دراسة تأثير أهم عوامل التخمير في إنتاج شاي الكومبوتشا

طالبة الدراسات العليا: م. نورهان القطريب

قسم الهندسة الغذائية – كلية الهندسة الكيميائية والبترولية – جامعة حمص

إشراف:

أ.د. شريف صادق أ.د. محمد نيوف

الملخص:

يُعدّ الشاي المتخمّر المعروف تجارياً بالكومبوتشا مشروب وظيفي حمضي قليل الكربونات منخفض الكحول، إذ يتم الحصول عليه من خلال تخمير الشاي الأسود أو الأخضر المحلّى باستخدام بادئ تكافلي من البكتريا والخمائر يدعى(scopy). تهدف هذه الدراسة إلى إنتاج مشروب الكومبوتشا ودراسة تأثير أهم عوامل التخمير ككمية السكروز وكمية الشاي ودرجة حرارة التخمير إضافة لزمن التخمير على الخصائص الفيزيوكيميائية والحسية للمنتج النهائي. صُمّمت التجارب وعولجت إحصائياً باستخدام منهجية تصميم التجارب العاملية الكاملة بأربعة عوامل ومستويين، عن طريق استخدام البرنامج الإحصائي (Statgraphic plus v19).

تـمّ فـي هـذا البحـث تحضـير عينـات الكومبوتشـا باسـتخدام الشـاي الأسـود المحلّـى مـع تغييـر العوامـل المشـار لهـا أعـلاه، وتـمّ قيـاس pH والمـواد الصـلبة الذائبـة (Brix) ونسـبة الكحـول فـي العينـات خـلال عمليـة التخميـر، كمـا تـمّ إجـراء اختبـار الفينـولات الكليـة والقـدرة المضـادة للأكسـدة (DPPH) قبـل وبعـد التخميـر. بيّنـت النتـائج أنّ قـيم البـريكس وقـيم pH انخفضـت فـي كافـة العينـات بعـد التخميـر، فيمـا ازدادت نسـبة الكحـول فـي العينـات فـي الأيـام الأولـى مـن التخميـر وانخفضـت لاحقـاً مـع اسـتمرار عمليـة التخميـر. كمـا ازدادت القـدرة المضـادة للأكسـدة والمحتـوى الفينـولي الكلـي فـي عينـة الكومبوتشـا بعـد التخميـر، ونتيجـة للتحليـل الحسـي لعينـات الكومبوتشـا حصـلت العينـة C (كميـة سـكر 75g/l، كميـة الشـاي 6.5g/l، درجـة حرارة التخمير 25°م، لمدة 7.5 يوم) على أعلى درجات القبول.

وخلصـت النتائج إلى أنّه يمكن إنتاج شـاي الكومبوتشـا وفق معايير العينة (C) للحصـول على مشـروب وظيفي منعش يحتوي على نسـبة كحول (1.041−1.052%) وغني بالمركبات الفينولية (102.17mg/l) ومضادات الأكسدة (86.65%).

الكلمـات المفتاحيـة: شـاي الكومبوتشـا، التقيـيم الحسـي، القـدرة المضـادة للأكسدة، التخمر الكحولي.

Study of the effect of the most important fermentation factors on the production of kombucha tea

Graduate student: Eng. Nourhan Alkatreeb

Department of Food Engineering - Faculty of Chemical and Petroleum Engineering - Al-Baath University

Supervised by:

Dr. Sharif Sadek **Dr. Mohamad Nayouf**

Abstract:

Fermented tea, known commercially as kombucha, is a functional, acidic, low-carbonation, low-alcohol beverage obtained by fermenting sweetened black or green tea using a symbiotic starter of bacteria and yeasts called scopy. This study aims to produce kombucha and study the effect of the most important fermentation factors, such as the amount of sucrose, the amount of tea, the fermentation temperature, in addition to the fermentation time, on the physicochemical and sensory properties of the final product. The experiments were designed and treated statistically using the full factorial experimental design methodology with four factors and two levels, by using the statistical program (Statgraphic plus v19).

In this research, kombucha samples were prepared using sweetened black tea while changing the factors referred to above. The pH, dissolved solids (Brix) and percentage of alcohol in the samples were measured during the fermentation process. A test for total phenols and antioxidant capacity (DPPH) was also performed before and after fermentation. . The results showed that the Brix and pH

values decreased in all samples after fermentation, while the percentage of alcohol in the samples increased in the first days of fermentation and decreased later as the fermentation process continued. The antioxidant capacity and total phenolic content in the kombucha sample also increased after fermentation, and as a result of the sensory analysis of the kombucha samples, sample C (amount of sugar 75g/l, amount of tea 6.5g/l, fermentation temperature 25°C, for 7.5 days) obtained the highest degree of acceptability.

The results concluded that kombucha tea can be produced according to sample standards (C) to obtain a refreshing functional drink that contains an alcohol content of 1.041%-1.052% and is rich in phenolic compounds (102.17mg/l) and antioxidants (86.65%).

Keywords: kombucha tea, sensory evaluation, antioxidant capacity, alcoholic fermentation.

1- مقدمة:

يعدّ الشاي المشروب الأكثر استهلاكًا في جميع أنحاء العالم، تم الحصول عليه من أوراق نبات *Camellia sinensis* الصينية منذ ما يقرب من 50 قرناً. نشأ نبات الشاي من جنوب شرق آسيا ويتم زراعته الآن في أكثر من 30 دولة، و الدول الخمس الرئيسية التي تنتج وتصدر الشاي هي الصين والهند وسريلانكا وكينيا وإندونيسيا.[19]

تم تصنيف الشاي إلى ثلاثة أنواع رئيسية منتجة في جميع أنحاء العالم، 78% من الشاي الأسود (المخمر بالكامل)، وعادةً ما يتم استهلاكه في الدول الغربية، و20%

من الشاي الأخضر(غير المخمر)، ويتم استهلاكه بشكل شائع في الدول الآسيوية، و2% شاي أولونج (المخمر جزئياً) الذي يتم إنتاجه بشكل أساسي في جنوب الصين. [9]

في الآونة الأخيرة، زاد الاهتمام في إنتاج واستخراج المركبات النشطة بيولوجيًا من النباتات في صناعات الأغذية والمشروبات. إذ ازدادت الاتجاهات الغذائية الفعليّة نحو المنتجات المصنّعة بأدنى حد من دون إضافات وقيمة غذائية وفوائد صحية عالية. وفي هذا السياق، جذب شاي الكومبوتشا التقليدي انتباه الباحثين والمستهلكين مؤخرًا بسبب خصائصه الحيوية والعلاجية. [20]

الكومبوتشا هو مشروب شاي مخمر يتم تصنيعه باستخدام الشاي الأسود أو أنواع أخرى من الشاي مثل (الشاي الأخضر أو الشاي الصيني الأسود) عن طريق إضافة البادئ (scopy) إلى الركيزة (الشاي الحلو) لفترة من التخمير الأولي التي تستمر عادةً سبعة أيام أو أكثر، ليتم الحصول في النهاية على منتج حمضي مكربن قليلاً مع كميات مختلفة من الكحول الايتيلي.[13]

على الرغم من عدم وجود تاريخ محدد عن أصل الكومبوتشا، تشير السجلات إلى أن الكومبوتشا منتج منذ آلاف السنين، وبدأ استهلاكه حوالي 220 قبل الميلاد في منشوريا، الواقعة في شمال شرق الصين، ثم انتشر إلى اليابان وأوربا ثم وصل إلى روسيا وتوسع انتشاره إلى ألمانيا وإيطاليا في القرن العشرين، في الخمسينيات من القرن الماضي أصبح شائعاً أيضًا في فرنسا وشمال إفريقيا.[23]

يعود اسم المشروب "كومبوتشا" إلى الطبيب الكوري المسمى كومبو، الذي استخدم المشروب لعلاج مشاكل هضمية عند الإمبراطور الياباني في ذلك الوقت، حوالي عام 414 م. قُدّم المشروب في اليابان ليكتسب بعد ذلك شهره وتوسعاً إلى دول أخرى، وأصبح يُطلق عليه اسم"Kombucha" تكريماً للطبيب Kombo و"Cha" تعني الشاي باللغة الياباني.[32]

يمتلك الكومبوتشا خصائص علاجية ووقائية فريدة من نوعها، ومن فوائده الصحيّة التي أُدرجت هي قدرته على خفض الكوليسترول في الدم، وتحفيز الجهاز المناعي، والتأثير الوقائي ضد أمراض القلب والأوعية الدموية والكبد، وأمراض التمثيل الغذائي، والإمساك. هناك أدلة متزايدة على أنّ الكومبوتشا يحتوي على مكونات نشطة بيولوجياً، مما يشير إلى أنّ هذا المنتج الفريد المتخمر هو مصدر مهم للبروبيوتيك ويمكن اعتباره من الأغذية الوظيفية.[13]

في عام 2014، بلغت مبيعات الكومبوتشا المعبأة في الولايات المتحدة 400 مليون دولار، وشكلت الشركات التي تصنع وتبيع الكمبوتشا منظمة تجارية (Kombucha Brewers International). ارتفعت مبيعات الكومبوتشا والمشروبات المخمرة الأخرى في الولايات المتحدة بنسبة 37% في عام 2017. تنتج شركات البيرة مثل Full Sail Brewing Company و Molson Coors Beverage Company الكومبوتشا بأنفسهم أو عبر الشركات التابعة.[6]

تحدث أثناء عملية تخمير الشاي لإنتاج الكومبوتشا العديد من التغيرات البيوكيميائية التي تؤثر على خصائص المنتج النهائي. ويرجع تعقيد عملية تخمّر الكومبوتشا بشكل أساسي إلى العدد الكبير من الكائنات الحية الدقيقة الموجودة في البادئ (scopy) والتفاعلات بينها. إذ يعتبر التنوع الميكروبي الموجود في الكومبوتشا وبادئه كبير جداً، ويمكن أن تصل الأنواع الميكروبية المختلفة إلى أكثر من 300 نوع [34]، اختلفت الدراسات في ذكرها ووصف تركيب ثابت وموحد لها، إذ أظهرت العديد من الدراسات أن التركيب الميكروبيولوجي للبادئ أو المعروف باسم (فطر الشاي)، قد يختلف بين تخمير وآخر.[14]

تعتبر من أهم البكتريا المكوّنة لبادئ الكومبوتشا وأكثرها هي (*Acetobacter xylinum* > 95%) ، أما سلالات الخميرة الأكثر شيوعاً هي (*Saccharomyces, Brettanomyces, Zygosaccharomyces*). تعمل أنواع الخمائر والبكتيريا المختلفة بالتوازي أثناء عملية التخمير لإنتاج منتجين نهائيين مختلفين وهما الشاي المخمر والغشاء الحيوي. [13]

إن وجود المكونات الكيميائية وكميتها في الكومبوتشا متغيّر(جدول-1)، ويعتمد ذلك بشكل أساسي على عدّة عوامل مهمّة مثل: مصدر البادئ [29]، تركيز السكر والشاي[36]، وقت التخمير[11]، درجة حرارة التخمير[26]. حيث يؤثر أي تغيير في ظروف التخمير على خصائص المنتج النهائي.

جدول (1): المكونات الرئيسية وبعض المستقلبات الرئيسية الموجودة في الكومبوتشا

المكونات		متوسط المكونات	السكروز الأولي g/l	زمن التخمير (أيام)	المصدر
الأحماض العضوية	حمض الخل	5.6 g/l	70	15	Blanc (1996)
	حمض الخل	8.36 g/l	100	18	Jayabalan et al. (2007)
	حمض الخل	11 g/l	100	30	Chen and Liu (2000)
	حمض الغلوكونيك	39 g/l	100	60	Chen and Liu (2000)
	حمض الغلوكورونيك	0.016 g/l	70	21	Lončar et al. (2006)
	حمض اللاكتيك	0.18 g/l	100	18	Jayabalan et al. (2007)
المكونات العامة	الايثانول	5.5 g/l	100 g/l	20	Chen and Liu (2000)
	البروتين	3 mg/Ml	100 g/l	12	Jayabalan et al. (2007)

Chu and Chen (2006)	15	100 g/l	7.8 mm GAE	البوليفينول	
Bauer-Petrovska and Petrushevska-Tozi (2000)	15	70 g/l	0.74 mg/mL	B_1	الفيتامينات
Malbaša et al. (2011)	10	70 g/l	8 mg/100 mL	B_2	
Bauer-Petrovska and Petrushevska-Tozi (2000)	15	70 g/l	0.52 mg/mL	B_6	
Bauer-Petrovska and Petrushevska-Tozi (2000)	15	70 g/l	0.84 mg/mL	B12	
Malbaša et al. (2011)	10	70 g/l	25 mg/L	C	

أثبتت العديد من الدراسـات أنّ حمض الخلّ هو الحمض السـائد في الكومبوتشـا. كما يعدّ حمض الجلوكورونيك المنتج أثناء عملية التخمير هو العامل العلاجي الرئيسـي في هذا المشروب.[24]

درس [35] إنتاج الكومبوتشـا باسـتخدام ركائز أسـاسـية بديلة عن الشـاي الأسـود حيث تمّ دراسة استخدام ماء جوز الهند كركيزة أساسية مما أدّى إلى تعزيز بعض الأنشطة البيولوجية في المنتج النهائي. بينما درس [5] إنتاج مشروب الكومبوتشا من عصير العنب وكانت النتيجة الحصول على مشروب بخصائص حسية ووظيفية محسنة بعد6 أيام فقط من التخمير. فيما بيّن [10] في دراسته أنّ أنسب ركائز لتحضير الكومبوتشا هي الشاي الأسود والأخضر بسبب مصادره العالية من النيتروجين مثل الكافيين، ومشتقات البيورين.

في دراسـة أجراها [30] لتقييم تأثير ظروف التخمير على الخصـائص الفيزيائية والكيميائية والميكروبيولوجية والحسية لمشروبات الكومبوتشا، تمّ التخمير لمدة 10 أيام عند درجات حرارة مختلفة 20–25–30°م، وكانت ظروف التخمير المثلى للمشـروبات هي

درجة حرارة 25°م وفترة 10 أيام، مما سمح بالحصول على منتج ذو خصائص فيزيائية كيميائية وحسيّة جيدة. وفي دراسة أخرى أجراها [17] درس فيها تخمير شاي الكومبوتشا عند درجات حرارة مختلفة لتقييم خصائص المشروب عند هذه الدرجات كان مجال درجة حرارة التخمير الأفضل هو 22–28°م.

يحتوي مشروب الكومبوتشا على نسبة عالية من المركبات النشطة بيولوجيًا المشتقة من المواد النباتية والتي لها خصائص معززة للصحة لذلك يعتبر مشروب وظيفي. في دراسة أجراها [28] لقياس نشاط مضادات الأكسدة في مشروب الكومبوتشا المنتج من الشاي الأسود باستخدام طريقة (DPPH) تبيّن أن إجمالي المركبات الفينولية، والقدرة المضادة للأكسدة زادت مع زيادة وقت التخمير.

2- هدف البحث:

1- دراسة تأثير أهم عوامل التخمير في خصائص مشروب الكومبوتشا حيث تشمل الدراسة بعض المواصفات الكيميائية والفيزيائية.

2- التقييم الحسي لمشروب الشاي المخمر (كومبوتشا) وإمكانية طرحه في السوق.

3- مواد وطرائق البحث:

تم تحضير عينات الكومبوتشا، باستخدام البادئ scopy، وأربعة متغيرات (كمية السكر، كمية الشاي، درجة حرارة التخمير، زمن التخمير) وتمّ قياس الخصائص الكيميائية والفيزيائية المدروسة لمشروب الكومبوتشا الناتج في كل مرة. تمت معالجة النتائج باستخدام برنامج التحليل الإحصائي لتصميم التجارب (Statgraphic plus v19) من

شركة Statgraphics Technologies. حيث تم تحديد فروق ذات دلالة إحصائية من خلال اختبارات متعددة النطاق عند مستوى الأهمية 0.05> P.

-المواد الأولية المستخدمة:

1-البادئ scopy (البادئ التكافلي من البكتريا والخمائر): تم الحصول على البادئ من الجمعية التعاونية في قرية السلطان يعقوب في لبنان، حيث تم نقل المنتج في كيس محكم الإغلاق ويرافقه 200 ml من السائل البادئ الذي يعتبر كافياً لإنتاج 1 لتر من الكومبوتشا.

الشكل(1): بادئ الكومبوتشا

وحسب المصدر الذي تمّ شراء البادئ منه فإنّ البادئ يحتوي على السلالات الموضحة في الجدول(2).

جدول (2): سلالات البكتريا والخمائر الموجودة في البادئ

البكتريا (Bacteria)	الخمائر (Yeasts)
xylinum Acetobacter	*cerevisiae Saccharomyces*
aceti Acetobacter	*bailii Zygosaccharomyces*
Acetobacter tropicalis	*bruxellensis Brettanomyces*
Bacillus aryabhattai	*stellata Candida*
Bacillus licheniformis	*Brettanomyces anomalus*

Kluyveromyces marxianus	*Bacillus cereus*
Saccharomyces ludwigii	*saccharivorans Gluconacetobacter*
	Bacillus aerophilus
	Gluconacetobacter rhaeticus

2- شاي أسود نوع الزين: تمّ شراؤه من السوق المحلي.

3- سكر أبيض: تمّ شراؤه من السوق المحلي.

- المواد الكيميائية المستخدمة:

كاشف فولين-سيوكالتيو إنتاج شركة(Sigma-Aldrish) حمض الغاليك بتركيز 5 g/l ، 2،2 ثنائي فينيل-1- بيكريل هيدرازيل DPPH بتركيز (0.025 g/l) إنتاج -Sigma) Aldrish) .

- طرائق البحث:

تم إجراء التجارب العملية والتحاليل المخبرية في مخابر قسم الهندسة الغذائية وفق الطرائق التالية:

1- المادة الجافة: باستخدام جهاز الريفراكتوميتر وفق طريقة AOAC932.14, (2006).

2- تقدير رقم الحموضة (pH): باستخدام جهاز pH- meter وفق طريقة: (AOAC 942.15, 2000).

3- تقدير نسبة الكحول. [1]

4- قياس القدرة المضادة للأكسدة بطريقة الجذر الحر DPPH. [37]

5- تقدير الفينولات الكلية بطريقة فولين سيوكالتيو. [38]

6- الاختبارات الحسية:

تمّ إجراء تقييم حسي لبعض الخصائص المميزة لمشروب الكومبوتشا، حيث قام 10 أشخاص بهذه الاختبارات. بعد ترشيح عينات شاي الكومبوتشا

وترتيبها، كان بمثابة مشروب بارد خفيف للمتذوقين. تم استخدام مقياس المتعة في التقييم الحسي لعينات الكومبوتشا حيث تتراوح الدرجات المعطاة على هذا المقياس بين (1 و5) حيث (1 الدرجة الأقل، 5 الدرجة الأعلى). تم تقييم العينات من حيث درجة الحلاوة والرائحة واللون والقبول العام في التحليل الحسي وفق الاستمارة المبينة في الجدول(3). [2]

جدول (3): استمارة التقييم الحسي

رمز العينة	درجة الحلاوة	الرائحة	اللون	القبول العام
A				
B				
C				
D				
E				

يبيّن الجدول(4) معايير تحضير عينات الكومبوتشا التي تمّ عرضها على المتذوقين من أجل التقييم الحسي، كما يبيّن الشكل رقم (2) عينات الكومبوتشا التي تمّ عرضها على المتذوقين.

جدول (4): رموزعينات التقييم الحسي

زمن التخمير (يوم)	درجة الحرارة (c°)	كمية الشاي g/l	السكروز الأولي g/l	رمز العينة
10	22	5	50	A
10	22	5	100	B
25	7.5	6.5	75	C

D	100	5	22	5
E	50	5	22	5

الشكل(2): عينات الكومبوتشا التي تمّ عرضها على المتذوقين

4- النتائج والمناقشة:

يبيّن الجدول (5) مصفوفة التجارب المنجزة من خلال البرنامج الإحصائي Satagraphic Plus، وفق تصميم تجارب عاملية بأربعة عوامل مدروسة مما يجعل عدد المعاملات المطلوبة في التصميم تخضع للمعادلة $2^K = 2^4 = 16$ حيث k هي عدد العوامل المدروسة (4 عوامل) ولاستقراء خطأ التجارب تمّ تكرار ثلاث نقاط مركزية. اختيرت العوامل ومستوياتها على الشكل التالي:

- العامل الأول: كمية السكر الأولية تتراوح بين 50غ كحد أدنى و100غ كحدّ أعلى.
- العامل الثاني: كمية الشاي الأولية تتراوح بين 5غ كحدّ أدنى و8غ كحدّ أعلى.
- العامل الثالث: زمن التخمير يترواح بين 5 أيام كحدّ أدنى و10 أيام كحدّ أعلى.
- العامل الرابع: درجة حرارة التخمير يتروواح بين 22°م كحدّ أدنى و 28°م كحدّ أعلى.

كمـــا يظهـــر الجـــدول (5) نتـــائج التجـــارب (Responses) التـــي أنجزت وفق التصميم السابق وتتمثل بقيمة Brix وقيمة pH ونسبة الكحول.

الجدول(5): مصفوفة التجارب(a) والنتائج Responses (b) بعد تنفيذ التجارب

رقم التجربة	السكروز g/l	الشاي g/l	درجة الحرارة c°	الزمن (يوم)	Brix	pH	الكحول %
1	50	5	22	5	4.1	3.521	0.841
2	50	5	22	10	3.7	3.451	0.558
3	50	8	22	10	3.5	3.382	0.681
4	100	8	22	10	7.6	3.281	0.725
5	100	5	22	10	7.9	3.342	0.723
6	100	5	28	10	6.9	3.074	1.582
7	50	5	28	10	2.9	3.185	1.432
8	50	8	28	10	2.3	3.091	1.224
9	50	8	22	5	4.2	3.492	0.924
11	100	8	22	5	8.3	3.395	1.542
11	50	5	28	5	4.2	3.491	2.175
12	50	8	28	5	3.8	3.273	2.184
13	100	5	28	5	7.7	3.261	3.452
14	100	8	28	5	7.9	3.253	3.584
15	100	5	22	5	8.4	3.412	1.451
16	100	8	28	10	6.6	2.949	1.812
3	75	6.5	25	7.5	6.4	3.435	1.041

1.034	3.343	6.3	7.5	25	6.5	75	نقاط مركزية
1.052	3.352	6.3	7.5	25	6.5	75	

تمت معالجة هذه النتائج باستخدام البرنامج الإحصائي حيث تمّ معالجة آثار عوامل التخمير الأربعة المدروسة (كمية السكر، كمية الشاي، درجة الحرارة، زمن التخمير) على خصائص الكومبوتشا (Brix، الرقم الهيدروجيني، الكحول).

يظهر الجدول (6) النتائج المتمثلة بالعوامل ذات الأثر الرئيسي المعنوي إحصائياً على كل خاصية وقيم الآثار إضافة للموديلات الرياضية لعلاقة كل خاصية مع العوامل المدروسة وقيمة معامل الانحدار لكل معادلة.

الجدول(6):ملخص المعاملات الإحصائية لآثار العوامل المدروسة على خصائص الكومبوتشا

الخاصية	العوامل ذات الأثر	قيمة الأثر	الموديل الرياضي	R^2
Brix	A D	+4.07 -0.9	Brix = −12.63 +0.239A+0.701D	98.25%
pH	C D A	−0.212 −0.168 −0.115	pH = 2.08 + 0.0039A +0.1007C + 0.1067D	94.82%
الكحول	C D A	+1.25 −0.926 +0.606	Alcohol = −7.37 − 0.0026A+ 0.293C+ 0.159D	94.94%

A –كمية السكر(g) B–كمية الشاي(g) C–درجة حرارة التخمير(م°) D– زمن التخمير(يوم)

تدلّ إشارة (+) في الجدول (6) على أنّ للعامل المدروس أثر إيجابي معنوي إحصائياً على الخاصيّة.

تدلّ إشارة (-) في الجدول (6) على أنّ للعامل المدروس أثر سلبي معنوي إحصائياً على الخاصيّة.

1- المواد الصلبة الذائبة (Brix):

توضح نتائج الدراسة الإحصائية في الجدول (6) أنّ خاصية الـ Brix تتأثر بالعاملين (كمية السكر، زمن التخمير) حيث لهما أثر معنوي إحصائياً بينما لم يكن لباقي العوامل أثر معنوي إحصائياً. ومن خلال النتائج العملية للتجارب في الجدول (5) يُلاحظ الآتي:

- من التجارب رقم (1,2) وعند تثبيت العوامل (كمية السكر، كمية الشاي، درجة حرارة التخمير) وتغيير زمن التخمير من 5 يوم إلى 10 يوم، انخفضت قيمة البريكس من 4.1% إلى 3.7% أي بنسبة (0.4%) حيث تتفق هذه النتيجة مع دراسة أجراها [27] بيّن فيها انخفاض البريكس خطياً مع الزمن بشكل خاص من اليوم الثالث إلى اليوم العاشر من عملية التخمير. ويعزى السبب في ذلك إلى تخمّر السكريات التي تعتبر مصدر للكربون بواسطة الكائنات الدقيقة الموجودة في البادئ أثناء عملية التخمير.
- من التجارب رقم (3,4) وعند تثبيت العوامل (كمية الشاي، درجة حرارة التخمير، زمن التخمير) وتغيير كمية السكر الأولية المضافة من 50غ إلى 100غ، نلاحظ اختلاف واضح في قيمة البريكس في اليوم العاشر من التخمير حيث بلغت القيم 3.5% في المنتج النهائي عند إضافة 50غ سكروز، بينما كانت 7.6% في المنتج النهائي عند إضافة 100غ سكروز، وهذا يتفق مع دراسة أجراها [18] بيّن

فيها أنّ إضافة كمية كبيرة من السكروز سوف تؤدي إلى الحصول على مشروب ذو درجة حلاوة عالية غير مرغوبة.

2- الرقم الهيدروجيني (pH):

توضـــح نتائج الدراســـة الإحصـــائية في الجدول (6) أنّ قيمة الرقم الهيدروجيني تتأثر بالعوامل الثلاثة (كمية الســـكر، زمن التخمير، درجة حرارة التخمير) بينما نلاحظ أنه لايوجد أثر لعامل كمية الشـــاي. ومن خلال النتائج العملية للتجارب في الجدول (5) يُلاحظ الآتي:

- من التجارب رقم (1,2) وعند تثبيت العوامل (كمية السـكر، كمية الشـاي، درجة حرارة التخمير) وتغيير زمن التخمير من 5 يوم إلى 10 يوم، انخفضـــت قيمة (pH) من 3.521 إلى 3.451 أي بمقدار (0.07) وهذا يتفق مع دراسة أجراها [31] بيّن فيها انخفاض الرقم الهيدروجيني مع زيادة زمن التخمير ليصـــل إلى النقطة المثلى وفق دراســـته (2.6) في اليوم العاشـــر. يعزى الســـبب في هذا الانخفاض بشـكل أسـاسـي إلى تشـكّل الأحماض العضـوية خلال فترة التخمير والناتجة عن أكسـدة الكحول الايتيلي المتشـكل في بداية التخمير، وذلك بواسـطة البكتريا الموجودة في البادئ.
- من التجارب رقم (3,4) وعند تثبيت العوامل (كمية الشاي، درجة حرارة التخمير، زمن التخمير) وتغيير كمية الســـكر الأولية المضـــافة من 50غ إلى 100غ، نلاحظ اختلاف في قيمة الرقم الهيدروجيني في اليوم العاشـــر من التخمير حيث بلغت القيم 3.382 ، 3.281 على التوالي، وهذا يتفق مع دراســـة أجراها [18] بيّن فيها أنّه عند استخدام السكروز كمصدر أساسي للكربون في عملية التخمير ســـيكون حمض الأســـيتيك هو المســـتقلب الغالب المنتج بالإضـــافة إلى إنتاج

الأحماض العضــوية الأخرى مثل الجلوكونيك والجلوكورونيك أيضًــا أثناء عملية التخمير والتي يزداد إنتاجها مع زيادة كمية السـكر الأولية المضــافة مما يسـبب انخفاض قيمة pH .

- من التجارب رقم (5,6) وعند تثبيت العوامل (كمية الشــاي، كمية الســكر، زمن التخمير) وتغيير درجة حرارة التخمير من 22°م إلى 28°م، انخفضت قيمة الرقم الهيدروجيني من 3.342 إلى 3.074 ويعزى السـبب في ذلك إلى ازدياد سـرعة عملية التخمير بزيادة درجة الحرارة وبالتالي زيادة إنتاج الأحماض العضــوية مما يؤدي إلى انخفاض قيمة الرقم الهيدروجيني.[26]

3- نسبة الكحول في العينات:

توضــح نتــائج الدراســة الإحصــائية فــي الجـدول (6) أنّ نسـبة الكحـول الناتجــة عــن عمليــة التخميــر تتــأثر بالعوامــل الثلاثــة (كميــة الســكر، زمــن التخميــر، درجــة حــرارة التخميــر) بينمــا نلاحــظ أنــه لايوجــد أثــر لعامــل كميــة الشاي. ومن خلال النتائج العملية للتجارب في الجدول (5) يُلاحظ الآتي:

- من التجارب رقم (1,2) وعند تثبيت العوامل (كمية السـكر، كمية الشــاي، درجة حرارة التخمير) وتغيير زمن التخمير من 5 يوم إلى 10 يوم، انخفضـــت نســـبة الكحول من 0.841% في اليوم الخامس إلى 0.558% في اليوم العاشــر وهي قريبة من النسـبة التي حصـل عليها [15] في دراسـته حيث بلغت نسـبة الكحول (0.49%) في عينة كومبوتشـــا مخمرة ل 10 أيام عند 25°م. يعزى الســـبب بشكل أساسي في هذا الانخفاض إلى أنّ البكتيريا السائدة في البادئ هي بكتيريا حمض الخل، وهي بكتيريا هوائية قادرة على اســـتخدام الكحول كركيزة لتكوين

حمض الأسيتيك والأحماض العضوية الأخرى عن طريق أكسدته مما يؤدي إلى انخفاض نسبة الكحول مع زيادة زمن التخمير.

- من التجارب رقم (3,4) وعند تثبيت العوامل (كمية الشاي، درجة حرارة التخمير، زمن التخمير) وتغيير كمية السكر الأولية المضافة من 50غ إلى 100غ، ازدادت نسبة الكحول من 0.681% إلى 0.725% في اليوم العاشر من التخمير، وهذا يتفق مع دراسة أجراها [16] بيّن فيها أنّ تركيز السكر الأولي يساهم في إنتاج الإيثانول وأنّ مستوى الإيثانول له علاقة إيجابية مع زيادة تركيز السكر حتى نقطة محددة. ويعود السبب في ذلك إلى أنّ السكروز يعتبر مصدر أساسي للكربون في عملية التخمير يتم تفكيكه بواسطة أنزيمات الخمائر وإنتاج الكحول الايتيلي وبالتالي زيادة الكمية المضافة منه توفّر الكمية الكافية من الغذاء للخمائر الموجودة في البادئ والتي تقوم بتحويل السكروز إلى كحول ايتيلي و CO_2.
- من التجارب رقم (5,6) وعند تثبيت العوامل (كمية الشاي، كمية السكر، زمن التخمير) وتغيير درجة حرارة التخمير من 22°م إلى 28°م، نلاحظ ارتفاع نسبة الكحول في المنتج من 0.723% إلى 1.582% في اليوم العاشر، ويتفق هذا مع دراسة أجراها [30] كان الهدف منها هو اختيار وتحسين ظروف عملية التخمير وتأثيرها على التغيرات الفيزيائية الكيميائية مع التركيز على تحديد محتوى السكر والكحول والحمض العضوي، حيث كانت نسبة الكحول 1.05% في عينة كومبوتشا مخمرة لمدّة 10 أيام عند 20°م بينما كانت 1.10% في عينة كومبوتشا مخمرة عند نفس الظروف مع تغيير درجة الحرارة إلى 25°م. ويعزى السبب في ذلك بشكل أساسي إلى أنّ درجات الحرارة المرتفعة تعزّز نمو الخميرة

وتزيد نشـــاطها وبالتالي تزداد ســـرعة عملية التخمير مما يؤدي إلى زيادة كمية الايتانول الناتجة. [26]

4- القدرة المضادة للأكسدة DPPH والمحتوى الفينولي الكلي:

يبين الجدول(7) نتائج اختبار القدرة المضـــادة للأكســـدة والمحتوى الفينولي الكلي لعينة الكومبوتشا المخمرة بأزمنة تخمير مختلفة.

الجدول(7): نتائج اختبار القدرة المضادة للأكسدة والمحتوى الفينولي الكلي لعينة كومبوتشا

الفينولات الكليّة mg /l	القدرة المضادة للأكسدة %DPPH	زمن التخمير (يوم)	درجة الحرارة (C°)	كمية الشاي g/l	سكروز الأولي g/l
66.43	46.798	0	25	6.5	75
102.17	86.65	7.5			
98.03	89.69	10			

يُلاحظ من الجدول رقم (7) الآتي:

- ازدادت القدرة المضادة للأكسدة (DPPH) لعينة كومبوتشا مع زيادة زمن التخمير حيث بلغت (46.798%) لعينة الشـــاي قبل التخمير ثمّ ازدادت في اليوم 7.5 لتصـل إلى (86.65%) واسـتمرت في الزيادة حيث بلغت في اليوم العاشـر من التخمير (89.69%)، أي أنّ عملية تخمير الكومبوتشـا خلال 10 أيام أدّت إلى ارتفاع القدرة المضـــادة للأكســـدة بمقدار (42.892%)، وهذا يتفق مع دراســـة أجراها [25] قارنت خصائص مضادات الأكسدة والمركبات النشطة بيولوجيًا التي ينتجها الشـاي الأسـود وشـاي الكومبوتشـا. أظهرت النتائج مسـتويات أعلى من مضادات الأكسدة والمركبات النشطة بيولوجيا في شاي الكومبوتشا مقارنة بالشاي الأسـود. حيث تم تقييم نشاط مضادات الأكسـدة في مشـروبات الكومبوتشـا مع

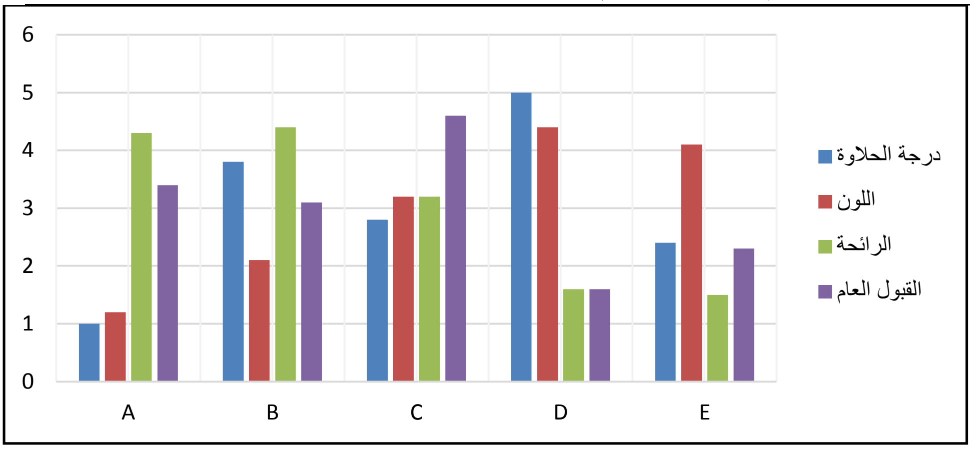
تعزيز وقت التخمير. وقد لوحظ أعلى نشاط مضاد للأكسدة (93.79%) في اليوم السابع من التخمير، ويعزى السبب في زيادة القدرة المضادة للأكسدة إلى حقيقة أنّ الإنزيمات التي تطلقها البكتريا والخميره أثناء عملية التخمير تحلّل البوليفينول المعقّد إلى جزيئات صغيرة، مما يؤدّي إلى زيادة إجمالي المركبات الفينولية والفلافونويدات التي تعتبر مضادات أكسدة عالية المستوى [33]. حيث أنّ القدرة المضادة للأكسدة تختلف من مركب لآخر ضمن المجموعة الواحدة وبالتالي لاتتوافق نفس مستويات المركبات الفينولية مع بعضها بقدرتها المضادة للأكسدة.

- بلغ محتوى الفينولات الكلية لعينة الشاي قبل التخمير (66.43 mg/l) ثمّ ازدادت في اليوم 7.5 لتصل إلى (102.17 mg/l) وانخفضت قليلا بعدها حيث بلغت في اليوم العاشر من التخمير (98.03 mg/l)، أي أنّ عملية تخمير الكومبوتشا خلال 10 أيام أدّت إلى ارتفاع محتوى الفبنولات الكلية في العينة بمقدار (31.6 mg/l)، وهذا يتفق مع دراسة أجراها [15] تم فيها دراسة الملف الفينولي للكومبوتشا المنتج من تخمير الشاي الأخضر و الشاي الأسود عند 25°م لمدة 10 أيام إلى جانب تحديد قدرتها المضادة للأكسدة والأنشطة المضادة للبكتيريا، كانت النتيجة ازدياد إجمالي محتوى الفينول بنسبة تصل إلى 98%. يعزى السبب في زيادة محتوى الفينولات الكلية نتيجة عملية التخمير إلى التحلل البيولوجي لبوليفينول الشاي بواسطة الإنزيمات المتوفرة في البادئ أثناء التخمير، مما يؤدي إلى إطلاق جزيئات أصغر من الفينولات ذات أنشطة مضادة للأكسدة أعلى[15]. أمّا بالنسبة للانخفاض القليل في محتوى الفينول الكلي الذي حصل مع زيادة زمن التخمير ف يعزى السبب في ذلك إلى أكسدة فينولات الشاي

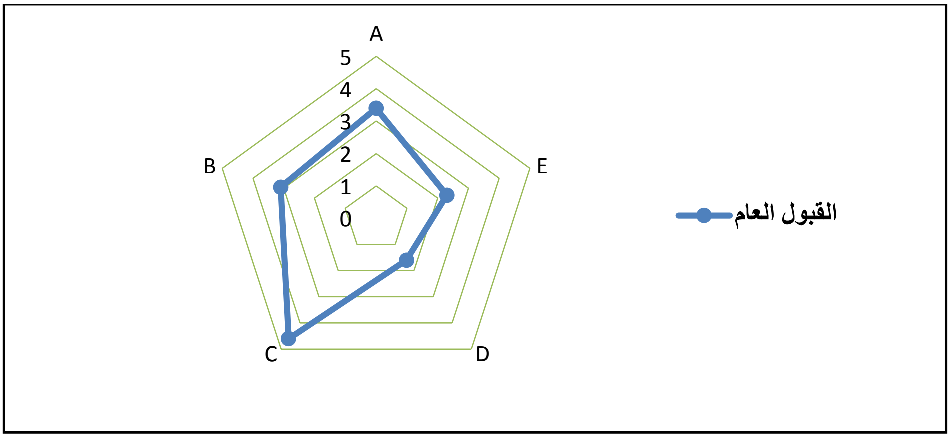
اعتمادًا على مستوى الأكسجين وانخفاض قيمة الرقم الهيدروجيني أثناء عملية التخمير حيث أنّ الزيادة في الحموضة تؤدي إلى تسريع أكسدة الفينولات.[22]

5- التقييم الحسي لعينات كومبوتشا:

يبيّن الشكل رقم (3) المتوسطات الحسابية لنتائج التقييم الحسي لعينات الكومبوتشا، فيما يظهر الشكل (4) نتائج القبول العام معروضة بنموذج التمثيل العنكبوتي. حيث لوحظ أنّ العينة C حصلت على أعلى درجات القبول أي يمكن اعتبارها العينة الأفضل من حيث التقييم الحسي وعلاوة على ذلك حققت العينة C (جدول-7) خصائص جيدة من حيث احتوائها على مكونات ذات خصائص وظيفية حيث بلغت نسبة مضادات الأكسدة (86.65%) ومحتواها من الفينول الكلي (102.17mg/l)، وقيمة رقم هيدروجيني[3.435 -3.343] pH وهي غير مسببة للضرر بالجهاز الهضمي، ونسبة كحول تتراوح بين [1.034-1.052%] (جدول-5)، وبالتالي استهلاكه بشكل معتدل يكون مفيد وصحي. وهذه النتيجة تتفق مع دراسة أجراها [30] حيث كانت ظروف التخمير المثلى للمشروب الكومبوتشا هي درجة حرارة 25°م وفترة 10 أيام مما مكّن من الحصول على منتج ذو خصائص فيزيائية كيميائية وحسية جيدة. أما التخمير الذي يتجاوز 10 أيام، فسيؤدي إلى الحصول على مشروبات مذاقها أشبه بالخل وغير مرغوبة.



الشكل(3): نتائج التقييم الحسي لعينات الكومبوتشا



الشكل(4): القبول العام للعينات

الاستنتاجات والتوصيات

الاستنتاجات:

1- انخفضت قيم الرقم الهيدروجيني ومستوى البريكس لجميع عينات الكومبوتشا أثناء عملية التخمير متأثرة بعوامل التخمير المختلفة وأهمها زمن التخمير حيث انخفضت

القيم بزيادة زمن التخمير الذي يعتبر من أهم العوامل المحدّدة لخصائص المنتج النهائي.

2-ارتفعت نسبة الكحول في عينات الكومبوتشا خاصة في الأسبوع الأول من التخمير ثمّ انخفضت قليلاً مع زيادة زمن التخمير.

4- ارتفعت القدرة المضـادة للأكسـدة بعد عملية التخمير مقارنة مع عينة الشـاي قبل التخمير، حيث ازدادت في عينة كومبوتشا مخمرة لمدة 10 أيام في درجة حرارة 25°م بنســبة (42.892%) مع زيادة زمن التخمير، وبلغت (89.69%) في نهاية عملية التخمير.

5- ارتفع محتوى الفينولات الكلية بعد عملية التخمير مقارنة مع عينة الشـــاي قبل التخمير، حيث بلغ في عينة كومبوتشـــا مخمرة لمدة 10 أيام في درجة حرارة 25°م (102.17mg/l) في اليوم السابع من التخمير، ومع استمرار عملية التخمر انخفض المحتوى الكلي للفينولات ليصل إلى (98.03 mg/l) في اليوم العاشر.

6- أظهرت نتائج التقييم الحسـي أن العينة C المحضـرة وفق المعايير التالية (75g/l سكر و6.5g/l شـاي أسـود والمخمرة لمدة 7.5 يوم عند درجة حرارة 25°م) حصـلت على أعلى درجات التفضـيل في التقييم الحســي من حيث القبول العام وبالتالي يمكن اعتماد معايير هذه العينة للحصول على مشروب الكومبوتشا بجودة حسية وخصائص وظيفية جيدة.

7- تم وضع نماذج رياضية تربط بين كل من (رقم الحموضة pH، الإيثانول، والبريكس) كتابع إلى (كمية السكر، كمية الشاي، درجة حرارة التخمير، زمن التخمير).

التوصيات:

1- المزيد من البحث حول حركية تخمّر الكومبوتشا من أجل التمكّن من تحديد المستقلبات المنتجة، ودراسة علاقتها بالأنشطة البيولوجية.

2- استخدام ركائز بديلة للشاي الأسود في تحضير الكومبوتشا ودراسة تأثير هذه الركائز على خصائص المشروب ومدى تقبل المستهلك المحلي له.

3- التوسع في دراسة الشروط المثلى وذلك لإنشاء معايير هوية للكومبوتشا وتوحيدها لضبط عملية الإنتاج ودراسة الشروط الملائمة لتخفيض كمية الإيتانول المنتج خلال عملية التخمير.

4- تحضير كومبوتشا بنكهات مختلفة بإضافة أصناف من الفاكهه أو أعشاب نباتية ودراسة تأثير هذه الإضافات على خصائص المشروب الكيميائية والحسية.

المراجع العلمية:

1 - المراجع العربية:

1. الباقوني محمد رياض، سعد مطانيس،1997- كيمياء الأغذية، القسم العلمي. منشورات جامعة البعث، كلية الهندسة الكيميائية والبترولية، 263 صفحة.
2. نيوف محمد، 2017- مراقبة الجودة، القسم العملي. منشورات جامعة البعث، كلية الهندسة الكيميائية والبترولية، ص 192-179.

2-المراجع الاجنبية:

3. AOAC 17th edn,(2000),- Official Method 942.15 Acidity (Titrable) of fruit products read with A.O.A.C . Official method 920.149 Preparation of test sample.
4. AOAC,(2006)- Official Method 932.14.Solids in Syrups.Official Methods of Analysis of AOAC International, 18th Ed.AOAC International, Gaithersburg,MD,USA.
5. Ayed, L., Ben Abid, S., Hamdi, M. (2016). Development of a beverage from red grape juice fermented with the Kombucha consortium. Annals of Microbiology. 67, 111–121.
6. Antolak, H., Piechota, D., Kucharska, A.(2021). Kombucha Tea—A Double Power of Bioactive Compounds from Tea and Symbiotic Culture of Bacteria and Yeasts (SCOBY). Antioxidants. 10, 1541.
7. Blanc, P. J. (1996). Characterization of the tea fungus metabolites. Biotechnology Letters, 18 (2), 139–142.
8. Bauer-petrovska, B., Petrushevska-tozi, L. (2000). Mineral and water soluble vitamin content in the Kombucha drink. International Journal of Food Science and Technology, 35, 201–205.
9. Butt, S., Sultan, M. (2009). Green tea: Nature's defense against malignancies. Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 49: 463-473.

10. Battikh, H., Bakhrouf, A., & Ammar, E. (2012). Antimicrobial effect of Kombucha analogues. LWT - Food Science and Technology, 47(1), 71–77.
11. Chen, C., Liu, B. Y. (2000). Changes in major components of tea fungus metabolites during prolonged fermentation. Journal of Applied Microbiology, 89 (5), 834–839.
12. Chu, S. C., Chen, C. (2006). Effects of origins and fermentation time on the antioxidant activities of Kombucha. Food Chemistry, 98(3), 502–507.
13. Crum, H., LaGory, A. (2016). The Big Book of Kombucha: Brewing, Flavoring, and Enjoying the Health Benefits of Fermented Tea. Storey Publishing: North Adams, MA, USA, p. 400.
14. Coton, M., Pawtowski, A., Taminiau, B., Burgaud, G., Deniel, F., Coulloumme-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.
15. Cardoso, R.R., Neto, R.O., Santos D'Almeida, C.T., Nascimento, T.P., Pressete, C.G., Azevedo, L., Martino, H.S.D., Cameron, L.C., Ferreira, M.S.L., de Barros, F.A.R.(2019). Kombuchas from green and black teas have different phenolic profile, which impacts their antioxidant capacities, antibacterial and antiproliferative activities. Food Research International 128, 10-17.
16. Fauzi, M., Ihsani, N., Hernahadini, N. (2021). The variation of ethanol concentration and kombucha characterization on several incubation periods The variation of ethanol concentration and kombucha characterization on several incubation periods. Journal of Physics: Conference Series.
17. Grumezescu, A.M., Holban, A.M. (2019). “Fermented beverages” The science of beverages, volume 5, chapter 10 pp. 401-425.
18. Goh, W.N., Rosma, A., Kaur, B., Fazilah, A., Karim A.A., Bhat, R.(2012). Fermentation of black tea broth (Kombucha): I. Effects of sucrose concentration and fermentation time on

the yield of microbial cellulose. International Food Research Journal 19(1): 109-117.

19. Hayat, K., Iqbal, H., Malik, U., Bilal, U., Mushtaq, S. (2013). Tea and Its Consumption: Benefits and Risks. Critical reviews in food science and nutrition. 55.
20. 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.
21. Jayabalan, R., Marimuthu, S., & Swaminathan, K. (2007). Changes in content of organic acids and tea polyphenols during Kombucha tea fermentation. Food Chemistry, 102 (1), 392–398.
22. Jayabalan, R., Malbasa, R., Loncar, E.S., Vitas, J.S., Sathishkumar, M. (2014). A review on Kombucha tea-microbiology, composition, fermentation, beneficial effects, toxicity, and tea fungus. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 13 (4), 538–550.
23. Jayabalan, R., Malbaša, R.V., Sathishkumar, M. (2016). Kombucha. Reference Module in Food Science 1–8.
24. Kumar, V., Joshi, V. K. (2016). Kombucha: Technology, microbiology, production, composition and therapeutic value. International Journal of Food and Fermentation Technology, 6(1), 13.
25. Lobo, R.O., Dias, F., Shenoy, C.K.(2017). Kombucha for healthy living, evaluation of antioxidant potential and bioactive compounds. Int Food Res J, 24, 541-546.
26. Lončar, E., Djurić, M., Malbaša, R., Kolarov, L. J., Klašnja, M. (2006). Influence of working conditions upon Kombucha conducted fermentation of black tea. Food and Bioproducts Processing, 84 (3), 186–192.
27. Malbaša, R., Lončar, E., Djurić, M.(2008). Comparison of the products of Kombucha fermentation on sucrose and molasses. Food Chemistry - FOOD CHEM. 106. 1039-1045.
28. Massoud, R., Jafari-Dastjerdeh, R., Naghavi, N., Khosravi-Darani, K. (2022). All aspects of antioxidant properties of kombucha drink. Biointerface Research in Applied Chemistry. Volume 12, 4018-4027.

29. Nguyen, N. K., Nguyen, P. B., Nguyen, H. T., & Le, P. H. (2015). Screening the optimal ratio of symbiosis between isolated yeast and acetic acid bacteria strain from traditional Kombucha for high-level production of glucuronic acid. LWT -Food Science and Technology, 64(2), 1149–1155.
30. Neffe-Skocińska, K., Sionek, B., Ścibisz, I., Kołożyn-Krajewska, D.(2017). Acid contents and the effect of fermentation condition of Kombucha tea beverages on physicochemical, microbiological and sensory properties. CyTA J. Food 15 (4), 601–607.
31. Shade, A. (2011). The Kombucha Biofilm: A Model System for Microbial Ecology.
32. Silva, J., Mafaldo, Í., Brito, I., Cordeiro, A. (2022). Kombucha: Formulation, chemical composition, and therapeutic potentialities. Current Research in Food Science. 5, 360-365.
33. Srihari, T., Karthikesan, K., Ashokkumar, N., Satyanarayana, U. (2013). Antihyperglycaemic efficacy of kombucha in streptozotocin-induced rats. J. Funct. Foods 5 (4), 1794–1802.
34. Villarreal-Soto, S. A., Beaufort, S., Bouajila, J., Souchard, J.P., Taillandier, P.(2018).Understanding kombucha tea fermentation: a review. Journal of Food Science, vol. 83, no. 3, pp. 580–588.
35. Watawana, M. I., Jayawardena, N., Gunawardhana, C. B., Waisundara, V. Y. (2015). 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
36. Watawana, M. I., Jayawardena, N., Ranasinghe, S. J., Waisundara, V. Y. (2016). Evaluation of the Effect of Different Sweetening Agents on the Polyphenol Contents and Antioxidant and Starch Hydrolase Inhibitory Properties of Kombucha: Alternative Sweeteners for Kombucha. Journal of Food Processing and Preservation,41(1).
37. Pisoschi.A.M., Cheregi, M.C., Danet.A.F.(2009).Total Antioxidant capacity of some commercial fruit juices:

Electrochemical and Spectrophotometrical Approaches. Melecules.14(1),480-493.

38. Singleton,V.L.,Orthofer,R., Lamuela-Raventos,R.M.(1999).[14] Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent.Methods in enzymology,Academic pree,299,152-178.