



Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής
Σχολή Επιστημών Τροφίμων
Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων

Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών
ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ, ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΑΣΦΑΛΕΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ
**Μελέτη μικροβιακής ζύμωσης φυτικών προϊόντων με βάση μικροβιακή
κοινότητα αποτελούμενη από ζύμες και βακτήρια**

MSc Thesis
**Study of microbial fermentation of plant based products based on microbial
culture consisting of yeast and bacteria**



ΟΝΟΜΑ ΦΟΙΤΗΤΗ/NAME OF STUDENT

Γούτη Μαρία
Gouti Maria

ΟΝΟΜΑ ΕΙΣΗΓΗΤΗ/NAME OF SUPERVISOR

Ανθμία Μπατρίνου
Anthimia Batrinou

ΑΙΓΑΛΕΩ/AIGALEO 2024

Επιτροπή Αξιολόγησης Μεταπτυχιακής Διπλωματικής Εργασίας

Οι υπογράφοντες δηλώνουμε ότι έχουμε εξετάσει τη μεταπτυχιακή διπλωματική εργασία (master thesis) με τίτλο “Μελέτη μικροβιακής ζύμωσης φυτικών προϊόντων με βάση μικροβιακή κοινότητα αποτελούμενη από ζύμες και βακτήρια” που παρουσιάστηκε από την Γούτη Μαρία, υποψηφίου για τον μεταπτυχιακό τίτλο σπουδών στην ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ, ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΑΣΦΑΛΕΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ και βεβαιώνουμε ότι γίνεται δεκτή.

Ημερομηνία

Ψηφιακή Υπογραφή

Όνομα επιβλέποντος

Βαθμίδα/Ιδιότητα

Ψηφιακή Υπογραφή

Όνομα μέλους επιτροπής

Βαθμίδα/Ιδιότητα

Ψηφιακή Υπογραφή

Όνομα μέλους επιτροπής

Βαθμίδα/Ιδιότητα

Δήλωση περί λογοκλοπής/Copyright

ΔΗΛΩΣΗ ΣΥΓΓΡΑΦΕΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Ο/η κάτωθι υπογεγραμμένος/η Μαρία Γούτη του Ιωάννη, με αριθμό μητρώου 22004

φοιτητής/τρια του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών (Π.Μ.Σ.) «ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ,

ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΑΣΦΑΛΕΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ» του Τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας

Τροφίμων της Σχολής Επιστημών Τροφίμων, του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής, δηλώνω υπεύθυνα ότι:

«Είμαι συγγραφέας αυτής της διπλωματικής εργασίας και ότι κάθε βοήθεια την οποία

είχα για την προετοιμασία της είναι πλήρως αναγνωρισμένη και αναφέρεται στην

εργασία. Επίσης, οι όποιες πηγές από τις οποίες έκανα χρήση δεδομένων, ιδεών ή

λέξεων, είτε ακριβώς είτε παραφρασμένες, αναφέρονται στο σύνολό τους, με πλήρη

αναφορά στους συγγραφείς, τον εκδοτικό οίκο ή το περιοδικό, συμπεριλαμβανομένων

και των πηγών που ενδεχομένως χρησιμοποιήθηκαν από το διαδίκτυο. Επίσης,

βεβαιώνω ότι αυτή η εργασία έχει συγγραφεί από μένα αποκλειστικά και αποτελεί

προϊόν πνευματικής ιδιοκτησίας τόσο δικής μου, όσο και του Ιδρύματος.

Παράβαση της ανωτέρω ακαδημαϊκής μου ευθύνης αποτελεί ουσιώδη λόγο για την

ανάκληση του πτυχίου μου».

Ο/Η Δηλών/ούσα

Μαρία Γούτη



Ευχαριστίες

Θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες στην επιβλέπουσα αξιότιμη καθηγήτρια Ανθιμία Μπατρίνου, για όλη την καθοδήγηση και τις συμβουλές που μου παρείχε κατά την διάρκεια της εκπόνησης της ερευνητικής μου εργασίας.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την υποψήφια διδάκτορα Κατερίνα Πυροβόλου όπου με την πολύτιμη βοήθεια της επιτεύχθηκε επιτυχώς το πειραματικό μέρος της διπλωματικής μου εργασίας. Η έρευνα που διεξήχθη στην παρούσα διπλωματική εργασία αποτελεί μέρος της διδακτορικής της διατριβής με τίτλο «Αξιοποίηση συστατικών χαρουπιού (*Ceratonia siliqua*) μέσω μικροβιακών ζυμώσεων».

Περιεχόμενα

Δήλωση περί λογοκλοπής/Copyright	3
Ευχαριστίες	4
Περίληψη	9
Abstract	10
1. Εισαγωγή	12
2. Kombucha 2.1 Ιστορική αναδρομή	14
2.2 Χαρακτηριστικά της kombucha	15
2.3 SCOBY- Συμβιωτική Καλλιέργεια Βακτηρίων και Ζυμών.....	16
2.3.1 Βακτηριακή κυτταρίνη της kombucha (KOMBUCHA BACTERIAL CELLULOSE, KBC).....	21
2.3.2 Ζύμες (yeasts)	24
2.3.3 Βακτήρια του οξικού οξέος (AAB)	27
2.3.4 Βακτήρια του γαλακτικού οξέος (LAB)	30
2.4 Τρόπος παρασκευής της kombucha	33
2.4.1 Οργανοληπτικά χαρακτηριστικά.....	35
2.4.1.1 Γεύση	35
2.4.1.2 Αρωματικό προφίλ	36
2.4.1.3 Αιθανόλη.....	36
2.4.2 Παραδοσιακά συστατικά της kombucha	37
2.4.2.1 Σακχαρόζη	37
2.4.2.3 Φύλλα τσαγιού	37
2.5 Παραλλαγές ποτών kombucha	37
2.5.1 Εναλλακτικές πηγές σακχάρων για την παρασκευή kombucha	38
2.5.1.2 Μελάσα.....	39
2.5.2 Εναλλακτικές πηγές τσαγιών για την παρασκευή kombucha	39
2.5.2.1 Τσάι rooibos	39
2.5.2.2. Αρωματικά και φαρμακευτικά φυτά της οικογένειας Lamiaceae	40
2.5.2.3 Μέντα.....	40
2.5.3 Kombucha με εκχύλισμα φρούτων και λαχανικών.....	40
2.5.3.1 Εκχύλισμα από φλούδα μπανάνας	41
2.5.3.1 Χυμός σταφύλι	41
2.6 Ζύμωση και παραγωγή μεταβολιτών.....	42
2.6.1 Βιοδραστικά συστατικά της kombucha	44
2.6.1.1 Φαινολικές ενώσεις.....	44

2.6.1.2	Οργανικά οξέα.....	45
2.6.1.3	Βακτηριοσίνες	46
2.6.1.4	Βιταμίνες.....	47
2.6.1.5	Μέταλλα.....	47
2.7	Χαρούπι	48
2.7.1	Χαρουπόμελο	49
2.7.1.1	Τρόπος παρασκευής χαρουπόμελου	49
2.7.2	Χημική Σύσταση χαρουπόμελου	50
2.8	<i>Sideritis scardica</i>	50
2.8.1	Χημική σύσταση του <i>Sideritis scardica</i>	51
2.8.2	Λειτουργικές ιδιότητες του <i>Sideritis scardica</i>	52
3.	ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	53
3.1	Σκοπός	53
3.2	Υλικά και Μέθοδοι	54
3.2.1	Παρασκευή τσαγιών kombucha.....	54
3.2.1.1	Παρασκευή διαλύματος πράσινου τσαγιού-κρυσταλλικής ζάχαρης.....	57
3.2.1.2	Παρασκευή συστημάτων τσαγιού kombucha με χαρουπόμελο, ζάχαρη, sideritis και πράσινο τσάι.....	58
3.2.2	Μικροβιολογική ανάλυση.....	64
3.2.2.1	Προετοιμασία υποστρωμάτων	65
3.2.2.2	Προετοιμασία τρυβλίων για μικροβιολογικό έλεγχο για OMX, LAB, ζύμες, AAB στο αρχικό δείγμα kombucha-scoby Δ1	67
3.2.2.3	Προετοιμασία τρυβλίων δειγμάτων Δ1 (10%CS+50%Sid) ,Δ2 (90%CS+50%Sid) ,Δ3 (50%CS+10%Sid), Δ4 (50%CS+90%Sid) για τους μικροβιολογικούς ελέγχους AAB, LAB, OMX, ζύμες.....	71
3.2.3	Χημικές αναλύσεις	74
3.2.3.1	Διαύγαση δειγμάτων	74
3.2.3.2	Προσδιορισμός του ολικού φαινολικού περιεχομένου με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu	78
3.2.3.3	pH	81
3.2.3.4	Μέτρηση Αλκοόλης	82
3.2.3.5	Μέτρηση χρώματος	83
3.2.3.6	Μέτρηση ολικών στερεών	84
4.	Αποτελέσματα-Συζήτηση	86
4.1	Χημικές Αναλύσεις	86

4.1.1 Προσδιορισμός ολικού φαινολικού περιεχομένου (Total Phenolic Content, TPC) - Μέθοδος Folin-Ciocalteu.....	86
4.1.2 pH	89
4.1.3 Αλκοόλη	91
4.1.4 Ολικά στερεά (Plato)/Σάκχαρα (oBrix)	93
4.1.5 Χρώμα	95
4.1.6 Ειδικό βάρος/πυκνότητα	98
4.2 Μικροβιολογικές αναλύσεις.....	100
5. Συμπεράσματα.....	104
Βιβλιογραφία.....	108

Κατάλογος Πινάκων

Πίνακας 2.1: Εναλλακτικά συστατικά υποστρωμάτων για παρασκευή kombucha	38
Πίνακας 3.1: Εξοπλισμός για την παρασκευή τσαγιών kombucha στο εργαστήριο	56
Πίνακας 3.2: Ποσότητες συστατικών για την παρασκευή 4 συστημάτων kombucha με χαρουπόμελο και τσάι sideritis.....	58
Πίνακας 3.3: Ονομασία δειγμάτων CS: χαρουπόμελο, Sid: τσάι sideritis	59
Πίνακας 3.4: Ποσότητες χαρουπέμελου που ζυγίστηκαν για την παρασκευή των 4 τεσσάρων συστημάτων kombucha	61
Πίνακας 3.5: Ποσότητες ζάχαρης που ζυγίστηκαν για την παρασκευή των 4 τεσσάρων συστημάτων kombucha	62
Πίνακας 3.6: Ονομασίες διπλών συστημάτων kombucha	63
Πίνακας 3.7: Υλικά και εξοπλισμός των μικροβιολογικών αναλύσεων.....	64
Πίνακας 3.8: Υποστρώματα και μικροοργανισμοί που αναπτύσσονται σε αυτά	65
Πίνακας 3.9: Χρόνος και θερμοκρασία επώασης των μικροοργανισμών (ζύμες, AAB, LAB, OMX).....	70
Πίνακας 3.10: Αραιώσεις δειγμάτων για τις μικροβιολογικές αναλύσεις.....	72
Πίνακας 3.11: Χρόνος και θερμοκρασία επώασης των μικροοργανισμών (ζύμες, AAB, LAB, OMX)....	73
Πίνακας 3.12: Υλικά και εξοπλισμός που χρησιμοποιήθηκαν για την διαύγαση των δειγμάτων	74
Πίνακας 3.13: Δείγματα προς διαύγαση.....	75
Πίνακας 3.14: Υλικά και εξοπλισμός που χρησιμοποιήθηκαν για την μέθοδο Folin-Ciocalteu	78
Πίνακας 4.1: Αριθμητικά δεδομένα από την μέτρηση απορρόφησης με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu. CS: carob syrup, Sid: τσάι sideritis	86
Πίνακας 4.2 CS: carob syrup, Sid: τσάι sideritis.....	89
Πίνακας 4.3: Πειραματικά δεδομένα μετρήσεων αιθανόλης CS: carob syrup, Sid: τσάι sideritis.....	91
Πίνακας 4.4: Πειραματικά δεδομένα αναλύσεων Plato CS: carob syrup, Sid: τσάι sideritis.....	93
Πίνακας 4.5: Πειραματικά δεδομένα αναλύσεων Brix CS: carob syrup, Sid: τσάι sideritis	93
Πίνακας 4.6: Πειραματικά δεδομένα μεταβολής χρώματος CS: carob syrup, Sid: τσάι sideritis	96
Πίνακας 4.7: Τιμές πυκνότητας (g/cm^3) των δειγμάτων για την ημέρα 0, ημέρα 6, ημέρα 12 CS: carob syrup, Sid: τσάι sideritis	98
Πίνακας 4.8: Τιμές ειδικού βάρους (g/cm^3) των δειγμάτων για την ημέρα 0, ημέρα 6, ημέρα 12 CS: carob syrup, Sid: τσάι sideritis.....	98
Πίνακας 4.9: Πειραματικά δεδομένα LogCFU/ml των δειγμάτων για ζύμες, AAB, LAB CS: carob syrup, Sid: τσάι sideritis.....	100

Περίληψη

Η kombucha είναι ένα παραδοσιακό ρόφημα τσαγιού που έχει υποστεί ζύμωση, γνωστό για τη μοναδική του γεύση και τα πιθανά οφέλη για την υγεία. Παράγεται χρησιμοποιώντας μια συμβιωτική καλλιέργεια βακτηρίων και ζυμών (SCOBY), η οποία μετατρέπει το ζαχαρούχο τσάι σε ένα ελαφρώς ανθρακούχο, ξινό ρόφημα. Η διαδικασία ζύμωσης περιλαμβάνει ζυμομύκητες που μετατρέπουν τα σάκχαρα σε αιθανόλη, η οποία στη συνέχεια οξειδώνεται σε οξικό οξύ από βακτήρια οξικού οξέος (AAB). Τα τελευταία χρόνια η κατανάλωση της kombucha έχει αυξηθεί και χρησιμοποιούνται διάφορες παραλλαγές υποστρωμάτων που ενισχύουν τη γεύση και τα θρεπτικά συστατικά του ροφήματος. Αυτή η μελέτη διερευνά τη ζύμωση της kombucha με ποικίλες αναλογίες χαρουπόμελου και τσαγιού sideritis, με στόχο την χημική ανάλυση των μεταβολιτών που προκύπτουν και τη παρακολούθηση του πληθυσμού των ζυμομυκήτων, των AAB και των βακτηρίων γαλακτικού οξέος (LAB). Το χαρουπόμελο, που προέρχεται από τους λοβούς του δέντρου *Ceratonia siliqua*, είναι πλούσιο σε φυσικά σάκχαρα και μέταλλα και χρησιμοποιείται παραδοσιακά ως γλυκαντικό στη μεσογειακή κουζίνα. Το *Sideritis scardica*, κοινώς γνωστό ως ελληνικό τσάι του βουνού, είναι ένα βότανο γνωστό για την υψηλή του περιεκτικότητα σε βιοδραστικές ενώσεις, συμπεριλαμβανομένων των φαινολικών και флаβονοειδών, που έχουν αντιοξειδωτικές ιδιότητες. Ο πειραματικός σχεδιασμός περιελάμβανε τέσσερα συστήματα kombucha με διαφορετικές συγκεντρώσεις χαρουπόμελου και τσαγιού sideritis. Πραγματοποιήθηκαν μικροβιολογικές αναλύσεις με καλλιέργεια για την παρακολούθηση των πληθυσμών ζυμομυκήτων, AAB και LAB και χημικές αναλύσεις για το μεταβολικό προφίλ των συγκεντρώσεων των φαινολικών ενώσεων, αιθανόλης και άλλων μεταβολιτών. Η μελέτη κατέληξε στο συμπέρασμα ότι τόσο το χαρουπόμελο όσο και το τσάι sideritis είναι αποτελεσματικά υποστρώματα για τη ζύμωση της kombucha, επηρεάζοντας σημαντικά τη μικροβιακή δυναμική και την παραγωγή μεταβολιτών. Κάθε σύστημα ζύμωσης παρουσίαζε μοναδικά χαρακτηριστικά όσον αφορά το pH, τη συγκέντρωση αιθανόλης, τη συνολική περιεκτικότητα σε φαινολικά και τα επίπεδα σακχάρων. Αυτά τα ευρήματα καταδεικνύουν τη δυνατότητα χρήσης τοπικών ελληνικών συστατικών για την παραγωγή καινοτόμων ροφημάτων kombucha με διακριτές λειτουργικές ιδιότητες.

Λέξεις κλειδιά: kombucha, συμβιωτική καλλιέργεια βακτηρίων και ζυμών (SCOBY), βακτηριακή κυτταρίνη, ζύμωση, ζύμες, βακτήρια οξικού οξέος (AAB), βακτήρια γαλακτικού οξέος (LAB), τσάι sideritis, χαρουπόμελο, μεταβολίτες

Abstract

Kombucha is a traditional fermented tea beverage known for its unique taste and potential health benefits. It is produced using a symbiotic culture of bacteria and yeast (SCOBY), which turns sugary tea into a slightly carbonated, sour drink. The fermentation process involves yeasts converting sugars into ethanol, which is then oxidized to acetic acid by acetic acid bacteria (AAB). In recent years the consumption of kombucha has increased as different variations of substrates are used to enhance the flavor and nutrients of the drink. This study investigates the fermentation of kombucha with varying proportions of carob syrup and sideritis tea, aiming to chemically analyze the resulting metabolites and monitor the population of yeasts, AAB and lactic acid bacteria (LAB). Carob syrup, which comes from the pods of the *Ceratonia siliqua* tree, is rich in natural sugars and minerals and is traditionally used as a sweetener in Mediterranean cuisine. *Sideritis scardica*, commonly known as Greek mountain tea, is an herb known for its high content of bioactive compounds, including phenolics and flavonoids, which have antioxidant properties. The experimental design included four kombucha systems with different concentrations of carob syrup and sideritis tea. Microbiological assays were performed by culture to monitor yeast, AAB and LAB populations and chemical assays to metabolic profile the concentrations of phenolic compounds, ethanol and other metabolites. The study concluded that both carob syrup and sideritis tea are effective substrates for kombucha fermentation, significantly influencing microbial dynamics and metabolite production. Each fermentation system exhibited unique characteristics in terms of pH, ethanol concentration, total phenolic content and sugar levels. These findings demonstrate the potential of using local Greek ingredients to produce innovative kombucha beverages with distinct functional properties.

Key words: kombucha, symbiotic culture of bacteria and yeasts (SCOBY), bacteria cellulose, fermentation, yeasts, acetic acid bacteria (AAB), lactic acid bacteria (LAB), sideritis tea, carob syrup, metabolites

1. Εισαγωγή

Τα τελευταία χρόνια, υπάρχει ένα αυξανόμενο ενδιαφέρον για την αξιοποίηση μικροβιακών κοινοτήτων για τη ζύμωση διαφόρων φυτικών προϊόντων. Μεταξύ αυτών των μικροβιακών κοινοτήτων, μια από τις πιο ενδιαφέρουσες είναι η συμβιωτική καλλιέργεια βακτηρίων και ζυμομυκήτων (SCOBY Symbiotic Culture of Bacteria and Yeast) που χρησιμοποιείται για την παραγωγή kombucha. Η kombucha, είναι ένα παραδοσιακό ρόφημα που έχει υποστεί ζύμωση, έχει κερδίσει την προσοχή όχι μόνο για τη μοναδική γεύση και τα πιθανά οφέλη για την υγεία, αλλά και για την ευελιξία της στη χρήση διαφορετικών φυτικών υποστρωμάτων για ζύμωση. Στις μέρες μας, οι καταναλωτές της kombucha αυξάνονται παγκοσμίως (Kim & Adhikari, 2020). Η διαδικασία ζύμωσης της kombucha περιλαμβάνει τη συνεργική δράση ζυμών και βακτηρίων, με αποτέλεσμα τη μετατροπή των σακχάρων και άλλων θρεπτικών συστατικών που υπάρχουν στο υπόστρωμα σε μια ποικιλία μεταβολικών προϊόντων. Η kombucha που παρασκευάζεται από μαύρο και πράσινο τσάι έχει μελετηθεί ευρέως, αν και δεν έχουν πραγματοποιηθεί έως τώρα σε βάθος μικροβιολογικές μελέτες τόσο σε βακτήρια όσο και σε ζυμομύκητες με συνδυασμό τεχνικών, όπως καλλιέργεια και μοριακές τεχνικές (Marsh et al., 2014). Τα μεταβολικά προϊόντα που παράγονται μέσω της ζύμωσης kombucha, συμπεριλαμβανομένων των οργανικών οξέων, βιταμινών, ενζύμων και φαινολικών ενώσεων, συμβάλλουν στο χαρακτηριστικό γευστικό προφίλ της και στις πιθανές ιδιότητες που προάγει στην υγεία των καταναλωτών. Η αναζήτηση μιας ζύμωσης χρησιμοποιώντας γηγενή συστατικά πλούσια σε θρεπτικές ενώσεις έχουν οδηγήσει στη χρήση εναλλακτικών υποστρωμάτων, που περιέχουν περισσότερες βιοδραστικές ουσίες και παράγουν διαφορετικά προφίλ οργανοληπτικών συστατικών (Ayed και Hamdi 2015). Στην παρούσα μελέτη, ενσωματώνεται το ελληνικό χαρουπόμελο ως κύρια πηγή σακχάρων και το τσάι *Sideritis scardica* ως πηγή φυτοχημικών. Η χρήση αυτών των τοπικών ελληνικών συστατικών υπογραμμίζει τη δυνατότητα αξιοποίησης των εγχώριων πόρων για καινοτόμες διαδικασίες ζύμωσης. Το ελληνικό χαρουπόμελο, που προέρχεται από τους λοβούς του δέντρου *Ceratonia siliqua*, προσφέρει μοναδικό γευστικό προφίλ και θρεπτική σύνθεση, πλούσια σε σάκχαρα που ευνοούν τη μικροβιακή ζύμωση. Ομοίως, το τσάι *Sideritis scardica*, διαθέτει μια πληθώρα βιοδραστικών ενώσεων, συμπεριλαμβανομένων πολυφαινολών και флаβονοειδών, που μπορεί να προσδώσουν διακριτικά χαρακτηριστικά στο ρόφημα που έχει υποστεί ζύμωση και να προσφέρουν πιθανά οφέλη για την υγεία. Με την ενσωμάτωση αυτών των ξεχωριστών συστατικών, εκτός από την εστίαση σε ένα νέο υπόστρωμα, μέσω

αυτής της μελέτης εξετάζεται η επίδραση των διαφορετικών υποστρωμάτων τσαγιού στη μικροβιακή σύνθεση, στην εξέλιξη της ζύμωσης και των μεταβολικών προϊόντων.

2. Kombucha

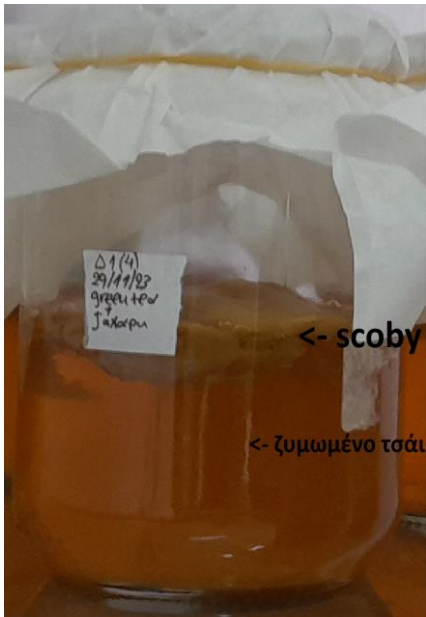
2.1 Ιστορική αναδρομή

Οι πρώτες τεκμηριωμένες αναφορές σε ρόφημα kombucha χρονολογούνται στην αρχαία Κίνα. Τα χαρακτηριστικά του «Θεϊκού Τσε» εκτιμήθηκαν από τη Δυναστεία των Τσιν ήδη από το 220 π.Χ.. Το ρόφημα είχε εξαπλωθεί σε άλλες χώρες της Άπω Ανατολής και το 414 μ.Χ. ο γιατρός Κομπού έφερε τον μύκητα του τσαγιού από την Κορέα στην Ιαπωνία κατόπιν εντολής του αυτοκράτορα Inkyo για να θεραπεύσει τα πεπτικά του προβλήματα. Στους επόμενους αιώνες, οι έμποροι διέδωσαν την Kombucha «Tea Kvass» στη Ρωσία, από όπου στις αρχές του 19ου και 20ου αιώνα, το ρόφημα διαδόθηκε στην Ευρώπη (Dufresne & Farnworth, 2000). Η κατανάλωση του τσαγιού μειώθηκε σημαντικά κατά τη διάρκεια του Β' Παγκοσμίου Πολέμου λόγω της περιορισμένης πρόσβασης στο τσάι και τη ζάχαρη. Μετά τον πόλεμο, ξεκινώντας από τη Γερμανία, τη Γαλλία και την Ιταλία, η δημοτικότητα του ποτού αυξήθηκε ξανά. Ανάλογα με την περιοχή του κόσμου στην οποία μεταφέρθηκε αυτό το ποτό, το ποτό απέκτησε νέα ονόματα: «Manchurian Mushroom Tea», «Tea Fungus», «Kargasok Tea», «Grib tea kvass», «Indian Tea Fungus», «Manchu Fungus», «Teakwass», «Tea Beer» και πολλά άλλα (Karr & Sumner, 2019). Στις μέρες μας υπάρχει μεγάλος αριθμός εταιρειών που παράγουν kombucha. Αυτά τα προϊόντα διανέμονται στα καταστήματα λιανικής πώλησης και στα εστιατόρια. Η φρέσκια kombucha από τα taprooms γίνεται δημοφιλής παγκοσμίως, όπου οι καταναλωτές μπορούν να απολαύσουν φρέσκια kombucha. Παρόλα αυτά οι άνθρωποι εξακολουθούν να παρασκευάζουν παραδοσιακά σπιτική kombucha σε οικιακό επίπεδο σε μικρή κλίμακα. Η εκβιομηχάνιση της kombucha στις ΗΠΑ ξεκίνησε για πρώτη φορά στην περιοχή της Καλιφόρνια γύρω στη δεκαετία του 1990. Αφού η κομπούχα κέρδισε τη δημοτικότητά της μεταξύ των καταναλωτών, ένας μεγάλος αριθμός εταιρειών kombucha ιδρύθηκαν σε όλες τις ΗΠΑ για μερικές δεκαετίες, κάνοντας εύκολη την εύρεση εμπορικών προϊόντων kombucha ακόμα και στα τοπικά καταστήματα λιανικής πώλησης. Καθώς η βιομηχανία kombucha αναπτύσσεται, το 2014 ιδρύθηκε ένας μη κερδοσκοπικός οργανισμός με την ονομασία Kombucha Brewers International (KBI) για να βοηθήσει με κανονισμούς και νομοθεσίες που σχετίζονται με το προϊόν. Επί του παρόντος, από τον Νοέμβριο του 2019, υπάρχουν 235 εταιρείες παγκοσμίως που είναι εγγεγραμμένες ως μέλη αυτού του οργανισμού. Τα μέλη του KBI

μοιράζονται πληροφορίες, όπως η βέλτιστη πρακτική για τους κατασκευαστές kombucha, ο τρόπος μέτρησης του αλκοόλ, η ανάλυση κινδύνου και οι προληπτικοί έλεγχοι βάσει κινδύνου (HARPC) (Kim & Adhikari, 2020).

2.2 Χαρακτηριστικά της kombucha

Η kombucha είναι ένα ρόφημα, αποτέλεσμα ζύμωσης ζαχαρούχου τσαγιού (*Camellia sinensis*) από μια συμβιωτική αποικία βακτηρίων και ζυμομυκήτων (SCOBY), εγκατεστημένων σε ένα φιλμ κυτταρίνης. Ωστόσο, και άλλα είδη τσαγιών μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την προετοιμασία της kombucha. Αυτό το φιλμ κυτταρίνης ονομάζεται SCOBY (Συμβιωτική αποικία βακτηρίων και ζυμών). Ένα πλωτό κυτταρινικό στρώμα και ο ξινός υγρός ζωμός είναι οι δύο φάσεις στο τσάι kombucha. Ενώ οι οσμώφιλες ζύμες ζυμώνουν τη ζάχαρη στο τσάι και παράγουν αιθανόλη, τα βακτήρια οξειδώνουν την αιθανόλη και παράγουν οξικό οξύ. Εκτός από το οξικό οξύ σχηματίζονται και άλλα οργανικά οξέα, όπως π.χ γλυκονικό, γαλακτικό, μηλικό, κιτρικό και τρυγικό, τα οποία έχουν αντιβακτηριδιακή δράση και αποτρέπουν την επιμόλυνση της kombucha από παθογόνα βακτήρια. Όσον αφορά τη γεύση, η kombucha είναι ένα ελαφρώς όξινο και ελαφρώς ανθρακούχο ρόφημα. Μπορεί να γίνει υποκατάστατο με χαμηλή περιεκτικότητα σε αλκοόλ των αφρωδών κρασιών ή αναψυκτικών λόγω του υψηλού βαθμού ενανθράκωσης και αποτελεί μια πιο υγιεινή εναλλακτική λύση. Στην αγορά μπορεί να βρεθούν εκδοχές kombucha μη αλκοολούχων και χαμηλής περιεκτικότητας σε αλκοόλ (λιγότερο από 0,5% (v/v)) ή ακόμα και αλκοολούχα ροφήματα. Καθώς η ζύμωση προχωρά, η γεύση του τσαγιού Kombucha αλλάζει από μια ευχάριστα φρουτώδη, ξινή, ελαφριά και αφρώδη γεύση σε μια ήπια ξινή γεύση που θυμίζει ξίδι (Coelho et al., 2020).



Εικόνα 2.1: Φωτογραφία ζυμωμένου τσαγιού kombucha από το εργαστηριακό πείραμα

2.3 SCOBY- Συμβιωτική Καλλιέργεια Βακτηρίων και Ζυμών

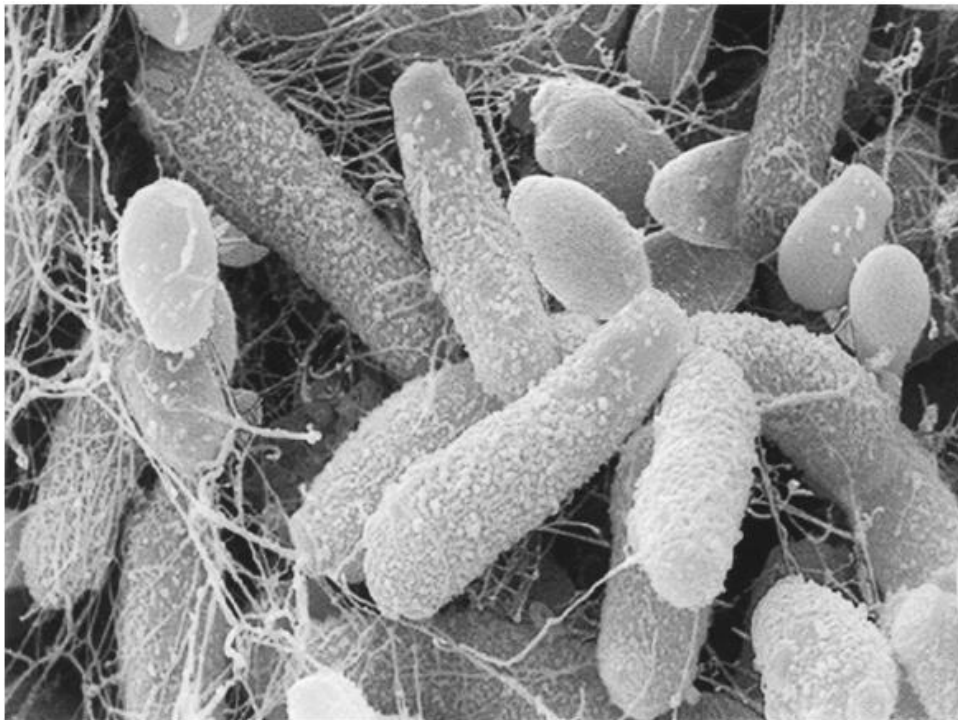


Εικόνα 2.2: Κυτταρινικό βιοφίλμ (https://en.wikipedia.org/wiki/SCOBY#/media/File:SCOBY_mushroom.jpg)

SCOBY είναι η κοινή ονομασία που δίνεται στο κυτταρινικό ζελατινώδες φιλμ που σχηματίζεται στην επιφάνεια του τσαγιού. Οι μεμβράνες κυτταρίνης σχηματίζονται σε στρώσεις, με την πιο κοντά στην επιφάνεια να είναι πάντα η πιο πρόσφατη.

Μικροοργανισμοί (βακτήρια και ζυμομύκητες) φιλοξενούνται σε αυτή τη μήτρα κυτταρίνης και είναι υπεύθυνοι για τη ζύμωση της kombucha. Παραδοσιακά, το SCOBY παίρνει τη

μορφή ενός κυτταρινικού στρώματος στερεάς φάσης, που μεταφέρεται σειριακά από μια τελική παρτίδα kombucha σε μια νέα παρτίδα τσαγιού. Το αρχικό εμβόλιο και το ίδιο το τσάι περιέχουν βακτήρια οξικού οξέος (Acetic Acid Bacteria, AAB), ζύμες και μερικές φορές βακτήρια γαλακτικού οξέος (Lactic Acid Bacteria, LAB). Αυτό το κυτταρινικό βιοφίλμ συχνά περιλαμβάνεται ως μέρος του εκκινήτη και μεταφέρεται μαζί με λίγο υγρό για τον εμβολιασμό φρέσκων παρτίδων τσαγιού. Η κυτταρίνη που παράγεται από τα AAB στην kombucha παρουσιάζει επίσης ενδιαφέρον ως υλικό για διάφορες εφαρμογές, συμπεριλαμβανομένων τεχνητών κερατοειδών, επιδέσμων τραυμάτων και βιοδιασπώμενων συσκευασιών. Ο σχηματισμός αυτής της στερεάς φάσης εξαρτάται από την παρουσία τουλάχιστον ενός στελέχους βακτηρίου οξικού οξέος του γένους *Komagataeibacter* (πρώην *Gluconacetobacter*), που παράγει κυτταρίνη (Harrison & Curtin, 2021).



Εικόνα 2.3: Μικρογραφία ηλεκτρονικής σάρωσης μιας αποικίας kombucha (Greenwalt et al., 2000)

Η «συμβιωτική» φύση αυτής της σχέσης (SCOBY) συχνά υποτίθεται ότι είναι μια αμοιβαία σχέση, τουλάχιστον εν μέρει λόγω του συμπληρωματικού μεταβολισμού των σακχάρων. Τα AAB δεν πιστεύεται ότι χρησιμοποιούν αποτελεσματικά τη σακχαρόζη που παρέχεται κατά την έναρξη της ζύμωσης. Αντίθετα, μεταβολίζουν προϊόντα διάσπασης από τις ιμβερτάσες ζυμών, συμπεριλαμβανομένης της γλυκόζης, της φρουκτόζης και της αιθανόλης. Λόγω αυτών των υποτιθέμενων αλληλεπιδράσεων μεταξύ βακτηρίων και ζυμομυκήτων, η

kombucha έχει προταθεί ως πρότυπο σύστημα για τη μελέτη της μικροβιακής συνεργασίας. Ωστόσο, λίγες μελέτες έχουν εξετάσει άμεσα τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ ζυμών και βακτηρίων στην kombucha. Προηγούμενες μελέτες που προσπάθησαν να ζευγαρώσουν κοινές ζύμες και απομονωμένα βακτηριακά στελέχη από την kombucha απέτυχαν να παράγουν βιομεμβράνες που αποτελούν χαρακτηριστικό γνώρισμα της ζύμωσης kombucha. Αυτό υποδηλώνει είτε ότι οι ζευγαρωμένοι εμβολιασμοί δεν είναι ικανοί να παράγουν ζυμώσεις που μοιάζουν με kombucha είτε ότι μόνο ορισμένα ζεύγη βακτηρίων και ζυμομυκήτων παράγουν βιοφίλμ. Η μικροβιακή σύνθεση της καλλιέργειας του τσαγιού kombucha είναι γνωστό ότι ποικίλλει από τη μια καλλιέργεια στην άλλη ανάλογα με παράγοντες όπως η γεωγραφική θέση, το κλίμα, τα τοπικά είδη βακτηρίων και ζυμομυκήτων και η πηγή του εμβολίου. Σε ορισμένες μελέτες έχει αποδειχθεί ότι η χρήση διαφορετικών καλλιιεργειών εκκίνησης kombucha μπορεί να προκαλέσει ανάπτυξη διαφορετικών μονοπατιών αντιοξειδωτικής δράσης ακόμη αν και έχει χρησιμοποιηθεί το ίδιο υπόστρωμα (Watawana et al., 2015). Το *Komagataeibacter* αναφέρεται σταθερά ως το πιο διαδεδομένο βακτηριακό γένος που σχετίζεται με την παραγωγή kombucha και έχει αναφερθεί στην υγρή και στην στερεά φάση. Τα είδη *Komagataeibacter* που παρατηρήθηκαν περιλαμβάνουν το *K. xylinus*, *K. rhaeticus*, *K. saccharivorans*, *K. intermedius* και *K. kombuchae* (επίσης γνωστά ως *K. hansenii*). Εκτός από τη δημιουργία του πολλού στερεάς φάσης, το *Komagataeibacter* είναι υπεύθυνο για την παραγωγή οργανικών οξέων, που συμβάλουν στο χαρακτηριστικό της γλυκιάς γεύσης της kombucha και του προφίλ της ξινής γεύσης. Αυτή η λειτουργία πιθανώς εκτελείται και από άλλα γένη AAB που περιγράφονται στο SCOBY, όπως το *Acetobacter*, το *Tanticharoenia* και το *Gluconobacter*, αν και η σχετική σημασία αυτών δεν έχει διευκρινιστεί. Ο ρόλος των βακτηρίων γαλακτικού οξέος (LAB) στη ζύμωση kombucha είναι λιγότερο σαφής, αλλά διάφορες μελέτες έχουν αναφέρει γένη όπως το *Lactobacillus*, τον λακτόκοκκο και τον οινόκοκκο μεταξύ των μικροβίων SCOBY.

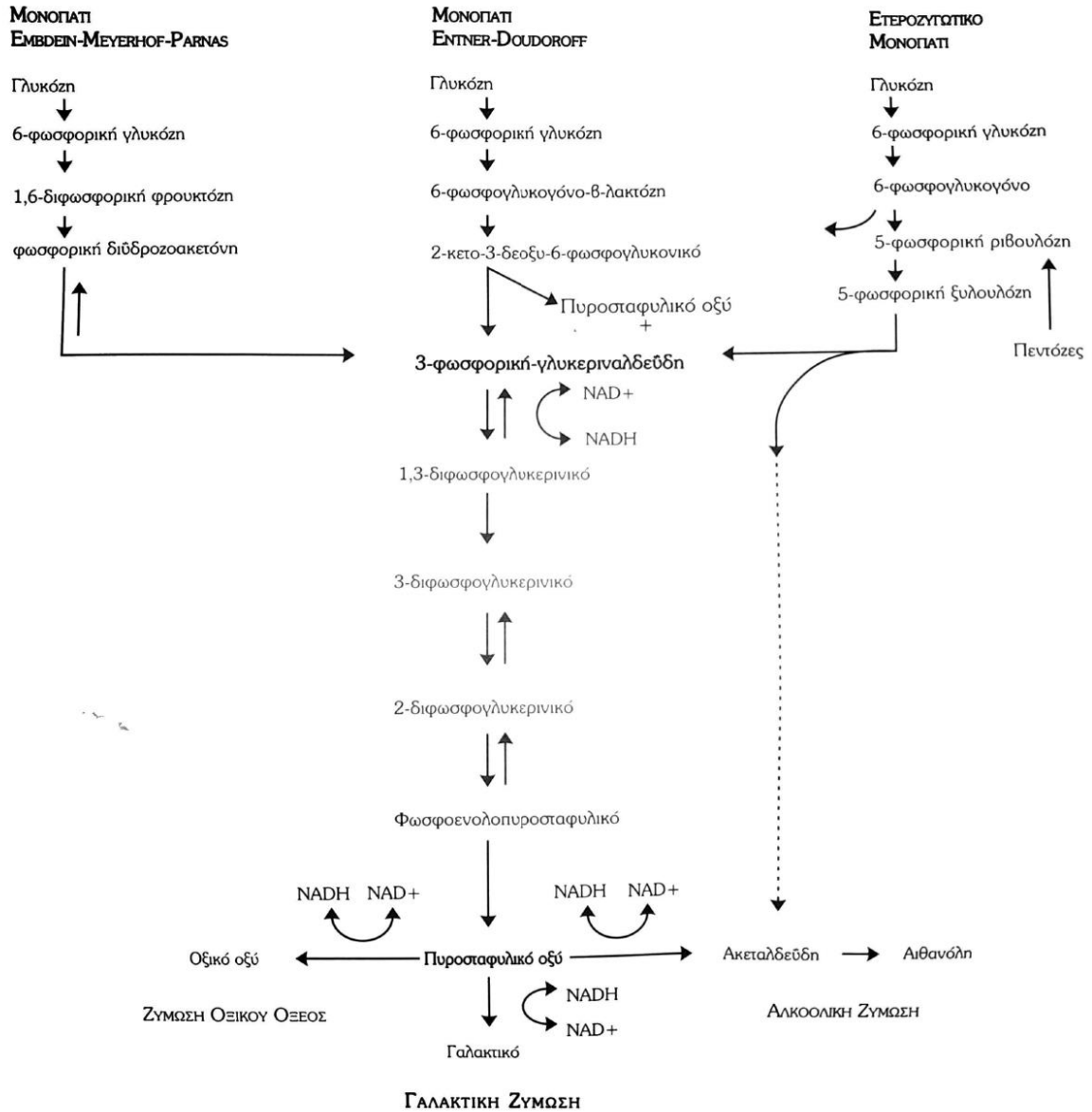
Η ζύμωση, που τυπικά κυριαρχείται από τα ίδια γένη, έχει μία ποικίλη βακτηριδιακή κοινότητα. Αντίθετα, τα κυρίαρχα γένη ζυμομυκήτων φαίνεται να είναι σημαντικά πιο μεταβλητά από μελέτη σε μελέτη. Γένη ζυμών όπως τα *Zygosaccharomyces*, *Candida Torulaspora*, *Pichia*, *Brettanomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Hanseniaspora* και *Saccharomyces* είναι μερικά από τα γένη που περιγράφονται ως σημαντικά για την παραγωγή kombucha. Ποικιλία ζυμών σε υγρή και σε στερεή φάση έχει παρατηρηθεί από

την ίδια ταξινομική βαθμίδα και στα δύο, αλλά διαφορετικά μοτίβα διαδοχής κατά τη διάρκεια της πορείας της ζύμωσης. Ο ρόλος των ζυμών στις ζυμώσεις kombucha είναι να μετατρέπουν σάκχαρα σε αιθανόλη η οποία στη συνέχεια χρησιμοποιείται από τα AAB. Πράγματι, κατά τη διάρκεια in vitro πειραμάτων με δύο γνωστούς οργανισμούς στην kombucha, *Starmarella bacillaris* και *Acetobacter syzgjii*, το οξικό οξύ ανιχνεύθηκε μόνο στη συγκαλλιέργεια, ενώ το γλυκονικό οξύ ανιχνεύθηκε σε μονοκαλλιέργεια *A. syzgjii*. Η μεταβλητότητα σε κυρίαρχους ζυμομύκητες περιγράφεται από διάφορες μελέτες και μπορεί να αντικατοπτρίζει τη λειτουργική ισοδυναμία αυτών των γενών (Harrison & Curtin, 2021).

Μερικοί συγγραφείς αναφέρουν ένα προβιοτικό δυναμικό για την kombucha, λόγω των υψηλών επιπέδων βακτηρίων του γαλακτικού οξέος (LAB). Ωστόσο, η χρήση του όρου προβιοτικό για την kombucha είναι αμφισβητήσιμος λόγω του υψηλού επιπέδου μη ζώντων μικροοργανισμών ως συνέπεια της παστερίωσης της εμπορικής kombucha. Ως εκ τούτου, είναι πιο κατάλληλο να αναφερθεί η κομπούχα ως μεταβιοτικό, το οποίο ορίζεται από την ISAPP (Διεθνής Επιστημονική Ένωση Προβιοτικών και Πρεβιοτικών) ως «μη ζώντες μικροοργανισμοί και/ή συστατικά τους που παρέχουν οφέλη για την υγεία στον ξενιστή». Δεν υπάρχει ούτε ένας τύπος που να περιγράφει τη μικροβίωμα της kombucha, γιατί εξαρτάται κυρίως από τις καλλιέργειες εκκίνησης που χρησιμοποιούνται στη ζύμωση, αλλά και από τις πρώτες ύλες (φυτά και άλλα συστατικά), την ποσότητα σακχαρόζης, τη θερμοκρασία ζύμωσης και τη διάρκεια της διαδικασίας (Diez-Ozaeta & Astiazaran, 2022). Λείπει μια ολοκληρωμένη κατανόηση του τρόπου με τον οποίο διαφορετικά μικροβιακά είδη κατανέμονται σε μοναδικές ζυμώσεις kombucha (ταξονομική ποικιλομορφία) και πώς αυτά τα είδη αλληλεπιδρούν μέσα στην kombucha. Δεδομένης της διαμερισματοποίησης μεταξύ τσαγιού και βιοφίλμ εντός των ζυμώσεων kombucha και της μεγάλης ποικιλίας στις πρακτικές ζύμωσης, απαιτείται πρόσθετη αλληλουχία μοναδικών ζυμώσεων kombucha για να επιβεβαιωθεί εάν αυτές οι ταξινομικές βαθμίδες αντιπροσωπεύουν τον πυρήνα του μικροβιώματος της kombucha (οικολογική και λειτουργική ποικιλομορφία). Αυτό το κενό γνώσης περιορίζει την ικανότητά μας να διαχειριζόμαστε ή να σχεδιάζουμε προβλέψιμα αυτήν την πολιτιστικά και οικονομικά σημαντική μικροβιακή κοινότητα. Αξίζει να αναφερθεί ότι η ζύμωση της kombucha λαμβάνει χώρα κυρίως παρουσία AAB και ζυμομυκήτων, αν και παρατηρούνται παραλλαγές σε είδη βακτηρίων ή ζυμομυκήτων (Chakravorty et al., 2016), ενώ η παρουσία LAB δεν είναι απαραίτητη προϋπόθεση, αν και

αποτελούν ένα σημαντικό μέρος της μικροχλωρίδας της kombucha (Coton et al., 2017; Nguyen, Dong, et al., 2015). Οι έντονες διαφορές στη μικροβιακή χλωρίδα της kombucha πιθανότατα εξαρτώνται και από τις διαφορετικές προσεγγίσεις ή πρωτόκολλα που χρησιμοποιούνται, καθώς και από τα διαφορετικά είδη kombucha και τον χρόνο δειγματοληψίας (Içen et al., 2023), (Landis et al., 2022).

Σύμφωνα με πειραματική μελέτη των Marsh et al., 2014, η μεταγονιδιωματική αλληλουχία shotgun έδειξε ότι το βακτήριο *Komagataeibacter rhaeticus* και η ζύμη *Brettanomyces bruxellensis* ήταν τα πιο κοινά μικρόβια στις μικροβιακές κοινότητες της κομπούχα στα δείγματα που ελήφθησαν. Σε συνδυασμούς ζευγών βακτηρίων και ζυμομυκήτων, τα *B. bruxellensis* και μεμονωμένα στελέχη *Komagataeibacter spp.* ήταν επαρκείς για να σχηματίσουν ζυμώσεις kombucha με ισχυρές βιομεμβράνες, αλλά ο *Zygosaccharomyces bisporus*, ένας άλλος ζυμομύκητας που βρέθηκε στην kombucha, δεν διέγειρε τα βακτήρια να παράγουν βιομεμβράνες. Η ενισχυμένη ικανότητα του *B. bruxellensis* να ζυμώνει και να παράγει βασικούς μεταβολίτες στο ζαχαρούχο τσάι μπορεί να εξηγήσει γιατί διεγείρει το σχηματισμό βιοφίλμ. Η συγκριτική γονιδιωματική έδειξε ότι το *Komagataeibacter spp.* με >99% γονιδιωματική ομοιότητα μπορεί να έχει ακόμα δραματικές διαφορές στην παραγωγή βιοφίλμ, με τους ισχυρούς παραγωγούς να παράγουν πέντε φορές περισσότερο βιοφίλμ από τους πιο αδύναμους παραγωγούς. Ο πληθυσμός των ζυμών βρέθηκε ότι κυριαρχείται από το *Zygosaccharomyces* σε ποσοστό >95% στο ρόφημα που έχει υποστεί ζύμωση, με μεγαλύτερη ποικιλότητα να υπάρχει στη μεμβράνη κυτταρίνης (SCOBY), συμπεριλαμβανομένων πολλών ειδών που δεν είχαν αναγνωρισθεί προηγουμένως στην kombucha (Marsh et al., 2014).

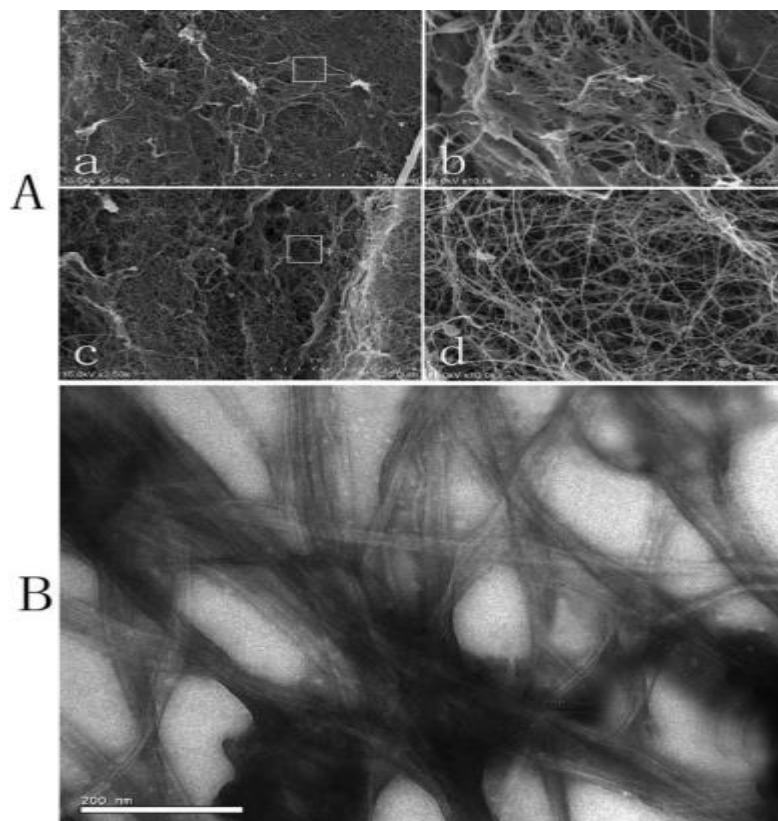


Εικόνα 2.4: Καταβολικά μονοπάτια που χρησιμοποιούνται στα ζυμούμενα τρόφιμα, όπως η kombucha, από τους μικροοργανισμούς (AAB, ζύμες, LAB (*Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*, M.P. Doyle, L. R. Beuchat, και T. J. Montville)

2.3.1 Βακτηριακή κυτταρίνη της kombucha (KOMBUCHA BACTERIAL CELLULOSE, KBC)

Ακριβώς όπως η συμβατική βακτηριακή κυτταρίνη, έτσι και η βακτηριακή κυτταρίνη της kombucha είναι μια ημιδιαφανής μεμβράνη που μοιάζει με γέλη. Η απαλή γέλη της KBC προκύπτει από τα στρώματα νερού που περιβάλλουν την πολυγλυκοζάνη, αλυσίδες μορίων βακτηριακής κυτταρίνης, έχει σπογγώδη δομή με πολυάριθμους πόρους διαφορετικών μεγεθών στην επιφάνεια και στην εσωτερική δομή της μήτρας (Zhu et al., 2014). Η βακτηριακή κυτταρίνη εμφανίζει συνδυασμό κρυσταλλικών και άμορφων περιοχών, όπως

επιβεβαιώνεται από τη θερμοβαρυμετρική ανάλυση (TGA) και τη διαφορική θερμιδομετρία σάρωσης. Κατά τη διαδικασία σχηματισμού της κυτταρινικής μεμβράνης, διάφορες ενώσεις άνθρακα του θρεπτικού μέσου χρησιμοποιούνται από τα βακτήρια του γένους *Komagataeibacter spp.*, το οποίο έχει αναφερθεί ως το κυρίαρχο είδος στην μικροβιακή κοινότητα της kombucha. Αυτές οι ενώσεις πολυμερίζονται σε απλές, γραμμικές αλυσίδες β-1,4-γλυκάνης και τελικά εκκρίνονται έξω από τα κύτταρα μέσω μιας γραμμής πόρων που βρίσκονται στην εξωτερική κυτταρική μεμβράνη. Αυτές οι αλυσίδες με δομή σαν κορδέλα θα αυτοσυναρμολογηθούν σε ινίδια δημιουργώντας ένα δίκτυο μακροϊνιδίων που μπορεί να ποικίλλει ανάλογα με τα χρησιμοποιημένα στελέχη, τον χρόνο καλλιέργειας και τα χημικά πρόσθετα στο μέσο καλλιέργειας. Η KBC δρα ως πηγή θρεπτικών συστατικών περιέχοντας αρκετές πρωτεΐνες, εξωκυτταρικά ένζυμα, νουκλεϊκά οξέα, λυμένα κύτταρα, και ούτω καθεξής. Αυτά τα στοιχεία αντιπροσωπεύουν μια σημαντική πηγή ενέργειας κατά τη διάρκεια της ζύμωσης. Αρκετές παράμετροι μελετώνται που θα μπορούσαν να τροποποιήσουν την απόδοση βακτηριακής κυτταρίνης όπως, η θερμοκρασία, ο χρόνος ζύμωσης, το βάθος βύθισης, μεταξύ των υπολοίπων. Ο φυσικοχημικές ιδιότητες της βακτηριακής κυτταρίνης, όπως η κρυσταλλικότητα, η υδροφιλία, ο βαθμός πολυμερισμού, η μηχανική αντοχή, η χημική σύσταση και η μικροδομή μπορούν να επηρεαστούν από διαφορετικές συνθήκες ζύμωσης κατά τη διαδικασία παραγωγής της χρησιμοποιώντας τσάι kombucha (Villarreal-Soto et al., 2021).

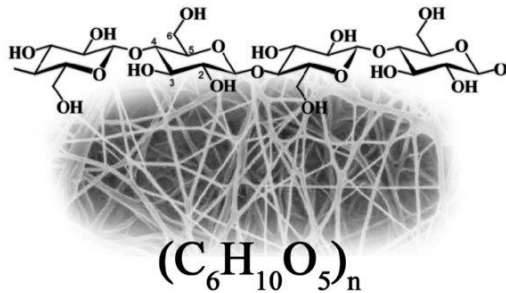


Εικόνα 2.5: Στις εικόνες (A) και (B) φαίνονται η υπερδομή της μεμβράνης και των ινών της KBC με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης(SEM) και ηλεκτρονικό μικροσκόπιο μετάδοσης(TEM), αντίστοιχα. Οι εικόνες από τα μικροσκόπια δείχνουν την πυκνότητα και το μέγεθος των πόρων (Zhu et al., 2014)

Σύμφωνα με την μελέτη των Zhu et al., 2014, οι εικόνες SEM δείχνουν ότι η μεμβράνη KBC αποτελείται από ίνες με διάμετρο μικρότερη από 100 nm, σχηματίζοντας ένα τρισδιάστατο συνυφασμένο δίκτυο. Οι εικόνες TEM αποκαλύπτουν ότι το δίκτυο ινών στις μεμβράνες KBC αποτελείται από δέσμες ινών που μοιάζουν με κορδέλα πλάτους περίπου 20–70 nm, με κάθε δέσμη να αποτελείται από 3–10 ινίδια με διάμετρο περίπου 7–10 nm (Zhu et al., 2014).

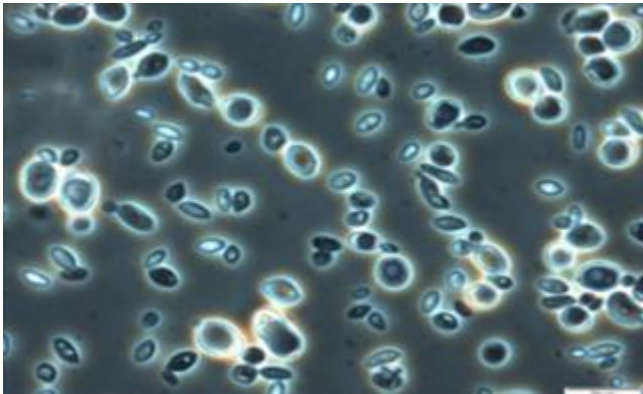
Στην μελέτη των Villarreal-Soto et al., 2021, βρέθηκε με την ανάλυση διασποράς ενέργειας ακτίνων X (EDX) της βακτηριακής κυτταρίνης Kombucha η χημική σύνθεση των κρυστάλλων που σχηματίζονται κατά τη διαδικασία ζύμωσης. Τα κύρια στοιχεία που ανιχνεύθηκαν στην ανάλυση EDX της μήτρας βακτηριακής κυτταρίνης είναι ο άνθρακας (50%-62%) και το οξυγόνο (38%-50%). Αυτά τα στοιχεία αποτελούν τη δομή των ινιδίων, σύμφωνα με τη σύνθεση της κυτταρίνης ($C_6H_{10}O_5$)_n, η οποία αποτελείται κυρίως από άνθρακα, υδρογόνο και οξυγόνο. Εκτός από τον άνθρακα και το οξυγόνο, ίχνη αζώτου παρατηρήθηκαν σε

ορισμένα φάσματα, που πιθανότατα προέρχονται από ρύπους στα βιοφίλμ της Kombucha, όπως αμινοξέα ή πρωτεΐνες από εμπλεκόμενους μικροοργανισμούς. Άλλα στοιχεία, όπως το ασβέστιο και το κάλιο, έχουν ανιχνευθεί σε βιομεμβράνες kombucha σε προηγούμενες μελέτες. Η ειδική χημική σύνθεση που ανιχνεύεται στην ανάλυση EDX μπορεί να ποικίλλει ανάλογα με τις συνθήκες ζύμωσης και τον μικροβιακό πληθυσμό που εμπλέκεται στην παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης από το τσάι kombucha (Villarreal-Soto et al., 2021).



Εικόνα 2.6: Δομή βακτηριακής κυτταρίνης (Mensah et al., 2021)

2.3.2 Ζύμες (yeasts)



Εικόνα 2.7 (Antolak et al., 2021)

Οι ζυμομύκητες είναι ευκαρυωτικοί μικροοργανισμοί που ανήκουν στην κατηγορία των μυκήτων. Είναι μη κινητοί, με διάμετρο περίπου 8 μ m, με σφαιρικά ή ωσειδή κύτταρα. Είναι προαιρετικά αναερόβια αλλά απαιτούν οξυγόνο για ορισμένη ανάπτυξη-διατήρηση. Η βέλτιστη ανάπτυξη τους είναι περίπου στους 20-30 $^{\circ}$ C και σε pH 4,5-7,0, αλλά πολλές ζύμες μπορούν ακόμα να αναπτυχθούν σε pH 2,5. Οι ζύμες συνήθως δεν σχετίζονται με αρνητικές επιπτώσεις στην υγεία, αν και ορισμένες ζύμες είναι σε θέση να παράγουν βιογενείς αμίνες. Μερικές ζύμες μπορούν ακόμη και να παρέχουν οφέλη για την υγεία, όπως βρέθηκε για το

Saccharomyces cerevisiae var. *boulardii*. Οι περισσότερες ζύμες (όπως *Saccharomyces cerevisiae* και *Dekkera bruxellensis*) είναι προαιρετικά ζυμωτικές και μπορούν να πραγματοποιήσουν ζύμωση ή αναπνοή για παραγωγή ενέργειας. Η αναπνοή είναι δυνατή μόνο παρουσία οξυγόνου, αν και η παρουσία οξυγόνου δεν εγγυάται έναν αναπνευστικό μεταβολισμό (Rozpedowska et al., 2011). Πολλές ζύμες συνεχίζουν να εκτελούν ζύμωση υπό αερόβιες συνθήκες εφόσον υπάρχουν διαθέσιμοι υδατάνθρακες, συχνά αναφέρεται ως το «Φαινόμενο Crabtree». Αυτό αποτελεί μέρος της στρατηγικής «φτιάχνω-συσσωρεύω-καταναλώνω» για την ταχεία κυριαρχία τους σε ένα οικοσύστημα, ανταγωνίζονται άλλους μικροοργανισμούς και παραμένουν κυρίαρχοι σε αυτό το οικοσύστημα. Όταν οι υδατάνθρακες καταναλώνονται, η αιθανόλη μπορεί να μεταβολιστεί σε διοξείδιο του άνθρακα και νερό. Οι ζύμες μπορούν επίσης να παράγουν γλυκερίνη ως απάντηση σε υψηλή οσμωτική πίεση και για εσωτερική εξισορρόπηση οξειδοαναγωγής (Pigeau et al., 2007). Μια άλλη ένωση που μπορεί να παραχθεί από ζυμομύκητες για να διατηρήσει μια κατάλληλη εσωτερική ισορροπία οξειδοαναγωγής είναι το οξικό οξύ, το οποίο είναι γνωστό ότι οδηγεί σε μείωση του pH κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης από ζυμομύκητες. Αυτή η διαδικασία συνοδεύεται επίσης από την παραγωγή ανώτερων αλκοολών και εστέρων, που συμβάλλουν στο άρωμα των αλκοολούχων ποτών. Οι ανώτερες αλκοόλες είναι που παράγονται από την αποδόμηση των αμινοξέων μέσω του μονοπατιού Ehrlich αλλά μπορούν επίσης να παραχθούν μέσω της αναβολικής διαδικασίας από πυροσταφυλικό.

Όταν οι ζυμομύκητες πεθαίνουν, τα κύτταρα μπορούν να ξεκινήσουν μια διαδικασία αυτοαποδόμησης (αυτόλυση), όπου οι ενδοκυτταρικές ενώσεις (όπως π.χ. νουκλεϊκά οξέα, πρωτεΐνες, λιπίδια και πολυσακχαρίτες) αποικοδομούνται από ενδογενή ένζυμα. Αυτή η διαδικασία συμβαίνει για παράδειγμα κατά τη διάρκεια της ωρίμανση της μπίρας και του κρασιού και έχει ως αποτέλεσμα τη σύνθεση μιας μεγάλης ποικιλίας ενώσεων, που μπορεί να επηρεάσουν τη γεύση των τελικών προϊόντων. Τα θρεπτικά συστατικά που απελευθερώνονται μπορεί να χρησιμεύσουν ως θρεπτικά συστατικά για την ανάπτυξη άλλων μικροοργανισμών, όπως AAB ή LAB (Laureys et al., 2020). Ο ρόλος των ζυμομυκήτων στη ζύμωση της kombucha είναι η μετατροπή της σακχαρόζης σε οργανικά οξέα, διοξείδιο του άνθρακα και αιθανόλη, με το τελευταίο στη συνέχεια να χρησιμοποιείται από βακτήρια οξικού οξέος για να σχηματίσουν ακεταλδεΐδη και οξικό

οξύ. Τα βακτήρια οξικού οξέος χρησιμοποιούν επίσης γλυκόζη που προέρχεται από τις ζύμες για τη σύνθεση βακτηριακής κυτταρίνης και γλυκονικού οξέος (Marsh et al., 2014).

Αντίδραση μετατροπής σακχάρων (κυρίως γλυκόζη και φρουκτόζη από την υδρόλυση της σακχαρόζης) σε αιθανόλη και διοξείδιο του άνθρακα (Jayabalan et al., 2014) :



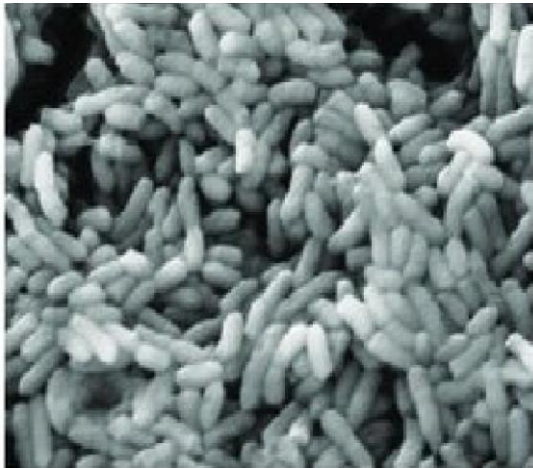
Οι ζύμες είναι αναπόσπαστο μέρος της kombucha καθώς πάντα υπάρχουν κατά τη διαδικασία της ζύμωσης. Μεγάλη ποικιλία έχει ήδη ανακτηθεί, που περιλαμβάνει είδη των γενών *Saccharomyces*, *Zygosaccharomyces*, *Dekkera/Brettanomyces*, *Pichia*, και άλλα. Κανένα συγκεκριμένο είδος ζυμομύκητα δεν βρέθηκε σταθερά που να χαρακτηρίζει τη διαδικασία ζύμωσης kombucha, αλλά το είδος *Dekkera* μπορεί να είναι ιδιαίτερα προσαρμοσμένο στο συγκεκριμένο περιβάλλον (Laureys et al., 2020).

Τα γένη ζυμών που έχουν βρεθεί στο SCOBY της kombucha σύμφωνα με τη βιβλιογραφία είναι (Marsh et al., 2014, Içen et al., 2023, Chakravorty et al., 2016, Landis et al., 2022):

- *Brettanomyces/Dekkera spp., anomala, bruxellensis, naardenensis*
- *Candida spp., boidinii, parapsilosis, stellata, stellimalicola, tropicalis*
- *Debaryomyces hansenii*
- *Eremothecium cymbalariae, ashbyii*
- *Hanseniaspora spp., meyeri, uvarum, valbyensis*
- *Kazachstania spp., exigua, telluris*
- *Kluyveromyces marxianus*
- *Lachancea spp., fermentati, kluyveri, thermotolerans*
- *Leucosporidiella spp.*
- *Merimbla ingelheimense*
- *Meyerozyma caribbica, guilliermondii*
- *Pichia spp., occidentalis, cecembensis, fermentans, membranifaciens, mexicana, kudriavzevii*
- *Rhodotorula mucilaginosa*

- *Saccharomyces cerevisiae*
- *Saccharomycopsis fibuligera*
- *Saccharomycodes ludwigii*
- *Schizosaccharomyces pombe*
- *Sporopachydermia lactativora*
- *Starmera amethionina , caribaea*
- *Torulospira delbreuckii ,microellipsoides*
- *Yarrowia lipolytica*
- *Zygosaccharomyces spp. , bailii, mellis, parabailii, rouxii*
- *Zygotorulasporea florentina*
- *Zygowilliopsis californica*

2.3.3 Βακτήρια του οξικού οξέος (AAB)



Εικόνα 2.8 (Yamashima, 2020)

Τα AAB είναι gram-αρνητικά (ή μεταβλητά κατά gram) βακτήρια που ανήκουν στην κατηγορία α-πρωτεοβακτήρια και στην οικογένεια των *Acetobacteraceae*. Μπορούν να είναι κινητά, έχουν περίπου πλάτος 0,5 μm και μήκος 1-4 μm, με ελλειψοειδή έως ραβδοειδή κύτταρα και δεν σποριώνονται. Αν και είναι υποχρεωτικά αερόβια, μπορούν να επιβιώσουν για παρατεταμένες περιόδους υπό συνθήκες χαμηλού οξειγόνου, όπως συμβαίνει στο εμφιαλωμένο κρασί. Η βέλτιστη ανάπτυξή τους είναι στους 25-30°C και σε pH 5,0-6,5, αλλά πολλά αναπτύσσονται επίσης σε pH 3,0-4,0 και ακόμη χαμηλότερο. Τα AAB γενικά δεν θεωρούνται παθογόνα για τον άνθρωπο και δεν είναι γνωστό ότι παράγουν

τοξικές ενώσεις ή βιογενείς αμίνες. Το πιο χαρακτηριστικό γνώρισμα των AAB είναι η οξείδωση αλκοολών, αλδεϋδων, σακχάρων παρουσία οξυγόνου από αφυδρογονάσες που βρίσκονται στην εξωτερική επιφάνεια της κυτταροπλασματικής τους μεμβράνης (Brazil et al., 2018). Για παράδειγμα, η αιθανόλη μπορεί να οξειδωθεί σε ακεταλδεϋδη, η οποία μπορεί να οξειδωθεί περαιτέρω σε οξικό οξύ. Η γλυκόζη μπορεί να οξειδωθεί σε γλυκονικό οξύ, γλυκουρονικό οξύ, 2-κετογλουκονικό οξύ, 5-κετογλουκονικό οξύ, 2,5-δικετογλουκονικό οξύ και γλυκουρονικό οξύ. Γενικά, τα είδη *Acetobacter* και *Gluconacetobacter* προτιμούν την οξείδωση της αιθανόλης έναντι της γλυκόζης, ενώ τα είδη *Gluconobacter* προτιμούν την οξείδωση της γλυκόζης, της γλυκερίνης, του γλυκονικού οξέος και της σορβιτόλης έναντι της αιθανόλης. Πολλά είδη *Gluconacetobacter* και *Komagataeibacter* παράγουν αδιάλυτους στο νερό πολυσακχαρίτες κυτταρίνης [b-(1->4) γλυκάνες] από γλυκόζη, φρουκτόζη, σακχαρόζη και άλλα υποστρώματα όπως η αιθανόλη και η γλυκερίνη (Valera et al., 2015). Αυτό είναι σαφώς ορατό κατά τη διάρκεια μιας ζύμωσης kombucha με τον σχηματισμό ενός παχύ πολτού που αναπτύσσεται στην επιφάνεια του υγρού ζύμωσης. Πολλοί παράγοντες επηρεάζουν την παραγωγή κυτταρίνης από AAB, όπως τύπος υποστρώματος, συγκέντρωση υποστρώματος και pH (Laureys et al., 2020). Ορισμένα είδη *Gluconobacter*, *Gluconacetobacter* και *Komagataeibacter* επίσης παράγουν υδατοδιαλυτές levans[b-(2->6) φρουκτάνη] από σακχαρόζη, υδατοδιαλυτές δεξτράνες από μαλτόζη ή μαλτοολιγοσακχαρίτες ή υδατοδιαλυτούς πολυσακχαρίτες ακετάνης (αποτελούμενοι από γλυκόζη, μαννόζη, γλυκουρονικό οξύ και ραμνόζη).

Τα βακτήρια οξικού οξέος (AAB) είναι αυτά που κυριαρχούν συνήθως στα βακτήρια της kombucha. Από τα βακτήρια του οξικού οξέος που κυριαρχούν στην καλλιέργεια της kombucha είναι αυτά που ανήκουν στο γένος *Acetobacter* και *Gluconobacter*. Το *Acetobacter xylinum* αναταξινομήθηκε ως *Gluconacetobacter xylinus* και, πιο πρόσφατα, ως *Komagataeibacter xylinus*. Αποδείχθηκε ότι είναι τα κύρια βακτήρια στο περιβάλλον της kombucha γιατί, εκτός από την παραγωγή οξικού και γλυκονικού οξέος, δημιουργούν επίσης την κυτταρίνη, μια απαραίτητη ένωση για την κυτταρινική μεμβράνη, η οποία σχηματίζει ένα αιωρούμενο βιοφίλμ στη διεπιφάνεια αέρα-υγρού κατά τη διάρκεια της ζύμωσης. Η αιθανόλη που παράγεται από τους ζυμομύκητες χρησιμοποιείται από τα βακτήρια του οξικού οξέος ώστε να σχηματίσουν ακεταλδεϋδη και οξικό οξύ, τα οποία συμβάλλουν στην ξινή γεύση της kombucha. Σύμφωνα με τη μελέτη των De Filippis et al., 2018, τα επίπεδα AAB στο βιοφίλμ στο τέλος της περιόδου ζύμωσης είναι σημαντικά

υψηλότερα στους 30°C σε σύγκριση με τους 20°C. Συνήθως, το *Gluconacetobacter* κυριαρχεί στις ζυμώσεις, ενώ το *Acetobacter* βρίσκεται σε χαμηλότερα επίπεδα, ήδη μετά από 24 ώρες ζύμωσης (De Filippis et al., 2018).

Αντίδραση μετατροπής της αιθανόλης (που παράγεται από τις ζύμες) σε οξικό οξύ και νερό (Department of Food Science and Technology, State University of Londrina, CEP 86057-970, Londrina, PR, Brazil et al., 2018):



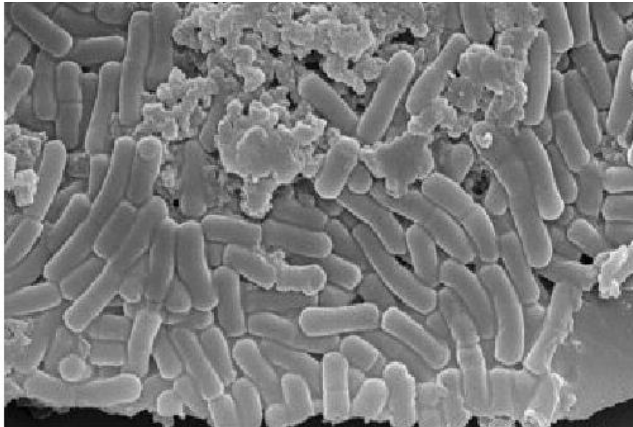
Έχει αποδειχθεί από πειράματα ότι τα παρακάτω γένη είναι τα επικρατή (Içen et al., 2023):

- *Komagataeibacter*,
- *Acetobacter*,
- *Gluconobacter* και
- *Gluconacetobacter*, ήταν τα σημαντικότερα AAB, με κύριο ρόλο τα
- *K. intermedius*, *K. rhaeticus*, *K. saccharivorans*, *K. hansenii*,
- *A. xylinum*, *A. aceti*, *A. pasteurians*, *A. tropicalis* και
- *G. oxydans* σε επίπεδο είδους.

Άλλα είδη AAB που έχουν βρεθεί στην kombucha είναι τα (Içen et al., 2023, Coelho et al., 2020)):

- *Novacetimonas hansenii*
- *Tanticharoemia sakaeratensis*
- *Acetobacter intermedius*, *Acetobacter nitrogenifigens*;
- *Gluconacetobacter kombucha*

2.3.4 Βακτήρια του γαλακτικού οξέος (LAB)



Εικόνα 2.9 (Lüdin et al., 2016)

Η παρουσία του βακτηρίων γαλακτικού οξέος (LAB) στην kombucha είναι ασυνεπής. Συνήθως, δεν υπάρχουν ή υπάρχουν σε χαμηλή αφθονία ιδιαίτερα στα τελευταία στάδια της ζύμωσης. Σε ορισμένες βιομηχανικές ζυμώσεις έχουν βρεθεί σε μεγαλύτερη αφθονία. Τα LAB που ανακτήθηκαν στην τελευταία περίπτωση ήταν κυρίως *Oenococcus oeni* και *Lactobacillus nagelii*, που είναι και τα δύο γνωστό ότι είναι ανθεκτικά σε οξύ. Τα LAB είναι θετικά κατά Gram βακτήρια που ανήκουν στην φυλή των Firmicutes και χαρακτηρίζονται από ορισμένα μορφολογικά, μεταβολικά και φυσιολογικά χαρακτηριστικά. Δεν είναι κινητά, έχουν σχήμα ράβδου (*Lactobacillus*) ή σφαιρικά (*Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Oenococcus*), και δεν σποριάζουν. Είναι προαιρετικά αναερόβια, αλλά δεν χρησιμοποιούν οξυγόνο για τον μεταβολισμό τους. Η βέλτιστη ανάπτυξή τους είναι στους 25-40°C και σε pH 4,0-6,0. Θεωρούνται γενικά ως ασφαλή (GRAS), αλλά ορισμένα στελέχη είναι γνωστό ότι παράγουν βιογενείς αμίνες, ενώ από την άλλη πλευρά, πολλά LAB θεωρούνται ως προβιοτικοί μικροοργανισμοί. Τα LAB συνδέονται με την παραγωγή γαλακτικού οξέος, αλλά μπορούν επίσης να παράγουν άλλους μεταβολίτες όπως αιθανόλη, οξικό οξύ, διοξείδιο του άνθρακα, διακετύλιο και μαννιτόλη.

Αντίδραση μετατροπής σακχάρων σε γαλακτικό οξύ (Marsh et al., 2014):



Τα LAB μπορεί να ταξινομούνται σε υποχρεωτικά ομοζυμωτικά (*εντερόκοκκος*, *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*), υποχρεωτικά ετεροζυμωτικά (*Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Weissella*) και προαιρετικά ετεροζυμωτικά. Το γένος *Lactobacillus* έχει κάποια είδη ομοζυμωτικά και ετεροζυμωτικά.

Το γένος *Lactobacillus* προτάθηκε από τον Beijerinck το 1901 και περιλαμβάνει θετικούς κατά Gram, ζυμωτικούς, προαιρετικά αναερόβιους και μη σποριογόνους μικροοργανισμούς. Το γένος κατατάσσεται στο γένος *Firmicutes*, κατηγορίας *Bacilli*, τάξης *Lactobacillales*, οικογένειας *Lactobacillaceae*, που περιέχει τα γένη *Lactobacillus*, *Paralactobacillus* και *Pediococcus*. Τα *Leuconostocaceae*, συμπεριλαμβανομένων των γενών *Convivina*, *Fructobacillus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus* και *Weissella*, είναι οι πιο στενοί συγγενείς της οικογένειας. Η πρώιμη ταξινόμηση των γαλακτοβακίλλων βασίστηκε σε φαινοτυπικά χαρακτηριστικά συμπεριλαμβανομένης της βέλτιστης θερμοκρασίας ανάπτυξης, χρήσης σακχάρων και φάσματος παραγόμενων μεταβολιτών. Περισσότερα από 250 είδη έχουν αποδοθεί στο γένος *Lactobacillus* τις τελευταίες δεκαετίες. Πρόσφατα, μια ομάδα 15 επιστημόνων από όλο τον κόσμο έχει αναταξινομήσει τα είδη *Lactobacillus* σε 25 γένη, συμπεριλαμβανομένου του τροποποιημένου γένους *Lactobacillus* (το οποίο τώρα περιορίζεται στην πρώην ομάδα *Lactobacillus delbrueckii*), *Paralactobacillus* και 23 νέα γένη: *Acetilus*, *Agtobacillus*, *Agence*, *Apilactobacillus*, *Bombilactobacillus*, *Companilactobacillus*, *Dellaglioia*, *Fructilactobacillus*, *Furfurilactobacillus*, *Holzapfelia*, *Lacticaseibacillus*, *Lactiplantibacillus*, *Lapidilactobacillus*, *Latilactobacillus*, *Letilactobacillus*, *Letilactobacillus*, *Letilactobacillus*, *Letilactobacillus actobacillus*, *Liquorilactobacillus*, *Loigolactobacillus*, *Paucilactobacillus*, *Schleiferilactobacillus* και *Secundilactobacillus*). Αυτά τα νέα γένη ομαδοποιούν είδη που μοιράζονται ολόκληρο το γονιδίωμα φυλογένεση, οικολογία και φυσιολογικές και μεταβολικές ιδιότητες. Φυσιολογικές και φυλογενετικές εκτιμήσεις και γονιδιωματικές αναλύσεις αντικατέστησαν επίσης την προηγούμενη διαφοροποίηση μεταξύ των «υποχρεωτικών ομοζυμωτικών», «προαιρετικά ετεροζυμωτικών» και «υποχρεωτικά ετεροζυμωτικών» βακτηρίων

γαλακτικού οξέος με απλούστερη διαφοροποίηση των ομοζυμωτικών βακτηρίων γαλακτικού οξέος που μεταβολίζουν εξόζες μέσω της οδού Embden-Meyerhoff προς το πυροσταφυλικό ως βασικό μεταβολικό ενδιάμεσο και των ετεροζυμωτικών βακτηρίων γαλακτικού οξέος, που μεταβολίζουν τις εξόζες μέσω η οδός της φωσφοκετολάσης προς το πυροσταφυλικό και το ακετυλο-φωσφορικό ως βασικά ενδιάμεσα. Στο γένος *Lactobacillus*, οι ομοζυμωτικοί και οι ετεροζυμωτικοί γαλακτοβάκιλλοι διακρίνονται σε φυλογενετικούς κλάδους ενώ ο ομογαλακτικός ή ετερογαλακτικός μεταβολισμός διατηρείται σε άλλα γαλακτικά όξινα βακτήρια σε οικογενειακό επίπεδο. Ο μεταβολισμός της πεντόζης, ωστόσο, είναι μεταβλητός σε επίπεδο είδους ή στελέχους (Zheng et al., 2020).

Το pH των βιομηχανικών διαδικασιών ζύμωσης kombucha είναι πιθανώς πιο αυστηρά ελεγχόμενο από τις ζυμώσεις kombucha σε οικιακό επίπεδο, καθώς η γεύση της kombucha θα γίνει δυσάρεστη κάτω από ένα ορισμένο pH. Αυτό εξηγεί επίσης την παρουσία των LAB σε ορισμένες βιομηχανικές διαδικασίες ζύμωσης kombucha και την απουσία τους στις διαδικασίες ζύμωσης οικιακής kombucha, αφού τα LAB δεν αναπτύσσονται κάτω από το pH 3,5. Είναι σαφές ότι οι παράμετροι της διαδικασίας κατά τη διάρκεια της ζύμωσης μιας kombucha θα έχει σημαντικό αντίκτυπο στην τελική μικροβιακή σύνθεση και συνεπώς στη σύνθεση των μεταβολιτών της kombucha. Για παράδειγμα, οι διαστάσεις του δοχείου ζύμωσης και η αναλογία της επιφάνειας προς τον όγκο θα μπορούσε να επηρεάσει το επίπεδο οξυγόνωσης κατά τη διάρκεια μιας ζύμωσης. Αυτό είναι λιγότερο ανησυχητικό όταν το ρόφημα αναδεύεται έντονα ή αερίζεται κατά τη διάρκεια της διαδικασίας ζύμωσης, όπως έχει εφαρμοστεί με επιτυχία από ορισμένους παραγωγούς. Χαμηλή οξυγόνωση και συνεπώς χαμηλή παραγωγή οξέος από το AAB μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα pH >4, το οποίο μπορεί να διεγείρει την ανάπτυξη των LAB και άρα την παραγωγή γαλακτικού οξέος. Ο χρόνος ζύμωσης θα έχει επίσης ουσιαστικό αντίκτυπο στο όξινο στρες προς το μικροβιακό οικοσύστημα και άρα τη μικροβιακή και χημική σύνθεση του τελικού προϊόντος. Οι υψηλότερες θερμοκρασίες ζύμωσης φαίνεται να ωφελούν τα LAB, το οποίο είναι συνεπές με τις υψηλότερες βέλτιστες θερμοκρασίες ανάπτυξής τους σε σύγκριση με τους ζυμομύκητες και τα AAB (Laureys et al., 2020).

Μελέτες έχουν δείξει ότι ένας ρόλος αυτών των μικροοργανισμών είναι να μπορούν να βοηθήσουν την ανάπτυξη κάποιων ειδών AAB. Σε αυτό, ο γαλακτοβάκιλλος έχει αποδειχθεί ότι αυξάνει σημαντικά την παραγωγή κυτταρίνης από το *Glucanacetobacter* σε συν-

καλλιέργεια και ακόμη, έχει αποδειχθεί ότι τα LAB υποστηρίζουν την ανάπτυξη του *Glucanacetobacter* στην kombucha (Coton et al., 2017).

Τα κύρια βακτήρια γαλακτικού οξέος στην kombucha έχει βρεθεί ότι είναι τα *Oenococcus oeni*, και συσχετίστηκαν έντονα με τις ζυμώσεις του πράσινου τσαγιού.

Τα γένη που έχουν βρεθεί στο SCOBY της kombucha σύμφωνα με τη βιβλιογραφία είναι (Coton et al., 2017):

- *Oenococcus oeni*
- *Lactobacillus nagelii*
- *Lactobacillus satsumensis*
- *Enterococcus faecium*
- *Lactobacillus spp. delbrueckii, acidophilus*

2.4 Τρόπος παρασκευής της kombucha

Σε όλο τον κόσμο, η kombucha παράγεται σε οικιακό επίπεδο, χειροποίητη σε μικρές επιχειρήσεις και σε μεγάλες, εμπορικές κλίμακες. Η kombucha Brewers International (KBI) είναι ένας παγκόσμιος μη κερδοσκοπικός οργανισμός εμπορικών εταιρειών kombucha που ασχολούνται με την παγκόσμια προώθηση του ποτού και την προστασία των παραγωγών. Οι περισσότερες από τις εταιρείες που ασχολούνται με την παραγωγή και τη διανομή της kombucha βρίσκονται στη Βόρεια Αμερική: 134 εταιρείες έχουν έδρα στις Ηνωμένες Πολιτείες, 28 στον Καναδά. Στην Ευρώπη, οι περισσότεροι παραγωγοί βρίσκονται στην Ισπανία και το Ηνωμένο Βασίλειο. Συνολικά, υπάρχουν τώρα πάνω από 200 διαφορετικά είδη αυτού του ποτού διαθέσιμα στον κόσμο. Η kombucha παράγεται παραδοσιακά από πράσινο, oolong ή συνηθέστερα μαύρο τσάι (Antolak et al., 2021). Η kombucha ζυμώνεται γενικά σε γυάλινα ή ανοξείδωτα δοχεία για τρόφιμα. Τα δοχεία και τα σκεύη ζύμωσης πρέπει να αποστειρώνονται για την αποφυγή πιθανής αλλοίωσης ή επιμόλυνσης. Η συνταγή για την παρασκευή kombucha ποικίλλει σε λεπτομέρειες όπως η ποσότητα του

τσαγιού ή η προσθήκη ζάχαρης και η καλλιέργεια εκκίνησης, ο χρόνος και η θερμοκρασία που απαιτούνται για τη ζύμωση. Ωστόσο, η κύρια διαδικασία είναι αρκετά παρόμοια. Η παραγωγή της kombucha ξεκινά με την παρασκευή αφεψήματος τσαγιού. Στο 1L πόσιμο βραστό νερό, συνήθως προστίθενται 5gr φύλλα τσαγιού και αφήνονται να εγχυθούν με αρχική θερμοκρασία μεταξύ 70-95°C. Μετά γίνεται η αφαίρεση των φύλλων με διήθηση. Τυπικά, προστίθενται 50 -150 gr/L (5-15%) ζάχαρης. Στη συνέχεια, το ζαχαρούχο τσάι πριν από την εισαγωγή του SCOBY αφήνεται να κρυώσει έως τους 20°C περίπου. Το SCOBY προστίθεται στο ζαχαρούχο τσάι με 100-200 mL προηγούμενης ζυμωμένης kombucha ή ξύδι. Αυτό μειώνει το pH του μείγματος για να αναστείλει την ανάπτυξη ανεπιθύμητων μικροοργανισμών. Το πάνω μέρος του δοχείου καλύπτεται με υλικά όπως ένα καθαρό βαμβακερό πανί ή μια χαρτοπετσέτα. Αυτό αποτρέπει την είσοδο μούχλας και σκόνης που μεταδίδεται με τον αέρα και κρατά έξω τα έντομα, όπως τις μύγες των φρούτων. Η επώαση γίνεται σε θερμοκρασία δωματίου (18-30 °C) για 7 έως 10 ημέρες. Καθώς προχωρά η ζύμωση, σχηματίζεται στην επάνω επιφάνεια του τσαγιού, το σφαιρίδιο κυτταρίνης σε σχήμα δίσκου που ονομάζεται «κόρη SCOBY» και η σύνθεση της υγρής φάσης αλλάζει με το επίπεδο σακχάρων, το pH μειώνεται και η οξύτητα αυξάνεται λόγω της συμβιωτικής δράσης βακτηρίων εκκίνησης και ζυμών. Το διάλυμα kombucha κατά την διάρκεια της ζύμωσης θα αρχίσει να έχει αρωματικές νότες ξυδιού και θα σχηματιστούν ορατές φυσαλίδες αερίου (Greenwalt et al., 2000), (Jayabalan et al., 2014). Καθώς προχωρά η ζύμωση, η γεύση της kombucha αλλάζει από γλυκιά σε φρουτώδη, ξινή και ελαφρώς αφρώδη, αποκτώντας μια ήπια γεύση ξυδιού. Δεν υπάρχει σαφές τελικό σημείο της ζύμωσης κομπούχα. Η οξύτητα, ωστόσο, μπορεί να αυξηθεί σε ένα δυνητικά επιβλαβές επίπεδο για κατανάλωση μετά από 10 ημέρες. Το τελικό σημείο pH >2,5 συνιστάται για την ασφαλή κατανάλωση kombucha. Για τις οικιακές ζυμώσεις, η διαδικασία θεωρείται ολοκληρωμένη μόλις επιτευχθεί το επιθυμητό επίπεδο οξίνισης, ενώ για πειραματικές ή βιομηχανικές έρευνες, το τελικό σημείο ζύμωσης μπορεί να προσδιοριστεί με μέτρηση του pH, της συνολικής τιτλοδοτήσιμης οξύτητας (TTA), της περιεκτικότητας σε αλκοόλ και της συγκέντρωσης σακχάρων. Είναι γενικά αποδεκτό ότι το pH μιας kombucha που έχει υποστεί βέλτιστη ζύμωση (από άποψη γεύσης) πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ pH 2,5-3,5 και η τιτλοδοτούμενη οξύτητα να κυμαίνεται ~4 g/L, παράγοντας ένα παραδοσιακό ρόφημα kombucha υψηλής οργανοληπτικής αξίας. Αφού η ζύμωση φτάσει το επιθυμητό επίπεδο, το SCOBY αφαιρείται από το δοχείο ζύμωσης. Το υγρό φιλτράρεται και αποθηκεύεται σε ένα πωματισμένο

δοχείο κατάλληλο για τρόφιμα και ποτά έτοιμα προς κατανάλωση. Σε βιομηχανικό επίπεδο πραγματοποιούνται οι απαραίτητες διεργασίες σύμφωνα με τη νομοθεσία για την ασφάλεια τροφίμων, όπως η παστερίωση του ροφήματος (Kim & Adhikari, 2020).

2.4.1 Οργανοληπτικά χαρακτηριστικά

2.4.1.1 Γεύση

Ολόκληρη η χημική σύνθεση του ποτού kombucha, συμπεριλαμβανομένου του υποστρώματος που θα χρησιμοποιηθεί, της συγκέντρωσης υπολειμμάτων σακχάρων, του διοξειδίου του άνθρακα και των οργανικών οξέων, είναι αυτό που τελικά καθορίζει τη γεύση του και ανάλογα με το χρόνο ζύμωσης θα ληφθούν διαφορετικές γεύσεις. Έχει παρατηρηθεί ότι το τσάι kombucha με υψηλότερη συγκέντρωση οξικού οξέος παράγει μια πιο όξινη και στυφή γεύση, εν τω μεταξύ, ένα άλλο με περισσότερο γλυκονικό οξύ παράγει μια πιο ήπια γεύση. Επομένως, με τον έλεγχο των συνθηκών ζύμωσης είναι δυνατό να επιτευχθούν τα απαραίτητα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά στο τσάι kombucha (Chen & Liu, 2000).

- Γλυκύτητα: η σακχαρόζη είναι το κύριο σάκχαρο που χρησιμοποιείται στην παραγωγή kombucha. Η συνολική γλυκύτητα της kombucha καθορίζεται από τη συγκέντρωση των μη ζυμωθέντων σακχάρων που παραμένουν στο μείγμα.
- Οξύτητα: το οξικό οξύ από τα AAB και άλλα οργανικά οξέα που παράγονται από τις ζύμες και τα LAB συμβάλουν στη διαμόρφωση της οξύτητας στην kombucha. Τα κύρια οργανικά οξέα στην kombucha περιλαμβάνουν το οξικό, το γλυκουρονικό και το γλυκονικό οξύ, ενώ τα δευτερεύοντα οξέα περιλαμβάνουν το γαλακτικό, το ηλεκτρικό και το μηλικό οξύ.
- Πικράδα: Η πικράδα στην kombucha προέρχεται κυρίως από την καφεΐνη του τσαγιού και τις πολυφαινόλες. Η πικράδα μπορεί να καλυφθεί από την αντιληπτή γλυκύτητα. Το κατώτατο όριο για την αντιληπτή πικράδα από την καφεΐνη είναι 0,2 gr/L, με συγκεντρώσεις στην kombucha που κυμαίνονται από 0,6 έως 1,0 gr/L. Οι πολυφαινόλες είναι δευτερογενείς μεταβολίτες από φυτά όπως το τσάι, που συμβάλλουν στην πικράδα και τη στυπτικότητα. Οι πολυφαινόλες του τσαγιού αποτελούν το 30-40% του ξηρού βάρους των φύλλων τσαγιού και τα επίπεδά τους αλλάζουν κατά τη διαδικασία της ζύμωσης (Bishop et al., 2022).

2.4.1.2 Αρωματικό προφίλ

Όπως και άλλα ποτά που έχουν υποστεί ζύμωση, οι πρώτες ύλες (τσάι) και τα μικρόβια (ζύμες και βακτήρια) θα έχουν αντίκτυπο στο συνολικό προφίλ αρώματος της kombucha. Ο τύπος του υποστρώματος τσαγιού που χρησιμοποιείται μπορεί να επηρεάσει το τελικό προφίλ αρώματος της kombucha. Οι πολυφαινόλες στο μαύρο τσάι υφίστανται μια οξειδωτική αντίδραση απελευθερώνοντας τις αρωματικές ενώσεις πριν από τη ζύμωση. Το πράσινο τσάι από την άλλη δεν υφίσταται την ίδια διαδικασία, πράγμα που σημαίνει ότι οι πρώτες ύλες μπορούν να υποστούν παρόμοια οξειδωτική αντίδραση από τη ζύμωση με αποτέλεσμα την απελευθέρωση αρωματικών ενώσεων μετά τη διαδικασία ζύμωσης. Το τσάι αποτελείται από έναν αριθμό διαφορετικών πτητικών οργανικών ενώσεων όπως 3-εξανόλη, λιναλοόλη, γερανιόλη, 2-φαινυλαιθανόλη, δαμασκενόνη και 2,5-διμεθυλ-4-υδροξυ-3-φουρόνη. Ωστόσο, το τυπικό προφίλ αρώματος του τσαγιού δεν φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο στο χαρακτηριστικό προφίλ αρώματος της kombucha. Αντίθετα, το προφίλ αρώματος κυριαρχείται κυρίως από το οξικό οξύ και τις πτητικές οργανικές ενώσεις που παράγονται από τις ζύμες (Bishop et al., 2022).

2.4.1.3 Αιθανόλη

Συνήθως, η kombucha περιέχει λιγότερο από 1% αιθανόλη, καθιστώντας την μη ανιχνεύσιμη στους περισσότερους καταναλωτές. Ωστόσο, εάν τα επίπεδα αιθανόλης πλησιάσουν αυτό το όριο, μπορεί να προσδώσει μια πικρή γεύση και να επηρεάσει το συνολικό άρωμα. Η παραγωγή αιθανόλης είναι ένα φυσικό προϊόν της διαδικασίας ζύμωσης της kombucha. Ο έλεγχος της περιεκτικότητας σε αιθανόλη γίνεται με τη χρήση του *Acetobacter* που μετατρέπει την αιθανόλη σε οξικό οξύ μέσω αερόβιας ζύμωσης. Λόγω της αφιλτράριστης, προβιοτικής φύσης του ροφήματος, η kombucha μπορεί να υποστεί μια δευτερεύουσα ζύμωση σε αναερόβιες συνθήκες εντός της συσκευασίας, αυξάνοντας την περιεκτικότητα του ροφήματος σε αιθανόλη (Bishop et al., 2022).

2.4.2 Παραδοσιακά συστατικά της kombucha

2.4.2.1 Σακχαρόζη

Η σακχαρόζη είναι μακράν η πιο κοινή πηγή άνθρακα που χρησιμοποιείται στη ζύμωση kombucha, τόσο λόγω της ικανότητάς της να παρέχει γλυκόζη και φρουκτόζη για τις μικροβιακές μεταβολικές οδούς όσο και λόγω του χαμηλού κόστους και της αφθονίας της. Υπάρχει μια γενική συναίνεση ότι η βέλτιστη συγκέντρωση σακχαρόζης βρίσκεται μεταξύ 5-10% w/v, ένα εύρος εντός του οποίου εκτελείται η πλειονότητα των ζυμώσεων kombucha (Nyhan et al., 2022).

2.4.2.3 Φύλλα τσαγιού

Η χρήση του τσαγιού στη ζύμωση kombucha αναφέρεται κυρίως ως πηγή αζώτου και μετάλλων για τους μικροοργανισμούς στην kombucha, με τα αποξηραμένα φύλλα τσαγιού να περιέχουν 21-28% πρωτεΐνη και αμινοξέα που συνεισφέρουν περίπου το 6% w/w στα στερεά του εκχυλίσματος. Επιπλέον, τα αναφερόμενα επίπεδα γλυκίνης, βαλίνης, λυσίνης, λευκίνης, αλανίνης, μεθειονίνης και θρεονίνης στην πρωτεΐνη του τσαγιού υπερβαίνουν ακόμη και εκείνα των πρωτεϊνών σόγιας. Το μαύρο και το πράσινο τσάι που προέρχονται από φύλλα της *Camellia sinensis* (L.) χρησιμοποιούνται παραδοσιακά για τη ζύμωση kombucha (Nyhan et al., 2022).

2.5 Παραλλαγές ποτών kombucha

Παραδοσιακά χρησιμοποιούνται κυρίως μαύρο τσάι και ζάχαρη ως συστατικά για το έγχυμα, αλλά σήμερα η kombucha παρασκευάζεται με διάφορες παραλλαγές. Ενώ η kombucha παράγεται παραδοσιακά με μαύρο και πράσινο τσάι, μια σειρά από νέες γεύσεις μπορεί να αναπτυχθούν χρησιμοποιώντας εναλλακτικά υποστρώματα, όπως το τσάι oolong, τα αρωματικά τσάγια, τα βότανα, ο καφές, το νερό καρύδας, οι διάφοροι χυμοί φρούτων, το κρασί, το γάλα (Sinir et al., 2019). Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι σε ορισμένες περιπτώσεις, κάποια εναλλακτικά υποστρώματα που χρησιμοποιούνται για την παρασκευή της kombucha υπερτερούν του μαύρου τσαγιού kombucha όσον αφορά τις λειτουργικές ιδιότητες, όπως η αντιοξειδωτική δραστηριότητα και η αντιμικροβιακή δράση.

Λαμβάνοντας υπόψη τις αλλαγές που προκύπτουν από τις προτιμήσεις των καταναλωτών,

οι οποίες επηρεάζονται από τα φυτικά υλικά που χρησιμοποιούνται για την παρασκευή της kombucha, καθώς και τα στελέχη AAB, LAB και ζυμών που χρησιμοποιούνται, αναμένονται νέοι τύποι αυτού του ποτού, που χαρακτηρίζονται από διαφορετικές διατροφικές, αισθητηριακές και λειτουργικές ιδιότητες. Η πλειονότητα των προϊόντων kombucha στα ράφια είναι kombucha με πολύπλοκες γεύσεις και αρώματα. Οι γεύσεις φρούτων και βοτάνων, όπως τζίντζερ, λεμόνι, βατόμουρο, φράουλα, λάιμ, μέντα και μάνγκο, είναι μια κοινή αρωματική επιλογή στα προϊόντα kombucha (Kim & Adhikari, 2020).

Στον παρακάτω πίνακα αναφέρονται μερικά παραδείγματα εναλλακτικών υποστρωμάτων που έχουν χρησιμοποιηθεί για την παρασκευή kombucha (Kim & Adhikari, 2020):

Είδος	Γεύσεις
φρούτα	Λεμόνι, blueberry, raspberry, φράουλα, lime, μάνγκο, κεράσι, ανανάς, ρόδι, μήλο, πορτοκάλι, σταφύλι, passionfruit, αχλάδι, πεπόνι, αρόνια, καρύδα, αγγούρι, elderberry, κόκκοι καφέ, αμύγδαλο, πράσινο μήλο, dragon fruit, κουμκουάτ, mangosteen, yuzu, bilberry, εσπεριδοειδή, cranberry, guava
βότανα	Μέντα, βασιλικός, λεβάντα, φασκόμηλο, δυόσμος, δεντρολίβανο, εχινάκεια, τουσί, λεμονόχορτο, κόκκινο τριφύλλι
μπαχαρικά	Τζίντζερ, κουρκουμάς, πιπέρι καγιέν, βανίλια, κανέλλα, γαρύφαλο, μαύρο πιπέρι, μοσχοκάρυδο
λαχανικά	Καρότο, παντζάρι, σπανάκι, kale, maca root, ραδίκι, jalapeno

Πίνακας 2.1: Εναλλακτικά συστατικά υποστρωμάτων για παρασκευή kombucha

2.5.1 Εναλλακτικές πηγές σακχάρων για την παρασκευή kombucha

Συνολικά, ο τύπος σακχάρων που χρησιμοποιείται στη ζύμωση kombucha επηρεάζει τον μεταβολισμό της κοινοπραξίας των μικροοργανισμών, τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των

μικροοργανισμών και, κατά συνέπεια, το προφίλ των μεταβολιτών που λαμβάνονται (Antolak et al., 2021).

2.5.1.2 Μελάσα

Μια παραδοσιακή πηγή άνθρακα για τη ζύμωση της kombucha είναι η σακχαρόζη. Η εφαρμογή οποιουδήποτε άλλου σακχάρου (λακτόζη, γλυκόζη ή φρουκτόζη) μπορεί να έχει σαφή επίδραση στην σχηματισμό αιθανόλης και γαλακτικού οξέος, αλλά έχουν μόνο μια μικρή επίδραση στη γεύση του τσαγιού που έχει υποστεί ζύμωση.

Η μελάσα από την επεξεργασία ζαχαρότευτλων, είναι ιδιαίτερα ελκυστική, όχι μόνο λόγω της χαμηλής τιμής της αλλά και λόγω της παρουσίας ενός αριθμού συστατικών, συμπεριλαμβανομένων μετάλλων, οργανικών ενώσεων και βιταμινών, τα οποία είναι πολύ χρήσιμα για τη διαδικασία της ζύμωσης. Η μελάσα είναι επίσης γνωστή ως η ευρέως χρησιμοποιούμενη πηγή άνθρακα στη βιομηχανική παραγωγή γαλακτικού οξέος. Η kombucha που παράγεται χρησιμοποιώντας μελάσα ως υπόστρωμα έχει υψηλότερη ολική οξύτητα, υψηλότερη περιεκτικότητα σε γαλακτικό οξύ και σημαντικά μεγαλύτερη απόδοση βιομάζας από το ζαχαρούχο τσάι kombucha, που αποδίδεται στη μεγαλύτερη διαθεσιμότητα αζώτου που υπάρχει στη μελάσα. Ωστόσο, οι αισθητηριακές ιδιότητες του ληφθέντος ροφήματος kombucha δεν ήταν ικανοποιητικές δίνοντας στο ποτό γλυκιά, καραμελωμένη γεύση και σκούρο χρώμα (Malbaša et al., 2008).

2.5.2 Εναλλακτικές πηγές τσαγιών για την παρασκευή kombucha

Μαζί με το μαύρο και το πράσινο τσάι, η επεξεργασία των φύλλων *Camellia sinensis* (L.) παράγει επίσης λευκό (μη οξειδωμένο), oolong (ημι-οξειδωμένο) και pu-erh (μετα-οξειδωμένο) τσάι. Η χρήση εναλλακτικών πηγών τσαγιού για την παραγωγή ροφήματος kombucha, έχει στόχο την παραγωγή ροφήματος πλούσιο σε βιοδραστικές ενώσεις (Değirmencioglu et al., 2021).

2.5.2.1 Τσάι rooibos

Σύμφωνα με τους Gaggia et al., 2018, παρασκευάστηκε kombucha από φύλλα rooibos (*Aspalathus linearis*), για μια μελέτη. Η μελέτη έδειξε ότι η Kombucha από το rooibos έχει χαμηλή συγκέντρωση αιθανόλης (1,1 mg/mL) και οξικού οξέος. Αν και η αντιοξειδωτική δράση ήταν υψηλότερη στην kombucha με μαύρο και πράσινο τσάι σε σύγκριση με το τσάι

rooibos, το τελευταίο έδειξε σημαντική επίδραση στην αποκατάσταση της οξειδωτικής βλάβης. Αυτά τα αποτελέσματα κάνουν τα φύλλα rooibos ενδιαφέροντα για την παρασκευή ενός ροφήματος που έχει υποστεί ζύμωση με οφέλη για την υγεία (Gaggia et al., 2018).

2.5.2.2. Αρωματικά και φαρμακευτικά φυτά της οικογένειας Lamiaceae

Έχουν γίνει δοκιμές παρασκευής ροφήματος kombucha χρησιμοποιώντας φυτά από την οικογένεια *Lamiaceae*. Τα φυτά αυτής της οικογένειας έχουν ένα ευρύ φάσμα βιολογικών και φαρμακολογικών ιδιοτήτων, καθώς χρησιμοποιούνται και για τη βελτίωση της γεύσης και των οργανοληπτικών ιδιοτήτων διαφόρων ειδών τροφίμων. Επίσης, τα αιθέρια έλαιά τους έχουν αντιμικροβιακές, σπασμολυτικές, αντικαρκινικές και άλλες ιδιότητες. Απαραίτητη η δυνατότητα λήψης ροφήματος kombucha με τη χρήση φαρμακευτικών βοτάνων από την οικογένεια *Lamiaceae* (μελισσόχορτο, μέντα, θυμάρι και φασκόμηλο) είναι η να διαθέτουν πηγή αζώτου ώστε να γίνει η ζύμωση. Αυτά τα φαρμακευτικά βότανα μπορούν να χρησιμοποιηθούν με επιτυχία ως το μόνο υπόστρωμα (όχι σε συνδυασμό) για ζύμωση kombucha αντί για μαύρο τσάι. Επιπλέον, σύμφωνα με πειράματα έχουν παρατηρηθεί διαφορετικοί χρόνοι ζύμωσης ανάλογα το βότανο (<https://www.researchgate.net/publication/267032775> Characteristics of kombucha fermentation on medicinal herbs from Lamiaceae family).

2.5.2.3 Μέντα

Η kombucha με βάση τη μέντα περιέχει αρκετές ενώσεις που απουσιάζουν από το παραδοσιακό τσάι kombucha και συνδέονται με αρώματα μέντας και φρεσκάδας. Σύμφωνα με έρευνα των Zhang et al., 2021, η μέντα και το πράσινο τσάι kombucha πέτυχαν τις υψηλότερες και χαμηλότερες συνολικές αξιολογήσεις αισθητηριακής αποδοχής, αντίστοιχα. Αυτή η μελέτη έδειξε την καταλληλότητα των φυτικών υποστρωμάτων για να παρασκευαστεί kombucha με σύνθετα πτητικά και γευστικά προφίλ διαφορετικά της kombucha με βάση το πράσινο τσάι. Τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης μελέτης αποκάλυψαν τη δυνατότητα εφαρμογής φυτικών παρασκευασμάτων, ιδιαίτερα αφεψημάτων μέντας ως εναλλακτικές λύσεις έναντι των πιο κοινών ροφημάτων kombucha με βάση το τσάι, λόγω του ότι παράγουν ροφήματα με ξεχωριστά προφίλ αρώματος και ελκυστικά αισθητηριακά χαρακτηριστικά (Zhang et al., 2021).

2.5.3 Kombucha με εκχύλισμα φρούτων και λαχανικών

Τα φρούτα και τα λαχανικά έχουν επίσης αναδειχθεί ως πιθανά υποστρώματα για την

kombucha, με τους ερευνητές να εστιάζουν και πάλι σε εκείνα που διακρίνονται για τις βιοδραστικές τους ενώσεις και τα πιθανά οφέλη για την υγεία. Τέτοιες μελέτες έχουν διερευνήσει τη χρήση πρώτων υλών όπως το σπανάκι, ο χυμός σταφυλιού, ο χυμός κερασιού, η φλούδα μπανάνας και ο χυμός ροδιού.

2.5.3.1 Εκχύλισμα από φλούδα μπανάνας

Ακόμη και τα απόβλητα φυτικών υλικών, όπως η μπανανόφλουδα, θα μπορούσε να είναι κατάλληλο υπόστρωμα μαζί με κάποιο βότανο ή τσάι για την παρασκευή kombucha.

Σύμφωνα με την έρευνα που έκανα οι Ebrahimi Pure & Ebrahimi Pure, 2016, παρασκευάστηκε kombucha με φύλλα τσουκνίδας, ένα κοινό φαρμακευτικό βότανο και φλούδες μπανάνας, απορρίμματα φυτικών υλικών, ως υπόστρωμα για την προετοιμασία της kombucha. Τα τελικά προϊόντα που προέκυψαν από αυτά τα νέα υποστρώματα έχουν υψηλότερο pH σε σύγκριση με την παραδοσιακή kombucha. Επίσης το καθένα από αυτά παρουσιάζει μια νέα γεύση, οσμή και χρώμα, διαφορετικά από την κοινή kombucha. Τα αφεψήματα kombucha με φύλλα τσουκνίδας και φλούδες μπανάνας περιέχουν σημαντική περιεκτικότητα σε φαινολικά συστατικά και έδειξαν σημαντική αντιοξειδωτική δράση (Ebrahimi Pure & Ebrahimi Pure, 2016).

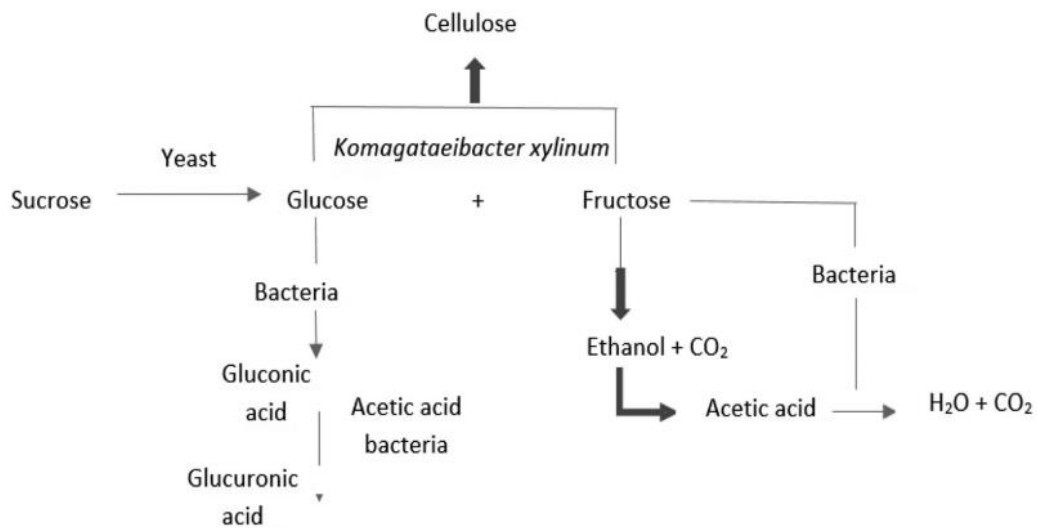
2.5.3.1 Χυμός σταφύλι

Ο χυμός σταφύλι περιέχει διάφορα θρεπτικά στοιχεία και φυτοχημικά, όπως πολυφαινόλες, που διαθέτουν ένα ευρύ φάσμα βιολογικών δραστηριοτήτων. Σύμφωνα με τους Ayed et al., 2017, διερευνήθηκαν τα χημικά χαρακτηριστικά, οι αισθητηριακές και οι αντιμικροβιακές δραστηριότητες του ροφήματος kombucha που έχει υποστεί ζύμωση χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα χυμό σταφυλιού. Το pH μειώθηκε από 3,95 σε 2,9 κατά τη διάρκεια της διαδικασίας ζύμωσης και παρέμεινε αρκετά σταθερό στη συνέχεια, και ο αριθμός των βακτηρίων οξικού οξέος και των ζυμών στο ζωμό αυξήθηκε σε 6 ημέρες ζύμωσης και στη συνέχεια μειώθηκε. Αυτά τα ευρήματα υποστηρίζουν τη δυνατότητα ανάπτυξης ενός ροφήματος χυμού σταφυλιού kombucha με υψηλή προστιθέμενη αξία και λειτουργικές ιδιότητες. Έξι ημέρες ζύμωσης φάνηκε να είναι επαρκείς για τη βελτίωση των θρεπτικών και αισθητηριακών χαρακτηριστικών του ροφήματος και μείωση της παραγωγής ανεπιθύμητων ενώσεων, όπως οργανικά οξέα που δίνουν στο ρόφημα μια ξιδάτη γεύση. Τα παραπάνω υποστρώματα όχι μόνο είναι ωφέλιμα όσον αφορά τις λειτουργικές τους

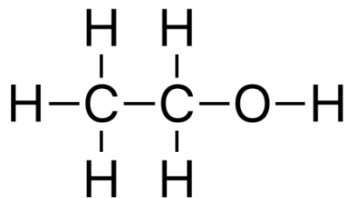
ενώσεις, αλλά μπορούν επίσης να διεγείρουν τον αυξημένο σχηματισμό οργανικών οξέων όπως το γλυκουρονικό οξύ υπό ευνοϊκές συνθήκες ζύμωσης (Ayed et al., 2017).

2.6 Ζύμωση και παραγωγή μεταβολιτών

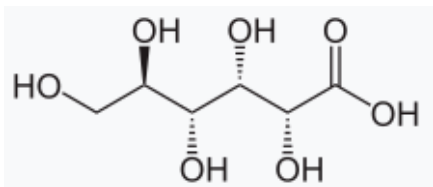
Κατά τη διάρκεια της ζύμωσης η σακχαρόζη υδρολύεται σε γλυκόζη και φρουκτόζη από τις ζύμες, με αποτέλεσμα την παραγωγή διοξειδίου του άνθρακα και αιθανόλης. Με τη σειρά τους, τα LAB χρησιμοποιούν μόρια γλυκόζης και φρουκτόζης για να παράγουν γαλακτικό οξύ, ενώ τα AAB χρησιμοποιούν γλυκόζη και αιθανόλη για να παράγουν γλυκονικό οξύ και οξικό οξύ, αντίστοιχα (Nyhan et al., 2022). Οι βιοδραστικές ενώσεις που λαμβάνονται με τη συμμετοχή μικροοργανισμών περιλαμβάνουν πολυφαινόλες (που προκύπτουν από τη μεταβολική δραστηριότητα του SCOBY), οργανικά οξέα, βιταμίνες, ένζυμα και πρωτεΐνες όπως βακτηριοσίνες. Τα τελικά οφέλη για την υγεία του ανθρώπου μέσω της κατανάλωσης του προϊόντος εξαρτώνται από το φυτικό υλικό, καθώς και από την κοινότητα μικροοργανισμών που χρησιμοποιούνται για τη ζύμωση (Antolak et al., 2021). Η χημική σύνθεση του τσαγιού kombucha περιλαμβάνει διάφορα οργανικά οξέα (όπως οξικό, γλυκονικό, γλυκουρονικό, κιτρικό, L-γαλακτικό, μηλικό, τρυγικό, μηλονικό, οξαλικό, ηλεκτρικό, πυροσταφυλικό και ουσνικό οξύ), σάκχαρα (όπως σακχαρόζη, γλυκόζη, και φρουκτόζη), βιταμίνες (B1, B2, B6, B12 και C), αμινοξέα, βιογενείς αμίνες, πουρίνες, χρωστικές, λιπίδια, πρωτεΐνες, υδρολυτικά ένζυμα, αιθανόλη, διοξείδιο του άνθρακα, φαινόλη, πολυφαινόλες τσαγιού, μέταλλα και άλλους μεταβολίτες που παράγονται από τις ζύμες και τα βακτήρια που συμμετέχουν στη διαδικασία ζύμωσης (Jayabalan et al., 2014). Η περιεκτικότητα και το προφίλ των οργανικών οξέων διαφέρουν αρκετά ανάλογα με τη μελέτη λόγω του μικροβιακού πληθυσμού στο SCOBY που ποικίλλει πολύ από τόπο σε τόπο. Οι ασυνεπείς συνθέσεις οξέων/αλκοόλης στην kombucha λόγω των παραλλαγών στο SCOBY μπορούν να επηρεάσουν σε μεγάλο βαθμό τις ιδιότητές της. Το τσάι θεωρείται ιστορικά ως υγιεινό ρόφημα λόγω της παρουσίας αντιοξειδωτικών όπως πολυφαινόλες. Στην περίπτωση της kombucha, οι πολυφαινόλες και η περιεκτικότητα σε φλαβονοειδή αυξάνονται κατά τη διαδικασία της ζύμωσης, γεγονός που αυξάνει περαιτέρω τα οφέλη για την υγεία του καταναλωτή (Wang et al., 2020).



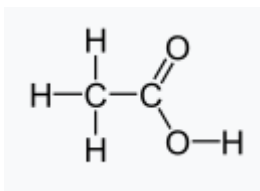
Εικόνα 2.10: Κύρια μεταβολική δραστηριότητα στην kombucha (Villarreal-Soto et al., 2018)



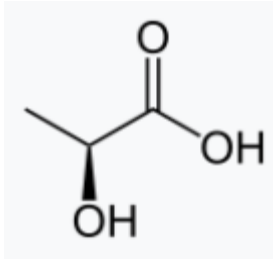
Εικόνα 2.11: Αιθανόλη (<https://en.m.wikipedia.org/wiki/File:Ethanol-structure.svg?searchToken=2dgmvyh38gp6lbh1c4roxjha4>)



Εικόνα 2.12: Γλυκονικό οξύ (https://en.m.wikipedia.org/wiki/Gluconic_acid)



Εικόνα 2.13: Οξικό οξύ (https://en.m.wikipedia.org/wiki/Acetic_acid)



Εικόνα 2.14: Γαλακτικό οξύ (https://en.m.wikipedia.org/wiki/Lactic_acid)

2.6.1 Βιοδραστικά συστατικά της kombucha

Η αρχική περιεκτικότητα σε βιοδραστικές ενώσεις που προέρχονται από το τσάι μπορεί να αλλάξει λόγω της μεταβολικής δραστηριότητας των μικροοργανισμών κατά τη διάρκεια της ζύμωσης.

2.6.1.1 Φαινολικές ενώσεις

Οι φαινολικές ενώσεις στην kombucha υφίστανται ενδιαφέρουσες αλλαγές κατά τη διαδικασία της ζύμωσης, οδηγώντας στην ενίσχυση των αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων του τελικού ροφήματος. Η αξία της αντιοξειδωτικής δράσης ποικίλλει μεταξύ του τσαγιού και του χρόνου ζύμωσης. Σε γενικές γραμμές, έχει βρεθεί ότι οι κατεχίνες και άλλες φαινολικές ενώσεις είναι υπεύθυνες για τις αντιοξειδωτικές ιδιότητες της kombucha. Οι κύριες φαινολικές ενώσεις του πράσινου τσαγιού περιλαμβάνουν φλαβανόλες και φαινολικά οξέα. Οι φλαβανόλες (γαλλοκατεχίνη, γαλλική κατεχίνη, γαλλική γαλλοκατεχίνη, επικατεχίνη, επιγαλλοκατεχίνη, γαλλική επικατεχίνη και γαλλική επιγαλλοκατεχίνη) είναι οι πιο άφθονες μεταξύ των ενώσεων του πράσινου τσαγιού, αντιπροσωπεύοντας περισσότερο από το 70% του συνολικού φαινολικού περιεχομένου (Lorenzo & Munekata, 2016).

Παράγοντες που επηρεάζουν τις φαινολικές ενώσεις κατά την ζύμωση της kombucha:

- *Αύξηση των ολικών πολυφαινολών και φλαβονοειδών*
Μελέτες έχουν δείξει ότι η περιεκτικότητα σε ολικές πολυφαινόλες και φλαβονοειδή αυξάνεται στην kombucha στο ζαχαρούχο μαύρο τσάι μετά τη ζύμωση. Η αύξηση αυτή αποδίδεται στην αποικοδόμηση σύνθετων ενώσεων σε μικρότερες, με αποτέλεσμα υψηλότερη περιεκτικότητα σε φαινολικές ενώσεις στην kombucha.

- *Επίδραση των συνθηκών ζύμωσης στις φαινολικές ενώσεις*
Η θερμοκρασία και η διάρκεια της ζύμωσης μπορούν να επηρεάσουν το φαινολικό περιεχόμενο, με ποικίλα αποτελέσματα που παρατηρούνται σε διαφορετικές θερμοκρασίες.
- *Ποικιλομορφία φαινολικών ενώσεων*
Η ζύμωση του μαύρου τσαγιού kombucha οδηγεί σε μεγαλύτερη ποικιλία φαινολικών ενώσεων, πιθανώς λόγω της υψηλότερης συγκέντρωσης πολυμερών φαινολικών ενώσεων στο μαύρο τσάι. Αυτή η ποικιλομορφία συμβάλλει στη μοναδική σύνθεση βιοδραστικών ενώσεων στο τσάι που έχει υποστεί ζύμωση.
- *Στελέχη μικροοργανισμών*
Είναι γνωστό ότι ορισμένα στελέχη, ιδιαίτερα τα βακτήρια γαλακτικού οξέος, είναι σε θέση να αποικοδομούν τις φαινολικές ενώσεις. Το ίδιο συμβαίνει και με άλλα στελέχη μικροοργανισμών που προέρχονται από το SCOBY. Εκτός από τον προσδιορισμό της επίδρασης μεμονωμένων στελεχών στα φαινολικά συστατικά της kombucha, είναι απαραίτητος ο προσδιορισμός της επίδρασης των φαινολικών ενώσεων στη μικροβιακή δραστηριότητα - ειδικά όταν σχεδιάζονται νέες κοινοπραξίες SCOBY (Antolak et al., 2021).

2.6.1.2 Οργανικά οξέα

Μετά τη ζύμωση, το τσάι kombucha περιέχει μια ποικιλία από οργανικά οξέα που συμβάλλουν στη μοναδική του γεύση και στα πιθανά οφέλη για την υγεία. Τα κύρια οργανικά οξέα που υπάρχουν στην kombucha περιλαμβάνουν το οξικό οξύ, γαλακτικό οξύ, γλυκονικό οξύ και γλυκουρονικό οξύ. Αυτά τα οργανικά οξέα παράγονται ως μεταβολικά υποπροϊόντα της μικροβιακής δραστηριότητας κατά τη διάρκεια της ζύμωσης. Η παρουσία οργανικών οξέων στην kombucha σχετίζεται με πολλά πιθανά οφέλη για την υγεία, συμπεριλαμβανομένης της αντιμικροβιακής δράσης, της αυξημένης βιοδιαθεσιμότητας των φαινολικών ενώσεων και των πιθανών επιδράσεων στην ορμονική ισορροπία. Αυτά τα οργανικά οξέα συμβάλλουν στις συνολικές λειτουργικές ιδιότητες της kombucha.

Παράγοντες που επηρεάζουν τα οργανικά οξέα κατά την ζύμωση της kombucha:

- *Παραλλαγές με βάση τον τύπο τσαγιού*

Μελέτες έχουν δείξει ότι η συγκέντρωση οργανικών οξέων στην kombucha μπορεί να ποικίλλει ανάλογα με τον τύπο του τσαγιού που χρησιμοποιείται για ζύμωση. Για παράδειγμα, η kombucha που λαμβάνεται από μαύρο τσάι έχει βρεθεί ότι έχει υψηλότερες συγκεντρώσεις γλυκουρονικού οξέος, γλυκονικού οξέος και οξικού οξέος σε σύγκριση με kombucha από το οolong και το πράσινο τσάι.

- *Επίδραση των συνθηκών ζύμωσης στα οργανικά οξέα*

Ο τύπος του τσαγιού και οι συνθήκες ζύμωσης μπορούν να επηρεάσουν τις αντιοξειδωτικές ιδιότητες της kombucha μέσω της παραγωγής οργανικών οξέων. Η συγκέντρωση οργανικών οξέων, όπως το οξικό οξύ, έχει συνδεθεί με τις αντιοξειδωτικές δραστηριότητες της kombucha. (Martínez Leal et al., 2018)

2.6.1.3 Βακτηρισίνες

Η kombucha περιέχει βακτηρισίνες, οι οποίες είναι μικρές πρωτεϊνικές δομές που παράγονται από βακτήρια του γαλακτικού οξέος. Οι βακτηρισίνες παρουσιάζουν ανταγωνιστικές και προληπτικές επιδράσεις έναντι παθογόνων μικροοργανισμών και μικροοργανισμών που προκαλούν αλλοίωση. Εκτιμώνται για την ασφάλειά τους, την έλλειψη κυτταροτοξικότητας και την ειδική τους δράση έναντι ορισμένων ομάδων μικροοργανισμών. Τα στελέχη *Lactobacillus spp.*, *Pediococcus spp.*, *Lactococcus spp* και *Leuconostoc spp.*, θεωρούνται οι κύριοι παραγωγοί βακτηρισινών μεταξύ των βακτηρίων γαλακτικού οξέος. Οι βακτηρισίνες που υπάρχουν στην kombucha συμβάλλουν στις αντιμικροβιακές της ιδιότητες και μπορεί να διαδραματίσουν ρόλο στη συντήρηση του ροφήματος αναστέλλοντας την ανάπτυξη ανεπιθύμητων μικροοργανισμών. Η ασφάλεια και η στοχευμένη δραστηριότητα των βακτηρισινών τις καθιστούν πολύτιμα συστατικά της kombucha όσον αφορά τη συντήρηση της και τα πιθανά οφέλη για την υγεία του καταναλωτή (Antolak et al., 2021).

2.6.1.4 Βιταμίνες

Σύνθεση της βιταμίνης C:

Η ζύμωση της kombucha οδηγεί στη σύνθεση της βιταμίνης C, με μελέτες που δείχνουν ότι η σύνθεση της βιταμίνης C είναι καλύτερη κατά τη διάρκεια της ζύμωσης πράσινου τσαγιού σε σύγκριση με την έγχυση πράσινου τσαγιού. Η μεταβολική δραστηριότητα των βακτηρίων οξικού οξέος, βακτηρίων γαλακτικού οξέος και ζυμομυκήτων συμβάλλει στη σύνθεση της βιταμίνης C, ιδιαίτερα των στελεχών του γένους *Gluconobacter*.

Βιταμίνες του συμπλέγματος B:

Επιλεγμένα στελέχη βακτηρίων γαλακτικού οξέος και ζυμομύκητες που εμπλέκονται στη ζύμωση της kombucha έχουν την ικανότητα να συνθέτουν βιταμίνες του συμπλέγματος B, συμπεριλαμβανομένης της ριβοφλαβίνης (βιταμίνη B2). Αυτές οι βιταμίνες παίζουν ουσιαστικό ρόλο σε διάφορες βιολογικές διεργασίες και είναι ευεργετικές για την υγεία (Antolak et al., 2021).

2.6.1.5 Μέταλλα

Σύμφωνα με τους Bauer-Petrovska & Petrushevska-Tozi, 2000, χαλκός, σίδηρος, μαγγάνιο, νικέλιο, και ο ψευδάργυρος είναι μέταλλα που αυξήθηκαν λόγω της μεταβολικής δραστηριότητας στην kombucha (Bauer-Petrovska & Petrushevska-Tozi, 2000).

2.7 Χαρούπι



Εικόνα 2.15

(https://el.wikipedia.org/wiki/%CE%A7%CE%B1%CF%81%CE%BF%CF%85%CF%80%CE%B9%CE%AC#/media/%CE%91%CF%81%CF%87%CE%B5%CE%AF%CE%BF:Ceratonia_siliqua_MHNT.BOT.2011.3.89.jpg)

Η χαρουπιιά (*Ceratonia siliqua* L.), είναι ένα αειθαλές δέντρο που ανήκει στην οικογένεια *Leguminosae*, και καλλιεργείται ευρέως στις μεσογειακές χώρες, έχει άγριους και καλλιεργημένους τύπους. Το χαρούπι είναι μια από τις σημαντικές πηγές για κάθε είδους ζύμωση λόγω των πλούσιων θρεπτικών συστατικών του. Το άγριο ή καλλιεργημένο χαρούπι έχει υψηλή περιεκτικότητα σε συνολικό ξηρό βάρος (περίπου 91-92%) που αποτελείται κυρίως από 34-42% σακχαρόζη, 7-10% γλυκόζη, 10-12% φρουκτόζη και επίσης ενσωματώνει μικρές ποσότητες μετάλλων, αμινοξέων και φαινολικών ενώσεων (El Batal et al., 2016). Η χημική σύνθεση του λοβού του χαρουπιού εξαρτάται από τις ποικιλίες, την προέλευση και τον χρόνο συγκομιδής. Τα δύο κύρια συστατικά του λοβού του χαρουπιού είναι (κατά βάρος): ο πολτός (90%) και ο σπόρος (10%). Ο λοβός του χαρουπιού είναι μία σημαντική πηγή ζύμωσης με τα πλούσια θρεπτικά συστατικά του. Η χρήση του χαρουπιού ως πηγή άνθρακα στις διεργασίες ζύμωσης μπορεί να συμβάλει στη μείωση του κόστους παραγωγής και στην αύξηση της χρηστικότητας των πηγών άνθρακα, συμβάλλοντας σε πιο οικονομικά αποδοτικές και βιώσιμες πρακτικές παραγωγής.

Το εκχύλισμα χαρουπιού περιέχει πολύτιμα θρεπτικά συστατικά που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την παραγωγή οργανικών οξέων, αιθανόλης, ενζύμων, αντισωμάτων και άλλων βιοτεχνολογικών προϊόντων με υψηλές αποδόσεις. Έρευνες έχουν δείξει ότι το εκχύλισμα χαρουπιού μπορεί να είναι οικονομικά ωφέλιμο για την παραγωγή προϊόντων

προστιθέμενης αξίας μέσω της ζύμωσης από διαφορετικούς μικροοργανισμούς (Yatmaz & Turhan, 2018).

2.7.1 Χαρουπόμελο

Το χαρουπόμελο ή σιρόπι χαρουπιού είναι ένα παραδοσιακό προϊόν εγγενές στην περιοχή της Μεσογείου, που περιέχει υψηλή συγκέντρωση σακχάρων, φαινολικών ενώσεων και μετάλλων (Tetik et al., 2011).

2.7.1.1 Τρόπος παρασκευής χαρουπόμελου

Σύμφωνα με τους Ρυγονόλου et al., 2024, για την παρασκευή χαρουπόμελου οι λοβοί των χαρουπιών πλύθηκαν και κόπηκαν σε μικρότερα κομμάτια, μήκους περίπου 2-3 cm, και αφαιρέθηκαν οι σπόροι. Οι ψιλοκομμένοι λοβοί χαρουπιών μεταφέρθηκαν σε μια κατσαρόλα με εμφιαλωμένο νερό σε αναλογία 1:2,4 και ο βρασμός διεξήχθη σε θερμοκρασία 100°C για 10 λεπτά. Το προκύπτον εκχύλισμα ψύχθηκε, τοποθετήθηκε σε μια μεμβράνη και αφέθηκε σε θερμοκρασία δωματίου (~25°C) για 2 έως 3 ημέρες. Στη συνέχεια, το εκχύλισμα διηθήθηκε όσες φορές χρειαζόταν για να αφαιρεθούν όλα τα υπολείμματα χαρουπιού, αφήνοντας μόνο το τελικό εκχύλισμα στην κατσαρόλα. Για βέλτιστη διαύγεια του τελικού προϊόντος, το εκχύλισμα υποβλήθηκε σε διήθηση με διηθητικό χαρτί και η διαδικασία επαναλήφθηκε ανάλογα με τις ανάγκες, ανάλογα με το επιθυμητό επίπεδο διαφάνειας. Τέλος, το τελικό εκχύλισμα υποβλήθηκε σε επαναβρασμό στους 100°C μέχρι να γίνει επαρκής συμπύκνωση και το εκχύλισμα απέκτησε το κατάλληλο ιξώδες χαρακτηριστικό της συγκεκριμένης κατηγορίας τροφίμων (Ρυγονόλου et al., 2024). Το σιρόπι που λαμβάνεται, πρέπει να είναι σε εμπορικά επίπεδα στα 66,5 °Brix . Η συγκέντρωση των σακχάρων πρέπει να πλησιάζει αλλά όχι να φτάνει αρκετά το σημείο υπερ-κορεσμού: η συγκέντρωση σακχάρων θα πρέπει να είναι μεταξύ 65% -67% w/w. Ένα χαμηλότερο ποσοστό σακχάρων κάνει το σιρόπι εξαιρετική θρεπτική ουσία για τις ζύμες και άλλους μικροοργανισμούς. Ένα κορεσμένο σιρόπι οδηγεί σε κρυστάλλωση ενός μέρους των σακχάρων υπό συνθήκες μεταβαλλόμενης θερμοκρασίας (Optimization of production of carob pulp syrup from different population of Moroccan carob (*Ceratonia siliqua* L.)).

2.7.2 Χημική Σύσταση χαρουπόμελου

Ο πολτός των χαρουπιών περιέχει υψηλή περιεκτικότητα σε σάκχαρα και μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως πρώτη ύλη για την παραγωγή σιροπιών και κρυσταλλωμένης σακχαρόζης για τη βιομηχανία τροφίμων. Το χαρουπόμελο έχει υψηλή περιεκτικότητα σε πολυφαινόλες, αντιριζικό δυναμικό και αντιμικροβιακή δράση. Αλλά αυτό το δυναμικό επηρεάζεται όταν στο σιρόπι χαρουπιού συμπληρώνεται ποσότητα ζάχαρης. Οι φαινολικές ενώσεις του χαρουπιού είναι π-κουμαρικό οξύ, γαλλική επιγαλλοκατεχίνη, επιγαλλοκατεχίνη, καμπφερόλη, κατεχίνη, συριγγικό οξύ, κερκετίνη, γλυκοσίδη, καφεϊκό οξύ, γαλλικό οξύ, γαλλική κατεχίνη, 3-γλυκοσίδη μυρικετίνης και κινναμικό οξύ. Οι συγκεντρώσεις όλων των φαινολικών ενώσεων μειώνονται χωριστά όταν προστίθεται ζάχαρη στο σιρόπι χαρουπιού κατά την εξαγωγή του (Yatmaz & Turhan, 2018).

2.8 *Sideritis scardica*



Εικόνα 2.16

(https://el.wikipedia.org/wiki/%CE%A4%CF%83%CE%AC%CE%B9_%CF%84%CE%BF%CF%85_%CE%B2%CE%BF%CF%85%CE%BD%CE%BF%CF%8D#/media/%CE%91%CF%81%CF%87%CE%B5%CE%AF%CE%BF:Sideritis_scardica_IMG_4653.jpg)

Το *Sideritis scardica* Griseb. (γένος *Sideritis*, οικογένεια *Lamiaceae*) είναι ένα ενδημικό φυτό της αλπικής ζώνης της Βαλκανικής Χερσονήσου. Το γένος *Sideritis* περιλαμβάνει περισσότερα από 150 είδη και αρκετά από αυτά απαντώνται στην Ελλάδα και σε άλλες μεσογειακές χώρες. Τα είδη *Sideritis* χρησιμοποιούνται παραδοσιακά για την παρασκευή

τσαγιού, ευρέως γνωστό ως «τσάι του βουνού», το οποίο καταναλώνεται ευρέως λόγω των ιδιοτήτων του, γνωστές από την παραδοσιακή ιατρική κατά του κοινού κρυολογήματος, συμπεριλαμβανομένου του πυρετού, της γρίπης και της βρογχίτιδας, για την ανακούφιση από γαστρικές διαταραχές και φλεγμονές του βλεννογόνου, ως αναλγητικό, ηρεμιστικό, διουρητικό, αντιμικροβιακό, αντιβακτηριδιακό, αντιοξειδωτικό και αντιφλεγμονώδες καθώς και ως συμπλήρωμα διατροφής για την πρόληψη της αναιμίας. Τα αφεψήματα από βότανα παρασκευάζονται από οποιοδήποτε μέρος των φυτών, συμπεριλαμβανομένων των φύλλων, των ανθών, τους σπόρους ή ολόκληρα τα εναέρια μέρη. Το "τσάι του βουνού" παρασκευάζεται παραδοσιακά ως έγχυμα, με εμβάπτιση ανθοφόρων μίσχων ή εναέριων τμημάτων σε βραστό νερό, για 10-30 λεπτά (Irakli et al., 2018, Todorova & Trendafilova, 2014).

2.8.1 Χημική σύσταση του *Sideritis scardica*

Οι φυτοχημικές έρευνες που έχουν γίνει μέχρι στιγμής έδειξαν ταυτοποίηση φαινολικών ενώσεων, διτερπενοειδών και υδρογονανθράκων. Διερευνήσεις άλλων κατηγοριών δευτερογενών μεταβολιτών όπως τριτερπενοειδή, ιριδοειδή, λιγνάνες ή κουμαρίνες επίσης παρουσιάζουν ενδιαφέρον καθώς είναι βιολογικά δραστικές ενώσεις (Todorova & Trendafilova, 2014).

Σύμφωνα με τη μελέτη σε υδατικό διάλυμα του *Sideritis scardica* των Irakli et al., 2018, βρέθηκε ότι η υψηλότερη βιοδραστική περιεκτικότητα και αντιοξειδωτική δράση παρουσιάστηκε σε εγχύσεις φύλλων ακολουθούμενη από άνθη, εναέρια μέρη και μίσχους. Υπό αυτή την προϋπόθεση το χλωρογενικό οξύ ανιχνεύθηκε ως τα κύριο φαινολικό οξύ σε όλες τις εγχύσεις *Sideritis scardica*. Επιπλέον, το έγχυμα περιέχει μέταλλα όπως κάλιο (K), φώσφορο (P), ασβέστιο (Ca), μαγνήσιο (Mg), νάτριο (Na) και σίδηρο (Fe). Η περιεκτικότητα σε ανόργανα άλατα στα αφεψήματα τσαγιού *Sideritis scardica* ποικίλλει ανάλογα με το μέρος του φυτού που χρησιμοποιείται για το έγχυμα. Τα αφεψήματα έχουν την υψηλότερη περιεκτικότητα σε ανόργανα άλατα ακολουθούμενη από άνθη, εναέρια μέρη και φύλλα. Οι φαινολικές ενώσεις που ανιχνεύθηκαν ανήκουν σε διαφορετικές κατηγορίες όπως, φαινυλαιθανοειδείς γλυκοσίδες, φλαβονοειδή-7-Ο-διγλυκοσίδες, φλαβονοειδή ακετυλογλυκοσίδες και υδροξυκιναμικά οξέα (Irakli et al., 2018).

2.8.2 Λειτουργικές ιδιότητες του *Sideritis scardica*

1. Αντιοξειδωτική δράση

Το τσάι *Sideritis scardica* είναι πλούσιο σε βιοδραστικές ενώσεις όπως φαινολικά οξέα και φλαβονοειδή, που παρουσιάζουν αντιοξειδωτικές ιδιότητες. Αυτές οι ενώσεις βοηθούν στην απομάκρυνση των επιβλαβών ελεύθερων ριζών στο σώμα, μειώνοντας έτσι το οξειδωτικό στρες και προστατεύοντας τα κύτταρα από βλάβες.

2. Αντιφλεγμονώδεις επιδράσεις

Το τσάι *Sideritis scardica* χρησιμοποιείται παραδοσιακά για τις αντιφλεγμονώδεις ιδιότητές του. Μπορεί να βοηθήσει στη μείωση της φλεγμονής στο σώμα και στην ανακούφιση των συμπτωμάτων των φλεγμονωδών καταστάσεων.

3. Αντιμικροβιακές και Αντιβακτηριακές Ιδιότητες

Μελέτες έχουν δείξει ότι τα είδη *Sideritis*, συμπεριλαμβανομένου του *Sideritis scardica*, διαθέτουν αντιμικροβιακές και αντιβακτηριακές δράσεις. Αυτές οι ιδιότητες μπορεί να βοηθήσουν στην καταπολέμηση διαφόρων παθογόνων μικροοργανισμών και στην προαγωγή της συνολικής υγείας.

4. Νευροπροστατευτικές επιδράσεις

Εκχυλίσματα *Sideritis scardica* έχουν αναφερθεί ότι παρουσιάζουν νευροπροστατευτικά αποτελέσματα, καθιστώντας τα δυνητικά ευεργετικά για καταστάσεις που σχετίζονται με τη γνωστική λειτουργία και τη μνήμη. Αυτό θα μπορούσε να είναι ιδιαίτερα χρήσιμο στη διαχείριση της νευροεκφυλιστικής νόσου (Irakli et al., 2018).

3. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

3.1 Σκοπός

Σκοπός του πειράματος είναι να μελετηθεί η συμβιωτική καλλιέργεια βακτηρίων και ζυμών που αποτελούν το μικροβίωμα της kombucha και τα μεταβολικά προϊόντα της ζύμωσης χρησιμοποιώντας τέσσερα διαφορετικά συστήματα ζύμωσης με βάση το χαρουπόμελο και τσάι *Sideritis scardica*. Το συγκεκριμένο εργαστηριακό πείραμα είχε στόχο τη μελέτη των μεταβολικών προϊόντων ζύμωσης σε διαφορετικές αναλογίες συστατικών υποστρώματος χρησιμοποιώντας το ίδιο SCOBY για την παρασκευή kombucha. Η μελέτη των μικροοργανισμών μέσω της καλλιέργειας έγινε με δειγματοληψία στο SCOBY και στον ζωμό της kombucha. Για την ανάλυση των μεταβολικών προϊόντων χρησιμοποιήθηκαν διάφορες τεχνικές. Οι μικροβιολογικές και χημικές αναλύσεις έγιναν σε όλα τα συστήματα, σε τρία διαφορετικά στάδια κατά τη διάρκεια της ζύμωσης της kombucha. Οι αναλύσεις στα τρία διαφορετικά χρονικά στάδια διεξήχθησαν ώστε να μελετηθούν οι διαφορές στα ποιοτικά και ποσοτικά χαρακτηριστικά των μικροοργανισμών, των μεταβολικών προϊόντων και των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών της kombucha κατά την εξέλιξη της ζύμωσης.

3.2 Υλικά και Μέθοδοι

3.2.1 Παρασκευή τσαγιών kombucha

Τα συστατικά που χρησιμοποιήθηκαν για την συνταγή τσαγιού kombucha ήταν:

- Πράσινο τσάι



Εικόνα 3.1

- Τσάι του βουνού



Εικόνα 3.2

- Χαρουπόμελο



Εικόνα 3.3

- Κρυσταλλική ζάχαρη



Εικόνα 3.4

- Εμφιαλωμένο νερό "Ζαγόρι"

- SCOBY “kombuchaorganic” , της εταιρίας www.kombuchaorganic.uk



Εικόνα 3.5

Εξοπλισμός που χρησιμοποιήθηκε:

ποτήρια ζέσεως 1L	ύαλος αναδεύσεως	διηθητικό χαρτί	μαχαίρι
ογκομετρικός κύλινδρος 1L	κουταλάκια	ζυγός ακριβείας EW KERN	λαβίδα
φούρνος μικροκυμάτων	αποστειρωμένα βάζα	γκαζάκι	θάλαμος Βιοασφάλειας class II

Πίνακας 3.1: Εξοπλισμός για την παρασκευή τσαγιών kombucha στο εργαστήριο



Εικόνα 3.6: Ζυγός ακριβείας EW KERN



Εικόνα 3.7: Θάλαμος Βιοασφάλειας class II

3.2.1.1 Παρασκευή διαλύματος πράσινου τσαγιού-κρυσταλλικής ζάχαρης

Για την παρασκευή ζαχαρούχου τσαγιού kombucha, το διάλυμα τσαγιού πρέπει να περιέχει 10% ζάχαρη και η αναλογία scoby/διάλυμα τσαγιού πρέπει να είναι 25gr scoby/250ml διαλύματος τσαγιού, σύμφωνα με την βιβλιογραφία. Η αναλογία πράσινο τσάι/νερό, πρέπει να είναι 4 φακελάκια πράσινο τσάι/1L νερό, σύμφωνα με τις οδηγίες του παρασκευαστή πράσινου τσαγιού.

Αρχικά, θερμάνθηκαν 2L εμφιαλωμένο νερό μέχρι τη θερμοκρασία βρασμού σε ένα ποτήρι ζέσεως. Στη συνέχεια προστέθηκαν 8 φακελάκια πράσινο τσάι και αφέθηκαν να εκχυλιστούν για 3 λεπτά στο βραστό νερό. Ζυγίστηκαν στον ζυγό ακριβείας 200gr κρυσταλλική ζάχαρη και διαλύθηκε στα 2L τσάι. Αφού η θερμοκρασία του διαλύματος επήλθε σ θερμοκρασία δωματίου, το τσάι μοιράστηκε σε 6 αποστειρωμένα βάζα σε ποσότητα 320ml.

Στον ζυγό ακριβείας, ζυγίστηκαν 31-34gr scoby από το scoby-δείγμα 1 και προστέθηκε σε 4 διαφορετικά βάζα που περιείχαν διάλυμα τσαγιού-ζαχαρης με όγκο ίσο με 320ml. Επομένως, ονομάστηκαν τα βάζα με τη νέα kombucha Δ1(1), Δ1(2), Δ1(3), Δ1(4).

Σκεπάστηκαν όλα τα βάζα με διηθητικό χαρτί και αφέθηκαν για 10 ημέρες ώστε να πραγματοποιηθεί ζύμωση για την παρασκευή kombucha και την ανάπτυξη του scoby.



Εικόνα 3.8: Παρασκευασμένα τσάγια kombucha με ζάχαρη και πράσινο τσάι

3.2.1.2 Παρασκευή συστημάτων τσαγιού kombucha με χαρουπόμελο, ζάχαρη, sideritis και πράσινο τσάι

Οι υπολογισμοί των αναλογιών για το κάθε συστατικό έγιναν με βάση τα 250ml διαλύματος.

Δείγμα	Ζάχαρη(gr)	Χαρουπόμελο(gr)	Πράσινο τσάι(ml)	Τσάι sideritis(ml)	SCOBY(gr)
Δ1	22,5	2,5	25,0	225,0	25,0
Δ2	2,5	22,5	125,0	125,0	25,0
Δ3	12,5	12,5	225,0	25,0	25,0
Δ4	12,5	12,5	25,0	225,0	25,0

Πίνακας 3.2: Ποσότητες συστατικών για την παρασκευή 4 συστημάτων kombucha με χαρουπόμελο και τσάι sideritis

Τα συστήματα ονομάστηκαν ως εξής:

Δ1 (10%CS+50%Sid)
Δ2 (90%CS+50%Sid)
Δ3 (50%CS+10%Sid)
Δ4 (50%CS+90%Sid)

Πίνακας 3.3: Ονομασία δειγμάτων

CS: χαρουπόμελο, Sid: τσάι sideritis

Υπολογίστηκε, ότι για να παρασκευαστούν 8 συστήματα kombucha (2 δείγματα από το κάθε σύστημα), θα έπρεπε σε κάθε διάλυμα τσαγιού kombucha να προστεθούν 25gr scoby-δείγμα 1. Ζυγίστηκαν στο ζυγό ακριβείας 25gr scoby-δείγμα 1 για το κάθε σύστημα.



Εικόνα 3.9: Ζύγιση των scoby



Εικόνα 3.10: Ζύγιση των scoby

Παρασκευή διαλύματος πράσινου τσαγιού: ζυγίστηκε στον ζυγό ακριβείας σε ποτήρι ζέσεως του 1L , 1L εμφιαλωμένο νερό. Στη συνέχεια θερμάνθηκε το νερό μέχρι τους 100°C και βυθίστηκαν σε αυτό 5 φακελάκια πράσινου τσαγιού για 3 λεπτά, σύμφωνα με τις οδηγίες του παρασκευαστή. Το διάλυμα τσαγιού αφέθηκε να κρυώσει σε θερμοκρασία δωματίου.

Παρασκευή διαλύματος sideritis: ζυγίστηκαν στον ζυγό ακριβείας σε ποτήρι ζέσεως του 1L, 1L εμφιαλωμένο νερό ζαγόρι. Στη συνέχεια θερμάνθηκε το νερό μέχρι τους 100°C και βυθίστηκαν σε αυτό 5 φακελάκια τσάι sideritis για 6' σύμφωνα με τις οδηγίες του παρασκευαστή. Το διάλυμα τσαγιού αφέθηκε να κρυώσει σε θερμοκρασία δωματίου.



Εικόνα 3.11: Προετοιμασία των υποστρωμάτων για την παρασκευή των συστημάτων kombucha

Στο θάλαμο Βιοασφάλειας class II σε συνθήκες αποστείρωσης, ζυγίστηκαν στον ζυγό ακριβείας διαφορετικές ποσότητες χαρουπόμελου, σύμφωνα με τους υπολογισμούς.

Δείγμα	Χαρουπόμελο (gr)
Δ1 (10%CS+50%Sid)	2,5
Δ2 (90%CS+50%Sid)	22,5
Δ3 (50%CS+10%Sid)	12,5
Δ4 (50%CS+90%Sid)	12,5

Πίνακας 3.4: Ποσότητες χαρουπέμελου που ζυγίστηκαν για την παρασκευή των 4 τεσσάρων συστημάτων kombucha

Επίσης, ζυγίστηκαν στον ζυγό ακριβείας, στον θάλαμο Βιοασφάλειας class II σε συνθήκες αποστείρωσης, κρυσταλλική ζάχαρη για το κάθε σύστημα ξεχωριστά, σύμφωνα με τους υπολογισμούς.

Δείγμα	Ζάχαρη (gr)
Δ1 (10%CS+50%Sid)	22,5
Δ2 (90%CS+50%Sid)	2,5
Δ3 (50%CS+10%Sid)	12,5
Δ4 (50%CS+90%Sid)	12,5

Πίνακας 3.5: Ποσότητες ζάχαρης που ζυγίστηκαν για την παρασκευή των 4 τεσσάρων συστημάτων kombucha

Αφού ζυγίστηκαν όλες οι ποσότητες από το κάθε συστατικό και παρασκευάστηκαν τα διαλύματα τσαγιών, αναμείχθηκαν τα συστατικά στις κατάλληλες αναλογίες και μεταφέρθηκαν σε αποστειρωμένα βάζα, για την παρασκευή των 4 διαφορετικών συστημάτων επί δύο φορές. Για το κάθε σύστημα παρασκευάστηκαν 2 δείγματα των 250ml. Στη συνέχεια, προστέθηκαν 25gr scoby σε κάθε σύστημα ώστε να ξεκινήσει η ζύμωση για την παρασκευή της kombucha. Το κάθε αποστειρωμένο βάζο καλύφθηκε με αλουμινόχαρτο.



Εικόνα 3.12: Προσθήκη του scoby σε κάθε σύστημα

Ο χρόνος παρασκευής των συστημάτων ορίστηκε ως **t=0d**.

Το κάθε σύστημα παρασκευάστηκε διπλές φορές και ονομάστηκαν ως εξής:

Δ1(α) (10%CS+50%Sid) Δ1(β) (10%CS+50%Sid)	Δ3 (α)(50%CS+10%Sid) Δ3(β) (50%CS+10%Sid)
Δ2(α) (90%CS+50%Sid) Δ2(β) (90%CS+50%Sid)	Δ4(α) (50%CS+90%Sid) Δ4(β) (50%CS+90%Sid)

Πίνακας 3.6: Ονομασίες διπλών συστημάτων kombucha



Εικόνα 3.13: Παρασκευασμένα συστήματα kombucha Δ1 (10%CS+50%Sid), Δ2 (90%CS+50%Sid), Δ3 (50%CS+10%Sid), Δ4 (50%CS+90%Sid)

3.2.2 Μικροβιολογική ανάλυση

Υλικά και εξοπλισμός που χρησιμοποιήθηκαν:

PCA	MRS Agar	πιπέτα	θάλαμος Βιοασφάλειας class II
Yeast broth	Enrichment medium	τιπς	δοκιμαστικοί σωλήνες
CCA	απιονισμένο νερό	κλίβανος αποστείρωσης	στατό
τρυβλία πέτρι	βάζα αποστείρωσης	φούρνος μικροκυμάτων	κλίβανος αποστείρωσης
υδατόλουτρο	κλίβανος επώασης	ζυγός ακριβείας EW KERN	κουταλάκια
σακούλες stomacher	ποτήρι ζέσεως 1L	αραιωτικό υγρό	κυκλοαναδευτήρας vortex
δοχεία απαέρωσης dispenser	ογκομετρικός κύλινδρος 1L	ύαλος αναδεύσεως	stomacher

Πίνακας 3.7: Υλικά και εξοπλισμός των μικροβιολογικών αναλύσεων



Εικόνα 3.14: Διάφορα υποστρώματα που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή τρυβλίων

3.2.2.1 Προετοιμασία υποστρωμάτων

Υποστρώματα	Μικροοργανισμοί
Plate Count Agar (PCA)	Ολική μικροβιακή χλωρίδα (ΟΜΧ)
Man Rogosa Sharpe agar (MRS Agar)	LAB
Yeast broth	Ζύμες
Enrichment medium	AAB
Calcium carbonate agar (CCA)	AAB

Πίνακας 3.8: Υποστρώματα και μικροοργανισμοί που αναπτύσσονται σε αυτά

1. **Plate Count Agar (PCA), γενικό υπόστρωμα για ολική μικροβιακή χλωρίδα (ΟΜΧ)**

Ζυγίστηκαν στον ζυγό ακριβείας **11,75gr PCA** και αναμίχθηκαν με **500 ml απιονισμένο νερό** σε ποτήρι ζέσεως. Για την ομογενοποίηση του μίγματος τοποθετήθηκε το ποτήρι ζέσεως πολλαπλές φορές για 1 λεπτό στον φούρνο μικροκυμάτων με συνεχή ανάδευση ώστε το μίγμα να γίνει διαυγές.

2. **Man Rogosa Sharpe agar (MRS Agar)**

Ζυγίστηκαν στον ζυγό ακριβείας:

26,12gr MRS

7,5gr άγαρ

500ml απιονισμένο νερό

Στη συνέχεια τα στερεά συστατικά διαλύθηκαν στα 500ml απιονισμένου νερού σε ποτήρι ζέσεως. Για την ομογενοποίηση του μίγματος το ποτήρι ζέσεως τοποθετήθηκε πολλαπλές φορές για 1λεπτό στον φούρνο μικροκυμάτων με συνεχή ανάδευση ώστε το μίγμα να γίνει διαυγές.

3. Yeast broth

Ζυγίστηκαν στον ζυγό ακριβείας:

2,4gr peptic digest animal tissue

1,5gr yeast extract

1,5gr malt extract

20gr dextrose

7,5gr agar

500ml απιονισμένο νερό

Στη συνέχεια όλα τα παραπάνω στερεά συστατικά διαλύθηκαν στα 500ml απιονισμένου νερού. Για την ομογενοποίηση του μίγματος το ποτήρι ζέσεως τοποθετήθηκε πολλαπλές φορές για 1λεπτό στον φούρνο μικροκυμάτων με συνεχή ανάδευση ώστε το μίγμα να γίνει διαυγές.

4. Enrichment medium

Στον ζυγό ακριβείας ζυγίστηκαν:

7,5gr πεπτόνη

4gr yeast extract

5gr δεξτρόζη

2,5gr αιθανόλη

5gr οξικό οξύ

0,05gr κυκλοεξαμίδιο

500ml απιονισμένο νερό

Όλα αυτά προστέθηκαν στα 500ml απιονισμένο νερό σε ποτήρι ζέσεως. Αναδεύτηκαν μέχρι να γίνει διαυγές το μίγμα. Στη συνέχεια μετρήθηκε το pH του διαλύματος με το pHmeter GLP21. Το αρχικό pH ήταν 4,3. Προστέθηκε υδροχλωρικό οξύ 2M ώστε το pH να φτάσει 3,51 σύμφωνα με το πρωτόκολλο.

5. Calcium carbonate agar (CCA)

Ζυγίστηκαν στον ζυγό ακριβείας οι παρακάτω ποσότητες συστατικών:

10gr γλυκόζη

4gr extract

3.5gr calcium carbonate

2.5gr αιθανόλη

2.5gr πεπτόνη

6gr άγαρ

500ml απιονισμένο νερό

Στη συνέχεια όλα τα παραπάνω στερεά συστατικά διαλύθηκαν στα 500ml απιονισμένου νερού. Για την ομογενοποίηση του μίγματος, το ποτήρι ζέσεως τοποθετήθηκε πολλαπλές φορές για 1λεπτό στον φούρνο μικροκυμάτων με συνεχή ανάδευση ώστε το μίγμα να γίνει διαυγές.

Όλα τα παραπάνω υποστρώματα μεταφέρθηκαν σε βάζα αποστείρωσης και τοποθετήθηκαν στον κλίβανο αποστείρωσης για 45 λεπτά.

3.2.2.2 Προετοιμασία τρυβλίων για μικροβιολογικό έλεγχο για OMX, LAB, ζύμες, AAB στο αρχικό δείγμα kombucha-scoby Δ1

- Προετοιμασία δειγμάτων kombucha σε σακούλα stomacher

Στον ζυγό ακριβείας, σε σακούλα stomacher μεταφέρθηκαν 99ml από το αραιωτικό υγρό και 12,80gr από το δείγμα Δ1 kombucha (scoby και υγρό).

Στη συνέχεια έγινε ανάδευση στο stomacher για την ομογενοποίηση του δείγματος. Σακούλα stomacher Δ1(10⁻¹).

- Αραιώσεις δειγμάτων

Για τις αραιώσεις των δειγμάτων προστέθηκαν σε μία ογκομετρική φιάλη των 1000ml, απιονισμένο νερό <1000ml και 1,25ml από το μητρικό υγρό (αραιωτικό υγρό). Με τη βοήθεια του dispenser μεταφέρθηκαν 9 ml από αυτό το διάλυμα σε ογκομετρικούς σωλήνες. Από τη σακούλα stomacher, αραιώση Δ1 (10⁻¹), μεταφέρθηκαν με πιπέτα 1ml διαλύματος σε δοκιμαστικό σωλήνα Δ1 (10⁻²) και με

τον ίδιο τρόπο έγιναν διαδοχικές αραιώσεις μέχρι την τάξη 10^{-4} .

$\Delta 1 10^{-1}$ (σακούλα)->1ml σε δοκιμαστικό σωλήνα -> $\Delta 1 10^{-2}$ ->1ml σε δοκιμαστικό σωλήνα-> $\Delta 1 10^{-3}$ -> 1ml σε δοκιμαστικό σωλήνα -> $\Delta 1 10^{-4}$.

Όλοι οι δοκιμαστικοί σωλήνες περιείχαν 9ml αραιωτικό υγρό.

Οι παραπάνω διεργασίες έγιναν υπό συνθήκες αποστείρωσης στον θάλαμο Βιοασφάλειας class II.



Εικόνα 3.15: Σακούλα stomacher

- *Παρασκευή τρυβλίων*

Για την παρασκευή τρυβλίων για την μέτρηση των ζυμών και των AAB, έγινε επιφανειακή επίστρωση των μικροοργανισμών σε κάθε ένα τρυβλίο υπό συνθήκες αποστείρωσης γύρω από φλόγα, σε τρυβλία που περιείχαν yeast broth και CCA, αντίστοιχα. Για την επίστρωση των μικροοργανισμών μεταφέρθηκαν με πιπέτα 0,1ml μικροοργανισμών από τα σωληνάκια στα τρυβλία για την κάθε αραιώση. Τα υποστρώματα πριν την επίστρωσή των μικροοργανισμών, είχαν τοποθετηθεί σε τρυβλία στον θάλαμο Βιοασφάλειας class II και παρέμειναν λίγα λεπτά εκεί μέχρι την στερεοποίησή τους. Προστέθηκαν περίπου 5ml σε κάθε τρυβλίο από το ανάλογο υπόστρωμα.



Εικόνα 3.16: Επίστρωση μικροοργανισμών σε τρυβλία

Για την μέτρηση των LAB και των OMX έγινε ενσωμάτωση των μικροοργανισμών σε κάθε ένα τρυβλίο υπό συνθήκες αποστείρωσης στον θάλαμο Βιοασφάλειας class II, σε τρυβλία που περιείχαν MRS και PCA, αντίστοιχα. Από τα σωληνάκια με τις διαδοχικές αραιώσεις μεταφέρθηκαν 1ml μικροοργανισμών με τη βοήθεια πιπέτας στο τρυβλίο που αντιστοιχεί στην κάθε αραιώση και στη συνέχεια στο κάθε τρυβλίο προστέθηκαν περίπου 5ml από το ανάλογο υπόστρωμα.

- Εμπλουτισμός AAB με το υπόστρωμα Enrichment medium Σε δοκιμαστικούς σωλήνες προστέθηκαν 7ml Enrichment medium και στη συνέχεια αφού αποστειρώθηκαν στον κλίβανο για 45 λεπτά, προστέθηκαν με τη βοήθεια πιπέτας 3ml δείγμα από τη σακούλα stomacher $\Delta 1(10^{-1})$.



Εικόνα 3.17: Δοκιμαστικός σωλήνας με *enrichment medium* , μετά την επώαση, με την χαρακτηριστική εμφάνιση μεμβράνης (βακτηριακή κυτταρίνη) που παράγεται από τα οξικά βακτήρια

- Επώαση δειγμάτων

Μικροοργανισμοί	Θερμοκρασία(°C)	Χρόνος (ώρες)
ζύμες	30	48-72
AAB, <i>enrichment medium</i>	30	48-72
LAB	37	37
OMX	36,4	24

Πίνακας 3.9: Χρόνος και θερμοκρασία επώασης των μικροοργανισμών (ζύμες, AAB, LAB, OMX)

*Τα τρυβλία με το υπόστρωμα MRS τοποθετήθηκαν σε δοχεία απαέρωσης με ειδικά φίλτρα απορρόφησης του οξυγόνου.



Εικόνα 3.18: MRS τρυβλία στον κλίβανο επώασης

3.2.2.3 Προετοιμασία τρυβλίων δειγμάτων Δ1 (10%CS+50%Sid) ,Δ2 (90%CS+50%Sid) ,Δ3 (50%CS+10%Sid), Δ4 (50%CS+90%Sid) για τους μικροβιολογικούς ελέγχους AAB, LAB, OMX, ζύμες

Ορίστηκαν 3 χρονικά σημεία για τους μικροβιολογικούς ελέγχους της kombucha (scoby+broth) στα νέα συστήματα Δ1 (10%CS+50%Sid), Δ2 (90%CS+50%Sid), Δ3 (50%CS+10%Sid), Δ4 (50%CS+90%Sid)

ημέρα 0: 0d

6^η μέρα: 6d

ημέρα 12: 12d

- Προετοιμασία δειγμάτων για μικροβιολογικό έλεγχο, $t=0d$

Αραιώσεις δειγμάτων

Στον ζυγό ακριβείας, ζυγίστηκαν σε σακούλες stomacher 1gr scoby και 1ml υγρό kombucha από κάθε δείγμα Δ1(α) (10%CS+50%Sid)+ Δ1(β) (10%CS+50%Sid) Δ2(α) (90%CS+50%Sid)+

$\Delta 2(\beta)$ (90%CS+50%Sid), $\Delta 3(\alpha)$ (50%CS+10%Sid)+ $\Delta 3(\beta)$ (50%CS+10%Sid),

$\Delta 4(\alpha)$ (50%CS+90%Sid)+ $\Delta 4(\beta)$ (50%CS+90%Sid)

, άρα συνολικά 4gr δειγματος από κάθε δείγμα και προστέθηκαν 40ml αραιωτικό υγρό σε κάθε σακούλα. Στη συνέχεια ακολούθησε η διαδικασία για τις αραιώσεις για το κάθε δείγμα.

$\Delta 10^{-1}$ (σακούλα)->1ml σε δοκιμαστικό σωλήνα -> $\Delta 10^{-2}$ ->1ml σε δοκιμαστικό σωλήνα-> $\Delta 10^{-3}$ -> 1ml σε δοκιμαστικό σωλήνα -> $\Delta 10^{-4}$

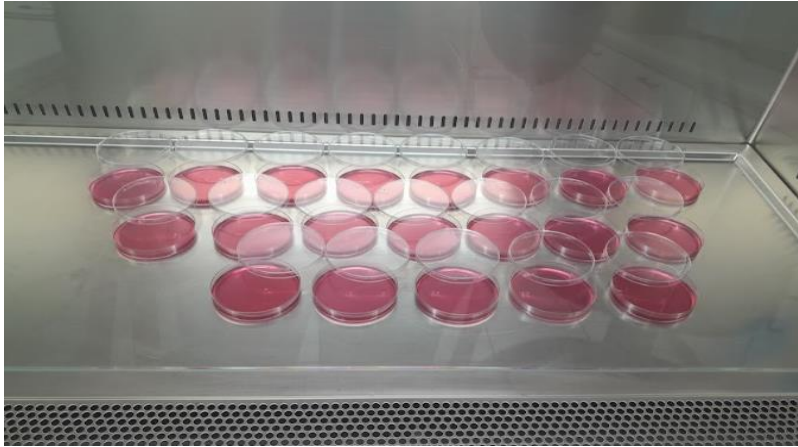
Αραιώσεις:

$\Delta 1(10\%CS+50\%Sid)$	$\Delta 2(90\%CS+50\%Sid)$	$\Delta 3(50\%CS+10\%Sid)$	$\Delta 4(50\%CS+90\%Sid)$
10^{-1}	10^{-1}	10^{-1}	10^{-1}
10^{-2}	10^{-2}	10^{-2}	10^{-2}
10^{-3}	10^{-3}	10^{-3}	10^{-3}
10^{-4}	10^{-4}	10^{-4}	10^{-4}

Πίνακας 3.10: Αραιώσεις δειγμάτων για τις μικροβιολογικές αναλύσεις

- *Παρασκευή τρυβλίων*

Ακολούθησαν η επίστρωση για ζύμες και AAB και ο εμβολιασμός για OMX και LAB των τρυβλίων χρησιμοποιώντας υποστρώματα yeast extract, CCA και PCA, MRS, αντίστοιχα. Ο τρόπος επίστρωσης και εμβολιασμού καθώς και οι ποσότητες μικροοργανισμών ήταν οι ίδιες όπως στην παράγραφο 3.2.2.2.



Εικόνα 3.19: Τρυβλία πέτρι μετά από ενσωμάτωση μικροοργανισμών στο θάλαμος Βιοασφάλειας class II

- Επώαση στον κλίβανο επώασης

<i>Μικροοργανισμοί</i>	<i>Θερμοκρασία(°C)</i>	<i>Χρόνος (ώρες)</i>
ζύμες	30	48-72
AAB	30	48-72
LAB	37	37
OMX	36,4	24

Πίνακας 3.11: Χρόνος και θερμοκρασία επώασης των μικροοργανισμών (ζύμες, AAB, LAB, OMX)

Η ίδια μεθοδολογία για την προετοιμασία των τρυβλίων των δειγμάτων Δ1(10%CS+50%Sid) Δ2 (90%CS+50%Sid), Δ3 (50%CS+10%Sid), Δ4 (50%CS+90%Sid) για τους μικροβιολογικούς ελέγχους των AAB, LAB, OMX, ζυμών, εφαρμόστηκε σε όλα τα στάδια για t=0,6,12d.

3.2.3 Χημικές αναλύσεις

3.2.3.1 Διαύγαση δειγμάτων

Υλικά και εξοπλισμός που χρησιμοποιήθηκαν:

falcon	φυγόκεντρος mrc scientific instruments	φίλτρο cellulose nitrate filter 0,45μm
ZnSO4 5%	σιφώνιο	πουάρ
Ba(OH)2 0,3N	αντλία κενού	βάζα αποστείρωσης με πώμα

Πίνακας 3.12: Υλικά και εξοπλισμός που χρησιμοποιήθηκαν για την διαύγαση των δειγμάτων



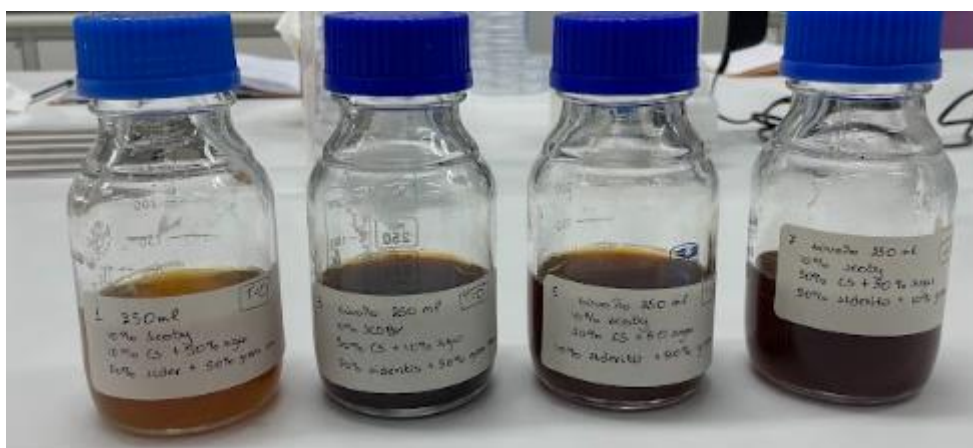
Εικόνα 3.20: Φυγόκεντρος mrc scientific instruments

Για να πραγματοποιηθούν οι χημικές αναλύσεις για κάθε δείγμα χρειάστηκε να γίνει διαύγαση όλων των δειγμάτων.

Δείγματα προς διαύγαση, περιέχουν το καθένα 120ml broth kombucha:

Δ1 (10%CS+50%Sid) t=0	Δ1 (10%CS+50%Sid) t=6	Δ1 (10%CS+50%Sid) t=12
Δ2 (90%CS+50%Sid) t=0	Δ2 (90%CS+50%Sid) t=6	Δ2 (90%CS+50%Sid) t=12
Δ3 (50%CS+10%Sid) t=0	Δ3 (50%CS+10%Sid) t=6	Δ3 (50%CS+10%Sid) t=12
Δ4 (50%CS+90%Sid) t=0	Δ4 (50%CS+90%Sid) t=6	Δ4 (50%CS+90%Sid) t=12

Πίνακας 3.13: Δείγματα προς διαύγαση



Εικόνα 3.21: Δείγματα Δ1 (10%CS+50%Sid), Δ2 (90%CS+50%Sid), Δ3 (50%CS+10%Sid), Δ4 (50%CS+90%Sid) που περιέχουν broth πριν την διαύγαση

- **Φυγοκέντρηση**

Κάθε δείγμα χωρίστηκε σε 3 falcon σε ποσότητες των 40ml. Σε κάθε falcon με τα 40ml δείγματος, προστέθηκαν με σιφώνιο 5ml $ZnSO_4$ 5% και 5ml $Ba(OH)_2$ 0,3N. Τα δείγματα ανακινήθηκαν και αφέθηκαν για 5 λεπτά σε κατάσταση ηρεμίας. Μετά από 5 λεπτά, τα δείγματα ανακινήθηκαν ξανά και αφέθηκαν σε κατάσταση ηρεμίας για άλλα 5 λεπτά. Τα falcon μεταφέρθηκαν στην φυγόκεντρο για 10 λεπτά στα 3500 RPM. Μετά την φυγοκέντρηση σχηματίστηκε ίζημα σε κάθε δείγμα. Με την βοήθεια ενός σιφωνίου μεταφέρθηκε το υπερκείμενο υγρό του κάθε δείγματος σε βάζο

αποθήκευσης. Η διαδικασία αυτή απομάκρυνε ένα μέρος στερεών σωματιδίων, πρωτεϊνών, από τα δείγματα.



Εικόνα 3.22: Δείγματα σε falcon πριν την φυγοκέντρηση



Εικόνα 3.23: Δημιουργία ιζήματος μετά την φυγοκέντρηση



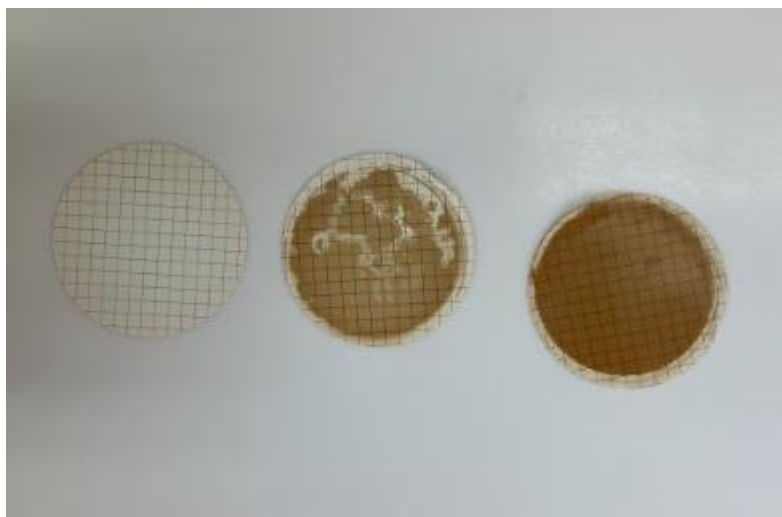
Εικόνα 3.24: Δημιουργία ιζήματος μετά την φυγοκέντρηση

- *Φιλτράρισμα*

Για την πλήρη διαύγαση των δειγμάτων, φιλτραρίστηκε το κάθε δείγμα σε συνθήκες κενού με την βοήθεια αντλίας κενού και φίλτρου. Το φίλτρο απομάκρυνε τα υπολείμματα του ιζήματος που παρέμειναν μετά την φυγοκέντρηση.



Εικόνα 3.25: Φιλτράρισμα δειγμάτων με αντλία κενού



Εικόνα 3.26: Φίλτρο πριν και μετά το φιλτράρισμα

3.2.3.2 Προσδιορισμός του ολικού φαινολικού περιεχομένου με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu

Υλικά και εξοπλισμός που χρησιμοποιήθηκαν:

απιονισμένο νερό	πιπέτα	τιτς
αντιδραστήριο Folin -Ciocalteu	κορεσμένο διάλυμα Na_2CO	φασματοφωτόμετρο Ηελιος ε Thermo Spectronic
κυψελίδες 4ml	υδατόλουτρο	eppendorf

Πίνακας 3.14: Υλικά και εξοπλισμός που χρησιμοποιήθηκαν για την μέθοδο Folin-Ciocalteu



Εικόνα 3.27: Φασματοφωτόμετρο Ηελιος ε, Thermo Spectronic

Σε κάθε κυψελίδα μεταφέρθηκαν με τη βοήθεια πιπέτας

-20μL δείγματος kombucha (Δ1 (10%CS+50%Sid) t=0, Δ2 (90%CS+50%Sid) t=0κλπ)

-2,5mL απιονισμένο νερό

-200μL αντιδραστήριο Folin -Ciocalteu

Στη συνέχεια ανακινήθηκαν οι κυψελίδες και έμειναν στο σκοτάδι για 8 λεπτά.

Έπειτα, προστέθηκαν σε κάθε κυψελίδα με την βοήθεια πιπέτας 500μL Na_2CO_3 και ανακινήθηκαν. Οι κυψελίδες τοποθετήθηκαν σε υδατόλουτρο στους 40°C για 30 λεπτά.

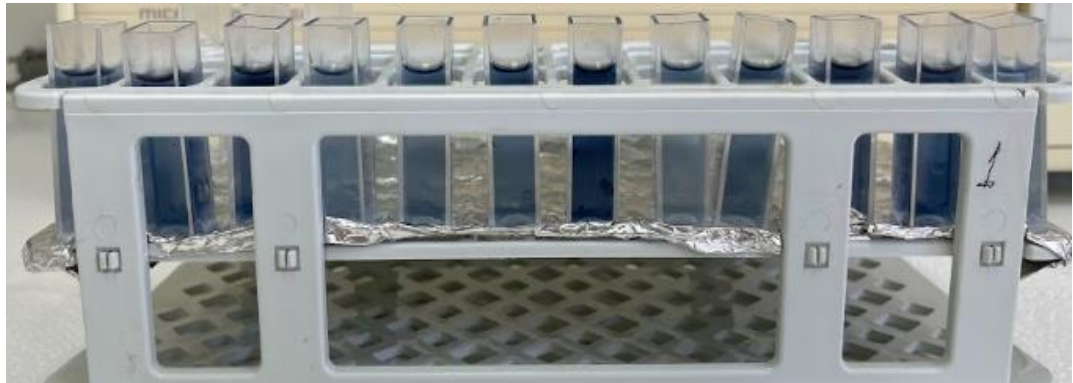
Για τα blank δείγματα προστέθηκαν σε κάθε κυψελίδα όλα τα αντιδραστήρια εκτός από το δείγμα.

Όλα τα δείγματα παρασκευάστηκαν επί 3 φορές.

Η μέτρηση του ολικού φαινολικού περιεχομένου έγινε με τη μέθοδο της φασματοφωτομετρίας με τη βοήθεια του οργάνου Ηελιος ε Thermo Spectronic, στα 750nm. Αρχικά τοποθετήθηκε στο φασματοφωτόμετρο η κυψελίδα που περιείχε μόνο απιονισμένο νερό για να μηδενιστεί το όργανο και στη συνέχεια τοποθετήθηκαν με τη σειρά όλες οι υπόλοιπες κυψελίδες ώστε να καταγραφούν οι μετρήσεις, δηλαδή η απορρόφηση του κάθε δείγματος (Andreou et al., 2018).

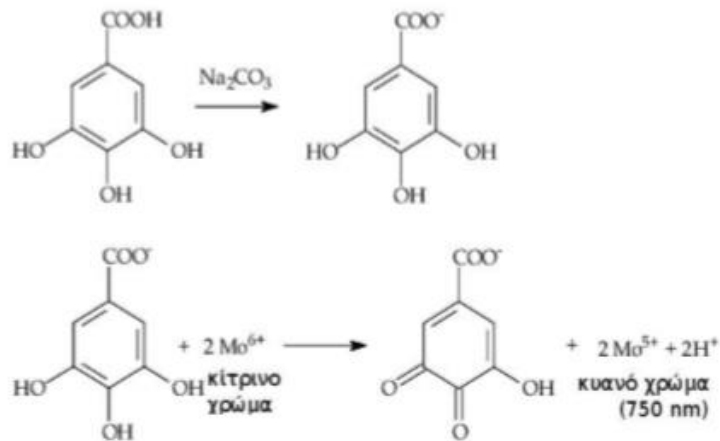
Σε ορισμένα δείγματα χρειάστηκε να γίνουν αραιώσεις $\frac{1}{2}$ ώστε οι τιμές απορρόφησης να μην ξεπερνούν τα όρια. Οι αραιώσεις έγιναν σε erpendorf , το πρωτόκολλο folin ήταν το ίδιο με τη διαφορά ότι προστέθηκε 50% δείγματος και 50% απιονισμένο νερό, δηλαδή 1ml δείγματος και 1ml νερό.

Αραίωση έγινε στα δείγματα: Δ2 (90%CS+50%Sid) t=0, Δ3 (50%CS+10%Sid) t=0, Δ2 (90%CS+50%Sid) t=6, Δ2 (90%CS+50%Sid) t=12, Δ3 (50%CS+10%Sid) t=12.



Εικόνα 3.28: Κυψελίδες μετά την παραμονή τους στο υδατόλουτρο

Το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu αποτελείται από άλατα του μολυβδαινίου (Mo) και του βολφραμίου (W). Σε αλκαλικό περιβάλλον, η φαινολική ένωση οξειδώνεται και το αντιδραστήριο ανάγεται προς οξείδια που έχουν το χαρακτηριστικό κυανό χρώμα του πεντασθενούς μολυβδαινίου. Η ένταση του χρώματος είναι ανάλογη του φαινολικού περιεχομένου, η συγκέντρωση του οποίου εκφράζεται σε ισοδύναμα ενός επιλεγμένου προτύπου.



Εικόνα 3.29: Αντίδραση του γαλλικού οξέος με το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu μέσω μηχανισμού μεταφοράς ηλεκτρονίων

3.2.3.3 pH

Η μέτρηση του pH έγινε με τη βοήθεια του οργάνου pH METER GLP 21 CRISON σε όλα τα δείγμα kombucha του πειράματος. Αρχικά, έγινε καλιμπράρισμα του οργάνου με τη βοήθεια δύο ρυθμιστικών διαλυμάτων, με pH 4 και pH 7. Πριν τη μέτρηση pH του κάθε δείγματος το ηλεκτρόδιο του οργάνου ξεπλένεται με απιονισμένο νερό για να μην επηρεάσει τις μετρήσεις. Οι μετρήσεις επαναλήφθηκαν 3 φορές για κάθε δείγμα.



Εικόνα 3.30: Καλιμπράρισμα οργάνου pH METER GLP 21 CRISO

3.2.3.4 Μέτρηση Αλκοόλης

Η μέτρηση της αλκοόλης έγινε με τη βοήθεια του οργάνου Alcohol and extract meter Alex 500, Anton Paar, σε όλα τα δείγματα που έχουν υποστεί διαύγαση. Το συγκεκριμένο όργανο μετράει επίσης πυκνότητα, real extract και original extract. Η αιθανόλη εκφράζεται σε %v/v, η πυκνότητα σε g/cm², το original extract σε °Plato και το real extract σε %w/w. Το real extract αναφέρεται στα διαλυτά στερεά συστατικά του διαλύματος, συμπεριλαμβανομένων των υπολειμμάτων σακχάρων και άλλων μη ζυμώσιμων συστατικών, ενώ το original extract αναφέρεται στα διαλυτά στερεά συστατικά. Οι μετρήσεις επαναλήφθηκαν 3 φορές για κάθε δείγμα, ενώ έχει προηγηθεί καθαρισμός με απιονισμένο νερό και καλιμπράρισμα του οργάνου.



Εικόνα 3.31: Alcohol and extract meter, Alex 500 Anton Paar

3.2.3.5 Μέτρηση χρώματος

Η μέτρηση χρώματος έγινε με τη βοήθεια του χρωματόμετρου Precision colorimeter NR110, σε όλα τα δείγματα που έχουν υποστεί διαύγαση.



Εικόνα 3.32: Χρωματόμετρο Precision colorimeter NR110



Εικόνα 3.33: Μέτρηση χρώματος δειγμάτων με το χρωματόμετρο Precision colorimeter NR110

Το χρωματόμετρο τοποθετείται πάνω σε κάθε δείγμα το οποίο βρίσκεται μέσα σε τρυβλίο πέτρι, λόγω του ότι βρίσκεται σε υγρή μορφή (20ml δείγμα). Το τρυβλίο πρέπει να βρίσκεται πάνω σε λευκό χαρτί για να μην επηρεάζονται οι μετρήσεις. Η μέτρηση έγινε σε 3

διαφορετικά σημεία στην επιφάνεια του δείγματος. Οι παράμετροι που μετράει το χρωματόμετρο σύμφωνα με το σύστημα CIE ($L^*a^*b^*$) είναι οι L^*, a^*, b^*, h, c .

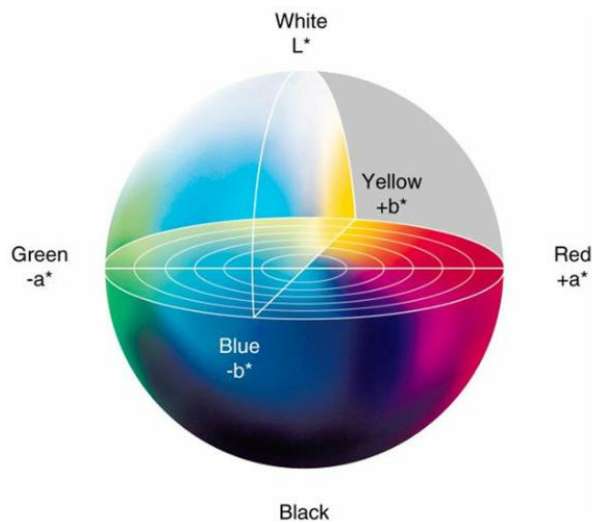
- L^* κατακόρυφος άξονας, με τιμές φωτεινότητας 0–100 (μαύρο έως απόλυτο λευκό)

- a^* οριζόντιος άξονας $-a^*/+a^*$, αρνητικές τιμές ($-a^*$): πράσινο και θετικές τιμές ($+a^*$): κόκκινο

- b^* οριζόντιος άξονας $-b^*/+b^*$, αρνητικές τιμές ($-b^*$): μπλε και θετικές τιμές ($+b^*$):κίτρινο

-χρώμα (c): μετρά τον κορεσμό ή την ένταση του χρώματος.

-απόχρωση (h): μετρά τον τύπο του χρώματος ως προς τη γωνία, υποδεικνύοντας ποιο χρώμα φαίνεται να είναι (Robertson, 1977).



Εικόνα 3.34: Σύστημα CIE ($L^*a^*b^*$) χρωματόμετρο Precision colorimeter NR110 (Cortez et al., 2017)

3.2.3.6 Μέτρηση ολικών στερεών

Η μέτρηση των ολικών στερεών δηλαδή του ειδικού βάρους (specific gravity S.G.), των σακχάρων ($^{\circ}$ Brix) και των στερεών διαλυτών συστατικών ($^{\circ}$ Plato) έγινε με τη βοήθεια του οργάνου Handheld density meter DMA 35 , Anton Paar. Το ειδικό βάρος ορίζεται ως ο λόγος της πυκνότητας του δείγματος προς την πυκνότητα του νερού, στην ίδια θερμοκρασία. Τα Plato αντιπροσωπεύουν το ποσοστό του βάρους του διαλύματος που αποτελείται από διαλυμένα στερεά, τα οποία συνήθως περιλαμβάνουν σάκχαρα, αλλά μπορεί επίσης να περιλαμβάνουν και άλλες ουσίες όπως άλατα και οξέα.

Τα Brix είναι μια άλλη κλίμακα που χρησιμοποιείται για τη μέτρηση της συγκέντρωσης των διαλυμένων στερεών σε ένα υγρό και πιο συγκεκριμένα αντιπροσωπεύει το ποσοστό κατά βάρος σακχαρόζης σε ένα διάλυμα.

Το όργανο διαθέτει ένα σωληνάκι με το οποίο προσροφά μια ποσότητα δείγματος και στο

τέλος της κάθε μέτρησης γίνεται έκπλυση του σωληνακίου με απιονισμένο νερό ώστε να μην επηρεαστεί η επόμενη μέτρηση. Η κάθε μέτρηση στο δείγμα έγινε από 3 φορές.



Εικόνα 3.35: Handheld density meter DMA 35, Anton Paar



Εικόνα 3.36: Μέτρηση των ολικών στερεών των δειγμάτων με το Handheld density meter DMA 35, Anton Paar

4. Αποτελέσματα-Συζήτηση

Υποθέσαμε ότι αρκετές βιοχημικές ιδιότητες θα αλλάξουν κατά τη διάρκεια της ζύμωσης μαζί με τις αλλαγές στις κοινότητες ζυμών και βακτηρίων. Τα πειραματικά δεδομένα που ελήφθησαν από τις μικροβιολογικές και χημικές αναλύσεις καταγράφηκαν για τις τρεις χρονικές περιόδους (t=0, t=6, t=12) κατά την διάρκεια της ζύμωσης του τσαγιού kombucha. Τα αποτελέσματα θα συζητηθούν και θα αξιολογηθούν με βάση την βιβλιογραφία ώστε να διεξαχθούν συμπεράσματα

4.1 Χημικές Αναλύσεις

4.1.1 Προσδιορισμός ολικού φαινολικού περιεχομένου (Total Phenolic Content, TPC) - Μέθοδος Folin-Ciocalteu

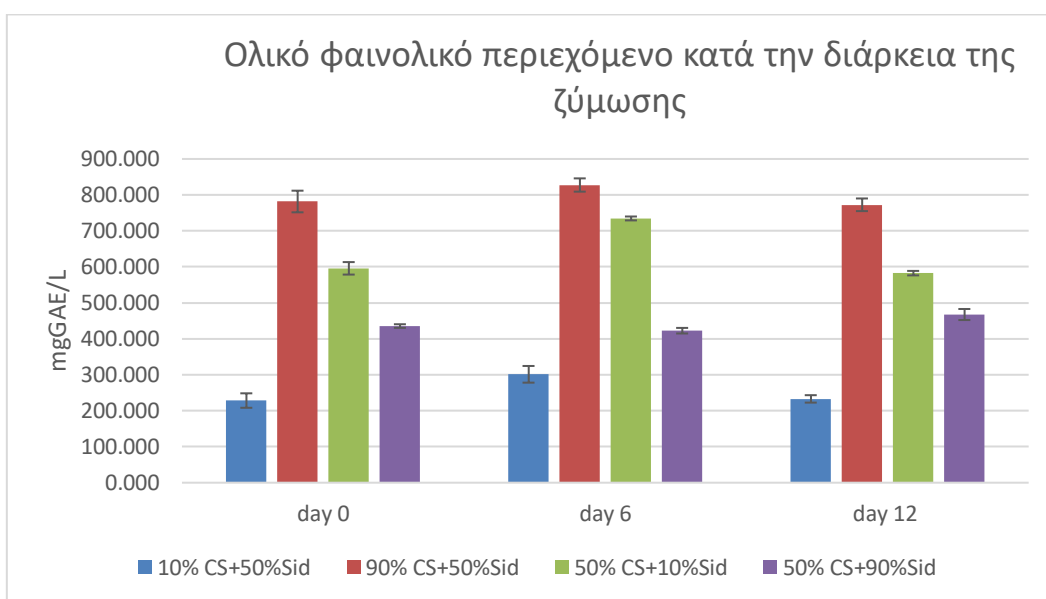
Οι φαινολικές ενώσεις στην kombucha υφίστανται ενδιαφέρουσες αλλαγές κατά τη διαδικασία της ζύμωσης. Η παρουσία των φαινολικών ενώσεων στα τέσσερα διαφορετικά συστήματα τσαγιού kombucha που παρασκευάστηκαν στο εργαστήριο, Δ1 (10%CS+50%Sid), Δ2 (90%CS+50%Sid), Δ3 (50%CS+10%Sid), Δ4 (50%CS+90%Sid), οφείλεται στο πράσινο τσάι, στο χαρουπόμελο και στο τσάι *Sideritis scardica*, σύμφωνα με την βιβλιογραφία.

Δείγματα	C average (mg/L)		C average (mg/L)		C average (mg/L)	
	day 0	SD	day 6	SD	day 12	SD
Δ1 (10%CS+50%Sid)	228,375	20,10	301,292	23,15	232,958	10,325
Δ2 (90%CS+50%Sid)	781,750	30,07	827,583	18,41	772,583	17,599
Δ3 (50%CS+10%Sid)	595,917	17,36	734,625	5,40	582,583	6,236
Δ4 (50%CS+90%Sid)	435,458	5,03	422,542	7,73	467,542	15,355

Πίνακας 4.1: Αριθμητικά δεδομένα από την μέτρηση απορρόφησης με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu.

CS: carob syrup, Sid: τσάι sideritis

Στον ΠΙΝΑΚΑ 4.1 αναγράφονται τα αριθμητικά δεδομένα για το κάθε σύστημα. Πιο συγκεκριμένα η συγκέντρωση των ολικών φαινολικών συστατικών (C average) και η αντίστοιχη τυπική απόκλιση (SD). Η συγκέντρωση εκφράζεται σε mg φαινολικών συστατικών/ L τσαγιού kombucha. Για το κάθε σύστημα έγιναν οι μετρήσεις της απορροφήσεως, την ημέρα 0, την ημέρα 6 και την ημέρα 12 της ζύμωσης, ώστε να μελετηθούν οι μεταβολές της συγκέντρωσης του ολικού φαινολικού περιεχομένου κατά τη διάρκεια της ζύμωσης.



Γράφημα 4.1: Ολικό φαινολικό περιεχόμενο όλων των συστημάτων κατά τη διάρκεια της ζύμωσης. CS: carob syrup, Sid: τσάι sideritis

Στο ΓΡΑΦΗΜΑ 4.1, απεικονίζονται οι μεταβολές στο ολικό φαινολικό περιεχόμενο στα τρία διαφορετικά στάδια των πειραματικών μετρήσεων την ημέρα 0, την ημέρα 6 και την ημέρα 12 της ζύμωσης. Όπως φαίνεται από το ΓΡΑΦΗΜΑ 4.1, την ημέρα 0, το σύστημα Δ2 (90%CS+50%Sid) με το μεγαλύτερο ποσοστό χαρουπόμελου, έχει τη μεγαλύτερη συγκέντρωση φαινολικών συστατικών. Το σύστημα Δ1 (10%CS+50%Sid), με το μικρότερο ποσοστό χαρουπόμελου, έχει τη μικρότερη συγκέντρωση φαινολικών συστατικών. Επομένως, σύμφωνα με τα πειραματικά δεδομένα, πρωταρχικό ρόλο στην συγκέντρωση του TPC έχει το χαρουπόμελο, αμέσως μετά το πράσινο τσάι και τέλος το τσάι *Sideritis scardica*.

Παρατηρείται ότι στα συστήματα Δ1 (10%CS+50%Sid), Δ2 (90%CS+50%Sid) και Δ3 (50%CS+10%Sid), το TPC αυξάνεται την ημέρα 6 της ζύμωσης. Στο σύστημα Δ4 (50%CS+90%Sid), παρατηρείται μια μικρή μείωση του TPC την ημέρα 6 της ζύμωσης ενώ την ημέρα 12 υπάρχει μια μικρή αύξηση σε σχέση με την ημέρα 0. Επίσης, το σύστημα Δ1 (10%CS+50%Sid) έχει μεγαλύτερη συγκέντρωση TPC την ημέρα 12 σε σχέση με την ημέρα 0. Μελέτες έχουν δείξει ότι η συνολική περιεκτικότητα σε φαινολικές ουσίες μπορούν να αυξηθούν κατά τη διάρκεια της ζύμωσης. Αυτή η αύξηση της συνολικής περιεκτικότητας σε φαινολικές ενώσεις στο τσάι kombucha μπορεί να οφείλεται στην αποικοδόμηση πολύπλοκων μορίων πολυφαινολών και φλαβονοειδών του τσαγιού σε μικρότερα μόρια από ορισμένα ένζυμα που απελευθερώνονται από τη συμβιωτική καλλιέργεια βακτηρίων και ζυμών της kombucha. Μικροοργανισμοί όπως η ζύμη *Candida tropicalis* είναι γνωστό ότι είναι ικανή να αποικοδομεί διάφορες πολυφαινόλες (Chakravorty et al., 2016). Ορισμένες ενώσεις που υπάρχουν ήδη στο υπόστρωμα της kombucha μπορούν να υποστούν βιομετατροπή κατά τη διάρκεια της ζύμωσης, οδηγώντας στη δημιουργία νέων πολυφαινολών και φλαβονοειδών. Επιπλέον, ένας λόγος για την αποικοδόμηση αυτών των ενώσεων θα μπορούσε να είναι η απελευθέρωση κατεχινών από ευαίσθητα στο οξύ μικροβιακά κύτταρα, που οδηγεί σε διακυμάνσεις στις συγκεντρώσεις τους κατά τη ζύμωση (Jayabalan et al., 2007). Εκτός από τον προσδιορισμό της επίδρασης μεμονωμένων στελεχών στα φαινολικά συστατικά της kombucha, είναι απαραίτητος ο προσδιορισμός της επίδρασης των φαινολικών ενώσεων στη μικροβιακή δραστηριότητα (Antolak et al., 2021). Στα συστήματα Δ2 (90%CS+50%Sid) και Δ3 (50%CS+10%Sid) την ημέρα 12 της ζυμώσεως, το TPC μειώνεται σε σχέση με το αρχικό TPC της ημέρας 0.

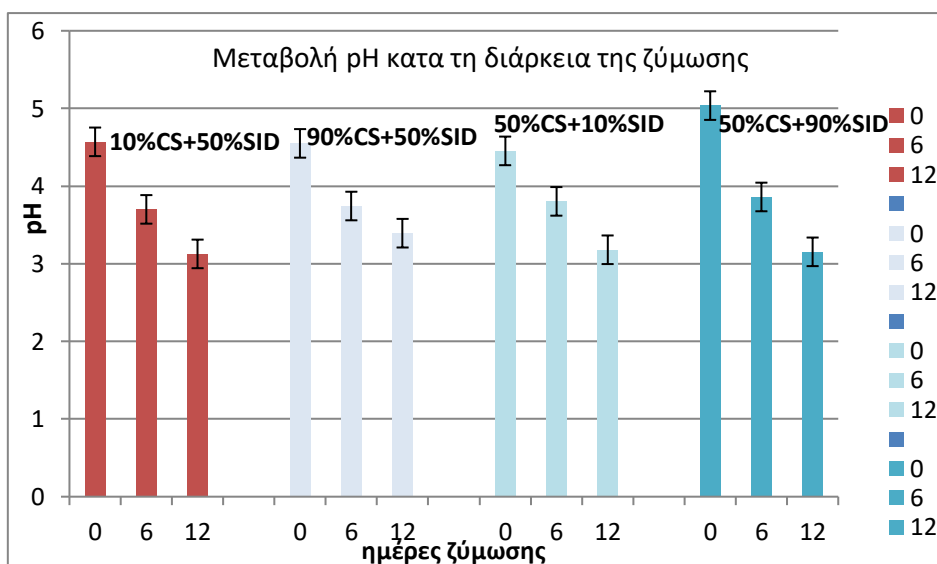
Ορισμένες φαινολικές ενώσεις, μπορούν να οξειδωθούν σε διαφορετικές μορφές κατά τη διάρκεια της ζύμωσης, αλλάζοντας ενδεχομένως το προφίλ πολυφαινόλης του υποστρώματος και μειώνοντας έτσι το ποσοστό του TPC (Hoon et al., 2014). Σύμφωνα με την πειραματική μελέτη των Jayabalan et al., 2007, η αποικοδόμηση των κατεχινών του πράσινου τσαγιού, συμπεριλαμβανομένων των ισομερών της επικατεχίνης, παρατηρήθηκε κατά τη διάρκεια της διαδικασίας ζύμωσης. Αυτές οι κατεχίνες αποικοδομούνται μέχρι ένα ορισμένο σημείο κατά τη διάρκεια της ζύμωσης, με επακόλουθη αύξηση της συγκέντρωσης που παρατηρήθηκε τις επόμενες ημέρες της ζύμωσης (Jayabalan et al., 2007).

4.1.2 pH

Κατά την εξέλιξη της ζύμωσης στην kombucha, το pH μειώνεται. Ορισμένα από τα οργανικά οξέα (οξικό και γλυκονικό) που παράγονται από τα AAB, τα LAB και τις ζύμες κατά τη διαδικασία της ζύμωσης έχουν επίδραση στην μείωση του pH.

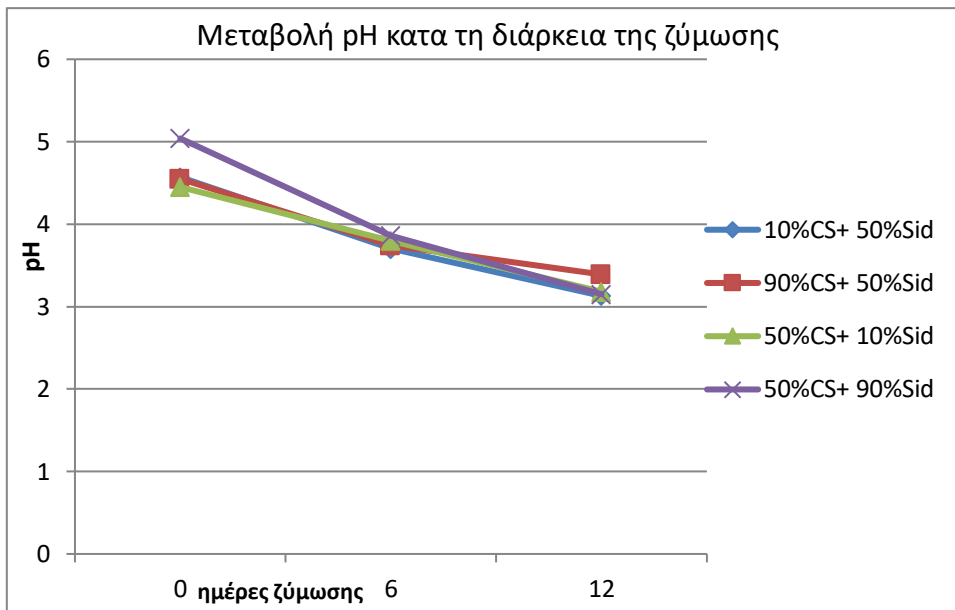
ημέρες	Δ1 (10%CS+50%Sid)	Δ2 (90%CS+50%Sid)	Δ3 (50%CS+10%Sid)	Δ4 (50%CS+90%Sid)
0	4,57	4,55	4,45	5,04
6	3,7	3,74	3,8	3,86
12	3,13	3,39	3,18	3,15

Πίνακας 4.2 CS: carob syrup, Sid: τσάι sideritis



Γράφημα 4.2: CS: carob syrup, Sid: τσάι sideritis

Όπως παρατηρείται από το ΓΡΑΦΗΜΑ 4.2, οι τιμές του pH όλων των συστημάτων μειώθηκαν κατά τη διάρκεια της ζύμωσης. Τα πειραματικά δεδομένα των τιμών του pH συσχετίζονται με αυτά παρόμοιων μελετών (Jayabalan et al., 2007).



Γράφημα 4.2: CS: carob syrup, Sid: τσάι sideritis

Κατά τη διάρκεια της ζύμωσης τα βακτήρια και οι ζύμες μεταβολίζουν τα σάκχαρα προς τον σχηματισμό οργανικών οξέων. Λόγω του σχηματισμού των οξέων συνέβη αυτή η πτώση του pH.

Σύμφωνα με το ΓΡΑΦΗΜΑ 4.3 αρχικά το pH όλων των συστημάτων μειώθηκε πιο απότομα από την ημέρα 0 έως την ημέρα 6 σε σχέση με την ημέρα 6 έως την ημέρα 12. Αυτή η πιο αργή μεταβολή του pH, που παρατηρείται από την ημέρα 6 έως την ημέρα 12, μπορεί να συσχετιστεί με τη ρυθμιστική ικανότητα που προκύπτει από τις σχηματιζόμενες ενώσεις από τις αντιδράσεις μεταξύ των παραγόμενων οργανικών οξέων και μετάλλων του υποστρώματος (Malbaša et al., 2008).

Το σύστημα Δ4 (50%CS+90%Sid) φαίνεται να έχει υψηλότερη τιμή pH σε σχέση με τα υπόλοιπα συστήματα αν και η τιμή pH του, πλησιάζει τις τιμές pH των υπόλοιπων συστημάτων την ημέρα 12. Επίσης, για το ίδιο σύστημα, παρατηρείται ότι η τιμή pH έχει μια πιο απότομη πτώση σε σχέση με τα υπόλοιπα συστήματα από την ημέρα 0 μέχρι την ημέρα 6.

Το σύστημα Δ2 (90%CS+50%Sid), την ημέρα 12, έχει ελάχιστα πιο υψηλή τιμή pH σε σχέση με τα υπόλοιπα συστήματα. Αυτό μπορεί να οφείλεται στο ότι οι μικροοργανισμοί διαθέτοντας περισσότερο χαρουπόμελο αντί για ζάχαρη παράγουν λιγότερες ποσότητες οργανικών οξέων.

Οι τιμές pH των δειγμάτων την ημέρα 12 συμφωνούν με τις τιμές pH της βιβλιογραφίας στο

πέρας της ζύμωσης kombucha. Είναι γενικά αποδεκτό ότι το pH μιας kombucha που έχει υποστεί βέλτιστη ζύμωση, από άποψη γεύσης και ασφάλειας, θα πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ pH 2,5 και 3,5 (Nyhan et al., 2022).

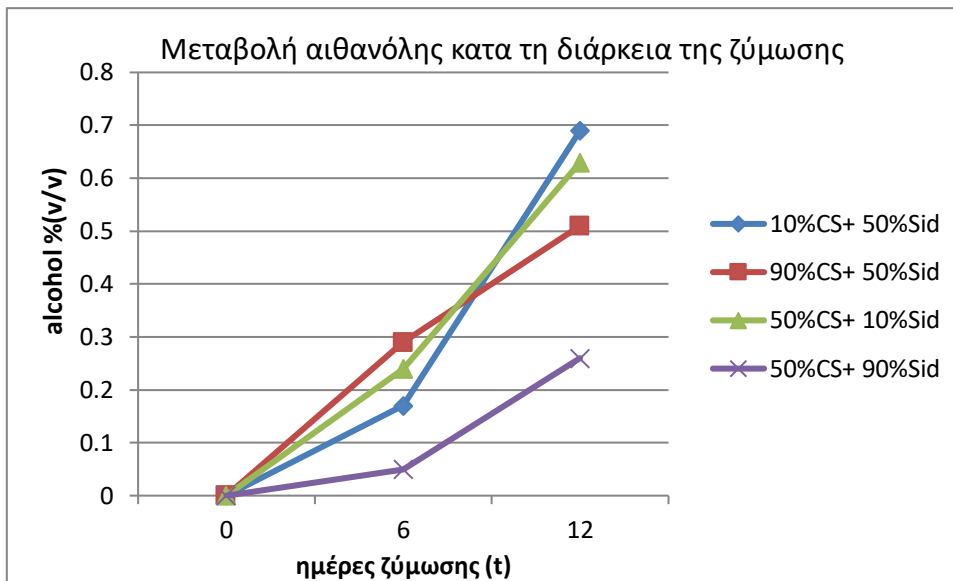
4.1.3 Αλκοόλη

Η παραγωγή αιθανόλης είναι ένα φυσικό προϊόν της διαδικασίας ζύμωσης της kombucha. Η συγκέντρωση της αυξάνεται με τον χρόνο ζύμωσης. Η αιθανόλη στην kombucha παράγεται από τις ζύμες μεταβολίζοντας τα σάκχαρα του υποστρώματος. Στη συνέχεια η αιθανόλη χρησιμοποιείται από τα βακτήρια του οξικού οξέος για τον σχηματισμό ακεταλδεΐδης και οξικού οξέος. Η παραγωγή οξικού οξέος από τα AAB διεγείρει την παραγωγή αιθανόλης από τις ζύμες. Επίσης, τα LAB είναι δυνατόν να παράγουν αιθανόλη κατά τη διάρκεια της ζύμωσης kombucha (Laureys et al., 2020) .

ημέρες	Δ1 (10%CS+ 50%Sid)	Δ2 (90%CS+ 50%Sid)	Δ3 (50%CS+ 10%Sid)	Δ4 (50%CS+ 90%Sid)
0	0	0	0	0
6	0,17	0,29	0,24	0,05
12	0,69	0,51	0,63	0,26

Πίνακας 4.3: Πειραματικά δεδομένα μετρήσεων αιθανόλης

CS: carob syrup, Sid: τσάι sideritis



Γράφημα 4.3: Μεταβολή αιθανόλης κατά τη διάρκεια της ζύμωσης

CS: carob syrup, Sid: τσάι sideritis

Στο ΓΡΑΦΗΜΑ 4.4, παρατηρείται ότι όλα τα συστήματα την ημέρα 0 είχαν 0%(v/v) αιθανόλη. Κατά τη διάρκεια της ζύμωσης, μέχρι την ημέρα 12, η αιθανόλη αυξάνεται. Η μεταβολή της αιθανόλης είναι απότομη από την ημέρα 6 έως την ημέρα 12 για τα συστήματα Δ1 (10%CS+ 50%Sid), Δ3 (50%CS+ 10%Sid), Δ4 (50%CS+ 90%Sid).

Το σύστημα Δ1 (10%CS+ 50%Sid) έχει το μεγαλύτερο ποσοστό αιθανόλης 0,69% (v/v) την ημέρα 12, ενώ το σύστημα Δ4 (50%CS+ 90%Sid) έχει το μικρότερο 0,26% (v/v). Επομένως, το σύστημα με τη μεγαλύτερη αναλογία σε ζάχαρη/χαρουπόμελο φαίνεται ότι παρήγαγε την περισσότερη συγκέντρωση σε αιθανόλη. Το σύστημα με τη μεγαλύτερη αναλογία σε τσάι *sideritis*/πράσινο τσάι, παρήγαγε τη μικρότερη συγκέντρωση αιθανόλης.

Μελέτες έχουν δείξει ότι οι μικροοργανισμοί στο ρόφημα τσαγιού kombucha προτιμούν τη σακχαρόζη ως πρωταρχικό σάκχαρο για την παραγωγή αιθανόλης. Κατά τη διαδικασία της ζύμωσης, η σακχαρόζη μετατρέπεται σε γλυκόζη και φρουκτόζη από κύτταρα ζυμομύκητα, με τη γλυκόζη να είναι η προτιμώμενη πηγή για την παραγωγή αιθανόλης. Η φρουκτόζη χρησιμοποιείται επίσης, αλλά συνήθως σε μικρότερες ποσότητες σε σύγκριση με τη γλυκόζη (Ivanišová et al., 2020). Επιπλέον, οι Cardoso et al., 2020 διαπίστωσαν ότι το πράσινο τσάι kombucha είχε μεγαλύτερο αλκοολικό περιεχόμενο 7,29 g/L έναντι του μαύρου τσαγιού 4,90 g/L (Cardoso et al., 2020).

Σύμφωνα με τους Talebi et al., 2017, σε εμπορικά προϊόντα kombucha με διαφορετικά υποστρώματα που εξετάστηκαν, βρέθηκε η συγκέντρωση αιθανόλης ότι ήταν 1,12–2,00%

(v/v) (Talebi et al., 2017). Τα πειραματικά δεδομένα στην παρούσα μελέτη δείχνουν ότι η συγκέντρωση της αιθανόλης των τεσσάρων συστημάτων είναι χαμηλή σε σχέση με άλλες πειραματικές μελέτες (Geraris Kartelias et al., 2023, Talebi et al., 2017).

4.1.4 Ολικά στερεά (Plato)/Σάκχαρα (°Brix)

Τα Plato αντιπροσωπεύουν το ποσοστό του βάρους του διαλύματος που αποτελείται από διαλυμένα στερεά, τα οποία συνήθως περιλαμβάνουν σάκχαρα, αλλά μπορεί επίσης να περιλαμβάνουν και άλλες ουσίες όπως άλατα και οξέα. Τα Brix είναι μια άλλη κλίμακα που χρησιμοποιείται για τη μέτρηση της συγκέντρωσης των διαλυμένων στερεών σε ένα υγρό και πιο συγκεκριμένα αντιπροσωπεύει το ποσοστό κατά βάρος σακχαρόζης σε ένα διάλυμα.

ημέρες	Δ1 (10%CS+ 50%Sid)	Δ2 (90%CS+ 50%Sid)	Δ3 (50%CS+ 10%Sid)	Δ4 (50%CS+ 90%Sid)
0	7,9	6,2	7,1	7
6	7,4	5,4	6,4	6,8
12	5,8	4,1	4,8	5,8

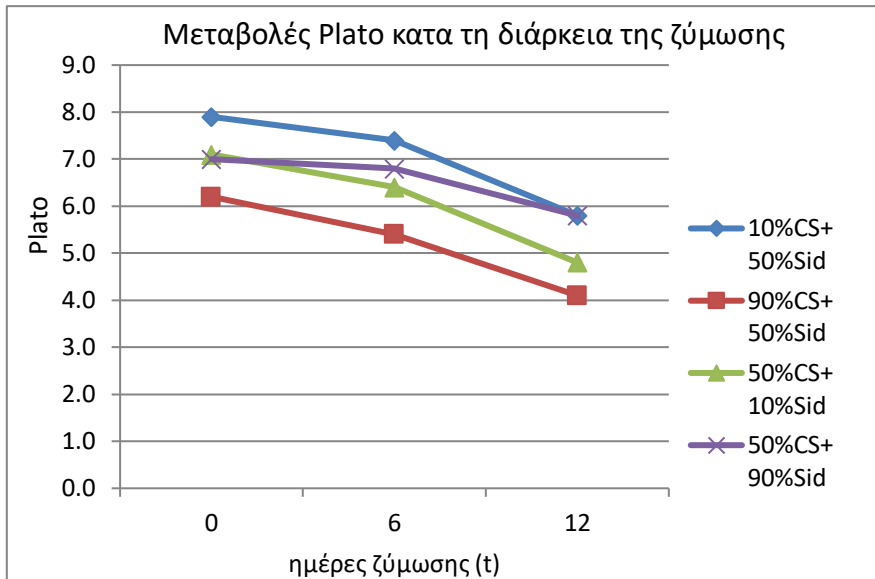
Πίνακας 4.4: Πειραματικά δεδομένα αναλύσεων Plato

CS: carob syrup, Sid: τσάι sideritis

ημέρες	Δ1 (10%CS+ 50%Sid)	Δ2 (90%CS+ 50%Sid)	Δ3 (50%CS+ 10%Sid)	Δ4 (50%CS+ 90%Sid)
0	7,9	6,2	7,1	7
6	7,4	5,3	6,4	6,8
12	5,7	4,1	4,9	5,8

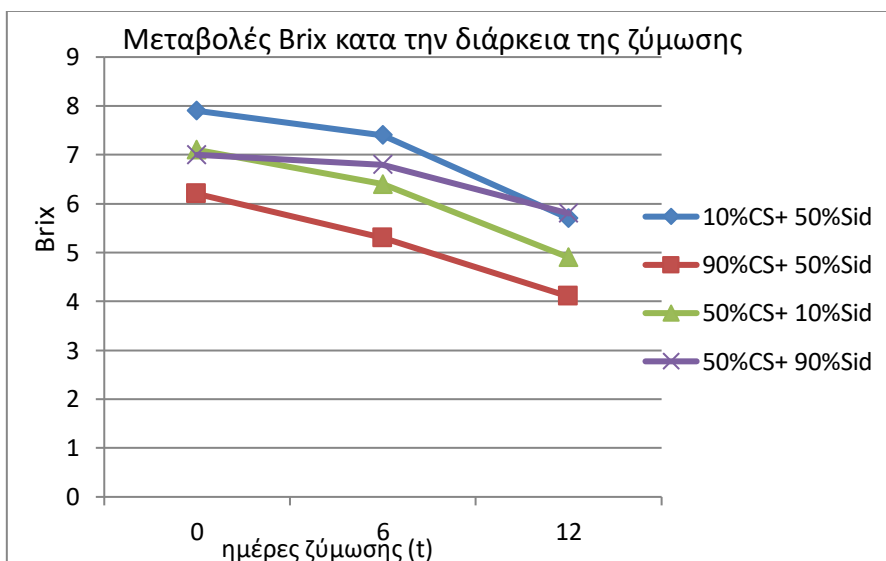
Πίνακας 4.5: Πειραματικά δεδομένα αναλύσεων Brix

CS: carob syrup, Sid: τσάι sideritis



Γράφημα 4.4: Μεταβολές Plato κατά τη διάρκεια της ζύμωσης

CS: carob syrup, Sid: τσάι sideritis



Γράφημα 4.5: Μεταβολές Brix κατά τη διάρκεια της ζύμωσης

CS: carob syrup, Sid: τσάι sideritis

Όπως φαίνεται στο ΓΡΑΦΗΜΑ 4.5 και στο ΓΡΑΦΗΜΑ 4.6, οι τιμές των Plato και Brix μειώνονται κατά τη διάρκεια της ζύμωσης. Τα σάκχαρα στο μέσο ζύμωσης χρησιμοποιούνται ως πηγή άνθρακα για την ανάπτυξη των κυττάρων μικροοργανισμών, εκτός από τις μεταβολικές διεργασίες που παράγουν κυτταρίνη και μεταβολίτες με τη

μορφή συγκεκριμένων οργανικών οξέων. Οι μεταβολές των Brix και Plato κατά τη διάρκεια της ζύμωσης συμφωνούν με την βιβλιογραφία (Geraris Kartelias et al., 2023).

Οι αρχικές τιμές την ημέρα 0, Brix και Plato είναι ίδιες για τα τέσσερα συστήματα ξεχωριστά. Οι τιμές την ημέρα 12 των Δ2 (90%CS+ 50%Sid) και Δ4 (50%CS+ 90%Sid) είναι ίδιες, ενώ οι τιμές των Δ1 (10%CS+ 50%Sid) και Δ3 (50%CS+ 10%Sid) διαφέρουν κατά 0,1. Αυτό, μπορεί να οφείλεται στο ότι τα διαλυτά στερεά συστατικά των συστημάτων είναι κυρίως σακχαρόζη. Είναι λογικό το σύστημα Δ1 (10%CS+ 50%Sid) να έχει την υψηλότερη τιμή Brix την ημέρα 0 και το σύστημα Δ2 (90%CS+ 50%Sid) να έχει την χαμηλότερη. Αυτό συμβαίνει επειδή το χαρουπόμελο εκτός από σακχαρόζη αποτελείται σε μικρότερο ποσοστό από φρουκτόζη και γλυκόζη.

Το σύστημα Δ4 (50%CS+ 90%Sid) δείχνει να έχει την μικρότερη μεταβολή Brix και Plato σε σχέση με τα υπόλοιπα συστήματα. Σε αυτό μπορεί να οφείλεται το μεγαλύτερο ποσοστό τσάι *sideritis* αντί πράσινου τσαγιού που βρίσκεται στο υπόστρωμα. Η χρήση του πράσινου τσαγιού στη ζύμωση kombucha αναφέρεται κυρίως ως πηγή αζώτου και μετάλλων για τους μικροοργανισμούς στην kombucha.

4.1.5 Χρώμα

Το χρώμα των συστημάτων διέπεται από χημικές, βιοχημικές, μικροβιακές και φυσικές αλλαγές που συμβαίνουν κατά την διάρκεια της ζύμωσης (Pathare et al., 2013). Κατά τη διάρκεια της ζύμωσης ενός τσαγιού kombucha, διάφοροι παράγοντες μπορούν να επηρεάσουν τις αλλαγές στα αισθητηριακά χαρακτηριστικά όπως το χρώμα. Αυτοί οι παράγοντες περιλαμβάνουν τις διακυμάνσεις της θερμοκρασίας, τα επίπεδα pH, τους τύπους του υποστρώματος που χρησιμοποιείται, τον χρόνο ζύμωσης και τη σύνθεση της μικροβιακής κοινοπραξίας που συμμετέχει στη διαδικασία ζύμωσης. Η θερμοκρασία και το pH μπορούν να επηρεάσουν την παραγωγή φαινολικών ενώσεων και οργανικών οξέων, τα οποία μπορούν να επηρεάσουν το χρώμα του τελικού προϊόντος. Επιπλέον, οι παραλλαγές στο υπόστρωμα που χρησιμοποιείται για τη ζύμωση μπορεί επίσης να οδηγήσουν σε διαφορές στο χρώμα λόγω της παρουσίας διαφορετικών θρεπτικών ουσιών και βιοδραστικών ενώσεων (Villarreal-Soto et al., 2018).

Για τον υπολογισμό της μεταβολής του χρώματος κατά τη διάρκεια της ζύμωσης για το κάθε σύστημα ξεχωριστά μετρήθηκαν οι παράμετροι L*(lightness), a*(redness) b*(yellowness) και χρησιμοποιήθηκε ο τύπος (Pathare et al., 2013):

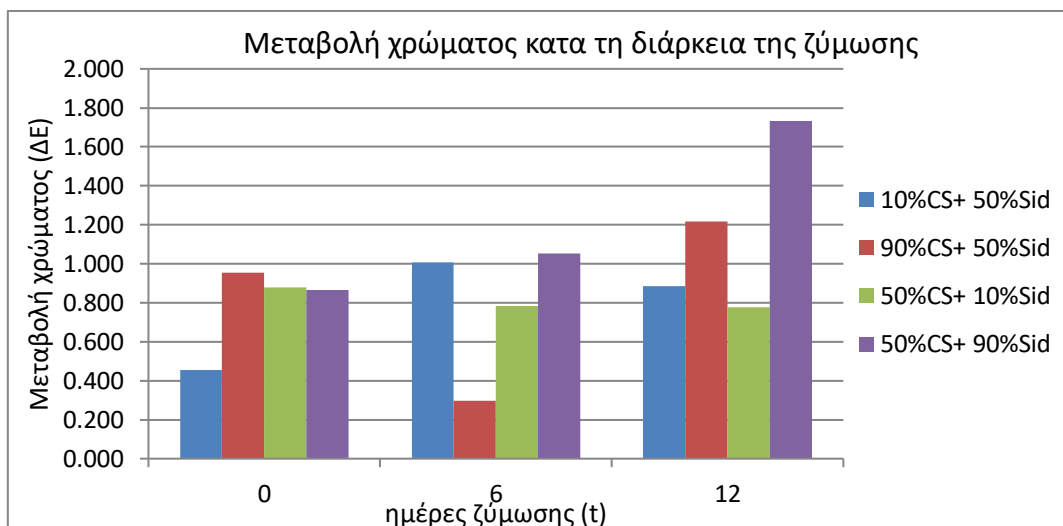
$$\Delta E^*_{ab} = \sqrt{(L^*_{2} - L^*_{1})^2 + (a^*_{2} - a^*_{1})^2 + (b^*_{2} - b^*_{1})^2}$$

Μεταβολή χρώματος ΔE*	Δ1 (10%CS+ 50%Sid)	Δ2 (90%CS+ 50%Sid)	Δ3 (50%CS+ 10%Sid)	Δ4 (50%CS+ 90%Sid)
ΔE* _{0d-6d}	0,454	0,956	0,880	0,864883
ΔE* _{6d-12d}	1,007	0,296	0,783	1,053307
ΔE* _{0d-12d}	0,885	1,217	0,777	1,731759

Πίνακας 4.6: Πειραματικά δεδομένα μεταβολής χρώματος

CS: carob syrup, Sid: τσάι sideritis

Τα δείγματα την ημέρα 0, θεωρήθηκαν ως δείγματα αναφοράς (control) για τις μεταβολές του χρώματος κατά την διάρκεια της ζύμωσης μέχρι και την ημέρα 12.



Γράφημα 4.6: Μεταβολή χρώματος κατά τη διάρκεια της ζύμωσης

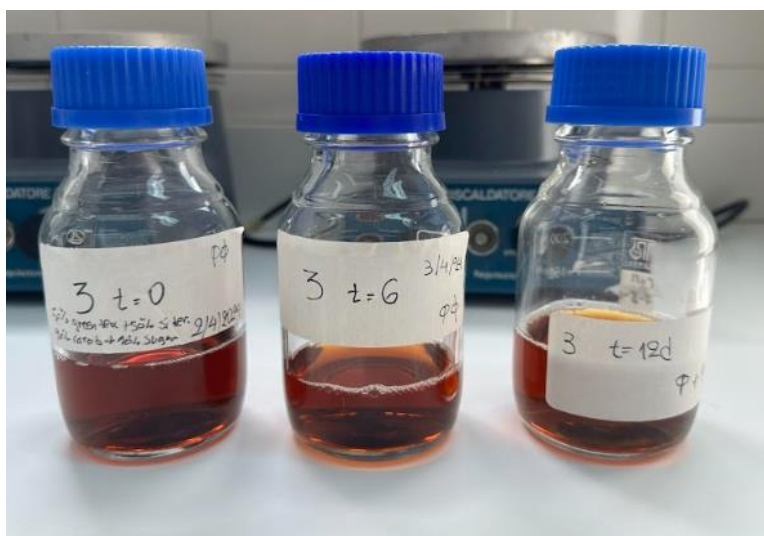
CS: carob syrup, Sid: τσάι sideritis

Στο ΓΡΑΦΗΜΑ 4.7, παρατηρείται ότι σε όλα τα συστήματα υπήρξε μεταβολή χρώματος κατά τη διάρκεια της ζύμωσης. Την ημέρα 0, φαίνεται ότι το δείγμα Δ1 (10%CS+ 50%Sid)

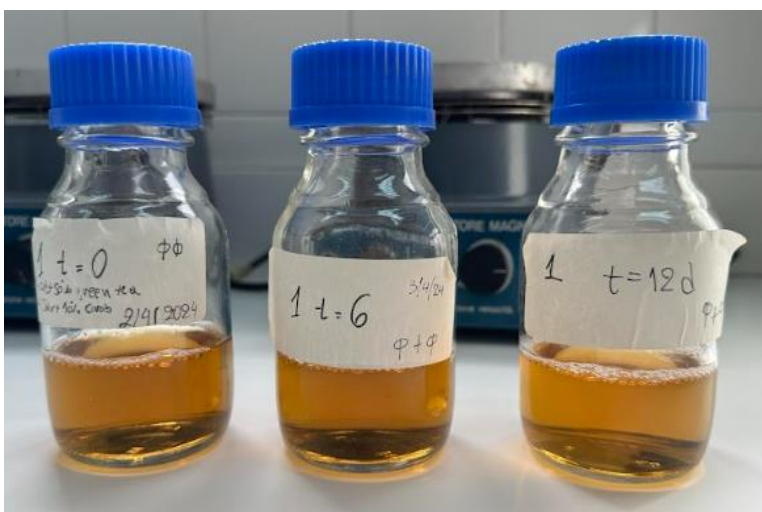
έχει πιο ανοιχτό χρώμα σε σχέση με τα υπόλοιπα δείγματα. Ακολουθούν με τη σειρά το δείγμα

Δ4 (50%CS+ 90%Sid), Δ3 (50%CS+ 10%Sid) και Δ2 (90%CS+ 50%Sid). Επομένως το δείγμα με το περισσότερο χαρουπόμελο Δ2 (90%CS+ 50%Sid) είναι το πιο σκούρο και το δείγμα με το λιγότερο Δ1 (10%CS+ 50%Sid) το πιο ανοιχτόχρωμο. Η παρουσία φαινολικών ενώσεων, μετάλλων, οξέων και σακχάρων από τους λοβούς του χαρουπιού συμβάλλει στο συνολικό χρώμα του διαλύματος (Hanousek Čiča et al., 2020). Επίσης, από τα δεδομένα συμπεραίνεται ότι το πράσινο τσάι έχει πιο σκούρο χρώμα από το τσάι *sideritis*. Το σκούρο χρώμα οφείλεται στην υψηλή συγκέντρωση των φαινολικών ενώσεων που περιέχεται σε κάθε συστατικό (Yatmaz & Turhan, 2018). Την ημέρα 6, υπάρχει μια απότομη μεταβολή στο χρώμα του δείγματος Δ2 (90%CS+ 50%Sid) το οποίο γίνεται πιο ανοιχτόχρωμο. Απότομη μεταβολή γίνεται και στο χρώμα του δείγματος Δ1 (10%CS+ 50%Sid), το οποίο σχεδόν διπλασιάζεται, γίνεται πιο σκουρόχρωμο. Την ημέρα 12, παρατηρείται απότομη μεταβολή στο δείγμα Δ2 (90%CS+ 50%Sid), το χρώμα του γίνεται σχεδόν 5 φορές πιο σκούρο. Το δείγμα Δ4 (50%CS+ 90%Sid) αποκτά και αυτό πιο σκούρο χρώμα με απότομη μεταβολή χρώματος. Οι μεταβολές χρώματος στα δείγματα Δ1 (10%CS+50%Sid) και Δ3 (50%CS+ 10%Sid) είναι πιο ήπιες την ημέρα 12 και αποκτούν πιο ανοιχτό χρώμα σε σχέση με την ημέρα 6.

Η μεταβολή του χρώματος σε πιο ανοιχτό μπορεί να είναι αποτέλεσμα της διάσπασης των πολυφαινολών σε μικρότερα μόρια λόγω ενζυματικής δράσης από βακτήρια και ζυμομύκητες στο όξινο περιβάλλον της kombucha (Geraris Kartelias et al., 2023).



Εικόνα 4.1: Δείγμα Δ2 (90%CS+ 50%Sid) την ημέρα 0, ημέρα 6, ημέρα 12



Εικόνα 4.2: Δείγμα Δ1 (10%CS+ 50%Sid) την ημέρα 0, ημέρα 6, ημέρα 12

4.1.6 Ειδικό βάρος/πυκνότητα

Το ειδικό βάρος ορίζεται ως ο λόγος της πυκνότητας του δείγματος προς την πυκνότητα του νερού, στην ίδια θερμοκρασία. Η πυκνότητα του νερού στους 25°C είναι 997,0479 kg/m³ ή ~1,0 g/cm³. Η πυκνότητα ορίζεται η μάζας ενός υλικού ανά μονάδα όγκου (Βασικές αρχές Μηχανικής τροφίμων, Νικόλαος Π. Ζόγκζας).

ημέρες	Δ1 (10%CS+ 50%Sid)	Δ2 (90%CS+ 50%Sid)	Δ3 (50%CS+ 10%Sid)	Δ4 (50%CS+ 90%Sid)
0	1,0293	1,0225	1,0261	1,0258
6	1,0273	1,0192	1,0233	1,025
12	1,0209	1,0139	1,0173	1,0209

Πίνακας 4.7: Τιμές πυκνότητας (g/cm³) των δειγμάτων για την ημέρα 0, ημέρα 6, ημέρα 12

CS: carob syrup, Sid: τσάι sideritis

ημέρες	Δ1 (10%CS+ 50%Sid)	Δ2 (90%CS+ 50%Sid)	Δ3 (50%CS+ 10%Sid)	Δ4 (50%CS+ 90%Sid)
0	1,0314	1,0247	1,0282	1,0278
6	1,0294	1,0211	1,0254	1,0271
12	1,0228	1,0160	1,0193	1,023

Πίνακας 4.8: Τιμές ειδικού βάρους (g/cm³) των δειγμάτων για την ημέρα 0, ημέρα 6, ημέρα 12

CS: carob syrup, Sid: τσάι sideritis

Όπως παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των τιμών για την πυκνότητα στον ΠΙΝΑΚΑ 4.7 και ΠΙΝΑΚΑ 4.8, φαίνεται ότι οι τιμές της πυκνότητας και του ειδικού βάρους μειώνονται κατά την διάρκεια της ζύμωσης. Αυτό μπορεί να οφείλεται στο ότι κατά τη διάρκεια της ζύμωσης μεταβολίζονται τα σάκχαρα από τους μικροοργανισμούς και παράγονται διάφοροι μεταβολίτες όπως η αιθανόλη, το διοξείδιο του άνθρακα και διάφορα οργανικά οξέα. Όλα αυτά μπορεί να προκαλούν μια μείωση στην πυκνότητα και στο ειδικό βάρος (Jayabalan et al., 2014). Η συγκέντρωση των σακχάρων στα διαλύματα που μελετήθηκαν στην έρευνα των Darros-Barbosa et al., 2003, έχει σημαντικό αντίκτυπο στην πυκνότητα των διαλυμάτων. Καθώς η συγκέντρωση των σακχάρων (όπως η σακχαρόζη, η γλυκόζη και η φρουκτόζη) αυξάνεται, η πυκνότητα των διαλυμάτων τείνει επίσης να αυξάνεται (Darros-Barbosa et al., 2003). Το δείγμα Δ1 (10%CS+ 50%Sid), έχει την μεγαλύτερη πυκνότητα από τα υπόλοιπα δείγματα, σε αυτό μπορεί να συμβάλει η μεγαλύτερη περιεκτικότητα σακχαρόζης στο υπόστρωμα.

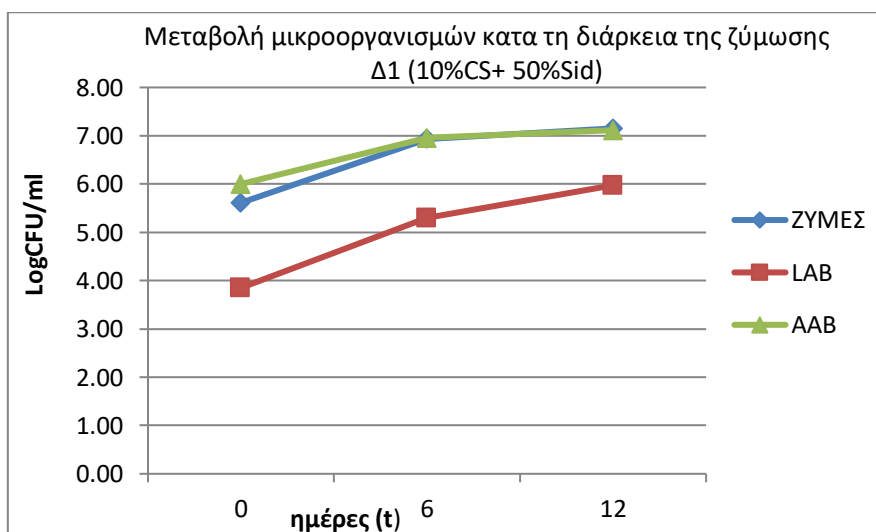
4.2 Μικροβιολογικές αναλύσεις

Η kombucha είναι αποτέλεσμα μεταβολικής δραστηριότητας μικροοργανισμών, ζυμών, βακτηρίων οξικού οξέος και βακτηρίων γαλακτικού οξέος.

ΔΕΙΓΜΑ	LogCFU/mL			
	ΗΜΕΡΕΣ	ΖΥΜΕΣ	LAB	AAB
Δ1	0	5,61	3,85	6
Δ1	6	6,94	5,30	6,95
Δ1	12	7,15	5,97	7,12
	ΗΜΕΡΕΣ	ΖΥΜΕΣ	LAB	AAB
Δ2	0	5,48	3,59	6
Δ2	6	6,94	3,70	6,95
Δ2	12	7,13	4,88	7,19
	ΗΜΕΡΕΣ	ΖΥΜΕΣ	LAB	AAB
Δ3	0	5,23	3,60	6
Δ3	6	6,64	4,41	6,69
Δ3	12	6,61	5,19	6,67
	ΗΜΕΡΕΣ	ΖΥΜΕΣ	LAB	AAB
Δ4	0	5,52	3,66	6
Δ4	6	6,60	4,20	6,58
Δ4	12	6,50	4,86	6,68

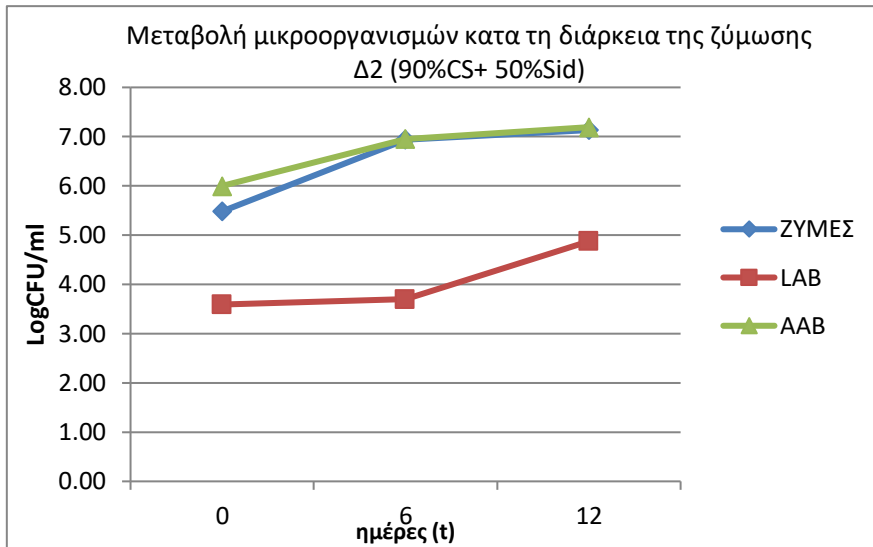
Πίνακας 4.9: Πειραματικά δεδομένα LogCFU/ml των δειγμάτων για ζύμες, AAB, LAB

CS: carob syrup, Sid: τσάι sideritis

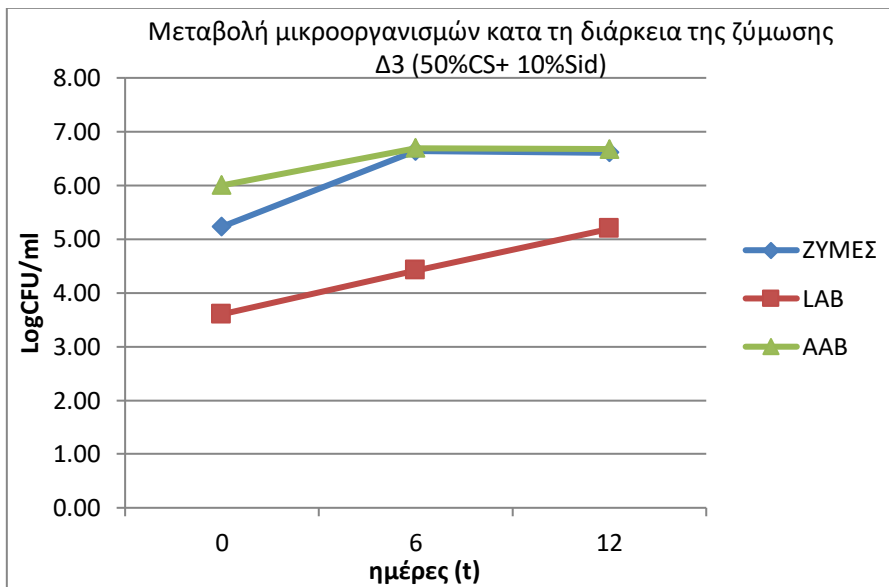


Γράφημα 4.7: Μεταβολή μικροοργανισμών κατά τη διάρκεια της ζύμωσης του δείγματος Δ1 (10%CS+ 50%Sid)

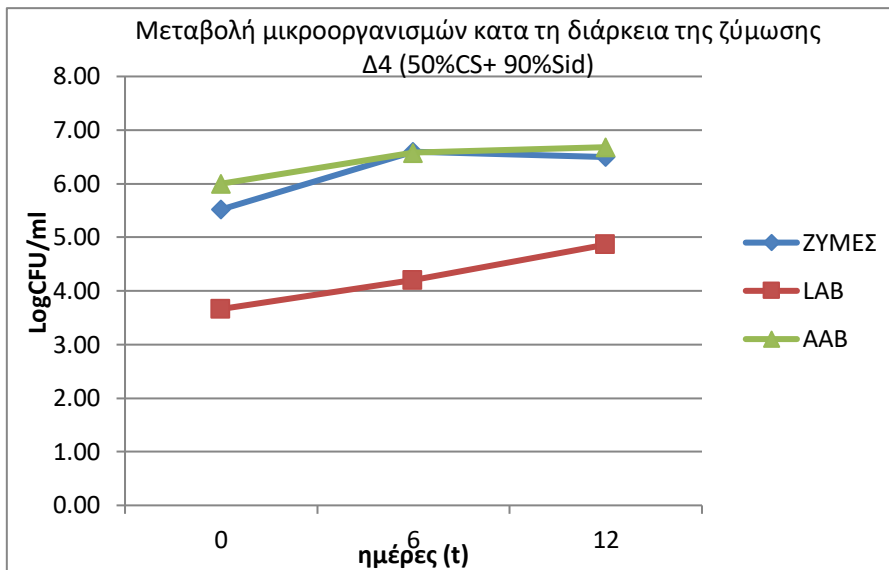
CS: carob syrup, Sid: τσάι sideritis



Γράφημα 4.8: Μεταβολή μικροοργανισμών κατά τη διάρκεια της ζύμωσης του δείγματος Δ2 (90%CS+ 50%Sid)
CS: carob syrup, Sid: τσάι sideritis



Γράφημα 4.9: Μεταβολή μικροοργανισμών κατά τη διάρκεια της ζύμωσης του δείγματος Δ3 (50%CS+ 10%Sid)
CS: carob syrup, Sid: τσάι sideritis



Γράφημα 4.10: Μεταβολή μικροοργανισμών κατά τη διάρκεια της ζύμωσης του δείγματος Δ4 (50%CS+ 90%Sid)
CS: carob syrup, Sid: τσάι sideritis

Όπως παρατηρείται στο ΓΡΑΦΗΜΑ 4.8, ΓΡΑΦΗΜΑ 4.9, ΓΡΑΦΗΜΑ 4.10 και ΓΡΑΦΗΜΑ 4.11 οι αποικίες των ζυμών, AAB και LAB (LogCFU/ml) αυξάνονται κατά τη διάρκεια της ζύμωσης, για όλα τα δείγματα. Οι κυτταρικές συγκεντρώσεις των ζυμών και των AAB την ημέρα 0, είναι μεγαλύτερες σε σχέση με των LAB και ειδικότερα αυτές των AAB έχουν την μεγαλύτερη τιμή. Οι βιώσιμες ποσότητες ζυμομυκήτων αυξήθηκαν και ακολούθησαν την ίδια τάση με αυτές του AAB κατά τη διάρκεια της ζύμωσης. Τα πειραματικά δεδομένα βρίσκονται σε συμφωνία με την βιβλιογραφία, όπου αναφέρεται ότι η παρουσία του βακτηρίου γαλακτικού οξέος (LAB) στην kombucha είναι ασυνεπής. Συνήθως, δεν υπάρχουν ή υπάρχουν σε χαμηλή αφθονία ιδιαίτερα στα τελευταία στάδια της ζύμωσης (Marsh et al., 2014). Η ζύμη και τα βακτήρια στη συμβιωτική καλλιέργεια kombucha χρησιμοποιούν υποστρώματα με διαφορετικούς και συμπληρωματικούς τρόπους.

Τα παραπάνω πειραματικά δεδομένα μπορούν να εξηγηθούν ως εξής: στο αρχικό στάδιο της ζύμωσης οι ζυμομυκήτες στη ζύμωση της kombucha μετατρέπουν τη σακχαρόζη σε οργανικά οξέα, διοξείδιο του άνθρακα και αιθανόλη. Με τη σειρά της, η λαμβανόμενη αιθανόλη οξειδώνεται από τα AAB σε οξικό οξύ. Ταυτόχρονα, το *Komagataeibacter* spp. που ανήκει στα AAB, χρησιμοποιεί γλυκόζη για να συνθέσει βακτηριακή κυτταρίνη, αλλά η αιθανόλη, η σακχαρόζη ή η γλυκερόλη συμμετέχουν επίσης στη σύνθεση. Εκτός από το οξικό οξύ και τη βακτηριακή κυτταρίνη, τα AAB είναι υπεύθυνα για την παραγωγή γλυκουρονικού οξέος. Αυτό το οξύ παράγεται από τη γλυκόζη, η οποία μεταβολίζεται σε

γλυκονικό οξύ και στη συνέχεια μετατρέπεται σε γλυκουρονικό οξύ. Επιπλέον, τα στελέχη *Glucanobacter* μπορούν να συνθέσουν τη βιταμίνη C (L-ασκορβικό οξύ) από την D-σορβιτόλη, η οποία με τη σειρά της λαμβάνεται από τη γλυκόζη. Ανάλογα με το είδος, τα LAB μπορούν να χρησιμοποιήσουν γλυκόζη στο μονοπάτι Embden-Meyerhof-Parnas, όπου το γαλακτικό οξύ λαμβάνεται ως ο κύριος μεταβολίτης (ομοζυμωτικά LAB), ή μέσω της οδού φωσφορικής πεντόζης, που έχει ως αποτέλεσμα τη σύνθεση γαλακτικού οξέος, αιθανόλης, και διοξειδίου του άνθρακα (ετεροζυμωτικά LAB) (Antolak et al., 2021). Ο αριθμός των αποικιών σε κάθε δείγμα διαφέρει λόγω του ότι εμφανίζεται ένας αριθμός συμβιωτικών αλληλεπιδράσεων και λόγω της πολύπλοκης φύσης τους και των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των μικροοργανισμών και του περιβάλλοντος ζύμωσης.

Από την ημέρα 6, φαίνεται από τα γραφήματα ότι οι κυτταρικές συγκεντρώσεις των AAB και ζυμών μεταβάλλονται με την ίδια κλίση. Αυτό πιθανόν συμβαίνει επειδή η πηγή θρεπτικών συστατικών των βακτηρίων οξικού οξέος πρέπει αρχικά να χρησιμοποιηθεί και να παραχθεί από ζυμομύκητες.

5. Συμπεράσματα

Κατά την μελέτη της συμπεριφοράς των τεσσάρων συστημάτων kombucha χρησιμοποιώντας εναλλακτικά πηγές θρεπτικών συστατικών, χαρουπόμελο και τσάι *sideritis* για την ζύμωση της από ζύμες, AAB και LAB έγιναν ορισμένες παρατηρήσεις την ημέρα 0, ημέρα 6 και ημέρα 12 στην μικροβιακή σύνθεση καθώς και στους μεταβολίτες που παρήχθησαν κατά την ζύμωση. Πιο συγκεκριμένα για τα συστήματα Δ1 (10%CS+ 50%Sid), Δ2 (90%CS+ 50%Sid), Δ3 (50%CS+ 10%Sid) και Δ4 (50%CS+ 90%Sid) τα οποία περιέχουν χαρουπόμελο, ζάχαρη, τσάι *sideritis* και πράσινο τσάι σε διαφορετικές αναλογίες αποδείχθηκε ότι η ζύμωση για την παρασκευή kombucha ήταν επιτυχής για τις 12 ημέρες που ορίστηκαν ως η διάρκεια της ζύμωσης. Το ολικό φαινολικό περιεχόμενο των συστημάτων που προσδιορίστηκε με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu κατά τη διάρκεια της ζύμωσης υπέστη μεταβολές κυρίως λόγω της μικροβιακής δραστηριότητας. Το σύστημα Δ2 (90%CS+ 50%Sid) είχε τη μεγαλύτερη συγκέντρωση ολικού φαινολικού περιεχομένου στην αρχή και στο τέλος της ζύμωσης, γεγονός που οφείλεται στην υψηλή περιεκτικότητα σε χαρουπόμελο στο σύστημα.

Οι τιμές pH όλων των συστημάτων μειώθηκαν λόγω της μετατροπής σακχάρων σε οργανικά οξέα από τους μικροοργανισμούς. Η μεταβολή των τιμών pH ήταν απότομη από την ημέρα 0 έως την ημέρα 6 ενώ στη συνέχεια η μεταβολή ήταν πιο σταθερή. Το pH των συστημάτων την ημέρα 12, έφτασε περίπου την τιμή 3,5 κάτι που σύμφωνα με άλλες μελέτες είναι γενικά αποδεκτό για ένα ρόφημα kombucha που έχει υποστεί βέλτιστη ζύμωση, από άποψη γεύσης και ασφάλειας.

Κατά τη μέτρηση της συγκέντρωσης αιθανόλης στα συστήματα, η συγκέντρωση της αιθανόλης αυξήθηκε σε όλα τα δείγματα καθώς την ημέρα 0 η συγκέντρωσή της ήταν 0% (v/v). Τα αποτελέσματα των μετρήσεων έδειξαν ότι το σύστημα Δ1 (10%CS+ 50%Sid) είχε το μεγαλύτερο ποσοστό αιθανόλης 0,69% (v/v) την ημέρα 12, ενώ το σύστημα Δ4 (50%CS+ 90%Sid) είχε το μικρότερο 0,26% (v/v). Επομένως, το σύστημα με τη μεγαλύτερη αναλογία σε ζάχαρη/χαρουπόμελο φαίνεται ότι παρήγαγε την περισσότερη συγκέντρωση σε αιθανόλη ενώ το σύστημα με τη μεγαλύτερη αναλογία σε τσάι *sideritis*/πράσινο τσάι, παρήγαγε τη μικρότερη συγκέντρωση αιθανόλης. Η αιθανόλη στην kombucha παράγεται από τις ζύμες μεταβολίζοντας τα σάκχαρα του υποστρώματος.

Η παραγωγή οξικού οξέος από τα AAB διεγείρει την παραγωγή αιθανόλης από τις ζύμες. Επίσης, τα LAB είναι δυνατόν να παράγουν αιθανόλη κατά τη διάρκεια της ζύμωσης

kombucha. Στην παρούσα μελέτη οι μικροοργανισμοί στο ρόφημα τσαγιού kombucha προτιμούν τη σακχαρόζη ως πρωταρχικό σάκχαρο για την παραγωγή αιθανόλης. Τα αποτελέσματα των μετρήσεων ολικών στερεών και σακχάρων έδειξαν ότι οι τιμές τους μειώθηκαν κατά τη διάρκεια της ζύμωσης. Τα σάκχαρα στο μέσο ζύμωσης χρησιμοποιούνται ως πηγή άνθρακα για την ανάπτυξη των κυττάρων των μικροοργανισμών, εκτός από τις μεταβολικές διεργασίες που παράγουν κυτταρίνη και μεταβολίτες με τη μορφή συγκεκριμένων οργανικών οξέων. Το σύστημα Δ1(10%CS+50%Sid) είχε την υψηλότερη τιμή Brix την ημέρα 0 και το σύστημα Δ2(90%CS+ 50%Sid) είχε την χαμηλότερη. Τα Brix αντιπροσωπεύουν το ποσοστό κατά βάρος σακχαρόζης σε ένα διάλυμα, επομένως αυτό το αποτέλεσμα οφείλεται στο ότι το χαρουπόμελο εκτός από σακχαρόζη αποτελείται σε μικρότερο ποσοστό από φρουκτόζη και γλυκόζη. Το σύστημα Δ4 (50%CS+ 90%Sid) με το περισσότερο ποσοστό τσάι sideritis έδειξε να έχει την μικρότερη μεταβολή Brix και Plato σε σχέση με τα υπόλοιπα συστήματα. Από τις μετρήσεις της αιθανόλης το σύστημα Δ4 (50%CS+ 90%Sid) είχε τη μικρότερη συγκέντρωση σε αιθανόλη την ημέρα 12. Σε συνδυασμό με τη μέτρηση της μεταβολής των σακχάρων και της συγκέντρωσης αιθανόλης, φαίνεται ότι στο σύστημα Δ4 (50%CS+ 90%Sid) ο μεταβολισμός των σακχάρων είναι πιο αργός. Σε αυτό μπορεί να οφείλεται η επίδραση των ενώσεων του τσάι sideritis στον μεταβολισμό των σακχάρων από τους μικροοργανισμούς. Η μέτρηση του χρώματος των συστημάτων kombucha, έδωσε αποτελέσματα τα οποία παρουσίασαν μεταβολές κατά τη διάρκεια της ζύμωσης για όλα τα δείγματα. Την ημέρα 0, το δείγμα με το περισσότερο χαρουπόμελο Δ2 (90%CS+ 50%Sid) ήταν το πιο σκούρο και το δείγμα με το λιγότερο Δ1 (10%CS+ 50%Sid) ήταν το πιο ανοιχτόχρωμο λόγω των φαινολικών συστατικών του χαρουπόμελου. Τα δεδομένα αυτά έρχονται σε συμφωνία με το ολικό φαινολικό περιεχόμενο όπου το δείγμα Δ2 (90%CS+ 50%Sid) είχε συγκέντρωση TPC 781,750 mg/L και το δείγμα Δ1 (10%CS+ 50%Sid) 228,375 mg/L. Την ημέρα 12, παρατηρήθηκε απότομη μεταβολή χρώματος στα δείγματα Δ2 (90%CS+ 50%Sid) και Δ4 (50%CS+ 90%Sid), των οποίων το χρώμα έγινε πιο σκούρο. Οι μεταβολές χρώματος στα δείγματα Δ1(10%CS+50%Sid) και Δ3 (50%CS+ 10%Sid) ήταν πιο ήπιες την ημέρα 12 και απέκτησαν πιο ανοιχτό χρώμα σε σχέση με την ημέρα 6. Η μεταβολή του χρώματος σε πιο ανοιχτό μπορεί να είναι αποτέλεσμα της διάσπασης των πολυφαινολών σε μικρότερα μόρια λόγω ενζυματικής δράσης από βακτήρια και ζυμομύκητες στο όξινο περιβάλλον της kombucha. Οι τιμές της πυκνότητας και του ειδικού βάρους έδειξαν ότι μειώνονται για όλα τα

συστήματα κατά τη διάρκεια της ζύμωσης, πιθανώς επειδή μεταβολίζονται τα σάκχαρα από τους μικροοργανισμούς και παράγονται διάφοροι μεταβολίτες όπως η αιθανόλη, το διοξείδιο του άνθρακα και διάφορα οργανικά οξέα. Όλα αυτά μπορεί να προκαλούν μια μείωση στην πυκνότητα και στο ειδικό βάρος. Το δείγμα Δ1 (10%CS+ 50%Sid), είχε την μεγαλύτερη πυκνότητα, σε αυτό μπορεί να συμβάλει η μεγαλύτερη περιεκτικότητα σακχαρόζης στο υπόστρωμα.

Τα αποτελέσματα των μικροβιακών αναλύσεων και πιο συγκεκριμένα για ζύμες, AAB και LAB έδειξαν παρόμοιες μεταβολές στις κυτταρικές τους αποικίες για όλα τα συστήματα kombucha, οι οποίες αυξήθηκαν κατά τη διάρκεια της ζύμωσης μέχρι την ημέρα 12. Οι κυτταρικές συγκεντρώσεις των ζυμών και των AAB την ημέρα 0 έως την ημέρα 12, ήταν μεγαλύτερες σε σχέση με των LAB και ειδικότερα αυτές των AAB είχαν την μεγαλύτερη τιμή. Ο αριθμός των αποικιών σε κάθε δείγμα διέφερε λόγω του ότι εμφανίζεται ένας αριθμός συμβιωτικών αλληλεπιδράσεων και λόγω της πολύπλοκης φύσης τους και των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των μικροοργανισμών και του περιβάλλοντος ζύμωσης. Επομένως, τα δεδομένα έδειξαν ότι το χαρουπόμελο και το τσάι *sideritis* είναι κατάλληλα υποστρώματα για την ζύμωση της kombucha από τη συμβιωτική καλλιέργεια ζυμών και βακτηρίων, προσδίδοντας λειτουργικές ιδιότητες στο ρόφημα. Το κάθε σύστημα είχε διαφορετική συμπεριφορά όσον αφορά την παραγωγή μεταβολιτών που παρήχθησαν από τους μικροοργανισμούς κατά η διάρκεια της ζύμωσης και διαφορετικές φυσικοχημικές ιδιότητες. Οι μικροοργανισμοί έδειξαν παρόμοια αύξηση συγκέντρωσης κυτταρικών αποικιών κατά τη διάρκεια της ζύμωσης με τις συγκεντρώσεις των ζυμών και των AAB να υπερσχύουν ποσοτικά έναντι των LAB, κάτι το οποίο αναφέρεται και στην βιβλιογραφία. Τα τελικά ζυμωμένα ροφήματα kombucha που προέκυψαν από τα τέσσερα συστήματα είχαν διαφορετικά χαρακτηριστικά όπως το pH, την συγκέντρωση αιθανόλης, την συγκέντρωση ολικού φαινολικού περιεχομένου, το χρώμα και τα σάκχαρα. Το χαρουπόμελο έδειξε να έχει κυρίαρχο ρόλο στις μεταβολές των μεταβολιτών κατά τη διάρκεια της ζύμωσης σε σχέση με τα υπόλοιπα υποστρώματα. Το τσάι *sideritis* έδειξε να επηρεάζει το μεταβολικό προφίλ, ενισχύοντας την υψηλή συγκέντρωση του φαινολικού περιεχομένου στο ρόφημα κατά διάρκεια της ζύμωσης και συμβάλλοντας στην χαμηλή συγκέντρωση αιθανόλης σε ένα τσάι kombucha.

Πρόταση για μελλοντική μελέτη:

Η παρούσα μελέτη θα μπορούσε να επεκταθεί ταυτοποιώντας τους μεταβολίτες της ζύμωσης, όπως κάποια σάκχαρα και οργανικά οξέα με την τεχνική HPLC. Επίσης, θα μπορούσε να γίνει ταυτοποίηση μικροοργανισμών με κάποια μοριακή τεχνική όπως είναι η NGS. Στη συνέχεια, θα είχε ενδιαφέρον να παρασκευαστούν τα ίδια υποστρώματα kombucha με τις ίδιες αναλογίες συστατικών χρησιμοποιώντας διαφορετικό SCOBY. Έτσι, θα μελετηθεί η μεταβολική δραστηριότητα της διαφορετικής συμβιωτικής καλλιέργειας ζυμών και βακτηρίων στα ίδια υποστρώματα και θα συγκριθούν οι μεταβολές και οι συγκεντρώσεις των μεταβολιτών και των φυσικοχημικών χαρακτηριστικών κατά τη διάρκεια της ζύμωσης kombucha με αυτά της παρούσας μελέτης. Η ταυτοποίηση των μεταβολιτών και των μικροοργανισμών θα γίνει και στα νέα συστήματα kombucha ώστε να συγκριθούν όλα τα δεδομένα για μια ολοκληρωμένη μελέτη.

Μια άλλη έρευνα, θα μπορούσε να είναι η μελέτη των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών του κάθε συστήματος από την παρούσα εργασία. Ανάλογα με τις προτιμήσεις των καταναλωτών και τα επιθυμητά βιοδραστικά συστατικά του τελικού προϊόντος θα επιλεγθεί ένα από τα παραπάνω συστήματα ως ένα καινοτόμο ρόφημα kombucha με χαρουπόμελο και τσάι *sideritis* με λειτουργικές ιδιότητες.

Βιβλιογραφία

- Antolak, H., Piechota, D., & Kucharska, A. (2021). Kombucha Tea—A Double Power of Bioactive Compounds from Tea and Symbiotic Culture of Bacteria and Yeasts (SCOBY). *Antioxidants*, *10*(10), 1541. <https://doi.org/10.3390/antiox10101541>
- Arikan, M., Mitchell, A. L., Finn, R. D., & Gürel, F. (2020). Microbial composition of Kombucha determined using amplicon sequencing and shotgun metagenomics. *Journal of Food Science*, *85*(2), 455–464. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.14992>
- Ayed, L., Ben Abid, S., & Hamdi, M. (2017). Development of a beverage from red grape juice fermented with the Kombucha consortium. *Annals of Microbiology*, *67*(1), 111–121. <https://doi.org/10.1007/s13213-016-1242-2>
- Bauer-Petrovska, B., & Petrushevska-Tozi, L. (2000). Mineral and water soluble vitamin content in the Kombucha drink. *International Journal of Food Science & Technology*, *35*(2), 201–205. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2621.2000.00342.x>
- Chakravorty, S., Bhattacharya, S., Chatzinotas, A., Chakraborty, W., Bhattacharya, D., & Gachhui, R. (2016). Kombucha tea fermentation: Microbial and biochemical dynamics. *International Journal of Food Microbiology*, *220*, 63–72. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.12.015>
- 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. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2000.01188.x>
- Coelho, R. M. D., Almeida, A. L. D., Amaral, R. Q. G. D., Mota, R. N. D., & Sousa, P. H. M. D. (2020). Kombucha: Review. *International Journal of Gastronomy and Food Science*, *22*, 100272. <https://doi.org/10.1016/j.ijgfs.2020.100272>
- Coton, M., Pawtowski, A., Taminiau, B., Burgaud, G., Deniel, F., Coulloumme-Labarthe, L., Fall, A., Daube, G., & Coton, E. (2017). Unraveling microbial ecology of industrial-scale Kombucha

fermentations by metabarcoding and culture-based methods. *FEMS Microbiology Ecology*, 93(5). <https://doi.org/10.1093/femsec/fix048>

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. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.01.008>

Değirmencioğlu, N., Yıldız, E., Sahan, Y., Güldas, M., & Gürbüz, O. (2021). Impact of tea leaves types on antioxidant properties and bioaccessibility of kombucha. *Journal of Food Science and Technology*, 58(6), 2304–2312. <https://doi.org/10.1007/s13197-020-04741-7>

Department of Food Science and Technology, State University of Londrina, CEP 86057-970, Londrina, PR, Brazil, Gomes, R. J., Borges, M. D. F., Embrapa Tropical Agroindustry, CEP 60511-110, Fortaleza, CE, Brazil, Rosa, M. D. F., Embrapa Tropical Agroindustry, CEP 60511-110, Fortaleza, CE, Brazil, Castro-Gómez, R. J. H., Department of Food Science and Technology, State University of Londrina, CEP 86057-970, Londrina, PR, Brazil, Spinosa, W. A., & Department of Food Science and Technology, State University of Londrina, CEP 86057-970, Londrina, PR, Brazil. (2018). Acetic Acid Bacteria in the Food Industry: Systematics, Characteristics and Applications. *Food Technology and Biotechnology*, 56(2). <https://doi.org/10.17113/ftb.56.02.18.5593>

Diez-Ozaeta, I., & Astiazaran, O. J. (2022). Recent advances in Kombucha tea: Microbial consortium, chemical parameters, health implications and biocellulose production. *International Journal of Food Microbiology*, 377, 109783. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2022.109783>

Dufresne, C., & Farnworth, E. (2000). Tea, Kombucha, and health: A review. *Food Research International*, 33(6), 409–421. [https://doi.org/10.1016/S0963-9969\(00\)00067-3](https://doi.org/10.1016/S0963-9969(00)00067-3)

Ebrahimi Pure, A., & Ebrahimi Pure, M. (2016). Antioxidant and Antibacterial Activity of Kombucha Beverages Prepared using Banana Peel, Common Nettle and Black Tea Infusions. *Applied Food Biotechnology*, 3(2). <https://doi.org/10.22037/afb.v3i2.11138>

- El Batal, H., Hasib, A., Ouatmane, A., Dehbi, F., Jaouad, A., & Boulli, A. (2016). Sugar composition and yield of syrup production from the pulp of Moroccan carob pods (*Ceratonia siliqua* L.). *Arabian Journal of Chemistry*, *9*, S955–S959. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2011.10.012>
- Gaggia, F., Baffoni, L., Galiano, M., Nielsen, D., Jakobsen, R., Castro-Mejía, J., Bosi, S., Truzzi, F., Musumeci, F., Dinelli, G., & Di Gioia, D. (2018). Kombucha Beverage from Green, Black and Rooibos Teas: A Comparative Study Looking at Microbiology, Chemistry and Antioxidant Activity. *Nutrients*, *11*(1), 1. <https://doi.org/10.3390/nu11010001>
- 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. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-63.7.976>
- Harrison, K., & Curtin, C. (2021). Microbial Composition of SCOBY Starter Cultures Used by Commercial Kombucha Brewers in North America. *Microorganisms*, *9*(5), 1060. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9051060>
- Içen, H., Corbo, M. R., Sinigaglia, M., Korkmaz, B. I. O., & Bevilacqua, A. (2023). Microbiology and antimicrobial effects of kombucha, a short overview. *Food Bioscience*, *56*, 103270. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2023.103270>
- Irakli, M., Tsifodimou, K., Sarrou, E., & Chatzopoulou, P. (2018a). Optimization infusions conditions for improving phenolic content and antioxidant activity in *Sideritis scardica* tea using response surface methodology. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, *8*, 67–74. <https://doi.org/10.1016/j.jarmap.2017.12.001>
- Irakli, M., Tsifodimou, K., Sarrou, E., & Chatzopoulou, P. (2018b). Optimization infusions conditions for improving phenolic content and antioxidant activity in *Sideritis scardica* tea using response surface methodology. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, *8*, 67–74. <https://doi.org/10.1016/j.jarmap.2017.12.001>
- 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. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12073>

- Kapp, J. M., & Sumner, W. (2019). Kombucha: A systematic review of the empirical evidence of human health benefit. *Annals of Epidemiology*, 30, 66–70. <https://doi.org/10.1016/j.annepidem.2018.11.001>
- Kim, J., & Adhikari, K. (2020). Current Trends in Kombucha: Marketing Perspectives and the Need for Improved Sensory Research. *Beverages*, 6(1), 15. <https://doi.org/10.3390/beverages6010015>
- Landis, E. A., Fogarty, E., Edwards, J. C., Popa, O., Eren, A. M., & Wolfe, B. E. (2022). Microbial Diversity and Interaction Specificity in Kombucha Tea Fermentations. *mSystems*, 7(3), e00157-22. <https://doi.org/10.1128/msystems.00157-22>
- 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. <https://doi.org/10.1080/03610470.2020.1734150>
- Lorenzo, J. M., & Munekata, P. E. S. (2016). Phenolic compounds of green tea: Health benefits and technological application in food. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 6(8), 709–719. <https://doi.org/10.1016/j.apitb.2016.06.010>
- Malbaša, R., Lončar, E., & Djurić, M. (2008). Comparison of the products of Kombucha fermentation on sucrose and molasses. *Food Chemistry*, 106(3), 1039–1045. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.07.020>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2013.09.003>
- 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. <https://doi.org/10.1080/19476337.2017.1410499>
- Nyhan, L. M., Lynch, K. M., Sahin, A. W., & Arendt, E. K. (2022). Advances in Kombucha Tea Fermentation: A Review. *Applied Microbiology*, 2(1), 73–101. <https://doi.org/10.3390/applmicrobiol2010005>

- Pigeau, G. M., Bozza, E., Kaiser, K., & Inglis, D. L. (2007). Concentration effect of Riesling Icewine juice on yeast performance and wine acidity: Riesling Icewine fermentation and acidity increase. *Journal of Applied Microbiology*, 103(5), 1691–1698. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03397.x>
- Rozpędowska, E., Hellborg, L., Ishchuk, O. P., Orhan, F., Galafassi, S., Merico, A., Woolfit, M., Compagno, C., & Piškur, J. (2011). Parallel evolution of the make–accumulate–consume strategy in *Saccharomyces* and *Dekkera* yeasts. *Nature Communications*, 2(1), 302. <https://doi.org/10.1038/ncomms1305>
- Skotti, E., Anastasaki, E., Kanellou, G., Polissiou, M., & Tarantilis, P. A. (2014). Total phenolic content, antioxidant activity and toxicity of aqueous extracts from selected Greek medicinal and aromatic plants. *Industrial Crops and Products*, 53, 46–54. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.12.013>
- Tetik, N., Turhan, I., Oziyci, H. R., & Karhan, M. (2011). Determination of D -pinitol in carob syrup. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 62(6), 572–576. <https://doi.org/10.3109/09637486.2011.560564>
- Todorova, M., & Trendafilova, A. (2014). *Sideritis scardica* Griseb., an endemic species of Balkan peninsula: Traditional uses, cultivation, chemical composition, biological activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 152(2), 256–265. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2014.01.022>
- Valera, M. J., Torija, M. J., Mas, A., & Mateo, E. (2015). Cellulose production and cellulose synthase gene detection in acetic acid bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(3), 1349–1361. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-6198-1>
- Wang, S., Zhang, L., Qi, L., Liang, H., Lin, X., Li, S., Yu, C., & Ji, C. (2020). Effect of synthetic microbial community on nutraceutical and sensory qualities of kombucha. *International Journal of Food Science & Technology*, 55(10), 3327–3333. <https://doi.org/10.1111/ijfs.14596>
- 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, 1–11. <https://doi.org/10.1155/2015/591869>

Yatmaz, E., & Turhan, I. (2018). Carob as a carbon source for fermentation technology. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 16, 200–208. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2018.08.006>

Zhang, J., Van Mullem, J., Dias, D. R., & Schwan, R. F. (2021). The chemistry and sensory characteristics of new herbal tea-based kombuchas. *Journal of Food Science*, 86(3), 740–748. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.15613>

[https://www.researchgate.net/profile/Aziz-](https://www.researchgate.net/profile/Aziz-Hasib/publication/307133981_Optimization_of_production_of_carob_pulp_syrup_from_different_population_of_Moroccan_carob_Ceratonia_siliqua_L/links/57c2174c08aeb95224d747d2/Optimization-of-production-of-carob-pulp-syrup-from-different-population-of-Moroccan-carob-Ceratonia-siliqua-L.pdf)

[Hasib/publication/307133981_Optimization_of_production_of_carob_pulp_syrup_from_diff
erent_population_of_Moroccan_carob_Ceratonia_siliqua_L/links/57c2174c08aeb95224d74
7d2/Optimization-of-production-of-carob-pulp-syrup-from-different-population-of-
Moroccan-carob-Ceratonia-siliqua-L.pdf\)](https://www.researchgate.net/profile/Aziz-Hasib/publication/307133981_Optimization_of_production_of_carob_pulp_syrup_from_different_population_of_Moroccan_carob_Ceratonia_siliqua_L/links/57c2174c08aeb95224d747d2/Optimization-of-production-of-carob-pulp-syrup-from-different-population-of-Moroccan-carob-Ceratonia-siliqua-L.pdf)

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. <https://doi.org/10.3390/app14031199>

Yamashima, T. (2020). Acetic Acid Bacteria Supplements that Possibly Prevent Alzheimer's Disease. *Archives in Neurology & Neuroscience*, 8(4). <https://doi.org/10.33552/ANN.2020.08.000691>

Lüdin, P., Von Ah, U., Rollier, D., Roetschi, A., & Eugster, E. (2016). Lactic Acid Bacteria as Markers for the Authentication of Swiss Cheeses. *CHIMIA*, 70(5), 349. <https://doi.org/10.2533/chimia.2016.349>

Zheng, Jinshui; Wittouck, Stijn; Salvetti, Elisa; Franz, Charles M.A.P.; Harris, Hugh M.B.; Mattarelli, Paola; O'Toole, Paul W.; Pot, Bruno; Vandamme, Peter; Walter, Jens; Watanabe, Koichi; Wuyts, Sander; Felis, Giovanna E.; Gänzle, Michael G.; Lebeer, Sarah. (2020). *A taxonomic note on the genus Lactobacillus: Description of 23 novel genera, emended description of the*

genus Lactobacillus Beijerinck 1901, and union of Lactobacillaceae and Leuconostocaceae.

<https://doi.org/10.7939/R3-EGNZ-M294>

Mensah, A., Chen, Y., Christopher, N., & Wei, Q. (2021). Membrane Technological Pathways and Inherent Structure of Bacterial Cellulose Composites for Drug Delivery. *Bioengineering*, 9(1), 3. <https://doi.org/10.3390/bioengineering9010003>

https://el.wikipedia.org/wiki/%CE%A4%CF%83%CE%AC%CE%B9_%CF%84%CE%BF%CF%85_%CE%B2%CE%BF%CF%85%CE%BD%CE%BF%CF%8D#/media/%CE%91%CF%81%CF%87%CE%B5%CE%AF%CE%BF:Sideritis_scardica_IMG_4653.jpg

https://en.m.wikipedia.org/wiki/Lactic_acid

https://en.m.wikipedia.org/wiki/Gluconic_acid

Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers, M.P. Doyle, L. R. Beuchat, και T. J. Montiville

<https://en.m.wikipedia.org/wiki/File:Ethanol-structure.svg?searchToken=2dgmvyh38gp6lbh1c4roxjha4>

https://en.m.wikipedia.org/wiki/Acetic_acid

https://en.wikipedia.org/wiki/SCOBY#/media/File:SCOBY_mushroom.jpg

Robertson, A. R. (1977). The CIE 1976 Color-Difference Formulae. *Color Research & Application*, 2(1), 7–11. <https://doi.org/10.1002/j.1520-6378.1977.tb00104.x>

Cortez, R., Luna-Vital, D. A., Margulis, D., & Gonzalez De Mejia, E. (2017). Natural Pigments: Stabilization Methods of Anthocyanins for Food Applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 16(1), 180–198. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12244>

Talebi, M., Frink, L. A., Patil, R. A., & Armstrong, D. W. (2017). Examination of the Varied and Changing Ethanol Content of Commercial Kombucha Products. *Food Analytical Methods*, 10(12), 4062–4067. <https://doi.org/10.1007/s12161-017-0980-5>

Ivanišová, E., Meňhartová, K., Terentjeva, M., Harangozo, L., Kántor, A., & Kačániová, M. (2020). The evaluation of chemical, antioxidant, antimicrobial and sensory properties of kombucha tea beverage.

Journal of Food Science and Technology, 57(5), 1840–1846. <https://doi.org/10.1007/s13197-019-04217-3>

- Geraris Kartelias, I., Karantonis, H. C., Giaouris, E., Panagiotakopoulos, I., & Nasopoulou, C. (2023). Kombucha Fermentation of Olympus Mountain Tea (*Sideritis scardica*) Sweetened with Thyme Honey: Physicochemical Analysis and Evaluation of Functional Properties. *Foods*, 12(18), 3496. <https://doi.org/10.3390/foods12183496>
- 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. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.14068>
- Hanousek Čiča, K., Mrvčić, J., Srećec, S., Filipan, K., Blažić, M., & Stanzer, D. (2020). Physicochemical and aromatic characterization of carob macerates produced by different maceration conditions. *Food Science & Nutrition*, 8(2), 942–954. <https://doi.org/10.1002/fsn3.1374>
- Darros-Barbosa, R., Balaban, M. O., & Teixeira, A. A. (2003). Temperature and Concentration Dependence of Density of Model Liquid Foods. *International Journal of Food Properties*, 6(2), 195–214. <https://doi.org/10.1081/JFP-120017815>
- Andreou, V., Strati, I. F., Fotakis, C., Liouni, M., Zoumpoulakis, P., & Sinanoglou, V. J. (2018). Herbal distillates: A new era of grape marc distillates with enriched antioxidant profile. *Food Chemistry*, 253, 171–178. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.01.162>