



# ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ UNIVERSITY OF WEST ATTICA

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

## ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Παρασκευή Ζυμώμενου Προβιοτικού Ροφήματος με Συμβιοτική Καλλιέργεια Ζυμών  
και Βακτηρίων με Προσθήκη Χαρουπόμελου

Production of Fermented Probiotic Beverage with Symbiotic Culture of Yeasts and  
Bacteria and Carob Syrup



Εισηγήτρια : Σαρουφίμ Μάρθα (Α.Μ.: 20684091)

Saroufim Martha

Επιβλέπουσα Καθηγήτρια : Μπατρίνου Ανθιμία

Batrinou Anthimia

ΑΘΗΝΑ, ΙΟΥΛΙΟΣ 2024



# ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ UNIVERSITY OF WEST ATTICA

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

Εγκρίθηκε από τριμελή εξεταστική επιτροπή.

Αθήνα, Ιούλιος 2024

## ΕΠΙΤΡΟΠΗ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗΣ

1. Επιβλέπουσα Καθηγήτρια

### **Μπατρίνου Ανθμία**

Βιολόγος MSc, PhD, Επίκουρη Καθηγήτρια Τμήματος Τεχνολογίας Τροφίμων, Σχολή  
Επιστημών Τροφίμων, Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων

2. Μέλος Εξεταστικής Επιτροπής

### **Κοντελής Σπυρίδων**

Γεωπόνος, PhD, Επίκουρος Καθηγητής Τμήματος Τεχνολογίας Τροφίμων, Σχολή  
Επιστημών Τροφίμων, Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων

3. Μέλος Εξεταστικής Επιτροπής

### **Στρατή Ειρήνη**

Χημικός MSc, PhD, Επίκουρη Καθηγήτρια Τμήματος Τεχνολογίας Τροφίμων, Σχολή  
Επιστημών Τροφίμων, Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων

## Δήλωση περί λογοκλοπής/Copyright

Έχοντας πλήρη επίγνωση των συνεπειών του νόμου περί πνευματικής ιδιοκτησίας, δηλώνω ότι είμαι αποκλειστική συγγραφέας της παρούσας διπλωματικής εργασίας. Δηλώνω, επίσης, ότι αναλαμβάνω όλες τις συνέπειες, όπως αυτές νομίμως ορίζονται, στην περίπτωση που διαπιστωθεί διαχρονικά ότι η εργασία μου αυτή ή τμήμα αυτής αποτελεί προϊόν λογοκλοπής.

Η ΔΗΛΟΥΣΑ

ΣΑΡΟΥΦΙΜ ΜΑΡΘΑ

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Marika', written over a horizontal line.

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου από καρδιάς στην επιβλέπουσα καθηγήτρια μου, Μπατρίνου Ανθιμία, επίκουρη καθηγήτρια του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής, για την ανάθεση του θέματος της πτυχιακής μου εργασίας, αλλά και την καθοδήγηση και πολύτιμη βοήθεια της κατά την εκπόνηση της παρούσας ερευνητικής εργασίας.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω την υποψήφια διδάκτορα, Πυροβόλου Κατερίνα, για την βοήθεια της και την υποστήριξη της, σε όλη την διάρκεια των πειραμάτων, αλλά και την εξαγωγή των αποτελεσμάτων. Η συγκεκριμένη ερευνά αποτελεί μέρος της διδακτορικής της διατριβής με τίτλο : «Αξιοποίηση συστατικών χαρουπιού (*Ceratonia siliqua*) μέσω μικροβιακών ζυμώσεων».

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της τριμελούς εξεταστικής επιτροπής, τον κ. Κοντελέ Σπυρίδων, επίκουρο καθηγητή του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής και την κ. Στρατή Ειρήνη, επίκουρη καθηγήτρια του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής, για την συμμετοχή τους ως μέλη της εξεταστικής επιτροπής της παρούσας εργασίας.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου και ιδιαίτερα τους γονείς μου, για την στήριξη, την εμπιστοσύνη και την αγάπη, που μου προσέφεραν καθ' όλη την διάρκεια των σπουδών μου.

## ΑΦΙΕΡΩΣΕΙΣ

Αφιερωμένη στους γονείς μου, Σαφουάτ και Ουάρντα.

## Περιεχόμενα

1. Εισαγωγή.....	7
2. Χαρακτηριστικά Kombucha.....	12
2.1. Μικροοργανισμοί.....	14
2.1.1. Βακτήρια Γαλακτικού Οξέος.....	15
2.1.2. Ζυμομύκητες.....	17
2.1.3. Βακτήρια Οξικού Οξέος.....	20
2.2. Scoby.....	22
2.3. Τρόπος Παρασκευής.....	24
2.3.1. Παράγοντες που επηρεάζουν την ζύμωση kombucha.....	24
2.3.1.1. Υπόστρωμα.....	25
2.3.1.2. Χρόνος Ζύμωσης.....	25
2.3.1.3. Θερμοκρασία.....	26
2.3.1.4. pH.....	26
2.4. Διαφορετικά Προϊόντα.....	28
2.5. Χαρούπι.....	29
2.6. Επιπτώσεις στην Υγεία του Ανθρώπου.....	30
3. Πειραματικό Μέρος.....	32
3.1. Σκοπός.....	32
3.2. Υλικά και Εξοπλισμός.....	32
3.3. Μεθοδολογία.....	57
3.3.1. Μικροβιολογική Ανάλυση.....	57
3.3.2. Μέτρηση Οργανικών Οξέων.....	90
3.3.3. Ολικές Πολυφαινόλες.....	97
3.3.4. Μέτρηση Αλκοόλης.....	101
3.3.5. Μέτρηση Σακχάρων.....	102
3.3.6. Μέτρηση χρώματος.....	104
3.3.7. Οργανοληπτικά χαρακτηριστικά.....	106
3.4. Αποτελέσματα και Συζήτηση.....	107
3.4.1. Μικροβιολογική Ανάλυση.....	107
3.4.2. Μέτρηση Οργανικών Οξέων.....	110
3.4.3. Ολικές Πολυφαινόλες.....	114
3.4.4. Μέτρηση Αλκοόλης.....	116
3.4.5. Μέτρηση Σακχάρων.....	118
3.4.6. Μέτρηση Χρώματος.....	121
3.5. Συμπεράσματα.....	126
4. Συμπεράσματα.....	129
5. Βιβλιογραφία.....	132

## 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η συγκεκριμένη πτυχιακή εργασία ασχολείται με την παρασκευή ενός ζυμωμένου προβιοτικού ροφήματος με βάση το χαρουπόμελο, όπου παρασκευάστηκε kombucha με διάφορες συνταγές, με διάφορα είδη, δηλαδή με αρχικό προϊόν από διαφορετικό προμηθευτή, με διαφορετικά υποστρώματα και με διαφορετικές ποσότητες σακχάρων κάθε φορά.

Πρόκειται για ένα ρόφημα τσαγιού, που έχει υποστεί ζύμωση και την τελευταία δεκαετία έχει γίνει ολοένα και πιο διαδεδομένο στη δυτική κοινωνία. Η kombucha έχει μακρά ιστορία δημοτικότητας σε όλο τον κόσμο και αυτό οφείλεται στην έντονη γεύση και τα οφέλη για την υγεία. (Ramos et al., 2023). Ιστορικά στοιχεία δείχνουν ότι πιθανότατα προέρχεται από την ιστορική περιοχή της Μαντζουρίας, που βρίσκεται στην βορειοανατολική Κίνα. (Villarreal-Soto et al., 2018). Ωστόσο, η προέλευση του συγκεκριμένου ροφήματος τσαγιού, που έχει υποστεί ζύμωση, είναι ακόμη άγνωστη. Ακούγοντας την λέξη «kombucha» φαίνεται να είναι γερμανικής καταγωγής, χωρίς να είναι σίγουρη αυτή η θεωρία. Μια ετυμολογική θεωρία αναφέρει ότι η λέξη «kombucha» μεταφράζεται σε «φυκι-τσαι» ή «kombucha» στα ιαπωνικά. Το γεγονός ότι υπάρχουν διάφορα ονόματα, συνεχώς εξακολουθεί να αυξάνει την αβεβαιότητα ως προς το πότε και που προήλθε το παρασκεύασμα. (Crum & LaGory, 2016)

Η kombucha υπάρχει από τη δυναστεία Tsin που χρονολογείται από το 220 π.Χ.. Από γεωγραφική άποψη, η kombucha πιθανότατα εξαπλώθηκε από την Κίνα αρχικά στην Κορέα και τελικά θα έφτανε στην Ιαπωνία μέσω διαφόρων εμπορικών οδών. Περίπου το 415 μ.Χ., ένας γιατρός κορεάτης, που ονομαζόταν Dr. Kombu κλήθηκε να θεραπεύσει τον αυτοκράτορα της Ιαπωνίας, Iynko, από μια πεπτική διαταραχή. Την εποχή εκείνη, αρκετοί Ιάπωνες θεωρούσαν ότι το τσάι έχει πολλές μυστικιστικές θεραπευτικές ιδιότητες. Τότε, ο Dr. Kombu για την θεραπεία των συμπτωμάτων του αυτοκράτορα, χρησιμοποίησε kombucha μαζί με άλλες πρώιμες ιατρικές βοτανικές θεραπείες. Ο συνδυασμός αυτός, της kombucha και των βοτάνων, έδωσε μεγάλη επιτυχία, που θα μπορούσε να δώσει μια εναλλακτική εξήγηση για το ποτό αυτό. Αυτή η λαογραφία ενισχύει την διάχυτη συσχέτιση των θεραπευτικών δυνάμεων με την kombucha, που εξακολουθεί να υπάρχει στον 21<sup>ο</sup> αιώνα, παρόλο που τέτοια αποτελέσματα δεν έχουν ακόμη προσδιοριστεί μέσω ιατρικής έρευνας. (Greenwalt et al., 2000)

Ζυμώμενα προϊόντα ονομάζονται τα προϊόντα εκείνα που έχουν υποστεί ζύμωση. Η ζύμωση είναι μια μέθοδος, η οποία χρησιμοποιείται από την αρχαιότητα ως μια τεχνική, με την οποία γίνεται η συντήρηση των προϊόντων και η αύξηση της διάρκειας ζωής αυτών, χωρίς όμως να υποστούν αλλοίωση. Για παράδειγμα, η ζύμωση των λαχανικών, επιτρέπει στους ανθρώπους να καταναλώνουν αυτά, όλο τον χρόνο, ακόμη και τους μήνες που εκείνα τα λαχανικά δεν είναι διαθέσιμα στην αγορά. Εκτός

από το γεγονός ότι αυξάνεται η διάρκεια ζωής των προϊόντων, με την ζύμωση ενισχύεται η υφή και η γεύση αυτών. Πιο συγκεκριμένα, συχνά παρατηρείται ότι τα ζυμώμενα τρόφιμα έχουν μια ισχυρή αλμυρή και ελαφρώς ξινή γεύση. (Leeuwendaal et al., 2022)

Τα τρόφιμα που έχουν υποστεί ζύμωση ανήκουν στην κατηγορία των υπερτροφών, λόγω της περιεκτικότητάς τους σε προβιοτικά και της νόστιμης γεύσης τους. Τα ζυμώμενα τρόφιμα αποτελούν ένα διαχρονικό συστατικό της διατροφής των ανθρώπων παγκοσμίως, αφού έρευνες έχουν δείξει ότι έχουν πολλά οφέλη και η κατανάλωση τους είναι ιδιαίτερα ευεργετική για την υγεία των ανθρώπων. Αυτό συμβαίνει, γιατί τα τρόφιμα που έχουν υποστεί ζύμωση ενισχύονται με αντιμικροβιακά συστατικά, αμινοξέα, βιταμίνες, ανόργανα στοιχεία, τα οποία συμβάλλουν στην διέγερση του ανοσοποιητικού συστήματος, την καλή ισορροπία του εντερικού μικροβιώματος και την καλύτερη απορρόφηση των θρεπτικών συστατικών. (Castellone et al., 2021)

Τα ζυμώμενα τρόφιμα παράγονται με ελεγχόμενη μικροβιακή ανάπτυξη (βακτήρια, μύκητες) και ενζυματική δράση, με αποτέλεσμα να μετατρέπονται ορισμένες οργανικές ενώσεις, όπως είναι τα σάκχαρα, σε μια αλκοόλη ή ένα οξύ. Αυτά, στη συνέχεια, παίζουν τον ρόλο στα τρόφιμα, των φυσικών συντηρητικών ή και των βελτιωτικών γεύσης. (Dimidi et al., 2019)

Γενικά, η ζύμωση πραγματοποιείται με δυο μεθόδους. Η μια μέθοδος είναι φυσικά, όπου η ζύμωση γίνεται από τους μικροοργανισμούς που υπάρχουν σε ένα τρόφιμο φυσικά, όταν, όμως, επιδράσουμε στο σύστημα με τις κατάλληλες συνθήκες. Από την άλλη πλευρά, η άλλη μέθοδος είναι με προσθήκη καλλιέργειας εκκίνησης, αφού προηγουμένως έχει προστεθεί μια ειδική καλλιέργεια επιλεγμένων μικροοργανισμών στο τρόφιμο, ώστε να μπορεί να αρχίσει η ζύμωση. (Guo et al., 2023)

Στην σημερινή εποχή, τα τρόφιμα που έχουν υποστεί ζύμωση συναντώνται παντού στην αγορά και σε μεγάλη ποικιλία. Μερικά παραδείγματα ζυμωμένων τροφίμων είναι το ψωμί με προζύμι, το κεφίρ, το γιαούρτι, το τυρί, η μπύρα, το κρασί, η kombucha κτλ. (Rezac et al., 2018)

Ο όρος «προβιοτικό» χρησιμοποιήθηκε από τους Lilly και Stillwell, το 1965 για πρώτη φορά. Τα προβιοτικά είναι ζωντανοί μη παθογόνοι μικροοργανισμοί, τα οποία χορηγούνται για τη βελτίωση της μικροβιακής ισορροπίας, ιδιαίτερα στο γαστρεντερικό σωλήνα. Η εισαγωγή ωφέλιμων βακτηριακών ειδών στο γαστρεντερικό σωλήνα μπορεί να είναι μια πολύ ελκυστική επιλογή για την πρόληψη ασθενειών και την αποκατάσταση της μικροβιακής ισορροπίας. Τα προβιοτικά είναι μη εύπεπτα συστατικά τροφής, τα οποία διεγείρουν επιλεκτικά ένα βακτήριο ή μια ομάδα βακτηρίων στο κόλον με προβιοτικές ιδιότητες, προσφέροντας, έτσι, πολλά οφέλη στον ξενιστή. (Staniszewski & Kordowska-Wiater, 2021)

Μέσω διαφόρων μηχανισμών, τα προβιοτικά ασκούν τα ευεργετικά τους αποτελέσματα. Μεταξύ αυτών συμπεριλαμβάνονται η μείωση του εντερικού pH, η



μείωση του αποικισμού και η εισβολή από παθογόνους μικροοργανισμούς και η τροποποίηση της ανοσολογικής απόκρισης του ξενιστή. Αξίζει να σημειωθεί, το γεγονός ότι τα προβιοτικά οφέλη που σχετίζονται με ένα είδος ή στέλεχος, δεν σημαίνει ότι απαραίτητα θα ισχύουν και για άλλα. Διάφορα βακτηριακά γένη που χρησιμοποιούνται συχνότερα σε προβιοτικά είναι τα *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Escherichia*, *Enterococcus*, *Bacillus* και *Streptococcus*. (de Oliveira et al., 2023)

Έως και σήμερα, δεν έχει διευκρινιστεί ο ελάχιστος αριθμός μικροοργανισμών, που θα πρέπει να ληφθούν, ώστε να επιτευχθεί ευεργετική δράση. Παρόλα αυτά, ένα προβιοτικό, συνήθως, θα πρέπει να περιέχει αρκετά δισεκατομμύρια μικροοργανισμούς, για να αυξήσει την πιθανότητα να συμβεί επαρκής αποικισμός του εντέρου. Τα προβιοτικά, γενικά, θεωρούνται αρκετά ασφαλή και καλά ανεκτά. Όμως, με πολύ μεγάλη προσοχή θα πρέπει να χρησιμοποιούνται σε ασθενείς, που είναι βαριά άρρωστοι ή σοβαρά ανοσοκατεσταλμένοι ή ασθενείς με κεντρικούς φλεβικούς καθετήρες, εφόσον σε μερικές περιπτώσεις μπορεί να εμφανιστούν συστηματικές λοιμώξεις. Όσον αφορά τα προβιοτικά, που προέρχονται από βακτήρια, θα πρέπει να διαχωρίζονται από τα αντιβιοτικά κατά τουλάχιστον δυο ώρες. (Merenstein et al., 2023).

# 1. Introduction

This particular thesis deals with the preparation of a fermented probiotic beverage based on carob syrup, where kombucha was prepared with various recipes, with different types, i.e., with the initial product from different suppliers, with different substrates, and with different amounts of sugars each time.

Kombucha is a fermented tea beverage that has become increasingly popular in Western society over the past decade. Kombucha has a long history of popularity worldwide due to its intense flavor and health benefits (Ramos et al., 2023). Historical evidence suggests that it likely originates from the historical region of Manchuria, located in northeastern China (Villarreal-Soto et al., 2018). However, the exact origin of this fermented tea beverage remains unknown. The word "kombucha" seems to be of German origin, though this theory is not certain. One etymological theory suggests that the word "kombucha" translates to "seaweed tea" or "kombucha" in Japanese. The fact that there are various names continues to increase the uncertainty about when and where the preparation originated (Crum & LaGory, 2016).

Kombucha has been around since the Tsin dynasty, dating back to 220 B.C. Geographically, kombucha likely spread from China initially to Korea and eventually reached Japan via various trade routes. Around 415 A.D., a Korean doctor named Dr. Kombu was called to treat the Japanese emperor Iyko for a digestive disorder. At that time, many Japanese believed that tea had many mystical healing properties. Dr. Kombu used kombucha along with other early herbal medical treatments to treat the emperor's symptoms. This combination of kombucha and herbs achieved great success, which could provide an alternative explanation for this beverage. This folklore reinforces the pervasive association of healing powers with kombucha that continues into the 21st century, even though such effects have yet to be determined through medical research (Greenwalt et al., 2000).

Fermented products are those that have undergone fermentation. Fermentation is a method used since ancient times as a technique to preserve products and extend their shelf life without spoiling. For example, the fermentation of vegetables allows people to consume them all year round, even in months when those vegetables are not available on the market. Besides increasing the shelf life of products, fermentation enhances their texture and flavor. More specifically, it is often observed that fermented foods have a strong salty and slightly sour taste (Leeuwendaal et al., 2022).

Fermented foods belong to the category of superfoods due to their probiotic content and delicious taste. Fermented foods have been a timeless component of human diets worldwide, as research has shown that they have many benefits and their consumption is particularly beneficial for human health. This is because fermented foods are enriched with antimicrobial ingredients, amino acids, vitamins, and minerals, which contribute to stimulating the immune system, maintaining a good

balance of the gut microbiome, and improving nutrient absorption (Castellone et al., 2021).

Fermented foods are produced through controlled microbial growth (bacteria, fungi) and enzymatic action, resulting in the conversion of certain organic compounds, such as sugars, into an alcohol or an acid. These, in turn, act as natural preservatives or flavor enhancers in foods (Dimidi et al., 2019).

Generally, fermentation is carried out using two methods. One method is natural, where fermentation occurs from the microorganisms naturally present in a food when influenced by the appropriate conditions. On the other hand, the other method is by adding a starter culture, where a special culture of selected microorganisms is added to the food to initiate fermentation (Guo et al., 2023).

Today, fermented foods are found everywhere on the market and in a wide variety. Some examples of fermented foods include sourdough bread, kefir, yogurt, cheese, beer, wine, kombucha, etc. (Rezac et al., 2018).

The term "probiotic" was first used by Lilly and Stillwell in 1965. Probiotics are live non-pathogenic microorganisms administered to improve microbial balance, particularly in the gastrointestinal tract. Introducing beneficial bacterial species into the gastrointestinal tract can be an attractive option for preventing diseases and restoring microbial balance. Prebiotics are indigestible food ingredients that selectively stimulate a bacterium or a group of bacteria in the colon with probiotic properties, thus offering many benefits to the host (Staniszewski & Kordowska-Wiater, 2021).

Probiotics exert their beneficial effects through various mechanisms. These include reducing intestinal pH, reducing colonization and invasion by pathogenic microorganisms, and modifying the host's immune response. It is worth noting that probiotic benefits associated with one species or strain do not necessarily apply to others. Various bacterial genera most commonly used in probiotics include *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Escherichia*, *Enterococcus*, *Bacillus*, and *Streptococcus* (de Oliveira et al., 2023).

To date, the minimum number of microorganisms required to achieve a beneficial effect has not been clarified. However, a probiotic typically needs to contain several billion microorganisms to increase the likelihood of sufficient gut colonization. Probiotics are generally considered quite safe and well-tolerated. However, they should be used with great caution in severely ill or severely immunocompromised patients or those with central venous catheters, as systemic infections may occur in some cases. Probiotics derived from bacteria should be separated from antibiotics by at least two hours (Merenstein et al., 2023).

## 2. ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ KOMBUCHA

Η kombucha είναι ένα παραδοσιακά ζυμώμενο ρόφημα τσαγιού, που παρασκευάζεται με τη χρήση ζυμώμενου τσαγιού, ζάχαρης και μιας συμβιωτικής καλλιέργειας βακτηρίων και ζύμης (scoby), που είναι παγιδευμένο σε ένα φυσικό πλωτό κυτταρινικό βιοφίλμ, το οποίο ονομάζεται pellicle. (Marsh, O'Sullivan, et al., 2014) Αυτή η μεικτή μικροβιακή κοινοπραξία σχηματίζει μια ισχυρή συμβίωση, ικανή να αναστέλλει την ανάπτυξη δυνητικά μολυσματικών βακτηρίων. Επίσης, η ζύμωση, λόγω της δραστηριότητας ορισμένων στελεχών του *Acetobacter sp.*, οδηγεί στον σχηματισμό ενός πολυμερούς κυτταρικού ιζήματος. (Jarrell et al., 2000)

Όλη η διαδικασία της ζύμωσης διαρκεί περίπου 7 – 20 ημέρες υπό αερόβιες συνθήκες. Το τελικό προϊόν είναι πλούσιο σε οργανικά οξέα και διοξείδιο του άνθρακα. (Martínez Leal et al., 2018). Από την μικροβιακή κοινοπραξία, η διαδικασία της ζύμωσης τσαγιού, μπόρεσε να δείξει αύξηση σε ορισμένες βιολογικές δραστηριότητες, που έχουν ήδη μελετηθεί. Παρόλα αυτά, ελάχιστες πληροφορίες είναι διαθέσιμες για τον χαρακτηρισμό των ενεργών συστατικών του και την εξέλιξη τους κατά τη ζύμωση. Επίσης, έρευνες έχουν αναφέρει ότι η χρήση εγχυμάτων από άλλα φυτά μπορεί να είναι μια πολλά υποσχόμενη εναλλακτική λύση. (Jayabalan et al., 2014)



Εικόνα 1 : Ρόφημα kombucha

Η kombucha έχει μια πολύ ιδιαίτερη γεύση. Πρόκειται για ένα όξινο αλλά ελαφρώς γλυκό μείγμα, συνήθως με νότες από διάφορα φρούτα. (Greenwalt et al., 2000). Η kombucha, που διατίθεται στην αγορά, όπως και τα περισσότερα ποτά που έχουν

υποστεί ζύμωση, έχει ελαφριά περιεκτικότητα σε αλκοόλ, που κυμαίνεται περίπου στο 0,5 %, ποσοστό που συμμορφώνεται με τους τωρινούς κανονισμούς και νομοθεσία. Όμως, η kombucha, που παρασκευάζουν οι καταναλωτές στο σπίτι, μπορεί να περιέχει έως και 3 % αλκοόλ. (SungHee Kole et al., 2009)

Γενικά, η κατανάλωση του συγκεκριμένου ποτού έχει αυξηθεί σημαντικά τα τελευταία χρόνια, λόγω των πολλαπλών λειτουργικών του ιδιοτήτων, όπως είναι η αντιφλεγμονώδης και η αντιοξειδωτική του δράση. Η μικροβιολογική σύνθεση του συγκεκριμένου ροφήματος είναι πολύ περίπλοκη και ακόμη χρειάζονται πάρα πολλές μελέτες, ώστε να κατανοηθεί επαρκώς η συμπεριφορά του. Ειδικότερα, χρειάζονται έρευνες, στις οποίες περιλαμβάνονται η χημική και μικροβιολογική σύνθεση του τσαγιού και οι κύριοι παράγοντες που μπορεί να επηρεάσουν την παραγωγή του. (Watawana et al., 2015)

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, η kombucha παρασκευάζεται σε ζυμό τσαγιού, που είναι συμπληρωμένο με μια ποσότητα σακχαρόζης, προσθέτοντας μια καλλιέργεια εκκίνησης, που διατίθεται στο εμπόριο. Κατά την διάρκεια της ζύμωσης, από την μια πλευρά, το pH μειώνεται σταθερά από το 5 περίπου στο 2,5 και από την άλλη πλευρά, το βάρος του «μύκητα τσαγιού» του ζυμού τσαγιού αυξάνεται τις πρώτες 4 ημέρες και στη συνέχεια παραμένει αρκετά σταθερό. Ο αριθμός των ζυμών και των βακτηρίων, που παράγουν οξικό οξύ στον ζυμό αυξάνεται τις πρώτες 4 ημέρες και μετά μειώνεται. Σύμφωνα με την βιβλιογραφία για την kombucha, το οξικό οξύ θεωρείται ότι είναι υπεύθυνο για την ανασταλτική δράση των μικροοργανισμών. (Reiss, 1994a)

## 2.1. ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ

Ανάμεσα σε πολλά παραδοσιακά τρόφιμα, τα οποία έχουν υποστεί ζύμωση, ένα από αυτά είναι η kombucha, που πλέον είναι ένα δημοφιλές ποτό. Όπως προαναφέρθηκε, τα βακτήρια και οι ζύμες, που υπάρχουν στο μέσο, δημιουργούν μια ισχυρή συμβίωση, η οποία είναι ικανή να αναστέλλει την ανάπτυξη μολυσματικών μικροοργανισμών. Το σύστημα αποτελείται από δυο φάσεις, ένα πλωτό βιοφίλμ και μια ξινή υγρή φάση. Τα κυριότερα συστατικά στο υγρό, αλλά και στο βιοφίλμ είναι το οξικό οξύ, το γλυκονικό οξύ και η αιθανόλη, λόγω της μεγάλης ικανότητας απορρόφησης νερού. Σε μια περίοδο περίπου 7 με 10 ημερών, υπό αερόβιες συνθήκες, η συμβιωτική κοινοπραξία kombucha είναι ικανή να μετατρέψει το τσάι και τη ζάχαρη σε ένα ελαφρώς ξινό, ανθρακούχο και δροσιστικό ποτό, το οποίο αποτελείται από πολλά οξέα, βιταμίνες, αμινοξέα και μερικά υδρολυτικά ένζυμα. (Villarreal-Soto et al., 2018)

Το τσάι kombucha λαμβάνεται από μια συμβιωτική καλλιέργεια βακτηρίων. Εμφανίζονται πολλά βακτήρια γαλακτικού οξέος LAB (*Lactobacillus*, *Lactococcus*) ζυμομύκητες (*Schizosaccharomyces pombe*, *Saccharomyces ludwigii*, *Kloeckera apiculata*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Zygosaccharomyces bailii*, *Torulaspora delbrueckii*, *Brettanomyces* τε γενικά, *Brettanomyces bruxellensis*) και βακτήρια οξικού οξέος AAB (*Komagataeibacter*, *Gluconobacter* και είδη *Acetobacter*). Επίσης, λόγω της δραστηριότητας ορισμένων στελεχών του AAB, η διαδικασία της ζύμωσης του οδηγεί στον σχηματισμό ενός επιπλέοντος βιοφίλμ στην επιφάνεια του μέσου ανάπτυξης. Τα κυριότερα οξέα, που εντοπίζονται είναι το οξικό, το τρυγικό, το γλυκονικό, το μηλικό και σε μικρότερη αναλογία το κιτρικό οξύ. Όλα τα παραπάνω οξέα είναι υπεύθυνα για την χαρακτηριστική ξινή γεύση του ροφήματος. Οι πραγματικές τάσεις των τροφίμων προς ελάχιστα επεξεργασμένα προϊόντα, με υψηλή θρεπτική αξία, χωρίς πρόσθετα και με οφέλη για την υγεία έχουν αυξηθεί με την ευαισθητοποίηση των καταναλωτών. Σε αυτό το πλαίσιο, το παραδοσιακό τσάι kombucha έχει προσελκύσει πρόσφατα την προσοχή, τόσο των καταναλωτών, όσο και των ερευνητών, λόγω των προβιοτικών χαρακτηριστικών του. Παρόλα αυτά, η μικροχλωρίδα, η τεχνολογία κατασκευής, οι φυσικοχημικές ιδιότητες και τα υποπροϊόντα είναι πολύ σημαντικά στοιχεία, τα οποία πρέπει να ληφθούν υπόψη για τη βιομηχανική παραγωγή. (Laureys & De Vuyst, 2014)

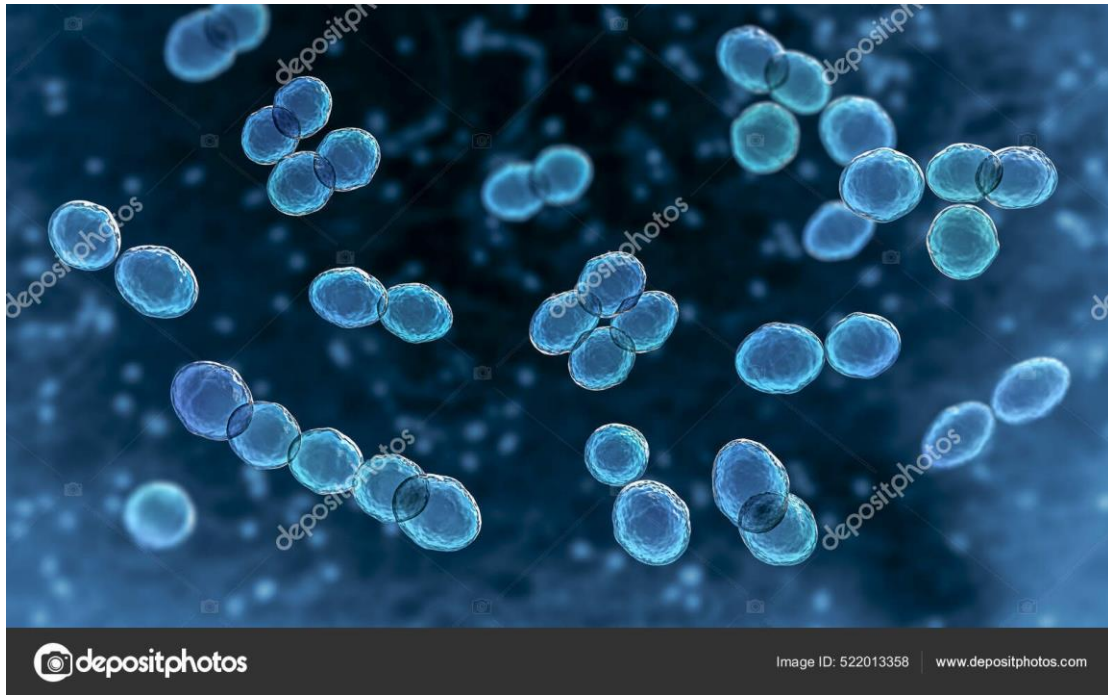
Υπάρχουν διάφοροι τύποι ζύμωσης και ανάλογα με τη μεταβολική οδό που ακολουθείται, λαμβάνονται διαφορετικά προϊόντα. Η kombucha, λόγω της παρουσίας πολλών βακτηρίων και ζυμομυκήτων, που συνυπάρχουν στο μέσο, προκύπτει από τον συνδυασμό τριών από τις επόμενες ζυμώσεις, γαλακτική, αλκοολική και οξική ζύμωση. Αρχικά, ξεκινά από ωσμοανεκτικούς μικροοργανισμούς και τελικά κυριαρχείται από ανθεκτικά είδη στα οξέα. Πολλοί ερευνητές έχουν μελετήσει τα οφέλη του τσαγιού kombucha. Παρόλα αυτά υπάρχουν ελάχιστες πληροφορίες αναφορικά με τον χαρακτηρισμό των ενεργών συστατικών του, τις

φαρμακολογικές τους δραστηριότητες και την εξέλιξη τους κατά τη ζύμωση. Ακόμα, είναι απαραίτητο να αξιολογηθεί η επίδραση των ζυμωτηρίων, των μεταβολικών, των υποστρωμάτων και οι βελτιώσεις τους στις οργανοληπτικές ιδιότητες και την κινητική της ζύμωσης. (May et al., 2019)

### **2.1.1. ΒΑΚΤΗΡΙΑ ΓΑΛΑΚΤΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ**

Τα βακτήρια του γαλακτικού οξέος (LAB) είναι, γενικά, φιλικά βακτήρια, τα οποία ασκούν ωφέλιμη δράση στον ανθρώπινο οργανισμό. Το όνομα τους έχει προέλθει από την ιδιότητα τους να μετατρέπουν τα σάκχαρα σε γαλακτικό οξύ, δημιουργώντας, έτσι, γύρω τους ένα όξινο περιβάλλον, που δεν επιτρέπει την ανάπτυξη παθογόνων μικροοργανισμών. Έχει αποδειχθεί ότι η λήψη τους με συμπλήρωμα βοηθά στην ισορροπία της εντερικής χλωρίδας, στην ενίσχυση του ανοσοποιητικού, στην καλή λειτουργία του εντέρου κ.τ.λ.. (Klotz & Barrangou, 2018)

Τα βακτήρια του γαλακτικού οξέος (LAB) είναι gram – θετικοί, μη σπορογόνοι, αναερόβιοι ή μικροαερόφιλοι μικροοργανισμοί, οι οποίοι έχουν απομονωθεί από πολλά διαφορετικά περιβάλλοντα, όπως γάλα, φυτικές επιφάνειες, γαστρεντερική οδό, μέσα από το στόμα, κολπική οδό ανθρώπων και ζώων. Τα βακτήρια του γαλακτικού οξέος (LAB) ανήκουν στο γένος Firmicutes και χαρακτηρίζονται, σύμφωνα με τα μεταβολικά, φυσιολογικά και ορισμένα μορφολογικά χαρακτηριστικά τους. Όπως προαναφέρθηκε παραπάνω, μη σποροειδής ράβδος (*Lactobacillus*) ή σφαιρικός (*Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Oenococcus*). Για αυτούς τους μικροοργανισμούς, άριστη ανάπτυξη παρατηρείται σε θερμοκρασία μεταξύ 25 – 40 °C και pH μεταξύ 4,0 – 6,0. (Quinto et al., 2014)



Εικόνα 2 : Βακτήρια του γαλακτικού οξέος κατά την διάρκεια της ζύμωσης

Επειδή τα βακτήρια του γαλακτικού οξέος (LAB) χρησιμοποιούνται από πολύ παλιά, γενικότερα, στις ζυμώσεις (γιαούρτι, τυριά, κεφίρ), έχουν λάβει το καθεστώς GRAS, δηλαδή γενικά αναγνωρισμένα ως ασφαλή από τον FDA, Οργανισμό Τροφίμων και Φαρμάκων των Ηνωμένων Πολιτειών. Επίσης, πολλά από τα βακτήρια του γαλακτικού οξέος, λόγω των πλεονεκτημάτων τους να προάγουν την υγεία, έχουν κατηγοριοποιηθεί ως προβιοτικά. Παρόλο που τα βακτήρια LAB έχουν γίνει γνωστά για την ικανότητα τους να παράγουν γαλακτικό οξύ, μπορούν, ακόμα, να παράγουν και άλλους μεταβολίτες, όπως είναι το οξικό οξύ, η αιθανόλη, το διοξείδιο του άνθρακα, η μαννιτόλη και το διακετύλιο. (De Filippis et al., 2018)

Τα βακτήρια του γαλακτικού οξέος (LAB) μπορούν να ταξινομηθούν σε τρεις διαφορετικές ομάδες. Τα ομοζυμωτικά (*Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*), τα προαιρετικά ετεροζυμωτικά (*Lactobacillus*) και τα υποχρεωτικά ετεροζυμωτικά (*Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Oenococcus*, *Weisella*). Οι πιο απλοί από αυτούς είναι οι ομοζυμωτήρες από την άποψη ότι χρησιμοποιώντας την οδό EMP, καταναλώνουν την γλυκόζη και παράγουν ως κύριο τελικό προϊόν το γαλακτικό οξύ. Αμέσως επόμενοι, που είναι ελαφρώς πιο πολύπλοκοι, είναι οι ετεροζυμωτήρες, οι οποίοι χρησιμοποιώντας την οδό της φωσφορικής πεντόζης, μεταβολίζουν την γλυκόζη και παράγουν ως κύρια τελικά προϊόντα το γαλακτικό οξύ, την αιθανόλη και το διοξείδιο του άνθρακα. Σε περίπτωση που αντί για γλυκόζη υπάρχει φρουκτόζη, παρασκευάζεται αντί για αιθανόλη οξικό οξύ, ενώ η φρουκτόζη ανάγεται σε μαννιτόλη. Τέλος, οι προαιρετικοί ετεροζυμωτήρες, χρησιμοποιώντας την ομοζυμωτική οδό μεταβολίζουν την γλυκόζη και χρησιμοποιώντας την

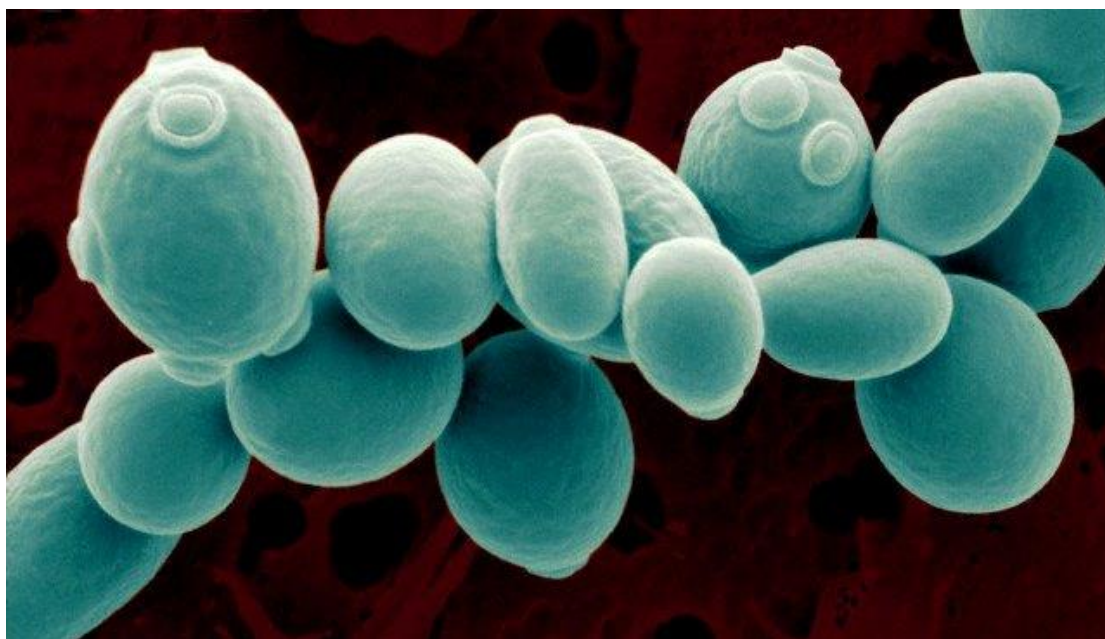


ετεροζυμωτική οδό μεταβολίζουν το γλυκονικό οξύ και την πεντόζη. (Wisselink et al., 2002)

### 2.1.2. ΖΥΜΟΜΥΚΗΤΕΣ

Οι ζυμομύκητες είναι γνωστοί και ως ζύμες ή βλαστομύκητες ή μαγιά. Είναι μονοκύτταροι οργανισμοί, οι οποίοι ανήκουν στην επικράτεια των ευκαριωτών και στο βασίλειο των μυκήτων. Έως και σήμερα έχουν αναγνωριστεί περίπου 1500 είδη. Αυτά υπολογίζεται ότι αποτελούν γύρω στο 1 % όλων των ειδών μυκήτων. Οι ζυμομύκητες εξελίχθηκαν από πολυκύτταρους μύκητες σε μονοκύτταρους οργανισμούς, με κάποια από αυτά τα είδη να μπορούν να αναπτύξουν πολυκυττάρια μορφές με μορφή ίνας, αποτελούμενες από συνδεδεμένα κύτταρα, που είναι γνωστά ως ψευδοφές. Το μέγεθος των ζυμομυκήτων ποικίλει και εξαρτάται, μάλιστα, από το περιβάλλον και το είδος. Το πιο συνηθισμένο είναι να έχουν διάμετρο 3 – 4 μm, αν και κάποια είδη φτάνουν τα 40 μm. Οι περισσότεροι ζυμομύκητες αναπαράγονται με μίτωση, ενώ ορισμένοι αναπαράγονται με εκβλάστηση, δηλαδή με ασύμμετρο διαχωρισμό. (Goh et al., 2012)

Τα περισσότερα είδη ζυμομυκήτων ζυμώνουν την ζάχαρη σε αιθανόλη, αν και αρκετές σύγχρονες διεργασίες αλκοολικής ζύμωσης, λόγω της υψηλής αποτελεσματικότητας του *Saccharomyces cerevisiae*, ξεκινούν την ζύμωση μόνο με αυτόν τον μικροοργανισμό, δηλαδή με μια μόνο καλλιέργεια εκκίνησης. Παρόλα αυτά, στην βιομηχανία και συγκεκριμένα σε μεικτές ζυμώσεις, όπως γίνεται στο κρασί και στην τεκίλα, χρησιμοποιούν ολοένα και περισσότερο τις ζύμες μη *Saccharomyces*, με αποτέλεσμα να εμπλουτίσουν το αρωματικό προφίλ και να ενισχύσουν την πολυπλοκότητα και την κινητική του τελικού προϊόντος. Οι μικροβιακές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των ζυμών *Saccharomyces* και μη *Saccharomyces* αποδεικνύεται ότι είναι μια πλεονεκτική επιλογή στην επεξεργασία μεικτής ζύμωσης, δίνοντας, έτσι, αρκετά πλεονεκτήματα, όπως είναι η προσθήκη αρωμάτων και γεύσεων, η αποφυγή των κινδύνων της κολλημένης ζύμωσης και η τροποποίηση των ανεπιθύμητων παραμέτρων. Κι έτσι, η αλληλεπίδραση με ζυμομύκητες της kombucha έχει αποδειχθεί ότι είναι μια κοινοπραξία, η οποία, τελικά, παράγει επιθυμητά χαρακτηριστικά. (Lopez et al., 2014)

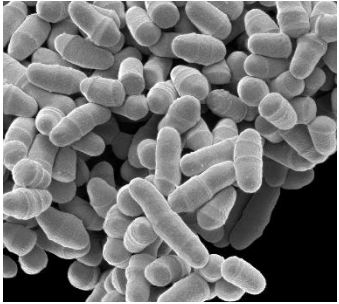
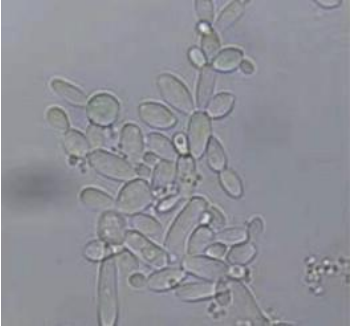
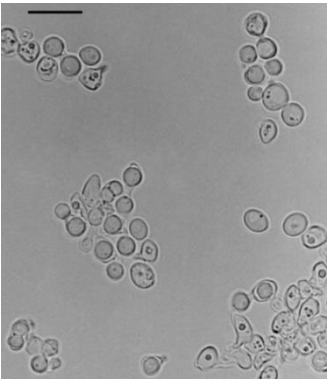


Εικόνα 3 : Ζυμομύκητες κατά την διάρκεια της ζύμωσης

Γενικά, στις καλλιέργειες kombucha υπάρχουν πολλά γένη και είδη ζυμομυκήτων, ένα ευρύ φάσμα από το οποίο έχει ήδη ερευνηθεί. Μερικά από αυτά είναι, τα είδη *Zygosaccharomyces*, *Candida*, *Kloeckera* / *Hanseniaspora*, *Torulasporea*, *Pichia*, *Brettanomyces* / *Dekkera*, *Saccharomyces*, *Lachancea* και *Schacharomy haveromyces*. Παρόλο που παρουσιάζουν μεγάλη μεταβλητότητα, κάποια από τα κυρίαρχα είδη εμφανίζονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 1). (Aguilar Uscanga et al., 2003)

Πίνακας 1 : Ορισμένα είδη ζυμομυκήτων που υπάρχουν σε καλλιέργειες kombucha

ΕΙΔΟΣ	ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ	ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Υψηλή ανοχή σε αιθανόλη</li> <li>• Γρήγοροι ρυθμοί ζύμωσης</li> <li>• Μη ευαισθησία στη θερμοκρασία και την συγκέντρωση υποστρώματος</li> </ul>

<p><i>Schizosaccharomyces pombe</i></p>		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Υψηλή ζυμωτική δύναμη</li> <li>• Δυνατότητα μετατροπής μηλικού οξέος σε αιθανόλη</li> <li>• Απελευθέρωση υψηλών ποσοτήτων πολυσακχαριτών</li> </ul>
<p><i>Brettanomyces bruxellensis</i></p>		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Υψηλή αντοχή σε οσμωτικό και αιθανολικό στρες</li> <li>• Υψηλότερη αποτελεσματικότητα στη χρήση των διαθέσιμων πηγών N από το <i>Saccharomyces cerevisiae</i></li> <li>• Τάση για ζύμωση των σακχάρων σε αιθανόλη και παραγωγή υψηλών συγκεντρώσεων οξικού οξέος σε αερόβιες συνθήκες</li> </ul>
<p><i>Zygosaccharomyces roxyii</i></p>		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Εξαιρετικά ωσμο- και αλο-ανεκτικό</li> <li>• Αντιμετωπίζει το καλύτερο στρες σε ζάχαρη και αλάτι από το <i>Saccharomyces cerevisiae</i></li> </ul>

Εκτός από τα παραπάνω, τα οποία έχουν ήδη βρεθεί και μελετηθεί, πολλοί ερευνητές έχουν ποσοτικοποιήσει κάποιες ακόμη ζύμες, που υπάρχουν στις καλλιέργειες kombucha. Πιο συγκεκριμένα, έχει βρεθεί ότι στις καλλιέργειες kombucha ο μικροοργανισμός *Zygosaccharomyces* αφθονεί ως κυρίαρχη ζύμη με ποσοστό περίπου 84,1 % και τα είδη *Dekkera* και *Pichia* με ποσοστό 6 % και 5 % αντίστοιχα. Ορισμένοι ζυμομύκητες, όπως είναι ο *Candida krusei* ή *Issatchenkia orientalis*, σχηματίζουν βιοφίλμ, όπως ανακαλύφθηκε το 1995 από τον Mayser. Επίσης, το 2001

οι Kuntzman, Robnett και Basehoar – Powers απομονώσαν από το τσάι kombucha μια νέα ασκοσπορογόνο μαγιά, που ονομάζεται *Zygosaccharomyces kombuchaensis*. (Pires et al., 2014)

### 2.1.3. ΒΑΚΤΗΡΙΑ ΟΞΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ

Τα βακτήρια οξικού οξέος (acetic acid bacteria – AAB) είναι gram αρνητικά βακτήρια, έχουν σχήμα ράβδου και είναι υποχρεωτικά αερόβια. Είναι μη σποριωδή, κινητά βακτήρια με πλάτος περίπου 0,5μm έως 1,4 μm μήκος και ελλειψοειδές έως ραβδοειδές σχήματος. Ανήκουν στην οικογένεια των Acetobacteraceae και πιο συγκεκριμένα στην κατηγορία άλφα - πρωτεοβακτηρίων. Κατά την διάρκεια της ζύμωσης, οξειδώνουν τα σάκχαρα ή την αιθανόλη και παράγουν οξικό οξύ. Στην βιομηχανία τροφίμων, αρκετά είδη βακτηρίων οξικού οξέος χρησιμοποιούνται για την παραγωγή πολλών τροφίμων και χημικών ουσιών. (Mamlouk & Gullo, 2013)

Στη ζύμωση kombucha τα πιο χαρακτηριστικά βακτήρια είναι τα βακτήρια του οξικού οξέος (AAB). Τα AAB αναπτύσσονται άριστα σε συνθήκες θερμοκρασίας από 25 °C έως 30 °C και pH από 5,0 έως 6,5, αν και μπορούν, επίσης, να αναπτυχθούν σε τιμές pH από 3,0 έως 4,0. Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, τα AAB είναι υποχρεωτικά αναερόβια, γεγονός που σημαίνει ότι μπορούν να επιβιώσουν κάτω από χαμηλά επίπεδα οξυγόνου για μεγαλύτερες χρονικές περιόδους, όπως συμβαίνει σε ένα μπουκάλι κρασί ή κατά την διάρκεια της διαδικασίας ζύμωσης κόκκων κακάο. Τέτοιες συνθήκες χαμηλού επιπέδου οξυγόνου μπορεί να οδηγήσουν σε ζωντανά, βιώσιμα βακτήρια, ωστόσο μη καλλιεργήσιμα (VBNC – βιώσιμα αλλά μη καλλιεργήσιμα), καθιστώντας την ανάκτηση αυτών των βακτηρίων πιο δύσκολη. Έτσι, μια απλή καλλιέργεια δεν είναι ικανή για να ανιχνευτούν τα βακτήρια, αλλά σίγουρα θα χρειαστεί ένας προεμπλουτισμός. (Laureys & De Vuyst, 2014)

Η διαδικασία ζύμωσης και πιο συγκεκριμένα η χημική σύνθεση της kombucha προκύπτει σε μεγάλο βαθμό από τον συνδυασμό των βακτηρίων της μαγιάς και του οξικού οξέος (AAB). Υπάρχουν περισσότερα από δεκαεπτά γένη AAB, τα οποία έχουν βρεθεί στην kombucha και ανήκουν στα παρακάτω γένη : *Acetobacter*, *Gluconobacter*, *Gluconacetobacter* και *Komagataeibacter*. (Wang et al., 2015). Από διάφορες μελέτες που έχουν διεξαχθεί, τα κυριότερα είδη βακτηρίων οξικού οξέος που βρέθηκαν είναι : *Acetobacter xylinus*, *A. xylinoides*, *Acetobacter aceti*, *A. pausterianus* και *Bacterium gluconicum*. Το *Acetobacter xylinus* έχει επαναταξινομηθεί ως *Gluconacetobacter xylinum* και επίσης, από όλα τα βακτήρια που βρίσκονται στην kombucha, αυτό θεωρείται το καλύτερο βακτήριο που παράγει κυτταρίνη. Στην kombucha, το πιο χαρακτηριστικό AAB είναι το είδος *Komagataeibacter* και πιο συγκεκριμένα το στέλεχος *Komagataeibacter xylinus*, λόγω της ικανότητας του να παράγει κυτταρίνη. (Semjonovs et al., 2017). Επιπλέον, τα είδη *Komagataeibacter* μπορούν να

συσσωρεύουν μέχρι και 10 – 20 % οξικό οξύ στο μέσο, ενώ τα είδη *Acetobacter* έχουν την ικανότητα να συσσωρεύουν το πολύ 8 % οξικό οξύ. (Gomes et al., 2018)

Εξαιτίας της απροθυμίας των βακτηρίων του οξικού οξέος να προσκολληθούν στο άγαρ, τα AAB είναι εμφανώς πολύ δύσκολο να απομονωθούν με προσεγγίσεις, που εξαρτώνται από την καλλιέργεια τους. Γι' αυτόν το λόγο, τα διάφορα αποτελέσματα των μετρήσεων AAB ποικίλλουν από μη ανιχνεύσιμα μέχρι παραπάνω από 8,5 log cfu ανά γραμμάριο κόκκου kombucha. Ωστόσο, τα βακτήρια του οξικού οξέος μπορούν να προέλθουν και από φυσικές πηγές, όπως είναι για παράδειγμα τα αλκοολούχα ποτά, δηλαδή σκληρός μηλίτης, κρασί και διάφορες μπύρες. (Thompson Witrick et al., 2017). Είναι γνωστό ότι τα βακτήρια του οξικού οξέος προσδίδουν στην kombucha, όπως και σε άλλα τρόφιμα που περιέχονται, γεύση που μοιάζει με ξύδι. Όμως, τα AAB είναι πιθανόν να εμπλακούν και στην αλλοίωση ορισμένων τροφίμων και ποτών, όπως είναι το κρασί, η μπύρα, τα αναψυκτικά και τα φρούτα. Τα βακτήρια του οξικού οξέος του γένους *Acetobacter* και *Gluconobacter* έχουν θεωρηθεί ο παράγοντας αλλοίωσης του κρασιού και της μπύρας. Για την παραγωγή ξυδιού χρησιμοποιούνται, κυρίως οι καλλιέργειες οξικού οξέος και για αυτό δεν προκαλεί έκπληξη το γεγονός ότι η kombucha έχει στοιχεία γεύσης που μοιάζουν με ξύδι. (Sengun & Karabiyikli, 2011)

## 2.2. SCOBY

Αφού αναφέρθηκαν παραπάνω οι κυριότεροι μικροοργανισμοί, που βρίσκονται στην kombucha, αξίζει να αναφερθούν και κάποια σημαντικά στοιχεία για το scoby. Το scoby είναι ένα βιοφίλμ κυτταρίνης, το οποίο έχει προέλθει από προηγούμενες ζυμώσεις τσαγιού. (Malbaša et al., 2011). Στην αρχή της ζύμωσης, το βιοφίλμ φαίνεται σαν ένα ορατό λεπτό στρώμα, το οποίο επιπλέει στην κορυφή του παρασκευάσματος. Κατά την διάρκεια της ζύμωσης, έχει παρατηρηθεί ότι τα βακτήρια παράγουν μικροσκοπικά νημάτια κυτταρίνης, τα οποία ανεβαίνουν στην κορυφή του υγρού και μετά συσσωματώνονται μαζί. Αυτή η συσσωμάτωση των νημάτων βοηθάει στην δημιουργία πολλών «στοιβαγμένων» στρωμάτων που επιπλέουν στην κορυφή του ποτού. Κατά την διάρκεια της ζύμωσης, τα στρώματα αυτά συνθέτουν ένα ισχυρότερο και μεγαλύτερο βιοφίλμ. (May et al., 2019). Σε αυτό το παχύ βιοφίλμ ζουν βακτήρια, τα οποία θεωρείται ότι παρέχουν έναν πρώτο αμυντικό μηχανισμό από τα περιβαλλοντικά βακτήρια και επίσης, επιτρέπουν την αποθήκευση πόρων. Εξαιτίας της έμφυτης σύνθεσης του ιξώδους της κυτταρίνης, το βιοφίλμ θέτει ως εμπόδιο στην διάχυση των αντιβιοτικών και τελικά συμβάλλει στην προστασία της kombucha από εξωτερικά βακτήρια. (Stewart, 1996)



Εικόνα 4 : Scoby που προστίθενται στο τσάι

Το scoby, όπως συνηθίζεται να λέγεται, είναι η «μητέρα» των μεταβολικών διεργασιών, που δημιουργεί το τελικό προϊόν, το τελικό ρόφημα kombucha. Το scoby, κατά την διάρκεια της ζύμωσης, λαμβάνει ένα πιο εμφανές σχήμα, που μοιάζει με την κορυφή του μανιταριού. Όσον αφορά την υφή του, είναι πυκνή, γλιστερή και μοιάζει με ζελέ. Αναφορικά με την μυρωδιά του, το scoby παράγει μια μυρωδιά που μπορεί να συγκριθεί με το ξύδι, γεγονός που μπορεί να εξηγήσει τόσο την όξινη μυρωδιά, όσο και την γεύση της kombucha. Η μυρωδιά αυτή, που μοιάζει με το ξύδι, είναι και μια καλή ένδειξη ότι το scoby είναι «ζωντανό» και υγιές, ενώ οποιαδήποτε μouxλιασμένη ή γενικά δυσάρεστη μυρωδιά, πιθανόν να σημαίνει ότι το scoby μπορεί να είναι μολυσμένο ή να βρίσκεται σε μια φάση αποσύνθεσης. (Crum & LaGory, 2016)

Για την διαδικασία της ζύμωσης χρησιμοποιούνται διάφορα βακτήρια του οξικού οξέος, όπως είναι τα *Acetobacter pasteurianus*, *Acetobacter aceti*, *Gluconobacter oxydans* και διάφοροι ζυμομύκητες, όπως είναι οι *Saccharomyces species*, *Zygosaccharomyces kombuchaensis*, *Torulopsis sp.*, *Pichia sp.*, *Brettanomyces sp.* (Karr & Sumner, 2019). Υπό συνθήκες αερόβιας ζύμωσης, οι μικροοργανισμοί, σε διάστημα περίπου 7 με 10 ημερών, έχουν την ικανότητα να μετατρέπουν το τσάι και την ζάχαρη σε ένα ελαφρώς ανθρακούχο και ελαφρώς όξινο δροσιστικό ρόφημα. Το ρόφημα αυτό αποτελείται από πολλά οξέα, όπως είναι το οξικό, το γλυκονικό και το γλυκουρονικό, διάφορες βιταμίνες, 14 αμινοξέα, αρκετές πολυφαινόλες του τσαγιού και ορισμένα υδρολυτικά ένζυμα. (Jayabalan et al., 2014)

Αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι μετά από έναν κύκλο ζύμωσης εννέα ημερών, η συνολική συγκέντρωση βακτηρίων και ζυμομυκήτων πιστεύεται ότι φτάνει τα  $10^6$  –  $10^{10}$  cfu ανά ml στην kombucha. (Dufresne & Farnworth, 2000) (Jarrell et al., 2000) (Liu et al., 1996)

## 2.3. ΤΡΟΠΟΣ ΠΑΡΑΣΚΕΥΗΣ

Η kombucha είναι ένα παραδοσιακό ζυμώμενο ρόφημα, το οποίο έχει υποστεί ζύμωση. Υπάρχουν διάφορες συνταγές για να φτιαχτεί το ρόφημα αυτό και οι συνταγές ποικίλλουν αρκετά, ανάλογα με την ποσότητα και τον τύπο του τσαγιού που χρησιμοποιείται, την ποσότητα του τσαγιού που προστίθενται, τον χρόνο ζύμωσης, την καλλιέργεια εκκίνησης, τη θερμοκρασία και πολλά άλλα. Πιο συγκεκριμένα, η kombucha παρασκευάζεται με την ζύμωση ζαχαρούχου τσαγιού με scoby και η διαδικασία για την παραγωγή της είναι πολύ απλή, όπως περιγράφεται παρακάτω. (Laureys et al., 2020)

Πρώτα από όλα, παρασκευάζεται το τσάι. Θερμαίνεται η κατάλληλη ποσότητα νερού και σε αυτή τοποθετούνται ο απαιτούμενος αριθμός από τα φακελάκια του τσαγιού για προκαθορισμένο χρονικό διάστημα, περίπου 5 με 10 λεπτά. Στην συνέχεια, προστίθενται στο ζεστό διάλυμα τσαγιού η απαραίτητη ποσότητα ζάχαρης και αναδεύεται, έτσι ώστε η ζάχαρη να διαλυτοποιηθεί εντελώς και το διάλυμα αυτό αφήνεται να κρυώσει. Όταν το διάλυμα φτάσει σε θερμοκρασία δωματίου, προστίθενται σε αυτό το scoby. Το scoby μαζί με 100 – 200 ml μιας προηγούμενης ζυμώμενης παρτίδας kombucha ή ξυδιού, προστίθενται για τον εμβολιασμό μιας νέας παρτίδας. Αυτή η προσθήκη της προηγούμενης ζυμώμενης kombucha ή ξυδιού, προκαλεί την πτώση του αρχικού pH του διαλύματος τσαγιού και παράλληλα αναστέλλει την ανάπτυξη αλλοιώσεων και παθογόνων μικροοργανισμών. Έπειτα, το μείγμα kombucha καλύπτεται με μια καθαρή πετσέτα ή με ένα πανί, ώστε να αποφευχθούν οι μολύνσεις. Το διάλυμα αφήνεται να ζυμωθεί σε θερμοκρασία δωματίου, δηλαδή 18 – 30 °C και η διαδικασία αυτή διαρκεί περίπου 10 ημέρες. (May et al., 2019)

### 2.3.1. Παράγοντες που επηρεάζουν την ζύμωση kombucha

Η διαδικασία της ζύμωσης, όπως περιγράφηκε παραπάνω, μπορεί να επηρεαστεί από διάφορους παράγοντες, όπως είναι το pH, η θερμοκρασία, η ποσότητα του οξυγόνου κατά την έναρξη της διαδικασίας της ζύμωσης, το διαλυμένο διοξείδιο του άνθρακα (CO<sub>2</sub>), ο ρυθμός διάτμησης στο ζυμωτήρα και η συγκέντρωση του υποστρώματος της ζύμωσης. Όπως συμβαίνει με τις περισσότερες ζυμώσεις, τα βακτήρια και η μαγιά έχουν ιδανικές συνθήκες ζύμωσης. Σε περίπτωση που οι συνθήκες αυτές αλλάξουν έστω και ελαφρώς, ο ρυθμός ζύμωσης επηρεάζεται είτε θετικά είτε αρνητικά. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να επηρεάζονται και η απόδοση, τα χαρακτηριστικά γεύσης και



αρώματος του τελικού προϊόντος, οι φυσικοχημικές ιδιότητες και τα θρεπτικά χαρακτηριστικά της kombucha. Επιπλέον, οι διαφορετικές ποικιλίες του τσαγιού, που χρησιμοποιούνται, μαύρο ή πράσινο τσάι, ο χρόνος ζύμωσης, οι αλλαγές στην συγκέντρωση και ζυμώσιμο υπόστρωμα, γλυκόζη αντί για σακχαρόζη, αλλά ακόμα και η ίδια η σύνθεση του scoby είναι ικανά στο να επηρεάσουν σε μεγάλο βαθμό την ζύμωση της kombucha, καθώς και να έχουν σημαντικό αντίκτυπο στην βιολογική της δραστηριότητα. (Marsh, Hill, et al., 2014).

### **2.3.1.1. Υπόστρωμα**

Η παραδοσιακή kombucha παρασκευάζεται με την χρήση μαύρου ή πράσινου τσαγιού ως βάση. Παρόλο αυτά, η kombucha μπορεί να παρασκευαστεί και με άλλα πολλά υποστρώματα, τα οποία θα αναφερθούν παρακάτω, στην επόμενη ενότητα (ενότητα 2.4. : Διαφορετικά Προϊόντα).

Το ίδιο το τσάι πρέπει να γλυκαθεί και αυτό συνήθως επιτυγχάνεται με σακχαρόζη ως υπόστρωμα ζύμωσης για την μαγιά. Η ζύμη υδρολύει την σακχαρόζη σε γλυκόζη και φρουκτόζη, με την βοήθεια του ενζύμου ιμβαρτάση, η οποία βρίσκεται στο περίπλασμα του κυττάρου ζυμομύκητα. (Gaggia et al., 2019). Τυπικά, τα πενήντα γραμμάρια σακχαρόζης ανά ένα λίτρο νερού είναι αρκετά, ώστε να διασφαλιστεί η επιτυχής ζύμωση. Η γλυκόζη και η φρουκτόζη ζυμώνονται από την μαγιά σε αιθανόλη, γλυκερόλη και διοξειδίο του άνθρακα. (Liu et al., 1996) Έπειτα, τα βακτήρια του οξικού οξέος (AAB) μετατρέπουν την αιθανόλη σε οξικό οξύ. Αυτή η παραγωγή του οξικού οξέος από τα βακτήρια AAB διεγείρουν την ζύμη στο να παράγει περισσότερη αιθανόλη. (Malbasa et al., 2002) (Vitas et al., 2013)

### **2.3.1.2. ΧΡΟΝΟΣ ΖΥΜΩΣΗΣ**

Ο χρόνος ζύμωσης είναι ένας από τους βασικούς παράγοντες που επηρεάζουν την διαδικασία της ζύμωσης. Ο χρόνος ζύμωσης της kombucha μπορεί να κυμαίνεται μεταξύ 7 – 60 ημέρες. Όμως, ο μέσος χρόνος ζύμωσης είναι περίπου στις 15 ημέρες.

Η πραγματική έκταση της δραστηριότητας εξαρτάται από την καλλιέργεια εκκίνησης και την διάρκεια της ζύμωσης, που επηρεάζει τους τύπους των μεταβολιτών που παράγονται. (Chu & Chen, 2006) Παρόλο που η αύξηση του χρόνου ζύμωσης της kombucha οδηγεί σε υψηλότερη συγκέντρωση αντιοξειδωτικών, αυτή η παράταση του χρόνου ζύμωσης δεν συνίσταται, εξαιτίας των δυνητικά επιβλαβών επιπέδων

οργανικών οξέων για την άμεση κατανάλωση. Επίσης, ένας παρατεταμένος χρόνος ζύμωσης μπορεί να δημιουργήσει ένα αφιλόξενο περιβάλλον, εξαιτίας της συσσώρευσης ζωτικών θρεπτικών συστατικών που οι μικροοργανισμοί λιμοκτονούν. (Chen & Liu, 2000)

Ο χρόνος ζύμωσης καθορίζει την συγκέντρωση και τους τύπους των θρεπτικών συστατικών, που παράγονται από τους μικροοργανισμούς και επίσης, επηρεάζει τις ενώσεις γεύσης και αρώματος, που παράγονται. Μελέτες έχουν δείξει ότι η ζύμωση της kombucha σε χρόνο μεταξύ 6 – 10 ημέρες, δημιουργεί ένα δροσιστικό ρόφημα, που μοιάζει με φρούτα. Ενώ, η ζύμωση που αφήνεται να ξεπεράσει τις 10 ημέρες, δημιουργεί ποτά, τα οποία με τις μέρες αρχίζουν να γίνονται δυσάρεστα και να έχουν περισσότερη γεύση, που να μοιάζει με ξύδι. (Reiss, 1994b)

### **2.3.1.3. ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ**

Η θερμοκρασία, στην οποία διατηρείται το δείγμα, παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στην ζύμωση της kombucha. Είναι γνωστό ότι, στις περισσότερες ζυμώσεις, αν όχι σε όλες, απαιτείται η ιδανική θερμοκρασία ζύμωσης να παραμένει σταθερή, ώστε να επιτευχθεί η βέλτιστη συγκέντρωση μικροοργανισμών, για την διαδικασία της ζύμωσης, καθώς και η ενζυματική δραστηριότητα. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα, να παραχθεί το καλύτερο δυνατό προϊόν. (Hur et al., 2014)

Για να μπορέσει η ζύμωση να ξεκινήσει με επιτυχία πρέπει το υπόστρωμα της ζύμωσης να είναι 20 °C τουλάχιστον. Για αυτόν τον λόγο, αναφέρεται η εξαιρετικά σημαντική δράση της θερμοκρασίας. Γενικά, οι βέλτιστες θερμοκρασίες ζύμωσης για την kombucha βρίσκονται μεταξύ 22 °C – 30 °C. Έρευνες έχουν δείξει ότι η αύξηση της θερμοκρασίας ζύμωσης της kombucha, παράγει μεγαλύτερες συγκεντρώσεις οξέων και μεταβολιτών, όπως και βιταμίνης C. (Lončar et al., 2006) Όμως, σε περίπτωση που η θερμοκρασία ζύμωσης αυξηθεί κατά πολύ, παράγονται ιδιαίτερα αυξημένες συγκεντρώσεις τόσο οξικού οξέος, όσο και αιθανόλης. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα, να παραχθεί ένα προϊόν μη αναλώσιμο. (Crum & LaGory, 2016)

### **2.3.1.4. pH**

Το pH είναι ένας άλλος σημαντικός παράγοντας που επηρεάζει την διαδικασία ζύμωσης της kombucha. Πιο συγκεκριμένα, είναι μια σημαντική περιβαλλοντική παράμετρος, διότι, κατά την διαδικασία της ζύμωσης, η επίδραση μερικών από τα

οργανικά οξέα που παράγονται, όπως είναι το οξικό και το γλυκονικό, είναι ικανή να επηρεάσει την βιολογική δραστηριότητα κάποιων μικροοργανισμών.

Είναι γνωστό ότι, το pH επηρεάζει τον ρυθμό ανάπτυξης των μικροοργανισμών, που ζυμώνουν και επίσης, προκαλεί δομικές αλλαγές στα φυτοχημικά, που βρίσκονται στην kombucha, τα οποία, με την σειρά τους, μπορούν να επηρεάσουν την αντιοξειδωτική δράση. (Hur et al., 2014). Το ρόφημα της kombucha έχει μια τιμή pH, η οποία, κατά την διάρκεια όλης της διαδικασίας, δεν πρέπει να πέσει κάτω από την τιμή  $pH = 3$ , τιμή που φυσιολογικά συναντάται στον γαστρεντερικό σωλήνα. Όμως, σε περίπτωση που το συνολικό pH του ροφήματος πέσει σε πολύ χαμηλότερο επίπεδο, τότε το ποτό αυτό γίνεται αρκετά όξινο και δύσκολα γίνεται αποδεχτό από τους καταναλωτές. (Lončar et al., 2006). Για αυτόν τον λόγο, η διαδικασία ζύμωσης πρέπει να διακόπτεται, όταν η τιτλοδοτήσιμη οξύτητα φτάσει σε μια ιδανική συγκέντρωση, που κυμαίνεται περίπου στα 4 – 5 g/L. Το βασικό ζήτημα είναι ότι, ο χρόνος που χρειάζεται για την επίτευξη των βέλτιστων επιπέδων τιτλοδοτήσιμης οξύτητας πιθανόν να αλλάζει και να μην είναι σταθερός. Αυτό σχετίζεται με την καλλιέργεια εκκίνησης, που χρησιμοποιήθηκε, καθώς και με τις υπόλοιπες παραμέτρους ζύμωσης. (Villarreal-Soto et al., 2018).

## 2.4. ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΑ ΠΡΟΙΟΝΤΑ

Το τσάι kombucha πρόκειται για ένα δροσιστικό ρόφημα, το οποίο φτιάχνεται μετά από ζύμωση μαύρου, συνήθως, τσαγιού με ζάχαρη και μια κοινοπραξία μαγιάς και κυρίως βακτηρίων οξικού οξέος. Στις μέρες μας, παγκοσμίως, το τσάι kombucha λαμβάνει μια σημαντική και συνεχόμενη αύξηση στο ενδιαφέρον και μάλιστα, εύκολα, μπορεί να ειπωθεί ότι είναι ένα αναδυόμενο δημοφιλές ρόφημα. Μια ζωντανή απόδειξη των μεγάλων ποσοτήτων μεταμόρφωσης, που έχει υποστεί το συγκεκριμένο ποτό, ανά τους αιώνες, είναι το γεγονός ότι το τσάι kombucha, στην εποχή μας, είναι διαθέσιμο σε πάρα πολλές μορφές και γεύσεις. Πιο συγκεκριμένα, υπάρχουν πάρα πολλές και διαφορετικές συνταγές kombucha, οι οποίες ποικίλλουν πολύ. Η διαφορά τους μπορεί να είναι στον τύπο και την ποσότητα του τσαγιού που χρησιμοποιείται, στην ποσότητα ζάχαρης που προστίθενται, στον χρόνο ζύμωσης, στην καλλιέργεια εκκίνησης, στην θερμοκρασία, και πολλά άλλα. (Kim & Adhikari, 2020)

Όπως έχει ήδη προαναφερθεί, η παραδοσιακή kombucha παρασκευάζεται με την χρήση τσαγιού ως βάση. Το τσάι, εκτός από μαύρο ή πράσινο, μπορεί, επίσης, να είναι τσάι του βουνού ή τσάι macha ή γενικότερα οποιοδήποτε άλλο είδος τσαγιού. Επιπλέον, ως βάση μπορεί να χρησιμοποιηθεί κάποιο βότανο, όπως είναι το φασκόμηλο ή το δίκταμο ή οποιοδήποτε άλλο βότανο. Εκτός από τα παραπάνω, πρέπει να σημειωθεί ότι η kombucha μπορεί να παρασκευαστεί και με άλλα υποστρώματα, όπως είναι το εκχύλισμα κονδύλου αγκινάρας Ιερουσαλήμ, γάλα, κρασί, χυμός φρούτων, αφεψήματα φυτών και άλλα. Γενικότερα, αξίζει να σημειωθεί, ότι ως βάση για την kombucha, μπορεί να χρησιμοποιηθεί κάθε υπόστρωμα, το οποίο να φέρει θρεπτικά οφέλη και οφέλη για την υγεία, με βάση το επιλεγμένο μέσο. (Watawana et al., 2015)

Στο ρόφημα kombucha, συνήθως, προστίθενται μια ποσότητα σακχάρου. Αυτό το σάκχαρο μπορεί να είναι η κοινή λευκή κρυσταλλική ζάχαρη ή το μέλι ή το χαρουπόμελο ή γενικότερα οποιοδήποτε συστατικό μπορεί να προσδώσει γλυκύτητα στο ποτό. Όποιο συστατικό και αν χρησιμοποιηθεί από τα παραπάνω, οι ποσότητες που προστίθενται μπορούν να αλλάξουν, οι τελικές συγκεντρώσεις του σακχάρου μπορούν να διαφέρουν από την μια ζύμωση στην άλλη. Το γεγονός αυτό δείχνει ότι η μεταβολική οδός δεν συμβαίνει πάντα με τον ίδιο τρόπο.

## 2.5. ΧΑΡΟΥΠΙ

Το χαρούπι είναι ένα αείφυλλο δέντρο, το οποίο ανήκει στην οικογένεια των Κυαμοειδών και πιο συγκεκριμένα στην τάξη των Κυαμωδών. Η επιστημονική του ονομασία είναι *Ceratonia siliqua*. Η χαρουπιιά είναι ένα δέντρο μακρόβιο, πολύγαμο και μπορεί να είναι μονοικό ή διοικό. Είναι ιδιαίτερα δημοφιλές στην περιοχή της Μεσογείου. Το δέντρο αυτό καλλιεργείται εύκολα και ευδοκμεί σε όλα τα εδάφη, εκτός από τα υγρά και τα άπορα. Τα άνθη της χαρουπιιάς είναι μικρά, πράσινα και δεν έχουν πέταλα. Ο καρπός της είναι πεπλατυσμένος λοβός. Όταν τα χαρούπια είναι άγουρα, είναι μακριά, σκληρά, στριφτά και έχουν πράσινο χρώμα, ενώ όταν είναι ώριμα, είναι ξυλώδη εξωτερικά και το χρώμα τους είναι σκούρο καστανό, όπως φαίνεται και στην παρακάτω εικόνα (Εικόνα 5). (Fidan et al., 2020)



Εικόνα 5 : Χαρούπια

Το χαρουπόμελο είναι ένα φυσικό γλυκαντικό, το οποίο παράγεται από τους καρπούς του χαρουπιού. Είναι σακχαρώδες και έχει μια ευχάριστη, γλυκιά γεύση. Για αυτόν τον λόγο, το χαρουπόμελο χρησιμοποιείται στο ρόφημα kombucha ως γλυκαντικό, αντί της ζάχαρης. (Azab, 2017)

Το χαρουπόμελο έχει αρκετές θετικές επιπτώσεις. Το χαρούπι περιέχει πολλές πολυφαινόλες, οι οποίες είναι αντιοξειδωτικές ουσίες, που είναι γνωστό ότι μειώνουν τον κίνδυνο καρδιακών παθήσεων. Επίσης, βοηθά στην κατανάλωση των τοξινών και στην πρόληψη της επιβλαβούς βακτηριακής ανάπτυξης στο πεπτικό σύστημα του καταναλωτή. Το χαρούπι περιέχει ασβέστιο, που είναι ένα σημαντικό μέταλλο για την υγεία των οστών του ανθρώπου και βοηθά στην καλή λειτουργία της καρδιάς, των μυών και των νεύρων. Όπως προαναφέρθηκε, το χαρούπι είναι μια πλούσια πηγή αντιοξειδωτικών πολυφαινολών, αφού περιέχει περίπου 24 πολυφαινόλικες ενώσεις, οι κυρίες από τις οποίες είναι το γαλλικό οξύ και τα φλαβονοειδή, ενώσεις που έχει αποδειχθεί ότι μειώνουν το οξειδωτικό στρες. Πιο συγκεκριμένα, έχει βρεθεί ότι το γαλλικό οξύ απομακρύνει τις ελεύθερες ρίζες και σκοτώνει τα καρκινικά κύτταρα. Ακόμη, μελέτες έχουν δείξει ότι τα φλαβονοειδή έχουν αντικαρκινικές, αντιφλεγμονώδεις και νευροπροστατευτικές ικανότητες. (Spizzirri et al., 2024) (Vitali et al., 2023)

## 2.6. ΕΠΙΠΤΩΣΕΙΣ ΣΤΗΝ ΥΓΕΙΑ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ

Η kombucha, όπως είναι πια γνωστό, πρόκειται για μια ποικιλία από ζυμωμένα, μερικώς αναβράζοντα, ζαχαρούχα ποτά μαύρου ή πράσινου τσαγιού, που συνήθως προορίζονται ως λειτουργικά ροφήματα, για τα υποτιθέμενα οφέλη για την υγεία του καταναλωτή, όπως αναφέρονται παρακάτω. Η kombucha, ουσιαστικά, παράγεται από ένα τσάι, που ζυμώνεται, χρησιμοποιώντας μια συμβιωτική αποικία βακτηρίων και ζυμομυκήτων, που ονομάζεται scoby. Ιδιαίτερα στις Ηνωμένες Πολιτείες, τα μέσα κοινωνικής δικτύωσης έχουν διαδώσει το συγκεκριμένο ρόφημα, επισημαίνοντας τα θετικά οφέλη που έχει για την υγεία και μπορεί κάποιος να τα λάβει με την τακτική κατανάλωση του. (Ramos et al., 2023)

Η kombucha έχει προταθεί ότι μπορεί να μειώσει την χοληστερόλη και την αρτηριακή πίεση, να αυξήσει την απώλεια βάρους, όπως και την ανοσολογική απόκριση, να ανακουφίσει την αρθρίτιδα, να μειώσει την ασβεστοποίηση των νεφρών και να αυξήσει την ζωτικότητα. Επίσης, έχει την ικανότητα να εξαλείψει τις ρυτίδες, να καταπολεμήσει την ακμή, να καθαρίσει τη χοληδόχο κύστη, να βελτιώσει την δυσκοιλιότητα, να αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό του καρκίνου, βοηθήματα θεραπείας και πολλές μητρικές τροφές. (Nout, 1994)

Η kombucha έχει προωθηθεί με ισχυρισμούς ότι μπορεί να θεραπεύσει μια τεράστια ποικιλία ανθρώπινων ασθενειών, από πολύ σοβαρά μέχρι απλά καθημερινά, συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου, του AIDS, των καρδιαγγειακών παθήσεων, ακόμα και του διαβήτη. Επιπλέον, η kombucha είναι ικανή να παρέχει διάφορα

ευεργετικά αποτελέσματα, όπως είναι η τόνωση του ανοσοποιητικού συστήματος και η αναστροφή των γκρίζων μαλλιών. (Anal, 2019)

Ακόμα, η kombucha έχει την δυνατότητα να προλαμβάνει και να θεραπεύει το έλκος του στομάχου, αλλά και να βοηθήσει στην επούλωση της candida από τον υπερπληθυσμό του μέσα στο έντερο, αποκαθιστώντας την ισορροπία στο πεπτικό σύστημα, με ζωντανή προβιοτική καλλιέργεια, η οποία βοηθάει να επαναπληθυσθεί με καλά βακτήρια, ενώ παραγκωνίζει την candida. Η kombucha, γενικότερα, μπορεί να βοηθήσει στην αποτοξίνωση του σώματος και στην προστασία από ασθένειες, λόγω του ότι περιέχει ισχυρά αντιοξειδωτικά. Ο λόγος για τον οποίο η kombucha δυνητικά μπορεί να μειώσει τον κίνδυνο για ένα συγκεκριμένο είδος καρκίνου, πιθανότατα οφείλεται στην ποιότητα μείωσης της φλεγμονής και της αποτοξίνωσης. (Anal et al., 2020)

Γενικότερα, η kombucha φαίνεται να έχει αρκετά πλεονεκτήματα για την υγεία των καταναλωτών της, αφού προάγει την πρόληψη ασθενειών, βελτιώνει την ψυχική υγεία, υποστηρίζει ένα υγιές έντερο, προστατεύει τους πνεύμονες, είναι αντιβακτηριακό, βοηθά στην διαχείριση του διαβήτη, είναι ευεργετικό για το καρδιαγγειακό σύστημα και βοηθά στην διατήρηση ενός υγιούς ήπατος. Ένας λόγος για τον οποίο τα συμπληρώματα, κάποιες φορές περιέχουν ξηρά προϊόντα kombucha, είναι το γεγονός ότι το ρόφημα αυτό έχει υψηλή περιεκτικότητα σε βιταμίνη Β – 12. Επίσης, το ότι φαίνεται να βοηθά στην ανακούφιση των συμπτωμάτων του διαβήτη, οφείλεται στις λειτουργίες των αντιοξειδωτικών στο ποτό kombucha και πιο αποτελεσματικά από το αντιδιαβητικό μαύρο τσάι, από το οποίο έχει υποστεί ζύμωση. (Anyogu et al., 2021)

Παρόλου που όλες αυτές οι σχετικές επιπτώσεις στην υγεία των καταναλωτών έχουν προκαλέσει αύξηση του ενδιαφέροντος για το συγκεκριμένο ρόφημα, οι δημοσιευμένες επιστημονικές μελέτες, που αποδεδειγμένα αναφέρουν ότι η kombucha είναι ικανή να παρέχει όλες αυτές τις επιπτώσεις στην υγεία είναι αρκετά περιορισμένες. Αξίζει να αναφερθεί ότι υπάρχουν αρκετές ενδείξεις ότι η κατανάλωση του ποτού kombucha πράγματι μπορεί να προσφέρει μια προφύλαξη για την υγεία και μια ανάκαμψη μέσω αποτοξίνωσης, δυναμωτικών, αντιοξειδωτικών και ανοσοδιεγερτικών επιδράσεων. (Benkerroum, 2013)

Από την άλλη μεριά, πρέπει να αναφερθούν και ορισμένα μειονεκτήματα, που φαίνεται να παρατηρούνται. Μερικά δυσμενή μειονεκτήματα στην υγεία των καταναλωτών, πιθανόν να προκαλούνται από την οξύτητα του τσαγιού, η οποία μπορεί να οδηγήσει σε οξέωση. Άλλες αρνητικές επιπτώσεις στην υγεία, κατά την διαδικασία παρασκευής, μπορεί να είναι ένα αποτέλεσμα μόλυνσης από μύκητες ή από βακτήρια. Αξίζει να σημειωθεί ότι το ρόφημα kombucha δεν συνιστάται να καταναλώνεται από γυναίκες που είναι έγκυες, γυναίκες που θηλάζουν, άτομα που έχουν κακή ανοσοποιητική λειτουργία, καθώς και από παιδιά κάτω των 4 ετών. (Gawai & Prajapati, 2017).

### 3. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

#### 3.1. ΣΚΟΠΟΣ

Ο σκοπός της συγκεκριμένης ερευνητικής εργασίας είναι η παραγωγή ενός ζυμωμένου προβιοτικού ροφήματος με συμβιωτική καλλιέργεια βακτηρίων και ζυμών με την προσθήκη χαρουπόμελου ως σάκχαρο. Στην συνέχεια, γίνονται μικροβιολογικές αναλύσεις, με την βοήθεια των οποίων εξετάζονται οι μικροοργανισμοί, που βρίσκονται μέσα στο ρόφημα αυτό, καθώς και διάφορες χημικές αναλύσεις, για την μέτρηση οξέων και αλκοόλης, όπως αναλύονται στα επόμενα κεφάλαια. Τέλος, έγιναν και οργανοληπτικοί έλεγχοι στο τελικό προϊόν, όπου αξιολογήθηκαν η γεύση και το άρωμα, τα αποτελέσματα των οποίων φαίνονται παρακάτω.

#### 3.2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ

1. Απιονισμένο νερό



Εικόνα 6 : Δοχείο με απιονισμένο νερό



Απιονισμένο νερό χρησιμοποιείται σε όλες τις παρασκευές, που έγιναν, για την μικροβιολογική ανάλυση του προϊόντος, ώστε να μην επηρεάζεται από τυχόν χημικά στοιχεία του νερού βρύσης.

## 2. Εμφιαλωμένο νερό «Ζαγόρι»



Εικόνα 7 : Εμφιαλωμένο νερό "Ζαγόρι"

Εμφιαλωμένο νερό της εταιρείας «Ζαγόρι» χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή των τσαγιών, όπως επισημαίνεται παρακάτω.

## 3. Ζυγαριά ακρίβειας 0,01 gr



Εικόνα 8 : Ζυγαριά ακρίβειας 0,01 gr

Με την βοήθεια της ζυγαριάς αυτής, ζυγίζονται όλα τα υλικά που χρησιμοποιούνται κατά την διάρκεια του πειράματος.

## 4. Αλουμινόχαρτο



Εικόνα 9 : Αλουμινόχαρτο εργαστηρίου

Το αλουμινόχαρτο του εργαστηρίου είναι πολύ χοντρό, αποστειρωμένο και πάνω σε αυτό τοποθετούνται όλα τα συστατικά, που εμπλέκονται στην μικροβιολογική ανάλυση, όπως είναι για παράδειγμα τα υπόστρωμα, scoby από το δείγμα kombucha που αναλύεται κι αλλά, ώστε να μην υπάρχει κίνδυνος επιμόλυνσης.

## 5. Κουταλάκια – σπάτουλα



Εικόνα 10 : Κουταλάκι - σπάτουλα εργαστηρίου

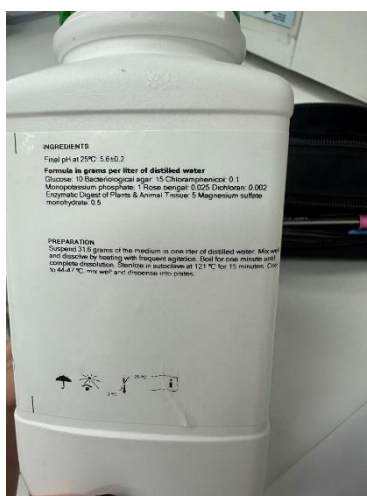
Με την βοήθεια της κουτάλας – σπάτουλας του εργαστηρίου, λαμβάνεται η ζητούμενη ποσότητα οποιουδήποτε συστατικού, ώστε να επιτευχθεί όσο το δυνατόν μεγαλύτερη ακρίβεια.

## 6. Θρεπτικά υποστρώματα

### 6.1. Rose Bengal Agar + Cholamphenicol + Dichloran (DRBC Agar) ISO



Εικόνα 11 : Υπόστρωμα RBC



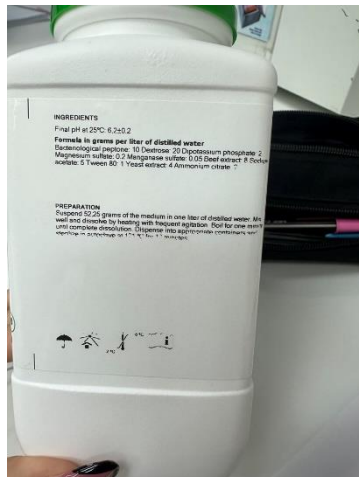
Εικόνα 12 : Οδηγίες για υπόστρωμα RBC

Το υπόστρωμα Rose Bengal Agar είναι εκλεκτικό για την ανάπτυξη των ζυμών.

### 6.2. MRS Broth



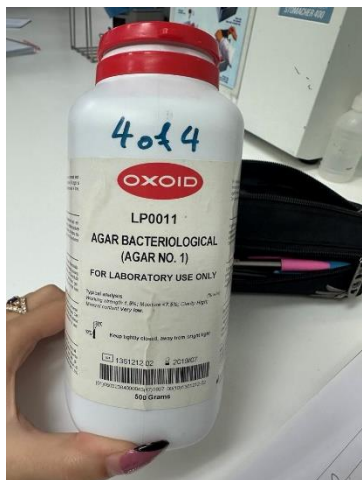
Εικόνα 13 : Υπόστρωμα MBS



Εικόνα 14 : Οδηγίες για υπόστρωμα MRS

Το υπόστρωμα MRS Agar είναι εκλεκτικό για την ανάπτυξη των βακτηρίων του γαλακτικού οξέος (LAB).

### 6.3. Agar Bacteriological (Agar No. 1)



Εικόνα 16 : Agar



Εικόνα 15 : Οδηγίες για Agar

Το agar προστίθεται σε ορισμένα υποστρώματα για τους προσδώσει κάποιες συγκεκριμένες ιδιότητες. Για παράδειγμα, προστίθεται στο υπόστρωμα MRS Broth, με αποτέλεσμα να το μετατρέπει από broth σε agar και να αποκτά, έτσι, άλλες ιδιότητες.

### 6.4. Plate Count Agar

## 6.5. Enrichment Medium



Εικόνα 17 : Υποστρώματα που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή του enrichment medium

Το υπόστρωμα enrichment medium δεν είναι ένα έτοιμο υπόστρωμα, όπως τα παραπάνω, αλλά παρασκευάζεται ως εξής :

1,5 % peptone

0,8 % yeast extract

1 % glucose

0,5 % ethanol

0,3 % acetic acid

0,01 % cycloheximide

## 6.6. Calcium Carbonate Agar



Εικόνα 18 : Υποστρώματα που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή του calcium carbonate agar

Το υπόστρωμα calcium carbonate agar δεν είναι ένα έτοιμο υπόστρωμα, αλλά παρασκευάζεται ως εξής :

2 % glucose

0,8 % yeast extract

0,7 % calcium carbonate

0,5 % ethanol

0,5 % peptone

1,2 % agar

#### 6.7. Yeast Malt Broth + Agar

Το υπόστρωμα yeast malt agar δεν είναι ένα έτοιμο υπόστρωμα, αλλά παρασκευάζεται ως εξής :

5 gr / Lt peptic digest animal tissue

3 gr / Lt yeast extract

3 gr / Lt malt extract

40 gr / Lt dextrose

1,5 % agar

#### 7. Αραιωτικό – Μητρικό υγρό



Εικόνα 19 : Αραιωτικό – μητρικό υγρό

Το αραιωτικό – μητρικό υγρό είναι ένα ισότονο υγρό, που χρησιμοποιείται για να γίνουν οι διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις των δειγμάτων και τελικά να αναλυθούν μικροβιολογικά. Το διάλυμα αυτό είναι ισότονο, ώστε να μην υποστούν ωσμωτικό σοκ οι μικροοργανισμοί κατά την διάρκεια τους αραιώσης. Από το πυκνό, μητρικό, stock απαιτείται 1,25 ml και αυτό διαλύεται σε 1 lt απιονισμένου νερού, τα οποία τοποθετούνται σε μια μεγάλη ογκομετρική φιάλη 1000 ml και αναδεύονται. Στην συνέχεια, τοποθετούνται σε γυάλινα δοχεία, που φαίνονται παραπάνω στην εικόνα (Εικόνα 19) ή σε γυάλινους δοκιμαστικούς σωλήνες και αποστειρώνονται στον κλίβανο αποστείρωσης τους 121 °C για 15 λεπτά.

#### 8. Λαβίδα



Εικόνα 20 : Λαβίδα

Με την βοήθεια τους λαβίδας, πιάνεται για παράδειγμα το scoby, αφού πρώτα έχει αποστειρωθεί με φλόγα, ώστε να μην υπάρχουν επιμολύνσεις από τους χειριστές.

#### 9. Νυστέρι



Εικόνα 21 : Νυστέρι

Με την βοήθεια του νυστεριού, κόβονται τα scoby, για να μπορεί να ζυγιστεί η απαιτούμενη ποσότητα.

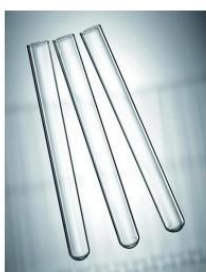
#### 10. Τρυβλία petri



Εικόνα 22 : Τρυβλία petri

Συνήθως, με την βοήθεια αυτών των τρυβλίων γίνονται οι μικροβιολογικές αναλύσεις και σε αυτά αναπτύσσονται οι υπό εξέταση μικροοργανισμοί.

#### 11. Δοκιμαστικοί σωλήνες με τα καπάκια



Εικόνα 23 : Δοκιμαστικοί σωλήνες

Συνήθως, τους δοκιμαστικούς σωλήνες, τους αναφέρεται και παρακάτω, γίνονται οι διαδοχικές αραιώσεις.

#### 12. Στατώ για δοκιμαστικούς σωλήνες



Εικόνα 24 : Στατώ για δοκιμαστικούς σωλήνες

Με την βοήθεια των στατώ στερεώνονται όλοι οι δοκιμαστικοί σωλήνες που χρησιμοποιούνται κατά την διάρκεια του πειράματος.

### 13. Βάζα



Εικόνα 25 : Βάζο για την ζύμωση

Μέσα σε τέτοια βάζα τοποθετούνται το τσάι, το scoby και τα υπόλοιπα απαραίτητα υλικά και γίνεται η ζύμωση. Τα βάζα αυτά, κατά την διάρκεια τους ζύμωσης, δεν κλείνονται με καπάκι αλλά με απορροφητικό χαρτί.

### 14. Απορροφητικό χαρτί



Εικόνα 26 : Απορροφητικό χαρτί

Το απορροφητικό χαρτί, τους αναφέρθηκε παραπάνω, χρησιμοποιείται για να κλείσουν τα βαζάκια με την kombucha κατά την διάρκεια τους ζύμωσης, τους φαίνεται και στην παρακάτω εικόνα (Εικόνα 27).



Εικόνα 27 : Βαζάκια με την kombucha



### 15. Ειδική ταινία αποστείρωσης

Η ταινία αυτή τοποθετείται πάνω σε οποιοδήποτε σκεύος, προτού γίνει η αποστείρωση του και με αυτόν τον τρόπο, γίνεται έλεγχος της αποστείρωσης. Εάν η ταινία είναι λευκή, σημαίνει ότι δεν έχει γίνει αποστείρωση, ενώ εάν η ταινία είναι ριγέ άσπρο – μαύρο, σημαίνει ότι έχει γίνει αποστείρωση.

### 16. Ογκομετρικοί κύλινδροι 250, 500 ml



Εικόνα 28 : Ογκομετρικός κύλινδρος 500 ml

Με την βοήθεια των ογκομετρικών κυλίνδρων, ζυγίζονται οι ζητούμενες ποσότητες, κατά την διάρκεια του πειράματος.

### 17. Ογκομετρικές φιάλες 100, 250, 500, 1000 ml



Εικόνα 29 : Ογκομετρικές φιάλες

Με την βοήθεια των ογκομετρικών φιαλών, παρασκευάζονται με ακρίβεια, τους για παράδειγμα το αραιωτικό – μητρικό υγρό, για να μπορεί να γίνει σωστή ανάδευση κλείνοντας το με το πώμα.

### 18. Ποτηράκια ζέσεως



Εικόνα 30 : Ποτηράκια ζέσεως

Στο εργαστήριο υπάρχουν πολλά ποτήρια ζέσεως, τα οποία είναι βαθμονομημένα. Με την βοήθεια αυτών, ζυγίζονται ποσότητες, όταν δεν ζητείται μεγάλη ακρίβεια και τους σε αυτά παρασκευάζονται τα υποστρώματα και τα τσάι για την Παρασκευή τους kombucha.

## 19. Υδατόλουτρο



Εικόνα 31 : Υδατόλουτρο

Στο υδατόλουτρο τοποθετούνται τα υποστρώματα agar, μετά την αποστείρωση τους, ώστε να μην πήξουν και να διατηρούνται σε μια συγκεκριμένη θερμοκρασία, μέχρι να χρησιμοποιηθούν.

## 20. Φούρνος μικροκυμάτων



Εικόνα 32 : Φούρνος μικροκυμάτων εργαστηρίου

Με την βοήθεια του φούρνου μικροκυμάτων, ζεσταίνονται, θερμαίνονται και αναθερμαίνονται διαλείμματα, υποστρώματα και οτιδήποτε άλλο χρειαστεί.

21. Γκαζάκι

22. Θάλαμος laminar 'Biosafety Cabin class II'



Εικόνα 33 : Θάλαμος laminar

Ο θάλαμος Biosafety Cabin class II είναι τους χώρος αποστειρωμένος, στο οποίο γίνεται όλη η μικροβιολογική ανάλυση. Δηλαδή, η επίστρωση του τρυβλίου με το υπόστρωμα και ο εμβολιασμός του. Με αυτόν τον τρόπο δεν υπάρχει κίνδυνος επιμολύνσεις από το αέρα.

23. Σακούλα stomacher

## 24. Στατώ για σακούλα stomacher



Εικόνα 34 : Στατώ για σακούλα stomacher

Με την βοήθεια τους βάσης τους, στερεώνονται οι σακούλες stomacher, για να μην υπάρχει κίνδυνος να χυθούν τα δείγματα, που τους επισημαίνεται και παρακάτω αποτελούν την πρώτη αραιώση  $10^{-1}$ .

## 25. Συσκευή stomacher BagMixer



Εικόνα 35 : Συσκευή stomacher BagMixer

Η συσκευή stomacher Bagmixer έχει μια κατάλληλη θέση εισόδου τους σακούλας stomacher, που φαίνεται στην εικόνα (Εικόνα 35). Τα δυο δοντάκια που υπάρχουν στο εσωτερικό είναι ικανά να αναδεύουν και να ομογενοποιούν το δείγμα, χωρίς να επηρεάσουν ή να τραυματίσουν την σακούλα. Ο χρόνος ανάδευσης είναι ρυθμιζόμενος από τον χειριστή.

## 26. Πιπέτες Eppendorf



Εικόνα 36 : Πιπέτες Eppendorf

Οι πιπέτες Eppendorf είναι ρυθμιζόμενες και στο άκρο τους προσαρμόζονται ειδικά tip. Με αυτές λαμβάνονται πολύ ακριβής ποσότητες οποιουδήποτε υλικού, τους για παράδειγμα λαμβάνεται 1 ml δείγματος από τους τους αραιώσεις για να γίνει ο κατάλληλος εμβολιασμός.

## 27. Tips για πιπέτες Eppendorf



Εικόνα 37 : Tips για πιπέτες Eppendorf

Υπάρχουν πολλά tips για τους πιπέτες Eppendorf διαφορετικού μεγέθους, για να προσαρμόζονται τους διαφορετικές πιπέτες. Τα tips αυτά αποστειρώνονται στον κλίβανο αποστείρωσης, διότι, κυρίως, χρησιμοποιούνται τους μικροβιολογικές αναλύσεις, που απαιτούνται μόνο μικροποσότητες και δεν πρέπει να επιμολύνονται τα δείγματα που μελετώνται από αυτά.

## 28. Κυκλοαναδευτήρας vortex genie



Εικόνα 38 : Συσκευή vortex

Με την βοήθεια του κυκλοαναδευτήρα vortex αναδεύεται το περιεχόμενο των δοκιμαστικών σωλήνων, ώστε εάν για παράδειγμα υπάρχουν μικροοργανισμοί σε αυτό να κατανέμονται ίσα σε όλο το μείγμα και να μην μένουν όλοι σε ένα σημείο, ώστε να γίνεται σωστή δειγματοληψία.

## 29. Υδροβολέας



Εικόνα 39 : Υδροβολείς

Οι υδροβολείς του εργαστηρίου γεμίζονται με απιονισμένο νερό, το οποίο χρησιμοποιείται, κυρίως, τους μικροβιολογικές αναλύσεις. Συνήθως, είναι πλαστικοί. Πρόκειται για ένα βοηθητικό σκεύος, αφού είναι δύσκολο να λαμβάνεται κάθε φορά η απαιτούμενη ποσότητα από τον μεγάλο πλαστικό δοχείο, το οποίο είναι πολύ βαρύ και δεν μετακινείται, τους φαίνεται και στην εικόνα (Εικόνα 6). Η μυτούλα στην άκρη του σωλήνα βοηθά, όταν επιζητάται ακρίβεια, αφού το νερό μπορεί να πέφτει από εκεί σταγόνα – σταγόνα.

## 30. Γυάλινη ράβδος ανάδευσης



Εικόνα 40 : Γυάλινη ράβδος ανάδευσης

Με την βοήθεια τους γυάλινης ράβδου ανάδευσης, αναδεύονται όλα τα δείγματα πολύ καλά, μέχρι να ομογενοποιηθούν. Για παράδειγμα, ανάδευση των υποστρωμάτων, μέχρις ότου να διαλυτοποιηθούν όλα τα συστατικά.

- 31. Γυάλινη ράβδος επίστρωσης
- 32. Υγρός κλίβανος αποστείρωσης
- 33. Επωαστικός κλίβανος



Εικόνα 42 : Επωαστικός κλίβανος



Εικόνα 41 : Επωαστικός κλίβανος (εσωτερικά)

Στον επωαστικό κλίβανο, τους φαίνεται στην παραπάνω εικόνα (Εικόνα 41), τοποθετούνται τα τρυβλία για την επώαση. Ο κλίβανος τους ρυθμίζεται στην κατάλληλη θερμοκρασία κάθε φορά, ανάλογα με τα τρυβλία, που επωάζονται, ώστε οι συνθήκες να είναι ιδανικές για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών που επιθυμούνται.

- 34. Dispenser
- 35. Πεχάμετρο pH METER GLP 21



Εικόνα 43 : Πεχάμετρο

Με την βοήθεια του πεχάμετρου μετριέται το pH των δειγμάτων kombucha σε διάφορα στάδια κατά την ζύμωση.

### 36. Τζάρα αναεροβίωσης



Εικόνα 44 : Τζάρες αναεροβίωσης

Μέσα τους τζάρες αναεροβίωσης τοποθετούνται τα τρυβλία με το υπόστρωμα MRS, με τα οποία γίνεται ο έλεγχος των βακτηρίων του γαλακτικού οξέος (LAB). Οι τζάρες αυτές κλείνονται και σφραγίζονται με το καπάκι τους και στο εσωτερικό τους υπάρχουν φίλτρα αναεροβίωσης, τα οποία διώχνουν όλο το οξυγόνο.

### 37. Συσκευή απαρίθμησης αποικιών colony counter / SC6 /



Εικόνα 45 : Συσκευή απαρίθμησης αποικιών



Η συσκευή απαρίθμησης των αποικιών τίθεται σε λειτουργία και ανάβει μια λάμπα στο κέντρο. Στο κέντρο αυτό τοποθετούνται με την σειρά τα τρυβλία ένα – ένα και με την βοήθεια τους μαρκαδόρου, επιλέγονται οι σχηματιζόμενες αποικίες, αφού έχει προηγηθεί επώαση, και η συσκευή μετράει αυτόματα. Πρέπει να σημειωθεί ότι καταμετρώνται μόνο τα τρυβλία που έχουν 30 – 300 αποικίες, τα υπόλοιπα δεν λαμβάνονται υπόψη. Στην συνέχεια, υπολογίζεται το μικροβιακό φορτίο και σύμφωνα με αυτό λαμβάνονται τα τελικά συμπεράσματα.

### 38. Scoby



Εικόνα 46 : Διαλύματα kombucha με scoby

Σε όλα τα συστήματα, που αναλύονται παρακάτω, χρησιμοποιήθηκε ως πρώτη ύλη scoby τους εταιρείας Kombuchaorganic. Το scoby είναι το ‘Organic Kombucha Culture’ από την Αγγλία. Στο συγκεκριμένο scoby είχε γίνει ήδη μια πρώτη ζύμωση, προτού χρησιμοποιηθεί.

### 39. Πράσινο τσάι «Lipton»



Εικόνα 47 : Πράσινο τσάι «Lipton»

Σε ορισμένα συστήματα, για την ζύμωση τους kombucha χρησιμοποιήθηκε το συγκεκριμένο πράσινο τσάι “Lipton” classic, που φαίνεται παραπάνω στην εικόνα (Εικόνα 47).

#### 40. Τσάι του βουνού «Κοπέλι»



Εικόνα 48 : Τσάι του βουνού «Κοπέλι»

Σε κάποια συστήματα, για την ζύμωση τους kombucha χρησιμοποιήθηκε αυτό το τσάι του βουνού «Κοπέλι», παραδοσιακό κρητικό αφέψημα, που φαίνεται παραπάνω στην εικόνα (Εικόνα 48).

#### 41. Λευκή κρυσταλλική ζάχαρη



Εικόνα 49 : Λευκή κρυσταλλική ζάχαρη

Σε κάποια συστήματα, για την ζύμωση τους kombucha χρησιμοποιήθηκε αυτή η λευκή κρυσταλλική ζάχαρη για τους τους τους, που φαίνεται παραπάνω στην εικόνα (Εικόνα 49).

#### 42. Χαρουτόμελο «γη του νότου» 'ευγενική χορηγία τους εταιρείας RAK Petrakis'



Εικόνα 50 : Χαρουτόμελο «γη του νότου»

Σε ορισμένα συστήματα, για την ζύμωση τους kombucha χρησιμοποιήθηκε το συγκεκριμένο χαρουτόμελο «γη του νότου», το οποίο είναι ευγενική χορηγία τους εταιρείας RAK Petrakis, που φαίνεται παραπάνω στην εικόνα (Εικόνα 50).

#### 43. Σωληνάκια Falcon



Εικόνα 51 : Φυγοκεντρικός σωλήνας falcon για φυγοκέντρηση

Σε τους του φυγοκεντρικούς σωλήνες falcon τοποθετούνται τα δείγματα, που προορίζονται για φυγοκέντρηση.

#### 44. Φυγόκεντρος



Εικόνα 52 : Φυγόκεντρος

Με την βοήθεια τους φυγοκέντρου, γίνεται η φυγοκέντρηση των δειγμάτων, ώστε να γίνει ο διαχωρισμός τους σε δυο φάσεις. Τα βαριά στοιχεία μένουν ως ίζημα στον πυθμένα των σωλήνων, ενώ τα ελαφριά στοιχεία πηγαίνουν τους τους επιφάνεια, αποτελώντας το υπερκείμενο. Όταν απομακρύνεται το υπερκείμενο με κάποιο σιφώνιο, τότε έχει γίνει πλήρης διαχωρισμός του δείγματος.

45.  $\text{Ba}(\text{OH})_2$  0,3 N

46.  $\text{ZnSO}_4$  5 %

#### 47. Μηχανή φιλτραρίσματος με τρόμπα



Εικόνα 53 : Μηχανή φιλτραρίσματος με τρόμπα

Το φιλτράρισμα των δειγμάτων γίνεται με την βοήθεια του μηχανήματος αυτού, που συνδέεται με την τρόμπα, και με αυτόν τον τρόπο δημιουργούνται συνθήκες κενού, που είναι απαραίτητες.

#### 48. Φίλτρο “cellulose nitrate filter” 0,45 μm



Εικόνα 54 : Φίλτρο φιλτραρίσματος

Το φίλτρο αυτό τοποθετείται στο μηχάνημα τους εικόνας (Εικόνα 53) και έχει την ικανότητα να συγκρατεί τα υπολείμματα του μείγματος που περνάει.

#### 49. Κυψελίδες

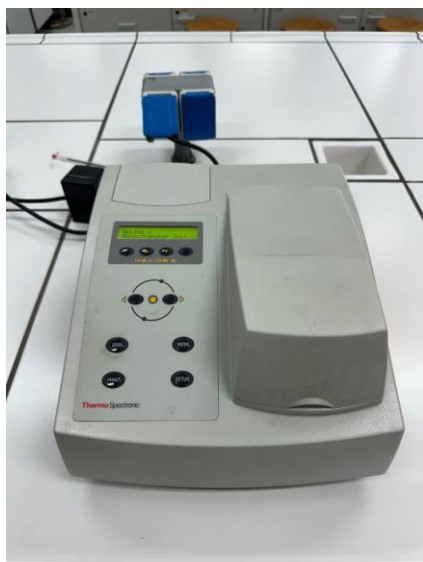


Εικόνα 55 : Κυψελίδα

Τους κυψελίδες τοποθετούνται τα δείγματα μαζί με διάφορα αντιδραστήρια, για να φασματοφωτομετρηθούν και να μετρηθεί η απορρόφηση τους.

50. Μικροσύριγγα των 100  $\mu\text{L}$

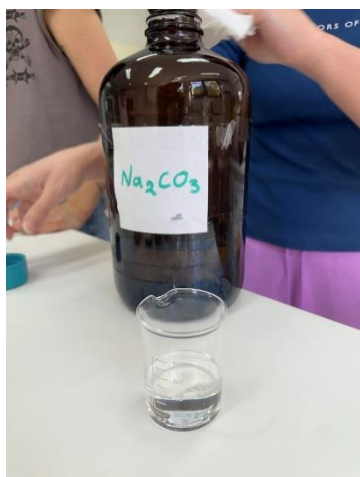
51. Φασματοφωτόμετρο Thermo Spectronic Ηελιος ε



Εικόνα 56 : Φασματοφωτόμετρο Thermo Spectronic Ηελιος ε

Με την βοήθεια του συγκεκριμένου φασματοφωτομέτρου μετριόνται οι απορροφήσεις των δειγμάτων και τελικά οι συγκεντρώσεις του γαλλικού οξέος.

52.  $\text{Na}_2\text{CO}_3$



Εικόνα 57 :  $\text{Na}_2\text{CO}_3$

Πρόκειται για ένα ασθενές οξύ, το οποίο προστίθενται στα δείγματα, τα οποία φασματοφωτομετρούνται. Έχει κρυστάλλους και κάνει αέρια. Οπότε, η προσθήκη του γίνεται με πολύ αργό ρυθμό. Φυλάσσεται σε σκουρόχρωμο δοχείο.

### 53. Όργανο Alex 500 Anton Paar



Εικόνα 58 : Όργανο Alex 500 Anton Paar

Το όργανο αυτό είναι εξαιρετικά χρήσιμο, αφού έχει την δυνατότητα να μετρά ταυτόχρονα σε ένα δείγμα την ποσότητα αλκοόλης που έχει σε % V/V, την πυκνότητα του σε  $\text{g}/\text{cm}^3$ , τα gr τους διαλυμένης ουσίας ανά 100 gr δείγματος (original extract) σε °Plato και την αρχική ποσότητα σακχάρων στην ζύμωση (real extract) σε % W/W.

#### 54. Χρωματόμετρο Precision Colorimeter NR110



Το

Εικόνα 59 : Χρωματόμετρο Precision Colorimeter NR110

συγκεκριμένο χρωματόμετρο χρησιμοποιήθηκε για την μέτρηση του χρώματος των δειγμάτων και τους 3 χρονικές περιόδους. Το όργανο αυτό μετρά τους παραμέτρους L, a, b, c και h. Για κάθε παράμετρο από αυτές λήφθηκαν 3 μετρήσεις.

#### 55. Όργανο Anton Paar DMA 35 Version 3



Εικόνα 60 : Όργανο Anton Paar DMA 35 Version 3

Το συγκεκριμένο όργανο έχει την ικανότητα να μετρά, μεταξύ άλλων, το ειδικό βάρος Specific Gravity (SG) σε  $g / cm^3 / K$ , την ποσότητα τους σακχαρόζης Brix σε °Brix και την ποσότητα των διαλυτών στερεών Plato σε °Plato.



### 3.3. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

#### 3.3.1. ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Η μικροβιολογική ανάλυση γίνεται για να εξεταστούν οι μικροοργανισμοί, που βρίσκονται μέσα στο ρόφημα kombucha, σε διάφορες φάσεις κατά την διάρκεια τους ζύμωσης.

Πρώτα από όλα, παρασκευάζονται τα θρεπτικά υποστρώματα, 500 ml από το καθένα. Το υπόστρωμα rose Bengal agar (RBC) για τους ζύμες, το MRS agar για τα βακτήρια του γαλακτικού οξέος (LAB), το enrichment medium για τα βακτήρια του οξικού οξέος (AAB) και το plate count agar (PCA), που είναι ένα γενικό υπόστρωμα, για την ΟΜΧ. Διαβάζονται πολύ καλά τους οι πληροφορίες που αναγράφονται πάνω στην συσκευασία των υποστρωμάτων.

Στο rose Bengal agar αναγράφεται ότι 31,6 gr διαλύονται σε 1 λίτρο απιονισμένο νερού. Με απλή μέθοδο των τριών, υπολογίζονται τα απαιτούμενα gr για τα 500 ml απιονισμένου νερού.

Στο 1000 ml απιονισμένου νερού διαλύονται 31,6 gr

Στα 500 ml απιονισμένου νερού διαλύονται x;

$$x = 15,8 \text{ gr}$$

Πιο συγκεκριμένα, σε ένα ποτήρι ζέσεως προστίθενται τα 500 ml απιονισμένου νερού, με την βοήθεια τους ογκομετρικού κυλίνδρου 500 ml και τα 15,8 gr από το υπόστρωμα, με την βοήθεια μιας ζυγαριάς ακρίβειας 0,01 gr και μιας σπάτουλας. Με μια γυάλινη ράβδο αναδεύεται το περιεχόμενο πολύ καλά και στη συνέχεια τοποθετείται το ποτήρι στο φούρνο μικροκυμάτων για να ζεσταθεί, μέχρις ότου διαλυτοποιηθεί πλήρως. Κάθε 1 λεπτό, το μείγμα αναδεύεται. Όταν διαλυτοποιηθεί εντελώς, μεταφέρεται το περιεχόμενο σε γυάλινα δοχεία με καπάκια, τα οποία δεν σφίγγονται πολύ και σε ένα τυχαίο σημείο του δοχείου αυτού τοποθετείται ένα κομμάτι μιας ειδικής ταινίας για τον έλεγχο τους αποστείρωσης.

Συνεχίζεται η ίδια διαδικασία για τα υποστρώματα MRS Agar και Plate Count Agar. Στην συσκευασία MRS Broth αναγράφεται ότι 52,25 gr διαλύονται σε 1 λίτρο απιονισμένο νερού. Με απλή μέθοδο των τριών, υπολογίζονται τα απαιτούμενα gr για τα 500 ml απιονισμένου νερού.

Στο 1000 ml απιονισμένου νερού διαλύονται 52,25 gr

Στα 500 ml απιονισμένου νερού διαλύονται x;

$$x = 26,125 \text{ gr}$$

Στην συσκευασία Agar Bacteriological αναγράφεται ότι είναι 1,5 % W/V. Με απλή μέθοδο των τριών, υπολογίζονται τα απαιτούμενα gr για τα 500 ml απιονισμένου νερού.

Στο 1000 ml απιονισμένου νερού διαλύονται 15 gr

Στα 500 ml απιονισμένου νερού διαλύονται x;

$$x = 7,5 \text{ gr}$$

Οπότε, για το MRS Agar σε ένα ποτήρι ζέσεως προστίθενται τα 500 ml απιονισμένου νερού, τα 26,125 gr MRS Broth και 7,5 gr Agar. Αναδεύονται με μια γυάλινη ράβδο και διαλυτοποιούνται στο φούρνο μικροκυμάτων, με ανάδευση κάθε 1 λεπτό. Μετά μεταφέρονται σε γυάλινα δοχεία και τοποθετείται, σε αυτά, η ειδική ταινία.

Στην συσκευασία Plate Count Agar αναγράφεται ότι 23,5 gr διαλύονται σε 1 λίτρο απιονισμένο νερού. Με απλή μέθοδο των τριών, υπολογίζονται τα απαιτούμενα gr για τα 500 ml απιονισμένου νερού.

Στο 1000 ml απιονισμένου νερού διαλύονται 23,5 gr

Στα 500 ml απιονισμένου νερού διαλύονται x;

$$x = 11,75 \text{ gr}$$

Μετά, ακολουθούνται τα ίδια βήματα, που έγιναν και παραπάνω.

Τους, το υπόστρωμα Enrichment Medium πρέπει να παρασκευαστεί, αφού δεν είναι ένα έτοιμο θρεπτικό υπόστρωμα, τους τα προηγούμενα. Αρχικά, διαβάζονται πολύ καλά οι πληροφορίες και οι αναλογίες και γίνονται οι απαραίτητες μετατροπές στα 500 ml, τους φαίνεται στο παρακάτω πίνακα (Πίνακας 2).

Πίνακας 2 : Σύσταση υποστρώματος και μετατροπές

100 ml	500 ml
1,5 % peptone	7,5 gr peptone
0,8 % yeast extract	4 gr yeast extract
1 % glucose	5 gr glucose
0,5 % ethanol	2,5 gr ethanol
0,3 % acetic acid	1,5 gr acetic acid
0,01 % cycloheximide	0,05 gr cycloheximide

Ζυγίζονται και προστίθενται τους οι ποσότητες, που φαίνονται στην δεύτερη στήλη του πίνακα 1, σε ένα ποτήρι με 500 ml απιονισμένου νερού. Αναδεύονται όλα τα συστατικά πολύ καλά με μια γυάλινη ράβδο και διαλύονται, θερμαίνοντας το στο φούρνο μικροκυμάτων, όπου κάθε λεπτό αναδεύονται ξανά. Αφού διαλυτοποιηθούν όλα τα συστατικά πολύ καλά και το μείγμα γίνει διαυγές, το υγρό υπόστρωμα

τοποθετείται σε δοκιμαστικούς σωλήνες με καπάκια. Σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα τοποθετείται μια ποσότητα 7 ml από το θρεπτικό υπόστρωμα. Οι δοκιμαστικοί σωλήνες τοποθετούνται σε μια βάση και σε αυτήν τοποθετείται η ειδική ταινία αποστείρωσης.

Παράλληλα, παρασκευάζεται και το αραιωτικό – μητρικό υγρό, το οποίο χρησιμοποιείται τους αραιώσεις. Πιο συγκεκριμένα, χρησιμοποιείται ένα ισότονο αραιωτικό υγρό, για να γίνουν οι διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις των δειγμάτων και τελικά να αναλυθούν μικροβιολογικά. Το διάλυμα αυτό είναι ισότονο, ώστε να μην υποστούν ωσμωτικό σοκ οι μικροοργανισμοί κατά την διάρκεια τους αραιώσης. Από το πυκνό, μητρικό, stock απαιτείται 1,25 ml και αυτό διαλύεται σε 1 lt απιονισμένου νερού, τα οποία τοποθετούνται σε μια μεγάλη ογκομετρική φιάλη 1000 ml και αναδεύονται. Με την βοήθεια του dispenser, τους δοσομετρητή γεμίζονται τα γυάλινα σωληνάκια με 9 ml από το αραιωτικό υγρό και κλείνονται με τα καπάκια τους. Αφού γεμιστούν όλα τα σωληνάκια, τοποθετούνται σε μια βάση και σε αυτήν την βάση κολλάται η ειδική ταινία αποστείρωσης.

Όλα τα γυάλινα δοχεία με τα υγρά θρεπτικά υποστρώματα, τους και τα γυάλινα σωληνάκια με το αραιωτικό – μητρικό υγρό τοποθετούνται στον κλίβανο αποστείρωσης, όπου γίνεται η αποστείρωση τους 121 °C για 15 λεπτά, με την συνολική διαδικασία να διαρκεί περίπου 45 – 60 λεπτά.

Αφού ολοκληρωθεί η διαδικασία τους αποστείρωσης, τα θρεπτικά υποστρώματα και κυρίως αυτά που είναι agar, μπαίνουν κατευθείαν στο υδατόλουτρο, ώστε να μην πήξουν. Για τα υποστρώματα, που είναι broth, τους είναι για παράδειγμα το enrichment medium, δεν χρειάζεται να μπουν στο υδατόλουτρο, αφού δεν υπάρχει κίνδυνος να πήξουν.

Αξίζει να σημειωθεί ότι όλη η διαδικασία τους μικροβιολογικής ανάλυσης, από την προετοιμασία των δειγμάτων, τους αραιώσεις, αλλά ακόμα και μέχρι τον εμβολιασμό των τρυβλίων με το μείγμα, πρέπει όλα να γίνονται σε αποστειρωμένο χώρο, για να αποφεύγονται τυχόν επιμολύνσεις από το περιβάλλον ή από κάποιο άλλο συστατικό, υλικό ή συσκευή. Υπάρχουν δυο τρόποι. Ο τους τρόπος είναι κοντά από ένα γκαζάκι με αναμμένη φλόγα, ώστε το γύρω περιβάλλον, που γίνονται τους οι διεργασίες να είναι αποστειρωμένο και τα υλικά, τους είναι η ράβδος και η λαβίδα, να καίγονται σε αυτήν. Ο τους τρόπος είναι τους οι διεργασίες να γίνονται μέσα στο laminar. Πρόκειται για έναν χώρο, θάλαμο αποστείρωσης, ο οποίος φαίνεται στην εικόνα (Εικόνα 33).

Προτού ξεκινήσει η μικροβιολογική ανάλυση των δειγμάτων και συγκεκριμένα σε χρόνο  $t = 0$ , μετράται η τιμή pH αυτών, με την βοήθεια του πεχαμέτρου pH METER GLP21, που φαίνεται στην εικόνα (Εικόνα ). Αρχικά, η συσκευή τίθεται σε λειτουργία και αν χρειαστεί πρέπει να καλιμπριστεί πριν χρησιμοποιηθεί. Το όργανο καλιμπράρεται με την βοήθεια δυο δειγμάτων, που έχουν τιμές pH,  $pH = 4$  και  $pH = 7$ , αντίστοιχα, με την σειρά που ζητηθεί από το όργανο. Οι τιμές pH των 2 δειγμάτων είναι :

$\text{pH}_1 = 2,82$

$\text{pH}_2 = 2,84$

Ακολουθεί η προετοιμασία των δειγμάτων kombucha σε σακούλα stomacher. Πιο συγκεκριμένα, η σακούλα stomacher, με την βοήθεια μιας βάσης, τοποθετείται πάνω σε μια ζυγαριά ακρίβειας 0,01 gr. Στην σακούλα stomacher προστίθενται 99 ml αραιωτικό – μητρικό υγρό και 12,80 gr από την kombucha 1. Η μισή περίπου ποσότητα τους kombucha είναι το scoby και η άλλη μισή είναι το υγρό μέσα στο οποίο αυτό βρίσκεται. Μετά η σακούλα stomacher κλείνεται και τοποθετείται στην συσκευή stomacher, όπου αναδεύεται για περίπου 2 λεπτά. Σε μια άλλη σακούλα stomacher ζυγίζονται 99 ml αραιωτικό – μητρικό υγρό και 11,04 gr kombucha 2 (scoby και υγρό σε ίσες περίπου ποσότητες) και ακολουθεί η ίδια ακριβώς διαδικασία. Οι δυο σακούλες stomacher, μετά την ανάδευση, φαίνονται τους παρακάτω εικόνες (Εικόνες 61 και 62).



Εικόνα 61 : Σακούλα stomacher με kombucha 1



Εικόνα 62 : Σακούλα stomacher με kombucha 2

Για την μικροβιολογική ανάλυση γίνονται 4 αραιώσεις. Οι παραπάνω σακούλες stomacher θεωρούνται ότι είναι οι πρώτες αραιώσεις  $10^{-1}$ . Σε δυο στατώ τοποθετούνται 6 δοκιμαστικοί σωλήνες (3 σε κάθε στατώ), οι οποίοι περιέχουν 9 ml από το αραιωτικό – μητρικό υγρό και είναι αποστειρωμένα. Ο κάθε δοκιμαστικός σωλήνας είναι μια επόμενη αραιώση,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  και  $10^{-4}$ . Οι αραιώσεις είναι διαδοχικές και δεκαδικές. Δηλαδή, από την κάθε σακούλα stomacher, αραιώση  $10^{-1}$ , παίρνεται 1 ml, με την βοήθεια μιας πιπέτας, και τοποθετείται στον δοκιμαστικό σωλήνα, που έχει το αραιωτικό υγρό. Αυτή είναι η αραιώση  $10^{-2}$ . Ο δοκιμαστικός σωλήνας ανακινείται πολύ καλά με το vortex και στην συνέχεια παίρνεται 1 ml από αυτόν και προστίθεται

σε ένα άλλο δοκιμαστικό σωλήνα, που, τους, έχει αραιωτικό υγρό. Αυτή είναι η αραιώση  $10^{-3}$ . Ο δοκιμαστικός τους σωλήνας αναδεύεται πολύ καλά στην συσκευή vortex και μετά παίρνεται από αυτόν 1 ml και προστίθεται στο τελευταίο δοκιμαστικό σωλήνα, που έχει αραιωτικό υγρό. Αυτή είναι η τελευταία αραιώση,  $10^{-4}$  και αναδεύεται ο σωλήνας, για να ομογενοποιηθεί το μείγμα. Ακριβώς η ίδια διαδικασία ακολουθείται και με την άλλη σακούλα stomacher 2 τους τους τρεις δοκιμαστικούς σωλήνες και το αποτέλεσμα, φαίνεται στην παρακάτω εικόνα (Εικόνα 63).



Εικόνα 63 : Αραιώσεις 10-2, 10-3, 10-4 για τα 2 δείγματα

Σε κάθε αραιώση αντιστοιχούν 2 τρυβλία petri, α και β. Στα τρυβλία γράφονται το δείγμα (π.χ. Δ1), αν είναι α ή β, το υπόστρωμα (π.χ. PCA) και η ημερομηνία. Στα υποστρώματα PCA και MRS γίνεται ενσωμάτωση, ενώ στο υπόστρωμα RBC γίνεται επίστρωση των μικροοργανισμών.

Η διαδικασία τους ενσωμάτωσης γίνεται με τον εξής τρόπο : Από τους δοκιμαστικούς σωλήνες τους κάθε αραιώσης λαμβάνεται μια ποσότητα 1 ml, με την πιπέτα, και τοποθετείται στα αντίστοιχα τρυβλία (1 ml στο τρυβλίο α και 1 ml στο τρυβλίο β τους αραιώσης τους). Αφού έχει γίνει αυτό σε όλα τα τρυβλία, τότε προστίθεται και το θρεπτικό υπόστρωμα στα τρυβλία. Πρέπει να σημειωθεί ότι πριν γίνει η ενσωμάτωση των υποστρωμάτων PCA και MRS στα τρυβλία, πρέπει να ελεγχθεί η θερμοκρασία τους, αφού βγουν από το υδατόλουτρο. Η θερμοκρασία των υποστρωμάτων δεν θα πρέπει να είναι μεγάλη, γιατί αλλιώς καίγονται και καταστρέφονται οι μικροοργανισμοί, με αποτέλεσμα να μην μπορεί να γίνει σωστή μελέτη και τελική αξιολόγηση. Αφού τοποθετηθεί μια ικανή ποσότητα, περίπου 15 gr από το θρεπτικό υπόστρωμα σε κάθε τρυβλίο, τότε γίνεται πολύ καλή ανάδευση με το χέρι τους τους κατευθύνσεις, ώστε να αναμειχθούν οι μικροοργανισμοί στο θρεπτικό υπόστρωμα, να μπορέσουν να αναπτυχθούν και τελικά να μπορεί να γίνει η απαρίθμηση τους. Σε περίπτωση που όλοι οι μικροοργανισμοί μείνουν σε ένα μόνο σημείο, τότε η απαρίθμηση τους θα είναι εξαιρετικά δύσκολη, αφού οι μικροοργανισμοί θα είναι ο τους πάνω στον άλλο και δεν θα διακρίνονται καθαρά οι

αποικίες. Επιπλέον, πολύ σημαντικό είναι ότι τα τρυβλία πρέπει να αφήνονται ανοιχτά για λίγα λεπτά, ώσπου να πήξει το υπόστρωμα με τους μικροοργανισμούς και να μην κλείνονται αμέσως, για να μην δημιουργούνται υδρατμοί, οι οποίοι στην συνέχεια μπορεί να πέσουν στο υπόστρωμα και πιθανόν να αλλοιώσουν το τελικό αποτέλεσμα.

Η διαδικασία τους επίστρωσης γίνεται με τον εξής τρόπο : Επιστρώνονται όλα τα τρυβλία με περίπου 15 gr από το θρεπτικό υπόστρωμα RBC και αφήνονται για λίγα λεπτά μισάνοιχτα, έως ότου στεγνώσουν και σταθεροποιηθούν. Στην συνέχεια, εμβολιάζονται με μια ποσότητα 0,1 ml, με την πιπέτα, από κάθε δοκιμαστικό σωλήνα, δηλαδή από κάθε αραιώση ( 0,1 ml στο τρυβλίο α και 0,1 ml στο τρυβλίο β από την αντίστοιχη αραιώση). Με την βοήθεια τους γυάλινης ράβδου επίστρωσης, η ποσότητα αυτή απλώνεται σε όλη την επιφάνεια του υποστρώματος. Πιο συγκεκριμένα, αυτή η γυάλινη ράβδος, αφού πλυθεί με αλκοόλη, καίγεται σε αναμμένη φλόγα, κρυστώνεται στο υπόστρωμα, που βρίσκεται στα τοιχώματα του τρυβλίου και μετά απλώνεται η εμβολιαζόμενη ποσότητα. Είναι σημαντικό, να επιβεβαιωθεί ότι η γυάλινη ράβδος έχει κρυσώσει, προτού ακουμπήσει το εμβόλιο, γιατί αλλιώς οι μικροοργανισμοί θα καούν και θα θανατωθούν, με αποτέλεσμα να μην μπορεί να γίνει σωστή μελέτη και τελική αξιολόγηση. Τους, η ποσότητα του εμβολίου θα πρέπει να κατανεμηθεί σε όλη την επιφάνεια του θρεπτικού υποστρώματος, για να μπορέσουν να αναπτυχθούν οι μικροοργανισμοί και τελικά να μπορεί να γίνει η απαρίθμηση τους. Σε περίπτωση που όλοι οι μικροοργανισμοί μείνουν σε ένα μόνο σημείο, τότε η απαρίθμηση τους θα είναι εξαιρετικά δύσκολη, αφού οι μικροοργανισμοί θα είναι ο τους πάνω στον άλλο και δεν θα διακρίνονται καθαρά οι αποικίες.

Τέλος, εμβολιάζονται και οι δοκιμαστικοί σωλήνες με το υπόστρωμα enrichment medium. Αφού βγουν από την αποστείρωση, το κάθε σωληνάκι έχει ήδη 7 ml από το υπόστρωμα και συμπληρώνονται 3 ml από κάθε δείγμα, από κάθε αραιώση.

Δεν πρέπει να ξεχνάτε ότι όλη η παραπάνω διαδικασία πρέπει να γίνεται σε συνθήκες αποστείρωσης, αφού γίνεται μικροβιολογική ανάλυση, τους ήδη προαναφέρθηκε. Υπάρχουν δυο τρόποι. Ο τους τρόπος είναι κοντά από ένα γκαζάκι με αναμμένη φλόγα, ώστε το γύρω περιβάλλον, που γίνονται τους οι διεργασίες να είναι αποστειρωμένο και τα υλικά, τους είναι η ράβδος, να καίγονται σε αυτήν. Ο τους τρόπος είναι τους οι διεργασίες να γίνονται μέσα στο laminar. Πρόκειται για έναν χώρο, θάλαμο αποστείρωσης.

Εφόσον έχουν εμβολιαστεί όλα τα τρυβλία και οι δοκιμαστικοί σωλήνες από τους τους αραιώσεις, ακολουθεί η διαδικασία τους επώασης. Στον επωαστικό κλίβανο, ρυθμίζονται οι κατάλληλες κάθε φορά συνθήκες για τους μικροοργανισμούς, που επιθυμείται να γίνει η ανάπτυξη τους. Τα τρυβλία με το υπόστρωμα PCA, όπου πρόκειται να γίνει ο έλεγχος τους OMX, τοποθετούνται για επώαση τους 37 °C για 24 ώρες. Τα τρυβλία με το υπόστρωμα MRS, που προορίζονται για να γίνει ο έλεγχος για τα βακτήρια του γαλακτικού οξέος (LAB), τοποθετούνται σε τζάρες αναεροβίωσης με

φίλτρα αναεροβίωσης, ώστε να φύγει όλο το οξυγόνο από μέσα, κλείνονται καλά και επωάζονται τους 37 °C για 48 ώρες. Τα τρυβλία με το υπόστρωμα RBC, που πρόκειται να γίνει ο έλεγχος των ζυμών, τοποθετούνται για επώαση τους 30 °C για 72 ώρες. Τέλος, τα τρυβλία με το υπόστρωμα enrichment medium, που πρόκειται να γίνει ο έλεγχος για τα βακτήρια του οξικού οξέος (AAB), τοποθετούνται για επώαση τους 30 °C για 72 ώρες, τους φαίνεται και στην παρακάτω εικόνα (Εικόνα 64).

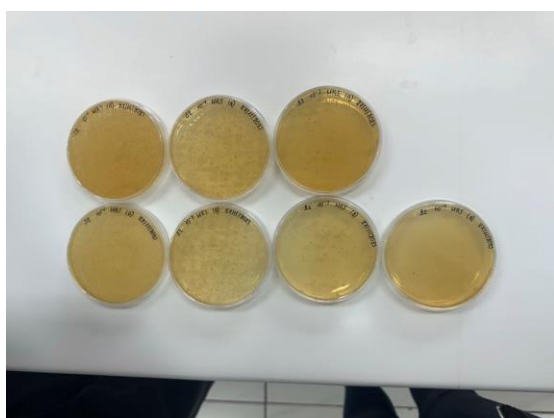


Εικόνα 65 : Τζαρες αναεροβίωσης με τρυβλία στον επωαστικό κλίβανο



Εικόνα 64 : Τρυβλία στον επωαστικό κλίβανο

Όταν περάσει ο απαραίτητος χρόνος τους επώασης, βγάζετε τα τρυβλία από τον επωαστικό κλίβανο. Τα τρυβλία και οι δοκιμαστικοί σωλήνες, μετά την επώαση, φαίνονται παρακάτω τους εικόνες (Εικόνες 66 και 67).



Εικόνα 66 : Τρυβλία μετά την επώαση



Εικόνα 67 : Δοκιμαστικοί σωλήνες μετά την επώαση

Με την βοήθεια τους συσκευής απαρίθμησης των αποικιών, που φαίνεται στην εικόνα (Εικόνα 45), μετριώνται οι αποικίες όλων των μετρήσιμων τρυβλίων (30 – 300 αποικίες), υπολογίζεται το μικροβιακό φορτίο και σύμφωνα με αυτό λαμβάνονται τα τελικά συμπεράσματα.

Πίνακας 3 : Αποτελέσματα μικροβιολογικής ανάλυσης

Δείγμα	ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ		
	PCA (ΟΜΧ)	RBA (Ζύμες και Μύκητες)	MRS (LAB)
$\Delta 1 10^{-1}$ (α)	93	>300	>300 (393)
$\Delta 1 10^{-1}$ (β)	<30 (17)	>300	>300 (418)
$\Delta 1 10^{-2}$ (α)	<30 (2)	128	<30 (0)
$\Delta 1 10^{-2}$ (β)	<30 (0)	104	<30 (0)
$\Delta 1 10^{-3}$ (α)	<30 (0)	<30 (7)	<30 (0)
$\Delta 1 10^{-3}$ (β)	<30 (0)	<30 (6)	<30 (0)
$\Delta 1 10^{-4}$ (α)	<30 (1)	<30 (1)	<30 (0)
$\Delta 1 10^{-4}$ (β)	<30 (0)	<30 (2)	<30 (0)
$\Delta 2 10^{-1}$ (α)	>300	>300	>300
$\Delta 2 10^{-1}$ (β)	>300	>300	>300
$\Delta 2 10^{-2}$ (α)	>300	>300	>300
$\Delta 2 10^{-2}$ (β)	>300	>300	>300
$\Delta 2 10^{-3}$ (α)	141	173	>300
$\Delta 2 10^{-3}$ (β)	250	168	>300



$\Delta 2 \cdot 10^{-4}$ (α)		134	<30 (20)	38
$\Delta 2 \cdot 10^{-4}$ (β)		148	<30 (19)	

Γίνονται οι απαραίτητες πράξεις για τον υπολογισμό του μικροβιακού φορτίου (cfu / ml) του αρχικού δείγματος.

- ❖ Για τους δίπλες σειρές τρυβλίων σε μια μόνο αραιώση, υπολογίζεται ο μέσος όρος (Μ.Ο.).
- ❖ Για τους διπλές σειρές τρυβλίων σε κάθε αραιώση, από μετρήσιμες αποικίες ( $30 < x < 300$ ), στα τρυβλία δύο διαδοχικών αραιώσεων, θα γίνει η χρήση του ακόλουθου μαθηματικού τύπου:

$$N = \frac{\sum c}{V(n_1 + 0,1 n_2) d}, \text{ όπου:}$$

$\sum c$  = το άθροισμα των αποικιών στα μετρούμενα τρυβλία,  
 $V$  = ο όγκος του ενοφθαλμίσματος εντός των τρυβλίων,  
 $n_1$  = ο αριθμός των τρυβλίων τους μικρότερης αραιώσης,  
 $n_2$  = ο αριθμός των τρυβλίων τους μεγαλύτερης αραιώσης και  
 $d$  = ο βαθμός τους μικρότερης αραιώσης .

Για το PCA για το δείγμα Δ2:

Από την αραιώση  $10^{-4}$  μετρήθηκαν στο α τρυβλίο 134 αποικίες και στο β τρυβλίο 148 αποικίες. Επομένως, το μικροβιακό φορτίο είναι :

$$\Delta 2 = \frac{134+148}{2} \rightarrow \Delta 2 = \frac{282}{2} \rightarrow \Delta 2 = 141$$

Εφόσον είναι στην αραιώση  $10^{-4}$  το μικροβιακό φορτίο cfu/ml είναι

$$141 \cdot 10^4 = 1,41 \cdot 10^6 \text{ cfu / ml}$$

Για το RBA για το δείγμα Δ1 :

Από την αραιώση  $10^{-2}$  βρέθηκαν στο α τρυβλίο 128 αποικίες και στο β τρυβλίο 104 αποικίες. Επομένως, το μικροβιακό φορτίο είναι :

$$\Delta 1 = \frac{128+104}{2} \rightarrow \Delta 1 = \frac{232}{2} \rightarrow \Delta 1 = 116$$

Εφόσον είναι στην αραιώση  $10^{-2}$  το μικροβιακό φορτίο cfu/ml είναι

$$116 \cdot 10^2 = 1,16 \cdot 10^4 \text{ cfu / ml}$$

Για το RBA για το δείγμα Δ2 :

Από την αραιώση  $10^{-3}$  μετρήθηκαν στο α τρυβλίο 173 αποικίες και στο β τρυβλίο 168 αποικίες. Επομένως, το μικροβιακό φορτίο είναι :

$$\Delta 2 = \frac{173+168}{2} \rightarrow \Delta 2 = \frac{341}{2} \rightarrow \Delta 2 = 170,5$$

Εφόσον είναι στην αραιώση  $10^{-3}$  το μικροβιακό φορτίο cfu/ml είναι

$$170,5 * 10^3 = 1,705 * 10^5 \text{ cfu / ml}$$

Όσον αφορά, την μέτρηση των βακτηρίων του οξικού οξέος (AAB), αυτή δεν μπορεί να πραγματοποιηθεί στους δοκιμαστικούς σωλήνες, όπως φαίνεται και στην παραπάνω εικόνα (Εικόνα 67). Υπενθυμίζεται ότι τα σωληνάκια αυτά, περιέχουν το θρεπτικό υπόστρωμα enrichment medium και εμβολιάστηκαν με τους μικροοργανισμούς των δειγμάτων από τους αραιώσεις  $10^{-1}$ . Οπότε, για την μέτρηση των βακτηρίων του οξικού οξέος (AAB), αρχικά, παρασκευάστηκε το θρεπτικό υπόστρωμα calcium carbonate, το οποίο δεν είναι ένα έτοιμο υπόστρωμα, αλλά παρασκευάστηκε, σύμφωνα με τους οδηγίες τους επιβλέπουσας καθηγήτριας. Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακα 4), σημειώνονται οι απαραίτητες μετατροπές για την Παρασκευή του υποστρώματος σε 500 ml απιονισμένου νερού.

Πίνακας 4 : Σύσταση υποστρώματος και μετατροπές

100 ml	500 ml
2 gr glucose	10 gr glucose
0,8 gr yeast extract	4 gr yeast extract
0,7 gr calcium carbonate	3,5 gr calcium carbonate
0,5 gr ethanol	2,5 gr ethanol
0,5 gr peptone	2,5 gr peptone
1,2 gr agar	6 gr agar

Σε ένα ποτήρι ζέσεως, ζυγίστηκαν 500 ml απιονισμένου νερού και τους οι ποσότητες που φαίνονται στην δεύτερη στήλη του πίνακα (Πίνακας 4), με την βοήθεια μιας ζυγαριάς ακρίβειας 0,01 gr. Το διάλυμα αυτό αναδεύεται πολύ καλά με μια γυάλινη ράβδο και ζεσταίνεται στο φούρνο μικροκυμάτων μέχρι να διαλυτοποιηθούν όλα τα συστατικά, αναδεύοντας το διάλυμα κάθε 1 λεπτό. Έπειτα, το διάλυμα αυτό μεταφέρεται σε δυο γυάλινα δοχεία, τα οποία δεν σφίγγονται πολύ και πάνω στα δοχεία κολλάται η ειδική ταινία αποστείρωσης. Τα δοχεία αυτά αποστειρώνονται στον υγρό κλίβανο αποστείρωσης τους 121 °C για 15 λεπτά, με την συνολική διαδικασία να διαρκεί περίπου 45 – 60 λεπτά. Αφού ολοκληρωθεί η αποστείρωση, το υγρό υπόστρωμα ανακινείται πολύ καλά και τοποθετείται στο υδατόλουτρο, τόσο για να μην πήξει, όσο και για να μειωθεί η θερμοκρασία του. Η όλη διαδικασία πραγματοποιείται κοντά σε αναμμένο λύχνο, για να αποφεύγονται τυχόν

επιμολύνσεις. Τέσσερα τρυβλία ανοίγονται και σε αυτά προστίθενται περίπου 15 ml από το υπόστρωμα. Τα τρυβλία αυτά αφήνονται για λίγα λεπτά μισάνοιχτα τους την μεριά τους φλόγας, για να στεγνώσουν. Αφού στεγνώσουν τα τρυβλία, επιστρώνονται με 0,1 ml από το υλικό, που βρίσκεται μέσα στα τέσσερα σωληνάκια. Πιο συγκεκριμένα, στο κάθε σωληνάκι γίνεται vortex και μετά, με την πιπέτα, παίρνεται 0,1 ml και τοποθετείται σε κάθε από τα τρυβλία με το υπόστρωμα. Αναφορικά με την επίστρωση, μια γυάλινη σπάτουλα επίστρωσης εμβαπτίζεται σε αλκοόλη και καίγεται στην φλόγα. Η σπάτουλα αυτή αφήνεται για λίγα δευτερόλεπτα, πάντα κοντά στην φλόγα, για να κρυώσει, και μετά γίνεται η επίστρωση με τους μικροοργανισμούς. Πρέπει να βεβαιωθεί ότι η σπάτουλα έχει κρυώσει, ακουμπώντας την στην άκρη του υποστρώματος, ώστε να μην υπάρχει κίνδυνος να θανατωθούν οι μικροοργανισμοί και το τελικό αποτέλεσμα τους μικροβιολογικής ανάλυσης να είναι λανθασμένο.

Ακολουθεί η Παρασκευή του πράσινου τσαγιού. Η βιβλιογραφία αναφέρει ότι για κάθε 1 λίτρο νερού αναλογούν 4 φακελάκια πράσινου τσαγιού και ότι το διάλυμα τσαγιού πρέπει να περιέχει 10 % ζάχαρη. Τους, σύμφωνα με την βιβλιογραφία, τα 250 ml διαλύματος χρειάζονται 25 gr kombucha. Οπότε, για 1 λίτρο νερού χρειάζονται 4 φακελάκια πράσινου τσαγιού και 100 gr ζάχαρης. Τους, παρασκευάστηκαν 2 λίτρα, με αποτέλεσμα να χρειάστηκαν οι διπλάσιες ποσότητες. Άρα, αρχικά, 2 Lt απιονισμένου νερού έβρασαν σε ένα ποτήρι ζέσεως και προστέθηκαν 8 φακελάκια πράσινου τσαγιού. Η εκχύλιση διήρκησε 3 λεπτά και μετά τα φακελάκια του τσαγιού αφαιρέθηκαν από το διάλυμα. Με την βοήθεια τους ζυγαριάς ακριβείας 0,01 gr, ζυγίστηκαν 200 gr ζάχαρης και προστέθηκαν στο διάλυμα. Το διάλυμα αναδεύτηκε, με μια γυάλινη ράβδο, μέχρι να διαλυτοποιηθεί η ζάχαρη και μετά έμεινε για λίγα λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, μέχρι να κρυώσει. Αφού το διάλυμα πράσινου τσαγιού – ζάχαρης κρύωσε, τότε χωρίστηκε σε 6 αποστειρωμένα βαζάκια. Σε κάθε βαζάκι ζυγίστηκαν και προστέθηκαν 320 ml διαλύματος. Άρα, υπολογίστηκε και η ποσότητα τους kombucha που απαιτείται.

Τα 250 ml διαλύματος χρειάζονται 25 gr kombucha

Τα 320 ml       »                       »       x ;

$$x = 32 \text{ gr kombucha}$$

Σε κάθε ένα βαζάκι από τα 5, ζυγίστηκαν 320 ml τσαγιού με 10 % ζάχαρη και περίπου 31 – 34 gr scoby από την kombucha 1 και για αυτό τα βαζάκια αυτά ονομάστηκαν Δ1(1), Δ1(2), Δ1(3), Δ1(4) και Δ1(5) αντίστοιχα. Στο 6<sup>ο</sup> βαζάκι ζυγίστηκε 320 ml πράσινου τσαγιού με 10 % ζάχαρη και 13,60 gr scoby από την kombucha 2 και για αυτό ονομάστηκε Δ2.

Την στιγμή που παρασκευάστηκαν τα νέα διαλύματα kombucha είναι ο χρόνος  $t = 0$  και στον χρόνο αυτό μετρήθηκαν τα pH τους, με το πεχάμετρο pH METER GLP 21.

$\Delta 1(1) \rightarrow \text{pH} = 3,98$

$\Delta 1(2) \rightarrow \text{pH} = 3,89$

$\Delta 1(3) \rightarrow \text{pH} = 3,86$

$\Delta 1(4) \rightarrow \text{pH} = 3,50$

$\Delta 1(5) \rightarrow \text{pH} = 3,58$

$\Delta 2 \rightarrow \text{pH} = 5,08$

Το γεγονός ότι τα 5 πρώτα διαλύματα, που προέρχονται από την kombucha 1, είναι πιο όξινα, δηλαδή έχουν μικρότερες τιμές pH, από ότι το τελευταίο διάλυμα, που προέρχεται από την kombucha 2, μπορεί να εξηγηθεί εύκολα. Στα διαλύματα  $\Delta 1$  προστέθηκε μεγαλύτερη ποσότητα scoby (31 – 34 gr scoby) από ότι στο διάλυμα  $\Delta 2$  (13,60 gr scoby), τους αναφέρθηκε και παραπάνω.

Είναι γνωστό ότι όσο περνάει ο καιρός και γίνεται η ζύμωση, θα πρέπει το pH των διαλυμάτων να μειώνεται, αφού παράγονται οξέα και επομένως, τα διαλύματα γίνονται πιο όξινα. Αυτό μπορεί εύκολα να ελεγχθεί, μετρώντας το pH των διαλυμάτων τους επόμενες μέρες.

Πιο συγκεκριμένα, το pH των διαλυμάτων μετρήθηκε την 5<sup>η</sup> και την 6<sup>η</sup> ημέρα.

5<sup>η</sup> ημέρα :

$\Delta 1(1) \rightarrow \text{pH} = 3,18$

$\Delta 1(2) \rightarrow \text{pH} = 3,33$

$\Delta 1(3) \rightarrow \text{pH} = 3,13$

$\Delta 1(4) \rightarrow \text{pH} = 3,15$

$\Delta 1(5) \rightarrow \text{pH} = 3,14$

$\Delta 2 \rightarrow \text{pH} = 3,04$

6<sup>η</sup> ημέρα :

$\Delta 1(1) \rightarrow \text{pH} = 3,14$

$\Delta 1(2) \rightarrow \text{pH} = 3,34$

$\Delta 1(3) \rightarrow \text{pH} = 3,14$

$\Delta 1(4) \rightarrow \text{pH} = 3,15$

$\Delta 1(5) \rightarrow \text{pH} = 3,11$

$\Delta 2 \rightarrow \text{pH} = 3,07$

Σε γενικές γραμμές, παρατηρείται μείωση του pH σε όλα τα διαλύματα, τους παρατηρείται παραπάνω.

Στον χρόνο  $t = 6$  ημέρες, επιλέχθηκε τυχαία το βαζάκι  $\Delta 1(4)$  και σε αυτό διακόπηκε η ζύμωση, τοποθετώντας το στο ψυγείο. Στο δείγμα αυτό θα ακολουθήσει μέτρηση των βαθμών αλκοόλης του (αιθανόλη).

Τα βαζάκια με την kombucha αφήνονται κλειστά με ένα απορροφητικό χαρτί σε ένα σημείο του εργαστηρίου, για να προχωρήσει η διαδικασία τους ζύμωσης, τους φαίνεται παρακάτω στην εικόνα (Εικόνα 68).



Εικόνα 68 : Βαζάκια με την kombucha

Ζυγίζονται όλα τα scoby, στερεή ουσία που υπάρχει σε όλα τα βαζάκια

$\Delta 1(1) \rightarrow m = 60,08 \text{ gr}$

$\Delta 1(2) \rightarrow m = 20,06 \text{ gr}$

$\Delta 1(3) \rightarrow m = 55,55 \text{ gr}$

$\Delta 1(4) \rightarrow m = 42,58 \text{ gr}$

$\Delta 1(5) \rightarrow m = 63,72 \text{ gr}$

Το συνολικό άθροισμα όλων των παραπάνω μαζών είναι  $m = 241,99 \text{ gr}$ .

Για να φτιαχτούν 4 νέα συστήματα και το κάθε σύστημα να είναι διπλό, θα πρέπει να χωριστεί η υπάρχουσα ποσότητα σε 8 νέα βαζάκια. Άρα, το κάθε βαζάκι να περιέχει περίπου 30,25 gr scoby.

Σύμφωνα με τα υπάρχοντα δεδομένα, υπάρχουν 15 διαφορετικά σετ πειραμάτων για την kombucha, τα οποία φαίνονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 5).

Πίνακας 5 : Τα 15 διαφορετικά σετ πειραμάτων για την kombucha

Standard Run	3 factor Box – Behnken design, 1 block, 15 runs (KOMBUCHA)		
	SCOBY	CAROB	SIDERITIS
11	20	10	90
8	30	50	90
15	20	50	50
7	10	50	90
3	10	90	50
14	20	50	50
6	30	50	10
1	10	10	50
9	20	10	10
4	30	90	50
2	30	10	50
10	20	90	10
13	20	50	50
5	10	50	10
12	20	90	90

Factors :

- A) Amount of SCOBY : 10 gr / 100 ml (10 %)  
 20 gr / 100 ml (20 %)  
 30 gr / 100 ml (30 %)

- B) Carob syrup content (10 % w/v) : 10 % cs + 90 % sugar (10 gr + 90 gr / Lt)  
 50 % cs + 50 % sugar (50 gr + 50 gr / Lt)  
 90 % cs + 10 % sugar (90 gr + 10 gr / Lt)

- C) Sideritis content (1 % W/V) : 10 % SID + 90 % tea (0,1 gr SID + 0,9 gr / 100 ml)  
 50 % SID + 50 % tea (0,5 gr SID + 0,5 gr / 100 ml)  
 90 % SID + 10 % tea (0,9 gr SID + 0,1 gr / 100 ml)

Το σετ πειραμάτων, που ακολουθεί, είναι το 1 και το 3, δηλαδή :

1 :     10 % scoby  
          10 % cs + 90 % sugar  
          50 % sideritis + 50 % tea

3 :     10 % scoby  
          90 % cs + 10 % sugar  
          50 % sideritis + 50 % tea

Όλοι οι υπολογισμοί γίνονται με βάση τα 250 ml διαλύματος.

Οπότε, προκύπτουν οι εξής ποσότητες :

1 :     25 gr scoby  
          2,5 gr χαρουπόμελο + 22,5 gr ζάχαρη  
          125 ml τσάι του βουνού + 125 ml πράσινο τσάι

3 :     25 gr scoby  
          22,5 gr χαρουπόμελο + 2,5 gr ζάχαρη  
          125 ml τσάι του βουνού + 125 ml πράσινο τσάι

Το κάθε σύστημα από αυτά τα δυο γίνονται εις διπλούν (α και β), οπότε στο σύνολο χρησιμοποιήθηκαν :

100 gr scoby  
50 gr χαρουπόμελο  
50 gr ζάχαρη  
500 ml τσάι του βουνού  
500 ml πράσινο τσάι

Όσον αφορά τον μικροβιολογικό έλεγχο, για αυτές τους δυο σειρές (1 και 3), ορίστηκαν 3 χρόνοι, κατά την διάρκεια τους ζύμωσης. Οι χρόνοι αυτοί είναι :

t = 0 ημέρες

t = 6 ημέρες

t = 12 ημέρες

Αναφορικά με τα υποστρώματα που χρησιμοποιήθηκαν για την μικροβιολογική ανάλυση, αυτά είναι τα εξής :

Υπόστρωμα Plate Count Agar (PCA), για τον έλεγχο της Ολικής Μεσοφιλης Χλωρίδας (ΟΜΧ),

Υπόστρωμα MRS, για τον έλεγχο των βακτηρίων του γαλακτικού οξέος (LAB),

Υπόστρωμα yeast extract, για τον έλεγχο των ζυμών και των μυκήτων,

Υπόστρωμα Calcium Carbonate Agar (CCA), για τον έλεγχο των βακτηρίων του οξικού οξέος (AAB).

Πάνω σε κάθε τρυβλίο, για την μικροβιολογική ανάλυση, σημειώνονται ο αριθμός του δείγματος, η αραιώση, το υπόστρωμα και το γράμμα α ή β, γιατί τους οι αναλύσεις γίνονται σε διπλά τρυβλία.

Στον μικροβιολογικό έλεγχο για την kombucha, αναμένεται τους αρκετά μεγάλος αριθμός μικροοργανισμών και για αυτό γίνονται οι αραιώσεις μέχρι και  $10^{-4}$ . Η αραιώση  $10^{-1}$  γίνεται σε σακούλα stomacher και οι υπόλοιπες αραιώσεις σε δοκιμαστικούς σωλήνες, οι οποίοι περιέχουν αραιωτικό – μητρικό υγρό. Γίνονται διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις, δηλαδή για 1 gr δείγματος προστίθενται 9 ml αραιωτικού υγρού. Στο συγκεκριμένο πείραμα, για 10 gr δείγματος, από τα οποία τα 5 gr είναι scoby (στερεή ουσία) και τα υπόλοιπα 5 ml είναι υγρό από την kombucha, προστίθενται 90 ml αραιωτικού υγρού. Το αραιωτικό – μητρικό υγρό είναι ένα ισότονο υγρό, το οποίο δεν αλληλοεπιδρά με το τρόφιμο, δεν έχει τοξικότητα τους μικροοργανισμούς, έχει ουδέτερο pH και δεν προκαλεί ωσμωτικό σοκ τους μικροοργανισμούς. Για αυτόν τον λόγο, χρησιμοποιείται το συγκεκριμένο υγρό τους αραιώσεις.

Αρχικά, παρασκευάστηκαν όλα τα υποστρώματα, δηλαδή PCA, MRS, yeast extract και CCA, τους αναφέρθηκε αναλυτικά παραπάνω. Στην συνέχεια, έγιναν οι αραιώσεις,  $10^{-1}$  έως  $10^{-4}$ . Η αραιώση  $10^{-1}$  είναι η ίδια η σακούλα stomacher. Στην σακούλα stomacher προστίθενται 10 gr δείγματος, από τα οποία τα 5 gr είναι scoby (στερεή ουσία) και τα υπόλοιπα 5 ml είναι υγρό από την kombucha, και 90 ml αραιωτικού υγρού. Η σακούλα stomacher κλείνεται καλά και αφαιρείται τους ο αέρας από μέσα, ώστε να γίνει καλύτερα η ομογενοποίηση και να μην σκάσει η σακούλα μέσα στην συσκευή. Στην συσκευή stomacher BagMixer, που φαίνεται στην εικόνα (Εικόνα 35), γίνεται η



ομογενοποίηση για 3 λεπτά. Από την σακούλα stomacher, που είναι η αραιώση  $10^{-1}$ , λαμβάνεται 1 ml και τοποθετείται σε έναν δοκιμαστικό σωλήνα με 9 ml αραιωτικού υγρού και αναδεύεται στον vortex. Αυτή είναι η αραιώση  $10^{-2}$  και ακολουθεί η ίδια διαδικασία και για τους υπόλοιπες αραιώσεις. Πρέπει να σημειωθεί ότι οι πιπέτες, που χρησιμοποιούνται για τους αραιώσεις, πλένονται και καθαρίζονται πολύ καλά, πριν την χρήση τους, με αλκοόλη 70 %, διότι οι μεμβράνες των μικροοργανισμών είναι υδατοδιαλυτές και η συγκεκριμένη αλκοόλη 70 % έχει την ικανότητα να σπάει τους μεμβράνες των μικροοργανισμών και επομένως να τους θανατώνει.

Τα βακτήρια του οξικού οξέος (AAB) και οι ζύμες / μύκητες χρειάζονται πολύ οξυγόνο και αναπτύσσονται επιφανειακά, άρα για αυτά γίνεται επιφανειακή επίστρωση. Επομένως, τα υποστρώματα Yeast Extract και Calcium Carbonate Agar (CCA) εμβολιάζονται με επιφανειακή επίστρωση, ενώ τα υποστρώματα Plate Count Agar (PCA) και MRS εμβολιάζονται με ενσωμάτωση. Η επιφανειακή επίστρωση γίνεται με 0,1 ml δείγματος, ενώ η ενσωμάτωση γίνεται με 1 ml δείγματος.

Οι διαδικασίες επιφανειακής επίστρωσης και ενσωμάτωσης περιγράφονται αναλυτικότερα παραπάνω.

Το πιο σημαντικό είναι ότι τους οι διεργασίες πρέπει να γίνονται σε αποστειρωμένο χώρο, είτε κοντά σε φλόγα, είτε στον θάλαμο laminar.

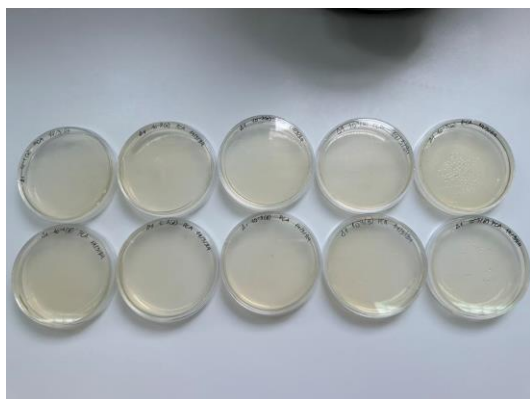
Το Plate Count Agar (PCA) είναι ένα γενικό υπόστρωμα, στο οποίο εμφανίζονται όλοι οι μικροοργανισμοί που υπάρχουν στο δείγμα που εξετάζεται. Σχετικά με τα υπόλοιπα υποστρώματα, είναι εκλεκτικά υποστρώματα, διότι ανάλογα με την σύστασή τους, βοηθάνε την ανάπτυξη τους συγκεκριμένου μικροοργανισμού ή είδος μικροοργανισμού ή είδη μικροοργανισμών.

Με την συγκεκριμένη μικροβιολογική ανάλυση, αναμένεται να αναπτυχθούν αρκετές ζύμες, τους και οξυγαλακτικά βακτήρια, αφού το προϊόν αυτό είναι προβιοτικό, αλλά δεν αναμένεται ανάπτυξη μυκήτων, που θα ήταν ανεπιθύμητο.

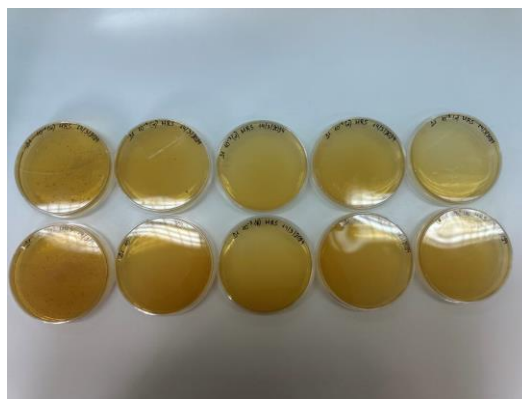
Αφού επιστρώθηκαν και εμβολιάστηκαν όλα τα τρυβλία, πρέπει να ακολουθήσει η επώαση τους σε έναν επωαστικό κλίβανο. Στον επωαστικό κλίβανο, ρυθμίζονται οι κατάλληλες κάθε φορά συνθήκες για τους μικροοργανισμούς, που επιθυμείται να γίνει η ανάπτυξη τους. Τα τρυβλία με το υπόστρωμα Plate Count Agar (PCA), όπου πρόκειται να γίνει ο έλεγχος τους ΟΜΧ, τοποθετούνται για επώαση τους  $37^{\circ}\text{C}$  για 24 ώρες. Τα τρυβλία με το υπόστρωμα MRS, που προορίζονται για να γίνει ο έλεγχος για τα βακτήρια του γαλακτικού οξέος (LAB), τοποθετούνται σε τζάρες αναεροβίωσης με φίλτρα αναεροβίωσης, ώστε να φύγει όλο το οξυγόνο από μέσα, εφόσον τα οξυγαλακτικά βακτήρια χρειάζονται αναερόβιες συνθήκες για να αναπτυχθούν, έπειτα κλείνονται καλά και επωάζονται τους  $37^{\circ}\text{C}$  για 48 ώρες. Η θερμοκρασία των  $37^{\circ}\text{C}$  επιλέγεται, επειδή τα βακτήρια του γαλακτικού οξέος (LAB) ζουν στον γαστρεντερικό σωλήνα και αυτή είναι περίπου η θερμοκρασία του σώματος, άρα και η ιδανική θερμοκρασία για την ανάπτυξή τους. Τα τρυβλία με το υπόστρωμα yeast extract, που πρόκειται να γίνει ο έλεγχος των ζυμών, τοποθετούνται για επώαση τους

30 °C για 48 – 72 ώρες, ώστε να επιταχυνθεί λίγο η διαδικασία. Τέλος, τα τρυβλία με το υπόστρωμα Calcium Carbonate Agar (CCA), που πρόκειται να γίνει ο έλεγχος για τα βακτήρια του οξικού οξέος (AAB), τοποθετούνται για επώαση τους 30 °C για 48 – 72 ώρες.

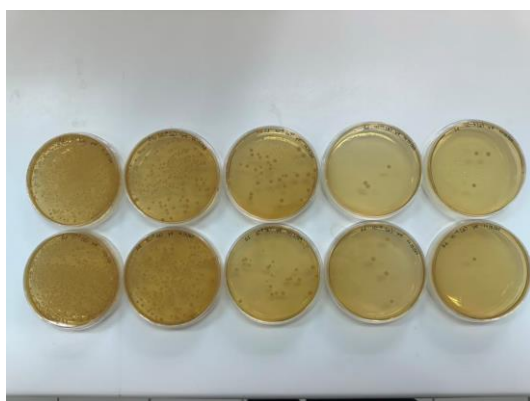
Τα τρυβλία, μετά την επώαση, φαίνονται παρακάτω :



Εικόνα 71 : Τρυβλία PCA μετά την επώαση



Εικόνα 70 : Τρυβλία MRS μετά την επώαση



Εικόνα 69 : Τρυβλία Yeast Extract μετά την επώαση

Με την βοήθεια τους συσκευής απαρίθμησης των αποικιών, που φαίνεται στην εικόνα (Εικόνα 45), μετριόνται οι αποικίες όλων των μετρήσιμων τρυβλίων (30 – 300 αποικίες), υπολογίζεται το μικροβιακό φορτίο και σύμφωνα με αυτό λαμβάνονται τα τελικά συμπεράσματα.

Πίνακας 6 : Αποτελέσματα μικροβιολογικής ανάλυσης

Δείγμα	ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ			
	PCA (OMX)	MRS (LAB)	Yeast Extract (Yeast)	CCA (AAB)
$\Delta 1 10^{-1} (\alpha)$	>300	>300	>300	
$\Delta 1 10^{-1} (\beta)$	>300	>300	>300	

$\Delta 1 10^{-2} (\alpha)$		146		278	
$\Delta 1 10^{-2} (\beta)$		126		351	
$\Delta 1 10^{-3} (\alpha)$		<30 (2)	<30(0)	43	
$\Delta 1 10^{-3} (\beta)$		<30 (1)	<30(0)	39	
$\Delta 1 10^{-4} (\alpha)$		<30 (3)	<30(0)	<30(4)	
$\Delta 1 10^{-4} (\beta)$		<30 (0)	<30(0)	<30(5)	
$\Delta 1 10^{-5} (\alpha)$		<30 (0)	<30(0)	<30(3)	
$\Delta 1 10^{-5} (\beta)$		<30 (0)	<30(0)	<30(1)	

Για το PCA :

Από την αραιώση  $10^{-2}$  μετρήθηκαν στο α τρυβλίο 146 αποικίες και στο β τρυβλίο 126 αποικίες. Επομένως, το μικροβιακό φορτίο είναι :

$$M.O. = \frac{146+126}{2} \rightarrow M.O. = \frac{272}{2} \rightarrow M.O. = 136$$

Εφόσον είναι στην αραιώση  $10^{-2}$  το μικροβιακό φορτίο cfu/ml είναι

$$136 * 10^2 = 1,36 * 10^4 \text{ cfu / ml}$$

Για το yeast extract :

Από την αραιώση  $10^{-2}$  μετρήθηκαν στο α τρυβλίο 278 αποικίες και στο β τρυβλίο 351 αποικίες και από την αραιώση  $10^{-3}$  βρέθηκαν στο α τρυβλίο 43 αποικίες και στο β τρυβλίο 39 αποικίες. Επομένως, το μικροβιακό φορτίο είναι :

$$N = \frac{\sum c}{V(n_1 + 0,1 n_2) d} \rightarrow N = \frac{278+351+43+39}{0,1(2+0,1*2)0,01} \rightarrow$$

$$\rightarrow N = \frac{711}{0,0022} \rightarrow$$

$$\rightarrow N = 323181,818 \rightarrow N = 3,2 * 10^5 \text{ cfu / ml}$$

Παρασκευή συστημάτων

Πρώτα από όλα, για την δημιουργία των συστημάτων (1 και 3), γίνεται η Παρασκευή των τσαγιών. Σε δυο μεγάλα ποτήρια ζέσεως ζυγίστηκαν, με την βοήθεια του αναλυτικού ζυγού ακριβείας 0,01 gr, 1200 gr εμφιαλωμένου νερού «Ζαγόρι» στο καθένα και ζεστάθηκαν στο φούρνο μικροκυμάτων μέχρι που επιτεύχθηκε βρασμός, δηλαδή 100 °C. Στο ένα ποτήρι ζέσεως με τα 1200 gr βραστό νερού τοποθετήθηκαν 6 φακελάκια πράσινου τσαγιού Lipton Classic και έμειναν για εκχύλιση 3 λεπτά, τους αναφέρει η συσκευασία του τσαγιού. Στο άλλο ποτήρι ζέσεως με τα 1200 gr βραστό νερού τοποθετήθηκαν 6 φακελάκια τσάι του βουνού «κοπέλι» και έμειναν για εκχύλιση 6 λεπτά, τους αναφέρει η συσκευασία του τσαγιού. Αφού πέρασε ο

κατάλληλος χρόνος εκχύλισης για το κάθε τσάι, τα φακελάκια απομακρυνθήκαν και τα διαλύματα τσαγιού έμειναν για λίγη ώρα σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι να κρυώσουν.



Εικόνα 73 : Εκχύλιση πράσινου τσαγιού



Εικόνα 72 : Εκχύλιση τσάι του βουνού

Τα δυο συστήματά (1 και 3) είναι τα εξής :

1 : 25 gr scoby

25 gr σάκχαρα → 2,5 gr χαρουπόμελο

22,5 gr ζάχαρη

250 ml τσαγιού → 125 ml πράσινου τσαγιού

125 ml τσάι του βουνού

3 : 25 gr scoby

25 gr σάκχαρα → 22,5 gr χαρουπόμελο

2,5 gr ζάχαρη

250 ml τσαγιού → 125 ml πράσινου τσαγιού

125 ml τσάι του βουνού

Το κάθε σύστημα γίνεται 2 φορές. Οπότε, προκύπτουν τα 1<sup>α</sup>, 1<sup>β</sup>, 3<sup>α</sup>, 3<sup>β</sup>.

Στον αναλυτικό ζυγό ακριβείας 0,01 gr ζυγίστηκαν τους οι παραπάνω ποσότητες τσαγιού, scoby, ζάχαρης και χαρουπόμελου. Όλα τα συστατικά αυτά ζυγίστηκαν σε αποστειρωμένα ποτηράκια ζέσεως και όλη η διαδικασία έγινε κοντά σε αναμμένη φλόγα, για να αποφεύγονται τυχόν επιμολύνσεις από το περιβάλλοντα χώρο, τους φαίνεται τους παρακάτω εικόνες (Εικόνες 75 και 74).



Εικόνα 75 : Ζύγιση χαρουπομελου για τα συστήματα



Εικόνα 74 : Ζύγιση scoby για τα συστήματα

Στα αποστειρωμένα βαζάκια, πρώτα ζυγίστηκε η ποσότητα του χαρουπόμελου, μετά προστέθηκε η υπολογιζόμενη ποσότητα τσαγιού, το διάλυμα αναδεύτηκε πολύ καλά με μια γυάλινη ράβδο και έπειτα, προστέθηκε η υπολογιζόμενη ποσότητα της ζάχαρης και το τελικό διάλυμα αναδεύτηκε ξανά πολύ καλά, μέχρις ότου διαλύθηκαν όλα τα συστατικά. Κάθε φορά, προστίθενται το τσάι ανάμεσα στο χαρουπόμελο και την ζάχαρη και στο ενδιάμεσο γίνεται καλή ανάδευση, γιατί αν προστεθούν χαρουπόμελο και ζάχαρη μαζί υπάρχει κίνδυνος δημιουργίας συσσωματωμάτων στο διάλυμα, που θα ήταν ανεπιθύμητο. Τέλος, προστέθηκε και η κατάλληλη ποσότητα scoby σε κάθε βαζάκι, τους φαίνεται στην εικόνα (Εικόνα 74). Η λαβίδα και το νυστέρι, που ήρθαν σε επαφή με το scoby, είχαν αποστειρωθεί, καίγοντας τα προηγουμένως στην φλόγα.

Αφού προστέθηκαν όλα τα συστατικά στα βαζάκια, τα συστήματα 1 και 3 ήταν πλέον έτοιμα για να ξεκινήσει η διαδικασία της ζύμωσης. Ο χρόνος τους ήταν ο χρόνος  $t = 0$  ημέρες και στον χρόνο αυτό έγινε και ο πρώτος μικροβιολογικός έλεγχος.

Μικροβιολογική ανάλυση σε  $t = 0$  ημέρες

Πρώτα από όλα, παρασκευάστηκαν τα υποστρώματα

- ✓ Υπόστρωμα Plate Count Agar (PCA), για τον έλεγχο της Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας (ΟΜΧ),
- ✓ Υπόστρωμα MRS, για τον έλεγχο των βακτηρίων του γαλακτικού οξέος (LAB),
- ✓ Υπόστρωμα yeast extract, για τον έλεγχο των ζυμών και των μυκήτων,
- ✓ Υπόστρωμα Calcium Carbonate Agar (CCA), για τον έλεγχο των βακτηρίων του οξικού οξέος (AAB).

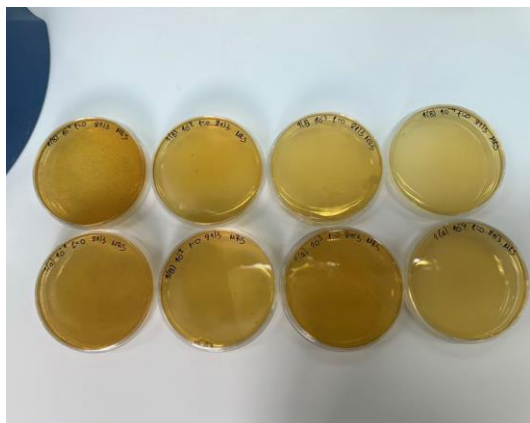
Ακολούθησε η αποστείρωση των υποστρωμάτων στον κλίβανο αποστείρωσης στους 121 °C για 15 λεπτά. Στον χρόνο αυτό έγινε η προετοιμασία των δειγμάτων και οι αραιώσεις τους. Πιο συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν δυο σακούλες stomacher, η μια για το σύστημα 1 και η άλλη για το σύστημα 3. Σε κάθε σακούλα stomacher προστίθενται 4 gr δείγματος και 40 ml αραιωτικού – μητρικού υγρού. Τα 4 gr δείγματος που προστέθηκαν ήταν 2 gr scoby και συγκεκριμένα 1 gr από το α βαζάκι και 1 gr από το β βαζάκι και 2 gr υγρό από την kombucha και συγκεκριμένα 1 gr από το βαζάκι α και 1 gr από το βαζάκι β. Η κάθε σακούλα stomacher αναδεύτηκε για 3 λεπτά στο μηχάνημα stomacher και μετά έγιναν οι αραιώσεις μέχρι την  $10^{-4}$ . Από το μείγμα τους κάθε σακούλας ξεχωριστά, λήφθηκε 1 ml και προστέθηκε σε έναν δοκιμαστικό σωλήνα, ο οποίος περιείχε 9 ml αραιωτικού – μητρικού υγρού. Αυτή ήταν η διαδοχική δεκαδική αραιώση  $10^{-2}$  και η ίδια διαδικασία συνεχίστηκε μέχρι και την αραιώση  $10^{-4}$  και για τα δυο συστήματα, 1 και 3. Πριν γίνει η κάθε αραιώση, οι δοκιμαστικοί σωλήνες αναδεύτηκαν στην συσκευή vortex. Πολύ σημαντικό είναι ότι πάντα οι αραιώσεις πρέπει να γίνονται από την μικρότερη τους την μεγαλύτερη.

Στην συνέχεια, απλώθηκαν και εμβολιάστηκαν όλα τα τρυβλία. Στο σύνολο χρειάστηκαν 64 τρυβλία για τον συγκεκριμένο μικροβιολογικό έλεγχο. 64 τρυβλία, επειδή οι αραιώσεις είναι 4 (η σακούλα stomacher  $10^{-1}$  και οι τρεις δοκιμαστικοί σωλήνες  $10^{-2} - 10^{-4}$ ) επί δυο τρυβλία η κάθε αραιώση είναι 8 τρυβλία. Τα 8 τρυβλία χρειάστηκαν για κάθε ένα από τα 4 υποστρώματα, άρα 32 τρυβλία και τέλος 32 τρυβλία για το ένα σύστημα 1 και άλλα 32 για το άλλο σύστημα 3. Επομένως, χρειάστηκαν 64 τρυβλία συνολικά. Δεν πρέπει να ξεχνάτε ότι από κάθε σύστημα, η μισή ποσότητα, που προστίθενται, αντιστοιχεί στο α βαζάκι και η άλλη μισή ποσότητα στο β βαζάκι του κάθε συστήματος.

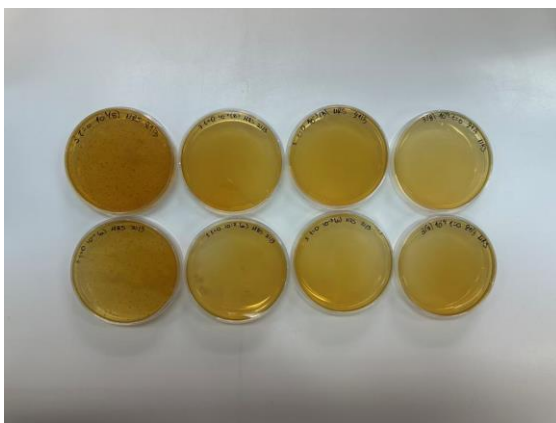
Από τα 4 υποστρώματα, που παρασκευάστηκαν, το PCA και το MRS εμβολιάστηκαν με ενσωμάτωση (1 ml εμβολίου από κάθε αραιώση δείγματος), ενώ το Yeast Extract και το CCA εμβολιάστηκαν με επιφανειακή επίστρωση (0,1 ml εμβολίου από κάθε αραιώση δείγματος). Οι δυο διαδικασίες ενσωμάτωσης και επιφανειακής επίστρωσης περιεγράφηκαν πολύ αναλυτικά παραπάνω. Αφού εμβολιάστηκαν όλα τα τρυβλία με τον αντίστοιχο όγκο εμβολίου από τους τους αραιώσεις, ακολουθήσε η επώαση τους στον επωαστικό κλίβανο τους κατάλληλες συνθήκες χρόνου και θερμοκρασίας, οι οποίες, τους, αναφέρθηκαν παραπάνω σχολαστικά.

Μετά την επώαση, τα μετρήσιμα τρυβλία, αυτά δηλαδή που περιείχαν 30 – 300 αποικίες, μετρήθηκαν, με την βοήθεια τους συσκευής απαρίθμησης τρυβλίων colony

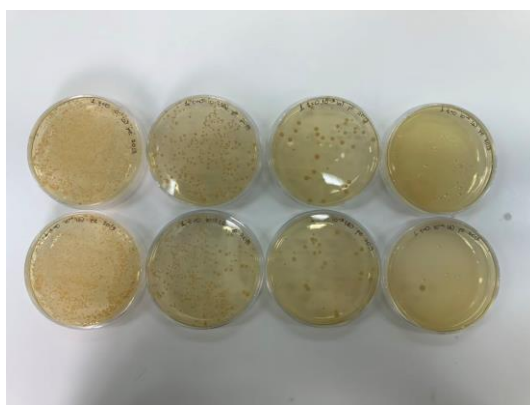
counter SC6, και οι μετρήσεις σημειώθηκαν τους παρακάτω πίνακες (Πίνακες 7 και 8). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που λήφθηκαν, υπολογίστηκε και το μικροβιολογικό φορτίο.



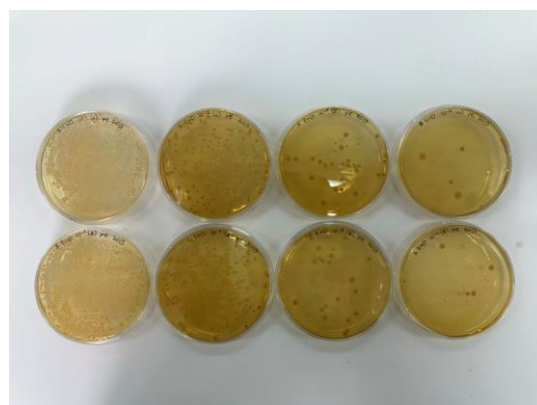
Εικόνα 81 : Τρυβλία MRS δείγματος 1 ( $t = 0$ )



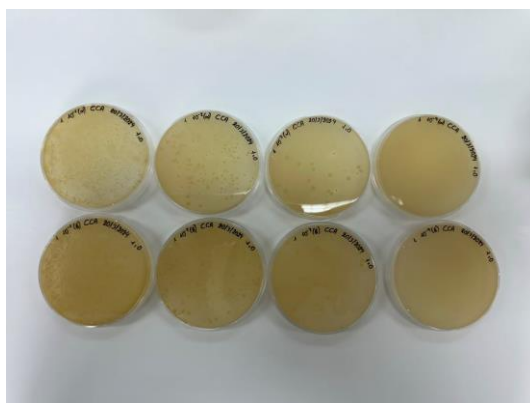
Εικόνα 80 : Τρυβλία MRS δείγματος 3 ( $t = 0$ )



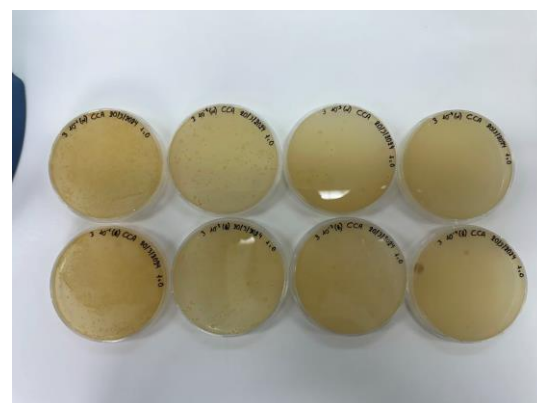
Εικόνα 79 : Τρυβλία Yeast Extract δείγματος 1 ( $t = 0$ )



Εικόνα 78 : Τρυβλία Yeast Extract δείγματος 3 ( $t = 0$ )



Εικόνα 76 : Τρυβλία CCA δείγματος 1 ( $t = 0$ )



Εικόνα 77 : Τρυβλία CCA δείγματος 3 ( $t = 0$ )

Πίνακας 7 : Αποτελέσματα δείγματος 1 σε χρόνο  $t = 0$

Δείγμα 1	Υποστρώματα			
	PCA	MRS	Yeast Extract	CCA
$10^{-1}$ (α)	0	3120	>300	>300 (συν.)
$10^{-1}$ (β)	1	4872	>300	>300 (συν.)
$10^{-2}$ (α)	0	112	>300 (398)	103 (μδ)/276 (συν.)
$10^{-2}$ (β)	0	30	>300	97 (μδ)/262 (συν.)
$10^{-3}$ (α)	3	0	45	6 (μδ)/37 (συν.)
$10^{-3}$ (β)	12	<30 (4)	37	5 (μδ)/30 (συν.)
$10^{-4}$ (α)	0	0	<30 (2)	0 (συν.)
$10^{-4}$ (β)	0	0	<30 (9)	1 (συν.)

Για το PCA : 10 cfu / ml

Παρατηρήθηκε ότι από την πρώτη κι όλης αραιώση  $10^{-1}$  δεν εμφανίστηκαν καθόλου αποικίες. Αυτό σημαίνει ότι μπορεί να έγινε επιμόλυνση του δείγματος ή ότι όταν έγινε η συγκεκριμένη αραιώση, οι μικροοργανισμοί κήκαν και θανατώθηκαν από το καυτό υπόστρωμα.

Για το MRS :

Από την αραιώση  $10^{-2}$  μετρήθηκαν στο α τρυβλίο 112 αποικίες και στο β τρυβλίο 30 αποικίες. Επομένως, το μικροβιακό φορτίο είναι :

$$M.O. = \frac{112+30}{2} \rightarrow M.O. = \frac{142}{2} \rightarrow M.O. = 71$$

Εφόσον είναι στην αραιώση  $10^{-2}$  το μικροβιακό φορτίο cfu/ml είναι

$$71 * 10^2 = 7,1 * 10^3 \text{ cfu / ml}$$

Επειδή, έγινε ενσωμάτωση με 1 ml εμβολίου, το μικροβιακό φορτίο cfu / ml είναι :

$$7,1 * 10^3 * 1 = 7,1 * 10^3 \text{ cfu / ml}$$

Για το Yeast Extract :

Από την αραιώση  $10^{-3}$  μετρήθηκαν στο α τρυβλίο 45 αποικίες και στο β τρυβλίο 37 αποικίες. Επομένως, το μικροβιακό φορτίο είναι :

$$M.O. = \frac{45+37}{2} \rightarrow M.O. = \frac{82}{2} \rightarrow M.O. = 41$$

Εφόσον είναι στην αραιώση  $10^{-3}$  το μικροβιακό φορτίο cfu/ml είναι



$$41 * 10^3 = 4,1 * 10^4 \text{ cfu / ml}$$

Επειδή, έγινε επιφανειακή επίστρωση με 0,1 ml εμβολίου, το μικροβιακό φορτίο cfu / ml είναι :

$$4,1 * 10^4 * 10 = 4,1 * 10^5 \text{ cfu / ml}$$

Για το CCA :

Από την αραιώση  $10^{-2}$  μετρήθηκαν στο α τρυβλίο 103 αποικίες και στο β τρυβλίο 97 αποικίες. Επομένως, το μικροβιακό φορτίο είναι :

$$\text{M.O.} = \frac{103+97}{2} \rightarrow \text{M.O.} = \frac{200}{2} \rightarrow \text{M.O.} = 100$$

Εφόσον είναι στην αραιώση  $10^{-2}$  το μικροβιακό φορτίο cfu/ml είναι

$$100 * 10^2 = 1 * 10^4 \text{ cfu / ml}$$

Επειδή, έγινε επιφανειακή επίστρωση με 0,1 ml εμβολίου, το μικροβιακό φορτίο cfu / ml είναι :

$$1 * 10^4 * 10 = 1 * 10^5 \text{ cfu / ml}$$

Πίνακας 8 : Αποτελέσματα δείγματος 3 σε χρόνο  $t = 0$

Δείγμα 3	Υποστρώματα			
	PCA	MRS	Yeast Extract	CCA
$10^{-1}$ (α)	<30	2064	>300	>300 (συν.)
$10^{-1}$ (β)	<30 (5)	1584	>300	>300 (συν.)
$10^{-2}$ (α)	0	39	284	49 (μδ) / 259 (συν.)
$10^{-2}$ (β)	0	24	274	47 (μδ) / 285 (συν.)
$10^{-3}$ (α)	0	0	33	4 (μδ) / 32 (συν.)
$10^{-3}$ (β)	0	0	29	1 (μδ) / 22 (συν.)
$10^{-4}$ (α)	0	0	<30 (5)	0 (συν.)
$10^{-4}$ (β)	0	0	<30 (5)	3 (συν.)

Για το PCA : 50 cfu / ml

Και σε αυτό το δείγμα, παρατηρήθηκε ότι από την πρώτη κι όλης αραιώση  $10^{-1}$  δεν εμφανίστηκαν καθόλου αποικίες. Αυτό σημαίνει ότι μπορεί να έγινε επιμόλυνση του

δείγματος ή ότι όταν έγινε η συγκεκριμένη αραιώση, οι μικροοργανισμοί κήκαν και θανατώθηκαν από το καυτό υπόστρωμα.

#### Για το MRS :

Από την αραιώση  $10^{-2}$  μετρήθηκαν στο α τρυβλίο 39 αποικίες και στο β τρυβλίο 24 αποικίες. Επομένως, το μικροβιακό φορτίο είναι :

$$M.O. = \frac{39+24}{2} \rightarrow M.O. = \frac{63}{2} \rightarrow M.O. = 31,5$$

Εφόσον είναι στην αραιώση  $10^{-2}$  το μικροβιακό φορτίο cfu/ml είναι

$$31,5 * 10^2 = 3,15 * 10^3 \text{ cfu / ml}$$

Επειδή, έγινε ενσωμάτωση με 1 ml εμβολίου, το μικροβιακό φορτίο cfu / ml είναι :

$$3,15 * 10^3 * 1 = 3,15 * 10^3 \text{ cfu / ml}$$

#### Για το Yeast Extract :

Από την αραιώση  $10^{-2}$  μετρήθηκαν στο α τρυβλίο 284 αποικίες και στο β τρυβλίο 274 αποικίες. Επομένως, το μικροβιακό φορτίο είναι :

$$M.O. = \frac{284+274}{2} \rightarrow M.O. = \frac{558}{2} \rightarrow M.O. = 279$$

Εφόσον είναι στην αραιώση  $10^{-2}$  το μικροβιακό φορτίο cfu/ml είναι

$$279 * 10^2 = 2,79 * 10^4 \text{ cfu / ml}$$

Επειδή, έγινε επιφανειακή επίστρωση με 0,1 ml εμβολίου, το μικροβιακό φορτίο cfu / ml είναι :

$$2,79 * 10^4 * 10 = 2,79 * 10^5 \text{ cfu / ml}$$

#### Για το CCA :

Από την αραιώση  $10^{-2}$  μετρήθηκαν στο α τρυβλίο 49 αποικίες και στο β τρυβλίο 47 αποικίες. Επομένως, το μικροβιακό φορτίο είναι :

$$M.O. = \frac{49+47}{2} \rightarrow M.O. = \frac{96}{2} \rightarrow M.O. = 48$$

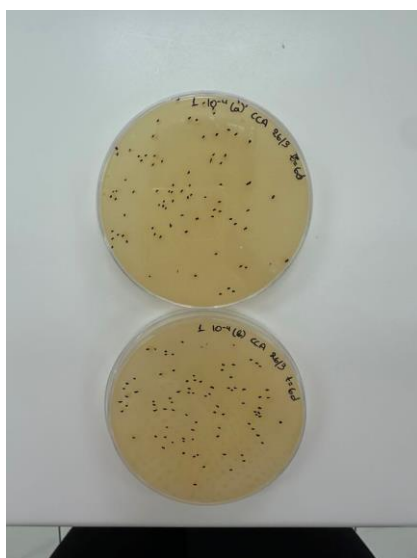
Εφόσον είναι στην αραιώση  $10^{-2}$  το μικροβιακό φορτίο cfu/ml είναι

$$48 * 10^2 = 4,8 * 10^3 \text{ cfu / ml}$$

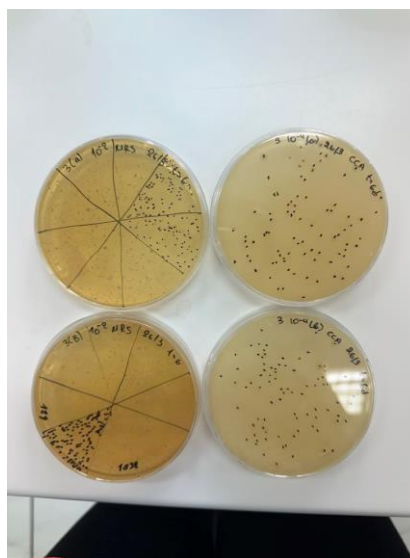
Επειδή, έγινε επιφανειακή επίστρωση με 0,1 ml εμβολίου, το μικροβιακό φορτίο cfu / ml είναι :

$$4,8 * 10^3 * 10 = 4,8 * 10^4 \text{ cfu / ml}$$

Ο μικροβιολογικός έλεγχος επαναλήφθηκε σε χρόνο  $t = 6$  ημέρες, όπου έγινε ακριβώς η ίδια διαδικασία με παραπάνω για τον χρόνο  $t = 0$  ημέρες. Η μόνη διαφορά ήταν ότι για το υπόστρωμα PCA έγιναν αραιώσεις μόνο μέχρι την  $10^{-2}$ , εφόσον η προηγούμενη μικροβιολογική ανάλυση έδωσε μηδενικά αποτελέσματα. Οι μετρήσεις, που λήφθηκαν, φαίνονται παρακάτω τους πίνακες (Πίνακες 9 και 10).



Εικόνα 83 : Τρυβλία CCA αραιωση  $10^{-4}$  δείγματος 1 ( $t = 6$ )



Εικόνα 82 : Τρυβλία MRS και CCA δείγματος 3 ( $t = 6$ )

Πίνακας 9 : Αποτελέσματα δείγματος 1 σε χρόνο  $t = 6$  ημέρες

Δείγμα 1	Υποστρώματα			
	PCA	MRS	Yeast Extract	CCA
$10^{-1} (\alpha)$	>300	>300	>300	>300
$10^{-1} (\beta)$	>300	>300	>300	>300
$10^{-2} (\alpha)$	>300	>300	>300	>300
$10^{-2} (\beta)$	>300	>300	>300	>300
$10^{-3} (\alpha)$		178	>300	>300
$10^{-3} (\beta)$		222	>300	>300

<b>10<sup>-4</sup> (α)</b>			<30 (7)	82	89
<b>10<sup>-4</sup> (β)</b>			<30 (17)	91	91

Για το PCA :

Δεν λήφθηκαν αποτελέσματα, τους φαίνεται και στον παραπάνω πίνακα (Πίνακας 8), γιατί έγιναν αραιώσεις μέχρι την 10<sup>-2</sup> μόνο, όπου τα τρυβλία είχαν εκατοντάδες αποικίες και η αρίθμηση τους με το ανθρώπινο μάτι ήταν αδύνατη.

Για το MRS :

Από την αραιώση 10<sup>-3</sup> μετρήθηκαν στο α τρυβλίο 178 αποικίες και στο β τρυβλίο 222 αποικίες. Επομένως, το μικροβιακό φορτίο είναι :

$$M.O. = \frac{178+222}{2} \rightarrow M.O. = \frac{400}{2} \rightarrow M.O. = 200$$

Εφόσον είναι στην αραιώση 10<sup>-3</sup> το μικροβιακό φορτίο cfu / ml είναι

$$200 * 10^3 = 2 * 10^5 \text{ cfu / ml}$$

Επειδή, έγινε ενσωμάτωση με 1 ml εμβολίου, το μικροβιακό φορτίο cfu / ml είναι :

$$2 * 10^5 * 1 = 2 * 10^5 \text{ cfu / ml}$$

Για το Yeast Extract :

Από την αραιώση 10<sup>-4</sup> μετρήθηκαν στο α τρυβλίο 82 αποικίες και στο β τρυβλίο 91 αποικίες. Επομένως, το μικροβιακό φορτίο είναι :

$$M.O. = \frac{82+91}{2} \rightarrow M.O. = \frac{173}{2} \rightarrow M.O. = 86,5$$

Εφόσον είναι στην αραιώση 10<sup>-4</sup> το μικροβιακό φορτίο cfu/ml είναι

$$86,5 * 10^4 = 8,65 * 10^5 \text{ cfu / ml}$$

Επειδή, έγινε επιφανειακή επίστρωση με 0,1 ml εμβολίου, το μικροβιακό φορτίο cfu / ml είναι :

$$8,65 * 10^5 * 10 = 8,65 * 10^6 \text{ cfu / ml}$$

Για το CCA :

Από την αραιώση 10<sup>-4</sup> μετρήθηκαν στο α τρυβλίο 89 αποικίες και στο β τρυβλίο 91 αποικίες. Επομένως, το μικροβιακό φορτίο είναι :

$$M.O. = \frac{89+91}{2} \rightarrow M.O. = \frac{180}{2} \rightarrow M.O. = 90$$

Εφόσον είναι στην αραιώση  $10^{-4}$  το μικροβιακό φορτίο cfu / ml είναι

$$90 * 10^4 = 9 * 10^5 \text{ cfu / ml}$$

Επειδή, έγινε επιφανειακή επίστρωση με 0,1 ml εμβολίου, το μικροβιακό φορτίο cfu / ml είναι :

$$9 * 10^5 * 10 = 9 * 10^6 \text{ cfu / ml}$$

Πίνακας 10 : Αποτελέσματα δείγματος 3 σε χρόνο  $t = 6$  ημέρες

Δείγμα 3	Υποστρώματα			
	PCA	MRS	Yeast Extract	CCA
$10^{-1}$ (α)	>300	>300	>300	>300
$10^{-1}$ (β)	>300	>300	>300	>300
$10^{-2}$ (α)	>300	600	>300	>300
$10^{-2}$ (β)	>300	1032	>300	>300
$10^{-3}$ (α)		<30 (20)	>300	>300
$10^{-3}$ (β)		<30 (5)	>300	>300
$10^{-4}$ (α)		<30 (0)	80	92
$10^{-4}$ (β)		<30 (0)	95	87

Για το PCA :

Δεν λήφθηκαν αποτελέσματα, τους φαίνεται και στον παραπάνω πίνακα (Πίνακας 8), γιατί έγιναν αραιώσεις μέχρι την  $10^{-2}$  μόνο, όπου τα τρυβλία είχαν εκατοντάδες αποικίες και η αρίθμηση τους με το ανθρώπινο μάτι ήταν αδύνατη.

Για το MRS :

Από την αραιώση  $10^{-2}$  μετρήθηκαν στο α τρυβλίο 600 αποικίες και στο β τρυβλίο 1032 αποικίες. Επομένως, το μικροβιακό φορτίο είναι :

$$M.O. = \frac{600+1032}{2} \rightarrow M.O. = \frac{1632}{2} \rightarrow M.O. = 816$$

Εφόσον είναι στην αραιώση  $10^{-2}$  το μικροβιακό φορτίο cfu / ml είναι

$$816 * 10^2 = 8,16 * 10^4 \text{ cfu / ml}$$

Επειδή, έγινε ενσωμάτωση με 1 ml εμβολίου, το μικροβιακό φορτίο cfu / ml είναι :

$$8,16 * 10^4 * 1 = 8,16 * 10^4 \text{ cfu / ml}$$

Για το Yeast Extract :

Από την αραιώση  $10^{-4}$  μετρήθηκαν στο α τρυβλίο 80 αποικίες και στο β τρυβλίο 95 αποικίες. Επομένως, το μικροβιακό φορτίο είναι :

$$M.O. = \frac{80+95}{2} \rightarrow M.O. = \frac{175}{2} \rightarrow M.O. = 87,5$$

Εφόσον είναι στην αραιώση  $10^{-4}$  το μικροβιακό φορτίο cfu / ml είναι

$$87,5 * 10^4 = 8,75 * 10^5 \text{ cfu / ml}$$

Επειδή, έγινε επιφανειακή επίστρωση με 0,1 ml εμβολίου, το μικροβιακό φορτίο cfu / ml είναι :

$$8,75 * 10^5 * 10 = 8,75 * 10^6 \text{ cfu / ml}$$

Για το CCA :

Από την αραιώση  $10^{-4}$  μετρήθηκαν στο α τρυβλίο 92 αποικίες και στο β τρυβλίο 87 αποικίες. Επομένως, το μικροβιακό φορτίο είναι :

$$M.O. = \frac{92+87}{2} \rightarrow M.O. = \frac{179}{2} \rightarrow M.O. = 89,5$$

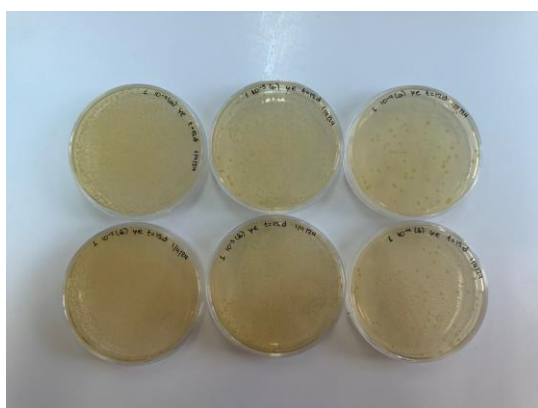
Εφόσον είναι στην αραιώση  $10^{-4}$  το μικροβιακό φορτίο cfu / ml είναι

$$89,5 * 10^4 = 8,95 * 10^5 \text{ cfu / ml}$$

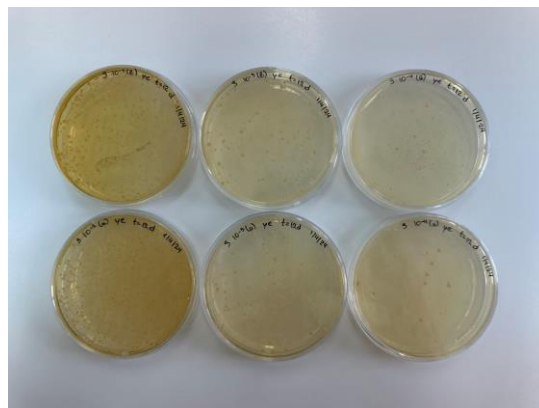
Επειδή, έγινε επιφανειακή επίστρωση με 0,1 ml εμβολίου, το μικροβιακό φορτίο cfu / ml είναι :

$$8,95 * 10^5 * 10 = 8,95 * 10^6 \text{ cfu / ml}$$

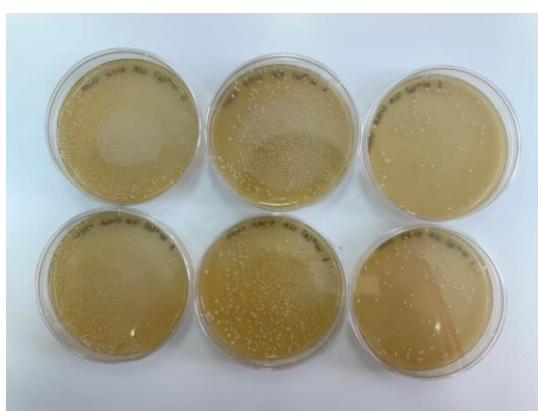
Ο μικροβιολογικός έλεγχος επαναλήφθηκε σε χρόνο  $t = 12$  ημέρες, όπου έγινε ακριβώς η ίδια διαδικασία με παραπάνω για τον χρόνο  $t = 0$  ημέρες. Οι μετρήσεις, που λήφθηκαν, φαίνονται παρακάτω τους πίνακες (Πίνακες 11 και 12).



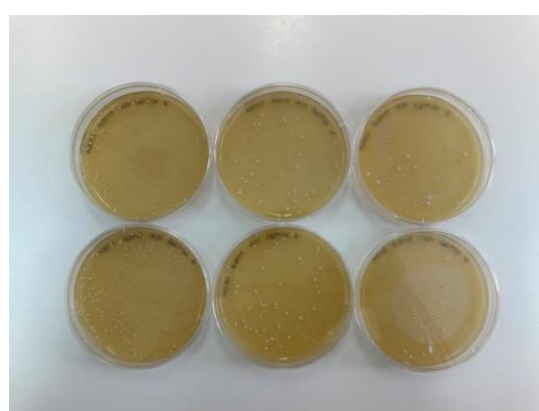
Εικόνα 86 : Τρυβλία Yeast Extract δείγματος 1 (t = 12)



Εικόνα 85 : Τρυβλία Yeast Extract δείγματος 3 (t = 12)



Εικόνα 87 : Τρυβλία CCA δείγματος 1 (t = 12)



Εικόνα 84 : Τρυβλία CCA δείγματος 3 (t = 12)

Πίνακας 11 : Αποτελέσματα δείγματος 1 σε χρόνο t = 12 ημέρες

Δείγμα 1	Υποστρώματα			
	PCA	MRS	Yeast Extract	CCA
$10^{-1}$ (α)	0	>300	>300	>300
$10^{-1}$ (β)	0	>300	>300	>300
$10^{-2}$ (α)	0	>300	>300	>300
$10^{-2}$ (β)	0	>300	>300	>300
$10^{-3}$ (α)	0	>300	>300	>300
$10^{-3}$ (β)	0	>300	>300	>300
$10^{-4}$ (α)	0	88	119	126
$10^{-4}$ (β)	0	100	165	135

#### Για το PCA :

Τους έχει ήδη αναφερθεί, το υπόστρωμα Plate Count Agar (PCA), είναι ένα γενικό υπόστρωμα, στο οποίο αναπτύσσονται όλα τα είδη των μικροοργανισμών. Στον συγκεκριμένο μικροβιολογικό έλεγχο, δεν αναπτυχθήκαν καθόλου μικροοργανισμοί. Παρόλο αυτά, είναι λίγο απίθανο να μην υπήρχαν μικροοργανισμοί. Το πιο πιθανόν είναι οι μικροοργανισμοί να κάηκαν και να θανατώθηκαν κατά την διάρκεια του ελέγχου αυτού ή κατά τους αραιώσεις.

#### Για το MRS :

Από την αραιώση  $10^{-4}$  μετρήθηκαν στο α τρυβλίο 88 αποικίες και στο β τρυβλίο 100 αποικίες. Επομένως, το μικροβιακό φορτίο είναι :

$$M.O. = \frac{88+100}{2} \rightarrow M.O. = \frac{188}{2} \rightarrow M.O. = 94$$

Εφόσον είναι στην αραιώση  $10^{-4}$  το μικροβιακό φορτίο cfu / ml είναι

$$94 * 10^4 = 9,4 * 10^5 \text{ cfu / ml}$$

Επειδή, έγινε ενσωμάτωση με 1 ml εμβολίου, το μικροβιακό φορτίο cfu / ml είναι :

$$9,4 * 10^5 * 1 = 9,4 * 10^5 \text{ cfu / ml}$$

#### Για το Yeast Extract :

Από την αραιώση  $10^{-4}$  μετρήθηκαν στο α τρυβλίο 119 αποικίες και στο β τρυβλίο 165 αποικίες. Επομένως, το μικροβιακό φορτίο είναι :

$$M.O. = \frac{119+165}{2} \rightarrow M.O. = \frac{284}{2} \rightarrow M.O. = 142$$

Εφόσον είναι στην αραιώση  $10^{-4}$  το μικροβιακό φορτίο cfu / ml είναι

$$142 * 10^4 = 1,42 * 10^6 \text{ cfu / ml}$$

Επειδή, έγινε επιφανειακή επίστρωση με 0,1 ml εμβολίου, το μικροβιακό φορτίο cfu / ml είναι :

$$1,42 * 10^6 * 10 = 1,42 * 10^7 \text{ cfu / ml}$$

#### Για το CCA :

Από την αραιώση  $10^{-4}$  μετρήθηκαν στο α τρυβλίο 126 αποικίες και στο β τρυβλίο 135 αποικίες. Επομένως, το μικροβιακό φορτίο είναι :

$$M.O. = \frac{126+135}{2} \rightarrow M.O. = \frac{261}{2} \rightarrow M.O. = 130,5$$



Εφόσον είναι στην αραιώση  $10^{-4}$  το μικροβιακό φορτίο cfu / ml είναι

$$130,5 * 10^4 = 1,305 * 10^6 \text{ cfu / ml}$$

Επειδή, έγινε επιφανειακή επίστρωση με 0,1 ml εμβολίου, το μικροβιακό φορτίο cfu / ml είναι :

$$1,305 * 10^6 * 10 = 1,305 * 10^7 \text{ cfu / ml}$$

Πίνακας 12 : Αποτελέσματα δείγματος 3 σε χρόνο  $t = 12$  ημέρες

Δείγμα 3	Υποστρώματα			
	PCA	MRS	Yeast Extract	CCA
$10^{-1}$ (α)	0	>300	>300	>300
$10^{-1}$ (β)	0	>300	>300	>300
$10^{-2}$ (α)	0	>300	>300	>300
$10^{-2}$ (β)	0	>300	>300	>300
$10^{-3}$ (α)	0	79	>300	>300
$10^{-3}$ (β)	0	71	>300	>300
$10^{-4}$ (α)	0	<30 (6)	118	>300
$10^{-4}$ (β)	0	<30 (6)	154	156

Για το PCA :

Τους προαναφέρθηκε, το πιθανότερο είναι οι μικροοργανισμοί να κήκαν και να θανατώθηκαν, για κάποιο λόγο, κατά την διάρκεια του μικροβιολογικού ελέγχου, αφού μετά την επώαση δεν εμφανίστηκε καμία αποικία στα τρυβλία.

Για το MRS :

Από την αραιώση  $10^{-3}$  μετρήθηκαν στο α τρυβλίο 79 αποικίες και στο β τρυβλίο 71 αποικίες. Επομένως, το μικροβιακό φορτίο είναι :

$$M.O. = \frac{79+71}{2} \rightarrow M.O. = \frac{150}{2} \rightarrow M.O. = 75$$

Εφόσον είναι στην αραιώση  $10^{-3}$  το μικροβιακό φορτίο cfu / ml είναι

$$75 * 10^3 = 7,5 * 10^4 \text{ cfu / ml}$$

Επειδή, έγινε ενσωμάτωση με 1 ml εμβολίου, το μικροβιακό φορτίο cfu / ml είναι :

$$7,5 * 10^4 * 1 = 7,5 * 10^4 \text{ cfu / ml}$$

Για το Yeast Extract :

Από την αραιώση  $10^{-4}$  μετρήθηκαν στο α τρυβλίο 118 αποικίες και στο β τρυβλίο 154 αποικίες. Επομένως, το μικροβιακό φορτίο είναι :

$$M.O. = \frac{118+154}{2} \rightarrow M.O. = \frac{272}{2} \rightarrow M.O. = 136$$

Εφόσον είναι στην αραιώση  $10^{-4}$  το μικροβιακό φορτίο cfu / ml είναι

$$136 * 10^4 = 1,36 * 10^6 \text{ cfu / ml}$$

Επειδή, έγινε επιφανειακή επίστρωση με 0,1 ml εμβολίου, το μικροβιακό φορτίο cfu / ml είναι :

$$1,36 * 10^6 * 10 = 1,36 * 10^7 \text{ cfu / ml}$$

Για το CCA :

Από την αραιώση  $10^{-4}$  μετρήθηκαν στο α τρυβλίο 156 αποικίες. Επομένως, το μικροβιακό φορτίο είναι :

$$156 * 10^4 = 1,56 * 10^6$$

Επειδή, έγινε επιφανειακή επίστρωση με 0,1 ml εμβολίου, το μικροβιακό φορτίο cfu / ml είναι :

$$1,56 * 10^6 * 10 = 1,56 * 10^7 \text{ cfu / ml}$$

### **3.3.2. ΜΕΤΡΗΣΗ ΟΡΓΑΝΙΚΩΝ ΟΞΕΩΝ**

Παράλληλα, με τους μικροβιολογικές αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν και χημικές αναλύσεις. Οι χημικές αυτές αναλύσεις έγιναν τους τους χρόνους, δηλαδή  $t = 0$ ,  $t = 6$  και  $t = 12$  ημέρες, όπου συλλέχθηκε και το κατάλληλο υλικό. Πιο συγκεκριμένα, τους χρόνους τους, από κάθε δείγμα γινόταν λήψη 120 ml υγρό broth από την kombucha, τα οποία προέρχονταν 60 ml από το βαζάκι α και 60 ml από το βαζάκι β και τοποθετούνταν σε ένα γυάλινο δοχείο με καπάκι.

Στην συνέχεια, έγινε η διαδικασία τους διαύγασης στα δείγματα αυτά, δηλαδή πρώτα φυγοκέντρηση και μετά φιλτράρισμα. Πιο συγκεκριμένα, για την φυγοκέντρηση, το κάθε δείγμα 120 ml χωρίστηκε σε 3 σωληνάκια falcon των 40 ml και σε αυτά προστέθηκαν 5 ml  $Ba(OH)_2$  0,3 N και 5 ml  $ZnSO_4$  5 %, με την βοήθεια τους σιφωνίου. Αφού προστέθηκαν τα δυο αντιδραστήρια, τα σωληνάκια κλείστηκαν με το καπάκι και αναδεύτηκαν πάρα πολύ καλά με το χέρι. Έμειναν για 5 λεπτά πάνω σε ένα στατώ σε ακινησία, μετά αναδεύτηκαν ξανά με πολύ γρήγορες κινήσεις και ύστερα έμειναν για

ακόμα 5 λεπτά σε κατάσταση ηρεμίας. Αφού πέρασαν τα απαραίτητα λεπτά ακινησίας, τα σωληνάκια falcon τοποθετήθηκαν στην φυγόκεντρο για φυγοκέντρωση. Ο φυγοκεντρητής ρυθμίστηκε για :

RPM : 3500 RPM

RCF : 1980 xg

Time : 10 min

Αφού πέρασαν τα 10 λεπτά, οι φυγοκεντρικοί σωλήνες αφαιρέθηκαν από την φυγόκεντρο. Ο διαχωρισμός των δειγμάτων γίνεται αντιληπτός και τους παρακάτω εικόνες (Εικόνες 88 και 89).

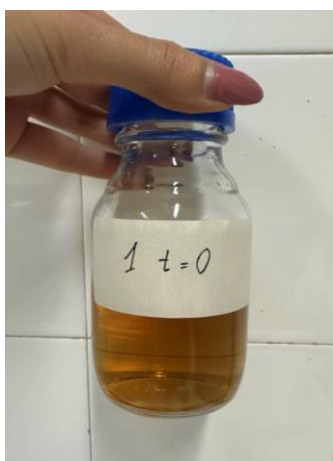


Εικόνα 89 : Σωληνάκια falcon με δείγματα 1 ( $t = 0$ ) μετά την φυγοκέντρωση



Εικόνα 88 : Σωληνάκια falcon με δείγματα 1 ( $t = 6$ ) μετά την φυγοκέντρωση

τους φαίνεται πολύ ξεκάθαρα, τα δείγματα έχουν διαχωριστεί. Στο κάτω μέρος των σωληνών έχουν συλλεχθεί οι πρωτεΐνες ως ίζημα και στην επιφάνεια μεταφέρθηκε όλο το υπερκείμενο υγρό. Αυτό το υπερκείμενο υγρό απομακρύνθηκε από τους σωλήνες, με την βοήθεια τους σιφωνίου, και τοποθετήθηκε σε νέα αποστειρωμένα βαζάκια αποθήκευσης, τα οποία φαίνονται παρακάτω τους εικόνες (Εικόνες 90 – 95).



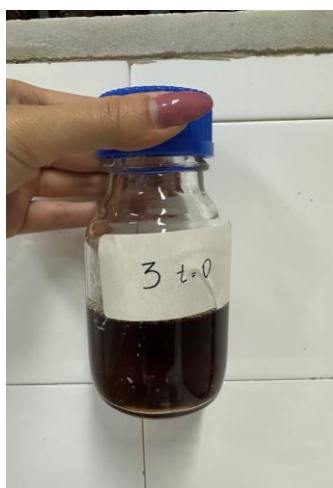
Εικόνα 92 : Δείγμα 1 ( $t = 0$ ) μετά την φυγοκέντρηση



Εικόνα 91 : Δείγμα 1 ( $t = 6$ ) μετά την φυγοκέντρηση



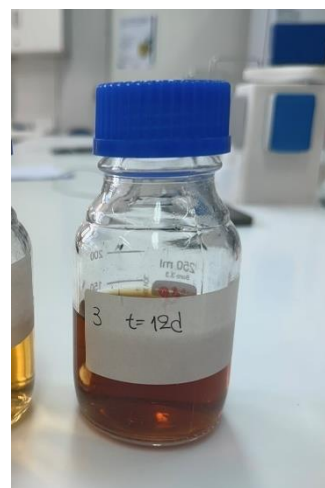
Εικόνα 90 : Δείγμα 1 ( $t = 12$ ) μετά την φυγοκέντρηση



Εικόνα 95 : Δείγμα 3 ( $t = 0$ ) μετά την φυγοκέντρηση

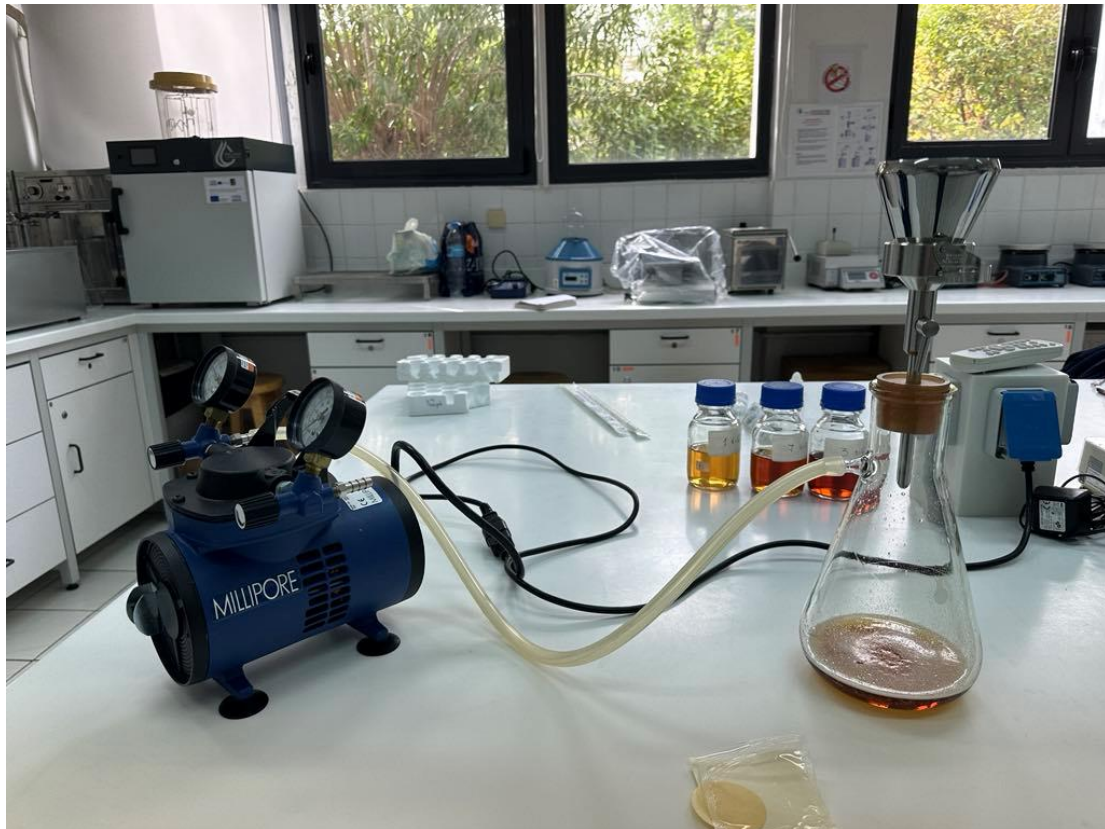


Εικόνα 94 : Δείγμα 3 ( $t = 6$ ) μετά την φυγοκέντρηση

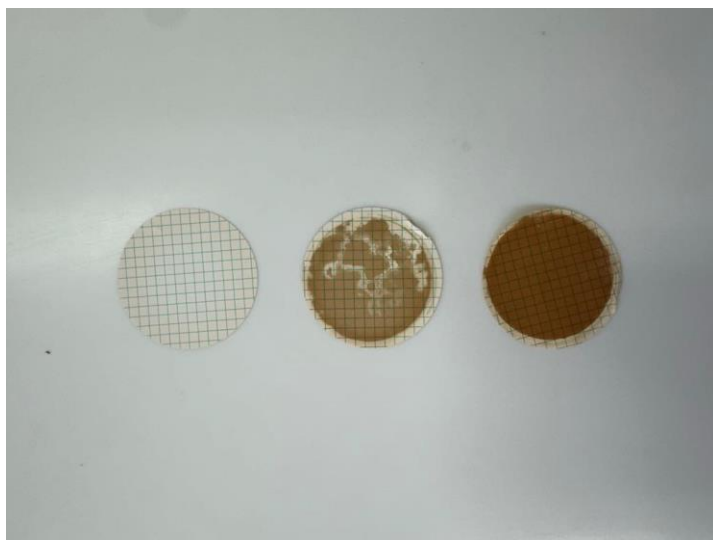


Εικόνα 93 : Δείγμα 3 ( $t = 12$ ) μετά την φυγοκέντρηση

Αφού ολοκληρώθηκε η φυγοκέντρηση όλων των δειγμάτων, ακολούθησε η διαδικασία του φιλτραρίσματος. Με την διαδικασία αυτή απομακρύνονται τυχόν υπολείμματα του ιζήματος, που πέρασαν μετά την φυγοκέντρηση. Πιο συγκεκριμένα, για το φιλτράρισμα, χρησιμοποιήθηκε το μηχάνημα, το οποίο δημιουργεί συνθήκες κενού, με την βοήθεια τρόμπας. Στο μηχάνημα αυτό τοποθετήθηκε φίλτρο "cellulose nitrate filter"  $0,45 \mu\text{m}$ , το οποίο έχει την ικανότητα να κατακρατά υπολείμματα που πιθανόν υπάρχουν σε ένα δείγμα. Το όλο σύστημα του φιλτραρίσματος φαίνεται παρακάτω στην εικόνα (Εικόνα 96).



Εικόνα 96 : Φιλτράρισμα δειγμάτων



Εικόνα 97 : Φίλτρα για φιλτράρισμα

Στην παραπάνω εικόνα (Εικόνα 97), φαίνονται 3 φίλτρα, που χρησιμοποιούνται για την διαδικασία του φιλτραρίσματος. Το πρώτο φίλτρο, στα αριστερά, δεν έχει χρησιμοποιηθεί, είναι καθαρό. Το δεύτερο φίλτρο, στην μέση, και το τρίτο φίλτρο, στα δεξιά, είναι χρησιμοποιημένα. Η διαφορά τους είναι ότι το δεύτερο φίλτρο έχει ακόμα την ικανότητα να συγκρατεί τα υπολείμματα και να περνά το υγρό, ενώ το

τρίτο φίλτρο δεν φαίνεται να έχει αυτήν την ικανότητα πλέον, αφού οι πόροι του έχουν βουλώσει και το υγρό δεν μπορεί να περάσει από το φίλτρο.

Σε όλα τα δείγματα τους χρονικές στιγμές  $t = 0$ ,  $t = 6$  και  $t = 12$  ημέρες, έγινε μέτρηση του pH, με την βοήθεια του πεχάμετρου pH METER GLP 21. Για κάθε δείγμα λήφθηκαν τρεις τιμές pH.

Αρχικά, η συσκευή τέθηκε σε λειτουργία και έγινε καλιμπράρισμα με δυο πρότυπα διαλύματα, που έχουν  $pH = 4$  το ένα και  $pH = 7$  το άλλο. Αφού ρυθμίστηκε το μηχάνημα, ο μοχλός που εισέρχεται μέσα στο δείγμα, πλύθηκε με απιονισμένο νερό και σκουπίστηκε με μια καθαρή χαρτοπετσέτα και έτσι, ξεκίνησε η διαδικασία μέτρησης των τιμών pH σε όλα τα δείγματα. Αξίζει να σημειωθεί ότι μετά από κάθε μέτρηση δείγματος ακολουθεί καθάρισμα και ξέπλυμα με απιονισμένο νερό. Η όλη διαδικασία φαίνεται στην παρακάτω εικόνα (Εικόνα 98) και τα αποτελέσματα συγκεντρώθηκαν και καταγράφηκαν στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 13).

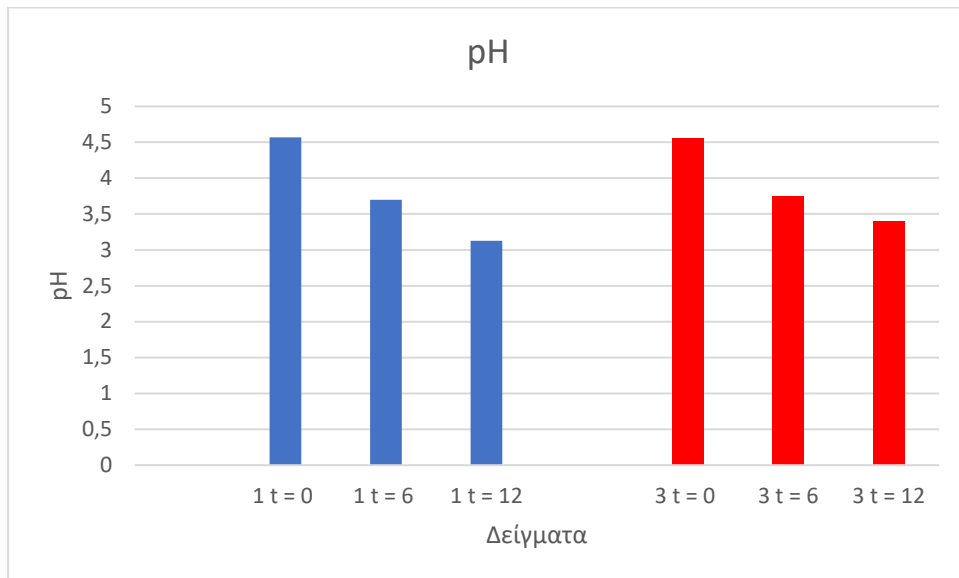


Εικόνα 98 : Μέτρηση pH δειγμάτων

Πίνακας 13 : Μετρήσεις pH δειγμάτων

Δείγμα	pH 1	pH 2	pH 3	pH (average)	pH sd
<b>1 (t = 0)</b>	4,58	4,56	4,57	4,57	0,008164966
<b>1 (t = 6)</b>	3,7	3,7	3,7	3,7	4,44089E-16
<b>1 (t = 12)</b>	3,13	3,12	3,13	3,12667	0,004714045

<b>3 (t = 0)</b>		4,55	4,56	4,54	4,55	0,008164966
<b>3 (t = 6)</b>		3,75	3,74	3,74	3,743333	0,004714045
<b>3 (t = 12)</b>		3,4	3,39	3,39	3,393333	0,004714045



Επιπλέον, σε όλα τα δείγματα τους χρόνους  $t = 0$ ,  $t = 6$  και  $t = 12$  ημέρες, λήφθηκαν μετρήσεις της πυκνότητας, του original extract και του real extract, με την βοήθεια του οργάνου Alex 500 Anton Paar. Το όργανο αυτό είναι εξαιρετικά χρήσιμο, αφού έχει την δυνατότητα να μετρά ταυτόχρονα σε ένα δείγμα την ποσότητα αλκοόλης που έχει σε % V/V, την πυκνότητα του σε  $g/cm^3$ , τα gr της διαλυμένης ουσίας ανά 100 gr δείγματος (original extract) σε °Plato (πραγματικός βαθμός) και την αρχική ποσότητα σακχάρων στην ζύμωση (real extract) σε % W/W (φαινομενικός βαθμός). Όσον αφορά την ποσότητα των σακχάρων, αρχικά, προστέθηκε μια ποσότητα και στην συνέχεια της ζύμωσης, η ποσότητα αυτή αναμένεται να μειώνεται με την πάροδο του χρόνου, διότι καταναλώνεται από τους μικροοργανισμούς που φυσιολογικά υπάρχουν και αναπτύσσονται.

Αρχικά, το όργανο τέθηκε σε λειτουργία και ρυθμίστηκε, ξεπλύθηκε και μηδενίστηκε με απιονισμένο νερό. Η διαδικασία του ξεπλύματος με το απιονισμένο νερό επαναλήφθηκε ανάμεσα σε όλα τα δείγματα. Η είσοδος του νερού και των δειγμάτων μετέπειτα, γίνεται από τον έναν σωλήνα, με ένα ποτηράκι ζέσεως και η έξοδος των υγρών γίνεται από την άλλη πλευρά, από άλλον τον σωλήνα. Η όλη διαδικασία φαίνεται παρακάτω στην εικόνα (Εικόνα 99) και τα αποτελέσματα καταγράφηκαν τους παρακάτω πίνακες (Πίνακες 14,15 και 16).



Εικόνα 99 : Μετρήσεις με Alex 500 Anton Paar

Πίνακας 14 : Μετρήσεις πυκνότητας

Δείγμα	Density (g/cm <sup>3</sup> )					d sd
	D 1	D 2	D 3	Density (average)		
1 (t = 0)	1,0294	1,0293	1,0292	1,0293	8,16497E-05	
1 (t = 6)	1,0273	1,0272	1,0272	1,027233	4,71405E-05	
1 (t = 12)	1,0209	1,0208	1,0208	1,020833	4,71405E-05	
3 (t = 0)	1,0225	1,0224	1,0224	1,022433	4,71405E-05	
3 (t = 6)	1,0192	1,0191	1,0191	1,019133	4,71405E-05	
3 (t = 12)	1,0139	1,0139	1,0138	1,013867	4,71405E-05	

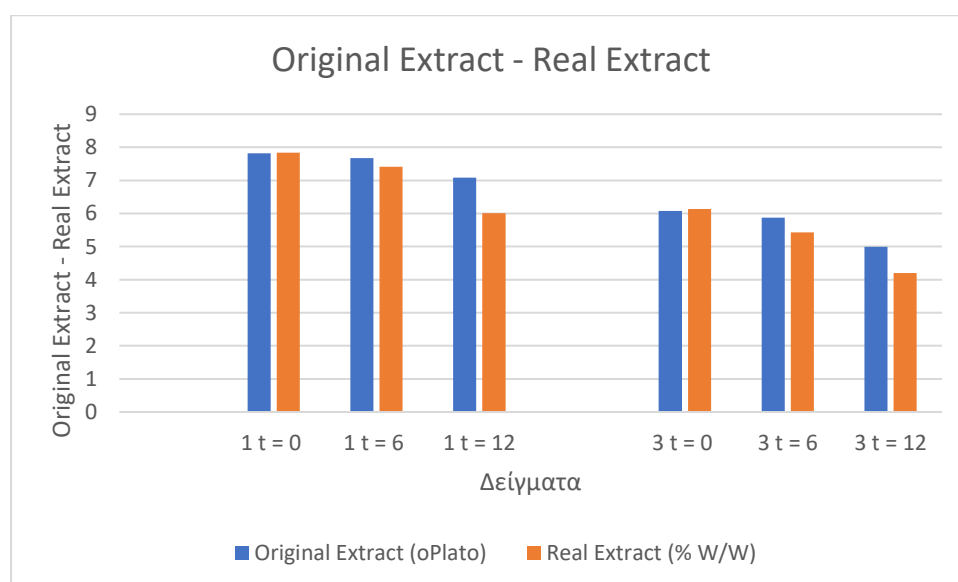
Πίνακας 15 : Μετρήσεις original extract

Δείγμα	Original Extract (°Plato)				Original Extract (average)	OE sd
	OE 1	OE 2	OE 3			
1 (t = 0)	7,82	7,8	7,83	7,816667	0,012472191	
1 (t = 6)	7,66	7,68	7,68	7,673333	0,00942809	
1 (t = 12)	7,08	7,08	7,08	7,08	8,88178E-16	
3 (t = 0)	6,07	6,08	6,07	6,073333	0,004714045	
3 (t = 6)	5,88	5,88	5,87	5,876667	0,004714045	
3 (t = 12)	4,98	5	4,99	4,99	0,008164966	



Πίνακας 16 : Μετρήσεις real extract

Δείγμα	Real Extract (% W/W)				RE sd
	RE 1	RE 2	RE 3	Real Extract (average)	
<b>1 (t = 0)</b>	7,86	7,83	7,83	7,84	0,014142136
<b>1 (t = 6)</b>	7,42	7,41	7,4	7,41	0,008164966
<b>1 (t = 12)</b>	6,02	6,01	6	6,01	0,008164966
<b>3 (t = 0)</b>	6,15	6,14	6,13	6,14	0,008164966
<b>3 (t = 6)</b>	5,45	5,43	5,42	5,433333	0,012472191
<b>3 (t = 12)</b>	4,21	4,2	4,19	4,2	0,008164966



### 3.3.3. ΟΛΙΚΕΣ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΕΣ

Έπειτα, ακολούθησε ο προσδιορισμός του ολικού φαινολικού περιεχομένου (Total Phenolic Content, TPC) με την μέθοδο Folin – Ciocalteu (F – C). Για το συγκεκριμένο πείραμα, η πειραματική πορεία διεξάχθηκε, σύμφωνα με το πρωτόκολλο του κ. Τιταρίδη.

Η Ολική Φαινολική Περιεκτικότητα (TPC) των δειγμάτων προσδιορίστηκε χρησιμοποιώντας μια τροποποιημένη έκδοση της ανάλυσης Folin-Ciocalteu. Η απορρόφηση μετρήθηκε στα 750 nm με ένα ορατό φασματοφωτόμετρο (Spectro 23, Digital Spectrophotometer, Labomed Inc., Culver City, CA 90034, USA). Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως mg ισοδύναμα γαλλικού οξέος (GAE) ανά 100 mL μύρας, χρησιμοποιώντας μια τυπική καμπύλη με εύρος 25–2600 mg/L Γαλλικού οξέος ( $y = 0,0005x + 0,0783$ ,  $R^2 = 0,9989$ ). (Pyrgonolou et al., 2024)

Αρχικά, έγινε τους δοκιμαστικός προσδιορισμός, για να ελεγχθεί η απορρόφηση του κάθε δείγματος. Είναι γνωστό, ότι για να είναι αποδεκτή η μέτρηση, οι τιμές απορρόφησης θα πρέπει να κυμαίνονται από 0,1 έως 1. Οποιαδήποτε άλλη τιμή απορρίπτεται. Ο κύριος λόγος, για τον οποίο έγινε η δοκιμαστική folin είναι να διαπιστωθεί, από τους τιμές απορρόφησης, εάν κάποιο δείγμα χρειάζεται περαιτέρω αραίωση.

Τα δείγματα ήταν ήδη φυγοκεντρημένα και φιλτραρισμένα, που είναι απαραίτητο βήμα για τους χημικές αναλύσεις, τους αυτή. Πρώτα από όλα, χρειάστηκαν 1 κυψελίδα για κάθε δείγμα, 3 κυψελίδες για τα τυφλά δείγματα και ακόμα 1 κυψελίδα, η οποία περιείχε απιονισμένο νερό, με την βοήθεια τους οποίας έγινε και ο μηδενισμός του φασματοφωτομέτρου.

Σε κάθε μια από τους πλαστικές κυψελίδες των 4,0 ml, προστίθενται, με την βοήθεια μιας μικροσύριγγας των 100  $\mu$ L, 20  $\mu$ L από κάθε δείγμα, 2500,0  $\mu$ L απιονισμένου νερού και 200,0  $\mu$ L αντιδραστήριου Folin – Ciocalteu (F – C). Το αντιδραστήριο F – C είναι ένα κίτρινο υγρό, και όσες περισσότερες πολυφαινόλες έχει το δείγμα, στο οποίο προστίθενται, αλλάζει το χρώμα του σε μπλε – πράσινο. Είναι θερμοευαίσθητο και φωτοευαίσθητο. Για αυτόν τον λόγο, η προσθήκη του τους κυψελίδες γίνεται με πολύ γρήγορο ρυθμό και αμέσως μετά ακολουθεί πολύ καλή ανάδευση του μείγματος και η τοποθέτηση του σε ένα σκοτεινό μέρος, τους για παράδειγμα μια ντουλάπα, για 8 λεπτά. Μετά το πέρας, του χρόνου αυτού, προστίθενται, με την βοήθεια μιας πιπέτας, 500,0  $\mu$ L κορεσμένου ασθενούς οξέος  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  και οι κυψελίδες τοποθετήθηκαν σε ένα υδατόλουτρο σταθερής θερμοκρασίας 40 °C για 30 λεπτά. Το ασθενές οξύ  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  έχει κρυστάλλους και δημιουργεί αέρια. Οπότε, η προσθήκη του γίνεται με πολύ αργό ρυθμό. Αμέσως μετά την προσθήκη του  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , ορισμένες κυψελίδες άρχισαν να αποχρωματίζονται, ενώ κάποιες τους άρχισαν να αποκτούν ένα σκούρο μπλε χρώμα, το οποίο με την πάροδο του χρόνου γινόταν ολοένα και πιο έντονο. Οι κυψελίδες, που ξεκίνησαν να αποχρωματίζονται σημαίνει ότι τα δείγματα αυτά δεν είχαν καθόλου πολυφαινόλες ή είχαν πολύ λίγες πολυφαινόλες. Αντίθετα, όσο πιο σκούρο γινόταν το χρώμα τους κυψελίδας, σημαίνει ότι το δείγμα τόσο περισσότερες πολυφαινόλες είχε και η τιμή τους απορρόφησης του πλησιάζει την μονάδα. Όσον αφορά το τυφλό δείγμα, προστέθηκαν όλα τα παραπάνω συστατικά, εκτός από το δείγμα. Το τυφλό δείγμα βοήθησε στην διόρθωση του σφάλματος από τους τιμές των απορροφήσεων, που λήφθηκαν. Πρέπει να σημειωθεί ότι τους οι κυψελίδες πρέπει να πιάνονται από τους τραχιές πλευρές και όχι από τους πλευρές που διέρχεται το φως, γιατί υπάρχει κίνδυνος, οι δακτυλιές του χειριστή να επηρεάσουν την μέτρηση.

Αφού πέρασαν τα 30 λεπτά στο υδατόλουτρο, οι κυψελίδες έμειναν για λίγη ώρα, μέχρι που απέκτησαν θερμοκρασία δωματίου και στη συνέχεια, μετρήθηκαν οι απορροφήσεις του κάθε δείγματος, με την βοήθεια του φασματοφωτομέτρου Thermo Spectronic Ηελιος ε.

Αρχικά, η συσκευή τέθηκε σε λειτουργία και ρυθμίστηκε στα 750 nm. Η συσκευή αυτή μηδενίστηκε (Setting blank), τοποθετώντας την κυψελίδα, που περιείχε μόνο απιονισμένο νερό. Μετά μετρήθηκαν τους οι απορροφήσεις των δειγμάτων και οι μετρήσεις, που λήφθηκαν, σημειώθηκαν στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 17). Η απορρόφηση μετριέται σε συγκέντρωση γαλλικού οξέος.

Πίνακας 17 : Μετρήσεις απορροφήσεως δειγμάτων

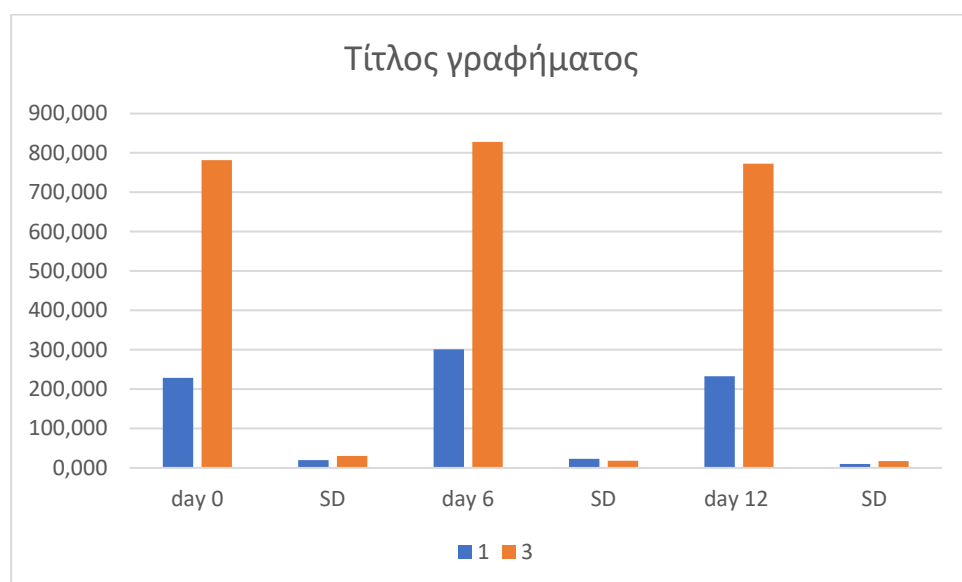
Δείγμα		A750 nm	Αραίωση
<b>1 (t = 0)</b>		0,377	
<b>3 (t = 0)</b>		1,068	½
<b>1 (t = 6)</b>		0,421	
<b>3 (t = 6)</b>		1,233	½
<b>1 (t = 12)</b>		0,45	
<b>3 (t = 12)</b>		1,024	½
<b>Blank 1</b>		0,020	
<b>Blank 2</b>		0,020	
<b>Blank 3</b>		0,021	

Τα δείγματα 3 (t = 0), 3 (t = 6) και 3 (t = 12) αραιώθηκαν ½. Πιο συγκεκριμένα, σε κάθε εppendorn προστέθηκε 50 % δείγματος και 50 % απιονισμένου νερού, δηλαδή 1 ml δείγματος και 1 ml απιονισμένο νερό. Στην συνέχεια, τηρήθηκε και εφαρμόστηκε το ίδιο ακριβώς πρωτόκολλο, που αναφέρεται παραπάνω και μετρήθηκαν οι απορροφήσεις των δειγμάτων, με την βοήθεια του φασματοφωτομέτρου Thermo Spectronic Ηελιος ε. Για κάθε δείγμα, η πειραματική διαδικασία και κατ' επέκταση οι προσδιορισμοί έγιναν εις τριπλούν.

Πίνακας 18 : Αποτελέσματα απορροφήσεως δειγμάτων

Samples		A (750 nm) V=20 µL		
1	1 t=0	0,289	0,279	0,251
2	3 t=0	0,394	0,420	0,395
3	1 t=6	0,323	0,357	0,314
4	3 t=6	0,412	0,430	0,422
5	1 t=12	0,265	0,283	0,282
6	3 t=12	0,390	0,407	0,401
<b>Blank</b>		0,013	0,011	0,012

	C average (mg/L)		C average (mg/L)		C average (mg/L)	
	day 0	SD	day 6	SD	day 12	SD
<b>1</b>	228,375	20,10	301,292	23,15	232,958	10,325
<b>3</b>	781,750	30,07	827,583	18,41	772,583	17,599



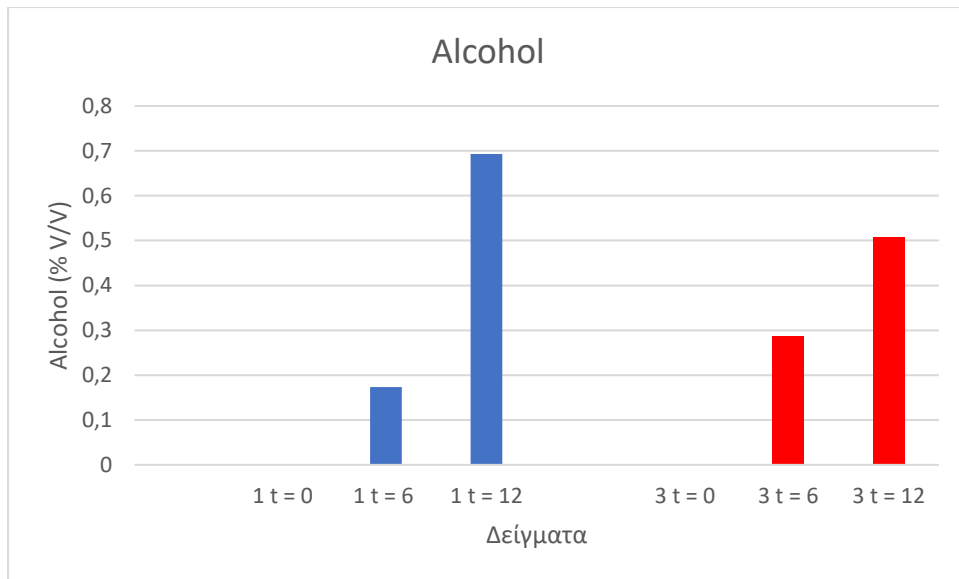
Τους φαίνεται και στο παραπάνω γράφημα, αρχικά παρατηρείται μια σταδιακή αύξηση τους απορρόφησης, που σημαίνει αύξηση των πολυφαινολών, γεγονός που πιθανότατα οφείλεται στο χαρουπόμελο. Η αύξηση αυτή μπορεί να προκλήθηκε κατά την διάρκεια τους ζύμωσης από κάποιο σύμπλοκο ή κάποιο σύμπλοκο να βοήθησε στην αποδέσμευση των πολυφαινολών. Στην συνέχεια, παρατηρείται μια σταδιακή μείωση τους απορρόφησης, άρα και μείωση των πολυφαινολών. Αυτό μπορεί να οφείλεται σε μια πιθανή κατανάλωση των πολυφαινολών αντί των σακχάρων από τους ζύμες, που υπάρχουν στο διάλυμα.

### 3.3.4. ΜΕΤΡΗΣΗ ΑΛΚΟΟΛΗΣ

Τους, σε όλα τα δείγματα τους χρονικές περιόδους  $t = 0$ ,  $t = 6$  και  $t = 12$  ημέρες, πραγματοποιήθηκε μέτρηση τους αλκοόλης σε % V/V, με την βοήθεια του οργάνου Alex 500 Anton Paar. Τους, ήδη αναφέρθηκε, το όργανο τέθηκε σε λειτουργία και ρυθμίστηκε, ξεπλύθηκε και μηδενίστηκε με απιονισμένο νερό. Η διαδικασία του ξεπλύματος με το απιονισμένο νερό επαναλήφθηκε ανάμεσα σε όλα τα δείγματα. Η είσοδος του νερού και των δειγμάτων μετέπειτα, γίνεται από τον έναν σωλήνα, με ένα ποτηράκι ζέσεως και η έξοδος των υγρών γίνεται από την άλλη πλευρά, από άλλον τον σωλήνα. Τα αποτελέσματα τους μέτρησης τους αλκοόλης καταγράφηκαν στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 19).

Πίνακας 19 : Μέτρηση αλκοόλης

Δείγμα	Alcohol (% V/V)					A sd
	A 1	A 2	A 3	Alcohol (average)		
<b>1 (t = 0)</b>	0	0	0	0	0	0
<b>1 (t = 6)</b>	0,16	0,18	0,18	0,173333	0,00942809	
<b>1 (t = 12)</b>	0,68	0,7	0,7	0,693333	0,00942809	
<b>3 (t = 0)</b>	0	0	0	0	0	0
<b>3 (t = 6)</b>	0,28	0,28	0,3	0,286667	0,00942809	
<b>3 (t = 12)</b>	0,5	0,5	0,52	0,506667	0,00942809	



### 3.3.5. ΜΕΤΡΗΣΗ ΣΑΚΧΑΡΩΝ

Σε όλα τα δείγματα τους χρονικές περιόδους  $t = 0$ ,  $t = 6$  και  $t = 12$  ημέρες, με την βοήθεια του οργάνου Anton Paar DMA 35 Version 3, μετρήθηκαν το ειδικό βάρος Specific Gravity (SG) σε  $g / cm^3 / K$ , η ποσότητα τους σακχαρόζης Brix σε  $^{\circ}Brix$  και η ποσότητα των διαλυτών στερεών Plato σε  $^{\circ}Plato$ .

Το όργανο αυτό διαθέτει έναν σωλήνα, ο οποίος, αφού πλύθηκε, σκουπίστηκε και ξεπλύθηκε με απιονισμένο νερό, βουτήχτηκε στα βαζάκια με τα δείγματα, ώστε να ληφθεί η μέτρηση. Το ξέπλυμα του σωλήνα αυτού επαναλήφθηκε ανάμεσα σε όλα τα δείγματα. Η διαδικασία τους μέτρησης φαίνεται παρακάτω στην εικόνα (Εικόνα 100) και τα αποτελέσματα καταγράφηκαν τους πίνακες (Πίνακες 20 και 21).



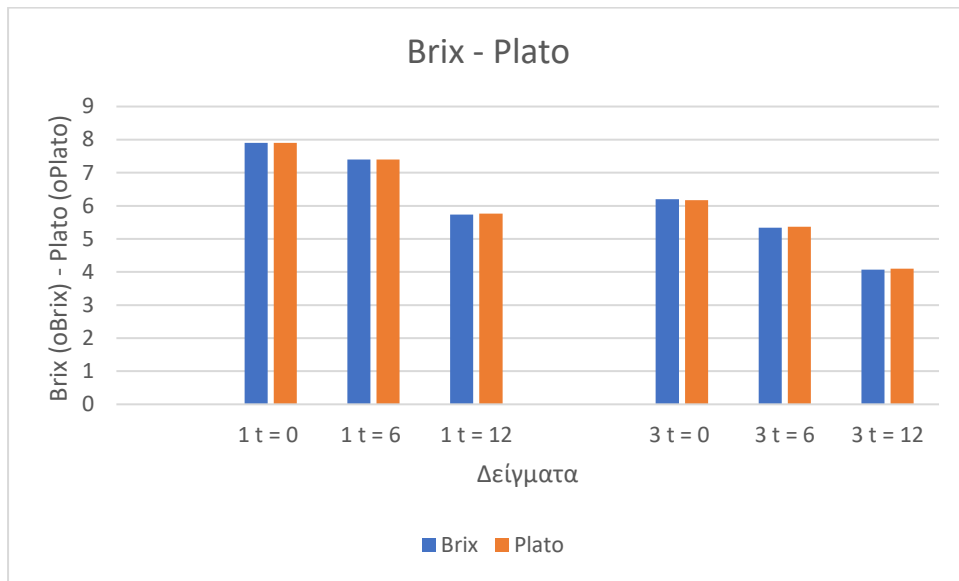
Εικόνα 100 : Μέτρηση με Anton Paar DMA 35

Πίνακας 20 : Αποτελέσματα μέτρησης ειδικού βάρους

Δείγμα	Specific Gravity (g/cm <sup>3</sup> /k)					SG sd
	SG 1	SG 2	SG 3	Specific Gravity (average)		
1 t = 0	1,0314	1,0314	1,0315	1,031433	4,71405E-05	
1 t = 6	1,0294	1,0294	1,0294	1,0294	0	
1 t = 12	1,0227	1,0228	1,023	1,022833	0,000124722	
3 t = 0	1,0247	1,0247	1,0247	1,0247	0	
3 t = 6	1,0213	1,0214	1,0206	1,0211	0,000355903	
3 t = 12	1,016	1,016	1,0161	1,016033	4,71405E-05	

Πίνακας 21 : Αποτελέσματα μέτρησης σακχάρων

Δείγμα	Brix (°Brix)				Plato (°Plato)			
	B 1	B 2	B 3	Brix (average)	P 1	P 2	P 3	Plato (average)
1 t = 0	7,9	7,9	7,9	7,9	7,9	7,9	7,9	7,9
1 t = 6	7,4	7,4	7,4	7,4	7,4	7,4	7,4	7,4
1 t = 12	5,7	5,7	5,8	5,733333	5,8	5,7	5,8	5,766667
3 t = 0	6,2	6,2	6,2	6,2	6,1	6,2	6,2	6,166667
3 t = 6	5,4	5,4	5,2	5,333333	5,4	5,4	5,3	5,366667
3 t = 12	4,2	4	4	4,066667	4,2	4,1	4	4,1



### 3.3.6. ΜΕΤΡΗΣΗ ΧΡΩΜΑΤΟΣ

Σε όλα τα δείγματα τους χρονικές περιόδους  $t = 0$ ,  $t = 6$  και  $t = 12$  ημέρες, πραγματοποιήθηκε μέτρηση χρώματος, με την βοήθεια του χρωματόμετρου Precision Colorimeter NR110, που φαίνεται στην εικόνα (Εικόνα ). Το όργανο αυτό μετρά τους παραμέτρους L, a, b, c και h. Για κάθε μια από αυτές τους παραμέτρους λήφθηκαν 3 μετρήσεις.

Για την μέτρηση του χρώματος, ζυγίστηκαν περίπου 15 gr από κάθε δείγμα ξεχωριστά, με την βοήθεια πλαστικού σιφωνίου μιας χρήσης και ζυγαριάς ακρίβειας 0,01 gr και τοποθετήθηκαν σε τρυβλία. Με το χρωματόμετρο έγιναν οι μετρήσεις, τους φαίνεται παρακάτω στην εικόνα (Εικόνα 101) και λήφθηκαν τα παρακάτω αποτελέσματα, τα οποία φαίνονται στον πίνακα (Πίνακας 22).





Εικόνα 101 : Μέτρηση χρώματος δειγμάτων με χρωματόμετρο

Πίνακας 22 : Αποτελέσματα μέτρησης χρώματος δειγμάτων

Δείγμα	L			a			b			c			h		
	L 1	L 2	L 3	a 1	a 2	a 3	b 1	b 2	b 3	c 1	c 2	c 3	h 1	h 2	h 3
<b>1 t = 0</b>	48,5	47,52	48,34	0,44	0,71	0,55	-	-	-	1,96	1,43	1,93	283,01	299,95	286,52
<b>1 t = 6</b>	48,15	48,96	46,95	0,38	0,78	0,27	-	-	-	2,26	1,61	2,67	279,6	298,91	275,89
<b>1 t = 12</b>	50,11	47,13	49,7	0,86	0,29	0,82	-1,1	-	-	1,39	2,95	1,75	307,95	275,58	298,06
<b>3 t = 0</b>	46,07	46,51	45,82	2,17	1,6	2,31	-	-0,2	-	2,18	1,62	2,32	354,5	352,86	357,75
<b>3 t = 6</b>	46,15	45,15	46,65	1,85	1,44	1,24	-	-	-	1,92	2,14	1,46	344,41	312,3	328,42
<b>3 t = 12</b>	46,21	46,33	44,83	1,36	1,34	1,49	-	-	-	1,61	1,62	2,25	327,74	326,01	311,6

### 3.3.7. ΟΡΓΑΝΟΛΗΠΤΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ

Στα δείγματα έγιναν και οργανοληπτικοί έλεγχοι. Σε έναν διαμορφωμένο χώρο για οργανοληπτικούς ελέγχους και με την βοήθεια 6 δοκιμαστών, λήφθηκαν τα παρακάτω αποτελέσματα, τα οποία φαίνονται στον πίνακα (Πίνακας 23). Είναι γνωστό ότι, επειδή οι δοκιμαστές δεν είναι εκπαιδευμένοι και έμπειροι, αναμένονται διαφορετικές απόψεις, για το κάθε δείγμα.

Πίνακας 23 : Αποτελέσματα οργανοληπτικού ελέγχου

		Δοκιμαστές					
		1	2	3	4	5	6
<b>1 (α)</b>	<b>οξύτητα</b>	1	1	2	1	1	1
	<b>άρωμα</b>	1	1	1	2	2	3
<b>1 (β)</b>	<b>οξύτητα</b>	2	1	3	1		
	<b>άρωμα</b>	1	3	1	2		
<b>3 (α)</b>	<b>οξύτητα</b>	3	1	2	3	2	2
	<b>άρωμα</b>	3	1	2	1	1	2
<b>3 (β)</b>	<b>οξύτητα</b>	3	2	2	3		
	<b>άρωμα</b>	2	1	2	2		

Τους παρατηρείται στον παραπάνω πίνακα (Πίνακας 23), οι περισσότεροι δοκιμαστές έκριναν ότι τα δείγματα 1 είναι πιο όξινα σε σχέση με τα δείγματα 3, που τα βαθμολόγησαν ως πιο ασθενή, με βάση τον βαθμό οξύτητας τους. Όσον αφορά το άρωμα των δειγμάτων φαίνεται να υπάρχει μεγάλη διαφορά τους απόψεις. Παρόλα αυτά, στο δείγμα 3, για παράδειγμα, στην αρχή τους ζύμωσης ( $t = 0$ ), μυρίζει πολύ έντονα η μυρωδιά του χαρουπόμελου, σε αντίθεση με το τέλος τους ζύμωσης ( $t = 12$ ), όπου έχει χαθεί η έντονη μυρωδιά με την ζύμωση και δεν μυρίζει πολύ το χαρουπόμελο.

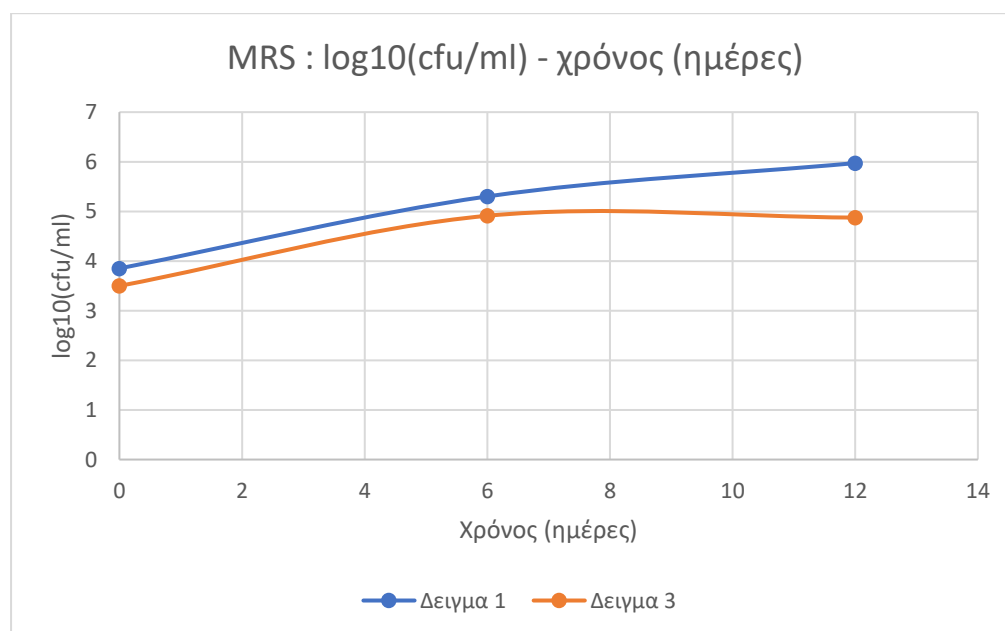
### 3.4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

#### 3.4.1. ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Όλη η διαδικασία της μικροβιολογικής ανάλυσης αναφέρεται λεπτομερώς παραπάνω και τα τελικά αποτελέσματα που προέκυψαν, φαίνονται συγκεντρωμένα τους παρακάτω πίνακες (Πίνακες 24, 25 και 26), σύμφωνα με τους οποίους σχεδιάστηκαν και τα διαγράμματα.

Πίνακας 24 : Αποτελέσματα για Βακτήρια Γαλακτικού Οξέος

	Δείγμα 1	Δείγμα 3	Δείγμα 1	Δείγμα 3	Δείγμα 1	Δείγμα 3
	cfu/ml		cfu/ml		log <sub>10</sub> (cfu/ml)	
t = 0	$7,1 \cdot 10^3$	$3,15 \cdot 10^3$	7100	3150	3,851258	3,498311
t = 6	$2 \cdot 10^5$	$8,16 \cdot 10^4$	200000	81600	5,30103	4,91169
t = 12	$9,4 \cdot 10^5$	$7,5 \cdot 10^4$	940000	75000	5,973128	4,875061



Δείγμα 1 (μπλε γραμμή) : Δείγμα με ζάχαρη

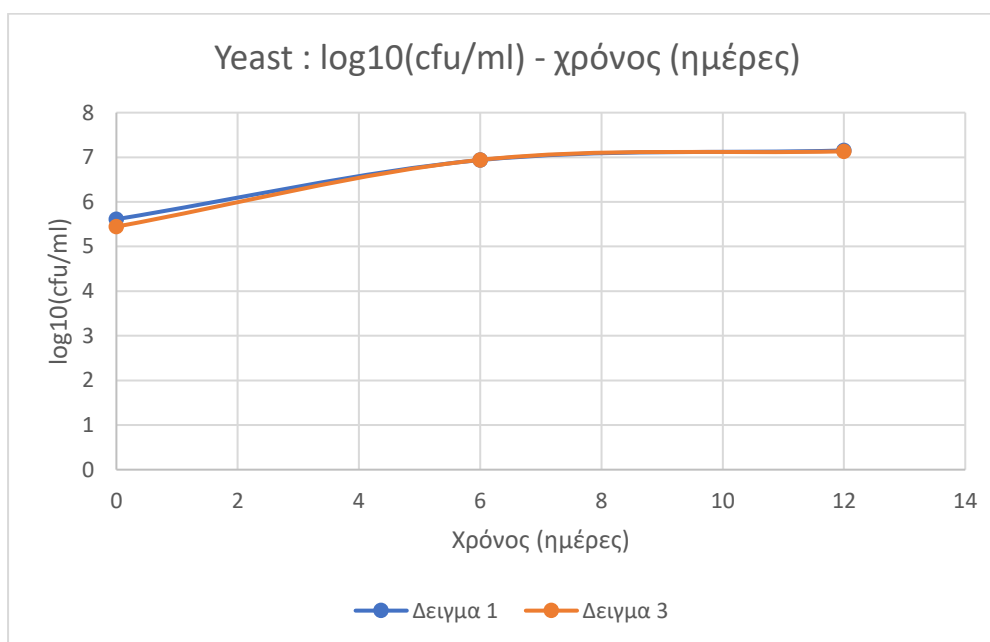
Δείγμα 3 (πορτοκαλί γραμμή) : Δείγμα με χαρουπόμελο

Από το παραπάνω διάγραμμα, βγαίνει το συμπέρασμα ότι και στα δυο συστήματα αυξάνεται ο πληθυσμός των βακτηρίων του γαλακτικού οξέος κατά την διάρκεια της

ζύμωσης. Ειδικότερα, τις πρώτες έξι ημέρες, παρατηρείται μια μεγάλη αύξηση των αποικιών και στην συνέχεια της ζύμωσης, μέχρι την δωδέκατη ημέρα, ο αριθμός των αποικιών αρχίζει να σταθεροποιείται. Σε γενικές γραμμές, στα δυο συστήματα, οι πληθυσμοί, που αναπτύσσονται, δεν παρουσιάζουν σημαντικές διαφορές μεταξύ τους.

Πίνακας 25 : Αποτελέσματα για Ζυμομύκητες

	Δείγμα 1	Δείγμα 3	Δείγμα 1	Δείγμα 3	Δείγμα 1	Δείγμα 3
	cfu/ml		cfu/ml		log10(cfu/ml)	
t = 0	$4,1 * 10^5$	$2,79 * 10^5$	410000	279000	5,612784	5,445604
t = 6	$8,65 * 10^6$	$8,75 * 10^6$	8650000	8750000	6,937016	6,942008
t = 12	$1,42 * 10^7$	$1,36 * 10^7$	14200000	13600000	7,152288	7,133539



Δείγμα 1 (μπλε γραμμή) : Δείγμα με ζάχαρη

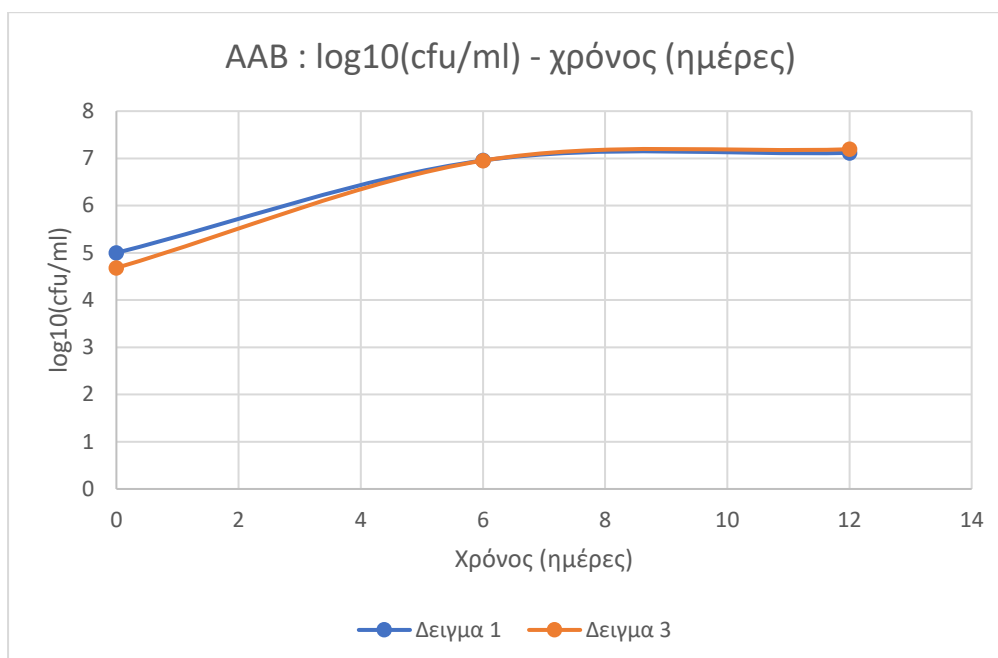
Δείγμα 3 (πορτοκαλί γραμμή) : Δείγμα με χαρουπόμελο

Και στην περίπτωση ανάπτυξης των ζυμομυκήτων, στο παραπάνω διάγραμμα, φαίνεται ότι ο πληθυσμός τους αυξάνεται κατά την διάρκεια της ζύμωσης. Η μεγάλη αύξηση παρατηρείται τις πρώτες έξι ημέρες και στην συνέχεια φαίνεται ότι ο αριθμός των ζυμομυκήτων αρχίζει να σταθεροποιείται. Το γεγονός ότι στα περισσότερα σημεία, οι δυο καμπύλες συμπίπτουν, φανερώνει πως οι πληθυσμοί, που

αναπτύσσονται, στα δυο συστήματα, δεν παρουσιάζουν μεγάλες διαφορές μεταξύ τους.

Πίνακας 26 : Αποτελέσματα για Βακτήρια του Οξικού Οξέος

	Δείγμα 1	Δείγμα 3	Δείγμα 1	Δείγμα 3	Δείγμα 1	Δείγμα 3
	cfu/ml		cfu/ml		log10(cfu/ml)	
t = 0	$1 * 10^5$	$4,8 * 10^4$	100000	48000	5	4,681241
t = 6	$9 * 10^6$	$8,95 * 10^6$	9000000	8950000	6,954243	6,951823
t = 12	$1,305 * 10^7$	$1,56 * 10^7$	13050000	15600000	7,115611	7,193125



Δείγμα 1 (μπλε γραμμή) : Δείγμα με ζάχαρη

Δείγμα 3 (πορτοκαλί γραμμή) : Δείγμα με χαρουπόμελο

Από το παραπάνω διάγραμμα, συμπεραίνεται ότι και στα δυο συστήματα ο πληθυσμός των βακτηρίων του οξικού οξέος αυξάνεται κατά την διάρκεια της ζύμωσης και πιο συγκεκριμένα, η μεγάλη αύξηση παρατηρείται τις πρώτες έξι μέρες, ενώ στην συνέχεια της ζύμωσης, ο αριθμός των αποικιών αρχίζει να σταθεροποιείται. Επίσης, στο συγκεκριμένο διάγραμμα, οι δυο καμπύλες ταυτίζονται η μια την άλλη, που σημαίνει ότι στα δυο συστήματα, οι πληθυσμοί, που αναπτύσσονται, δεν παρουσιάζουν σημαντικές διαφορές μεταξύ τους.

Συμπερασματικά, η μικροβιολογική ανάλυση που έγινε, έδειξε ότι στα δυο συστήματα (ζάχαρη και χαρουπόμελο), οι πληθυσμοί δεν παρουσιάζουν σημαντικές διαφορές, όσον αφορά το μικροβιολογικό φορτίο.

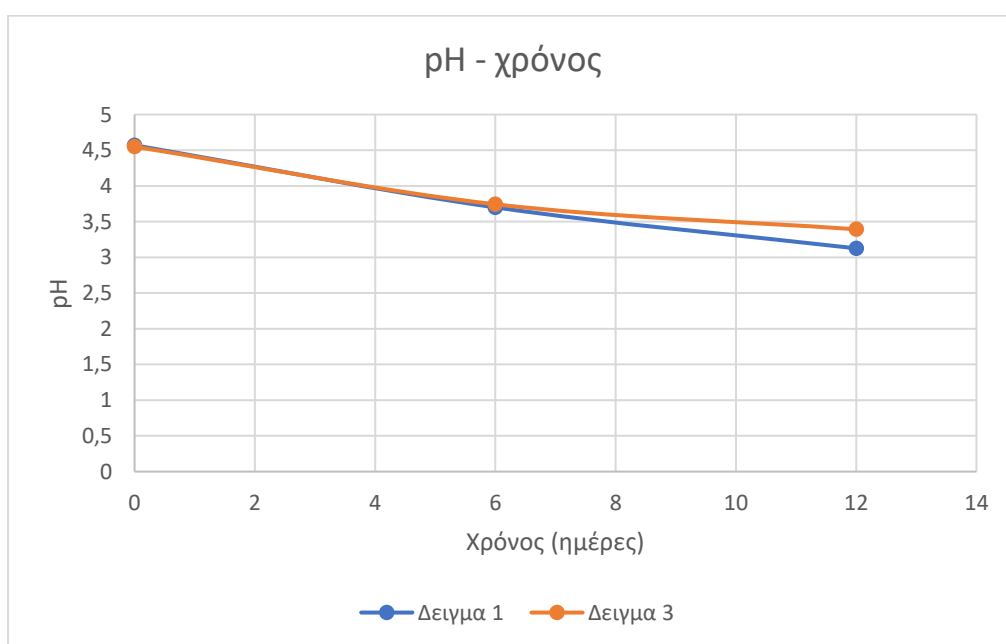
### 3.4.2. ΜΕΤΡΗΣΗ ΟΡΓΑΝΙΚΩΝ ΟΞΕΩΝ

#### pH

Όλη η διαδικασία μέτρησης του pH περιγράφηκε αναλυτικά παραπάνω και τα τελικά αποτελέσματα που προέκυψαν φαίνονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 27), με βάση του οποίου σχεδιάστηκε το διάγραμμα και σχολιάστηκαν τα αποτελέσματα.

Πίνακας 27 : Αποτελέσματα μέτρησης pH

	pH	
	Δείγμα 1	Δείγμα 3
t = 0	4,57	4,55
t = 6	3,7	3,743333
t = 12	3,126667	3,393333



Δείγμα 1 (μπλε γραμμή) : Δείγμα με ζάχαρη

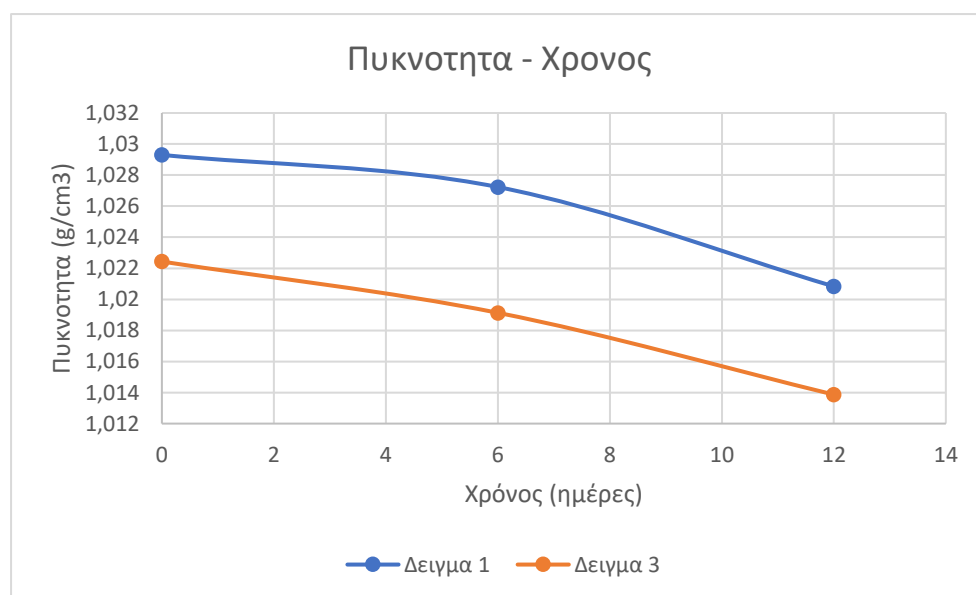
Δείγμα 3 (πορτοκαλί γραμμή) : Δείγμα με χαρουπόμελο

Όπως φαίνεται και στο παραπάνω διάγραμμα, οι τιμές pH και στα δυο συστήματα μειώνονται κατά την διάρκεια της ζύμωσης. Αυτό είναι φυσιολογικό και επιθυμητό φαινόμενο, αφού πρόκειται για ένα ζυμώμενο προϊόν με τελική τιμή pH περίπου 3. Τα δυο συστήματα μεταξύ τους (ζάχαρη και χαρουπόμελο), όπως διαπιστώνεται και από το διάγραμμα, δεν παρουσιάζουν σημαντικές διαφορές.

## ΠΥΚΝΟΤΗΤΑ

Πίνακας 28 : Αποτελέσματα Πυκνότητας

	Density (g/cm <sup>3</sup> )	
	Δείγμα 1	Δείγμα 3
t = 0	1,0293	1,022433
t = 6	1,027233	1,019133
t = 12	1,020833	1,013867



Δείγμα 1 (μπλε γραμμή) : Δείγμα με ζάχαρη

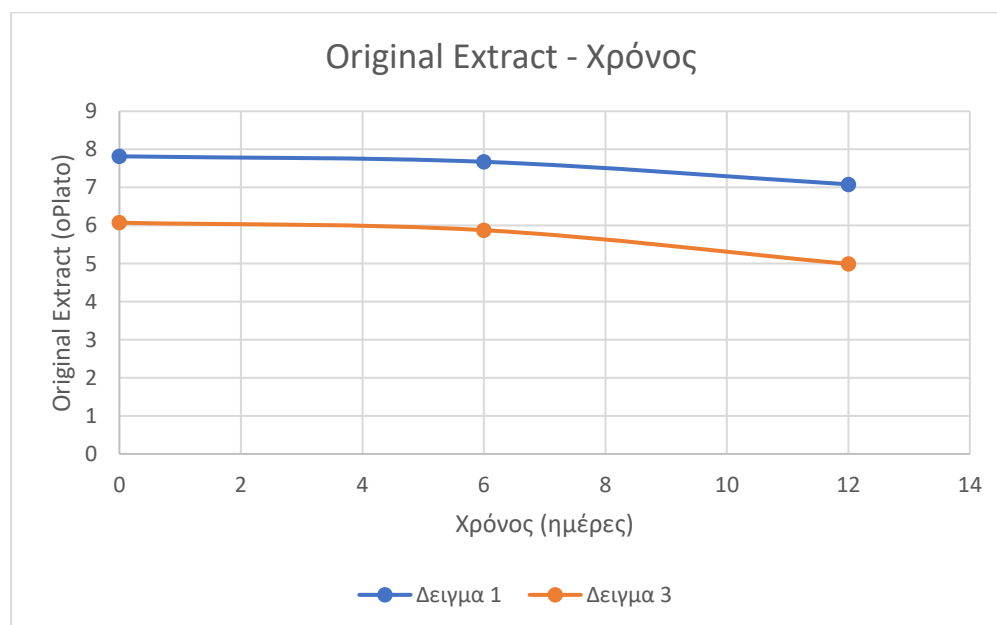
Δείγμα 3 (πορτοκαλί γραμμή) : Δείγμα με χαρουπόμελο

Όπως παρατηρείται από το διάγραμμα, η πυκνότητα μειώνεται κατά την διάρκεια της ζύμωσης και στα δυο συστήματα. Ο ρυθμός μείωσης είναι σχεδόν ίδιος και τα δυο συστήματα δεν εμφανίζουν μεγάλες διαφορές μεταξύ τους, αφού η διαφορά στα αποτελέσματα είναι από το τρίτο δεκαδικό ψηφίο και μετά.

## ORIGINAL EXTRACT

Πίνακας 29 : Αποτελέσματα Original Extract

	Original Extract (oPlato)	
	Δείγμα 1	Δείγμα 3
t = 0	7,816667	6,073333
t = 6	7,673333	5,876667
t = 12	7,08	4,99



Δείγμα 1 (μπλε γραμμή) : Δείγμα με ζάχαρη

Δείγμα 3 (πορτοκαλί γραμμή) : Δείγμα με χαρουπόμελο

Το original extract μετριέται σε °Plato και δείχνει το ποσοστιαίο βάρος των σακχάρων στο συνολικό βάρος του διαλύματος. Δηλαδή, τα gr της διαλυμένης ουσίας σε 100 gr διαλύματος. Από το παραπάνω διάγραμμα, παρατηρείται ότι η τιμή αυτή είναι

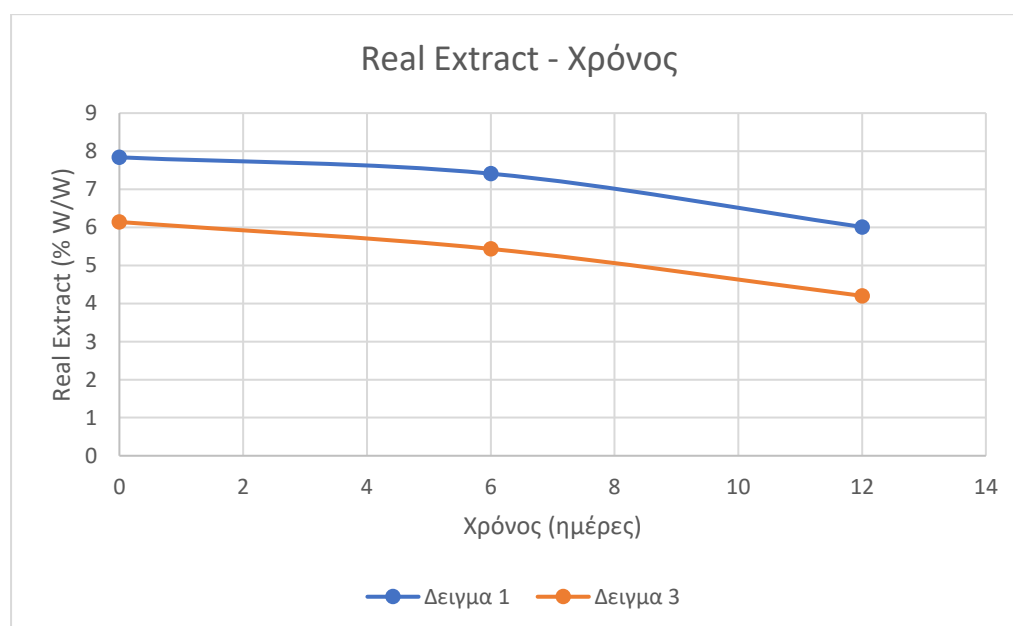


μεγαλύτερη στο δείγμα 1, με την ζάχαρη, από ότι στο δείγμα 3, με το χαρουπόμελο, και παραμένει μεγαλύτερη μέχρι και το τέλος της ζύμωσης. Αυτό σημαίνει ότι η ζάχαρη έχει μεγαλύτερο ποσοστό σακχάρων από ότι το χαρουπόμελο. Παρόλο αυτά, και στα δυο συστήματα, η τιμή original extract μειώνεται κατά την διάρκεια της ζύμωσης. Αυτό είναι φυσιολογικό και αναμενόμενο γεγονός, εφόσον κατά την διάρκεια της ζύμωσης, οι μικροοργανισμοί τρέφονται και αναπτύσσονται από τα σάκχαρα, που υπάρχουν στο διάλυμα, με αποτέλεσμα αυτά να μειώνονται. Όμως, και στα δυο συστήματα (ζάχαρη και χαρουπόμελο), ο ρυθμός μείωσης φαίνεται να είναι σχεδόν ίδιος.

## REAL EXTRACT

Πίνακας 30 : Αποτελέσματα Real Extract

	Real Extract (% W/W)	
	Δείγμα 1	Δείγμα 3
t = 0	7,84	6,14
t = 6	7,41	5,433333
t = 12	6,01	4,2



Δείγμα 1 (μπλε γραμμή) : Δείγμα με ζάχαρη

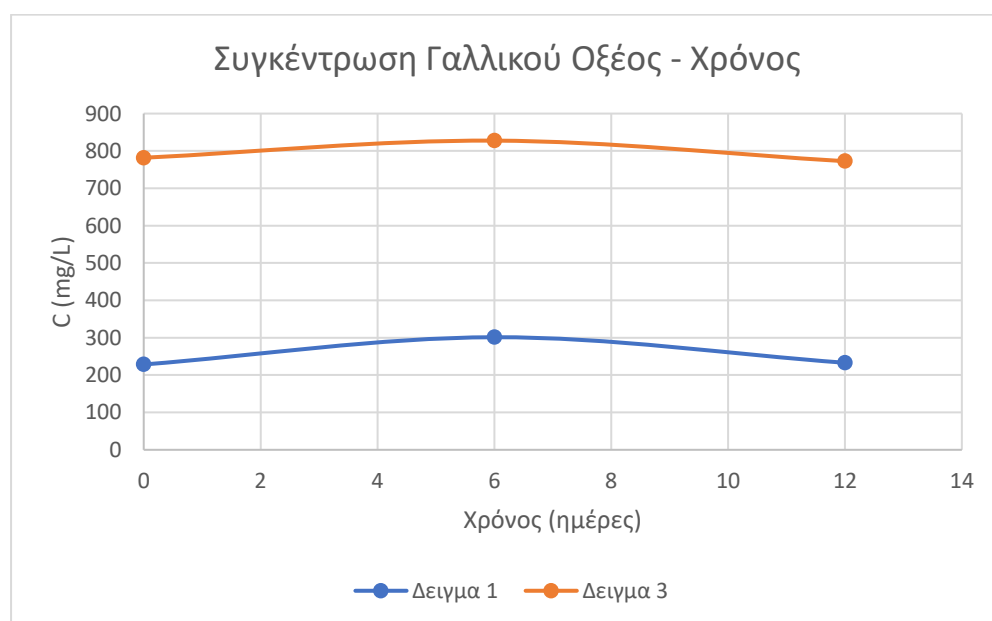
Δείγμα 3 (πορτοκαλί γραμμή) : Δείγμα με χαρουπόμελο

Το real extract μετριέται σε % W/W και δείχνει την αρχική ποσότητα των σακχάρων στο δείγμα. Από το παραπάνω διάγραμμα, παρατηρείται ότι η τιμή αυτή είναι μεγαλύτερη στο δείγμα 1, με την ζάχαρη, από ότι στο δείγμα 3, με το χαρουπόμελο, και παραμένει μεγαλύτερη μέχρι και το τέλος της ζύμωσης. Αυτό σημαίνει ότι η ζάχαρη έχει μεγαλύτερη αρχική ποσότητα σακχάρων από ότι το χαρουπόμελο. Παρόλο αυτά, και στα δυο συστήματα, η τιμή real extract μειώνεται κατά την διάρκεια της ζύμωσης. Αυτό είναι φυσιολογικό και αναμενόμενο γεγονός, εφόσον κατά την διάρκεια της ζύμωσης, οι μικροοργανισμοί τρέφονται και αναπτύσσονται από τα σάκχαρα, που υπάρχουν στο διάλυμα, με αποτέλεσμα αυτά να μειώνονται. Όμως, και στα δυο συστήματα (ζάχαρη και χαρουπόμελο), ο ρυθμός μείωσης φαίνεται να είναι σχεδόν ίδιος, όπως και στο διάγραμμα του original extract.

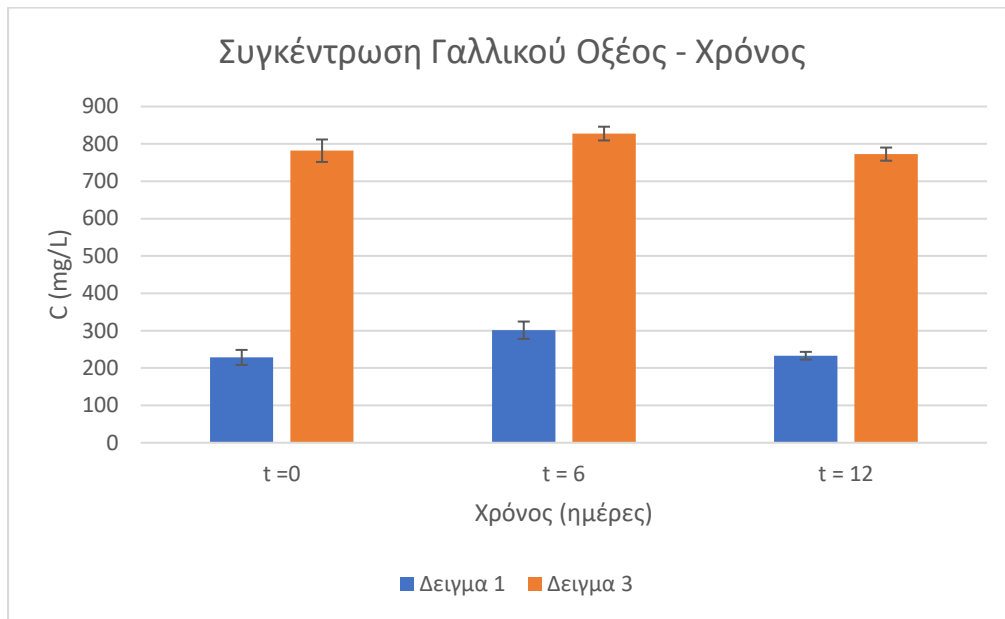
### 3.4.3. ΟΛΙΚΕΣ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΕΣ

Πίνακας 31 : Αποτελέσματα Ολικών Πολυφαινολών

Χρόνος (ημέρες)	Συγκέντρωση Γαλλικού Οξέος C (mg/L)	
	Δείγμα 1	Δείγμα 3
t = 0	228,375	781,75
t = 6	301,292	827,583
t = 12	232,958	772,583



ή



Δείγμα 1 (μπλε γραμμή) : Δείγμα με ζάχαρη

Δείγμα 3 (πορτοκαλί γραμμή) : Δείγμα με χαρουπόμελο

Όπως φαίνεται και στα παραπάνω διαγράμματα, το δείγμα 3, με το χαρουπόμελο, έχει πολύ μεγαλύτερη ποσότητα πολυφαινολών, από ότι το δείγμα 1, με την ζάχαρη, και αυτό οφείλεται στο χαρουπόμελο. Δηλαδή, το δείγμα με 90 % χαρουπόμελο έχει πολύ υψηλό ολικό πολυφαινολικό φορτίο, το οποίο οφείλεται στην πρώτη ύλη. Παρατηρείται, μάλιστα, ότι το χαρουπόμελο παραμένει σχεδόν σταθερό και μετά το τέλος της ζύμωσης, την δωδέκατη ημέρα, αφού η ποσότητα των πολυφαινολών δεν μεταβάλλεται αισθητά.

Στο παραπάνω διάγραμμα, κάθε κολώνα δείχνει το μέσο όρο των ολικών πολυφαινολών από τρεις επαναλήψεις, στο κάθε δείγμα τις χρονικές στιγμές  $t = 0$ ,  $t = 6$  και  $t = 12$  ημέρες. Οι γραμμές σφάλματος φανερώνουν πόσο είναι οι αποκλίσεις των τριών τιμών. Όλες οι αποκλίσεις είναι σχετικά μικρές, και στο δείγμα 1 και στο δείγμα 3, που σημαίνει ότι οι επαναλήψεις που έγιναν δεν διαφέρουν πολύ μεταξύ τους. Γενικά, είναι επιθυμητό, οι τυπικές αποκλίσεις να είναι όσο το δυνατόν μικρότερες.

Συγκρίνοντας τις τρεις χρονικές στιγμές του δείγματος 1, διαπιστώνεται ότι δεν παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική διαφορά. Το ίδιο ισχύει, συγκρίνοντας τις τρεις χρονικές στιγμές του δείγματος 3, αφού οι γραμμές σφάλματος επικαλύπτονται. Το γεγονός ότι, στην μέση της ζύμωσης, την έκτη ημέρα, παρατηρείται μια μικρή αύξηση των πολυφαινολών και στην συνέχεια, την δωδέκατη ημέρα, μια μικρή μείωση, δεν μπορεί να εξηγηθεί και να τεκμηριωθεί, διότι δεν είναι στατιστικά σημαντικές οι διαφορές και επίσης, δεν έγιναν άλλα εξειδικευμένα στατιστικά πακέτα, που θα

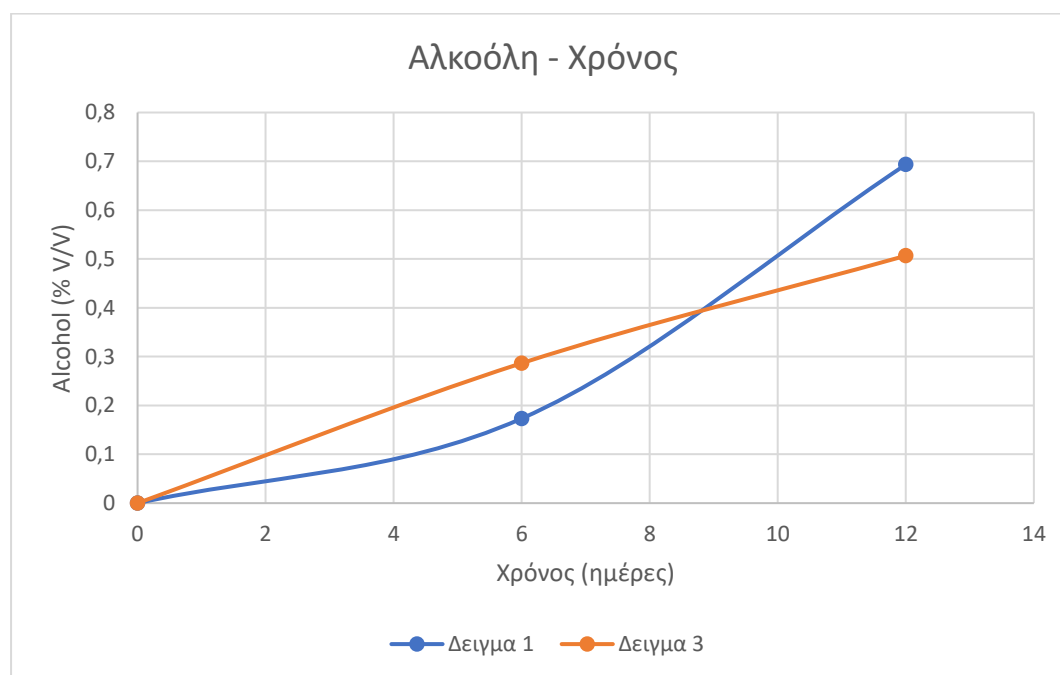
έδιναν και άλλες πληροφορίες. Το μόνο που θα μπορούσε να εξηγηθεί κάπως είναι ότι οι μικροοργανισμοί που ζυμώνουν μπορούν να διασπάσουν τις αρχικές πολυφαινόλες σε μικρότερες φαινολικές ενώσεις, που αύξησαν λίγο την φαινολική δράση, και άρα το φαινολικό περιεχόμενο, κατά την μέση της ζύμωσης. Αυτό, όμως, δεν είναι σίγουρο, εφόσον δεν ακολούθησε εξειδικευμένη στατιστική μελέτη.

Όμως, συγκρίνοντας το δείγμα 1, με την ζάχαρη, και το δείγμα 3, με το χαρουπόμελο, διαπιστώνεται ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά και μάλιστα οι ολικές πολυφαινόλες στο δείγμα με την ζάχαρη είναι τέσσερις φορές μικρότερη από αυτές στο δείγμα με το χαρουπόμελο.

### 3.4.4. ΜΕΤΡΗΣΗ ΑΛΚΟΟΛΗΣ

Πίνακας 32 : Αποτελέσματα Αλκοόλης

	Alcohol (% V/V)	
	Δείγμα 1	Δείγμα 3
t = 0	0	0
t = 6	0,173333	0,286667
t = 12	0,693333	0,506667



Δείγμα 1 (μπλε γραμμή) : Δείγμα με ζάχαρη

Δείγμα 3 (πορτοκαλί γραμμή) : Δείγμα με χαρουπόμελο

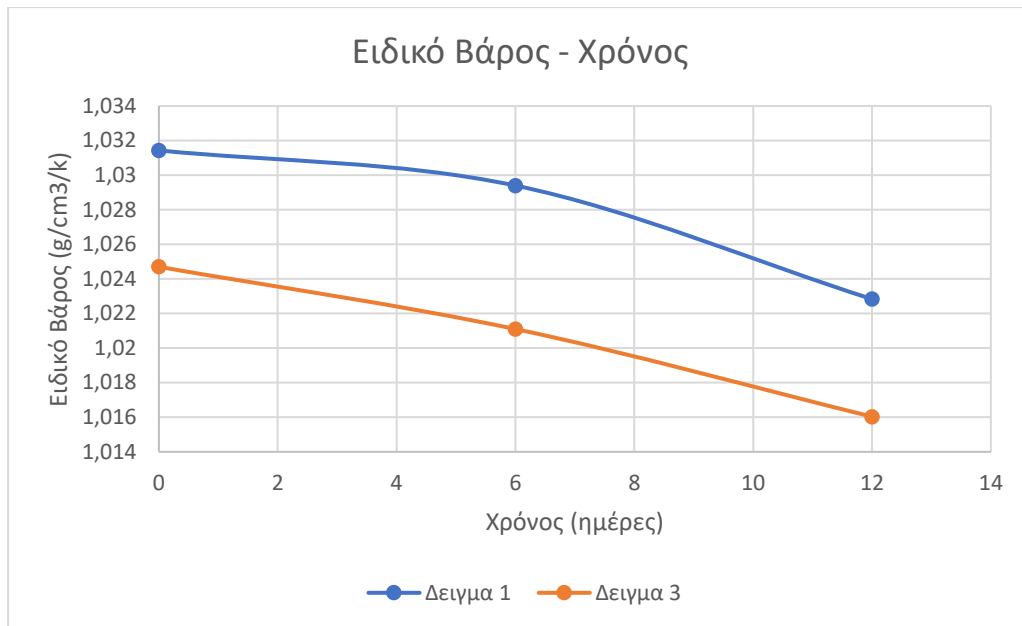
Στο παραπάνω διάγραμμα φαίνεται η παραγωγή αλκοόλης στα δείγματα και η μεταβολή αυτής. Αρχικά, την χρονική στιγμή  $t = 0$ , τα δυο δείγματα δεν έχουν καθόλου ποσότητα αλκοόλης, αφού δεν προστέθηκε αλκοόλη κατά την παρασκευή τους. Στη συνέχεια, όμως, κατά την διάρκεια της ζύμωσης, παράγεται μια ποσότητα αλκοόλης. Στην μέση της ζύμωσης, την  $t = 6$  ημέρες, παράχθηκε περισσότερη ποσότητα αλκοόλης στο δείγμα 3, με το χαρουπόμελο, από ότι στο δείγμα 1, με την ζάχαρη. Στο τέλος της ζύμωσης, όμως, την  $t = 12$  ημέρες, παράχθηκε περισσότερη ποσότητα αλκοόλης στο δείγμα 1, με την ζάχαρη, από ότι στο δείγμα 3, με το χαρουπόμελο.

Οπότε, διαπιστώνεται ότι το δείγμα 1, με την ζάχαρη, τις πρώτες ημέρες της ζύμωσης παρήγαγε μικρές ποσότητες αλκοόλης και μετά την μέση της ζύμωσης ξεκίνησε ραγδαία αύξηση αυτής. Σε αντίθεση, με το δείγμα 3, με το χαρουπόμελο, όπου η μεγαλύτερη ποσότητα της αλκοόλης παρατηρείται ότι παράχθηκε μέχρι τη μέση της ζύμωσης και μετά η παραγωγή μειώθηκε.

## ΜΕΤΡΗΣΗ ΕΙΔΙΚΟΥ ΒΑΡΟΥΣ

Πίνακας 33 : Αποτελέσματα Ειδικού Βάρους

	Specific Gravity (g/cm <sup>3</sup> /k)	
	Δείγμα 1	Δείγμα 3
t = 0	1,031433	1,0247
t = 6	1,0294	1,0211
t = 12	1,022833	1,016033



Δείγμα 1 (μπλε γραμμή) : Δείγμα με ζάχαρη

Δείγμα 3 (πορτοκαλί γραμμή) : Δείγμα με χαρουπόμελο

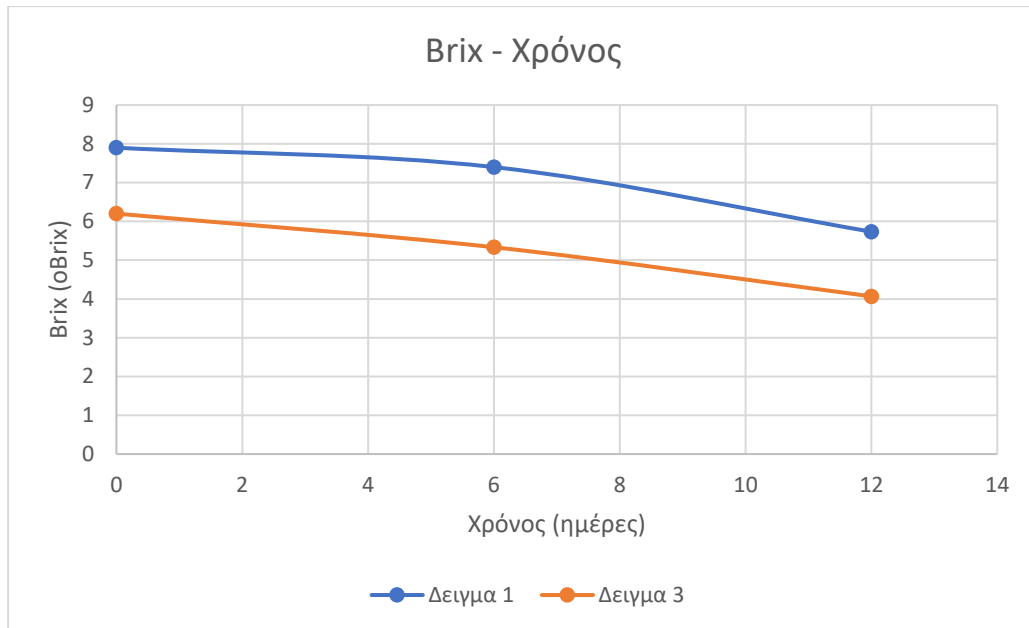
Στο παραπάνω διάγραμμα, φαίνονται οι μεταβολές του ειδικού βάρους στα δείγματα. Παρατηρείται ότι το ειδικό βάρος του δείγματος 1, με την ζάχαρη, είναι λίγο αυξημένο, σε σύγκριση με το ειδικό βάρος του δείγματος 3, με το χαρουπόμελο. Αλλά η διαφορά είναι στο δεύτερο δεκαδικό ψηφίο και μετά, όπως φαίνεται στον πίνακα (Πίνακας 33), είναι, δηλαδή, αμελητέα, οπότε δεν σχολιάζεται περαιτέρω.

Αυτό που αξίζει να σχολιαστεί είναι ότι και στα δυο δείγματα, το ειδικό βάρος μειώνεται κατά την διάρκεια της ζύμωσης. Πιο συγκεκριμένα, η μείωση του ειδικού βάρους αρχίζει από την πρώτη κι όλας ημέρα, αλλά γίνεται εντονότερη από την μέση της ζύμωσης και μετά, όπως φαίνεται από το διάγραμμα.

### 3.4.5. ΜΕΤΡΗΣΗ ΣΑΚΧΑΡΩΝ

Πίνακας 34 : Μέτρηση Brix

	Brix (°Brix)	
	Δείγμα 1	Δείγμα 3
t = 0	7,9	6,2
t = 6	7,4	5,333333333
t = 12	5,733333	4,066666667

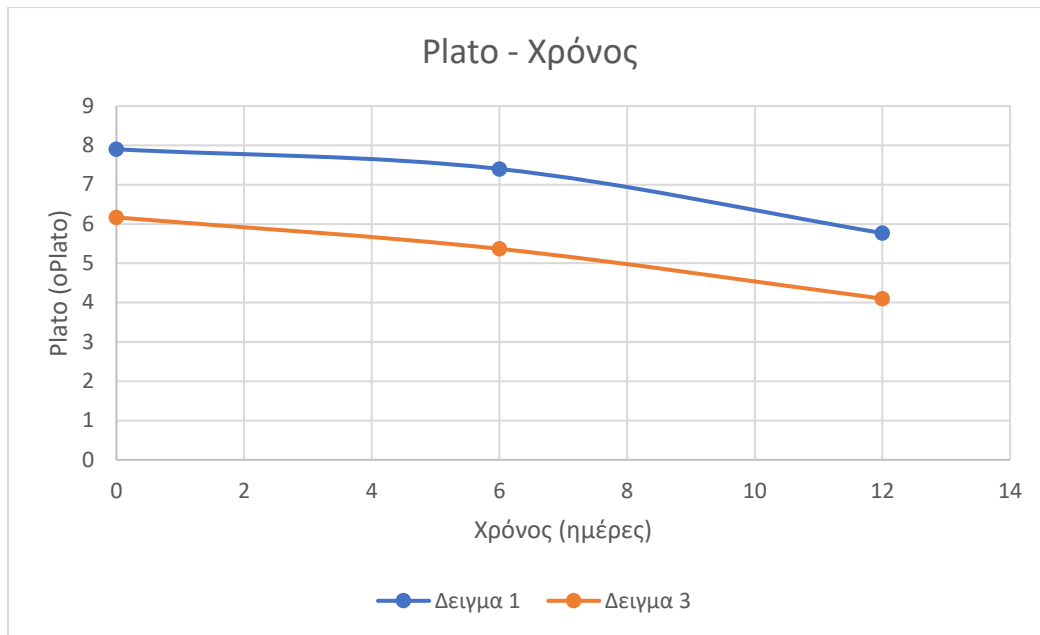


Δείγμα 1 (μπλε γραμμή) : Δείγμα με ζάχαρη

Δείγμα 3 (πορτοκαλί γραμμή) : Δείγμα με χαρουπόμελο

Πίνακας 35 : Αποτελέσματα Plato

	Plato (°Plato)	
	Δείγμα 1	Δείγμα 3
t = 0	7,9	6,16666667
t = 6	7,4	5,36666667
t = 12	5,766667	4,1



Δείγμα 1 (μπλε γραμμή) : Δείγμα με ζάχαρη

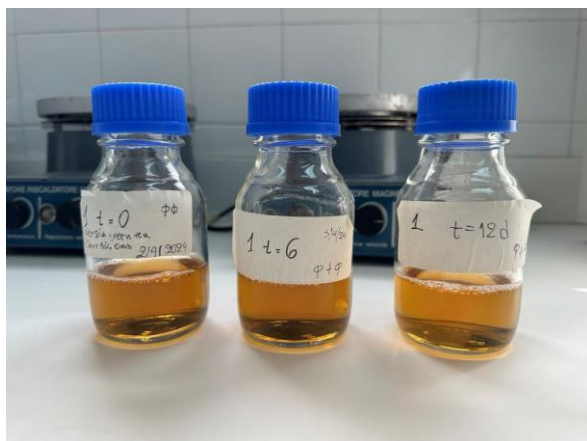
Δείγμα 3 (πορτοκαλί γραμμή) : Δείγμα με χαρουπόμελο

Στο πρώτο διάγραμμα, φαίνεται η ποσότητα της σακχαρόζης Brix σε °Brix και στο δεύτερο διάγραμμα, η ποσότητα των διαλυτών στερεών Plato σε °Plato και οι μεταβολές αυτών κατά την διάρκεια της ζύμωσης. Συγκρίνοντας τους δυο παραπάνω πίνακες (Πίνακες 34 και 35), διαπιστώνεται ότι οι τιμές τους είναι σχεδόν ίδιες. Δεν παρατηρούνται σημαντικές διαφορές και αυτό γιατί και οι δυο παράμετροι μετρούν την ποσότητα σακχάρων στο κάθε δείγμα.

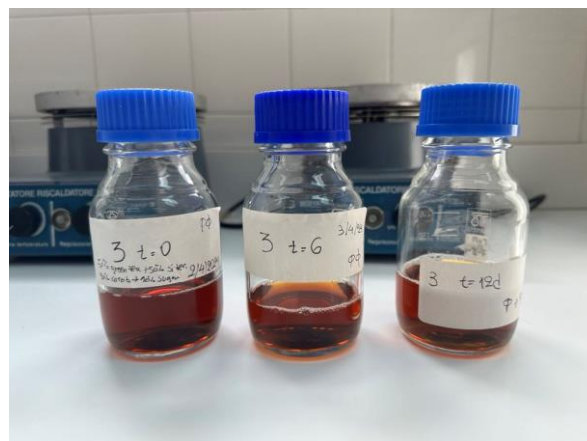
Το σημαντικό σημείο, που παρατηρείται, είναι ότι και στα δυο διαγράμματα, το δείγμα 1, με την ζάχαρη, εμφανίζει μεγαλύτερες τιμές, από ότι το δείγμα 3, με το χαρουπόμελο. Το γεγονός αυτό είναι φυσιολογικό και αναμενόμενο και οφείλεται στην ζάχαρη, όπου τα σάκχαρα είναι αυξημένα, σε σχέση με τα σάκχαρα του χαρουπόμελου. Αναφορικά, με την σταδιακή μείωση των σακχάρων και στα δυο δείγματα, είναι, επίσης, φυσιολογικό και αναμενόμενο γεγονός, αφού τα σάκχαρα καταναλώνονται από τους μικροοργανισμούς, που παράγονται και αναπτύσσονται κατά την διάρκεια της ζύμωσης.



### 3.4.6. ΜΕΤΡΗΣΗ ΧΡΩΜΑΤΟΣ



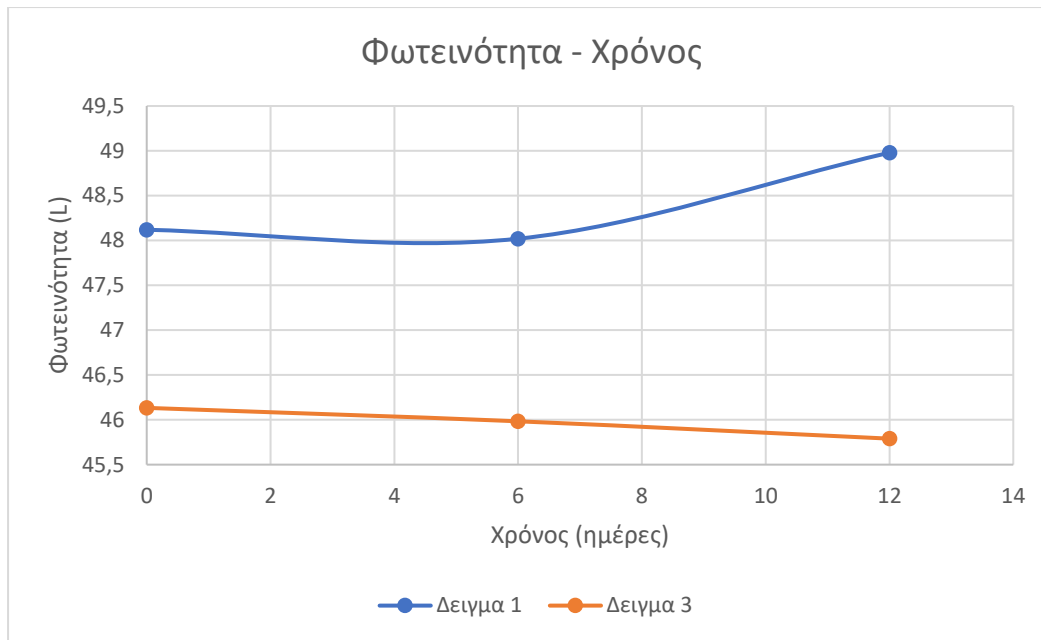
Εικόνα 103 : Δείγματα 1 την  $t = 0$ ,  $t = 6$  και  $t = 12$  ημέρες



Εικόνα 102 : Δείγματα 3 την  $t = 0$ ,  $t = 6$  και  $t = 12$  ημέρες

Πίνακας 36 : Μέτρηση Φωτεινότητας L

	L	
	Δείγμα 1	Δείγμα 3
t = 0	48,12	46,13333
t = 6	48,02	45,98333
t = 12	48,98	45,79



Δείγμα 1 (μπλε γραμμή) : Δείγμα με ζάχαρη

Δείγμα 3 (πορτοκαλί γραμμή) : Δείγμα με χαρουπόμελο

Τα χρώματα όλων των δειγμάτων σε όλες τις χρονικές στιγμές φαίνονται παραπάνω στις εικόνες (Εικόνες 102 και 103). Η φωτεινότητα όλων των δειγμάτων μετρήθηκε με το χρωματόμετρο και πιο συγκεκριμένα εκφράζεται με την παράμετρο L, οι μεταβολές της οποίας φαίνονται στο παραπάνω διάγραμμα.

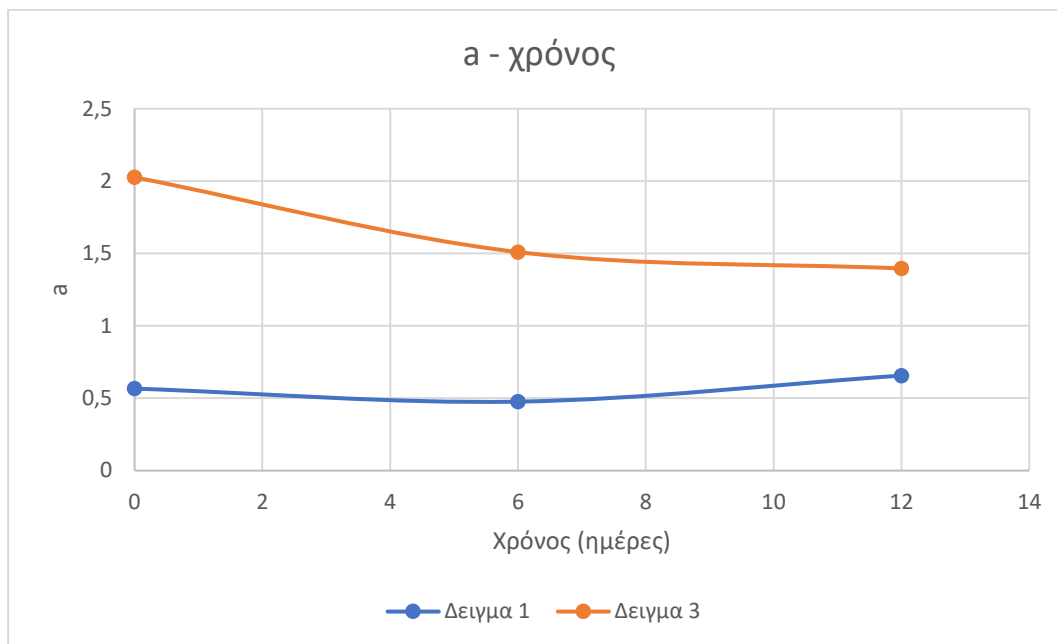
Οι τιμές της φωτεινότητας του δείγματος 1, με την ζάχαρη, είναι αυξημένες σε σύγκριση με αυτές του δείγματος 3, με το χαρουπόμελο. Το γεγονός αυτό είναι απολύτως φυσιολογικό και αναμενόμενο, αφού, είναι γνωστό ότι, τιμές φωτεινότητας προς το 0 δηλώνουν σκούρα χρώματα, ενώ τιμές φωτεινότητας προς το 100 δηλώνουν ανοιχτά χρώματα και όπως φαίνεται από τις εικόνες (Εικόνες 102 και 103), τα δείγματα 1, με την ζάχαρη, είναι πολύ πιο ανοιχτόχρωμα, από τα δείγματα 3, με το χαρουπόμελο.

Επιπλέον, στο δείγμα 1, με την ζάχαρη, παρατηρείται μια μικρή μείωση κατά την διάρκεια της ζύμωσης, ενώ στο δείγμα 3, με το χαρουπόμελο, παρατηρείται μια μικρή αύξηση.

Πίνακας 37 : Μέτρηση a

	a	
	Δείγμα 1	Δείγμα 3
t = 0	0,566667	2,026667
t = 6	0,476667	1,51

t = 12	0,656667	1,396667
--------	----------	----------



Δείγμα 1 (μπλε γραμμή) : Δείγμα με ζάχαρη

Δείγμα 3 (πορτοκαλί γραμμή) : Δείγμα με χαρουπόμελο

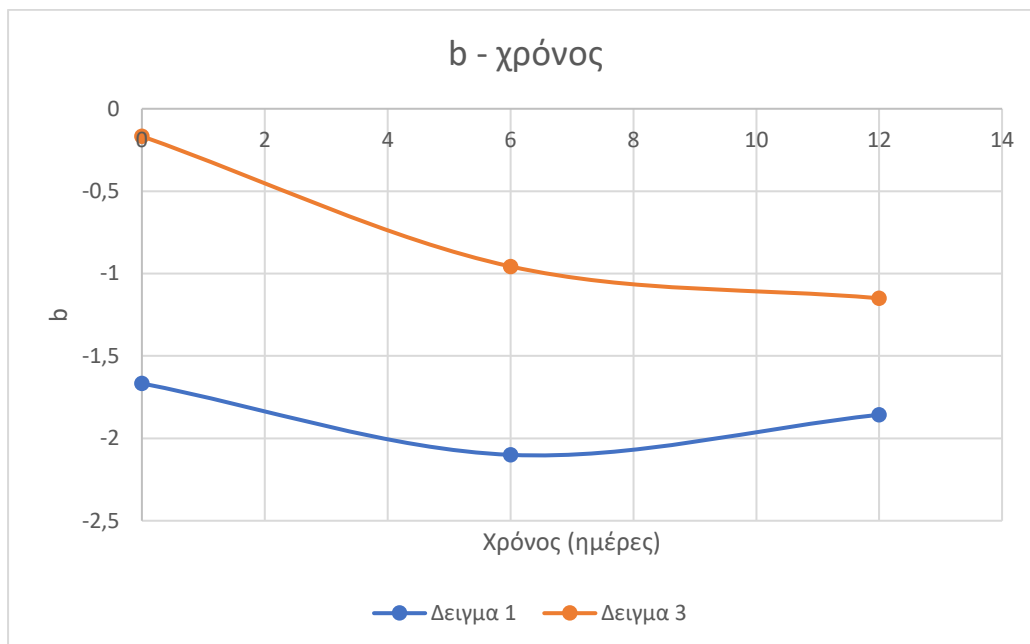
Η παράμετρος  $a$  φανερώνει το πράσινο – κόκκινο χρώμα. Πιο συγκεκριμένα, αρνητικές τιμές υποδηλώνουν πράσινο χρώμα, ενώ θετικές τιμές υποδηλώνουν κόκκινο χρώμα στο δείγμα.

Στην συγκεκριμένη περίπτωση, όλες οι τιμές των δειγμάτων είναι θετικές και άρα υποδηλώνουν κόκκινο χρώμα. Όμως, το δείγμα 1, με την ζάχαρη, παρουσιάζει χαμηλότερες τιμές, σε σχέση με το δείγμα 3, με το χαρουπόμελο. Αυτό είναι φυσιολογικό και αναμενόμενο, αφού τα δείγματα 3 έχουν πιο σκούρο χρώμα προς κόκκινο – μπορντό, από ότι τα δείγματα 1, που είναι πιο ανοιχτόχρωμα, όπως φαίνεται και στις παραπάνω εικόνες (Εικόνες 102 και 103).

Πίνακας 38 : Μέτρηση  $b$

	b	
	Δείγμα 1	Δείγμα 3
t = 0	-1,66667	-0,16667
t = 6	-2,1	-0,95667

t = 12	-1,85667	-1,15
--------	----------	-------



Δείγμα 1 (μπλε γραμμή) : Δείγμα με ζάχαρη

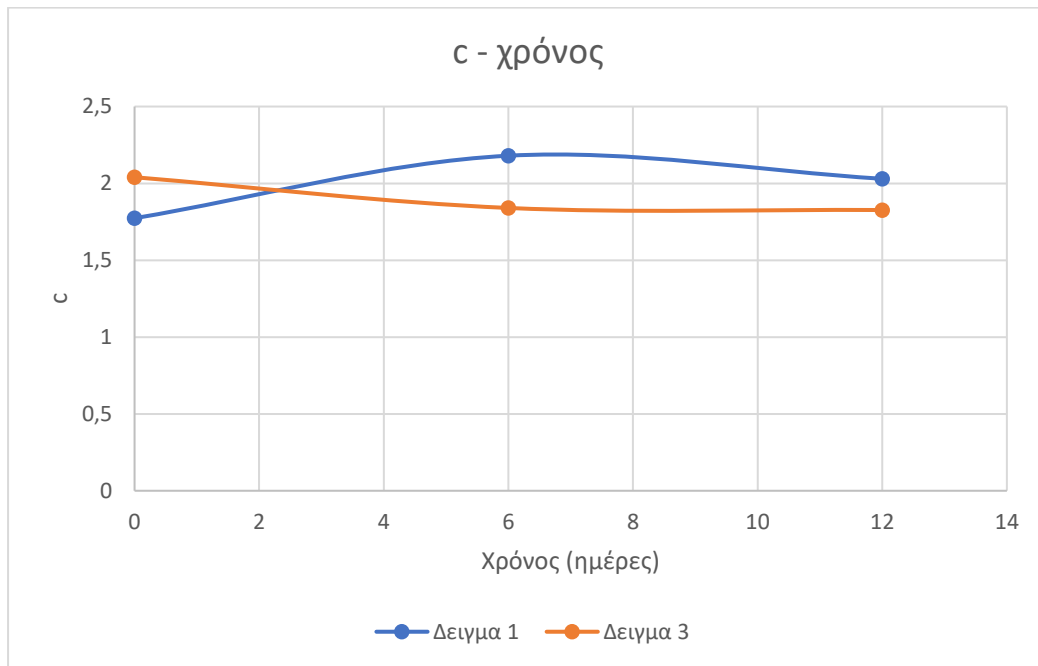
Δείγμα 3 (πορτοκαλί γραμμή) : Δείγμα με χαρουπόμελο

Η παράμετρος b φανερώνει το μπλε – κίτρινο χρώμα. Πιο συγκεκριμένα, αρνητικές τιμές υποδηλώνουν μπλε χρώμα, ενώ θετικές τιμές υποδηλώνουν κίτρινο χρώμα στο δείγμα.

Στην συγκεκριμένη περίπτωση, όλες οι τιμές των δειγμάτων είναι αρνητικές, και άρα υποδηλώνουν μπλε χρώμα. Όμως, το δείγμα 1, με την ζάχαρη, παρουσιάζει χαμηλότερες τιμές, σε σχέση με το δείγμα 3, με το χαρουπόμελο.

Πίνακας 39 : Αποτελέσματα c

	c	
	Δείγμα 1	Δείγμα 3
t = 0	1,773333	2,04
t = 6	2,18	1,84
t = 12	2,03	1,826667



Δείγμα 1 (μπλε γραμμή) : Δείγμα με ζάχαρη

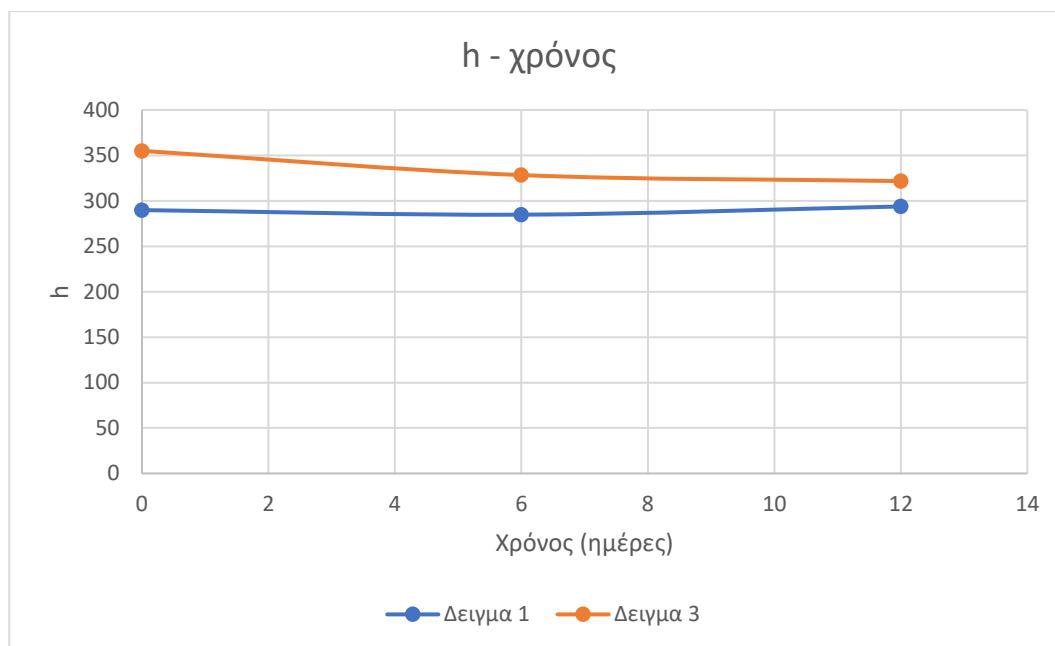
Δείγμα 3 (πορτοκαλί γραμμή) : Δείγμα με χαρουπόμελο

Η παράμετρος  $c$  αντιπροσωπεύει χρωματική καθαρότητα ή κορεσμό του χρώματος. Πιο συγκεκριμένα, υψηλές τιμές δείχνουν πιο έντονα και κορεσμένα χρώματα, ενώ χαμηλές τιμές δείχνουν πιο απαλά και αποχρωματισμένα χρώματα.

Οι τιμές  $c$  των δειγμάτων είναι αρκετά κοντινές μεταξύ τους. Παρόλα αυτά, το δείγμα 1, με την ζάχαρη, στην αρχή της ζύμωσης, την  $t = 0$ , έχει χαμηλότερη τιμή  $c$ , από ότι το δείγμα 3, με το χαρουπόμελο, αλλά στην συνέχεια της ζύμωσης αυτό αντιστρέφεται. Δηλαδή, οι τιμές  $c$  του δείγματος 1 αυξάνονται, ενώ οι τιμές  $c$  του δείγματος 3 μειώνονται.

Πίνακας 40 : Αποτελέσματα  $h$

	$h$	
	Δείγμα 1	Δείγμα 3
$t = 0$	289,8267	355,0367
$t = 6$	284,8	328,3767
$t = 12$	293,8633	321,7833



Δείγμα 1 (μπλε γραμμή) : Δείγμα με ζάχαρη

Δείγμα 3 (πορτοκαλί γραμμή) : Δείγμα με χαρουπόμελο

Η παράμετρος  $h$  ορίζει την χρωματική απόχρωση. Στην συγκεκριμένη περίπτωση, το δείγμα 1, με την ζάχαρη, παρουσιάζει χαμηλότερες τιμές από ότι το δείγμα 3, με το χαρουπόμελο. Και στα δυο δείγματα (δείγμα 1 και 3), οι τιμές  $h$  παραμένουν σχεδόν σταθερές κατά την διάρκεια της ζύμωσης, όπως φαίνεται και στο παραπάνω διάγραμμα.

### 3.5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Μετά την ολοκλήρωση του πειράματος και την εξαγωγή των αποτελεσμάτων, προέκυψαν ορισμένα συμπεράσματα.

Πιο συγκεκριμένα, αποδείχθηκε ότι το σύστημα που παρασκευάστηκε, πρόκειται για μια συμβiotική καλλιέργεια μικροοργανισμών, αφού σε αυτό αναπτύσσονται και πολλαπλασιάζονται τρεις κατηγορίες μικροοργανισμών, βακτήρια του γαλακτικού οξέος, ζυμομύκητες και βακτήρια του οξικού οξέος. Επίσης, το γεγονός ότι οι μικροοργανισμοί επιβιώνουν, αλλά και πολλαπλασιάζονται μέσα στο σύστημα, σημαίνει ότι μεταβολίζουν και μπορούν να αναπτύσσονται, τόσο με την ζάχαρη, που

προστέθηκε στο πρώτο σύστημα (σύστημα 1), όσο και με το χαρουπόμελο, που προστέθηκε στο δεύτερο σύστημα (σύστημα 3).

Όσον αφορά το pH, πράγματι, παρατηρείται η μείωση του κατά την διάρκεια της ζύμωσης. Αυτό σημαίνει ότι το τελικό προϊόν, που παρασκευάστηκε, είναι ένα ζυμώμενο προϊόν με τελική τιμή pH γύρω στο 3, τόσο στο σύστημα 1, με την ζάχαρη, όσο και στο σύστημα 3, με το χαρουπόμελο. Εξάλλου, το γεγονός ότι η τιμή pH μειωνόταν κατά την διάρκεια της ζύμωσης, ήταν ένα σημάδι ότι η ζύμωση εξελισσόταν φυσιολογικά.

Ο έλεγχος της πυκνότητας και στα δυο συστήματα (1 και 3), έδειξε ότι αυτή μειώθηκε σχεδόν με τον ίδιο ρυθμό κατά την διάρκεια της ζύμωσης. Οπότε, δεν παρουσιάστηκαν διαφορές στα δυο συστήματα. Δηλαδή, τα διαφορετικά σάκχαρα στο κάθε σύστημα, ζάχαρη στο σύστημα 1 και χαρουπόμελο στο σύστημα 3, δεν επηρέασε σημαντικά το αποτέλεσμα της πυκνότητας.

Αναφορικά με το original extract και το real extract παρατηρείται ότι οι διαφορές μεταξύ των τιμών είναι πολύ μικρές, σχεδόν αμελητέες. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, αυτό είναι φυσιολογικό και αναμενόμενο, αφού οι δυο παράμετροι μετρούν την ποσότητα των σακχάρων στο κάθε δείγμα. Αυτή η ποσότητα των σακχάρων είναι αυξημένη στο δείγμα 1, με την ζάχαρη, από ότι στο δείγμα 3, με το χαρουπόμελο και αυτό οφείλεται στην ζάχαρη. Και στα δυο συστήματα, προφανώς, η ποσότητα των σακχάρων μειώνεται, αφού οι μικροοργανισμοί τρέφονται και αναπτύσσονται με τα σάκχαρα αυτά κατά την διάρκεια της ζύμωσης.

Σχετικά με τις ολικές πολυφαινόλες, αποδείχθηκε το αναμενόμενο, ότι, δηλαδή, το σύστημα 3, με το χαρουπόμελο έχει τέσσερις φορές μεγαλύτερη ποσότητα πολυφαινολών από ότι το σύστημα 1, με την ζάχαρη. Παρόλο αυτά, και τα δυο συστήματα (1 και 3) δεν παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές κατά την διάρκεια της ζύμωσης. Δηλαδή, με την πάροδο του χρόνου, οι ολικές πολυφαινόλες δεν μεταβάλλονται σημαντικά, αλλά, φαίνονται να παραμένουν σχεδόν σταθερές.

Με την μέτρηση της αλκοόλης και στα δυο συστήματα (1 και 3) παρατηρείται ότι παρόλο που δεν προστέθηκε καθόλου αλκοόλη κατά την παρασκευή των συστημάτων, παράχθηκε αλκοόλη κατά την διάρκεια της ζύμωσης. Στο τέλος της ζύμωσης, διαπιστώνεται ότι το σύστημα 1, με την ζάχαρη έχει μεγαλύτερη ποσότητα αλκοόλης, από ότι το σύστημα 3, με το χαρουπόμελο, αλλά, όχι με σημαντική διαφορά.

Ο έλεγχος του ειδικού βάρους και στα δυο συστήματα (1 και 3), έδειξε ότι αυτό μειώθηκε σχεδόν με τον ίδιο ρυθμό κατά την διάρκεια της ζύμωσης. Αυτό σημαίνει ότι, δεν παρουσιάστηκαν διαφορές στα δυο συστήματα. Δηλαδή, τα διαφορετικά σάκχαρα στο κάθε σύστημα, ζάχαρη στο σύστημα 1 και χαρουπόμελο στο σύστημα 3, δεν επηρέασε σημαντικά το αποτέλεσμα του ειδικού βάρους.

Για την μέτρηση των σακχάρων, μετρήθηκαν τα brix και τα plato και παρατηρήθηκε ότι οι διαφορές μεταξύ των τιμών είναι πολύ μικρές, σχεδόν αμελητέες. Όπως έχει

προαναφερθεί, αυτό είναι φυσιολογικό και αναμενόμενο, αφού και οι δυο παράμετροι μετρούν την ποσότητα των σακχάρων στο κάθε δείγμα. Αυτή η ποσότητα των σακχάρων είναι αυξημένη στο δείγμα 1, με την ζάχαρη, από ότι στο δείγμα 3, με το χαρουπόμελο και αυτό οφείλεται στην ζάχαρη. Και στα δυο συστήματα, προφανώς, η ποσότητα των σακχάρων μειώνεται, αφού οι μικροοργανισμοί τρέφονται, αναπτύσσονται και πολλαπλασιάζονται με τα σάκχαρα αυτά κατά την διάρκεια της ζύμωσης.

Για την μέτρηση του χρώματος, μετρήθηκαν οι εξής παράμετροι, η φωτεινότητα L, η ύπαρξη πράσινου – κόκκινου χρώματος με το a, η ύπαρξη μπλε – κίτρινου χρώματος με το b, η χρωματική καθαρότητα με το c και η χρωματική απόχρωση με το h.



## 4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η συγκεκριμένη πτυχιακή εργασία ασχολήθηκε με την παρασκευή ενός ζυμώμενου προβιοτικού ροφήματος με συμβιοτική καλλιέργεια βακτηρίων και ζυμών με προσθήκη χαρουπόμελου.

Πιο συγκεκριμένα, παρασκευάστηκε kombucha. Πρόκειται για ένα ρόφημα τσαγιού, το οποίο έχει υποστεί ζύμωση. Γενικά, υπάρχουν πάρα πολλές συνταγές για την παρασκευή του συστήματος αυτού. Μπορεί να αλλάξει το scoby και η ποσότητα του, το είδος του τσαγιού, το είδος του σακχάρου και η ποσότητα αυτού. Όλα αυτά επηρεάζουν το σύστημα που παρασκευάζεται, το τελικό προϊόν που παράγεται και φυσικά τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του προϊόντος. Το σύστημα αυτό και τα χαρακτηριστικά, που έδωσε, όπως παρουσιάζεται αναλυτικά παραπάνω, είναι εξαιρετικά ενδιαφέρον.

Τα δυο συστήματα (1 και 3) που μελετήθηκαν, επεξεργάστηκαν και εξετάστηκαν ενδεδειγμένα παρασκευάστηκαν ως εξής. Και τα δυο συστήματα, αποτελούνται από το ίδιο scoby, την ίδια ποσότητα αυτού, τον ίδιο συνδυασμό και ποσότητα τσαγιού, δηλαδή 50 % πράσινο τσάι και 50 % τσάι του βουνού, την ίδια ποσότητα σακχάρου και η μόνη διαφορά τους βρίσκεται στο είδος του σακχάρου. Πιο συγκεκριμένα, στο σύστημα 1 προστέθηκε κυρίως ζάχαρη και μάλιστα 90 % ζάχαρη και 10 % χαρουπόμελο, ενώ στο σύστημα 3, το ακριβώς αντίθετο, δηλαδή, προστέθηκε κυρίως χαρουπόμελο και μάλιστα 90 % χαρουπόμελο και μόλις 10 % ζάχαρη.

Με την διαφορά αυτή, διαπιστώθηκε ότι κάποιες παράμετροι επηρεάζονται αρκετά, όπως για παράδειγμα οι ολικές πολυφαινόλες, ενώ άλλες παράμετροι δεν επηρεάζονται σχεδόν καθόλου, όπως για παράδειγμα οι μικροοργανισμοί, που αναπτύσσονται στα συστήματα. Όλα αυτά έγιναν αντιληπτά, μετά την ολοκλήρωση του πειράματος και την εξαγωγή των αποτελεσμάτων, όπου προέκυψαν και τα βασικά συμπεράσματα.

Πιο συγκεκριμένα, αποδείχθηκε ότι το σύστημα που παρασκευάστηκε, πρόκειται για μια συμβιοτική καλλιέργεια μικροοργανισμών, αφού σε αυτό αναπτύσσονται και πολλαπλασιάζονται τρεις κατηγορίες μικροοργανισμών, βακτήρια του γαλακτικού οξέος, ζυμομύκητες και βακτήρια του οξικού οξέος. Επίσης, το γεγονός ότι οι μικροοργανισμοί επιβιώνουν, αλλά και πολλαπλασιάζονται μέσα στο σύστημα, σημαίνει ότι μεταβολίζουν και μπορούν να αναπτύσσονται, τόσο με την ζάχαρη, που προστέθηκε στο πρώτο σύστημα (σύστημα 1), όσο και με το χαρουπόμελο, που προστέθηκε στο δεύτερο σύστημα (σύστημα 3).

Όσον αφορά το pH, πράγματι, παρατηρείται η μείωση του κατά την διάρκεια της ζύμωσης. Αυτό σημαίνει ότι το τελικό προϊόν, που παρασκευάστηκε, είναι ένα ζυμώμενο προϊόν με τελική τιμή pH γύρω στο 3, τόσο στο σύστημα 1, με την ζάχαρη, όσο και στο σύστημα 3, με το χαρουπόμελο. Εξάλλου, το γεγονός ότι η τιμή pH

μειωνόταν κατά την διάρκεια της ζύμωσης, ήταν ένα σημάδι ότι η ζύμωση εξελισσόταν φυσιολογικά.

Ο έλεγχος της πυκνότητας και στα δυο συστήματα (1 και 3), έδειξε ότι αυτή μειώθηκε σχεδόν με τον ίδιο ρυθμό κατά την διάρκεια της ζύμωσης. Οπότε, δεν παρουσιάστηκαν διαφορές στα δυο συστήματα. Δηλαδή, τα διαφορετικά σάκχαρα στο κάθε σύστημα, ζάχαρη στο σύστημα 1 και χαρουπόμελο στο σύστημα 3, δεν επηρέασε σημαντικά το αποτέλεσμα της πυκνότητας.

Αναφορικά με το original extract και το real extract παρατηρείται ότι οι διαφορές μεταξύ των τιμών είναι πολύ μικρές, σχεδόν αμελητέες. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, αυτό είναι φυσιολογικό και αναμενόμενο, αφού οι δυο παράμετροι μετρούν την ποσότητα των σακχάρων στο κάθε δείγμα. Αυτή η ποσότητα των σακχάρων είναι αυξημένη στο δείγμα 1, με την ζάχαρη, από ότι στο δείγμα 3, με το χαρουπόμελο και αυτό οφείλεται στην ζάχαρη. Και στα δυο συστήματα, προφανώς, η ποσότητα των σακχάρων μειώνεται, αφού οι μικροοργανισμοί τρέφονται και αναπτύσσονται με τα σάκχαρα αυτά κατά την διάρκεια της ζύμωσης.

Σχετικά με τις ολικές πολυφαινόλες, αποδείχθηκε το αναμενόμενο, ότι, δηλαδή, το σύστημα 3, με το χαρουπόμελο έχει τέσσερις φορές μεγαλύτερη ποσότητα πολυφαινολών από ότι το σύστημα 1, με την ζάχαρη. Παρόλο αυτά, και τα δυο συστήματα (1 και 3) δεν παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές κατά την διάρκεια της ζύμωσης. Δηλαδή, με την πάροδο του χρόνου, οι ολικές πολυφαινόλες δεν μεταβάλλονται σημαντικά, αλλά, φαίνονται να παραμένουν σχεδόν σταθερές.

Με την μέτρηση της αλκοόλης και στα δυο συστήματα (1 και 3) παρατηρείται ότι παρόλο που δεν προστέθηκε καθόλου αλκοόλη κατά την παρασκευή των συστημάτων, παράχθηκε αλκοόλη κατά την διάρκεια της ζύμωσης. Στο τέλος της ζύμωσης, διαπιστώνεται ότι το σύστημα 1, με την ζάχαρη έχει μεγαλύτερη ποσότητα αλκοόλης, από ότι το σύστημα 3, με το χαρουπόμελο, αλλά, όχι με σημαντική διαφορά.

Ο έλεγχος του ειδικού βάρους και στα δυο συστήματα (1 και 3), έδειξε ότι αυτό μειώθηκε σχεδόν με τον ίδιο ρυθμό κατά την διάρκεια της ζύμωσης. Αυτό σημαίνει ότι, δεν παρουσιάστηκαν διαφορές στα δυο συστήματα. Δηλαδή, τα διαφορετικά σάκχαρα στο κάθε σύστημα, ζάχαρη στο σύστημα 1 και χαρουπόμελο στο σύστημα 3, δεν επηρέασε σημαντικά το αποτέλεσμα του ειδικού βάρους.

Για την μέτρηση των σακχάρων, μετρήθηκαν τα brix και τα plato και παρατηρήθηκε ότι οι διαφορές μεταξύ των τιμών είναι πολύ μικρές, σχεδόν αμελητέες. Όπως έχει προαναφερθεί, αυτό είναι φυσιολογικό και αναμενόμενο, αφού και οι δυο παράμετροι μετρούν την ποσότητα των σακχάρων στο κάθε δείγμα. Αυτή η ποσότητα των σακχάρων είναι αυξημένη στο δείγμα 1, με την ζάχαρη, από ότι στο δείγμα 3, με το χαρουπόμελο και αυτό οφείλεται στην ζάχαρη. Και στα δυο συστήματα, προφανώς, η ποσότητα των σακχάρων μειώνεται, αφού οι μικροοργανισμοί

τρέφονται, αναπτύσσονται και πολλαπλασιάζονται με τα σάκχαρα αυτά κατά την διάρκεια της ζύμωσης.

Για την μέτρηση του χρώματος, μετρήθηκαν οι εξής παράμετροι, η φωτεινότητα L, η ύπαρξη πράσινου – κόκκινου χρώματος με το a, η ύπαρξη μπλε – κίτρινου χρώματος με το b, η χρωματική καθαρότητα με το c και η χρωματική απόχρωση με το h.

## 5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Aguilar Uscanga, M. G., Délia, M.-L., & Strehaiano, P. (2003). *Brettanomyces bruxellensis*: effect of oxygen on growth and acetic acid production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *61*, 157–162.
- Anal, A. K. (2019). Quality ingredients and safety concerns for traditional fermented foods and beverages from Asia: A review. *Fermentation*, *5*(1), 8.
- Anal, A. K., Perpetuini, G., Petchkongkaew, A., Tan, R., Avallone, S., Tofalo, R., Van Nguyen, H., Chu-Ky, S., Ho, P. H., & Phan, T. T. (2020). Food safety risks in traditional fermented food from South-East Asia. *Food Control*, *109*, 106922.
- Anyogu, A., Olukorede, A., Anumudu, C., Onyeaka, H., Areo, E., Adewale, O., Odimba, J. N., & Nwaiwu, O. (2021). Microorganisms and food safety risks associated with indigenous fermented foods from Africa. *Food Control*, *129*, 108227.
- Azab, A. (2017). Carob (*Ceratonia siliqua*): Health, medicine and chemistry. *Eur Chem Bull*, *6*(10), 456–469.
- Benkerroum, N. (2013). Traditional fermented foods of North African countries: technology and food safety challenges with regard to microbiological risks. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *12*(1), 54–89.
- Castellone, V., Bancalari, E., Rubert, J., Gatti, M., Neviani, E., & Bottari, B. (2021). Eating fermented: Health benefits of lab-fermented foods. In *Foods* (Vol. 10, Issue 11). <https://doi.org/10.3390/foods10112639>
- Chen, C., & Liu, B. Y. (2000). Changes in major components of tea fungus metabolites during prolonged fermentation. *Journal of Applied Microbiology*, *89*(5), 834–839.
- Chu, S.-C., & Chen, C. (2006). Effects of origins and fermentation time on the antioxidant activities of kombucha. *Food Chemistry*, *98*(3), 502–507.
- Crum, H., & LaGory, A. (2016). *The big book of kombucha: brewing, flavoring, and enjoying the health benefits of fermented tea*. Storey Publishing.
- De Filippis, F., Troise, A. D., Vitaglione, P., & Ercolini, D. (2018). Different temperatures select distinctive acetic acid bacteria species and promotes organic acids production during Kombucha tea fermentation. *Food Microbiology*, *73*, 11–16.
- de Oliveira, V. C., de Almeida Costa, N., & do Amaral e Paiva, M. J. (2023). Probiotics. In *Microencapsulation of Probiotics: Challenges and Future Prospects*. [https://doi.org/10.47363/jdsr/2023\(5\)159](https://doi.org/10.47363/jdsr/2023(5)159)
- Dimidi, E., Cox, S. R., Rossi, M., & Whelan, K. (2019). Fermented foods: Definitions and characteristics, impact on the gut microbiota and effects on gastrointestinal

- health and disease. In *Nutrients* (Vol. 11, Issue 8).  
<https://doi.org/10.3390/nu11081806>
- Dufresne, C., & Farnworth, E. (2000). Tea, Kombucha, and health: a review. *Food Research International*, 33(6), 409–421.
- Fidan, H., Petkova, N., Sapundzhieva, T., Baeva, M., Goranova, Z., Slavov, A., & Krastev, L. (2020). CAROB SYRUP AND CAROB FLOUR (*CERATONIA SILIQUA* L.) AS FUNCTIONAL INGREDIENTS IN SPONGE CAKES. *Carpathian Journal of Food Science & Technology*, 12(2).
- Gaggìa, F., Baffoni, L., Galiano, M., Nielsen, D. S., Jakobsen, R. R., Castro-Mejía, J. L., Bosi, S., Truzzi, F., Musumeci, F., & Dinelli, G. (2019). Kombucha beverage from green, black and rooibos teas: A comparative study looking at microbiology, chemistry and antioxidant activity. *Nutrients*. 2019; 11 (1): 1. DOI: <https://doi.org/10.3390/Nu11010001>. PMID: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30577416>.
- Gawai, K. M., & Prajapati, J. B. (2017). Safety aspects of fermented and probiotic foods. *International Journal of Fermented Foods*, 6(1), 45–55.
- Goh, W. N., Rosma, A., Kaur, B., Fazilah, A., Karim, A. A., & Bhat, R. (2012). Fermentation of black tea broth (Kombucha): I. Effects of sucrose concentration and fermentation time on the yield of microbial cellulose. *International Food Research Journal*, 19(1).
- Gomes, R. J., de Fatima Borges, M., de Freitas Rosa, M., Castro-Gómez, R. J. H., & Spinosa, W. A. (2018). Acetic acid bacteria in the food industry: systematics, characteristics and applications. *Food Technology and Biotechnology*, 56(2), 139.
- Greenwalt, C. J., Steinkraus, K. H., & Ledford, R. A. (2000). Kombucha, the fermented tea: microbiology, composition, and claimed health effects. *Journal of Food Protection*, 63(7), 976–981.
- Guo, Q., Chen, P., & Chen, X. (2023). Bioactive peptides derived from fermented foods: Preparation and biological activities. In *Journal of Functional Foods* (Vol. 101). <https://doi.org/10.1016/j.jff.2023.105422>
- Hur, S. J., Lee, S. Y., Kim, Y.-C., Choi, I., & Kim, G.-B. (2014). Effect of fermentation on the antioxidant activity in plant-based foods. *Food Chemistry*, 160, 346–356.
- Jarrell, J., Cal, T., & Bennett, J. W. (2000). The Kombucha consortia of yeasts and bacteria. *Mycologist*, 14(4), 166–170.
- Jayabalan, R., Malbaša, R. V., Lončar, E. S., Vitas, J. S., & Sathishkumar, M. (2014). A review on kombucha tea—microbiology, composition, fermentation, beneficial effects, toxicity, and tea fungus. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13(4), 538–550.

- Kapp, J. M., & Sumner, W. (2019). Kombucha: A systematic review of the empirical evidence of human health benefit. *Annals of Epidemiology*, *30*, 66–70.
- Kim, J., & Adhikari, K. (2020). Current trends in kombucha: Marketing perspectives and the need for improved sensory research. *Beverages*, *6*(1), 15.
- Klotz, C., & Barrangou, R. (2018). Engineering components of the *Lactobacillus* S-layer for biotherapeutic applications. *Frontiers in Microbiology*, *9*, 405326.
- Laureys, D., Britton, S. J., & De Clippeleer, J. (2020). Kombucha tea fermentation: A review. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, *78*(3), 165–174.
- Laureys, D., & De Vuyst, L. (2014). Microbial species diversity, community dynamics, and metabolite kinetics of water kefir fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*, *80*(8), 2564–2572.
- Leeuwendaal, N. K., Stanton, C., O'toole, P. W., & Beresford, T. P. (2022). Fermented Foods, Health and the Gut Microbiome. In *Nutrients* (Vol. 14, Issue 7). <https://doi.org/10.3390/nu14071527>
- Liu, C.-H., Hsu, W.-H., Lee, F.-L., & Liao, C.-C. (1996). The isolation and identification of microbes from a fermented tea beverage, Haipao, and their interactions during Haipao fermentation. *Food Microbiology*, *13*(6), 407–415.
- Lončar, E., Djurić, M., Malbaša, R., Kolarov, L. J., & Klašnja, M. (2006). Influence of working conditions upon kombucha conducted fermentation of black tea. *Food and Bioprocesses Processing*, *84*(3), 186–192.
- Lopez, C. L. F., Beaufort, S., Brandam, C., & Taillandier, P. (2014). Interactions between *Kluyveromyces marxianus* and *Saccharomyces cerevisiae* in tequila must type medium fermentation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *30*, 2223–2229.
- Malbasa, R. V, Loncar, E. S., & Kolarov, L. J. A. (2002). L-lactic, L-ascorbic, total and volatile acids contents in dietetic Kombucha beverage. *Romanian Biotechnological Letters*, *7*, 891–896.
- Malbaša, R. V, Lončar, E. S., Vitas, J. S., & Čanadanović-Brunet, J. M. (2011). Influence of starter cultures on the antioxidant activity of kombucha beverage. *Food Chemistry*, *127*(4), 1727–1731.
- Mamlouk, D., & Gullo, M. (2013). Acetic acid bacteria: physiology and carbon sources oxidation. *Indian Journal of Microbiology*, *53*, 377–384.
- Marsh, A. J., Hill, C., Ross, R. P., & Cotter, P. D. (2014). Fermented beverages with health-promoting potential: Past and future perspectives. *Trends in Food Science & Technology*, *38*(2), 113–124.

- Marsh, A. J., O'Sullivan, O., Hill, C., Ross, R. P., & Cotter, P. D. (2014). Sequence-based analysis of the bacterial and fungal compositions of multiple kombucha (tea fungus) samples. *Food Microbiology*, *38*, 171–178.
- Martínez Leal, J., Valenzuela Suárez, L., Jayabalan, R., Huerta Oros, J., & Escalante-Aburto, A. (2018). A review on health benefits of kombucha nutritional compounds and metabolites. *CyTA-Journal of Food*, *16*(1), 390–399.
- May, A., Narayanan, S., Alcock, J., Varsani, A., Maley, C., & Aktipis, A. (2019). Kombucha: A novel model system for cooperation and conflict in a complex multi-species microbial ecosystem. *PeerJ*, *7*, e7565.
- Merenstein, D., Pot, B., Leyer, G., Ouwehand, A. C., Preidis, G. A., Elkins, C. A., Hill, C., Lewis, Z. T., Shane, A. L., Zmora, N., Petrova, M. I., Collado, M. C., Morelli, L., Montoya, G. A., Szajewska, H., Tancredi, D. J., & Sanders, M. E. (2023). Emerging issues in probiotic safety: 2023 perspectives. In *Gut Microbes* (Vol. 15, Issue 1). <https://doi.org/10.1080/19490976.2023.2185034>
- Nout, M. J. R. (1994). Fermented foods and food safety. *Food Research International*, *27*(3), 291–298.
- Pires, E. J., Teixeira, J. A., Brányik, T., & Vicente, A. A. (2014). Yeast: The soul of beer's aroma—A review of flavour-active esters and higher alcohols produced by the brewing yeast. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *98*, 1937–1949.
- Pyrovolou, K., Tataridis, P., Revelou, P.-K., Strati, I. F., Konteles, S. J., Tarantilis, P. A., Houhoula, D., & Batrinou, A. (2024). Fermentation of a Strong Dark Ale Hybrid Beer Enriched with Carob (*Ceratonia siliqua* L.) Syrup with Enhanced Polyphenol Profile. *Applied Sciences*, *14*(3), 1199.
- Quinto, E. J., Jiménez, P., Caro, I., Tejero, J., Mateo, J., & Girbés, T. (2014). Probiotic lactic acid bacteria: a review. *Food and Nutrition Sciences*, *5*(18), 1765.
- Ramos, C. L., Bressani, A. P. P., Batista, N. N., Martinez, S. J., Dias, D. R., & Schwan, R. F. (2023). Indigenous fermented foods: Nutritional and safety aspects. *Current Opinion in Food Science*, *53*, 101075.
- Reiss, J. (1994a). Einfluß verschiedener Zucker auf den Stoffwechsel des Teepilzes. *Zeitschrift Für Lebensmittel-Untersuchung Und-Forschung*, *198*, 258–261.
- Reiss, J. (1994b). Influence of different sugars on the metabolism of the tea fungus. *Zeitschrift Für Lebensmittel-Untersuchung Und-Forschung*, *198*(3), 258–261.
- Rezac, S., Kok, C. R., Heermann, M., & Hutkins, R. (2018). Fermented foods as a dietary source of live organisms. In *Frontiers in Microbiology* (Vol. 9, Issue AUG). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01785>
- Semjonovs, P., Ruklisha, M., Paegle, L., Saka, M., Treimane, R., Skute, M., Rozenberga, L., Vikele, L., Sabovics, M., & Cleenwerck, I. (2017). Cellulose synthesis by

- Komagataeibacter rhaeticus strain P 1463 isolated from Kombucha. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101, 1003–1012.
- Sengun, I. Y., & Karabiyikli, S. (2011). Importance of acetic acid bacteria in food industry. *Food Control*, 22(5), 647–656.
- Spizzirri, U. G., Caputo, P., Nicoletti, R., Crupi, P., D'Ascenzo, F., Oliverio Rossi, C., Clodoveo, M. L., Aiello, F., & Restuccia, D. (2024). Unripe carob pods: An innovative source of antioxidant molecules for the preparation of high-added value gummies. *British Food Journal*, 126(1), 347–371.
- Staniszewski, A., & Kordowska-Wiater, M. (2021). Probiotic and potentially probiotic yeasts—characteristics and food application. *Foods*, 10(6).  
<https://doi.org/10.3390/foods10061306>
- Stewart, P. S. (1996). Theoretical aspects of antibiotic diffusion into microbial biofilms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 40(11), 2517–2522.
- SungHee Kole, A., Jones, H. D., Christensen, R., & Gladstein, J. (2009). A case of Kombucha tea toxicity. *Journal of Intensive Care Medicine*, 24(3), 205–207.
- Thompson Witrick, K., Duncan, S. E., Hurley, K. E., & O'Keefe, S. F. (2017). Acid and volatiles of commercially-available lambic beers. *Beverages*, 3(4), 51.
- Villarreal-Soto, S. A., Beaufort, S., Bouajila, J., Souchard, J., & Taillandier, P. (2018). Understanding kombucha tea fermentation: a review. *Journal of Food Science*, 83(3), 580–588.
- Vitali, M., Gandía, M., Garcia-Llatas, G., Tamayo-Ramos, J. A., Cilla, A., & Gamero, A. (2023). Exploring the Potential of Rice, Tiger Nut and Carob for the Development of Fermented Beverages in Spain: A Comprehensive Review on the Production Methodologies Worldwide. *Beverages*, 9(2), 47.
- Vitas, J. S., Malbaša, R. V, Grahovac, J. A., & Lončar, E. S. (2013). The antioxidant activity of kombucha fermented milk products with stinging nettle and winter savory. *Chemical Industry and Chemical Engineering Quarterly/CICEQ*, 19(1), 129–139.
- Wang, B., Shao, Y., Chen, T., Chen, W., & Chen, F. (2015). Global insights into acetic acid resistance mechanisms and genetic stability of *Acetobacter pasteurianus* strains by comparative genomics. *Scientific Reports*, 5(1), 18330.
- Watawana, M. I., Jayawardena, N., Gunawardhana, C. B., & Waisundara, V. Y. (2015). Health, wellness, and safety aspects of the consumption of kombucha. *Journal of Chemistry*, 2015(1), 591869.
- Wisselink, H. W., Weusthuis, R. A., Eggink, G., Hugenholtz, J., & Grobben, G. J. (2002). Mannitol production by lactic acid bacteria: a review. *International Dairy Journal*, 12(2–3), 151–161.



