



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ

ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ

Τομέας IV: Τομέας Σύνθεσης και  
Ανάπτυξης Βιομηχανικών Διαδικασιών

Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας

Παραγωγή μικροβιακής κυτταρίνης από συμβιωτική  
καλλιέργεια Kombucha



Διπλωματική εργασία:

ΚΥΠΡΙΑΝΙΔΗ ΘΕΟΔΩΡΑ

Επιβλέπων καθηγητής:

ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ ΚΕΚΟΣ

ΑΘΗΝΑ 2020

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η συμβιωτική καλλιέργεια κομπούχα αποτελείται από ένα πλήθος βακτηρίων και ζυμών, τα οποία μέσω της ζύμωσης ζαχαρούχου μαύρου τσαγιού παράγουν ένα ελαφρώς όξινο και ανθρακούχο αφέψημα που καταναλώνεται παγκοσμίως. Η προστιθέμενη σακχαρόζη χρησιμοποιείται ως πηγή άνθρακα και καταναλώνεται παράγοντας οργανικά οξέα και ένα στρώμα κυτταρίνης που επιπλέει στην επιφάνεια του δοχείου ζύμωσης.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία μελετήθηκε η παραγωγή μικροβιακής κυτταρίνης από την συμβιωτική καλλιέργεια κομπούχα. Αρχικά μελετήθηκε η επίδραση τεσσάρων συγκεντρώσεων πηγής άνθρακα (σακχαρόζη), δηλ. 50, 75, 100, και 125 g/L στην παραγωγή μικροβιακής κυτταρίνης, σε δοχεία με ειδική επιφάνεια επαφής  $0.32 \text{ cm}^{-1}$  και υπό σταθερή θερμοκρασία  $25^{\circ}\text{C}$ . Ο συνολικός μικροβιακός πληθυσμός (δηλ. βακτήρια οξικής ζύμωσης, ζύμες και βακτήρια γαλακτικού οξέος) παρατηρείται ότι είναι μεγαλύτερος στις ζυμώσεις με συγκέντρωση σακχαρόζης 75 και 100 g/L. Το περιεχόμενο σε ολικές φαινολικές ενώσεις αυξάνεται κατά την διάρκεια της ζύμωσης με τις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις για συγκέντρωση σακχαρόζης 75 και 100 g/L. Η αντιοξειδωτική δράση αυξάνεται κατά την διάρκεια της ζύμωσης, το ποσοστό αναστολής του DPPH κυμάνθηκε από 25-35% στο τέλος της ζύμωσης. Μέγιστη απόδοση σε μικροβιακή κυτταρίνη επιτεύχθηκε για συγκέντρωση σακχαρόζης 75 g/L σε ποσοστό 25.74% την 15<sup>η</sup> ημέρα της ζύμωσης.

Μεταβολίτες που επίσης παράγονται κατά τη ζύμωση είναι γλουκουρονικό, οξικό οξύ και γλυκονικό οξύ, το οποίο έχει ποικίλες εφαρμογές στην βιομηχανία τροφίμων, φαρμακευτική βιομηχανία καθώς και στην κλωστοϋφαντουργία. Η παραγωγή του οξικού οξέος σε όλες τις περιπτώσεις κυμάνθηκε μεταξύ 3 και 4 g/L καθόλη τη διάρκεια της ζύμωσης. Αντίθετα το γλυκονικό και γλουκουρονικό οξύ παρουσίασαν αύξηση με αύξηση του χρόνου καλλιέργειας.

Στην συνέχεια μελετήθηκε η επίδραση της ειδικής επιφάνειας επαφής του δοχείου, ήτοι  $0.14$ ,  $0.32$  και  $0.43 \text{ cm}^{-1}$ , στα προϊόντα της ζύμωσης υπό σταθερή συγκέντρωση σακχαρόζης 75 g/L και σταθερή θερμοκρασία  $25^{\circ}\text{C}$ . Ο συνολικός μικροβιακός πληθυσμός αυξάνεται με την αύξηση της ειδικής επιφάνειας επαφής, λόγω καλύτερων συνθηκών αερισμού. Με την αύξηση της ειδικής επιφάνειας επαφής αυξάνεται και η συγκέντρωση των ολικών φαινολικών ενώσεων, λόγω αυξημένης

μικροβιακής και/ή ενζυμικής δραστηριότητας. Επιπλέον η αύξηση των φαινολικών ενώσεων οδηγεί και σε αύξηση της αντιοξειδωτικής δράσης όπως προσδιορίστηκε με την αναστολή του DPPH. Η αύξηση της ειδικής επιφάνειας επαφής των δοχείων οδηγεί σε αύξηση της παραχθείσας μικροβιακής κυτταρίνης. Η μέγιστη απόδοση σε μικροβιακή κυτταρίνη ανήλθε σε 33.12% (g/L ξηρής κυτταρίνης/ g/L αρχικής σακχαρόζης) όταν η ειδική επιφάνεια επαφής ήταν  $0.43 \text{ cm}^{-1}$ .

Η ανάλυση της παραχθείσας μικροβιακής κυτταρίνης με περίθλαση ακτινών-X απέδειξε ότι πρόκειται για φυσική κυτταρίνη με δείκτη κρυσταλλικότητας CrI=45.44%. Η μικροβιακή κυτταρίνη υπεβλήθη σε υδρόλυση με χρήση του κυτταρινολυτικού σκευάσματος Celic-CTec2. Το ποσοστό υδρόλυσης ανήλθε στο 74%.

## ABSTRACT

Kombucha is a symbiotic cultivation of bacteria and yeast, through fermentation of sweetened black tea a slightly acetic beverage is produced and consumed around the world. Sucrose is used as a carbon source and produces organic acids and a floating cellulose layer on the top of the liquid broth.

In this present study the production of bacterial cellulose from symbiotic cultivation Kombucha was investigated. The effect of four different concentrations of carbon source (sucrose) 50, 75, 100, and 125 g/L to the production of cellulose was initially studied, the fermentation vessels a specific interfacial area of  $0.32 \text{ cm}^{-1}$ , and temperature was stable at  $25^\circ\text{C}$ . The total microbial population (i.e. acetic acid bacteria, yeast and lactic acid bacteria) was increased in the fermentations with sucrose concentration 75 and 100 g/L. The content in total phenolic compounds is increased during fermentation, greater content was observed for sucrose concentration 75 and 100 g/L. The antioxidant activity is increased during fermentation process, the DPPH inhibition rate ranged from 25-35% at the end of the fermentation. Greater yield in bacterial cellulose was achieved for sucrose concentration 75 g/L in percentage 25.74% the 15<sup>th</sup> fermentation day.

Metabolites that also were produced during fermentation are glucuronic acid, acetic acid and gluconic acid, which has various applications in the food industry, pharmaceutical industry and textile industries. Acetic acid production in all cases varied between 3 and 4 g / L throughout the fermentation. In contrast, gluconic and glucuronic acid increased with increasing cultivation time.

The effect of the specific interfacial area of the container was then studied, i.e. 0.14, 0.32 and  $0.43 \text{ cm}^{-1}$ , to the products of the fermentation under stable sucrose concentration 75 g/L, and temperature  $25^\circ\text{C}$ . The total microbial population increases with increase of the specific interfacial area, due to better ventilation conditions. Increasing the specific interfacial area also increases the concentration of total phenolic compounds due to increased microbial and / or enzyme activity. In addition, the increase in phenolic compounds results in an increase in antioxidant activity as determined by DPPH inhibition. The increase in the specific interfacial area of the vessel leads to an

increase of the cellulose production. The greater yield came up to 33.12% (g/L dry cellulose/ g/L initial sucrose) while the specific interfacial area was  $0.43 \text{ cm}^{-1}$ .

Analysis of the produced microbial cellulose by X-ray diffraction showed that it was a natural cellulose with a CrI = 45.44% crystallinity index. The microbial cellulose is hydrolyzed using the Cellic-CTec2 cellulolytic preparation. The rate of hydrolysis was 74%.

## Contents

ΠΕΡΙΛΗΨΗ .....	2
ABSTRACT.....	4
1 ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	10
ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	10
1.1 ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ.....	12
1.2 ΩΦΕΛΙΜΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΤΗΣ ΚΟΜΠΟΥΧΑΣ.....	13
1.3 ΒΙΟΧΗΜΙΚΗ ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΗΣ ΚΟΜΠΟΥΧΑΣ.....	15
1.4 ΣΑΚΧΑΡΟΖΗ.....	18
1.5 ΚΥΤΤΑΡΙΝΗ .....	18
1.5.1 Ιδιότητες και εφαρμογές της μικροβιακής κυτταρίνης.....	24
1.6 ΟΡΓΑΝΙΚΑ ΟΞΕΑ.....	25
1.7 ΟΛΙΚΕΣ ΦΑΙΝΟΛΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ .....	27
1.8 ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΕΣ ΤΟΥ ΤΣΑΓΙΟΥ .....	27
1.9 ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΗΣ ΚΟΜΠΟΥΧΑΣ.....	28
1.9.1 Ζύμες.....	29
1.9.2 Βακτήρια.....	30
1.10 ΑΛΛΟΙ ΔΕΥΤΕΡΟΓΕΝΕΙΣ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΕΣ.....	31
1.11 ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ.....	32
1.12 ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΕΠΗΡΕΑΖΟΥΝ ΤΗΝ ΖΥΜΩΣΗ ΤΗΣ ΚΟΜΠΟΥΧΑΣ.....	33
1.11.1 Υπόστρωμα τσαγιού .....	34

1.11.2	Χρονική επίδραση.....	34
1.11.3	Επίδραση θερμοκρασίας.....	35
1.11.4	Το pH .....	35
1.13	ΡΥΘΜΟΣ ΜΕΤΑΦΟΡΑΣ ΟΞΥΓΟΝΟΥ ΚΑΙ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΚΛΙΜΑΚΩΣΗΣ.....	36
1.14	ΠΙΘΑΝΗ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ.....	39
2	ΜΕΘΟΔΟΙ ΚΑΙ ΥΛΙΚΑ .....	40
2.1	Υλικά.....	40
2.1.1	Αντιδραστήρια-Διαλύτες.....	40
2.1.2	Συσκευές και όργανα .....	40
2.2	Μέθοδοι.....	40
2.2.1	Προετοιμασία τσαγιού κομπούχα για ζύμωση.....	40
2.2.2	Μικροβιολογικές αναλύσεις .....	42
2.3.3	Προσδιορισμός ολικών αναγωγικών σακχάρων .....	44
2.2.4	Μέτρηση ολικών φαινολικών ενώσεων.....	45
2.2.5	Μέτρηση αντιοξειδωτικής δράσης-Δοκιμή DPPH .....	46
2.2.6	Καθαρισμός βακτηριακής κυτταρίνης .....	46
2.2.7	Υδρόλυση της βακτηριακής κυτταρίνης .....	47
2.2.8	Μέτρηση γλυκόζης.....	47
2.2.9	Μέτρηση σακχαρόζης .....	47
2.2.10	Χρωματογραφική ανάλυση HPLC .....	48
2.2.11	Μέτρηση κρυσταλλικότητας.....	49

3 ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΚΑΙ ΣΧΟΛΙΑΣΜΟΣ.....	51
3.1 Επίδραση από την διαφορετική συγκέντρωση της σακχαρόζης.....	51
3.1.1 Κατανάλωση υποστρώματος .....	51
3.1.2 Μεταβολή του πληθυσμού των βιώσιμων βακτηρίων και ζυμών στον ζωμό του τσαγιού κατά την διάρκεια της βακτηριακής σύνθεσης της νανοκυτταρίνης .....	54
3.1.3 pH.....	57
3.1.4 Μικροβιακή κυτταρίνη .....	58
3.1.5 Άλλα μεταβολικά προϊόντα.....	60
3.1.6 Επίδραση στις ολικές φαινολικές ενώσεις.....	62
3.1.7 Αντιοξειδωτική ικανότητα του ζυμομένου προϊόντος.....	63
3.2 Επίδραση του αερισμού .....	65
3.2.1 Κατανάλωση υποστρώματος .....	66
3.2.2 Μεταβολή του πληθυσμού των βιώσιμων βακτηρίων και ζυμών στον ζωμό του τσαγιού κατά την διάρκεια της βακτηριακής σύνθεσης της νανοκυτταρίνης .....	68
3.2.3 pH.....	70
3.2.4 Μικροβιακή κυτταρίνη .....	72
3.2.5 Επίδραση στις ολικές φαινολικές ενώσεις.....	74
3.2.6 Επίδραση στην αντιοξειδωτική δράση .....	75
3.3 Μικροβιακή κυτταρίνη .....	77
3.3.1 Υδρόλυση της μικροβιακής κυτταρίνης από το κυτταρινολυτικό σκεύασμα Celic-CTec2 .....	77



3.3.2 Ανάλυση μικροβιακής κυτταρίνης με συσκευή περίθλασης ακτινών-X (XRD) .....	78
4 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ .....	79
5 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....	81

# 1 ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η ζύμωση είναι μια από τις πιο παλιές μεθόδους διατήρησης τροφίμων. Είναι επίσης ένα σύστημα χαμηλού κόστους και ενεργειακής κατανάλωσης, το οποίο ουσιαστικά διασφαλίζει την ποιότητα και τον χρόνο ζωής του τροφίμου. Πολλές βιοχημικές μεταβολές λαμβάνουν μέρος κατά την ζύμωση και ίσως επηρεάζουν τις θρεπτικές ενώσεις και κατά συνέπεια τις ιδιότητες του τελικού προϊόντος, όπως η βιοδραστικότητα και η πεπτικότητα. Προσφάτως, αυτή η βιοδιεργασία έχει εφαρμοστεί για την παραγωγή και την εξαγωγή βιοενεργών ενώσεων από φυτά στις βιομηχανίες φαγητών και ποτών (Villareal-soto et. al. 2018).

Το τσάι κομπούχα είναι ένα δημοφιλές ποτό ανάμεσα σε πολλά παραδοσιακά ζυμωμένα τρόφιμα σε όλο τον κόσμο, συχνά καλείται "μύκητας τσαγιού" (tea fungus) στην βιβλιογραφία, παρόλα αυτά δεν υπάρχει στην πραγματικότητα μύκητας που να εμπλέκεται στην ζύμωση (Sreeramulu et. al., 2000). Είναι ένα ελαφρώς γλυκό, και ελαφρώς όξινο αναζωογονητικό ποτό που καταναλώνεται παγκοσμίως, η γεύση του μοιάζει με του ανθρακούχου μηλίτη, και αποτελείται από δύο τμήματα ένα κυμαινόμενο στρώμα κυτταρίνης και τον ξινό ζωμό (Malbasa et. al., 2014). Παραλαμβάνεται από την έγχυση φύλλων μαύρου τσαγιού και την μετέπειτα ζύμωση μιας συμβιωτικής καλλιέργειας με βακτήρια και ζύμες σε ζαχαρούχο τσάι, δημιουργώντας το "μύκητας τσαγιού" (Malbasa et. al., 2014). Παρ'οτι πράσινο τσάι μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την προετοιμασία του τσαγιού κομπούχα, το μαύρο τσάι και η άσπρη ζάχαρη θεωρούνται τα καλύτερα υποστρώματα (Malbasa et. al., 2014). Η ακριβής μικροβιακή σύνθεση της και τα αυτόχθονα χαρακτηριστικά προσδιορίζονται από τις γεωγραφικές και κλιματικές συνθήκες της καλλιέργειας, καθώς και από τα τοπικά είδη των ζυμών και των βακτηρίων (Cvetkovic et. al., 2007). Η διάρκεια της ζύμωσης ποικίλει από έρευνα σε έρευνα από 7 έως και 20 ημέρες. Το τσάι κομπούχα θεωρείται ως το απόλυτο υγιεινό ποτό και θεραπευτικός παράγοντας σε αμέτρητες ασθένειες όπως ρευματισμός, εντερικές διαταραχές και καρκίνος. Επιπροσθέτως η κομπούχα παράγει το μικροβιακό βιοφιλμ ως ένα εν δυνάμει βιολογικό υλικό για διάφορες εφαρμογές σε πολλά πεδία. Η ζύμωση με το τσάι μύκητα μετατρέπει την προστιθέμενη ζάχαρη σε οργανικά οξέα και αιθανόλη. Το τσάι μύκητας χρησιμοποιεί την ζάχαρη ως πηγή άνθρακα και δημιουργεί μια νέα

ζελατινοειδή μεμβράνη κατά την διάρκεια της ζύμωσης. Μόνο ένα μέρος της καινούριας μεμβράνης που δημιουργήθηκε χρησιμοποιείται για νέα ζύμωση και αυτό που μένει πετιέται σαν απόβλητο (Jayabalan et. al.,2010) .

Η ακριβής μικροβιολογική σύνθεση εξαρτάται επίσης από την προέλευση του εμβολίου για την ζύμωση του τσαγιού. Τα μοντέλα ανάπτυξης για αυτούς τους μικροοργανισμούς κατά την διαδικασία της ζύμωσης του τσαγιού κομπούχα δεν είναι καλά τεκμηριωμένα. Κατά την διάρκεια της ζύμωσης, το pH μειώνεται δραστικά εξαιτίας της παραγωγής οργανικών οξέων από την προστιθέμενη ζάχαρη που προκαλείται από τον μεταβολισμό των βακτηρίων και των ζυμών. Οι πολυφαινόλες του τσαγιού υφίστανται υποβάθμιση ή μετασχηματισμό από τα ένζυμα των βακτηρίων και των ζυμών, το οποίο είναι εμφανές από την αλλαγή του χρώματος του μαύρου τσαγιού κατά την διάρκεια της ζύμωσης. Διάφορα ένζυμα έχουν αναφερθεί ότι είναι ενεργά στην Κομπούχα. Το τσάι μύκητας είναι ουσιαστικά ένα σύμπλεγμα κυτταρίνης όπου τα κύτταρα των βακτηρίων και των ζυμών είναι συνδεδεμένα και τελικά εμφανίζεται ως μια ζελοειδής μεμβράνη. Το πάχος αυτής της μεμβράνης δημιουργείται από την απόθεση κυτταρίνης στρώμα με στρώμα κατά την διάρκεια της ζύμωσης (Jayabalan et. al., 2015). Η γλυκόζη που απελευθερώνεται από την σακχαρόζη μεταβολίζεται για την σύνθεση της βακτηρικής κυτταρίνης και του γλυκονικού οξέος από ακετοβακτηρίδια. Η φρουκτόζη μεταβολίζεται σε αιθανόλη και διοξείδιο του άνθρακα από τις ζύμες. Η αιθανόλη οξειδώνεται σε οξικό οξύ από τα ακετοβακτηρίδια. Τα οργανικά οξέα που παράγονται κατά την διάρκεια της ζύμωσης προστατεύουν την συμβιωτική καλλιέργεια από μολύνσεις με ανεπιθύμητους μικροοργανισμούς που δεν είναι μέρος του τσαγιού μύκητα. Μια βέλτιστη χρονική διάρκεια της ζύμωσης είναι απαιτούμενη για την παραγωγή ενός πόσιμου ποτού. Μεγαλύτερη διάρκεια ζύμωσης έχει συχνά ως αποτέλεσμα την παραγωγή οξέων σε υψηλά επίπεδα που μπορεί να δημιουργήσει κινδύνους άμα καταναλωθεί. Μια πρόσφατη μελέτη πάνω σε αυτό το ποτό έδειξε ότι η αντιμικροβιακή του ιδιότητα εναντίων παθογόνων μικροοργανισμών είναι ευρέως αποδοτέα στο οξικό οξύ. Το οξικό οξύ είναι γνωστό ότι αναστέλλει και καταστρέφει έναν αριθμό από Gram-θετικούς και Gram-αρνητικούς μικροοργανισμούς. Πολλαπλές αναφορές από εκχυλίσματα από μη ζυμωμένα τσάγια καθώς και οι καθαρές τανίνες προτείνουν ότι έχει δυναμική αντιβιοτική δράση εναντίων ενός αριθμού από παθογόνους μικροοργανισμούς. Οι φυσικές αλλαγές που συμβαίνουν κατά την διαδικασία της

ζύμωσης του τσαγιού κομπούχα και η πιθανή συσχέτιση αυτών των αλλαγών με τις θεραπευτικές και αντιμικροβιακές ιδιότητες δεν είναι ακόμα καθαρή και υπάρχει ανάγκη για περαιτέρω συστηματική έρευνα (Sreeramulu et. al., 2000).

Η ανακύκλωση των αποβλήτων της μεμβράνης του τσαγιού μύκητα είναι ένα από τα σημαντικότερα μέσα αξιοποίησης του. Η βιομάζα αποβλήτων που λαμβάνεται από την ζύμωση της κομπούχας είναι πλούσια σε ίνες, οι οποίες περιέχουν κυτταρίνη και ημικυτταρίνη με καλή ποιότητα πρωτεΐνης. Τα χαρακτηριστικά του τσαγιού μύκητα είναι βασισμένα στον χρόνο της ζύμωσης. Μέχρι σήμερα δεν υπάρχει μελέτη που να αποκαλύπτει την επίδραση του χρόνου της ζύμωσης στα βιοχημικά συστατικά της μεμβράνης του τσαγιού μύκητα. Καθώς είναι αρκετά πολύτιμο να καταλάβουμε την επίδραση του χρόνου της ζύμωσης στα βιοχημικά συστατικά του τσαγιού μύκητα που συλλέγονται κατά την διάρκεια της ζύμωσης (Jayabalan et. al.,2010).

## 1.1 ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ

Το όνομα κομπούχα είναι μια διεθνώς χρησιμοποιούμενη γερμανοποιημένη εκδοχή από το ιαπωνικό όνομα για αυτό το ελαφρώς ζυμωμένο παρασκεύασμα από τσάι. Πρώτα χρησιμοποιήθηκε στην ανατολική Ασία για τα θεραπευτικά οφέλη του. Το τσάι κομπούχα προέρχεται από την βορειοανατολική Κίνα ( Μαντζουρία (Manchuria)) όπου έχει χρονολογηθεί κατά την διάρκεια της δυναστείας των Τσιν γύρω στο 220 π.Χ., για τις αποτοξινωτικές και ενεργειακές του ιδιότητες. Το 414 μ.Χ., ο γιατρός Κομπού (Kombu) έφερε το "τσάι μύκητα" στην Ιαπωνία και το χρησιμοποιούσε για να θεραπεύει τα πεπτικά προβλήματα του αυτοκράτορα Ινκίο (Inkyo). Καθώς οι εμπορικές οδοί επεκτάθηκαν, το τσάι κομπούχα ( πρώην εμπορική ονομασία "Mo-Gu") βρήκε την πρώτη του οδό για τη Ρωσία (μερικά από τα ονόματα που του δόθηκαν Cainiigrig, Cainii kvass, Japonskigrib, Kambucha, Jsakvasska) και στην συνέχεια σε άλλες ανατολικές περιοχές της Ευρώπης, εμφανιζόμενο στην Γερμανία (ως Heldenpilz, Kombuchaschwamm) γύρω στις αρχές του 20ού αιώνα. Κατά την διάρκεια του Δευτέρου Παγκοσμίου Πολέμου, αυτό το ποτό επανήλθε στην Γερμανία και κατά την διάρκεια της δεκαετίας του 1950 έφτασε και στην Γαλλία καθώς και στις περιοχές της Βορείου Αφρικής όπου κυριαρχούσε η Γαλλία, και όπου η κατανάλωση του έγινε αρκετά δημοφιλής. Η συνήθεια της κατανάλωσης ζυμωμένου τσαγιού έγινε αποδεκτή σε όλη την Ευρώπη μέχρι τον δεύτερο παγκόσμιο πόλεμο, γεγονός το οποίο έφερε εκτεταμένες ελλείψεις στα απαιτούμενα φύλλα τσαγιού και στην απαιτούμενη ζάχαρη. Στα μεταπολεμικά χρόνια, το πάθος της ιταλικής

κοινωνίας για αυτό το ποτό (που το ονόμαζαν "Funkochinese") κορυφώθηκε την δεκαετία του 1950. Την επόμενη δεκαετία επιστημονικοί ερευνητές στην Ελβετία ανέφεραν ότι το να πίνεις τσάι κομπούχα είχε παρόμοια ωφέλιμη τηνκατανάλωση γιουρτιού, και η δημοσιότητα του ποτού αυξήθηκε. Σήμερα το τσάι κομπούχα πωλείται παγκοσμίως σε καταστήματα λιανικής πώλησης τροφίμων και η καλλιέργεια κομπούχα πωλείται σε διάφορα διαδικτυακά καταστήματα (Malbasa et. al., 2014).

## 1.2 ΩΦΕΛΙΜΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΤΗΣ ΚΟΜΠΟΥΧΑΣ

Το τσάι καλλιεργείται σε περίπου 30 χώρες και είναι το πιο ευρέως καταναλώσιμο ποτό στον κόσμο, μετά το νερό. Το τσάι παράγεται ως πράσινο, μαύρο και οolong, ενώ το μαύρο τσάι αντιπροσωπεύει περίπου το 80% των προϊόντων τσαγιού. Επιδημιολογικές έρευνες προτείνουν ότι η κατανάλωση τσαγιού έχει προστατευτικές ιδιότητες απέναντι στον καρκίνο στους ανθρώπους. Οι πολυφαινολικές ενώσεις (κατεχίνες) που υπάρχουν στο τσάι είναι ικανές να παρέχουν προστασία έναντι του καρκίνου. (-)-Epicatechin (EC), (-)-epicatechin-3- gallate (ECG), (-)-epigallocatechin (EGC), (-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG) είναι τα 4 πιο σημαντικά πολυφαινολικά παράγωγα που υπάρχουν στο πράσινο τσάι. Η θειοφλαβίνη και οι καρβιμίνες είναι πολυφαινολικά παράγωγα που υπάρχουν στο μαύρο τσάι (R.Jayabalan et. al., 2007). Οι προστατευτικές ιδιότητες των πολυφαινολικών παραγώγων του τσαγιού ενάντια σε διάφορους τύπους καρκίνων έχουν εξεταστεί από διάφορους συγγραφείς (Stoner & Mukhtar, 1995; Yang, Maliakal, & Meng, 2002; Yang, Prabhu, & Landau, 2001; Yang & Wang, 1993). Το ζυμωμένο τσάι έχει επίσης βρεθεί ότι περιέχει σημαντικά επίπεδα από κατεχίνες και φλαβονοειδή. Στο πλαίσιο των τροφίμων με ελάχιστη μεταποίηση και υψηλή διατροφική αξία, η κομπούχα έχει προσφάτως κινήσει το ενδιαφέρον των ερευνητών και των καταναλωτών λόγω των προβιοτικών χαρακτηριστικών της (Villareal-soto et. al. 2018). Οι κατεχίνες είναι μια από τις λίγες ομάδες των φλαβονοειδών ενώσεων που κατέχουν σημαντικό βαθμό βιοδιαθεσιμότητας (Jayabalan et. al., 2007).

Το ποτό αυτό έχει αναφερθεί ως προφυλακτικός παράγοντας και ωφέλιμο για την ανθρώπινη υγεία, αλλά μένει ακόμα να αποδειχθεί. Το 1951, μια σημαντική δημογραφική μελέτη που διεξήχθη στη Ρωσία από το " Central Oncological Research Unit" και από την " Russian Academy of Science in Moscow" βρήκε ότι η καθημερινή κατανάλωση κομπούχας σχετίζεται με μια εξαιρετικά υψηλή αντίσταση στον καρκίνο. Τα οφέλη του τσαγιού κομπούχα αποδίδονται στην παρουσία των πολυφαινολών του τσαγιού, του γλυκονικού οξέος, του γαλακτικού οξέος, των βιταμινών, των αμινοξέων, των αντιβιοτικών, και σε μια ποικιλία από μικροθρεπτικά συστατικά που παράγονται

κατά την διαδικασία της ζύμωσης. Η Αμερικανική Υπηρεσία Τροφίμων και Φαρμάκων (US Food and Drug Administration) αξιολόγησε τις πρακτικές πολλών εμπορικών παραγωγών του τσαγιού κομπούχα και δεν βρήκε παθογόνους οργανισμούς ή άλλες παραβάσεις της υγιεινής. Πρόσφατες μελέτες αναφέρουν ότι η κομπούχα εμποδίζει την ηπατοτοξικότητα που προκαλείται από την παρακεταμόλη και το επαγόμενο από χρωμικό (VI) οξειδωτικό στρες σε αρουραίους αλμπίνο (Jayabalan et. al., 2007).

Η κομπούχα θεωρείται ότι έχει διάφορες ωφέλιμες ιδιότητες για την ανθρώπινη υγεία από τους καταναλωτές της ανά τον κόσμο. Εκτός από λίγα, τα αναφερόμενα οφέλη στην ανθρώπινη υγεία πρέπει ακόμα να μελετηθεί επιστημονικά. Οι αναφερόμενες ιδιότητες της κομπούχας από τις μαρτυρίες των καταναλωτών της και από Ρώσους ερευνητές είναι οι εξής :

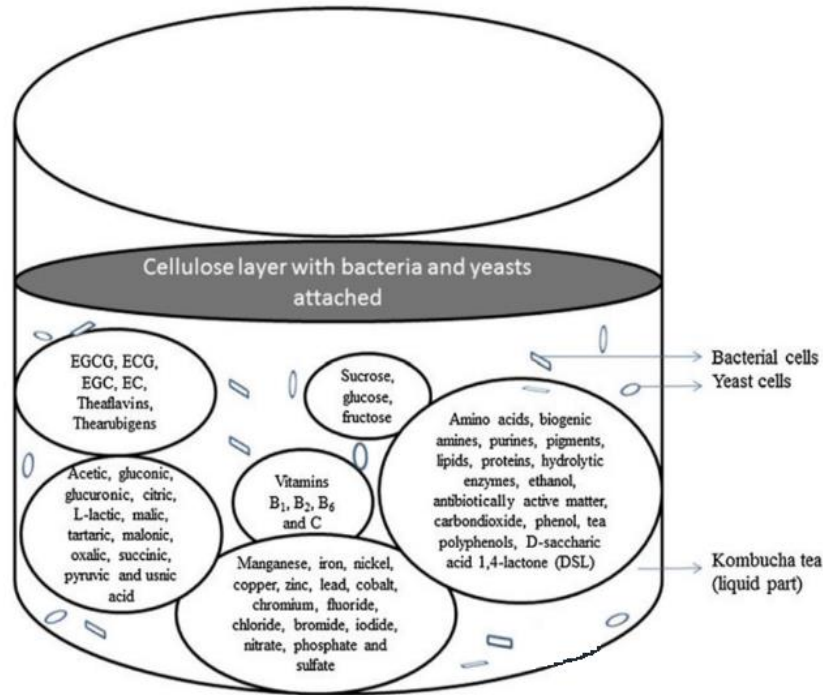
- Αποτοξίνωση του αίματος
- Μείωση της χοληστερόλης
- Μείωση την αθηροσκλήρωσης με αναγέννηση του κυτταρικού τοιχώματος
- Μείωση της αρτηριακής πίεσης
- Μείωση των φλεγμονωδών προβλημάτων
- Ανακουφίζει από τα συμπτώματα της αρθρίτιδας, του ρευματισμού και της ουρικής αρθρίτιδας
- Προάγει την ηπατική λειτουργία
- Κανονικοποιεί την εντερική λειτουργία, ρυθμίζει την εντερική χλωρίδα, και θεραπεύει τις αιμορροΐδες
- Μειώνει την παχυσαρκία και ρυθμίζει την όρεξη
- Αποτρέπει/θεραπεύει την μόλυνση της ουροδόχου κύστης και μειώνει την ασβεστοποίηση των νεφρών
- Τονώνει τα αδενικά συστήματα
- Προστατεύει από τον διαβήτη
- Αυξάνει την ανθεκτικότητα του οργανισμού στον καρκίνο
- Έχει αντιβιοτικές ιδιότητες ενάντια σε βακτήρια, ιούς και ζύμες
- Ενισχύει το ανοσοποιητικό σύστημα και ρυθμίζει την παραγωγή ιντερφερόνης
- Ανακουφίζει από την βρογχίτιδα και το άσθμα

- Μειώνει τα εμμηνορρυσιακά προβλήματα και τις εξάψεις της εμμηνόπαυσης
- Βελτιώνει την υγεία των μαλλιών, των νυχιών, και του δέρματος
- Μειώνει την επιθυμία για αλκοόλ σε ένα αλκοολικό
- Μειώνει το στρές, τις νευρικές διαταραχές και την αϋπνία
- Ανακουφίζει από πονοκεφάλους
- Βελτιώνει την όραση
- Αντισταθμίζει στην γήρανση
- Ενισχύει τον γενικό μεταβολισμό (Jayabalan et. al., 2015).

### 1.3 ΒΙΟΧΗΜΙΚΗ ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΗΣ ΚΟΜΠΟΥΧΑΣ

Διάφορες επιστημονικές έρευνες που έχουν δημοσιευθεί τα τελευταία 15 χρόνια αναφέρουν την παρουσία διαφόρων μεταβολιτών στην Κομπούχα. Η σύνθεση της κομπούχας, η οποία είναι γνωστή σήμερα, δίνεται στην Εικόνα 1.

Η βιοχημική σύνθεση του τσαγιού μύκητα και της κομπούχας δεν ήταν παρόμοιες σε όλες τις αναφορές. Αυτό ίσως είναι λόγω του γεγονότος ότι η μικροβιακή σύνθεση του τσαγιού μύκητα διαφέρει από περιοχή σε περιοχή και από χώρα σε χώρα. Ως εκ τούτου, οι μεταβολίτες που παράγονται από τα βακτήρια και τις ζύμες επίσης διαφέρουν, το οποίο αντανακλά στην χημική σύσταση της κομπούχας. Η διαφορές στην σύνθεση ίσως οφείλονται επίσης στις διαφορές της ποσότητας της ζάχαρης και του τσαγιού που χρησιμοποιείται ως υπόστρωμα, στις διαφορές της ποσότητας του τσαγιού μύκητα και της κομπούχας που χρησιμοποιούνται ως εμβόλιο και στις διαφορές στην διάρκεια της ζύμωσης.



Εικόνα 1: Βιοχημική σύνθεση της κομπούχας (Jayabalan et. al., 2015)

Παρόλα αυτά, ομοιόμορφες τάσεις στις αλλαγές σε κάποιες ιδιότητες έχουν συζητηθεί από τους περισσότερους ερευνητές. Για παράδειγμα, η μείωση του pH, η αύξηση στο περιεχόμενο από οργανικά οξέα, και η αρχική αύξηση και η διακοπτόμενη μείωση της συγκέντρωσης των κυττάρων των βακτηρίων και των ζυμών στο ζυμό του τσαγιού έχει παρατηρηθεί από πολλούς ερευνητές ανά τον κόσμο ανεξάρτητα από τις διαφορές που αναφέρθηκαν προηγουμένως. Μερικές αναφορές επίσης εμφανίζουν μια τάση αύξηση της αντιοξειδωτικής δράσης κατά την διάρκεια της ζύμωσης. Παίρνοντας υπόψιν το περιεχόμενο των βιομορίων που υπάρχουν στην κομπούχα, μια διακοπτόμενη αύξηση ή μείωση κατά την διάρκεια της ζύμωσης έχει παρατηρηθεί για τις περισσότερες ενώσεις που μελετήθηκαν. Ο Πίνακας 1 καταγράφει τις συγκεντρώσεις των μεταβολιτών που μετρήθηκαν στην κομπούχα (Jayabalan et. al., 2015).

Αναλυτική γνώση για την σύνθεση και τις ιδιότητες της κομπούχας είναι απαραίτητη για την καλύτερη κατανόηση της κινητικής της. Ωστόσο η σύνθεση και η συγκέντρωση των μεταβολιτών εξαρτώνται από την πηγή του εμβολίου, την ζάχαρη και την συγκέντρωση του τσαγιού, τον χρόνο της ζύμωσης, και την θερμοκρασία της ζύμωσης. Οποιαδήποτε αλλαγή στις συνθήκες της ζύμωσης πιθανώς να επηρεάσει το τελικό προϊόν. Η τελική συγκέντρωση ζάχαρης (υπολειπόμενη σακχαρόζη) μπορεί να διαφέρει από μια ζύμωση στην άλλη, το οποίο παραπέμπει στο ότι το μεταβολικό



μονοπάτι δεν ακολουθεί πάντα τον ίδιο δρόμο. Όσο αφορά την παραγωγή οργανικών οξέων, Jayabalan et al.(2007) παρατήρησε αυξανόμενη παραγωγή οξικού οξέος κατά την διάρκεια της ζύμωσης μέχρι το μέγιστο των 9.5 g/L μετά από 15 ημέρες.

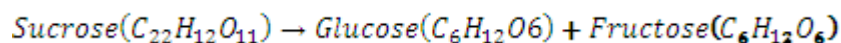
Πίνακας 1: Κύρια συστατικά στο τσάι κομπούχα στο τέλος της ζύμωσης (Jayabalan et. al., 2015)

Στοιχείο	Συγκέντρωση (g/L)	Αρχική σακχαρόζη (%)	Μαύρο τσάι (g/L)	Θερμοκρασία ζύμωσης (°C)	Διάρκεια ζύμωσης (ημέρες)
<b>Οξικό οξύ</b>	8	10	3	24±3	60
	4.69	10	12	24±3	18
<b>Γλυκουρονικό οξύ</b>	0.0031	5	1.5	28	21
	0.0026	7	1.5	28	21
	0.0034	10	1.5	28	21
	1.71	10	12	24±3	18
<b>Γλυκονικό οξύ</b>	39	10	3	24±3	60
<b>Γλυκόζη</b>	179.5	7	1.5	28	21
	24.59	7	1.5	28	21
	12	10	3	24±3	60
<b>Φρουκτόζη</b>	76.9	7	1.5	28	21
	5.4	7	1.5	28	21
	55	10	3	24±3	60
<b>Υπολλειπόμενη σακχαρόζη</b>	192.8	7	1.5	28	21
	11	10	3	24±3	60
	2.09	7	1.5	28	21

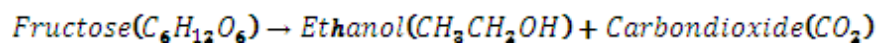
Στην περίπτωση του D-γλυκουρονικού οξέος, η μεγαλύτερη συγκέντρωση ήταν 2.3 g/L στην 12η ημέρα και σε μικρότερη ποσότητα 0.54 g/L οξικού οξέος εντοπίστηκαν την 3η ημέρα. Όσο για την παρουσία ανιόντων, παραμένουν σε χαμηλές τιμές , μεταξύ 0.04 και 3.20 mg/g με μεγαλύτερη παρουσία ανιόντων F- και CL-. Η χημική σύνθεση καθώς και η συγκέντρωση του κάθε μεταβολίτη που παράγεται στην κομπούχα πάντα θα εξαρτάται από το εμβόλιο, την αρχική συγκέντρωση της ζάχαρης και τις υπόλοιπες παράμετροι που αναφέρονται. Ωστόσο, ανάμεσα στα κύρια συστατικά της κομπούχας, το γλυκουρονικό οξύ θεωρείται από τους κύριους θεραπευτικούς παράγοντες (Villareal-soto et. al. 2018).

## 1.4 ΣΑΚΧΑΡΟΖΗ

Οι καταναλωτές κομπούχας χρησιμοποιούν κυρίως κοινή ζάχαρη (σακχαρόζη) για την προετοιμασία και ως εκ τούτου και για την επιστημονική ανάλυση. Ένα μόριο α-D-glucose και β-D-fructose συνδεδεμένα με ένα α-1,4-γλυκοσιδικό δεσμό σχηματίζουν ένα μόριο του δισακχαρίτη σακχαρόζη. Η υδρόλυση ενός α-1,4-γλυκοσιδικού δεσμού ελευθερώνει ισομοριακό μίγμα γλυκόζης και φρουκτόζης. Κατά την διάρκεια της ζύμωσης της κομπούχας, τα κύτταρα των ζυμών από το αρχικό εμβόλιο υδρολύουν την σακχαρόζη σε γλυκόζη και φρουκτόζη παράγοντας ιμβερτάση ή ένζυμο σακχαρόζης (β-fructofuranosidase). Εξαιτίας του μεγάλου εύρους σε όξινο pH (3.5-5.5), η ενεργότητα της ιμβερτάσης δεν παρεμποδίζεται από τα οξέα που παράγονται κατά την ζύμωση, και ως αποτέλεσμα η προστιθέμενη ζάχαρη υδρολύεται συνεχώς σε γλυκόζη και φρουκτόζη.



Τα κύτταρα των ζυμών καταναλώνουν την περισσότερη από την φρουκτόζη που απελευθερώνεται, από την δράση της ιμβερτάσης, μέσω της γλυκόλυσης και την μετατρέπουν σε αιθανόλη και διοξείδιο του άνθρακα. Η παραγόμενη αιθανόλη οξειδώνεται ταχέως σε οξικό οξύ από τα βακτήρια του οξικού οξέος που υπάρχουν στην συμβιωτική καλλιέργεια. Το οξικό οξύ είναι το επικρατέστερο οργανικό οξύ που παράγεται κατά την ζύμωση και ο κύριος λόγος για την μείωση του pH. Τα βακτήρια του οξικού οξέος επίσης οξειδώνουν την γλυκόζη σε γλυκονικό οξύ (Jayabalan et. al., 2015).



## 1.5 ΚΥΤΤΑΡΙΝΗ

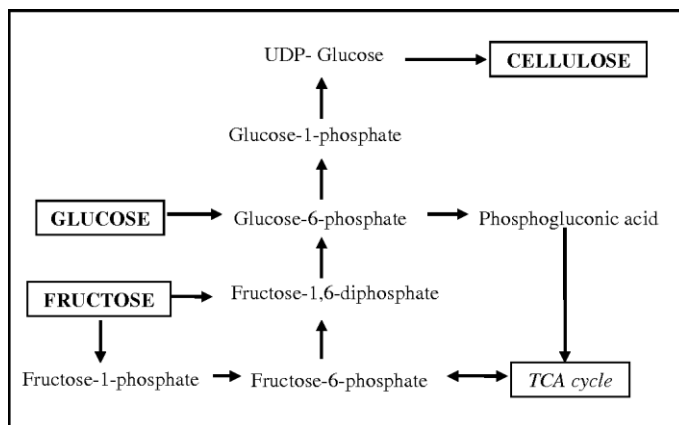
Η κυτταρίνη είναι ένα εκτενώς ερευνημένο βιολογικό από την ανακάλυψη της το 1838 από τον Anselme Payen, ο οποίος καθόρισε την στοιχειώδη σύνθεση του σε δρυ, οξιά, λεύκα, και την περιέγραψε ως ένα ινώδες στοιχείο αδιάλυτο σε διαλύτες και ακόμη και σε αλκαλικά διαλύματα, είναι ένας ομοπολυσακχαρίτης σχηματισμένος από μονομερή β-D-glucose συνδεδεμένα από ένα β-1,4-γλυκοσιδικό δεσμό μεταξύ τους. Η κυτταρίνη περιέχει μακριές, γραμμικές ομοπολυμερικές αλυσίδες από 100 έως 20.000 μονάδες D-γλυκόζης, στις οποίες το επαναλαμβανόμενο τμήμα, που

ονομάζεται κελοβιόζη, είναι ένα διμερές από δυο β-1,4-συνδεδεμένα άνυδρα μονομερή D-γλυκόζης, με κάθε μονομερές γυρισμένο 180ο προς το γειτονικό του. Τα γειτονικά μονομερή κυτταρίνης είναι ομοιοπολικά συνδεδεμένα μέσω δεσμού ακετάλης μεταξύ του άνθρακα C1 και του άνθρακα C4 του γλυκοπυρανοσικού δακτυλίου, και δύο διαμοριακούς δεσμούς υδρογόνου που σταθεροποιούν το σχήμα ρόμβων των αλυσίδων μεταξύ των υδροξυλίων των ανθράκων C3 και C6 του μονομερούς της γλυκόζης με το οξυγόνο του δακτυλίου και με το υδροξύλιο στον άνθρακα C2 του γειτονικού μονομερούς. Κατά την διάρκεια της βιοσύνθεσης της κυτταρίνης, κάθε πολυμερική αλυσίδα έχει ένα αναγωγικό άκρο το οποίο σταθεροποιείται ως κυκλική ημιακετάλη, και ένα μη αναγωγικό άκρο το οποίο αποδείχθηκε ότι είναι το μέρος που πραγματοποιείται η ανάπτυξη της αλυσίδα από την σύνθεση της κυτταρίνης που λαμβάνει μέρος. Αυτές οι μακρομοριακές αλυσίδες περαιτέρω συνδεδεμένες- σε ομάδες των 36 αλυσίδων μετά από ένα προτεινόμενο μοντέλο ή σε ομάδες 24 αλυσίδων σε ένα δεύτερο προτεινόμενο μοντέλο- με διαμοριακούς δεσμούς υδρογόνου και ενδιάμεσες αλληλεπιδράσεις van der Waals μεταξύ των γλυκοπυρανοσικών δακτυλίων και δημιουργούν ένα πρωτοινίδιο, στην συνέχεια μια ομάδα πρωτοινιδίων γίνεται νανοινίδιο. Εκατοντάδες νανοινίδια συναρμολογούνται περαιτέρω σε μικροινίδια που δημιουργούν το ανθεκτικό τρισδιάστατο βιοφίλμ που επιπλέει στην επιφάνεια του ζωμού. Αυτό το κυτταρινικό βιοφίλμ αντιπροσωπεύει μια εξαιρετικά προσαρμοστική μικροβιακή μακροαποικία με ένα προστατευτικό ρόλο για την κοινότητα του από προκαρυώτες ή ευκαρυώτες, ιδιαίτερα ανθεκτικό ακόμα και σε σκληρές συνθήκες όπως οι συνθήκες κενού, οι διακυμάνσεις της θερμοκρασίας και η υψηλή ακτινοβολία UV (Dima et. al., 2017).

Παρόλο που η κυτταρίνη είναι το πιο άφθονο βιοπολυμερές στην γη, είναι μια δύσκολη διαδικασία η παραλαβή κυτταρίνης από σύνθετες φυτικές μήτρες στις οποίες η κυτταρίνη συμμετέχει στην δημιουργία ενός σκληρού, παρεμβαλλόμενου δικτύου μαζί με άλλα βιοπολυμερή όπως η λιγνίνη, πηκτίνη, και η ημικυτταρίνη. Ισχυρά οξέα, βάσεις ή ιδιαίτεροι διαλύτες χρειάζονται για να σπάσει αυτή η σύνθετη φυτική μήτρα, το οποίο κάνει αυτές τις μεθόδους ακατάλληλες από περιβαλλοντική και οικονομική σκοπιά. Μια εναλλακτική για την παραγωγή κυτταρίνης από βιομάζα είναι η παραγωγή κυτταρίνης μέσω των μικροβιακών διεργασιών, η παραγόμενη κυτταρίνη είναι επίσης γνωστή ως μικροβιακή κυτταρίνη (bacterial nanocellulose BNC). Τα πλεονεκτήματα της μικροβιακής κυτταρίνης είναι η υψηλή καθαρότητα σε κυτταρίνη συγκρίνοντας με αυτή από φυτικές πηγές, υψηλότερη ευκαμψία, υψηλότερη υδροφιλικότητα, και ιδιότητες απελευθέρωσης φαρμακευτικού φορτίου. Τα μειονεκτήματα είναι ο μεγάλος χρόνος παραγωγής (21 ημέρες), η ανάγκη για στείρες

συνθήκες για την ανάπτυξη συγκεκριμένων βακτηρίων, και συνθήκες αντίδρασης για βιοσύνθεση (Dima et. al., 2017).

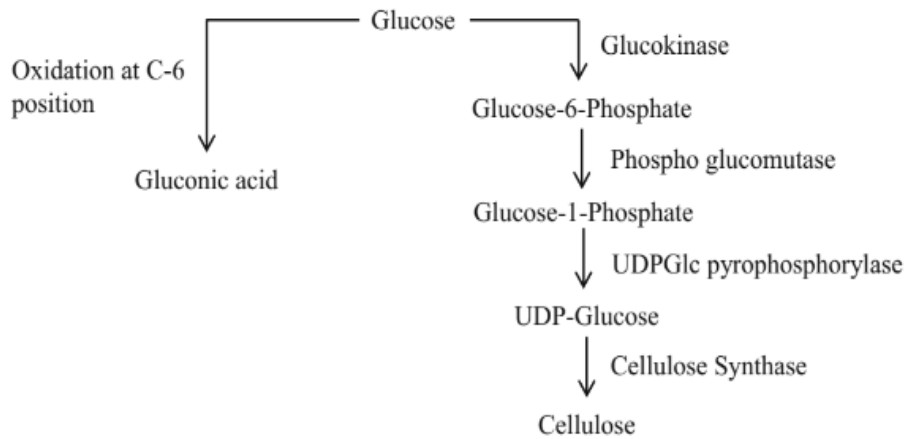
Η μικροβιακή κυτταρίνη είναι το επικρατέστερο υλικό που βρίσκεται στο τσάι μύκητα και παράγεται από αερόβια βακτήρια οξικού οξέος που βρίσκονται στην συμβιωτική καλλιέργεια. Τα βακτήρια του οξικού οξέος που βρίσκονται στην διεπιφάνεια υγρού και αέρα του δοχείου που χρησιμοποιείται για την παραγωγή κομπούχας παράγουν το κυτταρινικό βιοφίλμ σε άμεση επαφή με το οξυγόνο για να προστατευτούν από τις υψηλού επιπέδου στρες συνθήκες ανάπτυξης λόγω της παρουσίας υψηλής συγκέντρωσης σε οξικό οξύ ή αιθανόλη. Η παραγωγή του βιοφίλμ από τα βακτήρια του οξικού οξέος έχει αναφερθεί ότι γίνεται μέσω της επικοινωνίας κυττάρου-κυττάρου και μέσω σηματοδότησεως αθροιστικής ευαισθησίας. Η σύνθεση της κυτταρίνης εμπεριέχει την σύνθεση της ουριδινό-διφωσφογλυκόζης (UDPGlc) από την UDPGlc-πυροφωσφορυλάση που αργότερα πολυμερίζεται σε μεγάλες και χωρίς διακλαδώσεις αλυσίδες μέσω των β-1,4-γλυκοσιδικών δεσμών από το ένζυμο σύνθεσης κυτταρίνης, και η οποία είναι η πρόδρομος ένωση της κυτταρίνης, στην συνέχεια κάθε κύτταρο του *Acetobacter* πολυμερίζει μέχρι 200.000 υπολείμματα γλυκόζης το δευτερόλεπτο σε αλυσίδες β-1,4-γλυκάνης (Villareal-soto et. al. 2018) . Ωστόσο η μετατροπή της γλυκόζης σε UDPGlc απαιτεί δύο ακόμη πρόσθετα στάδια στα οποία μετατρέπονται τα μόρια γλυκόζης σε glucose-6-phosphate από την κινάση της γλυκόζης και στην συνέχεια σε glucose-1-phosphate από την φωσφογλυκομουτάση (Εικόνα 3). Είναι επίσης πιθανό να παράγεται κυτταρίνη μέσω της φρουκτόζης από τη μετατροπή σε glucose-6-phosphate μέσω επιτυχημένων δράσεων της κινάσης της φρουκτόζης και των ενζύμων ισομεραση της φωσφογλυκόζης (Εικόνα 2). Αλλά ίσως η φρουκτόζη να μην είναι διαθέσιμη στα βακτήρια οξικού οξέος εξαιτίας της δράσης των κυττάρων των ζυμών.



Εικόνα 2: Δημιουργία κυτταρίνης από γλυκόζη και φρουκτόζη

Μόνο ένα μέρος της γλυκόζης είναι διαθέσιμο για την σύνθεση της μικροβιακής κυτταρίνης καθώς η γλυκόζη επίσης οξειδώνεται σε γλυκονικό οξύ από τα βακτήρια του οξικού οξέος. Και τα δύο, η παραγωγή γλυκονικού οξέος και η παραγωγή κυτταρίνης απαιτούν την παρουσία οξυγόνου και αυτός είναι ο λόγος που το στρώμα της κυτταρίνης δημιουργείται μόνο στην διεπιφάνεια υγρού-αέρα από το δοχείο ζύμωσης της κομπούχας.(R.Jayabalan et. al., 2015). Το πλεονέκτημα αυτής της διαμόρφωσης της κυτταρινικής παραγωγής είναι ότι τα βακτήρια αναπτύσσονται ραγδαία υπό ελεγχόμενες συνθήκες και μπορούν να παράγουν κυτταρίνη από μία ποικιλία ανθρακικών πηγών περιλαμβάνοντας την γλυκόζη, την αιθανόλη, την σακχαρόζη, και την γλυκερόλη (Villareal-soto et. al. 2018).

Η μικροβιακή κυτταρίνη παράγεται εξωκυτταρικά σε μορφή ινιδίων τα οποία είναι συνδεδεμένα στο βακτηριακό κύτταρο. Κάθε κύτταρο έχει μεταξύ 50 και 80 πόρους ή σύνθετους τερματικούς (complex terminals Cts) με διάμετρο 3.5nm για να εξωθούν την κυτταρίνη έξω από την μεμβράνη του κυττάρου. Αυτές οι αλυσίδες αργότερα συγκεντρώνονται και δημιουργούν πιο παχιά ινίδια τα μακροινίδια (macrofibrils) δημιουργώντας μια τρισδιάστατη δομή από περίπου 1.000 μεμονωμένες αλυσίδες γλυκάνης οι οποίες μπορούν να κατακρατήσουν 200 φορές περισσότερο νερό από την ξηρή μάζα τους και κατέχουν υψηλή προσαρμοστικότητα και μεγάλη ελαστικότητα. Τα βακτήρια παράγουν δύο μορφές κυτταρίνης, την κυτταρίνη I και την κυτταρίνη II. Η κυτταρίνη I είναι ένα πολυμερές που μοιάζει με κορδέλα αποτελούμενο από δέσμες μικροϊνών, καθώς η κυτταρίνη II είναι ένα άμορφο πολυμερές το οποίο είναι θερμοδυναμικά πιο σταθερό από την κυτταρίνη I (Villareal-soto et. al. 2018).



Εικόνα 3: Δημιουργία του γλυκονικού οξέος και της κυτταρίνης από γλυκόζη (Jayabalan et. al., 2015)

Σε πρώτο στάδιο, τα βακτήρια παραγωγής κυτταρίνης αυξάνουν τον πληθυσμό τους μέσω της κατανάλωσης του διαλυμένου οξυγόνου. Κατά αυτήν την περίοδο, οι μικροοργανισμοί συνθέτουν συγκεκριμένο ποσό κυτταρίνης στο υγρό μέσο και μόνο τα βακτήρια που είναι στην επιφάνεια υγρού και αέρα μπορούν να διατηρήσουν την δράση τους και να παράγουν κυτταρίνη, η οποία δημιουργείται σε επάλληλα στρώματα. Όσο προχωράει η διάρκεια της ζύμωσης, το πάχος της μεμβράνης αυξάνεται από την παραγωγή νέων στρωμάτων στην επιφάνεια, δημιουργώντας μια αιωρούμενη δομή στο μέσο της καλλιέργειας. Η ανάπτυξη του βιοφίλμ μαζί με τους δεσμούς υδρογόνου και τους δεσμούς C-H θα συνεχιστεί καθόλη την διάρκεια της ζύμωσης, η σύνθεση του θα φτάσει τα όρια της όταν αναπτύσσεται καθέτως παγιδεύοντας όλα τα βακτήρια, η οποία θα γίνει ανενεργή λόγω ανεπαρκούς παροχής οξυγόνου. Τα βακτήρια που απομένουν στην υγρή φάση της καλλιέργειας βρίσκονται σε αδρανή κατάσταση και μπορούν να ξαναενεργοποιηθούν και να χρησιμοποιηθούν ως εμβόλιο σε επόμενη καλλιέργεια. Αυτό το βιοφίλμ κατέχει υψηλή κρυσταλλικότητα, υψηλή αντοχή εφελκυσμού, εξαιρετική αδιαλυτότητα στους περισσότερους διαλύτες, μοριακότητα, υψηλό βαθμό πολυμερισμού, είναι 100 φορές πιο λεπτή από την κυτταρίνη που παράγεται από τα φυτά, και η ικανότητα συγκράτησης νερού είναι 100 φορές πιο υψηλή. Ένα από τα κύρια χαρακτηριστικά

είναι η καθαρότητα, που την διαχωρίζει από αυτή που δημιουργείται από τα φυτά η οποία περιέχει ημικυτταρίνη και λιγνίνη, καθώς και ο υψηλός βαθμός κρυσταλλικότητας (>60%) όπου οι κρύσταλλοι δημιουργούνται και συντίθενται από τους κυτταρινικούς τύπους Ια και Ιβ. Αυτές οι μοναδικές ιδιότητες, καθώς και η καθαρότητά της έχουν επιστρέψει αρκετές επιτυχημένες εφαρμογές στον τομέα των βιοφαρμακευτικών υλικών. Το βιοφίλμ μπορεί να διαφέρει εξαρτώμενο από τα στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν, τον χρόνο ζύμωσης, και τα χημικά πρόσθετα που υπάρχουν στο μέσο της καλλιέργειας, καθώς και επίσης έχει υπάρξει υπόθεση ότι η μικροβιακή κυτταρίνη που παραλαμβάνεται από την καλλιέργεια κομπούχας ίσως παράγει ένα βιοφίλμ με διαφορετικά χαρακτηριστικά από αυτό που παράγεται από τις τυπικές πηγές. Υπάρχουν αρκετοί παράμετροι για να εξεταστούν ώστε να μεγιστοποιηθεί η απόδοση παραγωγής της μικροβιακής κυτταρίνης και για να βελτιστοποιηθεί η διαδικασία, για παράδειγμα, ο όγκος του εμβολιασμένου μέσου, ο χρόνος επώασης, η επιφάνεια, και οι συνθήκες ύψους επιφάνειας. Η μεταφορά άμορφων κομματιών των νανοϊνιδίων μέσω της όξινης υδρόλυσης μπορεί να παράγει νανοκρυστάλλους, οι οποίοι μπορούν να χρησιμοποιηθούν για διαφορετικούς σκοπούς σε αρκετούς τομείς όπως η συσκευασία τροφίμων ή ιατρικές εφαρμογές (Villareal-soto et. al. 2018).

Η μικροβιακή κυτταρίνη που σχηματίζεται από τα στρώματα του *A. xylinum* (*Gluconacetobacter xylinus*) είναι ένα μοναδικό βιοπολυμερές από την άποψη της μοριακής του δομής, της μηχανικής αντοχής και της χημικής σταθερότητας του. Ένα παρόμοιο κυτταρινικό δίκτυο επιπλέει στην επιφάνεια διαφόρων φρουτοποτών που ζυμώνονται από συμβιωτικές καλλιέργειες που αποτελούνται από *A. xylinum* και ζύμες και ονομάζεται "nata" και καταναλώνεται στις Φιλιππίνες ως έδεσμα. Στην Βραζιλία, αυτό το κυτταρινικό δίκτυο χρησιμοποιείται για την θεραπεία των εγκαυμάτων στο δέρμα και άλλων δερματικών τραυματισμών και παράγεται από καθαρή καλλιέργεια του *A. xylinum* που αναπτύσσεται σε ένα μέσο σχηματιζόμενο κυρίως από σακχαρόζη και ξανθίνες του τσαγιού. Η καφεΐνη και σχετικές ενώσεις, όπως η θεοφυλλίνη και η θεοβρωμίνη, έχουν ταυτοποιηθεί ως εκκινητές για την παραγωγή κυτταρίνης από *A. xylinum*. Στα αρχαία χρόνια, αυτό το κυτταρινικό βιοφίλμ χρησιμοποιούταν για την θεραπεία των πληγών. Η μικροβιακή κυτταρίνη που συντίθενται σε αφθονία από το *Acetobacter xylinum* παρουσιάζει τεράστια δυναμική ως σύστημα επούλωσης πληγών. Η υψηλή μηχανική αντοχή και οι αξιοσημείωτες φυσικές ιδιότητες προέρχονται από την μοναδική νανοδομή της αδιάβροχης μεμβράνης (Jayabalan et. al., 2015).

### 1.5.1 Ιδιότητες και εφαρμογές της μικροβιακής κυτταρίνης

Η κυτταρίνη (nanocellulose NC) είναι ένα από τα πιο εκτενώς ερευνημένα βιοπολυμερή μέχρι σήμερα εξαιτίας των ελκυστικών ιδιοτήτων όπως η υψηλή μηχανική αντοχή, μεγάλη επιφάνεια, χημική σταθερότητα, υδροφιλικότητα, κρυσταλλικότητα, διαφάνεια, βιοσυμβατότητα, μαγνητική και ηλεκτρική ευαισθησία, αγωγιμότητα πρωτονίων, πλούσια επιφανειακή χημεία, και διαθεσιμότητα, η κυτταρίνη είναι το πιο άφθονο ανανεώσιμο οργανικό υλικό που παράγεται στην βιόσφαιρα (Dima et. al., 2017). Η κρυσταλλικότητα είναι μια από τις πιο υποσχόμενες ιδιότητες της βακτηριακής κυτταρίνης, προκαλώντας καλύτερες μηχανικές και επιφανειακές ιδιότητες από αυτές της φυτικής κυτταρίνης. Ένας παράγοντας που σχετίζεται με το μήκος των αλυσίδων και την κρυσταλλικότητα είναι ο βαθμός πολυμερισμού της κυτταρίνης, ο οποίος αποτελείται από τον αριθμό των μονομερών γλυκόζης που υπάρχουν σε μια αλυσίδα. Ο βαθμός πολυμερισμού είναι μεγαλύτερος στη μικροβιακή κυτταρίνη από ότι στη φυτική εξαιτίας των μακριών κρυσταλλικών νανοϊνιδίων. Εξαιτίας της κρυσταλλικότητας και του βαθμού πολυμερισμού η βακτηριακή κυτταρίνη έχει μεγαλύτερη αντοχή εφελκυσμού και μεγαλύτερο Young's modulus από αυτά της φυτικής και για αυτό χρησιμοποιείται για την ενίσχυση άλλων υλικών. Οι μηχανικές ιδιότητες μαζί με την συμβατότητα της με την κυτταρίνη από ξύλο καθιστούν την μικροβιακή κυτταρίνη ως ένα εν δυνάμει υποψήφιο ενισχυτικό υλικό για την παραγωγή χαρτιού. Η μετάδοση του φωτός είναι μια ακόμη ενδιαφέρουσα ιδιότητα της μικροβιακής κυτταρίνης, υψηλή μεταβίβαση συμβαίνει επειδή το μήκος κύματος των ορατών ακτινών είναι υψηλότερο από το νανομέγεθος των ινών. Τα σύνθετα μικροβιακής κυτταρίνης μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε πολλές εφαρμογές όπως συσκευές προβολής, επιστρώσεις και φακούς. Η μικροβιακή κυτταρίνη είναι βιοσυμβατή και βιοαποικοδομήσιμη και μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε ένα ευρύ φάσμα εφαρμογών στην βιοϊατρική. Ωστόσο οι σημαντικότερες ιδιότητες της είναι η ιδιότητα επίδεσης τραύματος καθώς χρειάζεται συγκεκριμένο πορώδες για να εξασφαλίζει ότι ο αέρας και το υπόστρωμα εισχωρούν στο δέρμα, η αντιμικροβιακή ιδιότητα και θερμική σταθερότητα που επιτρέπει την χρήση της ως σύστημα χορήγησης φαρμάκων (Campano et al., 2016). Αυτές οι ιδιότητες κάνουν την μικροβιακή κυτταρίνη πολύ ενδιαφέρουσα για διάφορες εφαρμογές σε πολλούς τομείς. Επομένως στον τομέα της βιοϊατρικής και της φαρμακευτικής η κυτταρίνη μπορεί να χρησιμοποιηθεί για επίδεση τραυμάτων, φίλτρα απομάκρυνσης ιών,



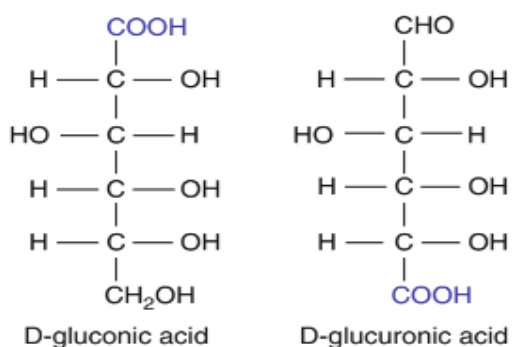
συστήματα χορήγησης φαρμάκων, ικρίωματα, αναγέννηση ιστών, ή βιοεκτύπωση. Στην βιομηχανία τροφίμων, η κυτταρίνη μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως ένα λειτουργικό συστατικό των τροφίμων, σταθεροποιητής τροφίμων, ή ως ναοπληρωτής σε ναοσύνθετα με ιδιότητες φραγμού αερίων για την συσκευασία τροφίμων εξαιτίας της μοναδικής εναιώρησης, της πάχυνσης, της ικανότητα απορρόφησης νερού, της ικανότητας σταθεροποίησης και την ικανότητα διογκώσεως. Η κυτταρίνη έχει επίσης χρησιμοποιηθεί σε υδρογέλες, αερογέλες, μεμβράνες και άλλων τύπων προσροφητικά μέσα για επεξεργασία λυμάτων και προηγμένες διεργασίες διαχωρισμών εξαιτίας της υδροφιλικότητας, της βιοδιασπασιμότητας, και των απορροφητικών ιδιοτήτων της. Η κυτταρίνη παρότι δεν είναι ένα αγωγίμο υλικό βρίσκει εφαρμογές ακόμη στην ανάπτυξη συσκευών υψηλής τεχνολογίας, εξαιτίας της ικανότητας της να μετατρέπεται σε αγωγίμο υλικό όταν προστίθεται στο δίκτυο της ένα αγωγίμο ναοϋλικό, σε τριβοηλεκτρικά, σε ναογεννήτριες, σε εύκαμπτα τρανζίστορ, σε βιοαισθητήρες και άλλες συσκευές της ναοτεχνολογίας, στην αποθήκευση ενέργειας και στην φωτονική (Dima et. al., 2017). Λαμβάνοντας υπόψη την δομή της μικροβιακής κυτταρίνης η οποία έχει βελτιωμένες ιδιότητες σε σύγκριση με την φυτική κυτταρίνη, όπως η πολύ λεπτή και εξαιρετικά καθαρή δομή δικτύου ινιδίων, έχει τροποποιηθεί για να εφαρμοστεί ως ένα εκρηκτικό (Campano et al., 2016).

## 1.6 ΟΡΓΑΝΙΚΑ ΟΞΕΑ

Η κομπούχα έχει αναφερθεί ότι περιέχει διάφορα οργανικά οξέα όπως, οξικό, γλυκονικό, γλυκουρονικό, κιτρικό, L-γαλακτικό, μηλικό, τρυγικό, μηλονικό, οξαλικό, ηλεκτρικό, πυρουβικό και απιονικό οξύ. Τα περισσότερα από αυτά τα οξέα έχουν τις ρίζες τους στο υπόστρωμα τσαγιού που χρησιμοποιείται για την προετοιμασία της κομπούχας. Περίπου το 0.5-0.6% του ξηρού βάρους του φρέσκου τσαγιού αποτελείται από οργανικά οξέα. Ανάμεσα στα οργανικά οξέα που υπάρχουν στην κομπούχα το κιτρικό, το μηλικό, το τρυγικό, το οξαλικό και το ηλεκτρικό οξύ αναφέρονται ότι υπάρχουν στο φρέσκο τσάι. Το οξικό, το γλυκονικό, το γλυκουρονικό, το L-γαλακτικό, το μηλονικό, το πυρουβικό, και το απιονικό οξύ παράγονται από την δράση των μικροβίων πάνω στην ζάχαρη κατά την ζύμωση. Το οξικό οξύ είναι το επικρατέστερο οργανικό οξύ που παράγεται από τα βακτήρια του οξικού οξέος μέσω της οξειδωσης της αιθανόλης. Είναι ο κύριος λόγος για την μείωση του pH. Εξαιτίας

της αύξησης της συγκέντρωσης των οργανικών οξέων που παράγονται κατά την διαδικασία της ζύμωσης από τα βακτήρια και τις ζύμες στην συμβιωτική καλλιέργεια του τσαγιού, το pH μειώνεται από το 5 στο 3. Φαινομενικά ο ζυμός ζύμωσης έχει κάποια ικανότητα ρυθμιστή (buffer). Κατά την διαδικασία της ζύμωσης, το διοξείδιο του άνθρακα απελευθερώνεται αρχικά με αργό ρυθμό και αρκετά πιο γρήγορα μετά από 2-3 ημέρες. Το λαμβανόμενο υδατικό διάλυμα του διοξειδίου του άνθρακα διαχωρίζεται και παράγει το αμφιπρωτικό υδροανθρακικό ανιόν ( $\text{HCO}_3^-$ ), το οποίο αντιδρά εύκολα με ιόντα υδρογόνου ( $\text{H}^+$ ) από τα οργανικά οξέα, αποτρέποντας περαιτέρω αλλαγές στην συγκέντρωση των ιόντων υδρογόνου και συμβάλλει στον ρυθμιστικό χαρακτήρα του συστήματος. Αυτός είναι ο έγκυρος λόγος για την ελαφρά μείωση του pH μετά από τις 3 μέρες (Jayabalan et. al., 2015).

Το οξικό οξύ έχει παρατηρηθεί ακόμη και όταν η πηγή ζάχαρης ήταν μελάσα. Το γαλακτικό και το κιτρικό οξύ δεν είναι χαρακτηριστικές ενώσεις για ένα παραδοσιακό ποτό κομπούχας. Το γαλακτικό οξύ έχει εντοπιστεί στο παραδοσιακό ποτό κομπούχα ακόμη και όταν είχε χρησιμοποιηθεί μελάσα και πράσινο τσάι ως πηγή ζάχαρης και υπόστρωμα τσαγιού, αντίστοιχα. Το κιτρικό οξύ έχει εντοπιστεί σε πολύ μικρή ποσότητα όταν χρησιμοποιείται μαύρο και πράσινο τσάι ως υπόστρωμα τσαγιού. Η οξείδωση του πρώτου άνθρακα της γλυκόζης δίνει γλυκονικό οξύ και του έκτου άνθρακα δίνει γλυκουρονικό οξύ (εικόνα 3). Το γλυκουρονικό οξύ έχει θεραπευτική σημασία εξαιτίας της αντιοξειδωτικής δράσης μέσα στο ανθρώπινο σώμα. Η σύζευξη του γλυκουρονικού οξέος με ανεπιθύμητες ενώσεις έχει ως αποτέλεσμα να μειώνει την τοξικότητα εξαιτίας της αύξησης της διαλυτότητας τους που διευκολύνει περαιτέρω στην μεταφορά και εξάλειψη τους από το ανθρώπινο σώμα. Η γλυκουρονιδίωση βοηθείται από το ένζυμο UDP γλυκουρονοσυλτρανσφεράσες. Τα βακτήρια του οξικού οξέος μετατρέπουν την γλυκόζη σε γλυκουρονικό οξύ και



Εικόνα 4: Δομή D-γλυκονικού και D-γλυκουρονικού οξέος (Jayabalan et. al., 2015)

αιθανόλη σε οξικό οξύ μέσω της οξείδωσης (Jayabalan et. al., 2015).

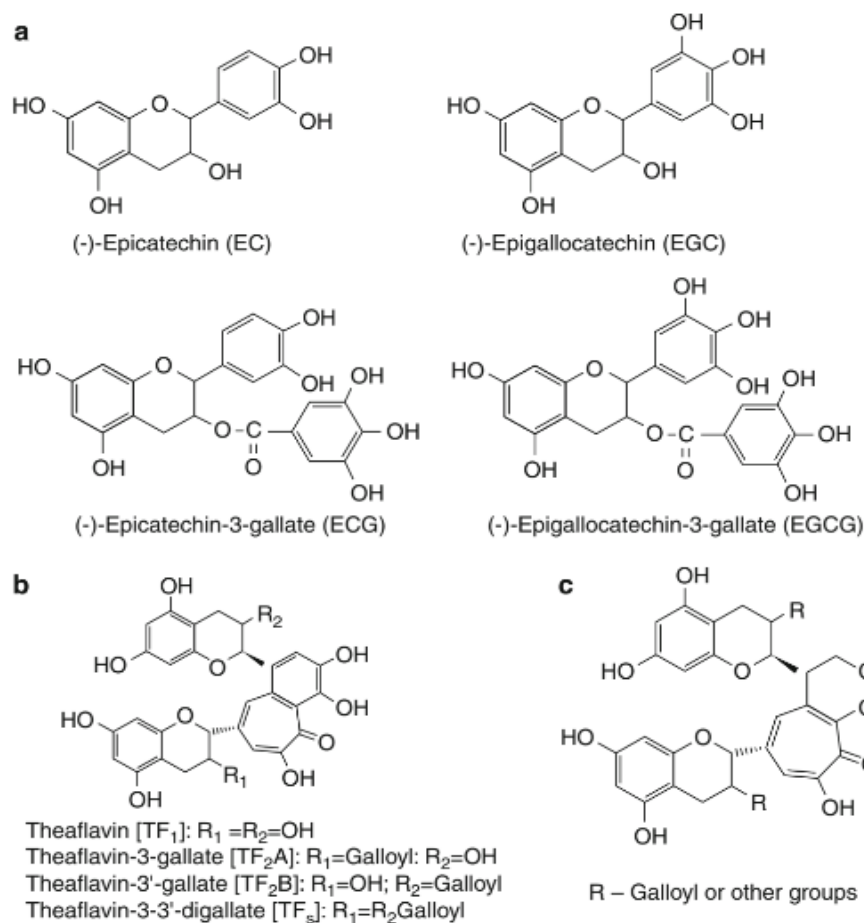
## 1.7 ΟΛΙΚΕΣ ΦΑΙΝΟΛΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ

Οι ολικές φαινολικές ενώσεις αυξάνονται προοδευτικά κατά την διάρκεια της ζύμωσης. Οι φαινολικές ενώσεις θεωρούνται ως υψηλού επιπέδου αντιοξειδωτικά εξαιτίας της ικανότητας τους να δεσμεύουν τις ελεύθερες ρίζες και τα ενεργά είδη οξυγόνου όπως το από οξυγόνο, τις ελεύθερες ρίζες υπεροξειδίου και τις ρίζες υδροξυλίου. Περίπλοκες φαινολικές ενώσεις στο πράσινο τσάι, το μαύρο τσάι και τα απορρίμματα του τσαγιού μπορεί να υποβληθούν σε υποβάθμιση στο όξινο περιβάλλον της κομπούχας και καθώς και από τα ένζυμα που απελευθερώνονται από τα βακτήρια και τις ζύμες στην συμβιωτική καλλιέργεια του τσαγιού. Έτσι, υπάρχουν πολλές αλλαγές στα ένζυμα που απελευθερώνονται από τα βακτήρια και τις ζύμες κατά την ζύμωση της κομπούχας στα οποία οφείλεται η υποβάθμιση των περίπλοκων φαινολικών σε μικρότερα μόρια το οποίο με την σειρά του έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση των ολικών φαινολικών ενώσεων (Jayabalan et. al., 2015).

## 1.8 ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΕΣ ΤΟΥ ΤΣΑΓΙΟΥ

Η πηγή πολυφαινολών στην κομπούχα είναι το υπόστρωμα του τσαγιού, το μαύρο τσάι ή το πράσινο τσάι. Η ποσότητα πολυφαινολών που υπάρχει εξαρτάται από την ποικιλία και την τάξη του τσαγιού υποστρώματος, την ποσότητα που χρησιμοποιείται, τον χρόνο βρασμού που κρατήθηκε για την προετοιμασία του αφεψήματος, και από τον χρόνο της ζύμωσης. Το περιεχόμενο σε ολικά φαινολικά του αφεψήματος αυξάνεται με τον χρόνο κατά την διάρκεια της ζύμωσης. Γαλακτικό οξύ, επικατεχίνες, (-)-epigallocatechin-3-gallate, (-)-epigallocatechin, (-)-epicatechin-3-gallate, (-)-epicatechin, ισομερή θειοφλαβίνη, και thearubigins εντοπίστηκαν και ποσοτικοποιήθηκαν κατά την διάρκεια της ζύμωσης. Τα ισομερή θεοφλαβίνης (theaflavin-3-gallate, theaflavin 3'-gallate, theaflavin 3,3'-digallate) δεν εντοπίστηκαν στην κομπούχα. Υψηλής πολυπλοκότητας πολυφαινόλες όπως EGCG και ECG υποβάλλονται σε υποβάθμιση και μετατρέπονται σε EGC και EC (Εικόνα4),

αντίστοιχα, το οποίο ήταν εμφανές μέσω της ποσοτικοποίησης των πολυφαινολών.



Εικόνα 5: Δομή των ισομερών επικατεχινών (a), θειοφλαβινών (b), και των thearubigins (Jayabalan et. al., 2015)

Το χρώμα του τελικώς ζυμωμένου τσαγιού κομπούχα είναι πιο ανοιχτό από το χρώμα του αρχικού αφεψήματος. Αυτό σημαίνει ότι οι ενώσεις που είναι υπεύθυνες για το χρώμα, thearubigins υποβάλλονται σε υποβάθμιση μέσα στο όξινο περιβάλλον της κομπούχας ή από τα ένζυμα που απελευθερώνονται από τα βακτήρια και τις ζύμες. Η απώλεια του αρχικού χρώματος ίσως επίσης οφείλεται στην μικροβιακή ή ενζυμική μετατροπή των thearubigins σε λιγότερο χρωματιστές ενώσεις (Jayabalan et. al., 2015).

## 1.9 ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΗΣ ΚΟΜΠΟΥΧΑΣ

Ο μύκητας τσαγιού ή *Medusomyces gisevii* είναι μια συμβιωτική καλλιέργεια από βακτήρια και ζύμες σε ένα κυτταρινικό βιοφίλμ. Τα βακτήρια ανήκουν σε αυτά που

παράγουν οξικό οξύ και οι ζύμες ανήκουν στην οσμοφυλλική ομάδα. Η μικροβιακή κυτταρίνη είναι ο μεταβολίτης που παράγεται από τα βακτήρια του οξικού οξέος όταν μεγαλώνουν αερόβια και τα μικροβιακά κύτταρα που υπάρχουν κοντά στις κυτταρικές ίνες παγιδεύονται μέσα της. Η σύνθεση των μικροβίων που υπάρχουν μέσα στο τσάι μύκητα δεν είναι ίδια ανά τον κόσμο. Η σύνθεση των μεταβολιτών της κομπούχας εξαρτάται από τον μεταβολισμό των μικροβίων που υπάρχουν σε αυτήν την συμβιωτική καλλιέργεια. Επομένως, η σύνθεση των μεταβολιτών της κομπούχας δεν είναι ίδια παντού (Jayabalan et. al., 2015).

### 1.9.1 Ζύμες

Τα περισσότερα είδη ζυμών μπορούν να ζυμώσουν την σακχαρόζη σε αιθανόλη, συνήθως χρησιμοποιείται ο *Saccharomyces cerevisiae* λόγω της υψηλής του απόδοσης. Παρόλα αυτά είδη ζυμών εκτός του *Saccharomyces* αρχίζουν να χρησιμοποιούνται περισσότερο από την βιομηχανία σε μικτές ζυμώσεις (όπως του κρασιού, της τεκίλας κτλ) με σκοπό να εμπλουτίσουν το αρωματικό προφίλ, και να ενισχύσουν την πολυπλοκότητα και την κινητική του τελικού προϊόντος. Μικροβιακές αλληλεπιδράσεις μεταξύ ειδών *Saccharomyces* και μη ζυμών φαίνεται να είναι επωφελής επιλογή στην διαδικασία μικτής ζύμωσης, έχοντας αρκετά οφέλη όπως την αποφυγή κινδύνων συγκολλημένης καλλιέργειας, της προσθήκης αρωμάτων και γεύσεων, και επιτρέπει την μετατροπή των ανεπιθύμητων παραμέτρων σε άλλες. Με αυτήν την έννοια η αλληλεπίδραση των ζυμών της κομπούχας έχει αποδειχθεί ότι είναι μια καλλιέργεια που παράγει τελικά επιθυμητά χαρακτηριστικά (Villareal-soto et. al. 2018).

Οι ζύμες στην κομπούχα περιλαμβάνουν τα γένη *Brettanomyces/Dekkera*, *Candida*, *Kloeckera*, *Mycotorula*, *Mycoderma*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Torulospora*, και *Zygosaccharomyces*. Το γένος *Brettanomyces* περιλαμβάνει *Brettanomyces intermedius*, *B. bruxellensis*, και *B. claussenii*. Τα αναφερόμενα είδη για το γένος *Candida* περιλαμβάνουν *Candida famata*, *C. guilliermondii*, *C. obutsa*, *C. stellate*, *C. colliculosa*, *C. kefir* και *C. krusei*. Από το γένος *Saccharomyces* περιλαμβάνονται τα *Saccharomyces cerevisiae* και *Saccharomyces bisporus*. Από το γένος *Schizosaccharomyces* έχει βρεθεί το *Schizosaccharomyces pombe* και από το γένος *Zygosaccharomyces* το *Zygosaccharomyces rouxii*, το *Zygosaccharomyces bailii*, και το *Zygosaccharomyces kombuchaensis* sp. n. Εκτός από αυτά τα είδη ζυμών έχουν αναφερθεί επίσης το *Saccharomyccoides ludwigii* και το

*Schizosaccharomyces pombe*. Τα είδη ζυμών που ακολουθούν επίσης αναφέρονται : *Torula*, *Torulopsis*, *Torulasporea delbrueckii*, *Mycoderma*, *Pichia*, *Pichia membranefaciens*, *Kloeckera apiculata*, *Kluyveromyces africanus* (R.Jayabalan et. al., 2015). Επιπλέον σε αυτά που έχουν ήδη αναφερθεί, αρκετοί ερευνητές έχουν ποσοτικοποιήσει κάποιες άλλες ζύμες παρούσες στην καλλιέργεια κομπούχας, Watawana et al. (2016) αναφέρει το *Zygosaccharomyces* ως την κυρίαρχη ζύμη με 84.1% σχετικό ποσοστό αφθονίας και τα είδη *Dekkera* και *Pichia* με 6% και 5% αντίστοιχα. Ο Mayser (1995) αποκαλύπτει τις ζύμες που δημιουργούν το βιοφίλμ ως τις *Candida krusei* ή *Issatchenkia orientalis* καθώς και επίσης είδη από τις ζύμες *apiculatus* (*Kloeckera*, *Hanseniaspora*). Μια νέα ασκοσπορογονική ζύμη ονομαζόμενη *Zygosaccharomyces kombuchaensis* έχει απομονωθεί από το τσάι κομπούχα από τους Kurtzman, Robnett, και Basehoar-Powers (2001)(Villareal-soto et. al. 2018).

### 1.9.2 Βακτήρια

Τα βακτήρια ανήκουν στα γένη *Acetobacter* και *Gluconobacter*. Για το γένος *Acetobacter* αναφέρονται *A. xylinum*, *A. pasteurianus*, *A. aceti*, *A. intermedium* sp nov, και *Acetobacter nitrogenifigens*. Ανάμεσα στο γένος *Gluconobacter* βρίσκονται *Gluconobacter oxydans*, *Gluconacetobacter* sp. A4, και *Gluconacetobacter kombuchae* sp. nov.. Παρουσία βακτηρίων από το είδος *Lactobacillus* έχει προσφάτως αναφερθεί(R.Jayabalan et. al., 2015). Τα επικρατέστερα βακτήρια στην κομπούχα είναι τα βακτήρια οξικού οξέος (AAB), τα οποία είναι αερόβια βακτήρια ικανά να χρησιμοποιήσουν την αλκοόλη ως υπόστρωμα για να δημιουργήσουν οξικό οξύ. Τα βακτήρια αυτά, σε αντίθεση με τις ζύμες, απαιτούν μεγάλες ποσότητες οξυγόνου για την ανάπτυξη και την δράση τους. Η μεταβολική διεργασία βασίζεται στην μετατροπή των ακεταλδεϋδων σε αιθανόλη και των ένυδρων ακεταλδεϋδών σε οξικό οξύ από το ένζυμο ακεταλδεϋδη αφυδρογονάση. Αρκετά AAB υπάρχουν στο τσάι μύκητα, περιλαμβάνοντας : *Acetobacter xylinoides*, *Bacterium gluconicum*, *Acetobacter aceti*, *Acetobacter pasteurianus*, και *Gluconobacter oxydans*. Ο Marsh et al. (2014) δούλεψε με αλληλουχική ανάλυση του rRNA και βρήκε μεταξύ 86% και 99% σχετική αφθονία του *Gluconobacter* καθόλη την ζύμωση στο υγρό μέσο και στο βιοφίλμ. Παρόμοια αποτελέσματα βρέθηκαν από Watawana et al. (2016) που ζύμωσαν νερό καρύδας με το τσάι μύκητα και βρήκαν το *Gluconobacter* ως το κύριο βακτήριο με σχετικό ποσοστό 85.6 και σε μικρότερες ποσότητες τα είδη *Acetobacter*, *Leuconostoc* και *Bifidobacterium* (Villareal-soto et. al. 2018).

Αναφέρεται ότι η βιώσιμη καταμέτρηση των βακτηρίων του οξικού οξέος και των ζυμών φτάνει στο μέγιστο μετά από 6 ημέρες ζύμωσης και στην συνέχεια μειώνεται μέχρι την τελική φάση της ζύμωσης. Η μείωση του αριθμού των βακτηρίων και των ζυμών κατά την τελική φάση της ζύμωσης πιθανώς προκαλείται από το όξινο στρες ( χαμηλό pH), το οποίο επηρεάζει τον πολλαπλασιασμό των βακτηρίων και των ζυμών. Επίσης αναφέρεται ότι το αναερόβιο και χωρίς τροφή περιβάλλον που δημιουργείται μπορεί να αποτελέσει και αυτό έναν λόγο για τον οποίο μειώνεται το μικροβιακό περιεχόμενο κατά την διάρκεια της ζύμωσης. Το διοξείδιο του άνθρακα που παράγεται ως αποτέλεσμα της ζύμωσης του αλκοόλ από τις ζύμες συσσωρεύεται στην διεπιφάνεια ανάμεσα στην μεμβράνη και τον ζυμό. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να διαχωρίζεται η μεμβράνη από τον ζυμό και να δημιουργείται αναερόβιο και χωρίς τροφή περιβάλλον εξαιτίας του παρεμποδισμού της μεταφοράς θρεπτικών συστατικών από τον ζυμό στην μεμβράνη και της μεταφοράς οξυγόνου από την επιφάνεια της μεμβράνης στον ζυμό. Υπάρχουν αμφιλεγόμενες δηλώσεις στην υπάρχουσα βιβλιογραφία που αφορούν την συγκέντρωση των βιώσιμων μικροβιακών κυττάρων στον ζυμό του τσαγιού και στην κυτταρινική μεμβράνη (Jayabalan et. al., 2015).

#### 1.10 ΑΛΛΟΙ ΔΕΥΤΕΡΟΓΕΝΕΙΣ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΕΣ

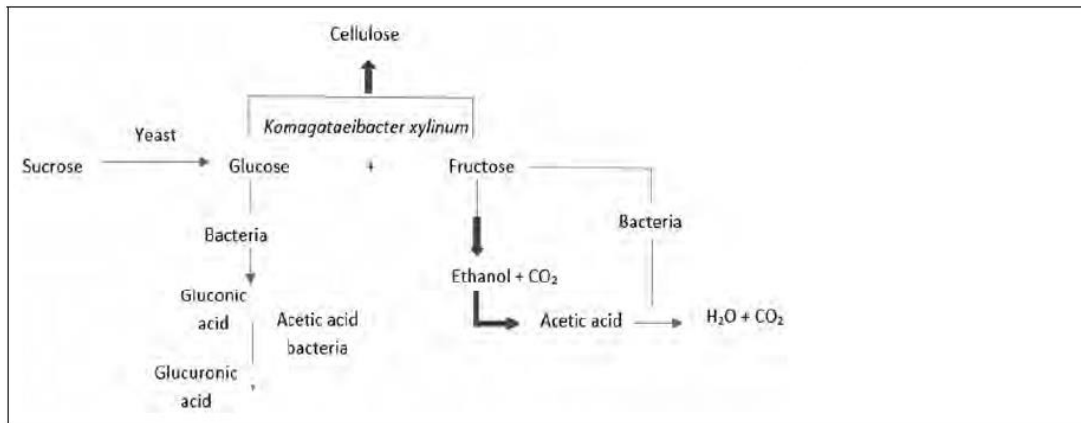
Τα κύτταρα των ζυμών παράγουν αιθανόλη ως προϊόν ζύμωσης από την φρουκτόζη μέσω της γλυκόλυσης και της δράση της πυροσταφυλικής αφυδρογονάσης και της αλκοολικής αφυδρογονάσης κατά την διάρκεια ζύμωσης της κομπούχας. Η αιθανόλη εντοπίζεται μόνο σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις (0.55%) εξαιτίας της οξειδωσής της σε οξικό οξύ από τα βακτήρια του οξικού οξέος. Υδατοδιαλυτές βιταμίνες όπως B1, B6, B12 και C αναφέρεται ότι υπάρχουν στην παραδοσιακή κομπούχα με υποστρώματα μαύρο τσάι και ζάχαρη. Οι ζύμες είναι υπεύθυνες για την βιοσύνθεση των βιταμινών B. Παρουσία μαγνησίου, σιδήρου, νικελίου, χαλκού. Ψευδαργύρου, μόλυβδου, κοβαλτίου και χρωμίου ανιχνεύεται στο αφέψημα της κομπούχας. Σημαντικά μέταλλα όπως ο χαλκός, ο σίδηρος, το μαγγάνιο, το νικέλιο και ο ψευδάργυρος αυξήθηκαν κατά την διάρκεια της ζύμωσης. Το κοβάλτιο εξαιτίας της συμπερίληψής του στην βιταμίνη B12, δεν αυξάνεται. Παρουσία ανιονικών μετάλλων όπως το φθοριούχο, το χλωριούχο, το βρωμιούχο , το ιωδιούχο, το νιτρικό, το φωσφορικό και το θειικό επίσης αποδείχθηκε. Το περιεχόμενο σε D-σακχαρινικό οξύ 1,4 λακτόνη (DSL) αυξάνεται κατά την ζύμωση μέχρι την 8η μέρα και στην συνέχεια μειώνεται. Παρομοίως το πρωτεϊνικό περιεχόμενο της κομπούχας επίσης αυξάνεται

μέχρι την 12η μέρα της ζύμωσης και αρχίζει να μειώνεται μετά από αυτή. Ίσως εξαιτίας της μείωσης του περιεχομένου σε εξωκυτταρικές πρωτεΐνες που εκκρίνονται από τα βακτήρια και τις ζύμες (Jayabalan et. al., 2015).

### 1.11 ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ

Η πολυπλοκότητα της κατανόησης της κινητικής της ζύμωσης της κομπούχας οφείλεται κυρίως στον σημαντικό αριθμό μικροοργανισμών που υπάρχουν και στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ τους, οποίες θεωρείται ότι έχουν παρεμποδιστικές επιδράσεις στην παραγωγή της αιθανόλης. Ωστόσο, ο θάνατος και η αυτόλυση των κυττάρων των ζυμών απελευθερώνει επίσης βιταμίνες και άλλα θρεπτικά συστατικά που διεγείρουν την ανάπτυξη των βακτηρίων. Τα περισσότερα μεταβολικά είδη αναδημιουργούν μεταβολικά προϊόντα τα οποία είτε διεγείρουν είτε παρεμποδίζουν τον ειδικό ρυθμό ανάπτυξης άλλων ειδών, καθιστώντας συμβιωτικές ή αμνησιολογικές αλληλεπιδράσεις οι οποίες πρέπει να αναλυθούν εκτενώς για να επιτευχθεί η κατανόηση αυτού του φαινομένου της συμβίωσης. Κάποιες βακτηριακές ομάδες όπως τα LAB και τα AAB, καθώς και κάποια είδη ζυμών όπως το *Saccharomyces cerevisiae*, έχουν καθιερωμένο ρόλο στην ζύμωση. Ωστόσο, μέχρι σήμερα, υπάρχουν πολλά άλλα είδη που ο ρόλος τους δεν έχει πλήρως χαρακτηριστεί, ούτε οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ τους. Υπάρχει ένας αριθμός εμποδίων για την κατανόηση των μικροβιακών συστημάτων, πρώτα από όλα η τεράστια ποικιλία και η πολυπλοκότητα των περισσότερων μικροβιακών κοινοτήτων, για παράδειγμα, ορισμένοι μικροοργανισμοί μπορούν να συμβιώνουν παράλληλα, καθώς άλλοι ενεργούν με διαδοχικό τρόπο με κυρίαρχη εξέλιξη κατά την διάρκεια της ζύμωσης. Στην περίπτωση της κομπούχας, οι διαφορετικές ζύμες και τα είδη βακτηρίων δρουν συμβιωτικά παράγοντας δύο διαφορετικά προϊόντα : το ζυμωμένο τσάι και το βιοφίλμ. Στην αρχή της ζύμωσης, η ζύμες υδρολύουν την σακχαρόζη σε γλυκόζη και φρουκτόζη, στην συνέχεια η αιθανόλη παράγεται και τελικά τα AAB μετατρέπουν την αιθανόλη σε οξικό οξύ, παρόλα αυτά η παραγωγή του γλυκονικού και του γλυκουρονικού οξέος είναι επίσης αξιοσημείωτη (Εικόνα 6) (Villareal-soto et. al. 2018).





Εικόνα 6:Κύρια μεταβολική δράση των μικροοργανισμών (Markov et. al.,2003)

Η σακχαρόζη ως πηγή άνθρακα στο μέσο της καλλιέργειας υδρολύεται από το ένζυμο ιμβέρταση από της ζύμες του τσαγιού μύκητα. Τα βακτήρια του οξικού οξέος απορροφούν τους μονοσακχαρίτες ( γλυκόζη και φρουκτόζη) που προκύπτουν από την υδρόλυση της σακχαρόζης, αλλά δεν μπορούν να χρησιμοποιήσουν την σακχαρόζη ως έχει επειδή έχουν έλλειψη σε υδρολάσες και κινάνες. Οι ζύμες ζυμώνουν την γλυκόζη και την φρουκτόζη σε αιθανόλη,η οποία στην συνέχεια οξειδώνεται σε οξικό οξύ από τα βακτήρια του οξικού οξέος. Αυτό είναι το κύριο μεταβολικό μονοπάτι της ζύμωσης της κομπούχας, και το οξικό οξύ είναι η κυρίαρχη οργανική ένωση του αφεψήματος (Cvetkovic et. al., 2007).

## 1.12 ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΕΠΗΡΕΑΖΟΥΝ ΤΗΝ ΖΥΜΩΣΗ ΤΗΣ ΚΟΜΠΟΥΧΑΣ

Η ζύμωση επηρεάζεται από πολλούς παράγοντες όπως η θερμοκρασία , το pH, το ποσό του οξυγόνου, το διοξείδιο του άνθρακα που διαλύεται, το λειτουργικό σύστημα, η συσσώρευση πρόδρομων ουσιών, η ταχύτητα διάτμησης στον ζυμωτήρα, καθώς και η φύση και η σύνθεση του μέσου ( Marsh et al. 2014). Οποιαδήποτε παραλλαγή σε αυτούς τους παράγοντες μπορεί να επηρεάσει τον ρυθμό της ζύμωσης, το φάσμα, την εκτέλεση, τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά, την ποιότητα της θρεπτικότητας και άλλες φυσικοχημικές ιδιότητες του προϊόντος. Οι διαφορετικές ποικιλίες φυτών, η συγκέντρωση της ζάχαρης, ο χρόνος της ζύμωσης, και η σύνθεση του τσαγιού μύκητα

μπορεί να οφείλονται για διαφορές στην σύνθεση και κατά συνέπεια επηρεάζονται και οι βιολογικές ιδιότητες (Wolfe and Dutton, 2015; Villareal-soto et. al. 2018).

### 1.11.1 Υπόστρωμα τσαγιού

Συνήθως το αφέψημα της κομπούχας παρασκευάζεται από ζύμωση μαύρου ή πράσινου τσαγιού, αλλά κάποιοι ερευνητές ( Battikh, Bakhrouf, and Ammaw , 2012; Watawana et al 2016) έχουν μελετήσει άλλα υποστρώματα σαν μια εναλλακτική για την παραγωγή κομπούχας παραλαμβάνοντας ενδιαφέροντα αποτελέσματα. Οι Battikh et al (2012) δοκίμασαν την αντιμικροβιακή ιδιότητα από αρκετά ανάλογα κομπούχας βρίσκοντας βελτιωμένες παρεμποδιστικές τιμές σε σχέση με τα παραδοσιακά αφεψήματα, κυρίως εναντίων των ειδών *Candida*. Οι Valicansju, Cvetkovic, and Markov (2013) απέδειξαν ότι η ζαχαρωμένη εχινάκεια (*Echinaceapurpurea* L.) και σατουρέγια η ορεινή (*Satureja montana* L.) μπορούν να χρησιμοποιηθούν εναλλακτικά ως πηγές αζώτου, μειώνοντας τον χρόνο της ζύμωσης παραλαμβάνοντας συγκρίσιμα χαρακτηριστικά με το παραδοσιακό αφέψημα. Οι Watawana et al. (2015) ζύμωσαν νερό καρύδας (*Cocos nucifera* var *aurantiaca*) μαζί με την καλλιέργεια της κομπούχας και παρατήρησαν βελτιστοποίηση κάποιων ενδιαφερόσων βιολογικών ιδιοτήτων. Πιο πρόσφατα οι Ayed et al. (2016) ανέπτυξαν ένα αφέψημα κομπούχας από χυμό σταφυλιών με βελτιωμένες αισθητικές και λειτουργικές ιδιότητες μετά από 6 ημέρες ζύμωσης. Σύμφωνα με μελέτες, συμπεραίνεται ότι η έρευνα της θεραπευτικής δυναμικής τους αφεψήματος κομπούχας που παρασκευάζεται από διαφορετικά υποστρώματα μπορεί να είναι μια ενδιαφέρουσα προσέγγιση (Villareal-soto et. al. 2018).

### 1.11.2 Χρονική επίδραση

Η ζύμωση της κομπούχας συνήθως ποικίλει από 7 με 60 ημέρες και οι βιολογικές ιδιότητες μπορεί να αυξάνονται κατά την διάρκεια της διαδικασίας, παρόλα αυτά τα καλύτερα αποτελέσματα λαμβάνονται κατά μέσο όρο στις 15 ημέρες (Chu and Chen 2006). Μολονότι οι περισσότερες αντιοξειδωτικές ιδιότητες που παραλαμβάνονται αυξάνονται με τον χρόνο επώασης, η παρατεταμένη ζύμωση δεν συνίσταται εξαιτίας της συσσώρευσης των οργανικών οξέων, η οποία μπορεί να φτάσει σε καταστρεπτικό επίπεδο για την απευθείας κατανάλωση. Επί πλέον, το διοξείδιο του άνθρακα που ελευθερώνεται μπορεί να συσσωρευτεί στην επιφάνεια μεταξύ του βιοφίλμ και του υγρού ζωμού και μπορεί να παρεμποδίσει την μεταφορά των θρεπτικών ουσιών δημιουργώντας ένα περιβάλλον χωρίς τροφή (Chu and Chen 2006). Η επιλογή του χρόνου της διάρκειας της ζύμωσης επίσης εξαρτάται από τα αναμενόμενα αισθητικά

χαρακτηριστικά. Ο Reiss (1994) αναφέρει ότι μεταξύ 6 και 10 ημερών ζύμωσης ένα φρουτάδες αναζωογονητικό αφέψημα παραλαμβάνεται, αντιθέτως με παρατεταμένη ζύμωση η γεύση μοιάζει περισσότερο με αυτή του ξιδιού. Σύμφωνα με το Food and Drug Administration Model Food Code για την ζύμωση της κομπούχας (Nunmer, 2013) μέχρι 10 ημέρες ζύμωσης συνίστανται εάν παράγεται για ανθρώπινη κατανάλωση. Ο Coton et al (2017) μελέτησε την εξέλιξη του μικροβιακού πληθυσμού της κομπούχας σε βιομηχανική παραγωγή καθόλη την διάρκεια (0, 2, 4, και 8 ημέρες). Παρατήρησε ότι τα περισσότερα AAB ήταν πιο άφθονα στο βιοφίλμ απ'ότι στον υγρό ζωμό την ημέρα 0 και ότι μετά από 8 ημέρες φτάνουν σε μια ισορροπία, σε σύγκριση με τα είδη ζυμών που φαίνεται να είναι κάπως σταθερά και στις δύο φάσεις σε όλη την ζύμωση. Ο Chakravorty et al. (2016) υπολόγισε το περιεχόμενο σε πολυφαινόλες και την αντιοξειδωτική δράση της κομπούχας κατά την διάρκεια της ζύμωσης του (0, 7, 14, και 21 ημέρες) και παρατήρησε υψηλή τάση για αύξηση ειδικότερα μετά τις 7 ημέρες, που ίσως είναι εξαιτίας της μεγαλύτερης μικροβιακής ποικιλότητας που κατακτάται σε εκείνο τον χρόνο (Villareal-soto et. al. 2018).

### 1.11.3 Επίδραση θερμοκρασίας

Η διατήρηση της βέλτιστης θερμοκρασία καθόλη την διάρκεια της ζύμωσης έχει ως αποτέλεσμα την καλύτερη μικροβιακή ανάπτυξη και ενζυμική δράση, ως εκ τούτου τα οφέλη της ζύμωσης βελτιώνονται. Επιπλέον, η αντιοξειδωτική δράση τροφίμων που έχουν βάση φυτά μπορεί να επηρεαστεί από τις διαφορές στην θερμοκρασία, για παράδειγμα η παραγωγή φαινολικών ενώσεων (Hur et al. 2014). Γενικότερα, η θερμοκρασιακές τιμές της ζύμωσης της κομπούχας ποικίλουν μεταξύ 22°C και 30°C. Ωστόσο, ο Vitas et al. (2013) πραγματοποίησε την ζύμωση γαλακτοκομικών προϊόντων με τσάι μύκητα σε θερμοκρασιακές τιμές : 37°C, 40°C, και 43°C χρησιμοποιώντας μοντέλα βελτιστοποίησης, σύμφωνα με τα αποτελέσματα του η θερμοκρασία ήταν ο πιο σημαντικός παράγοντας για την διάρκεια της ζύμωσης, και οι υψηλότερες τιμές αντιοξειδωτικής δράσης λήφθηκαν με θερμοκρασιακές τιμές μεταξύ 37oC και 42oC. Σύμφωνα με τον Loncar et al. (2006), ποσότητες των παραγόμενων οξέων και μεταβολιτών, καθώς και της βιταμίνης C, ήταν μεγαλύτερες σε δείγματα που ζυμώθηκαν σε μεγαλύτερες θερμοκρασίες (Villareal-soto et. al. 2018).

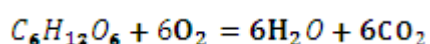
### 1.11.4 Το pH

Το pH είναι ένα από τους σημαντικότερους περιβαλλοντικούς παράγοντες που επηρεάζουν την ζύμωση της κομπούχας, διότι κάποια από τα οξέα που δημιουργούνται όπως το οξικό και γλυκουρονικό, μπορεί να είναι υπεύθυνα για τις

βιολογικές ιδιότητες του αφεψημάτος που δημιουργείται. Επίσης συνδέεται στενά με την μικροβιακή ανάπτυξη και τις δομικές αλλαγές των φωτοχημικών ενώσεων που μπορεί να επηρεάζουν την αντιοξειδωτική δράση (Hur et al. 2014). Ωστόσο, η χαμηλότερη αποδεκτή τιμή pH δεν πρέπει να είναι χαμηλότερη από 3, το οποίο είναι το pH της χωνευτικής έκτασης (Loncar et al. 2006). επίσης σύμφωνα με τους Saronjac and Vulic (2014), για να παραλαμβάνεται ένα ευχάριστο ξινό αφέψημα, η ζύμωση πρέπει να τελειώνει όταν η συνολική οξύτητα φτάνει την βέλτιστη τιμή της 4 με 5 g/L. Ωστόσο, η χρονική διάρκεια για να ληφθεί αυτή η τιμή ίσως να διαφέρει εξαρτώμενη από την πηγή του μέσου της καλλιέργεια και τις συνθήκες της ζύμωσης(Villareal-soto et. al. 2018).

### 1.13 ΡΥΘΜΟΣ ΜΕΤΑΦΟΡΑΣ ΟΞΥΓΟΝΟΥ ΚΑΙ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΚΛΙΜΑΚΩΣΗΣ

Οι περισσότερες διαδικασίες ζύμωσης είναι αερόβιες, και ως εκ τούτου, απαιτούν την παροχή οξυγόνου. Εάν ληφθεί υπόψιν η στοιχειομετρία της αναπνοής, τότε η οξείδωση της γλυκόζης μπορεί να αναπαρασταθεί ως εξής :



όπου 192 g οξυγόνου απαιτούνται για την πλήρη οξείδωση 180 g γλυκόζης. Παρόλα αυτά, και τα δύο στοιχεία πρέπει να βρίσκονται σε διάλυμα πριν να είναι διαθέσιμα σε έναν μικροοργανισμό και το οξυγόνο είναι 6000 φορές λιγότερο διαλυτό στο νερό απ'ότι είναι η γλυκόζη, έτσι δεν είναι δυνατό να προμηθευτεί η μικροβιακή καλλιέργεια με το απαιτούμενο οξυγόνο για την ολοκλήρωση της οξείδωσης της γλυκόζης ή οποιαδήποτε άλλης πηγής άνθρακα, με μια προσθήκη (Villareal-soto et. al. 2018).

Στην αρχή της διαδικασίας, σημαντικά ποσά αιθανόλης και μονοσακχαριτών απαιτούνται για τα AAB και προμηθεύονται από τις ζύμες της κομπούχας. Η οξείδωση της αιθανόλης σε οξικό οξύ απαιτεί ένα mol οξυγόνου (32 g) για την πλήρη οξείδωση ενός mol αιθανόλης (46 g), ως εκ τούτου η δράση των AAB, αυστηρά αερόβιων μικροοργανισμών, εξαρτάται στην μεταφορά οξυγόνου από τον αέρα στον υγρό ζωμό της ζύμωσης. Για αυτόν τον λόγο, μια μικροβιακή καλλιέργεια πρέπει να εφοδιάζεται με οξυγόνο κατά την ανάπτυξη σε ένα σημαντικό ρυθμό για να ικανοποιήσει την ζήτηση των οργανισμών (Stanbury et al. 2013). Όντας ένα αφέψημα σε συνεχή μελέτη και εξέλιξη, η κομπούχα έχει κυρίως μελετηθεί σε εργαστηριακή κλίμακα , από 200 ml μέχρι 2 L. Ωστόσο, μερικοί ερευνητές έχουν μελετήσει την

ζύμωση της σε μεγαλύτερους όγκους. Ο Malbasa et al. (2006) εφάρμοσε μια μέθοδο παλινδρομικής ανάλυσης σε μια διαδικασία παρτίδας (batch) των 8 L και συμπέρανε ότι το pH είναι μια μεταβλητή που μπορεί να επιτρέψει την εκτίμηση μεγαλύτερης κλίμακας. Αργότερα οι Cvetkovic et al., (2008) μελέτησαν την επίδραση του συγκεκριμένου τομέα διεπαφής, δηλαδή την επιφάνεια, ως μεταβλητή η οποία μπορεί να ελέγξει την παραγωγή της κομπούχας, χρησιμοποιώντας αντιδραστήρες των 90 L και συμπέραναν ότι οι αντιδραστήρες που έχουν την ίδια επιφάνεια διεπαφής, παρότι είχαν διαφορετικό μέγεθος μπορούν να παρέχουν όμοιες συνθήκες μεταφοράς μάζας. Και πρόσφατα, ο Coton et al (2017) δούλεψε με όγκους των 1000 L και μελέτησε την μικροβιακή οικολογία του παραγόμενου τσαγιού με μεθόδους meta-barcoding και μεθόδους που βασίζονται σε καλλιέργειες. Παρατήρησαν ότι ο μικροβιακός πληθυσμός έδειχνε να μην επηρεάζεται από τους παράγοντες που προκαλούν στρες στην βιομηχανική κλίμακα, το οποίο θα μπορούσε να οδηγήσει στην τυποποίηση του τσαγιού κομπούχα για βιομηχανική παραγωγή. Εκτός από τον όγκο, υπάρχουν αρκετές παράμετροι που πρέπει να ληφθούν υπόψιν για βιοπαραγωγική ανάπτυξη, όπου ο πιο σημαντικός περιλαμβάνει την γεωμετρία των δοχείων και τον τύπο ανακίνησης (Junker, 2004). Στην ζύμωση της κομπούχας, σύμφωνα με κάποιους ερευνητές, η διαδικασία ανακίνησης επηρεάζει την δομή του βιοφίλμ εξαιτίας της αναφερόμενης μείωσης της μηχανικής αντοχής του (Chawha et al., 2009). Σε στατικές καλλιέργειες, τα υποστρώματα πρέπει να μεταφέρονται εξ ολοκλήρου με διάχυση και η διαθεσιμότητα του οξυγόνου ίσως να γίνει ο περιοριστικός παράγοντας για τον μεταβολισμό των κυττάρων, το οποίο θα μπορούσε να έχει αρνητική επίδραση στην παραγωγή και την ποιότητα της κυτταρίνης. Ο κινητικός παράγοντας που εκφράζει την σχέση μεταξύ του διαλυμένου οξυγόνου και της επιφάνειας/όγκου του μέσου είναι η ειδική επιφάνεια διεπαφής, η οποία σχετίζεται άμεσα με άλλους παράγοντες, όπως η διατομή του αντιδραστήρα και ο συντελεστής μεταφοράς μάζας (Cvetkovic et al., 2008). Αυτό σημαίνει ότι ρυθμός ζύμωσης της κομπούχας σε αντιδραστήρα διαλείποντος έργου (batch) χωρίς ανάδευση και χωρίς εισαγωγή αερίου εξαρτάται από την ειδική επιφάνεια διεπαφής. Ο Cvetkovic et al. (2008) ανέπτυξε ένα μαθηματικό μοντέλο για την κλιμάκωση της ζύμωσης της κομπούχας βασισμένο σε διάφορες ειδικές επιφάνειες. Κατέληξαν στο ότι ανεξάρτητα από το μέγεθος του δοχείου ή τον όγκο του, εάν η τιμή της διαπιφάνειας επαφής είναι σταθερή μπορούσαν να εξασφαλίσουν την παραγωγή τσαγιού κομπούχας με παρόμοιες ιδιότητες. Στην ειδική περίπτωση της διαλείποντος

έργου ζύμωσης της κομπούχας, αρκετοί βιολογικοί παράγοντες πρέπει να ληφθούν υπόψιν. Ειδικότερα στην απουσία ανάδευσης, όπου η μικροβιακή αποσύνθεση ίσως συμβεί μεταξύ των βακτηρίων του οξικού οξέος τα οποία θα τείνουν να καταλάβουν το επιφανειακό στρώμα και των ζυμών οι οποίες ίσως δημιουργήσουν ίζημα στον πάτο του δοχείου (Loncar et al. 2006), και αυτό ίσως έχει αρνητικές επιδράσεις στην διαδικασία της ζύμωσης. Εκτός του γεγονότος ότι η μικροβιακή κυτταρίνη έχει ήδη μελετηθεί καλά από μερικούς ερευνητές (Campano et al., 2016, Czaja et al., 2006), οι διαθέσιμες πληροφορίες που καθορίζουν τις βέλτιστες συνθήκες στους αντιδραστήρες για την ανάπτυξή τους όπως η επιφάνεια/όγκος ή η επιφάνεια/ύψος είναι περιορισμένες. Με σκοπό να ερευνηθεί την επιρροή του όγκου στην διαδικασία, ο Loncar et al. (2006) δούλεψε με διάφορες συνθήκες και βρήκε ότι οι καλύτερες γεωμετρικές συνθήκες για την αύξηση της κλιμακας της ζύμωσης λήφθηκαν με ένα αντιδραστήρα 4 L και διαμέτρου 17 cm. Ο Goh και άλλοι (2012) διερεύνησαν την σχέση μεταξύ της απόδοσης παραγωγής, τις ιδιότητες του βιοφίλμ που παράγεται από την ζύμωση της κομπούχας, και την διεπιφάνεια επαφής, και βρήκαν ότι η παραγωγή του βιοφίλμ αυξάνεται με την επίταση της διαπιφάνειας επαφής, και μειώνεται με την διεύρυνση του βάθους. Αυτό μπορεί να εξηγηθεί διότι η μεταβολική διαδικασία είναι πλήρως αερόβια και παράγει διαρκώς διοξείδιο του άνθρακα, το οποίο ίσως να παγιδεύεται στην μεμβράνη και να καταλήγει να συσσωρεύεται σε μεγαλύτερες ποσότητες ειδικότερα σε βαθύτερα μέσα. Ωστόσο οι Cacicedo, Da Franca, και Lopez (2001) βρήκαν ότι ακόμη και αν η διεπιφάνεια επαφής είναι καθοριστική, το ύψος δεν είναι ασήμαντο, αφού παρατηρήθηκε ότι χρειάζεται ένα ελάχιστο ύψος για την δημιουργία της μεμβράνης, παίρνοντας υπόψιν την παραγωγή αρκετών στρωμάτων κυτταρίνης κατά την διάρκεια της ζύμωσης τα οποία θα καταλάβουν μέρος του αρχικού όγκου.

Εκτός από όλους του παράγοντες που ήδη αναφέρθηκαν, η διαδικασία επεξεργασίας της κομπούχας ίσως επηρεάζει τις τελικές της ιδιότητες. Η διαδικασία παραμένει σαν μια χειροτεχνία και η ακριβής ποσότητες των στοιχείων μπορεί να εξαρτώνται από το απαιτούμενο προϊόν. Παρ'όλα αυτά, έτσι ώστε να βελτιστοποιηθούν οι βιομηχανικές συνθήκες παραγωγής της κομπούχας, καθώς είναι ένα λειτουργικό αφέψημα, μια ολοκληρωμένη μελέτη περιλαμβάνοντας υψηλού όγκου παραγωγή, μικροβιολογική ταυτοποίηση, και βιολογικές δοκιμές πρέπει να πραγματοποιηθεί (Villareal-soto et. al. 2018).

#### 1.14 ΠΙΘΑΝΗ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ

Η ζύμωση της κομπούχας γίνεται κυρίως οικιακά, και για αυτό πρέπει να γίνεται με προσοχή διότι παθογόνοι μικροοργανισμοί μπορεί να μολύνουν το τσάι κατά την προετοιμασία του. Μερικές περιπτώσεις διαταραχών υγείας που έχουν αναφερθεί από μερικά μεμονωμένα άτομα με υποψία ζάλης και ναυτία, αυστηρές αρρώστιες, αλλεργικές αντιδράσεις, και πονοκέφαλο, οδηγώντας έτσι σε αντενδείξεις για την χρήση από εγκύους και λεχώνες (Jayabalan et al 2014; Srinivasan, Smolinkse and Greenbaum, 1997; Watawana et al. 2015). Από την άλλη μεριά, ο Vijayaraghavan et al. (2000) υπολόγισε την στοματική τοξικότητα για 90 ημέρες σε ποντίκια και οποιαδήποτε τοξικά σημάδια εντοπίστηκαν. Ο U.S Food and Drug Administration επίσης έκανε μερικές δοκιμές και ανέφερε ότι η κομπούχα είναι ασφαλής για κατανάλωση από ανθρώπους. Ωστόσο, λόγω των προηγουμένως αναφερόμενων λόγων και της μικροβιακής πολυπλοκότητας του αφεψημάτος είναι πάντα σημαντικό να παράγεται σύμφωνα με τα πρότυπα του FDA Model Food Code (Nunner, 2013)(Villareal-soto et al. 2018).

## 2 ΜΕΘΟΔΟΙ ΚΑΙ ΥΛΙΚΑ

### 2.1 Υλικά

#### 2.1.1 Αντιδραστήρια-Διαλύτες

Τα χημικά αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν αναλυτικού βαθμού καθαρότητας, προϊόντα της εταιρίας Sigma (Η.Π.Α). Το ενζυμικό σκεύασμα Celic-Ctec2 ήταν της εταιρίας Novozymes.

#### 2.1.2 Συσκευές και όργανα

- pH-μετρο 537, WTW (Γερμανία)
- Συσκευή ανάδευσης OrbitLs, Labnet (Μ.Βρετανία)
- Φωτόμετρο S-22 UV/Vis. Spectrophotometer της BOECO (Γερμανία)
- Σύστημα παραγωγής υπερκάθαρου νερού Direct-Q, Millipore (Η.Π.Α.)
- Φυγόκεντροι J2-21 και TJ-6 της Beckman Coulter (Η.Π.Α.), Sorvall RC28S, DuPont (Η.Π.Α.)
- Ζυγοί Mark 2060, και Mark 4065 (BEL Engineering) και Abs 120-4 (KERN & Sohn GmbH)
- Συσκευή φωτομέτρησης microplate reader Spectra Max 250 (Molecular Devices)
- Συσκευή υγρής χρωματογραφίας υψηλής ανάλυσης HPLC SHIMADZU LC20AD
- Συσκευή περίθλασης ακτίνων-X Advanced D8 Diffractometer, Bruker

### 2.2 Μέθοδοι

#### 2.2.1 Προετοιμασία τσαγιού κομπούχα για ζύμωση

Παρασκευή μαύρου τσαγιού 1.5% w/v (Lipton, Yellow label tea, Flavoured black tea) με εκχύλιση για 15 λεπτά σε βρασμένο, αποστειρωμένο, απιονισμένο νερό. Στην συνέχεια καθώς είναι ζεστό το διάλυμα γίνεται διάλυση της ποσότητας της σακχαρόζης που επιλέχθηκε (π.χ. 5% w/v, 7.5% w/v, 10% w/v, 12.5% w/v). Το



ζαχαρούχο τσάι αφήνεται να κρυώσει σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και στην συνέχεια μοιράζεται στα δοχεία που θα γίνει η ζύμωση με αναλογία όγκου υγρού 1/2.5, όγκος υγρού προς τον συνολικό όγκο χωρητικότητας του δοχείου. Ακολουθεί ο εμβολιασμός των δειγμάτων που έχουν ήδη τοποθετηθεί στα δοχεία με 10% ν/νεμβόλιο από προηγούμενη ζύμωση της καλλιέργειας κομπούχα. Το κάθε δοχείο σκεπάζεται με αποστειρωμένη γάζα (Εικόνα 18). Τέλος τα δοχεία τοποθετούνται για ζύμωση σε ειδικό θάλαμο σταθερής θερμοκρασίας 25°C.



*Εικόνα 7: Δοχείο ζύμωσης με εμβολιασμένο διάλυμα και καλυμμένο με αποστειρωμένη γάζα.*

Πραγματοποιήθηκαν δυο διαφορετικά πειράματα, στο πρώτο χρησιμοποιήθηκαν ίδια δοχεία ζύμωσης και πραγματοποιήθηκαν τέσσερις ζυμώσεις για τέσσερις διαφορετικές συγκεντρώσεις σακχαρόζης. Για την κάθε διαφορετική ζύμωση προετοιμάζονται 12 δοχεία όπως αυτό της Εικόνας 18, ώστε να είναι δυνατόν να λαμβάνονται δυο δείγματα την φορά για περαιτέρω ανάλυση. Δειγματοληψίες έγιναν την 3<sup>η</sup>, 6<sup>η</sup>, 9<sup>η</sup>, 13<sup>η</sup>, 15<sup>η</sup>, και 17<sup>η</sup> μέρα της ζύμωσης. Στο δεύτερο πείραμα χρησιμοποιήθηκαν τρία διαφορετικά δοχεία ζύμωσης με την ίδια συγκέντρωση

σακχαρόζης και το ίδιο εμβόλιο ώστε τα αποτελέσματα να είναι συγκρίσιμα. Προετοιμάστηκαν 6 δοχεία για την κάθε διαφορετική ζύμωση όπως αυτά της Εικόνας 7, ώστε να λαμβάνονται δύο δείγματα την φορά. Δειγματοληψίες έγιναν την 3<sup>η</sup>, 9<sup>η</sup> και 13<sup>η</sup> ημέρα της ζύμωσης.



Εικόνα 8: Διαφορετικά δοχεία ζύμωσης

### 2.2.2 Μικροβιολογικές αναλύσεις

Στα δείγματα πραγματοποιήθηκαν οι εξής μικροβιολογικές αναλύσεις: Ολικών αερόβιων βακτηρίων (Total Aerobic Bacteria, TAB), Βακτηρίων του οξικού οξέος (Acetic Acid Bacteria, AAB), Βακτηρίων του γαλακτικού οξέος (Lactic Acid Bacteria, LAB), και Ζυμών (Yeast). Τα θρεπτικά μέσα που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάπτυξη των βακτηρίων και των ζυμών, και το διάλυμα για τις αραιώσεις των δειγμάτων παρουσιάζονται στους Πίνακες που ακολουθούν.

Πίνακας 2: Σύσταση διαλύματος αραιώσεων

Συστατικό	Συγκέντρωση (g/L)
Tryptone	1
NaCl	8.5

*Πίνακας 3: Σύσταση θρεπτικού μέσου για TAB*

<b>Συστατικό</b>	<b>Συγκέντρωση (g/L)</b>
Tryptone	5
Yeast extract	2.5
Glucose	1
Agar	12
Ρύθμιση του pH στην τιμή 6.95	

*Πίνακας 4: Σύσταση θρεπτικού μέσου για LAB*

<b>Συστατικό</b>	<b>Συγκέντρωση (g/L)</b>
MRS broth	52.2
Agar	15
Ρύθμιση του pH στην τιμή 4.8-5	

*Πίνακας 5: Σύσταση θρεπτικού μέσου για Ζύμες*

<b>Συστατικό</b>	<b>Συγκέντρωση (g/L)</b>
Yeast extract	5
Glucose	20
Agar	15
Ρύθμιση του pH στην τιμή 6.4-6.8	

Πίνακας 6: Σύσταση θρεπτικού μέσου για AAB

Συστατικό	Συγκέντρωση (g/L)
Glucose	30
Yeast extract	5
Peptone	3
CaCO <sub>3</sub>	10
Agar	20
Προσθήκη 30 ml/Λιθανόλης μετά την αποστείρωση αφού κρύνει	

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για την δημιουργία στερεών καλλιεργειών είναι η εξής: Τα θρεπτικά μέσα διαλυτοποιούνται σε απιονισμένο νερό στους όγκους που χρειαζόμαστε, και στην συνέχεια τοποθετούνται σε μπουκάλια αποστείρωσης και αποστειρώνονται στο αυτόκλειστο για 20 λεπτά στους 121°C και υπό πίεση 0.1 Μρα. Για τις αναλύσεις των TAB και AAB το θρεπτικό μέσο εκχύνεται σε τρυβλία Petri υπό ασηπτικές συνθήκες, και αφού στερεοποιηθεί το περιεχόμενο των τρυβλίων επιστρώνεται με 0.1 ml αραιωμένου δείγματος. Για τις αναλύσεις LAB και Yeast1 ml αραιωμένου δείγματος τοποθετείται στα τρυβλία και στην συνέχεια εκχύνεται το θρεπτικό μέσο μέχρι να καλύψει την επιφάνεια, αφήνεται να στερεοποιηθεί και εκχύνεται μια νέα δόση θρεπτικού μέσου ώστε να δημιουργηθούν αναερόβιες συνθήκες. Όλα τα τρυβλία αφού στερεοποιηθούν τοποθετούνται σε επωαστήρα στους 30°C για 3-4 ημέρες, αφού περάσει αυτό το χρονικό διάστημα μετρούνται και καταγράφονται οι αποικίες.

### 2.3.3 Προσδιορισμός ολικών αναγωγικών σακχάρων

Η μέτρηση των ολικών αναγωγικών σακχάρων πραγματοποιείται με την φωτομετρική μέθοδο του δινιτρισαλικυκλικού οξέος (DNS). Ως αναγωγικό σάκχαρο ορίζεται το

σάκχαρο εκείνο που έχει ελεύθερο ημιακεταλικό υδροξύλιο. Η μέθοδος βασίζεται στον σχηματισμό συμπλόκου ανάμεσα στο προαναφερθέν υδροξύλιο και το δινιτροσαλικυλικό οξύ κατά την θέρμανση πάνω από τους 70°C. Το σύμπλοκο αυτό, εμφανίζει καμπύλη απορρόφησης στα 540 nm. Στα δείγματα που έχουμε τα αναγωγικά σάκχαρα είναι η φρουκτόζη και η γλυκόζη. Λαμβάνεται 0.5 ml από το δείγμα στην κατάλληλη αραιώση και προστίθενται 0.5 ml DNS, ακολουθεί βρασμός για 5 λεπτά και στην συνέχεια προσθήκη 4 ml απιονισμένου νερού. Η ίδια διαδικασία επαναλαμβάνεται για όλα τα δείγματα καθώς και για το τυφλό δείγμα που αντί για 0.5 ml αραιωμένου δείγματος προστίθεται 0.5 ml νερού. Ακολουθεί φωτομέτρηση στα 540 nm, αφού το φωτόμετρο μηδενιστεί με το τυφλό δείγμα. Προηγουμένως έχει πραγματοποιηθεί καμπύλη αναφοράς των ολικών αναγωγικών σακχάρων για το DNS με πρότυπα διαλύματα, και η συγκέντρωση των ολικών αναγωγικών σακχάρων δίνεται από την σχέση:  $y=1.5215x + 0.0222$ , όπου x είναι η απορρόφηση και y η συγκέντρωση ολικών αναγωγικών σακχάρων σε g/L.

#### 2.2.4 Μέτρηση ολικών φαινολικών ενώσεων

Η συγκέντρωση των ολικών φαινολικών ενώσεων προσδιορίζεται με την χρήση φασματοφωτομετρικής μεθόδου, και ο διαλύτης είναι το νερό. Η μέθοδος, αυτή περιλαμβάνει την αναγωγή του αντιδραστηρίου Folin-Ciocalteu με φαινολικές ενώσεις, με ταυτόχρονο σχηματισμό ενός μπλέ συμπλόκου. Το μίγμα της αντίδρασης παρασκευάζεται ως εξής:

- 0.5 μL δείγμα στην κατάλληλη αραιώση
- 3 ml απιονισμένο νερό
- 0.25 ml Folin-Ciocalteu
- 0.75 ml κορεσμένο ανθρακικό νάτριο ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ )
- 0.95 ml απιονισμένο νερό

Στην συνέχεια το μίγμα επωάζεται για 1 ώρα στο σκοτάδι και ακολουθεί φωτομέτρηση στα 755 nm. Ο προσδιορισμός των ολικών φαινολικών ενώσεων πραγματοποιείται με την χρήση πρότυπης καμπύλης για την απορρόφηση του γαλλικού οξέος η οποία δίνεται από την σχέση  $y=0.7882x - 0.0094$ , όπου y είναι η συγκέντρωση ολικών φαινολικών σε mg/L και x η απορρόφηση.

## 2.2.5 Μέτρηση αντιοξειδωτικής δράσης-Δοκιμή DPPH

Για τις δοκιμές DPPH χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος των Brnd-Williamsetal. (1995). Αρχικά παρασκευάζεται διάλυμα DPPH σε μεθανόλη με συγκέντρωση 0.025 g/L στην ποσότητα που χρειαζόμαστε σε ογκομετρική φιάλη. Ζυγίζεται η κατάλληλη ποσότητα DPPH και τοποθετείται στην ογκομετρική φιάλη, η μεθανόλη προστίθεται σταδιακά μέχρι την χαραγή της φιάλης με παράλληλη ανακίνηση της φιάλης για την πλήρη διάλυση του αντιδραστήριου. Το συγκεκριμένο διάλυμα παρασκευάζεται καθημερινά κατά το χρονικό διάστημα των μετρήσεων καθώς είναι φωτοευαίσθητο.

Στην συνέχεια για το μίγμα της αντίδρασης σε 0.1 ml δείγματος στην κατάλληλη αραιώση προστίθεται 3.9 ml διαλύματος DPPH, η ίδια διαδικασία ακολουθείται για την παρασκευή του τυφλού δείγματος με 0.1 ml απιονισμένου νερού αντί δείγματος. Οι αραιώσεις που πραγματοποιούνται στα δείγματα είναι δυο 0.02C και 0.05C, όπου C είναι η αρχική συγκέντρωση του δείγματος. Τα μίγματα της αντίδρασης επωάζονται για 30 λεπτά στο σκοτάδι σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, έως ότου δηλαδή ολοκληρωθεί πρακτικά η χημική αντίδραση της οξειδωσης, και ακολουθεί φωτομέτρηση στα 515 nm.

Το σύνολο των υπολογισμών, βασίζεται στην καμπύλη αναφοράς του αντιδραστήριου DPPH, η οποία δίνεται από την σχέση  $y=0.0326x + 0.0001$ , όπου y είναι η συγκέντρωση του αντιδραστήριου DPPH και x είναι η απορρόφηση. Βάση αυτής της καμπύλης υπολογίζεται η συγκέντρωση του αρχικού διαλύματος DPPH  $C_{0DPPH}$  (τυφλό δείγμα), καθώς και του μη ανηγμένου DPPH  $C_{tDPPH}$  μετά το τέλος της εκάστοτε αντίδρασης. Με αυτές τις τιμές μπορεί να υπολογιστεί η μεταβολή της συγκέντρωσης του DPPH,  $\Delta C_{DPPH}=C_{0DPPH}-C_{tDPPH}$ . Επίσης μπορεί να υπολογιστεί το ποσοστό εξουδετέρωσης της ελεύθερης ρίζας του DPPH από την παρακάτω σχέση

$$inhibition = \frac{A_{\text{τυφλου}} - A_{\text{δείγματος}}}{A_{\text{τυφλού}}} * 100$$

## 2.2.6 Καθαρισμός βακτηριακής κυτταρίνης

Οι μεμβράνες πλύθηκαν με NaOH 1% w/v σε βρασμό για 2 ώρες και ακολούθησε σχολαστική έκπλυση με απιονισμένο νερό, και τέλος ξήρανση σε φούρνο 60°C. Η αποξηραμένη μεμβράνη κονιορτοποιήθηκε σε πορσελάνινο γουδί.

### 2.2.7 Υδρόλυση της μικροβιακής κυτταρίνης

Η παραχθείσα κυτταρίνη υδρολύθηκε με χρήση του εμπορικού κυτταρινολυτικού σκευάσματος CellicCtec 2 . Η υδρόλυση πραγματοποιήθηκε σε συγκέντρωση μικροβιακής κυτταρίνης 2 g/L, pH=7.0 και θερμοκρασία 50°C. Δείγματα λαμβάνονταν σε τακτά χρονικά διαστήματα και αναλύονταν ως προς την παραγόμενη γλυκόζη.

### 2.2.8 Μέτρηση γλυκόζης

Για την μέτρηση της γλυκόζης χρησιμοποιείται ενζυματική χρωματογραφική ανάλυση, με την χρήση του ενζύμου GOD-PAP. Η γλυκόζη οξειδώνεται από την οξειδάση της γλυκόζης (GOD) προς γλυκονολακτόνη παρουσία ατμοσφαιρικού οξυγόνου. Το σχηματιζόμενο υπεροξείδιο του υδρογόνου οξειδώνει την 4-αμινοφαιναζόνη και την φαινόλη προς 4-(p-βενζοκινονο-μονοϊμινο)-φαιναζόνη, παρουσία υπεροξειδάσης (POD). Η ένταση του χρώματος της σχηματιζόμενης κόκκινης χρωστικής είναι ευθέως ανάλογη της συγκέντρωσης της γλυκόζης και μπορεί να μετρηθεί φωτομετρικά. Σε ειδικές κυψελίδες για το φωτόμετρο microplateπροετοιμάζονται τα δείγματα της αντίδρασης. Για το κάθε δείγμα προστίθονται 0.24 ml διαλύματος εργασίας GOD-PAP και 10 μL από το αραιωμένο δείγμα, τοποθετούνται στην συσκευή microplate για 15 λεπτά στους 37°C και στην συνέχεια ακολουθεί φωτομέτρηση στα 510 nm. Ο προσδιορισμός της γλυκόζης πραγματοποιείται με την χρήση πρότυπης καμπύλης για την απορρόφηση γλυκόζης η οποία δίνεται με από την σχέση :  $y=1.0442x$ , όπου y είναι η συγκέντρωση της γλυκόζης και x η απορρόφηση.

### 2.2.9 Μέτρηση σακχαρόζης

Η σακχαρόζη αποτελείται από ένα μόριο γλυκόζης και ένα μόριο φρουκτόζης. Η μέθοδος αυτή βασίζεται στο ισομοριακό διάλυμα, φρουκτόζης και γλυκόζης, που προκύπτει από την όξινη υδρόλυση της σακχαρόζης. Επομένως μετά την όξινη υδρόλυση η μέτρηση της γλυκόζης μας δίνει την συγκέντρωση της σακχαρόζης. Η προετοιμασία της αντίδραση είναι η εξής:

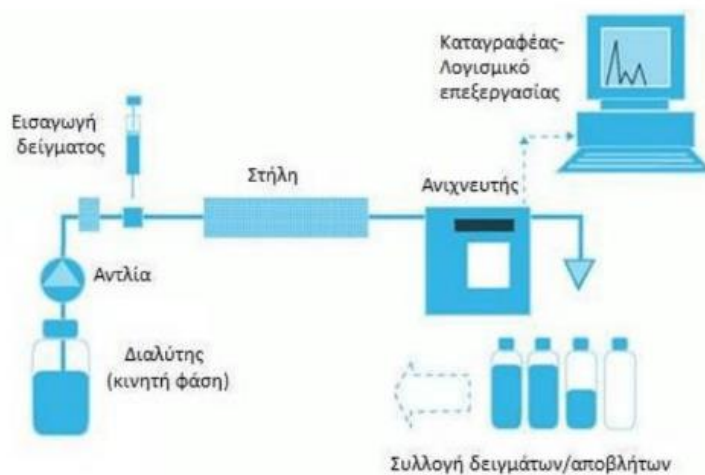
- 1 ml δείγματος στην κατάλυση αραίωση
- 0.1 ml πυκνό HCl

- επώαση για 15 λεπτά στους 90°C
- 0.1 ml πυκνό NaOH (13N)

Στην συνέχεια ακολουθείται η διαδικασία που αναφέρθηκε προηγουμένως για την μέτρηση της γλυκόζης στο φωτόμετρο microplate στα 510 nm.

### 2.2.10 Χρωματογραφική ανάλυση HPLC

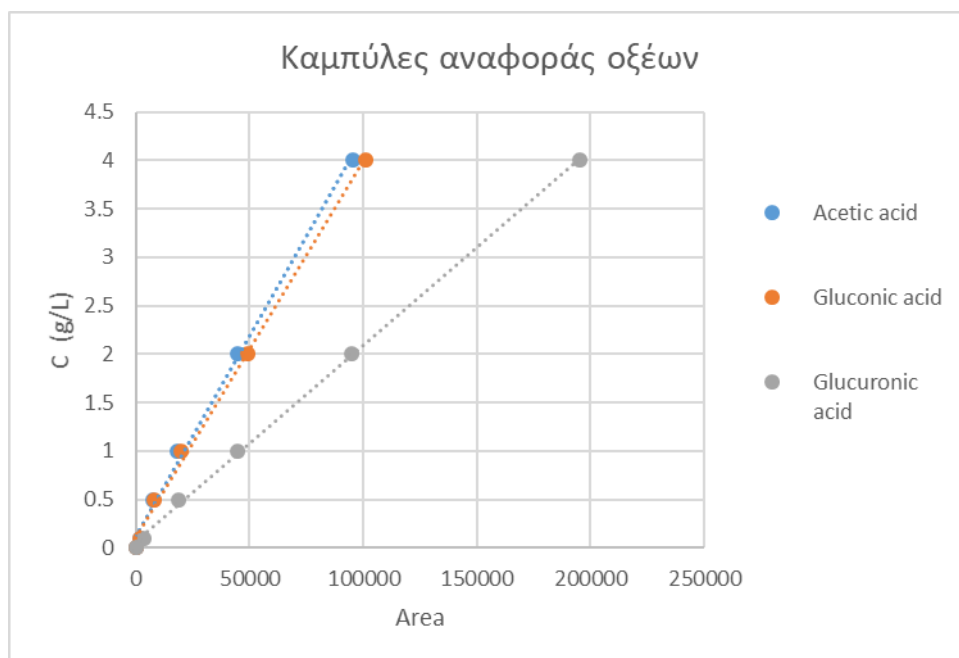
Η βασική αρχή όλων των χρωματογραφικών διαχωρισμών περιλαμβάνει τη διέλευση του δείγματος που βρίσκεται στην κινητή φάση (στο διαλύτη έκλουσης) μέσα από μια στατική φάση (στήλη). Στην υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης ο διαχωρισμός των συστατικών την κινητής φάσης πραγματοποιείται σε διαφορετικούς χρόνους και εξαρτάται από τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ δείγματος, σταθερής φάσης και διαλύτη έκλουσης. Η επιλογή της κατάλληλης κινητής φάσης γίνεται με βάση την δύναμη (solventstrength) και την εκλεκτικότητα (selectivity) του διαλύτη. Όταν η κινητική φάση έχει σταθερή σύσταση η έκλουση είναι ισοκρατική, ενώ όταν μεταβάλλεται βαθμιαία η έκλουση είναι βαθμιδωτή. Η διάταξη μιας συσκευής υγρής χρωματογραφίας αποτελείται από το σύστημα παροχής υγρής φάσης, το σύστημα εισαγωγής του δείγματος, τη στήλη, τον ανιχνευτή και τον καταγραφέα.



Εικόνα 9: Σχηματική απεικόνιση του συστήματος χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης



Η διάταξη που χρησιμοποιήθηκε αποτελείται από σύστημα παροχής διαλύτη Shimadzu LC-20AD, σε συνδυασμό με ανιχνευτή RID-10A, αυτόματο δειγματολήπτη Shimadzu SIL-20A και σύστημα εισαγωγής δεδομένων στον υπολογιστή Lcsolution έκδοση 1.24 SP1, Shimadzu. Η κινητή φάση ήταν θειικό οξύ ( $H_2SO_4$ ) 3 mM με ισοκρατικό πρόγραμμα με ροή 6 ml/min. Η στήλη που χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση των δειγμάτων είναι η Hcolumn. Για τον προσδιορισμό των συγκεντρώσεων καταστρώθηκαν καμπύλες αναφοράς, όπως φαίνεται στο παρακάτω Διάγραμμα. Η καμπύλη αναφοράς του οξικού οξέος είναι  $y=0.000043*x$  με  $R^2=0.9923$ , του γλυκονικού οξέος είναι  $y=0.00004*x$  με  $R^2=0.9939$ , και του γλυκουρονικού οξέος  $y=0.000021*x$  με  $R^2=0.9982$ , όπου  $y$  είναι η συγκέντρωση σε g/L και  $x$  η επιφάνεια που δίνεται από την ολοκλήρωση κάθε κορυφής.

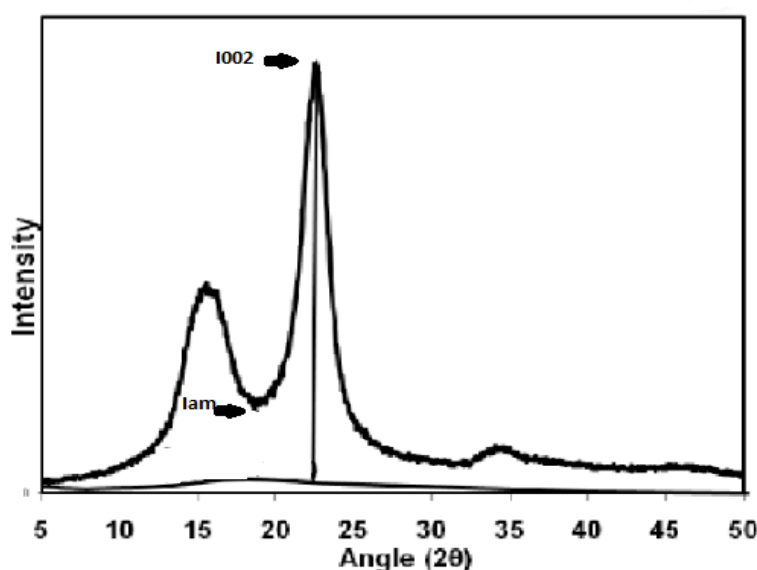


Διάγραμμα 1: Καμπύλες αναφοράς οξικού, γλυκονικού, και γλυκουρονικού οξέος.

### 2.2.11 Μέτρηση κρυσταλλικότητας

Είναι γνωστό ότι μέρος της κυτταρίνης βρίσκεται σε κρυσταλλική μορφή και ένα άλλο μέρος της είναι άμορφο (ημικρυσταλλικό). Στις κρυσταλλικές περιοχές οι αλυσίδες της κυτταρίνης συνδέονται με δεσμούς υδρογόνου γεγονός που δεν υφίσταται στις άμορφες περιοχές. Ο προσδιορισμός του δείκτη κρυσταλλικότητας πραγματοποιήθηκε σε όργανο περίθλασης ακτινών Χ χρησιμοποιώντας ακτινοβολία Cu-Kα. Το δείγμα (κονιορτοποιημένη και αποξηραμένη βακτηριακή κυτταρίνη)

τοποθετείται σε κατάλληλο δειγματοφορέα στο κέντρο του γωνιόμετρου, το οποίο περιστρέφεται με σταθερή ταχύτητα  $\theta$  στο επίπεδο ανάκλασης των ακτίνων X. Με τον τρόπο αυτό η επιφάνεια του δοκιμίου εκτίθεται σε μονοχρωματική ακτινοβολία μήκους κύματος  $\lambda=1.5405 \text{ \AA}$ , ενώ η γωνία  $\theta$  αυξάνεται συνεχώς, με επιλεγόμενο βήμα  $0.01^\circ/\text{sec}$  μεταξύ προεπιλεγμένων τιμών  $2\theta=3-30^\circ$ . Σημειώνεται ότι δεν περιστρέφεται μόνο το δοκίμιο αλλά και ο ανιχνευτής κατά γωνία  $2\theta$ , ώστε να ανιχνεύει τις ανακλώμενες ακτίνες. Έτσι λαμβάνεται διάγραμμα που αποτυπώνει την ένταση της ανακλώμενης ακτινοβολίας συναρτήσει της γωνίας  $2\theta$  από το οποίο προσδιορίζεται ο δείκτης κρυσταλλικότητας.



Εικόνα 10: Διάγραμμα περίθλασης ακτίνων X

Ο δείκτης κρυσταλλικότητας προσδιορίζεται σύμφωνα με την παρακάτω εξίσωση (Segaletal.1959)  $CrI=(I_{002}-I_{am})/I_{002}*100$ , όπου  $I_{002}$  είναι η μέγιστη ένταση του επιπέδου ανάκλασης 002 και  $I_{am}$  η ένταση της άμορφης περιοχής σε γωνία  $2\theta=18^\circ$ .

## 3 ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΚΑΙ ΣΧΟΛΙΑΣΜΟΣ

### 3.1 Επίδραση από την διαφορετική συγκέντρωση της σακχαρόζης

Μελετήθηκε η επίδραση της συγκέντρωσης της πηγής άνθρακα (σακχαρόζη) στην παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης. Εξετάστηκαν οι κάτωθι συγκεντρώσεις: 50 g/L, 75 g/L, 100g/L, και 125 g/L. Τα δοχεία που χρησιμοποιήθηκαν είχαν τα ακόλουθα χαρακτηριστικά:

Διάμετρος: 5.7 cm, Ύψος: 6.2 cm, Εμβαδόν επιφάνειας: 25.5 cm<sup>2</sup>, ειδική επιφάνεια: 0.32 (Εικόνα 10)

Έναρξη ζύμωσης



Τέλος ζύμωσης

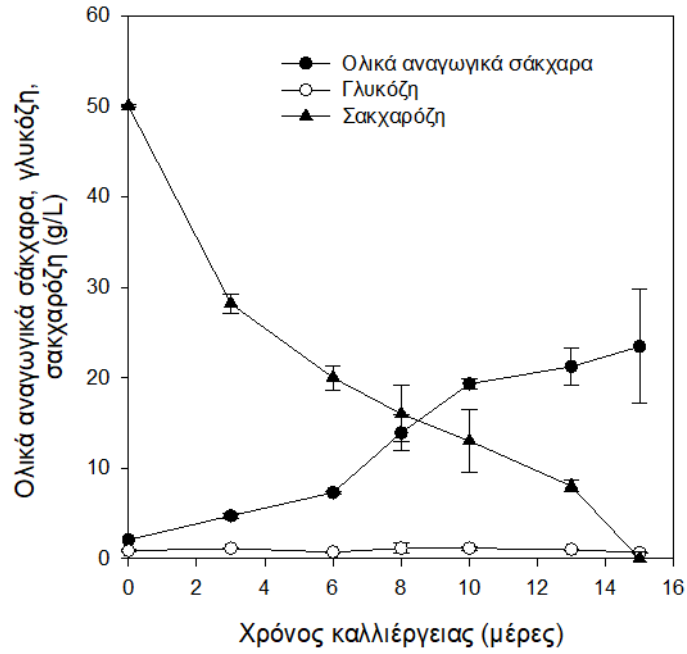


*Εικόνα 11: Δοχείο ζύμωσης*

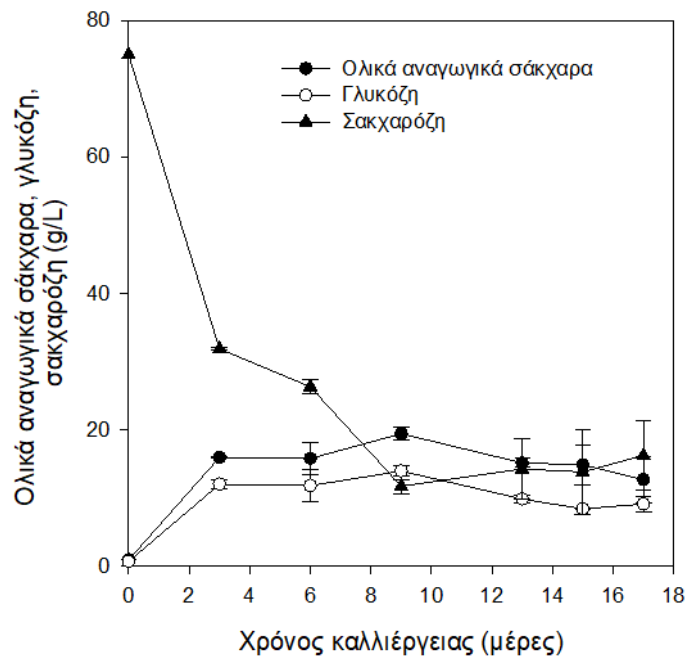
Ακολουθεί η παρουσίαση των αποτελεσμάτων της επίδρασης της συγκέντρωσης της σακχαρόζης στα διάφορα χαρακτηριστικά της ζύμωσης, υπόστρωμα, μικροοργανισμούς, προϊόντα, ολικές φαινολικές ενώσεις και αντιοξειδωτική δράση.

#### 3.1.1 Κατανάλωση υποστρώματος

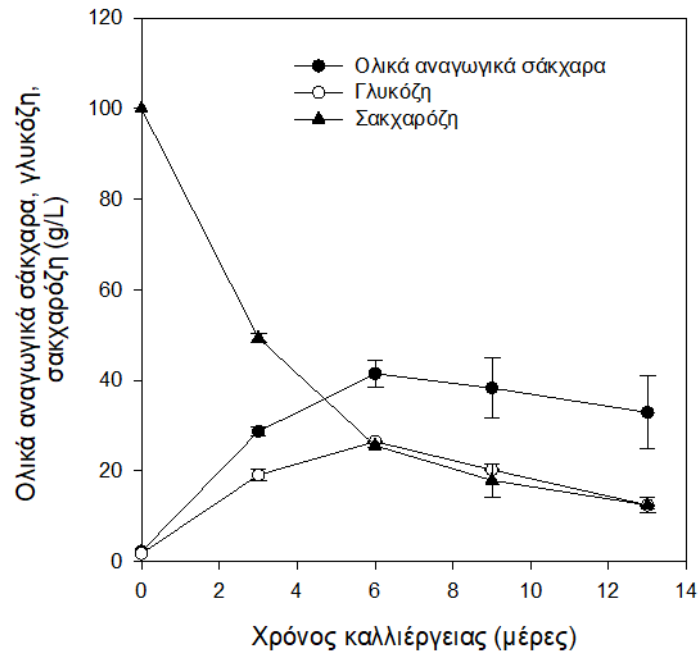
Στα παρακάτω διαγράμματα (Διάγραμμα 2-5) παρουσιάζεται η μεταβολή της συγκέντρωσης σακχαρόζης, γλυκόζης και ολικών αναγωγικών σακχάρων για τις τέσσερις διαφορετικές συγκεντρώσεις σακχαρόζης.



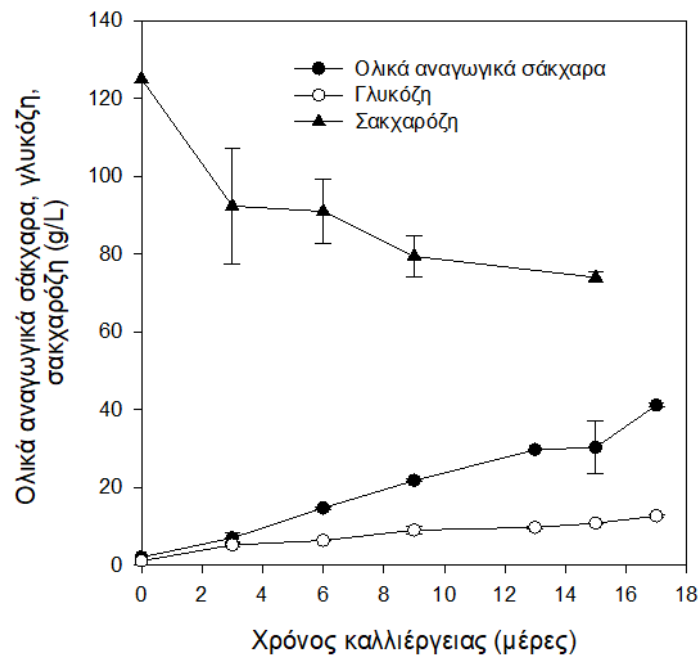
Διάγραμμα 2: Κατανάλωση υποστρώματος για την συγκέντρωση σακχαρόζης 50 g/L



Διάγραμμα 3: Κατανάλωση υποστρώματος για την συγκέντρωση σακχαρόζης 75 g/L



Διάγραμμα 4: Κατανάλωση υποστρώματος για την συγκέντρωση σακχαρόζης 100 g/L



Διάγραμμα 5: Κατανάλωση υποστρώματος για την συγκέντρωση σακχαρόζης 125 g/L

Το ποσοστό υδρόλυσης της σακχαρόζης στα συστατικά της μονοσάκχαρα (γλυκόζη και φρουκτόζη) μειώνεται με αύξηση της αρχικής της συγκέντρωσης (Διαγράμματα 2-5). Η παραχθείσα γλυκόζη αφομοιώνεται ταχύτατα από τους μικροοργανισμούς στην περίπτωση που η συγκέντρωση της σακχαρόζης είναι 50 g/L (Διάγραμμα 1). Με αύξηση της συγκέντρωσης της πηγής άνθρακα (75-125 g/L) παρατηρείται ότι η παραχθείσα γλυκόζη δεν καταναλώνεται πλήρως (Διαγράμματα 3-5).

Η σακχαρόζη είναι η πιο κοινή πηγή άνθρακα για την ζύμωση της κομπούχας. Ένα σημαντικό ποσό της δεν υδρολύεται κατά την διαδικασία της ζύμωσης (Malbasa et al., 2002). Έρευνες έχουν δείξει ότι 34.06% της σακχαρόζης δεν έχει υδρολυθεί μετά την 7<sup>η</sup> ημέρα της ζύμωσης, και 19.28% μετά την 21<sup>η</sup> ημέρα. Οι Chen&Liu (2000) προσδιόρισαν ότι το περιεχόμενο σε σακχαρόζη μειώνεται γραμμικά κατά την διάρκεια των πρώτων 30 ημερών, στην συνέχεια η μείωση είναι πιο αργή. Ο Yavari et al. (2010) κατέληξε στο ότι η κατανάλωση της σακχαρόζης, μετά την 4<sup>η</sup> ημέρα της ζύμωσης, άρχισε να επιταχύνεται μέχρι την 14<sup>η</sup> ημέρα της ζύμωσης όπου μετρήθηκε η πιο μικρή συγκέντρωση σακχαρόζης (2.1 g/L). Ο Malbasa et al. (2002) μέτρησε το περιεχόμενο σε γλυκόζη και φρουκτόζη και οι υψηλότερες τιμές βρέθηκαν 19.6% (την 14<sup>η</sup> ημέρα) και 10.25% (την 10<sup>η</sup> ημέρα), αντίστοιχα. Ο Loncar et al. (2000) κατέληξε στο ότι η σακχαρόζη, η γλυκόζη και η φρουκτόζη δεν καταναλώνονται πλήρως μετά την 21<sup>η</sup> ημέρα της ζύμωσης και επιβεβαίωσε ότι η φρουκτόζη μεταβολίζεται πριν από την γλυκόζη. Οι Chen&Liu (2000) αποδεικνύουν ότι η γλυκόζη (0.041%/ημέρα) δεν παράγεται με ανάλογο ρυθμό με την φρουκτόζη (0.085%/ημέρα) αλλά σε μικρότερα ποσά.

### 3.1.2 Μεταβολή του πληθυσμού των βιώσιμων βακτηρίων και ζυμών στον ζωμό του τσαγιού κατά την διάρκεια της βακτηριακής σύνθεσης της μικροβιακής κυτταρίνης

Στους Πίνακες που ακολουθούν παρουσιάζεται η μεταβολή του πληθυσμού των μικροοργανισμών που υπάρχουν στον υγρό ζωμό με τον χρόνο της ζύμωσης για τις τέσσερις διαφορετικές συγκεντρώσεις σακχαρόζης. Τα είδη των μικροοργανισμών που εξετάστηκαν είναι τα βακτήρια του οξικού οξέος (AAB), τα βακτήρια του γαλακτικού οξέος (LAB), οι ζύμες (Yeast), και τα ολικά αερόβια βακτήρια (TAB).

Πίνακας 7: Μεταβολή μικροοργανισμών για συγκέντρωση σακχαρόζης 50 g/L

Χρόνος ζύμωσης (ημέρες)	AAB (cfu/ml)	Yeast (cfu/ml)	TAB (cfu/ml)
0	1.98E+004	8.80E+004	Δ.Π.
3	9.50E+004	6.60E+004	1.00E+005
6	2.48E+005	3.45E+005	1.30E+005
9	4.28E+005	Δ.Π.	1.00E+004
13	3.28E+005	5.55E+005	Δ.Π.
15	3.33E+005	9.70E+005	8.05E+005
17	6.90E+005	9.65E+005	5.33E+005

Δ.Π. : δεν προσδιορίστηκαν

Τα AAB αυξάνονται μέχρι την 9<sup>η</sup> ημέρα της ζύμωσης και ο κυτταρικός τους πληθυσμός παραμένει σταθερός μέχρι το τέλος της ζύμωσης. Οι ζύμες αυξάνονται από την αρχή μέχρι το τέλος της ζύμωσης. Τα TAB αυξάνονται από την αρχή μέχρι το τέλος της ζύμωσης με μια σημαντική μείωση κατά μια τάξη μεγέθους την 9<sup>η</sup> ημέρα της ζύμωσης.

Πίνακας 8: Μεταβολή μικροοργανισμών για συγκέντρωση σακχαρόζης 75 g/L

Χρόνος ζύμωσης (ημέρες)	AAB (cfu/ml)	Yeast (cfu/ml)	TAB (cfu/ml)	LAB (cfu/ml)
0	3.65E+005	2.20E+005	5.45E+005	3.15E+005
3	5.93E+005	7.75E+006	4.88E+005	4.25E+006
6	2.00E+005	6.00E+005	2.25E+004	3.53E+006
9	Δ.Π.	9.75E+006	5.00E+004	1.25E+006
13	2.75E+004	1.48E+006	1.50E+005	7.08E+005
15	2.50E+003	8.95E+005	5.00E+003	7.18E+005

Δ.Π. : δεν προσδιορίστηκαν

Τα AAB αυξάνονται από την αρχή της ζύμωσης μέχρι την 6<sup>η</sup> ημέρα και στην συνέχεια μειώνονται σημαντικά μέχρι το τέλος της ζύμωσης κατά δυο τάξεις μεγέθους. Οι ζύμες ακολουθούν παρόμοια συμπεριφορά αυξάνονται μέχρι την 9<sup>η</sup> μέρα της ζύμωσης και στην συνέχεια ο κυτταρικός πληθυσμός μειώνεται. Ακριβώς την ίδια συμπεριφορά ακολουθούν και τα LAB. Ο πληθυσμός των TAB παρουσιάζει μία αρχική μείωση και αύξηση προς τα τελικά στάδια της ζύμωσης.

*Πίνακας 9: Μεταβολή μικροοργανισμών για συγκέντρωση σακχαρόζης 100 g/L*

<b>Χρόνος ζύμωσης (ημέρες)</b>	<b>AAB (cfu/ml)</b>	<b>Yeast (cfu/ml)</b>	<b>TAB (cfu/ml)</b>	<b>LAB (cfu/ml)</b>
<b>0</b>	5.00E+003	3.70E+004	3.00E+004	2.25E+004
<b>6</b>	1.90E+005	4.33E+006	1.46E+006	4.53E+006
<b>9</b>	1.25E+005	3.00E+006	1.25E+004	4.33E+006
<b>13</b>	1.25E+004	6.63E+005	5.00E+003	8.45E+005

Τα AAB αυξάνονται μέχρι την 6<sup>η</sup> ημέρα της ζύμωσης και στην συνέχεια μειώνονται μέχρι το τέλος της ζύμωσης, παρά την μείωση ο αριθμός των κυττάρων τους είναι μεγαλύτερος κατά μια τάξη μεγέθους από αυτόν στην αρχή της ζύμωσης. Σε αυτήν την ζύμωση και οι υπόλοιποι μικροοργανισμοί Yeast, LAB και TAB αυξάνονται μέχρι την 6<sup>η</sup> ημέρα της ζύμωσης και μειώνονται από την 6<sup>η</sup> ημέρα μέχρι το τέλος της ζύμωσης. Ο αριθμός των κυττάρων στο τέλος της ζύμωσης των ζυμών και των LAB είναι μεγαλύτερος κατά μια τάξη μεγέθους από αυτό στην αρχή της ζύμωσης, ενώ ο αριθμός των κυττάρων των TAB είναι μικρότερος κατά μια τάξη μεγέθους από αυτόν στην αρχή της ζύμωσης.

*Πίνακας 10: Μεταβολή μικροοργανισμών για συγκέντρωση σακχαρόζης 125 g/L*

<b>Χρόνος ζύμωσης (ημέρες)</b>	<b>AAB (cfu/ml)</b>	<b>Yeast (cfu/ml)</b>	<b>TAB (cfu/ml)</b>	<b>LAB (cfu/ml)</b>
<b>0</b>	2.00E+004	1.30E+004	3.50E+004	1.05E+004
<b>6</b>	7.50E+003	4.00E+005	5.00E+003	4.00E+005
<b>9</b>	3.25E+004	1.30E+005	1.25E+004	1.10E+006
<b>13</b>	2.25E+004	1.50E+004	4.25E+004	1.85E+005

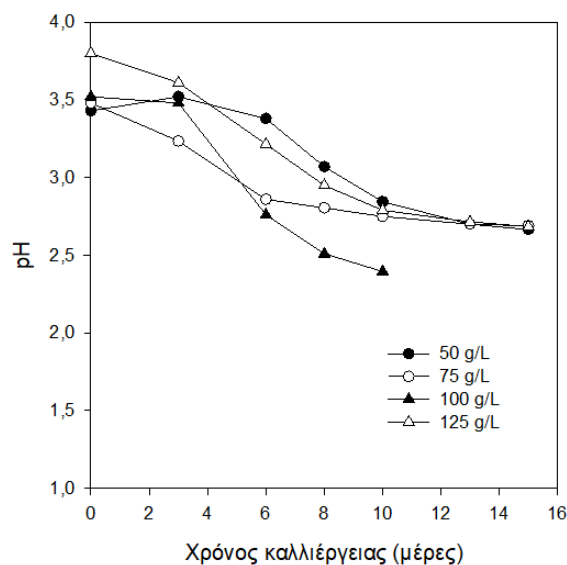


Τα AAB και τα TAB μειώνεται από την αρχή της ζύμωσης μέχρι την 6<sup>η</sup> ημέρα και στην συνέχεια αυξάνονται μέχρι το τέλος της ζύμωσης με αριθμούς κυττάρων στο τέλος της ζύμωσης παρόμοιους με αυτούς στην αρχή της ζύμωσης. Οι ζύμες αυξάνονται από την αρχή της ζύμωσης μέχρι της 6<sup>η</sup> ημέρα και στη συνέχεια μειώνονται έως το τέλος της ζύμωσης, όπου ο αριθμός των κυττάρων τους είναι παρόμοιος με αυτόν στην αρχή της ζύμωσης. Τα LAB αυξάνονται από την αρχή της ζύμωσης μέχρι την 9<sup>η</sup> ημέρα και στην συνέχεια μειώνονται έως το τέλος της ζύμωσης, όπου ο αριθμός τους είναι παρόμοιος με αυτόν στην αρχή της ζύμωσης.

Σε όλες τις ζυμώσεις παρατηρείται μεγαλύτερη ποσότητα ζυμών και βακτηριών του γαλακτικού οξέος από αυτήν των TAB και AAB κατά μια με δύο τάξεις μεγέθους, όπως παρατηρήθηκε και από τους Goh et al., (2012). Ο συνολικός μικροβιακός πληθυσμός παρατηρείται ότι είναι μεγαλύτερος στις ζυμώσεις με συγκέντρωση σακχαρόζης 75 και 100 g/L. Επειδή η κομπούχα είναι μια συμβιωτική καλλιέργεια βακτηρίων και ζυμών ο αριθμός των βιώσιμων κυττάρων τους μπορεί να διαφέρει από ζύμωση σε ζύμωση καθώς εξαρτάται από πολλούς παράγοντες (Goh et al., 2012). Στην βιβλιογραφία αναφέρεται αύξηση του αριθμού των κυττάρων των ζυμών και των βακτηριών μέχρι την 6-9<sup>η</sup> ημέρα της ζύμωσης και στην συνέχεια μείωση μέχρι το τέλος της ζύμωσης (Jayabalan et. al., 2015, Goh, et al., 2012). Αυτό το φαινόμενο παρατηρείται και στις τέσσερις ζυμώσεις με διαφορετικές συγκεντρώσεις σακχαρόζης εκτός από αυτήν με τα 50 g/L σακχαρόζη, όπου παρατηρείται συνεχής αύξηση καθόλη την διάρκεια της ζύμωσης.

### 3.1.3 pH

Στο παρακάτω Διάγραμμα παρουσιάζεται η μεταβολή του pH συναρτήσει του χρόνου ζύμωσης για τις τέσσερις διαφορετικές συγκεντρώσεις της σακχαρόζης.



Διάγραμμα 6: Μεταβολή του pH με τον χρόνο ζύμωσης για τις διαφορετικές συγκεντρώσεις της σακχαρόζης

Σε όλες τις ζυμώσεις παρατηρείται μείωση του pH με παρόμοιο ρυθμό, σημαντική μείωση από το αρχικό pH τις πρώτες 6 ημέρες της ζύμωσης και στην συνέχεια σταδιακή μείωση και σταθεροποίηση περίπου στην τιμή του pH 2.7 στο τέλος της ζύμωσης. Κατά την διάρκεια της ζύμωσης, το pH μειώνεται δραστικά εξαιτίας της παραγωγής οργανικών οξέων. Το κύριο οξύ που παράγεται είναι το οξικό οξύ. Αρχικά η φρουκτόζη μετατρέπεται σε αιθανόλη από τον πληθυσμό των ζυμών και στην συνέχεια ο πληθυσμός των AAB μετατρέπει την παραχθείσα αιθανόλη σε οξικό οξύ. Επιπλέον η γλυκόζη μετατρέπεται από τα AAB σε γλυκονικό και γλυκουρονικό οξύ. Σύμφωνα με τους Jayabalan et al., (2015) η δραστική μείωση του pH τις πρώτες μέρες της ζύμωσης οφείλεται στην παραγωγή οξικού οξέος. Ο διαφορετικός ρυθμός μείωσης του pH για τις διαφορετικές συγκεντρώσεις της σακχαρόζης οφείλεται στον διαφορετικό πληθυσμό AAB σε αυτές τις ζυμώσεις (Πίνακες 7-10).

### 3.1.4 Μικροβιακή κυτταρίνη

Στην καλλιέργεια της κομπούχας οι πρωκαρυώτες μικροοργανισμοί που βρίσκονται σε αφθονία είναι βακτήρια και ανήκουν στα γένη *Acetobacter* και *Gluconobacter*. Το κύριο βακτήριο είναι το *Acetobacter xylinum*, το οποίο παράγει ένα κυτταρινικό δίκτυο που επιπλέει στην επιφάνεια του ζυμωμένου ζωμού (Markov et al., 2001). Η

μεμβράνη μικροβιακής κυτταρίνης δημιουργείται στην διεπιφάνεια υγρού-αέρα καθώς τα AAB παράγουν μικροβιακή κυτταρίνη μόνο στην περιοχή που έρχεται σε επαφή με τον αέρα. Η μικροβιακή κυτταρίνη παράγεται πρώτα εξωτερικά μέχρι να καλυφθεί πλήρως η επιφάνεια του διαλύματος και στην συνέχεια μεγαλώνει σε πάχος. Έτσι το ανώτερο στρώμα κυτταρίνης θεωρείται ότι είναι το νεότερο.

### Μη καθαρή μικροβιακή κυτταρίνη      Καθαρή μικροβιακή κυτταρίνη



Εικόνα 12: Η μικροβιακή κυτταρίνη πριν και μετά τον καθαρισμό της

Η απόδοση των καλλιιεργειών σε μικροβιακή κυτταρίνη παρουσιάζεται στον Πίνακα 11. Η απόδοση της κυτταρίνης ορίστηκε ως η συγκέντρωση ξηρής κυτταρίνης (g/L) προς την αρχική συγκέντρωση σακχαρόζης (g/L).

Πίνακας 11: Απόδοση (%) μικροβιακής κυτταρίνης κατά την διάρκεια της ζύμωσης για τις διαφορετικές συγκεντρώσεις σακχαρόζης

Χρόνος ζύμωσης (ημέρες)	Απόδοση κυτταρίνης (%), 50 g/L	Απόδοση κυτταρίνης (%), 75 g/L	Απόδοση κυτταρίνης (%), 100 g/L	Απόδοση κυτταρίνης (%), 125 g/L
3	0	1.85	1.41	1.08
6	5.08	8.05	7.27	2.87
9	11.17	16.84	14.12	6.81
13	11.03	24.57	19.69	10.82
15	10.17	25.74	Δ.Π.	15.37

Μεγαλύτερη απόδοση σε μικροβιακή κυτταρίνη παρατηρείται για την συγκέντρωση σακχαρόζης 75 g/L με απόδοση 25.74% για την 15<sup>η</sup> ημέρα της ζύμωσης.

Οι μεγάλες συγκεντρώσεις σακχαρόζης οδηγούν στην παραγωγή περισσότερων μεταβολικών προϊόντων κατά την διαδικασία της ζύμωσης, αυτό πιθανώς να εξηγεί την μικρότερη παραγωγή προϊόντος (μικροβιακής κυτταρίνης). Η μεγαλύτερη ποσότητα μεταβολικών προϊόντων είναι πιθανό να παρεμποδίζουν την βακτηριακή σύνθεση της κυτταρίνης. Μια άλλη πιθανή εξήγηση είναι ο άνισος ρυθμός μεταφοράς των θρεπτικών ουσιών από τα κύτταρα, και ο ρυθμός κατανάλωσης τους. Το ποσοστό απομάκρυνσης δυνητικά επιβλαβών ουσιών εξισορροπεί την παραγωγή μικροβιακής κυτταρίνης (Goh et al., 2012).

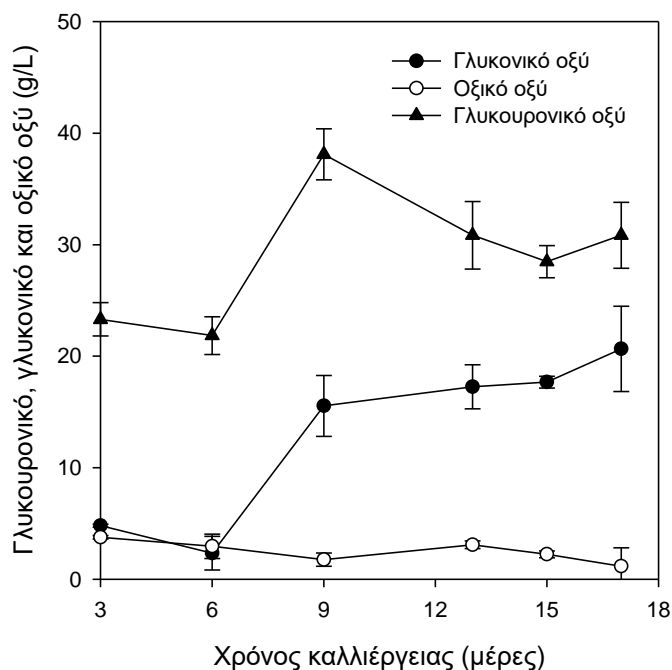
### 3.1.5 Άλλα μεταβολικά προϊόντα

Γλυκονικό οξύ ή πενταϋδροξυκαπροϊκό οξύ (C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>7</sub>), υπάρχει στην φύση στα φυτά, στα φρούτα, στο μέλι, στο ρύζι, στο κρέας, στο ξύδι, και άλλες φυσικές πηγές. Τα αλκαλικά άλατα του γλυκονικού οξέος όπως το γλυκονικό ασβέστιο ή το γλυκονικό νάτριο έχουν πολλαπλές εφαρμογές στην χημική, φαρμακευτική, κατασκευαστική βιομηχανία καθώς και στην βιομηχανία ποτών και τροφίμων. Εξαιτίας της χαμηλής τοξικότητας, χαμηλής διαβρωτικότητας, και της μεγάλης ικανότητας να δημιουργεί υδατοδιαλυτά σύμπλοκα με δισθενή και τρισθενή ιόντα μετάλλων, το γλυκονικό νάτριο έχει αναγνωριστεί ως GRAS (Generally Recognized As Safe) από τον USFDA (Food and Drug Administration). Επίσης έχει αναγνωρισθεί ως γενικά επιτρεπόμενο πρόσθετο τροφίμων (E574) από το Ευρωπαϊκό Κοινοβούλιο και Συμβούλιο. Όπως και άλλα οργανικά οξέα, το γλυκονικό οξύ έχει μεγάλο εύρος χρήσεων που εξαρτώνται από την δομή του, χρησιμοποιείται στην βιομηχανία τροφίμων, την φαρμακευτική βιομηχανία καθώς και στην κλωστοϋφαντουργία (Luciana et al., 2018).

Αρχικά και κατά την διάρκεια της ζύμωσης παράγεται γλυκόζη, από την υδρόλυση της σακχαρόζης, η οποία ακολουθεί δύο μεταβολικά μονοπάτια, στο ένα οξειδώνεται προς γλυκονικό οξύ και περαιτέρω σε γλυκουρονικό οξύ και στο άλλο χρησιμοποιείται για την παραγωγή της μικροβιακής κυτταρίνης. Η κατανάλωση της γλυκόζης εξαρτάται από τους μικροοργανισμούς που επικρατούν στον ζυμό. Τα βακτήρια του οξικού οξέος οξειδώνουν την γλυκόζη σε γλυκονικό και γλυκουρονικό

οξύ ενώ ένα το βακτήριο *Acetobacter xylinum* που αναταξινομήθηκε ως *Gluconacetobacter xylinus* και προσφάτως ως *Komagataeibacter xylinus* είναι υπεύθυνο για την παραγωγή της μικροβιακής κυτταρίνης (Villareal-soto et. al. 2018).

Η μεταβολή των οργανικών οξέων κατά τη διάρκεια της ζύμωσης παρουσιάζεται στο Διάγραμμα

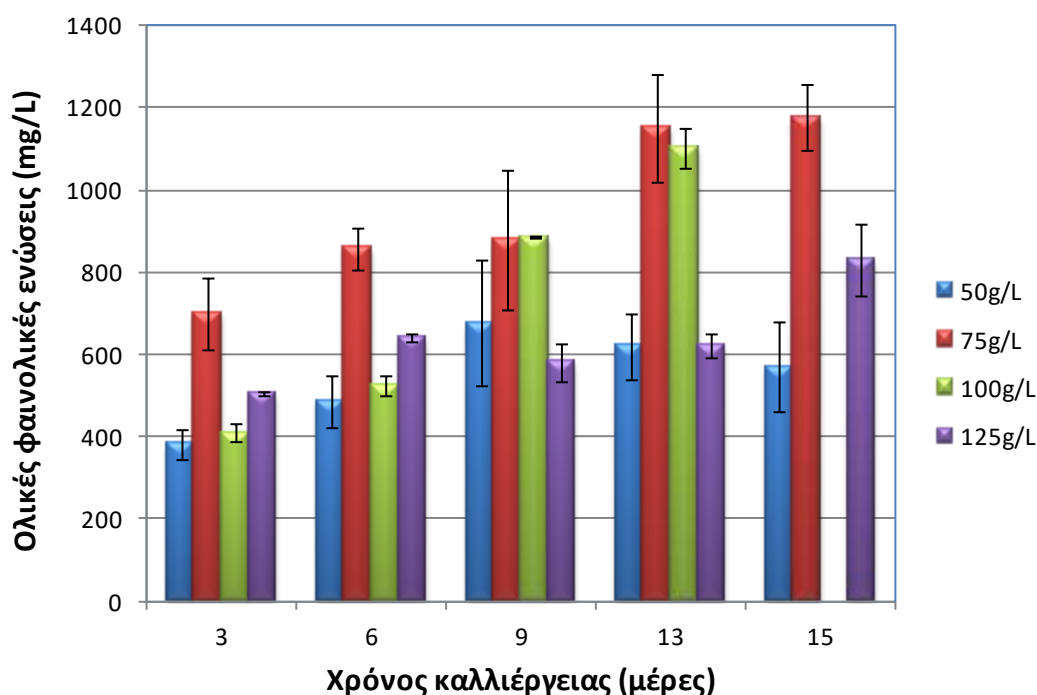


Διάγραμμα 7: Μεταβολή οξέων κατά την διάρκεια της ζύμωσης για συγκέντρωση σακχαρόζης 50g/L

Για το οξικό οξύ παρατηρείται σχεδόν σταθερή συγκέντρωση 3-5 g/L καθόλη την διάρκεια της ζύμωσης. Στο Διάγραμμα 7 παρατηρείται αύξηση της συγκέντρωσης του γλυκονικού και του γλυκουρονικού οξέος από την 6<sup>η</sup> μέχρι την 9<sup>η</sup> ημέρα και στην συνέχεια μείωση και σταθεροποίηση του γλυκουρονικού οξέος και σταθεροποίηση του γλυκονικού οξέος. Η παραγωγή αυτών των οξέων πραγματοποιείται με την οξείδωση της γλυκόζης και σχετίζεται άμεσα με τον πληθυσμό των βακτηρίων του οξικού οξέος AAB, όπως αναφέρθηκε προηγουμένως. Τα AAB στην ζύμωση με συγκέντρωση σακχαρόζης 50 g/L αυξάνονται καθόλη την διάρκεια της ζύμωσης μέχρι το τέλος της. Αυτό εξηγεί το φαινόμενο αύξησης του γλυκονικού και του γλυκουρονικού οξέος, καθώς και η μικρή απόδοση σε μικροβιακή κυτταρίνη που οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η γλυκόζη καταναλώνεται για την παραγωγή αυτών των οξέων.

### 3.1.6 Επίδραση στις ολικές φαινολικές ενώσεις

Στο παρακάτω Διάγραμμα παρουσιάζεται η μεταβολή της συγκέντρωσης των ολικών φαινολικών ενώσεων συναρτήσει του χρόνου ζύμωσης για τις τέσσερις διαφορετικές συγκεντρώσεις. Η συγκέντρωση ολικών φαινολικών ενώσεων στο μαύρο τσάι βρέθηκε ίση με 717mg/L.



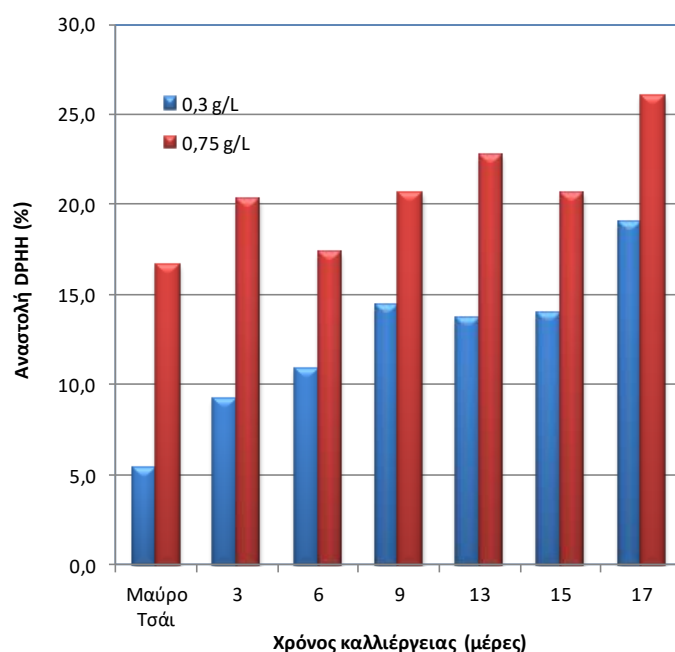
Διάγραμμα 8: Μεταβολή της συγκέντρωσης των ολικών φαινολικών (mg/L) κατά την διάρκεια της ζύμωσης για τις 4 συγκεντρώσεις σακχαρόζης

Η πηγή πολυφαινολών στην κομπούχα είναι το υπόστρωμα του τσαγιού, επομένως το μαύρο τσάι. Οι ολικές φαινολικές ενώσεις αυξάνονται προοδευτικά κατά την διάρκεια της ζύμωσης. Οι πολυφαινολικές ενώσεις που υπάρχουν στο μαύρο τσάι διασπώνται σε μόρια μικρότερου μοριακού βάρους από την δράση των ενζύμων που απελευθερώνονται από τα κύτταρα των μικροοργανισμών, αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση των ολικών φαινολικών ενώσεων στο ζυμωμένο τσάι (Jayabalan et. al., 2015). Για την συγκέντρωση 50 g/L παρατηρείται μικρή αύξηση μέχρι την 9<sup>η</sup> ημέρα της ζύμωσης στην συνέχεια μικρή μείωση μέχρι την 15<sup>η</sup> ημέρα. Για την συγκέντρωση 75 g/L παρατηρείται συνεχής αύξηση της συγκέντρωσης των ολικών φαινολικών ενώσεων από την αρχή μέχρι το τέλος της ζύμωσης με μια μικρή μείωση την 6<sup>η</sup>

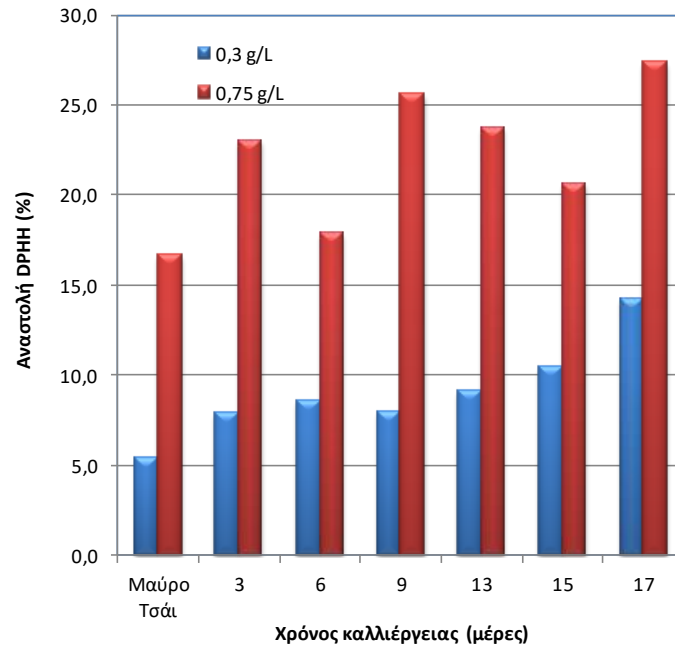
ημέρα της ζύμωσης. Για την συγκέντρωση 100 g/L παρατηρείται συνεχής αύξηση από την αρχή μέχρι το τέλος της ζύμωσης. Τέλος για την συγκέντρωση 125 g/L παρατηρείται μικρή αύξηση μέχρι την 6<sup>η</sup> ημέρα και στην συνέχεια σχεδόν σταθερή συγκέντρωση για τις υπόλοιπες μέρες με εξαίρεση την 13<sup>η</sup> ημέρα που σημειώνεται μικρή αύξηση στην συγκέντρωση των ολικών φαινολικών ενώσεων. Η μέγιστη συγκέντρωση φαινολικών ενώσεων παρατηρήθηκε στις συγκεντρώσεις 75 και 100 g/L και ήταν ίση με 1100 mg/L.

### 3.1.7 Αντιοξειδωτική ικανότητα του ζυμωμένου προϊόντος

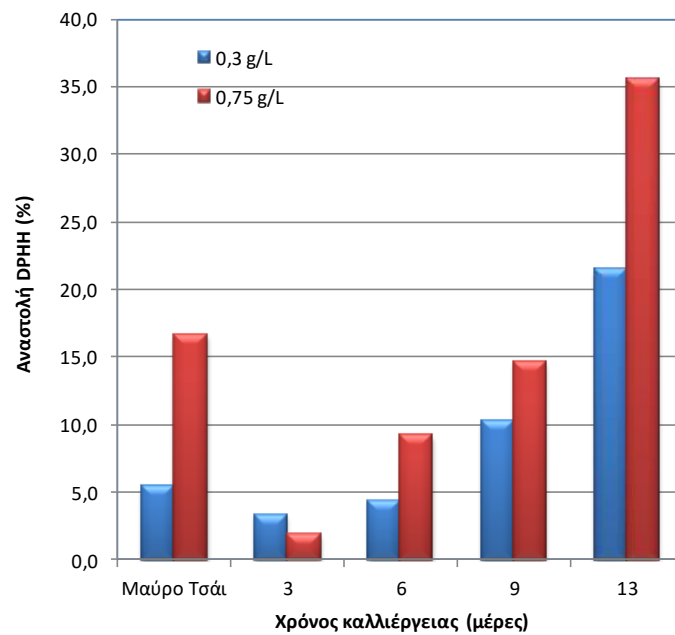
Στα διαγράμματα που ακολουθούν παρουσιάζεται η ποσοστιαία αναστολή του DPPH % συναρτήσει του χρόνου ζύμωσης.



Διάγραμμα 9: Αναστολή DPPH (%) κατά την διάρκεια της ζύμωσης για συγκεντρώση σακχαρόζης 50 g/L.

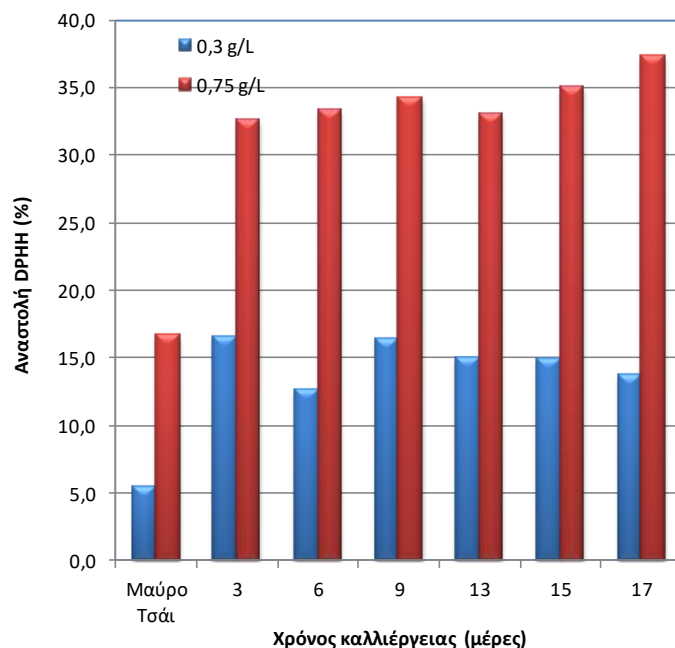


Διάγραμμα 10: Αναστολή DPPH (%) κατά την διάρκεια της ζύμωσης για συγκέντρωση σακχαρόζης 75 g/L



Διάγραμμα 11: Αναστολή DPPH (%) κατά την διάρκεια της ζύμωσης για συγκέντρωση σακχαρόζης 100 g/L.





Διάγραμμα 12: Αναστολή DPPH (%) κατά την διάρκεια της ζύμωσης για συγκέντρωση σακχαρόζης 125g/L.

Η αντιοξειδωτική ικανότητα σχετίζεται με την συγκέντρωση των ολικών φαινολικών ενώσεων, καθώς αυτές είναι υπεύθυνες για την δέσμευση των ελεύθερων ριζών που έχουν οξειδωτική δράση. Επομένως αναμένεται η παρεμπόδιση του DPPH να είναι ανάλογη με την συγκέντρωση των ολικών φαινολικών ενώσεων (Διαγράμματα 9, 10, 11 και 12 με το Διάγραμμα 8). Το ποσοστό αναστολής του DPPH κυμάνθηκε από 25-35% στο τέλος της ζύμωσης. Επιπλέον για όλες τις ζυμώσεις η αντιοξειδωτική ικανότητα είναι μεγαλύτερη από αυτήν του σκέτου μαύρου τσαγιού επομένως η ζύμωση αυξάνει την αντιοξειδωτική ικανότητα του αφεψήματος.

### 3.2 Επίδραση του αερισμού

Για την μελέτη της επίδρασης του αερισμού στη ζύμωση επιλέχθηκαν τρία δοχεία με διαφορετικές διαστάσεις, ώστε να υπάρχει διαφορετική επιφάνεια που έρχεται σε επαφή με το οξυγόνο. Το εμβόλιο ήταν το ίδιο για όλα τα δοχεία και ο όγκος υγρού που το τοποθετήθηκε σε κάθε δοχείο ήταν με αναλογία όγκου υγρού 1/2,5, όγκος υγρού προς τον συνολικό όγκο χωρητικότητας του δοχείου. Το δοχείο Α είναι ένα ογκομετρικός κύλινδρος των 50 ml, το δοχείο Β είναι το δοχείο που χρησιμοποιήθηκε

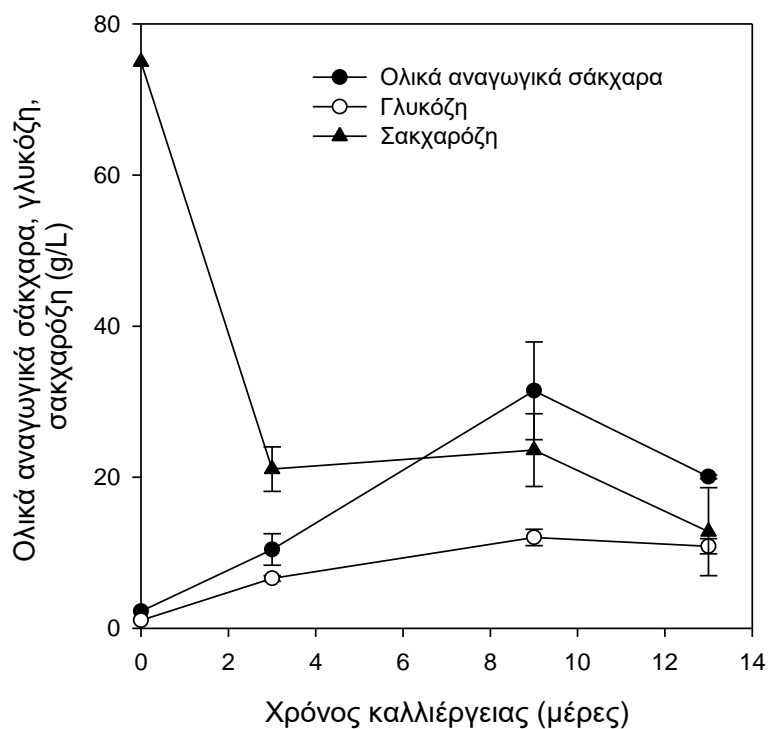
και στα προηγούμενα πειράματα και το δοχείο Γ είναι παρόμοιο με το δοχείο Β σε σχήμα με μεγαλύτερη διάμετρο. Στον παρακάτω πίνακα αναγράφονται οι διαστάσεις των τριών δοχείων.

Πίνακας 12: Χαρακτηριστικά στοιχεία των διαφορετικών δοχείων

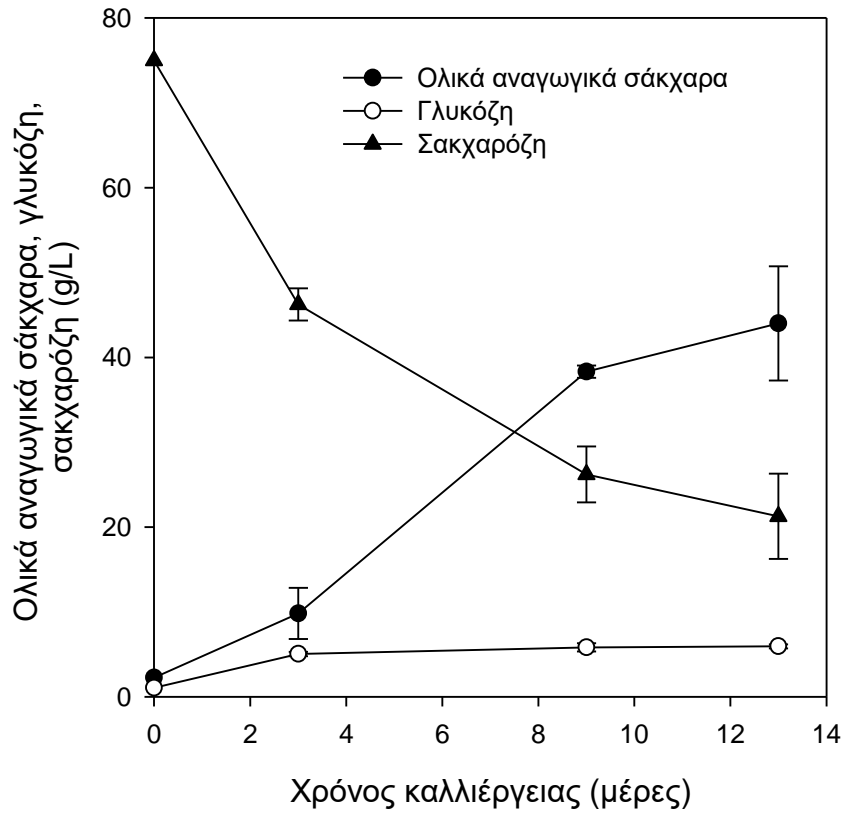
Δοχείο	Διάμετρος (cm)	Ύψος (cm)	Επιφάνεια (cm <sup>2</sup> )	Ειδική επιφάνεια επαφής (cm <sup>-1</sup> )
A	2.2	17.2	3.79	0.14
B	5.7	6.2	25.50	0.32
Γ	7.6	4	45.34	0.43

### 3.2.1 Κατανάλωση υποστρώματος

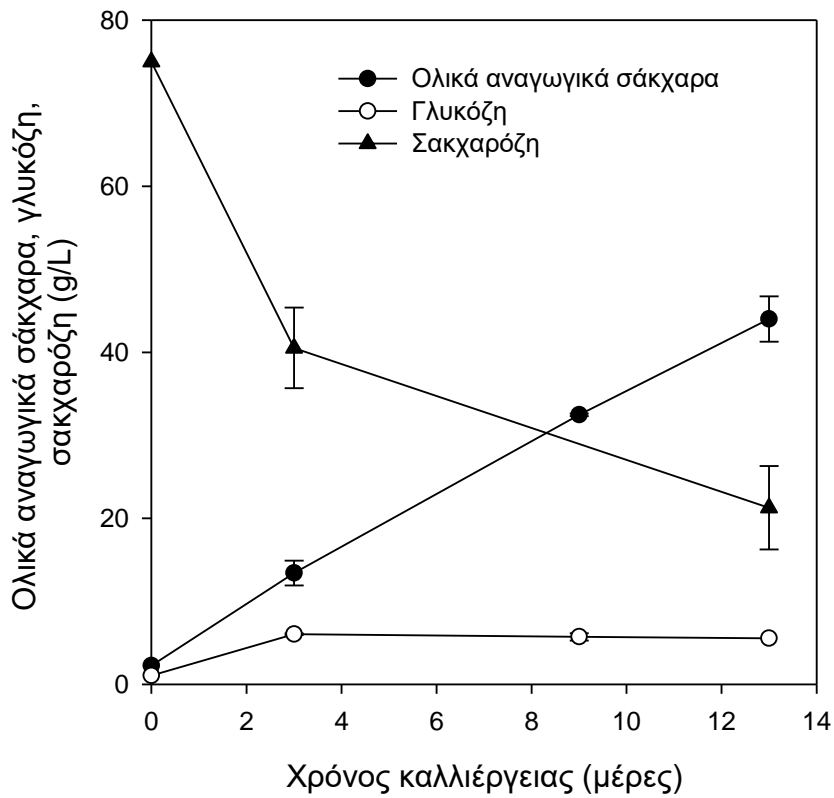
Στα παρακάτω διαγράμματα (Διάγραμμα 13-15) παρουσιάζεται η μεταβολή της συγκέντρωσης σακχαρόζης, γλυκόζης και ολικών αναγωγικών σακχάρων για διαφορετικά δοχεία.



Διάγραμμα 13: Κατανάλωση υποστρώματος για τον τύπο Δοχείου A



Διάγραμμα 14: Κατανάλωση υποστρώματος για τον τύπο Δοχείου Β



Διάγραμμα 15: Κατανάλωση υποστρώματος για τον τύπο Δοχείου Γ

Μεγαλύτερη υδρόλυση σακχαρόζης παρατηρείται στο Δοχείο Α με την μικρότερη ειδική επιφάνεια επαφής. Στα δοχεία Β και Γ παρατηρείται επίσης υδρόλυση της σακχαρόζης με μεγαλύτερη τελική συγκέντρωση σακχαρόζης. Η παραχθείσα γλυκόζη στο δοχείο Α αυξάνεται σταδιακά με τον χρόνο ενώ στα Β και Γ αυξάνεται αρχικά και στην συνέχεια παραμένει σταθερή. Αυτό συμβαίνει διότι στα δοχεία Β και Γ καταναλώνεται για την παραγωγή μικροβιακής κυτταρίνης και οργανικών οξέων. Επομένως η μεγαλύτερη ειδική επιφάνεια επαφής βοηθάει στην κατανάλωση της γλυκόζης για την παραγωγή μεταβολιτών και μικροβιακής κυτταρίνης.

### 3.2.2 Μεταβολή του πληθυσμού των βιώσιμων βακτηρίων και ζυμών στον ζυμό του τσαγιού κατά την διάρκεια της βακτηριακής σύνθεσης της μικροβιακής κυτταρίνης

Στους Πίνακες που ακολουθούν παρουσιάζεται η μεταβολή των μικροοργανισμών που υπάρχουν στον υγρό ζυμό με τον χρόνο της ζύμωσης για τα τρία διαφορετικά δοχεία.

*Πίνακας 13: Μεταβολή μικροοργανισμών για το Δοχείο Α*

Χρόνος ζύμωσης (ημέρες)	AAB (cfu/ml)	Yeast (cfu/ml)	TAB (cfu/ml)	LAB (cfu/ml)
0	1.00E+004	2.60E+004	5.50E+004	3.85E+004
3	4.25E+004	2.25E+005	1.75E+004	2.25E+005
9	7.15E+005	2.80E+006	8.33E+005	2.80E+006
13	1.50E+004	2.15E+006	3.50E+004	2.15E+006

Τα AAB και τα TAB αυξάνονται από την αρχή της ζύμωσης μέχρι την 9<sup>η</sup> ημέρα και στην συνέχεια μειώνονται έως το τέλος της ζύμωσης, παρόμοιος αριθμός κυττάρων υπάρχει στην αρχή και στο τέλος της ζύμωσης και για τα δύο ήδη βακτηρίων. Οι ζύμες και τα LAB αυξάνονται από την αρχή της ζύμωσης μέχρι μέχρι την 9<sup>η</sup> ημέρα της ζύμωσης και στην συνέχεια μειώνονται έως το τέλος της ζύμωσης, ο αριθμός των

κυττάρων στο τέλος της ζύμωσης είναι μεγαλύτερος κατά δυο τάξεις μεγέθους από αυτόν στην αρχή της ζύμωσης και στις ζύμες και στα LAB.

*Πίνακας 14: Μεταβολή μικροοργανισμών για το Δοχείο Β*

<b>Χρόνος ζύμωσης (ημέρες)</b>	<b>AAB (cfu/ml)</b>	<b>Yeast (cfu/ml)</b>	<b>TAB (cfu/ml)</b>	<b>LAB (cfu/ml)</b>
<b>0</b>	1.00E+004	2.60E+004	5.50E+004	3.85E+004
<b>3</b>	2.38E+005	6.00E+005	1.70E+005	6.50E+005
<b>9</b>	1.01E+006	293E+006	7.90E+005	3.25E+006
<b>13</b>	5.00E+003	1.52E+007	4.25E+004	2.28E+006

Τα AAB και TAB αυξάνονται από την αρχή της ζύμωσης μέχρι την 9<sup>η</sup> ημέρα και στην συνέχεια μειώνονται μέχρι το τέλος της ζύμωσης, στο τέλος της ζύμωσης ο αριθμός κυττάρων των AAB είναι μικρότερος κατά μια τάξη μεγέθους από αυτόν στην αρχή της ζύμωσης ενώ ο αριθμός κυττάρων των TAB στο τέλος της ζύμωσης είναι παρόμοιος με αυτόν στην αρχή της. Οι ζύμες αυξάνονται από την αρχή μέχρι το τέλος της ζύμωσης με τον αριθμό των κυττάρων τους να είναι μεγαλύτερος κατά τρεις τάξεις μεγέθους από αυτόν στην αρχή της ζύμωσης. Τα LAB αυξάνονται από την αρχή της ζύμωσης μέχρι την 9<sup>η</sup> ημέρα και στην συνέχεια μειώνονται ελάχιστα μέχρι το τέλος της ζύμωσης, ο αριθμός των κυττάρων τους στο τέλος της ζύμωσης είναι μεγαλύτερος κατά δυο τάξεις μεγέθους από αυτόν στην αρχή της ζύμωσης.

*Πίνακας 14: Μεταβολή μικροοργανισμών για το Δοχείο Γ*

<b>Χρόνος ζύμωσης (ημέρες)</b>	<b>AAB (cfu/ml)</b>	<b>Yeast (cfu/ml)</b>	<b>TAB (cfu/ml)</b>	<b>LAB (cfu/ml)</b>
<b>0</b>	1.00E+004	2.60E+004	5.50E+004	3.85E+004
<b>3</b>	5.53E+005	1.55E+006	2.60E+005	1.55E+006
<b>9</b>	1.20E+006	6.10E+006	1.09E+006	6.33E+006
<b>13</b>	1.50E+004	3.28E+007	5.00E+004	3.38E+007

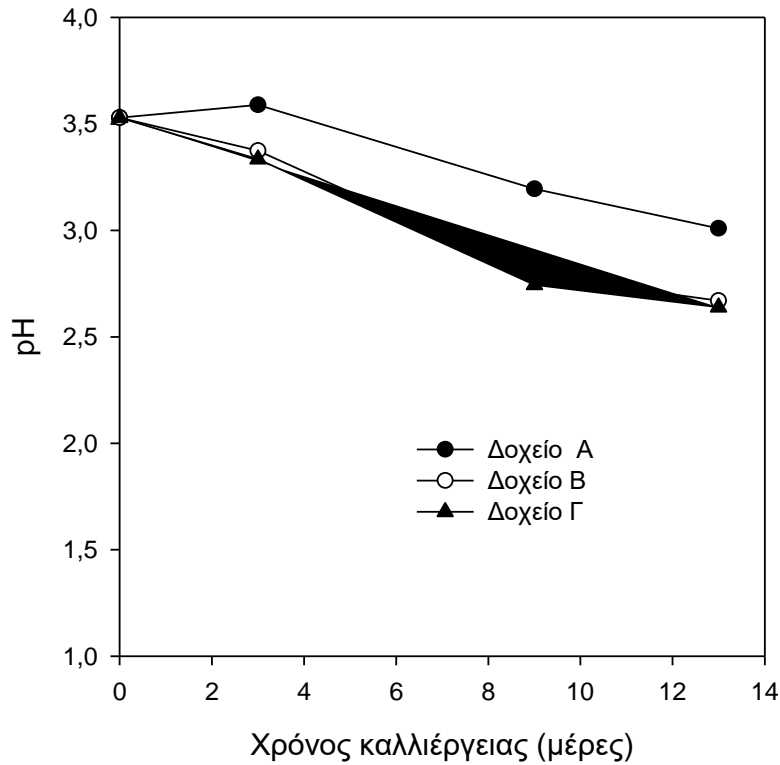
Τα AAB και τα TAB αυξάνονται από την αρχή της ζύμωσης μέχρι την 9<sup>η</sup> ημέρα και στην συνέχεια μειώνονται έως το τέλος της ζύμωσης, παρόμοιος αριθμός κυττάρων υπάρχει στην αρχή και στο τέλος της ζύμωσης και για τα δύο ήδη βακτηρίων. Οι ζύμες και τα LAB αυξάνονται από την αρχή μέχρι το τέλος της ζύμωσης, ο αριθμός

των κυττάρων τους στο τέλος της ζύμωσης είναι μεγαλύτερος κατά τρεις τάξεις μεγέθους από αυτόν στην αρχή της ζύμωσης τόσο για τις ζύμες όσο και για τα LAB.

Για το Δοχείο Α παρατηρείται συνεχής αύξηση των κυττάρων ζυμών και των LAB ενώ για τα AAB και TAB παρατηρείται αύξηση μέχρι την 9<sup>η</sup> ημέρα και στην συνέχεια μείωση του αριθμού των κυττάρων μέχρι το τέλος της ζύμωσης. Παρόμοια συμπεριφορά στην ανάπτυξη των μικροοργανισμών παρατηρείται και για τα Δοχεία Β και Γ. Επίσης παρατηρείται ότι καθώς αυξάνεται η ειδική επιφάνεια επαφής και ο όγκος σε κάθε δοχείο με μικρότερο το Α, επόμενο το Β και μεγαλύτερο το Γ, αυξάνεται και ο αριθμός των μικροοργανισμών που υπάρχουν στον υγρό ζυμό. Επομένως συμπεραίνεται ότι η αύξηση της ειδικής επιφάνειας επαφής έχει θετική επίδραση στην ανάπτυξη των μικροοργανισμών.

### 3.2.3 pH

Στο παρακάτω Διάγραμμα παρουσιάζεται η μεταβολή του pH συναρτήσει του χρόνου ζύμωσης για τα 3 διαφορετικά δοχεία.



*Διάγραμμα 16: Μεταβολή του pH κατά την διάρκεια της ζύμωσης για τα τρία διαφορετικά δοχεία*

Από το διάγραμμα παρατηρείται ότι για τα δοχεία B και Γ το pH μειώνεται με ακριβώς τον ίδιο ρυθμό και καταλήγει στην τιμή 2.7 όπως και στις ζυμώσεις με την διαφορετική συγκέντρωση σακχαρόζης. Για το δοχείο A παρατηρείται ότι η μείωση του pH είναι πιο ήπια και στο τέλος της ζύμωσης καταλήγει στην τιμή 3. Ο αριθμός των AAB στο δοχείο A είναι μικρότερος κατά μια τάξη μεγέθους σε σύγκριση με αυτόν του δοχείου B και του Δοχείου Γ, όπως αναφέρθηκε προηγουμένως τα AAB συμμετέχουν στην παραγωγή οξικού οξέος, το οποίο είναι ο κύριος λόγος μείωσης του pH, για αυτό παρατηρείται και πιο ήπια μείωση του pH στο δοχείο A. Επομένως η μείωση της ειδικής επιφάνειας επαφής έχει αρνητική επίδραση στην μείωση του pH καθώς στο δοχείο με την μικρότερη ειδική επιφάνεια επαφής η μείωση του του pH αποκλίνει από την συνήθη συμπεριφορά ως προς την τελική τιμή του.

### 3.2.4 Μικροβιακή κυτταρίνη

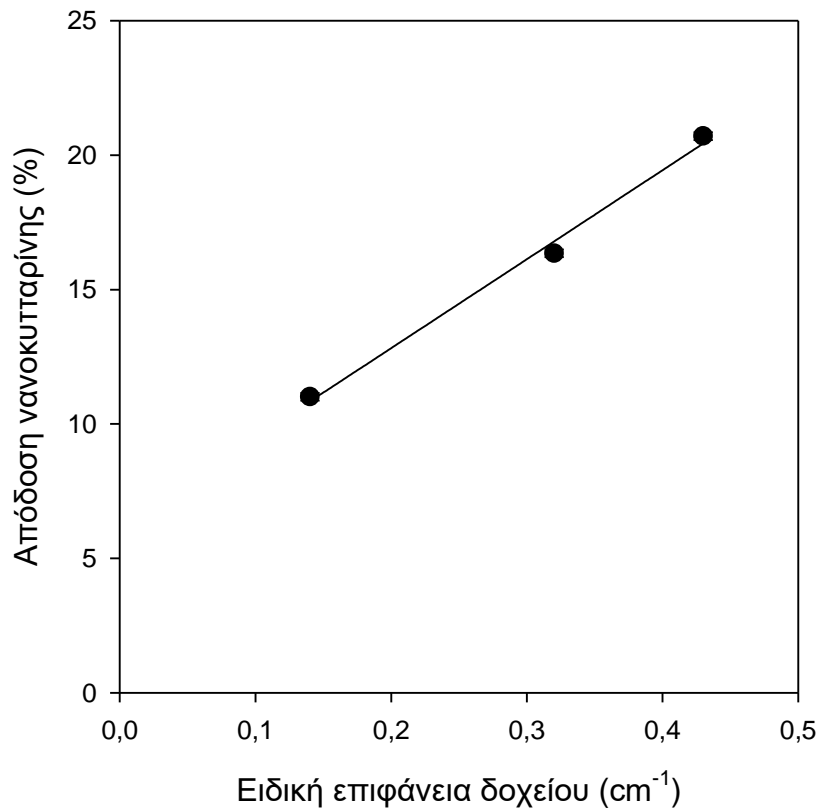
Ακολουθεί ο Πίνακας με τις τιμές της απόδοσης (%) της μικροβιακής κυτταρίνης κατά την διάρκεια της ζύμωσης και τα Διαγράμματα μεταβολής των μεταβολιτών που μετρήθηκαν στα 3 διαφορετικά Δοχεία.

*Πίνακας 15: Απόδοση (%) κυτταρίνης κατά την διάρκεια της ζύμωσης για τα διαφορετικά δοχεία*

<b>Χρόνος ζύμωσης (ημέρες)</b>	<b>Απόδοση κυτταρίνης (%), ειδική επιφάνεια επαφής 0.14cm<sup>-1</sup> Δοχείο Α</b>	<b>Απόδοση κυτταρίνης (%), ειδική επιφάνεια επαφής 0.32cm<sup>-1</sup> Δοχείο Β</b>	<b>Απόδοση κυτταρίνης (%), ειδική επιφάνεια επαφής 0.43cm<sup>-1</sup> Δοχείο Γ</b>
<b>3</b>	1.82	2.28	2.73
<b>9</b>	11.01	16.35	20.71
<b>13</b>	22.89	29.63	33.12

Ο ρυθμός παραγωγής μικροβιακής κυτταρίνης αυξάνεται όσο αυξάνεται η ειδική επιφάνεια του δοχείου. Το φαινόμενο αυτό παρατηρείται από την 3<sup>η</sup> ημέρα αλλά φαίνεται πιο ξεκάθαρα από την 9<sup>η</sup> ημέρα της ζύμωσης. Στο Διάγραμμα που ακολουθεί παρουσιάζεται η συσχέτιση της ειδικής επιφάνειας των τριών δοχείου με την απόδοση σε κυτταρίνη για την 9<sup>η</sup> ημέρα της ζύμωσης.



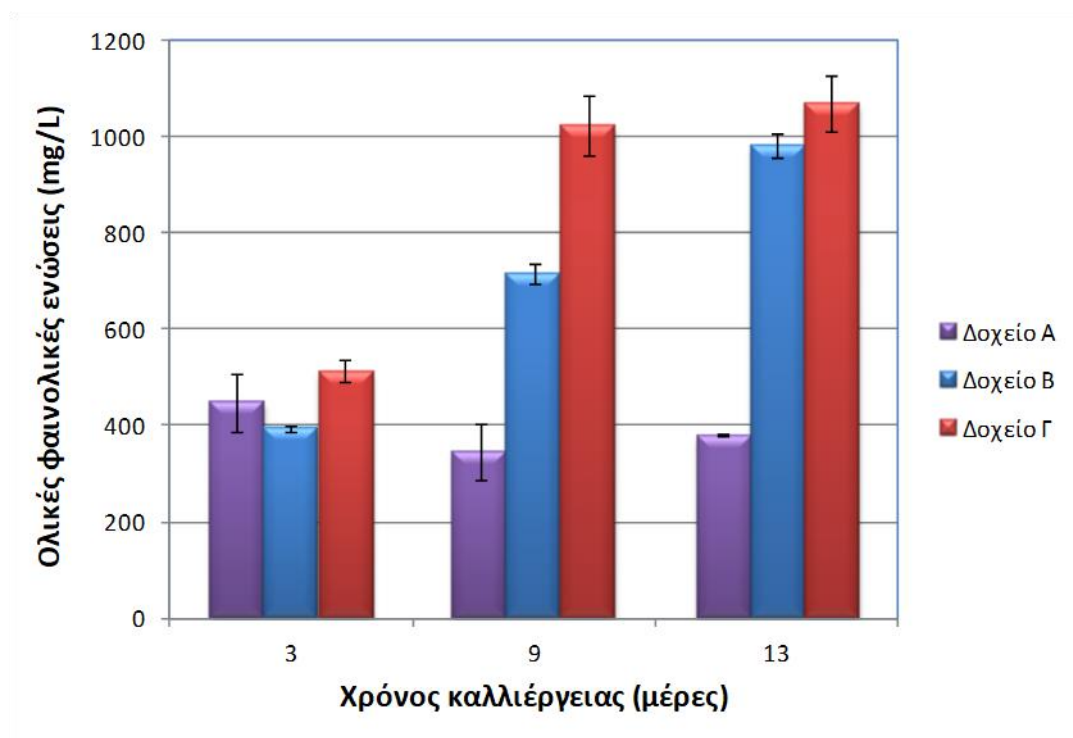


*Διάγραμμα 17: Συσχέτιση ειδικής επιφάνειας δοχείου και απόδοσης μικροβιακή κυτταρίνης*

Στο το Διάγραμμα 17 για την 9<sup>η</sup> ημέρα της ζύμωσης φαίνεται ότι η σχέση που συνδέει της ειδική επιφάνεια επαφής με την απόδοση σε μικροβιακή κυτταρίνη είναι γραμμική, η απόδοση σε μικροβιακή κυτταρίνη αυξάνεται ανάλογα με την αύξηση της ειδικής επιφάνειας του δοχείου. Επομένως για το δοχείο με την μεγαλύτερη ειδική επιφάνεια επαφής η απόδοση σε μικροβιακή κυτταρίνη είναι μεγαλύτερη, συγκεκριμένα η μεγαλύτερη απόδοση σε μικροβιακή κυτταρίνη είναι 33.12% για το δοχείο με ειδική επιφάνεια επαφής 0.43 cm<sup>-1</sup> την 13<sup>η</sup> ημέρα της ζύμωσης. Το αποτέλεσμα αυτό συμφωνεί με τις βιβλιογραφικές αναφορές και αποδεικνύει ότι η επιφάνεια είναι σημαντικός παράγοντας της ζύμωσης και της πορείας της (Goh et al., 2012).

### 3.2.5 Επίδραση στις ολικές φαινολικές ενώσεις

Στο παρακάτω Διάγραμμα παρουσιάζεται η μεταβολή της συγκέντρωσης των ολικών φαινολικών ενώσεων συναρτήσει του χρόνου ζύμωσης για τα τρία διαφορετικά Δοχεία ζύμωσης.



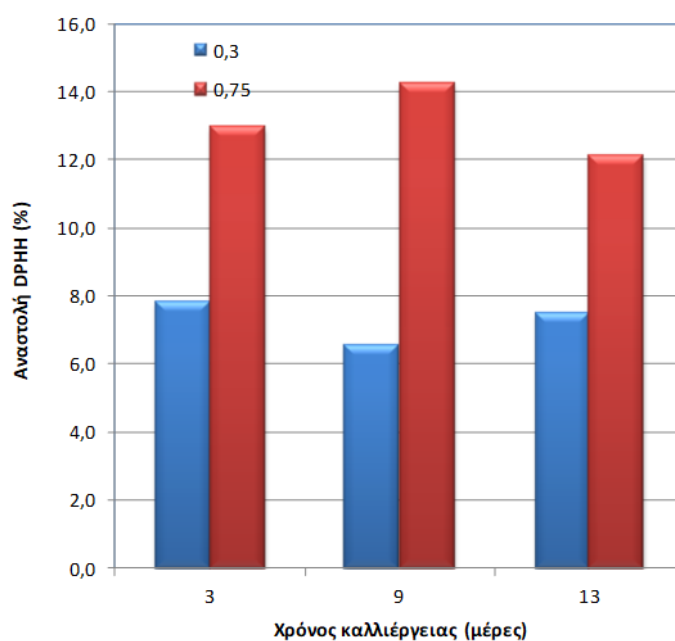
Διάγραμμα 16: Μεταβολή της συγκέντρωσης των ολικών φαινολικών (mg/L) κατά την διάρκεια της ζύμωσης για τα 3 διαφορετικά δοχεία

Σε όλες τις ζυμώσεις εκτός από αυτήν με τη μικρότερη ειδική επιφάνεια η συγκέντρωση των ολικών φαινολικών ενώσεων αυξάνεται με τον χρόνο της ζύμωσης και στο τέλος της ζύμωσης είναι μεγαλύτερη από αυτήν του σκέτου μαύρου τσαγιού, για του λόγους που αναφέρθηκαν προηγουμένως. Η συγκέντρωση των ολικών φαινολικών στην αρχή της ζύμωσης είναι και στα τρία δοχεία σχεδόν ίση και μικρότερη από αυτήν του σκέτου μαύρου τσαγιού. Με την αύξηση της ειδικής επιφάνειας επαφής αυξάνεται και η συγκέντρωση των ολικών φαινολικών ενώσεων. Στο Δοχείο A η μεταβολή της συγκέντρωσης αποκλίνει από αυτήν των άλλων δυο δοχείων, αυτό ίσως να οφείλεται στον μικρότερο πληθυσμό βακτηρίων και ζυμών που υπάρχουν στο Δοχείο A σε σχέση με αυτά που υπάρχουν στα άλλα δυο δοχεία. Μικρότερος πληθυσμός μικροοργανισμών οδηγεί σε μικρότερη ποσότητα ενζύμων στο δοχείο τα οποία δεν επαρκούν για την διάσπαση των περίπλοκων φαινολικών

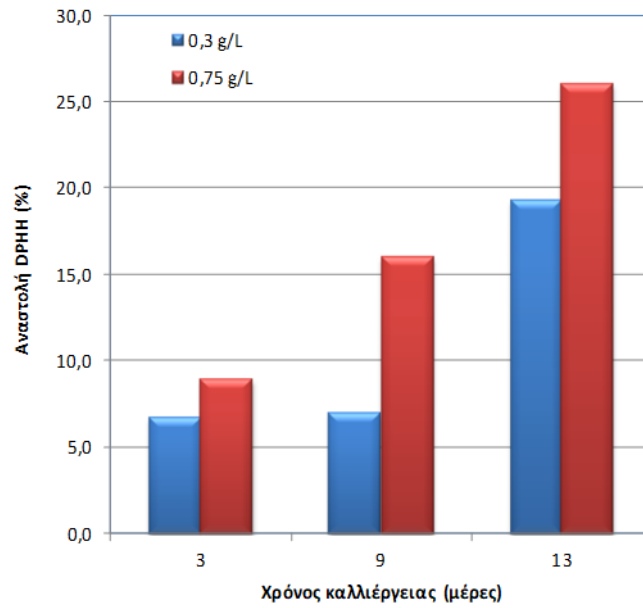
ενώσεων σε μικρότερα μόρια. Μεγαλύτερη συγκέντρωση ολικών φαινολικών ενώσεων παρατηρείται όσο αυξάνεται η ειδική επιφάνεια επαφής με το οξυγόνο επομένως ο αερισμός ευνοεί την αύξηση των ολικών φαινολικών ενώσεων.

### 3.2.6 Αντιοξειδωτική ικανότητα του ζυμωμένου προϊόντος

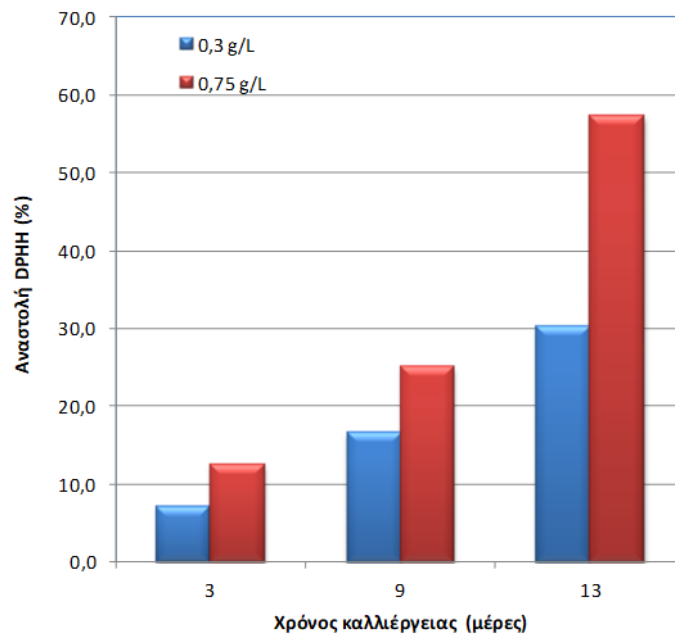
Στα παρακάτω Διαγράμματα παρουσιάζεται η παρεμπόδιση του DPPH % συναρτήσει του χρόνου ζύμωσης για δυο διαφορετικές αραιώσεις των δειγμάτων 0.02C και 0.05C.



Διάγραμμα 17: Αναστολή DPPH (%) κατά την διάρκεια της ζύμωσης σε δοχείο ειδικής επιφάνειας  $0.13 \text{ cm}^{-1}$



Διάγραμμα 18: Αναστολή DPPH (%) κατά την διάρκεια της ζύμωσης σε δοχείο ειδικής επιφάνειας 0.32 cm<sup>2</sup>



Διάγραμμα 19: Αναστολή DPPH (%) κατά την διάρκεια της ζύμωσης σε δοχείο ειδικής επιφάνειας 0.43 cm<sup>2</sup>

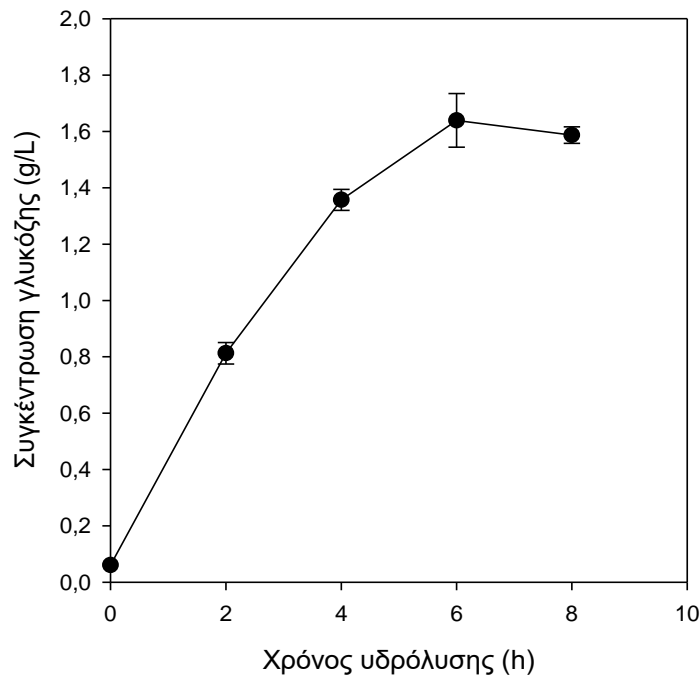
Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως η συσχέτιση της αντιοξειδωτικής ικανότητας με την συγκέντρωση των ολικών φαινολικών ενώσεων παρατηρείται και στα

Διαγράμματα 16,17, 18, και 19, καθώς παρουσιάζεται αύξηση της παρεμπόδισης του DPPH για τα δοχεία Β και Γ και ομοίως παρουσιάζεται αύξηση στην συγκέντρωση των ολικών φαινολικών ενώσεων αυτών των δοχείων. Μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα παρουσιάζει το Δοχείο Γ ακολουθεί το Δοχείο Β και με την μικρότερη αντιοξειδωτική δράση το δοχείο Α. Η αύξηση της ειδική επιφάνειας επαφής οδηγεί σε αύξηση της αναστολή του DPPH, δηλαδή της αντιοξειδωτικής ικανότητας, επομένως και της παραγωγής ενώσεων που δεσμεύουν τις ελεύθερες ρίζες, όπως οι φαινολικές ενώσεις.

### 3.3 Μικροβιακή κυτταρίνη

#### 3.3.1 Υδρόλυση της μικροβιακής κυτταρίνης από το κυτταρινολυτικό σκεύασμα Celic-CTec2

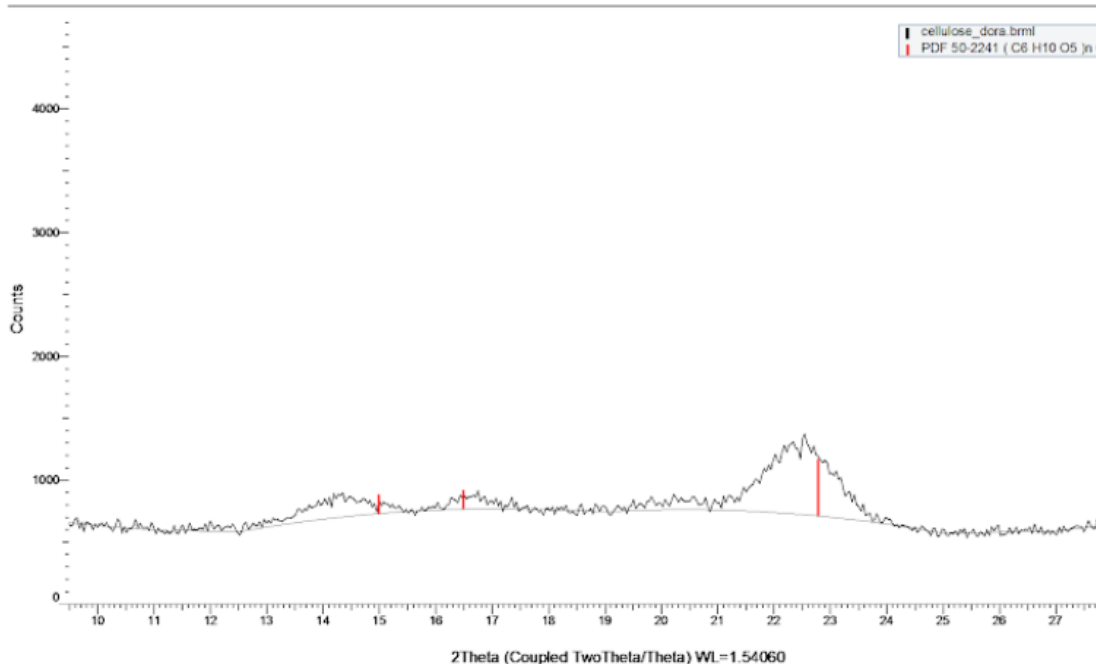
Ακολουθεί το διάγραμμα υδρόλυσης της μικροβιακής κυτταρίνης από το κυτταρινολυτικό σκεύασμα Celic-CTec2. Στο διάγραμμα παρατηρείται σταθεροποίηση της συγκέντρωσης της γλυκόζης μετά τις 6 ώρες δράσης του ενζύμου, επομένως συμπεραίνεται ότι η κυτταρίνη έχει υδρολυθεί πλήρως αφού παρατηρείται πλατό στην συγκέντρωση της γλυκόζης στις 6-8 ώρες δράσης του ενζύμου. Η μέγιστη τιμή γλυκόζης ανήλθε σε 1.64 g/L που ισοδυναμεί με 74% υδρόλυση της μικροβιακής κυτταρίνης.



Διάγραμμα 20: Υδρόλυση κυτταρίνης από το κυτταρινολυτικό σκεύασμα Cellic-CTec2

### 3.3.2 Ανάλυση μικροβιακής κυτταρίνης με συσκευή περίθλασης ακτινών-X (XRD)

Το διάγραμμα που ακολουθεί είναι το διάγραμμα περίθλασης ακτινών-X που λήφθηκε από την αντίστοιχη συσκευή για το δείγμα της μικροβιακής κυτταρίνης. Το όργανο ταυτοποίησε της κορυφές (κόκκινες γραμμές) ως native cellulose (φυσική κυτταρίνη). Η μέγιστη ένταση του επιπέδου ανάκλασης 002 βρέθηκε  $I_{002}=1393$  σε γωνία  $2\theta=22.537^\circ$  και η ένταση της άμορφης περιοχής  $I_{am}=760$  σε γωνία  $2\theta=20.829^\circ$ . Επομένως υπολογίζεται ο δείκτης κρυσταλλικότητας  $CrI=45.44\%$ .



Εικόνα 11: Διάγραμμα περίθλασης ακτίνων-Χ

## 4 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η μικροβιακή κυτταρίνη που παράγεται από την συμβιωτική καλλιέργεια βακτηρίων και ζυμών κομπούχα αναλύθηκε από την συσκευή περίθλασης ακτίνων-Χ και αποδείχθηκε ότι είναι φυσική κυτταρίνη με δείκτη κρυσταλλικότητας  $CrI=45.44\%$ . Η μικροβιακή κυτταρίνη υπεβλήθη σε υδρόλυση με χρήση του κυτταρινολυτικού σκευάσματος Celic-CTec2. Το ποσοστό υδρόλυσης ανήλθε στο 74%.

Η μελέτη της επίδρασης από την διαφορετική συγκέντρωση σακχαρόζη οδηγεί στα ακόλουθα συμπεράσματα. Η υδρόλυσης της σακχαρόζης στα συστατικά της

μονοσάκχαρα (γλυκόζη και φρουκτόζη) μειώνεται με αύξηση της αρχικής της συγκέντρωσης της σακχαρόζης. Η παραχθείσα γλυκόζη αφομοιώνεται ταχύτατα από τους μικροοργανισμούς στην περίπτωση που η συγκέντρωση της σακχαρόζης είναι 50 g/L, ενώ με την αύξηση της συγκέντρωσης της σακχαρόζης (75, 100, και 125 g/L) παρατηρείται ότι η παραχθείσα γλυκόζη δεν καταναλώνεται πλήρως. Σε όλες τις ζυμώσεις παρατηρείται μεγαλύτερη ποσότητα ζυμών και LAB από αυτήν των TAB και AAB κατά μια με δύο τάξεις μεγέθους. Σε όλες τις ζυμώσεις με διαφορετική συγκέντρωση σακχαρόζης ο πληθυσμός των μικροοργανισμών αυξάνεται μέχρι την 6-9<sup>η</sup> ημέρα της ζυμώσεις και στην συνέχεια μειώνονται μέχρι το τέλος της ζύμωσης με εξαίρεση την συγκέντρωση σακχαρόζης 50 g/L όπου αυξάνονται μέχρι το τέλος της ζύμωσης. Σε όλες τις ζυμώσεις το pH έχει παρόμοιο ρυθμό μείωσης, σημαντική μείωση από το αρχικό pH τις πρώτες 6 ημέρες της ζύμωσης και στην συνέχεια σταδιακή μείωση και σταθεροποίηση περίπου στην τιμή του pH 2.7 στο τέλος της ζύμωσης. Μεγαλύτερη απόδοση σε μικροβιακή κυτταρίνη παρατηρείται για την συγκέντρωση σακχαρόζης 75 g/L, με ποσοστό απόδοσης 25.74% την 15<sup>η</sup> ημέρα της ζύμωσης, σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις σακχαρόζης παράγεται μεγαλύτερο ποσό μεταβολιτών που παρεμποδίζουν την σύνθεση της μικροβιακής κυτταρίνης. Οι μεταβολίτες που βρέθηκαν ότι παράγονται κατά την διάρκεια της ζύμωσης είναι το οξικό οξύ που παραμένει σχεδόν σταθερό κατά την διάρκεια της ζύμωσης, το γλυκονικό και το γλυκουρονικό οξύ τα οποία αυξάνονται μέχρι την 9<sup>η</sup> ημέρα της ζύμωσης και στη συνέχεια σταθεροποιούνται. Το περιεχόμενο σε ολικές φαινολικές ενώσεις αυξάνεται στην πορεία της ζύμωσης. Η μέγιστη συγκέντρωση φαινολικών ενώσεων παρατηρήθηκε στις συγκεντρώσεις σακχαρόζης 75 και 100 g/L και ήταν ίση με 1100 mg/L. Η αντιοξειδωτική ικανότητα βρέθηκε ανάλογη με την συγκέντρωση των ολικών φαινολικών ενώσεων και ποσοστό αναστολής του DPHH κυμάνθηκε από 25-35% στο τέλος της ζύμωσης. Για όλες τις ζυμώσεις η αντιοξειδωτική ικανότητα είναι μεγαλύτερη από αυτήν του σκέτου μαύρου τσαγιού επομένως η ζύμωση αυξάνει την αντιοξειδωτική ικανότητα του αφεψήματος.

Η μελέτη της επίδραση του αερισμού, συγκεκριμένα της ειδικής επιφάνειας επαφής κάθε δοχείου, οδηγεί στα παρακάτω συμπεράσματα. Μεγαλύτερη υδρόλυση σακχαρόζης παρατηρείται στο Δοχείο με την μικρότερη ειδική επιφάνεια επαφής με το οξυγόνο  $0.14 \text{ cm}^{-1}$ . Η παραχθείσα γλυκόζη στο δοχείο με ειδική επιφάνεια  $0.14 \text{ cm}^{-1}$  αυξάνεται σταδιακά με τον χρόνο ενώ στα δοχεία με ειδική επιφάνεια 0.32 και 0.43



cm<sup>-1</sup> αυξάνεται αρχικά και στην συνέχεια παραμένει σταθερή, καθώς καταναλώνεται προς την παραγωγή μικροβιακής κυτταρίνης και μεταβολιτών. Σε όλα τα δοχεία παρατηρείται αύξηση του πληθυσμού των μικροοργανισμών μέχρι την 9<sup>η</sup> ημέρα της ζύμωσης και στην συνέχεια μείωση μέχρι το τέλος της ζύμωσης, επίσης παρατηρείται ότι η αύξηση της ειδικής επιφάνειας επαφής έχει θετική επίδραση στην ανάπτυξη των μικροοργανισμών. Για τα δοχεία με τις μεγαλύτερες ειδικές επιφάνειες επαφής ο ρυθμός μείωσης του pH παρόμοιος με όλες τις προηγούμενες ζυμώσεις και η τελική του τιμή είναι περίπου 2.7, ενώ για το δοχείο με την μικρότερη ειδική επιφάνεια επαφής 0.14 cm<sup>-1</sup> παρατηρείται ότι δεν ευνοείται η μείωση του pH και η τελική τιμή του είναι 3. Η απόδοση σε μικροβιακή κυτταρίνη αυξάνεται όσο αυξάνεται η ειδική επιφάνεια του δοχείου και παρατηρείται ότι η αύξηση της απόδοσης της κυτταρίνης είναι ανάλογη της αύξησης της ειδικής επιφάνειας. Η μεγαλύτερη απόδοση μικροβιακής κυτταρίνης είναι 33.12% για το δοχείο με ειδική επιφάνεια 0.43 cm<sup>-1</sup> την 13<sup>η</sup> ημέρα της ζύμωσης. Η συγκέντρωση των ολικών φαινολικών ενώσεων αυξάνεται στην πορεία της ζυμώσεως και αυξάνεται με την αύξηση της ειδικής επιφάνειας επαφής. Παρόμοια αποτελέσματα λαμβάνονται και για την αναστολή του DPPH καθώς σχετίζεται άμεσα με την συγκέντρωση των ολικών φαινολικών ενώσεων, η αντιοξειδωτική ικανότητα αυξάνεται με την αύξηση της ειδικής επιφάνειας.

## 5 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Ayed, L., Ben Abid, S., & Hamdi, M. (2016). Development of a beverage from red-grape juice fermented with the Kombucha consortium. *Annals of Microbiology*.

Battikh, H., Bakhrouf, A., & Ammar, E. (2012). Antimicrobial effect of Kombucha analogues, *LWT - Food Science and Technology*, 47(1), 71–77.

Caicedo, L. A., Da Francis, F. P., & Lopez, L. (2001). Factores para el escalado del proceso de producción de celulosa por fermentación estática. *Revista Colombiana de Química*, 30(2), 155–162, 57(1), 155–162.

Campano, C., Balea, A., Blanco, A., & Negro, C. (2016). Enhancement of the fermentation process and properties of bacterial cellulose: A review, *Cellulose*, 23(1), 57–91.

Chakravorty, S., Bhattacharya, S., Chatzinotas, A., Chakraborty, W., Bhattacharya, D., & Gachhui, R. (2016). Kombucha tea fermentation: Microbial and biochemical dynamics, *International Journal of Food Microbiology*, 220, 63–72.

Chawla, P. R., Bajaj, I. B., Survase, S. A., & Singhal, R. S. (2009). Microbial cellulose: Fermentative production and applications (Review), *Food Technology and Biotechnology*, 47(2), 107–124.

Chen, C. and Liu, B.Y., 2000, Changes in major components of tea fungus metabolites during prolonged fermentation, *J Applied Microbiol*, 89:834–839.

Chu, S. C., & Chen, C. (2006). Effects of origins and fermentation time on the antioxidant activities of Kombucha, *Food Chemistry*, 98(3), 502–507.

Coton, M., Pawtowski, A., Taminiau, B., Burgaud, G., Deniel, F., Coulloume-Labarthe, L., & Coton, E. (2017). Unraveling microbial ecology of industrial-scale Kombucha fermentations by metabarcoding and culture-based methods, *Fems Microbiology Ecology*, 93(5), 1–16.

Cvetkovic D., Markova S., Savic M.D.D., Velicanski A., (2008). Specific interfacial area as a key variable in scaling-up Kombucha fermentation, *Journal of Food Engineering*, 85, 387–392.

Dima S.O., Panaitescu D.M., Orban C., Ghiurea M., Doncea S.M., Fierascu R.C., Nistor C.L., Alexandrescu E., Nicolae C.A., Trică B., Moraru A., and Oancea F., (2017). Bacterial Nanocellulose from Side-Streams of Kombucha Beverages Production: Preparation and Physical-Chemical Properties, *Polymers*, 9, 374-398.

Goh, W. N., Rosma, A., Kaur, B., Fazilah, A., Karim, A. A., & Bhat R., (2012). Microstructure and physical properties of microbial cellulose produced during fermentation of black tea broth (Kombucha). II., *International Food Research*, 19(1), 153–158.

Goh, W.N., Rosma A., Kaur, B., Fazilah, A., Karim A.A. & Bhat., (2012). Fermentation of black tea broth (Kombucha): I. Effects of sucrose concentration and fermentation time on the yield of microbial cellulose., *International Food Research*, 19(1), 109-117.

Hsu, Y.-L., & Wu, W.-T. (2002). A novel approach for scaling-up a fermentation system, *Biochemical Engineering Journal*, 11, 123–130.

Hur, S. J., Lee, S. Y., Kim, Y.-C., Choi, I., & Kim, G.-B. (2014). Effect of fermentation on the antioxidant activity in plant-based foods, *Food Chemistry*, 160, 346–356.

Jayabalan R., Malbaša R.V., and Sathishkumar M., (2015). Kombucha Tea: Metabolites, *Handbook: Fungal Metabolites*.

Jayabalan R, Malini K., Sathishkumar M., Swaminathan K., and Yun S., (2010). Biochemical Characteristics of Tea Fungus Produced During Kombucha Fermentation, *Food Science and Biotechnology*, 19(3), 843-847.

Jayabalan R., Marimuthu S., Swaminathan K., (2007). Changes in content of organic acids and tea polyphenols during kombucha tea fermentation, *Food Chemistry*, 102, 392-398.

Junker, B. H. (2004). Scale-up methodologies for *Escherichia coli* and yeast fermentation processes, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 97(6), 347–364

Kurtzman, C. P., Robnett, C. J., & Basehoar-Powers, E., (2001). *Zygosaccharomyces kombuchaensis*, a new ascosporogenous yeast from “Kombucha tea.”, *Fems Yeast Research*, 1, 133–138.

Loncar, E., Djurić, M., Malbašić, R., Kolarov, L. J., & Klasić, M. (2006). Influence of working conditions upon Kombucha conducted fermentation of black tea, *Food and Bioprocess Technology*, 84(3), 186–192.

Lončar, E., Petrović, S., Malbašić, V. and Verac, R., 2000, Biosynthesis of glucuronic acid by means of tea fungus, *Nahrung*, 44, 138–139.

Luciana P.S., Vandenberghe Susan, G.Karp, Priscilla Z., de Oliveira Jílio C., de Carvalho Cristine Rodrigues Carlos, R.Soccol (2018). Solid-State Fermentation for the Production of Organic Acids, *Current Advances in Solid-State Fermentation*, 415-434.

Malbaš'a, R., Lončar, E. and Kolarov, Lj., 2002a, Sucrose and inulin balance during tea fungus fermentation, *Roum Biotechnol Lett*, 7(1):573–576.

Malbaš'a, R., Loncar, E., Djurić, M., Klavžnja, M., Kolarov, L. J., & Markov, S. (2006). Scale-up of black tea batch fermentation by Kombucha, *Food and Bioprocesses Processing*, 84(3), 193–199.

Malbaš'a R.V, Jayabalan R., Lončar E.S, Vitas J.S., and Sathishkumar M., (2014). A Review on Kombucha Tea—Microbiology, Composition, Fermentation, Beneficial Effects, Toxicity, and Tea Fungus, *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, Vol, 13, 2014.

Markov, S.L., Malbaš'a, R.V., Hauk, M.J. and Cvetković, D.D., (2001). Investigation of tea fungus microbe associations. I. The yeasts, faculty of technology, Novi Sad, *Acta Periodica Technologica*, 32: 133–138.

Markov, S., Jerinic, V., Cvetkovic, D., Loncar, E., & Malbasa, R. (2003). Kombucha – functional beverage: Composition, characteristics and process of biotransformation, *Chemical Industry* ,57(10),456–462.

Marsh, A. J., Hill, C., Ross, R. P., & Cotter, P. D. (2014). Fermented beverages with health-promoting potential: Past and future perspectives, *Trends in Food Science & Technology*, 38(2), 113–124.

Mayser, P., Fromme, S., Leitzmann, C., & Grunder, K., (1995). The yeast spectrum of the “tea fungus Kornbucha” Das Hefespektrum des “Teepilzes Kombucha.”, *Mycoses*, 295, 289–295.

Nielsen, J., Villadsen, J., & Liden, G. (2003). *Bioreaction engineering principles* (2nd ed.), New York, Moscow: Kluwer Academic/Plenum Publishers, pp. 477–518.

Nummer, B. A. (2013). Kombucha brewing under the food and drug administration model food code: Risk analysis and processing guidance abstract, *Journal of Environmental Health*, 76(4), 8–12.

Reiss, J. (1994). Influence of different sugars on the metabolism of the tea fungus, *Zeitschrift Fuer Lebensmittel-Untersuchung Und -Forschung*, 198(3), 258–261.

Saponjac, V. T. T., & Vulić, J. J. (2014). Antioxidant and antibacterial activity of the beverage obtained by fermentation of sweetened lemon balm (*Melissa officinalis* L.) Tea with Symbiotic consortium of bacteria and yeasts, *Food Technology and Biotechnology*, 52(4), 420–429.

Sreeramulu G., Zhu Y., and Knol W., (2000). Kombucha Fermentation and Its Antimicrobial Activity, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 2589–2594.

Srinivasan, R., Smolinske, S., & Greenbaum, D. (1997). Probable gastrointestinal toxicity of Kombucha tea: Is this beverage healthy or harmful, *Journal of General Internal Medicine*, 12(10), 643–644.

Stanbury, P. F., Whitaker, A., & Hall, S. J. (2013). Principles of fermentation technology, *Journal of Chemical Information and Modeling*, 53(9), 1689–1699.

Velicanski, A., Cvetković, D., & Markov, S. (2013). Characteristics of Kombucha fermentation on medicinal herbs from lamiaceae family, *Romani*, 18(1), 8034–8042.

Villarreal-Soto S.A., Beaufort S., Bouajila J., Souchard J.P., and Taillandier P., (2018). Understanding Kombucha Tea Fermentation: A Review, *Journal of Food Science*, 83(3), 580-588.

Vijayaraghavan R., Singh M., Rao P. V., Bhattacharya R., Kumar P., Sugendran K., Singh, R. (2000). Subacute (90 days) oral toxicity studies of Kombucha tea, *Biomedical and Environmental Sciences*, 13(4), 293–299.

Vitas, J., Malbasa, R., Grahovac, J., & Loncar, E. (2013). The antioxidant activity of Kombucha fermented milk products with stinging nettle and winter savory, *Chemical Industry and Chemical Engineering Quarterly*, 19(1), 129–133

Watawana, M. I., Jayawardena, N., Gunawardhana, C. B., & Waisundara, V. Y. (2015). Health, wellness, and safety aspects of the consumption of Kombucha, *Journal of Chemistry*, 2015, 1–11.

Watawana, M. I., Jayawardena, N., Gunawardhana, C. B., & Waisundara, V. Y. (2016). Enhancement of the antioxidant and starch hydrolase inhibitory activities of king coconut water (*Cocos nucifera* var. *aurantiaca*) by fermentation with Kombucha “tea fungus”, *International Journal of Food Science & Technology*, 51(2), 490–498.

Wolfe, B. E., & Dutton, R. J. (2015). Fermented foods as experimentally tractable microbial ecosystems, *Cell*, 161(1), 49–55.