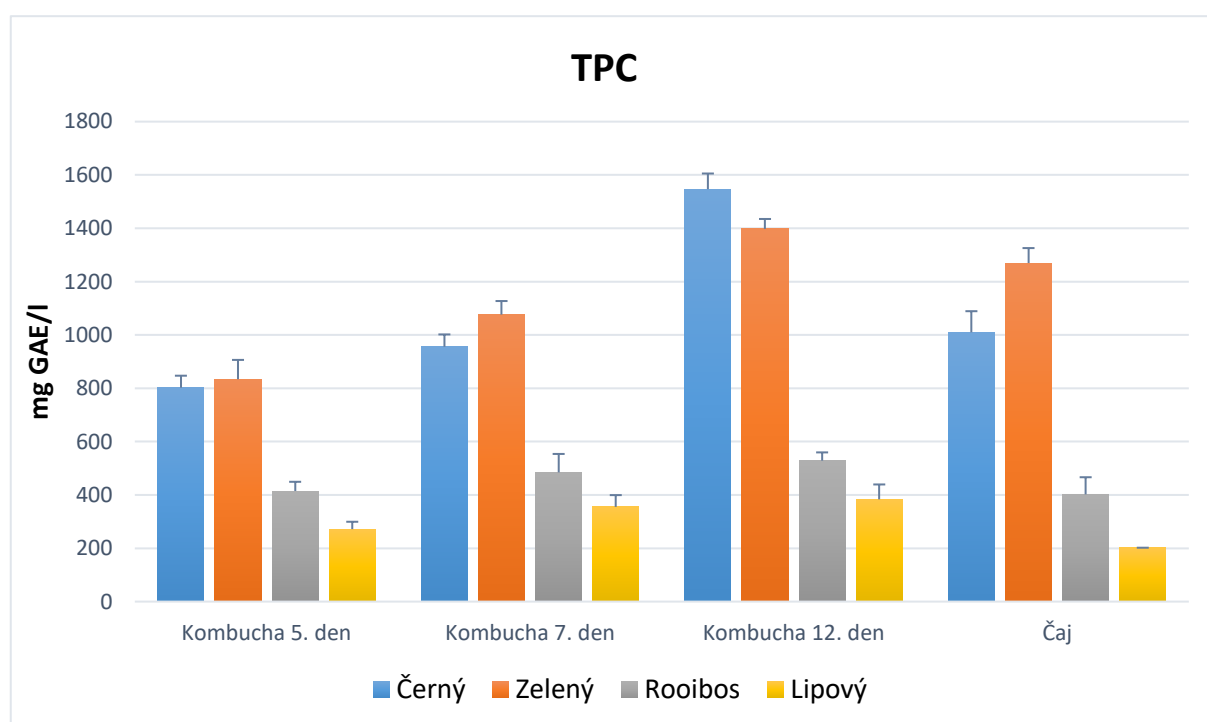
4.5 Statistické vyhodnocení

Výsledky ze třech změřených opakování od každého vzorku byly vyjádřeny jako průměr \pm směrodatná odchylka (SD) a byly analyzovány pomocí softwaru STATISTICA 12. K porovnání významnosti rozdílů mezi vzorky byla použita analýza rozptylu – ANOVA, kde hladina významnosti byla stanovena jako $p < 0,05$. Při p -hodnotě menší, než zvolená hladina významnosti, mezi vzorky byl tedy zjištěn rozdíl a pro podrobnější hodnocení byl dále použit Schéffého test, na základě kterého byl prokázán statisticky významný rozdíl mezi konkrétními vzorky.

5 Výsledky

5.1 Celkový obsah fenolických sloučenin

Na obrázku č.6 je grafické znázornění celkového obsahu fenolických sloučenin ve vzorcích čajových nálevů a kombuchy. Výpočet byl proveden s použitím kalibrační křivky standardu kyseliny gallové. Hodnoty čaje se pohybovaly v intervalu od $201,02 \pm 57,72$ do $1269,67 \pm 79,29$ mg GAE/l. Nejvyšší obsah fenolů byl naměřen v nálevu zeleného čaje $1269,67 \pm 79,29$ mg GAE/l, vysokou hodnotu měl také nálev černého čaje $1009,79 \pm 56,12$ mg GAE/l. Nejmenší hodnota byla naměřena u lipového čaje $201,02 \pm 57,72$ mg GAE/l. Při statistickém vyhodnocení byl prokázán statisticky významný rozdíl v obsahu fenolů mezi všemi vzorky roztoků čaje na hladině významnosti $p < 0,05$ (tabulka č.7).



Obrázek č.6: Výsledky celkového obsahu fenolických sloučenin za použití metody TPC v mg GAE/l. Jsou vyjádřeny jako průměr \pm SD.

Tabulka č.7: Vyhodnocení Scheffého testu pro obsah fenolů mezi všemi vzorky roztoků čaje.

Scheffého test; proměnná Obsah fenolických sloučenin (Čaj TPC ANOVA)				
Pravděpodobnosti pro post-hoc testy				
Chyba: meziskup. PC = 2181,6, sv = 16,000				
Čaj	Zelený	Rooibos	Lipový	Černý
	1269,67	402,06	201,02	1009,79
Zelený		0,000021	0,000002	0,000382
Rooibos	0,000021		0,000040	0,000017
Lipový	0,000002	0,000040		0,000000
Černý	0,000382	0,000017	0,000000	

*Označení hodnot v tabulce červenou barvou poukazuje na statisticky významný rozdíl ($p < 0,05$).

Obsah fenolických sloučenin v kombuše z černého čaje se pohyboval od $802,10 \pm 45,06$ do $1546,78 \pm 58,64$ mg GAE/l (5. až 12. den fermentace), ze zeleného čaje od $833,92 \pm 72,48$ do $1397,45 \pm 37,42$ mg GAE/l, z čaje rooibos od $414,65 \pm 34,64$ do $528,39 \pm 31,12$ mg GAE/l a z lipového čaje od $271,65 \pm 27,8$ do $383,49 \pm 55,81$ mg GAE/l. Nejvyšší obsah fenolů byl stanoven v kombuše z černého čaje 12. den fermentace $1546,78 \pm 58,64$ mg GAE/l. Vysokých hodnot také dosáhly kombucha ze zeleného čaje 12. den fermentace $1397,45 \pm 37,42$ mg GAE/l a kombucha ze zeleného čaje 7. den fermentace $1076,14 \pm 51,02$ mg GAE/l. Nejmenší hodnota byla naměřena v kombuše z lipového čaje 5. den fermentace $271,65 \pm 27,8$ mg GAE/l. Při statistickém vyhodnocení rozdílu mezi vzorky kombuchy v závislosti na druhu použitého čaje byl prokázán statisticky významný rozdíl mezi kombuchou ze zeleného, rooibos a lipového čaje, a také mezi kombuchou z černého, rooibos a lipového čaje 5. den fermentace; 7. a 12. den fermentace byl prokázán rozdíl mezi všemi druhy kombuchy. Mezi obsahem fenolů kombuchy ze zeleného a černého čaje 5. den fermentace statisticky významný rozdíl prokázán nebyl (tabulka č.8). Významný rozdíl v závislosti na dni fermentace byl stanoven pro kombuchu z každého druhu čaje mezi 5. a 7., 7. a 12., a 5. a 12. dnem fermentace, kromě vzorků kombuchy z lipového čaje na 7. a 12. den fermentace, mezi kterými statistický významný rozdíl prokázán nebyl (tabulka č.9).

Tabulka č.8: Vyhodnocení Scheffého testu pro obsah fenolů mezi vzorky kombuchy v závislosti na druhu použitého čaje (5. den fermentace).

Scheffého test; proměnná TPC (Kombucha TPC ANOVA)				
Pravděpodobnosti pro post-hoc testy				
Chyba: meziskup. PC = 1419,7, sv = 8,0000				
Kombucha	z černého čaje 802,12	ze zeleného čaje 833,92	z rooibos čaje 414,65	z lipového čaje 271,62
z černého čaje 5.		0,784164	0,000012	0,000001
ze zeleného čaje 5.	0,784164		0,000007	0,000019
z rooibos čaje 5.	0,000012	0,000007		0,009304
z lipového čaje 5.	0,000001	0,000019	0,009304	

*Označení hodnot v tabulce červenou barvou poukazuje na statisticky významný rozdíl ($p < 0,05$).

Tabulka č.9: Vyhodnocení Scheffého testu pro obsah fenolů mezi vzorky kombuchy z lipového čaje v závislosti na dni fermentace.

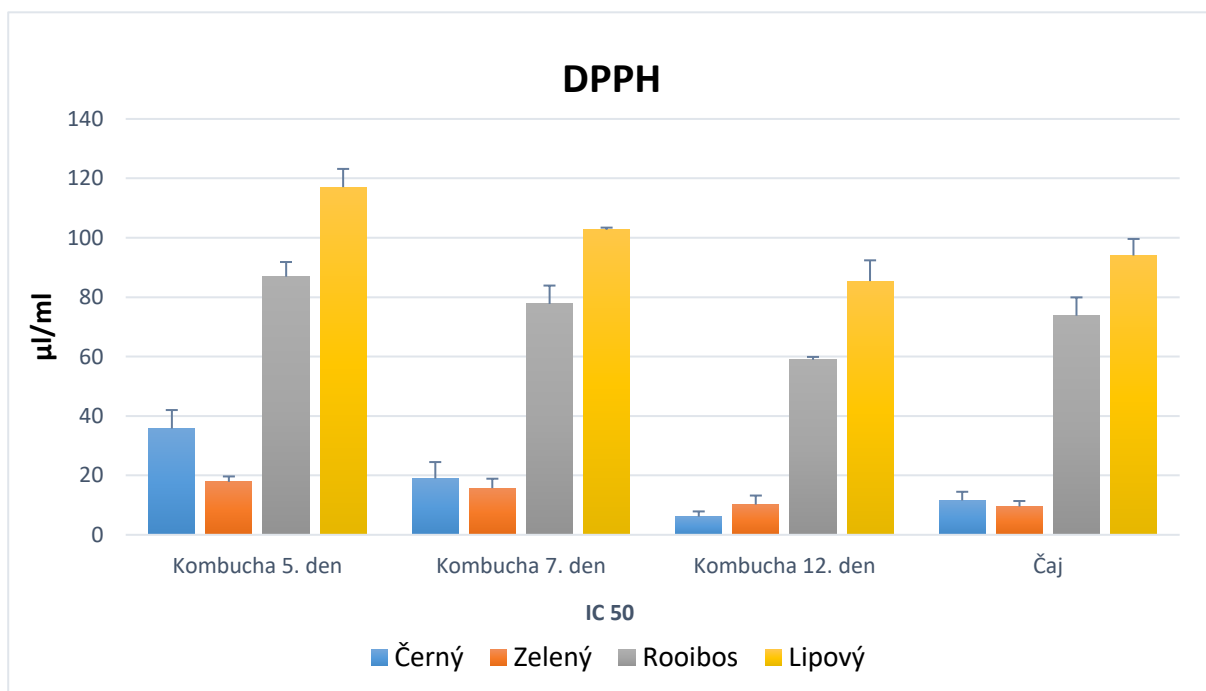
Scheffého test; proměnná TPC (Kombucha TPC ANOVA)			
Pravděpodobnosti pro post-hoc testy			
Chyba: meziskup. PC = 89,167, sv = 12,000			
Kombucha	z lipového čaje 5. 271,65	z lipového čaje 7. 355,08	z lipového čaje 12. 383,49
z lipového čaje 5.		0,000345	0,000081
z lipového čaje 7.	0,000345		0,992437
z lipového čaje 12.	0,000081	0,992437	

*Označení hodnot v tabulce červenou barvou poukazuje na statisticky významný rozdíl ($p < 0,05$).

Pro vyhodnocení rozdílu mezi obsahem fenolů v kombuše a čajových nálevech byly vybrány hodnoty kombuchy k 12. dni fermentace. Statisticky významný rozdíl byl prokázán mezi každým druhem čajového nálevu a vzorkem kombuchy z totožného čaje.

5.2 Antioxidační aktivita

Na obrázku č.7 je grafické znázornění antioxidační aktivity ve vzorcích čajových nálevů a kombuchy. Hodnoty IC 50 čajových nálevů se pohybovaly v intervalu od $9,55 \pm 2,94$ do $94,03 \pm 5,57$ $\mu\text{l/ml}$. Nejvyšší hodnotu IC 50 měl vzorek lipového čaje $94,03 \pm 5,57$ $\mu\text{l/ml}$. Nejmenší hodnoty byly naměřeny u zeleného $9,55 \pm 2,94$ $\mu\text{l/ml}$ a černého čaje $11,53 \pm 1,83$ $\mu\text{l/ml}$. Při statistickém vyhodnocení byl prokázán statisticky významný rozdíl mezi vzorky černého, rooibos a lipového čaje, a také mezi zeleným, rooibos a lipovým čajem. Mezi hodnotami IC 50 černého a zeleného čaje rozdíl prokázán nebyl (tabulka č.10).



Obrázek č.7: Výsledky antioxidační aktivity IC 50 v $\mu\text{l/ml}$. Jsou vyjádřeny jako průměr \pm SD.

Tabulka č.10: Vyhodnocení Scheffého testu pro hodnoty IC 50 mezi všemi vzorky roztoků čaje.

Scheffého test; proměnná IC 50 (Čaj DPPH ANOVA)				
Pravděpodobnosti pro post-hoc testy				
Chyba: meziskup. PC = 7,9755, sv = 16,000				
Čaj	Zelený 9,52	Rooibos 73,76	Lipový 94,03	Černý 11,55
Zelený		0,000875	0,000002	0,925588
Rooibos	0,000875		0,000031	0,000051
Lipový	0,000002	0,000031		0,000008
Černý	0,925588	0,000051	0,000008	

*Označení hodnot v tabulce červenou barvou poukazuje na statisticky významný rozdíl ($p < 0,05$).

Hodnoty IC 50 kombuchy z černého čaje se pohybovaly od $35,77 \pm 1,76$ do $6,12 \pm 1,81$ $\mu\text{l/ml}$ (5. až 12. den fermentace), ze zeleného čaje od $17,84 \pm 3,03$ do $10,19 \pm 6,18$ $\mu\text{l/ml}$, z čaje rooibos od $86,9 \pm 0,95$ do $58,93 \pm 4,94$ $\mu\text{l/ml}$ a z lipového čaje od $117,04 \pm 6,98$ do $85,42 \pm 6,14$ $\mu\text{l/ml}$. Nejvyšší hodnotu IC 50 měl vzorek kombuchy z lipového čaje 5. den fermentace

117,04 ± 6,98 µl/ml. Vysokých hodnot také dosáhly kombucha z lipového čaje 7. a 12. den fermentace (102,68 ± 0,73 a 85,42 ± 6,14 µl/ml) a kombucha z čaje rooibos 5. den fermentace 86,9 ± 0,95 µl/ml. Nejmenší hodnota byla naměřena v kombuše z černého čaje 12. den fermentace 6,12 ± 1,81 µl/ml. Nízkou hodnotu měl také vzorek kombuchy ze zeleného čaje 12. den fermentace 10,19 ± 6,18 µl/ml.

Při statistickém vyhodnocení rozdílu mezi vzorky kombuchy byl prokázán statisticky významný rozdíl mezi všemi druhy kombuchy 5.,7. a také 12. dne fermentace, jak v závislosti na druhu použitého čaje v každém konkrétním dni, tak i v závislosti na dnu fermentace pro každý druh kombuchy. Pro vyhodnocení rozdílu mezi hodnotami IC 50 kombuchy a čajových nálevů byly vybrány hodnoty kombuchy 12. den fermentace. Statisticky významný rozdíl byl prokázán mezi každým druhem čajového nálevu a vzorkem kombuchy ze stejného čaje, kromě vzorku zeleného čaje a kombuchy ze zeleného čaje 12. den fermentace, mezi kterými rozdíl prokázán nebyl (tabulka č.11).

Tabulka č.11: Vyhodnocení Scheffého testu pro hodnoty IC 50 mezi vzorky roztoků čaje a kombuchy 12. den fermentace.

Vzorek	Scheffého test; proměnná IC 50 (Kombucha VS Čaj DPPH ANOVA) Pravděpodobnosti pro post-hoc testy Chyba: meziskup. PC = ,71472, sv = 12,000								
	Vzorek	1 6,12	2 10,19	3 58,93	4 85,42	5 94,03	6 73,76	7 9,52	8 11,55
1	kombucha z černého čaje		0,015	0,003	0,001	0,000	0,000	0,006	0,001
2	kombucha ze zeleného čaje	0,015		0,000	0,000	0,004	0,000	0,000	0,926
3	kombucha z rooibos čaje	0,003	0,000		0,002	0,000	0,000	0,009	0,000
4	kombucha z lipového čaje	0,001	0,000	0,002		0,000	0,013	0,000	0,000
5	čaj lipový	0,000	0,004	0,000	0,000		0,000	0,021	0,000
6	čaj rooibos	0,000	0,000	0,000	0,013	0,000		0,017	0,000
7	čaj černý	0,006	0,000	0,009	0,000	0,021	0,017		0,545
8	čaj zelený	0,001	0,926	0,000	0,000	0,000	0,000	0,545	

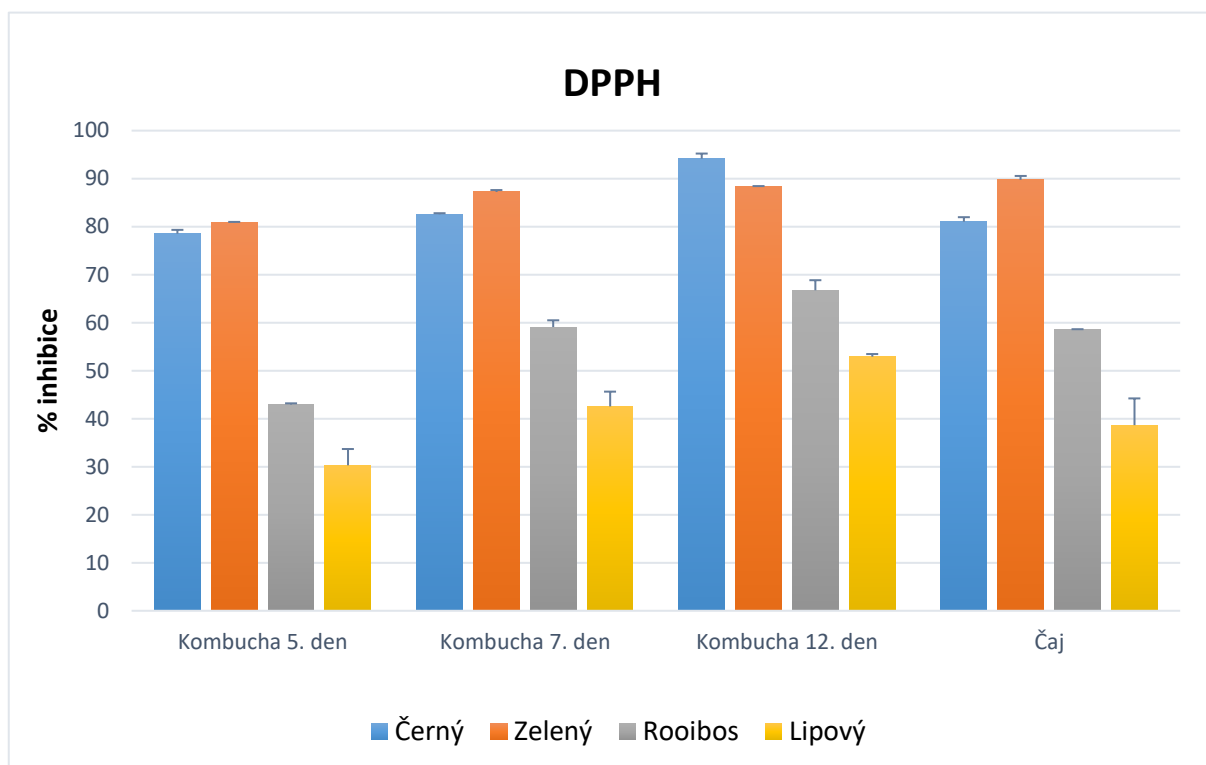
*Označení hodnot v tabulce červenou barvou poukazuje na statisticky významný rozdíl (p <0,05).

Mnoho studií také udává antioxidační aktivitu v hodnotách % inhibice DPPH radikálu. Pro lepší možnost porovnání s vědeckou literaturou byly tedy výsledky taktéž vypočteny z poklesu absorbance v % pomocí porovnání s kontrolou podle vztahu:

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

Kde A₀ – absorbance vzorku, A – absorbance kontroly (blank).

Výsledky jsou znázorněny na obrázku č.8.



Obrázek č.8: Výsledky antioxidační aktivity v % inhibice. Jsou vyjádřeny jako průměr ± SD.

6 Diskuse

Mnoho přirozených biologických procesů v našem těle, jako je dýchání, trávení potravy, metabolizace alkoholu a přeměna tuků na energii, produkuje škodlivé sloučeniny zvané volné radikály. Oxidační stres vzniká v důsledku nerovnováhy mezi volnými radikály a antioxidační sloučeninou, což vede k oxidaci biomolekul a následné ztrátě jejich biologických funkcí a homeostatické rovnováhy. Tato nerovnováha má relevantní důsledky pro řadu chronických nepřenositelných onemocnění, včetně aterosklerózy, neurodegenerativních poruch a rakoviny (Sharifi-Rad et al. 2020).

Moderní životní styl spojený s nezdravou stravou, nedostatkem fyzického cvičení, vystavováním se kombinaci chemikálií z různých zdrojů, těžkým kovům, potravinářským přísadám a znečištění životního prostředí může ovlivnit výskyt oxidačního stresu. To všechno může přispět ke zvyšující se zátěži organismu chronickými onemocněními (Fenga et al. 2017). Proto se častěji klade důraz na zdravou a vyváženou stravu, a zvyšuje se zájem lidí o přírodní, funkční a spolehlivé potraviny. Potraviny bohaté na některé fytochemikálie, jako jsou polyfenoly, flavonoidy, isoflavony, fenolové kyseliny, karotenoidy a kumariny, které zabraňují tvorbě volných radikálů, snižují oxidační stres, mají vysokou antioxidační aktivitu a pomáhají lidem chránit se před degenerativními poruchami (Özdemir & Hilmi, 2017).

V poslední době se objevily vědecké studie, jejichž cílem je zvýšit popularitu různých fermentovaných potravin, které se tradičně vyrábějí a konzumují v mnoha oblastech světa, určit jejich funkčnost a definovat účinné látky zajišťující tuto funkci. Nápoj Kombucha je jednou z těchto tradičně vyráběných fermentovaných potravin.

Pozitivní vliv kombuchy na zdraví je spojen zejména s mikroorganismy hrajícími roli v procesu fermentace a jejich metabolity. Různé druhy použitého substrátu, koncentrace cukru, doba fermentace, složení *scooby* a spousta dalších faktorů mají vliv na rozdíly ve složení a zároveň i antioxidační aktivitu konečného nápoje (Villarreal-Soto et al. 2018). Proto jsme se v této práci zaměřili na stanovení a zjištění rozdílu antioxidační aktivity kombuchy v závislosti na druhu použitého substrátu, na dni fermentace, a také byla pro porovnání stanovena antioxidační aktivita nefermentovaných substrátů.

Mnoho studií již prokázalo antioxidační účinky čaje. To se spojuje hlavně s tím, že čajové lístky obsahují bohatou rozmanitost antioxidačních fenolických sloučenin, a právě proto jsou černý a zelený čaj obvykle považovaný za nejlepší substráty pro přípravu kombuchy (Miranda et al. 2022).

Cardoso et al. (2020) zkoumali fenolický profil kombuchy vyrobené fermentací zeleného a černého čaje při 25 °C po dobu 10 dnů spolu se stanovením jejich antioxidačních aktivit. Koncentrace celkových fenolických sloučenin ve vzorcích kombuchy byla stanovena Folin-Ciocalteuovou metodou s použitím kyseliny gallové jako standardu. Antioxidační aktivita vzorků kombuchy byla určena jejich schopností inhibovat radikál ABTS, jako standard byl použit Trolox. Kombucha z černého čaje měla celkový obsah fenolů 1090 mg GAE/l, což bylo přibližně o 55,7 % více než u zeleného čaje. Kombucha z černého čaje také představovala vynikající antioxidační aktivitu (65,32 %) ve vztahu k zelenému čaji.

Kallel et al. (2012) zaznamenali vyšší koncentraci celkových fenolických látek v kombuše z černého čaje ve srovnání se zeleným během 15 dní fermentace při 24 °C. V nultý den byla koncentrace celkových fenolických látek 780 mg GAE/l v kombuše ze zeleného čaje

a 1010 mg GAE/l v kombuše z černého čaje. K 15. dnu celkové fenoly kombuchy ze zeleného čaje činily 1080 mg GAE/l a kombuchy z černého čaje 1120 mg GAE/l, což očividně potvrzuje tvrzení, že obsah fenolických sloučenin má tendenci se zvyšovat během doby fermentace. Celkové fenolické sloučeniny byly stanoveny pomocí Folin-Ciocalteu metody.

V další nedávné studii byl pozorován biochemický profil a antioxidační aktivita ve vzorcích kombuchy vyrobených ze zeleného, černého, bílého a červeného čaje. Analýza antioxidačního potenciálu ve vzorcích ukázala, že množství antioxidačních sloučenin bylo 94,61% inhibice radikálů DPPH u kombuchy ze zeleného čaje a 94,84 % u kombuchy z černého čaje (Jakubczyk et al. 2020).

Námi zjištěné výsledky korespondují s výsledky z uvedených prací. Celkový obsah fenolických sloučenin v kombuše ze zeleného a černého čaje k 12. dni fermentace činil $1397,45 \pm 37,42$ a $1546,78 \pm 58,64$ mg GAE/l a antioxidační aktivita $84,38 \pm 0,07$ a $94,16 \pm 1,06$ % (ve stejném pořadí), což je přibližně ve stejném rozmezí s hodnotami uvedenými ve studiích. Jistou míru odlišnosti výsledků lze vysvětlit několika příčinami. Každý vzorek může mít jiné vlastnosti a způsob přípravy. Velký vliv může mít i prostředí, jako jsou klimatické podmínky a agrotechnické postupy při pěstování každého druhu použitého čaje. Může se lišit jak metodika stanovení, tak i způsob a doba extrakce vzorků. Obsah polyfenolů a jejich antioxidační aktivita může být také ovlivněna teplotou a délkou doby skladování vzorků.

Námi také bylo potvrzeno že kombucha z černého čaje vykazuje vyšší antioxidační aktivitu v porovnání s kombuchou ze zeleného čaje, jak podle obsahu fenolických sloučenin, tak i podle procent inhibice DPPH radikálu. Tento rozdíl lze považovat za statisticky významný. Rozdíl může být vysvětlen větším množstvím, rozmanitostí a hojností tříd fenolických látek v kombuše z černého čaje. Větší rozmanitost fenolických sloučenin je způsobena tím, že černý čaj již podstoupil fermentaci během procesu výroby a následkem toho má odlišný profil fenolických sloučenin ve svém složení. Černý čaj má vyšší koncentraci dimerních a polymerních fenolických sloučenin (theaflavinů a thearubiginů), které jsou biotransformovány nebo degradovány enzymatickým působením a nízkým pH nápoje. Tím pádem během fermentace kombuchy vznikají fenolické sloučeniny s nižší molekulovou hmotností, které následně zvyšují diverzitu fenolických sloučenin v kombuše z černého čaje (Chu & Chen 2006; Jayabalan et al. 2007; Kallel et al. 2012; Ivanišová et al. 2020).

V poslední době se ve světové literatuře objevuje stále více zpráv o využití čajové houby k vytváření nových fermentovaných funkčních produktů z jiných surovin nežli čaje, například z ovocných nebo zeleninových šťáv, bylinných nebo rostlinných nálevů a mléčných produktů. Některé z nich obsahují sacharidy, které čajová houba využívá jako zdroj uhlíku a v procesu fermentace se produkují bioaktivní látky, díky kterým se získávají produkty s jedinečnými, pro zdraví prospěšnými vlastnostmi. V závislosti na složení suroviny se vlastnosti produktů liší. Zdá se, že aplikace čajové houby k vytvoření nových funkčních produktů na bázi různých surovin je stále otevřenou otázkou. V našem sledování jsme se také zaměřili na možnost využití jako substrát nejen tradiční, černý nebo zelený čaj, ale i jiné, méně populární možnosti. Vyrobili jsme také kombuchu na bázi některých bylinných nálevů, konkrétně rooibos a lipového květu. Některými studiemi již byly popsány vlastnosti kombuchy z daných typů substrátů, avšak jejich počet a informace jsou stále značně nedostačující.

Ve studii Hoon et al. (2014) byla stanovena antioxidační aktivita a množství polyfenolů v pěti typech kombuchového čaje během 5 dnů. I když bylo zjištěno, že množství celkových

fenolů kombuchy z čaje rooibos bylo výrazně větší než u kombuchy z červeného a oolong čaje, kombucha z černého a zeleného čaje měly nejvyšší celkový obsah fenolů na konci období analýzy. Gaggia et al. (2018) při zkoumání vlastností kombuchy z černého, zeleného a rooibos čaje přišli k podobným výsledkům: nejnižší antioxidační aktivitu měla kombucha z rooibosu.

Uvádí se, že čaj rooibos neobsahuje katechiny, a to je hlavním důvodem, proč kombucha, která je vyrobena z rooibosu, má nižší antioxidační aktivitu než například kombucha ze zeleného nebo černého čaje. Výsledky, které jsme stanovili toto tvrzení také potvrzují. Námi bylo zjištěno, že kombucha z čaje rooibos měla svou nejvyšší antioxidační aktivitu 12. den fermentace v hodnotě IC 50 - $58,93 \pm 4,94 \mu\text{l/ml}$, což představuje skoro 8krát nižší antioxidační aktivitu, než u kombuchy z černého čaje a 5krát nižší než u kombuchy ze zeleného čaje. Nicméně, jedna ze zmíněných studií také uvádí informaci, že kombucha z rooibos listů má množství kyseliny glukuronové srovnatelné s kombuchou z černého čaje, a navíc obsahuje další cenné sloučeniny, například rutin, aspalathin, orientin a isoorientin. Plus k tomu kombucha z rooibosu prokázala významný pozitivní vliv na regeneraci oxidačního poškození buněčných linií fibroblastů (Gaggia et al. 2018).

Čaj z lipového květu, jako substrát pro výrobu kombuchy, byl námi zvolen kvůli svým již dávno prokázaným, vysoké cenným účinkům na zdraví (Matsuda et al. 2002; Karioti et al. 2014; Melnyk et al. 2021). Výsledky antioxidační aktivity kombuchy z lipového čaje představovaly nejnižší hodnoty ze všech námi testovaných vzorků: $85,42 \pm 6,14 \mu\text{l/ml}$ IC 50 a $383,49 \pm 55,81 \text{ mg GAE/l}$. Kayisoglu & Coskun (2021) sledovali vlastnosti (včetně antioxidační aktivity) kombuchy během 14. dnu fermentaci, připravené z černého, zeleného, lipového čaje, peprné maty a šalvěže. I když kombucha z lipového čaje nevykázala nejnižší antioxidační aktivitu ze všech vzorků, její hodnoty byly výrazně nižší vůči kombuše ze zeleného a černého čaje. Přesto však autoři zjistili jiné pozitivní vlastnosti kombuchy z lipového čaje, týkající se sensorických vlastností konečného nápoje.

Vzhledem k výše uvedeným informacím by bylo vhodné zahájit další testování kombuchy z rooibos a lipového čaje, a zaměřit se na zkoumání jiných možných zdravích prospěšných vlastností kombuchy, připravené z těchto druhů rostlin.

Při vyhodnocení a porovnání rozdílů mezi vzorky v závislosti na dnu fermentace jsme došli k závěru, že obsah fenolických sloučenin a antioxidační aktivita kombuchy se zvyšuje s dobou fermentace. Obsah fenolů od 5. do 12. dne fermentace u kombuchy z černého, zeleného, rooibos a lipového čaje se zvýšil o 48, 41, 23 a 30 %, a antioxidační aktivita vzrostla o 18, 16, 22 a 20 % ve stejném pořadí.

Jafari et al. (2020) ve své studii provedli komplexní výzkum antioxidačních vlastností kombuchy při různé době kultivace. Kombucha z černého čaje byla ponechána fermentaci po dobu 14 dnů a byla sledována její antioxidační aktivita 7., 10. a 14. den. Autoři přišli ke stejnému zjištění, že delší fermentační doba má za následek zvýšenou antioxidační aktivitu ve vzorcích ($59,63 \pm 0,90$ až $88,13 \pm 0,83$ % inhibice DPPH).

Podobných výsledků dosáhli Jayabalan et al. (2008) při zkoumání kombuchy během fermentace připravené ze zeleného čaje, černého čaje a čajových zbytků. Při použití F-C metody a metody založené na schopnosti vychytávat DPPH radikál bylo stanoveno, že celkové množství fenolických sloučenin a antioxidační aktivita nápojů se progresivně zvyšovala s dobou fermentace. Bylo pozorováno zvýšení o 19 % celkových fenolických látek v kombuše

ze zeleného čaje (850 až 1250 mg GAE/l) a o 17 % v kombuše z černého čaje (600-720 mg GAE/l).

Amarasinghe et al. (2018) hodnotili antioxidační aktivitu čtyř vzorků kombuchy z černého čaje s různými koncentracemi během dvou měsíců. Bylo stanoveno že se zvyšující dobou fermentace vzorky kombuchy vykazovaly vyšší antioxidační aktivitu. Avšak antioxidační aktivita vzorků se po dvouměsíční fermentační době výrazně snížila, což ukázalo, že nadměrné zvýšení doby fermentace zvyšuje množství organických kyselin a činí nápoj nežádoucím ke konzumaci.

Dané zjištění lze pravděpodobně vysvětlit skutečností, že při mikrobiálních přeměnách se uvolňují sloučeniny, které mají za následek vyšší antioxidační aktivitu (Torino et al. 2013; Ivanišová et al. 2020). Komplexní fenolické sloučeniny ve fermentovaných nápojích mohou podléhat degradaci v kyselém prostředí a pomocí enzymů, uvolňovaných bakteriemi a kvasinkami symbiotické kultury, což v důsledku zvyšuje jejich celkový obsah. K tomu si je ještě třeba uvědomit, že na antioxidační aktivitě vzorků se podílí kromě obsahu polyfenolů i další složky, které jsou již přítomné nebo produkovány během procesu fermentace (vitamíny, antioxidanty na bázi aminokyselin atd.). Proto se domníváme, že mikrobiální fermentace se zdá být účinným procesem pro zlepšení antioxidační aktivity finálního produktu.

Stejnými přeměnami sloučenin lze vysvětlit i rozdíl mezi antioxidační aktivitou kombuchy a nefermentovaných čajových nálevů. Ivanišová a spol. (2019) porovnali, po 7. dnech fermentace při 22 °C, koncentrace fenolických sloučenin v černém čaji a kombuše ze stejného čaje. Autoři uvádějí vyšší hodnoty celkových fenolických látek, flavonoidů a antioxidační aktivity ve vzorku kombuchy, což potvrzuje výše uvedené tvrzení, že komplexní fenolické sloučeniny mohou být během fermentace degradovány na menší molekuly.

Polyfenoly nápoje kombucha z černého čaje po 21 dnech fermentace studovali Bhattacharya et al. (2016). Autoři zjistili, že obsah celkových polyfenolů a flavonoidů se u kombuchy zvyšuje ve srovnání s nefermentovaným vzorkem černého čaje. V jiné studii byly také porovnány antioxidační vlastnosti a množství bioaktivních sloučenin, produkováných černým čajem a kombuchou ze stejného druhu čaje. Výsledky ukázaly vyšší hladiny antioxidantů a bioaktivních sloučenin v kombuše než ve vzorku černého čaje (Lobo et al. 2017).

V naší práci jsme také provedli porovnání výsledků všech vzorků kombuchy se vzorky nefermentovaných čajových nálevů. Ve všech variantách výsledky vzorků kombuchy vykazovaly vyšší antioxidační aktivitu a obsah fenolických sloučenin než vzorky čajových nálevů. Výjimkou byly vzorky kombuchy ze zeleného čaje a nálevu zeleného čaje, mezi kterými statisticky významný rozdíl prokázán nebyl.

Navzdory skutečnosti, že tento nápoj je známý již dlouhou dobu, není pochyb o tom, že práce na vylepšení tohoto produktu by měla pokračovat. Stále existuje velké množství potenciálních surovin, které nebyly testovány z hlediska vhodnosti pro výrobu kombuchy. Použití nových substrátů může vést k vynálezu nových produktů s vlastnostmi podporujícími zdraví. Vzhledem k tomu, že studie provedené za účelem posouzení kvalitativních a kvantitativních vlastností složek kombuchy jsou rozptýlené, měl by také být proveden vědecký výzkum, aby se objasnila zdraví prospěšná tvrzení a aspekty bezpečnosti tohoto nápoje.

7 Závěr

Cílem práce bylo stanovit antioxidační aktivitu a obsah fenolických sloučenin kombuchy ze zeleného, černého, rooibos a lipového čaje a také ve vzorcích nefermentovaného čaje. Testování bylo provedeno pomocí TPC a DPPH metod. Nejlepší výsledky antioxidační aktivity a obsahu fenolických sloučenin prokázal vzorek kombuchy z černého čaje k 12. dni fermentace. Mezi čaji nejlepších výsledků dosáhl nálev zeleného čaje.

Druhým cílem bylo porovnat výsledky a vyhodnotit možný statisticky významný rozdíl v antioxidační aktivitě a obsahu fenolických sloučenin mezi vzorky kombuchy při různé době kultivace. Bylo provedeno testování vzorků 5., 7. a 12. den fermentace. Hypotéza, že antioxidační aktivita a obsah fenolických sloučenin v kombuše se progresivně zvyšuje s dobou fermentace, byla potvrzena ve všech variantách nápoje, rozdíl hodnot byl vyhodnocen jako statisticky významný. Výjimku představovaly vzorky kombuchy z lipového čaje 7. a 12. den fermentace, mezi kterými statisticky významný rozdíl prokázán nebyl.

Pro splnění dalšího cíle jsme provedli porovnání výsledků mezi vzorky kombuchy v závislosti na druhu použitého čaje. Hypotéza, že antioxidační aktivita a celkový obsah fenolických sloučenin nápoje kombucha se liší v závislosti na druhu použitého čaje se také potvrdila ve všech vzorcích, kromě vzorků kombuchy ze zeleného a černého čaje 5. den fermentace, mezi kterými podle obsahu fenolů nebyl prokázán statisticky významný rozdíl.

Posledním cílem bylo porovnání výsledků všech vzorků kombuchy se vzorky nefermentovaných čajových nálevu. Hypotéza, že obsah fenolických sloučenin a antioxidační aktivita u nefermentovaného čaje bude nižší než u kombuchy vyrobené ze stejného čaje, se potvrdila ve všech porovnávaných variantách. Statisticky významný rozdíl však nebyl prokázán mezi hodnotami IC 50 vzorků kombuchy ze zeleného čaje a nálevu zeleného čaje.

Protože se jedná o celosvětově známý nápoj, může být zkoumání výhod a nevýhod konzumace tohoto nápoje mimořádně smysluplné. Podle literatury neexistují téměř žádné záznamy o systematických pokusech, zkoumajících vliv konzumace kombuchy na organismus. To by mohla být cílová oblast, na kterou by bylo vhodné budoucí výzkum zaměřit. Objasnění zdraví prospěšných tvrzení by mohlo podpořit následnou propagaci kombuchového nápoje mezi spotřebiteli.

8 Literatura

- Abbas M, Saeed F, Anjum FM, Afzaal M, Tufail T, Bashir MS, Ishtiaq A, Hussain S, Suleria HAR. 2017. Natural polyphenols: An overview. *International Journal of Food Properties* **20**:1689–1699.
- Abedi E, Hashemi SMB. 2020. Lactic acid production – producing microorganisms and substrates sources-state of art. *Heliyon* (e04974) DOI: 10.1016/j.heliyon.2020.e04974.
- Adhikary B, Yadav SK, Roy K, Bandyopadhyay SK, Chattopadhyay S. 2011. Black Tea and Theaflavins Assist Healing of Indomethacin-Induced Gastric Ulceration in Mice by Antioxidative Action. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* **2011**:1–11.
- Aloulou A, Hamden K, Elloumi D, Ali MB, Hargafi K, Jaouadi B, Ayadi F, Elfeki A, Ammar E. 2012. Hypoglycemic and antilipidemic properties of kombucha tea in alloxan-induced diabetic rats. *BMC Complementary and Alternative Medicine* **12**:63.
- Amarasinghe H, Weerakkody NS, Waisundara VY. 2018. Evaluation of physicochemical properties and antioxidant activities of kombucha “Tea Fungus” during extended periods of fermentation. *Food Science & Nutrition* **6**:659–665.
- Anekonda TS. 2006. Resveratrol—A boon for treating Alzheimer’s disease? *Brain Research Reviews* **52**:316–326.
- Antolak H, Piechota D, Kucharska A. 2021. Kombucha Tea—A Double Power of Bioactive Compounds from Tea and Symbiotic Culture of Bacteria and Yeasts (SCOBY). *Antioxidants* **10**:1541.
- Ayed L, ben Abid S, Hamdi M. 2017. Development of a beverage from red grape juice fermented with the Kombucha consortium. *Annals of Microbiology* **67**:111–121.
- Banerjee D, Hassarajani SA, Maity B, Narayan G, Bandyopadhyay SK, Chattopadhyay S. 2010. Comparative healing property of kombucha tea and black tea against indomethacin-induced gastric ulceration in mice: possible mechanism of action. *Food & Function* **1**:284.
- Battikh H, Bakhrouf A, Ammar E. 2012. Antimicrobial effect of Kombucha analogues. *LWT - Food Science and Technology* **47**:71–77.
- Bauer-Petrovska B, Petrushevska-Tozi L. 2000. Mineral and water-soluble vitamin content in the Kombucha drink. *International Journal of Food Science and Technology* **35**:201–205.
- Bhattacharya D, Bhattacharya S, Patra MM, Chakravorty S, Sarkar S, Chakraborty W, Koley H, Gachhui R. 2016. Antibacterial Activity of Polyphenolic Fraction of Kombucha Against Enteric Bacterial Pathogens. *Current Microbiology* **73**:885–896.
- Bhattacharya S, Gachhui R, Sil PC. 2013. Effect of Kombucha, a fermented black tea in attenuating oxidative stress mediated tissue damage in alloxan induced diabetic rats. *Food and Chemical Toxicology* **60**:328–340.
- Bolle F, Brian W, Petit D, Boutakhrit K, Feraille G, van Loco J. 2011. Tea brewed in traditional metallic teapots as a significant source of lead, nickel and other chemical elements. *Food Additives & Contaminants: Part A* **28**:1287–1293.
- Brglez Mojzer E, Knez Hrnčič M, Škerget M, Knez Ž, Bren U. 2016. Polyphenols: Extraction Methods, Antioxidative Action, Bioavailability and Anticarcinogenic Effects. *Molecules* **21**:901.

- Buldurun K, Turan N, Bursal E, Mantarcı A, Turkan F, Taslimi P, Gülçin İ. 2020. Synthesis, spectroscopic properties, crystal structures, antioxidant activities and enzyme inhibition determination of Co(II) and Fe(II) complexes of Schiff base. *Research on Chemical Intermediates* **46**:283–297.
- Butt MS, Imran A, Sharif MK, Ahmad RS, Xiao H, Imran M, Rsool HA. 2014. Black Tea Polyphenols: A Mechanistic Treatise. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **54**:1002–1011.
- Cabrera C, Artacho R, Giménez R. 2006. Beneficial Effects of Green Tea—A Review. *Journal of the American College of Nutrition* **25**:79–99.
- Cardoso R, Neto R, dos Santos D’Almeida C, do Nascimento T, Pressete C, Azevedo L, Martino H, Cameron L, Ferreira M. 2020. Kombuchas from green and black teas have different phenolic profile, which impacts their antioxidant capacities, antibacterial and antiproliferative activities. *Food Research International* **128** (e108782) DOI: 10.1016/j.foodres.2019.108782
- Carocho M, Ferreira I. 2013. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food and Chemical Toxicology* **51**:15–25.
- Chen C, Liu BY. 2000. Changes in major components of tea fungus metabolites during prolonged fermentation. *Journal of Applied Microbiology* **89**:834–839.
- Chen C-N, Liang C-M, Lai J-R, Tsai Y-J, Tsay J-S, Lin J-K. 2003. Capillary Electrophoretic Determination of Theanine, Caffeine, and Catechins in Fresh Tea Leaves and Oolong Tea and Their Effects on Rat Neurosphere Adhesion and Migration. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **51**:7495–7503.
- Chib A, Gupta N, Bhat A, Anjum N, Yadav G. 2020. Role of antioxidants in food. *International Journal of Chemical Studies* **8**:2354–2361.
- Chikara S, Nagaprashantha LD, Singhal J, Horne D, Awasthi S, Singhal SS. 2018. Oxidative stress and dietary phytochemicals: Role in cancer chemoprevention and treatment. *Cancer Letters* **413**:122–134.
- Chu S-C, Chen C. 2006. Effects of origins and fermentation time on the antioxidant activities of kombucha. *Food Chemistry* **98**:502–507.
- Coelho RMD, Almeida AL de, Amaral RQG do, Mota RN da, Sousa PHM de. 2020. Kombucha: Review. *International Journal of Gastronomy and Food Science* **22** (e100272) DOI: 10.1016/j.ijgfs.2020.100272.
- Coentrão P de AM, Teixeira VL, Netto ADP. 2011. Antioxidant activity of polyphenols from green and toasted mate tea. *Natural product communications* **6**:651–654.
- Coton M, Pawtowski A, Taminiau B, Burgaud G, Deniel F, Coulloume-Labarthe L, Fall A, Daube G, Coton E. 2017. Unraveling microbial ecology of industrial-scale Kombucha fermentations by metabarcoding and culture-based methods. *FEMS Microbiology Ecology* **93**.
- Crum H, LaGory A. 2016. *The big book of kombucha: brewing, flavoring, and enjoying the health benefits of fermented tea*. Storey Publishing, Los Angeles.
- de las Rivas B, Rodríguez H, Anguita J, Muñoz R. 2019. Bacterial tannases: classification and biochemical properties. *Applied Microbiology and Biotechnology* **103**:603–623.

- Deegan LH, Cotter PD, Hill C, Ross P. 2006. Bacteriocins: Biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. *International Dairy Journal* **16**:1058–1071.
- Duffy SJ, Keaney Jr JF, Holbrook M, Gokce N, Swerdloff PL, Frei B, Vita JA. 2001. Short- and Long-Term Black Tea Consumption Reverses Endothelial Dysfunction in Patients With Coronary Artery Disease. *Circulation* **104**:151–156.
- Dufresne C, Farnworth E. 2000a. Tea, Kombucha, and health: a review. *Food Research International* **33**:409–421.
- Dufresne C, Farnworth E. 2000b. Tea, Kombucha, and health: a review. *Food Research International* **33**:409–421.
- Edlin DAN, Narbad A, Gasson MJ, Dickinson JR, Lloyd D. 1998. Purification and characterization of hydroxycinnamate decarboxylase from *Brettanomyces anomalus*. *Enzyme and Microbial Technology* **22**:232–239.
- Emiljanowicz KE, Malinowska-Pańczyk E. 2020. Kombucha from alternative raw materials – The review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **60**:3185–3194.
- Ernst E. 2003. A systemic review of the clinical evidence. *Research in Complementary medicine* **10**:85–87.
- Esa F, Tasirin SM, Rahman NA. 2014. Overview of Bacterial Cellulose Production and Application. *Agriculture and Agricultural Science Procedia* **2**:113–119.
- Fang Y-Z, Yang S, Wu G. 2002. Free Radicals, Antioxidants, and Nutrition. *Nutrition*:872–871.
- Faria A, Fernandes I, Norberto S, Mateus N, Calhau C. 2014. Interplay between Anthocyanins and Gut Microbiota. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **62**:6898–6902.
- Fenga C, Gangemi S, Teodoro M, Rapisarda V, Golokhvast K, Docea AO, Tsatsakis AM, Costa C. 2017. 8-Hydroxydeoxyguanosine as a biomarker of oxidative DNA damage in workers exposed to low-dose benzene. *Toxicology Reports* **4**:291–295.
- Ferrieres J. 2004. The French paradox: lessons for other countries. *Heart* **90**:107–111.
- Frank G. 1995. *Kombucha: Healthy Beverage And Natural Remedy from the Far East*, 9th edition. Ennsthaler Gesellschaft M B H & Co, Austria.
- Fujita H, Yamagami T. 2008. Antihypercholesterolemic effect of Chinese black tea extract in human subjects with borderline hypercholesterolemia. *Nutrition Research* **28**:450–456.
- Gaggia F et al. 2018. Kombucha Beverage from Green, Black and Rooibos Teas: A Comparative Study Looking at Microbiology, Chemistry and Antioxidant Activity. *Nutrients* **11**:1.
- Ganceviciene R, Liakou AI, Theodoridis A, Makrantonaki E, Zouboulis CC. 2012. Skin anti-aging strategies. *Dermato-Endocrinology* **4**:308–319.
- Gargey IA, Indira D, Jayabalan R, Balasubramanian P. 2019. Optimization of Etherification Reactions for Recycling of Tea Fungal Biomass Waste into Carboxymethylcellulose. Pages 337–346.
- Goh WN, Rosma A, Kaur B, Fazilah A, Karim AA. 2012. Fermentation of black tea broth (Kombucha): I. Effects of sucrose concentration and fermentation time on the yield of microbial cellulose. *International Food Research Journal* **9**(1): 109-117.
- Gulcin İ. 2020. Antioxidants and antioxidant methods: an updated overview. *Archives of Toxicology* **94**:651–715
- Gulcin İ, Elmastaş M, Aboul-Enein HY. 2012. Antioxidant activity of clove oil – A powerful antioxidant source. *Arabian Journal of Chemistry* **5**:489–499.

- Gutteridge JMC, Halliwell B. 1989. Iron toxicity and oxygen radicals. *Baillière's Clinical Haematology* **2**:195–256.
- Gutteridge JMC, Halliwell B. 2010. Antioxidants: Molecules, medicines, and myths. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **393(4)**:561-564
- Gutteridge JMC, Halliwell B. 2018. Mini-Review: Oxidative stress, redox stress or redox success? *Biochemical and Biophysical Research Communications* **502**:183–186.
- Halliwell B, Gutteridge JM, Cross CE. 1992. Free radicals, antioxidants, and human disease: where are we now? *The Journal of laboratory and clinical medicine* **119**:598–620.
- Halliwell B, Gutteridge JMC. 2015. *Free Radicals in Biology and Medicine*, 5th edition. Oxford University Press, Oxford.
- Hashemipour MA, Lotfi S, Torabi M, Sharifi F, Ansari M, Ghassemi A, Sheikhshoae S. 2017. Evaluation of the Effects of Three Plant Species (*Myrtus Communis L.*, *Camellia Sinensis L.*, *Zataria Multiflora Boiss.*) on the Healing Process of Intraoral Ulcers in Rats. *Journal of dentistry (Shiraz, Iran)* **18**:127–135.
- Hayat K, Iqbal H, Malik U, Bilal U, Mushtaq S. 2015. Tea and Its Consumption: Benefits and Risks. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **55**:939–954.
- Hazafa A, Iqbal MO, Javaid U, Tareen MBK, Amna D, Ramzan A, Piracha S, Naeem M. 2022. Inhibitory effect of polyphenols (phenolic acids, lignans, and stilbenes) on cancer by regulating signal transduction pathways: a review. *Clinical and Translational Oncology* **24**:432–445.
- Heinrich M, Williamson EM, Gibbons S, Barnes J, Prieto-Garcia J. 2017. *Fundamentals of Pharmacognosy and Phytotherapy*, 3rd edition. Elsevier Health Sciences.
- Henning SM, Wang P, Heber D. 2011. Chemopreventive effects of tea in prostate cancer: Green tea versus black tea. *Molecular Nutrition & Food Research* **55**:905–920.
- Herrera-Ruiz M, Román-Ramos R, Zamilpa A, Tortoriello J, Jiménez-Ferrer JE. 2008. Flavonoids from *Tilia americana* with anxiolytic activity in plus-maze test. *Journal of Ethnopharmacology* **118**:312–317.
- Hirata K, Shimada K, Watanabe H, Otsuka R, Tokai K, Yoshiyama M, Homma S, Yoshikawa J. 2004. Black tea increases coronary flow velocity reserve in healthy male subjects. *The American Journal of Cardiology* **93**:1384–1388.
- Hodgson JM, Puddey IB, Burke V, Croft KD. 2006. Is reversal of endothelial dysfunction by tea related to flavonoid metabolism? *British Journal of Nutrition* **95**:14–17.
- Hoon LY, Choo C, Watawana MI, Jayawardena N, Waisundara VY. 2014. Kombucha 'tea fungus' enhances the tea polyphenol contents, antioxidant activity and alpha-amylase inhibitory activity of five commonly consumed teas. *Journal of Functional Foods* DOI: 10.1016/j.jff.2014.07.010.
- Huang S-H, Tseng J-C, Lin C-Y, Kuo Y-Y, Wang B-J, Kao Y-H, Muller CJF, Joubert E, Chuu C-P. 2019. Rooibos suppresses proliferation of castration-resistant prostate cancer cells via inhibition of Akt signaling. *Phytomedicine* **64** (e153068) DOI: 10.1016/j.phymed.2019.153068.
- Hur SJ, Lee SY, Kim Y-C, Choi I, Kim G-B. 2014. Effect of fermentation on the antioxidant activity in plant-based foods. *Food Chemistry* **160**:346–356.

- Iso H, Date C, Wakai K, Fukui M, Tamakoshi A. 2006. The Relationship between Green Tea and Total Caffeine Intake and Risk for Self-Reported Type 2 Diabetes among Japanese Adults. *Annals of Internal Medicine* **144**:554.
- Ivanišová E, Meňhartová K, Terentjeva M, Harangozo L, Kántor A, Kačániová M. 2020. The evaluation of chemical, antioxidant, antimicrobial and sensory properties of kombucha tea beverage. *Journal of Food Science and Technology* **57**:1840–1846.
- Jafari R, Naghavi NS, Khosravi-Darani K, Doudi M, Shahanipour K. 2020. Kombucha microbial starter with enhanced production of antioxidant compounds and invertase. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* **29** (e101789) DOI: 10.1016/j.bcab.2020.101789
- Jakubczyk K, Kałduńska J, Kochman J, Janda K. 2020. Chemical Profile and Antioxidant Activity of the Kombucha Beverage Derived from White, Green, Black and Red Tea. *Antioxidants* **9**:447.
- Jayabalan R, Chen P-N, Hsieh Y-S, Prabhakaran K, Pitchai P, Marimuthu S. 2011. Effect of solvent fractions of kombucha tea on viability and invasiveness of cancer cells-characterization of dimethyl 2-(2-hydroxy-2-methoxypropylidene) malonate and vitexin. *Indian Journal of Biotechnology* **2**:75–82.
- Jayabalan R, Malbaša R v., Lončar ES, Vitas JS, Sathishkumar M. 2014. A Review on Kombucha Tea-Microbiology, Composition, Fermentation, Beneficial Effects, Toxicity, and Tea Fungus. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* **13**:538–550.
- Jayabalan R, Marimuthu S, Swaminathan K. 2007. Changes in content of organic acids and tea polyphenols during kombucha tea fermentation. *Food Chemistry* **102**:392–398. Available from <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814606004250>.
- Jayabalan R, Subathradevi P, Marimuthu S, Sathishkumar M, Swaminathan K. 2008. Changes in free-radical scavenging ability of kombucha tea during fermentation. *Food Chemistry* **109**:227–234.
- José Santos Júnior R, Andrade Batista R, Alves Rodrigues S, Xavier Filho L, Silva Lima Á. 2009. Antimicrobial Activity of Broth Fermented with Kombucha Colonies. *Journal of Microbial & Biochemical Technology* **1**:72–78.
- Joubert E, de Beer D. 2011. Rooibos (*Aspalathus linearis*) beyond the farm gate: From herbal tea to potential phytopharmaceutical. *South African Journal of Botany* **77**:869–886.
- Joubert E, Gelderblom WCA, Louw A, de Beer D. 2008. South African herbal teas: *Aspalathus linearis*, *Cyclopia* spp. and *Athrixia phylicoides*—A review. *Journal of Ethnopharmacology* **119**:376–412.
- Kaewkod T, Bovonsombut S, Tragoolpua Y. 2019. Efficacy of Kombucha Obtained from Green, Oolong, and Black Teas on Inhibition of Pathogenic Bacteria, Antioxidation, and Toxicity on Colorectal Cancer Cell Line. *Microorganisms* **7**:700.
- Kallel L, Desseaux V, Hamdi M, Stocker P, Ajandouz EH. 2012. Insights into the fermentation biochemistry of Kombucha teas and potential impacts of Kombucha drinking on starch digestion. *Food Research International* **49**:226–232.
- Kanurić KG, Milanović SD, Ikonić BB, Lončar ES, Ilić MD, Vukić VR, Vukić DV. 2018. Kinetics of lactose fermentation in milk with kombucha starter. *Journal of Food and Drug Analysis* **26**:1229–1234.

- Karioti A, Chiarabini L, Alachkar A, Fawaz Chehna M, Vincieri FF, Bilia AR. 2014. HPLC–DAD and HPLC–ESI-MS analyses of *Tiliae flos* and its preparations. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **100**:205–214.
- Kayisoglu S, Coskun F. 2021. Determination of physical and chemical properties of kombucha teas prepared with different herbal teas. *Food Science and Technology* **41**:393–397.
- Kim K.H, Moon E, Kim S.Y, Choi SU, Lee K.R. 2012. Lignan constituents of *Tilia amurensis* and their biological evaluation on antitumor and anti-inflammatory activities. *Food and Chemical Toxicology* **50**:3680–3686.
- King RE, Bomser JA, Min DB. 2006. Bioactivity of Resveratrol. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* **5**:65–70.
- Kumar SD, Narayan G, Hassarajani S. 2008. Determination of anionic minerals in black and kombucha tea using ion chromatography. *Food Chemistry* **111**:784–788.
- Kurtzman C. 2001. *Zygosaccharomyces kombuchaensis*, a new ascosporegenous yeast from “Kombucha tea.” *FEMS Yeast Research* **1**:133–138.
- la Torre C, Fazio A, Caputo P, Plastina P, Caroleo MC, Cannataro R, Cione E. 2021. Effects of Long-Term Storage on Radical Scavenging Properties and Phenolic Content of Kombucha from Black Tea. *Molecules* **26**:5474.
- Laavanya D, Shirkole S, Balasubramanian P. 2021. Current challenges, applications and future perspectives of SCOBY cellulose of Kombucha fermentation. *Journal of Cleaner Production* **295** (e126454) DOI: 10.1016/j.bcab.2020.101789.
- Lambert JD, Elias RJ. 2010. The antioxidant and pro-oxidant activities of green tea polyphenols: A role in cancer prevention. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **501**:65–72.
- Lazzarino G, Listorti I, Bilotta G, Capozzolo T, Amorini A, Longo S, Caruso G, Lazzarino G, Tavazzi B, Bilotta P. 2019. Water- and Fat-Soluble Antioxidants in Human Seminal Plasma and Serum of Fertile Males. *Antioxidants* **8**:96.
- LeBlanc JG, Laiño JE, del Valle MJ, Vannini V, van Sinderen D, Taranto MP, de Valdez GF, de Giori GS, Sesma F. 2011. B-Group vitamin production by lactic acid bacteria - current knowledge and potential applications. *Journal of Applied Microbiology* **111**:1297–1309.
- Lee L-S, Kim S-H, Kim Y-B, Kim Y-C. 2014. Quantitative Analysis of Major Constituents in Green Tea with Different Plucking Periods and Their Antioxidant Activity. *Molecules* **19**:9173–9186.
- Li F, Wang Y, Li D, Chen Y, Qiao X, Fardous R, Lewandowski A, Liu J, Chan T-H, Dou QP. 2018. Perspectives on the recent developments with green tea polyphenols in drug discovery. *Expert opinion on drug discovery* **13**:643–660.
- Li S, Lo C-Y, Pan M-H, Lai C-S, Ho C-T. 2013. Black tea: chemical analysis and stability. *Food Funct.* **4**:10–18.
- Li S, Tan H-Y, Wang N, Zhang Z-J, Lao L, Wong C-W, Feng Y. 2015. The Role of Oxidative Stress and Antioxidants in Liver Diseases. *International Journal of Molecular Sciences* **16**:87–124.
- Lobo RO, Dias FO, Shenoy CK. 2017. Kombucha for healthy living: evaluation of antioxidant potential and bioactive compounds. *International Food Research Journal* **4(2)**: 541-546

- Lončar E, Djurić M, Malbaša R, Kolarov LJ, Klašnja M. 2006. Influence of Working Conditions Upon Kombucha Conducted Fermentation of Black Tea. *Food and Bioproducts Processing* **84**:186–192.
- López V, Cásedas G, Petersen-Ross K, Powrie Y, Smith C. 2022. Neuroprotective and anxiolytic potential of green rooibos (*Aspalathus linearis*) polyphenolic extract. *Food & Function* **13**:91–101.
- Malbaša R v., Lončar ES, Vitas JS, Čanadanović-Brunet JM. 2011. Influence of starter cultures on the antioxidant activity of kombucha beverage. *Food Chemistry* **127**:1727–1731.
- Mao X, Gu C, Chen D, Yu B, He J. 2017. Oxidative stress-induced diseases and tea polyphenols. *Oncotarget* **8** (e81649–81661) DOI: 10.18632/oncotarget.20887.
- Marsh AJ, O’Sullivan O, Hill C, Ross RP, Cotter PD. 2014. Sequence-based analysis of the bacterial and fungal compositions of multiple kombucha (tea fungus) samples. *Food Microbiology* **38**:171–178.
- Martin MA, Goya L, Ramos S. 2017. Protective effects of tea, red wine and cocoa in diabetes. Evidences from human studies. *Food and Chemical Toxicology* **109**:302–314.
- Martínez Leal J, Valenzuela Suárez L, Jayabalan R, Huerta Oros J, Escalante-Aburto A. 2018. A review on health benefits of kombucha nutritional compounds and metabolites. *CyTA - Journal of Food* **16**:390–399.
- Matsuda H, Ninomiya K, Shimoda H, Yoshikawa M. 2002. Hepatoprotective principles from the flowers of *Tilia argentea* (Linden): structure requirements of tiliroside and mechanisms of action. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **10**:707–712.
- Melnyk N, Pawłowska KA, Ziaja M, Wojnowski W, Koshovyi O, Granica S, Bazyłko A. 2021. Characterization of herbal teas containing lime flowers – *Tiliae flos* by HPTLC method with chemometric analysis. *Food Chemistry* **346** (e128929) DOI: 10.1016/j.foodchem.2020.128929.
- Milder IEJ, Arts ICW, Putte B van de, Venema DP, Hollman PCH. 2005. Lignan contents of Dutch plant foods: a database including lariciresinol, pinoresinol, secoisolariciresinol and matairesinol. *British Journal of Nutrition* **93**:393–402.
- Miranda JF, Ruiz LF, Silva CB, Uekane TM, Silva KA, Gonzalez AGM, Fernandes FF, Lima AR. 2022. Kombucha: A review of substrates, regulations, composition, and biological properties. *Journal of Food Science* **87**:503–527.
- Moharram HA, Youssef MM. 2014. Methods for Determining the Antioxidant Activity: A Review. *Page Alex. J. Fd. Sci. & Technol* **11**(1): 31-42
- Moore RJ, Jackson KG, Minihane AM. 2009. Green tea (*Camellia sinensis*) catechins and vascular function. *British Journal of Nutrition* **102**:1790–1802.
- Mousavi A, Vafa M, Neyestani T, Khamseh M, Hoseini F. 2013. The effects of green tea consumption on metabolic and anthropometric indices in patients with Type 2 diabetes. *Journal of research in medical sciences : the official journal of Isfahan University of Medical Sciences* **18**:1080–6.
- Muhialdin BJ, Osman FA, Wan Sapawi C, Hussin M. 2019. Effects of sugar sources and fermentation time on the properties of tea fungus (kombucha) beverage. *Page International Food Research Journal*.
- Mukhtar H, Ahmad N. 2000. Tea polyphenols: prevention of cancer and optimizing health. *The American Journal of Clinical Nutrition* **71**:1698-1702.

- Müllerová D. 2014. *Hygiena, Preventivní lékařství a Veřejné Zdravotnictví*, 1st edition. Karolinum Press, Praha.
- Munteanu IG, Apetrei C. 2021. Analytical Methods Used in Determining Antioxidant Activity: A Review. *International Journal of Molecular Sciences* **22**:3380.
- Nagao T, Hase T, Tokimitsu I. 2007. A Green Tea Extract High in Catechins Reduces Body Fat and Cardiovascular Risks in Humans. *Obesity* **15**:1473–1483.
- Naveed M et al. 2018. Pharmacological values and therapeutic properties of black tea (*Camellia sinensis*): A comprehensive overview. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **100**:521–531.
- Neffe-Skocińska K, Sionek B, Ścibisz I, Kołożyn-Krajewska D. 2017. Acid contents and the effect of fermentation condition of Kombucha tea beverages on physicochemical, microbiological and sensory properties. *CyTA - Journal of Food* **15**:601–607.
- Nilgün Özdemir, Ahmet Hilmi. 2017. Kombucha and Health. *J. of Health Science* **5** DOI: 10.17265/2328-7136/2017.05.005.
- Nummer BA. 2013. Kombucha brewing under the Food and Drug Administration model Food Code: risk analysis and processing guidance. *Journal of environmental health* **76**:8–11.
- Odegaard AO, Pereira MA, Koh W-P, Arakawa K, Lee H-P, Yu MC. 2008. Coffee, tea, and incident type 2 diabetes: the Singapore Chinese Health Study. *The American Journal of Clinical Nutrition* **88**:979–985.
- O’Leary KA, Pascual-Tereasa S de, Needs PW, Bao Y-P, O’Brien NM, Williamson G. 2004. Effect of flavonoids and Vitamin E on cyclooxygenase-2 (COX-2) transcription. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **551**:245–254.
- Opletal L, Chlebek J, Macáková K, Benešová N. 2013. Antioxidanty a degenerativní onemocnění. *Praktické lékařství*:135–138. Available from www.praktickelekarenstvi.cz.
- Pastoriza S, Mesías M, Cabrera C, Rufián-Henares JA. 2017. Healthy properties of green and white teas: an update. *Food & Function* **8**:2650–2662.
- Petyaev IM. 2016. Lycopene Deficiency in Ageing and Cardiovascular Disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* **2016**:1–6.
- Pokorný J, Yanishlievá N, Gordon M. 2001. *Antioxidants in food: practical applications*. Woodhead Publishing Limited and CRC Press, Cambridge.
- Prasanth M, Sivamaruthi B, Chaiyasut C, Tencomnao T. 2019. A Review of the Role of Green Tea (*Camellia sinensis*) in Antiphotaging, Stress Resistance, Neuroprotection, and Autophagy. *Nutrients* **11**:474.
- Rahman T, Hosen I, Islam MMT, Shekhar HU. 2012. Oxidative stress and human health. *Advances in Bioscience and Biotechnology* **03**:997–1019.
- Rajendran P, Nandakumar N, Rengarajan T, Palaniswami R, Gnanadhas EN, Lakshminarasiah U, Gopas J, Nishigaki I. 2014, September 25. *Antioxidants and human diseases*. Elsevier.
- Ray PD, Huang BW, Tsuji Y. 2012. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling **24**: 981–990
- Roberts JD, Roberts MG, Tarpey MD, Weekes JC, Thomas CH. 2015. The effect of a decaffeinated green tea extract formula on fat oxidation, body composition and exercise performance. *Journal of the International Society of Sports Nutrition* **12**:1.

- Santesso N, Manheimer E. 2014. A Summary of a Cochrane Review: Green and Black Tea for the Primary Prevention of Cardiovascular Disease. *Global Advances in Health and Medicine* **3**:66–67.
- Sasaki M, Nishida N, Shimada M. 2018. A Beneficial Role of Rooibos in Diabetes Mellitus: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Molecules* **23**:839.
- Scalbert A, Johnson IT, Saltmarsh M. 2005. Polyphenols: antioxidants and beyond. *The American Journal of Clinical Nutrition* **81**:215-217.
- Serafini M. 2006. The role of antioxidants in disease prevention. *Medicine* **34**:533–535.
- Sharifi-Rad M et al. 2020. Lifestyle, Oxidative Stress, and Antioxidants: Back and Forth in the Pathophysiology of Chronic Diseases. *Frontiers in Physiology* (e1-21) DOI: 0.3389/fphys.2020.00694.
- Sharma C, Bhardwaj NK. 2019. Biotransformation of fermented black tea into bacterial nanocellulose via symbiotic interplay of microorganisms. *International Journal of Biological Macromolecules* **132**:166–177.
- Sharma OP, Bhat TK. 2009. DPPH antioxidant assay revisited. *Food Chemistry* **113**:1202–1205.
- Sievers M, Lanini C, Weber A, Schuler-Schmid U, Teuber M. 1995. Microbiology and Fermentation Balance in a Kombucha Beverage Obtained from a Tea Fungus Fermentation. *Systematic and Applied Microbiology* **18**:590–594.
- Sindhi V, Gupta V, Sharma K, Bhatnagar S, Kumari R, Dhaka N. 2013. Potential applications of antioxidants – A review. *Journal of Pharmacy Research* **7**:828–835.
- Singh BN, Prateeksha, Rawat AKS, Bhagat RM, Singh BR. 2017. Black tea: Phytochemicals, cancer chemoprevention, and clinical studies. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **57**:1394–1410.
- Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventós RM. 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. Pages 152–178.
- Smith C, Swart A. 2018. *Aspalathus linearis* (Rooibos) – a functional food targeting cardiovascular disease. *Food & Function* **9**:5041–5058.
- Soares MG, de Lima M, Reolon Schmidt VC. 2021. Technological aspects of kombucha, its applications and the symbiotic culture (SCOBY), and extraction of compounds of interest: A literature review. *Trends in Food Science & Technology* **110**:539–550.
- SungHee Kole A, Jones HD, Christensen R, Gladstein J. 2009. A Case of Kombucha Tea Toxicity. *Journal of Intensive Care Medicine* **24**:205–207.
- Talebi M, Frink LA, Patil RA, Armstrong DW. 2017. Examination of the Varied and Changing Ethanol Content of Commercial Kombucha Products. *Food Analytical Methods* **10**:4062–4067.
- Teran M del M, de Moreno de LeBlanc A, Savoy de Giori G, LeBlanc JG. 2021. Thiamine-producing lactic acid bacteria and their potential use in the prevention of neurodegenerative diseases. *Applied Microbiology and Biotechnology* **105**:2097–2107.
- Toker G, Aslan M, Yeşilada E, Memişoğlu M, Ito S. 2001. Comparative evaluation of the flavonoid content in officinal *Tiliae flos* and Turkish lime species for quality assessment. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **26**:111–121.

- Torino MI, Limón RI, Martínez-Villaluenga C, Mäkinen S, Pihlanto A, Vidal-Valverde C, Frias J. 2013. Antioxidant and antihypertensive properties of liquid and solid state fermented lentils. *Food Chemistry* **136**:1030–1037.
- Trujillo J, Chirino YI, Molina-Jijón E, Andérica-Romero AC, Tapia E, Pedraza-Chaverri J. 2013. Renoprotective effect of the antioxidant curcumin: Recent findings. *Redox Biology* **1**:448–456.
- Tsao R. 2010. Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols. *Nutrients* **2**:1231–1246.
- Tu P, Tawata S. 2015. Anti-Oxidant, Anti-Aging, and Anti-Melanogenic Properties of the Essential Oils from Two Varieties of *Alpinia zerumbet*. *Molecules* **20** (e16723–16740) DOI:10.3390/molecules200916723.
- Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M, Telser J. 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease **39(1)**:44-84
- van Heerden FR, van Wyk B-E, Viljoen AM, Steenkamp PA. 2003. Phenolic variation in wild populations of *Aspalathus linearis* (rooibos tea). *Biochemical Systematics and Ecology* **31**:885–895.
- Velićanski A, Cvetković D, Markov S. 2013. Characteristics of Kombucha fermentation on medicinal herbs from Lamiaceae family. *Romanian Biotechnological Letters* **18(1)**: 8034-8042
- Vijayaraghavan R, Singh M, Rao PVL. 2000. Sub-acute (90 days) oral toxicity studies of Kombucha tea. *Biomedical and Environmental Sciences* **13**:293–299.
- Villarreal-Soto SA, Beaufort S, Bouajila J, Souchart J-P, Taillandier P. 2018. Understanding Kombucha Tea Fermentation: A Review. *Journal of Food Science* **83**:580–588.
- Vitas J, Malbasa R, Grahovac J, Loncar E. 2013. The antioxidant activity of kombucha fermented milk products with stinging nettle and winter savory. *Chemical Industry and Chemical Engineering Quarterly* **19**:129–139.
- Voidarou C, Antoniadou M, Rozos G, Tzora A, Skoufos I, Varzakas T, Lagiou A, Bezirtzoglou E. 2020. Fermentative Foods: Microbiology, Biochemistry, Potential Human Health Benefits and Public Health Issues. *Foods* **10**:69.
- Vuong Q v., Stathopoulos CE, Nguyen MH, Golding JB, Roach PD. 2011. Isolation of Green Tea Catechins and Their Utilization in the Food Industry. *Food Reviews International* **27**:227–247.
- Watawana MI, Jayawardena N, Gunawardhana CB, Waisundara VY. 2015. Health, Wellness, and Safety Aspects of the Consumption of Kombucha. *Journal of Chemistry* **2015**:1–11.
- Watawana MI, Jayawardena N, Ranasinghe SJ, Waisundara VY. 2017. Evaluation of the Effect of Different Sweetening Agents on the Polyphenol Contents and Antioxidant and Starch Hydrolase Inhibitory Properties of Kombucha. *Journal of Food Processing and Preservation* **41** (e12752) DOI: 10.1111/jfpp.12752.
- Webb AL, McCullough ML. 2005. Dietary Lignans: Potential Role in Cancer Prevention. *Nutrition and Cancer* **51**:117–131.
- Wierzejska R. 2014. Tea and health-a review of the current state of knowledge. *Przegląd epidemiologiczny* **68**:501–6, 595–9.
- Wolfe BE, Dutton RJ. 2015. Fermented Foods as Experimentally Tractable Microbial Ecosystems. *Cell* **161**:49–55.

- Wu C-H, Lu F-H, Chang C-S, Chang T-C, Wang R-H, Chang C-J. 2003. Relationship among Habitual Tea Consumption, Percent Body Fat, and Body Fat Distribution. *Obesity Research* **11**:1088–1095.
- Xiong Z-M, O'Donovan M, Sun L, Choi JY, Ren M, Cao K. 2017. Anti-Aging Potentials of Methylene Blue for Human Skin Longevity. *Scientific Reports* **7**:2475.
- Xu Y-Q, Zou C, Gao Y, Chen J-X, Wang F, Chen G-S, Yin J-F. 2017. Effect of the type of brewing water on the chemical composition, sensory quality and antioxidant capacity of Chinese teas. *Food Chemistry* **236**:142–151.
- Yang CS, Hong J. 2013. Prevention of Chronic Diseases by Tea: Possible Mechanisms and Human Relevance. *Annual Review of Nutrition* **33**:161–181.
- Yang Z-W, Ji B-P, Zhou F, Li B, Luo Y, Yang L, Li T. 2009. Hypocholesterolaemic and antioxidant effects of kombucha tea in high cholesterol fed mice. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **89**:150–156.
- Young IS, Woodside J. 2001. Antioxidants in health and disease. *Journal of Clinical Pathology* **54(3)**: 176-186
- Yu Y, Deng Y, Lu B, Liu Y, Li J, Bao J. 2014. Green tea catechins: a fresh flavor to anticancer therapy. *Apoptosis* **19**:1–18.
- Zhang HC, Zhang TZ, Xin XL. 2011. Isolation and identification of microorganisms from kombucha fungus culture. *Natural Sciences* **2**: 118-132.
- Zheng X-X, Xu Y-L, Li S-H, Liu X-X, Hui R, Huang X-H. 2011. Green tea intake lowers fasting serum total and LDL cholesterol in adults: a meta-analysis of 14 randomized controlled trials. *The American Journal of Clinical Nutrition* **94**:601–610.
- Zubaidah E, Ifadah RA, Kalsum U, Lyrawati D, Putri WDR, Srianta I, Blanc PJ. 2019. Anti-diabetes activity of Kombucha prepared from different snake fruit cultivars. *Nutrition & Food Science* **49**:333–343.

9 Seznam použitých zkratek a symbolů

ABTS – kyselina 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonová)
BHA – butylovaný hydroxyanisol
BHT – butylovaný hydroxytoluen
C – katechin
CAT – kataláza
DPPH 2,2-di(4-terc-oktylfenyl)-1-pikrylhydrazyl
EC – epikatechin
EGC – epigalokatechin
EGCG – epigalokatechin galát
EKG – epikatechin galát
F-C – Folin-Ciocalteu
GAE ekvivalenty gallové kyseliny (gallic acid equivalents)
GC – gallokatechin
GCG – galokatechin galát
GPx - glutathionperoxidáza
HAT, hydrogen atom transfer – přenos atomu vodíku
IC 50–50% inhibiční koncentrace
LDL – nízkodenzitní lipoprotein
OG – oktylgalát
ORAC – Oxygen Radical Absorption Capacity
PG – propylgalát
RNS, Reactive Nitrogen Species – reaktivní formy dusíku
RONS – ROS a RNS
ROS, Reactive Oxygen Species – reaktivní formy kyslíku
SCOBY, Symbiotic Culture of Bacteria and Yeast – symbiotické spojení bakterií a kvasinek
SET, single electron transfer – přenos jednoho elektronu
SOD – superoxiddismutáza
TBHQ – terc-butylhydrochinon
TEAC – Trolox equivalent antioxidant capacity
TF – theaflaviny
TPC – total phenolic content
TR – thearubiginy