

SPRAWOZDANIE

z prowadzenia w 2013 r. badań podstawowych na rzecz rolnictwa ekologicznego

w zakresie rozporządzenia Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z dnia 18 maja 2010 r. w sprawie stawek dotacji przedmiotowych dla różnych podmiotów wykonujących zadania na rzecz rolnictwa (Dz. U. Nr 91, poz. 595, z późn. zm.)

pt.: Przetwórstwo produktów roślinnych, zwierzęcych metodami ekologicznymi: Ekologiczne metody przetwórstwa owoców i warzyw z uwzględnieniem właściwości prozdrowotnych otrzymywanych produktów

Realizowany przez: Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

finansowany zgodnie z rozporządzeniem Ministra Rolnictwa i Rozwoju

Wsi z dnia 18 maja 2010 r. w sprawie stawek dotacji przedmiotowych dla różnych podmiotów wykonujących zadania na rzecz rolnictwa (Dz. U. Nr 91, poz. 595, z późn. zm.)

na podstawie decyzji Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi

z dnia 06.05.2013 PKre-029-30-30/13(652)

Kierownik tematu: prof. dr hab. Ewa Solarska

Główni wykonawcy: dr Bożena Sosnowska, dr Tomasz Czernecki, mgr Anna Nowak

Wstęp

Kombucha (kombucza) jest symbiotycznym konsorcjum bakterii z rodzaju *Acetobacter* i drożdży głównie z rodzajów *Zygosaccharomyces* i *Saccharomyces*. Skład mikroorganizmów może się różnić ze względu na różnice geograficzne, klimatyczne i kulturowe, jak również różnorodność lokalnych gatunków dzikich drożdży i bakterii. Mikroorganizmy te wzrastają na płynnej pożywce otrzymanej z herbat czarnej, mat lub zielonej uzupełnionej przez źródło węgla. Brzeczka fermentacyjna nazywana "herbacianym grzybem" pochodzi z północno-wschodniej części Chin (Mandżuria). Napój ten wprowadzono do Europy na przełomie bieżącego wieku. Mikroorganizmy występujące w napoju produkują różne metabolity. Jest więc on bogaty w kwasy organiczne oraz aminokwasy, zwłaszcza lizynę, witaminy, antyoksydanty, enzymy i istotne mikroelementy (Na, K, Ca, Cu, Fe, Mn, Ni i Zn). Duże efekty zdrowotne metabolitów kombuchy spowodowały wzrost zainteresowania tym napojem. Największe właściwości prozdrowotne kombuchy to zdolność do detoksykacji i energetyzowania organizmu, poprawa trawienia oraz wzmocnienie systemu immunologicznego. Kombucha jest znana od wieków, ale zainteresowanie tym napojem ze strony naukowej wzrosło na początku ubiegłego wieku. W wyniku przeprowadzonych badań potwierdzono pozytywne oddziaływanie kombuchy na układ endokrynologiczny, immunologiczny, krążenia, przewodu pokarmowego i urologiczny. W latach 60-tych ubiegłego wieku zainteresowanie tym napojem spadło prawdopodobnie z powodu szerokiej ekspansji leków syntetycznych. Obecnie obserwuje się renesans kombuchy jako konsekwencja powrotu do naturalnych produktów leczniczych, jak również w wyniku prowadzonej działalności badawczej dotyczącej tych produktów. Najnowsze dobrze udokumentowane badania naukowe wskazują na przeciwbakteryjne, przeciwutleniające i antyproliferacyjne działanie kombuchy, poprawę po peroksydacji lipidów, stresie oksydacyjnym i cytotoxyczności spowodowanej substancjami zanieczyszczającymi środowisko, ponadto przeciwdziała otyłości, hypocholesterolemii wpływa na gojenie wrzodziejących ran posiada działanie ochronne przed chromosomowymi aberracjami indukowanymi przez promieniowanie gamma, chroni wątrobę przed stresem oksydacyjnym poprzez hamowanie apoptozy zależnej od mitochondriów. Wzrasta też zainteresowanie tym produktem w medycynie weterynaryjnej. Jak już wspomniano prozdrowotne właściwości kombuchy zapewniają mikroorganizmy w niej występujące, które należą do probiotyków, i ostatnio są również obiektem intensywnych badań.

Celem niniejszych badań było wytwarzanie napojów ekologicznych na bazie napoju orzeźwiającego z zielonej herbaty zwanego kombuchą z nowym stałym składnikiem w postaci szyszek chmielu ekologicznego. Dodatkiem do tego napoju były owoce i warzywa pochodzące z produkcji ekologicznej takie jak żurawina, malina, pigwa oraz natka zielonej pietruszki. Uzyskane produkty oceniano pod kątem właściwości prozdrowotnych.

Omówienie przebiegu badań.

Analiza mikrobiologiczna kombuchy.

Napoje stanowiące materiał badawczy zostały wyprodukowane w gospodarstwie ekologicznym Sylwii Pająk w Jastkowie k/ Lublina. Badano napoje wyprodukowane w czerwcu i w październiku bieżącego

roku .Zawierały one 10 g herbaty zielonej, 10 g szyszek chmielu, 100 g cukru oraz litr wody. Napoje były przewiezione do Katedry Biotechnologii, Żywienia Człowieka i Towaroznawstwa Żywności UP w Lublinie.

- **Użyte dodatki i numeracja prób**

Podstawowy skład napoju: herbata zielona 10 g, szyszki chmielu 10 g, cukier 100 g, woda 1000 cm³ BEZ PASTERYZACJI, PASTERYZACJA

		Natka		Żurawina		Malina		Pigwa		Próba zerowa bez dodatków owocowych
		Świeża [30g]g	Sucha [10g]	Świeża [10g]	Sucha [3g]	Świeża [10g]	Sucha [5g]	Świeże [10g]	Sucha [5g]	
Magnum [5g]	Suchy	01	03	05	07	09	11	13	15	17
Marynka [10g]	Suchy	02	04	06	08	10	12	14	16	18

- **Odmiany i formy chmielu**

Podstawowy skład napoju: herbata zielona 10 g, szyszki chmielu 10 g, cukier 100 g, woda 1000 cm³ BEZ PASTERYZACJI

	Magnum [5g]	Marynka[10g]
liofilizat	19	20
suchy	17	18
świeży	21	22

Bezpośrednio po przywiezieniu poddano analizie mikrobiologicznej zarówno płyn, jak i konglomerat drobnoustrojów zwanych „grzybem herbacianym”. Sterylnie odważono 10 g „grzyba” do kolb z 90 ml płynu fizjologicznego i wytrząsano przez 10 min. Po odstaniu przygotowywano dziesięciokrotne rozcieńczenia zawiesin wyjściowych. Takie rozcieńczenia przygotowano również dla płynów z napoju. Próby poddawano następującym oznaczeniom mikrobiologicznym zgodnie z PN-90/A-75052 stosując podłoża firmy BTL:

- ogólna liczba bakterii mezofilnych w 1 g na agarze odżywczym M;

- liczba drożdży i pleśni w 1 g na agarze z glukozą, ekstraktem drożdżowym i chloramfenikolem; Przeprowadzono identyfikację rodzajową drożdży w oparciu o obserwację makroskopową kolonii wyrosłych na agarze brzezkowym (wygląd, kształt, wielkość, zabarwienie, strukturę i mikroskopową obserwację specyficznych cech morfologicznych (kształt, wielkość, rodzaj rozmnażania, wytwarzanie pseudogrzybni). Wyniki z obserwacji porównywano z danymi literaturowymi.
- liczba bakterii kwaszących typu mlekowego w 1 g na agarze MRS;
- obecność bakterii octowych w 1 g owoców na brzezce z dodatkiem etanolu i kwasu octowego;
- najbardziej prawdopodobna liczba bakterii z grupy *coli* na podłożu z żółcią i zielenią brylantową;
- obecność i liczba *B. cereus* w 1 g na agarze Mossela, w razie konieczności testy potwierdzające
- obecność i liczba gronkowców *S. aureus* w 1 g – oznaczenie prowadzono na podłożu Baird-Parkera zgodnie z PN-93/A-86034/13, w razie konieczności obecność gronkowca potwierdzano testem na wytwarzanie koagulazy wolnej (Bactident Coagulase firmy Merck).

Wszystkie oznaczenia (za wyjątkiem metody NPL) wykonywano w trzech powtórzeniach i wyliczano średnie arytmetyczne z otrzymanych wyników.

Z uwagi na fakt, że badane napoje miały niskie pH wynoszące ok. 3, nie były oznaczane drobnoustroje takie jak *Salmonella* spp., *Listeria* spp., i *Proteus*, gdyż nie rosną one w tak kwaśnym środowisku (tab. 1).

Tab. 1 Wartości jonów pH dla poszczególnych prób napoju kombuchy.

^{lp}	Skład napoju	Wartości pH
1	Natka świeża 30 g, chmiel Magnum 5 g, cukier 100 g	3,52
2.	Natka świeża 30 g chmiel Marynka 10 g, cukier 100 g	3,59
3.	Natka sucha 10 g, chmiel Magnum 5 g, cukier 100 g	3,53
4.	Natka sucha 10 g, chmiel Marynka 10 g, cukier 100 g	3,30
5.	Żurawina świeża 10 g, chmiel Magnum 5 g, cukier 100 g	3,33
6.	Żurawina świeża 10g,chmiel Marynka 5g,cukier 100g	3,41
7.	Żurawina sucha 30g,chmiel Magnum 5g,cukier 100g	3,51
8.	Żurawina sucha 3g,chmiel Marynka 10g,cukier 100g	3,45
9.	Malina świeża 10g,chmiel Magnum 5g,cukier 100g	3,47
10.	Malina świeża 10g,chmiel Marynka 10g,cukier 100g	3,42
11.	Malina sucha 5 g,chmiel Magnum 5 g,cukier 100 g	3,53

12.	Malina sucha 5 g, chmiel Marynka 10 g, cukier 100 g	3,18
13.	Pigwa świeża 10g, chmiel Magnum 5 g, cukier 100 g	3,33
14.	Pigwa świeża 10 g, chmiel Marynka 10 g, cukier 100 g	3,40
15.	Pigwa sucha 5g, chmiel Magnum 5g, cukier 100g	3,29
16.	Pigwa sucha 5g, chmiel Marynka 10g, cukier 100g	3,30
17.	Próba zerowa bez dodatków, chmiel Magnum 5 g, cukier 100 g	3,39
18.	Próba zerowa bez dodatków, chmiel Marynka 10 g, cukier 100 g	3,69
19.	Chmiel Magnum 5 g liofilizat	3,22
20.	Chmiel Marynka 10 g, liofilizat	3,43
21.	Chmiel Magnum 5 g, świeży	3,72
22.	Chmiel Marynka 10 g, świeży	3,82
23.	Chmiel Magnum 10 g, suchy bez pasteryzacji	3,86
24.	Chmiel Magnum 5 g, suchy, bez pasteryzacji	3,73
25.	Chmiel Magnum 3 g, suchy, bez pasteryzacji	3,82
26.	Chmiel Marynka 20 g, suchy, bez pasteryzacji	3,76
27.	Chmiel Marynka 10 g, suchy, bez pasteryzacji	3,72
28.	Chmiel Marynka 5 g, suchy, bez pasteryzacji	3,74
29.	Cukier 90 g, bez pasteryzacji	3,40
30.	Cukier 65 g, bez pasteryzacji	3,42
32.	Cukier 75 g, bez pasteryzacji	3,40

Po inkubacji z wyrosłych koloni drożdży wykonano szereg posiewów redukcyjnych w celu uzyskania czystych kultur. Otrzymane pojedyncze kolonie zawieszono w płynie fizjologicznym i wykonano serię rozcieńczeń do 10^{-5} . Następnie posiano końcowe rozcieńczenia na agar brzezkowy. Wykonano preparaty przyżyciowe i przeprowadzono obserwację cech morfologicznych. Drożdże zidentyfikowano za pomocą testu ID API 32 C. Z podłoża brzezkowego o 7° Ballinga z kwasem octowym i alkoholem etylowym z kolbek o wyraźnym zapachu octu pobrano błonkę i przeniesiono

równolegle na podłoże z ekstraktem drożdżowym i alkoholem i na podłoże z węglanem wapnia. Nie zaobserwowano wzrostu bakterii octowych, urosły natomiast kolonie drożdży. W celu zahamowania wzrostu drożdży zastosowano aktidion. Do podłoża z węglanem wapnia, ekstraktem drożdżowym i alkoholem dodano aktidion w stężeniu 10 mg na litr. Po 72 h inkubacji pojawiły się kolonie wytwarzające kwas otoczone strefą prześwieconego podłoża na skutek rozłożenia węglanu wapniowego.

W celu określenia wyizolowanych drożdży i bakterii octowych do gatunku przeprowadzono diagnostykę molekularną. Materiał biologiczny stanowiły czyste kultury mikroorganizmów uzyskane w wyniku prowadzenia hodowli płytkowych na podłożu stałym. Próbkę przechowywane były w temp. – 20°C. Ekstrakcję DNA przeprowadzono poprzez wydłużanie etapu denaturacji wstępnej podczas reakcji PCR. Reakcję PCR przeprowadzono w obecności starterów specyficznych dla grzybów strzępkowych oraz bakterii (Dodatek 1). Amplifikowano fragmenty genomów, które umożliwiają identyfikację na podstawie porównania uzyskanych sekwencji z rekordami w bazie danych NCBI GenBank. Reakcję PCR przeprowadzono w 25 µl mieszaniny reakcyjnej o następującym składzie: 1 µl komórek mikroorganizmów pobranych z pożywki stałej, 20 pmol każdego ze starterów, 12,5 µl 2X PCR Master Mix (Thermo Scientific, Litwa). Do przeprowadzenia reakcji PCR stosowano następujący program temperatury: 95°C – 15 min. 45 cykli: 95°C - 30 sek., 55°C - 20 sek., 72°C - 30 sek. 72°C – 5 min. Produkty reakcji PCR rozdzielono na 1,5% żelu agarozowym w obecności 0,01 % bromku etydyny w buforze TBE, przy napięciu 150 V, natężeniu 285 mA, w czasie 2 h. Otrzymane wzory rozdziałów obserwowano w świetle UV w archiwizatorze żeli GelDoc2000 (BioRad). Uzyskane amplikony sekwencjonowano w firmie Genomed w Warszawie z wykorzystaniem sekwencjonatora kapilarnego. Identyfikację mikroorganizmów przeprowadzono poprzez przyrównanie z sekwencjami znajdującymi się w bazie NCBI GenBank.

Dodatek 1. Oligonukleotydy użyte do amplifikacji DNA mikroorganizmów.

1. Amplifikacja fragmentu genomu ITS, oligonukleotydy specyficzne dla grzybów strzępkowych:

Oligonukleotyd		1:	ITS1
sekwencja	5'->3':	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	
długość:		19	nt.
Tm	:		55.4°C

Oligonukleotyd		2:	ITS4
sekwencja	5'->3':	TCCTCCGCTTATTGATATGC	
długość:		20	nt.
Tm	:		49.7°C

2. Amplifikacja podjednostki rybosomalnej 28s, oligonukleotydy specyficzne dla grzybów strzępkowych:

Oligonukleotyd		1:	NL1
sekwencja	5'->3':		GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG
długość:		24	nt.
Tm	:		54.0°C

Oligonukleotyd		2:	NL4
sekwencja	5'->3':		GGTCCGTGTTTCAAGACGG
długość:		19	nt.
Tm	:		53.2°C

3. Amplifikacja podjednostki rybosomalnej 16s, oligonukleotydy specyficzne dla bakterii:

Oligonukleotyd		1:	27f
sekwencja	5'->3':		AGAGTTTGATCmTGGCTCAG
długość:		20	nt.
Tm	:	49.7°C	- 51.8°C

Oligonukleotyd		2:	1525r
sekwencja	5'->3':		AAGGAGGTGwTCCArCC
długość:		17	nt.
Tm	:	47.1°C	- 49.5°C

4. Amplifikacja podjednostki rybosomalnej 16s, oligonukleotydy specyficzne dla bakterii:

Oligonukleotyd		1:	p8FPL
sekwencja	5'->3':		AGAGTTTGATCCTGGCTCAG
długość:		20	nt.
Tm	:		51.8°C

Oligonukleotyd		2:	p806R
sekwencja	5'->3':		GGACTACCAGGGTATCTAAT
długość:		20	nt.
Tm	:		49.7°C

Identyfikacja i określenie zawartości kwasów fenolowych w napojach

Przeprowadzono metodą HPLC analizę kwasów fenolowych wolnych i związanych w próbach z dodatkami owoców lub natki i próbach kontrolnych (bez dodatków). Ponadto oznaczano aktywność antyoksydacyjną (w przeliczeniu na Trolox) w układzie z rodnikiem ABTS i DPPH we wszystkich próbach.

Analiza kwasów fenolowych wolnych i związanych metodą HPLC w napojach poprzedzona była hydrolizą próbek. Do rozdziału kwasów fenolowych wykorzystano zestaw HPLC firmy Gilson, złożony z: dwóch pomp tłokowych Gilson 306, detektora DAD typ 170, modułu manometrycznego 805, dynamicznego miksera 811C, pętli objętościowej Gilson 20 mm³ oraz programu komputerowego UniPoint wersja 3.01. Rozdziały prowadzono przy użyciu kolumny z odwróconą fazą Symmetry C18, 5 μm, 4,6 × 250 mm Cartridge (WatersIreland) oraz prekolumny Symmetry C18 5 μm, 8 × 20 mm Cartridge (WatersIreland). Detekcję sygnału monitorowano przy dł. fali 320 nm, a ponieważ fenolokwasy różnią się od siebie maksimami absorpcji również przy długościach fal: 365 nm, 280 nm i 260 nm, w układzie gradientowym, stosując jako eluenty: A – 0,1% roztwór kwasu octowego; B – 50% roztwór acetonitrylu. Identyfikację i ilościowe oznaczenie zawartości fenolokwasów dokonano w oparciu o następujące wzorce kwasów: galusowego, syringowego, proktokatecholowego, 4-hydroksybenzoesowego, chlorogenowego, kawowego, p-kumarowego, ferulowego, synapinowego i 2-hydroksycynamonowego na podstawie czasu retencji.

Określenie aktywności przeciwutleniającej badanych napojów

Analizę właściwości przeciwutleniających przeprowadzono w odpowiednio rozcieńczonych napojach wobec rodników ABTS i DPPH. Absorbancję mierzono przy długościach fali 700 (ABTS) lub 515 (DPPH) nm przez 5 min. w odstępach 30 sek. (20 ° C, czytnik płytek Sunrise, Tecan, Austria). Kontrola negatywna nie zawierała dodatku badanej próby. Przy opracowaniu wyników uwzględniono absorbancję odpowiednio rozcieńczonej próby bez dodatku roztworu zawierającego rodnik. Wyniki wyrażono w równoważnikach Trolox-u (TEAC), w zakresie stężeń wodnego roztworu Troloxu: 0,006 mmol·dm⁻³ – 0,623 mmol·dm⁻³, po 2 min. reakcji. Wszystkie analizy przeprowadzono w trzech powtórzeniach.

Analizę statystyczną wykonano za pomocą jednoczynnikowej lub wieloczynnikowej analizy wariancji, wykorzystując program StatSoft STATISTICA ver. 6.0. Istotność różnic pomiędzy średnimi w poszczególnych grupach zweryfikowano testem Tukey'a.

Określenie zawartości cukrów prostych: glukozy i fruktozy

Do określenia zawartości cukrów prostych: glukozy i fruktozy, obecnych w płynach pofermentacyjnych, wykorzystano metodę enzymatyczną, a w przypadku wariantów napojów z dużymi dawkami chmielu chromatografię cieczową prowadzoną na kolumnie Aminex HPX-42C (długości 330mm, średnicy 7,8mm) i detekcją refraktometryczną (Knauer K2300)

Określenie zawartości alkoholu etylowego i innych towarzyszących związków lotnych

Oznaczenie ilościowe i jakościowe alkoholu etylowego i towarzyszących związków lotnych przeprowadzono z wykorzystaniem zestawu do chromatografii gazowej z detekcją masową firmy Shimadzu. W skład zestawu wchodził chromatograf gazowy typ GC2010, kwadropolowy spektrometr mas z jonizacją elektronami, typ QP 2010Plus, automatyczny podajnik próbek, typ AOC-20i. Rejestracja i analiza danych prowadzona była za pomocą komputerowego systemu zbierania danych, pracującego pod kontrolą oprogramowania GCMS LabSolution 2.5 z biblioteką widm masowych NIST 5.0.

Określenie stopnia inhibicji aktywności α -amylazy trzustkowej przez wybrane próby napojów

W celu oznaczenia stopnia inhibicji aktywności α -amylazy przez wybrane napoje wykonano 3 rodzaje prób: próba właściwa (PW), próba zerowa nr 1 (P01), próba zerowa nr 2 (P02). Próby przygotowano wg tabeli 1. Przed wykonaniem analizy pH badanych prób skorygowano do wartości pH 8.

Tab. 2. Przygotowanie prób

PRÓBA	ROZTWÓR ENZYM	ROZTWÓR SKROBI	BADANA PRÓBA	WODA DESTYLOWANA
PW	0,1 cm ³	0,9 cm ³	0,5 cm ³	-----
P01	0,1 cm ³	-----	-----	1,4 cm ³
P02	-----	0,9 cm ³	0,5 cm ³	0,1 cm ³

Roztwór enzymu przygotowano rozpuszczając 0,08 g pankreatyny w 25 cm³ buforu fosforanowego o pH 7. 1% roztwór skrobi przygotowano przez rozpuszczenie 1 g skrobi w 100 cm³ buforu o pH 6.

Próby przygotowano wg tabeli 1. bez dodatku roztworu enzymu termostatowano w temperaturze 37°C przez 10 minut. Po osiągnięciu tej temperatury do prób PW i P01 dodano roztwór enzymu w ilości 0,1 cm³, a następnie inkubowano w temperaturze 37°C przez okres 20 min. Po tym czasie do każdej próby dodano 1,5 cm³ odczynnika DNS i ogrzewano w temperaturze 100°C przez 5 minut. Po ostudzeniu dodano 6 cm³ wody destylowanej do każdej z prób. Pomiaru absorbancji dokonano za pomocą

spektrofotometru Spekol 11 (Carl Zeiss Jena) przy długości fali 550nm w temperaturze 22°C, wobec próby odczynnikowej.

Ilość uwolnionej glukozy ze skrobi, przy udziale enzymu, została obliczona na podstawie krzywej wzorcowej (absorbancja od stężenie, $R^2=0,9705$).

Stopień inhibicji α -amylazy przez wybrane produkty został wyrażony poprzez jej aktywność definiowaną jako ilość miligramów glukozy uwolnionej ze skrobi w czasie 1 minuty w środowisku reakcyjnym o objętości 1cm³.

Określenie zdolności do inhibicji aktywności lipazy trzustkowej przez próby napojów

Celem określenia zdolności do inhibicji aktywności lipazy trzustkowej przez wybrane napoje wykonano 3 rodzaje prób (tab.2):

- Próba właściwa (PW)
- Próba zerowa nr 1 (P01)
- Próba zerowa nr 2 (P02)

Tab.3. Przygotowanie prób

RODZAJ PRÓBY	PRÓBKĄ	ROZTWÓR LIPZY	TWEEN 80	WODA	ETANOL
PW	100 μ l	100 μ l	40 μ l	-	100 μ l
P01	100 μ l	-	40 μ l	100 μ l	100 μ l
P02	-	100 μ l	-	240 μ l	-

Próby przygotowane wg tab. 2 termostatowano w temperaturze 37°C przez 40 minut. Oznaczenia wykonano w potrójnym powtórzeniu. Wydzielony w oznaczeniu kwas oleinowy ekstrahowano heksanem i po uprzednim przeprowadzeniu w ester metylowy, metanolowym roztwór KOH o stężeniu 2mol/dm³, oznaczono za pomocą chromatografu gazowego typ GC2010 z kwadrupolowym spektrometrem mas z jonizacją elektronami, typ QP 2010Plus, automatycznym podajnikiem próbek, typ AOC-20i. Rejestracja i analiza danych prowadzona była za pomocą komputerowego systemu zbierania danych, pracującego pod kontrolą oprogramowania GCMS LabSolution 2.5 z biblioteką widm masowych NIST 5.0. Jako wzorzec ilościowy FAME wykorzystano wzorzec firmy Supelco zawierający 37 estrów metylowych kwasów tłuszczowych. W oparciu o stężenie uwolnionego kwasu oleinowego obliczono ilość μ moli rozłożonego substratu (Tween 80) w przeciągu 1 minuty w

przeliczeniu na 1mg białka enzymatycznego. Wynik końcowy wyrażono w U/mg białka enzymatycznego.

Ocena organoleptyczna badanych napojów

Do oceny wyróżników organoleptycznych badanych produktów zastosowano ocenę pięciopunktową dla soków owocowych. Ocenę organoleptyczną badanych napojów przeprowadził 7-osobowy zespół, którego członkowie spełniali wymagane minimum wrażliwości sensorycznej. Pomieszczenie do badań było czyste, odpowiednio oświetlone i panowała w nim wymagana temperatura. Przy ocenie brano pod uwagę następujące wyróżniki: wygląd, barwa, zapach oraz smak. Uzyskane wyniki badań poddano analizie statystycznej, która obejmowała jednoczynnikową analizę wariancji. Wnioskowanie przeprowadzono w oparciu o test F Snedecora na poziomie istotności $\alpha=0,05$.

Wyniki

Analiza mikrobiologiczna napoju nr 1 wyprodukowanego w czerwcu 2013 roku

Tab. 4. Mikroorganizmy wyizolowane z „grzyba herbacianego” kombuchy nr 1

Rodzaj badań	Liczba drobnoustrojów [w 1g produktu]
Ogólna liczba bakterii mezofilnych	$6,8 \times 10^3$ jtk
Drożdże	$1,4 \times 10^4$ jtk
Pleśnie	Nieobecne
Bakterie mlekowe	Nieobecne
Bakterie z grupy coli	Nieobecne
Coli fekalne	Nieobecne
Bakterie octowe	Obecne
Bacillus cereus	Nieobecne
Staphylococcus aureus	Nieobecne

Tab.5. Mikroorganizmy wyizolowane z płynu kombuchy nr 1

Rodzaj badań	Liczba drobnoustrojów [w 1g produktu]
Ogólna liczba bakterii mezofilnych	4,5 x 10 ³ jtk
Drożdże	6 x 10 ³ jtk
Pleśnie	Nieobecne
Bakterie mlekowe	Nieobecne
Bakterie z grupy coli	Nieobecne
Coli fekalne	Nieobecne
Bakterie octowe	Obecne
Bacillus cereus	Nieobecne
Staphylococcus aureus	Nieobecne

Analiza mikrobiologiczna napoju nr 2 wyprodukowanego w październiku 2013 roku

Tab. 6 Mikroorganizmy wyizolowane z kombuchy nr 2

Rodzaj badań	Liczba drobnoustrojów [w 1g produktu]
Ogólna liczba bakterii mezofilnych	9,2 x 10 ⁴ jtk
Drożdże	9,1 x 10 ⁴ jtk

Pleśnie	Nieobecne
Bakterie mlekowe	Nieobecne
Bakterie z grupy coli	Nieobecne
Coli fekalne	Nieobecne
Bakterie octowe	Obecne
Bacillus cereus	Nieobecne
Staphylococcus aureus	Nieobecne

Największą liczbę bakterii mezofilnych i drożdży określono w napoju nr 2. W żadnej z badanych prób nie stwierdzono obecności bakterii chorobotwórczych takich jak *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* oraz bakterii z grupy *coli* (tab.6).

Bakterie octowe tworzyły żelową strukturę na powierzchni brzezki we wszystkich próbach. W wykonanym preparacie Grama po wybarwieniu w preparacie zaobserwowano Gram ujemne pałeczki. Wykonano test na katalazę, który wykazał wynik dodatni. Czystą kulturę bakterii przesiano na selektywne podłoża wraz ze szczepem wzorcowym *Acetobacter* spp.

- Z zielenią bromokrezolową i etanolem.

- Płynne z ekstraktem drożdżowym, etanolem.

- Podłoże z mleczanem wapniowym.

- Podłoże stałe z ekstraktem drożdżowym, węglanem wapnia i etanolem.

- Podłoże z zielenią po 24 h zmieniło barwę z niebieskozielonej na żółtą zarówno przy badanym szczepie jak i wzorcowym. Świadczy to że bakterie wytwarzają kwas octowy z alkoholu. Po 72h zabarwienie ponownie zmieniło się na zielononiebieskie, ponieważ szczepy *Acetobacter* dalej utleniają kwas octowy do dwutlenku węgla.
- Na podłożu płynnym z ekstraktem i etanolem sprawdzono czy szczep wytwarza celulozę w celu ustalenia czy jest to *Acetobacter xylinum*. Po inkubacji wytworzył się kożuszek, który umieszczono na szkiełku podstawowym, barwiono przez kilka minut płynem Lugola, płukano wodą i dodano kilka

kropli 50% kwasu siarkowego. Pod mikroskopem nie zaobserwowano wytworzonych nitek celulozy które powinny wybarwić się na kolor jaskrawoniebieski.

- Na podłożu z mleczanem wapniowym szczep wyrósł w postaci jasnokremowych kolonii otoczonych strefą przejaśnienia, podobnie jak szczep wzorcowy. Nie zaobserwowano mętnej strefy wytrąconego węgla wapniowego.
- Na podłożu stałym z ekstraktem, węglanem wapnia i etanolem szczep wyrósł w postaci jasnokremowych kolonii otoczonych strefą przejaśnienia.

Wyniki te wskazują że wyizolowany szczep jest z rodzaju *Acetobacter*. Badania genetyczne potwierdziły tę przynależność i określono do gatunku *Glukonacetobacter saccharivorans*.

Z napoju nr 1 wyizolowano pięć różnych rodzajów drożdży. Po 24-48h. Identyfikowano drożdże za pomocą testów ID API 32C.[9]

Identyfikacja biochemiczna wykazała:

Szczep nr I po 48h asymilował cukry: Galaktoza +, N-acetylo-glukozamina +, D-celobioza +, Glukoza +

Reszta cukrów nie była asymilowana. Stwierdzono więc jednoznacznie że jest to gatunek *Dekkera anomala*. co potwierdziły badania genetyczne .

Szczep nr II po 48h asymilował tylko D- sorbitol i jak wszystkie pozostałe szczepy glukozę, czyli posiada najbardziej przybliżone cechy klasyfikujące go do rodzaju *Zygosaccharomyces*. [13]

Szczep o tych właściwościach wg systematyki Kregera-van Rijja to *Zygosaccharomyces bisporus*. [10] Badania genetyczne i nie potwierdziły tego wyniku. Określono że jest to *Zygosaccharomyces bailii*.

Szczep nr III po 48h asymilował N-acetylo-glukozaminę, kwas mlekowy, glukozę i glicerol. Wyniki te wskazują, że jest to gatunek *Candida crusei* co zostało potwierdzone w badaniach genetycznych.

Szczep nr IV po 48h asymilował tylko kwas mlekowy, glukozę i glicerol co wskazuje że jest to *Candida inconspicue* .

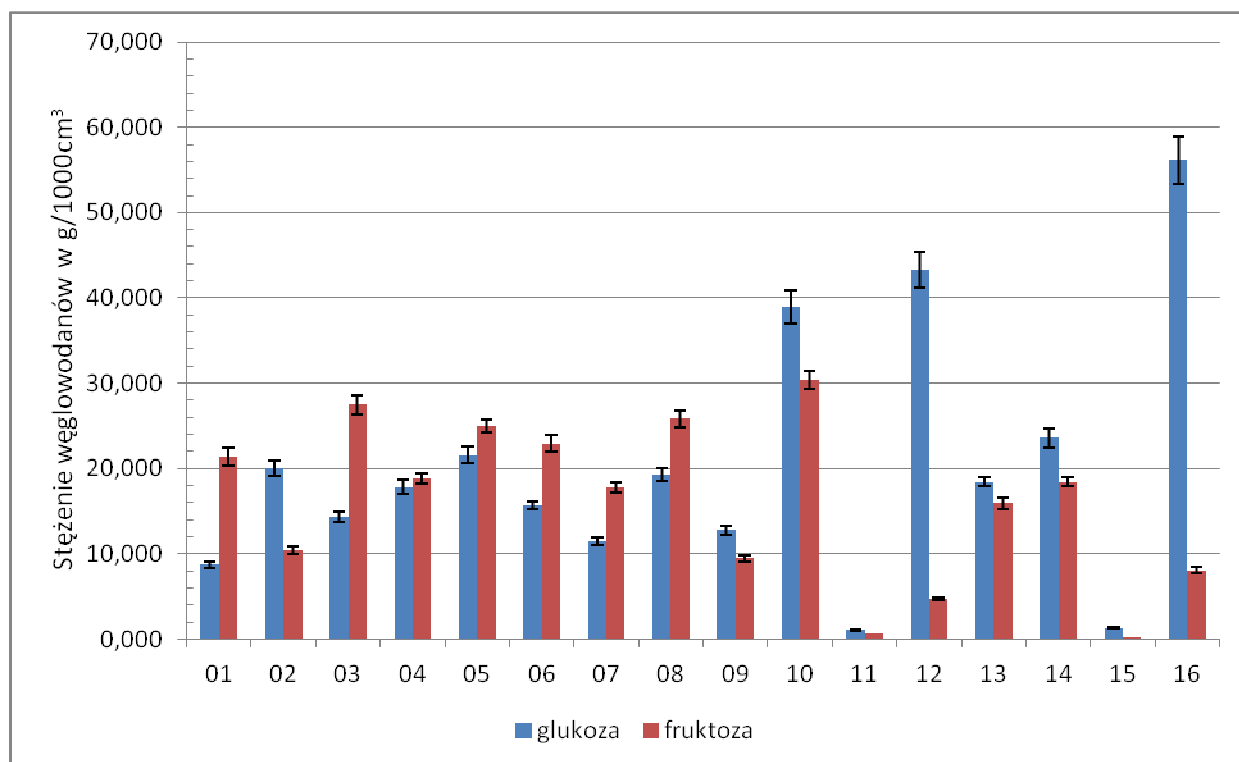
Szczep nr V po 48 h asymilował sacharozę, N-acetyloglukozaminę, kwas mlekowy, glukozaminę, nie wykazał wrażliwości na aktidion. Wyniki te nie pozwoliły jednoznacznie określić gatunku .Badania genetyczne wykazały , że jest to *Candida ethanolica*.

W napoju nr 2 za pomocą testów biochemicznych oznaczono gatunki drożdży takie jak w napoju nr 1 tj. *Dekkera anomala*, *Zygosaccharomyces bailii*, *Candida ethanolica* z wyjątkiem *Candida*

crusei i *Candidy inconspicue*. W napoju tym zidentyfikowano również bakterie octowe *Gluconacetobacter saccharivorans*. Obecność *Candida crusei* gatunku chorobotwórczego w jednej z prób wskazuje na konieczność wykonywania analiz mikrobiologicznych w każdej partii uzyskanego napoju, aby wyeliminować partie zanieczyszczone.

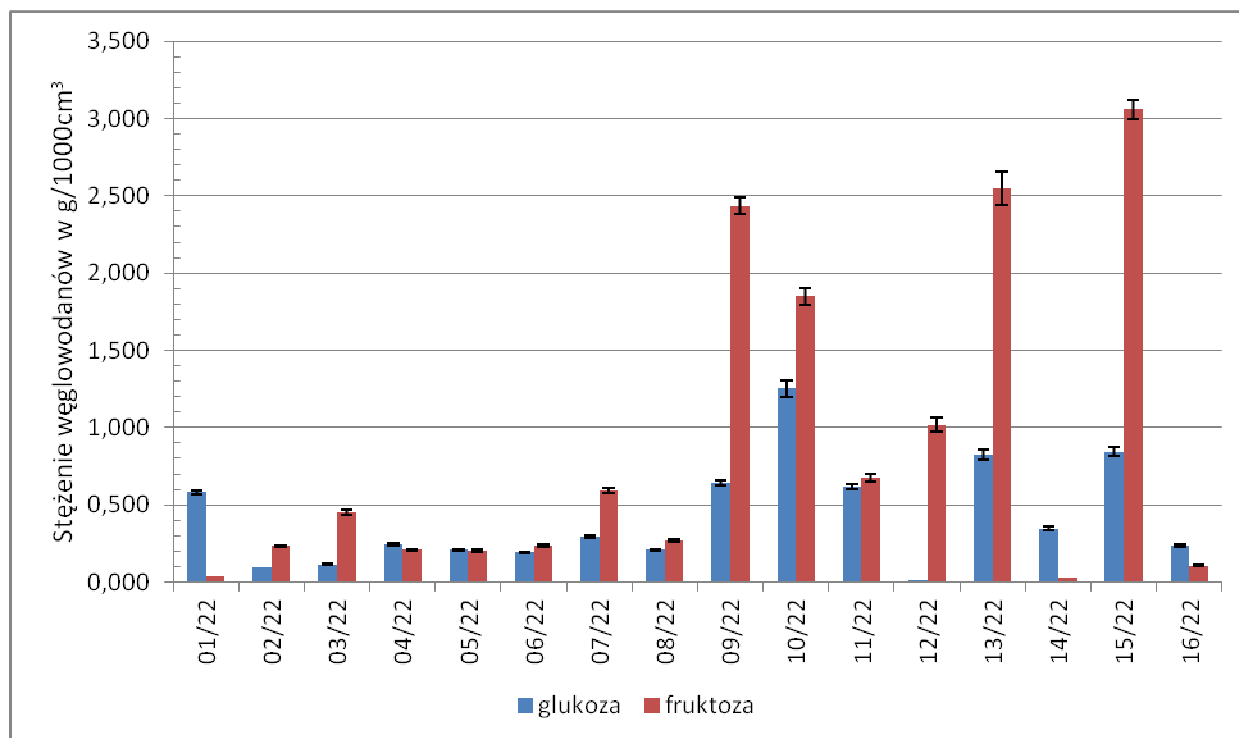
Zawartość glukozy i fruktozy w napoju świeżym i przechowywanym

Oznaczanie cukrów prostych wykonano we wszystkich wariantach napoju świeżego, pobranego bezpośrednio po upływie jednotygodniowej fermentacji oraz po przechowywaniu przez okres jednego tygodnia w temperaturze 22°C (rys.1). Najniższe stężenie glukozy oznaczono w próbkach 11, 15, 01 i wynosiło ono odpowiednio $1,043 \pm 0,031$ g/1000cm³, $1,304 \pm 0,064$ g/1000cm³ i $8,693 \pm 0,426$ g/1000cm³. Najwyższe stężenia glukozy oznaczono w próbkach 10, 12, 16 i wynosiły one odpowiednio $38,945 \pm 1,947$ g/1000cm³, $43,291 \pm 2,035$ g/1000cm³, $56,157 \pm 2,808$ g/1000cm³. W przypadku próbek 02, 09, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 stężenie glukozy jest wyższe od stężenia fruktozy. Taka proporcja glukozy do fruktozy może świadczyć o zbyt wczesnym zakończeniu fermentacji, przy założeniu iż w złożonym kompleksie mikrobiologicznym napoju, jednym z głównych procesów fermentacyjnych jest fermentacja alkoholowa prowadzona przez drożdże.



Rys. 1 Zawartość glukozy i fruktozy w napoju przeznaczonym do bezpośredniego spożycia, wyrażona w g/1000cm³

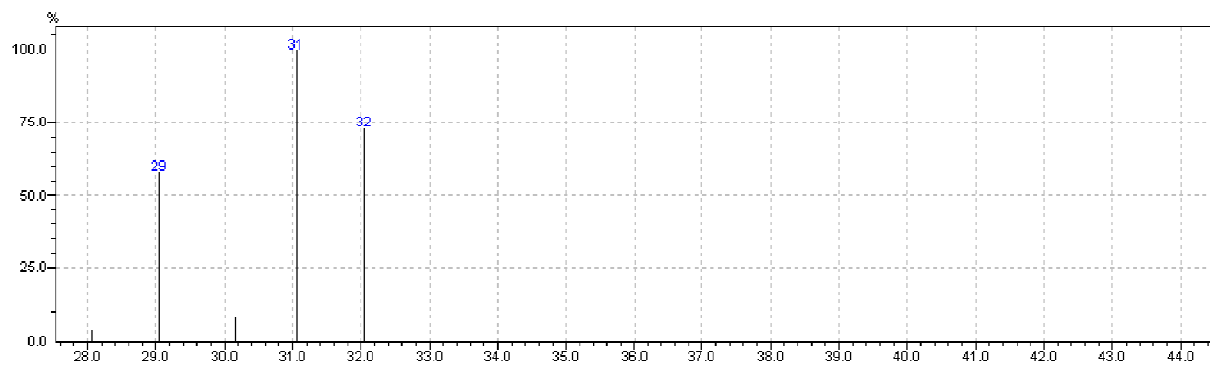
Po upływie jednotygodniowego okresu przechowywania w temperaturze 22°C zarówno proporcja glukozy do fruktozy jak i stężenie cukrów uległo zmianie (rys.2) w porównaniu do świeżego napoju (rys.1). W 12 na 16 próbek zaobserwowano wyższe stężenie fruktozy niż glukozy, co jest charakterystyczne dla procesu fermentacyjnego prowadzonego przez drożdże. Najwyższe stężenie fruktozy plasujące się w przedziale od $0,678 \pm 0,024 \text{ g/1000cm}^3$ do $3,060 \pm 0,061 \text{ g/1000cm}^3$ oznaczono dla próbek o numerach: 09/22, 10/22, 11/22, 12/22, 13/22, 15/22.



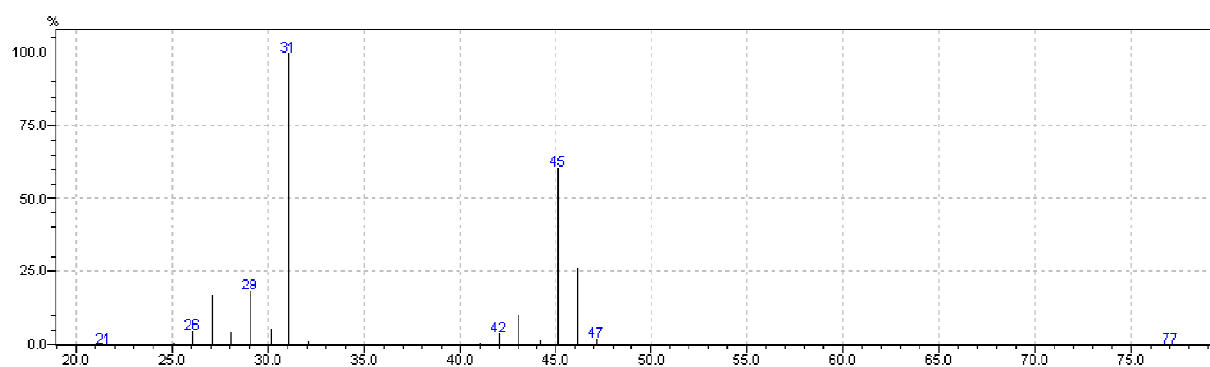
Rys. 2 Zawartość glukozy i fruktozy wyrażona w g/1000cm^3 w napoju po 7 dniach przechowywania w temperaturze 22°C

Zawartość alkoholu etylowego i innych towarzyszących związków lotnych

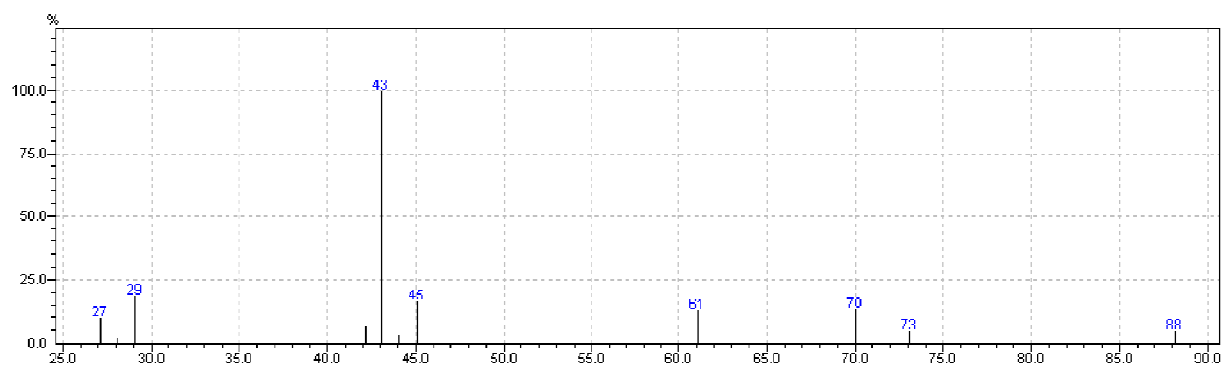
W analizowanych próbkach napojów oznaczono alkohol etylowy a także śladowe ilości alkoholu metylowego, octany etylu. Ponadto wykryto w śladowych ilościach 8 innych związków, których ustalono widma masowe. Widma mas poszczególnych związków przedstawiono na rys. od 3 do 13. W płynach pochodowlanych nie stwierdzono obecności: kwasu mrówkowego, kwasu propionowego, kwasu octowego, 1-pentanolu, 1-butanolu, 1-propanolu, alkoholu izoamylowego, glicerolu.



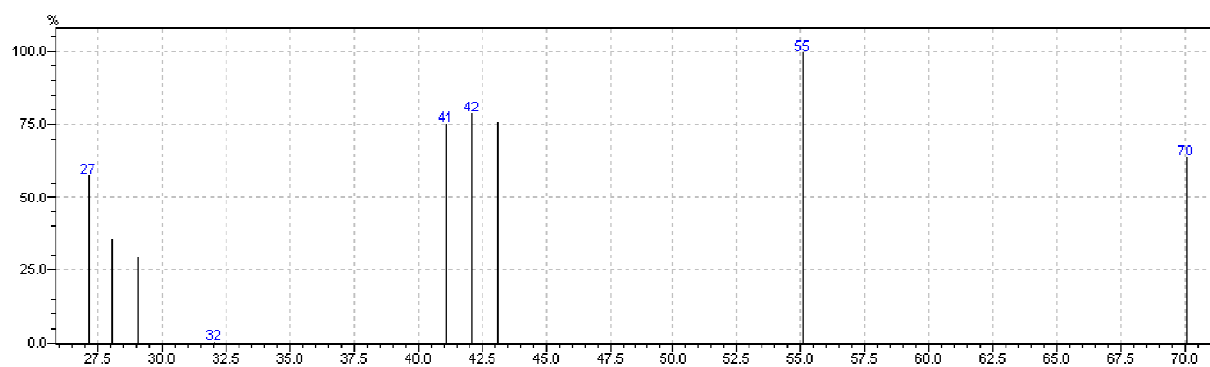
Rys. 3 Widmo mas alkoholu metylowego, otrzymane w wyniku jonizacji EI próbki napoju. Czas retencji alkoholu metylowego wynosił 1,471min.



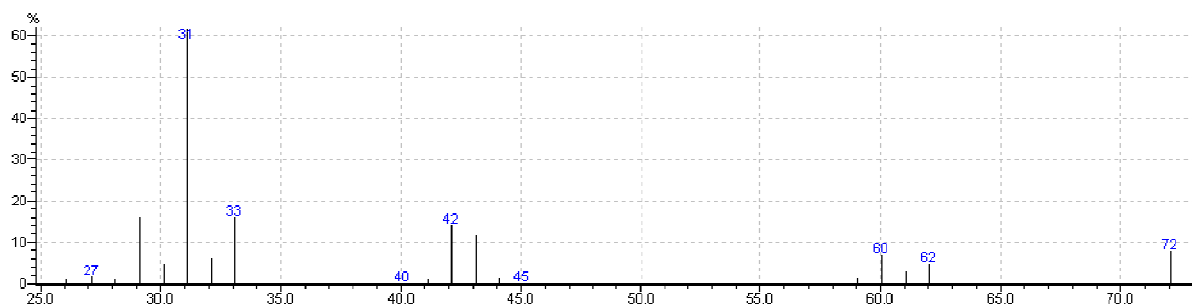
Rys. 4 Widmo mas alkoholu etylowego, otrzymane w wyniku jonizacji EI próbki napoju. Czas retencji alkoholu etylowego wynosił 1,69min.



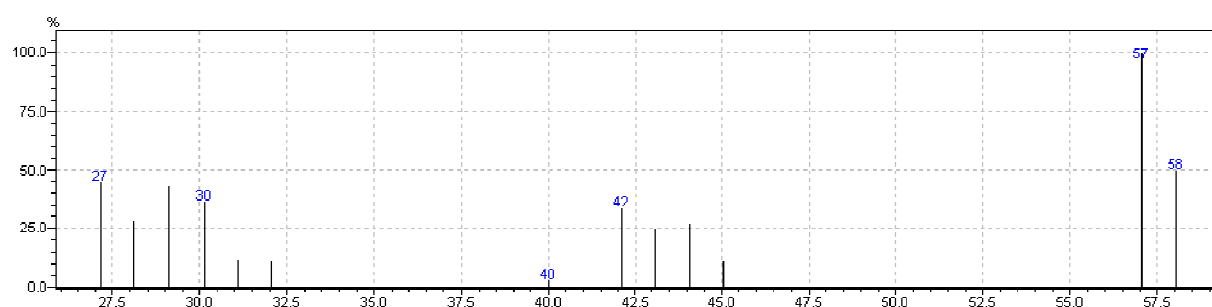
Rys. 5 Widmo mas octanu etylu, otrzymane w wyniku jonizacji EI próbki napoju. Czas retencji octanu etylu wynosił 1,27min.



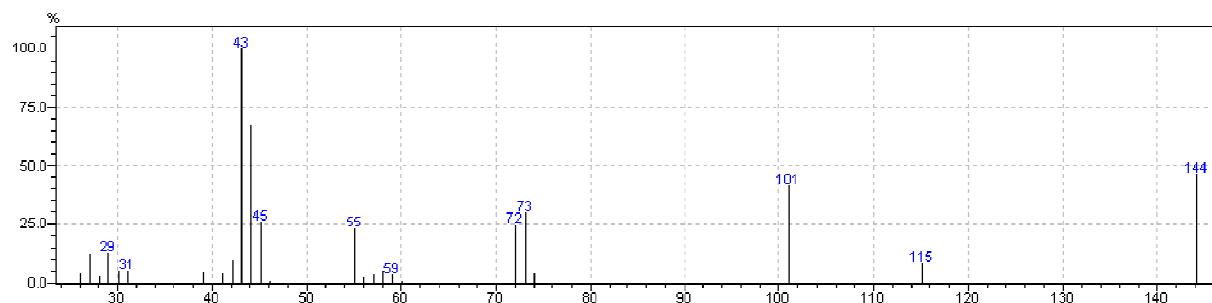
Rys. 6 Widmo mas nieznanego związku, otrzymane w wyniku jonizacji EI próbki napoju. Czas retencji wynosił 7,34min. Widmo w części identyczne (82) z widmem 3-metylo-1butanolu.



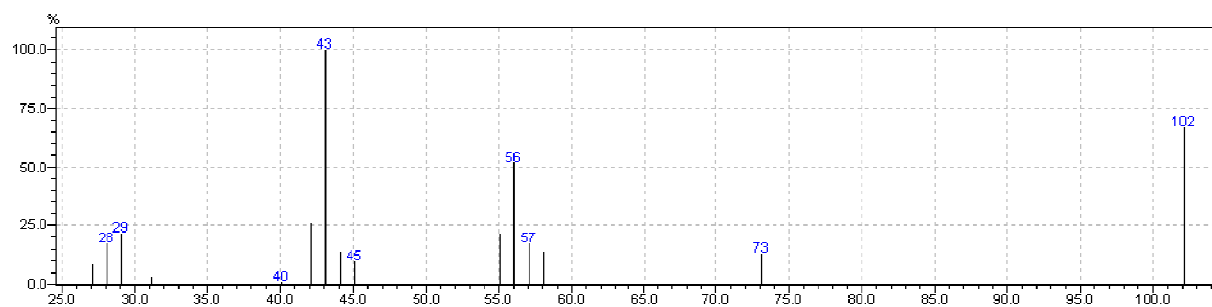
Rys. 7 Widmo mas nieznanego związku, otrzymane w wyniku jonizacji EI próbki napoju. Czas retencji wynosił 38,54min. Widmo w części identyczne (82) z widmem 2-propanonu.



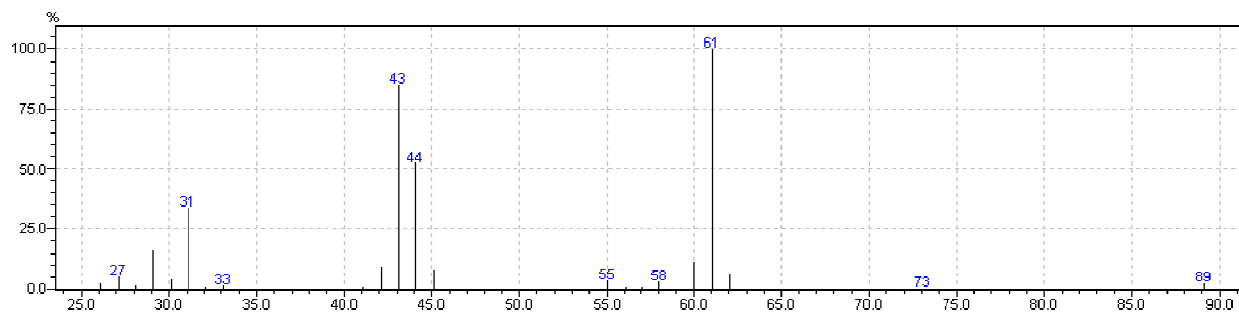
Rys. 8 Widmo mas nieznanego związku, otrzymane w wyniku jonizacji EI próbki napoju. Czas retencji wynosił 39,5min. Widmo w części identyczne (88) z widmem hydroksy-gamma-butyrolaktonu.



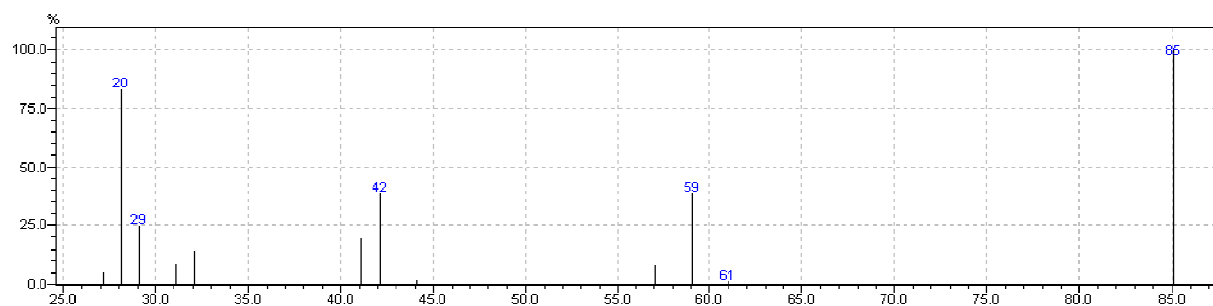
Rys. 9 Widmo mas nieznanego związku, otrzymane w wyniku jonizacji EI próbki napoju. Czas retencji wynosił 40,5min. Widmo w części identyczne (88) z widmem 4H-Pyran-4-on.



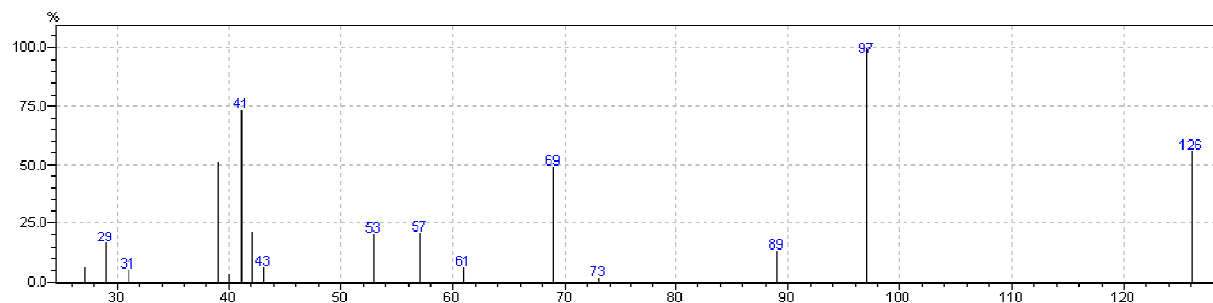
Rys. 10 Widmo mas nieznanego związku, otrzymane w wyniku jonizacji EI próbki napoju. Czas retencji wynosił 41,024min. Widmo w części identyczne (88) z widmem 4H-Pyran-4-on.



Rys. 11 Widmo mas nieznanego związku, otrzymane w wyniku jonizacji EI próbki napoju. Czas retencji wynosił 41,14min. Widmo w części identyczne (95) z widmem kwasu 4-okso-pentanowego.



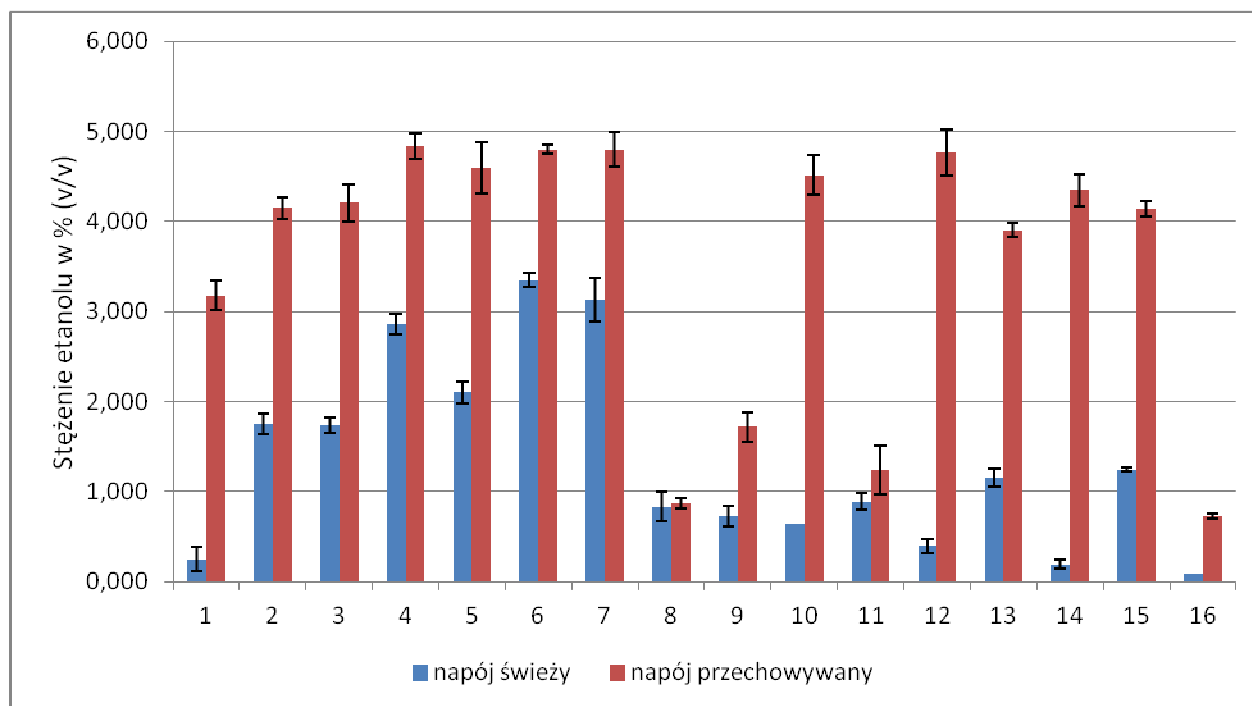
Rys. 12 Widmo mas nieznanego związku, otrzymane w wyniku jonizacji EI próbki napoju. Czas retencji wynosił 42,6min. Widmo w części identyczne (76) z widmem 1H-Tetrazolu.



Rys. 13 Widmo mas nieznanego związku, otrzymane w wyniku jonizacji EI próbki napoju. Czas retencji wynosił 42,8min. Widmo w części identyczne (79) z widmem 4-heksan-3-one.

We wszystkich wytworzonych wariantach napojów wykryto i oznaczono alkohol etylowy. W grupie napojów świeżych, nie poddanych przechowywaniu zawartość alkoholu etylowego w próbie plasowała się w przedziale od $0,087 \pm 0,019$ % (v/v) dla próby nr 16 do $3,348 \pm 0,124$ % (v/v) dla próby nr 6 (rys. 14). Jak można zauważyć na wykresie nr 3 próbki: 2, 3, 4, 5, 6, 7 zawierają wyższe stężenie etanolu, a zarazem niższe stężenie glukozy (rys. 1), co wskazuje na sprawniej przebiegający proces fermentacji etanolowej.

Zawartość etanolu wzrasta w okresie przechowywania, co świadczy o nadal trwającej w napojach fermentacji alkoholowej. Po zakończeniu 7 dniowego przechowywania w temperaturze 22°C średnia zawartość alkoholu etylowego w próbkach wynosi średnio $4,351 \pm 0,463$ % (v/v), z wyłączeniem prób 8,9,11,16 w których średnia zawartość alkoholu etylowego wynosi $1,139 \pm 0,097$ % (v/v). Oznaczone stężenia alkoholu etylowego czynią ten produkt napojem alkoholowym podlegającym, ustawowo kontrolowanemu obrotowi.



Rys. 14 Stężenie alkoholu etylowego, wyrażone w % (v/v), oznaczone w próbce świeżej i przechowywanej w 22°C przez 7 dni.

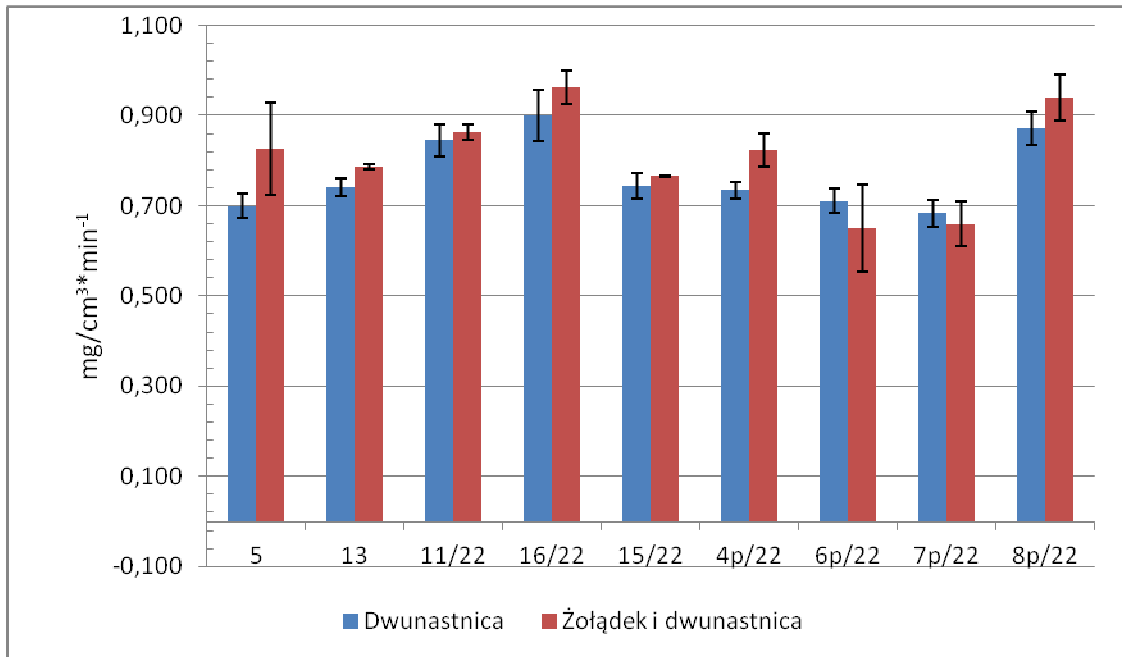
Analiza korelacji stężenia glukozy, fruktozy i alkoholu etylowego wykazała, że zawartość glukozy silnie koreluje dodatnio ($0,0,829224$ $p < 0,03$) z zawartością fruktozy, co wydaje się zgodne z przewidywaniami z uwagi na sacharozę, będącą wspólnym źródło tych węglowodanów w układzie. Stwierdzono również ujemną korelację między glukozą i fruktozą, odpowiednio $-0,5596572$ $p < 0,03$ oraz $-0,469936$ $p < 0,03$, a stężeniem etanolu w układzie. Można przypuszczać iż korelacja ta wynika z kierunku wykorzystania węglowodanów przez kompleks mikroorganizmów użytych do fermentacji, co wskazuje, że etanol jest jednym z głównych produktów przemiany węglowodanów w tym układzie.

Ocena stopnia inhibicji aktywności α -amylazy trzustkowej przez wybrane próby napojów

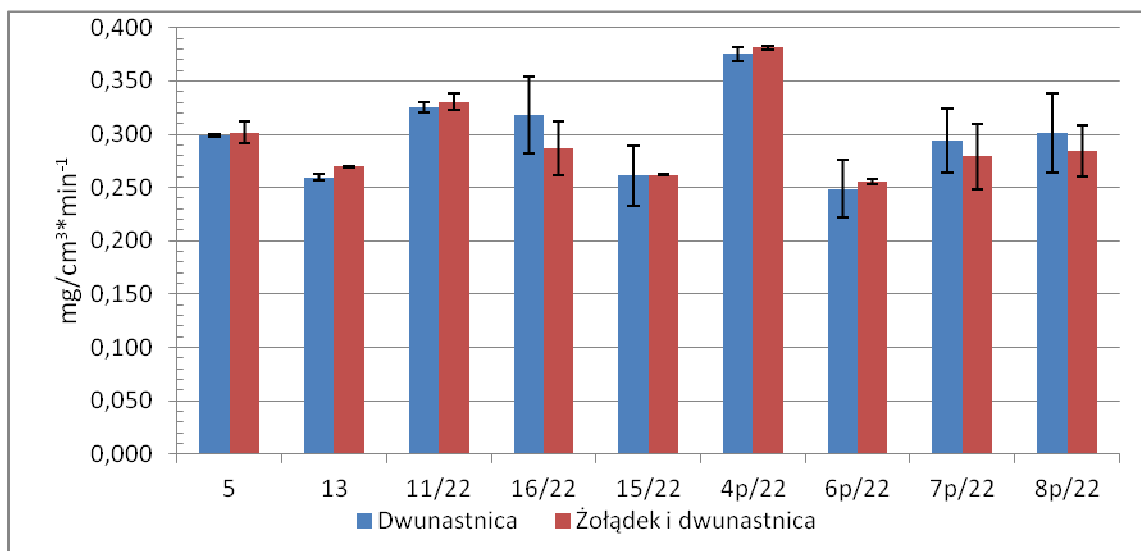
Wyniki analiz przedstawiono na rys. 15. Najwyższą zdolność do hamowania aktywności α -amylazy trzustkowej posiadał napój oznaczony 7p/22, która wynosiła $0,683 \pm 0,030$ $\text{mg}/\text{cm}^3 \cdot \text{min}^{-1}$. Najmniejszą zdolność hamowania aktywności α -amylazy wykazał napój oznaczony 16/22 którego aktywność wynosiła $0,900 \pm 0,056$ $\text{mg}/\text{cm}^3 \cdot \text{min}^{-1}$. Nie stwierdzono wpływu środowiska żołądka na inhibitory α -amylazy zawarte w napojach. Wyniki otrzymane w doświadczeniu składającym się z 2

etapów: trawienie w warunkach żołądka i środowisku dwunastnicy nie różniły się istotnie od modelu w którym przeprowadzono jednoetapowe trawienie w warunkach jakie panują w dwunastnicy (rys. 15).

Ocena zdolności do inhibicji aktywności lipazy trzustkowej przez próby napojów



Rys. 15 Wpływ wybranych napojów na aktywność α -amylazy. Badanie przeprowadzono w układzie badawczym składającym się z żołądka i dwunastnicy, oraz samej dwunastnicy.



Rys. 16 Wpływ wybranych napojów na aktywność lipazy trzustkowej. Badanie przeprowadzono w układzie badawczym składającym się z żołądka i dwunastnicy, oraz samej dwunastnicy.

Najmniejszą wartość aktywności lipazy trzustkowej, a tym samym największą zdolność do hamowania aktywności lipazy trzustkowej oznaczono dla próbek nr 13, 15/22, 6p/22 (rys. 16). Najmniejszą efektywnością w hamowaniu aktywności lipazy trzustkowej charakteryzowała się próbka oznaczona 4p/22 dla której to aktywność mierzona w układzie badawczym obejmującym dwuetapowe trawienie: w żołądku i dwunastnicy wynosiła $0,381 \pm 0,001 \text{ mg/cm}^3 \cdot \text{min}^{-1}$, a przy jednoetapowym trawieniu, w warunkach dwunastnicy wynosiła $0,375 \pm 0,007 \text{ mg/cm}^3 \cdot \text{min}^{-1}$. W związku z powyższym można stwierdzić, że badane napoje przygotowane na bazie konglomeratu mikrobiologicznego, chmielu, sacharozy i dodatków soków, mimo iż wykazują zdolność do hamowania amylazy i lipazy, to jednak siła tego oddziaływania nie jest duża.

Ocena zawartości kwasów fenolowych

Badane napoje są cennym źródłem kwasów fenolowych. Do najczęściej oznaczanych kwasów należały: chlorogenowy, kawowy, p-kumarowy, synapinowy i 2-hydroksycynamonowy. Zawartość jakościowa i ilościowa oznaczanych kwasów była bardzo zróżnicowana. Zastosowanie chmielu w recepturze napoju spowodowało jego wzbogacenie w szereg kwasów fenolowych - w największej ilości w formie związane kwasów galusowego ferulowego (tab.7). Pomimo tego, że sam chmiel przyczynił się do wzbogacenia napoju w związki biologicznie czynne, zaproponowano dodatkowo składniki owocowe i natkę pietruszki, które poza walorami smakowymi miały jeszcze podnieść prozdrowotną jakość napojów. W próbach z dodatkiem natki pietruszki oznaczano najczęściej kwasy kawowy, p-kumarowy i w dużej ilości formę związaną kwasu ferulowego (tab. 8). Dodatek żurawiny i maliny spowodował wzbogacenie napojów przede wszystkim w kwasy galusowy i ferulowy (tab. 9). W próbach pasteryzowanych z dodatkiem świeżej pigwy stwierdzono wysoką zawartość kwasu syringowego (tab. 10).

Tab. 7. Zawartość kwasów fenolowych wolnych i związanych w napojach w μmol kwasu/ml.

Kwasy fenolowe		Kontrola			
		Magnum	Magnum	Marynka	Marynka
		niepsteryzowane	pasteryzowane	niepsteryzowane	pasteryzowane
wolne	Galusowy				453,87
	Syringowy				
	Proktokatecholowy				202,36
	4-hydroksybenzoesowy				
	chlorogenowy	3,11	0,79	6,15	0,61
	Kawowy	0,76	0,29		1,26
	p-kumarowy	5,03	2,25	0,23	1,23
	Ferulowy	3,50	1,36	4,06	4,66
	Synapinowy	6,32	0,51	1,28	6,28
	2-hydroksycynamonowy	45,07	27,59	36,09	0,91
związane	Galusowy	310,30		40,85	
	Syringowy				
	Proktokatecholowy		280,80		
	4-hydroksybenzoesowy				
	chlorogenowy	5,21	1,61	5,58	2,35
	Kawowy	1,46	0,35	0,42	0,60
	p-kumarowy	1,82	0,91	1,05	0,72
	Ferulowy	16,36	139,40	0,58	
	Synapinowy	7,74	0,71		1,39

	2- hydroksycynamonow y			61,56	
--	------------------------------	--	--	-------	--

Tab. 8 Zawartość kwasów fenolowych wolnych i związanych w napojach wzbogaconych dodatkiem natki pietruszki świeżej lub suszonej w µmol kwasu fenolowego/ml.

Kwasy fenolowe		Natka pietruszki							
		Świeża				Sucha			
		Magnum		Marynka		Magnum		Marynka	
		NP	P	NP	P	NP	P	NP	P
wolne	Galusowy		89,04			29,26	437,54		76,80
	Syringowy				58,44				
	Proktokatecholowy								
	4- hydroksybenzoesowy								
	chlorogenowy	3,19	7,22	8,98		6,27	10,21		12,33
	Kawowy	0,27	4,51	9,15		3,24	10,21	9,78	11,90
	p-kumarowy		0,94	4,23		47,74	3,95	0,70	3,86
	Ferulowy		2,29	0,59	3,11	0,42	1,54	0,26	0,62
	Synapinowy		0,14	0,10	23,78	0,09	2,15	0,86	141,67
	2- hydroksycynamonow y		11,10	46,59			44,92	164,62	
związane	Galusowy							200,39	225,61
	Syringowy								
	Proktokatecholowy	270,75							
	4- hydroksybenzoesowy								
	chlorogenowy	0,59			0,89	5,27	0,74	1,98	1,91

	Kawowy	0,50	1,60	0,40	0,35	11,75	0,65	58,31	43,19
	p-kumarowy	2,03	166,34	1,06	0,55	1,07	2,72	2,81	2,06
	Ferulowy	203,30	10,42	276,38	25,13	23,51	2,36	483,32	324,86
	Synapinowy	12,32	0,55		0,71				32,73
	2- hydroksycynamonow y		3,33	1,72	75,44	3,79	7,42	1,62	51,59

NP- niepasteryzowane, P-pasteryzowane

Tab. 9 Zawartość kwasów fenolowych wolnych i związanych w napojach wzbogaconych dodatkiem żurawiny świeżej lub suszonej w μmol kwasu/ml.

Kwasy fenolowe		Żurawina							
		Świeża				Sucha			
		Magnum		Marynka		Magnum		Marynka	
		NP	P	NP	P	NP	P	NP	P
wolne	Galusowy	120,93	120,04	28,89	135,87	32,81	128,95		
	Syringowy								
	Proktokatecholowy								
	4- hydroksybenzoesowy	551,84							
	chlorogenowy	6,04	10,79	9,97	0,79	8,40	13,21		
	Kawowy		5,46	16,45	8,13	8,88	7,12	13,25	10,65
	p-kumarowy	1,41	1,53	1,07	3,72	2,95	1,36	1,35	0,87
	Ferulowy	0,84	0,58	11,10	0,66	0,23	12,86	13,75	4,52
	Synapinowy			1,04	0,32	0,16	0,92		0,59
	2- hydroksycynamonow y	33,16	151,70		40,86	21,93		52,26	36,87
związane	Galusowy	36,17			113,28	133,86	198,74		

	Syringowy								
	Proktokatecholowy								
	4- hydroksybenzoesowy								
	chlorogenowy	0,54	0,23	1,38	1,43		1,10	1,28	
	Kawowy	0,41		0,71	0,44	0,76	0,41	1,10	79,04
	p-kumarowy	258,11	24,53	0,31	0,31	0,71	0,43	0,81	0,31
	Ferulowy	5,88	19,03	45,71	275,84	32,29	275,50	54,76	245,48
	Synapinowy		0,92	1,19	37,52	5,37	24,44	1,31	33,97
	2- hydroksycynamonow y	27,27					4,74	3,48	

NP- niepasteryzowane, P-pasteryzowane

Tab. 10 Zawartość kwasów fenolowych wolnych i związanych w napojach wzbogaconych dodatkiem maliny świeżej lub suszonej w μmol kwasu/ml.

Kwasy fenolowe		Malina							
		Świeża				Sucha			
		Magnum		Marynka		Magnum		Marynka	
		NP	P	NP	P	NP	P	NP	P
wolne	Galusowy		64,12					27,70	
	Syringowy								1545,78
	Proktokatecholowy		21,84						
	4- hydroksybenzoesowy								
	chlorogenowy	5,01	7,05		0,41	0,81	2,82		0,28
	Kawowy	6,39	5,53		11,84	9,70	10,57		17,39
	p-kumarowy	3,13	1,80	0,93		0,99	8,13		7,51
	Ferulowy	13,91	0,71	11,85	0,65	14,44	7,26	16,62	0,67

	Synapinowy	5,36		2,40		0,98	0,28	0,99	9,69
	2- hydroksycynamonow y	5,86		4,68	108,56	47,80			28,46
związane	Galusowy	318,99	285,68	210,55	195,05	24,53			
	Syringowy				46,02				
	Proktokatecholowy								52,95
	4- hydroksybenzoesow y								
	chlorogenowy	1,07	0,84	1,18	0,88	0,91	0,41	0,91	1,06
	Kawowy	1,29	0,38	1,35	1,16	0,76	0,15	0,48	
	p-kumarowy	0,60	194,62		0,39	2,49	1,68	3,32	0,31
	Ferulowy	24,68	12,91	50,92	269,47	96,79	39,61		220,81
	Synapinowy	4,75	7,58	1,16	40,89	5,86	7,16	1,07	14,31
	2- hydroksycynamonow y				2,40				3,19

NP- niepasteryzowane, P-pasteryzowane

Tab.11 Zawartość kwasów fenolowych wolnych i związanych w napojach wzbogaconych dodatkiem pigwy świeżej lub suszonej w μmol kwasu/ml.

Kwasy fenolowe		Pigwa							
		Świeża				Sucha			
		Magnum		Marynka		Magnum		Marynka	
		NP	P	NP	P	NP	P	NP	P
wolne	Galusowy							23,31	138,44
	Syringowy								
	Proktokatecholowy								10,05
	4- hydroksybenzoesow y				11744,84				

	chlorogenowy		9,53	0,79		6,33	8,72	10,13	17,33
	Kawowy		5,84			7,32	8,35	9,42	16,40
	p-kumarowy	14,83	4,19		4,47	8,84	4,27	0,77	5,80
	Ferulowy		0,59		0,81	8,23	0,73	0,64	0,96
	Synapinowy		0,58	28,3 6		1,71	0,40	0,12	0,40
	2- hydroksycynamono wy	1244,5 9	32,98		63,18	6,70	32,68	0,93	
związane	Galusowy	3,00						420,3 1	
	Syringowy		945,9 3		1672,46				
	Proktokatecholowy								
	4- hydroksybenzoesow y								
	chlorogenowy	0,97		1,26			0,78	0,91	1,29
	Kawowy	0,69		17,9 8			0,81	1,20	0,83
	p-kumarowy	0,45				0,28	52,06	1,62	1,50
	Ferulowy	20,77		1,11		2,01	273,5 3	68,42	
	Synapinowy	0,63				0,65	0,85	1,67	
	2- hydroksycynamono wy					127,2 3			

NP- niepasteryzowane, P-pasteryzowane

Ocena aktywności przeciwutleniającej kombuchy

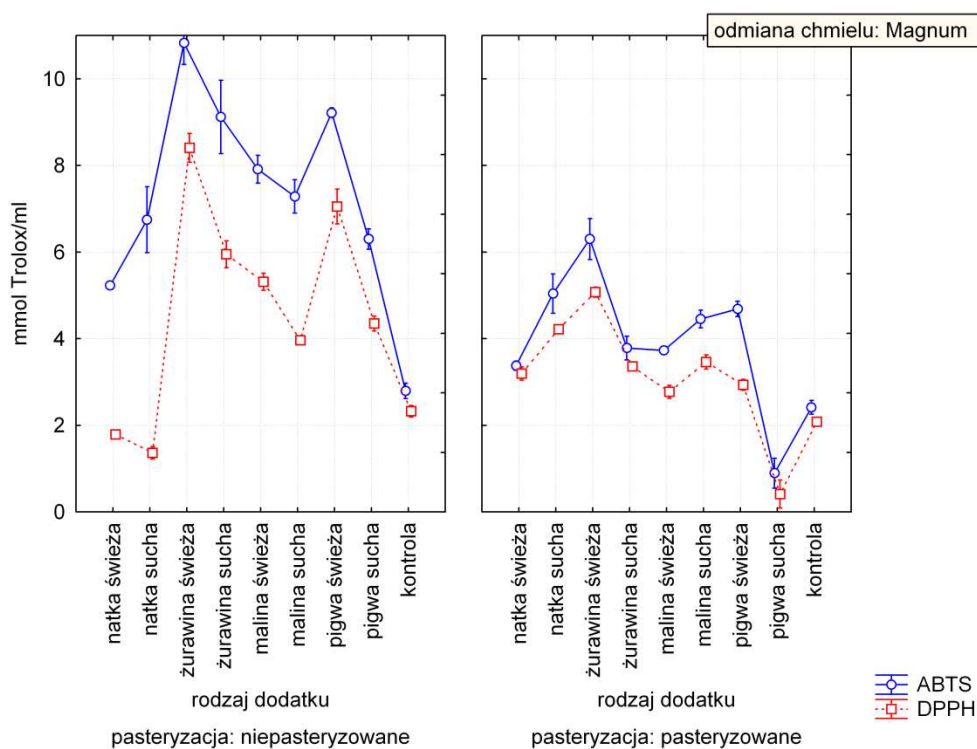
Aktywność przeciwutleniająca oznaczana wobec rodnika ABTS była wyższa w stosunku do aktywności analizowanej z rodnikiem DPPH.

W próbach świeżych pasteryzacja obniżyła aktywność przeciwutleniającą, w próbach przechowywanych, niezależnie od temperatury, nie można zaobserwować takiej zależności. Choć nie można jednoznacznie określić wpływu rodzaju dodatku na wzrost aktywności przeciwutleniającej, to można zaobserwować, że w wielu przypadkach dodatek żurawiny przyczynił się do podwyższenia badanej aktywności. Drugim dodatkiem, który spowodował podniesienie aktywności antyoksydacyjnej, była pigwa. Świeże próby kontrolne charakteryzowały się niższą aktywnością wobec rodnika ABTS w porównaniu z próbami z dodatkami, natomiast w analizie z rodnikiem DPPH nie w każdym przypadku (rys. 17-22).

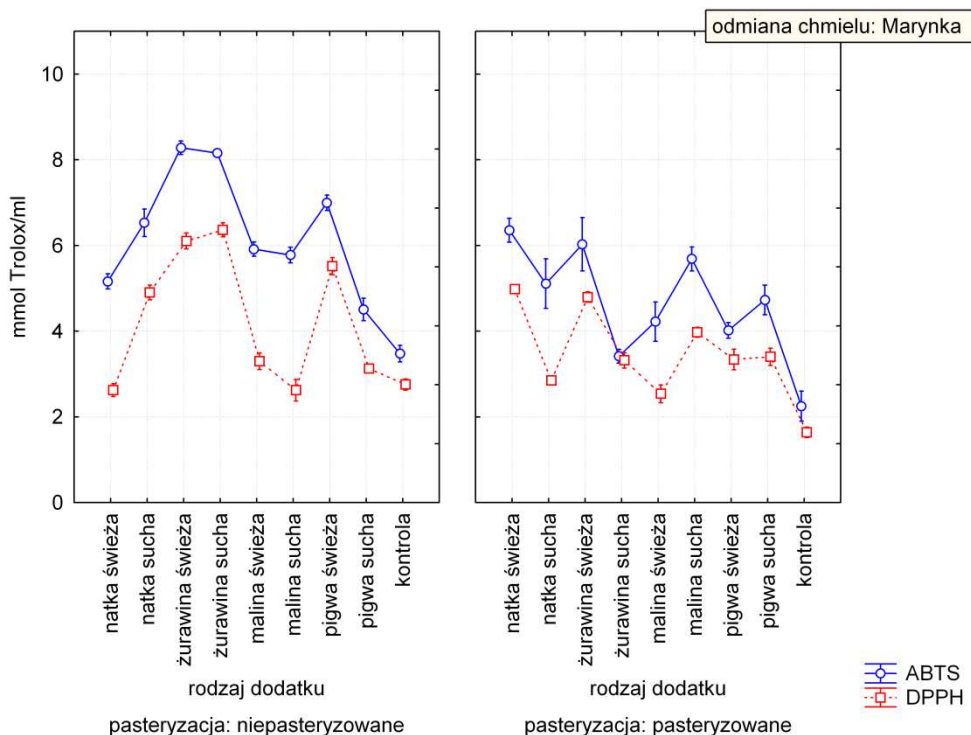
Przy analizie wpływu formy chmielu na aktywność przeciwutleniającą zaobserwowano, że najkorzystniejsze było zastosowanie chmielu suszonego (rys. 23).

Nie można jednoznacznie określić wpływu ilości dodawanego chmielu. Przy odmianie Marynka aktywność antyoksydacyjna była wyraźnie uzależniona od ilości dodawanego chmielu (im większy dodatek, tym wyższa aktywność), natomiast przy odmianie Magnum nie zaobserwowano takiej zależności - rys. 24.

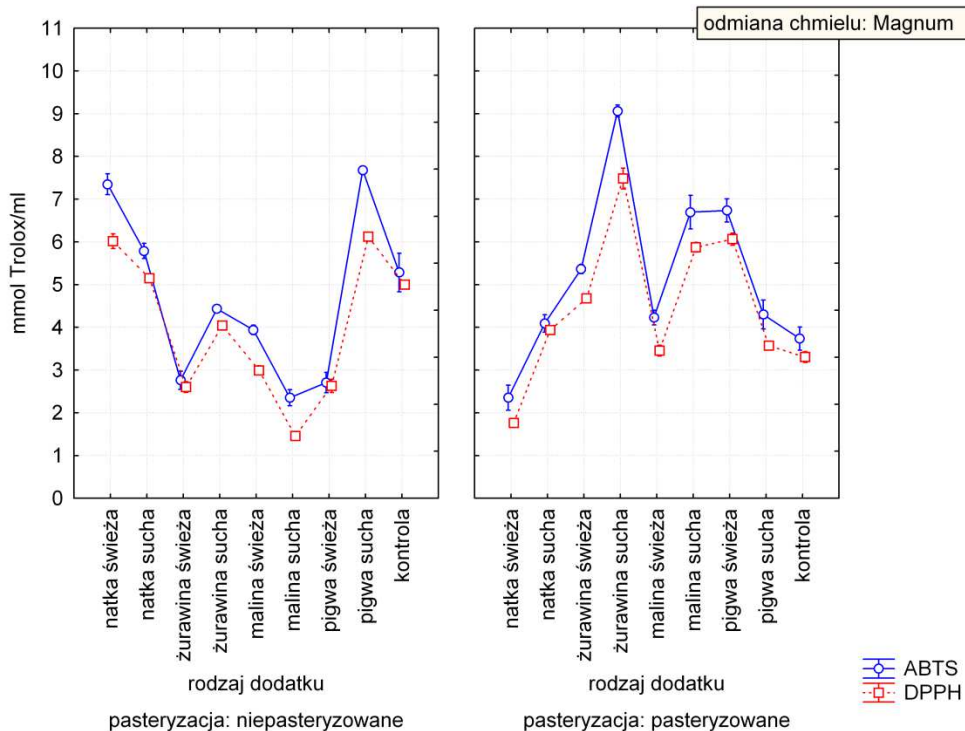
Dodatek najmniejszej ilości cukru spowodował wyraźne obniżenie aktywności antyoksydacyjnej napoju, natomiast w przypadku pozostałych ilości różnice te były niewielkie, wobec rodnika DPPH istotne statystycznie, wobec rodnika ABTS – nieistotne (rys. 25).



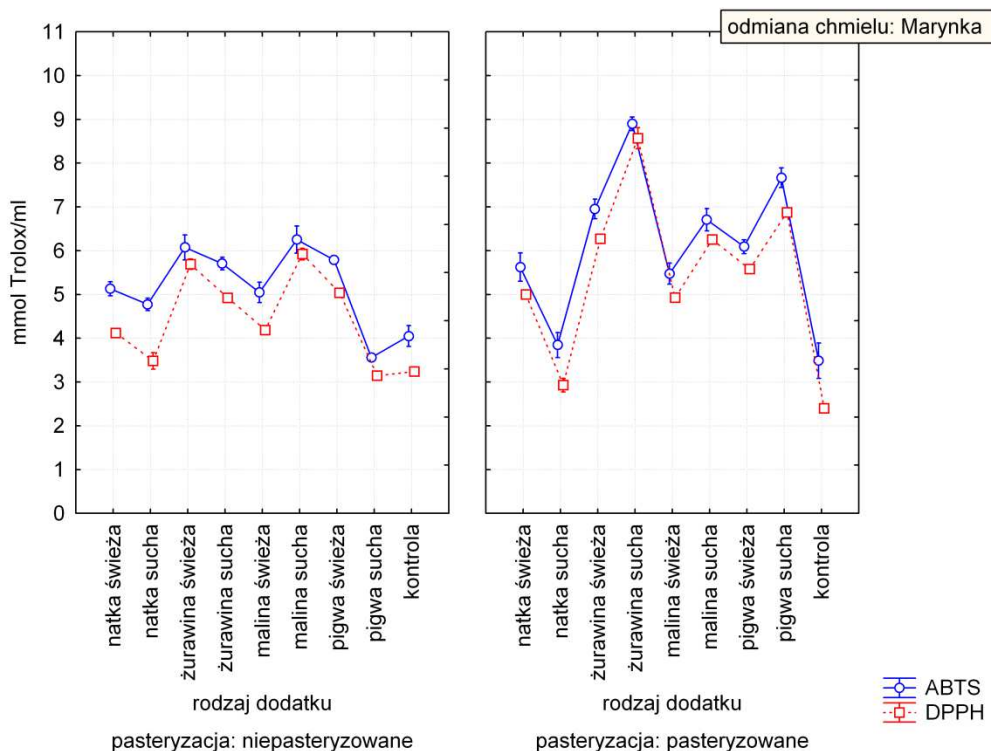
Rys. 17 Zmiany aktywności przeciwutleniającej świeżych napojów z chmielem odmiany Magnum wobec rodników ABTS i DPPH (w mmol Trolox/ml) w zależności od zastosowanego dodatku w próbach niepasteryzowanych i pasteryzowanych. Wąsy oznaczają błąd standardowy.



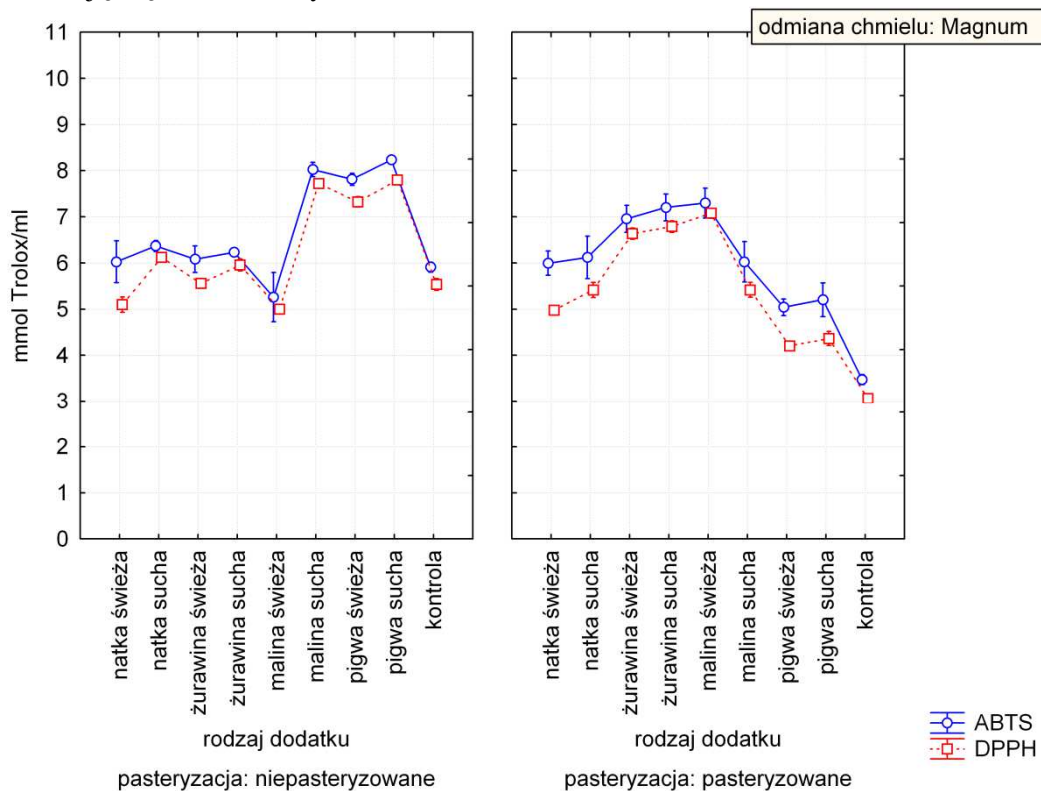
Rys.18 Zmiany aktywności przeciwutleniającej świeżych napojów z chmielem odmiany Marynka wobec rodników ABTS i DPPH (w mmol Trolox/ml) w zależności od zastosowanego dodatku w próbach niepasteryzowanych i pasteryzowanych. Wąsy oznaczają błąd standardowy.



Rys. 19 Zmiany aktywności przeciwutleniającej napojów z chmielem odmiany Magnum przechowywanych w temperaturze 4 °C wobec rodników ABTS i DPPH (w mmol Trolox/ml) w zależności od zastosowanego dodatku w próbach niepasteryzowanych i pasteryzowanych. Wąsy oznaczają błąd standardowy.

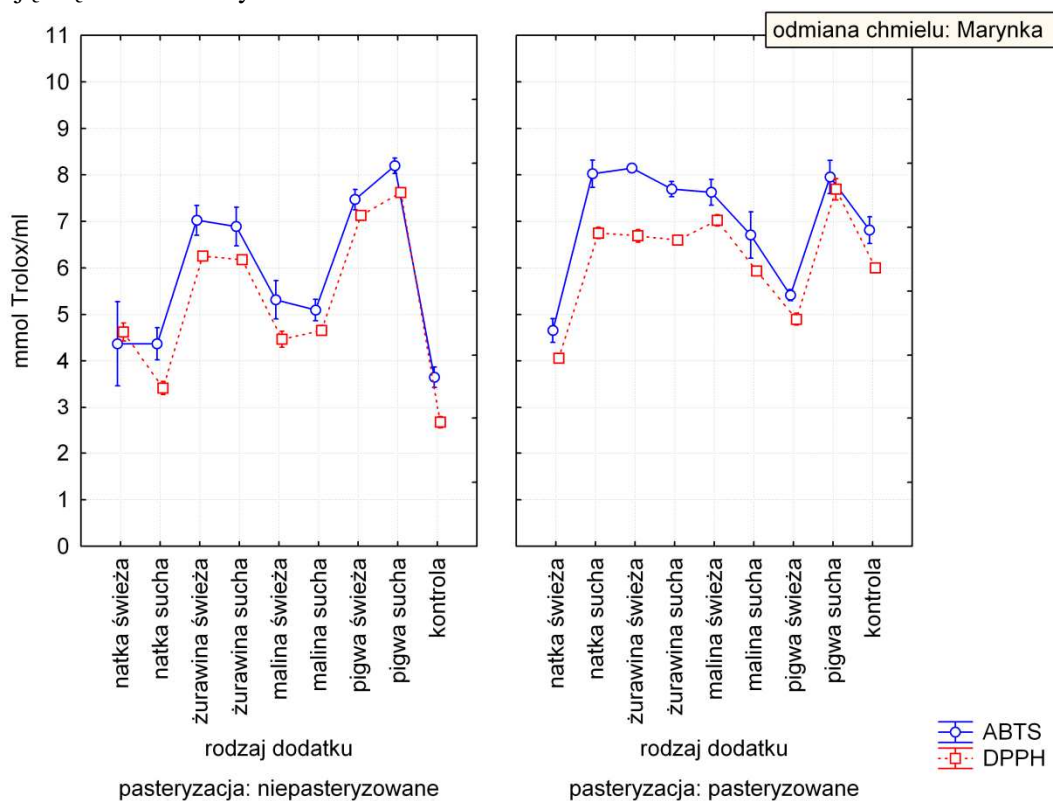


Rys. 20 Zmiany aktywności przeciwutleniającej napojów z chmielem odmiany Marynka przechowywanych w temperaturze 4 °C wobec rodników ABTS i DPPH (w mmol Trolox/ml) w zależności od zastosowanego dodatku w próbach niepasteryzowanych i pasteryzowanych. Wąsy oznaczają błąd standardowy.

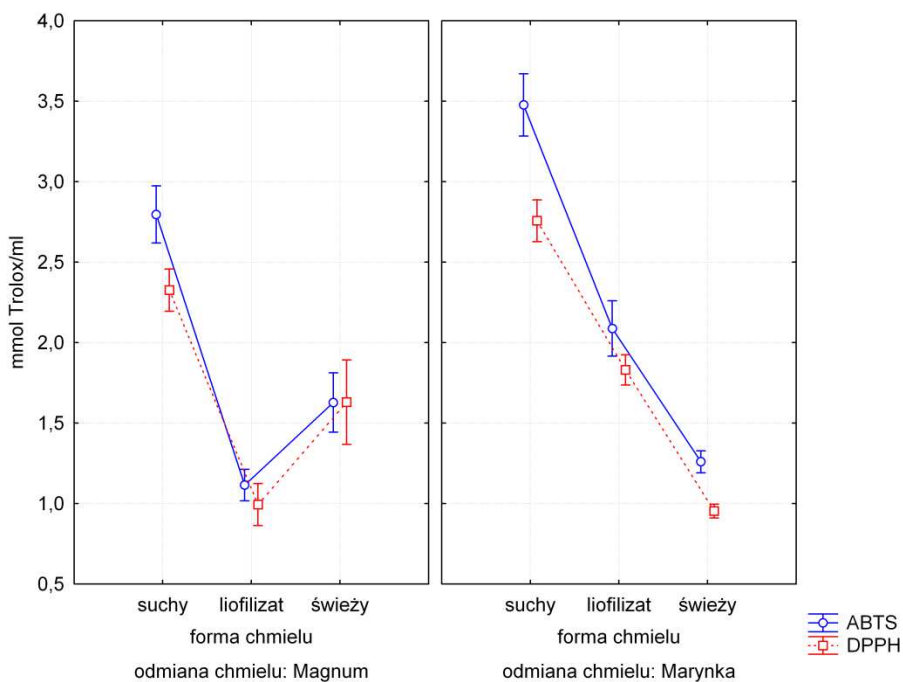


Rys. 21 Zmiany aktywności przeciwutleniającej napojów z chmielem odmiany Magnum przechowywanych w temperaturze 22 °C wobec rodników ABTS i DPPH (w mmol Trolox/ml) w

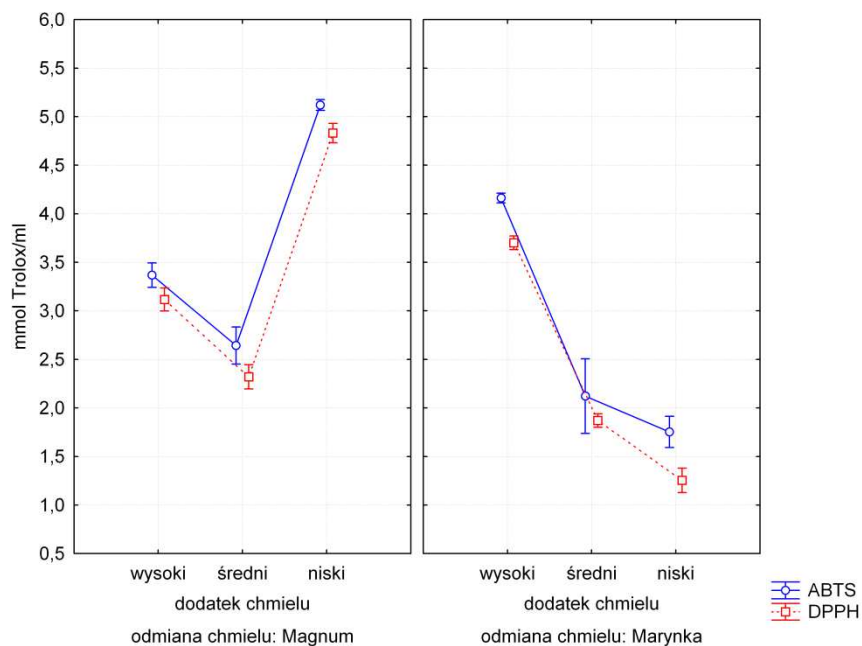
zależności od zastosowanego dodatku w próbach niepasteryzowanych i pasteryzowanych. Wąsy oznaczają błąd standardowy.



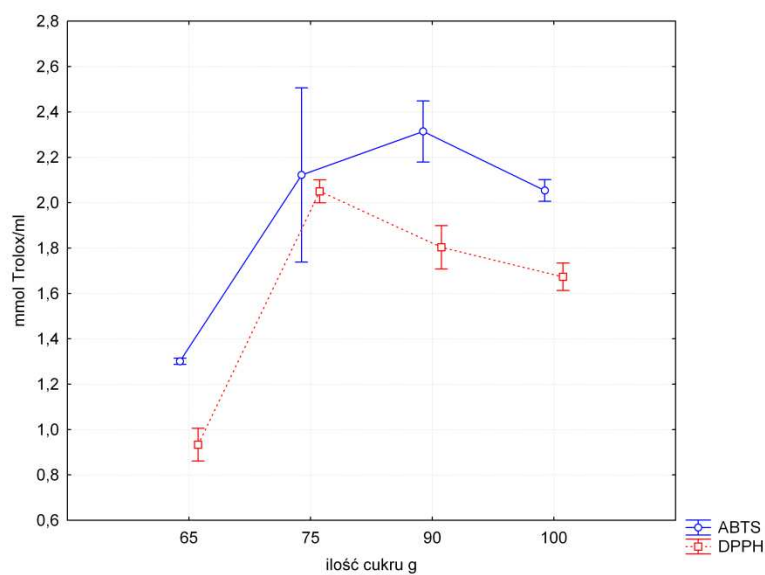
Rys. 22 Zmiany aktywności przeciwutleniającej napojów z chmielem odmiany Marynka przechowywanych w temperaturze 22 °C wobec rodników ABTS i DPPH (w mmol Trolox/ml) w zależności od zastosowanego dodatku w próbach niepasteryzowanych i pasteryzowanych. Wąsy oznaczają błąd standardowy.



Rys. 23 Zmiany aktywności przeciwutleniającej napojów wobec rodników ABTS i DPPH (w mmol Trolox/ml) w zależności od odmiany i formy chmielu. Wąsy oznaczają błąd standardowy.



Rys. 24 Zmiany aktywności przeciwutleniającej napojów wobec rodników ABTS i DPPH (w mmol Trolox/ml) w zależności od odmiany i ilości chmielu. Wąsy oznaczają błąd standardowy.



Rys. 25. Zmiany aktywności przeciwutleniającej napojów wobec rodników ABTS i DPPH (w mmol Trolox/ml) w zależności od ilości cukru.

Analiza sensoryczna badanych napojów z dodatkiem żurawiny

Do oceny sensorycznej wybrano napój z dodatkiem żurawiny, gdyż posiadał on najlepsze oceny pod względem zawartości kwasów fenolowych i aktywności przeciwutleniającej. Wyniki przeprowadzonej oceny cech sensorycznych przedstawiono w tabeli 12. Barwa badanych napojów otrzymała od oceniających noty na zbliżonym poziomie. Oceniane soki posiadały barwę jasnożółtą lub żółtą. Zapach badanych napojów oceniono na poziomie od 4,37 do 4,57 punktów, co oznacza, że wszystkie badane produkty miały zapach aromatyczny i zharmonizowany, wyraźny oraz bez obcych

zapachów (tab. 12). Wyniki oceny punktowej kombuczy za smak mieściły się w zakresie od 3,43 do 4,70 punktu (tab. 12). Najlepiej ocenionym napojem pod względem tego wyróżnika był napój oznaczony jako 18a, który uzyskał 4,7 punktu, co świadczy o tym, że dla oceniających jego smak był intensywny i zharmonizowany. Najslabiej oceniony został napój 7/4, który oceniono na poziomie 3,47 punktu. Zespół oceniających stwierdził, że napój ten posiadał smak bardzo gorzki (tab. 12).

Tabela 12. Charakterystyka cech sensorycznych kombuchy

próba badana	średnia ilość punktów i odchylenie standardowe			
	smak	wygląd	zapach	barwa
18/4	3,75 ± 0,24	4,01 ± 0,04	4,40 ± 0,15	4,53 ± 0,08
18	4,27 ± 0,19	4,07 ± 0,15	4,49 ± 0,15	4,49 ± 0,09
7p/22	3,76 ± 0,21	3,73 ± 0,23	4,16 ± 0,18	4,51 ± 0,04
17/4	4,60 ± 0,20	4,17 ± 0,19	4,56 ± 0,17	4,53 ± 0,13
7	3,51 ± 0,20	4,06 ± 0,10	4,20 ± 0,20	4,44 ± 0,11
8p/22	4,09 ± 0,17	4,06 ± 0,15	4,26 ± 0,16	4,37 ± 0,17
7/4	3,47 ± 0,23	4,06 ± 0,15	4,34 ± 0,14	4,44 ± 0,11
8/4	4,69 ± 0,16	4,09 ± 0,16	4,36 ± 0,13	4,50 ± 0,00
18a	4,70 ± 0,16	4,11 ± 0,20	4,46 ± 0,24	4,46 ± 0,08
7/22	3,36 ± 0,27	3,49 ± 1,54	3,73 ± 0,16	4,44 ± 0,08
8/22	3,43 ± 0,26	3,49 ± 1,54	3,97 ± 0,11	4,44 ± 0,08
8	4,23 ± 0,25	3,49 ± 1,54	4,07 ± 0,10	4,40 ± 0,12
17	4,61 ± 0,18	3,49 ± 1,54	4,54 ± 0,10	4,43 ± 0,10
8p/4	4,01 ± 0,13	3,49 ± 1,54	4,56 ± 0,13	4,50 ± 0,00
7p/4	3,76 ± 0,17	3,49 ± 1,54	4,54 ± 0,13	4,50 ± 0,00
8p	4,40 ± 0,19	3,49 ± 1,54	4,30 ± 0,22	4,39 ± 0,11
17/22	3,64 ± 0,24	3,49 ± 1,54	4,16 ± 0,10	4,37 ± 0,11
7p	3,53 ± 0,15	3,49 ± 1,54	4,13 ± 0,11	4,36 ± 0,13
18a/22	4,51 ± 0,30	3,49 ± 1,54	4,44 ± 0,10	4,40 ± 0,12
17a/22	4,19 ± 0,20	3,49 ± 1,54	4,24 ± 0,21	4,46 ± 0,05
18/22	4,03 ± 0,15	3,49 ± 1,54	4,31 ± 0,20	4,44 ± 0,05
17a/4	4,16 ± 0,13	3,49 ± 1,54	4,17 ± 0,18	4,47 ± 0,05
18/4^	4,37 ± 0,14	3,49 ± 1,54	4,33 ± 0,16	4,40 ± 0,12
17a	4,29 ± 0,25	3,49 ± 1,54	4,13 ± 0,23	4,37 ± 0,11

wyróżniki sensoryczne	rodzaj napoju
	F empiryczne
smak	30,873 *
wygląd	0,375
zapach	11,164 *
barwa	2,196 *

* różnice istotne statystycznie

Podsumowanie

Uzyskane wyniki wskazują na zwiększenie właściwości prozdrowotnych kombuchy z dodatkiem chmielu i owoców. Ponieważ napoje fermentowane mogą być źródłem chorobotwórczych gatunków z rodzaju *Candida*, co potwierdzają niniejsze badania, konieczna jest ocena mikrobiologiczna pod względem obecności tych gatunków w przygotowywanych partiach napoju w celu wyeliminowania zanieczyszczonych partii. Badania zawartości cukrów i alkoholu wskazały, że należy optymalizować kombuchę pod względem zawartości tych składników. Uzyskane wyniki pozwolą wybrać najwłaściwsze warianty napoju.