

Mikrobiota vybraných fermentovaných nealkoholických nápojů

Bc. Sára Sošková

Diplomová práce
2025



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav technologie potravin

Akademický rok: 2024/2025

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: Bc. Sára Sošková
Osobní číslo: T23268
Studijní program: N0721A210004 Technologie potravin
Forma studia: Prezenční
Téma práce: Mikrobiota vybraných fermentovaných nealkoholických nápojů

Zásady pro vypracování

Vypracujte literární rešerši zaměřenou na mikrobiotu fermentovaných nealkoholických nápojů. Zaměřte se na symbiotickou mikrobiotu a faktory, které mohou ovlivňovat její růst a také na metody identifikace mikroorganismů. Z fermentovaných nealkoholických nápojů izolujte mikroorganismy. Izolované mikroorganismy identifikujte dostupnými konvenčními i molekulárně biologickými metodami. Výsledky vyhodnotte, diskutujte a formulujte závěry práce.

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

Seznam doporučené literatury:

- [1] AUNG, Thinzar a Mi Jeong KIM, 2024. A comprehensive review on kombucha biofilms: A promising candidate for sustainable food product development. *Trends in Food Science & Technology*, 144. Dostupné z: doi:10.1016/j.tifs.2024.104325
- [2] JAYABALAN, Rasu, Radomir V. MALBAŠA, Eva S. LONČAR, Jasmina S. VITAS a Muthuswamy SATHISHKUMAR, 2014. A Review on Kombucha Tea – Microbiology, Composition, Fermentation, Beneficial Effects, Toxicity, and Tea Fungus. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13(4), 538-550. Dostupné z: doi:10.1111/1541-4337.12073
- [3] PENDÓN, María Dolores, Ana Agustina BENGÓA, Carolina IRAPORDA, Micaela MEDRANO, Graciela L. GARROTE a Analía G. ABRAHAM, 2022. Water kefir: Factors affecting grain growth and health-promoting properties of the fermented beverage. *Journal of Applied Microbiology*, 133(1), 162-180. Dostupné z: doi:10.1111/jam.15385
- [4] CHONG, Ann Qi, Siew Wen LAU, Nyuk Ling CHIN, Rosnita A. TALIB a Roseliza Kadir BASHA, 2023. Fermented Beverage Benefits: A Comprehensive Review and Comparison of Kombucha and Kefir Microbiome. *Microorganisms*, 11(5). Dostupné z: doi:10.3390/microorganisms11051344
- [5] LYNCH, Kieran M., Stuart WILKINSON, Luk DAENEN a Elke K. ARENDT, 2021. An update on water kefir: Microbiology, composition and production. *International Journal of Food Microbiology*, 345. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2021.109128
- [6] Elektronické zdroje dostupné z knihovny UTB ve Zlíně

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

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

L.S.

prof. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan

Ing. Robert Gál, Ph.D.
ředitel ústavu

Ve Zlíně dne 14. února 2025

PROHLÁŠENÍ AUTORA DIPLOMOVÉ PRÁCE

Beru na vědomí, že

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

Prohlašuji, že

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

Ve Zlíně, dne

.....
podpis autora

ABSTRAKT

Tato diplomová práce se zabývá mikrobiotou vybraných fermentovaných nealkoholických nápojů – kombuchy a vodního kefiru. Cílem práce bylo analyzovat bakteriální a kvasinkové složení těchto nápojů a sledovat vliv různých podmínek fermentace, konkrétně koncentrace sacharózy a typu použitého čaje, na rozmanitost mikroorganismů.

Ke stanovení mikrobiálního profilu byly využity jak tradiční kultivační metody, tak moderní molekulárně biologické techniky. Práce se zaměřuje na srovnání mikrobiálního složení za různých podmínek a na význam těchto mikroorganismů pro výsledné vlastnosti fermentovaných nápojů. Výsledky ukázaly, že mikrobiální složení fermentovaných nápojů je značně ovlivněno složením média. Rod *Leuconostoc* se vyskytoval napříč všemi vzorky, zatímco jiné rody, jako například *Gluconobacter*, byly citlivější na změny v koncentraci čaje či cukru. Zjištěné rozdíly potvrzují, že typ substrátu a jeho koncentrace hrají významnou roli při formování mikrobiálního společenství, a tím i výsledné kvality nápoje.

Klíčová slova: kombucha, vodní kefir, fermentace, mikroorganismy

ABSTRACT

This thesis explores the microbiota of selected fermented non-alcoholic beverages—specifically kombucha and water kefir. The aim of the study was to analyze the bacterial and yeast composition of these drinks and to examine how different fermentation conditions, namely sucrose concentration and the type of tea used, affect microbial diversity.

To determine the microbial profile, both traditional cultivation techniques and modern molecular biology methods were employed. The research focuses on comparing microbial communities under varying conditions and on the role these microorganisms play in shaping the final properties of the fermented beverages.

The results showed that the microbial composition of the drinks is significantly influenced by the composition of the fermentation medium. The genus *Leuconostoc* appeared consistently across all samples, whereas others, such as *Gluconobacter*, were more sensitive to variations in tea or sugar concentration. These findings confirm that both the type and concentration of the substrate play a crucial role in shaping the microbial ecosystem—and, by extension, the overall quality of the beverage.

Keywords: kombucha, water kefir, fermentation, microorganism

Velmi děkuji paní profesorce RNDr. Leoně Buňkové, Ph.D., vedoucí této diplomové práce za ochotu, vstřícnost, pomoc, podporu a cenné rady které mi při jejím vypracování poskytla.

OBSAH

ÚVOD.....	11
I TEORETICKÁ ČÁST	12
1 KOMBUCHA.....	13
1.1 HISTORIE VÝROBY	14
1.2 PŘÍPRAVA KOMBUCHY	14
1.3 CHEMICKÉ SLOŽENÍ.....	15
1.3.1 Sacharidy.....	15
1.3.2 Kofein.....	15
1.3.3 Fenolické látky	16
1.3.4 Organické kyseliny.....	16
1.3.5 Vitamíny.....	17
1.3.6 Minerální látky	18
1.4 FERMENTACE	19
1.4.1 Biofilm kombuchy	19
1.4.2 Metabolismus mikroorganismů během fermentace	20
2 MIKROBIÁLNÍ SLOŽENÍ KOMBUCHY	22
2.1 BAKTERIE.....	23
2.2 KVASINKY.....	24
3 VLIV VNĚJŠÍCH PODMÍNEK NA VLASTNOSTI KOMBUCHY	26
3.1 DRUH SLADIDLA.....	26
3.2 DRUH ČAJE	26
3.2.1 Zelený čaj	27
3.2.2 Černý čaj	27
3.2.3 Bílý čaj	27
3.2.4 Bylinné čaje.....	27
3.3 TEPLOTA	27
3.3.1 Vliv teploty na kvasinky	28
3.3.2 Vliv teploty na bakterie	28
3.3.3 Vliv teploty na organoleptické změny kombuchy	28
3.4 DÉLKA FERMENTACE.....	29
4 VLIV KOMBUCHY NA LIDSKÝ ORGANISMUS	30
4.1 PROBIOTICKÉ A PREBIOTICKÉ ÚČINKY	30
4.2 ANTIOXIDAČNÍ ÚČINKY	30
4.3 ANTIMIKROBNÍ ÚČINKY.....	30
4.4 PROTIRAKOVINNÉ ÚČINKY	31
5 VODNÍ KEFÍR.....	32
5.1 HISTORIE VÝROBY VODNÍHO KEFÍRU	32

5.2	VÝROBA VODNÍHO KEFÍRU	32
5.3	BIOFILM VODNÍHO KEFÍRU.....	33
5.4	MIKROBIÁLNÍ SPOLEČENSTVÍ VODNÍHO KEFÍRU	33
5.5	DYNAMIKA FERMENTACE VODNÍHO KEFÍRU	34
5.6	FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ RŮST ZRN VODNÍHO KEFÍRU	36
II	PRAKTICKÁ ČÁST	38
6	CÍLE PRÁCE.....	39
7	POUŽITÝ MATERIÁL A ZAŘÍZENÍ	40
7.1	POMŮCKY A PŘÍSTROJE.....	40
7.2	ROZTOKY A CHEMIKÁLIE	41
7.3	CHARAKTERISTIKA VZORKŮ.....	42
8	METODIKA.....	45
8.1	KULTIVAČNÍ ROZBOR A STANOVENÍ POČTU MIKROORGANISMŮ	45
8.1.1	Kultivační půdy	45
8.1.2	Příprava vzorků pro kultivaci	47
8.2	IZOLACE MIKROORGANISMŮ	48
8.3	BARVENÍ DLE GRAMA	48
8.4	IZOLACE DNÁ MIKROORGANISMŮ	49
8.5	POLYMERÁZOVÁ ŘETĚZOVÁ REAKCE	50
8.6	ELEKTROFORÉZA	52
8.7	SEKVENACE A IDENTIFIKACE IZOLOVANÝCH MIKROORGANISMŮ.....	53
9	VÝSLEDKY A DISKUZE	56
9.1	MIKROBIOLOGICKÉ ANALÝZA KOMBUCH A VODNÍCH KEFÍRŮ.....	56
9.2	SOUHRNNÁ DISKUZE.....	78
10	ZÁVĚR	83
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	85
	SEZNAM OBRÁZKŮ	96
	SEZNAM TABULEK.....	97
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	99

ÚVOD

Fermentované potraviny a nápoje patří mezi tradiční součást lidské výživy a v posledních letech zažívají renesanci díky rostoucímu zájmu o zdravý životní styl a přirozené zdroje probiotik. Vedle mléčných výrobků se stále více do popředí zájmu dostávají fermentované nealkoholické nápoje, mezi které patří zejména kombucha a vodní kefir. Tyto nápoje jsou výsledkem činnosti komplexních mikrobiálních společenství, jejichž složení a aktivita mají zásadní vliv na výsledné senzorické, chemické i zdravotní vlastnosti nápojů.

Kombucha, připravovaná fermentací oslazeného čaje pomocí symbiotické kultury bakterií a kvasinek (SCOBY), je známá svými osvěžujícími vlastnostmi a potenciálními přínosy pro zdraví. Vodní kefir, méně známý, avšak nutričně hodnotný nápoj, vzniká fermentací roztoku sacharózy s ovocem za přítomnosti kefírových zrn tvořených specifickou mikrobiotou. V obou případech jde o dynamické mikrobiální ekosystémy, jejichž složení je ovlivněno mnoha faktory – typem a koncentrací substrátu, teplotou, délkou fermentace i geografickým původem kultur.

Složení mikrobioty těchto nápojů má přímý vliv nejen na jejich výslednou chuť, vůni a konzistenci, ale také na obsah bioaktivních látek, jako jsou organické kyseliny, vitamíny či enzymy. Mikroorganismy se navíc navzájem ovlivňují, soutěží o živiny a podílejí se na metabolických přeměnách substrátů, čímž vytvářejí komplexní interakce v průběhu fermentačního procesu.

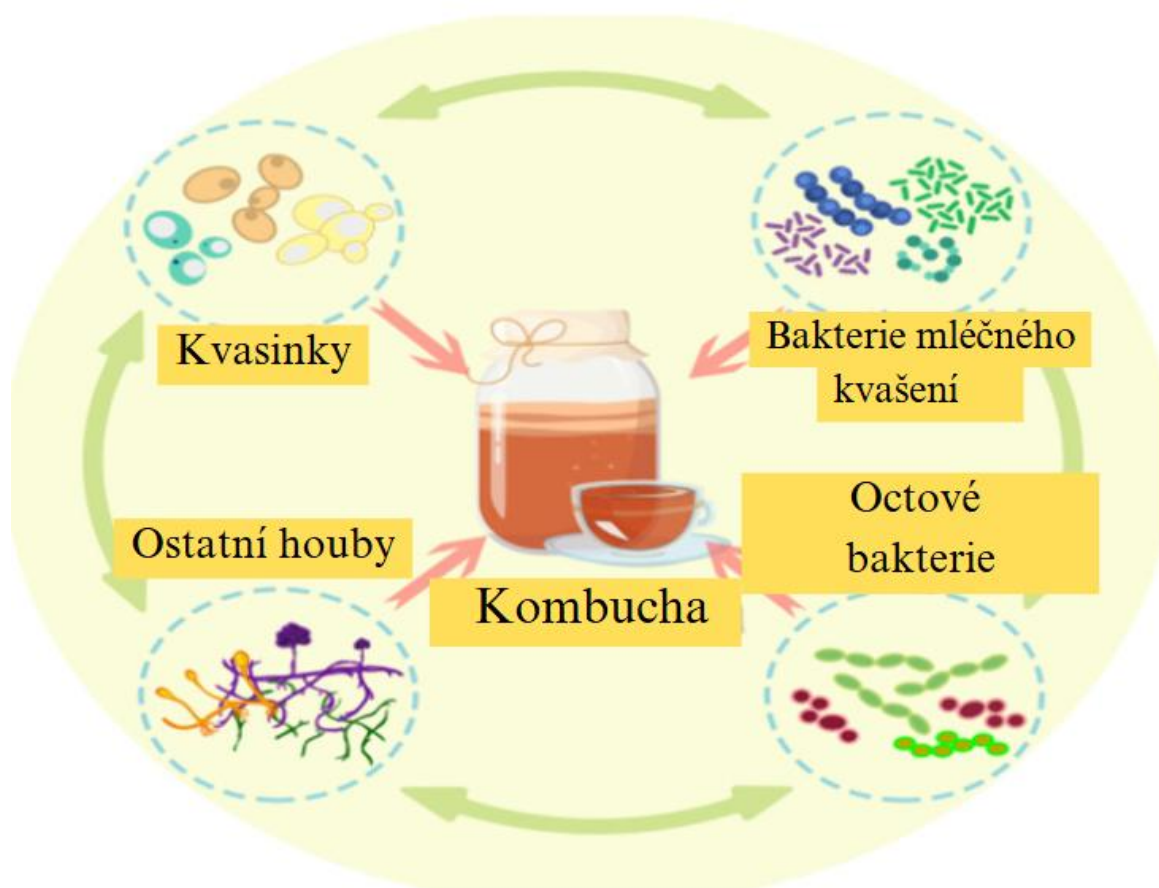
Vzhledem k tomu, že tyto nápoje nejsou výsledkem řízené fermentace jedním kmenem, ale spolupůsobením širokého spektra kvasinek a bakterií, je studium jejich mikrobiálního složení důležité nejen z hlediska technologického, ale i z pohledu kvality a stability produktu. Tradiční kultivační metody poskytují základní informace o přítomnosti dominantních mikroorganismů, zatímco moderní molekulárně biologické techniky umožňují přesnější identifikaci i těch druhů, které nelze snadno kultivovat.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 KOMBUCHA

Etymologie slova *kombucha* může pocházet ze dvou japonských slov *kombu*, pro mořské řasy, a *cha* pro čaj (Coton et al., 2017).

Kombucha je tradiční fermentovaný nápoj vyrobený ze slazeného čaje pomocí symbiotické kultury bakterií a kvasinek zvané SCOBY (Obr. 1; Huang, 2024, s.1610-1625). Je však také známa jako čajová houba (De Filippis et al., 2018). V průběhu fermentace vytváří mikrobiální komunita typicky hustý celulózový biofilm na rozhraní mezi kapalinou a vzduchem. Na fermentaci nápoje kombucha se podílí celá řada mikroorganismů. Mezi ně řadíme kvasinky, octové bakterie neboli AAB (acetic acid bacteria), bakterie mléčného kvašení a ostatní houby (Huang, 2024, s.1610-1625).



Obrázek 1 Popis symbiotické kultury SCOBY (upraveno podle Huang, 2024, s.1610-1625).

1.1 Historie výroby

Kombucha má dlouhou historii používání a výroby. Počátek výroby se datuje tisíce let do minulosti (Coton et al., 2017). Původ kombuchy zůstává záhadou, ale předpokládá se, že kombucha byla poprvé aplikována ve východní Asii pro své terapeutické účinky v roce 220 před naším letopočtem. Nicméně se ukázalo, že pochází ze severovýchodní Číny, kde byla pro své detoxikační a energetické vlastnosti využita během panování dynastie Tsin (Coelho et al., 2020, Huang 2024, s.1610-1625). Postupem času se kombucha díky rozvinutí obchodních cest rozšířila dále po kontinentu. Stala se populární v Koreji, Japonsku a později také ve Spojených státech (Huang, 2024, s. 1610–1625). V současné době se kombucha stala velmi populární v západním světě, konkrétně v Severní Americe. Svůj úspěch také sklízí v Evropě (Coton et al., 2017).

1.2 Příprava kombuchy

Kombucha se tradičně připravuje na bázi černého nebo zeleného čaje ve skleněné nádobě. Poměry čaje, cukru a vody se mohou lišit dle regionu nebo preferencí spotřebitelů. Měním se faktorem při přípravě kombuchy je také teplota, při které probíhá fermentace (Coelho et al., 2020).

Obecně platí, že pro přípravu kombuchy se nejprve připraví čajový nálev s cukrem, který slouží jako substrát pro bakterie a kvasinky. Poměry čaje a cukru mohou být následovné; čaj: sacharóza (Coelho et al., 2020, Jayabalan et al., 2016)

- 0,5 % čaje a 5 % sacharózy (Jayabalan et al., 2016)
- 5 % čaje a 10 % sacharózy (Coelho et al., 2020)
- 0,8 % čaje a 8 % sacharózy (Gaggia et al., 2019)

Následně se směs ochladí na pokojovou teplotu, aby nedošlo k tepelné inaktivaci mikroorganismů. Do směsi se poté přidá SCOBY společně s 10-20 % přídavkem již fermentovaného nápoje (Coelho et al., 2020).

Dalším klíčovým faktorem při přípravě kombuchy je výběr skladovací nádoby. Vzhledem k intenzivní tvorbě organických kyselin během fermentace jsou za vhodné materiály považovány nádoby ze skla nebo nerezové oceli. Naopak nevhodné materiály jsou olověné nebo keramické nádoby, z těchto materiálů se během fermentace mohou do nápoje uvolňovat toxické sloučeniny (Coelho et al., 2020).

Nádoba se směsí čaje, cukru a SCOBY by měla být překryta pouze gázou a nesmí být v první fázi fermentace zcela uzavřena z důvodu probíhajících aerobních pochodů. Takto připravená kombucha se nechá fermentovat při teplotě od 20 °C do 30 °C po dobu 7–14 dní (Coelho et al., 2020, Jayabalan et al., 2016, Watawana et al., 2015)

1.3 Chemické složení

Kombucha obsahuje velké množství zdraví prospěšných látek, které pocházejí z čaje anebo vznikají jako produkty během fermentace. Mezi tyto látky můžeme zařadit fenolické látky, organické kyseliny, vitamíny, enzymy a v minoritním množství také aminokyseliny. Kolísavá koncentrace funkčních metabolitů je ovlivněna zdroji uhlíku, koncentrací čaje, dobou a teplotou fermentace (Huang, 2024, s.1610-1625).

Konečný produkt, který se tradičně získává fermentací slazeného černého nebo zeleného čaje, je obzvláště bohatý na obsah organických kyselin a CO₂. Přestože je považován za nealkoholický nápoj, stopy etanolu obsahuje (Coton et al., 2017).

1.3.1 Sacharidy

Hlavním zdrojem sacharidů v nápoji je sacharóza. Sacharóza je v průběhu fermentace metabolizována kvasinkami na fruktózu a glukózu. Glukóza je dále využívána octovými bakteriemi, které ji přeměňují na kyselinu glukonovou (Laureys et al., 2020).

1.3.2 Kofein

Kofein je známý jako přírodní purinový alkaloid se stimulačními účinky. Kombucha obsahuje kofein, který do ní přechází z čajových lístků. Koncentrace kofeinu se v čajových lístcích může výrazně lišit a tuto koncentraci ovlivňuje celá řada faktorů. Mezi tyto faktory patří podmínky pěstování, metody sklizně nebo technika zpracování po sklizni. Obsah kofeinu také ovlivňuje způsob přípravy čaje (Huang, 2024, s.1610-1625). Konkrétní obsah kofeinu v nápoji kombucha se může lišit v závislosti od typu použitého čaje (Tabulka 1) a délky fermentace (Tran et al., 2020).

Kofein plní také úlohu při fermentačních procesech. Kofein podporuje metabolické a proliferační procesy v kvasinkách a bakteriích. Slouží jako významný zdroj dusíku, který je nezbytný pro metabolismus mikroorganismů (Villarreal-Soto et al., 2020).

Tabulka 1 Obsah kofeinu v jednotlivých druzích čaje (Yi et al., 2015)

Druh čaje	Obsah kofeinu (mg/g)
Zelený čaj	$34,86 \pm 4,32$
Bílý čaj	$27,17 \pm 5,37$
Černý čaj	$28,54 \pm 3,68$
Čaj Oolong	$19,67 \pm 2,95$

Přítomnost kofeinu pozitivně ovlivňuje organoleptické vlastnosti kombuchy. (Tran et al., 2020). Kromě stimulačních účinků má kofein také antioxidační aktivitu, která může doplňovat antioxidační kapacitu jiných sloučenin přítomných v nápoji, čímž může přispívat k jejím celkovým účinkům na podporu zdraví (LV et al., 2017, Huang, 2024, s.1610-1625).

1.3.3 Fenolické látky

Nejčastějšími fenolickými látkami vyskytujícími se v nápoji kombucha jsou epikatechin, epigalokatechin, epikatechingalát a epigalokatechingalát. Tyto látky se do nápoje dostávají difuzí z čajových lístků. Fenolické látky mají významné antioxidační účinky (Coelho et al., 2022). Koncentrace fenolických látek ve výsledném nápoji se liší na základě použitého typu čaje. Bylo zjištěno, že při použití zeleného čaje je hladina těchto látek vyšší než u nápoje vyrobeného z čaje černého. To lze přičíst významně vyšším hladinám polyfenolů a flavonoidů v zeleném čaji ve srovnání s černým čajem (Huang, 2024, s. 1610–1625).

1.3.4 Organické kyseliny

V průběhu fermentace se tvoří značné množství různých organických kyselin. V majoritním množství se tvoří kyseliny octová, glukonová, glukuronová a mléčná (Tabulka 2) (Teoh et al., 2004, Coelho et al., 2020). V minoritním množství se tvoří kyseliny jablečná, citronová, vinná, listová, malonová, šťavelová nebo pyrohroznová (Jayabalan et al., 2014).

Kyselina octová je zodpovědná za kyselé aroma a chuť v kombuše. Její koncentrace se na počátku fermentace zvyšuje a ke konci fermentace její hladina klesá. Pokles hladiny je zapříčiněn využitím kyseliny octové jako uhlíkového substrátu pro bakterie při vyčerpání sacharózy (Martínez et al., 2018).

Kyselina mléčná má významné detoxikační účinky v lidském těle. Váže se na toxické sloučeniny přítomné v játrech a pomáhá k jejich účinnějšímu vylučování. Slouží také jako prekurzor vitamínu C. Hladina kyseliny mléčné je vyšší v nápojích kombucha, které byly připraveny ze zeleného čaje (Nguyen et al., 2015).

Tabulka 2 Závislost koncentrace organických kyselin v nápoji kombucha na množství sacharózy a době fermentace (Villarreal-Soto et al., 2018).

Organická kyselina	Koncentrace kyseliny (g/l)	Počáteční množství sacharózy (g/l)	Doba fermentace (dny)
Kyselina octová	5,6	70	15
Kyselina octová	8,36	100	18
Kyselina octová	11	100	30
Kyselina mléčná	0,18	100	18
Kyselina glukonová	39	100	60
Kyselina glukonová	0,0160	70	21

1.3.5 Vitamíny

Vitamíny jsou základními složkami mnoha biochemických a fyziologických procesů (Ivanišová et al., 2020). Vitamíny mají vynikající antioxidační aktivitu díky svému redoxnímu potenciálu a jsou prospěšné pro lidské zdraví (Vitas et al., 2018). Kombucha obsahuje celou řadu vitamínů rozpustných ve vodě. Obsahuje vitamíny skupiny B (thiamin, riboflavin, niacin, kyselinu pantotenovou, pyridoxin, biotin, kyselinu listovou a kobalamin) a vitamín C. Tyto vitamíny pocházejí především z původních složek použitých pro fermentaci jako jsou čajové lístky (Bishop et al., 2022). Nicméně malé množství vitamínu B2 (riboflavinu) je syntetizováno přítomnými mikroorganismy.

Bylo zjištěno, že obsah vitamínů C a B2 se zvyšuje s prodlužující se dobou fermentace. Koncentrace vitamínu C se pohybovala v rozmezí 0,48 – 1,14 mg/l (Tabulka 3) a nejvyšší hodnoty byly naměřeny v na konci fermentace (Kitwetcharoen et al., 2023).

Tabulka 3 Koncentrace vybraných vitamínů v nápoji kombucha v závislosti na době fermentace (Villarreal-Soto et al., 2018).

Vitamín	Koncentrace vitamínu (mg/ml)	Počáteční množství sacharózy (g/l)	Doba fermentace (dny)
B1 niacin	0,74	70	15
B2 riboflavin	0,08	70	10
B6 pyridoxin	0,52	70	15
B12 kobalamin	0,84	70	15
Vitamín C	0,03	70	10

1.3.6 Minerální látky

Minerální látky jsou nezbytné pro optimální průběh mnoha metabolických drah a hrají klíčovou roli ve fyziologických funkcích (De Miranda et al., 2022). Kombucha obsahuje značné množství minerálních látek, obecně se udává koncentrace v rozmezí od 0,1 až 0,4 g/ml (Tabulka 4). Minerální látky se dostávají do nápoje z čajových lístků. Kombucha obsahuje tyto minerální látky: fluoridy, draslík, mangan, železo, nikl, měď a zinek. Hladina esenciálních minerálních látek, jako jsou Mn, Fe, Ni, Cu, Zn, se během fermentačního procesu zvyšuje (Coelho et al., 2020).

Tabulka 4 Přehled koncentrace vybraných minerálních látek v nápoji kombucha (Huang, 2024, s. 1610–1625).

Prvek	Koncentrace (μg/ml)
Mangan	0,46
Železo	0,35
Nikl	0,34
Měď	0,23
Zinek	0,15
Železo	0,31
Mangan	1,57
Zinek	0,53
Olovo	0,005
Chrom	0,001

V nápoji kombucha se také vyskytují anionty, jako jsou fluoridy, chloridy, bromidy a jodidy. Bylo zjištěno, že koncentrace fluoridů se pohybuje v rozmezí od 42,0 do 93,31 mg/l (Jakubczyk et al., 2021)

1.4 Fermentace

Fermentace je proces, při kterém dochází k přeměně substrátu na konečný produkt. Jako výchozí látka při procesu tradiční výroby a fermentace kombuchy slouží černý čaj a sacharóza. Fermentační proces probíhá spontánně a rychle díky mikrobiálnímu biofilmu, který obsahuje původní druhy kvasinek a bakterií. Je známo, že tyto bakteriální a kvasinkové komunity mají během fermentace symbiotický vztah (Coton et al., 2017).

Metabolismus mikroorganismů účastnících se fermentace kombuchy je složitý proces. Dosud není zcela objasněn kvůli velkému počtu zapojených mikroorganismů a interakcím, které mezi nimi probíhají (Coelho et al., 2020, Villarreal-Soto et al., 2018).

1.4.1 Biofilm kombuchy

Tvorba biofilmu kombuchy zahrnuje složitou souhru mezi bakteriálními a kvasinkovými populacemi přítomnými ve SCOBY (Aung et al., 2024). Termín biofilm představuje agregáty mikroorganismů, které jsou pevně vsazeny do vlastní matrice, ta bývá označena jako extracelulární polymerní substance. Extracelulární polymerní substance se skládá převážně z polysacharidů, proteinů, peptidoglykanů, lipidů, enzymů a extracelulární DNA (Aung et al., 2024). Biofilm je přímo produkován vybranými mikroorganismy, které se nacházejí v nápoj. Každá fermentace vede k nové vrstvě biofilmu, kterou lze následně použít jako startér pro novou fermentaci (Coton et al., 2017). Bylo popsáno, že významnou octovou bakterií podílející se na tvorbě biofilmu je *Komagataeibacter xylinus*. Důležitou funkcí biofilmu je také interakce s kyslíkem a udržování aerobního prostředí pro metabolismus octových bakterií (Coton et al., 2017).

Další bakterií, která se významně podílí na produkci biofilmu, je *Gluconacetobacter xylinus* (Coelho et al., 2020). Zpočátku se populace bakterií, které syntetizují mikrobiální celulózu v médiu, zvyšuje, a to v důsledku spotřeby rozpuštěného kyslíku na rozhraní fázi vzduch/médium. Jak fermentace postupuje, film se stává silnějším díky více vrstvám a vytváří strukturu zavěšenou na kapalině. Syntéza mikrobiální celulózy končí, když se film stane dostatečně hustým, a ponoří se do kapaliny. Mikroorganismy jsou tedy zachyceny ve SCOBY a AAB mají sníženou aktivitu z důvodu nedostatečného přívodu kyslíku (Villarreal-Soto et al., 2018).

Bakteriální celulóza vykazuje vyšší čistotu, mechanickou pevnost, schopnost zadržovat vodu, chemickou stabilitu a stupeň polymerace než rostlinná celulóza. Celulózové vlákno

má několik charakteristických vlastností – obsah vody 92,3 %, absorpční schopnost vlákna 84,4 %, tloušťka 0,2 mm nebo pevnost v tahu 120 MPa (Ramírez et al., 2022, Aung et al., 2024).

Kvasinky jsou umístěny ve spodní části biofilmu, kde mají nízký přísun kyslíku. Z důvodu sníženého obsahu kyslíku se přepne aerobní metabolismus do anaerobní fermentace. Během anaerobní fermentace se tvoří etanol a aromatické sloučeniny, které jsou velmi důležité pro aroma kombuchy (Watawana et al., 2015, Coelho et al., 2020).

1.4.2 Metabolismus mikroorganismů během fermentace

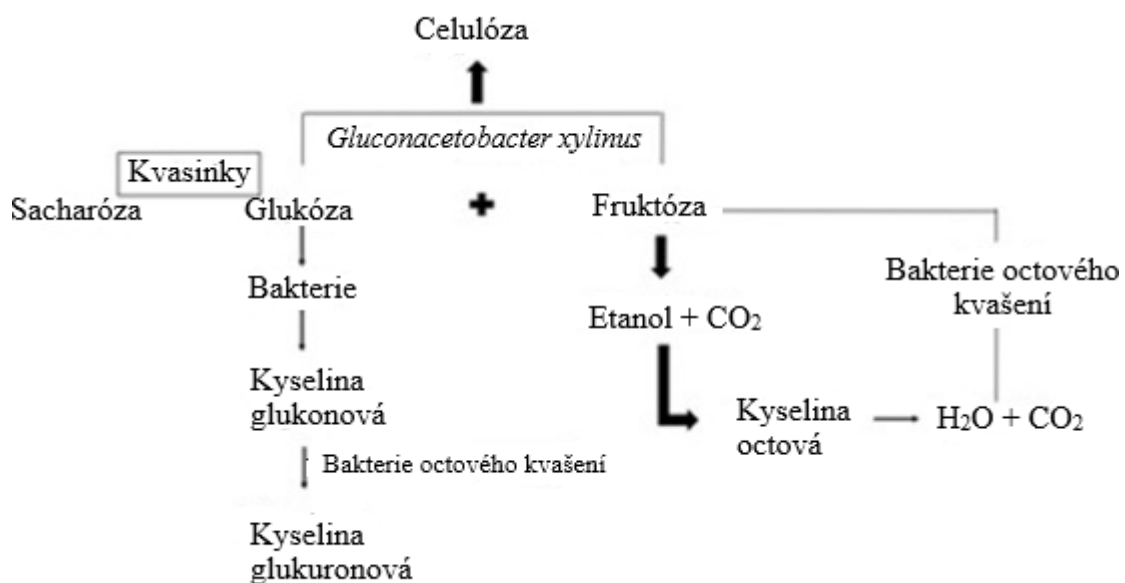
Na začátku procesu fermentace kvasinky hydrolyzují přítomnou sacharózu na glukózu a fruktózu. Tyto monosacharidy jsou následně využívány octovými bakteriemi a přeměněny na další produkty fermentace (Obr. 2; Coelho et al., 2020). Kvasinky pomocí enzymu invertázy a následně prostřednictvím metabolické dráhy glykolýzy produkují etanol. Kvasinky rodu *Saccharomyces* preferují jako zdroj monosacharidů glukózu, zatímco rod *Zygosaccharomyces* preferuje fruktózu (Jayabalan et al., 2014). Kvasinky díky vysokému osmotickému tlaku mohou produkovat glycerol, který je pomocí octových bakterií oxidován na dihydroxyaceton. Tento proces také vede k produkci dalších esterů, které přispívají k rozvoji aroma v kombuše (Villarreal-Soto et al., 2020). Pomocí kvasinek je glukóza přeměněna na kyselinu glukonovou a dále, díky AAB, na kyselinu glukuronovou. Přítomnost kyseliny glukonové stimuluje kvasinky k větší produkci etanolu a ten je pak využíván AAB k růstu a další produkci kyseliny octové (Coelho et al., 2020, Villarreal-Soto et al., 2020). Během zrání dochází také k autolýze kvasinek, tento jev může ovlivnit aroma a chuť nápoje kombucha (De Miranda et al., 2022).

Kromě kvasinek se do procesu fermentace zapojují také octové bakterie. Tyto bakterie využívají ke svému metabolismu glukózu, fruktózu. AAB přednostně používají jako substrát fruktózu na úkor glukózy. Fruktóza je fermentačními procesy přeměněna na etanol, který podléhá mikrobiální oxidaci za vzniku kyseliny octové, čímž se také snižuje hladina etanolu v hotovém nápoji. Glukóza je činností AAB přeměňována na organické kyseliny, jako jsou kyselina octová, jantarová, glukonová či glukuronová (Arikan et al., 2020, Savary et al., 2021).

Mezi význačné zástupce AAB patří *Acetobacter*, který je významným rodem podílejícím se na fermentaci. Díky činnosti těchto bakterií dochází k přeměně etanolu na kyselinu octovou pomocí enzymů alkoholdehydrogenázy a dehydrogenázy. Tyto enzymy

vstupují do Krebsova cyklu a výslednými produkty jsou poté H_2O a CO_2 (Martínez et al., 2018, Coelho et al., 2020).

Další skupinou mikroorganismů podílejících se na fermentaci kombuchy je skupina bakterií mléčného kvašení. Do této skupiny můžeme zařadit *Lactobacillus* spp., či *Lacticaseibacillus* spp. (Mohd Ariff et al., 2023).



Obrázek 2 Mikrobiální metabolismus kvasinek a octových bakterií během fermentace v nápoji kombucha (upraveno dle Coelho et al., 2020)

2 MIKROBIÁLNÍ SLOŽENÍ KOMBUCHY

Mikrobiální ekologie kombuchy je klíčovým faktorem při fermentaci a tvorbě biofilmu. Může se lišit v závislosti na různých faktorech jako jsou podmínky fermentace, použité suroviny a geografický původ SCOBY (Laavanya et al., 2021). Kombucha je velmi bohatá na výskyt mikroorganismů. Tyto mikroorganismy mohou být přítomny v biofilmu, který se nazývá symbiotická kultura bakterií a kvasinek, kapalně či obojím (Tabulka 5). Mikroorganismy produkují celou řadu látek, které plní různé funkce (Tabulka 6) (Coton et al., 2017).

Tabulka 5 Procentuální zastoupení a výskyt vybraných mikroorganismů v průběhu fermentace nápoje kombucha

	Mikroorganismus	Procentuální zastoupení (%)	Výskyt biofilm / kapalina	Zdroj
Kvasinky	<i>Candida stellimalicola</i>	55–65	Biofilm	(Chakravorty et al., 2016)
	<i>Dekkera anomala</i>	18–34	Kapalina	(Coton et al., 2017)
	<i>Dekkera bruxellensis</i>	18–30	Kapalina	(Coton et al., 2017)
	<i>Zygosaccharomyces</i>	>80	Biofilm, kapalina	(Villarreal-Soto et al., 2018)
	<i>Brettanomyces</i>	30	Kapalina	(Villarreal-Soto et al., 2018)
	<i>Schizosaccharomyces</i>	2–8	Kapalina	(Arikan et al., 2020)
Bakterie	<i>Gluconoacetobacter</i>	85	Biofilm, kapalina	(Marsh et al., 2014)
	<i>Komagataeibacter</i>	50	Biofilm, kapalina	(Chakravorty et al., 2016)
	<i>Gluconobacter</i>	2–15	Biofilm, kapalina	(Marsh et al., 2014)
	<i>Gluconobacter oxidans</i>	15–25	Kapalina	(Marsh et al., 2014)
	<i>Komagataeibacter xylinus</i>	80	Kapalina	(Al-Mohammadi et al., 2021)
	<i>Acetobacter</i>	50	Biofilm	(Coton et al., 2017)
	<i>Oenococcus oeni</i>	50	Kapalina	(De Filippis et al., 2018)
	<i>Lactobacillus</i>	1–9	Kapalina	(Watawana et al., 2015)
	<i>Bifidobacterium</i>	3	Biofilm, kapalina	(Chakravorty et al., 2016)
	<i>Weisella</i>	5–10	Kapalina	(Chakravorty et al., 2016)

Tabulka 6 Přehled látek produkovaných mikroorganismy v nápoji kombucha a jejich funkce (Villarreal-Soto et al., 2018, Coton et al., 2017, Aung et al., 2024)

Rod/Druh	Produkované látky	Funkce v nápoji
<i>Gluconacetobacter</i> / <i>Komagataeibacter</i> spp.	Kyselina octová	Snižování pH, acidifikace prostředí
	Kyselina glukonová	
	Kyselina glukuronová	Tvorba typické kyselé chuti
	Bakteriální celulóza	Tvorba biofilmu
	Exopolysacharidy	Stabilizace mikrobiální komunity
<i>Acetobacter</i> spp.	Kyselina octová	Tvorba kyselého prostředí
	Kyselina glukonová	Spolupráce při fermentaci s kvasinkami
	Etanol (v menším množství)	
Bakterie mléčného kvašení	Kyselina mléčná	Dodává jemnou kyselost
	Bakteriociny	Podpora rovnováhy mikrobiálního společenství
	Exopolysacharidy	
Kvasinky např. <i>Saccharomyces</i>, <i>Zygosaccharomyces</i>	Etanol	Produkce etanolu jako substrát pro octové bakterie
	CO ₂	
	Enzymy (invertáza)	Perlivost nápoje

2.1 Bakterie

Bakterie, které převažují v kultuře kombuchy, jsou zejména octové bakterie produkující kyselinu octovou, a také kyselinu glukonovou. Tyto bakterie patří do rodů *Acetobacter* a *Gluconobacter* (Yamada et al., 2012). Dalšími významnými bakteriemi, podílejícími se na fermentaci kombuchy, jsou bakterie rodů *Gluconacetobacter*, *Komagataeibacter*, *Acidomonas* a mléčné tyčinky (dříve rod *Lactobacillus*) (Jayabalan et al., 2016, Coelho et al., 2020).

Mezi zástupce rodu *Acetobacter* podílející se na fermentaci kombuchy lze zařadit druhy *Acetobacter musti*, *A. pasteurianus*, *A. pomorum*, *A. senegalensis*, *A. tropicalis* nebo *A. papayae*. Bakterie rodu *Acetobacter* patří mezi majoritní mikroorganismy, které během fermentace produkují kyselinu octovou (Chakravorty et al., 2016).

Z rodu *Gluconacetobacter* byly v nápoji kombucha identifikovány druhy *Gla. xylinus*, *Gla. kombuchae*, *Gla. europaeus*, *Gla. sacchariiconacetobacter* (Kaashyap et al., 2021).

Dalším rodem podílejícím se na fermentaci kombuchy je rod *Gluconobacter*. Z nápoje kombucha byly izolovány druhy *G. oxydans*, *G. europaeus*, *G. saccharivorans*, *G. morbifer* (Coton et al., 2017).

Významným rodem hrajícím klíčovou roli při produkci kombuchy je *Komagataeibacter*, zejména druhy *K. europaeus*, *K. hansenii*, *K. intermedius*, *K. medellinensis* a *K. xylinus* (Soares et al., 2021). Významnou roli při fermentaci kombuchy a tvorbě biofilmu zaujímá *K. xylinus*. Tato bakterie je známá svou schopností produkovat bakteriální celulózu. Mezi další bakterie produkující bakteriální celulózu patří *K. swingsii*, *K. rhaeticus* a *K. medellinensis* (Aung et al., 2024).

Při fermentaci kombuchy se kromě octových bakterií zapojují také mléčné tyčinky patřící do skupiny laktobacilů. Z fermentovaného nápoje byly izolovány tyto druhy *Lactobacillus nagelii*, *Lactobacillus kerfiranofaeciens* subsp. *kefigranum*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei* a *Lactobacillus rhamnosus* (Mohd Ariff et al., 2023).

V minoritním množství se při fermentaci zapojují také rody *Asaia*, *Acidomonas*, *Ameyamaea*, *Nguyenibacter*, *Oenococcus* nebo *Swingsia* (Aung et al., 2024).

2.2 Kvasinky

V nápoji kombucha je také rozmanité zastoupení kvasinek. V majoritním množství se zde vyskytují rody *Candida*, *Brettanomyces*, *Sacharomyces* a *Zygosaccharomyces*. V minoritním množství se zde vyskytují rody *Koleckera*, *Mycotorula*, *Mycoderma* a *Pichia* (Marsh et al., 2014).

Na začátku fermentace se nejprve uplatňují osmoofilní kvasinky jako *Saccharomyces cerevisiae* a *Zygosaccharomyces* spp. Následně se objevují druhy odolné vůči kyselinám jako *Brettanomyces* spp. a *Candida stellata* a další (Jayabalan et al., 2014).

Interakce mezi kvasinkami rodu *Saccharomyces* a non-*Saccharomyces* jsou výhodné při fermentaci kombuchy, neboť minimalizují riziko růstu nežádoucích bakterií, a zároveň přispívají k tvorbě charakteristických vůní a chutí (Villarreal-Soto et al., 2018). Nejčastěji vyskytujícími se druhy rodu *Saccharomyces* v nápoji kombucha jsou *S. cerevisiae*, *S. biformis* (Chakravorty et al., 2016).

Mezi druhy rodu *Candida*, které se vyskytují v kombuše, patří *Candida famata*, *C. obtusa*, *C. stellata*, *C. kefyr*, *C. krusei* (Chakravorty et al., 2016). Kvasinky rodu *Brettanomyces* vyskytující se v kombuše zahrnují druhy *B. intermedius*, *B. bruxellensis* a

B. clausenii (Coton et al., 2017). Z kombuchy byly také izolovány kvasinky rodu *Zygosaccharomyces*, konkrétně *Z. rouxii*, *Z. bailii* a *Z. kombuchaensis* (Chakravorty et al., 2016, Coton et al., 2017).

3 VLIV VNĚJŠÍCH PODMÍNEK NA VLASTNOSTI KOMBUCHY

Charakteristika a výtěžnost biofilmů kombuchy jsou determinovány složením a typem substrátu aplikovaného během fermentace. Rychlost fermentace je ovlivněna celou řadou faktorů. Mezi tyto faktory můžeme zařadit druh a koncentraci čaje, koncentraci cukru, délku a teplotu fermentace či přidání dalších přísad (Balasubramanian a Praharaj, 2023).

3.1 Druh sladidla

Nejčastěji používaným zdrojem uhlíku pro růst bakterií a kvasinek kombuchy je sacharóza. Jako alternativní zdroje energie pro mikroorganismy lze využít i jiná sladidla, jako například glukózu, třtinový cukr, včelí med či syntetické sladidlo aspartam (Watawana et al., 2017). Ukázalo se, že glukóza, třtinový cukr a sacharóza podporují růst a tvorbu biofilmu efektivněji než ostatní zkoumaná sladidla. Naproti tomu použití aspartamu nevedlo k tvorbě biofilmu, což může souviset s tím, že aspartam není vhodným zdrojem dusíku a uhlíku pro mikroorganismy zúčastněné na fermentaci. Přestože aspartam obsahuje aminokyseliny, jeho struktura není snadno metabolizovatelná a neposkytuje mikroorganismům dostatečně dostupné dusíkaté sloučeniny potřebné pro metabolismus a (Watawana et al., 2017). Ukázalo se, že glukóza, třtinový cukr a sacharóza vykazují lepší růst biofilmu a přináší vyšší výtěžnost biofilmu. Nejvyšší výtěžnost a nárůst biofilmu byla zjištěna při využití sacharózy. Sacharóza může být při fermentaci upřednostňována před jednotlivými monosacharidy, jako je glukóza a fruktóza, protože jejich enzymatická hydrolyza (např. pomocí invertázy) uvolňuje oba tyto cukry současně. Tím dochází k plynulému a rovnoměrnému zásobení mikroorganismů základními substráty pro jejich metabolismus, což může podpořit intenzivnější fermentační aktivitu a následnou tvorbu biofilmu. Některé mikroorganismy navíc disponují specifickými enzymy, které jim umožňují sacharózu efektivně využívat, a z tohoto důvodu ji mohou preferovat jako hlavní zdroj uhlíku (Malšaba et al., 2008).

3.2 Druh čaje

Jeden ze základních významných faktorů při fermentaci kombuchy je druh čaje. Čajový substrát je společně se sacharidy hlavním zdrojem živin pro mikroorganismy. Různé druhy čaje poskytují rozdílné živiny, které mohou ovlivnit mikrobiální složení, kyselost, chuť barvu i rychlost fermentace. Pro výrobu kombuchy se nejčastěji využívá čaj zelený a černý (Rizhon a Maldin, 2023, s. 1749–1760).

3.2.1 Zelený čaj

Zelený čaj je bohatý na polyfenoly, zejména flavonoidy jako je epigalokatechingalát. Tyto látky mají silné antioxidační účinky. Zelený čaj obvykle poskytuje méně taninů než černý čaj, což znamená, že fermentace může být rychlejší. Množství polyfenolů může ovlivnit růst mnohých mikroorganismů, ale naopak také poskytuje výhody v boji proti patogenům. Výsledná chuť kombuchy fermentové v zeleném čaji bývá jemnější a svěžejší s více květinovými a bylinnými tóny (Wang et al., 2025, Rizhon a Maldin, 2023, s. 1749–1760).

3.2.2 Černý čaj

Černý čaj má vyšší obsah taninů než čaj zelený a obsahuje také více kofeinu. Taniny patří mezi polyfenolické látky, které ovlivňují chuť nápoje. Tento druh čaje má vyšší obsah živin pro mikroorganismy, což může vést k pomalejší fermentaci, protože tyto živiny podporují růst doprovodné mikrobioty. Kombucha z černého čaje bývá silnější, s plnější a výraznější chutí (Marsh et al., 2014).

3.2.3 Bílý čaj

Bílý čaj má méně taninů než černý čaj, ale stále poskytuje dostatečné množství polyfenolů. Kombucha fermentovaná v bílém čaji může mít jemnější chuť a nižší kyselost, protože čaj obsahuje méně kofeinu a polyfenolů, což ovlivňuje rychlost fermentace. Kombucha z bílého čaje bývá jemná, sladší a s velmi jemnými ovocnými tóny (Wang et al., 2025, Marsh et al., 2014).

3.2.4 Bylinné čaje

Bylinné čaje obvykle neobsahují kofein, ale mohou obsahovat sloučeniny řazené mezi esenciální oleje, flavonoidy a další bioaktivní sloučeniny. Některé bylinné čaje mohou fermentaci zpomalit nebo změnit její mikrobiální složení, protože neobsahují všechny živiny typické pro tradiční čaj (černý, zelený). Kombucha fermentovaná v bylinných čajích bývá velmi aromatická, a její chuť často závisí na typu bylinného čaje, např. z čaje heřmánkového bude mít květinovou chuť, zatímco z rooibosu chuť a vůni sladkou a kořeněnou (Rizhon a Maldin, 2023, s. 1749–1760).

3.3 Teplota

Důležitým faktorem ovlivňujícím fermentaci kombuchy je teplota. Teplota může zásadně ovlivnit mikrobiální složení, složení a koncentraci metabolitů a chuť. Optimální teplota pro

fermentaci kombuchy se uvádí 25–30 °C. V tomto rozmezí teplot je fermentace vyvážená, kvasinky i bakterie jsou aktivní, což vede k optimální produkci etanolu, kyseliny octové a dalších metabolitů (Villarreal-Soto et al., 2018).

3.3.1 Vliv teploty na kvasinky

Vyšší teplota (nad 30 °C) podporuje růst některých kvasinek, např. *Saccharomyces cerevisiae*, což vede k vyšší produkci etanolu a CO₂. Fermentace probíhá rychleji a může vést k vyššímu obsahu etanolu, což ovlivní chuť kombuchy (Jayabalan et al., 2014, Villarreal-Soto et al., 2018).

Při nižší teplotě mezi 20–24 °C mají kvasinky tendenci metabolizovat pomaleji. Fermentace trvá déle, ale výsledná chuť bývá vyváženější s nižším obsahem etanolu. Tyto teploty mohou vytvářet u některých kvasinek adekvátní podmínky pro produkci exopolysacharidů a přispívat tak k tvorbě biofilmu (Jayabalan et al., 2014, Villarreal-Soto et al., 2018).

3.3.2 Vliv teploty na bakterie

Při vyšší teplotě mezi 25–30 °C octové bakterie jako *Komagataeibacter* a *Acetobacter* obecně lépe rostou. Teploty vyšší než 30 °C mohou zpomalit růst těchto bakterií a ovlivnit jejich schopnost oxidovat etanol na kyselinu octovou (Jayabalan et al., 2014, Villarreal-Soto et al., 2018).

Nižší teploty než 20 °C zpomalují metabolismus bakterií a fermentace trvá déle. Při těchto teplotách je produkce kyseliny octové obvykle nižší, což může vést k jemnější chuti kombuchy (Jayabalan et al., 2014, Villarreal-Soto et al., 2018).

3.3.3 Vliv teploty na organoleptické změny kombuchy

Vyšší teplota fermentace kombuchy zrychluje metabolismus kvasinek a octových bakterií, což vede k rychlejší acidifikaci a poklesu pH, čímž vzniká nápoj s výrazně kyselým profilem a prohloubenou octovou chutí. Zároveň dochází k intenzivnější produkci oxidu uhličitého, což zvyšuje perlivost nápoje (Jayabalan et al., 2014, Villarreal-Soto et al., 2018). Naopak nižší teploty zpomalují fermentační proces, což má za následek kombuchu s jemnější chutí, nižší kyselostí a pomalejší tvorbou perlení (Jayabalan et al., 2014, Villarreal-Soto et al., 2018).

3.4 Délka fermentace

Nápoj kombucha běžně fermentuje po dobu 5–21 dní. Během této doby se mění nejen zastoupení jednotlivých druhů mikroorganismů, ale také koncentrace přítomných metabolitů (Chen a Liu, 2000, s. 834–839).

Časovou osu fermentace kombuchy a změn mikrobiálního složení lze popsat následovně (Villarreal-Soto et al., 2018, Marsh et al., 2014):

1. Fáze fermentace (1–5 dnů):
 - Dominance kvasinek *Saccharomyces* a *Zygosaccharomyces*
 - Rozklad sacharózy na glukózu a fruktózu
 - Produkce etanolu a oxidu uhličitého
2. Střední fáze fermentace (6–10 dnů):
 - Nárůst octových bakterií *Acetobacter* a *Komagataeibacter*
 - Oxidace etanolu na kyselinu octovou
 - Tvorba kyseliny glukonové a glukuronové
 - Růst biofilmu
3. Pozdní fáze fermentace (10–14 dnů):
 - Dominance octových bakterií
 - Pokles počtu kvasinek díky kyselému prostředí
 - Maximální koncentrace organických kyselin
 - Snížení zbytkových cukrů
4. Dlouhodobá fermentace (více než 14 dnů):
 - Extrémní kyselost, pH kolem 2,5 – 3
 - Oslabení mikrobiální aktivity
 - Výrazná kyselá chuť

Délka fermentace tak výrazně ovlivňuje organoleptické vlastnosti výsledného nápoje a je jedním z mnoha faktorů, které se podílejí na variabilitě tohoto nápoje (Villarreal-Soto et al., 2018, Marsh et al., 2014, Jayabalan et al., 2014).

4 VLIV KOMBUCHY NA LIDSKÝ ORGANISMUS

4.1 Probiotické a prebiotické účinky

Probiotika pomáhají udržovat integritu střevní bariéry, zlepšují trávení. Konzumace kombuchy je spojována s vlivem na gastrointestinální mikrobiotu. Lidská střevní mikrobiota je komplexní společenství přibližné velikosti 10^{13} až 10^{14} mikroorganismů (Li et al., 2016). Studie naznačují, že kombucha může zlepšit střevní mikrobiotu díky svému chemickému složení. Alespoň 90 % fenolických sloučenin obsažených v kombuše není absorbováno v tenkém střevě, ale je metabolizováno specifickou mikrobiotou v tlustém střevě. Tyto sloučeniny tak mohou ovlivňovat střevní mikrobiotu a působit prebioticky tím, že podporují růst prospěšných mikroorganismů a zároveň brání množení patogenů (Costa et al., 2022).

V kombuše se vyskytuje také populace bakterií mléčného kvašení, tyto bakterie mají příznivý vliv na mikrobiotu tenkého střeva a plní tedy roli probiotik (Cardoso et al., 2021).

4.2 Antioxidační účinky

Mnoho příznivých účinků připisovaných kombuše, jako je prevence rakoviny, zvýšení imunity nebo zmírnění zánětů, souvisí s antioxidační aktivitou nápoje. Antioxidační kapacita nápoje se připisuje hlavně polyfenolům, které jsou vytvářeny v čajových lístcích a synergickému účinku různých látek vyskytujících se přímo v čaji. Mezi fenoly se řadí řada chemických sloučenin, mezi které patří fenolové kyseliny, flavonoidy, taniny a stilbeny (Chakravorty et al., 2016). Kombucha má lepší antioxidační aktivitu než nefermentovaný čaj, což souvisí s produkcí nízkomolekulárních látek a se strukturálními modifikacemi přítomných polyfenolů. Tyto přeměny zajišťují přítomné enzymy produkované bakteriemi a kvasinkami během fermentace (Jayabalan et al., 2014). Antioxidační vlastnosti kombuchy se během fermentace zvyšují (Ojo a De Smidt, 2023).

Bylo prokázáno, že hladiny theaflavinů a thearubiginu byly v kombuše z černého čaje významně vyšší než v její zelené variantě ($p < 0,05$). Kromě toho byla u kombuchy z černého čaje zjištěna přibližně o 65,32 % vyšší antioxidační kapacita než u kombuchy ze zeleného čaje (Cardoso et al., 2020).

4.3 Antimikrobní účinky

Kombucha se vyznačuje antimikrobními účinky proti mnoha grampozitivním a gramnegativním patogenům. Konkrétně proti *Helicobacter pylori*, *Salmonella*

Typhimurium, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Shigella sonnei*, *Escherichia coli* (Battikh et al., 2012). Účinně působí také proti houbám jako je *Aspergillus niger*, *Candida albicans* či *Microsporum gypseum* (Kapp a Sumner, 2019, s. 66-70).

Antimikrobní aktivita kombuchy je připisována především vysokému obsahu organických kyselin, zejména kyselině octové a přítomnosti katechinů, které inhibují grampozitivní a gramnegativní bakterie (Jayabalan et al., 2014).

Minimální inhibiční koncentrace kombuchy ze zeleného čaje byla určena na 250 µl/ml, přičemž účinně bránila růstu všech testovaných patogenů. Naopak kombucha z černého čaje vykazovala inhibiční účinek pouze proti *Staphylococcus aureus* a *Listeria monocytogenes*. Tento rozdíl v antimikrobiální aktivitě může souviset s vyšší kyselostí a vyšší koncentrací katechinů v zelené čajové kombuše (pH = 3,2) ve srovnání s kombuchou z černého čaje (pH = 3,5) (Cardoso et al., 2020, Huang, 2024, s.1610-1625).

4.4 Protirakovinné účinky

Protirakovinné účinky kombuchy byly převážně zkoumány na lidských rakovinných buněčných liniích *in vitro*, přičemž dostupné údaje z klinických studií a pokusů na zvířatech jsou zatím omezené. Bylo prokázáno, že kombucha výrazně potlačuje cytogenezi u karcinomu prostaty tím, že moduluje faktory podporující angiogenezi, jako je například interleukin-8. (Srihari et al., 2013).

Expozice buněk PC-3 (lidské rakovinné buňky prostaty) různým koncentracím kombuchy v rozmezí 100–500 µg/ml vedla k výraznému snížení jejich životaschopnosti, přičemž vyšší koncentrace vykazovaly typické vzorce buněčné smrti. Kromě toho dávka 400 µg/ml kombuchy inhibovala migraci buněk PC-3 výrazněji než koncentrace 200 µg/ml. (Srihari et al., 2013, Villarreal-Soto et al., 2020)

Kombucha ze zeleného čaje vykazovala výraznější antiproliferativní účinky na rakovinné buněčné linie ve srovnání s kombuchou z černého čaje. Tato zvýšená aktivita může být pravděpodobně spojena s vyšším obsahem katechinů a verbaskosidu v zeleném čaji (Cardoso et al., 2020).

5 VODNÍ KEFÍR

Označení „vodní keřirová zrna“ či „sladká keřirová zrna“ bylo zavedeno za účelem jejich odlišení od keřirových zrn používaných při fermentaci mléka. Tato zrna byla pojmenována i dalšími způsoby, například *tibicos* nebo *tibi* (Fiorda et al., 2017, Lynch et al., 2021). Vodní keřír je mírně kyselý, perlivý kvašený nápoj, vyrobený fermentací roztoku sacharózy, ovoce a zrn vodního keříru (Lynch et al., 2021).

5.1 Historie výroby vodního keříru

Předpokládá se, že vodní keřirová zrna byla do Evropy poprvé přivezena vojáky vracejícími se z krymské války v roce 1855, přičemž byla označována jako tzv. „zázvorové rostliny“. Alternativní teorie původu pak poukazuje na možnost spontánní tvorby zrn známých jako „tibicos“ na povrchu plochých listů mexického kaktusu (*Opuntia* spp.), kde mikroorganismy využívají sladké exsudáty jako zdroj živin. Navzdory nejasnému původu však platí, že tato zrna byla po generace předávána z domácnosti do domácnosti za účelem domácí výroby tohoto tradičního fermentovaného nápoje (Pendón et al., 2022).

5.2 Výroba vodního keříru

Vodní keřír se tradičně připravuje přidáním zrn vodního keříru do roztoku sacharózy s různým čerstvým nebo sušeným ovocem. Takto připravená směs se obvykle nechá fermentovat po dobu 2–4 dnů při pokojové teplotě mezi 21–25 °C. Nejčastější použité koncentrace sacharózy se pohybují v rozmezí 6–30 % (w/v) při koncentraci keřirových zrn 6–20 % (w/v) (Bueno et al., 2021, Verce et al., 2019).

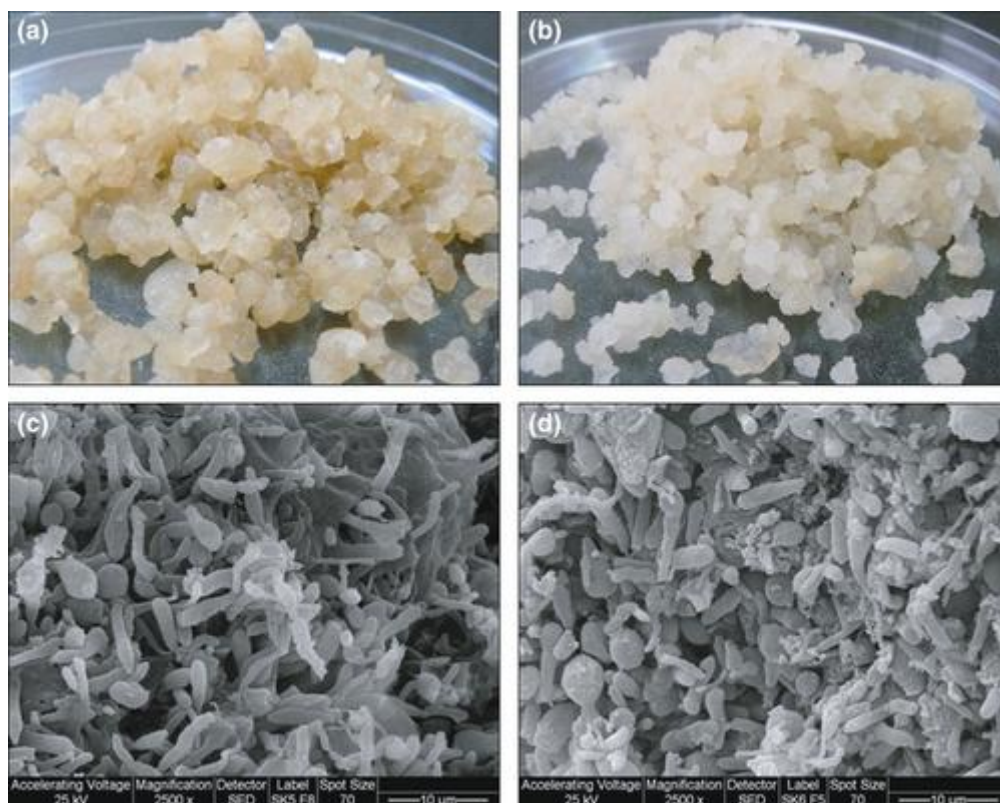
Někdy lze provést tzv. sekundární fermentaci. V tomto bodě, tedy po 24–48 hodinách fermentace, se odstraní keřirová zrna a přidá se ovoce či ovocná šťáva (obvykle jahodový, třešňový, mangový, jablečný, ananasový, pomerančový džus). Tato směs se nechá dále fermentovat po dobu 24 hodin. Výsledný nápoj má po použitém ovoci svěží, nakyslou, perlivou a ovocnou chuť (Bueno et al., 2021).

Během fermentace některé mikroorganismy přecházejí ze zrn do vodního prostředí, kde rostou a fermentují přítomný cukr, produkují organické kyseliny a tím snižují pH nápoje. Jiné mikroorganismy zůstávají spojeny se zrnem, syntetizují glukán ze sacharózy a ten tvoří hlavní složku matrice keřirových zrn (Fels et al., 2018). Takto připravený nápoj je okamžitě konzumován nebo skladován při teplotě kolem 4 °C po dobu 1–2 dnů, čímž vznikne více sycený nápoj (Verce et al., 2019).

5.3 Biofilm vodního kefiru

Zrna vodního kefiru jsou malá o průměru 1–10 mm, průsvitná s křehkou strukturou (Obr 3.) Barva zrn je typicky bílá až nažloutlá, ovšem záleží na substrátu, ve kterém jsou zrna vodního kefiru uchovávána. Přidáním ovoce, např. malin, dochází ke zbarvení zrn do růžova (Lynch et al., 2021).

Zrna vodního kefiru tvoří komplexní mikrobiologický celek, kde se vyskytuje celá řada mikroorganismů. Koexistují zde bakterie mléčného kvašení $10^7 - 10^8$ CFU/g zrna, octové bakterie $10^6 - 10^7$ CFU/g zrna a kvasinky $10^6 - 10^7$ CFU/g zrna. Tyto mikroorganismy jsou vsazeny v polysacharidové matici (Lynch et al., 2021, Pendón et al., 2022).



Obrázek 3 Makroskopický a mikroskopický (SEM) vzhled dvou vodních kefirů CIDCA SK5 (a,c) a CIDCA SK6 (b,d) (Pendón et al., 2022)

5.4 Mikrobiální společenství vodního kefiru

Mikrobiální společenství vodního kefiru je rozmanité. Bakteriální druhy mají mezi sebou symbiotické vztahy, přežívají nebo se množí pomocí sdílení svých bioproduktů jako zdroje energie nebo faktorů stimulujících růst (Fiorda et al., 2017). Bakterie mléčného kvašení, zejména mléčné tyčinky, jsou primárními bakteriálními členy mikrobiálního společenství vodního kefiru. Octové bakterie fermentují v závislosti na přítomnosti kyslíku. Mezi další

mikroorganismy vyskytujícími se ve vodním keřru patří kvasinky, nejčastěji druhy *Saccharomyces* a potom také non-*Saccharomyces* kvasinky (Lynch et al., 2021).

Při srovnání vodního keřru a tradičního mléčného keřru je mikrobiota bakterií mléčného kvašení velice podobná. Nicméně kvasinková komunita je rozmanitější u vodního keřru než u tradičního mléčného keřru (Pidoux et al., 1998). Analýza mikrobiální diverzity vodního keřru a keřrových zrn použitých k fermentaci potvrdila přítomnost shodných druhů bakterií a kvasinek, přičemž jako nejreprezentativnější bakteriální druhy byly identifikovány *Lactocaseibacillus casei/paracasei*, *Lactocaseibacillus hilgardii* a *Schleiferilactobacillus harbinensis*, zatímco dominantní kvasinkou byla *Saccharomyces cerevisiae*. Relativní zastoupení těchto mikroorganismů se však lišilo mezi keřrovými zrny a výsledným nápojem, kdy *Lactocaseibacillus casei/paracasei* převládaly v samotném nápoji, zatímco *L. hilgardii* byl nejhojněji zastoupeným druhem v keřrových zrnech (Laureys et al., 2014).

Octové bakterie fermentují za aerobních podmínek. Hlavními zjištěnými druhy octových bakterií ve vodním keřru jsou *Acetobacter fabarium*, *Gluconobacter roseus*, *Gluconobacter oxydans* a *Acetobacter indonesiensis*. Proliferace octových bakterií vede k produkci kyseliny octové a zároveň dochází ke snižování hodnoty pH, což může mít za důsledek zpomalování růstu zrn vodního keřru (Laureys et al., 2014).

Významným rodem octových bakterií podílejících se na fermentaci vodního keřru je rod *Acetobacter*. Z vodního keřru byly izolovány tyto druhy *A. fabarium*, *A. orientalis* a *A. lovaniensis* (Laureys et al., 2016, Chong et al., 2023).

Svou roli ve fermentaci vodního keřru hrají také přítomné bakterie mléčného kvašení. Majoritní rody z této skupiny zahrnují druhy původního rodu *Lactobacillus*, který byl překlasifikován a zahrnuje rody *Levilactobacillus*, *Lentilactobacillus*. Minoritně zastoupenými rody pak jsou *Leuconostoc*, *Oenococcus*, případně *Bifidobacterium* nenáležící mezi BMK (Zanirati et al., 2015).

Poslední významnou skupinou jsou kvasinky. Na fermentaci vodního keřru se podílejí kvasinky rodu *Saccharomyces*, *Pichia*, *Lanchancea*, *Kluyveromyces*, *Hanseniaspora*, *Zygosaccharomyces*, *Dekkera*, *Zygorhizasporea* (Fiorda et al., 2017).

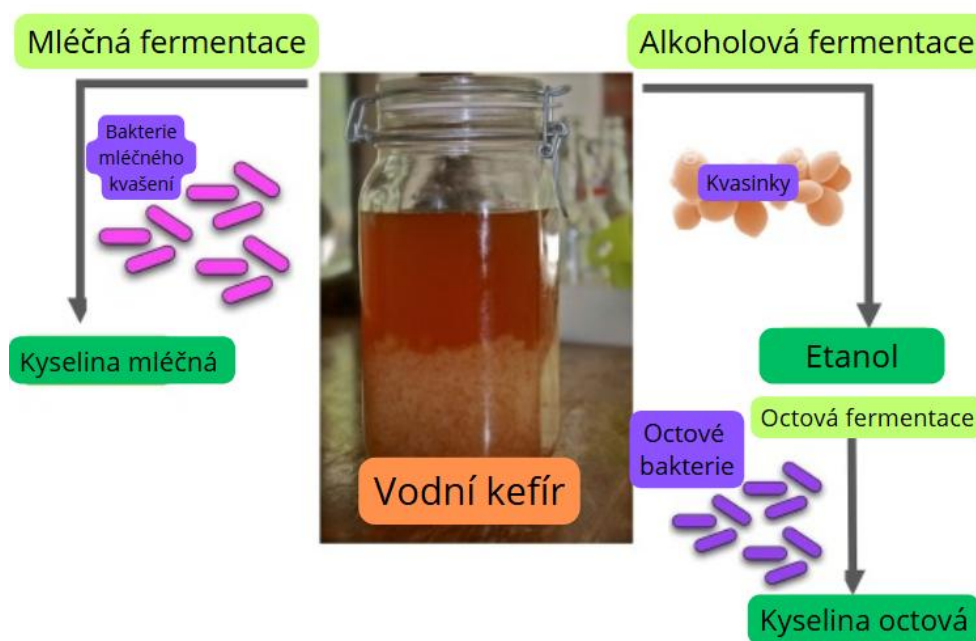
5.5 Dynamika fermentace vodního keřru

Na začátku fermentace je vysoká koncentrace substrátu okolo 80 % z jeho celkového objemu. Tento substrát se skládá přibližně z 90 % sacharózy, 6 % redukujících cukrů a 1,5 %

minerálních látek, jako jsou K, Ca, P, Mg, Na, Fe. Toto médium představuje bohatý zdroj živin vhodných pro mikrobiální růst (Guerra a Mujica, 2010, s. 250-257).

Hlavními produkty fermentace jsou etanol, kyselina mléčná, kyselina octová a další zdraví prospěšné látky jako jsou manitol, glycerol, estery a další organické kyseliny. Mezi důležitý produkt fermentace patří etanol, jehož koncentrace lineárně stoupá a dosahuje hodnot vyšších než 10 % celkového objemu (Fiorda et al., 2017).

Symbióza při fermentaci vodního kefiru mezi kvasinkami, octovými bakteriemi a bakteriemi mléčného kvašení (BMK) je znázorněna na obrázku 4. Metabolismus kvasinek podporuje růst AAB i BMK. Kvasinky hydrolyzují sacharózu pomocí enzymu invertázy na glukózu a fruktózu. Tyto jednoduché cukry poté ke svému metabolismu využívají jak BMK, tak i AAB. Mimo jiné kvasinky produkují malé množství etanolu, které stimuluje růst AAB (Fiorda et al., 2017, Lynch et al., 2021).



Obrázek 4 Metabolické dráhy mikrobiální komunity při fermentaci vodního kefiru (upraveno dle Fiorda et al., 2017)

Při fermentaci probíhají současně různé procesy. Mikroorganismy osidlující keřirová zrna rostou a syntetizují glukan a v důsledku toho se zvyšuje nárůst biomasy zrn. Současně probíhá také fermentace v tekutém médiu. Během prvních 24 hodin se koncentrace sacharózy sníží o 98 %. Současně se zvyšuje koncentrace etanolu, kyseliny mléčné, glycerolu, acetátu a manitolu. Spotřeba sacharózy během prvních 24 hodin pozitivně koreluje s produkcí etanolu kvasinkami (hlavně *Saccharomyces cerevisiae*). V pokročilých

fázích procesu fermentace hladina etanolu klesá v důsledku využití etanolu octovými bakteriemi (Martínez-Torres et al., 2017, Laureys et al., 2014).

5.6 Faktory ovlivňující růst zrn vodního kefiru

Tvorba zrn je zásadní pro pokračování a množení tibi krystalů. K přírůstku biomasy zrna, který je ovlivněn mnoha faktory, dochází v průběhu fermentace (Tabulka 7). Mezi tyto faktory patří vlastnosti zrna, množství inokula, prostředí, dostupnost živin, teplota a doba fermentace (Laureys a De Vuyst, 2017, s. 719–732).

Nízký růst biomasy zrn je častým problémem při fermentaci vodního kefiru. Byly publikovány výsledky průmyslové výroby, která se zaměřuje na zmrazená vodní kefirová zrna, která byla následně rozmrazena a reaktivována. Tyto výsledky prokázaly, že u zrn docházelo k fermentaci bez výrazného přírůstku biomasy. To naznačuje, že proces zmrazování a rozmrazování vede k nevratnému poškození zrn, což představuje další rozdíl mezi vodními kefirovými zrny a zrny používanými k fermentaci mléka (Laureys a De Vuyst, 2017, s. 719–732).

Tabulka 7 Obecné důsledky zvolených faktorů na fermentaci vodního kefiru (Fiorda et al., Laureys et al., 2018).

Faktor	Úroveň faktoru	
	Nízká	Vysoká
Živiny	Pomalá fermentace	Rychlá fermentace
	Vysoká koncentrace zbytkových sacharidů	Vysoká produkce metabolitů
	Nízká produkce metabolitů	Vysoká koncentrace zbytkových sacharidů
	Vysoké hodnoty pH	
	Nízký nebo žádný růst zrna	Vysoké pH
	Vysoká abundance AAB	Nižší poměr BMK: kvasinky
Kyslík	Nízká abundance AAB	Vysoká abundance AAB
pH	Nízký nárůst zrna	Vysoký nárůst zrna
Růst zrna	Malá zrna	Velká zrna
	Vysoká životaschopnost	Nižší životaschopné počty mikroorganismů
	Vysoká produkce metabolitů	

Dalším faktorem ovlivňujícím růst biomasy zrna je dostupnost živin. Pokud se v médiu nachází nízká koncentrace živin, dochází k poklesu růstu zrn vodního kefiru. Vyšší koncentrace živin v substrátu vede naopak k větším přírůstkům biomasy

(Laureys et al., 2019). Nejpoužívanějším zdrojem uhlíku a dusíku jsou čerstvé nebo sušené fíky. Důvod jejich popularity není znám, ale bylo zjištěno, že se substrátem obsahujícím fíky probíhá fermentace neoptimálnějším způsobem ve srovnání s jiným ovocem. Dále bylo pozorováno, že vynechání fíků významně zpomalilo spotřebu glukózy a tím i rychlost fermentace. Při použití sušených rozinek, datlí a švestek byla rychlost fermentace obdobná jako při použití fíků. Přítomnost fíků neovlivňuje pouze fermentaci, ale také růst zrn. Bylo zjištěno, že v přítomnosti fíků probíhá rychlý nárůst zrn, nižší produkce biomasy probíhá při využití banánů, rozinek, švestek, meruněk, brambor, mrkve a žádný nárůst neproběhl při využití jablek či pasterizované hroznové šťávy (Lynch et al., 2021).

Tabulka 8 Obsah vápníku ve vybraných druzích ovoce využívaných při fermentaci vodního kefiru (Lynch et al., 2021)

Druh Ovoce	Vápník (mg/100 g)
Fík sušený	162
Fík syrový	35
Rozinky	50
Meruňky sušené	55
Banán syrový	5
Jablko syrové	6
Švestka syrová	6
Brambory syrové	30
Mrkev syrová	33
Hroznová šťáva 100%	11

Potenciálním faktorem podporujícím růst krystalů je vápník (Laureys et al., 2019), jehož obsah v různých substrátech je uveden v tabulce 8. Ukázalo se, že pufrací kapacita a obsah vápníku ovlivňují fermentační procesy vodního kefiru, zejména co se týče nárůstu biomasy. Vyšší pufrací kapacita a koncentrace vápníku ve vodě použité pro fermentaci podporovaly růst. Při nižších hodnotách pH kolem 3,3 až 3,6 dochází ke snížené produkci zrn, což může být důsledkem příliš kyselého prostředí. Vzhledem k pozitivnímu vlivu vápníku na fermentaci a růst zrna je třeba vzít v úvahu vlastnosti vody využívané při fermentaci. Očekává se, že tvrdá voda obsahující vyšší obsah iontů vápníku a hořčíku společně s využitím fíků jako substrátu bude nejvhodnější pro fermentaci vodního kefiru (Laureys a De Vuyst, 2017, s. 719–732, Fiorda et al., 2017).

II. PRAKTICKÁ ČÁST

6 CÍLE PRÁCE

Hlavním cílem práce byla izolace a následná identifikace mikroorganismů z fermentovaných nealkoholických nápojů. Jako zástupci fermentovaných nealkoholických nápojů byly zvoleny nápoje kombucha a vodní kefir připravené z různých substrátů za různých podmínek. K izolaci mikroorganismů byly využity kultivační metody, zatímco k jejich následné identifikaci byly aplikovány metody molekulárně biologické.

7 POUŽITÝ MATERIÁL A ZAŘÍZENÍ

Zde jsou uvedeny veškeré pomůcky, přístroje, roztoky, chemikálie a kultivační půdy, které byly v rámci praktického testování využity.

7.1 Pomůcky a přístroje

- Binokulární mikroskop se čtyřmi objektivy (Intraco Micro, Česká republika)
- Centrifuga minispin plus (Eppendorf, Německo)
- Elektrický zdroj pro elektroforézu EV243 (Consort, Belgie)
- Elektroforetická vana vč. příslušenství MultiSUB Mini (Consort, Belgie)
- Flow Box (Clean Air, Česká republika)
- Chladnička s mrazicím boxem CSA34020 (BEKO, Turecko)
- Mikropipety (Biohit, Finsko)
- Mikropipety (Eppendorf, Německo)
- Mikropipety Nichipet EX (NICHIRYO, Japonsko)
- Mikrovlnná trouba (Electrolux, Švédsko)
- Osobní počítač ESPRIMO (Fujitsu-Siemens, Japonsko, Německo)
- PCR box AURA PCRTM (BIOAIR, Itálie)
- Termocykler Aeris™ (ESCO, Singapur)
- Termostat blokový Bio TDB-100 (Biosan, USA)
- UV-Transiluminátor InGeniusLHR (SYNGENE, Velká Británie)
- Váhy 440-47 N d=0,01 g (KERN, Německo)
- Vortex V-1 plus (Biosan, USA)
- Ostatní: Sterilní plastové Petriho misky, sterilní bakteriologické kličky, podložní sklíčka, imerzní olej, Pasteurovo kapátko, pipety, sterilní špičky, sterilní špičky s filtrem, sterilní skleněné zkumavky, sterilní zkumavky Eppendorf, sterilní mikrozukavky, stojánky na zkumavky, kádinky, odměrné válce, skleněné láhve, laboratorní pomůcky pro elektroforézu.

7.2 Roztoky a chemikálie

- 0,9% fyziologický roztok (0,8% NaCl (PENTA, Česká republika) v destilované vodě)
- 100 bp DNA Ladder N3231L (Biolabs. Inc., New England)
- Aceton (PENTA, Česká republika)
- Agaróza pro elektroforézu (Lonza, Švýcarsko)
- Barvivo GelRed pro vizualizaci nukleových kyselin agarózovou elektroforézou
- Etanol (PENTA, Česká republika)
- Imerzní olej (Merck, USA)
- Kit DNeasy Blood & Tissue Kit od firmy Qiagen.
- Krystalová violet (PENTA, Česká republika)
- Lugolův roztok (LACHEMA, Česká republika)
- PBS pufr (phosphate buffered saline (fosfátový pufr) je pufrovaný solný roztok, který udržuje stabilní pH a osmotické podmínky blízké fyziologickému prostředí buněk. (LONZA)
- Primery pro prokaryota RD1, FD1 a pro eukaryota LR6, NL1 (metabion international AG, Německo)
- Půdy: Acetobacter agar, Malt extract Broth Base, Lactobacillus MRS Broth (MRS Broth) (HIMEDIA)
- Redestilovaná voda pro molekulární biologii
- Safranin (HIMEDIA, Indie)
- TAE pufr – Tris-acetát-EDTA pufr je puфраční roztok běžně používaný při elektroforéze DNA. Udržuje stabilní pH prostředí, zajišťuje vodivost roztoku a chrání nukleové kyseliny před degradací díky přítomnosti EDTA, které váže kovové ionty (20 mM Tris-base, 10 mM acetát sodný, 0,5 mM EDTA, pH 7,4 (Merck, USA))
- VWR Red Taq DNA Polymerase Master Mix (Avantor, Dánsko)

7.3 Charakteristika vzorků

Pro mikrobiologický rozbor a následnou identifikaci mikroorganismů bylo použito 8 rozdílných vzorků kombuch lišících se v délce fermentace, koncentraci cukru, druhu sladidla a druhu čaje. Délka fermentace byla 7, 10, 14, 21, 28 a 35 dní. Sladidlem byla zvolena sacharóza a med. Koncentrace sacharózy byla 50 g/l a 75 g/l, použitá koncentrace medu byla 75 g/l. Kombucha byla kultivována ve dvou druzích čajů, jedním byl černý čaj Assam Orangajuli SFTGFOP1 (výrobce Oxalis, země původu Indie) v koncentraci 3 g/l a bylinný čaj Doktor z hor v koncentraci 4 g/l (Složení: šalvěj lékařská nať, řebříček obecný nať, podběl obecný květ i list, prvosenka jarní květ, divizna velkokvětá květ, sléz nať, chrpa květ, úročník bolhoj květ, výrobce Oxalis, země původu Slovenská republika). Přehled testovaných vzorků kombuch je uveden v Tabulce 9.

Dále byl proveden mikrobiologický rozbor 10 vzorků vodních kefirů lišících se v koncentraci použitého substrátu a koncentraci cukru. Jako čajový substrát byl použit bylinný čaj z rostliny *Sideritis syriaca* (tzv. horský čaj, výrobce NW s.r.o., sklizeň 05 - 06 / 2023, země původu Albánie). Koncentrace toho čaje byla zvolena 6, 8 a 10 g/l. Jako sladidlo byla použita sacharóza v koncentracích 30, 60 a 90 g/l. Fermentace probíhala 24 hodin. Přehled analyzovaných vzorků vodních kefirů je uveden v Tabulce 10. Modelové vzorky vodních kefirů laskavě poskytla Ing. Eva Lorencová, Ph.D.

Tabulka 9 Charakteristika vzorků kombuch použitých pro mikrobiologický rozbor

Číslo vzorku	Charakteristika vzorků kombuch
K1	Černý čaj koncentrace 3 g/l
	Sacharóza koncentrace 50 g/l
	Délka fermentace 28 dní
K2	Černý čaj koncentrace 3 g/l
	Sacharóza koncentrace 50 g/l
	Délka fermentace 21 dní
K3	Černý čaj koncentrace 3 g/l
	Sacharóza koncentrace 50 g/l
	Délka fermentace 14 dní
K4	Bylinný čaj koncentrace 4 g/l
	Med koncentrace 75 g/l
	Délka fermentace 7 dní
K5	Černý čaj koncentrace 3 g/l
	Sacharóza koncentrace 75 g/l
	Délka fermentace 7 dní, odběr vzorku spodní zákal
K6	Černý čaj koncentrace 3 g/l
	Sacharóza koncentrace 75 g/l
	Délka fermentace 7 dní, odběr vzorku pod biofilmem
K7	Černý čaj koncentrace 3 g/l
	Sacharóza koncentrace 75 g/l
	Délka fermentace 7 dní
K8	Černý čaj koncentrace 3 g/l
	Sacharóza koncentrace 50 g/l
	Délka fermentace 35 dní

Tabulka 10 Charakteristika vzorků vodních kefirů použitých pro mikrobiologický rozbor

Číslo vzorku	Charakteristika vzorků vodních kefirů
V1	Horský čaj koncentrace 6 g/l
	Sacharóza koncentrace 30 g/l
	Délka fermentace 24 hodin
V2	Horský čaj koncentrace 6 g/l
	Sacharóza koncentrace 60 g/l
	Délka fermentace 24 hodin
V3	Horský čaj koncentrace 6 g/l
	Sacharóza koncentrace 90 g/l
	Délka fermentace 24 hodin
V4	Horský čaj koncentrace 8 g/l
	Sacharóza koncentrace 30 g/l
	Délka fermentace 24 hodin
V5	Horský čaj koncentrace 8 g/l
	Sacharóza koncentrace 60 g/l
	Délka fermentace 24 hodin
V6	Horský čaj koncentrace 8 g/l
	Sacharóza koncentrace 90 g/l
	Délka fermentace 24 hodin
V7	Horský čaj koncentrace 10 g/l
	Sacharóza koncentrace 30 g/l
	Délka fermentace 24 hodin
V8	Horský čaj koncentrace 10 g/l
	Sacharóza koncentrace 60 g/l
	Délka fermentace 24 hodin
V9	Horský čaj koncentrace 10 g/l
	Sacharóza koncentrace 90 g/l
	Délka fermentace 24 hodin
V10	Černý čaj koncentrace 10 g/l
	Sacharóza 90 g/l
	Délka fermentace 24 hodin

8 METODIKA

8.1 Kultivační rozbor a stanovení počtu mikroorganismů

Kultivační média použitá pro mikrobiologický rozbor byla připravena z komerčních dehydratovaných směsí. Do lahve bylo dle návodu výrobce naváženo odpovídající množství příslušné dehydratované kultivační půdy. Navážka byla poté doplněna destilovanou vodou do celkového objemu 400 ml. Obsah lahve byl důkladně promíchán a následně sterilizován v autoklávu při teplotě 121 °C po dobu 15 minut. Po sterilizaci a ochlazení médií na přibližně 50–60 °C byly živné půdy rozlity do Petriho misek. Misky byly ponechány ve sterilním prostředí laminárního boxu až do zatuhnutí, poté byly řádně označeny. Připravené kultivační půdy byly ponechány ve skladovací lednici v temnu při teplotě 5±1 °C.

8.1.1 Kultivační půdy

Pro kultivaci vzorků, stanovení počtu mikroorganismů a izolaci mikroorganismů byly použity tyto kultivační půdy:

Acetobacter agar (Glucose)

Acetobacter agar se využívá pro kultivaci plísni, kvasinek a octových bakterií. Složení kultivační půdy je uvedeno v tabulce 11.

Tabulka 11 Složení Acetobacter agaru

Látka	Množství
Kvasničný extrakt	10 g/l
Uhličitan vápenatý	10 g/l
Glukóza	3 g/l
Agar	15 g/l

- pH při 25 °C 7,4±0,2

Malt extract Broth Base

Malt extract Broth Base se využívá pro detekci kvasinek, plísni a acidofilních mikroorganismů. Složení kultivační půdy je uvedeno v tabulce 12.

Tabulka 12 Složení Malt extract Broth Base

Látka	Množství
Sladový extrakt	17 g/l
Mykologický pepton	3 g/l

- pH při 25 °C 5,4±0,2
- Pro přípravu tuhé kultivační půdy byl použit Agar Type I v koncentraci 6,0 g / 400 ml

Lactobacillus MRS Broth (MRS Broth)

MRS Broth se využívá pro kultivaci mléčných bakterií. Složení kultivační půdy je uvedeno v tabulce 13.

Tabulka 13 Složení Lactobacillus MRS Broth

Látka	Množství
Proteózový pepton	10 g/l
HM pepton B	10 g/l
Kvasničný extrakt	5 g/l
Dextróza (glukóza)	20 g/l
Polysorbát 80 (Tween 80)	1 g/l
Citrát sodný	2 g/l
Acetát sodný	5 g/l
Sulfát hořečnatý	0,1 g/l
Sulfát manganatý	0,05 g/l
Hydrogen fosforečnan draselný	2 g/l

- pH při 25 °C 6,5±0,2
- Pro přípravu tuhé kultivační půdy byl použit Agar Type I v koncentraci 6,0 g / 400 ml

Agar Agar, Type I

Tento agar se využívá pro své želírující schopnosti k přípravě tuhých kultivačních medií.

8.1.2 Příprava vzorků pro kultivaci

Přítomnost mikroorganismů ve vzorcích kombuch a vodních kefirů byla stanovena kultivační metodou. Připravená suspenze byla naočkována na povrch kultivačních medií pomocí přístroje Spiral plater, přičemž byl zvolen program log mode 50. Vzorky byly uchovávány ve sterilních zkumavkách a veškerá manipulace s otevřenými zkumavkami probíhala výhradně v laminárním boxu, aby se zabránilo kontaminaci. Veškeré stanovení proběhlo ve dvojím opakování.

Desítkové ředění vzorků

K přípravě vzorků pro očkování na kultivační půdy bylo použito desítkové ředění. Do první sterilní zkumavky obsahující 4,5 ml sterilního fyziologického roztoku bylo přidáno 0,5 ml analyzovaného vzorku, čímž bylo dosaženo ředění 10^{-1} . Obsah zkumavky byl důkladně promíchán na vortexu. Následně bylo 0,5 ml z této zkumavky přeneseno do druhé sterilní zkumavky s 4,5 ml fyziologického roztoku (ředění 10^{-2}) a opět promícháno. Stejným způsobem byla připravena další ředění až po 10^{-5} .

Inokulace pomocí spiral plater a kultivace

K inokulaci vzorků na kultivační média byl použit přístroj spiral plater, přičemž byl nastaven program log mode 50. V laminárním boxu bylo do sterilních plastových nádob tvaru kloboučků napipetováno 800 μ l jednotlivých ředění vzorku. Každé ředění bylo pipetováno zvlášť do samostatného kloboučku. Pro kultivační půdy Acetobacter agar a MRS agar byla použita ředění 10^{-3} a 10^{-4} , zatímco pro médium Malt Extract Broth Base byla zvolena ředění 10^{-4} a 10^{-5} . Kloboučky byly následně postupně vkládány do držáku přístroje, který prováděl automatickou inokulaci na předem popsání kultivační média. Inokulovaná média byla inkubována při laboratorní teplotě (22 °C) po dobu 7 dní. Po uplynutí této doby byly vzorky dále zpracovány.

Stanovení CFU

Po uplynutí doby kultivace byl pomocí automatického počítače kolonií (přístroj Sphere Flash) stanoven počet kolonií vyrostlých na příslušných živných půdách. Následně byl výsledek vyjádřen jako počet jednotek tvořících kolonie neboli CFU (colony-forming units) na 1 gram vzorku.

8.2 Izolace mikroorganismů

Z vykultivovaných vzorků byly dále izolovány jednotlivé kolonie lišící se morfologií – barvou, velikostí, produkcí exopolysacharidů či vznikem opalescence. Vybrané kolonie byly přeneseny pomocí sterilní jednorázové očkovací kličky na příslušné kultivační médium, kde byl proveden křížový roztěr. Kultivační médium bylo vždy shodné s médiem, ze kterého byla daná kolonie izolována – například kolonie získaná z *Acetobacter* agaru byla opět přenesena na *Acetobacter* agar. Veškerá manipulace probíhala ve sterilních podmínkách laminárního boxu. Připravené Petriho misky byly inkubovány při laboratorní teplotě (22 °C) po dobu 5 dní. Po uplynutí této doby byl celý proces zopakován. Celkem byl postup přečištění kolonií proveden čtyřikrát.

8.3 Barvení dle Grama

U vybraných izolátu bylo pro kontrolu čistoty a zároveň zjištění, zda se jedná o bakterie či kvasinky, provedeno barvení dle Grama.

Gramovo barvení je diferencující metoda, která rozděluje bakterie do dvou základních skupin grampozitivní a gramnegativní, a to na základě rozdílů ve stavbě jejich buněčné stěny. Krystalová violet vytváří s jódem z Lugolova roztoku tmavě fialový komplex. U grampozitivních bakterií zůstává komplex zachován, protože silná vrstva peptidoglykanu zabraňuje jeho vyplavení. Buňky tedy zůstávají fialové. U gramnegativních bakterií je peptidoglykanová vrstva tenčí a alkohol komplex vyplaví. Buňky jsou bezbarvé. Tyto bakterie se poté dobarvují safraninem a jsou červené (Madigan et al., 2019).

Postup:

1. Zhotovení fixovaného preparátu
2. Aplikace krystalové violeti 1 min
3. Aplikace Lugolova roztoku 1 min
4. Oplach vodou
5. Odbarvováním acetonem / etanolem po dobu maximálně 20 s
6. Oplach vodou
7. Dobarvení safraninem 1 min

Takto obarvené preparáty byly usušeny a mikroskopovány pod imerzním objektivem. Dle této metody bylo nejen určeno, zda se jedná o bakterie či kvasinky, ale zároveň byla zjištěna čistota jednotlivých izolátů.

8.4 Izolace DNA mikroorganismů

S čistými izoláty mikroorganismů se dále pracovalo a probíhala izolace jejich DNA pomocí kitu DNeasy Blood & Tissue Kit od firmy Qiagen.

Postup:

1. Bakteriální kolonie byly resuspendovány v 200 μ l PBS do vzniku zákalu.
2. Poté se do směsi přidalo 20 μ l proteinázy K a 200 μ l AL pufru, směs se promíchala a inkubovala při 56 °C po dobu 10 minut.
3. Následně se přidalo do směsi 200 μ l 96% etanolu a opatrně se směs promíchala.
4. Směs se přenesla do DNeasy mini spin kolonek a proběhla centrifugace při 8000 rpm po dobu 1 minuty.
5. DNeasy mini spin kolona se přenesla do čisté 2 ml zkumavky a dovnitř kolony se napipetovalo 500 μ l AW1 promývacího pufru.
6. Kolony se směsí se centrifugovaly při 800 rpm po dobu 1 minuty.
7. Poté se DNeasy mini spin kolona se přenesla do čisté 2 ml zkumavky a dovnitř kolony se napipetovalo 500 μ l AW2 promývacího pufru.
8. Kolony se směsí se centrifugovaly při 14 000 rpm po dobu 3 minut.
9. Obsah zkumavek se vylil a kolonky se zkumavkami se opět nechaly centrifugovat při 14 000 po dobu 3 minut.
10. Následně se kolonky přenesly do čistých zkumavek a dovnitř kolonek se napipetovalo 100 μ l AE dilučního pufru předehřátého na 60 °C. Tato směs se nechala inkubovat po dobu 10 minut.
11. Centrifugace při 8000 rpm po dobu 1 minuty.
12. Přenesení DNA izolátu do zkumavky s víčkem

Stanovení čistoty a koncentrace DNA:

Princip stanovení čistoty a koncentrace DNA spočívá ve schopnosti nukleových kyselin absorbovat ultrafialové záření, absorpční maximum je při vlnové délce 260 nm.

Koncentrace DNA se určuje měřením absorbance při 260 nm přičemž platí, že absorbance při 260 nm odpovídá přibližně 50 µg/ ml dvouřetězcové DNA.

Čistota DNA se poté hodnotí pomocí poměru absorbancí A_{260}/A_{280} a A_{260}/A_{230} :

- A_{260}/A_{280} poměr mezi absorpcí DNA (260 nm) a absorpcí proteinů (280 nm)
 - ✓ Hodnota ~1,8 značí čistou DNA
 - ✓ Nižší hodnoty naznačují kontaminaci proteiny nebo fenolem
- A_{260}/A_{230} poměr indikující přítomnost organických kyselin
 - ✓ Hodnota ~2,0–2,2 značí kvalitní DNA

U získaných izolátů bylo provedeno měření čistoty koncentrace DNA pomocí přístroje TECAN 200.

Postup měření:

1. Na speciální destičku byly napipetovány 2 µl AE pufru, ve kterém byla DNA izolována a byla provedena kalibrace přístroje pomocí blank vzorku.
2. Následně byly napipetovány 2 µl od každého vzorku izolátu do příslušné jamky a postupně proběhlo měření a zapsání hodnot čistoty a koncentrace DNA.

Na základě získaných hodnot koncentrace a čistoty DNA byla u vhodných izolátů provedena PCR reakce.

8.5 Polymerázová řetězová reakce

Polymerázová řetězová reakce (PCR) je molekulárně biologická metoda, která umožňuje exponenciální amplifikaci specifického úseku DNA. Základní princip vychází z opakovaného cyklu tří kroků, které probíhají za přesně definovaných teplot. Jedná se o denaturaci, annealing a elongaci.

Denaturace probíhá při 94–95 °C v tomto kroku dochází k rozrušení dvouřetězcové DNA na jednotlivé řetězce. Následně probíhá annealing při teplotě 50–56 °C. Při annealingu se ke komplementárním sekvencím na jednotlivých DNA řetězcích připojují specifické

primery, které vymezují amplifikovaný úsek. Posledním krokem PCR reakce je elongace. Elongace probíhá při teplotě 72 °C, pomocí DNA polymerázy, která je termostabilní dochází k prodlužování primeru syntézou nové DNA dle templátu. Tyto tři kroky se obvykle opakují ve 30–40 cyklech, což vede k masivnímu zmnožení cílového úseku DNA.

Postup přípravy směsi:

Reakční směs pro izoláty byla připravena dle tabulek 14 a 15. Bylo napočítáno přesné množství jednotlivých komponent dle příslušných tabulek 14 a 15.

Tabulka 14 Složení PCR směsi určené pro prokaryota

Látka	Množství
*Master mix Red tag	12,5 µl
Primer RD1	0,5 µl
Primer FD1	0,5 µl
DNA izolát	1 µl
Voda	10,5 µl
Celkový objem pro 1 PCR reakci	Σ 25 µl

*Master mix Red tag: Taq DNA polymerázu, dNTPs (deoxynukleotid trifosfáty), MgCl₂, pufr, červené barvivo

Tabulka 15 Složení PCR směsi určené pro eukaryota

Látka	Množství
Master mix Red tag	12,5 µl
Primer LR6	0,5 µl
Primer NL1	0,5 µl
DNA izolát	1 µl
Voda	10,5 µl
Celkový objem pro 1 PCR reakci	Σ 25 µl

Následně bylo napipetováno 24 µl připravené PCR směsi do předem připravených a označených sterilních mikrozkušavek určených pro PCR reakce. Do každé zkumavky byl poté přidán 1 µl příslušného vzorku DNA. V poslední zkumavce byla připravena negativní kontrola, která obsahala PCR reakční směs a sterilní vodu. Takto připravené zkumavky byly stočeny a vloženy do PCR cycleru, kde probíhala PCR reakce (tabulka 16). Veškerá příprava probíhala ve sterilním boxu bez laminárního proudění vzduchu.

Program PCR reakce:

Tabulka 16 Program PCR reakce

Fáze	Teplota (°C)	Čas	Počet cyklů	Poznámka
Inicializace	95	2 min	1	Počáteční denaturace
Opakování cyklu			9	Annealing snižování teploty o 0,5 °C/cyklus (z 62 na 57 °C)
Denaturace	95	0:30 min		
Annealing	62–57	0:30 min		Klesá s každým cyklem o 0,5 °C
Elongace	72	1:30 min		
Opakování cyklu			24	Fixní teplota annealingu 57 °C
Denaturace	95	0:30 min		
Annealing	57	0:30 min		
Elongace	72	1:30 min		
Finální elongace	72	5:00 min		Prodloužení všech fragmentů
Ukončení	4	∞		Uchování vzorků

8.6 Elektroforéza

Elektroforéza je fyzikálně-chemická separační metoda, která slouží k rozdělení nabitých molekul (např. DNA, RNA nebo proteinů) na základě jejich velikosti a elektrického náboje v elektrickém poli. V případě nukleových kyselin se nejčastěji využívá agarózová gelová elektroforéza.

Po ukončení polymerázové řetězové reakce byla provedena elektroforéza. Elektroforéza po PCR reakci slouží k ověření úspěšnosti PCR. Konkrétně k tomu, jestli se amplifikoval požadovaný úsek DNA a také slouží k určení jeho velikosti.

Postup elektroforézy:

Nejprve byl připraven 1,5% elektroforetický gel. K přípravě gelu se využívala agaróza určena pro elektroforetické metody. Do erlenmeyerovy baňky bylo naváženo 3,75 g agarózy, následně se do baňky odměřilo 250 ml TAE pufru. Tato směs se zahřívala v mikrovlnné troubě do dokonalého rozpuštění agarózy v TAE pufru. Toto rozpouštění trvalo 3-4 minuty. Po vyčerení roztoku se baňka i s obsahem nechala zchladnout na cca 50 °C a do směsi byla přidána barva GelRed Nucleic Acid Stain. Na 250 ml gel bylo přidáno 5 kapek barviva. Tato směs se nalila do předem připravené formy s hřebínky a nechala zcela zatuhnout. Po zatuhnutí se vytáhly vložené hřebínky, které slouží k vytvoření jamek pro vzorky. Takto připravený agarózový gel se vložil do elektroforetické vany s předem nalitým TAE pufrem a gel byl zcela ponořený.

Do první jamky v každé řadě byl napipetován standard (marker o určité velikosti párů bází). Markeru bylo pipetováno 4 μ l. Následně do každé jamky byly napipetovány 4 μ l příslušného vzorku. Tento postup se opakoval do té doby, než byly naplněny všechny jamky v připraveném gelu.

Elektroforetická vana byla uzavřena a připojena ke zdroji, kde byl zvoleno napětí 120 V a elektroforéza probíhala po dobu 60 minut. Po 60 minutách byla elektroforéza ukončena a gel byl umístěn do zobrazovacího zařízení a podroben analýze pod UV zářením. Dle intenzity záření bylo vyhodnoceno, zda se vzorky mohou zpracovávat dále a připravovat na další analýzu, popřípadě zda je nutno opakovat PCR reakci.

8.7 Sekvenace a identifikace izolovaných mikroorganismů

Sekvenování DNA je molekulárně-biologická metoda, která umožňuje určit přesné pořadí nukleotidů (adenin, thymin, cytosin a guanin) v molekule DNA. Tato technika je klíčová pro identifikaci mikroorganismů, analýzu genů či studium genetických variací. Výsledné sekvence lze porovnat s databázemi, jako je např. NCBI GenBank, a tím určit druhovou příslušnost daného organismu. V současné době existuje několik různých metod sekvenování, z nichž mezi nejpoužívanější patří metoda Sangerova sekvenování.

Sangerovo sekvenování

Sangerova metoda, známá také jako metoda sekvenování podle terminace řetězce, byla vyvinuta Frederickem Sangerem v roce 1977 a stala se základem pro sekvenování první generace. Tato technika je založena na klasické PCR reakci, během které dochází k syntéze DNA pomocí DNA polymerázy, ale za přítomnosti speciálních dideoxynukleotidů (ddNTPs). Tyto modifikované nukleotidy postrádají hydroxylovou skupinu na 3' konci cukerné části, což způsobuje terminaci syntézy DNA při jejich zařazení do nově vznikajícího řetězce.

Každý ze čtyř dideoxynukleotidů (ddATP, ddTTP, ddCTP a ddGTP) je značen specifickým fluorescenčním barvivem. Po ukončení reakce vznikne směs fragmentů různých délek, zakončených vždy jedním z fluorescenčně značených ddNTPs. Tyto fragmenty jsou následně rozděleny elektroforézou na kapiláře podle velikosti a fluorescenční značení umožní automatické čtení sekvence detektorem. Sangerovo sekvenování je přesná metoda vhodná pro sekvenaci kratších úseků DNA (obvykle do 1000 bp) a je často využívána např. pro identifikaci bakteriálních kmenů na základě analýzy genu pro 16S rRNA (Sanger et al., 1977).

Vzorky, u kterých byl vyhodnocen správný průběh polymerázové řetězové reakce pomocí gelové elektroforézy byly podrobeny následné sekvenační analýze. V laboratoři byla provedena purifikace a poté se vzorky zaslaly do externí laboratoře kde byla sekvenace dokončena.

Postup purifikace:

1. Vzorky byly seřazeny do stojánku a bylo k nim napipetováno 17 μ l SPRI magnetických kuliček. Obsah zkumavek byl řádně promíchán a přepipetován do mikrotitrační destičky.
2. Mikrotitrační destička byla přenesena na magnetickou podložku, kde pomocí magnetické síly došlo k oddělení kuliček od supernatantu. Tento supernatant byl odpipetován.
3. Do každé jamky se přeneslo 180 μ l 85% etanolu a proběhla inkubace 30–60 sekund.
4. Mikrotitrační destička se přenesla na magnetickou podložku, kde se odseparovaly magnetické kuličky od supernatantu a supernatant v podobě 85% etanolu byl odstraněn.

5. Destička se nechala vysušit po dobu 5 minut.
6. Následně bylo napipetováno 30 μ l vody určené pro molekulární metody.
7. Proběhla inkubace po dobu 10 minut.
8. Destička byla přenesena na magnetickou podložku a supernatant byl přenesen do druhé označené mikrotitrační destičky.
9. U dvou vzorků z každé řady bylo provedeno kontrolní měření na přístroji TECAN pro kontrolu čistoty a koncentrace DNA.
10. Takto připravené vzorky byly zaslány do externí laboratoře pro dokončení sekvenační analýzy.

Po ukončení sekvenační analýzy byly výsledky rozděleny na dvě vlákna dle použitých primerů. V našem případě byly využity primery pro prokaryoty FD1 a RD1 a pro eukaryoty LR6 a NL1. Jednotlivá vlákna byla zkontrolována a následně byly příslušná vlákna spojena. Takto spojená vlákna byla nahrána do mikrobiologické databáze kde na základě jejich genetického kódu byla dokončena identifikace jednotlivých mikroorganismů izolovaných z kombuch a vodních kefirů.

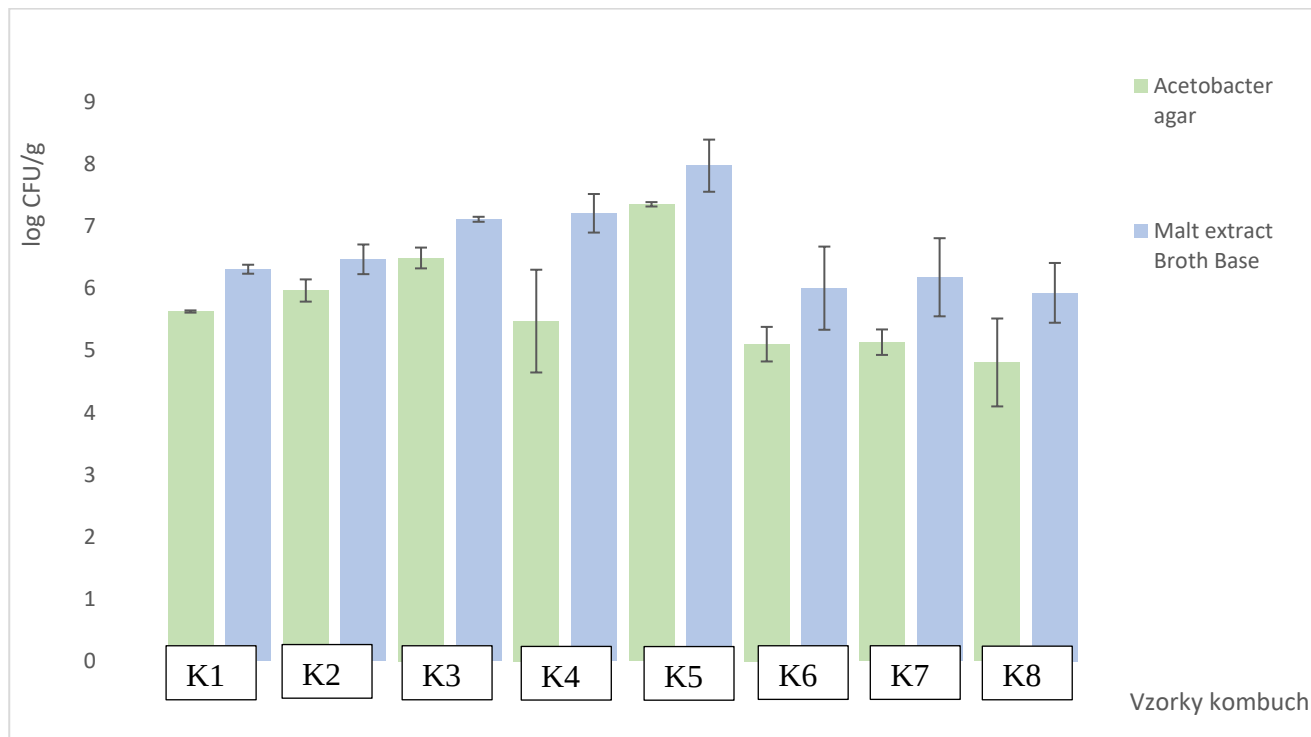
9 VÝSLEDKY A DISKUZE

9.1 Mikrobiologické analýza kombuch a vodních kefirů

K mikrobiologické analýze bylo vybráno 8 rozdílných vzorků kombuch a 10 vzorků vodních kefirů. Tyto vzorky byly podrobeny kultivační metodě za použití spirál plateru v programu log mode 50 a následně byl stanoven počet kolonie tvořících jednotek (CFU). Kolonie byly dále izolovány a bylo u nich provedeno Gramovo barvení. Následně byla provedena izolace DNA a měření čistoty a koncentrace DNA vybraných izolátů mikroorganismů. Vyizolovaná DNA byla poté pomocí polymerázové řetězové reakce amplifikována, purifikována a takto připravené vzorky byla zaslány na sekvenaci.

Stanovení CFU/g

U všech vzorků bylo provedeno desítkové ředění. Suspenze kombuch se nanášely na půdu Acetobacter agar v ředění 10^{-3} a 10^{-4} a na půdu Malt Extract Broth Base agar bylo zvoleno ředění 10^{-4} a 10^{-5} . Misky s uvedenými půdami byly kultivovány při laboratorní teplotě 22 °C po dobu 5–7 dnů. Veškeré analýzy byly provedeny ve dvojím opakování. Výsledky CFU/g pro jednotlivé vzorky kombuch jsou uvedeny v tabulce 17 a 18.



Obrázek 5 Počty mikroorganismů vyrostených v jednotlivých kombuchách

Tabulka 17 Počty mikroorganismů (vyjádřeny jako log CFU/g) ve vzorcích kombuch

Vzorek	AC agar	MEBB agar	Vzorek	AC agar	MEBB agar
	Log CFU/g	Log CFU/g		Log CFU/g	Log CFU/g
K1	5,6503	6,2122	K5	7,3820	7,7536
	5,6304	6,3874		7,3324	7,4928
	5,6180	6,3075		7,3802	8,2718
	5,6096	6,3222		7,3118	8,3729
PRŮMĚR	5,6271	6,3073	PRŮMĚR	7,3516	7,9728
SMODCH	0,02	0,07	SMODCH	0,04	0,42
K2	5,9206	6,5119	K6	5,2122	5,6096
	5,9415	6,2625		4,7853	6,7853
	5,7853	6,7853			6,3075
	6,2122	6,3075		5,3075	5,3075
PRŮMĚR	5,9649	6,4668	PRŮMĚR	5,1017	6,0025
SMODCH	0,18	0,24	SMODCH	0,28	0,67
K3	6,3424	7,1703	K7	5,0086	5,6096
	6,3579	7,1004		4,9101	5,7853
	6,5635	7,0864		5,3075	7,0086
	6,6884	7,0864		5,3075	6,3075
PRŮMĚR	6,4881	7,1108	PRŮMĚR	5,1334	6,1778
SMODCH	0,17	0,04	SMODCH	0,20	0,63
K4	5,0864	7,0864	K8	4,3075	5,7853
	4,9101	6,8993			5,3075
	6,4216	7,6304		5,3075	6,3075
		7,2122			6,3075
PRŮMĚR	5,4727	7,2071	PRŮMĚR	4,8075	5,9270
SMODCH	0,83	0,31	SMODCH	0,71	0,48

*ND= nedetekován nárůst mikroorganismů

Z výsledků uvedených v tabulce 17 vyplývá že počet mikroorganismů (vyjádřený jako kolonie tvořící jednotky) se pohybuje v rozmezí 10^4 až 10^8 CFU/g. Jejich logaritmická hodnota je znázorněna na obrázku 5. Nejnižší nárůst byl zaznamenán na půdě Acetobacter agar u vzorků K7 a K8 v řádu 10^4 až 10^5 CFU/g, což může být ovlivněno délkou fermentace analyzovaného nápoje kombucha. (K7 10 dní, K8 28 dní fermentace) Naopak nejvyšší hodnoty byly naměřeny u vzorku K5 kde se hodnoty pohybovaly v řádu 10^7 až 10^8 CFU/g. Tyto hodnoty mohou být opět ovlivněny délkou fermentace (K5 7 dní), či koncentrací sacharózy (75 g/l). Zároveň je nutno zohlednit, že vzorek K5 byl odebíráán ze spodního zákalu, kde během fermentace sedimentují kvasinky, což také odpovídá výsledkům CFU/g

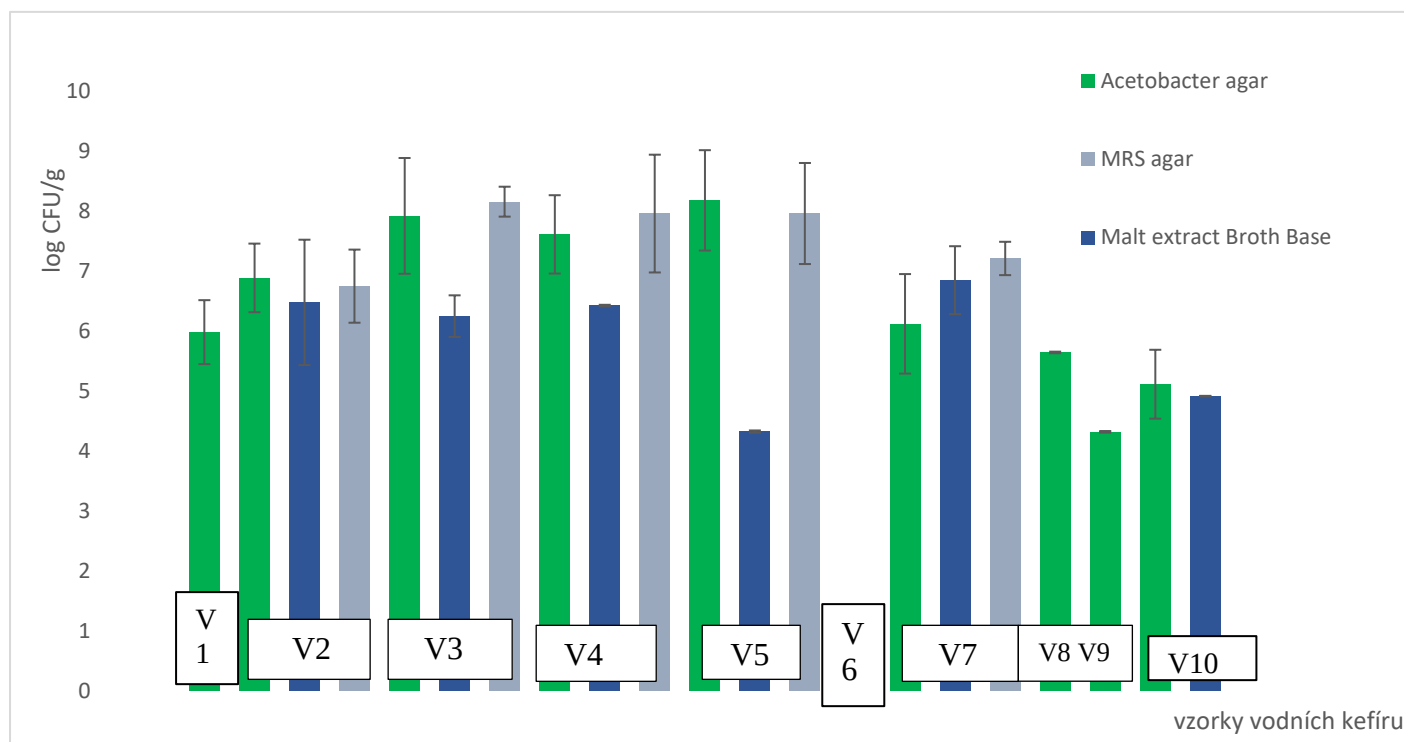
pro mikroorganismy zachycené na půdě Malt extract Broth Base, která se především využívá právě pro záchyt kvasinek.

Suspenze vodních kefirů se nanášely na půdu Acetobacter agar, Malt extract Broth Base (MEBB) agar a MRS agar v ředění 10^{-3} a 10^{-4} . Výsledky CFU/g pro jednotlivé vzorky vodních kefirů jsou uvedeny v tabulce 18.

Tabulka 18 Počty mikroorganismů (vyjádřeny jako log CFU/g) ve vzorcích vodních kefirů

Vzorek	AC agar Log CFU/g	MEBB agar Log CFU/g	MRS Log CFU/g	Vzorek	AC agar Log CFU/g	MEBB agar Log CFU/g	MRS Log CFU/g
V1	ND			V6			
	5,3636						
	6,2625						
	6,3118						
PRŮMĚR	5,9793	ND	ND	PRŮMĚR	ND	ND	ND
SMODCH	0,53			SMODCH			
V2	6,3655	5,5635	6,1875	V7	5,4216	6,3284	6,9661
	6,4116	5,5775	6,2504		5,3784	6,3820	6,9699
	7,3692	7,3766	7,2577		6,8395	7,3404	7,4698
	7,3892	7,3856	7,2900		6,8344	7,3324	7,4281
PRŮMĚR	6,8839	6,4758	6,7464	PRŮMĚR	6,1185	6,8458	7,2085
SMODCH	0,57	1,05	0,61	SMODCH	0,83	0,57	0,28
V3	7,0453	5,9513	7,9445	V8	5,6503		
	7,1206	5,9400	7,9360		5,6314		
	8,7664	6,5391	8,3483		ND		
	8,7419	6,5551	8,3945		ND		
PRŮMĚR	7,9186	6,2464	8,1558	PRŮMĚR	5,6409	ND	ND
SMODCH	0,97	0,35	0,25	SMODCH	0,01		
V4	7,0294	6,4314	7,0531	V9	4,3075		
	7,0607	6,4116	7,1614		4,3263		
	8,1523	ND	8,7993		ND		
	8,1987	ND	8,8142		ND		
PRŮMĚR	7,6103	6,4215	7,9570	PRŮMĚR	4,3169	ND	ND
SMODCH	0,65	0,01	0,98	SMODCH	0,01		
V5	7,4654	4,3075	7,2648	V10	4,6096	4,9101	
	7,4393	4,3345	7,1931		4,6180	4,9159	
	8,9036	ND	8,6776		5,6096	ND	
	8,9004	ND	8,6972		5,6075	ND	
PRŮMĚR	8,1772	4,3210	7,9582	PRŮMĚR	5,1112	4,9130	ND
SMODCH	0,84	0,02	0,84	SMODCH	0,57	0,00	

*ND= nedetekován nárůst mikroorganismů



Obrázek 6 Počty mikroorganismů vyrostených v jednotlivých vodních kefirech

Tabulka 18 zaznamenává výsledky počtu kolonií (vyjádřeno jako log CFU/g) v analyzovaných vodních kefirech. U vodních kefirů byl zaznamenán nárůst mikroorganismů v širokém rozmezí od 10^4 do 10^8 CFU/g, viz obrázek 6. Nejnižší nárůst byl zaznamenán u vzorků V6, V8 a V9. U těchto vzorků byla detekována přítomnost mikroorganismů pouze na Acetobacter agaru v řádu 10^4 až 10^5 CFU/g. Na půdách Malt extract Broth Base agar a MRS agar nárůst detekován nebyl. Nejvyšší počty mikroorganismů byly zaznamenány u vzorků V3, V4 a V5 v řádu 10^6 až 10^8 CFU/g. Počty mikroorganismů mohly být opět ovlivněny koncentrací sacharózy nebo koncentrací čaje.

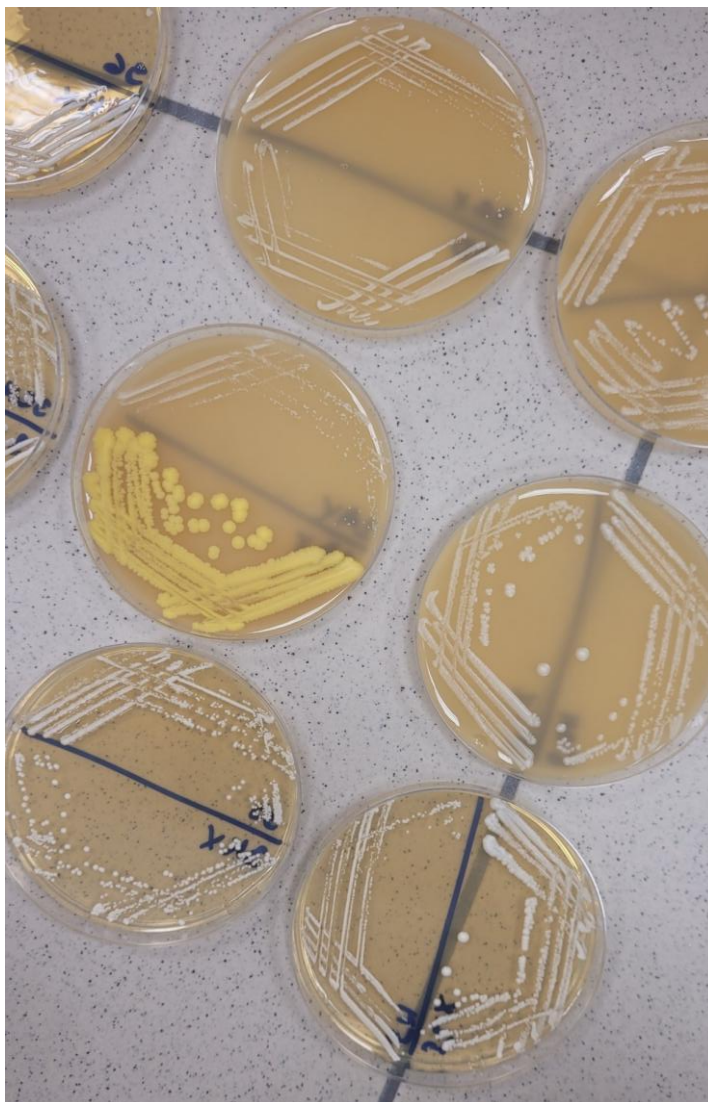
Izolace mikroorganismů

Z vykultivovaných misek byly dále izolovány jednotlivé, rozlišné kolonie, které se lišily např. velikostí, zbarvením, profilem nebo konzistencí. Bylo provedeno přečištění těchto kolonií pomocí křížového roztěru. V tabulkách 19 a 20 je uveden seznam všech vyizolovaných kolonií z kombuch a vodních kefirů, které byly podrobeny další analýze.

Tabulka 19 Označení jednotlivých kolonií izolovaných ze vzorků kombuch

Vzorek	Izolace kolonií		Celkový počet izolátů
	Acetobacter agar	Malt extract Broth Base	
K1	1 A, 1 B, 1 C, 1 D, 1E, 1 F, 1G	1 H, 1CH, 1I, 1 J, 1 K	12
K2	2 A, 2 B, 2 C, 2 D, 2 E, 2 F, 2 G, 2 H	2CH, 2I, 2 J, 2 K, 2L	13
K3	3 A, 3 B, 3 C, 3 D, 3 E, 3 F	3 G, 3 H, 3 CH, 3I, 3 J, 3 K, 3 L	14
K4	4 A, 4 B, 4 C, 4 D, 4E, 4 F	4 G, 4 H, 4 CH	9
K5	5 A, 5 B, 5 C, 5 D, 5 E, 5 F, 5G, 5 H, 5CH,5 I	5 J, 5 K, 5L, 5M, 5 N, 5O, 5P, 5Q	18
K6	6 A, 6 B, 6 C, 6 D, 6 E, 6 F, 6 G, 6 H	6 CH, 6 I, 6 J	11
K7	7 A, 7 B, 7 C, 7 D, 7 E, 7 F, 7 G, 7 H, 7 CH	7 I, 7 J, 7 K, 7L	13
K8	8 A, 8 B	-	2
			Celkem 92

Z uvedené tabulky 19 je patrné, že z kombuch bylo izolováno 92 rozdílných kolonií u kterých bylo provedeno přečištění. Z těchto kolonií bylo následně vybráno 58 izolátů (obrázek 7) u kterých bylo následně provedeno Gramovo barvení a identifikace pomocí molekulárně biologických metod. U kombuchy K1 bylo izolováno 7 kolonií z Acetobacter agaru a 5 kolonií z Malt extract Broth Base agaru. Ze vzorku kombuchy K2 bylo izolováno 8 kolonií z Acetobacter agaru a 5 kolonií z Malt extract Broth Base agaru. Ze vzorku K3 bylo izolováno z Acetobacter agaru 6 kolonií a z Malt extract Broth Base agaru 7 kolonií. U kombuchy K4 bylo izolováno 6 kolonií z Acetobacter agaru a 3 kolonie z Malt extract Broth Base agaru. Pro vzorek K5 bylo vybráno z Acetobacter agaru 10 rozlišných kolonií a 8 kolonií rostoucích na Malt extract Broth Base agaru. Z kombuchy K6 bylo izolováno 8 kolonií rostoucích na Acetobacter agaru a 3 kolonie rostoucí na Malt extract Broth Base agaru. U kombuchy K7 bylo izolováno 9 kolonií z Acetobacter agaru a 4 kolonie z Malt extract Broth Base agaru. Ze vzorku kombuchy K8 byly izolovány 2 kolonie rostoucí na Acetobacter agaru.



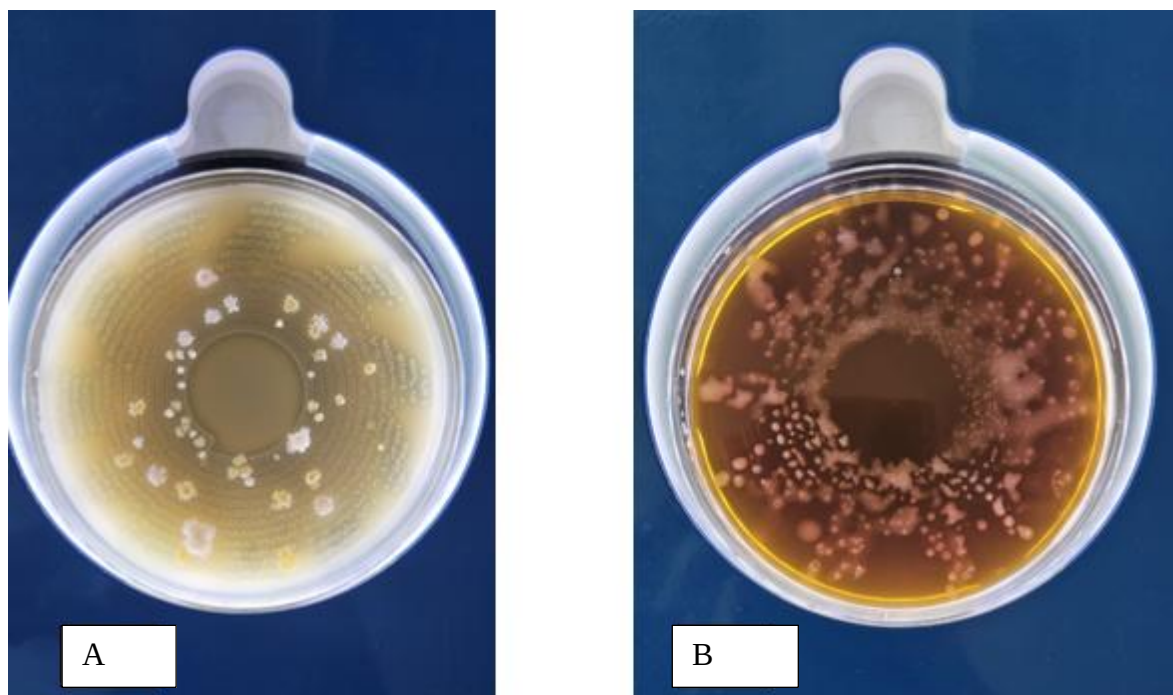
Obrázek 7 Vybrané izoláty mikroorganismů ze vzorků kombuch vyrostených na půdě
Acetobacter agar

Z modelových vzorků vodních kefirů bylo izolováno 25 rozdílných kolonií (tabulka 20, obrázek 8 a 9) u kterých bylo provedeno přečištění. Z těchto kolonií bylo následně vybráno 25 izolátů u kterých bylo následně provedeno Gramovo barvení a u 22 proběhla identifikace pomocí molekulárně biologických metod.

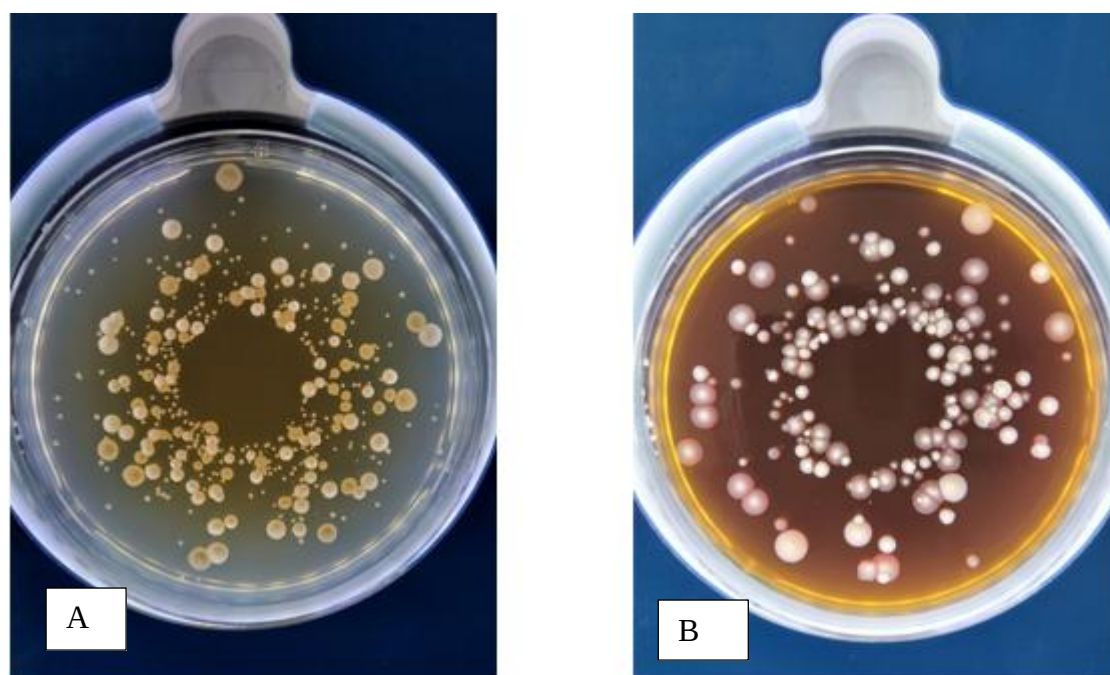
Tabulka 20 Označení jednotlivých kolonií izolovaných ze vzorků vodních kefirů

Vzorek	Izolace kolonií			Celkový počet izolátů	
	Acetobacter agar	Malt extract Broth Base	MRS		
Vodní kefir 1	V1A	-	-	1	
Vodní kefir 2	V2A, V2B	V2D, V2E	V2C	5	
Vodní kefir 3	V3A, V3B	V3D	V3C	4	
Vodní kefir 4	V4A	0	V4B	2	
Vodní kefir 5	V5A	-	-	1	
Vodní kefir 6	ND	ND	ND	-	
Vodní kefir 7	V7A, V7B, V7C	V7E, V7F	V7D	6	
Vodní kefir 8	V8A, V8B	-	-	2	
Vodní kefir 9	V9A	-	-	1	
Vodní kefir 10	V10A, V10B	V10C		3	Celkem
					25

*ND = nedetekován nárůst mikroorganismů



Obrázek 8 Nárůst mikroorganismů vodního kefiru V2 na půdách Acetobacter agar (A) a MRS agar (B)



Obrázek 9 Nárůst mikroorganismů vodního kefiru V7 na půdách Malt extract Broth Base (A) a MRS agar (B)

Gramovo barvení

Gramovo barvení bylo provedeno u 80 izolátů ze vzorků kombuch a vodních kefirů. Na základě Gramova barvení proběhla identifikace mikroorganismů a rozdělení jednotlivých izolátů na grampozitivní, gramnegativní bakterie a kvasinky. V tabulce 21 jsou výsledky Gramova barvení pro vzorky mikroorganismů izolované z kombuchy. V tabulce 22 jsou uvedeny výsledky Gramova barvení pro vzorky mikroorganismů izolované z vodního kefiru.

Z výsledků uvedených v tabulce 22 je patrné, že dominantní podíl v mikrobiální komunitě kombuch hrají kvasinky. Oproti tomu dominantní mikrobiota ve vodním kefiru představuje směs grampozitivních a gramnegativních bakterií. Dle typu morfologie jednotlivých kolonií bylo vyhodnoceno, že vzorky V1A a V5A vykazují stejné morfologické znaky jako vzorek V2A a z toho důvodu byly vyřazeny z následné analýzy. Z takto připravených izolátů bylo následně pomocí komerčně dodávaného kitu vyizolováno DNA.

Tabulka 21 Výsledky Gramova barvení pro izoláty z kombuch

Izolát	Výsledek	Izolát	Výsledek	Izolát	Výsledek
1A	G- bakterie	3CH	kvasinka	6B	kvasinka
1B	G- bakterie	3I	kvasinka	6D	G- bakterie
1E	kvasinka	3K	G- bakterie	6E	G- bakterie
1F	G- bakterie	4A	G- bakterie	6G	kvasinka
1H	kvasinka	4B	kvasinka	6CH	kvasinka
1K	kvasinka	4C	G- bakterie	6I	G- bakterie
1I	G- bakterie	4E	G- bakterie	6J	kvasinka
2A	kvasinka	4G	G- bakterie	7A	kvasinka
2B	kvasinka	4H	G- bakterie	7B	G- bakterie
2C	G- bakterie	4CH	G- bakterie	7C	kvasinka
2D	kvasinka	5A	kvasinka	7E	kvasinka
2F	G+ bakterie	5C	kvasinka	7G	kvasinka
2K	G- bakterie	5E	kvasinka	7CH	kvasinka
2L	kvasinka	5F	kvasinka	7I	kvasinka
2CH	kvasinka	5I	kvasinka	7K	kvasinka
3A	kvasinka	5K	kvasinka	7L	kvasinka
3B	kvasinka	5L	kvasinka	8A	G+ bakterie
3C	kvasinka	5N	kvasinka	8B	G+ bakterie
3E	kvasinka	5P	kvasinka		
3H	kvasinka	6A	G- bakterie		

Tabulka 22 Výsledky Gramova barvení pro izoláty z vodních keřů

Izolát	Výsledek	Izolát	Výsledek	Izolát	Výsledek
V2A	G+ bakterie	V4A	G- bakterie	V8A	G- bakterie
V2B	G+ bakterie	V4B	G+ bakterie	V8B	G- bakterie
V2C	G- bakterie	V7A	G- bakterie	V9A	G+ bakterie
V2D	G- bakterie	V7B	kvasinka	V10A	G+ bakterie
V3A	G- bakterie	V7C	kvasinka	V10B	G- bakterie
V3B	G- bakterie	V7D	G- bakterie	V10C	G- bakterie
V3C	G+ bakterie	V7E	kvasinka		
V3D	G- bakterie	V7F	kvasinka		

Izolace DNA a měření čistoty a koncentrace DNA

Po skončení izolace DNA proběhlo měření čistoty a koncentrace DNA na přístroji TECAN. Dle výsledku této analýzy bylo poté rozhodnuto, zda se vzorky vyizolují znovu anebo se mohou použít pro polymerázovou řetězovou reakci. V tabulce 23 jsou uvedeny výsledné hodnoty čistoty a koncentrace DNA pro vzorky kombuch. V tabulce 24 jsou uvedeny hodnoty čistoty a koncentrace DNA pro vzorky vodních kefirů.

Tabulka 23 Naměřené hodnoty čistoty a koncentrace DNA pro izoláty z kombuch

Koncentrace a čistota DNA					
Vzorek	Koncentrace $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	Ratio	Vzorek	Koncentrace $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	Ratio
1A	23,7	2,19	4CH	425,6	2,19
1B	19,8	2,04	5A	17,1	2,09
1E	10,9	2,37	5C	8,2	2,48
1F	22,4	2,02	5E	3,8	1,9
1H	6	2	5F	63,7	2,26
1K	7,8	2,17	5I	27,6	2,3
1I	20,8	2,26	5K	4,5	2,25
2A	6,7	1,91	5L	2,3	1,77
2B	16,5	2,01	5N	12,5	2,12
2C	10,7	2,23	5P	9,8	2
2D	10,4	2	6A	56,3	2,08
2F	7,2	2,18	6B	19,2	2,4
2K	44,2	2,15	6D	29,6	2,13
2L	5,6	2,15	6E	30,7	2,05
2CH	17,5	2,13	6G	10,1	2,06
3A	13,3	2,08	6CH	33	2,14
3B	15,1	2,16	6I	155	2,1
3C	11,2	2,29	6J	2,7	1,8
3E	12,3	1,95	7A	8,9	2,02
3H	3,1	1,94	7B	46,7	1,97
3CH	12,6	2,14	7C	5,6	2,67
3I	9,8	2,18	7E	17,9	2,18
3K	4,8	1,92	7G	14,4	2,03
4A	23,6	1,95	7CH	14,2	2,29
4B	15	2,24	7I	7	2,33
4C	26,6	2,13	7K	9,3	2,11
4E	27,8	2,07	7L	5,7	2,19
4G	35	2,22	8A	16,6	1,93
4H	311	2,16	8B	20,1	2,07

*Ratio = poměr absorpance A_{260}/A_{280} sloužící k posouzení čistoty nukleových kyselin, zejména s ohledem na přítomnost bílkovin či jiných kontaminantů

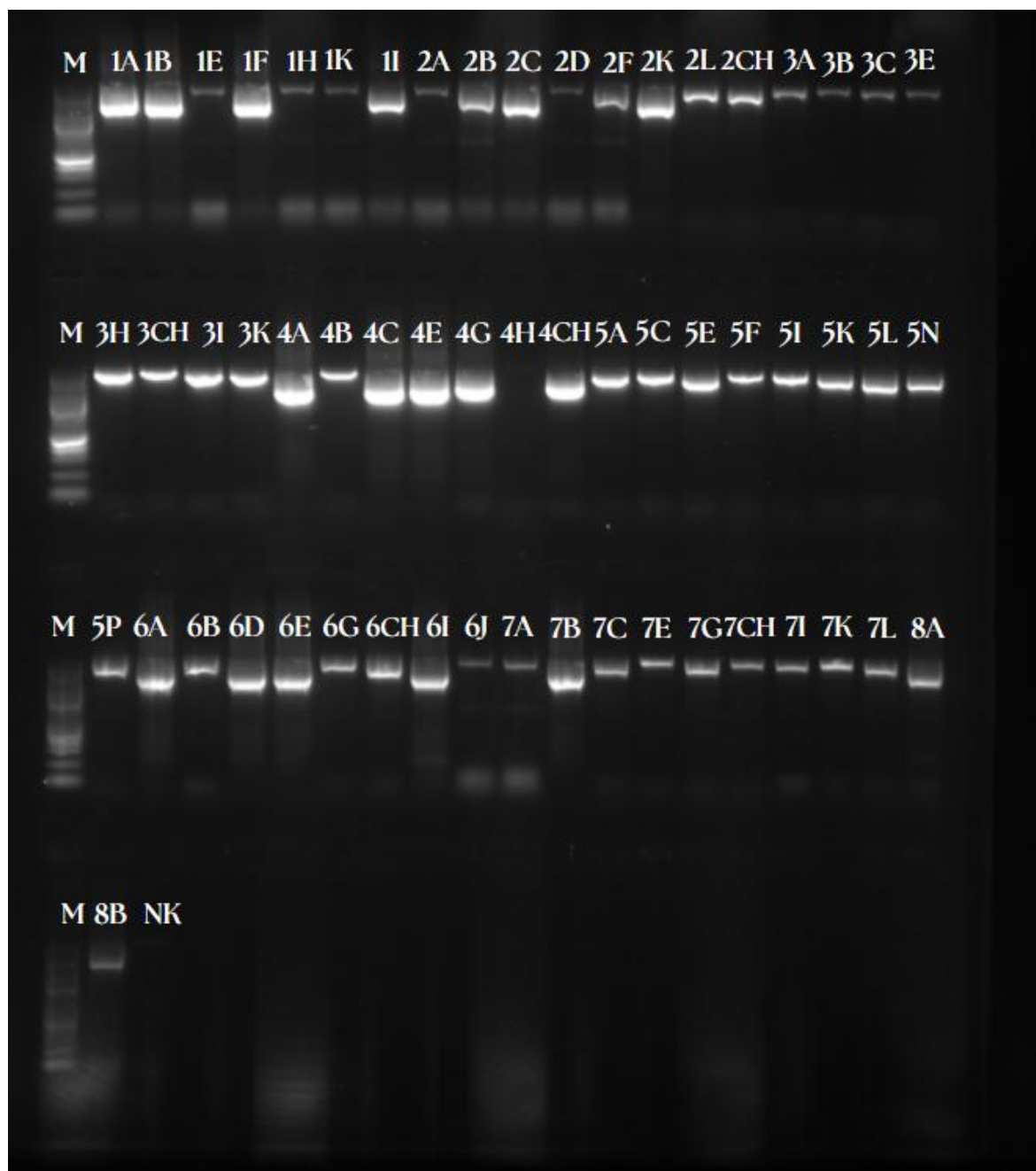
Tabulka 24 Naměřené hodnoty čistoty a koncentrace DNA pro izoláty z vodních kefirů

Koncentrace a čistota DNA					
Vzorek	Koncentrace $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	Ratio	Vzorek	Koncentrace $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	Ratio
V2A	48,8	1,81	V7C	8,2	1,78
V2B	12,4	2,03	V7D	5,3	2,12
V2C	14,7	2,07	V7E	10,8	1,93
V2D	3,4	1,89	V7F	17,3	1,9
V3A	62,6	1,95	V8A	179,1	2,13
V3B	24,3	1,81	V8B	25,9	1,96
V3C	6,1	1,74	V9A	17	1,93
V3D	6,9	1,73	V10A	5,9	1,78
V4A	73,2	2,09	V10B	7,7	1,83
V4B	11,7	2,02	V10C	8,8	1,8
V7A	7,8	1,86			
V7B	4,4	1,83			

Výsledné hodnoty čistoty a koncentrace DNA z tabulek 23 a 24 odpovídají běžným hodnotám a izoláty DNA byly použity pro další analýzu, konkrétně do polymerázové řetězové reakce.

Výsledky polymerázové řetězové reakce a elektroforézy

Po skončení polymerázové řetězové reakce, která probíhala v PCR cycleru se vzorky zchladily na 4 °C a byla provedena elektroforéza. Do 1,5% agarózového gelu byly pipetovány 4 μl vzorků a následně probíhala elektroforéza 1 hodinu při 120 V. Výsledný gel se zobrazil v zobrazovacím zařízení a na základě intenzity záření bylo vyhodnoceno, zda jsou vzorky vhodné pro následnou sekvenaci nebo zda se musí PCR reakce zopakovat.

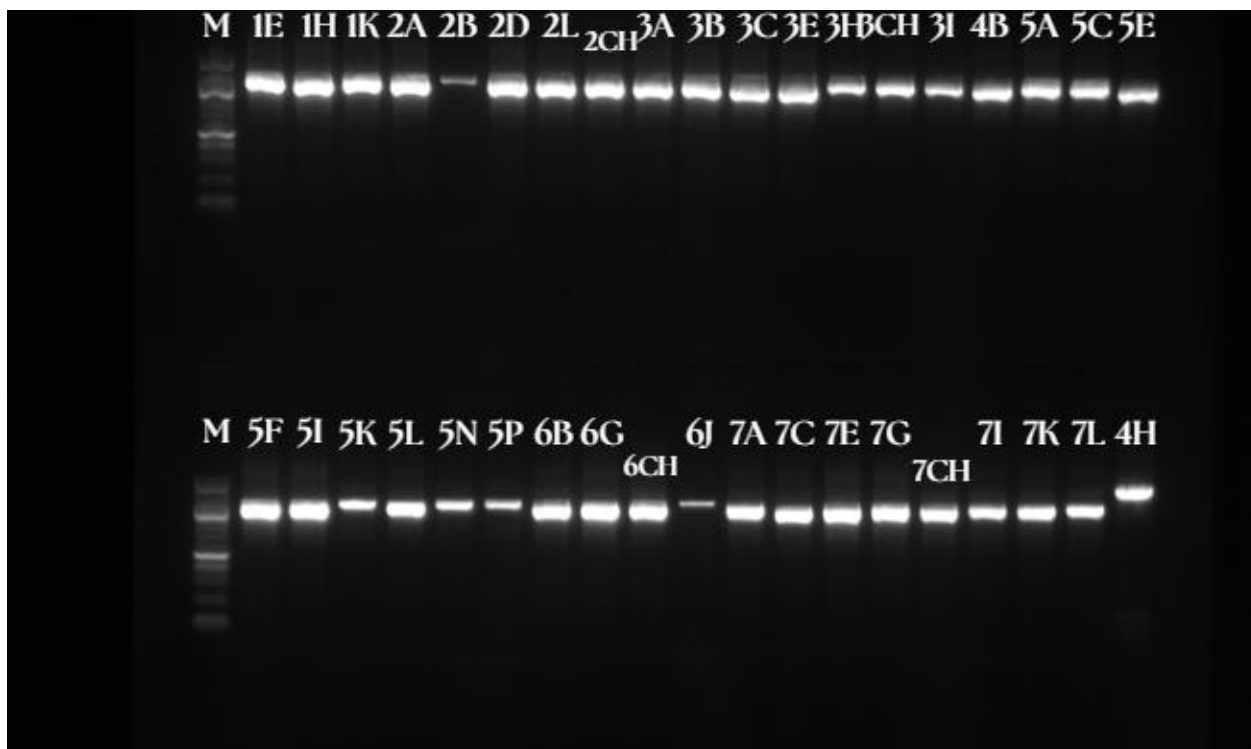


Obrázek 10 Gelová elektroforéza PCR produktů izolátů z kombuch za použití primeru FD1 a RD1

M= marker, NK= negativní kontrola

Dle výsledků gelové elektroforézy (obrázek 10 bylo rozhodnuto, že u vzorků 1A, 1B, 1F, 1I, 2C, 2F, 2K, 4A, 4C, 4E, 4G, 6A, 6D, 6E, 6I, 7B, 8A, 8B proběhla amplifikace správně a byl vytvořen produkt o očekávané velikosti 1000 bp. U vzorků 1E, 1H, 1K, 2A, 2B, 2D, 2L, 2CH, 3A, 3B, 3C, 3E, 3H, 3CH, 3I, 4B, 5A, 5C, 5E, 5F, 5I, 5K, 5L, 5N, 5P, 6B, 6G, 6CH, 6J, 7A, 7C, 7E, 7G, 7CH, 7I, 7K, 7L byla polymerázová řetězová reakce provedena znovu z důvodu špatně zvolených primerů. Pro polymerázovou řetězovou reakci byly poprvé zvoleny pouze primery FD1 a RD1, což jsou primery pro sekvenaci DNA z

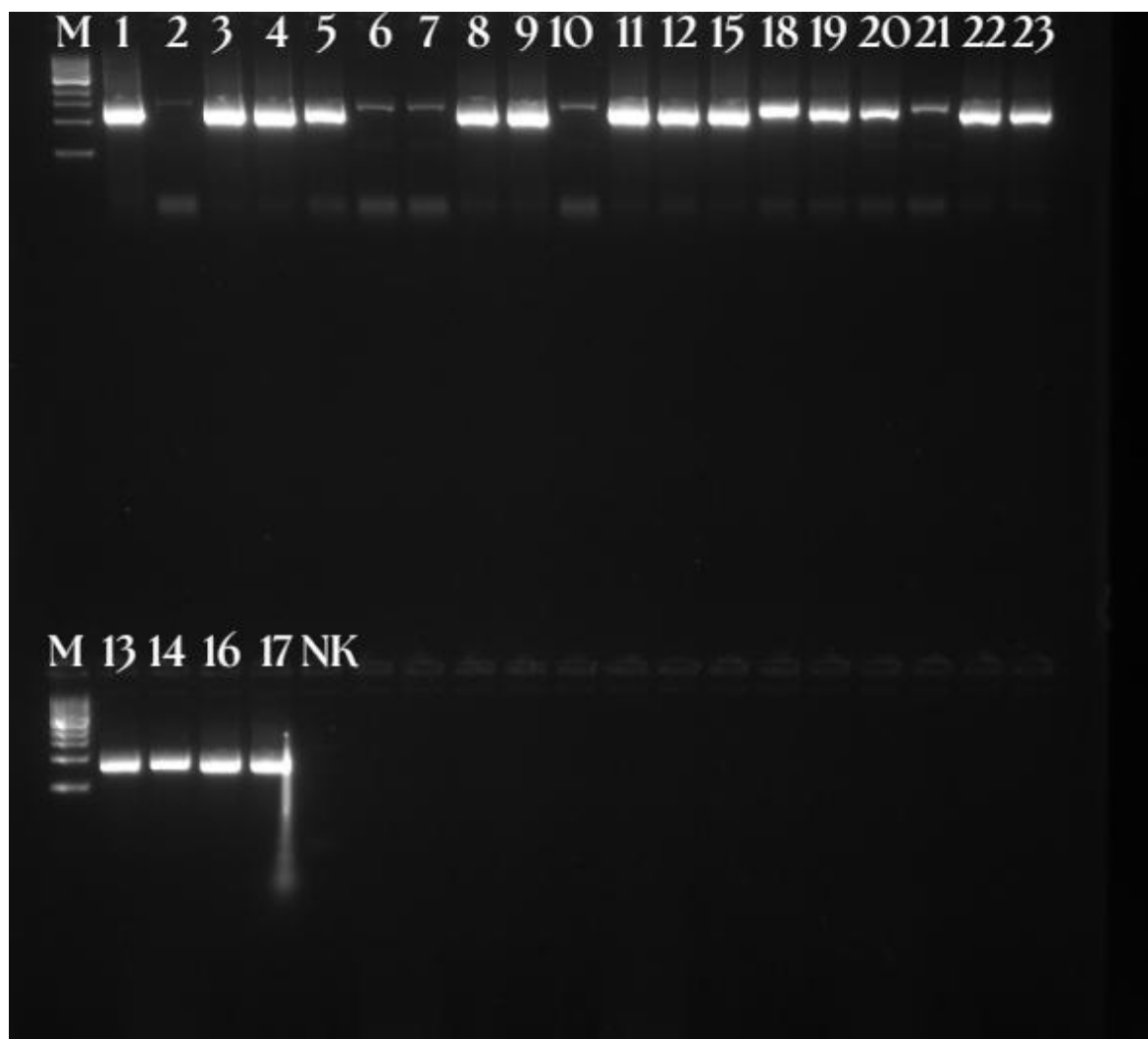
prokaryotických buněk. Vzhledem k předchozímu Gramovu barvení byly ve vzorcích také eukaryotické buňky konkrétně kvasinky, pro které tyto primery nejsou určeny. Při opakované PCR reakci byly zvoleny primery určeny pro eukaryota, tedy LR6 a NL1. Vzorek 4H se rovněž opakoval.



Obrázek 11 Gelová elektroforéza PCR produktů vzorků kombuch za použití primerů LR6 a NL1, u vzorku 4H byl použit primer FD1 a RD1

M= marker

Dle výsledku gelové elektroforézy PCR (obrázek 11) produktů u vzorků 1E, 1H, 1K, 2A, 2D, 2L, 2CH, 3A, 3B, 3C, 3E, 3H, 3CH, 3I, 4B, 5A, 5C, 5E, 5F, 5I, 5K, 5L, 5N, 5P, 6B, 6G, 6CH, 6J, 7A, 7C, 7E, 7G, 7CH, 7I, 7K, 7L, 4H, bylo rozhodnuto, že amplifikace proběhla dle očekávání a velikost PCR produktů byla o velikosti 1000 bp. U těchto vzorků byla dále provedena sekvenační analýza.



Obrázek 12 Gelová elektroforéza PCR produktů vzorků vodních kefirů za použití primerů RD1 a FD1 pro první řadu a primerů LR6 a NL1 pro druhou řadu

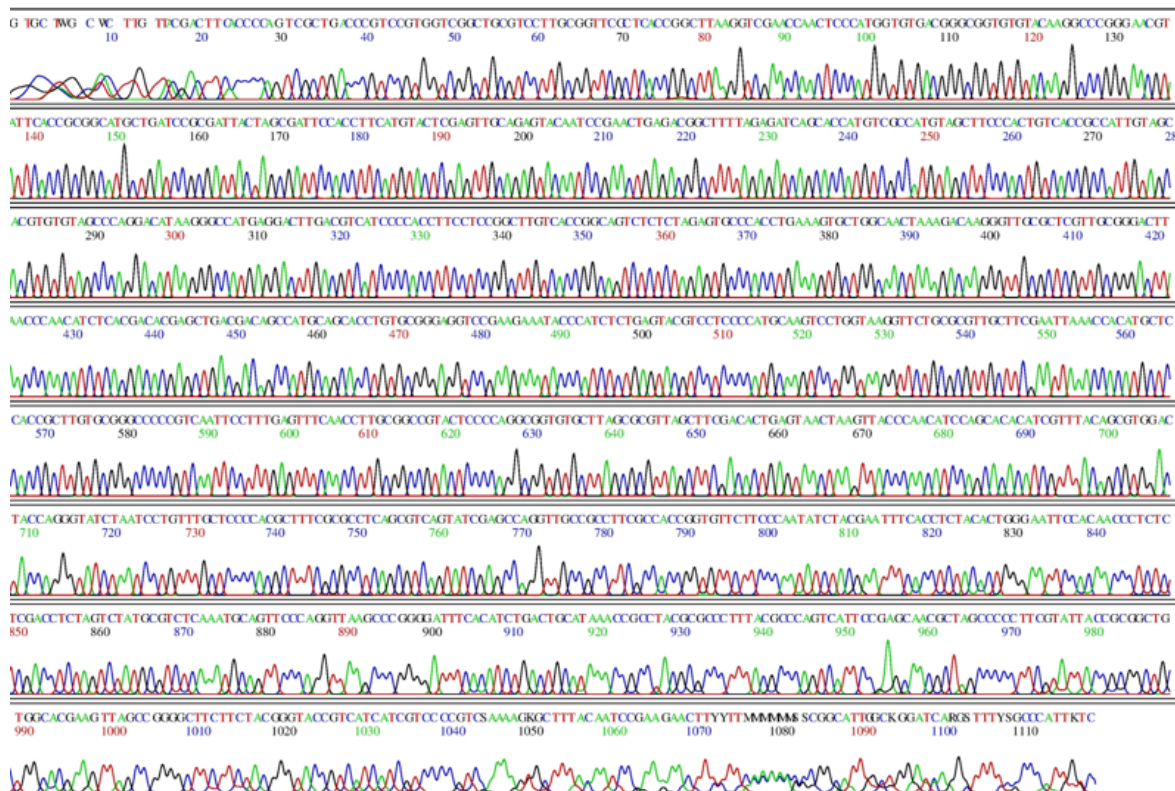
1= V2A, 2= V2B, 3=V2C, 4= V2D, 5=V2E, 6=V3A, 7=V3B, 8=V3C,9=V3D, 10=V4A, 11=V4B, 12=V7A, 13=V7B, 14=V7C,15= V7D, 16=V7E, 17= V7F, 18=V8A, 19=V8B,20=V9A, 21=V10A, 22=V10B, 23=V10C, M= marker, NK= negativní kontrola

Dle výsledků gelové elektroforézy (obrázek 12) byl z následné analýzy vyřazen vzorek s označením číslo 2 (V2B), který nesplňoval požadavky ohledně velikosti amplifikované DNA. Všechny ostatní vzorky byly dále analyzovány sekvenční metodou. Ostatní vzorky byly amplifikovány v požadované velikosti 1000 bp a byly použity v následné analýze.

Identifikace mikroorganismů:

Dle získaných dat ze sekvenční analýzy byly identifikovány jednotlivé mikroorganismy. Výsledkem sekvenace jsou vlákna jednotlivých primerů FD1 + RD1 pro prokaryota

(obrázek 13) a LR6 + NL1 pro eukaryota, které se spojí v programu DNA baser (obrázek 14) a následně se tato genetická informace nahraje do databáze mikroorganismů National library of medicine (obrázek 15), kde dojde k jejich identifikaci.



Tabulka 25 Identifikace mikroorganismů izolovaných z kombuchy K1

Kombucha K1		
Izolát	Mikroorganismus	Identifikační skóre (%)
1A	<i>Komagataeibacter rhaeticus</i>	99,68
1B	<i>Acetobacter tropicalis strain</i>	99,3
1E	<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	94,8
1F	<i>Acetobacter tropicalis</i>	99,53
1H	<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	95,51
1K	<i>Zygosaccharomyces bisporus</i>	95,44
1I	<i>Komagataeibacter rhaeticus</i>	99,37

V kombuše K1, která fermentovala 28 dní a základní substrát byl tvořen černým čajem o koncentraci 3 g/l a sacharózou o koncentraci 50 g/l byly identifikovány mikroorganismy uvedené v tabulce 25. Z tabulky je patrné, že úspěšně bylo identifikováno 7 kmenů mikroorganismů izolovaných z této kombuchy. Z výsledků je patrné, že byly zastoupeny 3 rody a to *Komagataeibacter*, *Acetobacter* a *Zygosaccharomyces*. Bakterie rodu *Komagataeibacter* byly zastoupeny 2 kmeny téhož druhu (*Komagataeibacter rhaeticus*), z rodu *Acetobacter* byly identifikovány rovněž 2 kmeny a zbývající tři izoláty byly zařazeny mezi kvasinky rodu *Zygosaccharomyces* (*Z. bailii* a *Z. bisporus*).

Tabulka 26 Identifikace mikroorganismů izolovaných z kombuchy K2

Kombucha K2		
Izolát	Mikroorganismus	Identifikační skóre (%)
2A	<i>Zygosaccharomyces pseudobailii</i>	99,81
2B	<i>Sporobolomyces pararoseus</i>	99,36
2C	<i>Komagataeibacter rhaeticus</i>	99,37
2D	<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	100
2F	<i>Micrococcus sp.</i>	99,69
2K	<i>Gluconobacter sp.</i>	99,37
2L	<i>Zygosaccharomyces baillii</i>	99,26
2CH	<i>Zygosaccharomyces baillii</i>	100

Vzorek kombuchy K2 fermentoval po dobu 21 dní za použití černého čaje o koncentraci 3 g/l a sacharózy v koncentraci 50 g/l. Celkem bylo z tohoto vzorku izolováno osm mikroorganismů, které náleží k pěti různým rodům, viz tabulka 26. Nejčastěji zastoupeným byl rod *Zygosaccharomyces*, přičemž se ve vzorku objevily druhy *Z. bailii* a

Z. pseudobailii. Dále byly identifikovány kvasinky *Sporobolomyces pararoseus* a bakterie rodů *Komagataeibacter*, *Gluconobacter* a *Micrococcus*. Výsledné složení mikrobioty ukazuje na výraznou převahu kvasinek, přičemž bakteriální část byla tvořena spíše doplňkovými druhy.

Tabulka 27 Identifikace mikroorganismů izolovaných z kombuchy K3

Kombucha K3		
Izolát	Mikroorganismus	Identifikační skóre (%)
3A	<i>Dekkera bruxelensis</i>	99,19
3B	<i>Brettanomyces bruxellensis</i>	99,61
3C	<i>Brettanomyces bruxellensis</i>	99,61
3E	<i>Brettanomyces bruxellensis</i>	99,6
3H	<i>Dekkera bruxelensis</i>	98,75
3CH	<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	99,62
3I	<i>Dekkera bruxelensis</i>	97,33
3K	<i>Comamonas sp.</i>	92,83

Kombucha K3 fermentovala po dobu 14 dní za standardních podmínek s použitím černého čaje 3 g/l a sacharózy 50 g/l. Celkem bylo identifikováno osm mikroorganismů (tabulka 27), přičemž dominantní zastoupení měly kvasinky rodů *Dekkera* a *Brettanomyces*, které jsou považovány za dvě nomenklaturní označení téhož organismu. Tyto druhy se vyskytly u většiny izolátů. Dále byl detekován zástupce kvasinek *Zygosaccharomyces bailii* a také jeden zástupce bakterií rodu *Comamonas*. Výsledky poukazují na výraznou převahu kvasinkové složky mikrobioty, s jediným zjištěným bakteriálním izolátem.

Tabulka 28 Identifikace mikroorganismů izolovaných z kombuchy K4

Kombucha K4		
Izolát	Mikroorganismus	Identifikační skóre (%)
4A	<i>Gluconobacter sp.</i>	99,37
4B	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	98,93
4C	<i>Gluconobacter potus</i>	99,45
4E	<i>Gluconobacter oxydans</i>	99,13
4G	<i>Gluconobacter oxydans</i>	99,05
4H	<i>Gluconobacter sp.</i>	99,37
4CH	<i>Gluconobacter oxydans</i>	98,97

Kombucha K4 fermentovala po dobu 7 dní s použitím bylinného čaje o koncentraci 4 g/l a jako alternativní sladidlo byl použit med v koncentraci 75 g/l. Analýzou bylo

identifikováno celkem sedm mikroorganismů viz tabulka 28. Vzorek byl charakteristický výraznou převahou bakteriální složky, konkrétně rodu *Gluconobacter*, který byl přítomen v šesti izolátech, včetně druhů *G. oxydans* a *G. potus*. Kvasinková složka byla zastoupena jediným druhem – *Saccharomyces cerevisiae*. Přítomnost těchto mikroorganismů naznačuje typické složení pro rané fáze fermentace s dominantní účastí octových bakterií.

Tabulka 29 Identifikace mikroorganismů izolovaných z kombuchy K5

Kombucha K5		
Izolát	Mikroorganismus	Identifikační skóre (%)
5A	<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	99,62
5C	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99,51
5E	<i>Clavispora lusitaniae</i>	99,75
5F	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99,61
5I	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99,42
5K	<i>Dekkera bruxelensis</i>	98,25
5L	<i>Dekkera bruxelensis</i>	93,69
5N	nelze identifikovat	-
5P	<i>Dekkera bruxelensis</i>	97,88

Vzorek kombuchy K5 byl odebrán ze spodní části fermentační nádoby, konkrétně ze zákalu, kde během fermentace přirozeně sedimentují kvasinky. Fermentace probíhala 7 dní s použitím černého čaje 3 g/l a sacharózy 50 g/l. V rámci analýzy bylo identifikováno osm mikroorganismů, z nichž sedm bylo přiřazeno ke konkrétním druhům a jeden izolát se nepodařilo jednoznačně určit (tabulka 29). Mikrobiota vzorku byla výhradně kvasinkového původu. Nejčastěji se vyskytoval druh *Saccharomyces cerevisiae*, následovaný zástupci *Dekkera bruxelensis*, dále byly detekovány kvasinky *Zygosaccharomyces bailii* a méně obvyklý druh *Clavispora lusitaniae*. Přítomnost pouze kvasinek odpovídá odběru z prostředí s nižším obsahem kyslíku.

Tabulka 30 Identifikace mikroorganismů izolovaných z kombuchy K6

Kombucha K6		
Izolát	Mikroorganismus	Identifikační skóre (%)
6A	<i>Acetobacter sp</i>	99,36
6B	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99,22
6D	<i>Acetobacter tropicalis</i>	98,67
6E	<i>Acetobacter tropicalis</i>	99,37
6G	<i>Hanseniaspora opuntiae</i>	99,51
6CH	<i>Brettanomyces bruxellensis</i>	99,81
6I	<i>Acetobacter tropicalis</i>	99,45
6J	<i>Sporobolomyces sp.</i>	99,29

Kombucha K6 fermentovala po dobu 7 dní za použití černého čaje o koncentraci 3 g/l a sacharózy v množství 50 g/l. Celkem bylo identifikováno osm mikroorganismů, které zastupují jak bakteriální, tak kvasinkovou složku mikrobioty, přehled je uveden v tabulce 30. Bakterie byly reprezentovány především druhem *Acetobacter tropicalis*, který byl identifikován ve třech izolátech, a jedním neupřesněným zástupcem rodu *Acetobacter*. Kvasinky byly rozmanitější – ve vzorku se vyskytovala *Saccharomyces cerevisiae*, *Hanseniaspora opuntiae*, *Brettanomyces bruxellensis* a *Sporobolomyces sp.* Výsledné složení naznačuje vyvážené zastoupení obou mikrobiálních skupin, které jsou běžnými účastníky fermentačního procesu kombuchy.

Tabulka 31 Identifikace mikroorganismů izolovaných z kombuchy K7

Kombucha K7		
Izolát	Mikroorganismus	Identifikační skóre (%)
7A	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99,61
7B	<i>Acetobacter tropicalis</i>	99,37
7C	<i>Clavispora lusitaniae</i>	95,59
7E	<i>Hanseniaspora opuntiae</i>	99,70
7G	<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	99,24
7CH	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99,61
7I	<i>Dekkera anomala</i>	98,04
7K	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99,42
7L	<i>Dekkera bruxellensis</i>	97,87

Kombucha K7 fermentovala po dobu 7 dní s použitím černého čaje o koncentraci 3 g/l a vyšší dávky sacharózy 75 g/l. Bylo identifikováno celkem devět mikroorganismů (tabulka 31), přičemž převažovala kvasinková složka. Nejčastěji se vyskytoval druh *Saccharomyces cerevisiae*, zastoupený ve třech izolátech. Dále byly detekovány druhy *Zygosaccharomyces bailii*, *Hanseniaspora opuntiae*, *Clavispora lusitaniae* a zástupci rodu *Dekkera* – konkrétně *D. bruxellensis* a *D. anomala*. Bakteriální složku tvořil pouze jeden zástupce – *Acetobacter tropicalis*. Takto vysoká mikrobiální diverzita ukazuje na komplexní průběh fermentace, přičemž vyšší koncentrace cukru mohla přispět k intenzivnějšímu rozvoji kvasinek.

Tabulka 32 Identifikace mikroorganismů izolovaných z kombuchy K8

Kombucha K8		
Izolát	Mikroorganismus	Identifikační skóre (%)
8A	<i>Micrococcus sp.</i>	99,23
8B	<i>Micrococcus yunnanensis</i>	93,7

Kombucha K8 prošla nejdelší fermentací ze všech analyzovaných kombuch – 35 dní při použití černého čaje o koncentraci 3 g/l a sacharózy 50 g/l. V tomto vzorku byly identifikovány dva bakteriální izoláty náležející k rodu *Micrococcus*, konkrétně *M. yunnanensis* a jeden blíže nespecifikovaný zástupce téhož rodu (tab. 32). Překvapivě nebyly ve vzorku detekovány žádné kvasinky. Přítomnost bakterií rodu *Micrococcus* může být spojena s jejich schopností přežívat v kyselém prostředí po delší dobu fermentace, kdy, již jiné mikroorganismy ustupují.

Další částí práce byla identifikace mikroorganismů z modelových vzorků vodních kefirů, jejíž výsledky jsou uvedeny v tabulce 33. Byly analyzovány mikroorganismy izolované ze 7 vodních kefirů. Vzorek vodního kefiru V2 byl fermentován po dobu 24 hodin s použitím horského čaje (6 g/l) a sacharózy v koncentraci 60 g/l. Bylo identifikováno pět mikroorganismů, přičemž převažovala bakteriální složka. Nejčastěji se vyskytoval druh *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *jonggajibkimchii*, přítomný ve dvou izolátech. Dále byly detekovány bakterie rodu *Gluconobacter* – konkrétně *G. cerinus* a *G. oxydans*. Složení odpovídá typickému obrazu kefirové fermentace s dominantními zástupci mléčného a octového kvašení.

Vzorek V3 fermentoval rovněž 24 hodin s horským čajem (6 g/l) a vyšší dávkou sacharózy (90 g/l). Získány byly čtyři izoláty, z nichž dva náležely druhu *Leuconostoc mesenteroides*, jeden *Gluconobacter cerinus* a jeden byl identifikován jako *Sedimentibacter* sp. Přítomnost tohoto rodu je poměrně vzácná a mohla souviset s vyšší koncentrací substrátu nebo interakcí mikroorganismů v rané fázi fermentace.

Vzorek V4 byl připraven s horským čajem v koncentraci 8 g/l a 30 g/l sacharózy, fermentovaný 24 hodin. Izolovány byly dvě varianty druhu *Leuconostoc mesenteroides*, přičemž jedna byla podrobněji určena jako poddruh *jonggajibkimchii*. Tyto bakterie mléčného kvašení jsou pro vodní kefir typické a často dominují v prostředí s nižší cukernatostí.

Tabulka 33 Identifikace mikroorganismů izolovaných z vodních kefirů

Vodní keřiry		
Izolát	Mikroorganismus	Identifikační skóre (%)
V2A	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>jonggajibkimchii</i>	99,70
V2C	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>jonggajibkimchii</i>	92,62
V2D	<i>Gluconobacter cerinus</i>	98,97
V2E	<i>Gluconobacter oxydans</i>	98,79
V3A	<i>Sedimentbacter</i> sp.	98,96
V3B	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	97,03
V3C	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	99,63
V3D	<i>Gluconobacter cerinus</i>	99,09
V4A	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	97,56
V4B	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>jonggajibkimchii</i>	99,62
V7A	<i>Gluconobactere</i> sp.	99,6
V7B	Nelze identifikovat	-
V7C	<i>Sacharomyces cerevisiae</i>	99,79
V7D	<i>Sacharomyces cerevisiae</i>	95,60
V7E	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	98,96
V7F	<i>Hanseniaspora valbyensis</i>	99,58
V8A	Nelze identifikovat	-
V8B	<i>Pseudomonas fulva</i>	99,85
V9A	<i>Corynebacterium mucifaciens</i>	96,05
V10A	<i>Micrococcus luteus</i>	99,54
V10B	<i>Gluconobacter</i> sp.	99,37
V10C	<i>Acetobacter persici</i>	99,53

Vzorek V7 fermentoval při použití horského čaje (10 g/l) a 30 g/l sacharózy po dobu 24 hodin. Byl jedním z diverzitně nejbohatších – bylo detekováno šest mikroorganismů. Mezi nimi dva izoláty *Saccharomyces cerevisiae*, dále zástupci rodů *Gluconobacter*, *Leuconostoc* a *Hanseniaspora*, přičemž jeden izolát zůstal neidentifikovaný. Vyšší čajová koncentrace mohla přispět k rozvoji komplexnějšího mikrobiálního společenství s výrazným zastoupením kvasinek.

Vzorek vodního keříru V8 vznikl fermentací s horským čajem (10 g/l) a sacharózou v množství 60 g/l po dobu 24 hodin. Ze vzorku byly získány dva izoláty – jeden neidentifikovaný a druhý určený jako *Pseudomonas fulva*. Výskyt tohoto rodu je v keřírové fermentaci poměrně neobvyklý a může signalizovat kontaminaci nebo odlišné vlastnosti vstupních surovin.

Vzorek V9 fermentoval s nejvyšší koncentrací čaje i sacharózy (10 g/l a 90 g/l) po dobu 24 hodin. Identifikován byl pouze jeden druh – *Corynebacterium mucifaciens*. Tento mikroorganismus není běžným zástupcem keřírové mikrobioty a jeho výskyt může souviset se specifickým složením substrátu či mikrobiálním vývojem při vysoké osmolaritě.

Vzorek V10 byl připraven z černého čaje (10 g/l) a 90 g/l sacharózy, fermentovaný 24 hodin. Detekovány byly tři mikroorganismy: *Micrococcus luteus*, *Gluconobacter* sp. a *Acetobacter persici*. Kombinace zástupců octového kvašení doplněná o druh *Micrococcus* odpovídá rozmanité mikrobiotě, která může vzniknout při fermentaci s alternativním typem čaje.

9.2 Souhrnná diskuze

V rámci této diplomové práce byla analyzována mikrobiální diverzita nealkoholických fermentovaných nápojů, konkrétně kombuchy a vodního keříru. Celkem bylo analyzováno osm různých vzorků kombuch a deset vzorků vodních keřírů, přičemž jednotlivé vzorky se lišily v délce fermentace, druhu a koncentraci použitého čaje, koncentraci sacharózy nebo typu použitého sladidla. Vzorky byly nejprve podrobeny kultivační analýze za účelem stanovení počtu mikroorganismů (vyjádřených jako kolonie tvořící jednotky na 1 g výrobku). Následně proběhla izolace vizuálně odlišných kolonií, ze kterých byla izolována DNA a následně provedena molekulárně-biologická identifikace mikroorganismů pomocí sekvenace. Na základě získaných dat byla určena mikrobiální skladba jednotlivých vzorků, která slouží jako podklad pro následující diskuzi

Počet mikroorganismů ve vzorcích kombuch se pohyboval v rozmezí 10^4 až 10^8 CFU/g, což odráží vliv různých podmínek fermentace. Počet octových bakterií se většinou pohyboval mezi 10^5 a 10^6 CFU/g, s výjimkou kombuchy K5 (10^7 CFU/g). Kvasinky byly detekovány především v rozmezí 10^6 až 10^8 CFU/g, u některých vzorků však pouze 10^5 CFU/g. Podobné hodnoty byly zaznamenány ve studii Kaashyap et al. (2021), kde celkový počet mikroorganismů dosáhl $4,9 \times 10^7$ CFU/ml. Dále Silva et al. (2024) uvádějí CFU/ml u kvasinek $1,74 \times 10^6$, mléčných bakterií $7,59 \times 10^6$ a octových bakterií $1,35 \times 10^4$.

U vodních kefirů se počet mikroorganismů pohyboval obdobně jako u kombuch – nejčastěji v rozmezí 10^4 až 10^8 CFU/g. Nejvyšší počet byl zaznamenán u vzorků V3, V4 a V5 (10^7 – 10^8 CFU/g), s výjimkou nižší hodnoty (10^4 CFU/g) ve vzorku V5 na médiu Malt Extract Broth Base. Hodnoty srovnatelné s těmito výsledky zaznamenává také studie Patel et al. (2022), která uvádí přibližně 10^6 CFU/g.

Z výsledků lze usuzovat, že mezi kombuchou a vodním kefirem není zásadní rozdíl v celkovém počtu mikroorganismů. Významný vliv však mají specifické fermentační podmínky, jako je délka fermentace a složení substrátu.

Cílem práce bylo rovněž určit mikrobiální složení jednotlivých vzorků. V rámci analýzy bylo identifikováno celkem 57 mikroorganismů izolovaných z kombuch, z nichž se pouze jeden izolát nepodařilo zařadit. Největší diverzitu vykazoval vzorek K7, ve kterém bylo detekováno šest různých rodů zahrnujících jak bakterie, tak kvasinky. Napříč všemi analyzovanými vzorky kombuch byly identifikovány následující rody: *Komagataeibacter*, *Acetobacter*, *Micrococcus*, *Gluconobacter*, *Comamonas*, *Zygosaccharomyces*, *Sporobolomyces*, *Dekkera*, *Brettanomyces*, *Saccharomyces*, *Clavispora* a *Hanseniaspora*.

V kombuše K1 byly identifikovány mikroorganismy jako *Komagataeibacter rhaeticus*, *Acetobacter tropicalis*, *Zygosaccharomyces bailii* a *Zygosaccharomyces bisporus*. Tyto druhy byly rovněž zaznamenány ve studii Chakravorty a kol. (2016), která se zaměřovala na mikrobiální rozmanitost kombuchy z černého čaje. Přítomnost *K. rhaeticus* potvrdila také studie Huang a kol. (2022), zabývající se biofilmem vznikajícím během fermentace kombuchy. Podobné mikroorganismy byly nalezeny i ve studii Landis a kol. (2022), která zkoumala interakce mezi mikroorganismy v kombuše.

V kombuše K2 byly zjištěny rody *Zygosaccharomyces*, *Sporobolomyces*, *Komagataeibacter*, *Micrococcus* a *Gluconobacter*. Výskyt *Gluconobacter* byl potvrzen také ve studii Soarese a kol. (2021), která se věnovala technologickým aspektům výroby

kombuchy a využití symbiotické kultury SCOBY. Zajímavostí je přítomnost rodu *Sporobolomyces*, jehož zástupci patří mezi netypické kvasinky schopné produkovat různorodé metabolity. Přestože jejich vlastnosti zatím nejsou dostatečně popsány, potenciál těchto kvasinek v potravinářství naznačuje studie Kot a kol. (2021).

V kombuše K3 byly identifikovány rody *Dekkera*, *Brettanomyces*, *Zygosaccharomyces* a *Comamonas*. Kvasinka *Brettanomyces bruxellensis* byla popsána ve studii Tran et al. (2021) jako významný zástupce mikroorganismů podílejících se na fermentaci nápoje kombucha. Stejný druh byl rovněž zmíněn ve studii Coton et al. (2017), která analyzovala mikrobiální ekologii kombuchy v průběhu fermentace.

Kombucha K4 obsahovala mikroorganismy rodu *Gluconobacter* a *Saccharomyces*. Výskyt *Gluconobacter oxydans* byl pozorován také ve studii Kaashyap a kol. (2021), která se zabývala mikrobiální charakteristikou kombuchy fermentované na základě černého čaje (*Camellia sinensis*) s přídavkem sacharózy. Autoři identifikovali různé druhy bakterií i kvasinek, přičemž *Gluconobacter* patřil mezi dominantní bakteriální rody. Kvasinka *Saccharomyces cerevisiae* byla v tomto vzorku detekována poprvé, přičemž její přítomnost zaznamenal i Chakravorty a kol. (2016) ve své práci o mikrobiální dynamice kombuchy. Ve zmíněné studii autoři fermentovali nápoj s použitím černého čaje a sacharózy po dobu 14 dnů, přičemž sledovali vývoj bakteriálních i kvasinkových populací v čase.

Stanovení přítomnosti mikroorganismů v kombuše K5 bylo specifické svým způsobem odběru – pro mikrobiologickou analýzu byl zvolen sediment ze dna nádoby, kde se během fermentace koncentrují kvasinky. Dle očekávání tak byly ve vzorku přítomny výhradně kvasinky rodů *Zygosaccharomyces*, *Saccharomyces*, *Clavispora* a *Dekkera*. Většina těchto rodů byla popsána i v jiných studiích, které se věnovaly vlivu skladovacích podmínek a fází fermentace na mikrobiální dynamiku kombuchy. Například Villarreal-Soto a kol. (2020) analyzovali mikrobiální složení kombuchy fermentované po dobu 14 dnů s použitím oslazeného černého čaje jako substrátu. Autoři ve své práci prokázali přirozený výskyt rodů *Saccharomyces* a *Zygosaccharomyces* v průběhu fermentace a upozornili na jejich dominanci v pozdějších fázích zrání. Výjimku tvoří rod *Clavispora*, konkrétně *Clavispora lusitaniae*, jehož výskyt v nápoji kombucha je ojedinělý a nebyl dosud v dostupné literatuře zaznamenán.

Vzorek kombuchy K6 určený pro mikrobiologickou analýzu byl odebrán v těsné blízkosti biofilmu. V tomto vzorku byly identifikovány jak bakterie, tak kvasinky. Detekováni byli zástupci rodů *Acetobacter*, *Saccharomyces*, *Hanseniaspora*, *Brettanomyces* a *Sporobolomyces*. Přítomnost rodu *Hanseniaspora* byla zaznamenána také ve studii Savary

a kol. (2021), která se zabývala biochemickými změnami způsobenými mikrobiotou během fermentace kombuchy. V této studii byl fermentační proces prováděn při 25 °C po dobu 14 dnů s použitím černého čaje (*Camellia sinensis*) slazeného sacharózou. Autoři zaznamenali významný vliv mikrobiální komunity na produkci organických kyselin a vývoj aromatických profilů nápoje, přičemž rod *Hanseniaspora* se uplatnil zejména v raných fázích fermentace.

Největší druhovou rozmanitost prokázala kombucha K7, v níž byly detekovány rody *Saccharomyces*, *Acetobacter*, *Clavispora*, *Zygosaccharomyces*, *Dekkera* a *Hanseniaspora*. V tomto vzorku převažovaly kvasinky nad bakteriemi, z bakterií zde byl identifikován významný rod *Acetobacter*, typický pro fermentační procesy kombuchy, zejména pro tvorbu její charakteristické chuti. Vysoká mikrobiální diverzita této kombuchy pravděpodobně souvisí s fermentačními podmínkami – konkrétně fermentací po dobu sedmi dní, s koncentrací černého čaje 3 g/l a sacharózy 75 g/l. Podobnou diverzitu zaznamenali také Marsh a kol. (2014), kteří při fermentaci kombuchy s použitím černého čaje a 10% roztoku sacharózy pozorovali přítomnost různorodých kvasinkových i bakteriálních rodů včetně *Zygosaccharomyces*, *Saccharomyces*, *Brettanomyces* a *Acetobacter*, přičemž mikrobiální složení se měnilo v závislosti na délce fermentace.

Poslední kombucha, K8 vykazovala přítomnost pouze jediného bakteriálního rodu – *Micrococcus*. Tato kombucha fermentovala po dobu 35 dní při koncentraci černého čaje 3 g/l a sacharózy 50 g/l. V odborné literatuře nebyly nalezeny studie popisující mikrobiální profil kombuchy při takto nastavených podmínkách, avšak z dostupných výsledků lze usuzovat, že tyto parametry mohly vést k úbytku nebo úplnému odumření většiny mikroorganismů během fermentace.

Ve vodních kefirech byla identifikována řada bakteriálních i kvasinkových druhů, které se shodují s druhy a rody běžně popisovanými v literatuře. Nejčastěji detekovaným rodem byl *Leuconostoc*, konkrétně *Leuconostoc mesenteroides* a jeho poddruh *jonggajibkimchii*. Tento druh mléčné bakterie je pravidelně uváděn jako jeden z klíčových zástupců heterofermentativních mléčných bakterií ve vodním kefiru, a to zejména díky své schopnosti produkovat exopolysacharidy, které mohou přispívat ke struktuře keřirových zrn (Laureys et al., 2014, Watawana et al., 2015).

Rody *Gluconobacter* a *Acetobacter*, patřící mezi octové bakterie, byly rovněž výrazně zastoupeny v analyzovaných vodních kefirech, konkrétně *Gluconobacter cerinus*, *G. oxydans*, *Gluconobacter* sp. a *Acetobacter persici*. Tyto bakterie jsou známy svou schopností oxidovat cukry a alkoholy na organické kyseliny, přičemž hrají zásadní roli při

okyselování prostředí vodního kefiru nebo kombuchy během fermentace (Xu et al., 2023). Laureys et al. (2018) rovněž prokázali, že *Gluconobacter* spp. bývá dominantním rodem octových bakterií v prvních dnech fermentace vodního kefiru.

Mezi méně časté, avšak zajímavé izoláty patří *Sedimentibacter* sp., *Corynebacterium mucifaciens*, *Micrococcus luteus* a *Pseudomonas fulva*. Jejich výskyt může být ovlivněn prostředím, použitými surovinami nebo kontaminací. Tyto bakterie nejsou typické pro vodní kefir, a jejich role v tomto fermentačním systému zůstává nejasná, přičemž některé mohou být součástí běžné mikrobioty okolního prostředí (Marsh et al., 2014).

Kvasinková složka mikrobioty analyzovaných vodních kefirů byla reprezentována druhy *Saccharomyces cerevisiae* a *Hanseniaspora valbyensis*, které jsou běžnými účastníky symbiotické fermentace. *S. cerevisiae* je jedním z nejčastěji izolovaných druhů z vodního kefiru a je zodpovědná za produkci CO₂ a etanolu, což přispívá k organoleptickým vlastnostem nápoje (Gulitz et al., 2011). *Hanseniaspora* spp. bývá častěji detekována v prvních fázích fermentace díky své toleranci ke kyslíku a nižší koncentraci etanolu (Liu et al., 2019)

Zajímavým zjištěním je výskyt několika neidentifikovaných kmenů, které mohou naznačovat přítomnost dosud málo prozkoumaných nebo nepopsaných druhů.

Výsledky tak potvrzují vysokou mikrobiální diverzitu vodního kefiru a zároveň poukazují na variabilitu mezi jednotlivými vzorky. Tato variabilita je často ovlivněna geografickým původem zrn, složením fermentačního média a podmínkami fermentace (Laureys et al., 2014).

10 ZÁVĚR

Tato diplomová práce přinesla komplexní pohled na mikrobiální diverzitu dvou populárních nealkoholických fermentovaných nápojů – kombuchy a vodního kefiru – a zároveň zdůraznila význam fermentačních podmínek pro výslednou mikrobiální skladbu. I přes rozdílné složení použitých substrátů a technologických postupů bylo u obou typů nápojů zjištěno, že se v nich vyskytuje vysoké množství životaschopných mikroorganismů, často v podobném rozsahu, a to jak co do počtu, tak i diverzity.

V rámci mikrobiologické analýzy bylo celkem identifikováno 82 mikroorganismů, z toho 59 izolátů z kombuchy a 23 izolátů z vodních kefirů. Z celkového počtu izolátů bylo přibližně 62 % kvasinkového a 38 % bakteriálního původu.

U kombuchy byly nejčastěji zastoupeny kvasinky rodu *Saccharomyces*, *Zygosaccharomyces*, *Dekkera/Brettanomyces* a *Hanseniaspora*. Z bakterií dominovaly rody *Acetobacter*, *Gluconobacter* a *Komagataeibacter*. Některé vzorky, zejména ty s delší fermentací nebo odběrem ze sedimentu, vykazovaly téměř výhradně kvasinkové složení.

Ve vzorcích vodních kefirů převažovaly bakterie mléčného a octového kvašení, především rody *Leuconostoc*, *Gluconobacter* a *Acetobacter*. Významnou složku tvořily také kvasinky, přičemž nejčastěji se vyskytovala *Saccharomyces cerevisiae*. Zaznamenány byly i méně běžné rody jako *Sedimentibacter*, *Pseudomonas* nebo *Corynebacterium*, jejichž výskyt může být ovlivněn použitým substrátem či podmínkami fermentace.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

AL-MOHAMMADI, Abdul-Raouf; ISMAIEL, Ahmed A.; IBRAHIM, Rehab A.; MOUSTAFA, Ahmed H.; ABOU ZEID, Azza et al. Chemical Constitution and Antimicrobial Activity of Kombucha Fermented Beverage. Online. *Molecules*. 2021, roč. 26, č. 16. ISSN 1420-3049. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/molecules26165026>. [cit. 2025-03-09].

ARIKAN, Muzaffer; MITCHELL, Alex L.; FINN, Robert D. a GÜREL, Filiz. Microbial composition of Kombucha determined using amplicon sequencing and shotgun metagenomics. Online. *Journal of Food Science*. 2020, roč. 85, č. 2, s. 455-464. ISSN 0022-1147. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/1750-3841.14992>. [cit. 2025-02-25].

AUNG, Thinzar a KIM, Mi Jeong. A comprehensive review on kombucha biofilms: A promising candidate for sustainable food product development. Online. *Trends in Food Science & Technology*. 2024, roč. 144. ISSN 09242244. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2024.104325>. [cit. 2024-12-27].

BALASUBRAMANIAN, Paramasivan a PRAHARAJ, Prachi Tanya. Principal component analysis revealed the key influencing factors of kombucha bacterial cellulose yield and productivity. Online. *Bioresource Technology Reports*. 2023, roč. 23. ISSN 2589014X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2023.101539>. [cit. 2025-03-24].

BATTIKH, Houda; BAKHROUF, Amina a AMMAR, Emna. Antimicrobial effect of Kombucha analogues. Online. *LWT - Food Science and Technology*. 2012, roč. 47, č. 1, s. 71-77. ISSN 00236438. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2011.12.033>. [cit. 2025-03-09].

BAUER-PETROVSKA, Biljana a PETRUSHEVSKA-TOZI, Lidija. Mineral and water soluble vitamin content in the Kombucha drink. Online. *International Journal of Food Science & Technology*. 2000, roč. 35, č. 2, s. 201-205. ISSN 0950-5423. Dostupné z: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2621.2000.00342.x>. [cit. 2025-02-15].

BISHOP, Peyton; PITTS, Eric R.; BUDNER, Drew a THOMPSON-WITRICK, Katherine A. Chemical Composition of Kombucha. Online. *Beverages*. 2022, roč. 8, č. 3. ISSN 2306-5710. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/beverages8030045>. [cit. 2025-02-15].

BUENO, Raíssa S.; RESSUTTE, Jéssica B.; HATA, Natália N.Y.; HENRIQUE-BANA, Fernanda C.; GUERGOLLETO, Karla B. et al. Quality and shelf life assessment of a new

beverage produced from water kefir grains and red pitaya. Online. *LWT*. 2021, roč. 140. ISSN 00236438. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110770>. [cit. 2025-03-20].

CARDOSO, Rodrigo Rezende; MOREIRA, Luiza de Paula Dias; DE CAMPOS COSTA, Mirian Aparecida; TOLEDO, Renata Celi Lopes; GRANCIERI, Mariana et al. Kombuchas from green and black teas reduce oxidative stress, liver steatosis and inflammation, and improve glucose metabolism in Wistar rats fed a high-fat high-fructose diet. Online. *Food & Function*. 2021, roč. 12, č. 21, s. 10813-10827. ISSN 2042-6496. Dostupné z: <https://doi.org/10.1039/D1FO02106K>. [cit. 2025-03-10].

CARDOSO, Rodrigo Rezende; NETO, Rafaela Oliveira; DOS SANTOS D'ALMEIDA, Carolina Thomaz; DO NASCIMENTO, Talita Pimenta; PRESSETE, Carolina Girotto et al. Kombuchas from green and black teas have different phenolic profile, which impacts their antioxidant capacities, antibacterial and antiproliferative activities. Online. *Food Research International*. 2020, roč. 128. ISSN 09639969. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108782>. [cit. 2025-03-09].

COELHO, Raquel Macedo Dantas; ALMEIDA, Aryelle Leite de; AMARAL, Rafael Queiroz Gurgel do; MOTA, Robson Nascimento da a SOUSA, Paulo Henrique M. de. Kombucha: Review. Online. *International Journal of Gastronomy and Food Science*. 2020, roč. 22. ISSN 1878450X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ijgfs.2020.100272>. [cit. 2025-02-15].

COSTA, Mirian Aparecida de Campos; DIAS MOREIRA, Luiza de Paula; DUARTE, Vinícius da Silva; CARDOSO, Rodrigo Rezende; SÃO JOSÉ, Vinícius Parzanini Brilhante de et al. Kombuchas from Green and Black Tea Modulate the Gut Microbiota and Improve the Intestinal Health of Wistar Rats Fed a High-Fat High-Fructose Diet. Online. *Nutrients*. 2022, roč. 14, č. 24. ISSN 2072-6643. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/nu14245234>. [cit. 2025-03-10].

COTON, Monika; PAWTOWSKI, Audrey; TAMINIAU, Bernard; BURGAUD, Gaëtan; DENIEL, Franck et al. Unraveling microbial ecology of industrial-scale Kombucha fermentations by metabarcoding and culture-based methods. Online. *FEMS Microbiology Ecology*. 2017, roč. 93, č. 5. ISSN 1574-6941. Dostupné z: <https://doi.org/10.1093/femsec/fix048>. [cit. 2025-02-15].

DE FILIPPIS, Francesca; TROISE, Antonio Dario; VITAGLIONE, Paola a ERCOLINI, Danilo. Different temperatures select distinctive acetic acid bacteria species and promotes

organic acids production during Kombucha tea fermentation. Online. *Food Microbiology*. 2018, roč. 73, s. 11-16. ISSN 07400020. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.01.008>. [cit. 2025-02-15].

DE MIRANDA, Jeniffer Ferreira; RUIZ, Larissa Fernandes; SILVA, Cíntia Borges; UEKANE, Thais Matsue; SILVA, Kelly Alencar et al. Kombucha: A review of substrates, regulations, composition, and biological properties. Online. *Journal of Food Science*. 2022, roč. 87, č. 2, s. 503-527. ISSN 0022-1147. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/1750-3841.16029>. [cit. 2025-02-15].

FELS, Lea; JAKOB, Frank; VOGEL, Rudi F. a WEFERS, Daniel. Structural characterization of the exopolysaccharides from water kefir. Online. *Carbohydrate Polymers*. 2018, roč. 189, s. 296-303. ISSN 01448617. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.02.037>. [cit. 2025-03-20].

FIORDA, Fernanda Assumpção; DE MELO PEREIRA, Gilberto Vinicius; THOMAZ-SOCCOL, Vanete; RAKSHIT, Sudip Kumar; PAGNONCELLI, Maria Giovana Binder et al. Microbiological, biochemical, and functional aspects of sugary kefir fermentation - A review. Online. *Food Microbiology*. 2017, roč. 66, s. 86-95. ISSN 07400020. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.04.004>. [cit. 2025-03-19].

FIORDA, Fernanda Assumpção; DE MELO PEREIRA, Gilberto Vinicius; THOMAZ-SOCCOL, Vanete; RAKSHIT, Sudip Kumar; PAGNONCELLI, Maria Giovana Binder et al. Microbiological, biochemical, and functional aspects of sugary kefir fermentation - A review. Online. *Food Microbiology*. 2017, roč. 66, s. 86-95. ISSN 07400020. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.04.004>. [cit. 2025-03-19].

GAGGIÀ, Francesca; BAFFONI, Loredana; GALIANO, Michele; NIELSEN, Dennis Sandris; JAKOBSEN, Rasmus Riemer et al. Kombucha Beverage from Green, Black and Rooibos Teas: A Comparative Study Looking at Microbiology, Chemistry and Antioxidant Activity. Online. *Nutrients*. 2019, roč. 11, č. 1. ISSN 2072-6643. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/nu11010001>. [cit. 2025-02-15].

GUERRA, Marisa Josefina a MUJICA, María Virginia. Physical and chemical properties of granulated cane sugar "panelas." Online. *Food Science and Technology*. 2010, roč. 30, č. 1, s. 250-257. ISSN 1678-457X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1590/S0101-20612010005000012>. [cit. 2025-03-20].

HUANG, Rong. Exploring Kombucha: Production, Microbiota Biotransformation, Flavor, Health Benefits and Potential Risks. Online. *ACS Food Science & Technology*. 2024, roč. 4, č. 7, s. 1610-1625. ISSN 2692-1944. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/acsfoodscitech.4c00242>. [cit. 2024-12-27].

CHAKRAVORTY, Somnath; BHATTACHARYA, Semantee; CHATZINOTAS, Antonis; CHAKRABORTY, Writachit; BHATTACHARYA, Debanjana et al. Kombucha tea fermentation: Microbial and biochemical dynamics. Online. *International Journal of Food Microbiology*. 2016, roč. 220, s. 63-72. ISSN 01681605. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.12.015>. [cit. 2025-03-04].

CHEN, C. a LIU, B.Y. Changes in major components of tea fungus metabolites during prolonged fermentation. Online. *Journal of Applied Microbiology*. 2000, roč. 89, č. 5, s. 834-839. ISSN 1364-5072. Dostupné z: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2000.01188.x>. [cit. 2025-03-26].

CHONG, Ann Qi; LAU, Siew Wen; CHIN, Nyuk Ling; TALIB, Rosnita A. a BASHA, Roseliza Kadir. Fermented Beverage Benefits: A Comprehensive Review and Comparison of Kombucha and Kefir Microbiome. Online. *Microorganisms*. 2023, roč. 11, č. 5. ISSN 2076-2607. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/microorganisms11051344>. [cit. 2025-03-20].

IVANIŠOVÁ, Eva; MEŇHARTOVÁ, Kristína; TEREŇTJEVA, Margarita; HARANGOZO, Ľuboš; KÁNTOR, Attila et al. The evaluation of chemical, antioxidant, antimicrobial and sensory properties of kombucha tea beverage. Online. *Journal of Food Science and Technology*. 2020, roč. 57, č. 5, s. 1840-1846. ISSN 0022-1155. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s13197-019-04217-3>. [cit. 2025-02-15].

JAKUBCZYK, Karolina; GUTOWSKA, Izabela; ANTONIEWICZ, Justyna a JANDA, Katarzyna. Evaluation of Fluoride and Selected Chemical Parameters in Kombucha Derived from White, Green, Black and Red Tea. Online. *Biological Trace Element Research*. 2021, roč. 199, č. 9, s. 3547-3552. ISSN 0163-4984. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s12011-020-02445-9>. [cit. 2025-02-15].

JAYABALAN, Rasu; MALBAŠA, Radomir V. a SATHISHKUMAR, Muthuswamy. Kombucha. Online. In: *Reference Module in Food Science*. Elsevier, 2016. ISBN 9780081005965. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.03032-8>. [cit. 2025-02-15].

JAYABALAN, Rasu; MALBAŠA, Radomir V.; LONČAR, Eva S.; VITAS, Jasmina S. a SATHISHKUMAR, Muthuswamy. A Review on Kombucha Tea—Microbiology, Composition, Fermentation, Beneficial Effects, Toxicity, and Tea Fungus. Online. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2014, roč. 13, č. 4, s. 538-550. ISSN 1541-4337. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12073>. [cit. 2025-02-15].

KAASHYAP, Mayank; COHEN, Marc a MANTRI, Nitin. Microbial Diversity and Characteristics of Kombucha as Revealed by Metagenomic and Physicochemical Analysis. Online. *Nutrients*. 2021, roč. 13, č. 12. ISSN 2072-6643. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/nu13124446>. [cit. 2025-03-26].

KAASHYAP, Mayank; COHEN, Marc a MANTRI, Nitin. Microbial Diversity and Characteristics of Kombucha as Revealed by Metagenomic and Physicochemical Analysis. Online. *Nutrients*. 2021, roč. 13, č. 12. ISSN 2072-6643. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/nu13124446>. [cit. 2025-05-04].

KAPP, Julie M. a SUMNER, Walton. Kombucha: a systematic review of the empirical evidence of human health benefit. Online. *Annals of Epidemiology*. 2019, roč. 30, s. 66-70. ISSN 10472797. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.annepidem.2018.11.001>. [cit. 2025-03-09].

KITWETCHAROEN, Haruthairat; PHUNG, Ly Tu; KLANRIT, Preekamol; THANONKEO, Sudarat; TIPPAYAWAT, Patcharaporn et al. Kombucha Healthy Drink—Recent Advances in Production, Chemical Composition and Health Benefits. Online. *Fermentation*. 2023, roč. 9, č. 1. ISSN 2311-5637. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/fermentation9010048>. [cit. 2025-02-15].

KOT, Anna M.; KIELISZEK, Marek; PIWOWAREK, Kamil; BŁAŻEJAK, Stanisław a MUSSAGY, Cassamo Ussemane. Sporobolomyces and Sporidiobolus – non-conventional yeasts for use in industries. Online. *Fungal Biology Reviews*. 2021, roč. 37, s. 41-58. ISSN 17494613. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2021.06.001>. [cit. 2025-05-04].

LAHAVANYA, D.; SHIRKOLE, Shivanand a BALASUBRAMANIAN, P. Current challenges, applications and future perspectives of SCOBY cellulose of Kombucha fermentation. Online. *Journal of Cleaner Production*. 2021, roč. 295. ISSN 09596526. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2021.126454>. [cit. 2025-03-04].

LANDIS, Elizabeth A.; FOGARTY, Emily; EDWARDS, John C.; POPA, Otilia; EREN, A. Murat et al. Microbial Diversity and Interaction Specificity in Kombucha Tea Fermentations. Online. *MSystems*. 2022, roč. 7, č. 3, s. e00157-22. ISSN 2379-5077. Dostupné z: <https://doi.org/10.1128/msystems.00157-22>. [cit. 2025-05-04].

LAUREYS, D. a DE VUYST, L. The water kefir grain inoculum determines the characteristics of the resulting water kefir fermentation process. Online. *Journal of Applied Microbiology*. 2017, roč. 122, č. 3, s. 719-732. ISSN 13645072. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/jam.13370>. [cit. 2025-03-19].

LAUREYS, David; AERTS, Maarten; VANDAMME, Peter a DE VUYST, Luc. The Buffer Capacity and Calcium Concentration of Water Influence the Microbial Species Diversity, Grain Growth, and Metabolite Production During Water Kefir Fermentation. Online. *Frontiers in Microbiology*. 2019, roč. 10. ISSN 1664-302X. Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02876>. [cit. 2025-03-19].

LAUREYS, David; AERTS, Maarten; VANDAMME, Peter a DE VUYST, Luc. Oxygen and diverse nutrients influence the water kefir fermentation process. Online. *Food Microbiology*. 2018, roč. 73, s. 351-361. ISSN 07400020. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.02.007>. [cit. 2025-03-20].

LAUREYS, David; BRITTON, Scott J. a DE CLIPPELEER, Jessika. Kombucha Tea Fermentation: A Review. Online. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*. 2020, roč. 78, č. 3, s. 165-174. ISSN 0361-0470. Dostupné z: <https://doi.org/10.1080/03610470.2020.1734150>. [cit. 2025-02-25].

LAUREYS, David; CNOCKAERT, Margo; DE VUYST, Luc a VANDAMME, Peter. *Bifidobacterium aquikefiri* sp. nov., isolated from water kefir. Online. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2016, roč. 66, č. 3, s. 1281-1286. ISSN 1466-5026. Dostupné z: <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.000877>. [cit. 2025-03-20].

LAUREYS, David; DE VUYST, Luc a GRIFFITHS, M. W. Microbial Species Diversity, Community Dynamics, and Metabolite Kinetics of Water Kefir Fermentation. Online. *Applied and Environmental Microbiology*. 2014, roč. 80, č. 8, s. 2564-2572. ISSN 0099-2240. Dostupné z: <https://doi.org/10.1128/AEM.03978-13>. [cit. 2025-03-19].

LI, Daotong; WANG, Pan; WANG, Pengpu; HU, Xiaosong a CHEN, Fang. The gut microbiota: A treasure for human health. Online. *Biotechnology Advances*. 2016, roč. 34, č.

7, s. 1210-1224. ISSN 07349750. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2016.08.003>. [cit. 2025-03-10].

LIU, Y., TRAN, T.M., NEVES, M.A. a JONGSUTJIVAT, N. *Impact of yeast–yeast interactions on aroma production during alcoholic fermentation: A review*. Food Microbiology, 2019, 83, 12–23. DOI: 10.1016/j.fm.2019.04.009 [cit. 2025-05-06].

LV, Hai-peng; ZHANG, Yue; SHI, Jiang a LIN, Zhi. Phytochemical profiles and antioxidant activities of Chinese dark teas obtained by different processing technologies. Online. *Food Research International*. 2017, roč. 100, s. 486-493. ISSN 09639969. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.10.024>. [cit. 2025-02-15].

LYNCH, Kieran M.; WILKINSON, Stuart; DAENEN, Luk a ARENDT, Elke K. An update on water kefir: Microbiology, composition and production. Online. *International Journal of Food Microbiology*. 2021, roč. 345. ISSN 01681605. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2021.109128>. [cit. 2025-03-19].

MADIGAN, Michael T.; BENDER, Kelly S.; BUCKLEY, Daniel H.; SATTLEY, W. Matthew a STAHL, David Allan. *Brock biology of microorganisms*. Fifteenth edition. New York: Pearson, [2019]. ISBN 978-1-292-23510-3.

MARSH, Alan J.; O'SULLIVAN, Orla; HILL, Colin; ROSS, R. Paul a COTTER, Paul D. Sequence-based analysis of the bacterial and fungal compositions of multiple kombucha (tea fungus) samples. Online. *Food Microbiology*. 2014, roč. 38, s. 171-178. ISSN 07400020. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2013.09.003>. [cit. 2025-03-09].

MARTÍNEZ LEAL, Jessica; VALENZUELA SUÁREZ, Lucía; JAYABALAN, Rasu; HUERTA OROS, Joselina a ESCALANTE-ABURTO, Anayansi. A review on health benefits of kombucha nutritional compounds and metabolites. Online. *CyTA - Journal of Food*. 2018, roč. 16, č. 1, s. 390-399. ISSN 1947-6337. Dostupné z: <https://doi.org/10.1080/19476337.2017.1410499>. [cit. 2025-02-15].

MARTÍNEZ-TORRES, Abigail; GUTIÉRREZ-AMBROCIO, Sandra; HEREDIA-DEL-ORBE, Pamela; VILLA-TANACA, Lourdes a HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ, César. Inferring the role of microorganisms in water kefir fermentations. Online. *International Journal of Food Science & Technology*. 2017, roč. 52, č. 2, s. 559-571. ISSN 0950-5423. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/ijfs.13312>. [cit. 2025-03-20].

MOHD ARIFF, Rafidah; CHAI, Xin Yi; CHANG, Lee Sin; FAZRY, Shazrul; OTHMAN, Babul Airianah et al. Recent trends in Kombucha: Conventional and alternative fermentation in development of novel beverage. Online. *Food Bioscience*. 2023, roč. 53. ISSN 22124292. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2023.102714>. [cit. 2025-03-09].

NGUYEN, Nguyen Khoi; NGUYEN, Phuong Bang; NGUYEN, Huong Thuy a LE, Phu Hong. Screening the optimal ratio of symbiosis between isolated yeast and acetic acid bacteria strain from traditional kombucha for high-level production of glucuronic acid. Online. *LWT - Food Science and Technology*. 2015, roč. 64, č. 2, s. 1149-1155. ISSN 00236438. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.07.018>. [cit. 2025-02-15].

OJO, Abidemi Oluranti a DE SMIDT, Olga. Microbial Composition, Bioactive Compounds, Potential Benefits and Risks Associated with Kombucha: A Concise Review. Online. *Fermentation*. 2023, roč. 9, č. 5. ISSN 2311-5637. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/fermentation9050472>. [cit. 2025-03-09].

PATEL, S.H.; TAN, J.P.; BÖRNER, R.A.; ZHANG, S.J.; PRIOUR, S. et al. A temporal view of the water kefir microbiota and flavour attributes. Online. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*. 2022, roč. 80. ISSN 14668564. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2022.103084>. [cit. 2025-05-04].

PENDÓN, María Dolores; BENGGOA, Ana Agustina; IRAPORDA, Carolina; MEDRANO, Micaela; GARROTE, Graciela L. et al. Water kefir: Factors affecting grain growth and health-promoting properties of the fermented beverage. Online. *Journal of Applied Microbiology*. 2022, roč. 133, č. 1, s. 162-180. ISSN 1365-2672. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/jam.15385>. [cit. 2025-03-19].

PIDOUX, M.; BRILLOUET, J. M. a QUEMENER, B. Characterization of the polysaccharides from *Lactobacillus brevis* and from sugary kefir grains. Online. *Biotechnology Letters*. 1988, roč. 10, č. 6, s. 415-420. ISSN 0141-5492. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/BF01087442>. [cit. 2025-03-19].

RAMÍREZ TAPIAS, Yuly A.; DI MONTE, M. Victoria; PELTZER, Mercedes A. a SALVAY, Andrés G. Bacterial cellulose films production by Kombucha symbiotic community cultured on different herbal infusions. Online. *Food Chemistry*. 2022, roč. 372. ISSN 03088146. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.131346>. [cit. 2025-03-10].

RIZHON, Rizhon a MALDIN, Siska Amelia. The Influence Of Tea Types In Making Kombucha On The Taste And Preference Of Hoteliers In Batam. Online. *Jurnal Indonesia Sosial Teknologi*. 2023, roč. 4, č. 10, s. 1749-1760. ISSN 2745-5254. Dostupné z: <https://doi.org/10.59141/jist.v4i10.752>. [cit. 2025-03-26].

SAMBROOK, Joseph a RUSSELL, David W. *Molecular Cloning: a laboratory manual*. Vol. 2. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

SANGER, F.; NICKLEN, S. a COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Online. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1977, roč. 74, č. 12, s. 5463-5467. ISSN 0027-8424. Dostupné z: <https://doi.org/10.1073/pnas.74.12.5463>. [cit. 2025-04-21].

SAVARY, Océane; MOUNIER, Jérôme; THIERRY, Anne; POIRIER, Elisabeth; JOURDREN, Julie et al. Tailor-made microbial consortium for Kombucha fermentation: Microbiota-induced biochemical changes and biofilm formation. Online. *Food Research International*. 2021, roč. 147. ISSN 09639969. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110549>. [cit. 2025-02-25].

SILVA, Thiago Okagawa; COSTA, Giselle Nobre; DOS SANTOS LIMA, Marcos; FEIHRMANN, Andresa Carla; BARÃO, Carlos Eduardo et al. Chemical, microbial, and functional characterization of a new fruity probiotic kombucha. Online. *Food Research International*. 2024, roč. 198. ISSN 09639969. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2024.115398>. [cit. 2025-05-04].

SOARES, Marcelo Gomes; DE LIMA, Marieli a REOLON SCHMIDT, Vivian Consuelo. Technological aspects of kombucha, its applications and the symbiotic culture (SCOBY), and extraction of compounds of interest: A literature review. Online. *Trends in Food Science & Technology*. 2021, roč. 110, s. 539-550. ISSN 09242244. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.02.017>. [cit. 2025-03-26].

SRIHARI, Thummala; ARUNKUMAR, Ramachandran; ARUNAKARAN, Jagadeesan a SATYANARAYANA, Uppala. Downregulation of signalling molecules involved in angiogenesis of prostate cancer cell line (PC-3) by kombucha (lyophilized). Online. *Biomedicine & Preventive Nutrition*. 2013, roč. 3, č. 1, s. 53-58. ISSN 22105239. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.bionut.2012.08.001>. [cit. 2025-03-10].

TRAN, Thierry; GRANDVALET, Cosette; VERDIER, François; MARTIN, Antoine; ALEXANDRE, Hervé et al. Microbiological and technological parameters impacting the

chemical composition and sensory quality of kombucha. Online. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2020, roč. 19, č. 4, s. 2050-2070. ISSN 1541-4337. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12574>. [cit. 2025-02-15].

TRAN, Thierry; GRANDVALET, Cosette; WINCKLER, Pascale; VERDIER, François; MARTIN, Antoine et al. Shedding Light on the Formation and Structure of Kombucha Biofilm Using Two-Photon Fluorescence Microscopy. Online. *Frontiers in Microbiology*. 2021, roč. 12. ISSN 1664-302X. Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.725379>. [cit. 2025-05-04].

VERCE, Marko; DE VUYST, Luc a WECKX, Stefan. Shotgun Metagenomics of a Water Kefir Fermentation Ecosystem Reveals a Novel *Oenococcus* Species. Online. *Frontiers in Microbiology*. 2019, roč. 10. ISSN 1664-302X. Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00479>. [cit. 2025-03-20].

VILLARREAL-SOTO, Silvia Alejandra; BEAUFORT, Sandra; BOUAJILA, Jalloul; SOUCHARD, Jean-Pierre a TAILLANDIER, Patricia. Understanding Kombucha Tea Fermentation: A Review. Online. *Journal of Food Science*. 2018, roč. 83, č. 3, s. 580-588. ISSN 0022-1147. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/1750-3841.14068>. [cit. 2025-02-15].

VILLARREAL-SOTO, Silvia Alejandra; BOUAJILA, Jalloul; PACE, Mauro; LEECH, John; COTTER, Paul D. et al. Metabolome-microbiome signatures in the fermented beverage, Kombucha. Online. *International Journal of Food Microbiology*. 2020, roč. 333. ISSN 01681605. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108778>. [cit. 2025-02-15].

VITAS, Jasmina S.; CVETANOVIĆ, Aleksandra D.; MAŠKOVIĆ, Pavle Z.; ŠVARC-GAJIĆ, Jaroslava V. a MALBAŠA, Radomir V. Chemical composition and biological activity of novel types of kombucha beverages with yarrow. Online. *Journal of Functional Foods*. 2018, roč. 44, s. 95-102. ISSN 17564646. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jff.2018.02.019>. [cit. 2025-02-15].

WANG, Leyu; SUN, Panjie; HUANG, Mengxin; HAN, Ziyi; YU, Haonan et al. Impact of Kombucha Fermentation on the Flavor and Physicochemical Properties of Tea (*Camellia sinensis*) Flower Infusions. Online. *Food Frontiers*. 2025, roč. 6, č. 2, s. 750-762. ISSN 2643-8429. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/fft2.536>. [cit. 2025-03-26].

WATAWANA, Mindani I.; JAYAWARDENA, Nilakshi; GUNAWARDHANA, Chaminie B. a WAISUNDARA, Viduranga Y. Health, Wellness, and Safety Aspects of the

Consumption of Kombucha. Online. *Journal of Chemistry*. 2015, roč. 2015, s. 1-11. ISSN 2090-9063. Dostupné z: <https://doi.org/10.1155/2015/591869>. [cit. 2025-02-15].

WATAWANA, Mindani I.; JAYAWARDENA, Nilakshi; RANASINGHE, Shakkya J. a WAISUNDARA, Viduranga Y. Evaluation of the Effect of Different Sweetening Agents on the Polyphenol Contents and Antioxidant and Starch Hydrolase Inhibitory Properties of Kombucha. Online. *Journal of Food Processing and Preservation*. 2017, roč. 41, č. 1. ISSN 01458892. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/jfpp.12752>. [cit. 2025-03-24].

XU, Yunli; SHU, Guowei; LIU, Yu; MA, Lin; LI, Yichao et al. Lactic Acid Bacteria and Yeasts from Milk Kefir Grains: Isolation, Characterization, Screening, and Identification. Online. *Acta Universitatis Cibiniensis. Series E: Food Technology*. 2023, roč. 27, č. 1, s. 71-82. ISSN 2344-150X. Dostupné z: <https://doi.org/10.2478/auaft-2023-0006>. [cit. 2025-05-04].

YAMADA, Yuzo; YUKPHAN, Pattaraporn; LAN VU, Huong Thi; MURAMATSU, Yuki; OCHAIKUL, Duangjai et al. Description of *Komagataeibacter* gen. nov., with proposals of new combinations (Acetobacteraceae). Online. *The Journal of General and Applied Microbiology*. 2012, roč. 58, č. 5, s. 397-404. ISSN 0022-1260. Dostupné z: <https://doi.org/10.2323/jgam.58.397>. [cit. 2025-03-04].

YI, Tao; ZHU, Lin; PENG, Wan-Ling; HE, Xi-Cheng; CHEN, Hong-Li et al. Comparison of ten major constituents in seven types of processed tea using HPLC-DAD-MS followed by principal component and hierarchical cluster analysis. Online. *LWT - Food Science and Technology*. 2015, roč. 62, č. 1, s. 194-201. ISSN 00236438. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.01.003>. [cit. 2025-03-09].

ZANIRATI, Débora Ferreira; ABATEMARCO, Mário; SANDES, Sávio Henrique de Cicco; NICOLI, Jacques Robert; NUNES, Álvaro Cantini et al. Selection of lactic acid bacteria from Brazilian kefir grains for potential use as starter or probiotic cultures. Online. *Anaerobe*. 2015, roč. 32, s. 70-76. ISSN 10759964. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2014.12.007>. [cit. 2025-03-20].

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 Popis symbiotické kultury SCOBY (upraveno podle Huang, 2024, s.1610-1625).	13
Obrázek 2 Mikrobiální metabolismus kvasinek a octových bakterií během fermentace v nápoji kombucha (upraveno dle Coelho et al., 2020)	21
Obrázek 3 Makroskopický a mikroskopický (SEM) vzhled dvou vodních kefirů CIDCA SK5 (a,c) a CIDCA SK6 (b,d) (Pendón et al., 2022)	33
Obrázek 4 Metabolické dráhy mikrobiální komunity při fermentaci vodního kefiru (upraveno dle Fiorda et al., 2017)	35
Obrázek 5 Počty mikroorganismů vyrostených v jednotlivých kombuchách.....	56
Obrázek 6 Počty mikroorganismů vyrostených v jednotlivých vodních kefirech	59
Obrázek 7 Vybrané izoláty mikroorganismů ze vzorků kombuch vyrostených na půdě Acetobacter agar	61
Obrázek 8 Nárůst mikroorganismů vodního kefiru V2 na půdách Acetobacter agar (A) a MRS agar (B)	63
Obrázek 9 Nárůst mikroorganismů vodního kefiru V7 na půdách Malt extract Broth Base (A) a MRS agar (B).....	63
Obrázek 10 Gelová elektroforéza PCR produktů izolátů z kombuch za použití primeru FD1 a RD1	68
Obrázek 11 Gelová elektroforéza PCR produktů vzorků kombuch za použití primerů LR6 a NL1, u vzorku 4H byl použit primer FD1 a RD1	69
Obrázek 12 Gelová elektroforéza PCR produktů vzorků vodních kefirů za použití primerů RD1 a FD1 pro první řadu a primerů LR6 a NL1 pro druhou řadu	70
Obrázek 13 Výsledek sekvence izolátu V2D poskytnutý firmou zajišťující sekvenaci	71
Obrázek 14 Sekvence izolátu V2D zpracovaná v programu DNA baser	71
Obrázek 15 Identifikace vzorku V2D v databázi mikroorganismů (National Library of Medicine)	71

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 Obsah kofeinu v jednotlivých druzích čaje (Yi et al., 2015).....	16
Tabulka 2 Závislost koncentrace organických kyselin v nápoji kombucha na množství sacharózy a době fermentace (Villarreal-Soto et al., 2018).....	17
Tabulka 3 Koncentrace vybraných vitamínů v nápoji kombucha v závislosti na době fermentace (Villarreal-Soto et al., 2018).	18
Tabulka 4 Přehled koncentrace vybraných minerálních látek v nápoji kombucha (Huang, 2024, s. 1610–1625).....	18
Tabulka 5 Procentuální zastoupení a výskyt vybraných mikroorganismů v průběhu fermentace nápoje kombucha	22
Tabulka 6 Přehled látek produkovaných mikroorganismy v nápoji kombucha a jejich funkce (Villarreal-Soto et al., 2018, Coton et al., 2017, Aung et al., 2024).....	23
Tabulka 7 Obecné důsledky zvolených faktorů na fermentaci vodního kefiru (Fiorda et al., Laureys et al., 2018).	36
Tabulka 8 Obsah vápníku ve vybraných druzích ovoce využívaných při fermentaci vodního kefiru (Lynch et al., 2021)	37
Tabulka 9 Charakteristika vzorků kombuch použitých pro mikrobiologický rozbor.....	43
Tabulka 10 Charakteristika vzorků vodních kefirů použitých pro mikrobiologický rozbor.....	44
Tabulka 11 Složení Acetobacter agaru	45
Tabulka 12 Složení Malt extract Broth Base	46
Tabulka 13 Složení Lactobacillus MRS Broth	46
Tabulka 14 Složení PCR směsi určené pro prokaryota	51
Tabulka 15 Složení PCR směsi určené pro eukaryota.....	51
Tabulka 16 Program PCR reakce.....	52
Tabulka 17 Počty mikroorganismů (vyjádřeny jako log CFU/g) ve vzorcích kombuch.....	57
Tabulka 18 Počty mikroorganismů (vyjádřeny jako log CFU/g) ve vzorcích vodních kefirů	58
Tabulka 19 Označení jednotlivých kolonií izolovaných ze vzorků kombuch.....	60
Tabulka 20 Označení jednotlivých kolonií izolovaných ze vzorků vodních kefirů	62
Tabulka 21 Výsledky Gramova barvení pro izoláty z kombuch	64
Tabulka 22 Výsledky Gramova barvení pro izoláty z vodních kefirů.....	65
Tabulka 23 Naměřené hodnoty čistoty a koncentrace DNA pro izoláty z kombuch	66
Tabulka 24 Naměřené hodnoty čistoty a koncentrace DNA pro izoláty z vodních kefirů ..	67
Tabulka 25 Identifikace mikroorganismů izolovaných z kombuchy K1	72
Tabulka 26 Identifikace mikroorganismů izolovaných z kombuchy K2.....	72
Tabulka 27 Identifikace mikroorganismů izolovaných z kombuchy K3.....	73
Tabulka 28 Identifikace mikroorganismů izolovaných z kombuchy K4.....	73

Tabulka 29 Identifikace mikroorganismů izolovaných z kombuchy K5	74
Tabulka 30 Identifikace mikroorganismů izolovaných z kombuchy K6	75
Tabulka 31 Identifikace mikroorganismů izolovaných z kombuchy K7	75
Tabulka 32 Identifikace mikroorganismů izolovaných z kombuchy K8	76
Tabulka 33 Identifikace mikroorganismů izolovaných z vodních kefirů	77

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

AAB Octové bakterie

BMK Bakterie mléčného kvašení

PCR polymerázová řetězová reakce

SCOBY Symbiotický kultura bakterií a kvasinek

