

# Vlastnosti vybraných netradičních fermentovaných nápojů

Bc. Jana Kopečková

---

Diplomová práce  
2021



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická

---

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav technologie potravin

Akademický rok: 2020/2021

## **ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE**

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Jana Kopečková**  
Osobní číslo: **T19469**  
Studijní program: **N0721A210004 Technologie potravin**  
Studijní obor: **Technologie potravin**  
Forma studia: **Prezenční**  
Téma práce: **Vlastnosti vybraných netradičních fermentovaných nápojů**

### **Zásady pro vypracování**

#### **I. Teoretická část**

Vypracujte literární rešerši týkající se následujících bodů:

1. Popište současný stav řešené problematiky kombuchových nápojů a vodního kefiru.
2. Popište výrobu kombuchy a vodního kefiru; charakterizujte výrobek.
3. Popište symbiotické kultury pro výrobu výše uvedených nápojů.

#### **II. Praktická část**

1. Vytvořte modelové vzorky kombuchy a vodního kefiru.
2. Proveďte vybrané analýzy.
3. Výsledky zhodnoťte a zformulujte závěry.

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

**Seznam doporučené literatury:**

- [1] Coelho, R. M. D., Almeida, A. L. de, Amaral, R. Q. G. do, Mota, R. N. da, & Sousa, P. H. M. de. (2020). Kombucha: Review. *International Journal Of Gastronomy And Food Science*, 22. <https://doi.org/10.1016/j.ijgfs.2020.100272>
- [2] Ahmed, R. F., Hikal, M. S., & Abou-Taleb, K. A. (2020). Biological, chemical and antioxidant activities of different types Kombucha. *Annals Of Agricultural Sciences*, 65(1), 35-41. <https://doi.org/10.1016/j.aogas.2020.04.001>
- [3] Leonarski, E., Cesca, K., Zanella, E., Stambuk, B. U., de Oliveira, D., & Poletto, P. (2021). Production of kombucha-like beverage and bacterial cellulose by acerola byproduct as raw material. *Lwt*, 135. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110075>
- [4] Tu, C., Azi, F., Huang, J., Xu, X., Xing, G., & Dong, M. (2019). Quality and metagenomic evaluation of a novel functional beverage produced from soy whey using water kefir grains. *Lwt*, 113. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108258>

Vedoucí diplomové práce: **Ing. Richardos Nikolaos Salek, Ph.D.**  
Ústav technologie potravin

Datum zadání diplomové práce: **31. prosince 2020**

Termín odevzdání diplomové práce: **14. května 2021**

L.S.

---

**prof. Ing. Roman Čermák, Ph.D.**  
děkan

---

**Ing. Robert Gál, Ph.D.**  
ředitel ústavu

Ve Zlíně dne 8. února 2021

## PROHLÁŠENÍ AUTORA DIPLOMOVÉ PRÁCE

Beru na vědomí, že:

- diplomová práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému a dostupná k nahlédnutí;
- 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 autorského zákona 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 diplomové práci pracoval samostatně a použitou literaturu jsem citoval. V případě publikace výsledků budu uveden jako spoluautor.
- že odevzdaná verze diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou obsahově totožné.

Ve Zlíně dne:

Jméno a příjmení studenta:

.....  
podpis studenta

## **ABSTRAKT**

Tato diplomová práce se zabývá vybranými netradičními fermentovanými nápoji, kombuchou a vodním keřírem. Byly vyrobeny modelové vzorky těchto nápojů, u kterých byly stanoveny fyzikálně-chemické (pH, TDS, refraktometrická sušina, hustota a obsah etanolu), barva a reologické parametry. Také byl proveden mikrobiologický rozbor zaměřený na skupiny mikroorganismů pocházejících ze symbiotických kultur a na případné kontaminanty, které by mohly ohrozit zdravotní nezávadnost výrobků.

Z fyzikálně-chemických parametrů byly zaznamenány minimální změny pH, TDS i refraktometrické sušiny. Nárůst obsahu etanolu byl vyšší u vodního keříru, hlavně u vodního keříru ze zelné šťávy (konečná hodnota 5,56 % v/v) a u vodního keříru z vícedruhové zeleninové šťávy (konečná hodnota 5,64 % v/v). Z reologického hlediska šlo v případě černého čaje a jablečné a zelné šťávy o pseudoplastické kapaliny a z hlediska vícedruhové zeleninové šťávy o kapaliny dilatantní. V nápojích byly detekovány ty skupiny mikroorganismů, které se, i dle dostupných studií, v daných vzorcích vyskytují nejčastěji (acetobakterie, laktobacily, mléčné koky, kvasinky), zároveň by se daly nápoje z tohoto hlediska vyhodnotit jako bezpečné, protože nebyl detekován nárůst koliformních bakterií, enterokoků, stafylokoků ani klostridií.

**Klíčová slova:** kombucha, vodní keřír, fyzikálně-chemické parametry, reologie, mikrobiologie

## **ABSTRACT**

This diploma thesis is dealing with the properties of selected untraditional fermented beverages, kombucha and water kefir. There were produced model samples of these beverages, for which were determined physicochemical (pH, TDS, refractometric dry matter, density and ethanol content), color and rheological parameters. Microbiological analysis was also performed in terms of the micro-organisms from the symbiotic cultures, as well as in terms of possible contaminating groups of micro-organisms that would pose a potential health risk.

There were reported minimal changes in pH, TDS and refractometric dry matter. The increase in ethanol was higher in water kefir samples, mainly in water kefir in cabbage juice (final value 5,56 % v/v) and in water kefir in multi-species vegetable juice (final value 5,64% v/v). From a rheological point of view, the samples of kombucha in black tea and cabbage juice and water kefir in apple and cabbage juice were pseudoplastic liquids and in the case of samples kombucha and water kefir in multi-species vegetable juice they were dilatant liquids. Furthermore, those groups of microorganisms were detected which, according to available studies, occur most frequently in the given samples (acetic acid bacteria, lactobacilli, lactococci, yeasts), at the same time the drinks could be evaluated as safe from a microbiological point of view, because no increase of contaminating groups of microorganisms (coliform bacteria, staphylococci, enterococci, clostridia) was detected.

**Keywords:** kombucha, water kefir, physicochemical parameters, rheology, microbiology

Na tomto místě bych ráda poděkovala vedoucímu své diplomové práce, panu Ing. Richardosu Nikolaosu Salekovi, Ph. D. za odbornou pomoc, trpělivost, ochotu a věcné připomínky během vypracovávání této práce. Rovněž bych ráda poděkovala paní Ing. Evě Lorencové, Ph. D. a panu Ing. Pavlu Plevovi, Ph. D. za pomoc a trpělivost při zpracovávání praktické části. V neposlední řadě patří poděkování také mé rodině za podporu po celou dobu studia.

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

## OBSAH

<b>ÚVOD</b> .....	<b>10</b>
<b>I TEORETICKÁ ČÁST</b> .....	<b>12</b>
<b>1 HISTORIE A SOUČASNÝ STAV PROBLEMATIKY KOMBUCHY A VODNÍHO KEFÍRU</b> .....	<b>13</b>
1.1    KOMBUCHA .....	13
1.1.1    Historie nápoje kombucha.....	13
1.1.2    Současný stav problematiky nápoje kombucha .....	14
1.2    VODNÍ KEFÍR .....	15
1.2.1    Historie vodního kefiru .....	15
1.2.2    Současný stav problematiky nápoje vodního kefiru .....	16
<b>2 CHARAKTERISTIKA A VÝROBA KOMBUCHY A VODNÍHO KEFÍRU</b> .....	<b>18</b>
2.1    CHARAKTERISTIKA KOMBUCHY .....	18
2.1.1    Chemické složení kombuchy .....	18
2.1.2    Fyziologické účinky kombuchy .....	22
2.1.3    Senzorická charakteristika kombuchy.....	23
2.2    TECHNOLOGIE VÝROBY KOMBUCHY.....	24
2.2.1    Suroviny pro výrobu kombuchy.....	25
2.2.2    Postup výroby kombuchy.....	26
2.3    CHARAKTERISTIKA VODNÍHO KEFÍRU .....	28
2.3.1    Chemické složení vodního kefiru.....	28
2.3.2    Fyziologické účinky vodního kefiru .....	30
2.3.3    Senzorická charakteristika vodního kefiru.....	31
2.4    TECHNOLOGIE VÝROBY VODNÍHO KEFÍRU .....	32
2.4.1    Suroviny pro výrobu vodního kefiru.....	32
2.4.2    Postup výroby vodního kefiru .....	33
<b>3 MIKROBIOLOGIE KOMBUCHY A VODNÍHO KEFÍRU</b> .....	<b>35</b>
3.1    MIKROBIOLOGIE KOMBUCHY .....	35
3.2    MIKROBIOLOGIE VODNÍHO KEFÍRU .....	35
<b>II PRAKTICKÁ ČÁST</b> .....	<b>37</b>
<b>4 CÍL PRÁCE</b> .....	<b>38</b>
<b>5 METODIKA PRÁCE</b> .....	<b>39</b>
5.1    MATERIÁL A METODY .....	39
5.1.1    Suroviny pro výrobu nápoje kombucha a vodního kefiru.....	39
5.1.2    Chemické látky a přípravky .....	39
5.1.3    Přístroje a pomůcky.....	40
5.2    VÝROBA MODELOVÝCH VZORKŮ KOMBUCHY A VODNÍHO KEFÍRU .....	40



5.2.1	Surovinová skladba modelových vzorků kombuchy a vodního kefiru .....	41
5.2.2	Postup výroby modelových vzorků kombuchy a vodního kefiru .....	42
5.3	FYZIKÁLNĚ-CHEMICKÁ ANALÝZA .....	42
5.3.1	Stanovení pH .....	42
5.3.2	Stanovení TDS .....	43
5.3.3	Stanovení refraktometrické sušiny .....	43
5.3.4	Stanovení hustoty a obsahu etanolu .....	43
5.4	REOLOGICKÁ ANALÝZA.....	43
5.5	MĚŘENÍ BARVY .....	44
5.6	STANOVENÍ AKTIVITY VODY .....	44
5.7	MIKROBIOLOGICKÝ ROZBOR .....	44
<b>6</b>	<b>VÝSLEDKY A DISKUZE .....</b>	<b>52</b>
6.1	VYHODNOCENÍ FYZIKÁLNĚ – CHEMICKÉ ANALÝZY .....	52
6.1.1	Výsledky stanovení pH .....	52
6.1.2	Výsledky stanovení TDS.....	56
6.1.3	Výsledky stanovení refraktometrické sušiny .....	58
6.1.4	Výsledky stanovení hustoty a obsahu etanolu .....	60
6.2	VÝSLEDKY REOLOGICKÉ ANALÝZY .....	71
6.3	VÝSLEDKY STANOVENÍ BARVY .....	80
6.4	VÝSLEDKY STANOVENÍ AKTIVITY VODY .....	82
6.5	VYHODNOCENÍ MIKROBIOLOGICKÉHO ROZBORU.....	84
<b>7</b>	<b>ZÁVĚR.....</b>	<b>91</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....</b>	<b>93</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....</b>	<b>106</b>
	<b>SEZNAM OBRÁZKŮ .....</b>	<b>107</b>
	<b>SEZNAM TABULEK.....</b>	<b>109</b>

## ÚVOD

Fermentované rostlinné nápoje se v posledních letech dostávají mnohem více do povědomí. Možnými důvody mohou být potřeba přirozenou cestou přispět ke zlepšení trávicích a jiných zdravotních potíží, nahrazení fermentovaných mléčných nápojů kvůli alergii na mléčný disacharid laktózu, nebo mléčné bílkoviny, nebo hledání alternativy pro alkoholické nápoje (Frias et al., 2017).

Kombucha je nápoj známý již několik staletí a konzumovaný především v oblasti severovýchodní Asie. V současné době je spíše znovuobjevený a více experimentálně prozkoumaný. Především z hlediska mikrobiologického rozboru kultury SCOBY, symbiotické kultury mikroorganismů, která zapříčiňuje vznik tohoto nápoje a jeho typických organoleptických vlastností. Jedná se o skupinu bakterií mléčného a octového kvašení a kvasinek, které jsou schopny v rámci fermentace přetvořit přítomné sacharidy na organické kyseliny, oxid uhličitý, etanol a další látky, dodávající především sensorický podtext nápoji. Právě přítomné organické kyseliny, především kyselina octová a mléčná, ale i další, jako jablečná, citronová a glukonová, jsou prospěšné pro lidské zdraví. Přispívají k dobrým podmínkám pro rozvoj bakterií a dalších mikroorganismů ve střevě, čímž podporují správný průběh trávení. Další látky, především polyfenolické povahy, vitamíny rozpustné ve vodě a minerální látky, jsou velmi prospěšné pro imunitní systém. Kombucha se v současné době nejčastěji vyrábí z černého a zeleného čaje, případně obohaceného ovocem. Fermentace trvá většinou 5-10 dní a v závislosti na době kvašení se také liší obsah kyselin a dalších látek, ovlivňujících sensorické vlastnosti konečného produktu (Frias et al., 2017; Macedo et al., 2020).

V případě vodního kefiru, známého také jako „sladký kefir“ (sugary kefir), se jedná o kefirová zrna, známá také jako „Tibi“ nebo „Tibicos“, která vytváří tento nápoj. Jde o uskupení mikroorganismů, opět především bakterií mléčného a octového kvašení a kvasinek, které jsou shlukovány v zrnech, na povrchu chráněných vrstvou exopolysacharidů. Nejčastěji se vodní kefir vyrábí ze sacharózou oslazené vody, do které bylo přidáno sušené nebo čerstvé ovoce a právě kefirová zrna. Během několika málo dní, zpravidla 3-5, probíhá fermentace a výsledným produktem je lehce nažloutlý perlivý nápoj mírně nakyslé chuti. Obsahovými látkami jsou také především organické kyseliny (kyselina mléčná, kyselina octová), etanol a oxid uhličitý. Vodní kefir je ideální alternativou pro jedince, kteří nemohou konzumovat kefir na bázi mléka především ze zdravotních důvodů. Další příčinou může být také jiný způsob stravování, který

nepodporuje konzumaci produktů živočišného původu (Tu et al., 2019; Marangoni et al., 2020)

## I. TEORETICKÁ ČÁST

## 1 HISTORIE A SOUČASNÝ STAV PROBLEMATIKY KOMBUCHY A VODNÍHO KEFÍRU

V poslední době je evidentní zvýšený zájem o potraviny, které přirozeným způsobem přispívají k podpoře imunitního systému, správnému trávení apod. Mezi takové druhy potravin patří určité potraviny fermentované pomocí bakterií mléčného kvašení, jako jsou hlavně mléčné výrobky. Alternativní volbou k mléčným produktům, např. z důvodu alergie na disacharid obsažený v mléce – laktózu, mohou být třeba mléčně kvašená zelenina nebo právě kombucha a vodní kefir (Macedo et al., 2020; Marangoni et al., 2020).

### 1.1 Kombucha

Kombucha je fermentovaný nápoj z černého, nebo zeleného čaje, do kterého byla přidána sacharóza a tzv. „čajová houba“, nebo také Scoby (Symbiotic Culture Of Bacteria and Yeast, dále jen Scoby). Jedná se o kulturu, jež je tvořena hlavně skupinou bakterií *Acetobacter* spp. a kvasinek *Brettanomyces* a *Saccharomyces* produkujících v rámci svého metabolismu především kyselinu octovou, kyselinu mléčnou, etanol a oxid uhličitý (Frias et al., 2017).

#### 1.1.1 Historie nápoje kombucha

První zmínky o fermentovaném čaji pocházejí již z roku 220 před n. l. z oblasti východní Asie. Konzumován byl především pro své terapeutické účinky. Původně se konzumace fermentovaného čaje rozmohla v severovýchodní oblasti Číny, známé také jako Mandžusko, kde se pití tohoto produktu rozšířilo hlavně v období dynastie Tsyn z důvodu svých pravděpodobných detoxikačních a povzbuzujících účinků (Macedo et al., 2020).

Název „Kombucha“ pochází pravděpodobně z roku 414 n. l., kdy byl tento nápoj představen císaři Inkyo a použit pro léčbu jeho trávicích potíží. Od té doby se čaji říká „Kombucha“, nebo také „Kombu čaj“ (Macedo et al., 2020).

Tento produkt v průběhu času získal několik dalších označení, jako např. Čajová houba (Tea Fungus), Kargasocký čaj (Kargasok Tea), Mandžuská houba (Manchurian Mushroom) a Haipao. V důsledku obchodních cest byla kombucha rozšířena do několika dalších zemí, jako třeba v Rusku a poté ve východní Evropě. V Německu byl tento nápoj představen zhruba začátkem 20. století. Následně během druhé světové války se tento produkt stal známým a velmi oblíbeným třeba ve Francii a severní Africe. O několik let později bylo ve Švýcarsku zjištěno, že konzumace kombuchy má podobné příznivé účinky

jako např. jogurt, díky přítomnosti kyselin, které podporovaly růst prospěšných bakterií ve střevě. Po tomto zjištění se kombucha stala velmi populárním nápojem na trhu a byla představena v mnoha chuťových a aromových variantách (Macedo et al., 2020).

### 1.1.2 Současný stav problematiky nápoje kombucha

Kombucha se stala velmi populárním nápojem. Především pak v USA, kde již od 90. let 20. století patří mezi velmi oblíbené produkty na trhu. Jedním z hlavních důvodů je pravděpodobně rozsáhlejší povědomí o prospěšných účincích bakterií mléčného a octového kvašení a probiotických bakterií na trávicí trakt. V závislosti na požadavcích spotřebitelů se na trhu objevuje nápoj kombucha v různých variantách, např. i s příchutí. Dále se jedná, společně s vodním keffírem, o skvělou náhradu fermentovaných mléčných výrobků u jedinců trpících laktózovou intolerancí, nebo alergií na laktózu či kasein. Je vhodnou alternativou také pro vegany, tedy pro osoby, jejichž stravování vylučuje konzumaci jakýchkoliv živočišných produktů (Kim, Adhikari, 2020). Jak již bylo zmíněno, typickým médiem pro výrobu nápoje kombucha je černý, nebo zelený čaj. V posledních letech se však mnoho studií soustředí na výzkum výroby nápoje kombucha, jehož základem jsou např. ovocné šťávy z různých druhů ovoce. Jedním z možných příkladů může být výroba nápoje kombucha, kdy jako substrát pro *Scoby* byla použita šťáva z červených hroznů révy vinné (*Vitis vinifera*). Tento druh ovoce je významným zdrojem sacharidů, vitamínů, minerálních látek, vlákniny a látek s antioxidačními účinky. Do poslední zmíněné skupiny komponentů patří zejména polyfenolické látky, především pak fenolické kyseliny, resveratrol, proantokyanidiny a flavonoidy, hlavně antokyany. Ty jsou v červených hroznech obsaženy ve vyšší míře, než u hroznů bílých. Bylo zjištěno, že během šestidenní fermentace se zvýšil obsah nutričně významných látek, především pak těch zajišťujících antioxidační charakter produktu. Zároveň došlo ke snížení typicky octového pachu nápoje, což mělo za následek vyšší přijatelnost u panelu hodnotitelů sensorických vlastností konečného produktu (Ayed et al., 2017). V případě, kdy byl nápoj kombucha vyráběn za použití datlového sirupu jako substrátu, bylo zjištěno, že ve srovnání s černým/zeleným čajem, je produkce metabolitů vyšší. Především pak v případě organických kyselin glukuronové a octové a u polyfenolických látek, obsažených v surovině, tedy v datlích, resp. v datlovém sirupu. Tyto komponenty hrají velmi významnou roli ve fyziologických účincích, připisovaných tomuto produktu (Khosravi et al., 2019).

Dále má Sobby potenciál produkovat biopolymer, který by dle studií Ramírez et al. (2020) a Domskiene et al. (2019) mohl být použit v obalovém a textilním průmyslu. Jedná se o bakteriální celulózu, která má pevná, odolná a hlavně biodegradabilní vlákna. Využití v textilním průmyslu má svá úskalí zvláště v nestandardnosti získávání biofilmu bakteriální celulózy, kdy není vždy jistá stejná tloušťka, pórovitost a mechanické vlastnosti biofilmu (Domskiene et al., 2019; Ramírez et al., 2020).

## 1.2 Vodní kefir

Vodní kefir je fermentovaný, lehce nakyslý, mírně alkoholický nápoj, který se vyrábí pomocí kefirových zrn ve vodě, obohacené ovocnými sacharidy (Tu et al., 2019). Kefirová zrna jsou tvořena biofilmem z exopolysacharidů, který je na jejich povrchu. Tento biofilm je jinak nazýván také kefiran a chrání mikroorganismy, kterými je vytvářen a které tvoří právě kefirová zrna a jsou iniciátory fermentace (Marangoni et al., 2020). Struktura exopolysacharidů je složena především z  $\alpha$ -glukanů (Lynch et al., 2021).

### 1.2.1 Historie vodního kefiru

Existují dvě hlavní teorie o původu vodního kefiru. Jedna z nich předpokládá, že vojáci, kteří se vrátili z krymské války, donesli kefirová zrna i do oblastí západní Evropy, čímž se tento nápoj následně rozšířil (Marsh et al., 2013). Údajně jim kefirová zrna připomínala fermentační kulturu, která se používala pro přípravu zázvorového piva („gingerbeer plants“). Druhá teorie tkví v přesvědčení, že kefirová zrna, nebo-li také „zrna Tibi“ („Tibi grains“), byla získána z kaktusu Opuncie, jehož jedním z hlavních oblastí pěstování je Mexiko. Zde byla údajně sbírána z listů této rostliny. Dalšími názvy, které jsou s těmito kefirovými zrny spojovány, jsou např. „California bees“, „Ale nuts“, „African bees“, „Japanese Beer Seeds“, „Balm of Gilead“, nebo „Sugary kefir grains“, čímž byly odlišeny od zrn, využívaných pro výrobu mléčného kefiru (Gulitz et al., 2011). Ovšem stále nejpravděpodobnější teorií, jak se vodní kefir rozšířil do dalších oblastí světa, je předávání kefirových zrn mezi jednotlivými regiony a místními obyvateli. To je nejspíš také důvodem, proč vodní kefir není tolik komerčně rozšířen. Obecně platí fakt, že vodní kefir zatím není tolik prozkoumán, na rozdíl od kombuchy, nebo kefiru na bázi mléka (Marsh et al., 2013).

### 1.2.2 Současný stav problematiky nápoje vodního kefiru

Kefír byl vždy vyráběn z mléka různých živočišných druhů, především z kravského, ale také z ovčího nebo kozího. V posledních letech se však z důvodů zdravotních (alergie na laktózu, alergie na mléčnou bílkovinu), nebo jiného životního stylu a stravování, které nepodporuje konzumaci živočišných produktů, řada spotřebitelů přiklání k alternativní variantě, tedy kefiru, jež je vyroben na bázi rostlinného nápoje. Dalšími důvody mohou být také klimatické změny a celková zátěž životního prostředí mimo jiné také z dlouhodobé nadprodukce živočišných produktů, včetně právě mléka a výrobků z něj. To může vést výrobce ke změně sortimentu nabízených produktů, případně může být dalším důvodem vyšší poptávka po rostlinných alternativách ke klasickému mléčnému kefiru. Mezi nejčastější zástupce rostlinných variant mléčného kefiru patří lískooříškový, rýžový a sójový fermentovaný nápoj. Bylo prokázáno, že tyto rostlinné nápoje obsahují řadu výživově významných komponent, jako esenciální mastné kyseliny, vlákninu, vitamíny a minerální látky. Zároveň však není možné nahradit všechny živiny, které jsou obsaženy v mléce a jsou z něj také mnohem lépe vstřebatelné. Existuje několik studií, zabývajících se problematikou navýšení nutriční hodnoty vodního kefiru. Sözeri et al. (2021) se ve své studii zabývá variantou obohacení vodního kefiru přísadkou mořské řasy *Spirulina platensis*. Obecně jsou mořské řasy významným zdrojem minerálních látek, aminokyselin, nebo vitamínů a mají antioxidační a protizánětlivé účinky. Mimo to přísadka mořských řas může zlepšit vitalitu probiotických bakterií a navýšit nutriční hodnotu hotového produktu, především pak z hlediska antioxidační aktivity (Sözeri et al., 2021). Dalšími produkty, vyrobenými pomocí zrn vodního kefiru, jsou rostlinné fermentované výrobky připomínající svou texturou jogurt. V rámci studie Lim et al., 2019 byly vyráběny rostlinné fermentované výrobky ze sóji (*Glycine max* (L.) Merr.) a z černých fazolí (*Phaseolus vulgaris* L.) (Lim et al., 2019). Další velmi významnou roli v alternativních surovinách, ze kterých by bylo možné vyrobit vodní kefir, je extrakt z kokosového ořechu (*Cocos nucifera* L.). Extrakt má podobné organoleptické vlastnosti jako mléko, tedy hlavně barvu a charakteristické aroma, čímž se stává pro spotřebitele velmi přijatelným. Kokosový nápoj je tedy ideální variantou jako alternativa k mléčným fermentovaným produktům. Požadavkem spotřebitelů je především to, aby měl konečný produkt co nejvíce podobné vlastnosti jako typický mléčný kefir. Přísadkou inulinu a kokosového cukru se zaručuje, že kokosový vodní kefir bude mít výslednou texturu a aroma, které budou podpořeny typickou nakyslou chutí výsledného produktu (Alves et al., 2021). Vodní kefir lze připravit



téměř v jakémkoliv médiu, např. ovocné a zeleninové šťávy z různých druhů (jablko, kiwi, rajčata, hrušky), z kokosové vody, sójové syrovátky, kdy se jedná navíc o využití vedlejšího produktu výroby tofu, z různých rostlinných nápojů (mandlový, obilný, ořechový). Existuje několik receptur, které jsou typické pro určité oblasti/státy. Například nápoj „Tapache“ je vyroben z ananasového nápoje, hnědého cukru a skořice. Jedná se o velmi oblíbenou podobu vodního kefiru, konzumovanou převážně v Latinské Americe. Dále nápoj „Kefir d’uva“ je velmi oblíbený v Itálii. Tento vodní kefir je vyroben z hroznové šťávy. V Řecku je pomocí kefirových zrn a zázvoru vyráběno tzv. „zázvorové pivo“, které se stalo oblíbeným nápojem také ve východní Africe, kde má název „Tandawizi“ (Egea et al., 2020; Açıık et al., 2020).

Stejně jako v případě Scoby, využívané při výrobě nápoje kombucha, probíhají studie využití biofilmu vodního kefiru. Hlavním důvodem je ekologická stránka, kdy by bylo možné vyrobit biodegradabilní biopolymer, který by nahradil běžné plastové materiály. Aktuálně je zkoumána možnost využití kefirových zrn v souvislosti a výrobou rozložitelného obalového materiálu (Coma et al., 2019).

## 2 CHARAKTERISTIKA A VÝROBA KOMBUCHY A VODNÍHO KEFÍRU

Kombucha i vodní kefir jsou fermentované nápoje vyrobené pomocí kultury složené z několika druhů mikroorganismů, které v rámci svého metabolismu přetváří přítomné sacharidy na příslušné kyseliny a další látky. Ty poté vytváří typické organoleptické vlastnosti těchto produktů. V této kapitole bude detailněji popsáno chemické složení vybraných nápojů a také způsob jejich výroby.

### 2.1 Charakteristika kombuchy

Jak již bylo zmíněno výše, kombucha je nápoj, získaný fermentací oslazeného černého nebo zeleného čaje, do kterého byla přidána kultura složená z bakterií a kvasinek (Bamforth et al., 2019). Co se týče chemického složení, přítomné osmofilní kvasinky během fermentace přeměňují v rámci svého metabolismu přítomnou glukózu a fruktózu hlavně na alkohol (etanol) a oxid uhličitý a bakterie octového kvašení pak oxidují přítomný etanol na kyselinu octovou. Mimo tvorbu kyseliny octové vznikají i další organické kyseliny, jako např. kyselina glukonová, kyselina jablečná, vinná, citronová a kyselina mléčná, které všechny vykazují určitou antimikrobiální aktivitu, čímž chrání Scoby před kontaminací nežádoucími mikroorganismy, např. plísněmi. Dalšími velmi prospěšnými látkami, obsaženými ve výsledném produktu, jsou antibiotika, aminokyseliny, polyfenoly z čaje, vitamíny rozpustné ve vodě a další minoritně obsažené minerální látky a další (Macedo et al., 2020; Ahmed et al., 2020).

#### 2.1.1 Chemické složení kombuchy

##### Voda

Voda je bezpochyby hlavní surovinou pro výrobu nápoje kombucha. Musí se jednat o vodu, která byla přivedena k varu a následně vychlazena na teplotu 80 °C, což je teplota, při které se do vody přidá vybraný druh čaje a vytvoří se jeho vodný extrakt. Jelikož čaj obsahuje převážně látky rozpustné ve vodě, nikoliv v oleji, nebo jiném rozpouštědle, tvoří voda ideální prostředí pro extrakci (Bamforth et al., 2019).

V současné době existuje několik studií, ve kterých se vodný extrakt čaje aplikuje jako standard pro srovnání s inovativními médii pro výrobu nápoje kombucha. Jedná se hlavně o ovocné a zeleninové šťávy, extrakty z léčivých, aromatických a kořeninových rostlin a jiných vhodných variant (Kim et al., 2020).

### Extrakt čaje

Nejčastější a základní surovinou pro výrobu nápoje Kombucha je čaj, přesněji tedy čaj pravý (Vitas et al., 2018). Čaj pravý je dle Vyhlášky č. 330/1997 Sb. definován jako „čaj vyrobený z výhonků, listů, pupenů, nebo jemných částí zdřevnatělých stonků čajovníku *Camellia sinensis* (Linnaeus) O. Kunze, popřípadě jejich kombinací.“ Pro výrobu nápoje Kombucha se nejčastěji využívá buď černý, nebo zelený čaj. Černý čaj je dále dle zmíněné Vyhlášky definován jako „čaj pravý, ve kterém proběhla plná fermentace,“ zelený čaj je pak charakterizován jako „čaj pravý, ve kterém neproběhla fermentace“ (Vyhláška č. 330/1997 Sb.). Čaj je jedním z nejvíce konzumovaných nápojů na světě (Vitas et al., 2018).

Zelený a černý čaj se liší nejen způsobem výroby, ale také obsahovými látkami. Nejvíce jsou zastoupeny polyfenoly, konkrétně flavanoly katechiny. Hlavními katechiny obsaženými v čaji jsou epikatechin, gallokatechin, epikatechin-3-gallát, epigallokatechin a epigallokatechin-3-gallát (Gramza-Michałowska et al., 2016). Dalšími obsaženými látkami, patřícími do skupiny flavonoidů, jsou flavonoly, jako myricetin, quercetin a kaempferol, a flavony luteolin a apigenin (Donlao, Ogawa, 2019). Čím více je čaj oxidován, tím nižší obsah těchto polyfenolických látek je. V zeleném čaji jsou tedy obsaženy v podstatně vyšším množství. V černém čaji v důsledku oxidace vznikají tearubiginy a teaflaviny, které mimo jiné dodávají černému čaji charakteristickou barvu, aroma i chuť. Další podstatnou obsahovou látkou čaje je kofein. Jedná se o alkaloid se schopností stimulovat centrální nervovou soustavu, dále má také schopnost ovlivňovat činnost ledvin a potlačovat únavu. Uvolňuje se mnohem déle, než kofein obsažený v kávě (Gramza-Michałowska et al., 2016; Gramza-Michałowska et al., 2014).

### Sacharóza

Sacharóza je disacharidem, který tvoří substrát pro symbiotickou kulturu mikroorganismů. Sacharóza je rozložena na monosacharidy glukózu a fruktózu působením enzymu invertáza, kterou vytvářejí kvasinky přítomné ve Scoby. Kvasinkami je glukóza a fruktóza v rámci fermentace přetvořena především na etanol a oxid uhličitý. Octové bakterie následně oxidují etanol hlavně na kyselinu octovou (Ahmed et al., 2020). V průběhu fermentace tedy narůstá množství organických kyselin, čímž se snižuje pH výsledného nápoje (Jayabalan et al., 2014).

### **Oxid uhličitý**

Bezbarvý plyn vznikající během fermentace v rámci metabolismu přítomných kvasinek, které přetvářejí sacharózu na etanol a právě tento plyn. Je příčinou perlivosti nápoje a zlepšuje sensorické vlastnosti. Koncentrace oxidu uhličitého ve výsledném produktu se odvíjí od počátečního množství sacharózy a délky kvašení (Talebi et al., 2017).

### **Alkoholy a jejich estery**

Nejvíce je zastoupen alkohol etanol, který vzniká v rámci metabolismu přítomných mikroorganismů, konkrétně hlavně kvasinek rodu *Saccharomyces*, které jej metabolizují ze sacharózy. Etanol dále využívají bakterie octového kvašení. Mezi další zástupce alkoholů přítomných v nápoji kombucha jsou linalool, terpineol, fenyletyl alkohol a další. Výsledná koncentrace etanolu a dalších alkoholů záleží především na vstupní koncentraci sacharózy a podmínkách fermentace, tedy teplotě a době, po kterou kvašení probíhá (Zhao et al., 2018). Obvykle se přidává 5 – 15 % (w/v) sacharózy a během fermentace, která trvá zpravidla 5-10 dní, vzniká většinou 0,2 – 0,4 % etanolu. Při této konečné koncentraci etanolu v nápoji kombucha lze produkt označit jako nealkoholický (Ihsani et al., 2021).

### **Organické kyseliny**

Mezi nejvíce obsažené organické kyseliny patří octová, glukonová, glukuronová, citronová, L-mléčná, vinná, jablečná a další. Vznikají díky činnosti přítomných mikroorganismů, tedy kvasinek a bakterií mléčného a octového kvašení. Vytvářejí typickou jemně nakyslou chuť nápoje (Jayabalan et al., 2014).

Dalšími obsahovými látkami jsou vitamíny, minerální látky a aminokyseliny. V případě kombuchy i vodního kefiru jsou tyto komponenty přítomny především v závislosti na použité surovině pro výrobu nápoje a také vznikají v rámci metabolismu přítomné symbiotické kultury.

### **Vitamíny**

Během fermentace vzniká několik vitamínů. Jedná se především o vitamíny skupiny B, konkrétně vitamíny B<sub>1</sub> (tiamin), B<sub>2</sub> (riboflavin), B<sub>6</sub> (pyridoxin) a B<sub>12</sub> (kobalamin), a také vitamín C (kyselina L-askorbová). V průběhu fermentace koncentrace všech těchto vitamínů narůstá (Jayabalan et al., 2020; Villarreal-Soto et al., 2018).

Vitamín B<sub>1</sub>, neboli tiamin, zaujímá velmi důležitou roli v rámci metabolismu. Zajišťuje normální růst a vývoj lidského organismu. Podporuje správnou funkci trávicího, nervového

a kardiovaskulárního systému. Jedná se o ve vodě rozpustný vitamín. Lze jej přijímat ve stravě, ale je také syntetizován mikroorganismy, tvořící střevní mikroflóru (Bubko et al., 2015).

Zdrojem vitamínu B<sub>2</sub>, riboflavinu, jsou hlavně mléčné produkty, vejce, maso, ryby s vyšším obsahem tuku, obiloviny a zelenina. Dále je také syntetizován bakteriemi mléčného kvašení v rámci jejich metabolismu. Tento vitamín je důležitý pro normální růst a vývoj lidského organismu, reprodukci, laktaci a celkové fyzické i psychické zdraví. Zároveň hraje velmi důležitou roli v metabolismu, kdy je prekurzorem pro flavinmononukleotid a flavinadeninukleotid, což jsou kofaktory, které se účastní oxidačně-redukčních reakcí během metabolismu sacharidů, aminokyselin a také aktivují přeměnu folátu a pyridoxinu do jejich koenzymových forem. Folát představuje aktivní formu vitamínu B<sub>9</sub> a je možné jej přirozeně přijímat v potravinách. Dlouhodobý nedostatek tohoto vitamínu může přispět ke zhoršení zraku, snížení rychlosti růstu, problémy s kůží a další (Thakur et al., 2016).

Vitamín B<sub>6</sub>, jinak také pyridoxin, je dalším ve vodě rozpustným vitamínem skupiny B. Zdrojem tohoto vitamínu je především maso, včetně rybiho, dále ořechy, fazole, v určitém množství i ovoce a zelenina. Jeho převažující funkcí v organismu je účast při metabolismu živin, hlavně sacharidů a lipidů, a sice jako kofaktor reakcí (Brown et al., 2020).

Velmi významným vitamínem, přítomným v nápoji kombucha, je vitamín B<sub>12</sub>, neboli kobalamin. Další vitamín skupiny B, rozpustný ve vodě. Primárním zdrojem jsou živočišné produkty, především maso, vejce a mléčné výrobky, ale v menší míře je přítomen také ve fermentovaných rostlinných produktech, např. tempehu, kvašené zelenině, misu, nebo právě nápoji kombucha (Zheng et al., 2021). Fyziologické účinky, které jsou tomuto vitamínu připisovány, jsou účast při metabolických procesech, např. syntéza nukleových kyselin, podpora nervového systému a zajištění krvetvorby (Hüpsch-marzec et al., 2019).

Vitamín C, nebo také kyselina L-askorbová, je velmi známý ve vodě rozpustný vitamín. Jeho hlavní fyziologickou funkcí je podpora správné funkce imunitního systému, má antioxidantní efekt, je kofaktorem několika enzymů a ovlivňuje také činnost centrální nervové soustavy. Zdrojem vitamínu C jsou převážně citrusové plody a jiné ovoce a zelenina (Han et al., 2018; Pullar et al., 2017).

### **Minerální látky**

Mezi zástupce minerálních látek, obsažených ve výsledném produktu, patří především hořčík, železo, nikl, zinek, měď a olovo (Macedo et al., 2020).

Zinek a měď jsou stopovými prvky a jsou nezbytnými kofaktory enzymatických reakcí. Příjem mědi v potravinách je spíše minoritní. Vyskytuje se převážně v živočišných produktech, např. v játrech a vejcích, dále pak v obilovinách nebo luštěninách, ořeších, čaji nebo kávě. Vyšší obsah mědi je v potravinách pocházejících z moře, tedy např. v rybách nebo mořských řasách. Slouží jako kofaktor několika enzymů, podporuje správnou činnost srdce a krevní oběh (Mounjouenpou et al., 2020).

Zinek zaručuje správné hojení ran, přispívá k podpoře imunitního systému a např. během těhotenství podporuje správný vývoj plodu. Zdrojem tohoto minerálu jsou převážně luštěniny, jako např. fazole, čočka, nebo cizrna, dále různá semena (např. konopná), ořechy a sójové výrobky (např. tempeh, ze kterého je také lépe vstřebatelný, jelikož se jedná o fermentovaný produkt) (Mounjouenpou et al., 2020).

Hořčík je důležitým minerálem pro správnou funkci nervového systému. Zdrojem jsou např. obiloviny, zelenina a luštěniny, kakao, maso a živočišné produkty a také ořechy (Mounjouenpou et al., 2020).

### **Aminokyseliny**

Aminokyseliny jsou základními stavebními jednotkami bílkovin. V lidském organismu jsou nepostradatelné. Jsou např. předstupněm nervových přenašečů, účastní se enzymatických reakcí, důležitou roli hrají také ve správném hojení ran, ovlivňují funkci žláz a orgánů. Dělí se na esenciální (tělo si tyto aminokyseliny nedokáže syntetizovat samo, je třeba je přijímat ve stravě) a neesenciální. Z esenciálních aminokyselin jsou v nápoji kombucha zastoupeny izoleucin, leucin, lyzin, metionin, fenylalanin, valin, tryptofan a treonin. Zástupci neesenciálních aminokyselin jsou pak alanin, cystein, glycin, histidin, tyrozin, serin, prolin, arginin, kyselina glutamová a kyselina asparagová. Během fermentace jejich obsah narůstá (Leal et al., 2018).

Dalšími obsahovými látkami, obsaženými spíše ve stopovém množství, jsou biogenní aminy, lipidy, pigmenty, puriny, některé hydrolytické enzymy a anionty (Macedo et al., 2020).

#### **2.1.2 Fyziologické účinky kombuchy**

Existuje mnoho faktorů, které významným podílem ovlivňují lidské zdraví. Mezi hlavní takové faktory patří hlavně stres a obecně psychická zátěž, nezdravý životní styl a také zhoršující se životní prostředí např. z hlediska znečištění vzduchu. Všechny tyto

skutečnosti přispívají k rozvoji několika onemocnění, převážně týkajících se kardiovaskulárního systému, ale také nervové soustavy nebo k rozvoji obezity. Konkrétně lze zmínit např. Alzheimerovu nebo Parkinsonovu chorobu, aterosklerózu nebo ischemii mozku (stav, kdy má mozek nedostatek kyslíku a v důsledku toho postupně odumírá; děje se tak z důvodu vzniku krevní sraženiny, která ucpe tepnu vedoucí právě k mozku). Konzumací potravin, které jsou zdrojem antioxidantů, vitamínů a minerálních látek lze přispět k prevenci těchto dnes již civilizačních chorob (Jakubczyk et al., 2020).

V rámci klinických výzkumů byly prokázány jisté fyziologické účinky nápoje kombucha, a sice antimikrobiální, především díky převažujícímu obsahu kyseliny octové, antikarcinogenní, antidiabetické a antioxidační. Kombucha také díky přítomnosti probiotických bakterií pravděpodobně příznivě ovlivňuje trávicí trakt, dále snižuje hladinu cholesterolu v krvi a přispívá k podpoře imunitního systému a díky vyšší koncentraci kyseliny glukuronové podporuje také detoxikaci jater (Chakravorty et al., 2016; Cardoso et al., 2020). Dalšími příznivými účinky, které jsou nápoji kombucha přisuzovány, je prevence aterosklerózy, revmatismu a artritidy, podpora rozvoje střevní mikroflóry, zmírnění potíží během menstruace a menopauzy, podpora zmírnění problémů týkajících se nervového systému, jako stres a bolesti hlavy (Macedo et al., 2020).

Stále ale chybí dostatek klinických studií, které by s dostatečně vysokou jistotou potvrdily tato tvrzení. To je důvodem, proč prozatím nebyly uznány účinky tohoto nápoje na lidské zdraví Evropským úřadem pro bezpečnost potravin (EFSA) (Morales, 2020).

### 2.1.3 Senzorická charakteristika kombuchy

Senzorický vjem je hodnocen všemi smysly – zrakem, sluchem, hmatem, chutí i čichem. Při konzumaci nápoje kombucha je předpoklad vizuálního vjemu (vzhledové charakteristiky produktu), čichového vjemu (aroma před a po požití), chuťového vjemu (sladkost, kyselost) a určitého hmatového vjemu, např. díky bublinkám oxidu uhličitého praskajících na jazyku. Velmi podstatný vliv na senzorickou charakteristiku výsledného produktu má bez pochyby výběr čaje a délka extrakce, koncentrace sacharózy a doba a teplota fermentace (Tran et al., 2020).

Nápoj kombucha má lehce octové až citronové aroma a chuť. Co se týče barvy výsledného nápoje kombucha, který byl vyroben z černého čaje, tato je ovlivněna polyfenoly z čaje, teaflavinem a tearubiginem, které dodávají nápoji typicky červeno-oranžovou barvu. V průběhu fermentace, nárůstu obsahu organických kyselin, a tím snížení hodnoty pH

nápoje, se určitým způsobem snižuje intenzita barvy (Tran et al., 2020; Ivanišová et al., 2020).

Čichový vjem vzniká na základě obsahových látek v surovině, tedy čaje, a obsahu několika metabolitů, které vznikají během fermentace. Mezi látky, které jsou obsaženy v čaji a přispívají k typickému aroma nápoje kombucha, patří např. linalool (květinové aroma), geraniol (sladké, medové aroma), 2-fenyletanol (medové aroma) nebo damascenon (vůně po růžích). Dominantní aroma, které je typické pro nápoj kombucha, je lehce octové, což je důsledek přítomnosti bakterií octového kvašení, a také aroma typické pro cider, tedy kvašený jablečný mošt, což je následek přítomnosti kvasinek. Také vzniká několik alkoholů a jejich esterů, např. amyl alkoholy (banánové a hruškové aroma), butanol (balsamické aroma), propanol (typická vůně fermentovaného nápoje, ovocné aroma), etyl acetát (ovocné aroma) a etyl laktát (krémové, ovocné aroma) a také oktanol (citrusové aroma) (Tran et al., 2020; Ivanišová et al., 2020).

Co se týče chuti konečného nápoje kombucha, je také ovlivněna počáteční koncentrací sacharózy a formou, ve které je použita (stolní cukr, melasa, agávový sirup, glukózový sirup) a na délce fermentace. Čím delší doba fermentace je, tím kyselější a perlivější nápoj se získá. Kyselost zaručují především bakterie octového kvašení, vliv bakterií mléčného kvašení a kvasinek však také není zanedbatelný. Tyto mikroorganismy v rámci svého metabolismu produkují organické kyseliny, především kyselinu octovou, glukuronovou, dále kyselinu mléčnou, jantarovou a jablečnou. Určitá míra hořké chuti je případně způsobena přítomností polyfenolů a kofeinu, pocházejícího z čaje (Tran et al., 2020; Ivanišová et al., 2020).

Celkový vjem je často popisován jako „osvěžující“. To je zapříčiněno pravděpodobně přítomností oxidu uhličitého, nízkou viskozitou nápoje a také aroma nápoje, které je nejčastěji charakterizováno jako citrusové, případně broskvové apod. (Tran et al., 2020; Ivanišová et al., 2020).

## 2.2 Technologie výroby kombuchy

Výroba nápoje kombucha není obtížná. Je však nutné vytvořit vhodné podmínky pro symbiotickou kulturu Scoby a udržovat tyto podmínky po celou dobu fermentace. Zároveň je zásadní dodržování zásad správné hygienické praxe.



### 2.2.1 Suroviny pro výrobu kombuchy

#### Voda

Jak již bylo zmíněno výše, pro výrobu nápoje kombucha, kdy se připravuje extrakt čaje, je potřeba převařená voda o teplotě 60 – 80 °C. Následně se do ní přidá vybraný druh černého, zeleného nebo jiného čaje, případně, pokud se vyrábí nápoj kombucha z extraktů léčivých, aromatických nebo kořeninových rostlin, tak jsou přidány vybrané druhy, a sice v čerstvé, nebo sušené formě. Teplota vody se musí vždy upravit podle suroviny, která je použita pro výrobu extraktu. Před přidáním Scoby musí mít voda, resp. vodný extrakt suroviny teplotu cca 22 °C (Ahmed et al., 2020; Jayabalan et al., 2014).

#### Vodný extrakt z čaje

Pro výrobu extraktu lze použít černý, nebo zelený čaj, případně také oolong, nebo i jiné druhy čaje. Nejvýznamnějšími obsahovými látkami čaje jsou polyfenolické látky. Během fermentace jejich obsah narůstá. Jelikož u zeleného čaje nedochází k oxidaci, je již v čerstvé surovině poměrně vysoký obsah této skupiny látek a po fermentaci dojde tedy ještě k jeho navýšení (Kim et al., 2020). Během fermentace dochází také vlivem zvýšené činnosti enzymu polyfenol oxidázy k oxidaci katechinů, konkrétně epikatechinu, epikatechin gallátu, epigallokatechinu a epigallokatechin gallátu na teaflaviny. Polyfenoly si zachovávají svou chemickou strukturu i po snížení pH, ke kterému dochází během fermentace vlivem nárůstu koncentrace organických kyselin. Dále také dochází k nárůstu koncentrace flavonoidů (Wang et al., 2020).

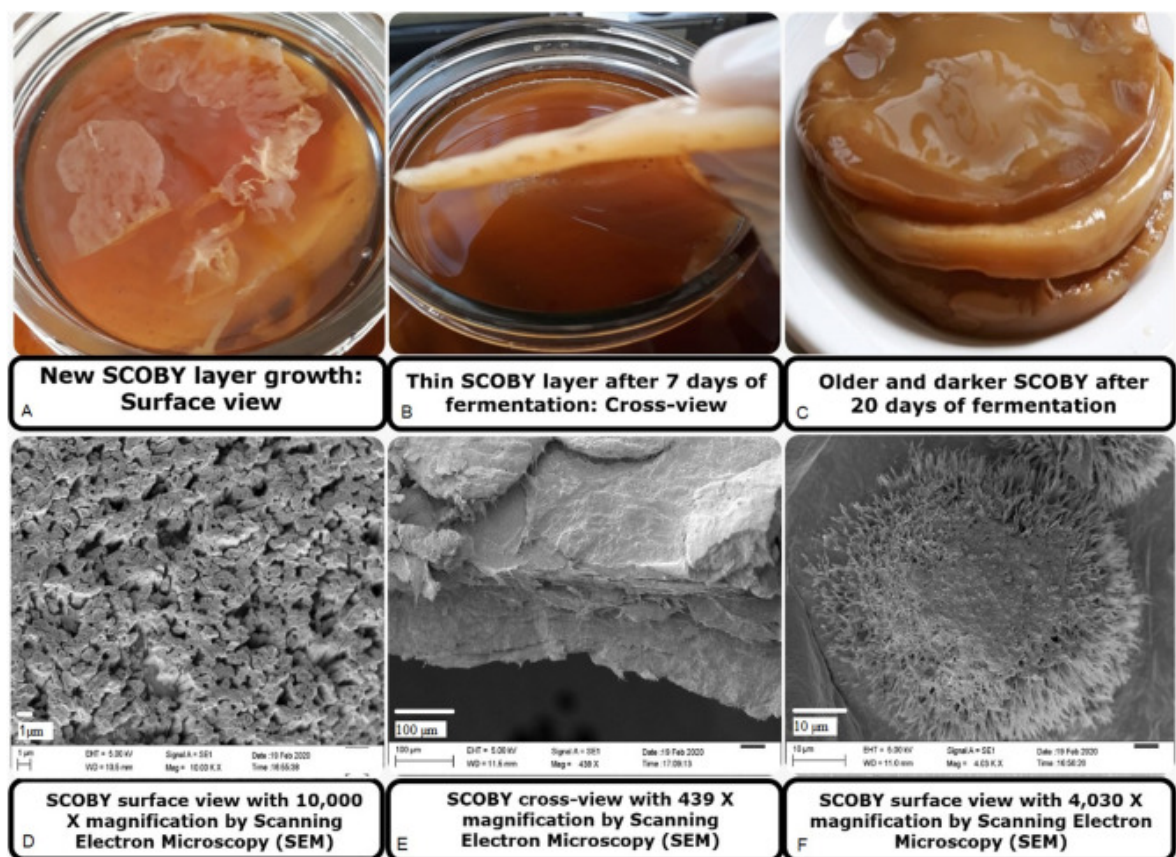
#### Sacharóza

Sacharóza se při výrobě kombuchy nejčastěji přidává v klasické sypké formě jako krystalový cukr. Lze použít také různé rostlinné sirupy, např. agávový, javorový, nebo datlový sirup. Zpravidla je přidáváno 50 – 100 g/l sacharózy (Jayabalan et al., 2014; Macedo et al., 2020).

#### SCOBY

Scoby, symbiotická kultura bakterií a kvasinek, je celulózový plát, nazýván také „čajová houba“, vzniklý činností právě přítomných mikroorganismů, žijících v symbióze. Jedná se především o bakterie octového kvašení a osmofilní kvasinky, ale podstatnými přítomnými mikroorganismy jsou také bakterie mléčného kvašení. Tento biofilm je vytvářen jako sekundární produkt metabolismu přítomných mikroorganismů, především pak bakterií

*Acetobacter xylinum*, *Acetobacter xylinoides*, *Acetobacter aceti* a osmofilních kvasinek *Saccharomyces ludwigii*, *Kloeckera apiculata*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Torulopsis*, *Candida* a několik dalších (Laavanya et al., 2021). Další skupinou mikroorganismů, která je součástí SCOBY, jsou probiotické bakterie, hlavně zástupci rodů *Lactobacillus* a *Bifidobacterium*. Zastoupeny jsou také probiotické druhy kvasinek, např. *Saccharomyces boulardii*, *Saccharomyces cerevisiae* a další. Typickými potravinami, ve kterých byla přítomnost probiotických mikroorganismů prokázána, jsou jogurty, fermentované i nefermentované mléko, sójové produkty jako miso, tempeh, dále šťáva z kvašeného zelí a v neposlední řadě také kombucha. Pro rozvoj probiotických bakterií je potřeba zajistit dostatečný příjem vlákniny. Tyto mikroorganismy jsou velmi prospěšné pro trávicí trakt a významným podílem přispívají ke správné funkci imunitního systému (Kozyrovska et al., 2012).

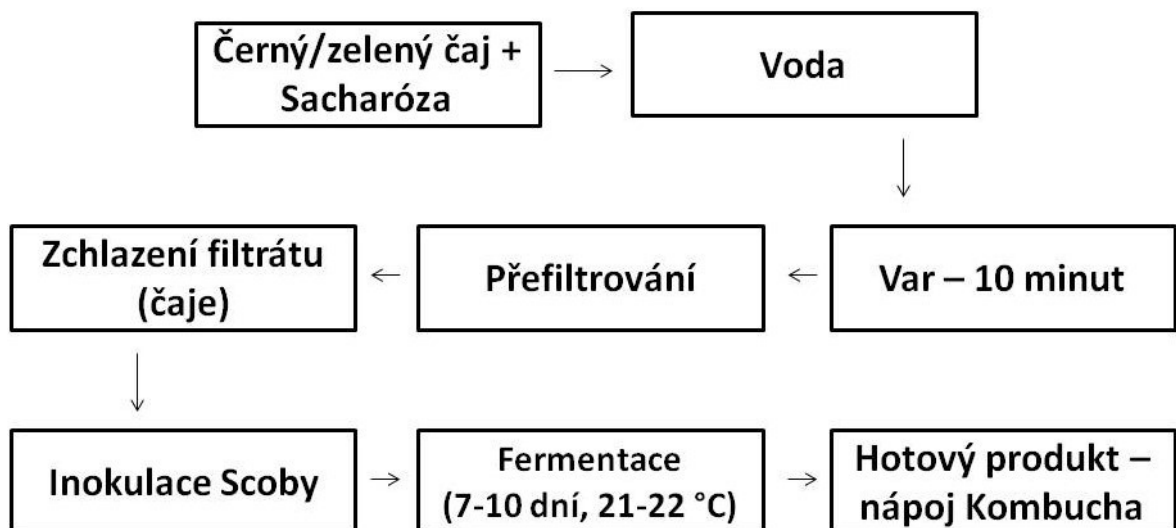


Obrázek 1. Kultura SCOBY (Soares et al., 2021).

### 2.2.2 Postup výroby kombuchy

Nejčastěji je nápoj Kombucha vyráběn tak, že je 1,5 – 5 g/l černého (případně zeleného) čaje zalito převařenou vodou, nechá se vychladnout na pokojovou teplotu a před inokulací je přidáno 50 – 150 g/l sacharózy, aby byl získán 5 – 15% roztok (Bhattacharya et al.,

2013). Následně je přidána Scoby společně se 100 ml hotového nápoje kombucha z předešlé fermentace. Sklenice s takto připraveným nápojem se přikryjí čistým bavlněným plátnem (Greenwalt et al., 2000). Octové bakterie, které jsou součástí kultury Scoby, zapříčiňující fermentaci, vytváří na hladině nápoje zmiňovanou plovoucí celulózovou vrstvu krémové nebo světle béžové barvy (Ahmed et al., 2020). Ze začátku fermentace je nápoj kyselý, spíše ovocné chuti a jemně perlivý. Během dalších dnů kvašení se chuť změní na typicky lehce octovou a nápoj je také více perlivý (Boekhout et al., 2003). Fermentace probíhá zpravidla po dobu 7 – 14 dní (Bhattacharya et al., 2013). Pro výrobu Kombuchy je nejčastěji využíván černý a zelený čaj, ale lze využít také bílé a žluté čaje nebo bylinné nápoje (např. z máty, skořice, anýzu, šalvěje nebo majoránky) (Ahmed et al., 2020).

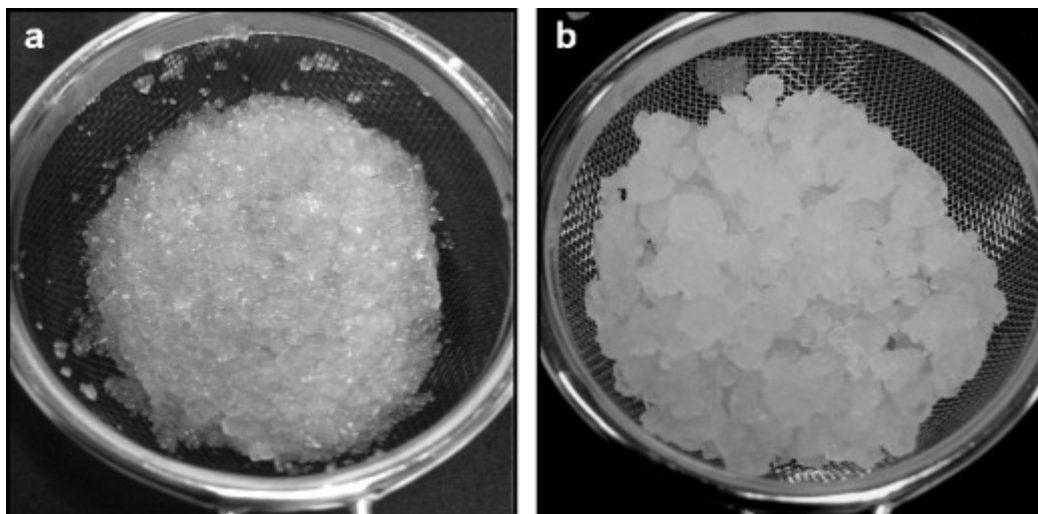


**Obrázek 2.** Výrobní schéma nápoje Kombucha (Kumar, Joshi, 2016).

Co se týče konečné fáze výroby, tedy balení a distribuce, komerčně dostupný hotový produkt, nápoj kombucha, je balen převážně do hliníkových, z vnitřní strany pocínovaných, plechovek, které nápoj chrání především před vlivem světla a vzdušného kyslíku. Některé společnosti upřednostňují pouze balení do skla, jiné aplikují oba způsoby balení nápoje (plechovka i sklo). Jelikož nedochází k pasteraci po procesu fermentace, existuje riziko tzv. sekundární fermentace a expanze vzniklého oxidu uhličitého. Proto se po lahvování, případně tedy stáčení do plechovek, provádí chlazení, které zpomalí nástup druhotné fermentace (Kim, Adhikari, 2020).

### 2.3 Charakteristika vodního kefiru

Vodní kefir je rostlinný fermentovaný nápoj, podobných organoleptických charakteristik jako kombucha. Vzniká díky kefirovým zrnům, které jsou přidány do roztoku vody, sacharózy a čerstvého (např. citron) nebo sušeného (např. rozinky, fíky) ovoce, případně ovocných extraktů. Kefirová zrna nepravidelného tvaru a gelovitého charakteru obsahují skupinu mikroorganismů, které mají schopnost velmi rychle v rámci svého metabolismu přetvářet hydrolyzovanou sacharózu na příslušné produkty (Fels et al., 2018). Kultura kefirových zrn pro výrobu vodního kefiru je, podobně jako u kombuchy, tvořena několika druhy bakterií mléčného a octového kvašení a také kvasinkami (Tu et al., 2019). Činností těchto mikroorganismů vzniká perlivý, lehce nakyslý kvašený nápoj. Svými vlastnostmi je velmi podobný kefiru na bázi mléka (Lynch et al., 2021).



**Obrázek 3.** Zrna vodního kefiru - a) zrna vodního kefiru použita ve studii, b) zrna vodního kefiru využívána pro domácí výrobu nápoje (Laureys et al., 2017).

#### 2.3.1 Chemické složení vodního kefiru

##### Voda

Ve většině případů tvoří voda základ nápoje vodní kefir. Při výrobě vodního kefiru se stejně, jako u kombuchy, používá převařená vychlazená demineralizovaná voda, vychlazená na pokojovou teplotu, tedy 21 °C. Není však striktně dáno, že je nutné vyrábět vodní kefir pouze za použití vody, oslazené sacharózou a ochucené sušeným ovocem. Existuje mnoho variant – např. lze použít ovocné či zeleninové šťávy z různých druhů plodin, rostlinné nápoje z ořechů, mandlí, obilovin, případně sóji, která je z tohoto hlediska poměrně oblíbenou surovinou (Laureys et al., 2021).

### **Sacharóza**

Jak již bylo zmíněno výše, jedná se o nejznámější neredukující disacharid. Obsažen je v téměř všech částech rostlin. Mimo cukrovou řepu a cukrovou třtinu je zdrojem sacharózy také javor cukrodárný (*Acer saccharum*). Velmi dobře se rozpouští ve vodě a je zkvasitelná. V případě vodního kefiru slouží jako zdroj uhlíku pro mikroorganismy, které sacharózu v rámci svého metabolismu během fermentace přetvářejí na příslušné produkty. Nejčastěji je využíván krystalový řepný cukr, a sice v množství 60 – 100 g/l (Lynch et al., 2021; Hřivna, 2014; Destro et al., 2019).

### **Organické kyseliny**

Hlavním zástupcem organických kyselin je, podobně jako u kombuchy, kyselina octová. Dále je ve vyšší koncentraci zastoupena kyselina mléčná (Lynch et al., 2021). Přítomny mohou být také kyseliny propionová, kaprylová a kaprinová a další organické kyseliny (např. kyseliny vinná, jablečná, citronová, glukonová atd.), obsažené v surovině, která tvoří substrát pro výrobu vodního kefiru (např. jablečná šťáva a jiné ovocné/zeleninové šťávy) (Randazzo et al., 2016).

### **Oxid uhličitý**

Oxid uhličitý je bezbarvý plyn, bez zápachu, těžší než vzduch. Je velmi dobře rozpustný ve vodě. Při rozpuštění ve vodě vzniká kyselina uhličitá. V určité koncentraci má oxid uhličitý v nápoji také konzervační účinek. Vzniká během fermentace hlavně díky přítomnosti kvasinek (Ashurst, 2016).

### **Alkoholy a jejich estery**

Mezi hlavní zástupce alkoholů, obsažených ve vodním kefiru, patří etanol, který je jedním z hlavních produktů metabolismu přítomných mikroorganismů, konkrétně kvasinek. Je dále využíván bakteriemi octového kvašení, které jej přetvářejí (oxidují) na kyselinu octovou. Etanol vzniká v rámci procesu zvaném glykolýza, ke kterému dochází během fermentace (Randazzo et al., 2016).

Dále byla detekována také přítomnost několika těkavých esterů a vyšších alkoholů, např. izoamylacetátu, izoamylalkoholu, etyl oktanoátu, 2-metyl-1-propanolu a několika dalších látek, které ovlivňují sensorické vlastnosti výsledného produktu, (viz kapitola Sensorická charakteristika vodního kefiru) (Lynch et al., 2021).

## Vitamíny

Mezi zástupce vitamínů, které jsou obsaženy ve výsledném produktu, vodním kefiru, patří vitamíny skupiny B – B<sub>1</sub>, B<sub>6</sub> a B<sub>12</sub>. Tyto vitamíny jsou obsaženy také v nápoji kombucha a jejich fyziologické účinky jsou tedy popsány výše (Lynch et al., 2021).

## Minerální látky

Minerálními látkami, které jsou obsaženy v tomto nápoji, jsou mimo jiné např. vápník a draslík (Hampton et al., 2021).

Zdrojem vápníku jsou především mléčné výrobky, jako mléko, fermentované mléčné výrobky, sýry. Dále je pak vápník obsažen např. v ořechách, olejnatých semenech (např. mák), listové zelenině, obilovinách nebo luštěninách. Příjem vápníku je důležitý především pro správný vývoj a růst kostí a zubů. Při jeho nedostatku hrozí rozvoj osteoporózy, což je onemocnění známé jako řídnutí kostí, které se vyskytuje především u žen vyššího věku (Trailokya et al., 2016).

Draslík je velmi důležitou minerální látkou, obsaženou hlavně v zelenině a ovoci, nebo v bramborách, ale také v živočišných produktech, např. v rybách, nebo v mléčných výrobcích. Je nezbytný pro kardiovaskulární systém, hlavně tedy z hlediska podpory prevence vysokého tlaku a potíží se srdcem. Nepostradatelný je také v případě správného růstu a vývoje kostí, podobně jako vápník (Weaver, 2013).

## Aminokyseliny

Během kvašení dochází ke vzniku řady aminokyselin. Mezi nejvíce obsažené patří leucin, izoleucin, metionin, fenylalanin, tryptofan a valin. Všechny patří mezi tzv. esenciální aminokyseliny, tedy aminokyseliny, které si není lidský organizmus schopný sám syntetizovat a je nutné je přijímat ve stravě. Lze tedy předpokládat, že by vodní kefir mohl být jedním ze zdrojů těchto látek (Lynch et al., 2021).

### 2.3.2 Fyziologické účinky vodního kefiru

Vodnímu kefiru jsou přisuzovány určité zdravotní benefity, které poměrně významným podílem korelují se zdravotními účinky kefiru na bázi mléka (Lynch et al., 2021). Díky přítomnosti bakterií mléčného a octového kvašení a probiotických bakterií rodu *Bifidobacterium* vznikají během fermentace organické kyseliny (hlavně tedy kyselina mléčná a octová, ale také kyseliny jablečná a glukuronová), které určitým podílem přispívají k rozvoji střevní mikroflóry, čímž je příznivě ovlivněn průběh trávení a také tyto

kyseliny mají protizánětlivé účinky. Dále zmíněné mikroorganismy přispívají ke správné funkci imunitního systému. Vodní kefir má mimo jiné také antioxidační účinky, byla detekována antiulcerogenní aktivita, čímž by pravděpodobně konzumace vodního kefiru určitým podílem mohla přispět k prevenci vředových onemocnění trávicího traktu. Další provedené studie prokázaly antihyperglykemický efekt tohoto nápoje, neboli schopnost snížení koncentrace LDL-cholesterolu v krvi. Tím by vodní kefir mohl být dalším produktem, přispívajícím k prevenci kardiovaskulárních onemocnění, obezity a dalších civilizačních chorob (Egea et al., 2020).

### 2.3.3 Senzorická charakteristika vodního kefiru

V případě vodního kefiru, stejně jako u kombuchy, se také hodnotí sensorický vjem ze všech pěti hledisek. Organoleptické charakteristiky konečného produktu se odvíjí od použitého média, tedy zda se jedná o ovocnou nebo zeleninovou šťávu, nebo o vodu, do které se přidá sušené či čerstvé ovoce. Dále také záleží na množství přidaného cukru a na délce fermentace (Laureys, De Vuyst, 2014; Randazzo et al., 2016).

Zpravidla je však získáván lehce nakyslý, perlivý nápoj s ovocným aroma. Chuťový vjem je ovlivněn opět převážně organickými kyselinami. V případě vodního kefiru se jedná především o kyselinu mléčnou, octovou, jablečnou a vinnou (Laureys, De Vuyst, 2014; Randazzo et al., 2016).

Mezi látky, které ovlivňují čichový vjem vodního kefiru, patří 2-metyl-1-propanol (alkoholové aroma), izoamyl alkohol (aroma po odlakovači na nehty), etyl acetát (hlavně ovocné aroma, v menší míře také alkoholové aroma a aroma po odlakovači na nehty), izoamyl acetát (sladké ovocné aroma, připomínající banán nebo hrušku), etyl hexanoát (ovocné aroma připomínající jablka, banány), etyl oktanoát (také ovocné aroma typické pro ananas, případně hrušku), etyl dekanoát (květinové aroma), etyl butanoát (květinové a ovocné aroma) a etyl 2-metyl-butanoát (ovocné aroma charakteristické pro jahody, nebo ananas), anetol (lékořicové aroma) a linalool (citrusová, ovocná, případně květinová vůně) (Laureys, De Vuyst, 2014; Randazzo et al., 2016).

Chuť vodního kefiru je ovlivněna konečnou koncentrací organických kyselin. Ty vznikají v rámci metabolismu bakterií mléčného a octového kvašení. Převažují hlavně tedy kyselina mléčná a kyselina octová, dále kyseliny jablečná, vinná a citronová. Chuťový vjem hotového produktu je ovlivněn také koncentrací etanolu a oxidu uhličitého, který zapříčiňuje typickou perlivost nápoje. Všechny tyto charakteristiky se odvíjí od vstupní koncentrace sacharózy a doby fermentace. Celkový sensorický vjem nápoje vodní kefir je

nejčastěji popisován jako „svěží, perlivý, mírně nakyslý nápoj s ovocným aroma“ (Sabokbar, Khodaiyan, 2015).

## **2.4 Technologie výroby vodního kefiru**

Produkce nápoje vodní kefir není komplikovaná. Stejně jako u kombuchy je zásadní připravit symbiotické kultuře vhodné podmínky pro kultivaci a udržovat je po celou dobu fermentace, aby bylo např. zabráněno kontaminaci. Tedy je potřeba dodržovat dané hygienické podmínky.

### **2.4.1 Suroviny pro výrobu vodního kefiru**

#### **Voda**

Pro výrobu vodního kefiru je potřeba převařená vychlazená voda na teplotu  $22\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ . Do vody je následně přidán cukr, ovoce (sušené/čerstvé) a kultura.

#### **Sacharóza**

Sacharóza je přidávána ve formě krystalového bílého řepného cukru, případně může být použit také cukr třtinový, nebo cukr není přidáván vůbec v případě, že je vodní kefir vyráběn z ovocné šťávy, která již sama o sobě obsahuje požadované množství sacharózy. V případě využití klasického krystalového cukru je přidáváno zpravidla 60-100 g/l (Tu et al., 2019; Destro et al., 2019).

#### **Ovoce**

Jako nejčastěji používaný druh ovoce jsou uváděny fíky, a sice v sušené formě. Dále je možno přidat plátky čerstvého citronu. Další možností je použití ovocné/zeleninové šťávy z nejrůznějších rostlinných druhů (např. jablko, meloun, hruška, méně tradiční ovocné druhy jako kiwi, granátové jablko, dále ze zeleniny např. fenykl, mrkev nebo cibule, velmi často využívaná sója, přesněji sójová syrovátka, zázvor, kokosový ořech, ananas a několik dalších) (Lynch et al., 2021).

#### **Kefírová kultura**

Zrna vodního kefiru jsou komerčně dostupné v lyofilizované formě, případně je lze zakoupit i s matečným zákysem od někoho, kdo si sám vodní kefir vyrábí v domácím prostředí. V případě přídavku zrn vodního kefiru v lyofilizované formě se přidává zpravidla 5 g, což odpovídá obsahu jednoho balení kultury vodního kefiru od výrobce



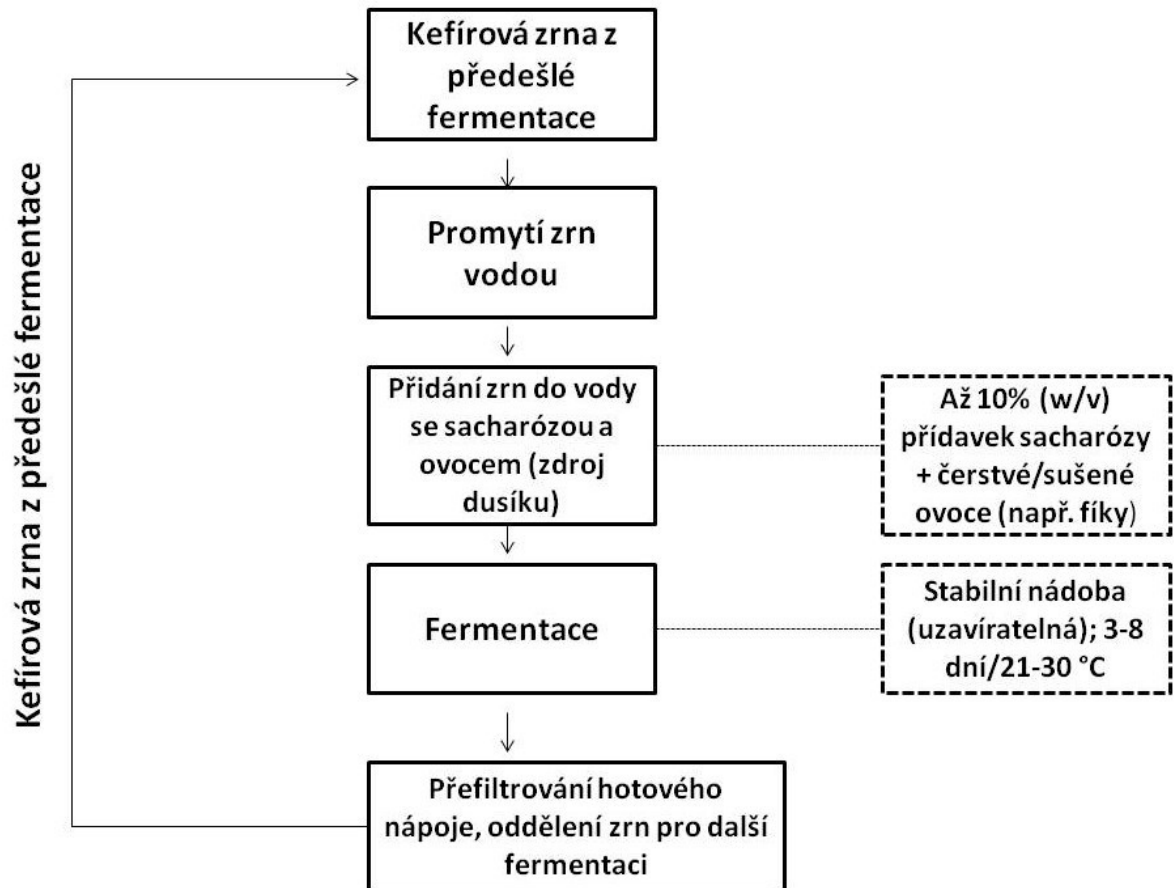
UNIBIOM s.r.o. V případě použití zrn vodního kefiru od nekomerčního výrobce by mělo být použito 5 – 15 % (w/v) zrn s matečným zákyssem (Vodní kefirové kultury, 2018).

#### 2.4.2 Postup výroby vodního kefiru

Nejdříve je potřeba připravit sterilní sklenice o požadovaném objemu (2 – 3 l). Dále je nejčastější uváděný způsob výroby vodního kefiru takový, že je do převařené demineralizované vody, vychlazené na teplotu 21-22 °C, přidáno 0,5 – 1,5 kg (6 – 10 %) sacharózy v klasické sypké formě a několik sušených fíků, případně i čerstvý, na plátky nakrájený citron. Následně se přidají kefirová zrna (6 – 31 %) z předešlé fermentace. (Laureys et al., 2017; Verce et al., 2019).

Směs je ponechána při pokojové teplotě a anaerobních podmínkách po dobu, nejčastěji, 2 – 4 dnů. Během této doby probíhá poměrně rychlá fermentace (Laureys et al., 2018). Vzniká tak perlivý nápoj mírně nažloutlé barvy, obsahující etanol, CO<sub>2</sub>, manitol, organické kyseliny, především kyselinu mléčnou a kyselinu octovou, a další látky, které přispívají ke vzniku typického aroma tohoto produktu (Fels et al., 2018). Právě díky vznikajícím organickým kyselinám se v průběhu fermentace snižuje pH produktu. Během 3-4 dnů se pH sníží na hodnotu 3,43 – 3,5 (Laureys et al., 2018; Laureys et al., 2014).

V současné době existuje jen málo malých firem, které vyrábí a prodávají určité množství matečného zákysu vodního kefiru s kefirovými zrny (podobné jako s násadou u kombuchy). Důvodem je především to, že fermentace a celková výroba vodního kefiru není stabilní proces, resp. zatím nebyl vynalezen způsob, jak výrobní proces standardizovat, aby bylo dosaženo stabilních výsledků, např. z hlediska získání stejných organoleptických vlastností nebo zajištění přítomnosti pouze prospěšných mikroorganismů (bakterií mléčného a octového kvašení, kvasinek a probiotických bakterií) v konečném produktu. V této podobě, kefirová zrna s částí nápoje z předešlé fermentace, je vodní kefir prodáván pouze v malých prodejnách zaměřených na produkty tzv. zdravé výživy, případně lze přes webové stránky zakoupit kefirovou kulturu v lyofilizované formě a připravit si i matečný zákys. Na rozdíl od kombuchy, hotový nápoj vodní kefir jako takový však dostupný prozatím není (Laureys et al., 2017; Laureys, de Vuyst, 2014).



Obrázek 4. Výrobní schéma vodního kefiru (Lynch et al., 2021)

### 3 MIKROBIOLOGIE KOMBUCHY A VODNÍHO KEFÍRU

Mikroorganismy přítomné v nápojích kombucha a vodní kefir jsou podstatou těchto produktů. Během fermentace vzniká díky činnosti mikroorganismů několik chemických látek, které mají mimo jiné nutriční a konzervační účinek, dále přispívají k typickým fyzikálně-chemickým a senzorickým vlastnostem těchto fermentovaných nápojů. Jelikož nedochází k tepelné konzervaci po konci fermentace, mají hotové nápoje také probiotický efekt (podpora správného průběhu trávení, vliv na imunitní systém), především pak díky přítomnosti bakterií rodu *Bifidobacterium*, což je další důvod, proč jsou pro spotřebitele velmi atraktivními produkty (Vilela, 2019).

#### 3.1 Mikrobiologie kombuchy

Pro přípravu nápoje kombucha je kromě černého/zeleného čaje a sacharózy nezbytné použít kulturu mikroorganismů, která je podstatou tohoto produktu. Jedná se o symbiotickou kulturu bakterií a kvasinek (SCOBY), která tvoří biofilm na povrchu média. Jiná označení pro tento biofilm mohou být např. zázračná houba, Japonská houba, Mandžuská houba a jiné. Termín Scoby poprvé použil Leo Porzio v 90. letech 20. století (Soares et al., 2021).

Na začátku fermentace jsou aktivní především osmotolerantní kvasinky rodu *Zygosaccharomyces* sp. a druhy *Schizosaccharomyces pombe* a *Torulasporea delbrueckii*. Následně dojde k rozvoji acidotolerantních kvasinek, především *Brettanomyces* sp. a *Candida stellata* (Soares et al., 2021). Přítomny jsou také bakterie octového kvašení, především druhy bakterií *Acetobacter aceti*, *Acetobacter xylinum*, *Acetobacter pasteurianus*, *Gluconobacter oxydans* a kvasinky *Zygosaccharomyces kombuchaensis* (Kapp et al., 2019). Dále byly detekovány také bakterie mléčného kvašení, především pak druhy *Lactobacillus fermentum*, *Oenococcus oeni*, (Soares et al., 2021). Fermentace probíhá zpravidla 7-10 dní při pokojové teplotě do 30 °C (Torán-Pereg et al., 2021).

#### 3.2 Mikrobiologie vodního kefiru

K výrobě vodního kefiru je zapotřebí kromě sacharózy a sušeného či čerstvého ovoce, případně ovocné/zeleninové šťávy, kultura mikroorganismů, které jsou do nápoje přidávány ve formě kefirových zrn společně s matečným zákysem. Kulturu lze také zakoupit v lyofilizované podobě (Lynch et al., 2021).

Zrna vodního kefiru jsou tvořena především bakteriemi mléčného kvašení, bakteriemi octového kvašení a kvasinkami. Konkrétně se jedná o druhy bakterií mléčného a octového kvašení *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Leuconostoc citreum*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus kefir*, *Lactobacillus parabuchneri*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Gluconobacter japonicus*, *Gluconobacter oxydans* a *Acetobacter lovaniensis* (Lynch et al., 2021; Fiorda et al., 2017).

Mezi hlavní zástupce kvasinek patří *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida* a *Kluyveromyces lactis* (Fiorda et al., 2017). Zrna jsou téměř průhledná a na jejich povrchu je vrstva exopolysacharidů, která je vytvářena právě přítomnými skupinami mikroorganismů (Lynch et al., 2021; Fiorda et al., 2017). Fermentace probíhá zpravidla 4 – 8 dní při teplotě v rozmezí 21 – 30 °C (Lynch et al., 2021).

## II. PRAKTICKÁ ČÁST

#### 4 CÍL PRÁCE

Cílem práce bylo zjistit vybrané parametry netradičních fermentovaných nápojů, kombuchy a vodního kefiru. Přínos této práce spočívá zvláště v aplikaci Scobu a Tibi keřirových zrn do zeleninových šťáv, kterým doposud v dostupné literatuře nebyl v souvislosti se zmíněnými symbiotickými kulturami věnován prostor. Výstupem práce je tedy i výroba „prototypů“ nových výrobků.

Práce byla následně zaměřena na tyto dílčí cíle:

- Vyrobit modelové vzorky kombuchy ze tří druhů nápojů, černého čaje, šťávy z kysaného zelí a ze zeleninové šťávy (dále také označení „vícedruhová zeleninová šťáva“) o počáteční koncentraci sacharózy 9 % (w/v) u všech tří nápojů.
- Vyrobit modelové vzorky vodního kefiru rovněž ze tří druhů nápojů, a sice 100% jablečné šťávy, šťávy z kysaného zelí a ze zeleninové šťávy o počáteční koncentraci sacharózy 9 % (w/v) u všech tří nápojů.
- U vzorků nápoje kombucha provést základní chemické analýzy – stanovení pH, TDS (Total Dissolved Solids, dále jen TDS), refraktometrické sušiny v průběhu desetidenní fermentace.
- U vzorků nápoje vodní kefir provést rovněž základní chemické analýzy – stanovení pH, TDS, refraktometrické sušiny v průběhu čtyřdenní fermentace
- Pomocí přístroje Alcolyzer Anton Paar stanovit v totožných časových intervalech parametry jako obsah etanolu, hustota, zdánlivý a reálný extrakt, zdánlivý a reálný stupeň fermentace a energetická hodnota.
- Ve stejných časových intervalech provést měření reologických vlastností vzorků nápojů, a sice zdánlivé viskozity a smykového napětí (meze toku).
- Ve stejných časových intervalech provést měření barvy pomocí systému CieLab a měření aktivity vody rovněž ve stejných časových intervalech, u všech vzorků.
- Naměřené výsledky analýz vyhodnotit, zpracovat do vhodných grafů a tabulek a vyvodit závěr.

## 5 METODIKA PRÁCE

V rámci metodiky práce jsou sepsány všechny suroviny a přístroje, které byly použity pro výrobu vzorků a následné analýzy za daných laboratorních podmínek. Dále jsou popsány principy a postupy jednotlivých měření.

### 5.1 Materiál a metody

#### 5.1.1 Suroviny pro výrobu nápoje kombucha a vodního kefiru

Černý čaj (Assam Orangajuli SFTGFOP1, země původu: Indie; distributor Oxalis, spol. s r. o., ČR)

Jablečná šťáva (Linea Nivnice, a. s., ČR) - Složení: Jablečná šťáva, antioxidant: kyselina askorbová. Podíl ovocné složky: 100 %. Pasterováno.

Šťáva z kysaného zelí (Země původu: Německo; distributor pro ČR: DM drogerie markt s.r.o., České Budějovice, ČR) - Složení: Šťáva z kysaného zelí\*, mořská sůl. Zkvašeno kyselinou mléčnou. \*z biodynamického zemědělství.

Zeleninová šťáva (Země původu: Německo; distributor pro ČR: DM drogerie markt s.r.o., České Budějovice, ČR) - Složení: 67 % rajčatová šťáva\*, 13 % mrkvová šťáva\*, 6 % šťáva z kysaného zelí\*, 4 % celerová šťáva (alergen)\*, 4 % šťáva z červené řepy\*, 2 % okurková šťáva\*, 2 % paprikové pyré\*, šťáva z cibule\*, šťáva z fazolí\*, šťáva z kopru\*, bylinková mořská sůl\* (mořská sůl, pórek\*, pískavice modrá\*, tymián\*, kerblík\*, libeček\*, koriandr\*, kopr\*, bazalka\*, jalovec\*, vavřín\*, brutnák lékařský\*). Zkvašeno kyselinou mléčnou. \*z biologického zemědělství

Sacharóza – krystalový bílý řepný cukr (Cukrovar Vrbátky, ČR)

Kombucha násada (Stevikom s. r. o., Praha, ČR), celulósový fungus v matečné suspenzi

Lyofilizovaná kultura vodního kefiru (UNIBIOM s.r.o., Břeclav, ČR)

#### 5.1.2 Chemické látky a přípravky

MRS Agar (HiMedia Laboratories, Indie)

M17 Agar (HiMedia Laboratories, Indie)

Mannitol Salt Agar (HiMedia Laboratories, Indie)

Endo Agar Base (HiMedia Laboratories, Indie)

Acetobacter Agar Glucose (HiMedia Laboratories, Indie)

Reinforced Clostridial Agar (HiMedia Laboratories, Indie)

Slanetz-Bartley Agar (HiMedia Laboratories, Indie)

Sabouraud Dextrose Agar (HiMedia Laboratories, Indie)

Sterilní fyziologický roztok

Etanol absolutní p. a. (Penta s.r.o., ČR)

### 5.1.3 Přístroje a pomůcky

Váhy Kern PFB 1200-2 (Kern & Sohn GmbH, Německo)

Centrifuga EBA 21 (Hettich, Německo)

pH meter Foodcare HI 99161 (Hanna Instruments, USA)

Digital refractometer Kern ORF 45BE (Kern & Sohn GmbH, Německo)

Konduktometr CyberScan CON 110 (Eutech Instruments, Thermo Scientific, USA)

Alcolyzer Anton Paar (Anton Paar GmbH, Rakousko)

HAAKE RheoStress 1 (Thermo Fisher Scientific, USA)

Water Activity Meter (AquaLab, Decagon Devices, Inc., USA)

Spektrofotometr Ultrascan PRO (HunterLab, USA)

Eddy Jet 2W – Spiral Plater (Neutec Group, Inc., USA)

Termostat blokový Bio TDB-100 (Biosan, USA)

SphereFlash® - Automatic Colony Counter (IUL Instruments, Španělsko)

Vortex V-1 plus (Biosan, USA)

Inkubátor mikrobiologický (Mettler, Německo)

Autokláv 135 S, H+P VARIOKLAV (H+P Labortechnik AG, Německo)

Box laminární BIO IIA, typ Biohazard (TELSTAR, ČR)

Sklenice typu OMNIO 3,75

Plastové zkumavky s víčky o objemu 50 ml a 15 ml

## 5.2 Výroba modelových vzorků kombuchy a vodního kefiru

Bylo vyrobeno celkem šest modelových vzorků (prototypů výrobků), tři vzorky kombuchy a tři vzorky vodního kefiru. U každého nápoje bylo jedno ze tří prostředí typickým prostředím, do kterého se dané symbiotické kultury aplikují nejčastěji. U kombuchy se jednalo o černý čaj a u vodního kefiru o jablečnou šťávu. Další dvě média byla společná



pro oba nápoje, kdy se jednalo o šťávu z kvašeného zelí a o vícedruhovou zeleninovou šťávu.

### 5.2.1 Surovinová skladba modelových vzorků kombuchy a vodního kefiru

Výchozí koncentrace sacharózy byla u všech médií (čaj, ovocná a zeleninové šťávy) a pro oba fermentované nápoje (kombucha i vodní kefir) nastavena na 9 % (w/w).

Kombucha

- Vzorek K\_X\_C: Extrakt čaje 91,0 % (w/w), sacharóza 9,0 % (w/w), kdy na toto množství bylo přidáno 4,0 % (w/w) SCOBY
- Vzorek K\_X\_Z: Zelná šťáva 91,8 % (w/w), sacharóza 8,2 % (w/w), kdy na toto množství bylo přidáno 4 % (w/w) SCOBY
- Vzorek K\_X\_M: Vícedruhová zeleninová šťáva 92,7 % (w/w), sacharóza 7,3 % (w/w), kdy na toto množství bylo přidáno 4 % SCOBY

Místo písmene „X“ je v označení vzorku uvedeno číslo odběru. Celkem bylo v případě kombuchy provedeno 7 odběrů v časech 0 h (1. odběr, tedy např. K\_1\_C), 24 h (2. odběr), 48 h (3. odběr), 72 h (4. odběr), 96 h (5. odběr), 168 h (6. odběr) a 216 h (7. odběr) fermentace.

Vodní kefir

- Vzorek V\_X\_J: Jablečná 100% šťáva bez úprav, kdy na toto množství bylo použito 17 % (w/w) matečného zákysu vodního kefiru
- Vzorek V\_X\_Z: Zelná šťáva 91,8 % (w/w), sacharóza 8,2 % (w/w), kdy na toto množství bylo použito 17 % (w/w) matečného zákysu vodního kefiru
- Vzorek V\_X\_M: Vícedruhová zeleninová šťáva 92,7 % (w/w), sacharóza 7,3 % (w/w), kdy na toto množství bylo použito 17 % (w/w) matečného zákysu vodního kefiru

Matečný zákys vodního kefiru byl připraven 24hodinovou kultivací lyofilizované kultury v prostředí shodném s modelovými vzorky.

Místo písmene „X“ je v označení vzorku uvedeno číslo odběru. Celkem byly v případě vodního kefiru provedeny 4 odběry v časech 0 h (1. odběr, tedy např. V\_1\_J), 24 h (2. odběr), 48 h (3. odběr) a 72 h (4. odběr) fermentace.

## 5.2.2 Postup výroby modelových vzorků kombuchy a vodního kefiru

### Příprava Kombuchy

Skleněné nádoby pro kultivaci SCOBY, resp. pro výrobu kombuchy, byly sterilní. Extrakt černého čaje byl připraven smísením 0,6 % (w/w) navážky černého čaje s pitnou vodou, která vřela 10 minut. Infuze trvala rovněž 10 minut. Následně byl čaj přefiltrován do sterilní skleněné nádoby a byla u něj provedena úprava koncentrace zkvasitelného cukru. Za sterilních podmínek byl standardizován i obsah zkvasitelného cukru v zeleninových šťávách. Do takto připravených základů bylo přidáno SCOBY. Fermentace proběhla v místnosti s řízenou teplotou ( $25 \pm 2$  °C) a bez přístupu světla. Kombucha byla kultivována po dobu 216 hodin, kdy byly po dobu kultivace uskutečňovány zmíněné odběry v těchto časech: 0 h, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h, 168 h a 216 h.

### Příprava vodního kefiru

Byl připraven matečný zákys, kdy do upravených šťáv o hmotnosti 500 g bylo přidáno 5 g lyofilizované kultury. Kultivace byla realizována při  $25 \pm 2$  °C po dobu 24 h. Po 24 h byl matečný zákys inokulován do finálního objemu upravených šťáv. Fermentace proběhla v místnosti s řízenou teplotou ( $25 \pm 2$  °C) Šťávy byly ponechány kultivaci při pokojové teplotě (při  $25 \pm 2$  °C) a bez přístupu světla po dobu 72 hodin, kdy byly realizovány odběry v těchto časových intervalech: 0 h, 24 h, 48 h a 72 h.

## 5.3 Fyzikálně-chemická analýza

Během fermentace vzorků byla v každý odběrový čas provedena základní fyzikálně - chemická analýza, v rámci které bylo stanoveno pH, TDS (Total Dissolved Solids, dále jen TDS), refraktometrická sušina a pomocí přístroje Alcoalyzer Anton Paar byly stanoveny parametry jako obsah etanolu a hustota, na základě kterých software přístroje vypočetl další parametry, jako jsou zdánlivý a reálný extrakt, zdánlivý a reálný stupeň fermentace, kalorická hodnota. Dále byl proveden odběr vzorků pro mikrobiologický rozbor, pro stanovení viskozity, barvy a aktivity vody.

### 5.3.1 Stanovení pH

Hodnoty pH byly měřeny pomocí vpichového pH metru (pH meter, HI 99161, Foodcare, Hanna Instruments, USA) při laboratorní teplotě  $25 \pm 2$  °C. Měření bylo provedeno před odstředěním vzorků a u každého vzorku bylo provedeno třikrát ( $n = 3$ ).

### 5.3.2 Stanovení TDS

Stanovení hodnot TDS bylo provedeno pomocí elektrody konduktometru (CyberScan CON 110, Eutech Instruments, Thermo Scientific, USA). Měření bylo provedeno před odstředěním vzorku a u každého vzorku bylo provedeno třikrát ( $n=3$ ).

### 5.3.3 Stanovení refraktometrické sušiny

Měření refraktometrické sušiny bylo provedeno pomocí digitálního refraktometru (Digital refractometer Kern ORF 45BE, Kern & Sohn GmbH, Německo). Vzorky byly před měřením odstředěny na centrifuze při 6000 ot./min po dobu 10 minut. Následně bylo pomocí kapátka vždy dávkováno určité množství daného vzorku a změřena refraktometrická sušina. Měření bylo opět provedeno třikrát ( $n=3$ ) u každého vzorku.

### 5.3.4 Stanovení hustoty a obsahu etanolu

Pomocí přístroje Anton Paar Density Meter DMA 4500 M a konkrétně Alcolyzer Beer ME modulu byly měřeny parametry jako obsah etanolu a hustota. Přístroj měří na principu selektivní absorpční metody, blízké infračervené spektroskopie (NIR). Zdánlivý a reálný extrakt a zdánlivý a reálný stupeň fermentace a energetická hodnota byly dopočítány pomocí softwaru přístroje. Vzorky byly před stanovením centrifugovány (odplyněny) při 6000 otáčkách po dobu 10 minut. Měření bylo provedeno třikrát ( $n = 3$ ).

## 5.4 Reologická analýza

V rámci reologické analýzy byly sledovány dvě veličiny, a sice smykové napětí (mez toku) a viskozita modelových vzorků. Pro měření byl použit přístroj HAAKE RheoStress 1 (Thermo Fisher Scientific, USA) a zvolená geometrie byla válec-válec, vnitřní průměr válce byl 34 mm, šterbina 7,2 mm. Objem vzorku pro každé měření byl 40 ml a všechna měření byla provedena při teplotě  $20 \pm 1$  °C. Měření bylo provedeno dvakrát ( $n = 2$ ).

Tyto podmínky byly použity pro všechny modelové vzorky. Proces měření byl proveden v rámci 2 cyklů, tj. jeden vzestupný (od 0 do  $100 \text{ s}^{-1}$ ) za 250 s a následný druhý sestupný cyklus (od  $100$  do  $0 \text{ s}^{-1}$ ) rovněž během 250 s. Změny byly pozorovány z hlediska zdánlivé viskozity a smykového napětí. K popisu reologického chování modelových vzorků byl využit model Oswald de Waele, který slouží zejména pro látky pseudoplastické a dilatantní. Označován bývá také jako model Power Law nebo model mocninový.

K tomuto modelu se vztahuje rovnice:

$$\tau = K * \gamma^n$$

Kde:  $\tau$  ... smykové napětí [Pa]

$K$  ... součinitel konzistence [ $\text{Pa}\cdot\text{s}^n$ ]

$n$  ... index tokového chování ( $n > 1$  – látka dilatantní,  $n < 1$  – látka pseudoplastická)

[-]

$\gamma$  ... smyková rychlost [ $\text{s}^{-1}$ ]

## 5.5 Měření barvy

Měření barvy bylo provedeno pomocí přístroje spektrofotometru Ultrascan PRO (HunterLab, USA) v trojrozměrném prostoru CIE  $L^*a^*b^*$ . Vzorky byly proměřeny vždy třikrát ( $n = 3$ ).

Ke stanovení barvy vzorků je poměrně často využíván barevný prostor CIE  $L^*a^*b^*$ . Souřadnice  $L^*a^*b^*$  charakterizují barvu jako bod v trojrozměrném prostoru, kdy  $L^*$  je světlost barvy (hodnoty 0-černá barva až 100-bílá barva),  $a^*$  popisuje rozsah barev od zelené ( $-a^*$ ) po červenou ( $+a^*$ ) a  $b^*$  určuje rozsah barev od modré ( $-b^*$ ) po žlutou ( $+b^*$ ). Oblasti  $a^*$  a  $b^*$  jsou v horizontální rovině,  $L^*$  pak v rovině vertikální.

## 5.6 Stanovení aktivity vody

Stanovení aktivity vody bylo provedeno pomocí přístroje Water Activity Meter (AquaLab, Decagon Devices, Inc., USA). Vzorek byl vložen do testovací nádoby. Měření byla provedena při teplotě  $24 \pm 1$  °C. Měření bylo provedeno vždy třikrát ( $n = 3$ ).

## 5.7 Mikrobiologický rozbor

Ve výše zmíněných časových intervalech byl proveden mikrobiologický rozbor vzorků kombuchy a vodního kefiru. Byla použita metoda roztěru a objem inokulovaného vzorku byl 50  $\mu\text{l}$ . Inokulace byla provedena pomocí přístroje Eddy Jet 2W – Spiral Plater (Neutec Group, Inc., USA). Pro rozbor byla použita následující živná média:

### **Mannitol salt agar (dále jen MSA)**

Jedná se o často využívané selektivní růstové médium, které slouží pro stanovení patogenních zástupců rodu *Staphylococcus*. Kultivace probíhala v termostatu při 37 °C

aerobně, jelikož se jedná o mezofilní, fakultativně anaerobní a aerobní rod bakterií. Kultivace probíhala po dobu 24 hodin. V případě přítomnosti bakterií rodu *Staphylococcus*, které jsou schopny fermentovat obsažený D-mannitol, jsou vytvořeny žluté kolonie.

**Tabulka 1.** Složení MSA média.

Látka	Množství (g/l)
Proteózový pepton	10
Hovězí extrakt	1
Chlorid sodný	75
D-mannitol	10
Fenolová červeň	0,025
Agar	15

Bylo naváženo 111,0 g přípravku do 1000 ml destilované vody a tato směs byla zahřívána do úplného rozpuštění. Následně došlo ke sterilaci v autoklávu při teplotě 121 °C po dobu 15 minut. Poté byla směs ochlazená na teplotu 45 – 50 °C. Před naléváním na Petriho misky došlo k důkladnému promíchání. Konečné pH (při 25 °C) bylo  $7,4 \pm 0,2$ .

#### **Medium Slanetz-Bartley (dále jen SB)**

Toto médium slouží pro detekci a stanovení enterokoků. Kultivace probíhala v termostatu při 37 °C aerobně po dobu 24 hodin. Rod *Enterococcus* je skupinou bakterií mléčného kvašení, které jsou fakultativně anaerobní, což znamená, že mohou žít v prostředí, kde je koncentrace kyslíku nízká, i v prostředí, kde je koncentrace kyslíku vyšší. Tudíž zvolené podmínky byly pro růst tohoto rodu bakterií vhodné. Vytvářejí červené kolonie.

Tabulka 2. Složení SB média.

Látka	Množství (g/l)
Tryptóza	20
Kvasničný extrakt	5
Dextróza	2
Hydrogenfosforečnan (di)draselný	4
Azid sodný	0,4
Trifenyltetrazolium chlorid	0,1
Agar	15

Bylo naváženo 46,5 g přípravku do 1000 ml destilované vody a opatrně zahříváno při důkladném promíchávání do úplného rozpuštění. Nebyla provedena sterilace v autoklávu. Bylo třeba směs ochladit ve vodní lázni na 50 °C. Konečné pH (při 25 °C) je  $7,2 \pm 0,2$ .

#### **Reinforced clostridial broth (dále jen RCB)**

Jedná se o médium pro stanovení anaerobních sporulujících bakterií. Kultivace probíhala v termostatu při 30 °C anaerobně po dobu 24 hodin. Anaerobní podmínky byly zvoleny z důvodu fyziologických vlastností mikroorganismů, které byly na tomto médiu kultivovány, a sice se jednalo o anaerobní bakterie rodu *Clostridium*. Bakterie vytvářejí světlé, nažloutlé kolonie.

Tabulka 3. Složení RCB média.

Látka	Množství (g/l)
Enzymatický hydrolyzát kaseinu	10
Hovězí extrakt	10
Kvasničný extrakt	3
Dextróza	5
Chlorid sodný	5
Octan sodný	3
Škrob	1
L-cystein hydrochlorid	0,5
Agar	0,5

Pro přípravu živného média bylo naváženo 38,0 g přípravku do 1000 ml destilované vody a tato směs byla zahřívána až do úplného rozpuštění. Následně došlo k rozplnění do baněk a tyto byly sterilovány v autoklávu při teplotě 121 °C po dobu 15 minut. Konečné pH bylo (při 25 °C)  $6,8 \pm 0,2$ .

#### **M17 Broth (dále jen M17)**

Médium M17 je určeno pro stanovení mléčných streptokoků (*Streptococcus lactis*, *Streptococcus cremoris*, *Streptococcus diacetylactis*). Na tomto médiu rostou také laktokoky. Tedy lze případný nárůst komentovat jako nárůst mléčných koků. Kultivace probíhala v termostatu při 30 °C aerobně po dobu 48 hodin. Mléčné koky vytvářejí bílé diskovité kolonie.

Tabulka 4. Složení M17 broth média.

Látka	Množství (g/l)
Enzymatický hydrolyzát kaseinu	2,5
Masový pepton	2,5
Sójový pepton	5
Kvasničný extrakt	2,5
Hovězí extrakt	5
Laktóza	5
Kyselina askorbová	0,5
Síran hořečnatý	0,25
Beta-glycerofosforečnan (di)sodný	19

Bylo naváženo 42,25 g přípravku a 15 g agaru do 1000 ml destilované vody a zahříváno až do úplného rozpuštění média. Následně byla provedena sterilace v autoklávu při teplotě 121 °C po dobu 15 minut. Konečné pH bylo (při 25 °C)  $7,1 \pm 0,1$ .

#### Acetobacter Agar (dále jen AA)

Živné médium AA je určeno pro kultivaci glukóza pozitivních druhů rodu *Acetobacter*. Kultivace probíhala v termostatu při 30 °C aerobně po dobu 48 hodin, jelikož byl sledován celkový počet bakterií octového kvašení, konkrétně z rodu *Acetobacter*, kdy se jedná o aerobní mikroorganismy.

Tabulka 5. Složení AA média.

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



Bylo připraveno 38,0 g přípravku do 1000 ml destilované vody a zahříváno do bodu varu. Následně byla směs rozplněna do zkumavek tak, aby byl uhlíčitán vápenatý rovnoměrně zastoupen v celém médiu. Poté byla provedena sterilace v autoklávu při 121 °C po dobu 15 minut. Obsah zkumavek byl promíchán a rychle zchlazen v šikmé poloze tak, aby byl uhlíčitán vápenatý opět rovnoměrně rozptýlen. Konečné pH (při 25 °C) bylo  $7,4 \pm 0,2$ .

### **Endo agar (dále jen E)**

Médium E je určeno pro detekci a rozlišení laktóza-pozitivních a laktóza-negativních koliformních bakterií. Kultivace probíhala v termostatu při 37 °C aerobně po dobu 24 hodin. V případě laktóza-pozitivních mikroorganismů vznikají tmavě růžové až středně červené kolonie s lesklým zelenošedým zabarvením média. V případě laktóza-negativních mikroorganismů vznikají naopak světle růžové kolonie bez zabarvení média.

**Tabulka 6.** Složení Endo agaru.

<b>Látka</b>	<b>Množství (g/l)</b>
Masový pepton	10
Laktóza	10
Siřičitan sodný	2,5
Hydrogenfosforečnan (di)draselný	3,5
Bazický fuchsin	0,5
Agar	15

Bylo naváženo 41,5 g přípravku do 1000 ml destilované vody a tato směs byla zahřívána do úplného rozpuštění. Následně došlo ke sterilizaci v autoklávu při teplotě 121 °C po dobu 15 minut. Před naléváním na Petriho misky bylo připravené médium důkladně promícháno. Konečné pH (při 25 °C) bylo  $7,5 \pm 0,2$ .

### **Sabouraud Dextrose Agar (dále jen SAB)**

SAB je živné médium určené pro kultivaci kvasinek, plísní a acidotolerantních bakterií. Kultivace probíhala při pokojové teplotě, tedy při 25 °C aerobně po dobu 48 hodin. Vznikají smetanově bílé kolonie mikroorganismů.

Tabulka 7. Složení SAB média

Látka	Množství (g/l)
Mykologický pepton	10
Dextróza	40
Agar	15

Bylo naváženo 65,0 g média do 1000 ml destilované vody a zahříváno do úplného rozpuštění. Následně došlo ke sterilizaci v autoklávu při 121 °C po dobu 15 minut. Konečné pH (při 25 °C) bylo  $5,6 \pm 0,2$ .

#### ***Lactobacillus* MRS Broth (MRS Broth; dále jen MRS)**

MRS je živné médium určené pro kultivaci druhů rodu *Lactobacillus*. Kultivace probíhala v termostatu při 30 °C anaerobně po dobu 48 hodin. Přítomné bakterie rodu *Lactobacillus* vytvářejí kolonie bílé až krémové barvy.

Tabulka 8. Složení MRS broth média.

Látka	Množství (g/l)
Proteózový pepton	10,00
Hovězí extrakt	10,00
Kvasničný extrakt	5,00
Dextróza	20,00
Polysorbát 80	1,00
Citran amonný	2,00
Octan sodný	5,00
Síran hořečnatý	0,10
Síran manganatý	0,05
Hydrogenfosforečnan (di)draselný	2,00

Bylo naváženo 55,15 média a 15 g agaru do 1000 ml destilované vody a v této podobě byla směs zahřívána do úplného rozpuštění. Následně bylo médium rozplněno do zkumavek

(lze i do baněk) a sterilizováno pomocí autoklávu při 121 °C po dobu 15 minut. Konečné pH (při 25 °C)  $6,5 \pm 0,2$ .

U živných médií M17, MRS, AA a SAB bylo vždy provedeno desítkové ředění  $10^{-3}$  a  $10^{-5}$ . U zbylých médií, SB, E, MSA a RCB byly inokulovány neředěné vzorky, tedy  $10^0$ . Následný výpočet CFU/ml byl proveden pomocí softwaru přístroje SphereFlash® (Automatic Colony Counter, IUL Instruments, Španělsko). Nárůst byl detekován pouze u médií M17, MRS, AA a SAB. Pro výpočet CFU/ml bylo tedy využito průměru ze dvou ředění.

## 6 VÝSLEDKY A DISKUZE

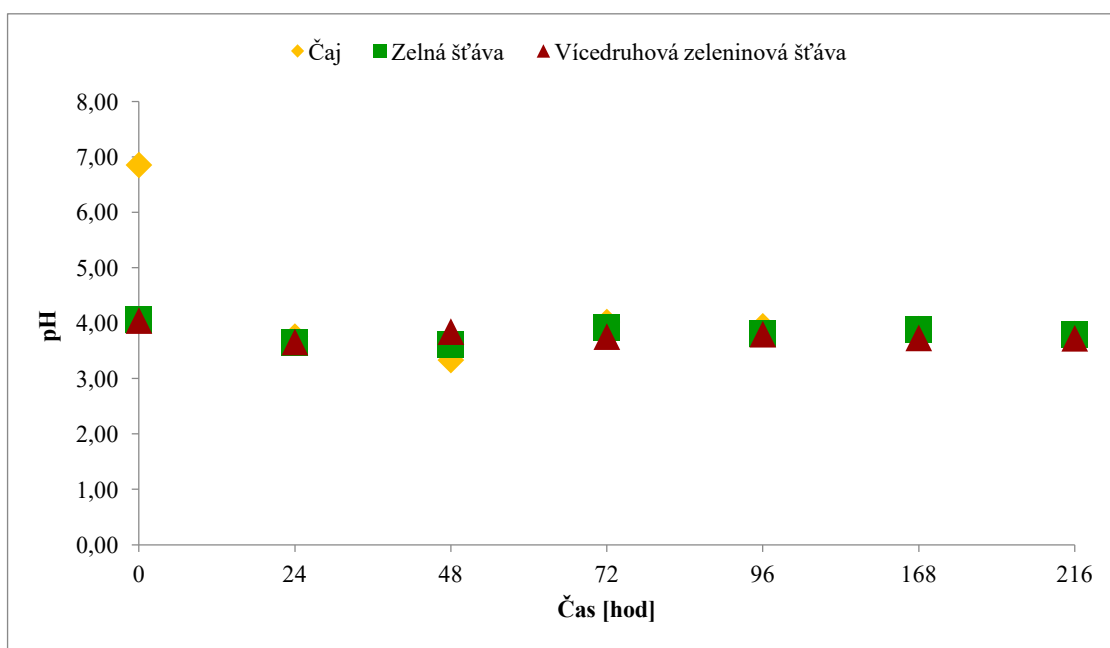
V rámci této diplomové práce byly vyrobeny dvě řady vzorků fermentovaných nápojů, kombuchy a vodního kefiru. V obou případech byly nápoje vyrobeny ze tří základů (tří nápojů), přičemž jeden ze tří byl vždy tradiční (čaj pro kombuchu, jablečná šťáva pro vodní kefir) a zbylá dvě prostředí byla společná (zelná šťáva, vícedruhová zeleninová šťáva). Prostor zelninových šťáv pro kultivaci zrn vodního kefiru a SCOBY bylo vybráno proto, že žádná doposud dostupná studie tato prostředí nezkoumala. U všech vzorků byla v průběhu fermentace provedena měření a mikrobiologický rozbor (kapitoly 5.3, 5.5 – 5.7). Ve stejných časových intervalech byly provedeny odběry pro reologickou analýzu (kapitola 5.4).

### 6.1 Vyhodnocení fyzikálně – chemické analýzy

U všech vzorků byla provedena v průběhu fermentace fyzikálně-chemická analýza.

#### 6.1.1 Výsledky stanovení pH

Vzorky kombuchy byly v časových intervalech 0 h, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h, 168 h a 216 h podrobeny stanovení pH, TDS a refraktometrické sušiny. Naměřené hodnoty pH u všech tří vzorků nápoje kombucha jsou uvedeny na Obrázku 5.



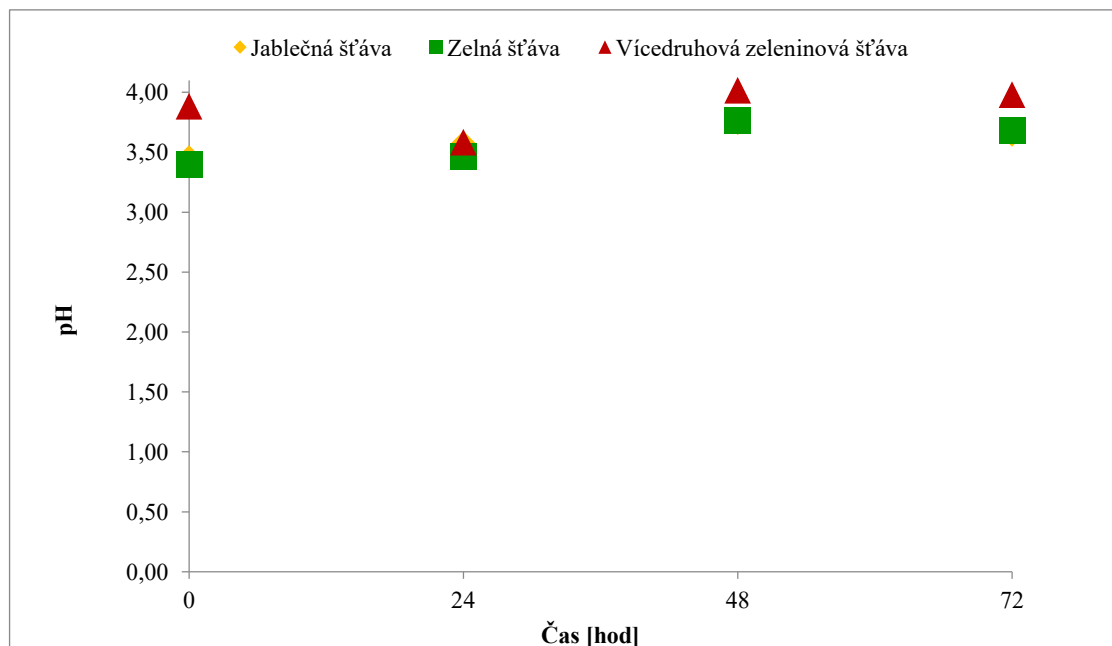
**Obrázek 5.** Změna pH během fermentace kombuchy z černého čaje a ze zeleninových šťáv; směrodatné odchylky jsou v rozsahu 0,00 – 0,03 a nejsou znázorněny v grafu.

Z grafu (Obr. 5) jasně vyplývá, že k výraznějšímu snížení pH během fermentace došlo pouze v černém čaji. K této změně došlo ihned první dny kultivace. V následujících dnech byla změna hodnot pH pouze nepatrná. U zbylých dvou médií, tedy zelné šťávy a vícedruhovému zeleninové šťávy, se hodnoty pH příliš neměnily. V případě kombuchy z černého čaje byla naměřena nejvyšší hodnota pH 6,85 a následně došlo k významnému poklesu na hodnoty v rozmezí 3,33 – 4,02. Dle studie Neffe-Skoncińska et al. (2017) byly v případě kombuchy v černém čaji naměřeny hodnoty pH v rozmezí 2,77 – 3,07 v průběhu 10denní fermentace. Souhlasně s námi došlo ke značnému snížení pH z důvodu fermentace a tvorby kyselých produktů. Rozdíly mohou být způsobeny odlišnými podmínkami fermentace a především pak v recepturních množstvích vstupních surovin. Průběh fermentace však měl podobné charakteristiky.

V případě kombuchy ze zelné šťávy bylo rozmezí hodnot pH 3,61 – 4,06. Z grafu (Obr. 5) je patrné, že v průběhu 216 hodin fermentace nedošlo k výrazné změně pH tohoto nápoje. Podobný průběh změny hodnot pH byl rovněž u kombuchy z vícedruhovému zeleninové šťávy, kdy rozmezí naměřených hodnot bylo 3,66 – 4,06.

Dle studie Ulusoy a Tamer (2019), kdy byly sledovány změny hodnot pH v průběhu fermentace kombuchy z čaje obohaceném různými druhy ovoce a zeleniny (konkrétně se jednalo o koncentráty šťáv z černé mrkve, z bobkovišni, z trnky obecné a z červených malin), došlo v případě zeleného čaje k poklesu hodnot pH během 24 hodin z hodnoty 7,2 na 3,97 a následný pokles během desetidenního skladování byl spíše pozvolný. To velmi koresponduje s našimi naměřenými hodnotami a průběhem změn pH v případě vzorku kombuchy v černém čaji. U vzorků s přísady ovocných a zeleninového extraktu šťáv byl pozorován pokles pH spíše mírný, což je také velmi podobné průběhu zjištěném v rámci této práce (Ulusoy, Tamer, 2019).

V případě vzorků vodního kefiru byly tyto podrobeny stanovení pH, TDS a refraktometrické sušiny v časových intervalech 0 h, 24 h, 48 h a 72 h fermentace. Naměřené hodnoty pH jsou znázorněny na následujícím grafu (Obrázek 6.).



**Obrázek 6.** Změna pH v době fermentace v nápoji vodní kefir z jablečné šťávy a ze zeleninových šťáv; směrodatné odchylky jsou v rozsahu 0,00 – 0,04 a nejsou znázorněny v grafu.

V případě vodního kefiru z jablečné šťávy pH nabývalo hodnot v rozmezí 3,45 – 3,75, přičemž nejnižší hodnota (3,45) byla naměřena právě první den měření, tedy v čase 0 h, a nejvyšší hodnota pH (3,75) po 48 hodinách fermentace. U vzorku vodního kefiru ze zelné šťávy byla změna pH během fermentace velmi podobná. Rozmezí hodnot bylo 3,40 – 3,76. U vzorku vodního kefiru z vícedruhové zeleninové šťávy rovněž nebyla detekována významná změna pH v průběhu fermentace. Rozmezí hodnot bylo v tomto případě 3,59 – 4,02. U těchto nápojů nedošlo tedy během fermentace k významným změnám. Ve studii Laureys, de Vuyst (2017) byl v případě vodního kefiru, připraveného z tradičních surovin (vody, sušeného a čerstvého ovoce, sacharózy a zrn vodního kefiru) pozorován výrazný pokles hodnot pH v průběhu fermentace, a sice ze 4,82 na hodnoty 3,34 – 3,47. Byly připraveny tři vzorky vodního kefiru s rozdílným množstvím inokula ( $90, 100$  a  $250 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ ), sacharózy ( $110, 90$  a  $60 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ ) a druhu ovoce (sušené figy a meruňky, sušené figy a rozinky a pouze sušené figy). Rovněž byla rozdílná teplota ( $15, 19$  a  $20 \text{ }^\circ\text{C}$ ) a doba fermentace, která trvala 192 h. Byl pozorován výrazný pokles hodnot pH v průběhu fermentace ze 4,82 na hodnoty 3,34 – 3,47. Tento výrazný rozdíl lze přisuzovat tomu, že byla použita vyšší množství inokula než v případě naší práce a také tomu, že fermentace trvala významně déle (Laureys, de Vuys, 2017). V případě vzorku vodního kefiru z vícedruhové zeleninové šťávy bylo rozmezí hodnot pH 3,58 – 4,02. Jednalo se tedy rovněž

o velmi mírný pokles hodnot pH. K poklesu hodnoty pH došlo po prvních 24 h fermentace. Atalar (2019) se ve své studii zabývá výrobou vodního kefiru z lískooříškového nápoje. Z naměřených dat, uvedených ve studii, je patrný velmi podobný vývoj hodnot pH, kdy došlo k pouze mírnému poklesu během fermentačního procesu. Obecně lze říci, že u vodního kefiru ze zelné a z vícedruhové zeleninové šťávy byl pozorován velmi podobný průběh změny pH v čase jako je uváděno v dostupných zdrojích. I přesto však nelze s naprostou jistotou data porovnávat, jelikož jde o jiný substrát. Pro zeleninové šťávy (obecně a ani pro konkrétně použité v této práci) neexistují v dostupné literatuře poznatky, se kterými bychom mohli provést přesnější srovnání.

### 6.1.2 Výsledky stanovení TDS

Dalším sledovaným parametrem bylo TDS. Jedná se o celkový obsah rozpustných látek ve vodě. Výsledné hodnoty TDS v případě kombuchy jsou znázorněny v následující tabulce (Tabulka 9.).

**Tabulka 9.** Kombucha - TDS [ppm].

Vzorek	TDS [ppm]
K_1_C	45,20 ± 1,16
K_2_C	66,27 ± 0,31
K_3_C	64,37 ± 0,40
K_4_C	65,90 ± 0,50
K_5_C	76,53 ± 0,39
K_6_C	77,00 ± 0,36
K_7_C	78,33 ± 0,39
Vzorek	TDS [ppm]
K_1_Z	1550,00 ± 49,67
K_2_Z	1416,67 ± 4,71
K_3_Z	1536,67 ± 60,18
K_4_Z	1446,67 ± 26,25
K_5_Z	1523,33 ± 20,55
K_6_Z	1586,67 ± 4,71
K_7_Z	1640,00 ± 8,16
Vzorek	TDS [ppm]
K_1_M	1560,00 ± 21,60
K_2_M	1320,00 ± 8,16
K_3_M	1530,00 ± 35,59
K_4_M	1400,00 ± 8,16
K_5_M	1520,00 ± 16,33
K_6_M	1450,00 ± 8,16
K_7_M	1610,00 ± 8,16

V případě kombuchy z černého čaje byly naměřeny hodnoty v rozmezí 45,20 – 78,33 ppm. U vzorku kombuchy ze zelné šťávy byly naměřeny hodnoty TDS v intervalu 1416,67 – 1640,0 ppm. U třetího vzorku, kombuchy z vícedruhové zeleninové šťávy, byly naměřeny hodnoty v rozmezí 1320,0 – 1610,0 ppm.



Změny hodnot TDS jsou zapříčiněny měnícím se množstvím elektrolytů, minerálních látek, a také ve vodě rozpustných komponent, které mají za následek vodivost výrobku. Zpravidla během fermentace nápoje kombucha dochází k nárůstu minerálních látek. I přesto je však jejich množství spíše stopové (Sheng-Dun et al., 2013). V případě všech uvedených vzorků kombuchy nedocházelo v průběhu fermentace k významným změnám TDS. Toto tvrzení je v souladu se studií Sangita et al. (2008), kde se autoři zabývali stanovením aniontů některých minerálních látek, které byly nejčastěji v nápoji kombucha detekovány. U vzorků kombuchy ze zelné a z vícedruhé šťávy prozatím nebyl tento parametr v dostupných studiích zkoumán.

Získané hodnoty TDS v případě vzorků vodního kefiru jsou uvedeny v následující tabulce (Tabulka 10.).

**Tabulka 10.** Vodní kefir - TDS [ppm].

Vzorek	TDS [ppm]
V 1 J	223,67 ± 1,25
V 2 J	235,33 ± 11,90
V 3 J	213,33 ± 1,25
V 4 J	267,00 ± 2,45
Vzorek	TDS [ppm]
V 1 Z	1410,00 ± 8,16
V 2 Z	1436,67 ± 20,55
V 3 Z	1516,67 ± 9,43
V 4 Z	1586,67 ± 134,74
Vzorek	TDS [ppm]
V 1 M	1646,67 ± 81,79
V 2 M	1770,00 ± 35,59
V 3 M	1336,67 ± 17,00
V 4 M	1363,33 ± 12,47

U vodního kefiru z jablečné šťávy byly naměřeny hodnoty v rozmezí 213,33 – 267,00 ppm. V případě vodního kefiru, vyrobeného ze zelné šťávy, byly naměřeny hodnoty 1410 – 1586 ppm. U vzorku vodního kefiru, vyrobeného z vícedruhé zeleninové šťávy byly naměřeny hodnoty 1336,67 – 1770,0 ppm.

Změny hodnot TDS u vzorků vodního kefiru lze vyhodnotit jako zanedbatelné, jelikož se jedná o velmi malé jednotky (ppm z angl. „parts per million“ = „částice na jeden milion“, „miliontina v celkovém množství“). U vzorků vodního kefiru ze zelné šťávy a z

vícedruhov $\acute{e}$  zeleninov $\acute{e}$  šť $\acute{a}$ v $\acute{e}$  byly hodnoty TDS srovnateln $\acute{e}$  s hodnotami nam $\acute{e}$ řen $\acute{y}$ mi v p $\acute{r}$ ípade $\acute{s}$  kombuchy ve stejn $\acute{y}$ ch šť $\acute{a}$ v $\acute{a}$ ch.

Dwiloka et al. (2020) ve sv $\acute{e}$  studii rovn $\acute{e}$ ž sleduj $\acute{i}$  zmn $\acute{e}$ ny TDS v p $\acute{r}$ ípade $\acute{s}$  vodn $\acute{i}$ ho kefiru z kokosov $\acute{e}$  vody. B $\acute{e}$ hem 48hodinov $\acute{e}$  fermentace byl pozorov $\acute{a}$ n podobn $\acute{y}$  charakter zmn $\acute{e}$ ny hodnot TDS, tedy došlo k velmi zanedbateln $\acute{e}$  zmn $\acute{e}$ n $\acute{e}$  této veličiny.

### 6.1.3 Výsledky stanovení refraktometrické sušiny

Refraktometrická sušina (dále také RS) je veličina udávaná ve stupn $\acute{i}$ ch Brix $\acute{e}$ , kdy 1 °Brix odpov $\acute{i}$ dá 1 g sacharózy na 100 g roztoku. Získan $\acute{e}$  hodnoty refraktometrické sušiny v p $\acute{r}$ ípade $\acute{s}$  kombuchy jsou uvedeny v následuj $\acute{i}$ ci tabulce (Tabulka 11.).

**Tabulka 11.** Vývoj refraktometrické sušiny v nápoji kombucha ( $\text{g} \cdot 100 \text{g}^{-1}$ ).

Vzorek	RS [ $\text{g} \cdot 100 \text{g}^{-1}$ ]
K_1_C	8,90 ± 0,08
K_2_C	9,00 ± 0,00
K_3_C	9,03 ± 0,09
K_4_C	9,00 ± 0,00
K_5_C	8,73 ± 0,05
K_6_C	8,53 ± 0,05
K_7_C	8,73 ± 0,05
Vzorek	RS [ $\text{g} \cdot 100 \text{g}^{-1}$ ]
K_1_Z	10,60 ± 0,00
K_2_Z	11,57 ± 0,05
K_3_Z	11,53 ± 0,05
K_4_Z	11,43 ± 0,05
K_5_Z	11,30 ± 0,22
K_6_Z	11,23 ± 0,05
K_7_Z	11,30 ± 0,00
Vzorek	RS [ $\text{g} \cdot 100 \text{g}^{-1}$ ]
K_1_M	11,53 ± 0,05
K_2_M	10,13 ± 0,05
K_3_M	11,17 ± 0,09
K_4_M	11,67 ± 0,09
K_5_M	11,33 ± 0,05
K_6_M	11,43 ± 0,05
K_7_M	11,57 ± 0,05

Jak je z výše uvedené tabulky (Tabulka 11.) patrn $\acute{e}$ , hodnoty refraktometrické sušiny se u kombuchy z čern $\acute{e}$ ho čaje p $\acute{r}$ il $\acute{i}$ š nelišily. Byly nam $\acute{e}$ řeny hodnoty v rozmez $\acute{i}$  8,53 – 9,03  $\text{g} \cdot 100 \text{g}^{-1}$ . Původn $\acute{i}$  RS odpov $\acute{i}$ dá vstupn $\acute{i}$  koncentraci sacharózy. V následuj $\acute{i}$ ch dnech

došlo k využití zkvasitelných sacharidů přítomnými mikroorganismy, proto lze pozorovat mírný pokles RS. Obecně lze říci, že jde však o zanedbatelnou změnu pravděpodobně z důvodu produkce dalších rozpustných látek. Námi naměřené hodnoty korelují s výsledky studie Yıkmış a Tuğgüm (2019), ve které je uveden u kombuchy z černého čaje rovněž velmi nízký pokles refraktometrické sušiny v průběhu desetidenní fermentace, konkrétně z původní hodnoty  $8,00 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$  na  $7,97 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$  (Yıkmış a Tuğgüm, 2019).

U vzorku kombuchy ze zelné šťávy byly naměřeny hodnoty refraktometrické sušiny v rozmezí  $10,47 - 11,57 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ . V případě vzorku kombuchy z vícedruhovité zeleninové šťávy byly hodnoty RS v intervalu  $9,13 - 11,67 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ . Původní množství přidané sacharózy bylo vypočteno tak, aby byla koncentrace všech zkvasitelných cukrů 9 % (w/w), toto koresponduje pouze s původní hodnotou RS u kombuchy z černého čaje, který jako takový původně žádné zkvasitelné sacharidy neobsahuje. Původní refraktometrická sušina u zmíněných zeleninových šťáv byla vyšší z důvodu již přirozeného určitého obsahu zkvasitelných sacharidů a dalších rozpustných látek v surovině, po přidavku sacharózy pro úpravu hodnoty na stejnou koncentraci zkvasitelných cukrů pak logicky došlo k navýšení refraktometrické sušiny. Následně došlo k využití zkvasitelných cukrů přítomnými mikroorganismy v průběhu fermentace. Dle naměřených hodnot v tabulce (Tabulka 11.) lze říci, že změny v RS byly spíše minimální. Pravděpodobně z důvodu hydrolýzy jiných opticky aktivních látek, které zvyšují RS a které vznikly díky činnosti přítomných mikroorganismů, resp. jejich hydrolytických enzymů. Jedná se např. o organické kyseliny a aminokyseliny (Yıkmış a Tuğgüm, 2019).

V následující tabulce (Tabulka 12.) jsou znázorněny výsledné hodnoty RS v případě vzorků vodního kefiru.

**Tabulka 12.** Vývoj refraktometrické sušiny v nápoji vodní kefir ( $\text{g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ ).

Vzorek	RS [ $\text{g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ ]
V_1_J	$10,93 \pm 0,05$
V_2_J	$9,07 \pm 0,21$
V_3_J	$7,70 \pm 0,00$
V_4_J	$5,73 \pm 0,05$
Vzorek	RS [ $\text{g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ ]
V_1_Z	$9,77 \pm 0,05$
V_2_Z	$9,73 \pm 0,09$
V_3_Z	$5,80 \pm 0,08$
V_4_Z	$5,83 \pm 0,05$
Vzorek	RS [ $\text{g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ ]
V_1_M	$10,80 \pm 0,16$
V_2_M	$4,70 \pm 0,16$
V_3_M	$5,10 \pm 0,08$
V_4_M	$4,93 \pm 0,05$

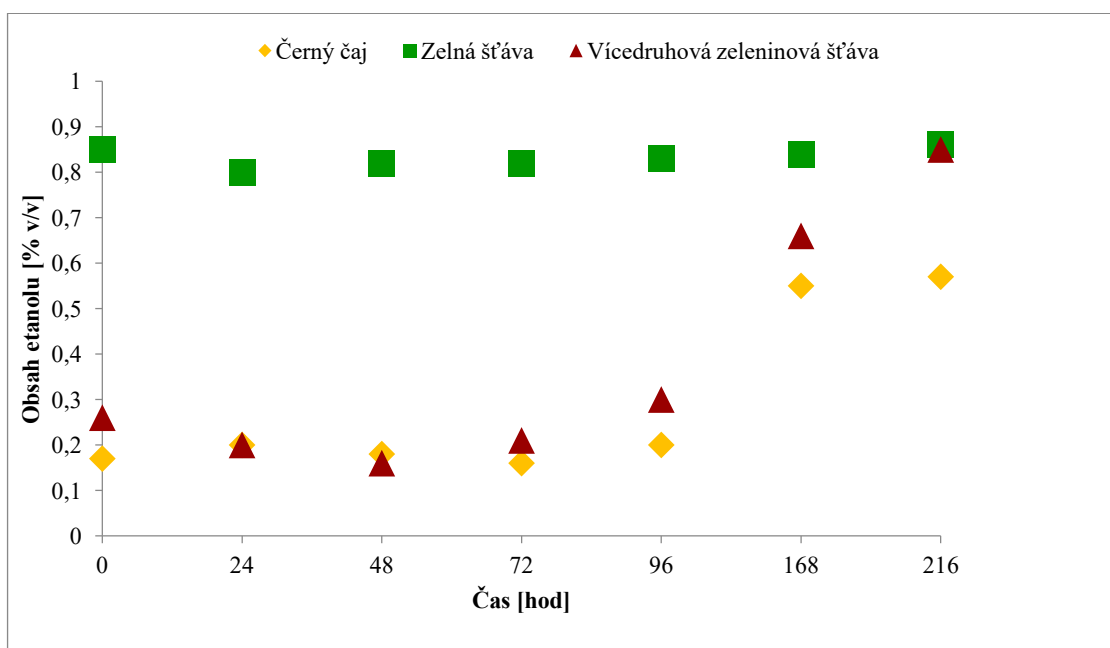
Refraktometrická sušina v průběhu fermentace vodního kefiru klesala.

U vzorku vodního kefiru z jablečné šťávy byly naměřeny hodnoty v rozmezí  $5,73 - 10,93 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ . V případě vzorku vodního kefiru ze zelné šťávy byly naměřeny hodnoty v rozmezí  $5,80 - 9,77 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ . U vzorku vodního kefiru z vícedruhové zeleninové šťávy lze pozorovat velmi podobný průběh fermentace z hlediska naměřených hodnot refraktometrické sušiny, které byly v intervalu  $4,70 - 10,80 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ . Výraznější pokles RS u vzorku vodního kefiru z vícedruhové zeleninové šťávy lze přisuzovat poměrně rychlému nástupu fermentace a nárůstu koncentrace etanolu, jak je patrné z následujícího grafu (Obrázek 8.).

#### 6.1.4 Výsledky stanovení hustoty a obsahu etanolu

Pomocí přístroje Anton Paar byly stanoveny veličiny jako hustota a obsah etanolu a následně byly doloženy hodnoty reálného a zdánlivého extraktu, reálného a zdánlivého stupně fermentace a energetická hodnota. Výsledky naměřených a doložených hodnot, pomocí zmíněného přístroje, jsou uvedeny na následujících obrázcích a v tabulkách.

Na následujícím grafu (Obrázek 7.) lze pozorovat změny koncentrace etanolu ve vzorcích kombuchy v průběhu fermentace.



**Obrázek 7.** Vývoj obsahu etanolu během fermentace v nápoji kombucha z černého čaje a ze zeleninových šťáv; směrodatné odchylky jsou v rozsahu 0,02 – 0,1 % (v/v) a nejsou znázorněny v grafu.

V případě vzorku kombuchy z černého čaje byly naměřeny hodnoty obsahu etanolu v rozmezí 0,16 – 0,57 % (v/v; 0,12 – 0,44 % w/w). Z globálního hlediska lze konstatovat fakt, že průběh nárůstu obsahu etanolu byl typický pro tento nápoj. V rámci studie Ihsani et al. (2021) byla pozorována změna obsahu etanolu v závislosti na různé délce doby fermentace. Celková doba fermentace byla 8 dní a rozmezí hodnot obsahu etanolu bylo 0,02 – 0,32 % (v/v). Rovněž tedy došlo k významnému nárůstu obsahu etanolu. Konečná koncentrace však závisí na množství vstupních surovin, především pak obsahu zkvasitelných sacharidů a inokula (Ihsani et al., 2021).

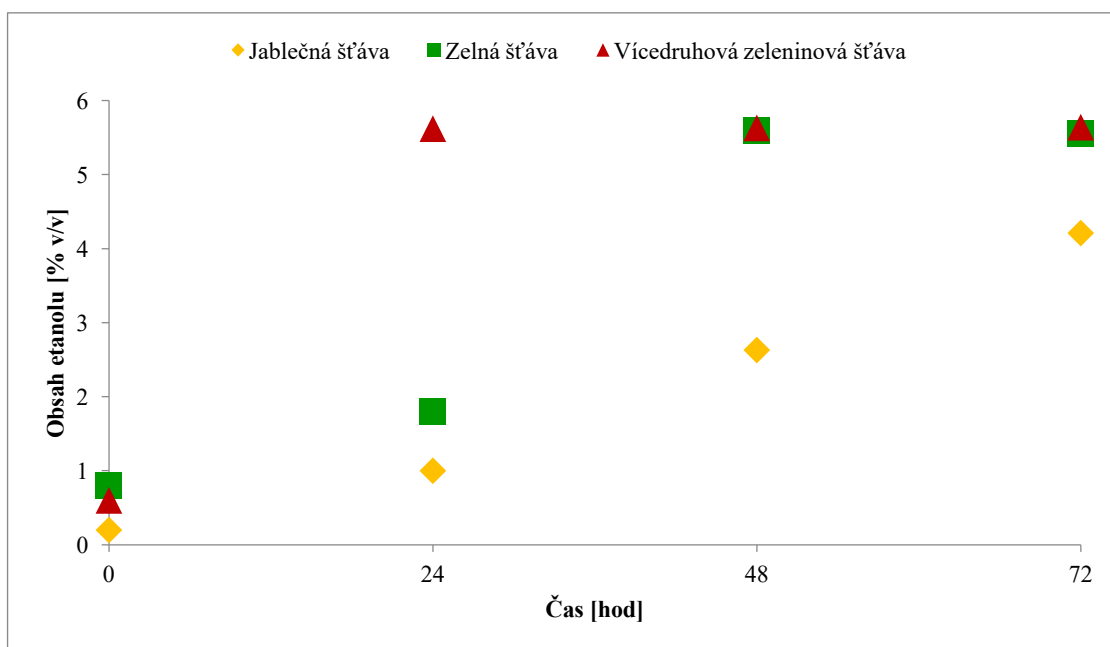
U vzorku kombuchy ze zelné šťávy byly naměřeny hodnoty v intervalu 0,8 – 0,86 % v/v (0,6 – 0,66 % w/w). V původní surovině, zelné šťávě, již byl přítomen etanol, protože byla vyrobena a konzervována mléčnou fermentací. Je patrné, že následně nedošlo k dalšímu významnému nárůstu etanolu během fermentace kulturou vodního keříru.

V případě vzorku kombuchy z vícedruhové zeleninové šťávy byly naměřeny hodnoty obsahu etanolu v rozmezí 0,16 – 0,85 % (v/v). Dle znázorněného grafu (Obrázek 7.) lze

pozorovat velmi podobný průběh změny obsahu etanolu, jako tomu bylo u kombuchy z černého čaje.

Za daných podmínek fermentačního procesu výroby kombuchy ze zelné šťávy by konečný produkt mohl být považován za nealkoholický a kombucha z černého čaje a z vícedruhové zeleninové šťávy již za alkoholický nápoj, jelikož výsledná hodnota obsahu etanolu je vyšší než 0,5 % v/v dle Vyhlášky 248/2018 Sb. Stále se ale jedná o nízkoalkoholické nápoje.

Na následujícím grafu (Obrázek 8.) je znázorněn průběh vývoje obsahu etanolu u vzorků vodního kefiru v průběhu fermentace.



**Obrázek 8.** Vývoj obsahu etanolu během fermentace v nápoji vodní kefir z jablečné šťávy a zeleninových šťáv; směrodatné odchylky jsou v rozsahu 0,02 – 0,6 % (v/v) a nejsou znázorněny v grafu.

Koncentrace etanolu ve vzorcích vodního kefiru v čase fermentace rostla. U vodního kefiru ze 100% jablečné šťávy byla nejvyšší naměřená hodnota 4,21 % v/v (3,29 % w/w). U vodního kefiru ze zelné šťávy byla nejvyšší naměřená hodnota obsahu etanolu 5,56 % v/v (4,36 % w/w). Dle studie Randazzo et al. (2016) byl obsah etanolu u vodního kefiru z jablečné šťávy po 48hodinové fermentaci 2,67 % (v/v). U vzorku vodního kefiru z vícedruhové zeleninové šťávy byla naměřena nejvyšší hodnota obsahu etanolu 5,64 % v/v (4,43 % w/w). U všech vzorků nárůst obsahu etanolu koresponduje s poklesem refraktometrické sušiny, tedy poklesem obsahu zkvasitelných sacharidů.

Dle Vyhlášky č. 248/2018 Sb. lze vzorky vodního kefiru, vyrobené za daných podmínek, vyhodnotit jako alkoholické nápoje. Tyto výrobky však nejsou v žádném legislativním předpisu jmenovitě definovány.

Dále byla v průběhu fermentace sledována změna hustoty u vzorků nápojů. Výsledné hodnoty jsou shrnuty v následujících tabulkách 13 a 14.

V případě vzorku kombuchy z černého čaje byly naměřeny hodnoty hustoty v rozmezí 1,0310 – 1,0356 g·cm<sup>-3</sup>. V průběhu fermentace došlo ke snížení hustoty vzorku kombuchy z černého čaje.

U vzorku kombuchy ze zelné šťávy byly naměřeny hodnoty v intervalu 1,0111 – 1,0456 g·cm<sup>-3</sup>. Z tabulky 13 je patrný nárůst hustoty v průběhu fermentace, stejně jako u vzorku kombuchy z vícedruhovité zeleninové šťávy, kdy bylo rozmezí hodnot 1,0421 – 1,0500 g·cm<sup>-3</sup>.

**Tabulka 13.** Změna hustoty u vzorků nápoje kombuchy (g · cm<sup>-3</sup>). Odchyłky naměřených hodnot byly v rozsahu 0,0001 – 0,0005 g · cm<sup>-3</sup>, proto nejsou uvedeny v tabulce.

Vzorek	Hustota [g·cm <sup>-3</sup> ]
K 1 C	1,0356
K 2 C	1,0340
K 3 C	1,0338
K 4 C	1,0339
K 5 C	1,0340
K 6 C	1,0310
K 7 C	1,0314
Vzorek	Hustota [g·cm <sup>-3</sup> ]
K 1 Z	1,0111
K 2 Z	1,0454
K 3 Z	1,0456
K 4 Z	1,0446
K 5 Z	1,0456
K 6 Z	1,0447
K 7 Z	1,0441
Vzorek	Hustota [g·cm <sup>-3</sup> ]
K 1 M	1,0500
K 2 M	1,0421
K 3 M	1,0470
K 4 M	1,0492
K 5 M	1,0482
K 6 M	1,0475
K 7 M	1,0472

V níže uvedené tabulce čtrnáct jsou znázorněny výsledné hodnoty hustoty v případě vzorků vodního kefiru.

**Tabulka 14.** Změna hustoty u vzorků nápoje vodní kefir. Odchyšky naměřených hodnot byly v rozsahu  $0,0002 - 0,0004 \text{ g} \cdot \text{cm}^{-3}$ , proto nejsou uvedeny v tabulce.

<b>Vzorek</b>	<b>Hustota [<math>\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}</math>]</b>
V_1_J	1,0431
V_2_J	1,0382
V_3_J	1,0225
V_4_J	1,0093
<b>Vzorek</b>	<b>Hustota [<math>\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}</math>]</b>
V_1_Z	1,0342
V_2_Z	1,0293
V_3_Z	1,0073
V_4_Z	1,0069
<b>Vzorek</b>	<b>Hustota [<math>\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}</math>]</b>
V_1_M	1,0433
V_2_M	1,0051
V_3_M	1,0050
V_4_M	1,0051

Jak je z tabulky patrné, v případě vzorku vodního kefiru z jablečné šťávy došlo v průběhu fermentace k postupnému poklesu hustoty. Byly naměřeny hodnoty v rozmezí  $1,0093 - 1,0431 \text{ g} \cdot \text{cm}^{-3}$ .

Podobný průběh změny hodnot hustoty jako u vodního kefiru z jablečné šťávy byl pozorován rovněž u vodního kefiru ze zelné šťávy. Interval naměřených hodnot v tomto případě byl  $1,0069 - 1,0342 \text{ g} \cdot \text{cm}^{-3}$ .

U vodního kefiru z vícedruhové zeleninové šťávy byly naměřeny hodnoty v rozmezí  $1,0050 - 1,0433 \text{ g} \cdot \text{cm}^{-3}$ . Výrazný pokles hustoty byl sledován již po 24 hodinách fermentace.

K poklesu hustoty u všech vzorků vodního kefiru došlo pravděpodobně z důvodu poměrně vysoké produkce etanolu a také snížení extraktu během fermentace.



V následujících tabulkách 15 a 16 jsou uvedeny hodnoty reálného a zdánlivého extraktu vzorků nápoje kombucha a také zdánlivého a reálného stupně fermentace vzorků nápoje kombucha.

**Tabulka 15.** Reálný (Er; % w/w) a zdánlivý (Ea; % w/w) extrakt u vzorků kombuchy; směrodatné odchylky jsou v rozsahu 0,04 – 0,27 % w/w a nejsou uvedeny v tabulce.

Vzorek	Er [% w/w]	Ea [% w/w]
K_1_C	9,45	9,35
K_2_C	9,08	9,00
K_3_C	9,02	9,26
K_4_C	9,04	9,28
K_5_C	9,08	9,00
K_6_C	8,47	8,27
K_7_C	8,58	8,37
Vzorek	Er [% w/w]	Ea [% w/w]
K_1_Z	3,63	3,30
K_2_Z	12,04	11,75
K_3_Z	12,10	11,80
K_4_Z	11,96	11,65
K_5_Z	12,10	11,80
K_6_Z	11,15	10,62
K_7_Z	11,75	11,44
Vzorek	Er [% w/w]	Ea [% w/w]
K_1_M	12,94	12,85
K_2_M	11,04	10,96
K_3_M	12,19	12,71
K_4_M	12,74	12,66
K_5_M	12,53	12,42
K_6_M	12,49	12,25
K_7_M	12,49	12,18

U kombuchy z černého čaje byla nejvyšší hodnota reálného extraktu naměřena v čase 0 h fermentace, a sice 9,45 % w/w. U vzorku kombuchy ze zelné šťávy byla nejvyšší hodnota reálného extraktu naměřena po 48 h fermentace, a sice 12,10 % w/w. A u vzorku kombuchy z vícedruhové zeleninové šťávy byl naměřen nejvyšší reálný extrakt rovněž v čase 0 h fermentace, a sice 12,94 % w/w. Reálný extrakt uvádá obsah nezkrvašených sacharidů. Zdánlivý extrakt slouží převážně pro srovnání.

**Tabulka 16.** Reálný (Rdf; % w/w) a zdánlivý (Adf; % w/w) stupeň fermentace u vzorků kombuchy směrodatné odchylky jsou v rozsahu 0,2 – 0,4 % w/w a nejsou uvedeny v tabulce.

<b>Vzorek</b>	<b>Rdf [% w/w]</b>	<b>Adf [% w/w]</b>
K_1_C	2,75	3,28
K_2_C	3,36	4,00
K_3_C	3,05	3,64
K_4_C	2,72	3,24
K_5_C	3,36	4,00
K_6_C	9,31	11,10
K_7_C	9,51	11,33
<b>Vzorek</b>	<b>Rdf [% w/w]</b>	<b>Adf [% w/w]</b>
K_1_Z	27,42	33,45
K_2_Z	9,39	10,99
K_3_Z	9,56	11,19
K_4_Z	40,42	49,71
K_5_Z	9,67	11,31
K_6_Z	16,93	19,89
K_7_Z	10,26	12,02
<b>Vzorek</b>	<b>Rdf [% w/w]</b>	<b>Adf [% w/w]</b>
K_1_M	3,03	3,53
K_2_M	2,76	3,25
K_3_M	2,00	2,35
K_4_M	2,50	2,92
K_5_M	3,59	4,20
K_6_M	7,60	8,88
K_7_M	9,58	11,19

Dále jsou popsány hodnoty zdánlivého a reálného extraktu vzorků vodního kefiru (Tabulka 17.).

**Tabulka 17.** Reálný (Er; % w/w) a zdánlivý (Ea; % w/w) extrakt u vzorků vodního kefiru; směrodatné odchylky jsou v rozsahu 0,01 – 0,1 % w/w a nejsou uvedeny v tabulce.

Vzorek	Er [% w/w]	Ea [% w/w]
V_1_J	11,28	11,20
V_2_J	10,39	10,41
V_3_J	7,13	6,17
V_4_J	4,38	2,85
Vzorek	Er [% w/w]	Ea [% w/w]
V_1_Z	11,90	11,54
V_2_Z	8,51	7,85
V_3_Z	4,35	2,34
V_4_Z	4,23	2,23
Vzorek	Er [% w/w]	Ea [% w/w]
V_1_M	11,71	11,49
V_2_M	3,80	1,77
V_3_M	3,78	1,75
V_4_M	3,81	1,77

U všech vzorků vodního kefiru lze pozorovat postupný pokles reálného extraktu. U vodního kefiru z jablečné šťávy byla nejvyšší hodnota 11,28 % w/w, u vodního kefiru ze zelné šťávy byla hodnota reálného extraktu nejvyšší ze všech vzorků, 11,90 % w/w a u vzorku vodního kefiru z vícedruhové zeleninové šťávy byla hodnota reálného extraktu 11,71 % w/w.

**Tabulka 18.** Reálný (Rdf; % w/w) a zdánlivý (Adf; % w/w) stupeň fermentace u vzorků vodního kefiru směřodátne odchylky jsou v rozsahu 0,24 – 0,5 % w/w a nejsou uvedeny v tabulce.

<b>Vzorek</b>	<b>Rdf [% w/w]</b>	<b>Adf [% w/w]</b>
V_1_J	2,70	3,18
V_2_J	13,13	15,50
V_3_J	37,05	44,34
V_4_J	60,81	73,66
<b>Vzorek</b>	<b>Rdf [% w/w]</b>	<b>Adf [% w/w]</b>
V_1_Z	11,60	13,59
V_2_Z	25,11	29,88
V_3_Z	67,57	31,77
V_4_Z	68,00	82,34
<b>Vzorek</b>	<b>Rdf [% w/w]</b>	<b>Adf [% w/w]</b>
V_1_M	7,41	8,69
V_2_M	70,51	86,22
V_3_M	70,75	85,85
V_4_M	70,61	85,67

Jak se snižoval reálný extrakt vzorků, tak docházelo k nárůstu reálného stupně fermentace. U vzorků vodního kefiru z jablečné a ze zelné šťávy lze pozorovat pozvolnější průběh. V případě vodního kefiru z vícedruhov $\acute{e}$  zeleninové šťávy došlo k poměrně výrazné změně již po 24 h fermentace. Tento fakt souvisí i s poměrně rychlým nárůstem obsahu etanolu a poklesem hustoty u vzorku vodního kefiru z vícedruhov $\acute{e}$  zeleninové šťávě, kdy muselo během 24 hodin dojít ke zkvašení přítomných sacharidů.

Reálný extrakt a reálný stupeň fermentace jsou parametry, které jsou téměř vždy sledovány během výroby fermentovaných nápojů, jako jsou pivo, víno, nebo třeba cider. U těchto produktů, především pak v případě piva, je velmi důležité znát reálný extrakt, aby mělo pivo po prokvašení odpovídající plnost. Jestliže porovnáme výrobu piva, vína nebo cideru s výrobou kombuchy a vodního kefiru, jedná se však o velmi rozdílné technologie výroby. Proto tyto veličiny nelze příliš srovnávat.

Pomocí softwaru přístroje Anton Paar vypočtena také energetická hodnota vzorků kombuchy a vodního kefiru. Výsledné hodnoty jsou v níže uvedených tabulkách 19 a 20.

**Tabulka 19.** Vývoj energetické hodnoty v průběhu fermentace u vzorků kombuchy.

Vzorek	kcal/100 ml	kJ/100ml
K_1_C	35,21	150,74
K_2_C	33,95	145,34
K_3_C	33,65	144,06
K_4_C	33,58	143,8
K_5_C	33,95	145,34
K_6_C	33,61	143,6
K_7_C	34,11	145,74
Vzorek	kcal/100 ml	kJ/100ml
K_1_Z	46,57	206,5
K_2_Z	48,48	207,13
K_3_Z	48,8	208,49
K_4_Z	48,43	208,34
K_5_Z	48,87	208,77
K_6_Z	48,61	207,19
K_7_Z	47,7	203,74
Vzorek	kcal/100 ml	kJ/100ml
K_1_M	49	209,8
K_2_M	41,36	177,08
K_3_M	45,57	195,17
K_4_M	47,93	205,23
K_5_M	47,63	203,87
K_6_M	49,44	211,38
K_7_M	50,47	215,61

**Tabulka 20.** Vývoj energetické hodnoty v průběhu fermentace u vzorků vodního kefiru.

Vzorek	kcal/100 ml	kJ/100 ml
V_1_J	42,27	181
V_2_J	43,28	184,69
V_3_J	40,04	169,52
V_4_J	38,75	162,74
Vzorek	kcal/100 ml	kJ/100 ml
V_1_Z	49,02	209,29
V_2_Z	40,59	172,54
V_3_Z	46,37	114,31
V_4_Z	45,65	191,26
Vzorek	kcal/100 ml	kJ/100 ml
V_1_M	46,11	197,12
V_2_M	44,43	185,97
V_3_M	44,47	186,14
V_4_M	44,56	186,53

Černý čaj jako takový má téměř nulovou energetickou hodnotu. V případě kombuchy z černého čaje byla energetická hodnota navýšena nejdříve přidáním sacharózy, po jejím využití přítomnými mikroorganismy v průběhu fermentace pak energetickou hodnotu kombuchy z černého čaje ovlivňoval (navyšoval) obsah etanolu. Nejvyšší hodnota byla 35,21 kcal/100 ml (150,74 kJ/100 ml) a během fermentace u tohoto vzorku nedošlo k významným změnám.

Původní energetická hodnota zelné šťávy byla 12 kcal/100 ml (52 kJ/100 ml). Po přidání sacharózy byla zvýšena na 46,57 kcal/100 ml (206,50 kJ/100 ml). Stejně jako v případě kombuchy z černého čaje, byla energetická hodnota ovlivněna obsahem etanolu, který vznikl v rámci fermentace. Konečná energetická hodnota byla u tohoto vzorku 208,77 kcal/100 ml (48,87 kJ/100 ml), v průběhu fermentačního procesu nedošlo k významným změnám.

V případě vícedruhové zeleninové šťávy byla původní energetická hodnota suroviny 22 kcal/100 ml (95 kJ/100 ml), což je ve srovnání se zelnou šťávou poměrně významný rozdíl. Po přidání sacharózy byla energetická hodnota tohoto vzorku 49 kcal/100 ml (209,80 kJ/100 ml). V průběhu fermentace vzorku došlo k mírnému navýšení energetické hodnoty na 50,47 kcal/100 ml (215, 61 kJ/100 ml).

V případě vodního kefiru z jablečné šťávy byla původní energetická hodnota 40 kcal/100 ml (170 kJ/100 ml). V čase 0 a po 24 hodinách fermentace byla tato hodnota vyšší pravděpodobně kvůli přidavku matečného zákysu, který již tedy nějaký etanol obsahoval. Dále nedocházelo k významným změnám.

U vodního kefiru ze zelné šťávy lze pozorovat pokles po 24 h fermentace z důvodu využití přidané sacharózy přítomnými mikroorganismy. Následně došlo k mírnému nárůstu, což odpovídá také průběhu nárůstu obsahu etanolu.

U třetího vzorku, vodního kefiru z vícedruhové zeleninové šťávy, byly pozorovány pouze nepatrné změny, kdy došlo nejdříve ke snížení energetické hodnoty vlivem využití přidané sacharózy a dalších zkvasitelných sacharidů. Následně byl zaznamenán pouze velmi mírný nárůst v důsledku obsahu etanolu, který byl ale v časech 24 h, 48 h a 72 h téměř konstantní.

## 6.2 Výsledky reologické analýzy

V rámci reologické analýzy bylo provedeno u všech vzorků stanovení zdánlivé viskozity a smykového napětí. Změny zdánlivé viskozity a smykového napětí v průběhu fermentace v případě nápoje kombucha jsou znázorněny na následujících grafech (Obrázek 9. až Obrázek 14.). U vodního kefiru jsou změny zdánlivé viskozity a smykového napětí rovněž znázorněny prostřednictvím grafů (Obrázek 15. až Obrázek 20.). Zároveň jsou v příslušných tabulkách (Tabulka 20. a Tabulka 21.) sepsány hodnoty získané z PowerLaw modelu u všech vzorků kombuchy a vodního kefiru.

Viskozita je fyzikální veličinou, která definuje vztah vnitřního tření tekutiny. Kapaliny se dle svých fyzikálních vlastností z hlediska viskozity dělí na dilatantní, newtonské a pseudoplastické. U newtonských kapalin platí Newtonův zákon viskozity, kdy platí přímá úměrnost mezi napětím a rychlostí deformace (Prokop, 2017). V případě vzorků nápojů kombuchy a vodního kefiru se však jedná o ne-newtonské kapaliny, které jsou označovány jako dilatantní a pseudoplastické. V následujícím textu budou vysvětleny rozdíly mezi těmito kapalinami v rámci popisu konkrétních vzorků nápojů.

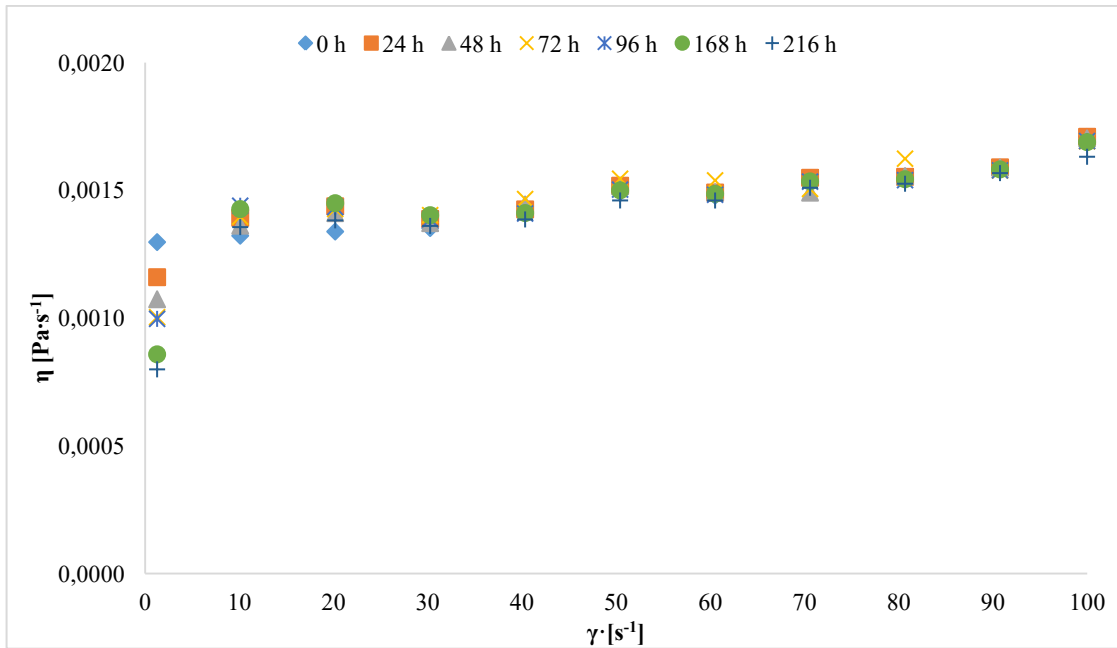
V následující tabulce (Tabulka 21.) jsou uvedeny výsledné hodnoty měření. Podstatnou veličinou je v tomto případě index tokového chování „ $n$ “. Pomocí této hodnoty je příslušná kapalina charakterizována buď jako dilatantní, v případě, že hodnoty  $n$  nabývají rozměří 0 – 1. Nebo jako pseudoplastická v případě, že jsou hodnoty vyšší než 1.

Tabulka 21. Výsledné hodnoty z Power Law modelu u vzorků kombuchy.

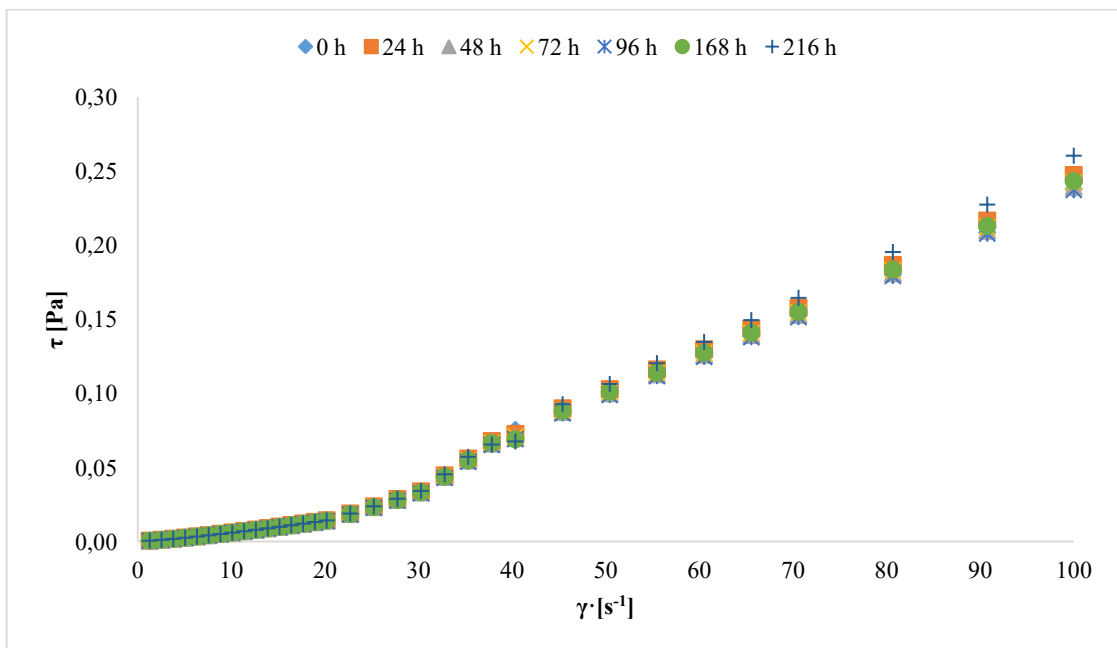
Vzorek	K (Pa s)*	n (-)*	R <sup>2</sup>
K_1_C	0,3590 10 <sup>-3</sup>	1,226	0,9953
K_2_C	0,3395 10 <sup>-3</sup>	1,244	0,9961
K_3_C	0,3392 10 <sup>-3</sup>	1,238	0,9956
K_4_C	0,3343 10 <sup>-3</sup>	1,243	0,9957
K_5_C	0,3309 10 <sup>-3</sup>	1,241	0,9958
K_6_C	0,3303 10 <sup>-3</sup>	1,246	0,9954
K_7_C	0,3114 10 <sup>-3</sup>	1,271	0,9953
Vzorek	K (Pa s)*	n (-)*	R <sup>2</sup>
K_1_Z	0,4323 10 <sup>-3</sup>	1,204	0,9965
K_2_Z	0,4213 10 <sup>-3</sup>	1,206	0,9965
K_3_Z	0,4201 10 <sup>-3</sup>	1,213	0,9964
K_4_Z	0,4066 10 <sup>-3</sup>	1,204	0,9974
K_5_Z	0,4018 10 <sup>-3</sup>	1,212	0,9965
K_6_Z	0,3858 10 <sup>-3</sup>	1,219	0,9962
K_7_Z	0,3841 10 <sup>-3</sup>	1,219	0,9974
Vzorek	K (Pa s)*	n (-)*	R <sup>2</sup>
K_1_M	0,0474	0,6003	0,994
K_2_M	0,1374	0,475	0,9952
K_3_M	0,2346	0,4265	0,9936
K_4_M	0,2438	0,4226	0,993
K_5_M	0,2926	0,402	0,9918
K_6_M	0,5419	0,3502	0,9934
K_7_M	0,6463	0,338	0,9903

Z výše uvedené tabulky (Tabulka 21.) je tedy patrné, že vzorky kombuchy z černého čaje a ze zelné šťávy vykazují pseudoplastické chování, což znamená, že se zvyšujícím se gradientem rychlosti tyto vzorky houstnou. V případě vzorku kombuchy z vícedruhové zeleninové šťávy lze pozorovat chování dilatantní kapaliny, jelikož hodnoty  $n$  jsou nižší než 1. To tedy znamená, že se zvyšujícím se gradientem rychlosti vzorky kombuchy z vícedruhové zeleninové šťávy řídou.



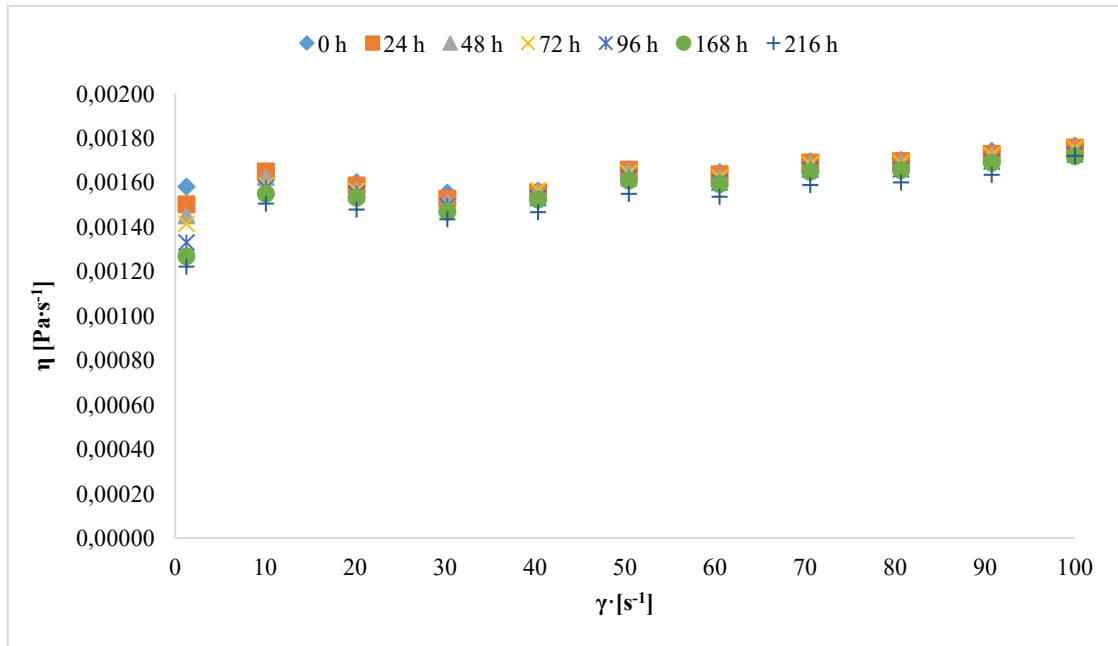


**Obrázek 9.** Vývoj zdánlivé viskozity během fermentace vzorku kombuchy z černého čaje.

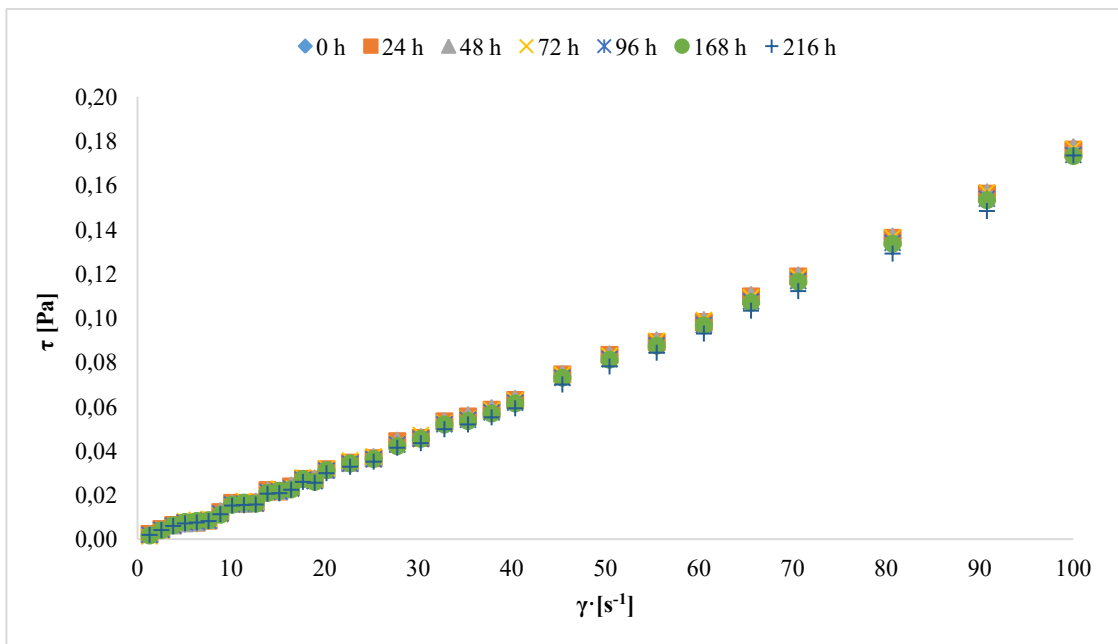


**Obrázek 10.** Vývoj smykového napětí během fermentace vzorku kombuchy z černého čaje.

Na uvedených grafech (Obrázek 9. a Obrázek 10.) je zobrazen průběh změny zdánlivé viskozity a smykového napětí během fermentace nápoje kombucha z černého čaje. Jak již bylo zmíněno, tento vzorek vykazuje chování pseudoplastické kapaliny, tedy takové, u které dochází se zvyšujícím se gradientem rychlosti k houstnutí.



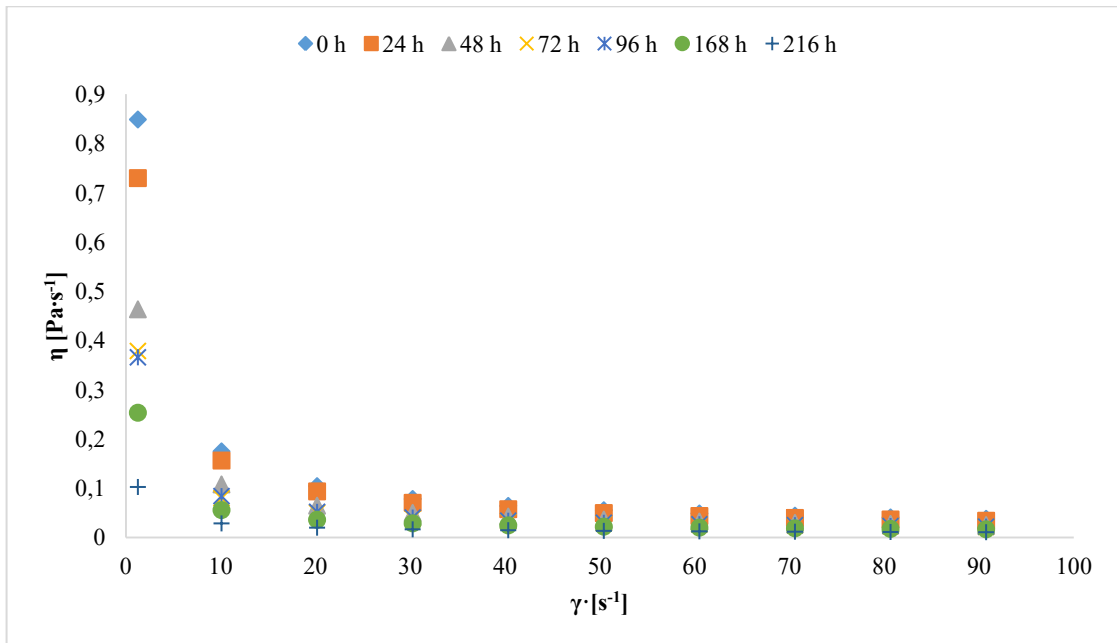
**Obrázek 11.** Vývoj zdánlivé viskozity během fermentace vzorku kombuchy ze zelné šťávy.



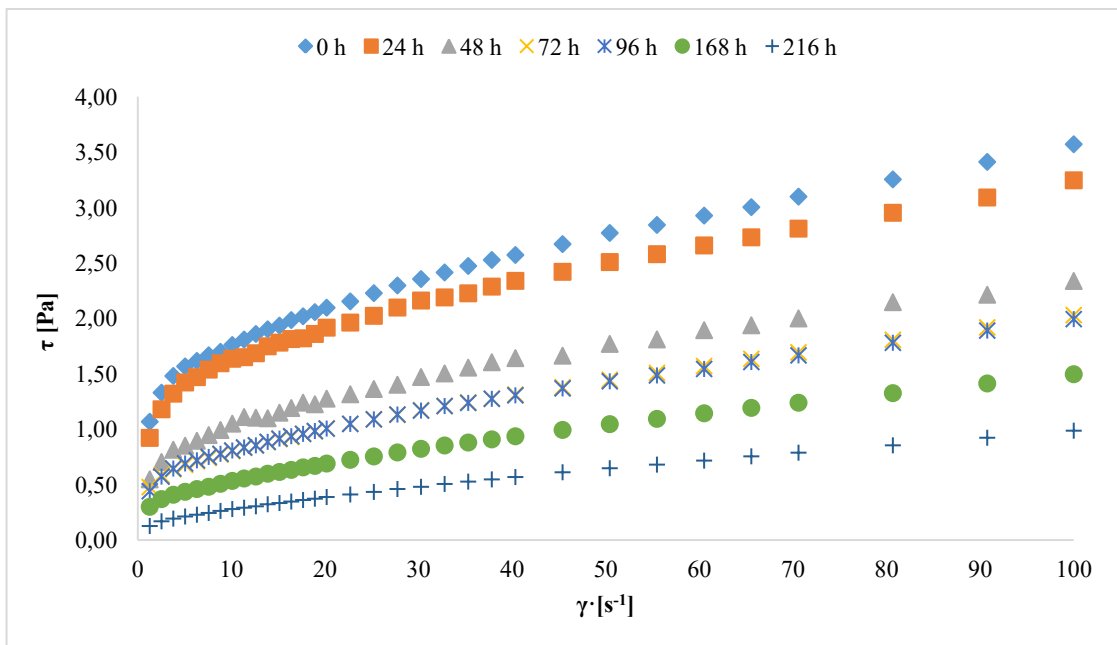
**Obrázek 12.** Vývoj smykového napětí během fermentace vzorku kombuchy ze zelné šťávy.

U vzorku kombuchy ze zelné šťávy lze pozorovat velmi podobný průběh změny zdánlivé viskozity a smykového napětí v průběhu fermentace nápoje jako u kombuchy v černém čaji. Hodnoty se v průběhu kvašení příliš nelišily. Vzorek kombuchy ze zelné šťávy vykazuje chování pseudoplastické kapaliny. V případě tohoto vzorku je změna zdánlivé

viskozity a smykového napětí srovnatelná s průběhem změny hustoty kombuchy ze zelené šťávy, uvedené v příslušné tabulce (Tabulka 13.).



**Obrázek 13.** Vývoj zdánlivé viskozity během fermentace vzorku kombuchy z vícedruhové zeleninové šťávy.



**Obrázek 14.** Vývoj smykového napětí během fermentace vzorku kombuchy z vícedruhové zeleninové šťávy.

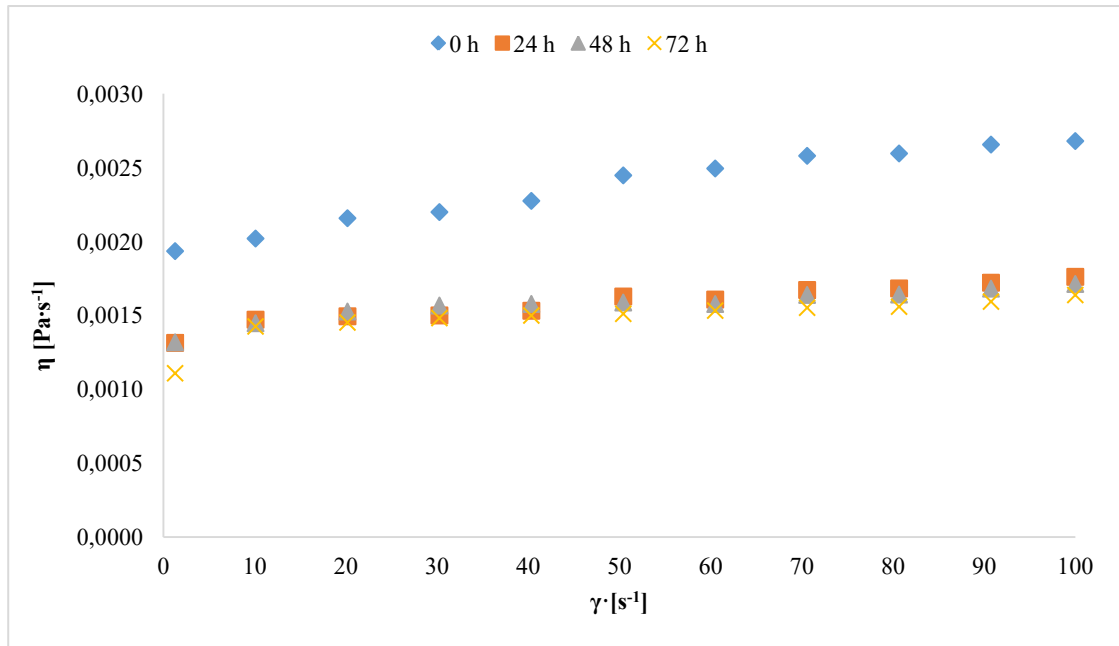
Na výše uvedených grafech (Obrázek 13. a Obrázek 14.) lze říci, že vzorek nápoje kombuchy z vícedruhové zeleninové šťávy na rozdíl od předchozích dvou vzorků, kombuchy

z černého čaje a ze zelné šťávy, vykazoval vlastnosti dilatantní kapaliny, tedy takové, u které dochází se zvyšujícím se gradientem rychlosti k řídnutí. Tato skutečnost opět koreluje s průběhem změny hustoty příslušného vzorku, tedy kombuchy ze vícedruhovité zeleninové šťávy.

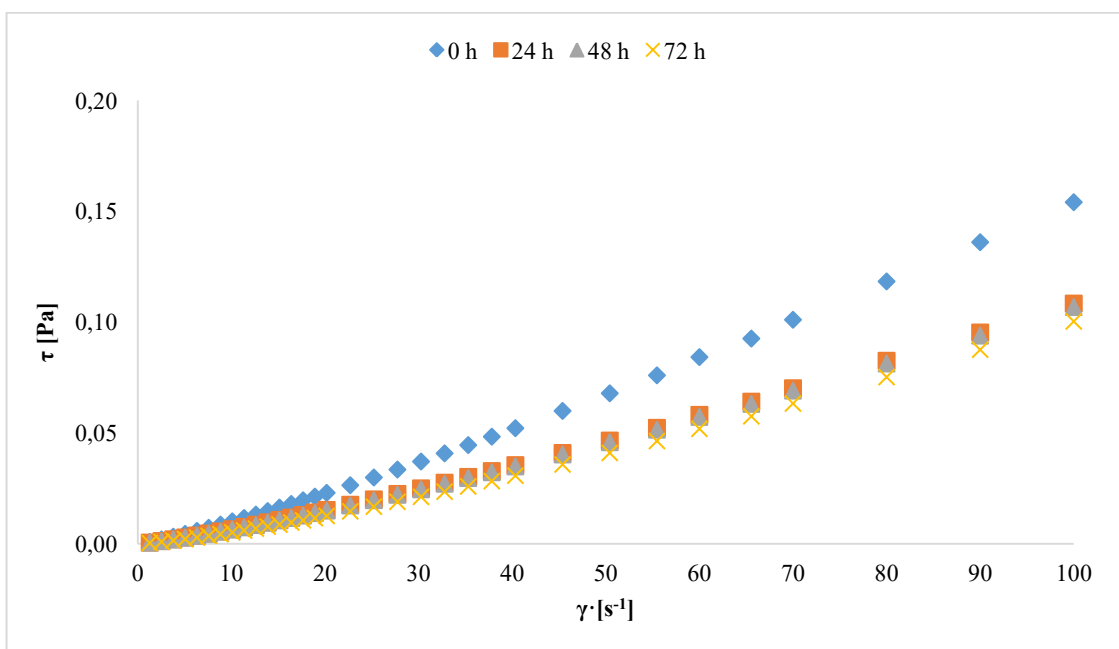
Dále jsou uvedeny výsledné hodnoty z Power Law modelu u vodního kefiru (Tabulka 22.). Opět je zásadní hodnota „n“, tedy index tokového chování, podle jehož hodnoty lze popsat charakteristické fyzikální vlastnosti daného vzorku z hlediska viskozity.

**Tabulka 22.** Výsledné hodnoty z Power Law modelu u vzorků vodního kefiru.

Vzorek	K (Pa s)*	n (-)*	R <sup>2</sup>
V_1_J	0,6569 10 <sup>-3</sup>	1,183	0,9962
V_2_J	0,3912 10 <sup>-3</sup>	1,219	0,9994
V_3_J	0,3822 10 <sup>-3</sup>	1,221	0,9961
V_4_J	0,2586 10 <sup>-3</sup>	1,292	0,9931
Vzorek	K (Pa s)*	n (-)*	R <sup>2</sup>
V_1_Z	0,4084 10 <sup>-3</sup>	1,231	0,995
V_2_Z	0,3744 10 <sup>-3</sup>	1,255	0,9996
V_3_Z	0,3305 10 <sup>-3</sup>	1,262	0,9931
V_4_Z	0,3141 10 <sup>-3</sup>	1,275	0,9965
Vzorek	K (Pa s)*	n (-)*	R <sup>2</sup>
V_1_M	0,5352	0,362	0,9882
V_2_M	0,6024	0,331	0,9996
V_3_M	0,7511	0,325	0,9908
V_4_M	0,9493	0,317	0,9919

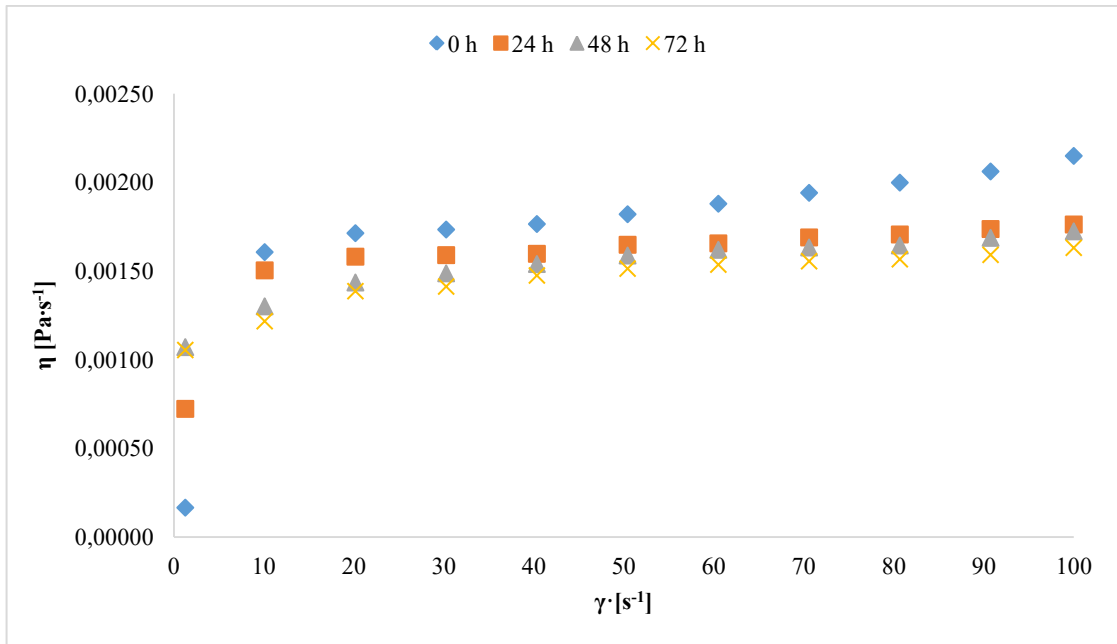


**Obrázek 15.** Vývoj zdánlivé viskozity během fermentace vodního kefiru z jablečné šťávy.

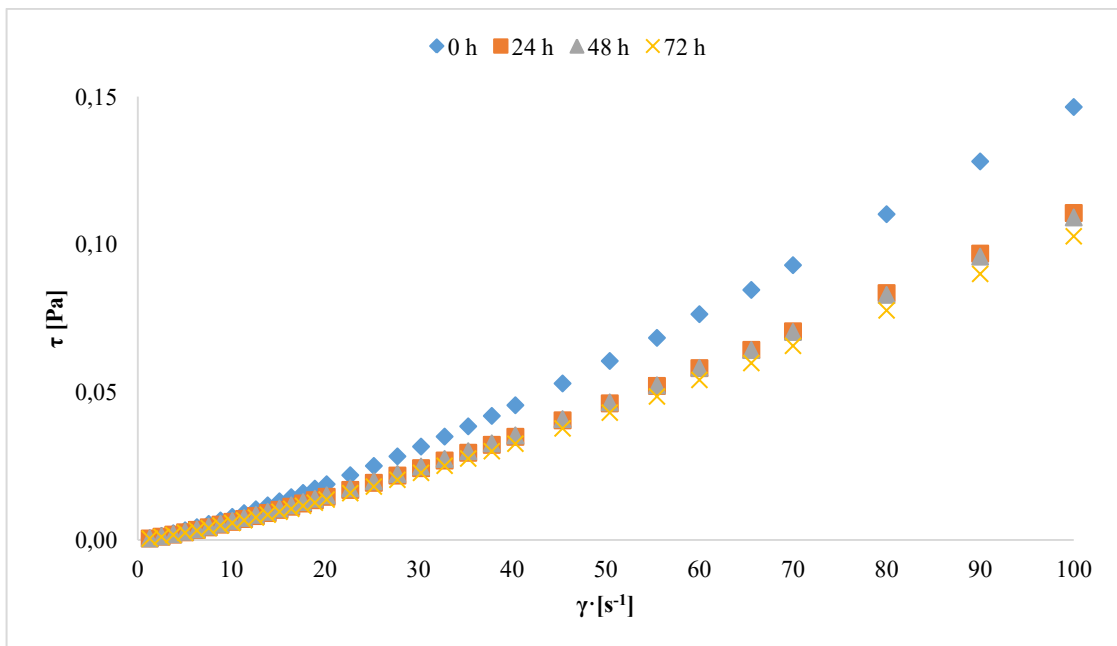


**Obrázek 16.** Vývoj smykového napětí během fermentace vzorku vodního kefiru z jablečné šťávy.

Hodnoty indexu tokového chování v případě vodního kefiru z jablečné šťávy byly vyšší, než 1. Na základě této skutečnosti a také výše uvedených grafů (Obrázek 15., Obrázek 16.) je možno říct, že se jedná o kapalinu, která vykazuje pseudoplastické chování, tedy v průběhu zvyšování rychlostního gradientu houstne.

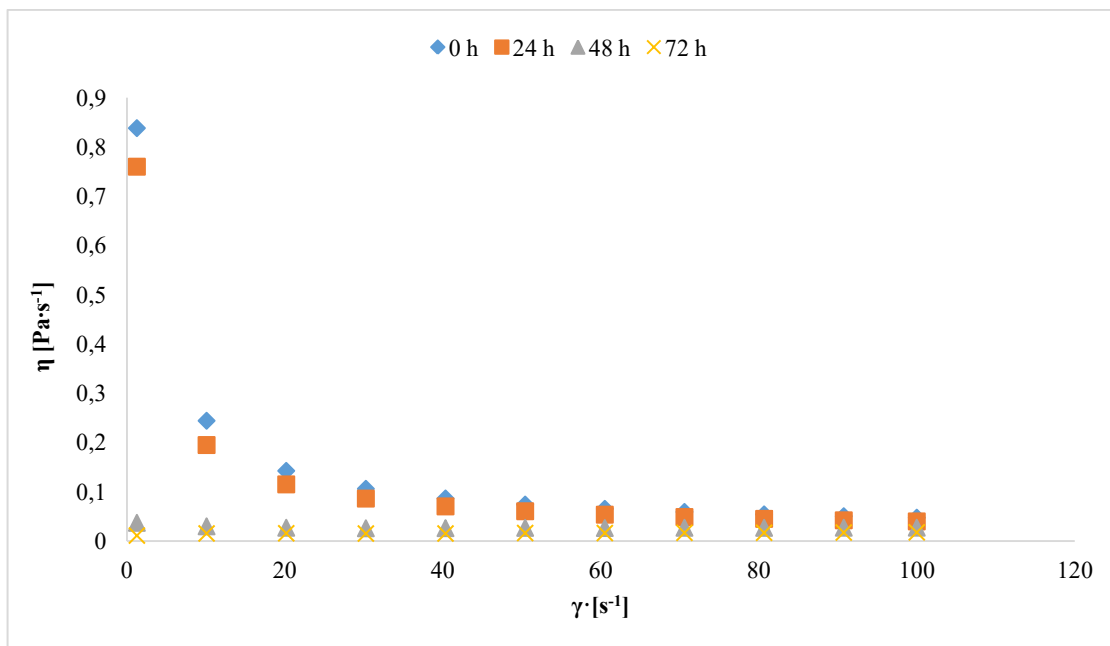


**Obrázek 17.** Vývoj zdánlivé viskozity během fermentace vodního kefiru ze zelné šťávy.

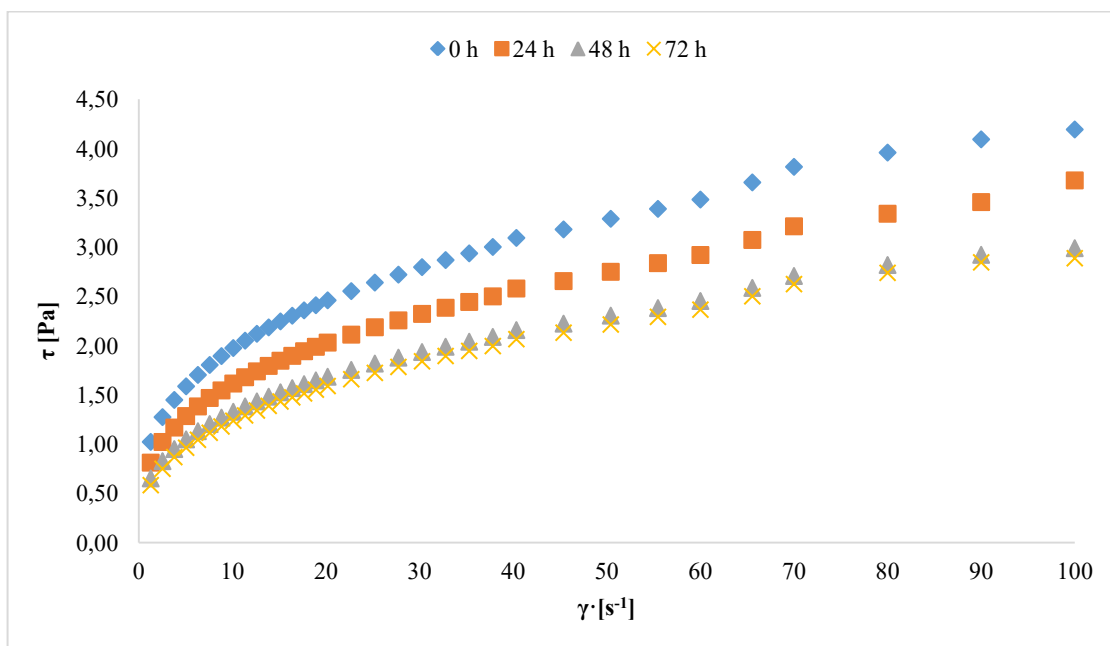


**Obrázek 18.** Vývoj smykového napětí během fermentace vodního kefiru ze zelné šťávy.

Z výše uvedených grafů (Obrázek 17. a Obrázek 18.) a z hodnot „n“, tedy indexu tokového chování vzorku, kdy tyto hodnoty jsou uvedeny v příslušné tabulce (Tabulka 22.), je patrné, že vzorek vodního kefiru ze zelné šťávy vykazuje rovněž vlastnosti pseudoplastické kapaliny, který v případě zvyšujícího se gradientu rychlosti houstne.



**Obrázek 19.** Vývoj zdánlivé viskozity během fermentace vodního kefíru z vícedruhové zeleninové šťávy.



**Obrázek 20.** Vývoj smykového napětí během fermentace vodního kefíru z vícedruhové zeleninové šťávy.

Na základě uvedených grafů (Obrázek 19. a Obrázek 20.), týkajících se vzorku vodního kefíru z vícedruhové zeleninové šťávy, lze říci, že stejně jako v případě kombuchy ze stejné šťávy, tedy vícedruhové zeleninové, se jedná o kapalinu vykazující dilatantní vlastnosti. Tedy u tohoto vzorku docházelo s rostoucím gradientem rychlosti k řidnutí.

### 6.3 Výsledky stanovení barvy

V rámci fyzikálně-chemické analýzy byly dále sledovány parametry jako barva a aktivita vody. Výsledné hodnoty jsou v následujících tabulkách (Tabulka 19., Tabulka 20.).

**Tabulka 23.** Vývoj barvy během fermentace vzorků kombuchy.

Vzorek	L*	a*	b*
K_1_C	26,94	2,62	6,23
K_2_C	27,38	2,54	5,12
K_3_C	26,92	2,61	5,48
K_4_C	27,67	2,60	5,27
K_5_C	27,11	2,51	4,93
K_6_C	29,39	1,64	3,89
K_7_C	28,50	2,32	5,33
Vzorek	L*	a*	b*
K_1_Z	29,69	-0,11	3,98
K_2_Z	29,50	0,01	3,83
K_3_Z	29,89	-0,11	3,91
K_4_Z	30,50	-0,22	3,55
K_5_Z	30,17	-0,24	4,04
K_6_Z	30,27	-0,30	3,88
K_7_Z	31,25	-0,20	2,91
Vzorek	L*	a*	b*
K_1_M	30,31	15,63	8,93
K_2_M	29,89	14,42	8,3
K_3_M	29,77	14,73	8,27
K_4_M	30,29	16,31	9,11
K_5_M	30,13	15,56	8,64
K_6_M	30,86	15,09	8,77
K_7_M	31,57	12,95	6,93

V případě kombuchy z černého čaje došlo v průběhu fermentace u hodnoty L\*, tedy světlost nápoje, pouze mírnému nárůstu. Hodnoty a\*, které jsou v červené oblasti, tedy +a\*, se v průběhu fermentace pouze mírně snižují. Lze tedy říci, že přechod mezi červenou a zelenou barvou je spíše minimální. Také v případě hodnot b\*, které jsou ve žluté oblasti tedy +b\*, jsou hodnoty pouze mírně klesající. Obecně platí, že výsledné hodnoty odpovídají povaze suroviny, tedy černému čaji. V průběhu fermentace došlo k nárůstu L\* a poklesu a\* a b\* v důsledku produkce organických kyselin přítomnými mikroorganismy (Ahmed et al., 2020; Yıkmış a Tuğgüm, 2019).

Yıkmış a Tuğgüm (2019) ve své studii rovněž sledovali změnu barvy kombuchy z černého čaje. V průběhu desetidenní fermentace došlo pouze k velmi mírnému nárůstu hodnoty L\*, a\* a b\*. V této studii však byla kombucha skladována po dobu 30ti dní, kdy k největšímu rozdílu došlo po dvaceti dnech skladování. I přesto lze vyvodit závěr, že kombucha má na



změnu barvy poměrně nízký vliv, jak sami autoři této studie uvádějí (Yıkmış a Tuğgüm, 2019).

V případě kombuchy ze zelné šťávy byl nárůst hodnot světlosti  $L^*$  spíše minimální. Hodnoty  $a^*$  jsou v záporné, tedy zelené oblasti, což odpovídá charakteru produktu. Hodnoty  $b^*$ , které odpovídají žluté oblasti, se v průběhu fermentace příliš nemění.

Vzorek kombuchy z vícedruhovové zeleninové šťávy má podobné hodnoty  $L^*$  jako předešlé dva vzorky kombuchy z černého čaje a ze zelné šťávy. Hodnoty  $a^*$  jsou v červené oblasti a hodnoty  $b^*$  jsou ve žluté oblasti a hodnoty u obou parametrů jsou mnohem vyšší, než u zbylých dvou vzorků kombuchy, což odpovídá charakteru výrobku, tedy vícedruhovové zeleninové šťávě.

U vzorků kombuchy ze zelné a z vícedruhovové šťávy nebyly provedeny studie pro srovnání naměřených hodnot.

V následující Tabulce 19 jsou uvedeny výsledné hodnoty stanovení změn barvy v průběhu fermentace vzorků vodního kefiru.

**Tabulka 24.** Vývoj barvy během fermentace vzorků vodního kefiru.

Vzorek	$L^*$	$a^*$	$b^*$
V_1_J	28,68	0,63	5,20
V_2_J	29,48	-0,23	3,04
V_3_J	31,84	0,24	6,11
V_4_J	30,44	0,03	3,35
Vzorek	$L^*$	$a^*$	$b^*$
V_1_Z	29,86	-0,19	3,86
V_2_Z	29,17	-0,56	2,68
V_3_Z	32,66	-1,14	2,89
V_4_Z	30,22	-0,30	3,31
Vzorek	$L^*$	$a^*$	$b^*$
V_1_M	29,95	17,46	8,76
V_2_M	30,82	16,70	8,63
V_3_M	33,88	21,40	12,10
V_4_M	33,63	21,13	11,92

V případě vzorku vodního kefiru z jablečné šťávy byl pozorován velmi mírný nárůst hodnot  $L^*$ , tedy světlosti, v průběhu fermentace. Dle studie Randazzo et al. (2016), kde je uvedeno srovnání čerstvé šťávy a vodního kefiru ze šťávy daného druhu ovoce, jsou hodnoty  $L^*$  u vodního kefiru z jablečné šťávy srovnatelné s námi naměřenými hodnotami světlosti. U hodnot  $a^*$ , tedy přechodu mezi zelenou a červenou barvou, došlo k mírnému

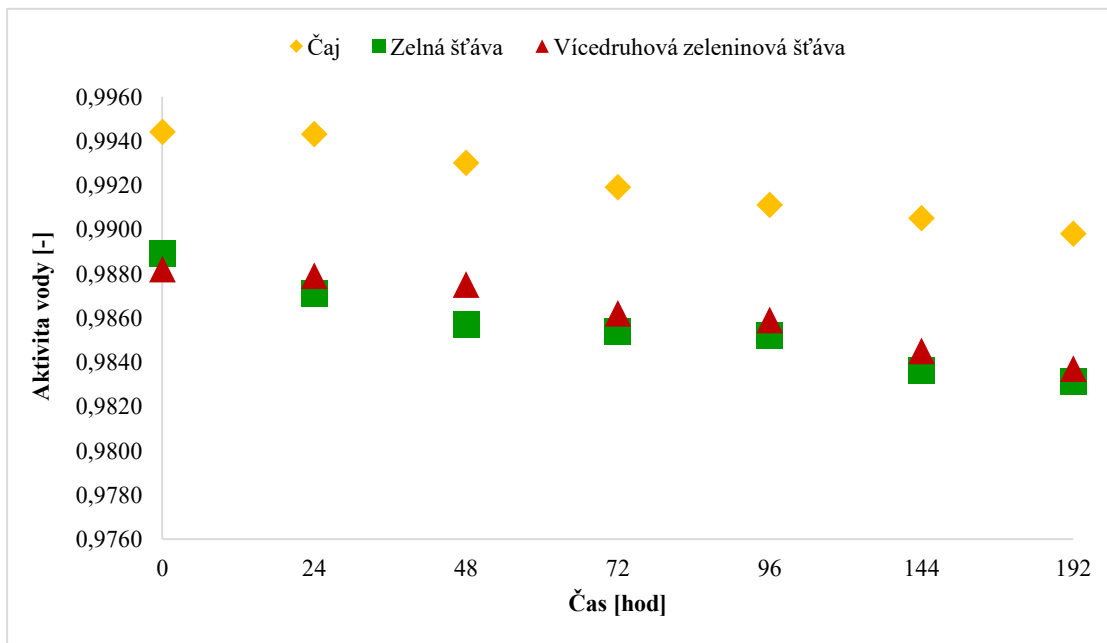
poklesu hodnot, které jsou na rozmezí přechodu těchto barev. Ve zmíněné studii Randazzo et al. (2016) jsou hodnota  $a^*$  vyšší. V případě hodnoty  $b^*$ , tedy přechodu barvy žluté do modré, jsou hodnoty v tomto případě i v případě zmíněné studie v oblasti  $+b^*$ . Což odpovídá charakteru produktu (Randazzo et al., 2016).

U vodního kefiru ze zelné šťávy došlo podobně jako u kombuchy ze zelné šťávy nárůstu hodnoty  $L^*$  v průběhu fermentace, a tedy zvýšení světlosti nápoje. Stejný průběh byl pozorován také u vodního kefiru z vícedruhové zeleninové šťávy, kde byl u hodnoty  $L^*$  zaznamenán podobný trend. Hodnota  $a^*$  u vodního kefiru ze zelné šťávy odpovídala již zelené oblasti a v průběhu fermentace lze dle dat pozorovat klesající tendenci. U vodního kefiru z vícedruhové zeleninové šťávy byly naměřeny hodnoty  $a^*$  v červené oblasti, což odpovídá charakteru suroviny. Hodnoty  $b^*$  se u vodního kefiru ze zelné šťávy pohybovaly ve žluté oblasti a nedocházelo k příliš významným změnám. U vodního kefiru z vícedruhové zeleninové šťávy byl zaznamenán určitý nárůst hodnot  $b^*$ , které odpovídaly rovněž žluté oblasti. Tyto změny lze přisuzovat obsahu organických kyselin, které mění pH nápoje, a tím i charakter barvy produktu. Nebyly provedeny studie týkající se měření barvy u vzorků vodního kefiru ze zelné a z vícedruhové zeleninové šťávy.

#### 6.4 Výsledky stanovení aktivity vody

Aktivita vody je u potravin velmi důležitým parametrem, především z hlediska jejich trvanlivosti, kvality a bezpečnosti. Aktivita vody se značí  $a_w$  a jedná se o bezrozměrnou veličinu. Je popisována jako poměr tlaku vodní páry potraviny ku tlaku vodní páry destilované vody při dané teplotě. Hodnoty  $a_w$  se pohybují v rozmezí 0 (suchá potravina) až 1 (destilovaná voda). Jedná se o vodu dostupnou pro mikroorganismy, ať již žádoucí, nebo kontaminující (Čopíková et al., 2006).

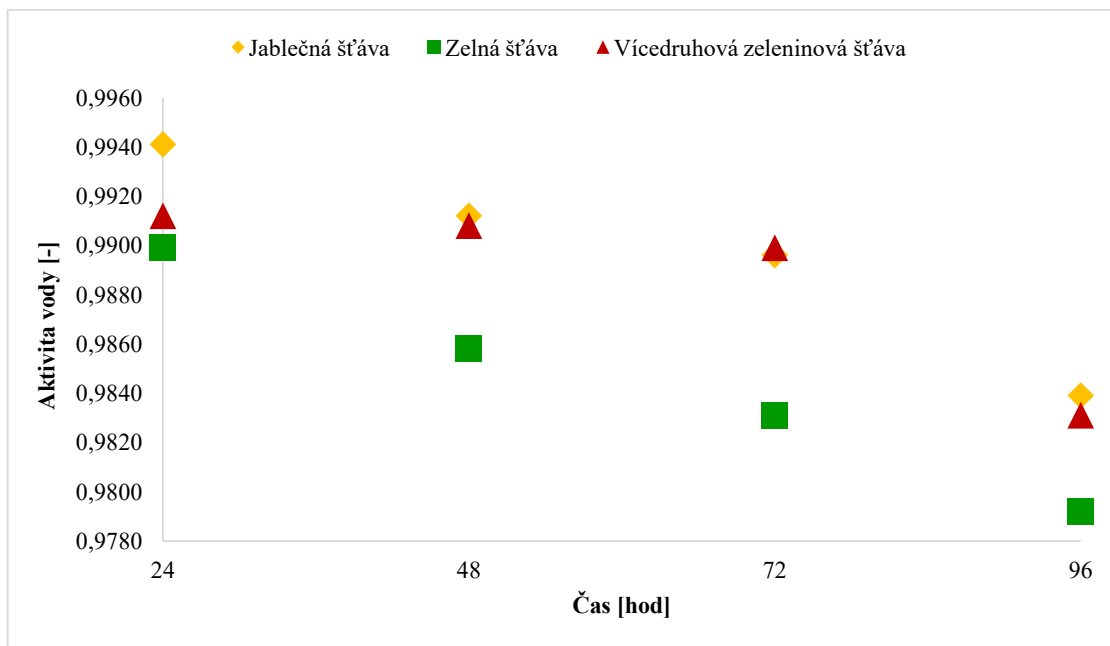
Na následujícím grafu (Obrázek 21.) je znázorněn vývoj aktivity vody v průběhu kvašení vzorků kombuchy z čaje a ze zeleninových šťáv.



**Obrázek 21.** Vývoj aktivity vody během fermentace vzorků kombuchy z černého čaje a zeleninových šťáv.

Aktivita vody vzorků nápoje kombucha měla ve všech třech případech velmi mírný pokles. U vzorků byla nejvyšší hodnota naměřena vždy první den fermentace, přičemž u černého čaje byla vyšší než u zbylých dvou vzorků zeleninových šťáv.

Změna hodnot aktivity vody u vzorků vodního kefiru měla velmi podobný průběh jako u kombuchy, tedy v průběhu fermentace klesala. Pravděpodobně byl pokles aktivity vody u vodního kefiru výraznější z důvodu kratší doby fermentace. I přesto se však jednalo o zanedbatelné rozdíly mezi jednotlivými hodnotami u daných vzorků. V rámci studie Dwiloka et al. (2020) byl stanoven obsah vody u vzorku vodního kefiru z kokosové vody. Výstupem tohoto stanovení je velmi nízký pokles hodnot. Lze tedy říct, že došlo rovněž k téměř zanedbatelnému poklesu aktivity vody.



**Obrázek 22.** Vývoj aktivity vody během fermentace vzorků vodního kefiru z jablečné šťávy a zeleninových šťáv.

## 6.5 Vyhodnocení mikrobiologického rozboru

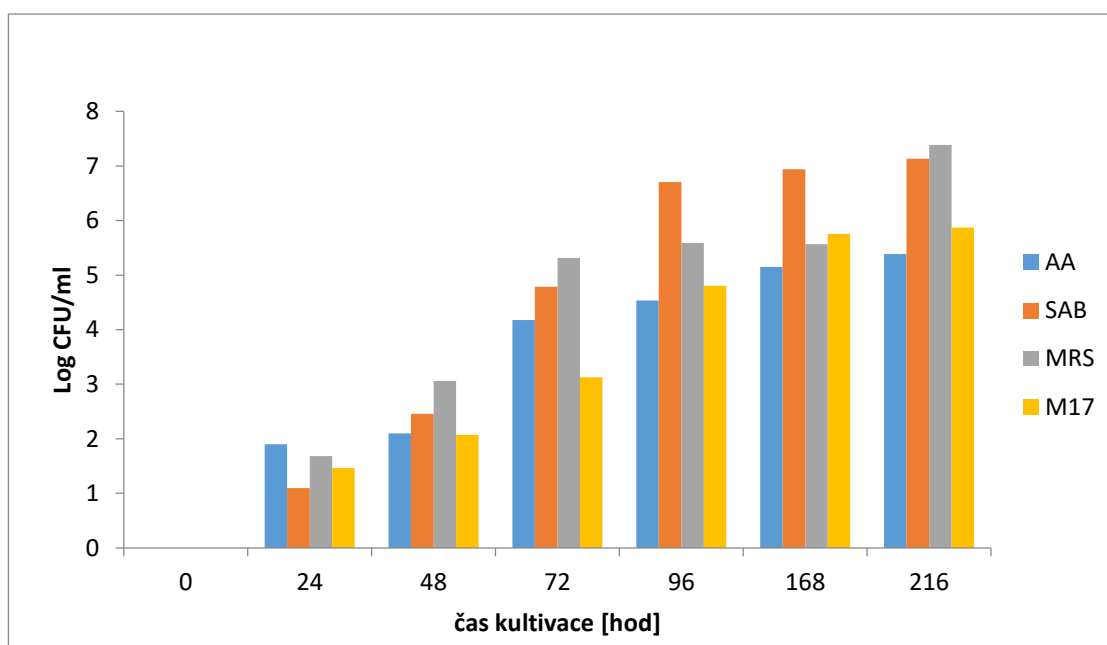
V rámci mikrobiologického rozboru byla provedena detekce mikroorganismů, u kterých byl předpoklad nárůstu v příslušných fermentovaných nápojích, nápoji kombucha a vodní kefir. Jednalo se především o kvasinky a bakterie mléčného (laktobacily, mléčné koky) a bakterie octového kvašení. Dle dostupných studií lze očekávat nárůst bakterií mléčného (hlavně druhy z rodů *Lactobacillus*, *Lactococcus* a další), bakterií octového kvašení (především druhy z rodů *Acetobacter*, a *Gluconobacter* a další) a kvasinek (hlavně druhy *Saccharomyces cerevisiae*, *Kloeckera apiculata*, *Saccharomyces ludwigii*, *Torulopsis delbrueckii*, *Brettanomyces bruxellensis* a další) (Villarreal-Soto et al., 2018).

Rovněž bylo provedeno zaočkování půd, které sloužily ve své podstatě jako kontrola v případě kontaminace nežádoucími skupinami mikroorganismů, jako jsou stafylokoky, enterokoky, clostridia a koliformní bakterie, které jsou charakterizovány jako (potenciálně) rizikové pro lidské zdraví, především pak ve vyšší koncentraci.

Rozdíl v průběhu nárůstu mikroorganismů u sledovaných dvou typů výrobků je patrný. V případě kombuchy byla provedena inokulace pomocí SCOBY a matečné suspenze. Zatímco u vodního kefiru blo potřeba provést předkultivaci z důvodu použití lyofilizované kultury (na základě doporučení výrobce). U kombuchy byl tedy pozorován pozvolný nárůst mikroorganismů v daném prostředí, zatímco u vodního kefiru byly již v čase 0

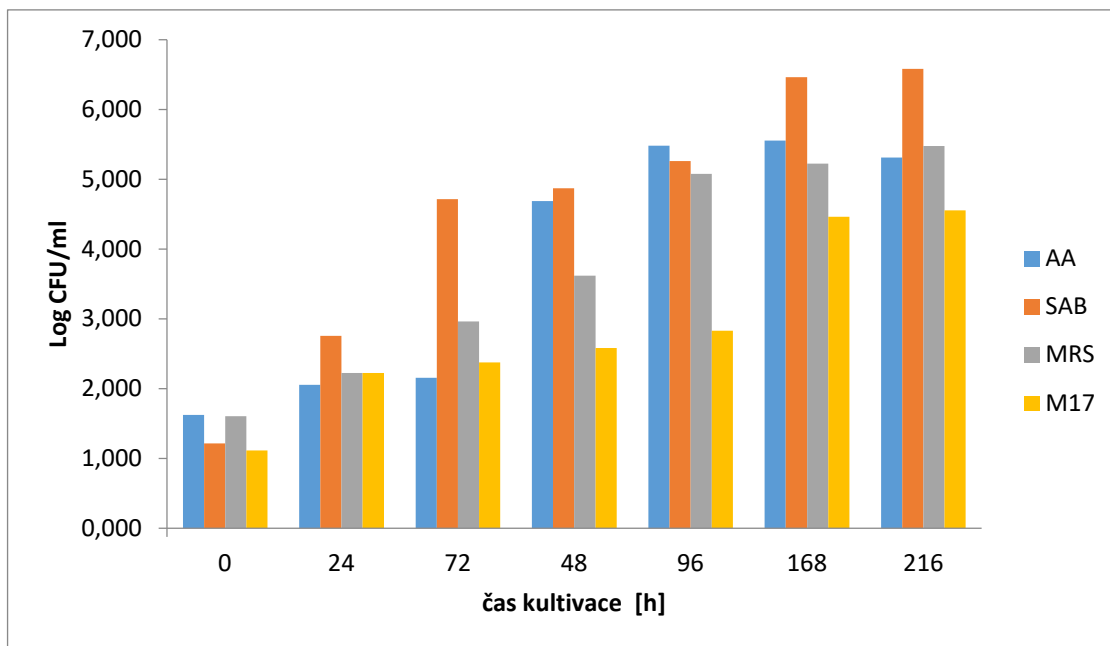
detekovány poměrně vysoké hodnoty CFU/ml. Jde však, vzhledem k poměru matečné kultury a celkovému množství prostředí, o očekávaný jev.

Dále jsou uvedeny grafy pro každý nápoj, tedy kombuchu z černého čaje a ze zeleninových šťáv a vodní kefir z jablečné šťávy a ze zeleninových šťáv. Tyto grafy uvádí vývoj počtu mikroorganismů (resp. logaritmu hodnot) v ml nápoje během času fermentace. Grafy vždy obsahují jen půdy, u kterých byl zaznamenán kontinuální nárůst mikroorganismů. Na ostatních médiích nebyl pozorován nárůst, tedy nebyly detekovány tyto skupiny mikroorganismů: stafylokoky (MSA), enterokoky (SB), klostridia (RCB), ani koliformní bakterie (Endo).



**Obrázek 23.** Nárůst acetobakterií (AA), kvasinek a plísní (SAB), laktokoků (M17) a laktobacilů (MRS) v čase (h) během fermentace kombuchy z černého čaje.

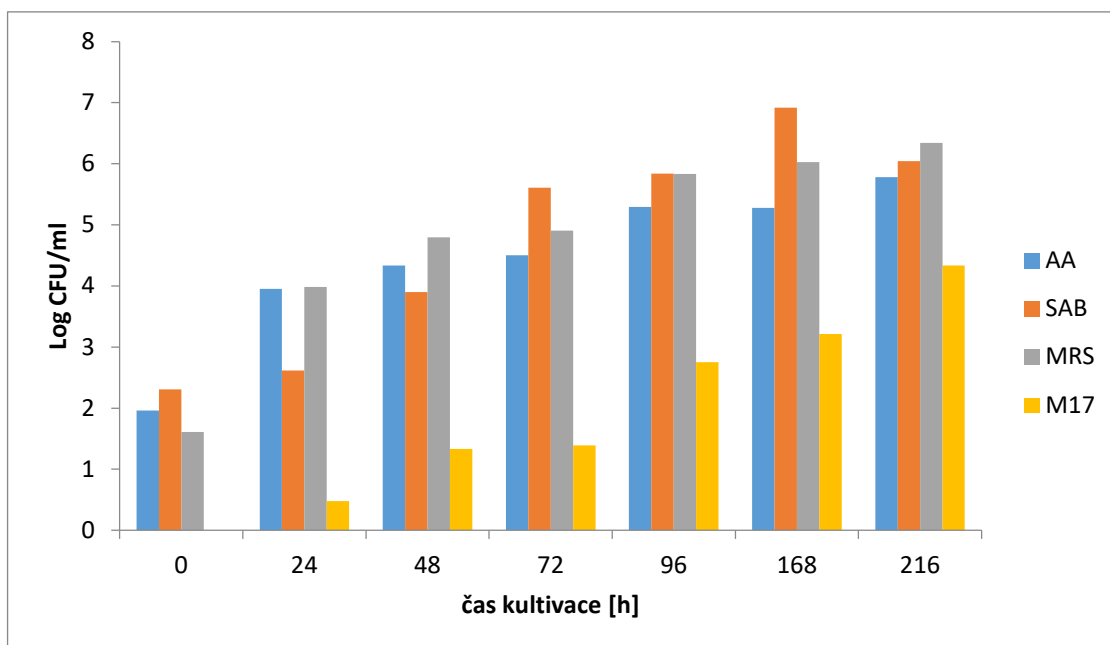
Během fermentace došlo nejvíce k nárůstu kolonií laktobacilů (MRS) a kvasinek (SAB). Rovněž byly již po 24 h fermentace detekovány acetobakterie a mléčné koky. Nárůst u těchto skupin mikroorganismů (acetobakterií a mléčných koků) byl spíše pozvolný.



**Obrázek 24.** Nárůst acetobakterií (AA), kvasinek a plísní (SAB), laktokoků (M17) a laktobacilů (MRS) v čase (h) během fermentace kombuchy ze zelné šťávy.

Na půdách AA, SAB, MRS a M17 byl již v čase 0 pozorován nárůst kolonií mikroorganismů. Nejvíce byly přítomny acetobakterie a laktobacily. To má pravděpodobně souvislost s charakterem původní suroviny, tedy zelné šťávy, která pocházela z již mléčně kvašeného zelí.

Během fermentace došlo k nejvýraznějšímu nárůstu na médiu SAB, tedy v případě kvasinek. Dále pak i na médiu MRS a AA bylo zaznamenáno pozvolné navyšování počtu mikroorganismů (CFU/ml). Na médiu M17 byl detekován rovněž pozvolný nárůst mléčných koků.

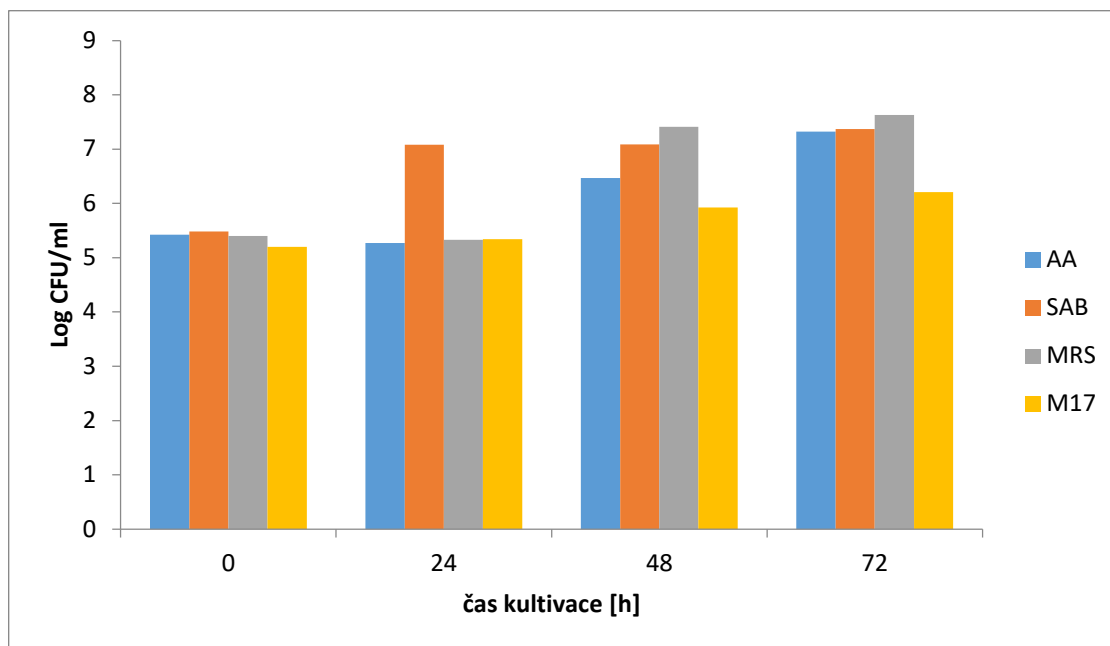


**Obrázek 25.** Nárůst acetobakterií (AA), kvasinek a plísní (SAB), laktokoků (M17) a laktobacilů (MRS) v čase (h) během fermentace kombuchy z vícedruhovové zeleninové šťávy.

U vzorku kombuchy z vícedruhovové zeleninové šťávy byl pozorován nejvýznamnější nárůst kvasinek (SAB) v porovnání s ostatními skupinami mikroorganismů v průběhu fermentace. Nárůst na médiích AA a MRS, tedy acetobakterií a laktobacilů, byl pozorován opět velmi podobný trend. V případě mléčných koků (M17) došlo k mírnějšímu nárůstu, kdy poprvé byl detekován až po 24 h, na rozdíl od ostatních skupin mikroorganismů.

Z komplexního hlediska, nejrovnoměrnější nárůst skupin mikroorganismů byl zaznamenán v případě černého čaje, konkrétně u laktobacilů a kvasinek. Ve srovnání s dalšími kultivačními prostředími, zeleninovými šťávami, lze říci, že v zelné šťávě byl nejlépe vyhodnocen nárůst kvasinek (SAB), acetobakterií (AA) a laktobacilů (MRS). Nárůst mléčných koků byl v tomto prostředí nejmírnější ve srovnání s jinými médii u vzorku kombuchy ze zelné šťávy.

Vzorek kombuchy z vícedruhovové zeleninové šťávy by se dal vyhodnotit jako velmi vhodné prostředí pro růst acetobakterií, kvasinek i laktobacilů. Ovšem je potřeba brát v úvahu také fakt, že jisté počty těchto skupin mikroorganismů byly v tomto vzorku již díky vstupní surovině, vícedruhovové zeleninové šťávě, která byla vyrobena a konzervována mléčnou fermentací.

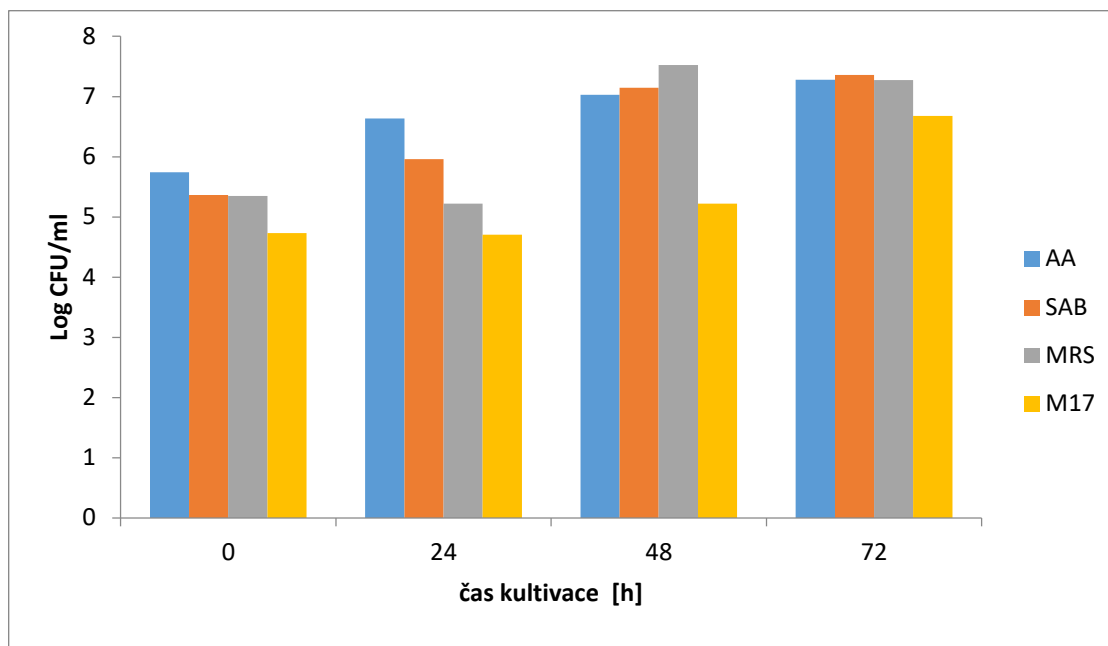


**Obrázek 26.** Nárůst acetobakterií (AA), kvasinek a plísní (SAB), laktokoků (M17) a laktobacilů (MRS) v čase (h) během fermentace vodního kefiru z jablečné šťávy.

Z výše uvedeného grafu (Obrázek 26.) je patrný výraznější nárůst kvasinek již během prvních 24 hodin. Nárůst laktobacilů (MRS) a acetobakterií (AA) měl v tomto případě velmi podobný charakter, kdy k vyššímu nárůstu došlo po 48 h fermentace. Nárůst mléčných koků byl pozvolný.

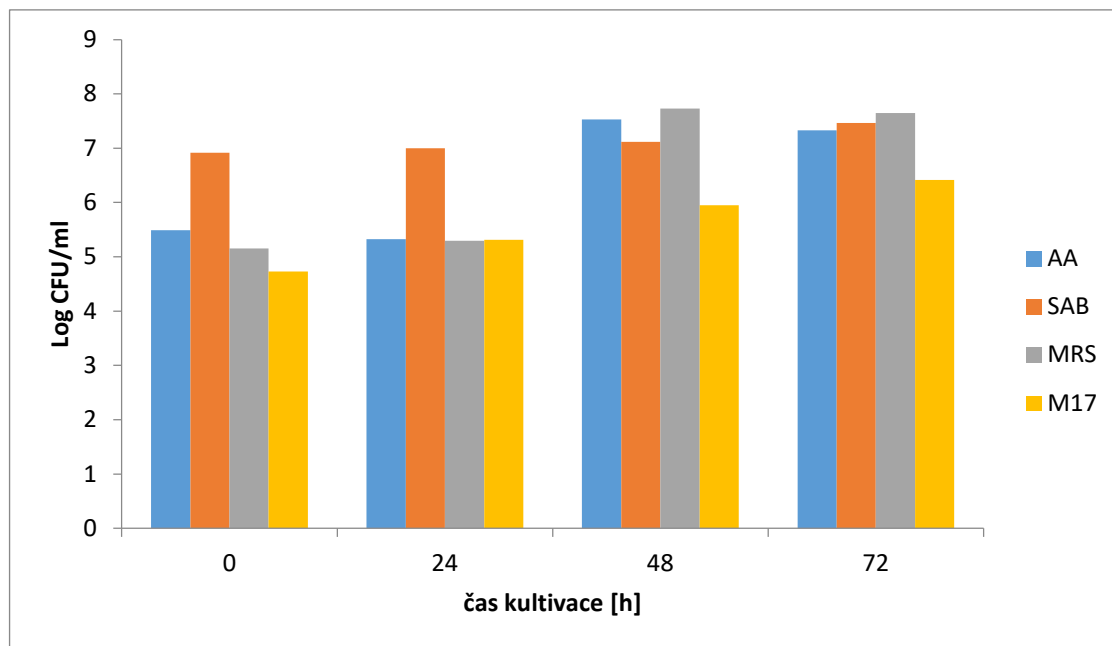
V rámci studie Hikmetoglu et al. (2020) byl stanovován celkový počet konkrétních druhů laktobacilů v kefiru na bázi mléka. U všech sledovaných mléčných bakterií byl zaznamenán nárůst za daných podmínek fermentace. Fiorda et al. (2017) ve své studii uvádějí nejčastější druhy bakterií a kvasinek vyskytujících se ve vodním kefiru vyrobeném z tradičních surovin. V případě kvasinek lze říci, že ve srovnání s mléčným kefirem je zpravidla více přítomen rod *Saccharomyces*, *Lanchancea* a *Pichia*. Kdežto u kefiru na bázi mléka jsou to především kvasinky rodů *Candida* a *Kluveromyces*. Bakterie mléčného kvašení, které se nejvíce vyskytují ve vodním kefiru, jsou pak rody *Lactobacillus*, *Leuconostoc* a *Acetobacter*, což koreluje s uvedenými grafy a trendy nárůstu daných druhů mikroorganismů (Fiorda et al., 2017).





**Obrázek 27.** Nárůst acetobakterií (AA), kvasinek a plísni (SAB), laktokoků (M17) a laktobacilů (MRS) v čase (h) během fermentace vodního kefiru ze zelné šťávy.

V případě vzorku vodního kefiru ze zelné šťávy byl pozorován podobný charakter nárůstu acetobakterií (AA), laktobacilů (MRS) a kvasinek (SAB). V tomto případě to má pravděpodobně opět souvislost s charakterem původní suroviny, tedy zelné šťávy, která byla vyrobena z mléčně zkvašeného zelí. Nárůst mléčných koků (M17) byl v případě tohoto vzorku nejnižší.



**Obrázek 28.** Nárůst acetobakterií (AA), kvasinek a plísní (SAB), laktokoků (M17) a laktobacilů (MRS) v čase (h) během fermentace vodního kefiru z vícedruhové zeleninové šťávy.

Z výše uvedeného grafu (Obrázek 28.) vyplývá, že počet kvasinek byl po celou dobu přibližně stejný. U ostatních skupin mikroorganismů docházelo k pozvolnému nárůstu po celou dobu fermentace. U laktobacilů a acetobakterií byly výraznější nárůsty příslušných kolonií detekovány po 48 h fermentace. Kdežto v případě mléčných koků byl pozorován opět spíše pozvolný nárůst.

Z celkového pohledu byl nárůst všech skupin mikroorganismů v případě vzorků vodního kefiru rovnoměrný. Stejně jako u vzorků kombuchy, i zde by se dalo říci, že nejlépe byl vyhodnocen nárůst kvasinek (SAB), dále pak acetobakterií (AA) a laktobacilů (MRS). V případě mléčných koků byl ve všech třech vzorcích vodního kefiru pozorován mírnější nárůst.

V rámci studie Koh et al. (2019) byly u vodního kefiru z dýňové šťávy sledovány stejné skupiny mikroorganismů, jako v této práci, tedy acetobakterie, kvasinky, mléčné koky a laktobacily. Byly vyrobeny vzorky vodního kefiru a následně proveden skladovací pokus, který trval 28 dní, a produkty byly skladovány při teplotě 4 °C. Byla sledována vitalita přítomných skupin mikroorganismů. Poznatky získané v této studii se shodují s námi zjištěnými výsledky, a sice že nejlepší byl nárůst kvasinek, laktobacilů a acetobakterií.

## 7 ZÁVĚR

Tato práce se zabývala netradičními fermentovanými nápoji, kombuchou a vodním kefirem. V teoretické části jsou shrnuty dostupné informace o historii a současném stavu řešené problematiky, o chemickém složení, výrobě a symbiotických kulturách, využívaných pro výrobu zmíněných nápojů. V rámci praktické části pak byly vyrobeny modelové vzorky kombuchy a vodního kefiru, které byly podrobeny poměrně rozsáhlé analýze.

Na základě výsledků praktické části této diplomové práce lze konstatovat, že:

- pH se měnilo pouze v případě vzorku kombuchy z černého čaje, pouze během prvních 24 hodin fermentace. U ostatních vzorků, kombuchy ze zelné a z vícedruhovité zeleninové šťávy a u všech tří vzorků vodního kefiru nebyl zaznamenán významné změny v hodnotách pH během fermentačního procesu.
- U všech vzorků kombuchy i vodního kefiru nebyly v případě TDS zaznamenány významné změny hodnot. Tento fakt se shoduje s výsledky v dostupných studiích, kde se autoři věnovali výzkumu tradičních prostředí pro výrobu těchto nápojů, tedy čajům a různým druhům ovocných a zeleninových šťáv.
- Refraktometrická sušina byla dalším měřeným parametrem, u kterého nebyla v případě vzorků kombuchy zaznamenána významná změna. U vzorků vodního kefiru refraktometrická sušina v průběhu fermentace klesala.
- Dále byla sledována hustota a obsah etanolu. Hustota se u všech šesti vzorků během fermentace příliš neměnila. Co se týče obsahu etanolu, nárůst byl zaznamenán u vzorků kombuchy z černého čaje a z vícedruhovité zeleninové šťávy. U kombuchy ze zelné šťávy byl obsah etanolu konstantní. Naopak u vodního kefiru byl ve všech vzorcích poměrně vysoký nárůst obsahu etanolu souhlasně s dostupnými studiemi.
- Z reologického hlediska, kdy byly sledovány parametry jako zdánlivá viskozita a smykové napětí, bylo zjištěno, že kombucha z černého čaje a ze zelné šťávy a vodní kefir z jablečné a ze zelné šťávy mají povahu pseudoplastických kapalin, kdežto kombucha i vodní kefir z vícedruhovité zeleninové šťávy se chovají jako dilatantní kapaliny.

- U parametrů barvy a aktivity vody nebyly během fermentace zaznamenány významné změny.
- V rámci mikrobiologického rozboru byl u obou symbiotických kultur zaznamenán na selektivně diagnostických půdách nárůst skupin mikroorganismů, které jsou jejich součástí (acetobakterie, laktobacily, mléčné koky, kvasinky). Naopak nebyly detekovány mikroorganismy, které by ohrožovaly mikrobiální jakost těchto nápojů (enterokoky, stafylokoky, koliformní bakterie a klostridia).

Tato diplomová práce doplňuje mezery v literatuře, které se týkají neprozkoumaných matric (zeleninových šťáv). Tyto prototypy nových výrobků byly navíc popsány z hlediska fyzikálně-chemických, reologických i mikrobiologických.

Tato oblast netradičních fermentovaných nápojů (nealkoholických nebo mírně alkoholických) vyrobených pomocí kultury SCOBY a zrn vodního kefiru je stále poměrně málo prozkoumána z hlediska různých matric a odlišných parametrů výroby. Je zde tedy prostor k dalším experimentům.

## SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- AÇIK, Murat, Funda Pınar ÇAKIROĞLU, Murat ALTAN a Tuğçe BAYBO. Alternative source of probiotics for lactose intolerance and vegan individuals: sugary kefir. *Food Science and Technology* [online]. 40. Scielo, 2020 [cit. 2021-4-25]. ISSN 0101-2061. Dostupné z: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0101-20612020000300523&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-20612020000300523&nrm=iso)
- AHMED, Rania F., Mohamed S. HIKAL a Khadiga A. ABOU-TALEB. Biological, chemical and antioxidant activities of different types Kombucha. *Annals of Agricultural Sciences* [online]. 2020, (65), 35-41 [cit. 2021-02-08]. ISSN 0570-1783. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.aos.2020.04.001>
- ALVES, Vanessa, Thamarys SCAPINI, Aline Frumi CAMARGO, et al. Development of fermented beverage with water kefir in water-soluble coconut extract (*Cocos nucifera* L.) with inulin addition. *LWT* [online]. 2021, (145) [cit. 2021-04-21]. ISSN 0023-6438. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S002364382100517X>
- ASHURST, Philip R. *Carbonated Beverages* [online]. Reference Module in Food Science. Elsevier, 2016 [cit. 2021-04-11]. ISBN 978-0-08-100596-5. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780081005965032406>
- ATALAR, Ilyas. Functional kefir production from high pressure homogenized hazelnut milk. *LWT* [online]. 2019, **107**, 256-263 [cit. 2021-5-11]. ISSN 0023-6438. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S002364381930194X>
- AYED, L., S. BEN ABID a M. HAMDI. Development of a beverage from red grape juice fermented with the Kombucha consortium. *Annals of Microbiology* [online]. 67. 2017, (1), 111-121 [cit. 2021-04-20]. Dostupné z: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-84997523717&doi=10.1007%2fs13213-016-1242-2&partnerID=40&md5=f73b262ca0d2308092adf73f2207b818>
- BAMFORTH, Charles W. a David J. COOK. *Food, fermentation and micro-organisms* [online]. Second edition. Hoboken, NJ : John Wiley & Sons, 2019, 1

online zdroj. ISBN 9781119557456. Dostupné z: <https://proxy.k.utb.cz/login?url=https://onlinelibrary.wiley.com/doi/book/10.1002/9781119557456> [cit. 2021-02-08].

- BHATTACHARYA, Semantee, Ratan GACHHUI a Parames C. SIL. Effect of Kombucha, a fermented black tea in attenuating oxidative stress mediated tissue damage in alloxan induced diabetic rats. *Food and Chemical Toxicology* [online]. 2013, **60**, 328-340 [cit. 2021-02-08]. ISSN 0278-6915. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.07.051>
- BOEKHOUT, T. a V. ROBERT. 12.3 Benefits of Yeasts in Non-Alcoholic Beverages. *Yeasts in Food - Beneficial and Detrimental Aspects*. Elsevier, 2003, s. 323-324. ISBN 978-1-85573-706-8. Dostupné také z: <https://app.knovel.com/hotlink/khtml/id:kt00C7JV95/yeasts-in-food-beneficial/benefits-yeasts-in-non>
- BROWN, Mary J., Muhammad Atif AMEER a Kevin BEIER. *Vitamin B6 Deficiency* [online]. StatPearls Publishing, Treasure Island, 2020 [cit. 2021-04-23]. Dostupné z: <http://europepmc.org/books/NBK470579>
- BUBKO, Irena, Beata M. GRUBER a Elżbieta L. ANUSZEWSKA. The role of thiamine in neurodegenerative diseases. *Postepy higieny i medycyny doswiadczalnej* [online]. 2015, (69), 1096—1106 [cit. 2021-04-23]. ISSN 1732-2693. Dostupné z: <http://europepmc.org/abstract/MED/26400895>
- CARDOSO, Rodrigo Rezende, Rafaela Oliveira NETO, Carolina THOMAZ DOS SANTOS D'ALMEIDA, et al. Kombuchas from green and black teas have different phenolic profile, which impacts their antioxidant capacities, antibacterial and antiproliferative activities. *Food Research International* [online]. 2020, (128) [cit. 2021-04-19]. ISSN 0963-9969. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0963996919306684>
- COMA, M. Eugenia, Mercedes A. PELTZER, Juan F. DELGADO a Andrés G. SALVAY. Water kefir grains as an innovative source of materials: Study of plasticiser content on film properties. *European Polymer Journal* [online]. 2019, (120) [cit. 2021-04-21]. ISSN 0014-3057. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014305719313825>

- ČOPÍKOVÁ, Jana, Oldřich LAPČÍK, Jitka MORAVCOVÁ a Pavel DRAŠAR. Cukerná nesacharosová sladidla a příbuzné látky. *Chemické listy* [online]. 2006, (100), 778–783 [cit. 2021-5-12]. Dostupné z: [http://w.chemicke-listy.cz/docs/full/2006\\_09\\_778-783.pdf](http://w.chemicke-listy.cz/docs/full/2006_09_778-783.pdf)
- DESTRO, Tainá Miranda, Denise DA FONTOURA PRATES, Lycio Shinji WATANABE, Sandra GARCIA, Guilherme BIZ a Wilma Aparecida SPINOSA. Organic brown sugar and jaboticaba pulp influence on water kefir fermentation. *Ciência e Agrotecnologia* [online]. Scielo, 2019, 43 [cit. 2021-5-5]. ISSN 1413-7054. Dostupné z: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1413-70542019000100402&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-70542019000100402&nrm=iso)
- DOMSKIENE, J., F. SEDERAVICIUTE a J. SIMONAITYTE. Kombucha bacterial cellulose for sustainable fashion. *International Journal of Clothing Science and Technology* [online]. 31. 2019, (5), 644-652 [cit. 2021-04-20]. ISSN 0955-6222. Dostupné z: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85068404607&doi=10.1108%2fIJCST-02-2019-0010&partnerID=40&md5=80bd234c37daaf36d129d70a0bec0370>
- DONLAO, Natthawuddhi a Yukiharu OGAWA. The influence of processing conditions on catechin, caffeine and chlorophyll contents of green tea (*Camelia sinensis*) leaves and infusions. *LWT* [online]. 116. 2019 [cit. 2021-04-07]. ISSN 0023-6438. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643819309090>
- DWILOKA, Bambang, Heni RIZQIATI a Bhakti SETIANI. Physicochemical and sensory characteristics of green coconut (*Cocos nucifera* L.) water kefir. *International Journal of Food Studies* [online]. 9. 2020, 346-359 [cit. 2021-5-12]. Dostupné z: <https://www.iseki-food-ejournal.com/ojs/index.php/e-journal/article/view/793>
- EGEA, Mariana Buranelo, Daiane COSTA DOS SANTOS, Josemar Gonçalves DE OLIVEIRA FILHO, Joana DA COSTA ORES, Katiuchia Pereira TAKEUCHI a Ailton Cesar LEMES. A review of nondairy kefir products: their characteristics and potential human health benefits. *Critical Reviews in Food Science and*

*Nutrition* [online]. Taylor & Francis, 2020 [cit. 2021-4-25]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1844140>

- FELLS, Lea, Frank JAKOB, Rudi F. VOGEL a Daniel WEFERS. Structural characterization of the exopolysaccharides from water kefir. *Carbohydrate Polymers* [online]. 2018, (189), 296-303 [cit. 2021-02-08]. ISSN 0144-8617. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.02.037>
- FIORDA, Fernanda Assumpção, Gilberto VINICIUS DE MELO PEREIRA, Vanete THOMAZ-SOCCOL, Sudip Kumar RAKSHIT, Maria Giovana Binder PAGNONCELLI, Luciana Porto de Souza VANDENBERGHE a Carlos Ricardo SOCCOL. Microbiological, biochemical, and functional aspects of sugary kefir fermentation - A review. *Food Microbiology* [online]. 2017, (66), 86-95 [cit. 2021-04-12]. ISSN 0740-0020. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0740002017301120>
- FRIAS, Juana, Cristina VILLALUENGA a Elena PEÑAS. 1.2 Types of Fermented Foods and Beverages. *Fermented Foods in Health and Disease Prevention*. Elsevier, 2017, s. 4-7. ISBN 978-0-12-802309-9. Dostupné také z: <https://app.knovel.com/hotlink/khtml/id:kt0112TQ9L/fermented-foods-in-health/types-fermented-foods>
- GRAMZA-MICHAŁOWSKA, A. Caffeine in tea *Camellia sinensis* - Content, absorption, benefits and risks of consumption. *The journal of nutrition, health & aging* [online]. 2014, (18), 143-149 [cit. 2021-04-07]. ISSN 1760-4788. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s12603-013-0404-1>
- GRAMZA-MICHAŁOWSKA, Anna, Joanna KOBUS-CISOWSKA, Dominik KMIĘCIK, Józef KORCZAK, Barbara HELAK, Krzysztof DZIEDZIC a Danuta GÓRECKA. Antioxidative potential, nutritional value and sensory profiles of confectionery fortified with green and yellow tea leaves (*Camellia sinensis*). *Food Chemistry* [online]. 2016, (211), 448-454 [cit. 2021-04-07]. ISSN 0308-8146. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814616307294>
- GREENWALT, C J, K. H. STEINKRAUS a R. A. LEDFORD. Kombucha, the fermented tea: microbiology, composition, and claimed health effects. *Journal of food protection* [online]. 63. 2000, (7), 976-981 [cit. 2021-4-25]. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10914673/>



- GULITZ, Anna, Jasmin STADIE, Mareike WENNING, Matthias A. EHRMANN a Rudi F. VOGEL. The microbial diversity of water kefir. *International Journal of Food Microbiology* [online]. 3. 2011, (151), 284-288 [cit. 2021-02-08]. ISSN 0168-1605. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.09.016>
- HAMPTON, Jessica, Cindy TANG, Athira Jayasree SUBHASH a Luca SERVENTI. Assessment of pear juice and puree as a fermentation matrix for water kefir. *Journal of Food Processing and Preservation* [online]. 45. 2021, (3) [cit. 2021-4-25]. Dostupné z: <https://ifst.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/jfpp.15223>
- HŘIVNA, Luděk, 2014: Technologie sacharidů. Vyd. 1. Brno: Mendelova univerzita v Brně, 157 s. ISBN 978-80-7509-022-5.
- HÜPSCH-MARZEC, Hanna, Roman PAWLAK a Dariusz SKABA. Understanding vitamin B12. *Journal of Stomatology* [online]. 72. 2019, (4), 184-189 [cit. 2021-4-25]. ISSN 0011-4553. Dostupné z: <http://dx.doi.org/10.5114/jos.2019.91237>
- CHAKRAVORTY, Somnath, Semantee BHATTACHARYA, Antonis CHATZINOTAS, Writachit CHAKRABORTY, Debanjana BHATTACHARYA a Ratan GACHHUI. Kombucha tea fermentation: Microbial and biochemical dynamics. *International Journal of Food Microbiology* [online]. 2016(220), 63-72 [cit. 2021-02-08]. ISSN 0168-1605. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.12.015>
- IHSANI, Nisa, Nelis HERNAHADINI a Muhammad FAUZI. The variation of ethanol concentration and kombucha characterization on several incubation periods. *Journal of Physics: Conference Series* [online]. 1764. 2021, (1) [cit. 2021-04-23]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1088/1742-6596/1764/1/012008>
- IVANIŠOVÁ, Eva, Kristína MEŇHARTOVÁ, Margarita TEREŇTJEVA, Ľuboš HARANGOZO, Attila KÁNTOR a Miroslava KAČÁNIOVÁ. The evaluation of chemical, antioxidant, antimicrobial and sensory properties of kombucha tea beverage. *Journal of Food Science and Technology* [online]. 2020, (57), 1840–1846 [cit. 2021-04-22]. ISSN 0975-8402. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s13197-019-04217-3>

- JAKUBCZYK, Karolina, Justyna KAŁDUŃSKA, Joanna KOCHMAN a Katarzyna JANDA. Chemical Profile and Antioxidant Activity of the Kombucha Beverage Derived from White, Green, Black and Red Tea. *Antioxidants* [online]. 9. 2020, (5) [cit. 2021-04-21]. ISSN 2076-3921. Dostupné z: <https://www.mdpi.com/2076-3921/9/5/447>
- JAYABALAN, Rasu, Radomir V. MALBAŠA, Eva S. LONČAR, Jasmina S. VITAS a Muthuswamy SATHISHKUMAR. *A Review on Kombucha Tea—Microbiology, Composition, Fermentation, Beneficial Effects, Toxicity, and Tea Fungus* [online]. *Comprehensive reviews in Food Science and Food Safety*, 2014, (4), 538-550 [cit. 2021-04-03]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12073>
- KAPP, Julie M. a Walton SUMNER. Kombucha: a systematic review of the empirical evidence of human health benefit. *Annals of Epidemiology* [online]. 2019, (30), 66-70 [cit. 2021-04-12]. ISSN 1047-2797. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1047279718307385>
- KHOSRAVI, S., M. SAFARI, Z. EMAM-DJOMEH a M.-T. GOLMAKANI. Development of fermented date syrup using Kombucha starter culture. *Journal of Food Processing and Preservation* [online]. 43. 2019, (2) [cit. 2021-04-20]. Dostupné z: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85060226840&doi=10.1111%2fjfp.13872&partnerID=40&md5=512ba80eb26e0af0e617740e7753ab41>
- KIM, Jae Young, Hye Jung SHIN, Hyungjin Lukas KIM, Hoon PARK, Phil Kun KIM, Steven PARK a Sae Hun KIM. The Compositional and Functional Properties of Kombucha: A Literature Review. *Food Engineering Progress* [online]. 24. Korean Society for Food Engineering, 2020, (1), 1-14 [cit. 2021-04-22].
- KIM, Juyoung a Koushik ADHIKARI. Current Trends in Kombucha: Marketing Perspectives and the Need for Improved Sensory Research. *Beverages* [online]. 6. 2020, (1) [cit. 2021-04-19]. ISSN 2306-5710. Dostupné z: <https://www.mdpi.com/2306-5710/6/1/15>
- KOH, Yin Wee, U. UTHUMPORN, Ahmad ROSMA, Effarizah MOHD ESAH a Wan ROSLI WAN ISHAK. Assessment of yeast, acetic and lactic acid bacteria isolated from water kefir grains and their application as starter culture in the

production of fermented pumpkin-based water kefir beverages in improving gastrointestinal tract digestive tolerance and inhibition against  $\alpha$ -glucosidase. *International Food Research Journal* [online]. 2019, **26**(2), 429-439 [cit. 2021-5-13]. Dostupné z: [https://www.researchgate.net/publication/333558488\\_Assessment\\_of\\_yeast\\_acetic\\_and\\_lactic\\_acid\\_bacteria\\_isolated\\_from\\_water\\_kefir\\_grains\\_and\\_their\\_application\\_as\\_starter\\_culture\\_in\\_the\\_production\\_of\\_fermented\\_pumpkin-based\\_water\\_kefir\\_beverages\\_in\\_impr/citations](https://www.researchgate.net/publication/333558488_Assessment_of_yeast_acetic_and_lactic_acid_bacteria_isolated_from_water_kefir_grains_and_their_application_as_starter_culture_in_the_production_of_fermented_pumpkin-based_water_kefir_beverages_in_impr/citations)

- KOZYROVSKA, N. O., O. M. REVA, V. B. GOGINYAN a J.-P. DE VERA. Kombucha microbiome as a probiotic: a view from the perspective of post-genomics and synthetic ecology. *Biopolym. Cell* [online]. 28. 2012, (2), 103-113 [cit. 2021-04-23]. ISSN 1993-6842. Dostupné z: <http://dx.doi.org/10.7124/bc.000034>
- KUMAR, Vikas a Vinod JOSHI. Kombucha: Technology, Microbiology, Production, Composition and Therapeutic Value. *International Journal of Food and Fermentation Technology* [online]. 6. 2016, , 13-24 [cit. 2021-4-26]. ISSN 2277-9396. Dostupné z: <http://www.indianjournals.com/ijor.aspx?target=ijor:ijfft&volume=6&issue=1&article=002>
- LAAVANYA, D., Shivanand SHIRKOLE a P. BALASUBRAMANIAN. Current challenges, applications and future perspectives of SCOBY cellulose of Kombucha fermentation. *Journal of Cleaner Production* [online]. 2021, (295) [cit. 2021-04-08]. ISSN 0959-6526. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0959652621006740>
- LAUREYS, D. a L. DE VUYST. The water kefir grain inoculum determines the characteristics of the resulting water kefir fermentation process. *Journal of applied microbiology* [online]. 2017, 719–732 [cit. 2021-5-10]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/jam.13370>
- LAUREYS, David a Luc DE VUYST. Microbial Species Diversity, Community Dynamics, and Metabolite Kinetics of Water Kefir Fermentation. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. American Society for Microbiology

Journals, 2014, (80), 2564-2572 [cit. 2021-02-09]. ISSN 0099-2240. Dostupné z: <https://aem.asm.org/content/80/8/2564>

- LAUREYS, David, Amandine VAN JEAN, Jean DUMONT a Luc DE VUYST. Investigation of the instability and low water kefir grain growth during an industrial water kefir fermentation process. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. 2017, (101), 2811–2819 [cit. 2021-4-25]. Dostupné z: <https://doi-org.proxy.k.utb.cz/10.1007/s00253-016-8084-5>
- LAUREYS, David, Frédéric LEROY, Tom HAUFFMAN, Marc RAES, Maarten AERTS, Peter VANDAMME a Luc DE VUYST. The Type and Concentration of Inoculum and Substrate as Well as the Presence of Oxygen Impact the Water Kefir Fermentation Process. *Frontiers in Microbiology* [online]. 12. 2021 [cit. 2021-4-25]. ISSN 1664-302X. Dostupné z: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2021.628599>
- LAUREYS, David, Maarten AERTS, Peter VANDAMME a Luc DE VUYST. Oxygen and diverse nutrients influence the water kefir fermentation process. *Food Microbiology* [online]. 2018, (73), 351-361 [cit. 2021-02-08]. ISSN 0740-0020. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.02.007>
- LEAL, Jessica Martínez, Lucía Valenzuela SUÁREZ, Rasu JAYABALAN, Joselina Huerta OROS a Anayansi ESCALANTE-ABURTO. A review on health benefits of kombucha nutritional compounds and metabolites. *CyTA - Journal of Food* [online]. 16. Taylor & Francis, 2018, (1), 390-399 [cit. 2021-4-25]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1080/19476337.2017.1410499>
- LIM, X. X., W. Y. KOH, U. UTHUMPORN, M. MAIZURA a W. I. W. ROSLI. The development of legume-based yogurt by using water kefir as starter culture. *International Food Research Journal* [online]. 26. 2019, (4), 1219-1228 [cit. 2021-04-21]. ISBN 19854668. Dostupné z: <https://www-proquest-com.proxy.k.utb.cz/scholarly-journals/development-legume-based-yogurt-using-water-kefir/docview/2308511177/se-2?accountid=15518>
- LYNCH, Kieran M., Stuart WILKINSON, Luk DAENEN a Elke K. ARENDT. *An update on water kefir: Microbiology, composition and production* [online]. 345. 2021, , 109-128 [cit. 2021-04-10]. ISSN 0168-1605. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160521000878>

- MACEDO DANTAS COELHO, Raquel, Aryelle LEITE DE ALMEIDA, Rafael QUEIROZ GURGEL DO AMARAL, Robson NASCIMENTO DA MOTA a Paulo Henrique M. DE SOUSA. Kombucha: Review. *International Journal of Gastronomy and Food Science* [online]. 2020, **22** [cit. 2021-02-07]. ISSN 1878-450X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ijgfs.2020.100272>
- MARANGONI Jr., Luís, Roniérik Pioli VIEIRA a Carlos Alberto Rodrigues ANJOS. Kefiran-based films: Fundamental concepts, formulation strategies and properties. *Carbohydrate Polymers* [online]. 2020, **246** [cit. 2021-02-07]. ISSN 0144-8617. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116609>
- MARSH, Alan J., Orla O'SULLIVAN, Colin HILL, R. Paul ROSS a Paul D. COTTER. Sequence-based analysis of the microbial composition of water kefir from multiple sources. *FEMS Microbiology Letters* [online]. 2013, **348**, 79–85 [cit. 2021-02-07]. ISSN 0144-8617. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/1574-6968.12248>
- MORALES, Diego. Biological activities of kombucha beverages: The need of clinical evidence. *Trends in Food Science & Technology* [online]. 2020, (105), 323-333 [cit. 2021-02-11]. ISSN 0924-2244. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.09.025>
- MOUNJOUENPOU, Pauline, Roger PONKA, Eyenga NGONO, Arielle TCHUISSEU, Eugene E. EHABE a Robert NDJOUENKEU. Physico-chemical and nutritional characterization of cereals brans enriched breads. *Scientific African* [online]. 7. 2020 [cit. 2021-4-25]. ISSN 2468-2276. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2468227619308129>
- NEFFE-SKOCIŃSKA, Katarzyna, Barbara SIONEK, Iwona ŚCIBISZ a Danuta KOŁOŻYŃ-KRAJEWSKA. Acid contents and the effect of fermentation condition of Kombucha tea beverages on physicochemical, microbiological and sensory properties. *CyTA - Journal of Food* [online]. 15. Taylor & Francis, 2017, (4), 601-607 [cit. 2021-5-9]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1080/19476337.2017.1321588>
- PROKOP, Filip. *Vliv viskozity na proudové charakteristiky nenewtonských kapalin*. Praha, 2017. Bakalářská práce. České vysoké učení technické v Praze.

- RAMÍREZ TAPIAS, Y. A., M. A. PELTZER, J.F. DELGADO a A. G. SALVAY. Kombucha Tea By-product as Source of Novel Materials: Formulation and Characterization of Films. *Food and Bioprocess Technology* [online]. 2020, 1166-1180 [cit. 2021-04-20]. ISSN 1935-5149. Dostupné z: <https://www-scopus-com.proxy.k.utb.cz/record/display.uri?eid=2-s2.0-85086006668&origin=resultslist&sort=plf-f&src=s&sid=66b7d2348a7bb96e5e2f4110cb9d1316&sot=b&sdt=b&sl=35&s=TITLE-ABS-KEY%28kombucha+development%29&relpos=5&citeCnt=4&searchTerm>
- RANDAZZO, Walter, Onofrio CORONA, Rosa GUARCELLO, Nicola FRANCESCA, Maria Antonietta GERMANÀ, Hüseyin ERTEN, Giancarlo MOSCHETTI a Luca SETTANNI. Development of new non-dairy beverages from Mediterranean fruit juices fermented with water kefir microorganisms. *Food Microbiology* [online]. 2016, (54), 40-51 [cit. 2021-04-11]. ISSN 0740-0020. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0740002015002038>
- SANGITA, Kumar D., G. NARAYAN a S. HASSARAJANI. Determination of anionic minerals in black and kombucha tea using ion chromatography. *Food Chemistry* [online]. 111. 2008, (3), 784-788 [cit. 2021-5-11]. ISSN 0308-8146. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814608005657>
- SHENG-DUN, Lin, Yang JOAN-HWA, Hsieh YUN-JUNG, Liu EN-HUI a Mau JENG-LEUN. Effect of Different Brewing Methods on Quality of Green Tea. *Journal of Food Processing and Preservation* [online]. 38. 2013, (3), 1234-1243 [cit. 2021-5-11]. Dostupné z: <https://doi-org.proxy.k.utb.cz/10.1111/jfpp.12084>
- SOARES, Marcelo Gomes, Marieli DE LIMA a Vivian CONSUELO. Technological aspects of kombucha, its applications and the symbiotic culture (SCOBY), and extraction of compounds of interest: A literature review. *Trends in Food Science & Technology* [online]. 2021, (110) [cit. 2021-04-12]. ISSN 0924-2244. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0924224421001187>
- SÖZERI, Didem Atik, Başak GÜRBÜZ, Esra BÖLÜK a İbrahim PALABIYIK. Development of vegan kefir fortified with *Spirulina platensis*. *Food*

*Bioscience* [online]. 2021, (42) [cit. 2021-04-21]. ISSN 2212-4292. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2212429221001759>

- TALEBI, Mohsen, Daniel W. ARMSTRONG a Rahul A. PATIL. Examination of the Varied and Changing Ethanol Content of Commercial Kombucha Products. *Food Analytical Methods* [online]. 10. 2017, (12), 4062-4067 [cit. 2021-4-25]. ISSN 1936-976X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s12161-017-0980-5>
- THAKUR, Kiran, Sudhir Kumar TOMAR a Sachinandan DE. Lactic acid bacteria as a cell factory for riboflavin production. *Microbial Biotechnology* [online]. 9. 2016, (4), 441-451 [cit. 2021-04-23]. Dostupné z: <https://sfamjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/1751-7915.12335>
- TORÁN-PEREG, Paula, Blanca DEL NOVAL, Susana VALENZUELA, Josefina MARTINEZ, Diego PRADO, Ramón PERISÉ a Juan Carlos ARBOLEYA. Microbiological and sensory characterization of kombucha SCOBY for culinary applications. *International Journal of Gastronomy and Food Science* [online]. 2021, (23) [cit. 2021-04-12]. ISSN 100314. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1878450X21000135>
- TRAILOKYA, Abhijit, Ambrish SRIVASTAVA, Milind BHOLE a Nitin ZALTE. Calcium and Calcium Salts. *Journal of The Association of Physicians of India* [online]. 65. 2016 [cit. 2021-4-25]. ISSN 0004-5772. Dostupné z: <https://www.japi.org/q2948454/calcium-and-calcium-salts>
- TRAN, Thierry, Cosette GRANDVALET, François VERDIER, Antoine MARTIN, Hervé ALEXANDRE a Raphaëlle TOURDOT-MARÉCHAL. Microbiological and technological parameters impacting the chemical composition and sensory quality of kombucha. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* [online]. 19. 2020, (4), 2050-2070 [cit. 2021-04-21]. Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/1541-4337.12574>
- TU, Chuanhai, Fidelis AZI, Jin HUANG, Xiao XU, Guangliang XING a Mingsheng DONG. Quality and metagenomic evaluation of a novel functional beverage produced from soy whey using water kefir grains. *LWT* [online]. 2019, 113 [cit. 2021-02-07]. ISSN 0023-6438. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108258>

- ULUSOY, Abubekir a Canan Ece TAMER. Determination of suitability of black carrot (*Daucus carota* L. spp. sativus var. atrorubens Alef.). *Journal of Food Measurement and Characterization* [online]. 13. 2019, (2), 1524-1536 [cit. 2021-5-12]. ISSN 2193-4134. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s11694-019-00068-w>
- Understanding the CIE L\*C\*h Color Space. *KONICA MINOLTA* [online]. 2006 [cit. 2021-5-5]. Dostupné z: <https://sensing.konicaminolta.us/us/blog/understanding-the-cie-lch-color-space/>
- VERCE, Marko, Luc DE VUYST a Stefan WECKX. Shotgun Metagenomics of a Water Kefir Fermentation Ecosystem Reveals a Novel *Oenococcus* Species. *Frontiers in Microbiology* [online]. 2019, (10) [cit. 2021-4-25]. ISSN 1664-302X. Dostupné z: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2019.00479>
- VILELA, Alice. The Importance of Yeasts on Fermentation Quality and Human Health-Promoting Compounds. *Fermentation* [online]. 5. 2019, (2) [cit. 2021-4-26]. ISSN 2311-5637. Dostupné z: <https://www.mdpi.com/2311-5637/5/2/46>
- VILLARREAL-SOTO, Silvia Alejandra, Sandra BEAUFORT, Jalloul BOUAJILA, Jean-Pierre SOUCHARD a Patricia TAILLANDIER. Understanding Kombucha Tea Fermentation: A Review. *Journal of Food Science* [online]. 3. 2018, **2018**, 580-588 [cit. 2021-04-04]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/1750-3841.14068>
- VITAS, Jasmina S., Aleksandra D. CVETANOVIĆ, Pavle Z. MAŠKOVIĆ, Jaroslava V. ŠVARC-GAJIĆ a Radomir V. MALBAŠA. Chemical composition and biological activity of novel types of kombucha beverages with yarrow. *Journal of Functional Foods* [online]. 2018, **44**, 95-102 [cit. 2021-04-06]. ISSN 1756-4646. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jff.2018.02.019>
- Vodní keřirové kultury (až na 30 litrů keřiru). *WUGI* [online]. 2018 [cit. 2021-5-5]. Dostupné z: <https://www.wugi.cz/p/vodni-keřirove-kultury-na-zkousku>
- Vyhláška č. 248/2018 Sb., o požadavcích na nápoje, kvasný ocet a droždí. In: Sbířka zákonů, 2018. Dostupné také z: <https://www.zakonyprolidi.cz/cs/2018-248/souvislosti>
- Vyhláška č. 330/1997 Sb.: Vyhláška Ministerstva zemědělství, kterou se provádí §18 písm. a), d), j) a k) zákona č. 110/1997 Sb., o potravinách a tabákových



výrobciích a o změně a doplnění některých souvisejících zákonů, pro čaj, kávu a kávoviny. In: *Sbírka zákonů*. 1997. Dostupné také z: <https://www.zakonyprolidi.cz/cs/1997-330>

- WANG, Shuai, Liming ZHANG, Libo QI, Huipeng LIANG, Xinping LIN, Shengjie LI, Chenxu YU a Chaofan JI. Effect of synthetic microbial community on nutraceutical and sensory qualities of kombucha. *International Journal of Food Science & Technology* [online]. 55. 2020, (10), 3327-3333 [cit. 2021-04-22]. Dostupné z: <https://ifst.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/ijfs.14596>
- WEAVER, Connie M. Potassium and Health. *Advances in Nutrition* [online]. 4. 2013, (3), 368S-377S [cit. 2021-4-25]. ISSN 2161-8313. Dostupné z: <https://doi.org/10.3945/an.112.003533>
- YIKMIŞ, Seydi a Seren TUĞGÜM. Evaluation of Microbiological, Physicochemical and Sensorial Properties of Purple Basil Kombucha Beverage. *Turkish Journal of Agriculture - Food Science and Technology* [online]. 7. 2019, (9) [cit. 2021-5-11]. ISSN 2148-127X. Dostupné z: <https://doi.org/10.24925/turjaf.v7i9.1321-1327.2550>
- ZHAO, Zhen-jun, Yu-cheng SUI, Hua-wei WU, Cai-bi ZHOU, Xian-chun HU a Jian ZHANG. Flavour chemical dynamics during fermentation of kombucha tea. *Emirates Journal of Food and Agriculture* [online]. 30. 2018, (9), 732-741 [cit. 2021-04-23]. Dostupné z: <http://www.ejfa.me/>

**SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK**

SCOBY = Symbiotic Colony of Bacteria and Yeast

CO<sub>2</sub> = oxid uhličitý

TDS = Total Dissolved Solids

RS = Refraktometrická sušina

MSA = Mannitol Salt Agar

SB = Slanetz-Bartley Medium

RCB = Reinforced Clostridial Broth

M17 = M17 Broth

PCA = Plate Count Agar

AA = Acetobacter Agar

E = Endo Agar

SAB = Sabouraud Agar

MRS = *Lactobacillus* MRS Broth; MRS Broth

## SEZNAM OBRÁZKŮ

<b>Obrázek 1.</b> Kultura SCOBY (Soares et al., 2021).....	26
<b>Obrázek 2.</b> Výrobní schéma nápoje Kombucha (Kumar, Joshi, 2016).....	27
<b>Obrázek 3.</b> Zrna vodního kefiru - a) zrna vodního kefiru použita ve studii, b) zrna vodního kefiru využívána pro domácí výrobu nápoje (Laureys et al., 2017).....	28
<b>Obrázek 4.</b> Výrobní schéma vodního kefiru (Lynch et al., 2021).....	34
<b>Obrázek 5.</b> Změna pH během fermentace kombuchy z černého čaje a ze zeleninových šťáv; směrodatné odchylky jsou v rozsahu 0,00 – 0,03 a nejsou znázorněny v grafu.....	52
<b>Obrázek 6.</b> Změna pH v době fermentace v nápoji vodní kefir z jablečné šťávy a ze zeleninových šťáv; směrodatné odchylky jsou v rozsahu 0,00 – 0,04 a nejsou znázorněny v grafu.....	54
<b>Obrázek 7.</b> Vývoj obsahu etanolu během fermentace v nápoji kombucha z černého čaje a ze zeleninových šťáv; směrodatné odchylky jsou v rozsahu 0,02 – 0,1 % (v/v) a nejsou znázorněny v grafu.....	61
<b>Obrázek 8.</b> Vývoj obsahu etanolu během fermentace v nápoji vodní kefir z jablečné šťávy a zeleninových šťáv; směrodatné odchylky jsou v rozsahu 0,02 – 0,6 % (v/v) a nejsou znázorněny v grafu.....	62
<b>Obrázek 9.</b> Vývoj zdánlivé viskozity během fermentace vzorku kombuchy z černého čaje.....	73
<b>Obrázek 10.</b> Vývoj smykového napětí během fermentace vzorku kombuchy z černého čaje.....	73
<b>Obrázek 11.</b> Vývoj zdánlivé viskozity během fermentace vzorku kombuchy ze zelné šťávy.....	74
<b>Obrázek 12.</b> Vývoj smykového napětí během fermentace vzorku kombuchy ze zelné šťávy.....	74
<b>Obrázek 13.</b> Vývoj zdánlivé viskozity během fermentace vzorku kombuchy z vícedruhé zeleninové šťávy.....	75
<b>Obrázek 14.</b> Vývoj smykového napětí během fermentace vzorku kombuchy z vícedruhé zeleninové šťávy.....	75
<b>Obrázek 15.</b> Vývoj zdánlivé viskozity během fermentace vodního kefiru z jablečné šťávy.....	77
<b>Obrázek 16.</b> Vývoj smykového napětí během fermentace vzorku vodního kefiru z jablečné šťávy.....	77
<b>Obrázek 17.</b> Vývoj zdánlivé viskozity během fermentace vodního kefiru ze zelné šťávy.....	78
<b>Obrázek 18.</b> Vývoj smykového napětí během fermentace vodního kefiru ze zelné šťávy.....	78
<b>Obrázek 19.</b> Vývoj zdánlivé viskozity během fermentace vodního kefiru z vícedruhé zeleninové šťávy.....	79
<b>Obrázek 20.</b> Vývoj smykového napětí během fermentace vodního kefiru z vícedruhé zeleninové šťávy.....	79
<b>Obrázek 21.</b> Vývoj aktivity vody během fermentace vzorků kombuchy z černého čaje a zeleninových šťáv.....	83

- Obrázek 22.** Vývoj aktivity vody během fermentace vzorků vodního kefiru z jablečné šťávy a zeleninových šťáv. .... 84
- Obrázek 23.** Nárůst acetobakterií (AA), kvasinek a plísni (SAB), laktokoků (M17) a laktobacilů (MRS) v čase (h) během fermentace kombuchy z černého čaje. .... 85
- Obrázek 24.** Nárůst acetobakterií (AA), kvasinek a plísni (SAB), laktokoků (M17) a laktobacilů (MRS) v čase (h) během fermentace kombuchy ze zelné šťávy. .... 86
- Obrázek 25.** Nárůst acetobakterií (AA), kvasinek a plísni (SAB), laktokoků (M17) a laktobacilů (MRS) v čase (h) během fermentace kombuchy z vícedruhovité zeleninové šťávy. .... 87
- Obrázek 26.** Nárůst acetobakterií (AA), kvasinek a plísni (SAB), laktokoků (M17) a laktobacilů (MRS) v čase (h) během fermentace vodního kefiru z jablečné šťávy. .... 88
- Obrázek 27.** Nárůst acetobakterií (AA), kvasinek a plísni (SAB), laktokoků (M17) a laktobacilů (MRS) v čase (h) během fermentace vodního kefiru ze zelné šťávy. .... 89
- Obrázek 28.** Nárůst acetobakterií (AA), kvasinek a plísni (SAB), laktokoků (M17) a laktobacilů (MRS) v čase (h) během fermentace vodního kefiru z vícedruhovité zeleninové šťávy. .... 90

## SEZNAM TABULEK

<b>Tabulka 1.</b> Složení MSA média.....	45
<b>Tabulka 2.</b> Složení SB média. ....	46
<b>Tabulka 3.</b> Složení RCB média. ....	47
<b>Tabulka 4.</b> Složení M17 broth média. ....	48
<b>Tabulka 5.</b> Složení AA média. ....	48
<b>Tabulka 6.</b> Složení Endo agaru.....	49
<b>Tabulka 7.</b> Složení SAB média ....	50
<b>Tabulka 8.</b> Složení MRS broth média. ....	50
<b>Tabulka 9.</b> Kombucha - TDS [ppm].....	56
<b>Tabulka 10.</b> Vodní kefir - TDS [ppm].....	57
<b>Tabulka 11.</b> Vývoj refraktometrické sušiny v nápoji kombucha ( $\text{g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ ).....	58
<b>Tabulka 12.</b> Vývoj refraktometrické sušiny v nápoji vodní kefir ( $\text{g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ ).....	60
<b>Tabulka 13.</b> Změna hustoty u vzorků nápoje kombuchy ( $\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$ ). Odchylky naměřených hodnot byly v rozsahu $0,0001 - 0,0005 \text{ g} \cdot \text{cm}^{-3}$ , proto nejsou uvedeny v tabulce.....	63
<b>Tabulka 14.</b> Změna hustoty u vzorků nápoje vodní kefir. Odchylky naměřených hodnot byly v rozsahu $0,0002 - 0,0004 \text{ g} \cdot \text{cm}^{-3}$ , proto nejsou uvedeny v tabulce.....	64
<b>Tabulka 15.</b> Reálný (Er; % w/w) a zdánlivý (Ea; % w/w) extrakt u vzorků kombuchy; směrodatné odchylky jsou v rozsahu $0,04 - 0,27 \text{ % w/w}$ a nejsou uvedeny v tabulce. ....	65
<b>Tabulka 16.</b> Reálný (Rdf; % w/w) a zdánlivý (Adf; % w/w) stupeň fermentace u vzorků kombuchy směrodatné odchylky jsou v rozsahu $0,2 - 0,4 \text{ % w/w}$ a nejsou uvedeny v tabulce. ....	66
<b>Tabulka 17.</b> Reálný (Er; % w/w) a zdánlivý (Ea; % w/w) extrakt u vzorků vodního kefiru; směrodatné odchylky jsou v rozsahu $0,01 - 0,1 \text{ % w/w}$ a nejsou uvedeny v tabulce. ....	67
<b>Tabulka 18.</b> Reálný (Rdf; % w/w) a zdánlivý (Adf; % w/w) stupeň fermentace u vzorků vodního kefiru směrodatné odchylky jsou v rozsahu $0,24 - 0,5 \text{ % w/w}$ a nejsou uvedeny v tabulce. ....	68
<b>Tabulka 19.</b> Vývoj energetické hodnoty v průběhu fermentace u vzorků kombuchy.....	69
<b>Tabulka 20.</b> Vývoj energetické hodnoty v průběhu fermentace u vzorků vodního kefiru. ....	69
<b>Tabulka 21.</b> Výsledné hodnoty z Power Law modelu u vzorků kombuchy.....	72
<b>Tabulka 22.</b> Výsledné hodnoty z Power Law modelu u vzorků vodního kefiru. ....	76
<b>Tabulka 23.</b> Vývoj barvy během fermentace vzorků kombuchy. ....	80
<b>Tabulka 24.</b> Vývoj barvy během fermentace vzorků vodního kefiru.....	81