



Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής  
Σχολή Επιστημών Τροφίμων  
Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

***Παραγωγή ζυμωμένου προβιοτικού ροφήματος με συμβιωτική καλλιέργεια ζυμών και βακτηρίων και τσάι του βουνού (Sideritis spp.)***

***Production of fermented probiotic beverage with symbiotic culture of yeasts and bacteria and mountain tea (Sideritis spp.)***



ΟΝΟΜΑ ΦΟΙΤΗΤΗ/NAME OF STUDENT

Στεφανή Μαρία – Αγλαΐα / Stefani Maria – Aglaia (19684133)

ΟΝΟΜΑ ΕΙΣΗΓΗΤΗ/NAME OF THE SUPERVISOR

Μπατρίνου Ανθιμιά / Batrinou Anthimia

ΑΙΓΑΛΕΩ/AIGALEO 2024

Έγινε δεκτή

Οι υπογράφοντες δηλώνουμε ότι έχουμε εξετάσει τη πτυχιακή εργασία με τίτλο **‘Παραγωγή ζυμώμενου προβιοτικού ροφήματος με συμβιωτική καλλιέργεια ζυμών και βακτηρίων και τσάι του βουνού (*Sideritis spp.*)’** που παρουσιάστηκε από την **Στεφανή Μαρία - Αγλαΐα** και βεβαιώνουμε ότι γίνεται δεκτή.

Ημερομηνία

Όνομα επιβλέποντος

Ημερομηνία

Όνομα μέλους επιτροπής

Ημερομηνία

Όνομα μέλους επιτροπής

## Δήλωση περί λογοκλοπής / Copyright

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

Στεφανή Μαρία - Αγλαΐα



## Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την επιβλέπουσα και επίκουρη καθηγήτρια Μπατρίνου Ανθιμιά για την συμβολή και καθοδήγησή της κατά την διάρκεια της εκπόνησης της πτυχιακής μου εργασίας.

Επίσης, θέλω να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στην υποψήφια διδάκτορα Αικατερίνη Πυροβόλου, Τεχνολόγος Τροφίμων MSc, που βρισκόταν δίπλα μου σε όλη την διάρκεια των πειραμάτων, προσφέροντας μου όλες τις απαραίτητες γνώσεις και υποστήριξη που χρειαζόμουν. Η παρούσα έρευνα πραγματοποιήθηκε σε συνεργασία με την κα. Πυροβόλου, στα πλαίσια της διδακτορικής της διατριβής με τίτλο: «Αξιοποίηση συστατικών χαρουπιού (*Ceratonia siliqua*) μέσω μικροβιακών ζυμώνσεων» στο εργαστήριο Μικροβιολογίας Τροφίμων του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής.

Τέλος, θα ήθελα να πω ένα μεγάλο ευχαριστώ στην οικογένειά μου και τους φίλους μου, για την υποστήριξη και αγάπη που μου παρείχαν καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μου.

Στεφανή Μαρία,

Σεπτέμβριος 2024

## Περίληψη

Το αυξανόμενο ενδιαφέρον για τα λειτουργικά προϊόντα έχει στρέψει την προσοχή στα παραδοσιακά ζυμωμένα ροφήματα, όπως την kombucha. Η παρούσα διατριβή διερευνά την παραγωγή ενός ζυμωμένου προβιοτικού ροφήματος χρησιμοποιώντας μια συμβιωτική καλλιέργεια ζυμομυκήτων και βακτηρίων (SCOBY) με ελληνικό τσάι του βουνού (*Sideritis spp.*), σε συνδυασμό με πράσινο τσάι και χαρουπόμελο. Τα πολυάριθμα θρεπτικά οφέλη που συναντώνται στην kombucha, προκύπτουν από τη δραστηριότητα των οξυγαλακτικών βακτηρίων (LAB), των ζυμών και των βακτηρίων οξικού οξέος (AAB), τα οποία συμπληρώνονται από τις αντιοξειδωτικές ιδιότητες των χρησιμοποιούμενων τσαγιών και το μοναδικό διατροφικό προφίλ, πλούσιο σε πολυφαινόλες, του χαρουπόμελου. Στόχος αποτελεί η εκτίμηση της επίδρασης των συγκεκριμένων τοπικών συστατικών στη μικροβιακή δραστηριότητα και τη χημική σύνθεση του προϊόντος. Έτσι, διεξάγονται αναλύσεις με σκοπό την παρακολούθηση της διαδικασίας της ζύμωσης, συμπεριλαμβανομένων pH, μεταβολής χρώματος, αλκοόλης, μικροβιολογικές και δοκιμές Folin-Ciocalteu και FRAP. Τα δείγματα αναλύονται στην αρχή, στο μέσο και στο τέλος της ζύμωσης. Τα αποτελέσματα δείχνουν σημαντική μείωση του pH κατά τη ζύμωση, υποδηλώνοντας επιτυχή μικροβιακή δραστηριότητα και σταθερότητα του προϊόντος. Οι μικροβιακές αναλύσεις επιβεβαιώνουν την παρουσία επιθυμητών μικροοργανισμών καθ'όλη τη διάρκεια της διαδικασίας. Οι αναλύσεις Folin-Ciocalteu και FRAP αποδεικνύουν ότι το Δείγμα Β (90% *Sideritis spp*) παρουσιάζει χαμηλότερη αντιοξειδωτική ικανότητα (467,54 mg GAE/L, 5578,9 Fe<sup>+2</sup> mg/L), συγκριτικά με το Δείγμα Α (10% *Sideritis spp*) (582,58 mg GAE/L, 7983,9 Fe<sup>+2</sup> mg/L). Όμως, η υψηλή περιεκτικότητα σε αιθανόλη στο Δείγμα Α 0,633 v/v και το χαμηλό pH των δειγμάτων, 3,18 και 3,15, υποδηλώνουν παρατεταμένη ζύμωση, με αυξημένες πιθανότητες υπερόξυνσης και αλλοίωσης των οργανοληπτικών και θρεπτικών χαρακτηριστικών του ροφήματος. Η παρούσα εργασία αποδεικνύει ότι το ελληνικό τσάι του βουνού και το χαρουπόμελο μπορούν να ενσωματωθούν με επιτυχία στην παραγωγή μίας παραλλαγής του ροφήματος kombucha, ενισχύοντας τη διατροφική και γευστική του αξία. Τα ευρήματα συμβάλλουν στον αναπτυσσόμενο τομέα των λειτουργικών ποτών, υποδηλώνοντας περαιτέρω δυνατότητες στη χρήση τοπικών ελληνικών συστατικών.

**Λέξεις – Κλειδιά:** χαρουπόμελο, Σιδερίτης, ζύμωση, πράσινο τσάι, SCOBY, κομπούτσα

## Abstract

The growing interest in functional products has shifted the focus to traditional fermented beverages, such as kombucha. This thesis explores the production of a fermented probiotic beverage using a symbiotic culture of yeast and bacteria (SCOBY) with Greek mountain tea (*Sideritis spp.*), combined with green tea and carob syrup. The numerous nutritional benefits found in kombucha result from the activity of lactic acid bacteria (LAB), yeasts and acetic acid bacteria (AAB), which are complemented by the antioxidant properties of the teas used and the unique nutritional profile of carob, rich in polyphenols. The aim of this study consists of evaluating the effect of the local ingredients on the microbial activity and the chemical composition of the product. Thus, analyses are carried out to monitor the fermentation process, including pH, colour variation, alcohol, microbiological analyses and antioxidant tests (Folin-Ciocalteu and FRAP). Samples are analysed at the beginning, middle and end of fermentation. The results show a significant decrease in pH during the fermentation, indicating successful microbial activity and product stability. The microbial analyses confirm the presence of desirable microorganisms throughout the process. Folin-Ciocalteu and FRAP analyses show that Sample B (90% *Sideritis spp.*) has a lower antioxidant capacity (467.54 mg GAE/L, 5578.9 Fe<sup>+2</sup> mg/L), compared to Sample A (10% *Sideritis spp.*) (582.58 mg GAE/L, 7983.9 Fe<sup>+2</sup> mg/L). However, the high ethanol content 0,633 v/v in Sample A and the low pH of both samples, 3,18 και 3,15, suggest prolonged fermentation, with increased potential for over-oxidation and deterioration of the organoleptic and nutritional characteristics of the beverage. The present work demonstrates that mountain tea and carob syrup can be successfully incorporated in the production of kombucha, enhancing its organoleptic and nutritional value. The findings contribute to the growing field of functional products, suggesting further potential for the use of local Greek ingredients.

**Keywords:** carob syrup, *Sideritis spp.*, fermentation, green tea, SCOBY, kombucha

## Πίνακας περιεχομένων

Περίληψη.....	5
Abstract.....	6
Κατάλογος Εικόνων .....	8
Κατάλογος Πινάκων.....	9
<b>1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....</b>	<b>10</b>
<b>2 ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....</b>	<b>12</b>
<b>2.1 Kombucha .....</b>	<b>12</b>
2.1.1 Ιστορικά Στοιχεία .....	12
2.1.2 Παρασκευή ροφήματος .....	13
2.1.3 SCOBY – Symbiotic Culture of Bacteria and Yeasts .....	16
2.1.4 Οφέλη για την υγεία .....	21
<b>2.2 Πράσινο Τσάι (<i>Camellia sinensis</i>) .....</b>	<b>24</b>
<b>2.3 Τσάι του βουνού (<i>Sideritis spp.</i>) .....</b>	<b>27</b>
<b>2.4 Χαρούπι και Χαρουπόμελο (<i>Ceratonia siliqua L.</i>).....</b>	<b>32</b>
<b>3 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ .....</b>	<b>36</b>
<b>3.1 Σκοπός .....</b>	<b>36</b>
<b>3.2 Υλικά και Μέθοδοι .....</b>	<b>36</b>
3.2.1 Ανάλυση pH.....	38
3.2.2 Μικροβιολογικές Αναλύσεις .....	39
3.2.3 Προσδιορισμός Αναγωγικής Ισχύος / Αντιοξειδωτικής Ικανότητας - Δοκιμή FRAP	43
3.2.4 Προσδιορισμός Ολικού Φαινολικού Περιεχόμενου - Δοκιμή Folin – Ciocalteu.....	46
3.2.5 Μέτρηση Περιεκτικότητας Αλκοόλης και Πυκνότητας.....	48
3.2.6 Μέτρηση Περιεκτικότητας Ολικών Στερεών - Σακχάρων .....	48
3.2.7 Μέτρηση χρώματος .....	49
<b>3.3 Προετοιμασία Δειγμάτων .....</b>	<b>50</b>
<b>4 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....</b>	<b>54</b>
<b>4.1 Ανάλυση pH .....</b>	<b>54</b>
<b>4.2 Μικροβιολογικές αναλύσεις .....</b>	<b>56</b>
<b>4.3 Προσδιορισμός Αναγωγικής Ισχύος / Αντιοξειδωτικής Ικανότητας - Δοκιμή FRAP ....</b>	<b>60</b>
<b>4.4 Προσδιορισμός Ολικού Φαινολικού Περιεχόμενου - Δοκιμή Folin – Ciocalteu .....</b>	<b>62</b>
<b>4.5 Μέτρηση Περιεκτικότητας Αλκοόλης .....</b>	<b>64</b>
<b>4.6 Μέτρηση Πυκνότητας και Ειδικού βάρους .....</b>	<b>65</b>
<b>4.7 Μέτρηση Περιεκτικότητας Ολικών Διαλυτών Στερεών (Σακχάρων).....</b>	<b>66</b>
<b>4.8 Μέτρηση Χρώματος.....</b>	<b>68</b>
<b>5 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....</b>	<b>71</b>
<b>6 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....</b>	<b>74</b>

## Κατάλογος Εικόνων

Εικόνα 2.1-1 Παραγωγή Kombucha	12
Εικόνα 2.1-2 Κύρια βήματα παραγωγής τσάι κομπούτσα (Antolak, et al., 2021)	14
Εικόνα 2.1-3 Μικροβιακός μεταβολισμός κατά την ζύμωση kombucha (Coelho, et al., 2020)	18
Εικόνα 2.2-1 Φυτό <i>Camellia sinensis</i> L	24
Εικόνα 2.2-2 Κύριες ενώσεις κατεχινών και φαινολικών οξέων που συναντώνται στο πράσινο τσάι (Zhao, et al., 2022)	25
Εικόνα 2.3-1 Αποξηραμένο φυτό <i>Sideritis</i> spp.	28
Εικόνα 2.3-2 Κύριες βιοδραστικές ενώσεις (φλαβονοειδή, φαινολικά οξέα) στο πράσινο τσάι Σιδερίτη	30
Εικόνα 2.4-1 Επιγραμματικό διάγραμμα ποικιλομορφίας προϊόντων χαρουπιού	34
Εικόνα 2.4-2 Χαρουπόμελο	35
Εικόνα 3.2-1 Εκκινητής SCOBY	36
Εικόνα 3.2-2 Τσάι του βουνού "Κοπέλι"	37
Εικόνα 3.2-3 Πράσινο Τσάι "Lipton"	37
Εικόνα 3.2-4 Χαρουπόμελο "ΓΗ ΤΟΥ ΝΟΤΟΥ"	37
Εικόνα 3.2-5 Λευκή Ζάχαρη Κρυσταλλική "ΖΑΓΟΡΙ"	38
Εικόνα 3.2-6 Διαδικασία Ανάλυσης pH	38
Εικόνα 3.2-7 MRS τρυβλία σε δοχεία αναεροβίωσης	41
Εικόνα 3.2-8 Επωασμένα τρυβλία MRS	41
Εικόνα 3.2-9 Μηχανισμός Αντίδρασης Αναγωγικής Ικανότητας	44
Εικόνα 3.2-10 Φασματοφωτόμετρο Helios Epsilon - Thermo Scientific 9423UVE100CE	44
Εικόνα 3.2-11 Κυψελίδες έτοιμες για ανάλυση FRAP	44
Εικόνα 3.2-12 Μηχανισμός αντίδρασης δοκιμής Folin - Ciocalteu	46
Εικόνα 3.2-13 Alcohol and Extract Meter: Alex 500 της Anton Paar	48
Εικόνα 3.2-14 Handheld Density Meter: DMA 35 Basic της Anton Paar	49
Εικόνα 3.2-15 Precision Colorimeter NR110 της 3nh	49
Εικόνα 3.2-16 Χρωματομετρικό μοντέλο CIE 1976 ( $L^*a^*b^*$ ),	50
Εικόνα 3.3-1 Δείγματα Α και Β κατά τη διάρκεια της ζύμωσης	52
Εικόνα 3.3-2 Φιλτράρισμα δειγμάτων με αντλία κενού	52
Εικόνα 3.3-3 Προετοιμασία δειγμάτων για φυγοκέντρηση	52
Εικόνα 3.3-4 Παρασκευή πράσινου τσάι και σιδερίτη	52



Εικόνα 4.2-1 Επωασμένα τρυβλία MRS _____	56
Εικόνα 4.2-2 Επωασμένο τρυβλίο με AAB αποικίες _____	58
Εικόνα 4.2-3 Επωασμένα τρυβλία με αποικίες ζυμομυκήτων _____	60
Εικόνα 4.8-1 Διαφορά χρώματος δειγμάτων A και B κατά τις ημέρες 0, 6 και 12 _____	70

## Κατάλογος Πινάκων

Πίνακας 2.1-1 Περιεκτικότητα (mg/mL) γλυκουρονικού οξέος, οξικού οξέος, αιθανόλης σε Kombucha παρασκευασμένη από μαύρο τσάι (KB), πράσινο τσάι (KG) και roiboos τσάι (KR) την ημέρα 7 και 14 της ζυμώσεως _____	15
Πίνακας 2.1-2 Περιεκτικότητα (mg/mL) γλυκόζης, φρουκτόζης, σακχαρόζης σε Kombucha παρασκευασμένη από μαύρο τσάι (KB), πράσινο τσάι (KG) και roiboos τσάι (KR) την ημέρα 7 και 14 της ζυμώσεως. (Gaggia, et al., 2019) _____	15
Πίνακας 3.2-1 Βασικός Εξοπλισμός για ανάλυση pH _____	38
Πίνακας 3.2-2 Βασικός Εξοπλισμός Μικροβιολογικής Μελέτης _____	39
Πίνακας 3.2-3 Συστατικά Υποστρώματος GYPEC _____	42
Πίνακας 3.2-4 Συστατικά Υποστρώματος Yeast Malt Extract Agar _____	43
Πίνακας 3.2-5 Βασικός Εξοπλισμός Δοκιμής FRAP _____	44
Πίνακας 3.2-6 Βασικός εξοπλισμός δοκιμής Folin - Ciocalteu _____	46
Πίνακας 3.3-1 Βασικός εξοπλισμός παρασκευής και διαύγασης δειγμάτων _____	53
Πίνακας 4.1-1 Αριθμητικές τιμές μετρήσεων pH δειγμάτων A και B κατά τη διάρκεια της ζύμωσης _____	55
Πίνακας 4.3-1 Αριθμητικές τιμές Αναγωγικής Ισχύος / Αντιοξειδωτική Ικανότητα (FRAP) δειγμάτων A και B κατά τη διάρκεια της ζύμωσης _____	60
Πίνακας 4.4-1 Αριθμητικές τιμές Ολικού Φαινολικού Περιεχομένου (TPC) δειγμάτων A και B κατά τη διάρκεια της ζύμωσης _____	62
Πίνακας 4.5-1 Αριθμητικές τιμές περιεκτικότητας αλκοόλης δειγμάτων A και B κατά τη διάρκεια της ζύμωσης _____	64
Πίνακας 4.6-1 Αριθμητικές τιμές πυκνότητας και ειδικού βάρους δειγμάτων A και B κατά τη διάρκεια της ζύμωσης _____	66
Πίνακας 4.7-1 Αριθμητικές τιμές βαθμών Brix και Plato των δειγμάτων A και B κατά τη διάρκεια της ζύμωσης _____	67
Πίνακας 4.8-1 Τιμές L*, a*, b* των δειγμάτων A και B κατά τη διάρκεια της ζύμωσης _____	68

## 1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τα τελευταία χρόνια, μία αυξανόμενη ανάπτυξη λειτουργικών τροφίμων και ποτών, λόγω των δυνητικών οφελών τους για την υγεία και του αυξανόμενου ενδιαφέροντος των καταναλωτών για την ευεξία. Μεταξύ αυτών, τα προβιοτικά προϊόντα, ιδίως εκείνα που προέρχονται από παραδοσιακές διαδικασίες ζύμωσης, έχουν γνωρίσει μια αναζωπύρωση της δημοτικότητας τους ανάμεσα στους καταναλωτές. Η παρούσα πτυχιακή εργασία επικεντρώνεται στην παραγωγή ενός ζυμωμένου προβιοτικού ροφήματος που χρησιμοποιεί μια συμβιωτική καλλιέργεια ζυμών και βακτηρίων (SCOBY) σε συνδυασμό με τσάι του βουνού (*Sideritis spp.*), ένα παραδοσιακό ελληνικό βότανο γνωστό για τις φαρμακευτικές του ιδιότητες και πράσινο τσάι (*Camelia sinensis*), γνωστό για την υψηλή περιεκτικότητά του σε αντιοξειδωτικά και τα πολυάριθμα οφέλη για την υγεία. Η έρευνα χωρίζεται σε δύο κύρια μέρη: την θεωρητική ανασκόπηση και την πειραματική μελέτη.

Στο θεωρητικό μέρος, αναλύεται το ευρέως αναγνωρισμένο ρόφημα, ειδικότερα στις χώρες της Ασίας, που έχει υποστεί ζύμωση, γνωστό ως kombucha. Η κομπούχα παράγεται μέσω της ζύμωσης τσαγιού από τον εκκινητή SCOBY, το οποίο αποτελεί μια συμβιωτική ομάδα μικροοργανισμών, συμπεριλαμβανομένων των βακτηρίων γαλακτικού οξέος (LAB), διαφόρων ζυμών και βακτηρίων οξικού οξέος (AAB). Οι συγκεκριμένοι μικροοργανισμοί λειτουργούν συνεργικά, με σκοπό την παραγωγή της χαρακτηριστικής γεύσης, του αφρισμού, αλλά και των πιθανών οφελών για την υγεία που συνδέονται με την κατανάλωση του συγκεκριμένου ποτού. Η κατανόηση του ρόλου των παρόντων μικροοργανισμών είναι ζωτικής σημασίας όχι μόνο για τη βελτιστοποίηση της διαδικασίας ζύμωσης και τη διασφάλιση της συνοχής, αλλά και της ποιότητας του τελικού προϊόντος.

Όσον αφορά την παρασκευή του ροφήματος, διαφορετικοί τύποι τσαγιού μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως βάση για την kombucha, συμβάλλοντας στην διαφοροποίηση του τελικού προϊόντος. Στην παρούσα διατριβή αναλύονται δύο συγκεκριμένοι τύποι τσαγιού: το πράσινο τσάι (*Camelia sinensis*) και το ελληνικό τσάι του βουνού (*Sideritis spp.*). Η επιλογή αυτών αποτέλεσε ένα σημαντικό βήμα, καθώς επηρεάζει όχι μόνο το γευστικό προφίλ του τελικού προϊόντος αλλά και τα πιθανά οφέλη για την υγεία. Εκτός από τα τσάγια, η ερευνητική εργασία εξετάζει επίσης τις ιδιότητες του χαρουπόμελου, το

οποίο χρησιμοποιήθηκε ως μία από τις δύο πηγές σακχάρων, τόσο ως πρόσθετο γεύσης όσο και ως ζυμώσιμο σάκχαρο. Το χαρούπι, που προέρχεται από τους λοβούς του χαρουπόδεντρου (*Ceratonia siliqua*), είναι ένα φυσικό γλυκαντικό με χαμηλότερο γλυκαιμικό δείκτη από τη ζάχαρη και είναι πλούσιο σε φυτικές ίνες και αντιοξειδωτικά. Η προσθήκη χαρουπόμελου στη διαδικασία της ζύμωσης προσφέρει μια μοναδική ανατροπή στην παραδοσιακή συνταγή της kombucha, ενισχύοντας ενδεχομένως την θρεπτική αξία και την γευστική πολυπλοκότητα του ροφήματος.

Το πειραματικό μέρος της παρούσας ερευνητικής εργασίας χωρίζεται σε δύο ενότητες. Η πρώτη περιγράφει τις διάφορες αναλύσεις που πραγματοποιήθηκαν στα δείγματα σε διαφορετικά στάδια της ζύμωσης – αρχή, μέση, τέλος. Μεταξύ άλλων περιλαμβάνουν μικροβιολογικές αναλύσεις για την αξιολόγηση της παρουσίας και της συγκέντρωσης των ωφέλιμων μικροοργανισμών, ανάλυση Folin-Ciocalteu για την ολική περιεκτικότητα σε φαινολικά οξέα, ανάλυση Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) για την αντιοξειδωτική ικανότητα, χρωματομετρική ανάλυση, κ.α.. Κάθε μία από αυτές τις παραμέτρους παρέχει ξεχωριστά πολύτιμες πληροφορίες σχετικά με τη διαδικασία ζύμωσης και τα εξελισσόμενα χαρακτηριστικά του προϊόντος.

Έπειτα, στο δεύτερο μέρος, παρουσιάζονται τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τις παραπάνω αναλύσεις, συνοδευόμενα από διαγράμματα και λεπτομερή σχόλια. Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα που εξάχθηκαν από τα διαφορετικά στάδια της ζύμωσης, παρέχεται μια ολοκληρωμένη επισκόπηση για την επιρροή των συστατικών στην ανάπτυξη ενός ζυμωμένου προβιοτικού ροφήματος.

Συμπερασματικά, η παρούσα πτυχιακή εργασία συμβάλλει στον αυξανόμενο όγκο ερευνών που διεξάγονται με θέμα τα λειτουργικά τρόφιμα, προσφέροντας ταυτόχρονα μία νέα προσέγγιση στην παραγωγή ενός παραδοσιακού ποτού. Ο συνδυασμός των παραδοσιακών μεθόδων ζύμωσης με χρήση τοπικών συστατικών της ελληνικής κοινωνίας, όπως το τσάι του βουνού και το χαρούπι, οδηγεί στην δημιουργία ενός καινοτόμου ροφήματος με αυξημένες θρεπτικές ιδιότητες και πολιτιστική σημασία. Τέλος, τα ευρήματα της παρούσας έρευνας έχουν τη δυνατότητα να συμβάλλουν σε μελλοντικές μελέτες για την ανάπτυξη καινοτόμων ζυμωμένων προϊόντων, επεκτείνοντας ακόμη την εφαρμογή παραδοσιακών βοτάνων και φυσικών γλυκαντικών στη βιομηχανία τροφίμων και ποτών.

## 2 ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### 2.1 Kombucha

#### 2.1.1 Ιστορικά Στοιχεία

Τα τελευταία χρόνια, καθώς η κοινωνία υιοθετεί όλο και περισσότερο έναν πιο υγιή τρόπο ζωής, το ενδιαφέρον για λειτουργικά τρόφιμα και ποτά έχει αυξηθεί δραματικά. Με την άμεση και γρήγορη πρόσβαση στην ενημέρωση, οι καταναλωτές είναι πιο συνειδητοποιημένοι από ποτέ σχετικά με τα διατροφικά οφέλη όσων καταναλώνουν, οδηγώντας σε αυξανόμενο ενδιαφέρον για διατροφικά πλούσια τρόφιμα και ποτά, από απλά και γνώριμα σε αυτούς υλικά, όπως τα παραδοσιακά, φυσικά ζυμωμένα προϊόντα. Η κομπούχα (kombucha), ένα ρόφημα τσαγιού που έχει υποστεί ζύμωση, έχει ξεχωρίσει σε αυτή την τάση, λόγω του μοναδικού συνδυασμού της, της αναζωογονητικής γεύσης, των πιθανών οφελών για την υγεία και της πολιτιστικής της σημασίας.

Η πλούσια ιστορία της κομπούχα χρονολογείται πάνω από δύο χιλιετίες πίσω, με την προέλευσή να εντοπίζεται στην Ασία και συγκεκριμένα την αρχαία Κίνα, όπου αναφερόταν συχνά ως το «τσάι της



Εικόνα 2.1-1 Παραγωγή Kombucha

αθανασίας». Η προέλευση της πιστεύεται ότι είναι η Μαντζουρία στην βορειοανατολική Κίνα κατά την διάρκεια της δυναστείας Τσιν (“Ling Chi” γύρω στο 220 π.Χ. (Miranda, et al., 2022). Ταυτόχρονα, όπως είναι γνωστό, η κατανάλωση τσαγιού στην Κίνα ξεκίνησε πριν πέντε χιλιετίες, αποτελώντας πλέον το αρχαιότερο γνωστό φάρμακο λόγω των ποικίλων διατροφικών οφελών και το δεύτερο πιο δημοφιλή ρόφημα μετά το νερό (Villarreal-Soto, et al., 2018). Έπειτα, το 414 μ.Χ. ο ιατρός Kombu μετέφερε τον μύκητα του τσαγιού, γνωστό πλέον ως SCOBY, από την Κορέα στην Ιαπωνία, με σκοπό την θεραπεία των γαστρεντερικών και πεπτικών προβλημάτων του αυτοκράτορα Inkyo (Antolak, et al., 2021). Με παρόμοιους τρόπους, η φήμη του ροφήματος εξαπλώθηκε από την Κίνα στη Ρωσία, αργότερα στην Ανατολική Ευρώπη και τελικά στον υπόλοιπο κόσμο, αποτελώντας βασικό συστατικό πολλών πολιτισμών.

Με την εξάπλωση της kombucha σε διαφορετικές πλευρές του πλανήτη, έγινε γνωστή σε διαφορετικούς λαούς με πληθώρα ονόματα, όπως 'Manchurian Mushroom Tea' (Μαντζουριαν Τσάι Μανιταριών), 'Tea Fungus' (Τσάι Μύκητα), 'Kargasok Tea', 'Grib tea kvass', 'Indian Tea Fungus' (Ινδικό Τσάι Μύκητα), 'Manchu Fungus', 'Teakwass' κ.λπ. ανάλογα με την περιοχή. Παρόλο αυτά, η κατανάλωση του συγκεκριμένου ροφήματος μειώθηκε σημαντικά κατά τη διάρκεια του 2<sup>ου</sup> Παγκόσμιου Πολέμου, εξαιτίας των ελλείψεων σε τσάι και ζάχαρη. Όμως, η μακρόχρονη φήμη του ως ελιξίριο υγείας συνέβαλε στη διαρκή δημοτικότητά του, ιδιαίτερα σε εποχές όπου οι φυσικές θεραπείες είχαν μεγάλη αξία. Έτσι, με το πέρας του πολέμου, η δημοτικότητα της κομπούτσα αυξήθηκε ξανά, ξεκινώντας από την Γερμανία, την Γαλλία και την Ιταλία (Antolak, et al., 2021). Σήμερα, η kombucha αποτελεί ένα από τα πιο δημοφιλή ζυμωμένα ποτά με χαμηλή περιεκτικότητα σε αλκοόλ, έχοντας την ταχύτερη ανάπτυξη στην αγορά των λειτουργικών ποτών.

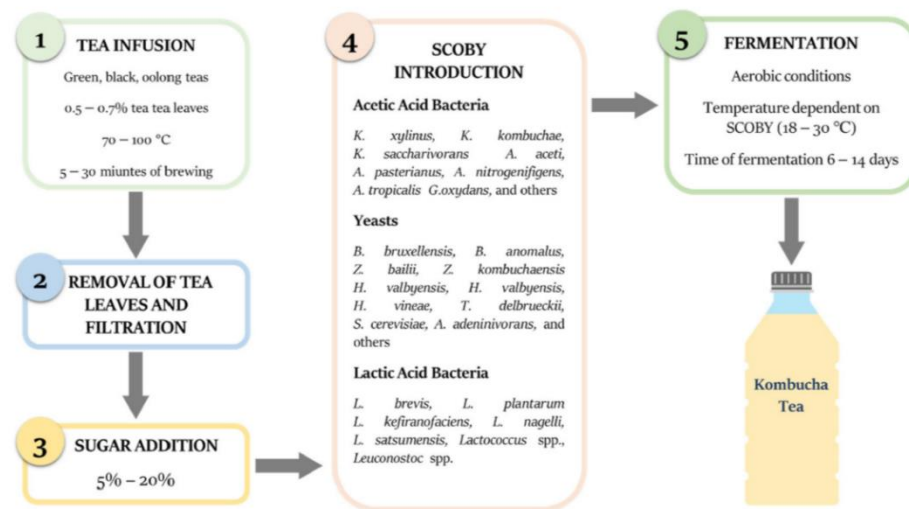
### **2.1.2 Παρασκευή ροφήματος**

Η κομπούτσα (kombucha) αποτελεί ένα παραδοσιακό ζυμωμένο μη αλκοολούχο ρόφημα τσαγιού με ιδιότητες που προάγουν την υγεία, χάρη στην διατροφικά πλούσια σύνθεσή της. Διαθέτει συγκεκριμένη δροσιστική γεύση, που χαρακτηρίζεται ως γλυκιά και ελαφρώς όξινη, παρόμοια με αυτή του ανθρακούχου μηλίτη (Emiljanowicz & Malinowska-Rańczyk, 2019). Παραδοσιακά παρασκευάζεται με την αλκοολική και οξική ζύμωση ζαχαρούχου μαύρου (ζυμωμένο), πράσινου (μη ζυμωμένο) ή oolong (ημι-ζυμωμένο) τσαγιού, προσθέτοντας μία μεμβράνη κυτταρίνης που περιέχει τη συμβιωτική καλλιέργεια βακτηρίων και οσμόφιλων ζυμών, γνωστό ως SCOBY.

Με την προσθήκη του βιοφίλμ στο ζαχαρούχο τσάι, ξεκινάει γρήγορα η ζύμωση και η μετατροπή του τσαγιού και της ζάχαρης σε βιοενεργές ενώσεις με θεραπευτικές ιδιότητες, συμπεριλαμβανομένων ενζύμων, πολυφαινολών, οργανικών οξέων και βιταμινών. Κατά τη διάρκεια της ζύμωσης, η γεύση του ροφήματος μεταβάλλεται από ευχάριστη φρουτώδης, σε πιο αφρώδης και όξινη μετά από λίγες ημέρες και τελικά, μετά από παρατεταμένη ζύμωση, αποτελείται από ήπια γεύση που θυμίζει ξύδι, καθώς ταυτόχρονα με την μεταβολή της γεύσης, μειώνεται το pH. Η σύνθεση της συμβιωτικής καλλιέργειας εμποδίζει την ανάπτυξη μολυσματικών βακτηρίων και αποτελείται από βακτήρια οξικού οξέος, ζύμες, οξέα, βιταμίνες και ένζυμα (Karr & Sumner, 2019) και

αναλύεται λεπτομερώς στην *υπό-ενότητα 2.1.3*.

Σε όλο τον κόσμο, η kombucha παράγεται τόσο στα σπίτια, χειροποίητα σε μικρής κλίμακας δοχεία, όσο και σε μεγάλες, εμπορικές κλίμακες. Αναλόγως την κλίμακα παραγωγής αλλά και την γεωγραφική τοποθεσία, μπορεί να παρατηρούνται μικρές διαφορές στα υλικά και στην ποσότητα που χρησιμοποιούνται ή στην διαδικασία, συμπεριλαμβανομένων των συνθηκών, της ζύμωσης. Σε γενικές γραμμές, η διάρκεια της ζύμωσης κυμαίνεται από 3 έως 60 ημέρες, ανάλογα την αρχική καλλιέργεια, η θερμοκρασία επώασης από 18 έως 30 °C και το ποσοστό σακχάρων στο παρασκεύασμα από 5 έως 20%.



Εικόνα 2.1-2 Κύρια βήματα παραγωγής τσάι κομπούτσα (Antolak, et al., 2021)

Σύμφωνα με μία συνταγή παρασκευής των (Dufresne & Farnworth, 2000), αρχικά εκχυλίζεται το μαύρο ή πράσινο τσάι σε βραστό νερό για έως και 10 λεπτά. Έπειτα, διαλύεται η ανάλογη ποσότητα σακχάρων (50g/l), συνήθως λευκή κρυσταλλική ζάχαρη, στο ζεστό εκχύλισμα και αφήνονται να κρυώσουν. Το ζαχαρούχο τσάι μεταφέρεται σε ευρύστομο καθαρό δοχείο, όπου προστίθεται ο μύκητας του τσαγιού (SCOBY), και το δοχείο καλύπτεται προσεκτικά με ένα καθαρό κάλυμμα, που επιτρέπει την ροή του αέρα. Το παρασκεύασμα αφήνεται να επωαστεί σε θερμοκρασία δωματίου, μεταξύ 20 και 30°C, για 10 έως 14 ημέρες σε αερόβιες συνθήκες, ώσπου να πραγματοποιηθούν η αλκοολική και η οξική ζύμωση. Κατά τη διάρκεια της ζύμωσης, μία θυγατρική μεμβράνη κυτταρίνης σχηματίζεται στην επιφάνεια του τσαγιού. Η μεμβράνη αφαιρείται και διατηρείται σε σακχαρούχο τσάι, ώσπου να χρησιμοποιηθεί στην επόμενη ζύμωση. Τέλος, το ρόφημα σουρώνεται μέσα από ειδικό ύφασμα, με σκοπό την απομάκρυνση

υπολειμμάτων κυτταρίνης, και διατηρείται σε κλειστές φιάλες στους 4°C, ώστε να βελτιωθεί το οργανοληπτικό του προφίλ και να μειωθεί ο ρυθμός ζύμωσης.

Πολλές φορές, πριν την εμφιάλωση της κομπούσα, μία δεύτερη ζύμωση πραγματοποιείται σε κλειστό δοχείο για διάρκεια 2 με 3 ημερών, με στόχο την δημιουργία πιο έντονα ανθρακούχου ποτού. Στο στάδιο αυτό είναι συνήθης και η χρήση συστατικών, όπως φρούτα και βότανα για την ενίσχυση της γεύσης του τελικού προϊόντος (Miranda, et al., 2022).

Το τελικό προϊόν που παρασκευάζεται, συμπεριλαμβανομένων της γεύσης και των θρεπτικών ιδιοτήτων του, επηρεάζεται από ποικίλους παράγοντες, τόσο από το είδος του τσαγιού και των σακχάρων που χρησιμοποιούνται, όσο και από τις συνθήκες της ζύμωσης και του περιβάλλοντος, όπως την διάρκεια, την θερμοκρασία και το pH. Για παράδειγμα, εκτός από τα προαναφερόμενα είδη τσάι, παρατηρείται πλέον η χρήση εκχυλισμάτων από παραδοσιακά βότανα, όπως χαμομήλι, τσάι του βουνού ή δίκταμο. Ενώ μελετάται και η χρήση διαφορετικών πηγών σακχάρων, όπως μέλι ή χαρουπόμελο, για τον περαιτέρω εμπλουτισμό του θρεπτικού και γευστικού προφίλ της.

Σε μια πρόσφατη μελέτη, παρασκευάστηκε kombucha χρησιμοποιώντας πράσινο και μαύρο τσάι, καθώς και φύλλα rooibos, παρουσιάζοντας μικροβιακή ποικιλομορφία κατά τη διάρκεια της ζύμωσης και ποσοτικοποίηση πολυφαινόλων, φλαβονοειδών, αιθανόλης και οξέων (Gaggia, et al., 2019).

Πίνακας 2.1-2 Περιεκτικότητα (mg/mL) γλυκόζης, φρουκτόζης, σακχαρόζης σε Kombucha παρασκευασμένη από μαύρο τσάι (KB), πράσινο τσάι (KG) και rooibos τσάι (KR) την ημέρα 7 και 14 της ζύμωσης. (Gaggia, et al., 2019)

Substrate	Glucose		Sucrose		Fructose	
	7	14	7	14	7	14
KB	11.20 ± 0.99	15.12 ± 0.64	36.23 ± 0.03	26.13 ± 0.43	4.84 ± 0.001	5.50 ± 0.13
KG	11.40 ± 0.22	15.89 ± 0.06	37.14 ± 0.09	26.21 ± 0.14	5.12 ± 0.02	6.92 ± 0.02
KR	8.60 ± 0.14 <sup>A</sup>	18.10 ± 0.20 <sup>B</sup>	42.08 ± 0.09	33.65 ± 0.05	4.07 ± 0.04 <sup>A</sup>	8.83 ± 0.04 <sup>B</sup>

(<sup>A,B</sup>) different letters showed significant difference between different sampling times for the same substrate (Bonferroni corrected  $p < 0.05$ . No letters showed no significance.

Πίνακας 2.1-1 Περιεκτικότητα (mg/mL) γλυκουρονικού οξέος, οξικού οξέος, αιθανόλης σε Kombucha παρασκευασμένη από μαύρο τσάι (KB), πράσινο τσάι (KG) και rooibos τσάι (KR) την ημέρα 7 και 14 της ζύμωσης

Substrate	GlcUA		AA		EtOH	
	7	14	7	14	7	14
KB	1.36 ± 0.08 <sup>A</sup>	3.23 ± 0.64 <sup>B</sup>	3.18 ± 0.003 <sup>A</sup>	9.18 ± 0.15 <sup>B</sup>	4.69 ± 0.05 <sup>b</sup>	5.83 ± 0.08 <sup>a</sup>
KG	1.78 ± 0.12	1.96 ± 0.10	4.22 ± 0.02	7.65 ± 0.003	2.81 ± 0.01 <sup>ab</sup>	4.18 ± 0.03 <sup>ab</sup>
KR	1.70 ± 0.09	2.87 ± 0.47	1.65 ± 0.004	4.89 ± 0.02	0.64 ± 0.01 <sup>a</sup>	1.14 ± 0.01 <sup>b</sup>

(<sup>a,b</sup>) different letters showed significant difference between different substrate in the same sampling time (Bonferroni corrected  $p < 0.05$ ); (<sup>A,B</sup>) different letters showed significant difference between different sampling times for the same substrate (Bonferroni corrected  $p < 0.05$ ). No letters showed no significance.

Στον Πίνακα 2.1.2-1 παρατηρούνται οι διαφορετικές περιεκτικότητες σε γλυκόζη, σακχαρόζη και φρουκτόζη με χρήση διαφορετικών ειδών τσάι (μαύρο, πράσινο και oolong), ενώ στον Πίνακα 2.1.2-2, παρατηρούνται οι διαφορετικές περιεκτικότητες σε γλυκουρονικό οξύ, οξικό οξύ και αιθανόλη για τις ημέρες 7 και 14 της ζύμωσης.

### 2.1.3 SCOBY – Symbiotic Culture of Bacteria and Yeasts

Η καλλιέργεια της kombucha ή Συμβιωτική Καλλιέργεια Βακτηρίων Και Ζυμών (SCOBY, Symbiotic culture of bacteria and yeast) αποτελεί ένα βιοφίλμ κυτταρίνης που λαμβάνεται από την συμβιωτική ένωση μεταξύ ζυμομυκήτων και οξικών βακτηρίων, γνωστό επίσης ως “fungus tea”, καθώς παρομοιάζεται με χαλί μυκήτων όταν αναπτύσσεται σε στατικές συνθήκες. Αυτό το βιοφίλμ αναπτύσσεται και επιπλέει στην επιφάνεια του σακχαρούχου και δροσερού τσαγιού, σχηματίζοντας τελικά μία κυτταρινούχα ζελατινώδη μεμβράνη. (Jayabalan, et al., 2016) Ως κύρια λειτουργία εκτελεί την συμβιωτική ζύμωση για την παραγωγή kombucha, καθώς οι υπεύθυνοι μικροοργανισμοί είναι ενσωματωμένοι στην μήτρα από κυτταρίνη. Συγκεκριμένα, αποτελείται από βακτήρια του γαλακτικού οξέος αλλά κυρίως του οξικού οξέος και ζυμομύκητες.

Το SCOBY, παραμένει ζωντανό και ενεργό κατά τη διάρκεια της ζύμωσης, σχηματίζοντας το δίκτυο κυτταρίνης, όταν χρησιμοποιείται σακχαρόζη ως κύρια πηγή άνθρακα. Γνωστό επίσης και ως η μητέρα της kombucha, διότι δημιουργεί συνήθως μία νέα μεμβράνη, την κόρη, κατά την παρασκευή του ροφήματος. Οι μεμβράνες σχηματίζονται σε στρώματα, με την πιο νεαρή να βρίσκεται πάντα πιο κοντά στην επιφάνεια του τσαγιού. Αυτό το δίκτυο στρωμάτων ενισχύει την ένωση μεταξύ βακτηρίων και ζυμών, παράγοντας νέες παχύτερες μεμβράνες με ζελατινώδη όψη που επιτρέπει στους μικροοργανισμούς να παραμένουν στο υγρό κοντά στη διεπιφάνεια, έτσι λαμβάνουν το απαραίτητο οξυγόνο για τον μεταβολισμό τους. Ειδικότερα, το SCOBY διατηρεί τα οξικά βακτήρια στην επιφάνεια, επιτρέποντας αρκετό οξυγόνο για την ανάπτυξή τους και προστατεύοντας τις ζύμες από την δράση του οξυγόνου, αφού στεγάζονται στο κάτω μέρος της μεμβράνης, επιτρέποντας την πραγματοποίηση αναερόβιας ζύμωσης. (Miranda, et al., 2022; Coelho, et al., 2020)

Η βακτηριακή αυτή μεμβράνη από κυτταρίνη διαθέτει μοναδικές ιδιότητες, συμπεριλαμβανομένων της υψηλής κρυσταλλικότητας και αντοχής σε εφελκυσμό, την



δυνατότητα μορφοποίησης και τον υψηλό βαθμό πολυμερισμού. Επίσης, είναι ακραία αδιάλυτη στους περισσότερους διαλύτες και 100 φορές πιο λεπτή από τις ίνες κυτταρίνης που παραλαμβάνονται από τα φυτά, ενώ ταυτόχρονα διαθέτει 100 φορές μεγαλύτερη ικανότητα συγκράτησης νερού (Costa, et al., 2017). Συνεπώς, η εφαρμογή της μεμβράνης παρατηρείται σε διαφορετικούς τομείς, όπως την συσκευασία, τα φάρμακα, τις ζωοτροφές και εννοείται τα τρόφιμα (Coelho, et al., 2020).

Ποικίλες μελέτες έχουν δείξει ότι η μικροβιολογική σύνθεση του SCOBY μπορεί να διαφέρει μεταξύ των ζυμώσεων, ανάλογα με παράγοντες συμπεριλαμβανομένων την προέλευση, το κλίμα, την γεωγραφική θέση και το υδάτινο μέσο που χρησιμοποιείται για τη διαδικασία ζύμωσης (Watawana, et al., 2015). Ωστόσο, τα βακτήρια που βρίσκονται σε μεγαλύτερη αναλογία στη συμβιωτική καλλιέργεια, ανήκουν στα γένη *Acetobacter* και *Gluconobacter* (Jayabalan, et al., 2016).

Η μικροβιολογική σύνθεση της kombucha, όπως και οι μηχανισμοί μεταβολισμού που συμβαίνουν, είναι περίπλοκοι και δεν έχουν καθοριστεί πλήρως ακόμη, ενώ υπάρχει πιθανότητα να διαφέρει ανάλογα την προέλευση, τα υποστρώματα και τις συνθήκες παραγωγής (Villarreal-Soto, et al., 2018). Στην υπό-ενότητα αυτή, θα γίνει προσπάθεια ανάλυσης των κύριων ειδών μικροοργανισμών, ξεκινώντας από τους ζυμομύκητες και τελειώνοντας με τα βακτήρια του γλυκονικού και οξικού οξέος.

#### I. Ζύμες

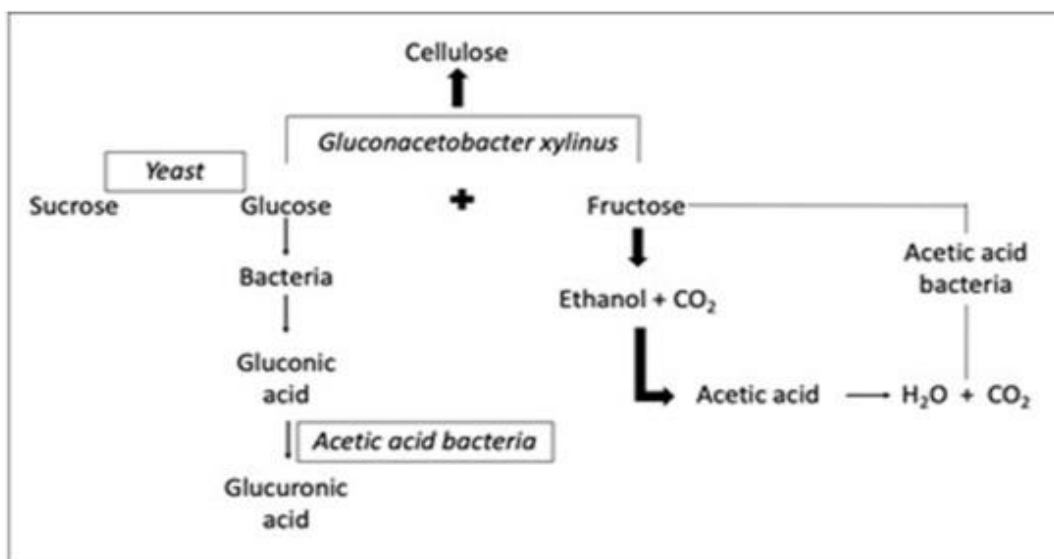
Όπως είναι γνωστό οι ζύμες, και κάποια βακτήρια όπως ο *Zygomonas mobilis*, είναι η κύριοι υπεύθυνοι για την πραγματοποίηση της αλκοολικής ζύμωσης, δηλαδή του πρώτου είδους ζυμώσεως που επιτυγχάνεται για την παραγωγή της kombucha.

Ως αλκοολική ζύμωση ορίζεται η μετατροπή των σακχάρων, συνήθως της γλυκόζης και της φρουκτόζης, σε αιθανόλη και διοξείδιο του άνθρακα. Η γενική χημική αντίδραση που περιγράφει την διαδικασία αυτή είναι:  $C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2CH_3CH_2OH + 2CO_2$ . Είναι αδιαμφισβήτητο, ότι η διαδικασία της αλκοολικής ζύμωσης είναι πιο περίπλοκη, συμπεριλαμβανομένων πολυάριθμων βιοχημικών, χημικών και φυσικών αντιδράσεων που συμβαίνουν ταυτόχρονα, αλλά δεν θα αναλυθούν εκτενώς στην συγκεκριμένη πτυχιακή εργασία. Μία από αυτές τις αντιδράσεις αποτελεί η γλυκόλυση, διαδικασία που λαμβάνει χώρα στο κυτταρόπλασμα και περιγράφει τον μετασχηματισμό της γλυκόζης και της φρουκτόζης σε πυροσταφυλικό οξύ. Αποτέλεσμα των πολυάριθμων αντιδράσεων είναι η παραγωγή ποικίλων προϊόντων και δευτερογενών μεταβολιτών,

που επηρεάζουν σημαντικά το οργανοληπτικό προφίλ και την ποιότητα των τελικών προϊόντων.

Κατά την παρασκευή της kombucha, το πρώτο στάδιο από την έναρξη της διαδικασίας πραγματοποιείται από τους ζυμομύκητες και είναι η υδρόλυση της σακχαρόζης σε γλυκόζη και φρουκτόζη μέσω της μβερτάσης, με αποτέλεσμα την παραγωγή αιθανόλης μέσω της γλυκόλυσης. Έχει παρατηρηθεί ότι ορισμένες ζύμες έχουν προτίμηση στη γλυκόζη, παράγοντας δηλαδή αυξημένες ποσότητες, όπως αυτές του γένους *Saccharomyces*, ενώ άλλοι ζυμομύκητες προτιμούν την φρουκτόζη, όπως το γένος *Zygosaccharomyces* (Jayabalan, et al., 2016). Σε γενικές γραμμές, οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ ζυμομυκήτων *Saccharomyces* και μη *Saccharomyces* πλεονεκτούν κατά την διαδικασία της μεικτής ζύμωσης της kombucha, καθώς ελαχιστοποιούν τον κίνδυνο ανάπτυξης βακτηρίων που μπορούν να παρεμποδίσουν τη ζύμωση και συμβάλλουν στο σχηματισμό των χαρακτηριστικών αρωμάτων και γεύσεων (Villarreal-Soto, et al., 2018).

Όσον αφορά τις οσμόφιλες ζύμες που είναι παρούσες στην μεμβράνη κυτταρίνης, έχουν ταυτοποιηθεί μεταξύ άλλων: *Candida stellimalicola*, *Candida tropicalis*, *Lachancea thermotolerans*, *Lachancea fermentati*, *Eremothecium cymbalariae*, *Kluyveromyces marxianus*, *Pichia mexicana*, *Dekkera bruxellensis*, *Dekkera anomala*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces uvarum*, *Zygosaccharomyces bailii*, *Zygotorulasporea Florentina* (Villarreal-Soto, et al., 2018). Σύμφωνα με μελέτες, τα οσμοανεκτικά είδη, όπως *Saccharomyces cerevisiae* και *Zygosaccharomyces spp.*, συχνά ξεκινούν τη ζύμωση ενώ τα οξεόφιλα είδη εμφανίζονται στη συνέχεια. Από τις ζύμες αυτές, σύμφωνα με



Εικόνα 2.1-3 Μικροβιακός μεταβολισμός κατά την ζύμωση kombucha (Coelho, et al., 2020)

(Watawana, et al., 2015), το γένος *Zygosaccharomyces* θεωρείται η κυρίαρχη ζύμη με 84,1% σχετικό ποσοστό αφθονίας στο SCOBY.

## II. Ακετοβακτηρίδια (Acetic Acid Bacteria AAB)

Τα βακτήρια οξικού οξέος (AAB) ανήκουν στην οικογένεια *Acetobacteraceae*, η οποία περιλαμβάνει πολλά γένη και είδη. Τα κύρια είδη ανήκουν στα γένη *Acetobacter*, *Gluconacetobacter*, *Gluconobacter* και *Komagataeibacter*, λόγω της μεγάλης ικανότητάς τους να οξειδώνουν την αιθανόλη σε οξικό οξύ και της μεγάλης αντοχής τους στο οξικό οξύ που απελευθερώνεται στο ζυμωτικό μέσο. (Gomes, et al., 2018) Η σύνθεση άλλων μεταβολιτών, για παράδειγμα, της Ι-σορβόζης από d-σορβιτόλη, καθώς και της διυδροξυακετόνης από γλυκερόλη, έχει επίσης συσχετισθεί για ορισμένα είδη οξικών οξέων. Αυτό όμως που είναι ενδιαφέρον, είναι η ικανότητά τους να παράγουν εξωκυτταρικά πολυμερή, για παράδειγμα βακτηριακή κυτταρίνη, η οποία συντίθεται κυρίως από τα γένη *Gluconobacter* και *Komagataeibacter*.

Γενικότερα, τα Ακετοβακτηρίδια είναι υποχρεωτικά αερόβιοι μικροοργανισμοί, Gram θετικοί ή αρνητικοί, θετικοί στην καταλάση και αρνητικοί στην οξειδάση. Ακόμη, έχουν σχήμα ελλειψοειδή ή ραβδόμορφο και εμφανίζονται είτε μεμονωμένα είτε σε ζεύγη ή αλυσίδες. Αποτελούν μία ομάδα μεσόφιλων μικροοργανισμών, με βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης τους 25 με 30°C. Ως βέλτιστο pH προτιμούν τιμές που κυμαίνονται μεταξύ 5,0 έως 6,5, αλλά αναπτύσσονται και σε χαμηλότερες τιμές pH. Όπως είναι γνωστό, τα οξικά βακτήρια διαθέτουν την δυνατότητα της οξείδωσης αλκοολών, αλδεϋδών, σακχάρων ή σακχαρούχων αλκοολών παρουσία οξυγόνου, με αποτέλεσμα την συσσώρευση προϊόντων οξείδωσης, όπως τα καρβοξυλικά οξέα (ανθρακικό) στο μέσο καλλιέργειας. Αποτελούν τα μόνα βακτήρια που έχουν την ικανότητα οξείδωσης της αιθανόλης σε αερόβιες και ταυτόχρονα υψηλής οξύτητας συνθήκες (Gomes, et al., 2018).

Η διαδικασία της οξικής ζύμωσης, δηλαδή η οξείδωση της αιθανόλης σε οξικό οξύ, πραγματοποιείται με δύο διαδοχικές καταλυτικές αντιδράσεις. Αρχικά, η αιθανόλη οξειδώνεται σε ακεταλδεϋδη, η οποία καταλύεται από τη μεμβρανική πυρρολοκινολινοκινόνη (PQQ) που εξαρτάται από την αλκοολική αφυδρογονάση (ADH). Στη συνέχεια, η παραγόμενη ακεταλδεϋδη οξειδώνεται αμέσως σε οξικό άλας από τη μεμβρανοεξαρτώμενη αλδεϋδική αφυδρογονάση (ALDH), που βρίσκεται κοντά στην ADH. Οι δύο τελευταίες σχηματίζουν ένα πολυενζυμικό σύμπλοκο στην μεμβράνη

κυτταρίνης και λειτουργούν διαδοχικά για τον σχηματισμό του οξικού οξέος. Τέλος, πρέπει να σημειωθεί ότι ορισμένα γένη AAB έχουν την ικανότητα να οξειδώνουν περαιτέρω το οξικό οξύ σε διοξείδιο του άνθρακα και νερό, γνωστή ως υπεροξειδωση. (Gomes, et al., 2018) Το γένος *Gluconobacter* δεν έχει την ικανότητα της υπεροξειδωσης, διότι δεν κατέχει τα απαραίτητα ένζυμα, έτσι παρατηρείται αύξηση προϊόντων, όπως το γλυκονικό οξύ (Coelho, et al., 2020).

Όσον αφορά τα βακτήρια οξικού οξέος που είναι παρόν στην μεμβράνη κυτταρίνης, έχουν ταυτοποιηθεί μεταξύ άλλων: *Acetobacter xylinum*, *Acetobacter pasteurianus*, *Acetobacter acetic*, *Bacterium gluconicum*, *Gluconobacter oxydans*, *Acetobacter intermedius*, *Acetobacter nitrogenifigens*; *Gluconacetobacter kombucha* (Jayabalan, et al., 2016).

Μεταξύ των οξικών βακτηρίων που αποτελούν μέρος της σύνθεσης του SCOBY, αξίζει να επισημανθεί το *Acetobacter xylinum* (ή *Komagataeibacter xylinus* ή *Gluconacetobacter xylinus*), δεδομένου ότι συνθέτει την κυτταρίνη της ζελατινώδης μεμβράνης. Ειδικότερα, η οξείδωση της γλυκόζης σε γλυκονικό οξύ αποτελεί το πρώτο βήμα της δράσης του *A. xylinum* (Jayabalan, et al., 2016). Έπειτα, μέσω ενός άλλου μεταβολικού μηχανισμού, δημιουργείται η μικροβιακή κυτταρίνη. Η διαδικασία περιλαμβάνει τη σύνθεση διφωσφορικής ουριδίνης – γλυκόζης (UDPGlc), αλλιώς η πρόδρομη ουσία της κυτταρίνης, με αποτέλεσμα κάθε κύτταρο *Acetobacter* να έχει την ικανότητα να πολυμερίσει ως 200.000 κατάλοιπα γλυκόζης σε αλυσίδες β-1,4-γλυκάνης ανά δευτερόλεπτο. Με τον τρόπο αυτό, τα βακτήρια πολλαπλασιάζονται υπό ελεγχόμενες συνθήκες, παράγοντας κυτταρίνη από διάφορες πηγές άνθρακα, όπως γλυκόζη, αιθανόλη, σακχαρόζη και γλυκερόλη (Villarreal-Soto, et al., 2018; Coelho, et al., 2020).

### III. Οξυγαλακτικά Βακτήρια (Lactic Acid Bacteria LAB)

Τέλος, αν και σε μικρότερο ποσοστό, αλλά εξίσου σημαντικά για την τελική ποιότητα και σύνθεση του προϊόντος, τα βακτήρια του γαλακτικού οξέος (LAB) μπορούν να βρεθούν στο SCOBY. Ο ρόλος και οι αναλογίες που βρίσκονται στην ζύμωση της kombucha είναι λιγότερο σαφής, αλλά μελέτες με βάση την καλλιέργεια και αλληλουχία έχουν αναφέρει γένη, συμπεριλαμβανομένων *Lactobacillus*, *Lactococcus* και *Oenococcus* (Harrison & Curtin, 2021).

Ως οξυγαλακτικά βακτήρια ορίζονται τα βακτήρια που παράγουν γαλακτικό οξύ ως κύριο προϊόν ζύμωσης των υδατανθράκων. Αποτελούν μία πολυάριθμη ομάδα θετικών κατά

Gram βακτηρίων, που δεν σχηματίζουν σπόριου και έχουν ραβδόμορφο ή κοκκοειδή σχήμα. Χρησιμοποιούνται ευρέως στον τομέα των τροφίμων, ιδίως στη ζύμωση τους, χάρη στην ικανότητά τους να διατηρούν τα τρόφιμα και να βελτιώνουν τις θρεπτικές και οργανοληπτικές ιδιότητές τους.

Συγκεκριμένα, στην παραγωγή της kombucha, τα LAB παίζουν συμπληρωματικό ρόλο στη συμβιωτική διαδικασία ζύμωσης μαζί με τις ζύμες και τα βακτήρια οξικού οξέος (AAB). Ενώ οι ζύμες ζυμώνουν τα σάκχαρα σε αιθανόλη και διοξείδιο του άνθρακα, οι LAB μπορούν να μετατρέψουν ορισμένα από τα σάκχαρα και πιθανώς μέρος της αιθανόλης σε γαλακτικό οξύ. Αυτή η παραγωγή γαλακτικού οξέος συμβάλλει στην οξύτητα του ποτού, προσθέτοντας μια ήπια ξινίλα και ενισχύοντας τις προβιοτικές του ιδιότητες. Τα προβιοτικά ορίζονται ως ζωντανοί μικροοργανισμοί που, όταν προσλαμβάνονται σε επαρκείς ποσότητες, παρέχουν οφέλη για την υγεία πέραν της βασικής διατροφής (Masood, et al., 2011).

#### **2.1.4 Οφέλη για την υγεία**

Από τα παλαιότερα χρόνια, πολυάριθμα οφέλη για τη υγεία και λειτουργικές ιδιότητες έχουν συνδεθεί με την συχνή κατανάλωση της κομπούτσα. Με την διαρκώς εξελισσόμενη έρευνα και την απόκτηση νέων πληροφοριών, η ελκυστικότητα του συγκεκριμένου ροφήματος έγκειται, όπως ήδη αναφέρθηκε, στα πιθανά οφέλη της για την υγεία, τα οποία σχετίζονται με το διαρκώς αυξανόμενο ενδιαφέρον των καταναλωτών τόσο για την υγεία του εντέρου και την αποτοξίνωση, όσο και για την γενική φυσική ευεξία. Έτσι, στο κεφάλαιο αυτό θα αναλυθούν οι λειτουργικές ιδιότητες του ροφήματος, βασισμένες όχι μόνο στην σύγχρονη έρευνα αλλά και στην παραδοσιακή φαρμακευτική.

Όπως είναι γνωστό, η ζύμωση του ζαχαρούχου τσαγιού από τη συμβιωτική καλλιέργεια, και η γενικότερη παρουσία του SCOBY στο ρόφημα, συμβάλλει στην παραγωγή βιοδραστικών ενώσεων και μικροοργανισμών. Η συμβιωτική καλλιέργεια αποτελείται από βακτήρια οξικού και γαλακτικού οξέος και οσμόφιλες ζύμες, όπως αναλύθηκε λεπτομερώς στην *υπό-ενότητα 2.1.3*. Από την πλευρά τους, ο πολύπλοκος συνδυασμός μικροοργανισμών συμβάλλει στην παραγωγή πολυφαινολών και μεταβολιτών, που προσδίδουν τελικά τα διατροφικά οφέλη στο τρόφιμο.

Συγκεκριμένα, λόγω της ζυμωτικής διαδικασίας, παρατηρείται η παραγωγή μεταβολιτών,

όπως το γλυκουρονικό οξύ και το βουτυρικό οξύ. Από την μία πλευρά, το γλυκουρονικό οξύ φημίζεται για τις αποτοξινωτικές του ιδιότητες, βοηθώντας στην αποβολή τοξινών από το σώμα, ενισχύοντας της υγεία του ήπατος (Karr & Sumner, 2019). Ακόμη, σχετίζεται με την υγεία των αρθρώσεων και την μείωση της φλεγμονής, μέσω της μετατροπής του σε γλυκοζαμίνη και θειική χονδροϊτίνη. Από την άλλη, το βουτυρικό οξύ συμβάλλει στην υγεία του εντέρου, υποστηρίζοντας την ακεραιότητα της εντερικής επένδυσης μέσω της προστασίας των ανθρώπινων κυτταρικών μεμβρανών (Watawana, et al., 2015). Επιπλέον, κατά την διάρκεια της ζύμωσης παρατηρείται η παραγωγή γαλακτικού οξέος και δευτερογενών μεταβολιτών. Το πρώτο χαρακτηρίζεται ευεργετικό για την υγεία του εντέρου, προάγοντας την συνολική υγεία του πεπτικού συστήματος, μέσω της διατήρησης ενός ισορροπημένου εντερικού μικροβιώματος. Οι δευτερογενείς μεταβολίτες σχετίζονται με την γενική ενίσχυση των ήδη υπαρχόντων θρεπτικών ιδιοτήτων, ενώ πιθανώς διαθέτουν αντιφλεγμονώδεις και αντικαρκινικές ιδιότητες (Watawana, et al., 2015).

Το ζυμωμένο ρόφημα είναι ακόμη πλούσιο σε πολυφαινόλες, γνωστές ως φυσικές ενώσεις με αντιοξειδωτικές ιδιότητες που απαντώνται κυρίως στο τσάι. Λέγεται ότι συμβάλλουν στην μείωση του οξειδωτικού στρες και της φλεγμονής, ενώ η διαδικασία της ζύμωσης ενισχύει την διαθεσιμότητα των πολυφαινολών, αυξάνοντας την ευεργετικότητά τους για την υγεία (Watawana, et al., 2015). Επιπρόσθετα, η kombucha αποτελεί αξιοσημείωτη πηγή βιταμινών του συμπλέγματος Β, που ως γνωστόν κρίνονται απαραίτητες για την ενίσχυση του μεταβολισμού, την υποστήριξη διαφόρων σωματικών λειτουργιών, όπως του νευρικού συστήματος, και γενικότερα για την συνολική υγεία (Karr & Sumner, 2019). Τέλος, μεταξύ των διάφορων οργανικών οξέων, το οξικό οξύ, ως ένα από τα κύρια παράγωγα συστατικά της kombucha που συμβάλλει στην όξινη γεύση της, διαθέτει αντιμικροβιακές ιδιότητες, που εμποδίζουν την ανάπτυξη παθογόνων και επιβλαβών βακτηρίων στο έντερο (Karr & Sumner, 2019). Συνεπώς, οι συγκεκριμένες ενώσεις προσδίδουν τις λειτουργικές ιδιότητες στο τρόφιμο και επηρεάζονται κυρίως από την ποιότητα και τον αρχικό πληθυσμό μικροοργανισμών, βακτηρίων και ζυμών, στο SCOBY αλλά και από τις συνθήκες που πραγματοποιείται η ζύμωση.

Παρόλο που απαιτείται περαιτέρω έρευνα για να κατανοηθεί πλήρως η έκταση λειτουργίας και οι μηχανισμοί πίσω από τις συγκεκριμένες ενώσεις, είναι αδιαμφισβήτητο ότι το τελικό προϊόν, μετά τη ζύμωση, διαθέτει πολυάριθμα οφέλη για

την ανθρώπινη υγεία. Πρώτα απ' όλα, ως προβιοτικό ρόφημα, η κομπούτσα συμβάλλει στην υγεία του πεπτικού συστήματος, ισορροπώντας την εντερική χλωρίδα, ομαλοποιώντας τελικά τις εντερικές δραστηριότητες και τον μεταβολισμό. Στο ίδιο πλαίσιο, βελτιώνει την λειτουργία του ήπατος, έχοντας προστατευτικές δράσεις έναντι βλαβών. (Watawana, et al., 2015; Miranda, et al., 2022). Στη συνέχεια, σύμφωνα με μελέτες που πραγματοποιήθηκαν σε διαβητικούς αρουραίους, η κατανάλωση kombucha προκάλεσε σημαντική μείωση των επιπέδων γλυκόζης στο αίμα και βελτίωση της ευαισθησίας στην ινσουλίνη, συμβάλλοντας στην ολική διαχείριση του διαβήτη (Miranda, et al., 2022). Σε παρόμοια γραμμή, άλλες έρευνες υποστηρίζουν ότι η κατανάλωση kombucha συσχετίζεται όχι μόνο με την επιτυχή διαχείριση του βάρους μέσω της ενίσχυσης του μεταβολισμού, αλλά και την μείωση των διαταραχών της εμμήνου ρύσεως και των εξάψεων της εμμηνόπαυσης, συνεισφέροντας στην συνολική υγεία των γυναικών (Watawana, et al., 2015).

Εκτός των προαναφερόμενων, λόγω της πλούσιας σύνθεσης του σε θρεπτικά συστατικά, είναι πιθανό ότι η συχνή κατανάλωση του ζυμωμένου τσάι να οδηγήσει στην τόνωση του ανοσοποιητικού συστήματος, προστατεύοντας τον οργανισμό από λοιμώξεις και ασθένειες. Επίσης, ορισμένες έρευνες υποστηρίζουν ότι συμβάλλει στη μείωση των επιπέδων χοληστερόλης και της αρτηριακής πίεσης, ενισχύοντας την καρδιαγγειακή υγεία (Karr & Sumner, 2019). Την ίδια στιγμή, λέγεται ότι η kombucha διαδραματίζει προστατευτικό ρόλο κατά του καρκίνου, λόγω της παρουσίας βιοδραστικών ενώσεων. Συγκεκριμένα, μειώνει την εξάπλωσή του, αφού παρουσιάζει αντιπολλαπλασιαστικές δράσεις έναντι διαφόρων ανθρώπινων κυττάρων (Miranda, et al., 2022). Τέλος, όπως ήδη αναφέρθηκε, το συγκεκριμένο λειτουργικό ποτό αποτελεί πηγή αναγκαίων βιταμινών και μετάλλων, για την ολική ευεξία του οργανισμού και ιδίως για την βελτιωμένη υγεία του δέρματος, των μαλλιών και νυχιών, αλλά και πολυφαινολών, προσδίδοντας αντιοξειδωτικές ιδιότητες. Ταυτόχρονα όμως, διαθέτει αντιμικροβιακές και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες, προσφέροντας ανακούφιση από την αρθρίτιδα και άλλες φλεγμονώδεις συνθήκες (Watawana, et al., 2015).

Όπως γίνεται φανερό, κατανοώντας την ιστορία, τον τρόπο παραγωγής και των πλεονεκτημάτων της kombucha, σχηματίζεται η συνολική εικόνα για τους λόγους που το αρχαίο ρόφημα, όχι μόνο άντεξε αλλά και άνθισε στη σύγχρονη εποχή, αποτελώντας σημαντικό μέρος της διατροφής, όσων δίνουν προτεραιότητα σε έναν υγιή τρόπο ζωής.

Όμως, τα περισσότερα από τα οφέλη για την υγεία προέρχονται από μελέτες που πραγματοποιήθηκαν *in vitro* και σε ζώα. Το γεγονός αυτό, χωρίς να αμφισβητεί τα όσα προαναφέρθηκαν παραπάνω, υποδηλώνει την ανάγκη για περαιτέρω έρευνα σε κλινικές δοκιμές σε ανθρώπους για την επικύρωση αυτών των ισχυρισμών.

## 2.2 Πράσινο Τσάι (*Camellia sinensis*)

Ένα από τα αρχαιότερα ροφήματα παγκοσμίως, το πράσινο τσάι, προέρχεται από τα φύλλα της *Camellia sinensis* και καταναλώνεται παγκοσμίως για πάνω από 5000 χρόνια, λόγω των αντιοξειδωτικών, αντιμικροβιακών και φαρμακευτικών του ιδιοτήτων. Γνωστό για την πλούσια ιστορία του και τα ιατρικά οφέλη του, το πράσινο τσάι είναι ιδιαίτερα διαδεδομένο στην Ανατολική Ασία και παραδοσιακά η κατανάλωση του πραγματοποιούταν με μάσηση των φρέσκων φύλλων, με τον ίδιο τρόπο που καταναλωνόταν ο καφές στην αρχή. Αργότερα, με την εφαρμογή του βρασμού στο νερό, διαδόθηκε η κατανάλωση του τσαγιού ως ένα αρωματικό αφέψημα και πλέον, πάνω από τα δύο τρίτα του παγκόσμιου πληθυσμού ευχαριστιούνται το ρόφημα αυτό σε συχνή βάση. Συγκεκριμένα, το πράσινο τσάι παράγεται πλέον από φρέσκα φύλλα του φυτού *Camellia sinensis*, τα οποία επεξεργάζονται ταχεία σε ατμό για την αποφυγή ζυμώσεώς τους (Shrivastava, et al., 2018). Έπειτα, πραγματοποιείται η εκχύλιση των φύλλων με χρήση ζεστού ή κρύου νερού.



Εικόνα 2.2-1 Φυτό *Camellia sinensis* L

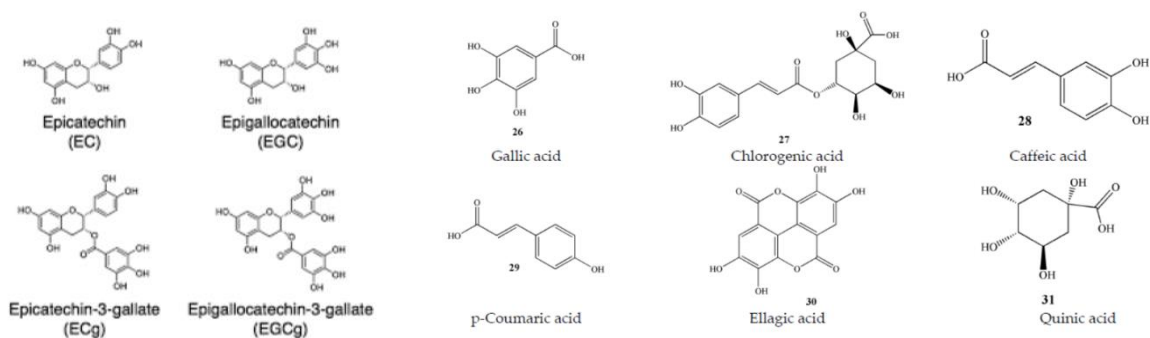
Η καλλιέργεια του πράσινου τσαγιού έχει τις ρίζες του στην Ανατολική Ασία, συγκεκριμένα στην Ιαπωνία και στην Κίνα. Αυτό συμβαίνει, διότι το φυτό ευδοκimeί σε περιβάλλοντα με μέτριες προς υψηλές θερμοκρασίες, υψηλά ποσοστά υγρασίας λόγω συχνών βροχοπτώσεων και όξινα εδάφη. Ως αποτέλεσμα, η συνήθης εικόνα του φυτού αποτελείται από ένα αειθαλή

θάμνο, με μεγάλο αριθμό κλαδιών, φύλλων σκούρου πράσινου χρώματος και επιμήκης ωοειδούς σχήματος και τέλος λευκά - κίτρινα λουλούδια, που αναπτύσσονται μεταξύ Οκτώβρη και Φεβρουάριο. Όσον αφορά την βοτανολογία, το *Camellia sinensis* L. αποτελεί φυτό της οικογένειας Theaceae και του γένους *Camelia*, γνωστό ως “Tea” ή



“Cha” στην διεθνή βιβλιογραφία και ως «πράσινο τσάι» στην ελληνική. Στην ευρύτερη γεωγραφική περιοχή της Ανατολικής Ασίας, έχουν βρεθεί πάνω από 90 διαφορετικές ποικιλίες της *Camellia sinensis*, με δύο βασικές την *Camellia sinensis sinensis* από την Κίνα και *Camellia sinensis assamica* από την Βόρεια Ινδία. (Shrivastava, et al., 2018)

Όσον αφορά την χημική σύσταση του πράσινου τσαγιού, από της αρχές του 19<sup>ου</sup> αιώνα έως σήμερα, πάνω από πάνω από 500 χημικές ενώσεις έχουν απομονωθεί, συμπεριλαμβανομένων 400 οργανικών ενώσεων και 40 ανόργανων. Όπως ήδη αναφέρθηκε, η ποικιλόμορφη σειρά βιοδραστικών συστατικών του οφείλεται για τις ιδιότητες που προάγουν την υγεία. Αρχικά, το πράσινο τσάι αποτελείται από πολυφαινόλες σε ποσοστό μέχρι και 20 με 30%. Μεταξύ των 30 διαφορετικών πολυφαινολικών ενώσεων που βρίσκονται στο τσάι, σε μεγαλύτερα ποσοστά είναι οι κατεχίνες, τα φλαβονοειδή και τα φαινολικά οξέα. Οι κατεχίνες, ως η κυριότερη υποκατηγορία φλαβονολών, κατέχουν πάνω από το 70% του ολικού φαινολικού περιεχόμενου του πράσινου τσαγιού και είναι υπεύθυνες για το 92% της αντιοξειδωτικής του ικανότητας. Οι κυριότερες κατεχίνες που συναντώνται είναι: catechin (C), epicatechin (EC), epigallocatechin (EGC), epicatechin gallate (ECG) και epigallocatechin Gallate (EGCG) (Lorenzo & Munekata', 2016). Τα φαινολικά οξέα, παρόλο που βρίσκονται σε μικρότερο ποσοστό, αποτελούν αντικείμενο ενδιαφέροντος της συγκεκριμένης πτυχιακής εργασίας, με τα κυριότερα να είναι: γαλλικό οξύ, χλωρογενικό οξύ, καφεϊκό οξύ, ελλαγικό οξύ και κινικό οξύ. Τέλος, το πράσινο τσάι είναι πλούσιο σε φλαβονοειδή, ειδικότερα σε γλυκοζίτες φλαβονόλης υπό την μορφή μόνο-, δι- ή τρι- σακχαριτών, συμπεριλαμβανομένων της μυρικετίνης και κερκετίνης, και σε ανθοκυανίνες. Παρόλο που η περιεκτικότητα των ανθοκυανινών στο τσάι είναι χαμηλή, ως υδατοδιαλυτές χρωστικές με πικρή γεύση, επηρεάζουν σημαντικά την ποιότητα του τελικού προϊόντος (Zhao, et al., 2022).



Εικόνα 2.2-2 Κύριες ενώσεις κατεχινών και φαινολικών οξέων που συναντώνται στο πράσινο τσάι (Zhao, et al., 2022)

Επιπλέον, εκτός την υψηλή περιεκτικότητα του σε πολυφαινόλες, το πράσινο τσάι περιέχει πρωτεΐνες σε περιεκτικότητα ίση με 15 έως 20%, που συμπεριλαμβάνουν τα αμινικά οξέα όπως την τυροσίνη, την τρυπτοφάνη, την θρεονίνη, την βαλίνη το ασπαρτικό οξύ κ.α. Ακόμη, αποτελεί πηγή ιχνοστοιχείων όπως μαγνήσιο, χρώμιο, μαγγάνιο, ασβέστιο, σίδηρο κ.λπ., μακροστοιχείων, όπως φώσφορο, φθόριο, ιώδιο και υδατανθράκων, όπως γλυκόζης, σακχαρόζης και κυτταρίνης. Τέλος, το τσάι προερχόμενο από το φυτό *Camellia sinensis*, λαμβάνοντας την ελάχιστη δυνατή επεξεργασία, αποφεύγωντας ταυτόχρονα την οξειδωσή του, είναι πλούσιο όχι μόνο σε βιταμίνες B<sub>2</sub>, B<sub>3</sub>, C και E, αλλά και σε στερόλες και λιπίδια όπως λινολεϊκό και α-λινολενικό οξύ (Musial, et al., 2020).

Όπως ήδη έχει αναφερθεί, τα τελευταία χρόνια το αυξανόμενο ενδιαφέρον των καταναλωτών για σωματική και ψυχική ευεξία σε συνδυασμό με την πληθώρα ερευνών που πραγματοποιούνται για τα διατροφικά πλεονεκτήματα των λειτουργικών τροφίμων, και συγκεκριμένα του πράσινου τσαγιού, έχει οδηγήσει σε μία δραματική αύξηση της δημοτικότητας του. Παραδοσιακά, εκεί που ξεκίνησε και η κατανάλωση του ως φαρμακευτικό τρόφιμο, δηλαδή στην κινέζικη παραδοσιακή ιατρική, το πράσινο τσάι προτεινόταν για ποικίλους λόγους, μεταξύ των οποίων τις αναζωογονητικές του ιδιότητες και την πρόληψη μελλοντικών προβλημάτων υγείας. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιούταν για την αντιμετώπιση πονοκεφάλων, γενικών σωματικών πόνων, πεπτικών προβλημάτων, κατάθλιψης και γενικότερα ως ένα ελιξίριο μακροζωίας. Παρόλο αυτά, η χρήση του δεν σταματούσε στην ιατρική αλλά κανείς μπορούσε να το συναντήσει τόσο στην μαγειρική όσο και σε παραδοσιακά καλλυντικά της εποχής.

Στη σύγχρονη κοινωνία, με την ανάπτυξη της δυτικής ιατρικής, η θέση των φαρμακευτικών ροφημάτων έχει μεταβληθεί, όμως οι τελευταίες τάσεις και έρευνες έχουν βοηθήσει στην αυξανόμενη ευαισθητοποίηση των ιδιοτήτων του φυτού *Camellia sinensis*. Με τον τρόπο αυτό, το πράσινο τσάι αναγνωρίζεται για τα ποικίλα οφέλη που προσφέρει, χάρη στην υψηλή περιεκτικότητα σε πολυφαινόλες και κυρίως κατεχίνες, με κυριότερη την epigallocatechin-3-gallate (EGCG). Συνεπώς, πρωταρχική θετική επιρροή αποτελεί η χρήση του ως προληπτικό μέσο, χάρη στην υψηλή περιεκτικότητά του σε πολυφαινόλες που είναι ισχυρά αντιοξειδωτικά. Οι ενώσεις αυτές συμβάλλουν στην προστασία του οργανισμού από το οξειδωτικό στρες και μπορούν να προλάβουν εκφυλιστικές ασθένειες. (Chacko, et al., 2010) Ακόμη, το τσάι υποστηρίζει το

ανοσοποιητικό σύστημα του ανθρώπου, ενισχύοντάς το μέσω της προστασίας του από οξειδωτικά και ελεύθερες ρίζες. Τρίτον, η κατανάλωση πράσινου τσαγιού έχει συνδεθεί με μειωμένο κίνδυνο εμφάνισης διαφόρων μορφών καρκίνου, όπως του πνεύμονα, του παχέος εντέρου, του οισοφάγου, του στόματος, του στομάχου, του λεπτού εντέρου, των νεφρών, του παγκρέατος και των μαστικών αδένων. Σύμφωνα με ποικίλες μελέτες, οι αντικαρκινικές ιδιότητες συνδέονται με την παρουσία των κατεχινών που συμβάλουν στην πρόληψη του οξειδωτικού στρες (Lorenzo & Munekata', 2016).

Ένα ακόμη όφελος της συχνής κατανάλωσης πράσινου τσαγιού αφορά την καρδιαγγειακή υγεία. Ορισμένες μελέτες σε ζώα έχουν αποδείξει ότι το πράσινο τσάι πιθανώς να μειώνει το επίπεδο γλυκόζης στο αίμα και το σωματικό βάρος, συμβάλλοντας στη μείωση της αρτηριακής πίεσης και του κινδύνου εγκεφαλικού επεισοδίου και στεφανιαίας νόσου. Ειδικότερα για την διαχείριση βάρους, η μακροχρόνια κατανάλωση των κατεχινών του πράσινου τσαγιού λέγεται ότι συμβάλλει στη διαχείριση της παχυσαρκίας και του διαβήτη τύπου 2, μέσω της επιρροής τους στο μεταβολισμό, κυρίως των υδατανθράκων. Τέλος, το φυτό *Camellia sinensis* διαθέτει αντιμικροβιακές επιδράσεις έναντι ποικίλων παθογόνων, όπως *Helicobacter pylori*, τον ιό της γρίπης και του έρπητα, υποδηλώνοντας πιθανά οφέλη στη διαχείριση λοιμώξεων (Chacko, et al., 2010).

Συμπερασματικά, είναι αδιαμφισβήτητο ότι η κατανάλωση πράσινου τσαί, προερχόμενο από το φυτό *Camellia sinensis* διαθέτει πολλαπλά οφέλη για τον ανθρώπινο οργανισμό, όντας ένα λειτουργικό τρόφιμο, λειτουργεί τόσο ως μέτρο πρόληψης όσο και αντιμετώπισης. Για τον λόγο αυτό, αποδεικνύεται και η χρησιμότητά του στον κλάδο της Φαρμακολογίας, Κοσμετολογίας, αλλά και Τεχνολογίας Τροφίμων. Παρόλο αυτά, είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι η υπέρμετρη κατανάλωσή του μπορεί να οδηγήσει σε αντίθετα αποτελέσματα, παραδείγματος χάρη τοξικότητα στα ηπατικά κύτταρα ή προβλήματα του θυρεοειδούς. Συνεπώς, κρίνεται απαραίτητη η πραγματοποίηση μελετών τόσο για την πιο ολοκληρωμένη κατανόηση των μηχανισμών του τσαί όσο και για την τοποθέτηση ασφαλών επιπέδων κατανάλωσης.

### 2.3 Τσάι του βουνού (*Sideritis spp.*)

Το ελληνικό τσάι του βουνού, επιστημονικά γνωστό ως *Sideritis spp.*, είναι ένα παραδοσιακό τσάι από βότανα που καταναλώνεται εδώ και αιώνες, ιδιαίτερα στην

περιοχή της Μεσογείου και της Ελλάδας. Το συγκεκριμένο τσάι, συχνά αναφερόμενο ως «τσάι του βοσκού», λόγω της ιστορικής χρήσης του από τους Έλληνες βοσκούς, παρασκευάζεται από τα αποξηραμένα άνθη, φύλλα και στελέχη των φυτών που ανήκουν στο γένος *Sideritis*. Γνωστό για την ευχάριστη γεύση του και τα πολυάριθμα οφέλη για την υγεία, το ελληνικό τσάι του βουνού έχει συγκεντρώσει την προσοχή όχι μόνο ως δημοφιλές ρόφημα αλλά και ως πιθανό λειτουργικό συστατικό σε διάφορα τρόφιμα, συμπεριλαμβανομένων των ζυμωμένων ποτών, με το αυξανόμενο ενδιαφέρον των καταναλωτών για την σωματική τους ευεξία.

Στο πλαίσιο της παρούσας πτυχιακής εργασίας, το ελληνικό τσάι του βουνού χρησιμεύει ως βασικό συστατικό για την παραγωγή ενός ζυμωμένου προβιοτικού ροφήματος, γνωστό ως κομπούχα. Η ενσωμάτωση του *Sideritis spp.* σε αυτή την παραδοσιακή διαδικασία ζύμωσης όχι μόνο ενισχύει το γευστικό προφίλ



Εικόνα 2.3-1 Αποξηραμένο φυτό *Sideritis spp.*

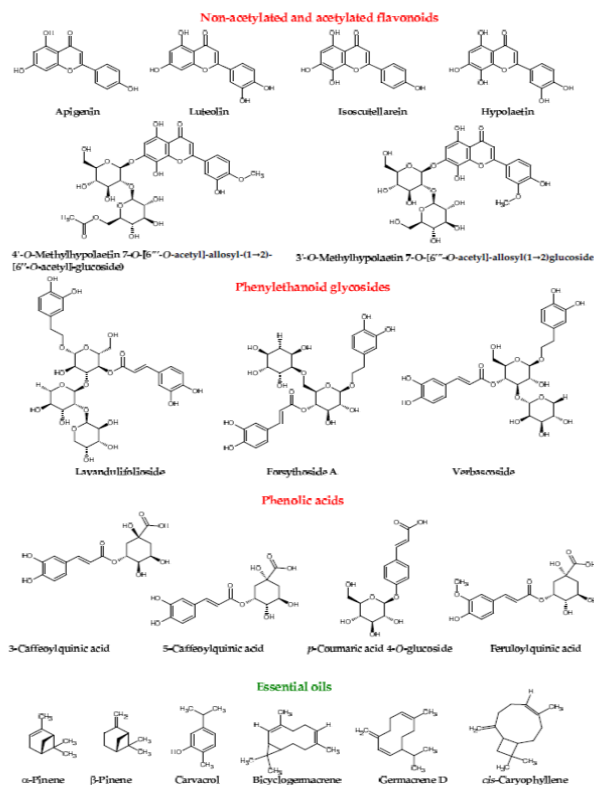
του προϊόντος, αλλά προσθέτει και τις μοναδικές ιδιότητες αυτού του βοτάνου, σε συνδυασμό με το πράσινο τσάι, που προάγουν την υγεία, καθιστώντας το ιδανικό υποψήφιο για χρήση σε λειτουργικά τρόφιμα και ποτά.

Η καλλιέργεια των φυτών *Sideritis*, όπως ήδη αναφέρθηκε, συναντάται κυρίως στην περιοχή της Μεσογείου, όπως Ελλάδα, Τουρκία και Ισπανία, αλλά και στα νησιά της Μακαρονησίας και στην δυτική και κεντρική Ασία. Το γένος *Sideritis* ανήκει στην οικογένεια *Lamiaceae* και περιλαμβάνει πολυετή φυτά που είναι ενδημικά στην Βαλκανική χερσόνησο, με πάνω από 150 διαφορετικά είδη που αναπτύσσονται φυσικά σε ορεινές περιοχές. (Zyzelewicz, et al., 2020) Κυριότερα είδη που συναντώνται στα ελληνικά εδάφη είναι το *Sideritis scardica*, γνωστό ως τσάι του Ολύμπου, το *Sideritis raeseri*, κυρίως βρίσκεται στον Παρνασσό ή στο λεκανοπέδιο Αττικής, *Sideritis syriaca*, γνωστό επίσης ως μαλοτήρας από την Κρήτη, *Sideritis clandestine*, αλλιώς τσάι του Μαλεβού από τον Ταΰγετο, κ.α..

Όσον αφορά την τις βοτανολογικές λεπτομέρειες, χαρακτηρίζεται από στενά και αρωματικά φύλλα με αιχμές που διαθέτουν κίτρινες, λευκές ή κόκκινες στεφάνες και ωοειδή καρπούς. Η ιδανική καλλιέργεια των ειδών του Σιδερίτη επιτυγχάνεται σε

ηλιόλουστες και βραχώδεις πλαγιές και βοσκοτόπια, σε υψόμετρο από το επίπεδο της θάλασσας μέχρι και τα 3000 μέτρα, σε ελαφρώς αλκαλικά εδάφη με μέτριες απαιτήσεις σε θρεπτικά συστατικά. Μία ακόμη ενδιαφέρουσα λεπτομέρεια του γένους είναι ότι κατέχει την ικανότητα να δημιουργεί φυσικά υβρίδια μεταξύ των ειδών, όπως το *Sideritis rodriguezii*, το *Sideritis laderoii* και το *Sideritis arizagae*. (González-Burgos, et al., 2011) Επίσης, η καλλιέργεια του τσάι του βουνού μπορεί να χρησιμοποιηθεί και με σκοπό την διατήρηση της βιοποικιλότητας ενός τόπου, έχοντας περιβαλλοντικά οφέλη. Συγκεκριμένα, στα χωράφια του Σιδερίτη συναντώνται ποώδη φυτά, κυρίως από τις οικογένειες *Asteraceae* και *Poaceae* και χρησιμοποιούνται τα ίδια χωράφια για τουλάχιστον 5 έως 8 χρόνια. Τέλος, η καλύτερη εποχή συγκομιδής αυτού του φυτού είναι κατά την διάρκεια της πλήρους ανθοφορίας και ακολουθεί η διαδικασία της ξήρανσης που παίζει καίριο ρόλο στην επίτευξη της επιθυμητής ποιότητας του τελικού προϊόντος. (Solomou, et al., 2019)

Η χημική σύσταση του τσάι του βουνού, όπως και του πράσινου τσάι, είναι πλούσια και πολύπλοκη, για τον λόγο αυτό αποτελεί και αντικείμενο μελέτης τα τελευταία χρόνια. Είναι όμως αναγκαίο να κατανοηθεί ότι μεταξύ των 150 διαθέσιμων ποικιλιών που είναι διαθέσιμα παγκοσμίως, το φυτοχημικό περιεχόμενο των φυτών Σιδερίτη μεταβάλλεται ανάλογα τις περιβαλλοντικές συνθήκες (θερμοκρασία, υψόμετρο, ηλιοφάνεια, υγρασία) και την γεωγραφική τους προέλευση. Το γένος *Sideritis* χαρακτηρίζεται από την πλούσια περιεκτικότητά του σε βιοδραστικές ενώσεις, όπως φλαβονοειδή, φαινολικά οξέα, και τα αιθέρια έλαια, τα οποία συμβάλλουν στις αντιοξειδωτικές, αντιφλεγμονώδεις και αντιμικροβιακές του ιδιότητες (Κατσιώτης & Χατζοπούλου, 2016). Παρά τις φυτοχημικές διαφορές μεταξύ των ειδών, έχει αποδεχθεί ότι συγγενικά είδη *Σιδερίτη* διαθέτουν και παρόμοιες ομάδες πολυφαινολών. Ειδικότερα, χαρακτηρίζονται από ακετυλογλυκοζίτες φλαβονοειδών και κυρίως φαινυλαιθανοειδών γλυκοζιτών (echinacoside, verbascoside, samioside, isoverbascoside κ.α.) αντοπροσωπεύοντας το 90% του συνόλου των φαινολικών ενώσεων. Σύμφωνα με μία μελέτη, συσχετίστηκε τελικά τα είδη φλαβονοειδών με την γεωγραφική προέλευση του εκάστοτε είδους Σιδερίτη. Με άλλα λόγια, στα Μακαρονησιακά είδη, κυρίαρχα φλαβονοειδή αποτελούν το 5,6,7-τριοξυγονωμένη φλαβόνη (κίρσιμαριτίνη, σαλβιγενίνη, νεπετίνη), αντίθετα στα Μεσογειακά είδη απαντώνται κυρίως 5,6,7,8-τετραοξυγονωμένη φλαβόνη (Gil, et al., 1993)



Εικόνα 2.3-2 Κύριες βιοδραστικές ενώσεις (φλαβονοειδή, φαινολικά οξέα) στο πράσινο τσάι Σιδεριτή

Σ' αντίθεση με τα υπόλοιπα γένη της οικογένειας *Lamiaceae*, στο γένος *Sideritis*, τα αιθέρια έλαια παράγονται, συγκριτικά, σε μικρότερες συγκεντρώσεις, μεταξύ 0,01% και 0,85%, χωρίς αυτό να σημαίνει ότι δεν διαθέτουν ένα εξίσου χαρακτηριστικό και ευχάριστο άρωμα. Ως γενικός κανόνας για την κατανόηση των αιθέριων ελαίων, ακολουθείται η παρακάτω συσχέτιση μεταξύ των κυρίων ομάδων που απαντώνται στα αιθέρια έλαια και την εκάστοτε συγκέντρωσή τους. Αναλυτικότερα, όσο υψηλότερη περιεκτικότητα σε μονοτερπενικούς υδρογονάνθρακες, τόσο υψηλότερη είναι και η απόδοση του αιθέριου ελαίου. Αντίθετα, όσο υψηλότερη η περιεκτικότητα σε σεσκιτερπένια, τόσο χαμηλότερη είναι η απόδοση του αιθέριου ελαίου (Kirimer, et al., 2004). Όσον αφορά τη σημαντική ομάδα των διτερπενίων, που εμφανίζονται σε οποιαδήποτε απόδοση, στην Ανατολική και Κεντρική Μεσόγειο απαντώνται κυρίως διτερπένια καουρανίου, ενώ στην Δυτική συναντώνται διτερπένια με ποικίλους ανθρακικούς σκελετούς, όπως labdane, atisene, ent-καουράνιο κ.λπ. (González-Burgos, et al., 2011). Εκτός των συστατικών που ήδη έχουν αναφερθεί, το πράσινο τσάι περιέχει ως αξιοσημείωτα συστατικά και την καφεΐνη και τις ταννίνες, που προσδίδουν το χρώμα.

Τα τελευταία χρόνια, χωρίς αμφιβολία, παρατηρείται αυξανόμενο ενδιαφέρον του επιστημονικού τομέα αλλά και των κλάδων στα προϊόντα που προάγουν την μακροζωία, έτσι και το ελληνικό τσάι του βουνού έχει συγκεντρώσει αυξημένη προσοχή. Στο παρελθόν, γνωστό ως «τσάι του βοσκού», κατείχε πολλαπλές χρήσεις, μεταξύ των οποίων ήταν θεραπεία για φλεγμονές, κοινό κρυολόγημα, ανακούφιση του πόνου, γαστρεντερικές διαταραχές κ.α.. Πλέον αποτελεί ένα χαμηλού κόστους αφέψημα, καθημερινής κατανάλωσης τόσο παγκοσμίως όσο και στην Ελλάδα, που διαθέτει αποδεδειγμένα ποικίλες ιδιότητες θετικές για τον οργανισμό. Αρχικά, οι ευεργετικές του ιδιότητες οφείλονται στην πλούσια πηγή βιοδραστικών συστατικών του, ιδίως πολυφαινολών, παρουσιάζοντας τόσο αντιοξειδωτική όσο και αντιφλεγμονώδη δράση. Επίσης, λέγεται ότι η συχνή κατανάλωση Σιδεριτή επιβραδύνει την ανάπτυξη αθηροσκλήρωσης, χάρη στην παρουσία φλαβονοειδών, όπως του χλωρογενικού οξέος και της ακτεοσίδης. Οι δύο αυτές ενώσεις χαρακτηρίζονται από την επίδρασή τους στην αναστολή της οξείδωσης της LDL, μειώνοντας τα μόρια κυτταρικής προσκόλλησης και καταστέλλοντας τους μεσολαβητές φλεγμονής, μειώνοντας τελικά την ολική χοληστερόλη (Tomou, et al., 2020). Ένα ακόμη όφελος άμεσα συνδεδεμένο με την κατανάλωση τσάι του βουνού αποτελεί η βελτίωση γαστρεντερικών διαταραχών, με κυριότερες τον στομαχόπονο, την δυσπεψία και το φούσκωμα. Τέλος, είναι γνωστό ότι ανακουφίζει συμπτώματα κοινού κρυολογήματος, συμπεριλαμβανομένου του πυρετού, της γρίπης, του πονόλαιμου, της βρογχίτιδας αλλά ταυτόχρονα θεωρείται και τονωτικό και διουρητικό μέσο (González-Burgos, et al., 2011).

Συνοψίζοντας, το ελληνικό τσάι του βουνού από το φυτό *Sideritis spp.* αποδεικνύεται, αν και λιγότερο γνωστό, ως ένα πολύτιμο βότανο με όχι μόνο ευχάριστη γεύση και άρωμα, αλλά και πλήθος ιδιοτήτων που προάγουν την υγεία. Η μοναδική φυτοχημική του σύνθεση, που περιλαμβάνει ισχυρά αντιοξειδωτικά και αντιφλεγμονώδεις ενώσεις, το καθιστά επίσης πολύτιμο συστατικό σε σύγχρονα λειτουργικά τρόφιμα και ποτά. Συνεπώς, με την ενσωμάτωση του τσάι του βουνού στην παραγωγή ενός ζυμωμένου προβιοτικού ροφήματος, η παρούσα εργασία αναδεικνύει τη δυνατότητά του να ενισχύσει τόσο τις οργανοληπτικές ιδιότητες όσο και τα οφέλη για την υγεία του τελικού προϊόντος.

#### 2.4 Χαρούπι και Χαρουπόμελο (*Ceratonia siliqua* L.)

Η επιστημονική ονομασία της χαρουπιάς, *Ceratonia siliqua* L., προέρχεται από την ελληνική λέξη «κέρας», η οποία σχετίζεται με το κερατόμορφο σχήμα του καρπού, και τη λατινική λέξη *siliqua*, η οποία αναφέρεται στη σκληρότητα και το σχήμα των λοβών (Papaefstathiou, et al., 2018). Το χαρούπι αποτελεί μέρος της διατροφής των ανθρώπων και των ζώων από την αρχαιότητα μέχρι και σήμερα. Συναντάται κυρίως στις χώρες τις Μεσογείου, με κύριους παραγωγούς την Ιταλία, την Ισπανία, την Τουρκία και την Ελλάδα, αλλά και στις χώρες της Νότιας Αραβίας. Ειδικότερα, σε περιόδους πείνας κατείχε βασικό κομμάτι της διατροφής του πληθυσμού, λόγω της εύκολης πρόσβασης και συντήρησης του καρπού σε συνδυασμό με τα πλούσια θρεπτικά συστατικά του. Είναι γνωστό κι ως «η σοκολάτα των φτωχών», που βοήθησε αξιοσημείωτο μέρος της ελληνικής κοινωνίας, ιδίως της Κρήτης, να σωθεί από την ασιτία κατά τη διάρκεια του Β' Παγκόσμιου Πολέμου (Tzatzani & Ouzounidou, 2023).

Όπως ήδη αναφέρθηκε, η χαρουπιά είναι ένα ενδημικό φυτό στην περιοχή της Μεσογείου, που πρωταρχικά προήλθε από την Δυτική Ασία και το χαρούπι (*Ceratonia siliqua* L.) είναι ένα αειθαλές δέντρο που ανήκει στην οικογένεια *Leguminosae* ή *Fabaceae* (υποοικογένεια *Caesalpinioideae*). Οι τέσσερις κύριες γενετικές ομάδες του είδους *C. siliqua*, που έχουν μέχρι στιγμής αναγνωριστεί είναι: SM από το Νότιο Μαρόκο, SS από την Νότια Ισπανία, CM από την Κεντρική Μεσόγειο, δηλαδή από Γαλλία και Νότια Ιταλία, και EM από την Ανατολική Μεσόγειο, δηλαδή Ελλάδα, Κύπρος και Λίβανος (Brassescio, et al., 2021). Η καλλιέργεια της χαρουπιάς ευδοκμεί στις ημίξηρες Μεσογειακές χώρες ή υποτροπικά κλίματα, καθώς έχει χαμηλές απαιτήσεις σε αρδευτικές ανάγκες και προτιμάει κυρίως αλκαλικά αμμώδεις και ασβεστούχα εδάφη. Με άλλα λόγια, έχει υψηλή ανθεκτικότητα στην ξηρασία και σε υψηλές θερμοκρασίες, αλλά είναι ευαίσθητη στο ψύχος (Batlle & Tous, 1997).

Όπως και τα περισσότερα φυτά στη φύση, η χημική σύνθεση του χαρουπιού διαφοροποιείται ανάλογα τις περιβαλλοντικές συνθήκες (θερμοκρασία, υψόμετρο, ηλιοφάνεια, υγρασία), την γεωγραφική του προέλευση, αλλά και τον χρόνο συγκομιδής του. Σε γενικές γραμμές, όμως, η χημική σύσταση του χαρουπιού αποτελείται από: 45 έως 52% σάκχαρα, συμπεριλαμβανομένων 35 με 45% σακχαρόζη, 6 με 7% φρουκτόζη και 2 με 4% γλυκόζη, έως 40% φυτικές ίνες, 2 έως 7% πρωτεΐνες, 5,5% D-Πινιτόλη, 2 έως 3% τέφρα, 0,5 έως 1% λίπος και 1,4 έως 2,0% ολικό φαινολικό περιεχόμενο. Η υψηλή

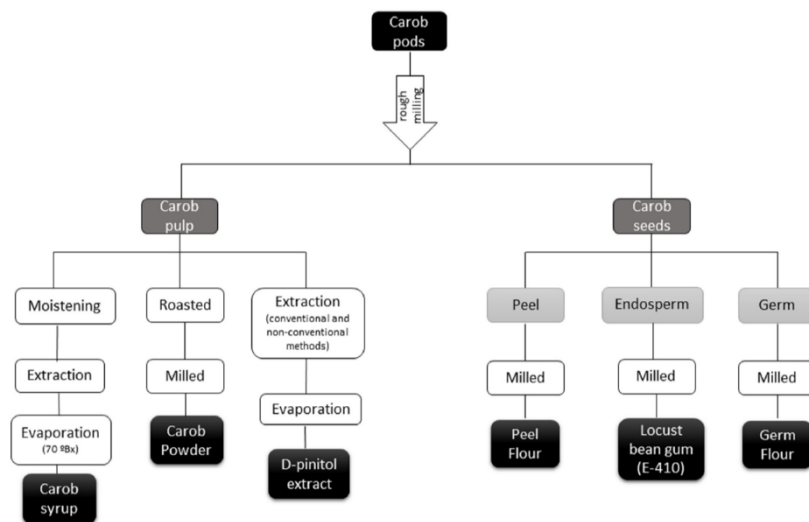


συγκέντρωση ολικών σακχάρων δημιουργούν τις κατάλληλες συνθήκες για την πραγματοποίηση ζυμώσεων με χρήση των μικροοργανισμών *Aspergillus niger*, *Lactobacillus casei*, *Saccharomyces cerevisiae* ή *Zygomonas mobilis*. Επιπρόσθετα, περιλαμβάνει ικανοποιητικό ποσοστό ανόργανων συστατικών, συμπεριλαμβανομένων κάλιο (993 έως 1089 mg / 100 g), ασβέστιο (266 έως 319 mg / 100 g), μαγνήσιο (76 έως 79 mg / 100 g) και φώσφορο (55 έως 56 mg / 100 g) (Nasar-Abbas, et al., 2015), και βιταμινών E, D, C και B<sub>6</sub>. Η συγκεκριμένη χημική δομή του αποδίδει μία γεύση που θυμίζει σοκολάτα με νότες ξηρών καρπών, χωρίς αυτό να σημαίνει ότι περιέχει διεγερτικά, γνωστά ως καφεΐνη και θεοβρωμίνη ή οξαλικό οξύ που πιθανώς αποτελεί πηγή σχηματισμού πέτρας στα νεφρά (Nasar-Abbas, et al., 2015).

Είναι αδιαμφισβήτητο ότι το χαρούπι χρησιμοποιείται από τον άνθρωπο ως σημαντική διατροφική πηγή και φαρμακευτικό φυτό από τα αρχαία χρόνια, χάρη στην πλούσια δομή που του προσδίδει πολυάριθμες ιδιότητες για την υγεία. Πρώτα από όλα, το χαρούπι αποτελεί μία εξαιρετική πηγή αντιοξειδωτικών χάρη στο υψηλό ολικό φαινολικό περιεχόμενο, σε συνδυασμό με αντιβακτηριακή και αντιμυκητιακή δράση (Azab, 2017). Συγκεκριμένα, η αντιοξειδωτική δράση συμβάλλει στην εξουδετέρωση του οξειδωτικού στρες, δρώντας ευεργετικά στις κυτταρικές αντιδράσεις και στην λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος (Brassescio, et al., 2021). Επιπλέον, το χαρούπι αποτελεί ένα διατροφικό προϊόν με υψηλή συγκέντρωση φυτικών ινών αλλά και υψηλή συγκέντρωση απλών σακχάρων, γεγονός που του προσδίδει χαμηλό γλυκαιμικό δείκτη και κορεσμό για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα. Συγκεκριμένα, έχει αποδεχθεί ότι ο ρυθμό απορρόφησης της γλυκόζης στο αίμα και πέψης μειώνονται με την κατανάλωση φυτικών ινών, ενώ ταυτόχρονα είναι πιθανό να συμβάλλουν στην πρόληψη παχυσαρκίας και καρδιαγγειακών νοσημάτων (Brown, 2016). Συνεπώς, ο συνδυασμός της υψηλής περιεκτικότητας φυτικών ινών με την 5,5% συγκέντρωση D-Πινιτόλης, προσδίδει όχι μόνο αντιδιαβητική δράση έναντι του διαβήτη τύπου 2, αλλά και προστατευτικές επιδράσεις έναντι του οξέος έλκους και γαστρεντερικές διαταραχές, όπως δυσκοιλιότητα (Brassescio, et al., 2021). Τέλος, η πολύπλοκη σύνθεση του χαρουπιού (*Ceratonia siliqua* L.), και συγκεκριμένα η υψηλή συγκέντρωση πολυφαινολών και ινών, συμβάλλουν στην μείωση της LDL χοληστερόλης και στην πρόληψη κατά διάφορων τύπων καρκίνου, χάρη στην υψηλή αντιοξειδωτική δράση (Nasar-Abbas, et al., 2015).

Παρατηρώντας και την εικόνα 2.4-1, το χαρούπι χρησιμοποιείται πλέον για την

δημιουργία ποικίλων προϊόντων, που είτε είναι διαθέσιμα στην αγορά ως έχει είτε εφαρμόζονται σε άλλα τρόφιμα, εμπλουτίζοντας την γεύση και την διατροφική τους ετικέτα. Ειδικότερα, το χαρούπι επεξεργάζεται κυρίως σε χαρουπάλευρο και χαρουπόμελο, τα οποία συχνά προστίθενται σε ροφήματα, ιδίως ζυμωμένα, ζυμαρικά χωρίς γλουτένη, αρτοσκευάσματα, αλείμματα κ.λπ..



Εικόνα 2.4-1 Επιγραμματικό διάγραμμα ποικιλομορφίας προϊόντων χαρουπιού

Το χαρουπόμελο, αλλιώς το σιρόπι χαρουπιού, παρασκευάζεται από του λοβούς που προέρχονται από το φυτό χαρουπιού (*Ceratonia siliqua* L). Συγκεκριμένα, παρασκευάζεται με την επεξεργασία του πολτού χαρουπιού, όπου το αλεσμένο χαρούπι αφήνεται σε νερό, ακολουθεί η εκχύλιση του και ο βρασμός ώπου να εξατμιστεί το νερό και να επιτευχθεί η επιθυμητή συνοχή, δηλαδή ένα χρυσόμαυρο παχύρευστο σιρόπι (Brassesco, et al., 2021). Ως τελικό προϊόν, το χαρουπόμελο μπορεί να θεωρηθεί ένα λειτουργικό τρόφιμο, διότι η σύστασή του δεν περιέχει έλαια αλλά αποτελείται από υψηλότερα ποσοστά υγρασίας και συνολικών σακχάρων. Συγκεκριμένα, λόγω της εξάτμισης που πραγματοποιείται, διαθέτει υψηλότερο ποσοστό σακχάρων, συμπεριλαμβανομένων σακχαρόζης, γλυκόζης και φρουκτόζης, σε σχέση με τον πολτό που προέρχεται. Το γεγονός αυτό το κατατάσσει ως πιο ευδιάλυτο σε νερό και αλκοόλη, συγκριτικά με τον καρπό χαρουπιού, αλλά και ως πιθανή πηγή ανάπτυξης επιβλαβών βακτηρίων. Επιπλέον, διαθέτει υψηλή περιεκτικότητα σε ανόργανα συστατικά, όπως κάλιο, φώσφορο και ασβέστιο, και υψηλότερα επίπεδα αργύρου και τιτανίου, σε σύγκριση με το φρούτο (Brassesco, et al., 2021). Έτσι, το σιρόπι χαρουπιού μπορεί να

χρησιμοποιηθεί σε τρόφιμα ως γλυκαντικό, ως υποκατάστατο ζάχαρης ή ως μέσο καλλιέργειας μικροοργανισμών για παραγωγή ποικίλων προϊόντων, όπως η μαννιτόλη.

Είναι αδιαμφισβήτητο ότι, από τα παλαιότερα χρόνια, το σιρόπι χαρουπιού χρησιμοποιείται στην παραδοσιακή θεραπευτική και έχει πλέον αναγνωριστεί για τις φαρμακευτικές του ιδιότητες. Προερχόμενο από το πολτό του καρπού *Ceratonia siliqua* L



Εικόνα 2.4-2 Χαρουπόμελο

περιλαμβάνει τις περισσότερες από τις θρεπτικές ιδιότητες που κατέχει ο ακατέργαστος καρπός. Αρχικά, έχει σημειωθεί ότι διαθέτει αντιοξειδωτικές ιδιότητες, λόγω της παρουσίας πολυφαινολών (Azab, 2017). Επιπλέον, αν και σε μικρότερα ποσοστά από τον πολτό, χαρακτηρίζεται από υψηλή συγκέντρωση φυτικών ινών και χαμηλή λιποπεριεκτικότητα, ενώ αποτελεί ένα προϊόν χωρίς καφεΐνη, ιδανικό για όλες τις ηλικιακές ομάδες. Τέλος, έχοντας χαμηλό γλυκαιμικό δείκτη και λιγότερες θερμίδες από την σοκολάτα, το χαρουπόμελο μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως υποκατάστατο της λευκής ζάχαρης, και να συμπεριληφθεί σε διαβητική διατροφή ή διατροφή για την διατήρηση κανονικού βάρους (Papaefstathiou, et al., 2018).

Συμπερασματικά, το χαρουπόμελο χρησιμοποιείται στην παρούσα πειραματική εργασία, ως ένα από τα βασικά συστατικά για την παραγωγή ενός ζυμωμένου προβιοτικού ροφήματος, σε συνδυασμό με την λευκή ζάχαρη. Αυτό συμβαίνει διότι η προσθήκη του όχι μόνο εισάγει ένα μοναδικό γευστικό προφίλ, αλλά επίσης ενισχύει τη διατροφική αξία του ροφήματος λόγω της υψηλής περιεκτικότητάς του σε φυτικές ίνες, βιταμίνες και αντιοξειδωτικά, που αναλύθηκε ήδη. Η φυσική γλυκύτητα και ο χαμηλός γλυκαιμικός δείκτης του χαρουπιού το καθιστούν ελκυστική επιλογή για όσους αναζητούν πιο υγιεινές εναλλακτικές λύσεις ζάχαρης, ιδίως στο πλαίσιο της παραγωγής λειτουργικών τροφίμων.

### 3 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

#### 3.1 Σκοπός

Σκοπός της παρούσας ερευνητικής εργασίας, και συγκεκριμένα του πειραματικού μέρους της, είναι η παραγωγή καινοτόμου ζυμωμένου ροφήματος πλούσιο σε προβιοτικά, γνωστό ως kombucha (κομπούχα), που θα διαθέτει αυξημένες λειτουργικές ιδιότητες, χάρη στην επιλογή των υλικών. Βάση για την παραγωγή του συγκεκριμένου λειτουργικού τρόφιμου αποτελεί ένα μείγμα από τσάι του βουνού (*Sideritis L.*) και πράσινου τσάι (*Camelia sinensis*), σε δύο διαφορετικές αναλογίες, όπου αναμιγνύονται με ίσες ποσότητες χαρουπόμελου (*Ceratonia siliqua*) και λευκής ζάχαρης κρυσταλλικής. Για την επίτευξη του συγκεκριμένου στόχου, χρησιμοποιήθηκε η διαδικασία της ζύμωσης με την βοήθεια συμβιωτικής καλλιέργειας ζυμών και βακτηρίων (SCOBY). Για τον έλεγχο της ποιότητας αλλά και της λειτουργικότητας των δύο προϊόντων που παρασκευάστηκαν, πραγματοποιήθηκαν χημικές και μικροβιολογικές αναλύσεις στα δείγματα κατά την έναρξη, την διάρκεια αλλά και το τέλος της ζυμώσεως.

#### 3.2 Υλικά και Μέθοδοι

Για την πραγματοποίηση του πειράματος και των ποικίλων αναλύσεων, χρησιμοποιήθηκε ένας αξιοσημείωτος αριθμός υλικών και μηχανημάτων. Συνεπώς, αναγκαία για την διεξαγωγή της παρούσας πτυχιακής εργασίας κρίθηκαν:

- i. Εκκινητής – συμβιωτική καλλιέργεια ζυμών και βακτηρίων “SCOBY”



Εικόνα 3.2-1 Εκκινητής SCOBY

- ii. Τσάι του βουνού, Κοπέλι παραδοσιακό κρητικό αφέψημα *Sideritis syriaca*



Εικόνα 3.2-2 Τσάι του βουνού "Κοπέλι"

- iii. Πράσινο τσάι, Lipton *Camelia sinensis*



Εικόνα 3.2-3 Πράσινο Τσάι "Lipton"

- iv. Χαρουπόμελο, γη του νότου από 100% χαρούπι ολικής άλεσης



Εικόνα 3.2-4 Χαρουπόμελο "ΓΗ ΤΟΥ ΝΟΤΟΥ"

- v. Εμφιαλωμένο νερό, ΖΑΓΟΡΙ φυσικό μεταλλικό νερό από Βόρεια Πίνδο

vi. Λευκή ζάχαρη κρυσταλλική, AB



Εικόνα 3.2-5 Λευκή Ζάχαρη Κρυσταλλική "ΖΑΓΟΡΗ"

### 3.2.1 Ανάλυση pH

Η μέτρηση του pH κρίθηκε απαραίτητη για την παρακολούθηση της πορείας του συγκεκριμένου πειράματος τόσο κατά την έναρξη και την διάρκεια της ζυμώσεως όσο και στο τελικό προϊόν. Κατά τη ζύμωση του προβιοτικού ροφήματος παρατηρείται συνήθως πτώση του pH. Συνεπώς, λήφθηκαν τιμές για τα δείγματα A και B τις ημέρες 0, 6 και 12 της ζυμώσεως. Ο βασικός εξοπλισμός για την μέτρηση παρουσιάζεται στον Πίνακα 3.2-1.

Πίνακας 3.2-1 Βασικός Εξοπλισμός για ανάλυση pH

Πεχάμετρο GLP 21, CRISON
Ποτήρι ζέσεως 50 ml
Ρυθμιστικά διαλύματα με pH=4 και pH=7
Απιονισμένο νερό

Πριν την έναρξη μέτρησης των πειραματικών τιμών των δειγμάτων απαιτείται το καλιμπράρισμα του οργάνου (Πεχάμετρο GLP 21, CRISON). Η διαδικασία αυτή επιτυγχάνεται με τη χρήση δύο ρυθμιστικών διαλυμάτων, από τη μία ένα όξινο με pH ίσο με 4 και από την άλλη ένα ουδέτερο με pH ίσο με 7. Μετά την ολοκλήρωση της ρύθμισης του οργάνου,



Εικόνα 3.2-6 Διαδικασία Ανάλυσης pH



πραγματοποιείται η λήψη των μετρήσεων των δειγμάτων, με τρεις επαναλήψεις για κάθε δείγμα. Για υψηλότερη ακρίβεια απαιτείται έκπλυση του ηλεκτροδίου του οργάνου με απιονισμένο νερό μεταξύ την εναλλαγή διαφορετικών δειγμάτων (Instruments, n.d.).

### 3.2.2 Μικροβιολογικές Αναλύσεις

Κατά την πραγματοποίηση της συγκεκριμένης πτυχιακής εργασίας, αντικείμενο της μικροβιολογικής μελέτης αποτέλεσαν ποικίλοι μικροοργανισμοί, κυρίως ζύμες, βακτήρια οξικού οξέος (ακετοβακτηριοειδή, AAB) και βακτήρια γαλακτικού οξέος (γαλακτοβάκιλλοι, LAB). Ο βασικός εξοπλισμός για την μικροβιολογική μελέτη παρουσιάζεται στον Πίνακα 3.2-2.

Πίνακας 3.2-2 Βασικός Εξοπλισμός Μικροβιολογικής Μελέτης

Τρυβλία Petri	Θρεπτικά υποστρώματα
Δοκιμαστικού Σωλήνες	Φούρνος μικροκυμάτων
Vortex	Υδατόλουτρο (Memmert)
Λύχνος Bunsen	Πιπέτα
Απαγωγός (Laminar flow cabinet)	Tips
Υγρός αποστειρωτήρας	Πουάρ
Κρίκος ενοφθαλμισμού	Γυάλινες φιάλες 250 ml
Ισοτονικό αποστειρωμένο αραιωτικό διάλυμα	Μεταλλικά κουτάλια και πλαστικές σπάτουλες
Επωαστικός Κλίβανος (Memmert)	Σπάτουλα εξάπλωσης (spreader)
Θάλαμος αναεροβίωσης	Καθαρή αλκοόλη
Φάκελοι αναεροβίωσης	Μετρητής αποικιών (Stuart SC6)
Κυκλοαναδευτήρας Vortex	Stomacher ομογενοποιητής

Η μικροβιολογική μελέτη πραγματοποιήθηκε στα δείγματα Α και Β τις ημέρες 0, 6 και 12 της ζυμώσεως, αλλά και στον εκκινητή SCOPY πριν την χρήση του. Χρησιμοποιήθηκαν τέσσερα διαφορετικά μικροβιολογικά υποστρώματα, ώστε να εξεταστεί η ανάπτυξη όλων των πιθανών παρόντων μικροοργανισμών. Ειδικότερα, για κάθε δείγμα (Α και Β) πραγματοποιήθηκαν πέντε αραιώσεις και για κάθε αραιώση πραγματοποιήθηκε διπλή επανάληψη για την βέλτιστη επαναληψιμότητα του πειράματος. Η κάθε αραιώση διαθέτει βαθμό 1:10 και πραγματοποιήθηκε με προσθήκη αποστειρωμένου ισοτονικού

διαλύματος και ομογενοποίηση στο μηχάνημα Stomacher.

Ανάλογα το είδος του υποστρώματος και των μικροοργανισμών προς μελέτη, χρησιμοποιήθηκε διαφορετικές μεθόδους εμβολιασμού. Από την μία, η μέθοδος της επιφανειακής εξάπλωσης με χρήση 0,1 ml αραιωμένου δείγματος για τους υποχρεωτικά αερόβιους μικροοργανισμούς και από την άλλη της ενσωμάτωσης με χρήση 1,0 ml αραιωμένου δείγματος για τους υποχρεωτικά ή προαιρετικά αναερόβιους μικροοργανισμούς.

Συγκεκριμένα, για την πραγματοποίηση των μικροβιολογικών αναλύσεων χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω θρεπτικά υποστρώματα:

#### **i. Plate Count Agar (PCA)**

Το Plate Count Agar (PCA) αποτελεί ένα μικροβιολογικό θρεπτικό υπόστρωμα που χρησιμοποιείται συνήθως για την αξιολόγηση ή την παρακολούθηση της «συνολικής» ή βιώσιμης βακτηριακής ανάπτυξης ενός δείγματος. Στη βακτηριολογία τροφίμων χρησιμοποιείται αυτό το μη επιλεκτικό μέσο για την απαρίθμηση αερόβιων βακτηρίων, της ολικής μεσόφιλης χλωρίδας (ΟΜΧ).

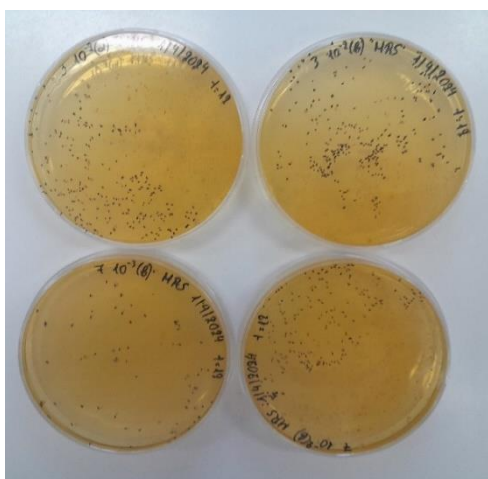
Όσον αφορά τη σύνθεση του υποστρώματος μπορεί να διαφέρει από κατασκευαστή σε κατασκευαστή, αλλά πάντα περιέχει πεπτόνη, εκχύλισμα ζύμης, γλυκόζη και άγαρ. Το προϊόν ενζυμικής πέψης της καζεΐνης παρέχει αμινοξέα, άζωτο, άνθρακα, βιταμίνες και ανόργανα άλατα για την ανάπτυξη του σώματος. Το εκχύλισμα ζύμης παρέχει κυρίως τις βιταμίνες του συμπλέγματος Β, ενώ η γλυκόζη, ως ζυμώσιμος υδατάνθρακας, παρέχει πηγή ενέργειας για την ανάπτυξη των βακτηρίων. Το άγαρ αποτελεί τον στερεοποιητικό παράγοντα (CliniSciences, n.d.).

Για την παρασκευή του απαιτείται 23,5 g έτοιμου μείγματος σκόνης PCA όπου προστίθενται σε 1,0 λίτρο απιονισμένου νερού και διαλύονται υπό βρασμό μέχρι την ομογενοποίηση τους με τη βοήθεια του φούρνου μικροκυμάτων. Πριν την χρήση του υποστρώματος, απαιτείται η αποστείρωση στους 121°C για 15 λεπτά σε υγρό αποστειρωτήρα και ύστερα η παραμονή του σε υδατόλουτρο 45°C για την αποφυγή πηγμάτων. Στη συνέχεια, εμβολιάζονται τα τρυβλία με τα προς εξέταση δείγματα με την μέθοδο της ενσωμάτωσης, αφού έχουν πραγματοποιηθεί πρώτα οι κατάλληλες αραιώσεις. Η επώαση πραγματοποιείται στον επωαστικό κλίβανο (Memmert) στους 37°C για 24 με 48 ώρες. Τέλος, πραγματοποιείται η καταμέτρηση των εμφανιζόμενων αποικιών.



## ii. De Man-Rogose-Sharpe agar (MRS)

Το De Man-Rogose-Sharpe agar (MRS) αποτελεί ένα επιλεκτικό υπόστρωμα για την καλλιέργεια, απομόνωση και απαρίθμηση οξυγαλακτικών βακτηρίων (LAB). Παρέχει όλα τα απαραίτητα συστατικά ώστε να αναπτυχθούν τα LAB με επιτυχία, που παράγουν γαλακτικό οξύ, με χαρακτηριστικό μέγεθος και μορφολογία (ThermoFisherScientific, n.d.). Συγκεκριμένα, η σύσταση μπορεί να μεταβάλλεται από κατασκευαστή σε κατασκευαστή, συνήθως όμως περιέχει εκχύλισμα ζύμης και βόειου κρέατος, καζεΐνη και δεξτρόζη για την ανάπτυξη και αυξητικούς παράγοντες όπως πολυσορβικό, οξικό, μαγνήσιο και μαγγάνιο. Επιπλέον, τα παραπάνω συστατικά έχουν την ικανότητα να δουλεύουν ανταγωνιστικά έναντι των μη επιθυμητών μικροοργανισμών, έτσι αναστέλλεται η ανάπτυξη βακτηρίων που δεν ανήκουν στην κατηγορία των LAB. (Janet



Εικόνα 3.2-8 Επωασμένα τρυβλία MRS



Εικόνα 3.2-7 MRS τρυβλία σε δοχεία αναερόβιωσης

E.L. Corry, 2003)

Για την παρασκευή του απαιτείται 52,25 g έτοιμου μείγματος MRS broth και 15,0 g άγαρ, όπου προστίθενται σε 1,0 λίτρο απιονισμένου νερού και διαλύονται υπό βρασμό μέχρι την ομογενοποίηση τους, με τη βοήθεια του φούρνου μικροκυμάτων. Στη συνέχεια, ακολουθεί η ίδια διαδικασία που πραγματοποιήθηκε για την αποστείρωση και τον εμβολιασμό του γενικού υποστρώματος PCA. Η επώαση όμως των τρυβλίων με MRS agar πραγματοποιείται στον επωαστικό κλίβανο (Mettmert) στους 37°C για 48 με 72 ώρες, υπό αναερόβιες συνθήκες. Αυτές επιτυγχάνονται με την χρήση θαλάμων και φακέλων αναερόβιωσης, μέσα στους οποίους τοποθετούνται τα τρυβλία. Τέλος, πραγματοποιείται η καταμέτρηση των εμφανιζόμενων αποικιών.

### iii. GYPEC (Glucose – Yeast Extract – Peptone – Ethanol – CaCO<sub>3</sub>) agar

Το Glucose – Yeast Extract – Peptone – Ethanol – CaCO<sub>3</sub> agar (GYPEC) αποτελεί ένα εκλεκτικό μικροβιολογικό θρεπτικό υπόστρωμα που χρησιμοποιείται συνήθως για την αξιολόγηση ή την παρακολούθηση της ανάπτυξης των βακτηρίων οξικού οξέος σε ένα δείγμα. Η ανάπτυξη υποδηλώνεται καθώς τα οξικά βακτήρια καταναλώνουν το ανθρακικό ασβέστιο (CaCO<sub>3</sub>) και δημιουργείται μία διαυγής ζώνη. Ταυτόχρονα, καταναλώνεται η αιθανόλη και η γλυκόζη του υποστρώματος για την παραγωγή οξικού και γλυκονικού οξέος και βακτηριακής κυτταρίνης. Το εκχύλισμα ζυμών και η πεπτόνη αποτελούν τις βασικές πηγές αζώτου του μέσου για την ανάπτυξη των βακτηρίων, ενώ το άγαρ αποτελεί τον σταθεροποιητικό παράγοντα (Gomes, et al., 2018).

Για την παρασκευή του απαιτούνται τα υλικά που παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.2-3. Συγκεκριμένα, για ένα λίτρο υποστρώματος:

Πίνακας 3.2-3 Συστατικά Υποστρώματος GYPEC

Γλυκόζη	20,0 g
Εκχύλισμα Ζύμης	8,0 g
Ανθρακικό Ασβέστιο (CaCO <sub>3</sub> )	7,0 g
Αιθανόλη	5,0 g
Πεπτόνη	5,0 g
Άγαρ	12,0 g

Ακολουθείται η ίδια διαδικασία παραγωγής και αποστείρωσης που χρησιμοποιήθηκε και στην παρασκευή των υπόλοιπων υποστρωμάτων. Μόνες διαφορές αποτελούν από τη μία η μη ταυτόχρονη προσθήκη των υλικών, με την αιθανόλη να προστίθεται μετά το πέρας του βρασμού και της διαλυτοποίησης του ανθρακικού ασβεστίου προς αποφυγή εξάτμισής της. Από την άλλη, για τον εμβολιασμό των τρυβλίων χρησιμοποιείται η μέθοδος της επιφανειακής εξάπλωσης. Έτσι, επιτυγχάνεται το μοίρασμα του GYPEC μέσου στα τρυβλία υπό ασηπτικές συνθήκες, είτε στον απαγωγό είτε γύρω από λύχνο Bunsen και αφήνεται σε ηρεμία έως ότου πήξει και είναι έτοιμο προς χρήση. Η επώαση πραγματοποιείται στον επωαστικό κλίβανο (Memmert) στους 30°C για 48 με 72 ώρες. Τέλος, πραγματοποιείται η καταμέτρηση των εμφανιζόμενων αποικιών.

#### iv. Yeast – Malt Extract Agar

Το Yeast - Malt Extract Agar χαρακτηρίζεται ως ένα ιδανικό υπόστρωμα για ποιοτικές τεχνικές καλλιέργειας και απαρίθμησης των ζυμών και μυκήτων ενός δείγματος. Διαθέτει pH ίσο με  $6,2 \pm 0,2$  στους  $25^{\circ}\text{C}$ . Όσον αφορά τη σύνθεση του υποστρώματος μπορεί να διαφέρει από κατασκευαστή σε κατασκευαστή, αλλά πάντα περιέχει πεπτόνη ως πηγή άνθρακα, αζώτου και αμινικών οξέων. Ακόμη, το εκχύλισμα βύνης εμπλουτίζει το υπόστρωμα με τα απαραίτητα θρεπτικά συστατικά για την ανάπτυξη των ζυμών και μυκήτων, ενώ η δεξτρόζη αποτελεί πηγή άνθρακα και ενέργειας. Τέλος, το εκχύλισμα ζύμης παρέχει τις απαραίτητες βιταμίνες του συμπλέγματος B για την ανάπτυξη τους (Thermofisher, n.d.).

Για την παρασκευή του απαιτούνται τα υλικά που παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.2-4. Συγκεκριμένα, για ένα λίτρο υποστρώματος:

Πίνακας 3.2-4 Συστατικά Υποστρώματος Yeast Malt Extract Agar

Δεξτρόζη	40,0 g
Πεπτόνη	5,0 g
Εκχύλισμα Βύνης	3,0 g
Εκχύλισμα Ζύμης	3,0 g
Άγαρ	15,0 g

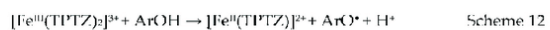
Ακολουθείται η ίδια διαδικασία παραγωγής, αποστείρωσης και εμβολιασμού που χρησιμοποιήθηκε και στο εκλεκτικό υπόστρωμα για τα οξικά βακτήρια. Η επώαση πραγματοποιείται στον επωαστικό κλίβανο (Memmert) στους  $30^{\circ}\text{C}$  για 48 με 72 ώρες. Τέλος, πραγματοποιείται η καταμέτρηση των εμφανιζόμενων αποικιών.

#### 3.2.3 Προσδιορισμός Αναγωγικής Ισχύος / Αντιοξειδωτικής Ικανότητας - Δοκιμή FRAP

Η δοκιμή FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) αποτελεί μία γρήγορη και άμεση φασματοφωτομετρική μέθοδο με στόχο τον υπολογισμό της συνολικής αντιοξειδωτικής δύναμης, αλλιώς αναγωγικής ικανότητας, ενός δείγματος τρόφιμου. Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στην ικανότητα του προς εξέταση δείγματος να μεταφέρει ένα μονήρες ηλεκτρόνιο με σκοπό την αναγωγή του συμπλόκου του τρισθενούς σιδήρου με 2,4,6-τρι-(2-πυριδυλ)-τριαζίνη ( $\text{Fe}^{+3}$ -TPTZ) σε δισθενή σίδηρο ( $\text{Fe}^{+2}$ -TPTZ). Το τελευταίο εμφανίζει έντονο μπλε χρώμα στην απορρόφηση των 595 nm. Η συγκεκριμένη αντίδραση πραγματοποιείται σε  $\text{pH} = 3,6$ , ώστε να διατηρείται η διαλυτότητα του

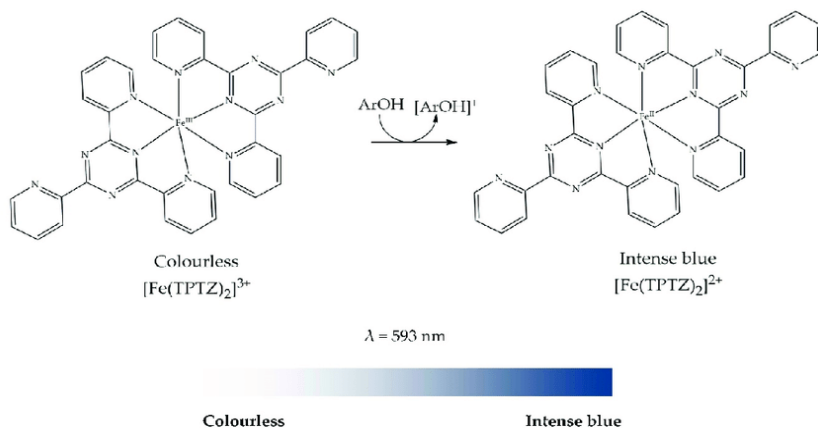
σιδήρου του διαλύτη (Sadeer, et al., 2020). Ο μηχανισμός της αντίδρασης παρουσιάζεται στην εικόνα 3.2-9, ενώ ο βασικός εξοπλισμός για την δοκιμή παρουσιάζεται στον Πίνακα 3.2-5.

Chemical reaction:



Scheme 12

Mechanism of reaction:



Εικόνα 3.2-9 Μηχανισμός Αντίδρασης Αναγωγικής Ικανότητας

Πίνακας 3.2-5 Βασικός Εξοπλισμός Δοκιμής FRAP

Φασματοφωτόμετρο Helios Epsilon - Thermo Scientific 9423UVE100CE	
Ρυθμιστικό διάλυμα $\text{CH}_3\text{COOH} - \text{CH}_3\text{COONa}$ 300 mM (pH=3,6)	
Διάλυμα 2,4,6-τρι-(2-πυριδυλ)-τριαζίνη (TPTZ) 10 mM	
$\text{FeCl}_3 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$ 20 mM	Κυψελίδες 4 mL
$\text{FeSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$	Μικροσύριγγα 50 $\mu\text{L}$
Απεσταγμένο νερό	Κυκλοαναδευτήρας Vortex
Υδατόλουτρο (Mettmert)	Στατό

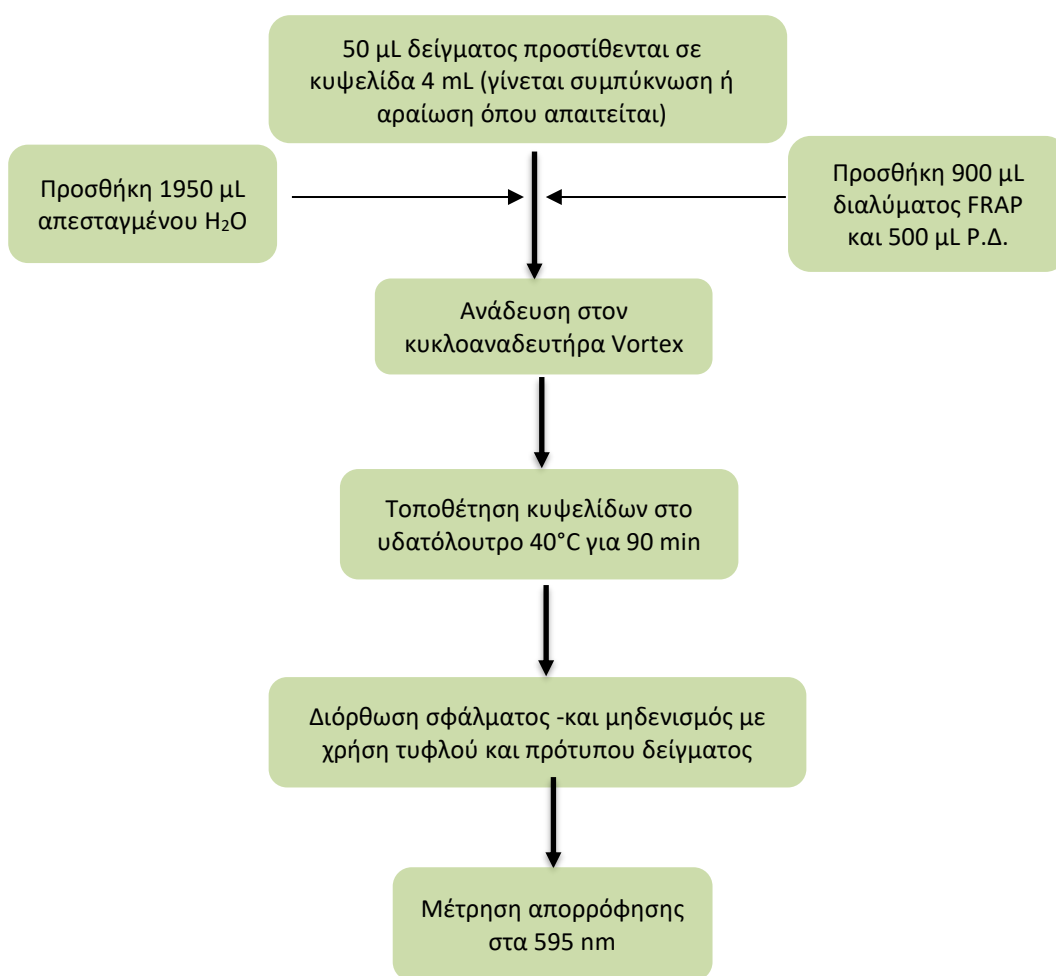


Εικόνα 3.2-11 Κυψελίδες έτοιμες για ανάλυση FRAP



Εικόνα 3.2-10 Φασματοφωτόμετρο Helios Epsilon - Thermo Scientific 9423UVE100CE

Για την πραγματοποίηση της δοκιμής FRAP, λήφθηκαν οι πειραματικές τιμές των δειγμάτων A και B κατά τις ημέρες 0, 6 και 12 της ζυμώσεως, ύστερα από την διαύγαση τους. Εκτός της διαύγασης των δειγμάτων, πριν την έναρξη της δοκιμής απαιτείται η παρασκευή του διαλύματος FRAP μέσω ανάμειξης 200,0 mL ρυθμιστικού διαλύματος με 20,0 mL διαλύματος  $\text{FeCl}_3 \times 6 \text{H}_2\text{O}$  20 mM και 20,0 mL διαλύματος TPTZ 10 mM. Στο παρακάτω Σχήμα 3.2-1 παρουσιάζεται το διάγραμμα ροής μέτρησης της συνολικής αντιοξειδωτικής δύναμης – αναγωγικής ικανότητας. Κάθε μέτρηση κάθε δείγματος πραγματοποιείται εις τριπλούν.

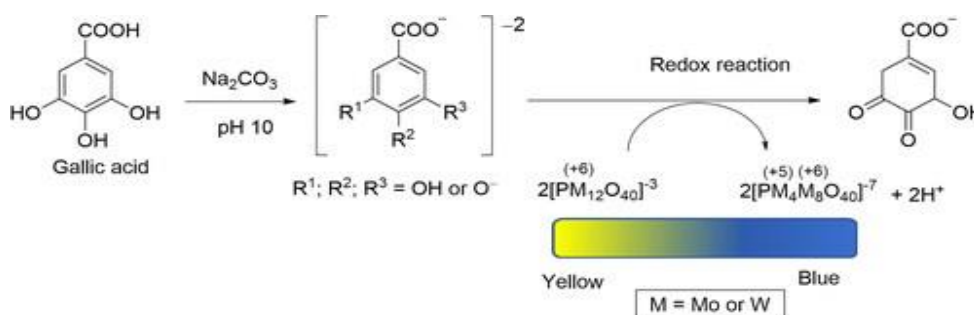


Σχήμα 3.2-1 Διάγραμμα ροής μέτρησης της συνολικής αντιοξειδωτικής δύναμης – αναγωγικής ικανότητας

### 3.2.4 Προσδιορισμός Ολικού Φαινολικού Περιεχόμενου - Δοκιμή Folin – Ciocalteu

Η δοκιμή Folin – Ciocalteu αποτελεί μία γρήγορη και άμεση φασματοφωτομετρική μέθοδο, με στόχο τον προσδιορισμό του ολικού φαινολικού περιεχόμενου ενός δείγματος τρόφιμου. Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στο γεγονός ότι σε αλκαλικό περιβάλλον το αντιδραστήριο ανάγεται προς οξείδια που έχουν χαρακτηριστικό κυανό χρώμα του πεντασθενούς μολυβδαινίου. Το αντιδραστήριο αυτό της Folin – Ciocalteu αποτελείται από άλατα μολυβδαινίου και βολφραμίου. Τελικά, η ένταση του μπλε χρώματος είναι ανάλογη του φαινολικού περιεχόμενου. (Dominguez-López, et al., 2023)

Ο μηχανισμός της αντίδρασης παρουσιάζεται στην *Εικόνα 2.2-12*, ενώ ο βασικός εξοπλισμός για την δοκιμή παρουσιάζεται στον *Πίνακα 3.2-6*.

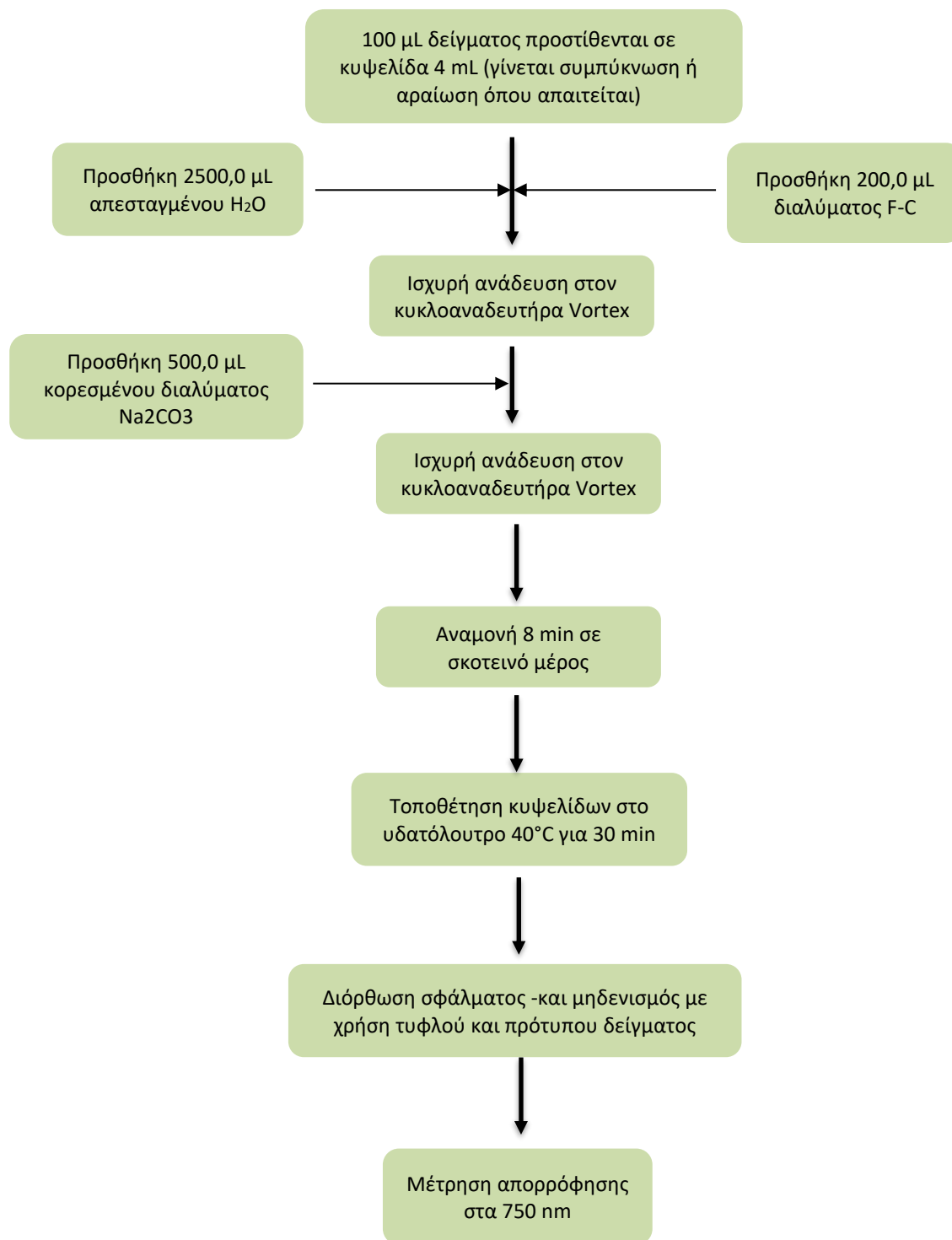


*Εικόνα 3.2-12 Μηχανισμός αντίδρασης δοκιμής Folin - Ciocalteu*

*Πίνακας 3.2-6 Βασικός εξοπλισμός δοκιμής Folin - Ciocalteu*

Φασματοφωτόμετρο Helios Epsilon - Thermo Scientific 9423UVE100CE	
Κορεσμένο διάλυμα ανθρακικού νατρίου $\text{Na}_2\text{CO}_3$	
Μεθανόλη αναλυτικής καθαρότητας	Κυψελίδες 4 mL
Αντιδραστήριο Folin - Ciocalteu	Μικροσύριγγα 100 $\mu\text{L}$
Απεσταγμένο νερό	Κυκλοαναδευτήρας Vortex
Υδατόλουτρο (Memmert)	Στατό

Για την πραγματοποίηση της τροποποιημένης έκδοσης της δοκιμής Folin - Ciocalteu, λήφθηκαν οι πειραματικές τιμές των δειγμάτων Α και Β κατά τις ημέρες 0, 6 και 12 της ζυμώσεως, ύστερα από την διαύγαση τους. Στο παρακάτω *Σχήμα 3.2-2* παρουσιάζεται το διάγραμμα ροής μέτρησης του συνολικού φαινολικού περιεχόμενου. Κάθε μέτρηση κάθε δείγματος πραγματοποιείται εις τριπλούν.



Σχήμα 3.2-2 Διάγραμμα Ροής προσδιορισμού του συνολικού φαινολικού περιεχομένου



### 3.2.5 Μέτρηση Περιεκτικότητας Αλκοόλης και Πυκνότητας

Η μέτρηση της περιεκτικότητας αλκοόλης και της πυκνότητας κρίθηκε ακόμη ένα απαραίτητο βήμα της πειραματικής πορείας, όντας ένα προϊόν ζυμώσεως, παρά την κατηγοριοποίησή του ροφήματος ως μη αλκοολούχο. Ειδικότερα, λήφθηκαν οι πειραματικές τιμές των δειγμάτων Α και Β κατά τις ημέρες 0, 6 και 12 της ζυμώσεως, ύστερα από την διαύγαση τους. Για κάθε δείγμα και χρόνο ζυμώσεως λήφθηκαν 3 μετρήσεις, ενώ πραγματοποιήθηκε καθαρισμός με απιονισμένο νερό μεταξύ διαφορετικών δειγμάτων και βαθμονόμηση του οργάνου πριν την αρχική χρήση.

Η λήψη των πειραματικών δειγμάτων πραγματοποιήθηκε με το όργανο Alcohol and



Extract Meter: Alex 500 της Anton Paar. Η συγκεκριμένη συσκευή συνδυάζει την μέτρησης της απορρόφησης μέσω φασματοσκοπίας NIR και την μέτρηση της πυκνότητας με βάση την τεχνολογία ταλαντευόμενου σωλήνα U. Το Alex 500 έχει τη δυνατότητα καταγραφής τόσο της περιεκτικότητας αλκοόλης (%v/v) και πυκνότητας ( $\text{g}/\text{cm}^3$ ), όσο και το original extract ( $^{\circ}\text{Plato}$ ) και το real extract (%w/w). (Paar, n.d.)

Εικόνα 3.2-13 Alcohol and Extract Meter: Alex 500 της Anton Paar

### 3.2.6 Μέτρηση Περιεκτικότητας Ολικών Στερεών - Σακχάρων

Μία ακόμη χρήσιμη μέτρηση για την πειραματική πορεία κρίθηκε η μέτρηση των ολικών στερεών ή σακχάρων. Με τη βοήθεια του οργάνου Handheld Density Meter: DMA 35 Basic της Anton Paar λήφθηκαν οι μετρήσεις για το ειδικό βάρος (Specific Gravity, SG), sugar extract ( $^{\circ}\text{Plato}$ ) και Brix ( $^{\circ}\text{Brix}$ ). Ως ειδικό βάρος ορίζεται ο λόγος της μάζας ενός συγκεκριμένου όγκου υλικού στους  $23^{\circ}\text{C}$  προς τον ίδιο όγκο απιονισμένου νερού (Laurence, 2020). Επιπλέον, ως  $^{\circ}\text{Brix}$  ορίζεται μια βαθμονόμηση του δείκτη διάθλασης ενός διαλύματος έναντι της διαλυμένης σακχαρόζης ή ένα μέτρο των διαλυτών στερεών συστατικών σε ένα υδατικό διάλυμα. Συγκεκριμένα,  $1^{\circ}\text{Brix}$  ισοδυναμεί με 1 γραμμάριο σακχαρόζης σε 100 γραμμάρια διαλύματος (John A. & Elizabeth, 2014), (Rory, 2014). Τέλος, ως  $^{\circ}\text{Plato}$  ορίζεται το ποσοσιαίο βάρος των σακχάρων μέσα στο συνολικό βάρος του διαλύματος.



Η συγκεκριμένη συσκευή λαμβάνει μόνο μία μικρή ποσότητα δείγματος (2 ml) απευθείας από το δοχείο μέσω της ενσωματωμένης αντλίας, αποφεύγοντας την σπατάλη και δίνοντας απευθείας τα αποτελέσματα στην επιθυμητή μονάδα μέτρησης (Paar, n.d.). Για την πραγματοποίηση της μέτρησης, λήφθηκαν οι πειραματικές τιμές των δειγμάτων Α και Β κατά τις ημέρες 0, 6 και 12 της ζυμώσεως, ύστερα από την διαύγασή τους. Για κάθε δείγμα και χρόνο ζυμώσεως λήφθηκαν 3 μετρήσεις, ενώ πραγματοποιήθηκε καθαρισμός με απιονισμένο νερό μεταξύ διαφορετικών δειγμάτων και βαθμονόμηση του οργάνου πριν την αρχική χρήση.



Εικόνα 3.2-14 Handheld Density Meter: DMA 35 Basic της Anton Paar

### 3.2.7 Μέτρηση χρώματος

Η μέτρηση της μεταβολής του χρώματος κρίθηκε η τελευταία απαραίτητη παράμετρος για να ολοκληρωθεί η συγκεκριμένη πειραματική πορεία. Με την μέτρηση λήφθηκαν τιμές για την σύγκριση τόσο της μεταβολής του χρώματος των δύο δειγμάτων κατά τη διάρκεια της ζύμωσης όσο και για την μεταξύ σύγκριση των δύο διαφορετικών

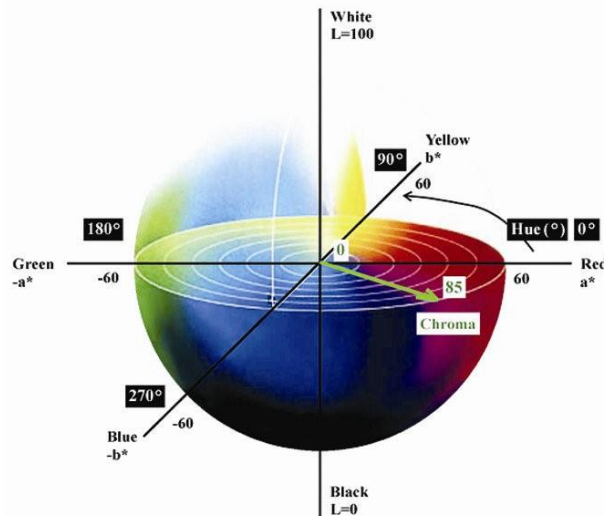
δειγμάτων Α και Β. Η μέτρηση χρώματος πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια του οργάνου Precision Colorimeter NR110 της 3nh. Η συγκεκριμένη συσκευή έχει τη δυνατότητα φωτισμού του δείγματος από όλες τις γωνίες και μέτρηση του ανακλώμενου φωτός υπό γωνία  $8^\circ$  από την επιφάνεια του δείγματος. Επιπλέον, το χρωματόμετρο NR110 διαθέτει ενσωματωμένες παραμέτρους λευκής πλάκας, έτσι δεν απαιτείται βαθμονόμηση κάθε φορά. Συνεπώς, αποτελεί μία



Εικόνα 3.2-15 Precision Colorimeter NR110 της 3nh

κατάλληλη μέθοδο για τον ποιοτικό προσδιορισμό του χρώματος των δειγμάτων με ταχεία αποτελέσματα (3nh, n.d.).

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιεί το χρωματομετρικό μοντέλο CIE 1976 ( $L^*a^*b^*$ ), όπου εκφράζει σε αριθμητικές τιμές τις τρεις παραμέτρους των χρωμάτων, απόχρωση,



Εικόνα 3.2-16 Χρωματομετρικό μοντέλο CIE 1976 ( $L^*a^*b^*$ ),

κορεσμός και φωτεινότητα, σε ένα τρισδιάστατο χώρο. Ειδικότερα, με  $L^*$  ορίζεται ο κατακόρυφος άξονας που ισοδυναμεί με τιμές φωτεινότητας 0 έως 100, δηλαδή από το μαύρο έως το απόλυτο λευκό. Ως  $a^*$  ορίζεται ο οριζόντιος άξονας που ισοδυναμεί σε αρνητικές ( $-a^*$ ) και θετικές τιμές ( $+a^*$ ) και υποδηλώνουν το πράσινο και το κόκκινο αντίστοιχα. Τέλος, ως  $b^*$  ορίζεται ο οριζόντιος άξονας που ισοδυναμεί σε αρνητικές ( $-b^*$ ) και θετικές τιμές ( $+b^*$ ) και υποδηλώνουν το μπλε και το κίτρινο αντίστοιχα. Το χρωματόμετρο NR110 υπολογίζει ακόμα την παράμετρο  $c^*$ , που υποδηλώνει το χρώμα και την  $h^*$ , με τελικό στόχο τον υπολογισμό της συνολικής μεταβολής του χρώματος  $\Delta E^*$  (Yoshi, 2000).

Για την πραγματοποίηση της μέτρησης, λήφθηκαν οι πειραματικές τιμές των δειγμάτων A και B κατά τις ημέρες 0, 6 και 12 της ζυμώσεως, ύστερα από την διαύγαση τους. Στη συνέχεια, μικρή ποσότητα των δειγμάτων, περίπου 20 ml, τοποθετήθηκε σε τρυβλία Petri, τα οποία τοποθετήθηκαν πάνω σε λευκές λείες επιφάνειες, για την διασφάλιση αντικειμενικότητας. Για κάθε δείγμα και χρόνο ζυμώσεως λήφθηκαν μετρήσεις από τρία διαφορετικά σημεία η κάθε μία.

### 3.3 Προετοιμασία Δειγμάτων

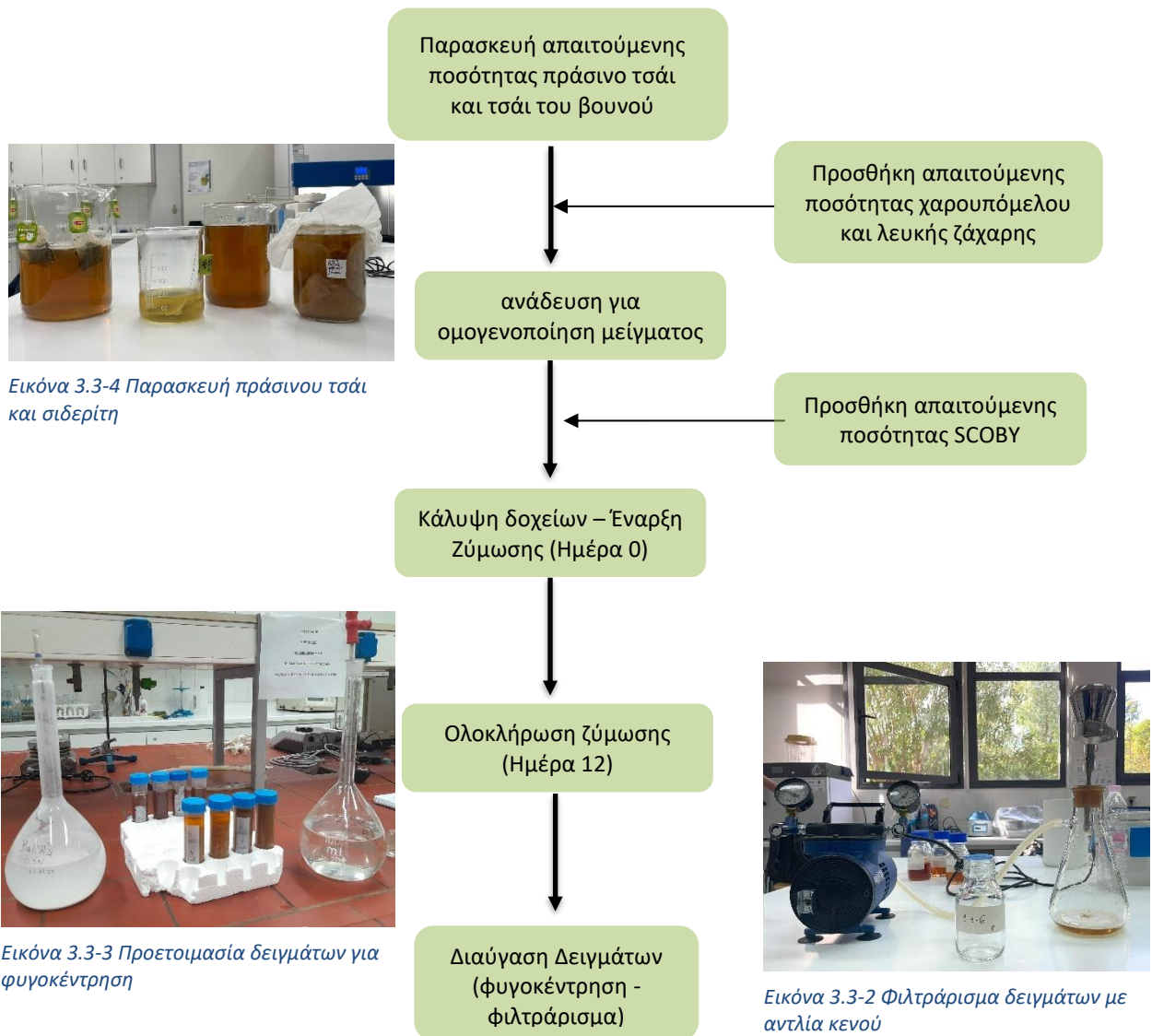
Κατά την παρούσα ερευνητική εργασία μελετήθηκαν, μέσω των ανωτέρων αναλύσεων, δύο διαφορετικά δείγματα, A και B, του ζυμώμενου προβιοτικού

ροφήματος, γνωστού ως κομπούχα ή kombucha. Για την παρασκευή των συγκεκριμένων δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε: SCOBY, χαρουπόμελο, εμφιαλωμένο νερό και λευκή κρυσταλλική ζάχαρη σε ίδιες ποσότητες. Ενώ το πράσινου τσάι και το τσάι του βουνού αποτελούσαν την βάση των ροφημάτων, σε αναλογίες που διαφέρουν. Οι πρώτες ύλες παρουσιάζονται στην υπό-ενότητα «3.2 Υλικά και Μέθοδοι».

Έτσι, για κάθε λίτρο παραγόμενου ροφήματος (δείγμα Α και Β), ως πηγή σακχάρων, χρησιμοποιήθηκε ίδια ποσότητα χαρουπόμελου και λευκής κρυσταλλικής ζάχαρης, το σύνολο των οποίων ισούται με το 10% της μάζας του νερού που χρησιμοποιήθηκε για την παραγωγή τσάι. Επιπλέον, έχοντας ως στόχο την επίδραση της χρησιμοποιούμενης ποσότητας σιδηρίτη στο τελικό προϊόν, το δείγμα Α παρασκευάστηκε με 10% σιδηρίτη και 90% πράσινο τσάι. Αντίθετα, για το δείγμα Β επιλέχθηκε 90% σιδηρίτης και 10% πράσινο τσάι. Τέλος, προστέθηκε στα δείγματα ο μικροοργανισμός εκκινητής της ζύμωσης, το SCOBY, σε αναλογία 10% της μάζας του νερού που χρησιμοποιήθηκε. Στη συνέχεια, τα δύο δείγματα καλύφθηκαν με διηθητικό χαρτί και αφήθηκαν σε ηρεμία σε σκιερό χώρο σταθερής θερμοκρασίας περιβάλλοντος (1<sup>η</sup> ημέρα) για την πραγματοποίηση της ζύμωσης.

Αφού ολοκληρώθηκε η ζύμωση (12<sup>η</sup> ημέρα) και πραγματοποιήθηκε δειγματοληψία καθ' όλη τη διάρκεια της, στις ημέρες 0, 6 και 12, ακολούθησε η διαδικασία της διαύγασης των συγκεντρωμένων δειγμάτων, με στόχο την καθίζηση των πρωτεϊνών. Πρώτα από όλα, πραγματοποιήθηκε η διαδικασία της φυγοκέντρωσης και η απομάκρυνση του δημιουργούμενου ιζήματος. Για να λάβει χώρα ο διαχωρισμός, απαιτείται ανακίνηση των δειγμάτων, μεταφορά 40 mL σε φυγοκεντρικούς σωλήνες falcon και προσθήκη 5 mL θειικού ψευδάργυρου ( $ZnSO_4$  5%) και 5 mL οξικού βáriου ( $Ba(OH)_2$  0,3N). Έπειτα, κάθε διάλυμα ανακινήθηκε και αφέθηκε σε ηρεμία για 10', με έντονη ανάδευση στα 5'. Ύστερα, ακολούθησε η φυγοκέντρωση των δειγμάτων στα 3500 rpm για 10'. Αφού ολοκληρώθηκε, απομακρύνθηκε το υπερκείμενο και τοποθετήθηκαν σε καθαρά δοχεία. Τέλος, για την πλήρη διαύγαση των δειγμάτων Α και Β, έλαβε χώρα το φιλτράρισμα μέσω διηθητικών φίλτρων σε συσκευή κενού. Ως αποτέλεσμα, λήφθηκαν διαυγασμένα χωρίς ιζήματα δείγματα για την πραγματοποίηση των ανωτέρων μετρήσεων.

Στο παρακάτω *Σχήμα 3.3-1* παρουσιάζεται το διάγραμμα ροής παρασκευής και διαύγασης των δειγμάτων Α και Β, ενώ στον *Πίνακα 3.3-1* παρουσιάζονται τα απαραίτητα υλικά, εκτός των πρώτων υλών, για την εκτέλεση των βημάτων.



Σχήμα 3.3-1 Διάγραμμα ροής παρασκευής και διαύγασης των δειγμάτων A και B



Εικόνα 3.3-1 Δείγματα A και B κατά τη διάρκεια της ζύμωσης

Πίνακας 3.3-1 Βασικός εξοπλισμός παρασκευής και διαύγασης δειγμάτων

Falcon 50mL	Αποστειρωμένα δοχεία
Αντλία κενού Chemical Duty Pump 220 V/ 50 Hz Millipore	
Διηθητικό χαρτί	Νυστέρι
Διάλυμα ZnSO <sub>4</sub> 5%	Ζυγαριά Ακριβείας
Διάλυμα Ba(OH) <sub>2</sub> 0,3N	Αλουμινόχαρτο
Φυγόκεντρος, mrc Scientific Instruments	Στατό
Φούρνος Μικροκυμάτων	Φλόγα Bunsen
Μικροβιοκρατές φίλτρο	Τσιμπίδα

## 4 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Καθώς ολοκληρώθηκε η προετοιμασία των δειγμάτων Α και Β του ροφήματος και κατά την εξέλιξη και το τέλος της ζύμωσης, πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις τις ημέρες 0, 6 και 12 με σκοπό τον έλεγχο της ποιότητας και των χαρακτηριστικών τους. Συγκεκριμένα, οι μετρήσεις που έλαβαν χώρα, και περιεγράφηκαν αναλυτικά στο «Κεφάλαιο 3: Πειραματικό Μέρος», είναι: ανάλυση pH, μικροβιολογικές αναλύσεις, προσδιορισμός αναγωγικής ισχύος (δοκιμή FRAP), προσδιορισμός ολικού φαινολικού περιεχομένου (δοκιμή Folin-Ciocalteu), μέτρηση περιεκτικότητας αλκοόλης και ολικών στερεών ή σακχάρων, μέτρηση πυκνότητας και χρώματος. Στο παρόν κεφάλαιο, παρουσιάζονται αναλυτικά, υπό την μορφή πινάκων και διαγραμμάτων, τα δεδομένα που συλλέχτηκαν κατά την διάρκεια του πειράματος. Αξίζει να σημειωθεί ότι για την ορθότερη έκφραση των αποτελεσμάτων, για κάποιες από τις αναλύσεις, ήταν αναγκαίος ο πολλαπλασιασμός των μετρούμενων τιμών με το αντίστροφο της αραίωσης των δειγμάτων.

### 4.1 Ανάλυση pH

Από τη μία, το pH του νερού κυμαίνεται στο 7,5 και του χαρουπόμελου στο 4,3 με 5,4 (Toufeili, et al., 2022). Από την άλλη, το pH του πράσινου τσαγιού κυμαίνεται συνήθως μεταξύ στο 4 με 6, ένα βέλτιστο διάστημα για τις περιεχόμενες κατεχίνες (Musial, et al., 2020), ενώ για το pH του Σιδερίτη ποικίλλει σημαντικά ανάλογα με τη σύνθεση του φυτού και τις μεθόδους επεξεργασίας που χρησιμοποιήθηκαν, από το 2 έως το 7. Οι τιμές αυτές αντιπροσωπεύουν το pH των δειγμάτων Α και Β κατά την αρχή του πειράματος πριν ξεκινήσει η ζύμωση. Στο *Διάγραμμα 4.1-1* παρουσιάζονται οι μετρήσεις του pH όλων των δειγμάτων καθ' όλη τη διάρκεια της ζύμωσης. Παρατηρείται ότι οι αρχικές τιμές είναι εντός των βιβλιογραφικών ορίων που βρέθηκαν.

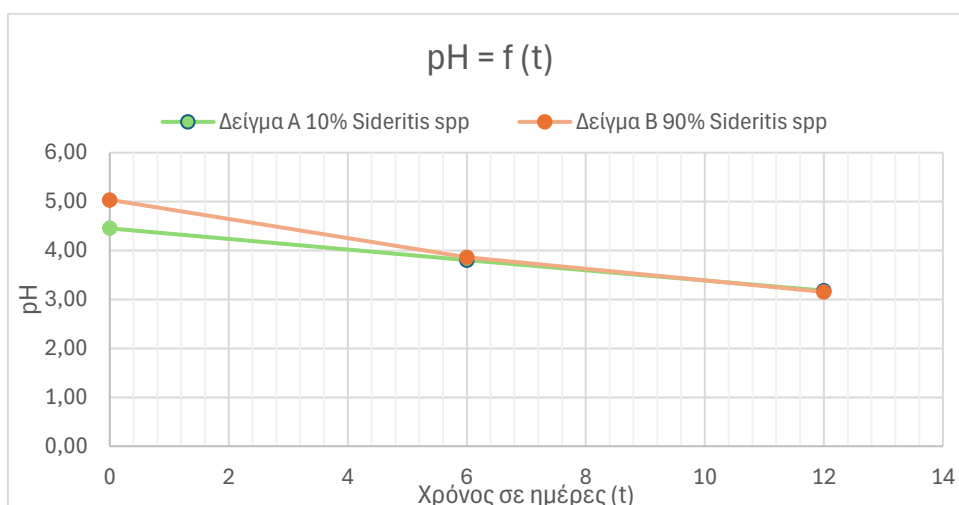
Κατά τη διάρκεια της ζύμωσης της kombucha παρατηρείται η πτώση του pH, λόγω της παραγωγής δευτερογενών οργανικών οξέων κατά την αλκοολική ζύμωση. Κύρια αιτία όμως αποτελεί η παραγωγή οξικών οξέων και γαλακτικών οξέων κατά την οξική ζύμωση (Narendranath & Power, 2005). Ακόμη, στο διάστημα της ημέρας 0 και 6 της ζύμωσης, συγκριτικά με το διάστημα των ημερών 6 και 12, παρατηρείται πιο ραγδαία μείωση του pH. Ταυτόχρονα, τα δείγματα Α και Β ξεκίνησαν με διαφορά στις μεταξύ τους τιμές, τα

οποία, όμως, δεν έχουν καμία στατιστική διαφορά στο τέλος του πειράματος. Τα δύο συγκεκριμένα συμβάντα πιθανών να οφείλονται στα χρησιμοποιούμενα SCOBY και στην μικροβιακή τους σύσταση. Σύμφωνα με μελέτες, το ίδιο το SCOBY μπορεί να απελευθερώσει όξινες ενώσεις από μια προηγούμενη ζύμωση, ακόμη και μία ώρα μετά την τοποθέτησή του στο παρασκεύασμα, ανεξάρτητα από το γεγονός αν έχει ξεκινήσει η ζύμωση στο νέο δείγμα (Hammel, et al., 2016), δηλαδή χωρίς να εξαρτάται από τα επί μέρους συστατικά του ροφήματος.

Πίνακας 4.1-1 Αριθμητικές τιμές μετρήσεων pH δειγμάτων A και B κατά τη διάρκεια της ζύμωσης

Ημέρες	Δείγμα A 10% <i>Sideritis spp</i>	Δείγμα B 90% <i>Sideritis spp</i>
0	4,45 ± 0,00471	5,04 ± 0,00943
6	3,80 ± 0,00471	3,86 ± 0,00000
12	3,18 ± 0,00000	3,15 ± 0,00471

Γενικότερα όμως, το pH είναι ένας κρίσιμος παράγοντας για τη διασφάλιση της ασφάλειας και της ποιότητάς της κατά τη διάρκεια της ζύμωσης. Για να θεωρείται μικροβιολογικά ασφαλής η kombucha, πρέπει να διατηρεί ένα εύρος pH μεταξύ 2,5 και 4,2, με κρίσιμο όριο το  $\text{pH} \leq 4,2$ , σύμφωνα με τις οδηγίες του FDA (Miranda, et al., 2022). Συνεπώς, με τελικές τιμές pH 3,18 και 3,15 στα δείγματα A και B αντίστοιχα, τα προϊόντα θεωρούνται μικροβιακά σταθερά. Παρόλο αυτά, για οργανοληπτικούς λόγους συνιστάται να ολοκληρώνεται η ζύμωση όταν το pH κυμαίνεται στο 4.



Διάγραμμα 4.1-1 Τιμές pH δειγμάτων A και B κατά τη διάρκεια της ζύμωσης



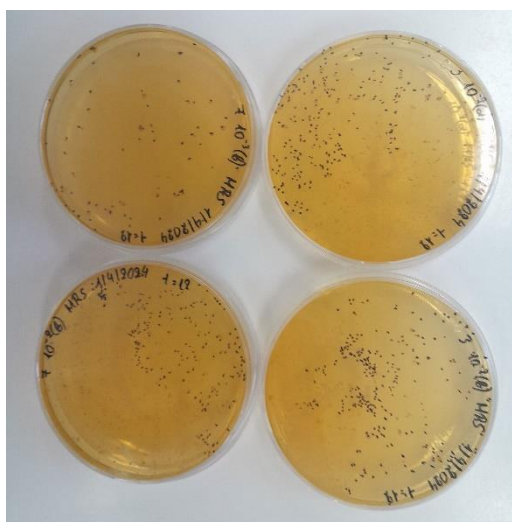
## 4.2 Μικροβιολογικές αναλύσεις

### I. Plate Count Agar (PCA)

Όπως αναλύθηκε στην *Ενότητα 3.2*, το Plate Count Agar αποτελεί ένα μη επιλεκτικό μέσο για την απαρίθμηση αερόβιων βακτηρίων, της ολικής μεσόφιλης χλωρίδας (OMX). Για την εκτέλεση του παρόντος πειράματος πραγματοποιήθηκε μικροβιολογική ανάλυση τόσο στον εκκινητή SCOBY προς έλεγχο του μικροβιακού φορτίου του όσο και σε τρία διαφορετικά χρονικά σημεία κατά τη ζύμωση. Από το συγκεκριμένο μη επιλεκτικό υπόστρωμα εξήχθησαν αποτελέσματα για τον αρχικό πληθυσμό του μύκητα του τσαγιού και για τα δείγματα A και B την 1<sup>η</sup> και 6<sup>η</sup> ημέρα του πειράματος. Συγκεκριμένα, ο έλεγχος της κυτταρινούχας μεμβράνης έδειξε πληθυσμό των  $1,4 \cdot 10^4$  CFU / mL βακτηρίων της ολικής μεσόφιλης χλωρίδας, επιβεβαιώνοντας την βιωσιμότητα του και την δυνατότητα χρήσης του για την πραγματοποίηση του πειράματος. Η πρώτη μέτρηση έδειξε πληθυσμό περίπου ίσο με 10 CFU / mL και για τα δύο δείγματα και η τρίτη δεν επέφερε μετρήσιμες αποικίες. Όμως, η δεύτερη ανάλυση σε PCA εμφάνισε μετρήσιμα αποτελέσματα που αναλογούν σε πληθυσμό μεγαλύτερο των  $3 \cdot 10^4$  CFU / mL, αποτελώντας σημάδι πολλαπλασιασμού των αερόβιων βακτηρίων. Η απουσία αποτελεσμάτων για την 12<sup>η</sup> ημέρα πιθανών οφείλεται σε κάποιο τυχαίο σφάλμα κατά την πραγματοποίηση της μικροβιολογικής ανάλυσης, συμπεριλαμβανομένων της λανθασμένης διάρκειας ή θερμοκρασίας επώασης, κ.λπ. ή και σε μη επιθυμητές συνθήκες ανάπτυξης των βακτηρίων στο προϊόν, όπως όξινο pH.

### II. De Man-Ragose-Sharpe agar (MRS)

Όπως είναι γνωστό το De Man-Ragose-Sharpe agar (MRS) αποτελεί ένα επιλεκτικό υπόστρωμα για την καλλιέργεια, απομόνωση και απαρίθμηση οξυγαλακτικών βακτηρίων (LAB). Τα βακτήρια του γαλακτικού οξέος είναι παρών στις πρώτες ύλες για την παρασκευή της kombucha, ειδικότερα εκτός από το SCOBY, βρίσκονται στο χαρούπι που χρησιμοποιείται για την παρασκευή του χαρουπόμελου.

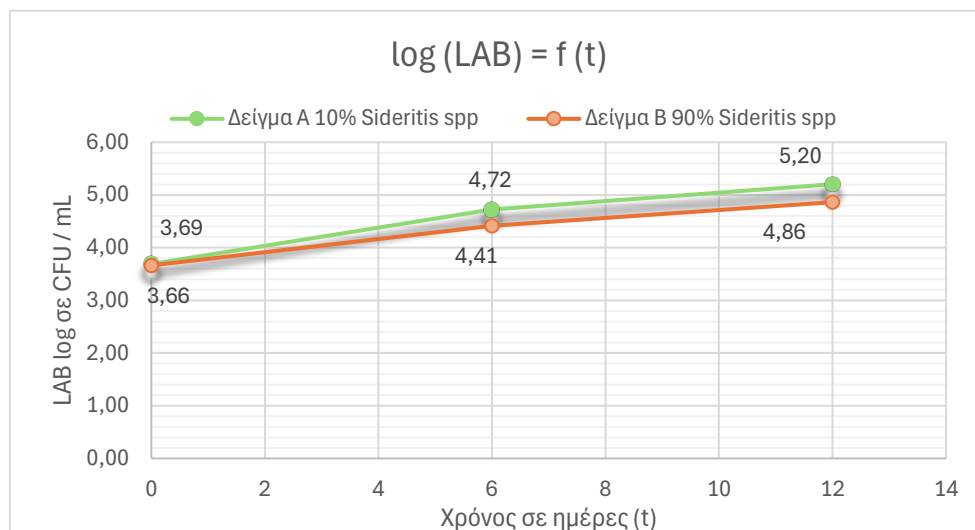


Εικόνα 4.2-1 Επωασμένα τρυβλία MRS

Γενικότερα, τα οξυγαλακτικά βακτήρια αναπτύσσονται σε αναερόβιες συνθήκες, χωρίς



αυτό να σημαίνει ότι δεν μπορούν να πολλαπλασιαστούν και σε αερόβιες συνθήκες ή δεν παρουσιάζουν τουλάχιστον ανθεκτικότητα στο οξυγόνο (Marín, et al., 2019). Καταναλώνουν την απαραίτητη ποσότητα των διαθέσιμων σακχάρων, με στόχο της παραγωγή του γαλακτικού οξέος. Έπειτα, το παραγόμενο γαλακτικό οξύ χρησιμοποιείται από τα βακτήρια του οξικού οξέος ως πηγή άνθρακα για την μετατροπή σε οξικό οξύ.



Διάγραμμα 4.2-1 Λογαριθμική απεικόνιση ζωντανών καταμετρούμενων αποικιών οξυγαλακτικών βακτηρίων για τα δείγματα κατά τη διάρκεια της ζύμωσης

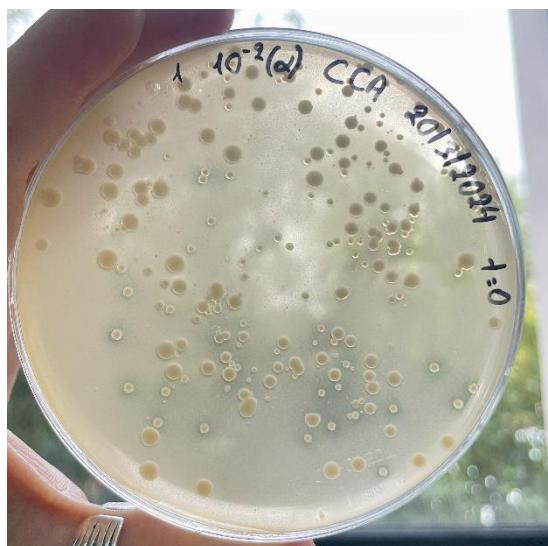
Στο Διάγραμμα 4.2-1 παρουσιάζεται η λογαριθμική πορεία που ακολούθησαν οι καταμετρούμενες αποικίες των βακτηρίων του γαλακτικού οξέος κατά τη διάρκεια της ζύμωσης. Και για τα δύο δείγματα παρατηρείται μία σταδιακή αύξηση του πληθυσμού, με τα επίπεδα να φθάνουν την τάξη των  $10^4$  και  $10^5$  CFU / mL, συγκριτικά με τον αρχικό πληθυσμό των  $10^3$  CFU / mL. Όμως, παρατηρείται μία πληθυσμιακή διαφορά μεταξύ του Δείγματος A (10% *Sideritis* spp) και B (90% *Sideritis* spp), με το τελευταίο να υπέστη μικρότερη άνοδο. Η διαφορά αυτή μπορεί να οφείλεται στις διαφορετικές περιεκτικότητες πράσινου τσαγιού και Σιδερίτη στα δύο δείγματα. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, ο πληθυσμός οξυγαλακτικών βακτηρίων στην kombucha κυμαίνεται συνήθως στα  $10^6$  CFU/mL (Mendelson, et al., 2023), χωρίς όμως η τιμή αυτή να αποτελεί ένα σταθερό νούμερο.

### III. Glucose – Yeast Extract – Peptone – Ethanol – CaCO<sub>3</sub> agar (GYPEC)

Στο Διάγραμμα 4.2-1 παρουσιάζεται η λογαριθμική πορεία που ακολούθησαν οι καταμετρούμενες αποικίες των βακτηρίων του οξικού οξέος κατά την 6<sup>η</sup> και 12<sup>η</sup> ημέρα της ζύμωσης. Και για τα δύο δείγματα παρατηρείται πληθυσμός παρόμοιας τάξης

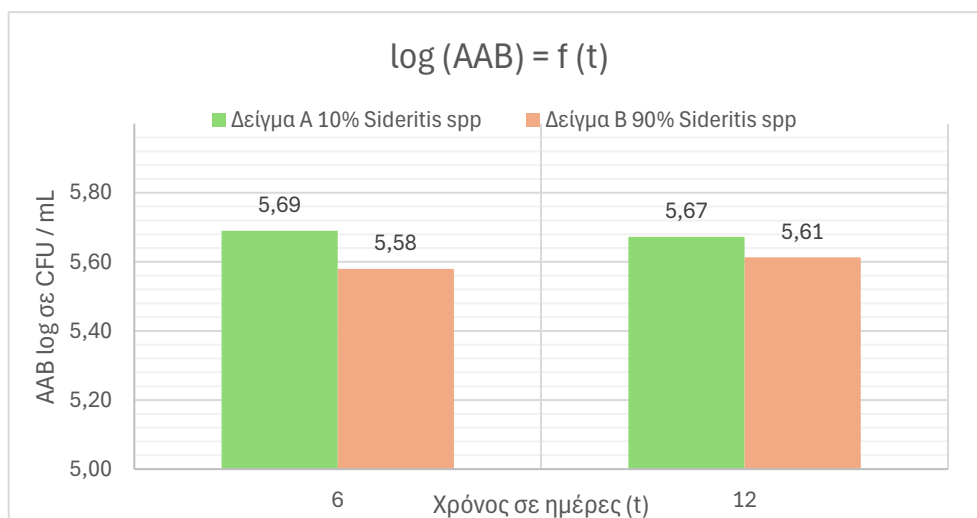
μεγέθους  $10^5$  CFU/mL με μικρή διαφοροποίηση των αριθμητικών τιμών, που δεν θεωρείται στατιστικά σημαντική. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, ο πληθυσμός βακτηρίων οξικού οξέος στην kombucha κυμαίνεται συνήθως μεταξύ  $10^4$  CFU/mL και  $10^7$  CFU/mL (Χιαογυαν, et al., 2023; Hang, 2011). Όπως φαίνεται στην Εικόνα 4.2-2, οι αποικίες των βακτηρίων οξικού οξέος εμφανίζουν στρογγυλό σχήμα μικρού μεγέθους με μπεζ ή λευκή απόχρωση, ενώ διαθέτουν λεία ή τραχιά επιφάνεια, σχηματίζοντας ένα ημιδιαφανή στεφάνι περιμετρικά.

Για τον αρχικό έλεγχο του μικροβιώματος του SCOBY και την ημέρα 0, η καταμέτρηση των Ακετοβακτηριοειδών θεωρήθηκε μη πραγματοποιήσιμη. Γενικότερα, τα βακτήρια του οξικού οξέος μπορούν να χαρακτηρισθούν ως βιώσιμα αλλά μη καλλιεργήσιμα (viable but non countable - VBNC), ενώ ταυτόχρονα διαθέτουν υψηλές απαιτήσεις όσον αφορά τα απαραίτητα θρεπτικά συστατικά για την επιβίωσή τους.



Εικόνα 4.2-2 Επωασμένο τρυβλίο με AAB αποικίες

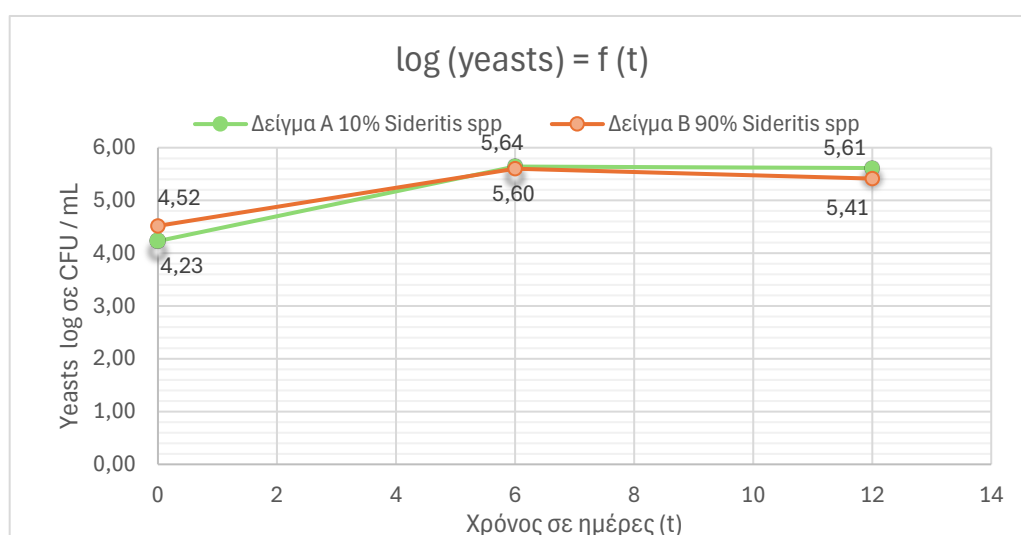
Συνεπώς, η απομόνωση, μέτρηση και ανάπτυξη των συγκεκριμένων βακτηρίων καθίσταται δύσκολη σε εργαστηριακό περιβάλλον, ειδικότερα όσον αφορά προϊόντα ή ποτά ζύμωσης (Sengun & Karabiγikli, 2011; Vegas, et al., 2010). Σε περιπτώσεις αδυναμίας απαρίθμησης, όπως την ημέρα 0 του πειράματος, η παρουσία θολερότητας στο θρεπτικό μέσο αποτελεί ένδειξη παρουσίας βακτηρίων του οξικού οξέος.



Διάγραμμα 4.2-2 Λογαριθμική απεικόνιση ζωντανών καταμετρούμενων αποικιών AAB για τα δείγματα κατά την 6η και 12η ημέρα.

#### IV. Yeast - Malt Extract Agar

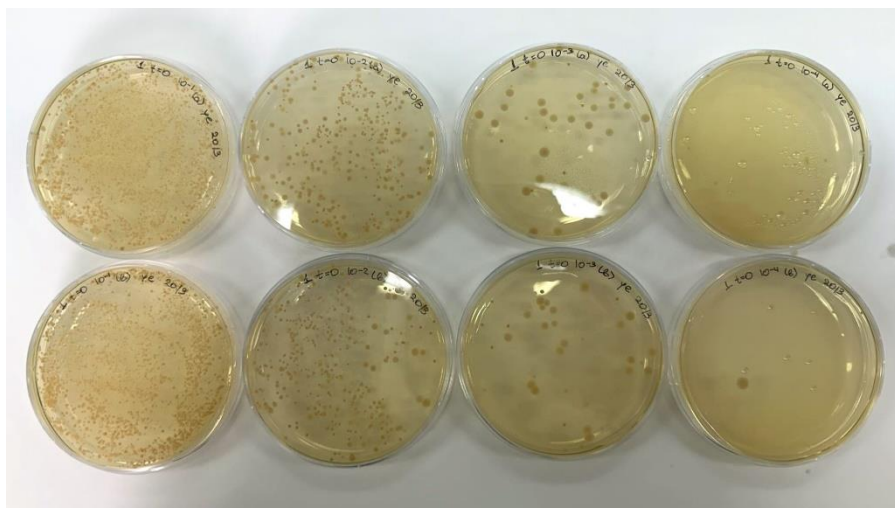
Στο Διάγραμμα 4.2-1 παρουσιάζεται η λογαριθμική πορεία που ακολούθησαν οι καταμετρούμενες αποικίες των ζυμών κατά την διάρκεια της ζύμωσης. Και για τα δύο δείγματα παρατηρείται αρχικός πληθυσμός παρόμοιας τάξης μεγέθους  $10^4$ , όμως το Δείγμα Β (90% *Sideritis spp*) διέθετε διπλάσιο σχεδόν αριθμό καταμετρήσιμων αποικιών κατά την ημέρα 0 της ζύμωσης συγκριτικά με το Δείγμα Α (10% *Sideritis spp*). Ο αρχικός έλεγχος του μικροβιώματος του SCOBY, έδειξε πληθυσμό ίδιας τάξης μεγέθους και παρόμοιου μεγέθους με του δείγματος Β την ημέρα 0, δηλαδή  $3,2 \cdot 10^4$  CFU / mL. Όσον αφορά τον ρυθμό ανάπτυξης των ζυμών στα δύο διαφορετικά δείγματα παρατηρείται διαφοροποίηση.



Διάγραμμα 4.2-3 Λογαριθμική απεικόνιση ζωντανών καταμετρούμενων αποικιών ζυμών για τα δείγματα κατά την ζύμωση.

Από την μία, το Δείγμα Α (10% *Sideritis spp*) παρουσιάζει συγκριτικά μία δραματική αύξηση για το διάστημα των ημερών 0 έως 6, με τον αριθμό των καλλιεργήσιμων αποικιών να ανέρχεται σε 25 φορές μεγαλύτερος. Έπειτα, μεταξύ των ημερών 6 και 12, παρατηρείται μία πτώση της τάξεως  $3,0 \cdot 10^4$  CFU / mL, δηλαδή μείωση 7%. Από την άλλη, το Δείγμα Β (90% *Sideritis spp*) παρουσιάζει επίσης μία σημαντική αύξηση για το διάστημα των ημερών 0 έως 6, με τον αριθμό των καλλιεργήσιμων αποικιών να ανέρχεται σε 12 φορές μεγαλύτερος. Παρόλο αυτά, για το διάστημα μεταξύ των ημερών 6 και 12, παρατηρείται μία σημαντική πτώση στον αριθμό αποικιών, ίση με 35%. Η αύξηση του πληθυσμού οφείλεται στο γεγονός ότι κατά το διάστημα μεταξύ ημέρας 0 και 6, οι μικροοργανισμοί βρίσκονται στην εκθετική φάση, αφού προηγήθηκε η φάση προσαρμογής, χάρη στο πλούσια σε θρεπτικά συστατικά υπόστρωμα, κυρίως σάκχαρα.

Αντίθετα, στο διάστημα μεταξύ της μέσης της ζυμώσεως και το τέλος, οι μικροοργανισμοί προφανώς περνάνε από την στατική φάση και έπειτα την φάση θανάτου, λόγω απουσίας ή έλλειψης των απαραίτητων θρεπτικών συστατικών. Γενικά, σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, ο πληθυσμός ζυμών στην kombucha κυμαίνεται συνήθως στα  $10^6$  CFU/mL (Mendelson, et al., 2023).



Εικόνα 4.2-3 Επωασμένα τρυβλία με αποικίες ζυμομυκήτων

#### 4.3 Προσδιορισμός Αναγωγικής Ισχύος / Αντιοξειδωτικής Ικανότητας - Δοκιμή FRAP

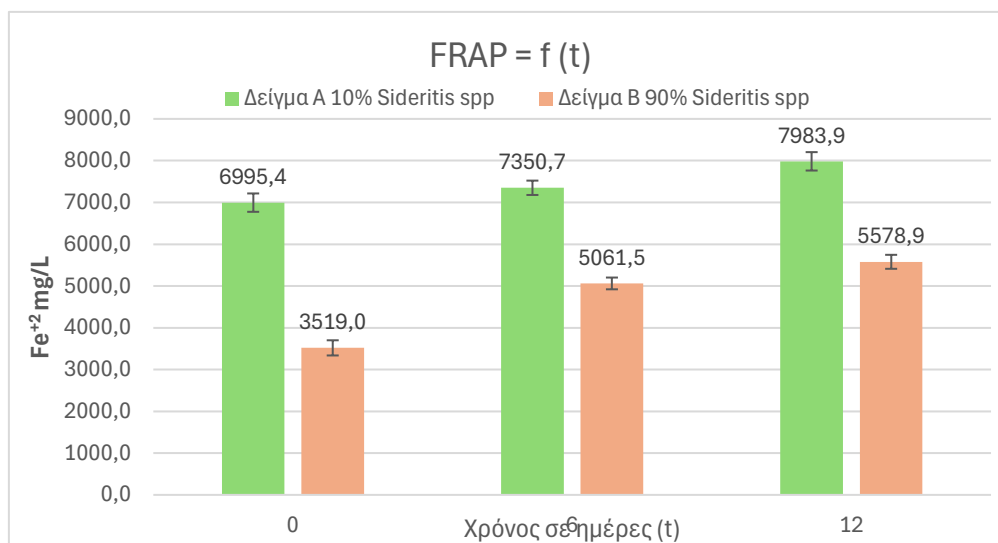
Στον Πίνακα 4.3-1 παρουσιάζονται όλες οι αριθμητικές μετρήσεις που πραγματοποιήθηκαν κατά την δοκιμή FRAP σε συνδυασμό με τις τυπικές αποκλίσεις τους για τα δείγματα A και B κατά τη διάρκεια της ζύμωσης, ενώ στο Διάγραμμα 4.3-1 παρουσιάζονται οι ανωτέρω τιμές σχηματικά. Για την εξαγωγή των παρακάτω αποτελεσμάτων, βάσει τις μετρούμενες τιμές, χρησιμοποιήθηκε μια πρότυπη καμπύλη ( $y = 0,0035x + 0,0074$ ,  $R^2 = 0,9903$ ) που είχε παρασκευαστεί χρησιμοποιώντας διάφορες συγκεντρώσεις ( $N = 10$ ) των αποθεματικών διαλυμάτων  $FeSO_4 \times 7H_2O$  (10-300  $\mu M$ ). Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως mg  $FeSO_4 \times 7H_2O$  ανά L kombucha (Lantzouraki, et al., 2016).

Πίνακας 4.3-1 Αριθμητικές τιμές Αναγωγικής Ισχύος / Αντιοξειδωτική Ικανότητα (FRAP) δειγμάτων A και B κατά τη διάρκεια της ζύμωσης

Ημέρες	Δείγμα A 10% Sideritis spp	Δείγμα B 90% Sideritis spp
0	6995,4 $\pm$ 220,1	3519,0 $\pm$ 181,5
6	7350,7 $\pm$ 171,9	5061,5 $\pm$ 140,6
12	7983,9 $\pm$ 220,2	5578,9 $\pm$ 167,5

Παρατηρώντας τα αποτελέσματα, είναι φανερό ότι η διαφορετική περιεκτικότητα σε εκχυλίσματα πράσινου τσαγιού και Σιδερίτη επηρεάζει την αναγωγική ισχύς /

αντιοξειδωτική ικανότητα (FRAP), καθώς τα δύο δείγματα αποτελούνται από την ίδια ποσότητα χαρουπόμελου, 50% επί του συνόλου των σακχάρων, μία από τις κύριες πηγές πολυφαινολών στο προϊόν που συμβάλει δηλαδή στην αντιοξειδωτική ικανότητα της kombucha, όπως αναλύθηκε στην υπό-ενότητα 2.4. Γενικότερα, σύμφωνα την βιβλιογραφία, η παραγωγή kombucha από πράσινο τσάι παρουσιάζει την υψηλότερη αντιοξειδωτική ικανότητα, συγκριτικά με την χρήση διαφορετικών εκχυλισμάτων (Khaerah & Akbar, 2019).



Διάγραμμα 4.3-1 Αναγωγική Ισχύς / Αντιοξειδωτική Ικανότητα (FRAP) δειγμάτων A και B κατά τη διάρκεια της ζύμωσης

Συνεπώς, έτσι και στο συγκεκριμένο πείραμα, το δείγμα A, με περιεκτικότητα 10% εκχυλίσματος *Sideritis spp* και 90% *Camelia sinensis*, παρουσιάζει μία αυξητική τάση όσον αφορά την αναγωγική ισχύ / αντιοξειδωτική ικανότητά του καθ' όλη τη διάρκεια της ζύμωσης του ροφήματος. Παρόλο αυτά, όπως φαίνεται στο Διάγραμμα 4.3-1, παρατηρείται στατιστικά σημαντική αύξηση την ημέρα 12, χωρίς όμως οι μετρήσεις των ημερών 0 και 6 να διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους. Αντίθετα, το δείγμα B, με περιεκτικότητα 90% εκχυλίσματος *Sideritis spp* και 10% *Camelia sinensis*, παρουσιάζει επίσης μία αυξητική τάση κατά την ολική διάρκεια του πειράματος. Όμως, συγκριτικά με το Δείγμα A, παρατηρούνται στατιστικά σημαντικά χαμηλότερες αριθμητικές τιμές τις ημέρες 0, 6 και 12, επιβεβαιώνοντας τόσο την βιβλιογραφία αλλά και τα αποτελέσματα του προσδιορισμού του ολικού φαινολικού περιεχομένου (TPC). Συγκεκριμένα για το Δείγμα B, παρατηρούνται στατιστικά σημαντικές διαφορές στα αποτελέσματα τόσο μεταξύ των ημερών 0 και 6, όσο και μεταξύ των ημερών 6 και 12, αποδεικνύοντας μία ισχυρότερη αυξητική τάση.

#### 4.4 Προσδιορισμός Ολικού Φαινολικού Περιεχομένου - Δοκιμή Folin – Ciocalteu

Στον Πίνακα 4.4-1 παρουσιάζονται όλες οι αριθμητικές μετρήσεις που πραγματοποιήθηκαν κατά τις μετρήσεις Folin – Ciocalteu σε συνδυασμό με τις τυπικές αποκλίσεις τους για τα δείγματα Α και Β κατά τη διάρκεια της ζύμωσης, ενώ στο Διάγραμμα 4.4-1 παρουσιάζονται οι ανωτέρω τιμές σχηματικά. Για την εξαγωγή των παρακάτω αποτελεσμάτων, βάσει τις μετρούμενες τιμές, χρησιμοποιήθηκε μια πρότυπη καμπύλη με εύρος 25-2600 mg/L γαλλικού οξέος ( $y = 0,0005x + 0,0783$ ,  $R^2 = 0,9989$ ) και τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως mg ισοδύναμα γαλλικού οξέος (GAE) ανά L kombucha (Andreou, et al., 2018).

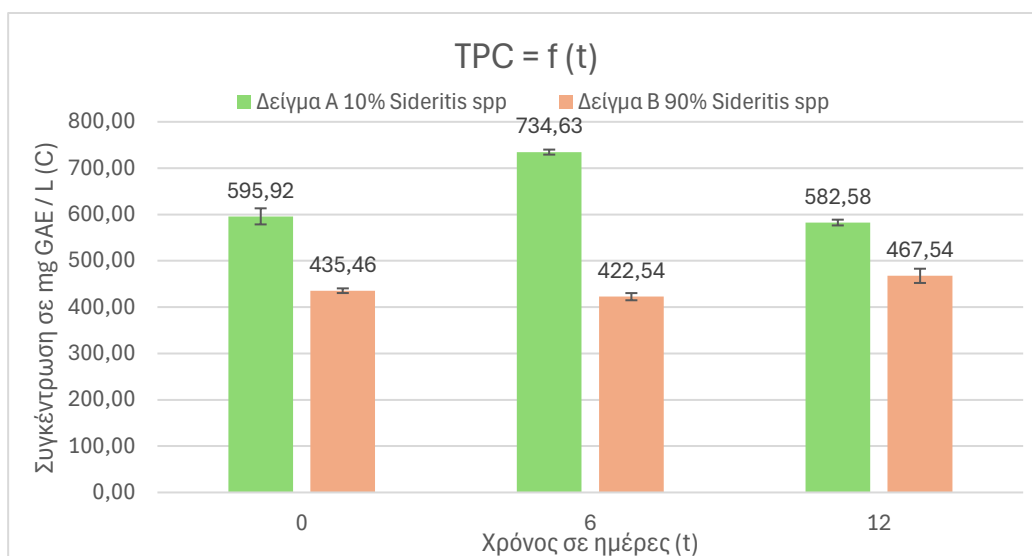
Πίνακας 4.4-1 Αριθμητικές τιμές Ολικού Φαινολικού Περιεχομένου (TPC) δειγμάτων Α και Β κατά τη διάρκεια της ζύμωσης

Ημέρες	Δείγμα Α 10% <i>Sideritis spp</i>	Δείγμα Β 90% <i>Sideritis spp</i>
0	595,92 ± 17,36	435,46 ± 5,03
6	734,63 ± 5,40	422,54 ± 7,73
12	582,58 ± 6,24	467,54 ± 15,35

Παρατηρώντας τα αποτελέσματα, είναι φανερό ότι η διαφορετική περιεκτικότητα σε εκχυλίσματα πράσινου τσαγιού και Σιδερίτη επηρεάζει το ολικό φαινολικό περιεχόμενο (TPC), καθώς τα δύο δείγματα αποτελούνται από την ίδια ποσότητα χαρουπόμελου, 50% επί του συνόλου των σακχάρων, μία από τις κύριες πηγές πολυφαινολών στο προϊόν, όπως αναλύθηκε στην υπό-ενότητα 2.4. Γενικά, ο τύπος σακχάρων που χρησιμοποιείται για τη ζύμωση επηρεάζει την συνολική περιεκτικότητα σε φαινολικά συστατικά, με πλεονεκτική επιλογή του χαρουπόμελου, τόσο για το φαινολικό όσο και για το χημικό προφίλ, και της ζάχαρης έναντι εναλλακτικών γλυκαντικών, όπως της ασπαρτάμης (Emiljanowicz & Malinowska-Pańczyk, 2019).

Το δείγμα Α, με περιεκτικότητα 10% εκχυλίσματος *Sideritis spp* και 90% *Camelia sinensis*, παρουσιάζει μία αυξητική τάση τις πρώτες 6 ημέρες του πειράματος, έπειτα όμως παρατηρείται πτώση του ολικού φαινολικού περιεχομένου σε τιμή παρόμοια με την αρχική. Συγκεκριμένα, τα αποτελέσματα των ημερών 0 και 12 δεν παρουσιάζουν κάποια στατιστικά σημαντική αύξηση, όμως η ραγδαία αύξηση που παρατηρείται την ημέρα 6 διαφέρει στατιστικά τόσο από το αρχικό όσο και από το τελικό ολικό φαινολικό περιεχόμενο. Αντίθετα, το δείγμα Β, με περιεκτικότητα 90% εκχυλίσματος *Sideritis spp* και 10% *Camelia sinensis*, παρουσιάζει στατιστικά χαμηλότερη αρχική και τελική τιμή του ολικού φαινολικού περιεχομένου, συγκριτικά με το δείγμα Α. Τελικά, παρατηρείται μία

μικρή αύξηση της περιεκτικότητας σε φαινόλες εκφρασμένη σε γαλλικό οξύ, αφού πρώτα προηγήθηκε μία ακόμη μικρότερη πτώση κατά τις μετρήσεις της 6<sup>η</sup> ημέρας. Συγκεκριμένα, παρατηρείται στατιστικά σημαντική αύξηση μόνο την ημέρα 12, χωρίς όμως οι μετρήσεις των ημερών 0 και 6 να διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους. Η αυξημένη συγκέντρωση πολυφαινολών στο δείγμα A κατά τις μετρήσεις τις 6<sup>ης</sup> ημέρας πιθανώς οφείλονται στη διάσπαση πολύπλοκων πολυφαινολικών μορίων σε απλούστερα, αυξάνοντας έτσι την περιεκτικότητά τους. Αυτό επιτυγχάνεται λόγω της αυξημένης περιεκτικότητας αιθανόλης και της παραγόμενης ακεταλδεϋδης, χάρη στην αλκοολική ζύμωση που λαμβάνει χώρα από τους ζυμομύκητες (Nogueira, et al., 2008; Ζου, et al., 2017). Η πτώση που εμφανίζεται στα δείγματα οφείλεται στην παρουσία των βακτηρίων οξικού οξέος και την ικανότητά τους να αποικοδομούν μεμονωμένες φαινολικές ενώσεις σε απλά μόρια ή σε άλλους μεταβολίτες, μέσω διάφορων ενζυμικών οδών (Andlauer, et al., 2000). Συγκεκριμένα για το δείγμα A, η δραματική πτώση του ολικού φαινολικού περιεχομένου που εμφανίζεται μεταξύ 6<sup>ης</sup> και 12<sup>ης</sup> ημέρας, πιθανώς να οφείλεται σε υπεροξείδωση του δείγματος.



Διάγραμμα 4.4-1 Ολικό Φαινολικό Περιεχόμενο (TPC) δειγμάτων A και B κατά τη διάρκεια της ζύμωσης

Παρόλο αυτά, σύμφωνα με μελέτη του ολικού φαινολικού περιεχομένου σε διαφορετικά ροφήματα kombucha, μπορεί να κυμανθεί από 147,33 έως 535 mg GAE ανά L (Mfpora, et al., 2024; Wang, et al., 2022), ανάλογα το είδος του τσαγιού που θα χρησιμοποιηθεί, μαύρο ή πράσινο, την διάρκεια ζυμώσεως και το είδος σακχάρων. Συνεπώς, τόσο ο συνδυασμός των εκχυλισμάτων όσο και η προσθήκη χαρουπόμελου δημιουργούν ένα προϊόν με ικανοποιητικά ως υψηλά ποσοστά ολικού φαινολικού περιεχομένου.



#### 4.5 Μέτρηση Περιεκτικότητας Αλκοόλης

Η kombucha αποτελεί ένα ποτό χαμηλής περιεκτικότητας σε αλκοόλ, που παράγεται μέσω ζύμωσης των διαθέσιμων σακχάρων (χαρουπόμελο, κρυσταλλική ζάχαρη) σε αιθανόλη από τους ζυμομύκητες, και έπειτα μετατροπή τους σε οξικό οξύ από τα Ακετοβακτηρίδια. Η περιεκτικότητα σε αλκοόλ επηρεάζεται από το χρόνο ζύμωσης και τα επίπεδα σακχάρων, ενώ κυμαίνεται μεταξύ 0,3 και 1% (v/v), με συνηθέστερες τις τιμές κάτω από 0,5% (v/v), ώστε να θεωρείται μη αλκοολούχο ποτό (Antolak, et al., 2021). Η περιεχόμενη αλκοόλη όχι μόνο προσθέτει μια διακριτική ζεστασιά, αλλά ενισχύει τον ανθρακούχο χαρακτήρα του ποτού, δημιουργώντας μια αίσθηση αφρισμού που πολλοί καταναλωτές βρίσκουν ελκυστική (Watawana, et al., 2015).

Μέσω της μέτρησης περιεκτικότητας αλκοόλης προσδιορίζεται η περιεχόμενη ποσότητα αιθανόλης που περιέχει το αλκοολούχο ρόφημα. Τα δείγματα αποτελούνται από χαρουπόμελο, κρυσταλλική ζάχαρη, μείγμα εκχυλίσματος πράσινου τσαγιού και Σιδερίτη και SCOBY, συστατικά που δεν παρουσιάζουν θετικό βαθμό αλκοόλης. Συνεπώς, την ημέρα 0, πριν την έναρξη της ζύμωσης, τα δείγματα δεν περιέχουν μετρήσιμη περιεκτικότητα αλκοόλης.

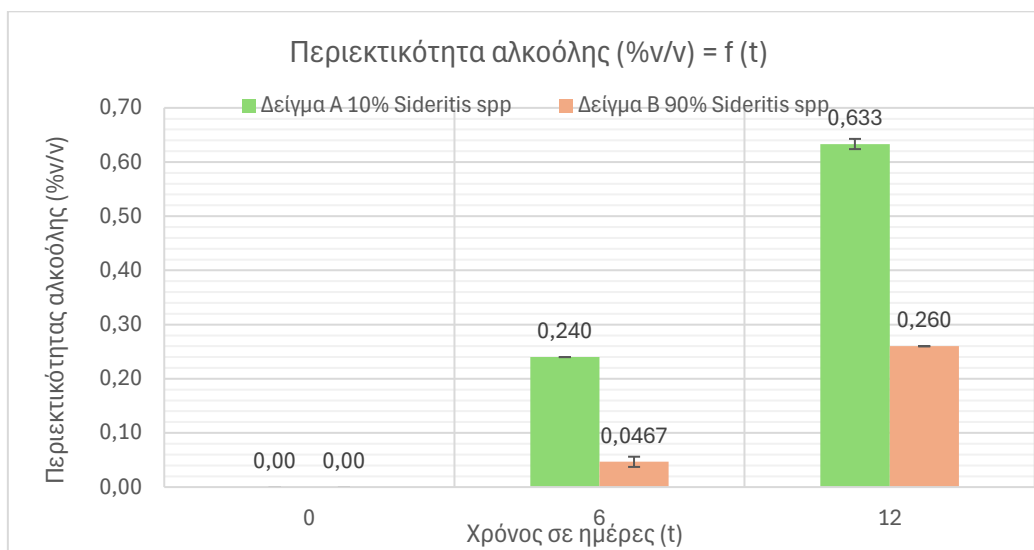
Πίνακας 4.5-1 Αριθμητικές τιμές περιεκτικότητας αλκοόλης δειγμάτων A και B κατά τη διάρκεια της ζύμωσης

Ημέρες	Δείγμα A 10% <i>Sideritis spp</i>	Δείγμα B 90% <i>Sideritis spp</i>
0	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
6	0,240 ± 0,00	0,0467 ± 0,0094
12	0,633 ± 0,0094	0,260 ± 0,00

Στο *Διάγραμμα 4.5-1* παρουσιάζονται γραφικά οι μετρήσεις περιεκτικότητας αλκοόλης των δειγμάτων A και B καθ' όλη τη διάρκεια της ζύμωσης. Η μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε αλκοόλη διακρίνεται την ημέρα 12 της ζυμώσεως, με σημαντική όμως διαφορά μεταξύ των δύο δειγμάτων, αφού παρατηρείται 0,633% (v/v) στο δείγμα A και 0,260% (v/v) στο δείγμα B. Αφού τα δείγματα A και B, περιέχουν τις ίδιες αναλογίες σε σάκχαρα και οι συνθήκες (θερμοκρασία και χρόνος) ζύμωσής τους ήταν ταυτόσημες, η διαφορά στην αλκοολική περιεκτικότητα πιθανώς να οφείλεται σε αυξημένη ή μειωμένη παρουσία βακτηρίων οξικού οξέος και ζυμομυκήτων στην συμβιωτική καλλιέργεια. Παρόλο αυτά, για να διατηρείται το ποσοστό αλκοόλης κάτω από 0,5% (v/v) και το ποτό



να παραμένει ασφαλές για κατανάλωση, ο Οργανισμός Τροφίμων και Φαρμάκων (FDA) συνιστά τον περιορισμό του χρόνου ζύμωσης σε περίπου 10 ημέρες.



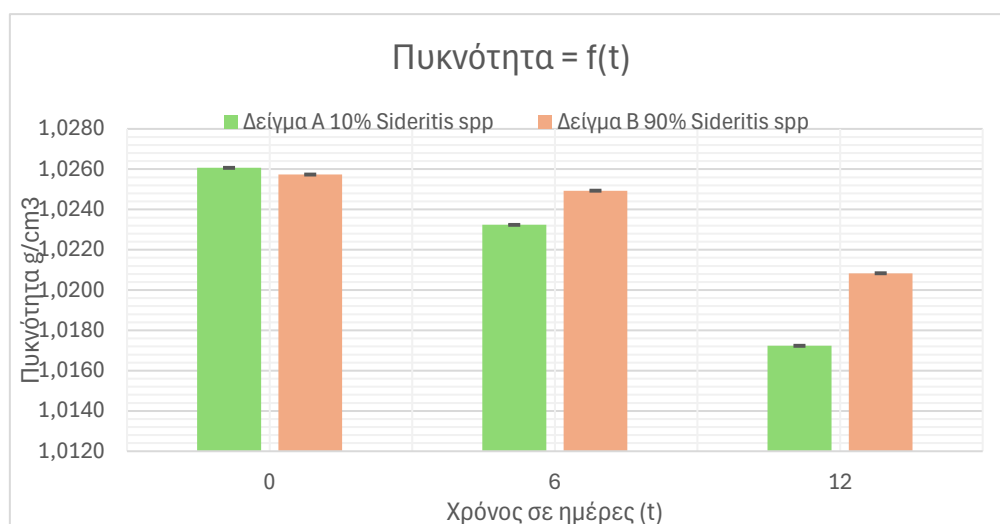
Διάγραμμα 4.5-1 Τιμές περιεκτικότητας αλκοόλης δειγμάτων A και B κατά τη διάρκεια της ζύμωσης

#### 4.6 Μέτρηση Πυκνότητας και Ειδικού βάρους

Το ειδικό βάρος (SG) αποτελεί ένα μέγεθος χωρίς διαστάσεις, που προσδιορίζει την πυκνότητα μιας ουσίας σε σχέση με μια ουσία αναφοράς, συνήθως το νερό. Ορίζεται ως ο λόγος της μάζας ενός συγκεκριμένου όγκου μιας ουσίας προς τη μάζα ίσου όγκου νερού σε μια συγκεκριμένη θερμοκρασία, συνήθως 60°F (Tiab & Donaldson, 2004). Η τιμή της πυκνότητας του νερού υπολογίζεται ως 0,9982 g/ml ή  $\approx 1,0$  g/ml. Η πυκνότητα αποτελεί ένα μέγεθος με διαστάσεις g/mL, που ορίζεται ως ο λόγος της μάζας μιας ουσίας προς τον όγκο της (Tiab & Donaldson, 2004). Επομένως, τα αποτελέσματα των δύο αναλύσεων, του ειδικού βάρους και της πυκνότητας, αποτελούνται από αριθμητικά κοντινές τιμές, όπως φαίνεται και στον Πίνακα 4.6-1. Επιπλέον, παρατηρείται χαμηλή διακύμανση, δηλαδή μεταβολή και χαμηλή τυπική απόκλιση μεταξύ των τιμών, δείχνοντας υψηλή επαναληψιμότητα. Συνεπώς, κατά τη διάρκεια του πειράματος, δεν υπάρχει σημαντική μεταβολή των μετρήσεων, έτσι η πυκνότητα και το ειδικό βάρος παραμένουν σχεδόν σταθερά.

Πίνακας 4.6-1 Αριθμητικές τιμές πυκνότητας και ειδικού βάρους δειγμάτων A και B κατά τη διάρκεια της ζύμωσης

Ημέρες	Δείγμα A 10% <i>Sideritis spp</i>		Δείγμα B 90% <i>Sideritis spp</i>	
	Density g/cm <sup>3</sup>	Specific Gravity	Density g/cm <sup>3</sup>	Specific Gravity
0	1,0261 ± 0,000047	1,0282 ± 0,000050	1,0257 ± 0,000047	1,0278 ± 0,000090
6	1,0232 ± 0,000045	1,0254 ± 0,00	1,0249 ± 0,000047	1,0271 ± 0,000050
12	1,0172 ± 0,000047	1,0193 ± 0,00013	1,0208 ± 0,000047	1,0230 ± 0,00



Διάγραμμα 4.6-1 Τιμές πυκνότητας δειγμάτων A και B κατά τη διάρκεια της ζύμωσης

#### 4.7 Μέτρηση Περιεκτικότητας Ολικών Διαλυτών Στερεών (Σακχάρων)

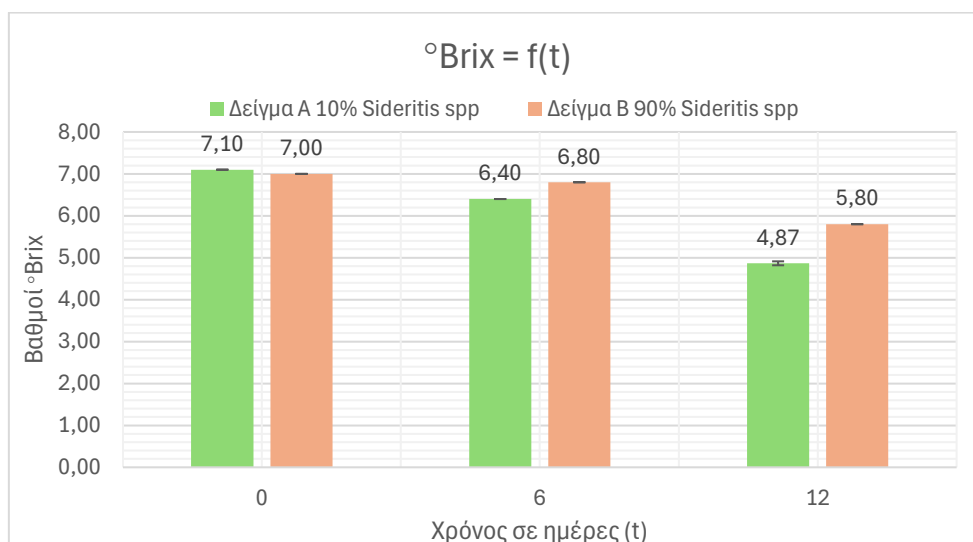
Η περιεκτικότητα σε ολικά διαλυτά στερεά (ΟΔΣ) αναφέρεται στη συνολική ποσότητα διαλυμένων ουσιών, οργανικών και ανόργανων, που υπάρχουν σε ένα υγρό και μπορούν να διαλυθούν σε συγκεκριμένο όγκο, συνήθως νερού. Συμπεριλαμβάνονται κυρίως σάκχαρα, αλλά και πρωτεΐνες, βιταμίνες και ανόργανα άλατα. Μετριέται στα ποτά, τρόφιμα και διαλύματα για την αξιολόγηση της ποιότητας, της γλυκύτητας και της συνολικής συγκέντρωσης διαλυτών ουσιών. Πέρα από τη λευκή κρυσταλλική ζάχαρη, σημαντικά ποσοστά σε σάκχαρα περιέχει και το χαρουπόμελο στην kombucha. Συγκεκριμένα, η περιεκτικότητα του σε σάκχαρα κυμαίνεται από 45 έως 70%, ανάλογα την προέλευση, συμπεριλαμβανόμενων μικρών ποσοτήτων μετάλλων, αμινοξέων και φαινολικών ενώσεων (Yatmaz & Turhan, 2018).

Στην κομπούχα το μεγαλύτερο ποσοστό από τα ολικά διαλυτά στερεά είναι σάκχαρα, έτσι οι μετρήσεις πραγματοποιούνται σε °Brix και °Plato. Ως °Brix ορίζεται το μέτρο των διαλυτών στερεών σε ένα υδατικό διάλυμα, δηλαδή τα γραμμάρια σακχαρόζης ανά 100 g διαλύματος, ενώ ως °Plato ορίζεται το ποσοστιαίο βάρος των σακχάρων στο συνολικό βάρος του διαλύματος. Στον Πίνακα 4.7-1 παρουσιάζονται οι αριθμητικές τιμές των °Brix

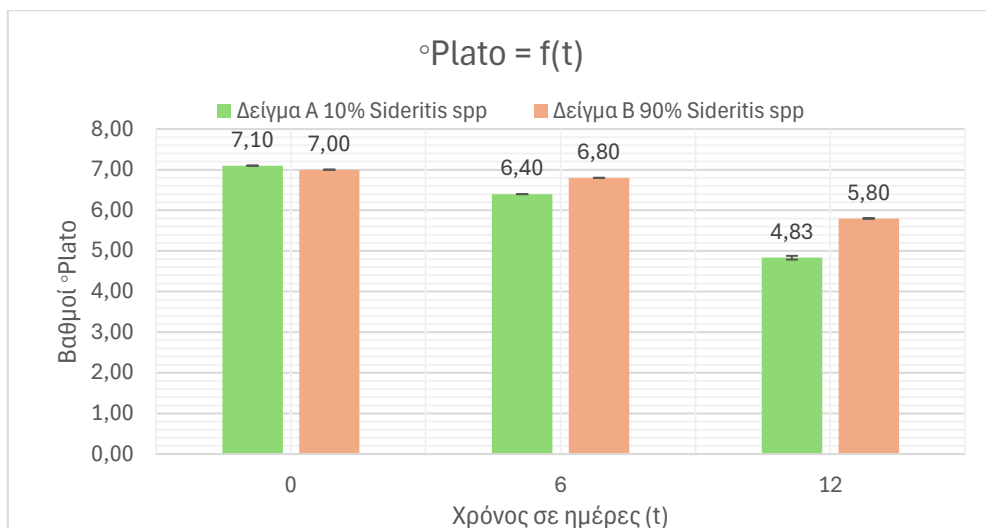
και °Plato, για τα δείγματα A και B κατά τη διάρκεια της ζύμωσης, χωρίς να παρατηρούνται σημαντικές διαφορές. Συγκεκριμένα, τα Διαγράμματα 4.7-1 και 4.7-2 παρουσιάζουν παρόμοιες τιμές και διακυμάνσεις, ενώ παρουσιάζουν μία υψηλή περιεκτικότητα σακχάρων την ημέρα 0 που στη συνέχεια ελαττώνεται. Στο διάστημα μεταξύ των ημερών 6 και 12 της ζύμωσης, παρατηρείται μία ουσιαστική πτώση των σακχάρων, καθώς εξελίσσονται η αλκοολική και η οξική ζύμωση, όπου οι ζύμες και τα βακτήρια του οξικού οξέος μεταβολίζουν τα σάκχαρα για την παραγωγή αιθανόλης και οξικού οξέος, αντίστοιχα. Παρατηρείται ακόμη μία διαφορά μεταξύ των τελικών τιμών του δείγματος A και B. Η υψηλότερη περιεκτικότητα σακχάρων στο δείγμα B οφείλεται πιθανώς σε ασθενέστερη παρουσία μικροοργανισμών στο χρησιμοποιούμενο SCOBY, έτσι χαμηλότερη κατανάλωση των υπάρχοντων σακχάρων.

Πίνακας 4.7-1 Αριθμητικές τιμές βαθμών Brix και Plato των δειγμάτων A και B κατά τη διάρκεια της ζύμωσης

Ημέρες	Δείγμα A 10% <i>Sideritis spp</i>		Δείγμα B 90% <i>Sideritis spp</i>	
	°Brix	°Plato	°Brix	°Plato
0	7,10 ± 0,00	7,10 ± 0,00	7,00 ± 0,00	7,00 ± 0,00
6	6,40 ± 0,00	6,40 ± 0,00	6,80 ± 0,00	6,80 ± 0,00
12	4,87 ± 0,05	4,83 ± 0,05	5,80 ± 0,00	5,80 ± 0,00



Διάγραμμα 4.7-1 Τιμές βαθμών Brix των δειγμάτων A και B κατά τη διάρκεια της ζύμωσης



Διάγραμμα 4.7-2 Τιμές βαθμών Plato των δειγμάτων A και B κατά τη διάρκεια της ζύμωσης

#### 4.8 Μέτρηση Χρώματος

Στον Πίνακα 4.8-1, παρουσιάζονται οι τιμές  $L^*$ ,  $a^*$  και  $b^*$  των δειγμάτων A και B κατά τη διάρκεια της ζύμωσης, που υποδηλώνουν, όπως ήδη αναφέρθηκε, την φωτεινότητα, το πράσινο-κόκκινο και το μπλε-κίτρινο, αντίστοιχα. Για την επιτυχή επεξεργασία των δεδομένων και τον υπολογισμό της μεταβολής του χρώματος  $\Delta E^*$ , τα αρχικά δείγματα με τις μετρούμενες τιμές κατά την ημέρα 0 της ζύμωσης, χαρακτηρίστηκαν ως τα δείγματα αναφοράς (control).

Για τον υπολογισμό της μεταβολής χρώματος χρησιμοποιήθηκε ο παρακάτω τύπος:

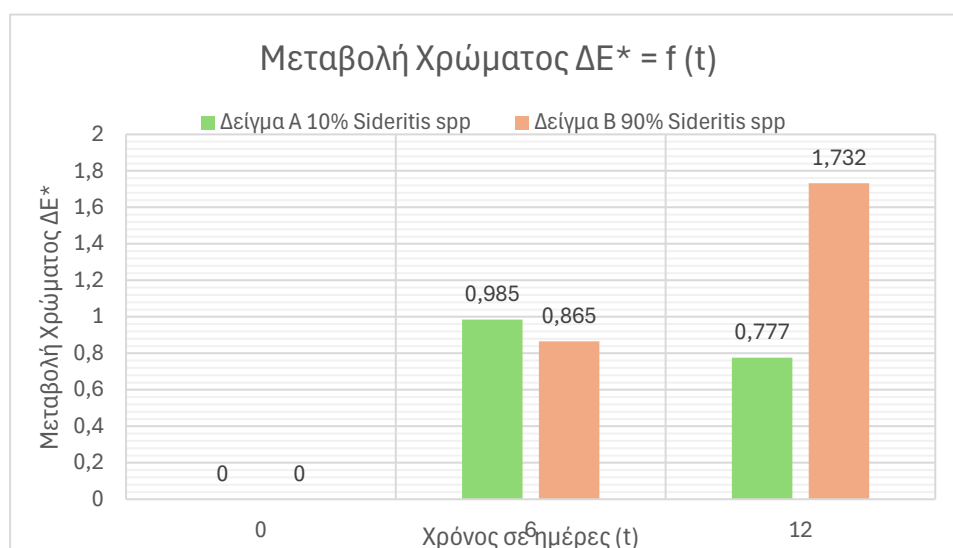
$$\Delta E_{ab}^* = \sqrt{(L_2^* - L_1^*)^2 + (a_2^* - a_1^*)^2 + (b_2^* - b_1^*)^2}.$$

Πίνακας 4.8-1 Τιμές  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$  των δειγμάτων A και B κατά τη διάρκεια της ζύμωσης

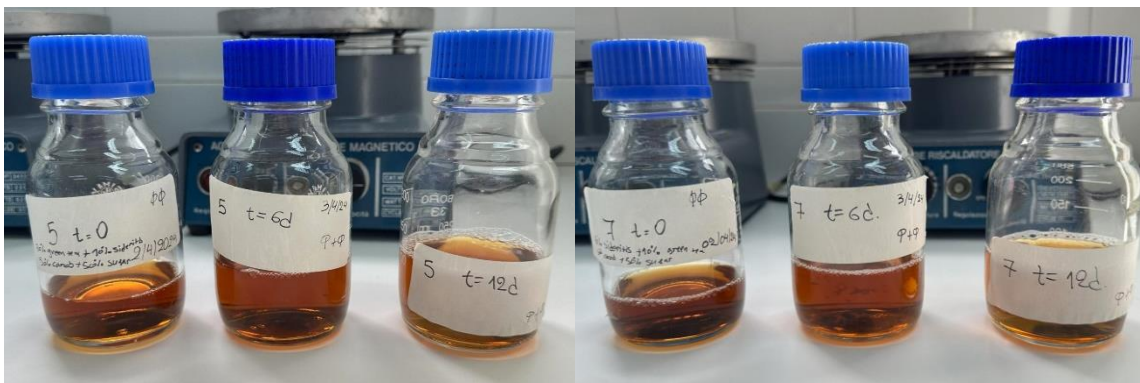
Ημέρες	Δείγμα A 10% <i>Sideritis spp</i>			Δείγμα B 90% <i>Sideritis spp</i>		
	$L^*$	$a^*$	$b^*$	$L^*$	$a^*$	$b^*$
0	46,463 ± 0,844	1,750 ± 0,410	-0,220 ± 0,092	46,553 ± 0,455	1,610 ± 0,082	-0,877 ± 0,297
6	46,920 ± 0,236	1,103 ± 0,097	-0,807 ± 0,422	46,637 ± 0,739	0,980 ± 0,094	-1,463 ± 0,492
12	47,130 ± 0,857	1,630 ± 0,249	-0,600 ± 0,163	45,973 ± 0,740	0,703 ± 0,169	-2,233 ± 0,310

Κατά την διάρκεια του πειράματος, μεγαλύτερη μεταβολή χρώματος συγκριτικά με τα δείγματα αναφοράς της ημέρας 0, διαθέτει το δείγμα B (90% *Sideritis spp*), όπως διακρίνεται στο Διάγραμμα 4.8-1. Η τιμή της μεταβολής χρώματος σχεδόν διπλασιάζεται την 12<sup>η</sup> ημέρα, συγκριτικά με την 6<sup>η</sup> ημέρα. Αντίθετα, το δείγμα A (10% *Sideritis spp*)

παρουσιάζει παρόμοια μεταβολή με το δείγμα Β την 6<sup>η</sup> ημέρα, όμως την 12<sup>η</sup> ημέρα παρατηρείται μία πτώση της διαφοράς. Συγκεκριμένα, για την φωτεινότητα L\* δεν παρατηρείται κάποια αξιοσημείωτη μεταβολή κατά τη διάρκεια της ζύμωσης σε κανένα από τα δύο δείγματα. Όσον αφορά την τιμή a\* που υποδηλώνει την κλίμακα πράσινο ως αρνητικό και κόκκινο ως θετικό, τα δύο δείγματα παρουσιάζουν διαφορετικές αλλαγές, αλλά παρόμοιες αρχικές τιμές. Το δείγμα Α τελικά δεν παρουσίασε κάποια σημαντική αλλαγή μεταξύ της ημέρας 0 και 12. Αντίθετα, το δείγμα Β εμφάνισε μία σταδιακή πτώση της τιμής +a\* καθ' όλη τη διάρκεια της ζύμωσης. Τέλος, λόγω της σημαντικής διαφοράς τους σε περιεκτικότητα Σιδερίτη, τα δείγματα Α και Β δεν διαθέτουν παρόμοιες αρχικές τιμές -b\* (μπλε κλίμακα). Παρόλο αυτά, και στις δύο περιπτώσεις παρατηρήθηκε σχεδόν τριπλασιασμός των τιμών -b\* μεταξύ των ημερών 0 και 12. Συμπερασματικά, με την χρήση του ανθρώπινου οφθαλμού τα δύο δείγματα διαφέρουν ελαφρώς χρωματικά, επιβεβαιώνεται όμως ευκολότερα με την ανάλυση χρώματος. Το δείγμα Β, από 90% τσάι του βουνού εμφανίζει μία σταθερή και σταδιακή μεταβολή του χρώματος και των επιμέρους τιμών, ενώ το δείγμα Α από 10% τσάι του βουνού παρουσιάζει μικρές διαφορές κατά την 6<sup>η</sup> μέρα, που αναιρούνται τελικά την 12<sup>η</sup> ημέρα του πειράματος. Οι ανωτέρω αλλαγές οφείλονται στην ποικιλία μικροοργανισμών που βρίσκονται στο SCOBY και στην παραγωγή μεταβολιτών, λόγω δράσης τους. Σ' αντίθεση, η διαφορά μεταξύ των αρχικών τιμών βασίζεται στην διαφορετική περιεκτικότητα τσάι του βουνού μεταξύ δειγμάτων Α και Β.



Διάγραμμα 4.8-1 Τιμές μεταβολής χρώματος ΔΕ\* δειγμάτων κατά τη διάρκεια της ζύμωσης



Εικόνα 4.8-1 Διαφορά χρώματος δειγμάτων A και B κατά τις ημέρες 0, 6 και 12

## 5 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η παραγωγή ενός ζυμωμένου προβιοτικού ποτού με τη χρήση μιας συμβιωτικής καλλιέργειας ζυμομυκήτων και βακτηρίων (SCOBY) με τσάι του βουνού (*Sideritis spp.*) αποτελεί μια νέα διασταύρωση των παραδοσιακών τεχνικών ζύμωσης και της χρήσης τοπικών φαρμακευτικών βοτάνων. Η παρούσα διατριβή διερεύνησε την ανάπτυξη και την ανάλυση μίας παραλλαγής του ροφήματος kombucha, χρησιμοποιώντας ελληνικό τσάι του βουνού, γνωστό για τις πιθανές αντιοξειδωτικές και θεραπευτικές του ιδιότητες, μαζί με πράσινο τσάι και χαρουπόμελο ως εναλλακτική λύση ζάχαρης. Τα αποτελέσματα προσφέρουν πολύτιμες πληροφορίες για τη μικροβιολογική, βιοχημική και οργανοληπτική δυναμική αυτού του καινοτόμου ροφήματος.

Το θεωρητικό μέρος αυτής της έρευνας παρείχε τα θεμέλια για την κατανόηση της της kombucha. Η λεπτομερής εξέταση των εμπλεκόμενων μικροοργανισμών, συμπεριλαμβανομένων των ζυμών, των βακτηρίων γαλακτικού οξέος (LAB) και των βακτηρίων οξικού οξέος (AAB), κατέδειξε την πολυπλοκότητα της συμβιωτικής σχέσης εντός του SCOBY. Οι μικροοργανισμοί εργάζονται συνεργικά για τη μετατροπή των σακχάρων σε οργανικά οξέα, αιθανόλη και διοξείδιο του άνθρακα, δημιουργώντας ένα ποτό πλούσιο σε φαινολικά που προάγει την υγεία. Η ενσωμάτωση του τσαγιού του βουνού και του χαρουπόμελου στη διαδικασία ζύμωσης ενίσχυσε περαιτέρω τα χαρακτηριστικά του ροφήματος, προσφέροντας μια μοναδική γεύση και πιθανά οφέλη για την υγεία.

Στο πειραματικό τμήμα, πραγματοποιήθηκαν ποικίλες δοκιμές για την παρακολούθηση της διαδικασίας ζύμωσης και την αξιολόγηση του τελικού προϊόντος σε διάφορα στάδια της ζύμωσης. Οι αναλύσεις αυτές επιβεβαίωσαν τη δυναμική αλληλεπίδραση μεταξύ της μικροβιακής κοινότητας και του υποστρώματος ζύμωσης, δείχνοντας πώς παράγοντες, όπως ο τύπος του τσαγιού και των σακχάρων που χρησιμοποιήθηκαν, επηρέασαν την οξύτητα, τη γεύση και την περιεκτικότητα του ποτού σε διαφορετικές ενώσεις. Τα ευρήματα της παρούσας διατριβής καταδεικνύουν τη δυνατότητα παραγωγής ενός υψηλής ποιότητας ζυμωμένου προβιοτικού ροφήματος με τη χρήση τοπικών συστατικών, όπως το εκχύλισμα του *Sideritis spp.* και το χαρουπόμελο, που αποδίδει χαρακτηριστικά παρόμοια ως καλύτερα από αυτά της παραδοσιακής ή κλασσικής συνταγής.

Συγκεκριμένα, οι μικροβιακές αναλύσεις έδειξαν ότι ο συνδυασμός σακχάρων, από το

χαρουπόμελο και την κρυσταλλική ζάχαρη, είναι ιδανικός για την επιβίωση και πολλαπλασιασμό των παρόντων μικροοργανισμών, ώστε να παράγουν τους απαραίτητους μεταβολίτες για την παρασκευή του προβιοτικού ροφήματος. Μία πρόταση για μελλοντική έρευνα αποτελεί η χρήση εκκινητή SCOBY διαφορετικής προέλευσης και μετέπειτα η ταυτοποίηση των παρόντων μικροοργανισμών των χρησιμοποιούμενων SCOBY με τη μέθοδο PCR. Η συγκεκριμένη μελέτη θα δώσει περαιτέρω πληροφορίες τόσο για τους υπεύθυνους μικροοργανισμούς και πως μπορεί να βελτιωθεί η διαδικασία των ζυμώσεων, όσο και θα αποτελέσει μέθοδο σύγκρισης διαφορετικών γεωγραφικών τόπων.

Επιπλέον, αποδείχθηκε ότι ο συνδυασμός τσάι του βουνού, πράσινου τσαγιού και χαρουπόμελου προσδίδει στο προϊόν την επιθυμητή υψηλή περιεκτικότητα σε αντιοξειδωτικά και πολυφαινόλες. Παρατηρείται όμως ότι το Δείγμα Β (90% *Sideritis spp*) παρουσιάζει χαμηλότερες τιμές ολικού φαινολικού φορτίου και αντιοξειδωτικής ικανότητας, δηλαδή για την 12<sup>η</sup> ημέρα TFC ίσο με 467,54 mg GAE / L και FRAP ίσο με 5578,9 Fe<sup>+2</sup> mg / L, συγκριτικά με το Δείγμα Α (10% *Sideritis spp*) που παρουσιάζει αντίστοιχα 582,58 mg GAE / L και 7983,9 Fe<sup>+2</sup> mg / L. Παρόλο αυτά, η χρήση Σιδερίτη συμβάλλει ικανοποιητικά στο θρεπτικό και γευστικό προφίλ. Συνεπώς, ενδιαφέρον έρευνα θα αποτελούσε η παρασκευή kombucha με εξολοκλήρου χρήση χαρουπόμελου ως πηγή σακχάρων και ελληνικό τσάι του βουνού ως βάση. Σκοπός θα αποτελούσε η χημική, μικροβιολογική και οργανοληπτική ανάλυση του ροφήματος, με στόχο την παραγωγή kombucha από 100% ελληνικά συστατικά, υποστηρίζοντας την ελληνική οικονομία και ταυτόχρονα προάγοντας την υγεία του καταναλωτή.

Για το συγκεκριμένο πείραμα, επιλέχθηκε μία χρονική διάρκεια 12 ημερών για την ολοκλήρωση της ζύμωσης. Παρατηρώντας τα συνολικά αποτελέσματα, φαίνεται πως το προϊόν πιθανών να απαιτούσε λιγότερες ημέρες ζύμωσης ή / και μικρότερη από 10% περιεκτικότητα SCOBY, ώστε να αποτελούταν από υψηλότερη περιεκτικότητα πολυφαινολών, δηλαδή πλουσιότερο θρεπτικό περιεχόμενο, και καλύτερο οργανοληπτικό προφίλ. Ειδικότερα, οι παρατεταμένοι περίοδοι ζύμωσης μπορεί να οδηγήσουν σε υψηλότερες συγκεντρώσεις αλκοόλης, καθώς οι ζύμες συνεχίζουν να παράγουν αιθανόλη, όπως στην περίπτωση του Δείγματος Α με περιεκτικότητα αλκοόλης ίση με 0,633 v/v. Ακόμη, με παρατεταμένη ζύμωση αυξάνονται οι πιθανότητες υπερβολικής όξυνσης, η οποία μειώνει τα διατροφικά οφέλη του ροφήματος, και



σημαντικότερα το καθιστά λιγότερο εύγεστο. Ομοίως, είναι σημαντικό να ελέγχονται τα επίπεδα pH κατά τη ζύμωση, ώστε να μην παραχθούν υψηλά ποσοστά οξικού οξέος και να τερματίζεται σε pH πλησίον του 4,0, σ' αντίθεση με τα λαμβανόμενα αποτελέσματα όπου το Δείγμα A (10% *Sideritis spp*) παρουσιάζει pH ίσο με 3,18 και το Δείγμα B (90% *Sideritis spp*) pH ίσο με 3,15.

Τελικά, οι προτάσεις για μελλοντική έρευνα και εξέλιξη του παρόντος πειράματος είναι ποικίλες, πιθανώς συμβάλλοντας στην βελτίωση της συγκεκριμένης παραλλαγής του προϊόντος και των συνθηκών παραγωγής της. Για παράδειγμα, θα μπορούσε μελλοντικά να διεξαχθεί η μέθοδος χρωματογραφίας, υγρή και αέρια, για να μελετηθεί η ποσοτικοποίηση των υπάρχων οργανικών οξέων (οξικό, γαλακτικό, κιτρικό κ.α.), σακχάρων (σακχαρόζη, φρουκτόζη, γλυκόζη), βιταμινών, κυρίως του συμπλέγματος Β, ή των πτητικών αρωματικών ενώσεων. Εκτός των ανωτέρων, μία ακόμη απαραίτητη δοκιμή για την δημιουργία ενός νέου προϊόντος, που δεν πραγματοποιήθηκε, αποτελεί η εκτέλεση οργανοληπτικού ελέγχου με κατάλληλο και εκπαιδευμένο πάνελ. Στόχος αποτελεί πάντα η παραγωγή ενός καινοτόμου και θρεπτικά πλούσια ροφήματος, ευχάριστο προς κατανάλωση.

Συμπερασματικά, η παρούσα έρευνα έδειξε με επιτυχία ότι οι παραδοσιακές τεχνικές ζύμωσης μπορούν να ενισχυθούν με τη χρήση τοπικών βοτάνων και συστατικών, με αποτέλεσμα ένα προβιοτικό ποτό με πολιτιστική σημασία και παρόμοιες θρεπτικές ιδιότητες με το πρότυπο. Τα αποτελέσματα ανοίγουν το δρόμο για περαιτέρω μελέτες σχετικά με τη βελτιστοποίηση των συνθηκών ζύμωσης και των αναλογιών των επιλεγμένων συστατικών, ή ακόμη και τη διερεύνηση άλλων τοπικών συστατικών, συμβάλλοντας στην ανάπτυξη νέων, λειτουργικών τροφίμων με πιθανές εμπορικές εφαρμογές.

## 6 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

3nh, n.d. *3nh*. [Online]

Available at: <http://www.3nh.com/en/product/162-133.html>

Andlauer, W., Stumpf, C. & Fürst, P., 2000. Influence of the Acetification Process on Phenolic Compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(8), pp. 3533-3536.

Andreou, V. et al., 2018. Herbal distillates: A new era of grape marc distillates with enriched antioxidant profile. *Food Chemistry*, Volume 253, pp. 171-178.

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*.

Azab, A., 2017. *Carob (Ceratonia siliqua): Health, Medicine and Chemistry*, s.l.: s.n.

Battle, I. & Tous, J., 1997. *Carob tree. Ceratonia siliqua L. Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops*, s.l.: s.n.

Brassescos, M. E., Brandão, T. R., Silva, C. L. & Pintado, M., 2021. Carob bean (*Ceratonia siliqua* L.): A new perspective for functional food. *Trends in Food Science & Technology*, Issue 114, pp. 310-322.

Brown, J. E., 2016. *Η διατροφή στο κύκλο της ζωής*. Πέμπτη Έκδοση επιμ. s.l.: Ιατρικές Εκδόσεις.

Chacko, S. M., Thambi, P. T., Kuttan, R. & Nishigaki, I., 2010. Beneficial effects of green tea: A literature review. *Chinese Medicine*, pp. 5-13.

CliniSciences, n.d. *CliniSciences*. [Online]

Available at: <https://www.clinisciences.com/en/buy/cat-plate-count-agar-pca-non-selective-5497.html>

Coelho, R. M. D. et al., 2020. Kombucha: Review. *International Journal of Gastronomy and Food Science*, December, Volume 22.

Costa, A., Almeida, F., Vinhas, G. & Sarubbo, L., 2017. Production of bacterial cellulose by *Gluconacetobacter hansenii* using corn steep liquor as nutrient sources.

Dominguez-López, I., Pérez, M. & Lamuela-Raventós, R. - M., 2023. *Total (poly)phenol analysis by the Folin-Ciocalteu assay as an anti-inflammatory biomarker in biological samples*, s.l.: s.n.

Dufresne, C. & Farnworth, E., 2000. Tea, Kombucha, and health: a review. *Food Research International*, pp. 409-421.

Emiljanowicz, K. E. & Malinowska-Pańczyk, E., 2019. Kombucha from alternative raw materials – The review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 28 October, pp. 3185-3194.

- Gaggia, F. et al., 2019. Kombucha Beverage from Green, Black and Rooibos Teas: A Comparative Study Looking at Microbiology, Chemistry and Antioxidant Activity. *Nutrients*, Issue 11.
- Gil, M., Ferreres, F., A. Marrero A., F. T.-L. & Tomas-Barberan, F., 1993. Distribution of flavonoid aglycones and glycosides in *Sideritis speciosa* from the Canary Islands and Madeira. *Phytochemistry*, Issue 34, pp. 227-232.
- Gomes, R. J. et al., 2018. Acetic Acid Bacteria in the Food Industry: Systematics, Characteristics and Applications. *Food Technology and Biotechnology*, June, pp. 139-151.
- Gomes, R. J. et al., 2018. *Acetic Acid Bacteria in the Food Industry: Systematics, Characteristics and Applications*, s.l.: s.n.
- González-Burgos, E., Carretero, M. E. & Serranillos, M. G. -, 2011. *Sideritis* spp.: Uses, chemical composition and pharmacological activities — A review. *Journal of Ethnopharmacology*, 17 March, Volume 135(2), pp. 209-225.
- Hammel, R., Karakilic, V. & Shaw, F., 2016. The affect of temperature and pH on the food safety of kombucha tea. *BCIT Environmental Public Health Journal*.
- Hang, X.-m., 2011. Isolation and Identification of Predominant Microbes from Kombucha and Phylogenic Analysis.
- Harrison, K. & Curtin, C., 2021. Microbial Composition of SCOBY Starter Cultures Used by Commercial Kombucha Brewers in North America. *Microorganisms*, Issue Food Microbial Diversity.
- Instruments, C., n.d. *pH Meter GLP 21*. [Online]  
Available at:  
[https://www.crisoninstruments.com/site/pdfs\\_en/Ficha%20tecnica%20GLP%2021\\_ANG\\_0909.pdf](https://www.crisoninstruments.com/site/pdfs_en/Ficha%20tecnica%20GLP%2021_ANG_0909.pdf)
- Janet E.L. Corry, G. C. R. M. B., 2003. de man, rogosa and sharpe (MRS) agar. In: *Progress in Industrial Microbiology*. s.l.:s.n., pp. 511-513.
- Jayabalan, R., Malbasa, R. & Sathishkumar, M., 2016. Kombucha. *Reference module in food science*.
- John A., C. & Elizabeth, F., 2014. Στο: *A Complete Guide to Quality in Small-Scale Wine Making*. s.l.:s.n.
- Kapp, J. M. & Sumner, W., 2019. Kombucha: a systematic review of the empirical evidence of human health benefit. *Annals of Epidemiology*, Issue 30, pp. 66-70.
- Khaerah, A. & Akbar, F., 2019. Aktivitas Antioksidan Teh Kombucha dari Beberapa Varian Teh yang Berbeda. *Peran Penelitian dalam Menunjang Percepatan Pembangunan Berkelanjutan di Indonesia*.
- Kirimer, N., Baser, K. H. C., Demirci, B. & Duman, H., 2004. Essential Oils of *Sideritis* Species

of Turkey Belonging to the Section Empedoclia. *Chemistry of Natural Compounds*, pp. 19-23.

Lantzouraki, D. Z., Sinanoglou, V. J., Zoumpoulakis, P. & Proestos, C., 2016. Comparison of the Antioxidant and Antiradical Activity of Pomegranate (*Punica granatum* L.) by Ultrasound-Assisted and Classical Extraction. *Special Issue on the Ninth Aegean Analytical Chemistry Days (AACD2014)*, 49(7), pp. 969-978.

Laurence, W. M., 2020. Introduction to the Physical, Mechanical, and Thermal Properties of Plastics and Elastomers. In: *The Effect of Radiation on Properties of Polymers*. s.l.:William Andrew Publishing, pp. 21-53.

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*.

Marín, A., Plotto, A., Atarés, L. & Chiralt, A., 2019. Lactic Acid Bacteria Incorporated into Edible Coatings to Control Fungal Growth and Maintain Postharvest Quality of Grapes. *HortScience*, February, 54(2).

Masood, M. I., Qadir, M. I., Shirazi, J. H. & Khan, I. U., 2011. Beneficial effects of lactic acid bacteria on human beings. *Critical Reviews in Microbiology*, pp. 91-98.

Mendelson, C. et al., 2023. Kombucha tea as an anti-hyperglycemic agent in humans with diabetes – a randomized controlled pilot investigation. *Frontiers in Nutrition*.

Mfopa, A. N. et al., 2024. Polyphenols Content, Antioxidant and Antileishmanial Activities of Kombucha as Affected by Fermentation Time. *Heliyon*.

Miranda, J. F. d. και συν., 2022. Kombucha: A review of substrates, regulations, composition, and biological properties. *Wiley Journal of Food Science*, Issue 87, pp. 503-527.

Musial, C., Kuban-Jankowska, A. & Ponikowska, M. G. -, 2020. Beneficial Properties of Green Tea Catechins. *International Journal Of Molecular Sciences*.

Narendranath, N. V. & Power, R., 2005. Relationship between pH and Medium Dissolved Solids in Terms of Growth and Metabolism of *Lactobacilli* and *Saccharomyces cerevisiae* during Ethanol Production. *Applie and Environmental Microbiology*, 71(5), pp. 2239-2243.

Nasar-Abbas, S. et al., 2015. Carob Kibble: A Bioactive-Rich Food Ingredient. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*.

Nogueiral, A. et al., 2008. Effect of alcoholic fermentation in the content of phenolic compounds in cider processing. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, Volume 51, pp. 1025-1032.

Paar, A., χ.χ. *Alcoholand Extract Meter Alex 500*. [Ηλεκτρονικό]  
Available at: <https://www.anton-paar.com/corp-en/products/details/alcohol-and-extract-meter-alex-500/?srsltid=AfmBOooNI3GE127p6Jp74BTVJDUaC8pJtjJrcez0qVybGqbSlwx-aTDO>

Paar, A., χ.χ. *Portable Density Meter DMA 35 basic*. [Ηλεκτρονικό]  
Available at: <https://www.anton-paar.com/corp-en/products/details/portable-density->

[meter-dmatm-35-basic/?srsltid=AfmBOorVzG1Ws6dpDtwiWAZKD0\\_3mztEIIAaG4aE14v5aMnpEg6t7e4o](#)

Papaefstathiou, E., Agapiou, A., Giannopoulos, S. & Kokkinofta, R., 2018. Nutritional characterization of carobs and traditional carob products. *Food Science & Nutrition*, 6(8).

Rory, R., 2014. Safety of Food and Beverages: Soft Drinks and Fruit Juices. Στο: *Encyclopedia of Food Safety*. s.l.:s.n., pp. 360-363.

Sadeer, N. B. et al., 2020. *The Versatility of Antioxidant Assays in Food Science and Safety-Chemistry, Applications, Strengths, and Limitations*. *Antioxidants*, s.l.: s.n.

Sengun, I. Y. & Karabiyikli, S., 2011. Importance of acetic acid bacteria in food industry. *Food Control*, 22(5), pp. 647-656.

Shrivastava, R. R., Pateriya, P. & Singh, M., 2018. Green Tea - A short review. *International Journal of Indigenous Herbs and Drugs*, 28 March, pp. 12-21.

Solomou, A. D. et al., 2019. Cultivation and utilization of 'Greek Mountain Tea' (*Sideritis* spp.): current knowledge and future challenges. *Asian J. Agric. Biol.*, pp. 288-299.

ThermoFisher, n.d. *Yeast Malt Extract Agar*. [Online]  
Available at: <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/IFU8988.pdf>

ThermoFisherScientific, n.d. *ThermoFisherScientific*. [Online]  
Available at:  
[http://www.oxoid.com/uk/blue/prod\\_detail/prod\\_detail.asp?pr=CM1153&org=9&c=uk&lang=en](http://www.oxoid.com/uk/blue/prod_detail/prod_detail.asp?pr=CM1153&org=9&c=uk&lang=en)

Tiab, D. & Donaldson, E. C., 2004. Density, Specific Gravity, and API Gravity.

Tomou, E.-M., Perrea, D. N. & Skaltsa, H., 2020. Mountain Tea (*Sideritis* plants): A potential anti-atherogenic agent?. *J Atherosclerosis Prev Treat.*

Toufeili, I. και συν., 2022. Nutritional and Functional Potential of Carob Syrup Versus Date and Maple Syrup. *Food Technology and Biotechnology*, 60(2), pp. 266-278.

Tzatzani, T.-T. & Ouzounidou, G., 2023. Carob as an Agrifood Chain Product of Cultural, Agricultural and Economic Importance in the Mediterranean Region. *Journal of Innovation Economics & Management*, February, Issue 42.

Vegas, C. et al., 2010. Population dynamics of acetic acid bacteria during traditional wine vinegar production. *International Journal of Food Microbiology*, 138(1-2), pp. 130-136.

Villarreal-Soto, S. A., Sandra Beaufort, J. B., Souchard, J.-P. & Taillandier, P., 2018. Understanding Kombucha Tea Fermentation: A Review. *Journal of Food Science*, 6 March, 38(3), pp. 580-588.

Wang, X. et al., 2022. Chemical Profile and Antioxidant Capacity of Kombucha Tea by the Pure Cultured Kombucha. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*.

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*.

Xiaoyuan, L. et al., 2023. Symbiosis of acetic acid bacteria and yeast isolated from black tea fungus mimicking the kombucha environment in bacterial cellulose synthesis. *international food research journal*, Issue 2.

Yatmaz, E. & Turhan, I., 2018. Carob as a carbon source for fermentation technology. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, pp. 200-208.

Yoshi, O., 2000. *CIE Fundamentals for Color Measurements*, Gaithersburg, Maryland: s.n.

Zhao, T., Li, C., Wang, S. & Song, X., 2022. *Green Tea (Camelia sinensis): A review of Its Phytochemistry, Pharmacology, and Toxicology*, s.l.: s.n.

Zou, B. et al., 2017. Evolution of the antioxidant capacity and phenolic contents of persimmon during fermentation. *Food Sci Biotechnol*, Volume 26, pp. 563-571.

Zyzelewicz, D., Kulbat-Warycha, K., Oracz, J. & Zyzelewicz, K., 2020. Polyphenols and Other Bioactive Compounds of Sideritis Plants and Their Potential Biological Activity. *Molecules*, Issue Plant Polyphenols and Gut Health.

Κατσιώτης, Σ. & Χατζοπούλου, Π., 2016. *Αρωματικά φαρμακευτικά φυτά και αιθέρια έλαια: Παραγωγή, επεξεργασία, μεταποίηση, αξιοποίηση, διεθνείς αγορές, αρωματοθεραπεία, αρωματοποιία*, Θεσσαλονίκη: Κυριακίδη.

## Πηγές Εικόνων

Εξώφυλλο 1: <https://www.pngwing.com/en/free-png-iwhln>

Εξώφυλλο 2: <https://www.pngwing.com/en/free-png-zprkr/download>

2.1.1-1: <https://www.foodmanufacturing.com/ingredients/news/22890788/brewing-better-kombucha-through-chemistry>

2.1.2-1: <https://doi.org/10.3390/antiox10101541>

2.1.3-1: <https://doi.org/10.1016/j.ijgfs.2020.100272>

2.2-1: <https://www.healthline.com/nutrition/camellia-sinensis-leaf-extract?c=1178363581362>

2.2-2: <https://doi.org/10.3390/molecules27123909>

2.3-1: <https://www.agrotypos.gr/kalliergeies/alles-kalliergeies/o-sideritis-to-elliniko-votano-me-idiaitero-exagogiko-endiaferon>

2.3-2: <https://doi.org/10.3390/molecules25163763>

2.4-1: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.05.037>

2.4-2: <https://www.votanotherapeia.gr/article/sumboules/charoypomelo-o-mayros-chrysos-tha-ginei-i-yetrofi-soy>

3.2-1,2,3,4: προσωπικό αρχείο

3.2-5: <https://www.ab.gr/el/eshop/Vasika-typopoiimena-trofima/Zachari/Leyki/Zachari-Leyki-Krystalliki-1kg/p/7473026>

3.2-6,7,8: προσωπικό αρχείο

3.2-9:

[https://www.researchgate.net/publication/343444872\\_The\\_Versatility\\_of\\_Antioxidant\\_Assays\\_in\\_Food\\_Science\\_and\\_Safety-Chemistry\\_Applications\\_Strengths\\_and\\_Limitations](https://www.researchgate.net/publication/343444872_The_Versatility_of_Antioxidant_Assays_in_Food_Science_and_Safety-Chemistry_Applications_Strengths_and_Limitations)

3.2-10,11: προσωπικό αρχείο

3.2-12: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10408398.2023.2220031#d1e132>

3.2-13,14: προσωπικό αρχείο

3.2-15: <http://www.colorimeter.com/Products/Colorimeter/NR110.html>

3.2-16: [https://coatinginstitute.org/cielab\\_color\\_space/](https://coatinginstitute.org/cielab_color_space/)

3.3-1,2,3,4: προσωπικό αρχείο

4.2-1,2,3: προσωπικό αρχείο

4.8-1: προσωπικό αρχείο