

Fermentasyon Süresinin Kombu Çayı Mikrobiyotası ve Canlılık Oranları Üzerine Etkileri

Nurcan Değirmencioglu¹  , Elif Yıldız² , Yasemin Şahan³ , Metin Gültaş⁴ , Ozan Gürbüz³ 

¹Bandırma Onyedi Eylül Üniversitesi Bandırma Meslek Yüksekokulu Gıda İşleme Bölümü, Bandırma-Balıkesir

²University of the District of Columbia The College of Agriculture Urban Sustainability and Environmental Sciences, Washington DC, USA

³Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü, Bursa

⁴Uludağ Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi Beslenme ve Diyetetik Bölümü, Bursa

Geliş Tarihi (Received): 15.04.2019, Kabul Tarihi (Accepted): 29.07.2019

✉ Yazışmalardan Sorumlu Yazar (Corresponding author): nurcan.degirmencioglu@gmail.com (N. Değirmencioglu)

☎ 0 266 714 93 02 📠 0 266 714 93 04

ÖZ

Kombu çayı kültürü ilavesiyle aerobik koşullarda çay yapraklarının fermentasyonu ile elde edilen Kombu çayı, maya ve asetik asit bakterilerinin birlikte çalıştığı simbiyotik bir sistemdir. Bu çalışmada, farklı çay (*beyaz, yeşil, oolong, siyah ve pu-erh*) yaprakları kullanılarak üretilen kombu çaylarının, 21 gün (30°C, karanlık koşullarda) fermentasyon süresince laktik asit bakterisi (LAB), toplam maya (TM), toplam asetik asit (TAA) ve toplam glukonobakter (TGB) sayımları yapılmış ve *in vitro* yapay statik gastrointestinal model kullanılarak mevcut mikrobiyotanın canlı kalma oranları ile fermentasyon süresine bağlı olarak değişimi incelenmiştir. Yapay mide-barsak ortamında en yüksek canlılık oranının fermentasyonun 12. gününde asetik asit bakterileri ve glukonobakterlerde (%91.16-99.61 ve %90.84-99.37) olduğu, fermentasyon sonunda, TAA ve TGB sayılarının 7.77-10.66 ve 7.68-9.68 log kob/mL arasında değiştiği, LAB sayılarında ise önce artış ardından yüksek asitlik (11.17 g/L, asetik asit cinsinden) ve düşen pH (2.82) nedeniyle inhibisyon sonucu %60 oranında azalma olduğu belirlenmiştir. Kombu çaylarının antibakteriyel etkisinin belirlenmesine yönelik incelemede ise artan asitliğe en hassas mikroorganizmanın *Escherichia coli* ve en dirençli mikroorganizmanın da *Lactobacillus acidophilus* olduğu belirlenmiştir. Pu-erh çay yapraklarıyla üretilen kombu çaylarının ise mikroorganizmalar üzerinde en fazla antibakteriyel etki gösteren çay yaprağı olduğu tespit edilmiştir (p<0.05). Sonuç olarak, ticari Kombu çayı üretiminde probiyotiklerin canlılık özellikleri göz önünde bulundurulurken ideal fermentasyon süresi olarak 2 haftanın önerilebileceği, fonksiyonel özelliklerin korunabilmesi için de fermentasyon koşullarının standardize edilmesi gerektiği sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Kombu çayı, Mikrobiyota, *In vitro*, Yapay statik gastrointestinal sistemde canlılık

Effect of Fermentation Time on Bio-Viability of Kombucha Tea

ABSTRACT

Kombucha is a symbiotic system including synergistic effects of yeasts and acetic acid bacteria, produced by the fermentation of tea leaves and the incorporation of kombucha cultures under aerobic conditions. In this study, kombucha samples were produced using different tea leaves (*white, green, oolong, black and pu-erh*), and the number of lactic acid bacteria (LAB), total yeast (TM), total acetic acid (TAA) and total gluconobacter (TGB) were determined in these samples during the fermentation of 21 days (30°C, dark conditions). Moreover, the survival rates of the present microbiota were investigated by using the *in vitro* artificial gastrointestinal model depending on the various fermentation periods. On the 12th day of fermentation, the highest vitality rates were obtained for acetic acid bacteria (91.16-99.61%) and gluconobacteria (90.84-99.37%) in artificial gastrointestinal model. At the end of the

fermentation period, TAA and TGB counts were 7.77-10.66 and 7.68-9.68 log cfu/mL, respectively. LAB counts increased first, followed by a reduction of 60% due to high acidity (11.17 g/L, as acetic acid) and a decrease in pH (2.82). In terms of antibacterial activity; *E. coli* was the most sensitive microorganism and *Lactobacillus acidophilus* was the most resistant microorganism to the elevated acidity. The Kombucha tea produced by *Pu-erh* tea leaves had the highest antibacterial effect on the microorganisms investigated ($p < 0.05$). In terms of the industrial production of Kombucha tea and the viability of the probiotics, it was concluded that the ideal fermentation period should be 2 weeks, and the fermentation conditions should be standardized in order to maintain its functional properties.

Keywords: Kombucha, Microbiota, *In vitro*, Artificial static gastrointestinal model

GİRİŞ

Bakteri (*Acetobacter* ve *Gluconobacter*) ve mayaların birlikte çalıştığı simbiyotik bir sistem olan Kombü çayı, şeker ve çay yapraklarının (siyah, yeşil, beyaz veya oolong) fermentasyonu ile üretilen, hafif tatlı, asidik ve gazlı bir içecektir [1, 2]. M.Ö. 221'de Çin, Kore ve Japonya'da enerji verici ve detoksifiye edici olarak tüketilen Kombü çayı, Japon İmparatoru'nun sindirim rahatsızlıklarını düzeltmek amacıyla Dr. Kombü tarafından ilk kez Kore'den Japonya'ya götürülmüş ve oradan da dünya'ya yayılmıştır [2]. Kombü çayı kelimesi, Japonca'da geniş yapraklı deniz yosunu (*Laminaria japonica*)'na verilen "Kombü", çay anlamına gelen "Cha" kelimelerinin birleşiminden oluşmaktadır. Farklı kaynaklarda kökeninin Rusya'ya dayanmakta olduğuna dair bilgiler bulunmakta olup, Rusya'da "Kargasok" çayı olarak bilinen Kombü çayı, "Red Tea Fungus, Haipao Manchurian Mushroom, Chainii kvass, Kocho kinoko" gibi isimlerle de anılmaktadır [3].

Yapılan çalışmalarda, "bakteri ve mayaların simbiyotik kültürü" (SCOBY, Symbiotic Culture of Bacteria and Yeast) olarak adlandırılan selülozik biyofilm tabakasında (zooglea biyofilm) *Acetobacteraceae* familyasına dahil Gram negatif aerob basiller (*Acetobacter xylinum*, *A. xylinoides*, *A. aceti*, *A. pasteurianus*, *Bacterium gluconicum* ve *Gluconobacter oxydans*) ile mayalar (*Saccharomyces cerevisiae*, *S. ludwigii*, *Zygosaccharomyces bailii*, *Z. rouxii*, *Z. kombuchaensis* sp.nov., *Schizosaccharomyces pombe*, *Torulasporea delbrueckii*, *Brettanomyces bruxellensis*, *B. lambicus*, *B. custerii*, *Candida krusei*, *C. albicans*, *Kluyveromyces africanus*, *Pichia membranaefaciens*, *Kloeckera apiculata*, *Torulopsis* sp., *Dekkera* sp.) ve laktik asit bakterilerinin (*Lactobacillus* sp., *Lactococcus* sp., *Leuconostoc* sp., *Bifidobacterium* sp.) simbiyotik olarak birlikteliği tespit edilmiştir [1-2, 4-18]. Yapılan son çalışmalarda; *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Deinococcus-Thermus*, *Firmicutes* ve *Proteobacteria* sınıflarına dahil mikroorganizmaların da bulunduğu belirlenmiş olup, *Firmicutes* sınıfına dahil *Lactobacillus* ve *Lactococcus* cinslerine bakteri ve mayaların simbiyotik kültüründe yoğun olarak rastlanıldığı, *Leuconostoc*, *Enterococcus* ve *Allobaculum* (kilo kaybında etkili) cinslerinin ilk kez kombü çayı örneklerinde tespit edildiği, *Propionibacterium* ve *Bifidobacterium* cinslerinin ise Kombü çayı fermentasyonunun erken dönemlerinde belirlendiği ifade edilmektedir [14, 19].

Bakteri ve mayaların simbiyotik kültüründe bulunan mayalar, invertaz enzimleriyle sakkarozu kullanarak etil

alkol ve CO₂ oluştururken; *Acetobacter* cinsi bakteriler, mayaların oluşturduğu etil alkolü alkol ve aldehit dehidrogenaz enzimleriyle asetik aside dönüştürmekte, *Gluconobacter*'ler ise süksinat ve α -ketoglutarat enzimlerinin bulunmaması nedeniyle de asetik asidi okside edemediklerinden glukonat oluşturmaktadırlar. Ayrıca, *Gluconobacter* ve *Acetobacter*'lerin glukonik asit üretimi için glikozu; asetik asit üretimi için de fruktoz ve etanolu kullanma yetenekleri de bulunmaktadır [1, 10, 20, 21].

Kombü çayında bulunan mikroorganizmalar; çay yaprakları ve zenginleştirmek için eklenen diğer bitkisel materyallerdeki (oğul otu, nane, enginar, kekik, adaçayı, dut, vişne vb.) fenolik bileşikler kullanılarak, bağlı formlarından serbest fenolikler oluşturmakta, hem son ürünün duyu özelliklerine katkıda bulunmakta hem de sağlık üzerinde olumlu etki gösteren fermentasyon ürünleri (asetik asit, glukonik asit, glukuronik asit, malik asit, CO₂, etil alkol, çeşitli vitaminler, amino asitler, mineraller vb.) meydana getirmektedirler. Maya ve bakterilerin meydana getirdikleri diğer metabolitler arasında, suda çözünür vitaminler (C, B₁, B₂, B₃, B₆, B₁₂) ile asetik asidin yanı sıra önemli ölçüde glukonik, glukuronik, sitrik, malik, tartarik, folik, laktik, okzalik, süksinik, pürvik asit gibi diğer organik asitler, mineral maddeler (Mn, Fe, Ni, Cu, Zn, Co, Cr vb.) ve fenolik bileşikler de yer almaktadır. Oluşan metabolitlerin çeşitliliği; bakteri ve mayaların simbiyotik kültüründe bulunan mikroorganizmaların çeşitliliğine, fermentasyon koşullarına (süre, sıcaklık vb.), kullanılan şeker ve çay miktarına, çay yaprağının çeşidine ve eklenen diğer bitkisel materyallere göre değişiklik göstermekle beraber; iklim, coğrafi koşullar, üretim sırasındaki hijyenik koşullar da bu konuda etkili olabilmektedir [1, 5, 10-12, 17, 22-25].

Kombü çayının pekçok metabolik hastalığı iyileştirici ve destekleyici etkisinin olduğu belirlenmiş (diabet, kronik yorgunluk, romatizmal hastalıklar, gut, hemoroid, yaşlılık, ateroskleroz, kolesterol ve kan basıncının düzenlenmesi, kanser ve AIDS gibi hastalıklarda görülen kilo kayıplarının kontrolü, bağışıklık ve sindirim sistemleriyle karaciğer fonksiyonlarını destekleme, yangısal durumları azaltma, gastrointestinal sistemin çalışmasını iyileştirme) olup, fenolik bileşik içeriğinden dolayı serbest radikalleri etkisiz kılıcı ve antioksidan aktivitesinin yanısıra, organik asit içeriğiyle de patojen bakterilere (*Salmonella typhimurium*, *S. enteritidis*, *Staphylococcus aureus*, *Helicobacter pylori*, *Shigella sonnei*, *E.coli*) karşı antibakteriyel etkisi bulunmaktadır [1, 8-9, 24-31].

Çay mantarı olarak bilinen *Medusomyces gisevii*'nin gelişebilmesi osmofilik mayalar ve bakterilerin çoğalmasına bağlı olup; sakkarozu kullanan asetik asit bakterileri (*Acetobacter xylinum*) fermentasyon sırasında, selülozik yapıda-kalın "zooglea biyofilm" tabakasını oluşturarak simbiyotik bakteri ve maya topluluğunun bir arada kalmasını sağlamaktadır [10, 11, 26]. Bakteri ve mayaların oluşturduğu simbiyoz konsorsiyum geliştikçe oluşan selüloz yapı, yüzeydeki mikroorganizmaları hem UV ışınlarından korumakta hem de gelişmeleri için gerekli olan oksijeni sağlamaktadır [1].

Probiyotik mikroorganizmaların insan sağlığı üzerindeki olumlu etkilerini ortaya koymaya yönelik pek çok araştırma yürütülmekte olup, bu mikroorganizmaların sindirim sisteminden geçerken canlı kalabilmeleri büyük önem taşımaktadır. *In-vitro* gastrointestinal modeller, statik ve dinamik olmak üzere ikiye ayrılmakta; statik modellerde gıda maddesi sindirim sistemindeki işlemlere maruz bırakılarak sindirim sırasında zamana bağlı olarak değişen parametreler (pH, enzim düzeyi, örnek miktarı vb.) dikkate alınmamakta, dinamik modellerde ise fiziksel ve mekanik işlemlerle zamana bağlı olarak değişen parametreler sindirim sırasında stimüle edilmektedir [27].

Taze kaynatılmış su kullanılarak (1 litre) ve 50-200 g/L oranında sakkaroz (çay şekeri) ile tatlandırıldıktan sonra, çoğunlukla siyah çay yapraklarıyla (1.5-5.0 g/L) demlenen Kombu çayı (10 dakika); yapraklar uzaklaştırıldıktan sonra, oda sıcaklığına soğutulmakta ve ardından bakteri ve mayaların simbiyotik kültürü (SCOBY, Kombu çayı mantarı) ve daha önce fermente edilmiş çaydan (100-150 mL/L) eklenerek, üzeri temiz bir bezle örtüldükten sonra fermentasyona bırakılmaktadır (7-60 gün) [5, 7, 11, 20, 24-25, 32]. Süre ve sıcaklık artışına bağlı olarak artan asetik asidin olumsuz etki yaratmaması için fermentasyonun; pH 4.2'ye ulaştığında sonlandırılması, alkol ve CO₂ oluşumunu kontrol edebilmek için ise ürünün pastörize edilmesi veya koruyucu (%0.1 sodyum benzoat ve %0.1 potasyum sorbat) ilave edilip soğukta muhafaza edilmesi önerilebilmektedir [24, 25, 34].

Bu çalışmada, *beyaz, yeşil, oolong, siyah ve pu-erh çay* yaprakları kullanılarak üretilen Kombu çayı örneklerinin; 21 günlük (30°C, karanlık koşullarda) fermentasyon süresince, mevcut mikrobiyotasını (laktik asit bakterisi-LAB, toplam maya-TM, toplam asetik asit-TAA ve toplam glukonobakter-TGB) ve bu mikrobiyotanın *in vitro* statik gastrointestinal model ortamında fermentasyon süresine bağlı olarak canlı kalma oranlarının tespit edilerek ideal fermentasyon süresinin ve antimikrobiyal özelliklerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

MATERYAL ve METOT

Kombu Çayı Üretimi

Kombu çayı örneklerinin hazırlanmasında Chado firmasından temin edilen *beyaz* (Yin Zhen Silver Needle, *Camellia sinensis var. sinensis*, Çin), *yeşil* (Matcha Koicha, *Camellia sinensis var. assemica*, Japonya), *milk*

oolong (*Camellia sinensis var. sinensis*, Tayvan), *siyah* (Keemun black, *Camellia sinensis var. sinensis*, Qimen bölgesi Çin) ve *Golden pu-erh* (*Camellia sinensis var. sinensis*, Pu-erh bölgesi Çin) çay yaprağı örnekleri kullanılarak Greenwalt ve ark. [28] tarafından önerilen yöntem adapte edilmiştir. Sterilize edilmiş 1 litre damıtık suya, şeker (100 g/L) ilave edilerek kaynatılmış, ardından çay yaprakları (6 g/L) ayrı ayrı eklendikten sonra 15 dakika süreyle demlenmiş ve soğutulmuş çay örneklerine bakteri ve mayaların simbiyotik kültürü ve fermente Kombu çayı (100 mL/L) ilave edilerek 21 gün süreyle, 30±2°C'de karanlıkta, fermente edilmiştir. Denemeler sırasında; bakteri ve mayaların simbiyotik kültürü, piyasada satılan ticari bir Kombu çay örneğinin (Mavili kapı firmasına ait) üç kez ard arda yukarıda belirtilen koşullarda fermente edilmesiyle elde edilmiş ve çay örneğinin üst yüzeyinde gelişen selülozik tabaka SCOBY olarak kullanılmıştır.

Fizikokimyasal ve Kimyasal Analizler

Fermentasyon süresince Kombu çay örneklerinin pH değerleri Hanna pH 211 model (Hanna Instruments S.R.L., ABD) pH metreyle ölçülerek belirlenmiş; toplam asitlik değerleri, CO₂'i uçurulmuş 10 mL Kombu çayı örneğinin 0.1 N NaOH eşliğinde titrasyonu ile tespit edilmiş ve sonuçlar asetik asit cinsinden g/L olarak ifade edilmiştir [35].

Mikrobiyolojik Analizler

Kombu çayı örneklerinden aseptik koşullarda 10'ar mL alınarak 90 mL steril %0.1 pepton (Merck 107214) ve %0.85 iyotsuz NaCl içeren dilüsyon sıvısı içinde homojenize edilmiş ve ileri dilüsyonlar için aynı dilüsyon çözeltisi kullanılmıştır. LAB sayımı için De Man Rogosa Sharpe (MRS) Agar (Merck 1.10660, 30±2°C, 48 saat), toplam maya sayımı için Rose Bengal Chloramphenicol Agar (Merck 1.00467, 22±2°C, 5 gün) kullanılmış [36] olup, toplam asetik asit bakterisi ve toplam Gluconobacter sayımları için ise Asai ve ark. [37] tarafından önerilen yöntem uygulanmıştır. Toplam asetik asit bakterisi sayımı için 30 g/L glikoz monohidrat (Merck 108342), 5 g/L maya ekstraktı (Merck 103753), 3 g/L pepton (Merck 107214), 20 g/L agar (Merck 101614) içeren besiyeri hazırlanarak sterilize edildikten sonra içerisine %3 etanol (Merck 100983) ve 10 g CaCO₃ (Merck 10207) eklenmiş, 25±2°C'de 3 gün inkübe edilmiştir. Toplam Gluconobacter sayımları için ise, 25 g/L D(-)-mannitol (Merck 105982), 5 g maya ekstraktı (Merck 103753), 3 g/L pepton (Merck 107214), 20 g/L agar (Merck 101614) içeren besiyeri hazırlanarak, 30±2°C'de 3 gün süreyle inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda tüm mikroorganizmalar için koloniler değerlendirilmiş ve sonuçlar "log kob/mL" şeklinde ifade edilmiştir.

In-vitro Yapay Statik Gastrointestinal Modelde Canlılık

Fermentasyon süresince, Kombu çayında bulunan mikroorganizmaların *in-vitro* yapay statik gastrointestinal modelde canlı kalma oranlarının tespitinde Nazzaro ve

ark. [38] ve Valero-Cases ve Frutos [39] tarafından belirtilen yöntemler kullanılmıştır. Yapay mide ve barsak ortamı; her mikroorganizma grubu için 9 mL uygun sıvı besiyeri kullanılarak oluşturulmuş ve hazırlanan besiyerleri kullanılmadan önce 0.22 µm (Minisart 16534, Sartorius Biotech GmbH 37070 Goettingen, Almanya) gözenek çapına sahip filtreden geçirilerek sterilize edilmiştir. *In-vitro* yapay statik gastrointestinal model ortamında canlı kalan mikroorganizma sayıları, her mikroorganizma grubu için uygun besiyerine ekim yapılarak tespit edilmiş ve sonuçlar "log kob/mL" olarak bildirilmiştir. Kombü çayı örneklerindeki mikroorganizmaların canlı kalma yüzdeleri ise; *in-vitro* yapay statik gastrointestinal model ortamı öncesindeki her mikroorganizma grubuna ait toplam canlı hücre sayısının, *in-vitro* yapay statik gastrointestinal model ortamı sonrasında toplam canlı hücre sayısına bölünerek, 100 ile çarpılmasıyla belirlenmiştir.

Antimikrobiyal Aktivite

Kombü çayı örneklerinin antimikrobiyal etkilerinin belirlenmesinde disk difüzyon yöntemi [40] uygulanmış olup, fermentasyonun 12. gününde alınan örnekler, 0.2

µm gözenek çapına sahip steril filtreden geçirilmiş, Tablo 1'de isimleri ve gelişme koşulları belirtilen mikroorganizmalar üzerinden antimikrobiyal etkileri belirlenmiştir. 18-24 saatlik kültürlerden 100 µL alınarak patojen mikroorganizmalar (8.44-8.98 log kob/mL) için TS agar besiyerine; laktik asit bakterileri (7.20-7.62 log kob/mL) için ise MRS agar besiyerine yüzey sürme yöntemiyle ekim yapılmış ve 4°C'de 2 saat süreyle bekletilerek kültürlerin besiyerine difüzyonu sağlanmıştır. Süre sonunda 6 mm çapındaki kağıt diskler (Oxoid CT0998B), besiyeri yüzeye yerleştirilerek her kombü çayı örneğinden 20 µL alınarak kağıt disklere emdirilmiştir. Pozitif kontrol olarak 20 µL kloramfenikol (0.1 g/L, Oxoid SR0078E), negatif kontrol olarak ise 20 µL saf su (0.2 µm gözenek çapına sahip filtreden geçirilmiş) kullanılmıştır. İnkübasyon sonrasında petrillerdeki zon çapları ölçülerek (-: *inhibe edici etki yok*; +: <10 mm; ++: 10-15 mm; +++: 15-20 mm), test edilen mikroorganizmalar üzerine Kombü çayı örneklerinin antimikrobiyal etkileri değerlendirilmiştir. Çalışmada yapılan fizikokimyasal, kimyasal ve mikrobiyolojik analizler üç kez tekrarlanmış ve sonuçlar bu üç değerler ortalaması olarak verilmiştir.

Tablo 1. Antimikrobiyal aktivite belirlenmesinde kullanılan mikroorganizmalar ve gelişme koşulları

Mikroorganizma adı	Temin edildiği yer	Kullanılan besiyeri ve Gelişme koşulları
<i>Salmonella enteritidis</i> (ATCC 13076) <i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922) <i>Staphylococcus aureus</i> ssp. <i>aureus</i> (ATCC 29213) <i>Enterobacter aerogenes</i> (ATCC 13048)	Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı	Tryptic Soy Broth (TSB)/ Tryptic Soy Agar (TSA), (Oxoid CM0129)/ (Oxoid CM0131) 37°C'de 24 saat
<i>Listeria monocytogenes</i> serotype1/2b <i>Salmonella enterica</i> serovars. <i>Typhimurium</i>	Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı	
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> NRRL B 548 <i>Lactobacillus casei</i> NRRL B 1922 <i>Lactobacillus acidophilus</i> NRRL B 4495	USDA's Agricultural Research Services Culture Collection (Birleşik Devletler Tarım Bölümü'nün Tarımsal Araştırma Servisi Kütür Koleksiyonu)	De man Rogosa Sharp Broth/ De man Rogosa Sharp Agar (Merck 1.10661)/(Merck 1.10660) 37°C'de 2 gün

Duyusal Değerlendirme

Kombü çayı örneklerinde duyusal değerlendirme; 1-5 hedonik skala (5 puan: Çok iyi, 4 Puan: iyi, 3 Puan: Kabul edilebilir, 2 Puan: Yeterli değil, 1 Puan: Kötü) kullanılarak, 18-48 yaş aralığında 25 kişi ile; örneklerin; lezzet, koku, ekşilik, renk ve genel kabul edilebilirlik açısından değerlendirilmesiyle gerçekleştirilmiştir [41].

İstatistiksel Analizler

Analizler sonucu elde edilen veriler istatistiksel olarak SPSS 16.0 programı kullanılarak değerlendirilmiştir. Elde edilen ortalama değerler arasındaki istatistiksel farklılıkların belirlenmesinde p<0.05 olasılık düzeyinde LSD (Least Significant Difference) testi kullanılmıştır.

BULGULAR ve TARTIŞMA

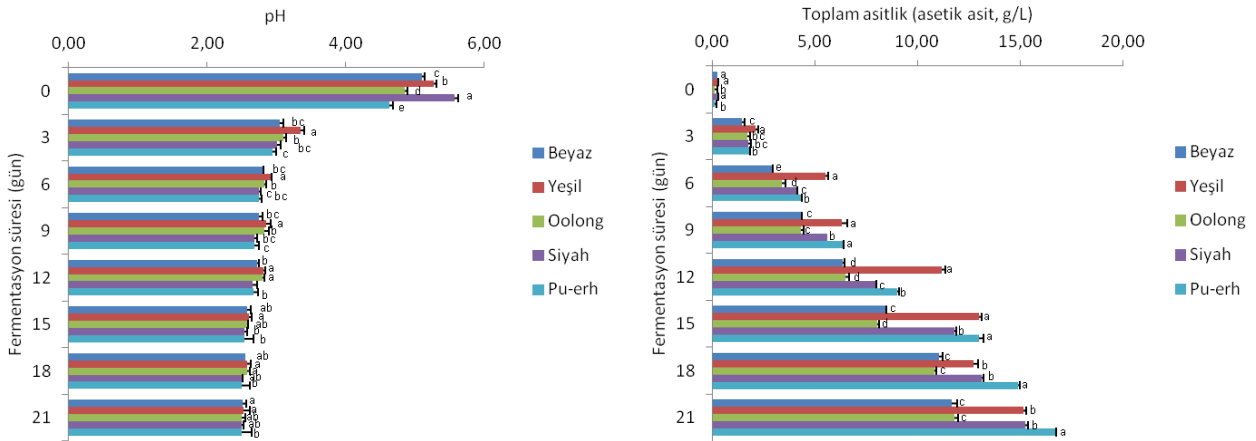
Kombü çayı örneklerinin fizikokimyasal analiz sonuçları Şekil 1'de verilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre

örneklerin pH değerleri fermentasyonun başında 4.63-5.58 arasında değişiklik gösterirken, fermentasyonun 21. gününde ise 2.50-2.53'e düşmüştür. Kombü çayı üretiminde hammadde olarak farklı çay yaprakları kullanımının, örneklerin pH değerlerinde belirgin farklılığa (p>0.05) yol açmadığı gözlenmekle birlikte, tüm çay örneklerinde düzenli bir azalmanın olduğu tespit edilmiştir. Kombü çayı ile ilgili olarak daha önce yapılmış çalışmalarda fermentasyon sonu pH değerleri olarak 1.80 [12], 3.00-3.50 [14], 4.60-4.70 [18], 3.91-4.19 [21], 2.50 [42], 2.50 [43], 3.08 [44], 2.76-3.15 [45], 2.60 [46], 2.50-3.00 [47], 2.90 [48], 2.90 [49], 3.00 [50], 1.95-2.89 [51], 3.11-3.22 [52], 3.60 [53], 2.57-3.05 [54] değerleri elde edilmiş ve pH değerlerinin diğer çalışmalarda 1.80-4.70 arasında değiştiği gözlenmiştir. Bu değerlerle karşılaştırıldığında çalışmamızdaki fermentasyon sonu pH değer aralığının, bu pH değişim bandı içinde kalarak genel ortalamayla uyumlu olduğu belirlenmiştir. Pek çok araştırmacı tarafından da belirtildiği gibi [10, 12, 51, 55, 56] tüm çay örneklerine aynı oranda ilave edilen sakaroz; fermentasyonda kullanılarak farklı organik

asitlere dönüşmekte ve bunun doğal sonucu olarak da pH değerinde azalma gözlenmektedir. Fermentasyonun 3. gününden sonra gözlenen pH değerindeki azalmada ve pH düşüşünün tüm denemelerde yavaş seyretmesinde, Malbaşa ve ark. [32], Sun ve ark. [48] ile Jayabalan ve ark. [50] tarafından da ifade edildiği gibi; çay yapraklarındaki mineral maddelerle, fermentasyon sırasında oluşan zayıf asitlerin etkileşiminin etkili olduğu düşünülmektedir. Çay örnekleri arasında fermentasyon başlangıç ve sonu pH değerleri açısından diğer örneklerle göre en düşük değerlere sahip olan Kombu çayı tipi; *pu-erh* çay yaprakları kullanılarak üretilen örneklerdir ($p < 0.05$). pH değerlerindeki değişimin *pu-erh* çayının üretim tekniğinden ve çay yapraklarının bileşimindeki farklılıklardan (fenolik madde ve kateşin içeriğinden) kaynakladığı düşünülmekle beraber; fermentasyon sonunda tüm farklı çay örneklerinden yapılan denemelerde benzer pH değerlerine ulaşılmış olup, istatistiki olarak önemli bir farklılık bulunmamıştır ($p > 0.05$). Diğer çalışmalarla da [48, 52, 54, 57] uyumlu sonuçlar elde edilmesi sonucunda, farklı çay yaprakları kullanımının Kombu çayı fermentasyonu üzerinde pH değeri ve fermentasyon asitliği açısından önemli bir olumsuz etki yaratmadığı kanısına varılmıştır.

Kombu çayı örneklerinin toplam asitlik değerlerinin, fermentasyon başlangıcında 0.12-0.24 g/L (asetik asit cinsinden) arasında iken, 21. günün sonunda 11.77-16.69 g/L aralığına yükselmiştir. Yapılan farklı çalışmalarda; sıcaklık, ilave edilen şeker miktarı, kullanılan çay yaprağının çeşidi ve miktarı,

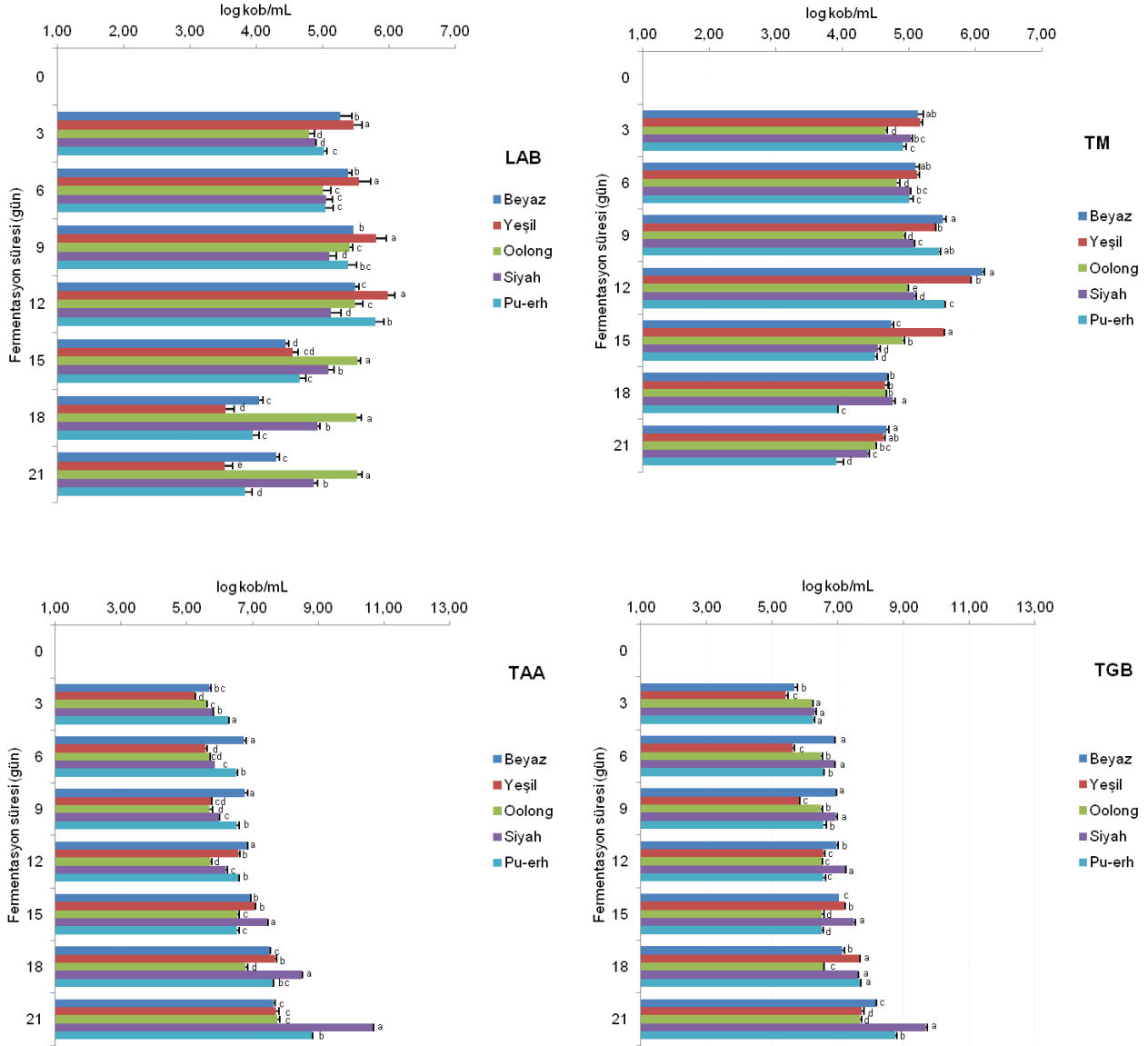
fermentasyon süresi ve sıcaklığı vb. koşullar neden gösterilerek daha düşük asitlik değerleri elde edildiği görülmüştür [18, 22, 32, 48, 52, 54, 57, 58]. En hızlı asitlik artışı pH değerindeki değişime paralel olarak, *pu-erh* çay yaprakları kullanılarak üretilen Kombu çayı örneklerinde belirlenmiştir ($p < 0.05$). Essawelt ve ark. [57] ile Lv ve ark. [58] tarafından da bildirildiği gibi *pu-erh* çay yapraklarının suda çözünür kurumadde oranı ve içeriği, fermentasyon sırasında CO_2 ve dolayısıyla suda çözünen hem asit hem de baz karakterine sahip hidrokarbonat (HCO_3^-) anyonu oluşumuna yol açmaktadır. Bu anyonun, zayıf asitlerin iyonizasyonundan açığa çıkan serbest hidrojen iyonlarına bağlanarak pH'daki düşüşü, tamponlama etkisiyle sayesinde, kısmen kontrol altında tuttuğu düşünülmektedir. pH değerlerinin fermentasyonun 3. gününden sonra ani değişimler göstermemesine karşın, toplam asitlik değerlerinde görülen artışlara benzer çalışmalarda da rastlanılmış olup, fermentasyon süresinin bitimine; pH değerlerindeki değişimin yanı sıra toplam asitlik değerlerine bakılarak da karar verilmesi önerilmektedir. Bu farklılıkta, muhtemelen pH değeri ölçümünde sadece suda iyonlaşan H^+ iyonu konsantrasyonunun ölçülmesi, titrasyon asitliğinde ise suda iyonlaşan ve asitlik veren diğer atom grubu, kök ve bileşiklerin de etkili olması rol oynamaktadır. Diğer yandan, fermentasyon sonunda ulaşılan pH değerleri, fermentasyonda etkili olan mayaların çalışabileceği pH değerinin çok altında olmasına karşın, simbiyotik kültürde bulunan bakteri ve mayaların faaliyetlerine devam edebildiğini göstermiştir ($p < 0.05$).



Şekil 1. Fermentasyon süresince pH ve toplam asitlik değişimi (log kob/mL, a-e: farklı harfler gruplar arasındaki farklılıkları ($p < 0.05$) ifade etmektedir)

Fermentasyon süresince belirlenen LAB, TM, TAA ve TGB sayıları Şekil 2'de gösterilmiştir. Fermentasyonun 3. gününde tüm mikroorganizma gruplarında hızlı bir artış olmuş, bu artış LAB ve TM sayılarında 12. güne kadar devam etmiştir. En yüksek değerler, LAB sayılarında yeşil çayda (5.80 log kob/mL) ve TM sayısı

bakımından ise beyaz çayda (6.11 log kob/mL) tespit edilmiştir ($p < 0.05$). *Oolong* çayı kullanılarak üretilen kombu çayı örnekleri ise, LAB sayılarında 3. günden itibaren 21. güne kadar düzenli artış ($p < 0.05$) gözlenmiştir.



Şekil 2. Fermentasyon süresince laktik asit bakterisi (LAB), toplam maya (TM), toplam asetik asit bakterisi (TAA) ve toplam glukonabakter (TGB) sayılarındaki değişimler (log kob/mL, a-e: farklı harfler gruplar arasındaki farklılıkları ($p < 0.05$) ifade etmektedir)

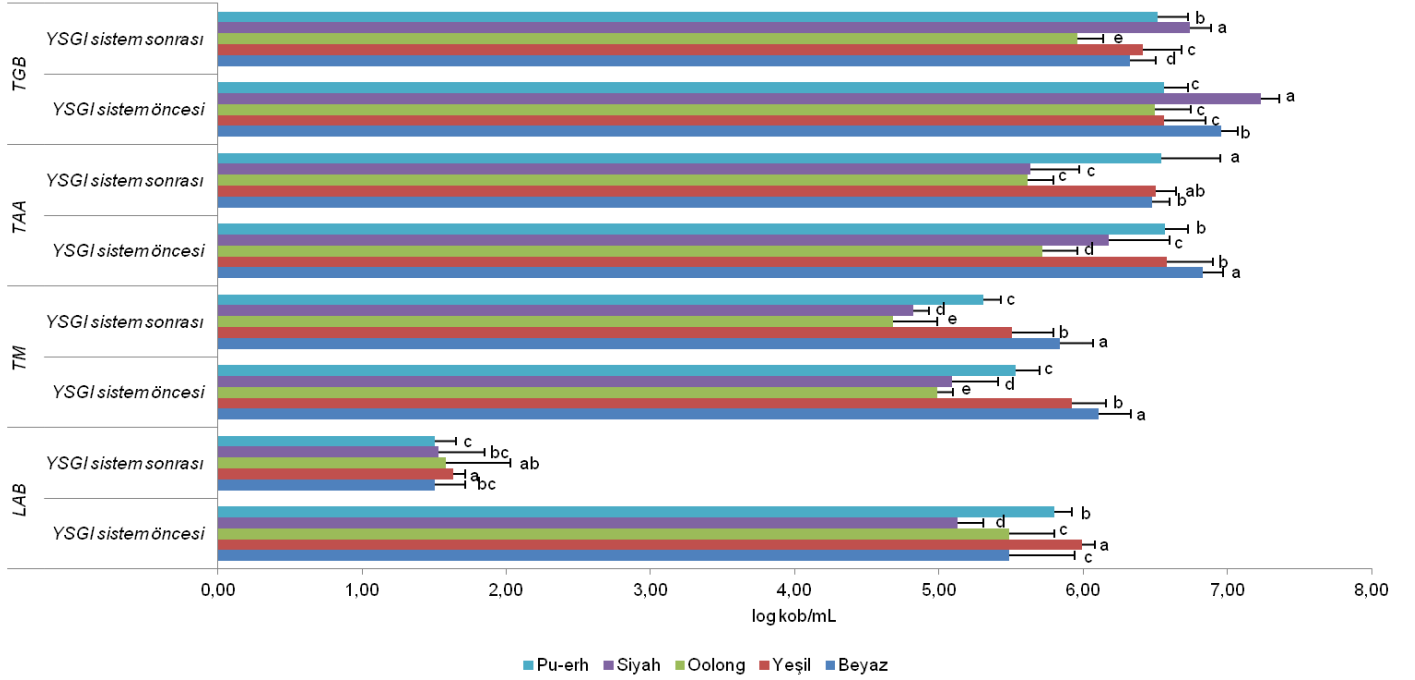
Fermentasyon sırasında maya sayılarındaki artışın 12. günden sonra azalma seyri içerisinde olmasında; fermentasyonun 3. ve 12. günleri arasında görülen pH değerindeki azalma ve toplam asitlik değerlerindeki artışın rol oynadığı, Teoh ve ark. [9] ile Esswelt ve ark. [57] tarafından yapılan çalışmalarda da vurgulandığı gibi, aynı dönemde toplam asetik asit ve glukonabakter sayılarında görülen artışa bağlı olarak da mayaların bu iki grup mikroorganizma ile besin maddesi içeriği ve pH azalışından dolayı rekabet edemediği sonucuna varılmıştır. En yüksek değerine sırasıyla 10.66 ve 9.68 log kob/mL ile 21. günde ulaşan toplam asetik asit ve glukonabakter sayılarında, 3. günden itibaren düzenli artış olduğu ve 3. günde ulaşılan değerden daha düşük seviyeye inmedikleri belirlenmiştir ($p < 0.05$). Gladysheva ve ark. [59] tarafından vurgulandığı üzere, asetik asit bakterileri 25-30°C aralığında en iyi gelişimi göstermekte olup, bizim çalışmamızda da Kombu çayı denemeleri

30°C'de ve karanlıkta gerçekleştirilmiştir. Ayrıca, bakteri ve mayaların simbiyotik kültürünün yanı sıra fermentasyonunun başlangıcında, fermentasyonunu henüz tamamlamış Kombu çayı örneklerinden başlatıcı kültür olarak ortama ilave edilmesi ve kullanılan çay yapraklarının kafein ve fenolik içeriklerinin de toplam asetik asit ve glukonabakter sayılarındaki düzenli artış üzerinde etkili olduğu düşünülmektedir.

Laktik asit bakterilerinin en yüksek seviyede (5.99 log kob/mL) olduğu 12. günde yapılan *in vitro* statik gastrointestinal sistemde canlılık analizi sonuçlarına göre (Şekil 3); yapay mide barsak ortamı sonrasında 1.51-1.63 log kob/mL düzeylerinde belirlenen LAB, *in vitro* statik gastrointestinal sistem koşullarında en düşük canlı kalma oranına (%25.95-29.85) sahip mikroorganizma grubu olmuş, bunu sırasıyla toplam maya (%92.99-96.02), toplam glukonabakter (%90.84-

99.37) ve toplam asetik asit bakterileri (%91.16-99.61) takip etmiştir ($p<0.05$). Kullanılan çay yaprakları açısından değerlendirildiğinde ise, *pu-erh* çay yaprakları

ilave edilen Kombu çayı denemeleri ($p<0.05$) LAB dışında en yüksek canlılık oranına sahip denemeler olarak belirlenmiştir.



Şekil 3. Yapay statik gastrointestinal (YSGI) sistem öncesi ve sonrası canlı kalma (12. gün) (log kob/mL, a-e: farklı harfler gruplar arasındaki farklılıkları ($p<0.05$) ifade etmektedir)

Kateşin gibi fenoller *E.coli*, *Bordetella bronchiseptica*, *Serratia marcescens*, *Klebsiella pneumoniae*, *S.choleraesuis*, *Pseudomonas aerogenosa*, *S.aureus* ve *Bacillus subtilis* gibi bakteri türlerine karşı hidrojen peroksit oluşturmak, hücre membranının geçirgenliğini değiştirmek, DNA, RNA, proteinler ve polisakaritlerin sentezini inhibe etmek ve bakterilerin exponansiyel büyüme aşamasını düzenleyen küçük sinyal moleküllerinin oluşumunu ve bakteriler arasındaki iletişimi (quorum sensing) engellemek suretiyle antimikrobiyal etki göstermektedir [60-63]. Aynı zamanda fenolik bileşikler oksidasyonla yapraklardaki renk değişiminden sorumlu olan yeni bileşiklere dönüşmektedir [64]. Bazı araştırmacılar ise, antimikrobiyal etkinin sodyum glutamat ve riboz gibi intra selüler maddelerin salınımından ve hücre duvarı ile hücre membranının geçirgenliğine zarar vermelerinden kaynaklandığını; ayrıca Cu, Mg, Zn ve Fe gibi minerallerin oluşumunun hızlanmasıyla da antimikrobiyal etkinin arttığını bildirmektedirler [65]. Çay yapraklarında bulunan fenolik bileşikler (kateşinler ve metil-ksantin alkaloidler), kafein, teabromin, ve teofilin antibakteriyel etkiye sahip bileşikler olup, bu etki çay yapraklarının oksidasyon-fermentasyon süresinin uzamasına bağlı olarak azalmaktadır. Bu açıdan değerlendirildiğinde yeşil çayın, siyah çaya göre daha güçlü antibakteriyel etkisi bulunmakta [62, 66-67], ancak siyah çay yapraklarındaki tanen ve flavonoidler bu etkiyi bazı durumlarda arttırabilmektedirler [64]. En yüksek antimikrobiyal etkiyi göstermesi beklenen fermente-oksidede olmamış beyaz çay yapraklarında, yaprakların soldurulması esnasında enzimatik inaktivasyon gerçekleşmediğinden polifenoller daha az düzeyde

okside olmakta ve renk değişimi için oksidasyon enzimleri aktif biçimde çalışmaya devam etmektedir [64, 68-69]. Fermente siyah çayda, çay yapraklarında bulunan fenolik bileşiklerin oksidasyonu polifenoloksidaz enzimiyle biyokimyasal süreç kapsamında gerçekleşirken, *pu-erh* çay yapraklarındaki fenoliklerin oksidasyonunda mikroorganizmalar etkili olmaktadır [70]. Yapılan çalışmalarda, önemli miktarda suda çözünür nitelikte flavonoid içeren *pu-erh* çay ekstraktlarının hem Gram (+) hem de Gram (-) mikroorganizmalar üzerine, ATP, DNA ve RNA gibi protein yapısındaki intraselüler moleküllerin kaybına sebep olan mikrobiyal hücre geçirgenliğini değiştirerek yüksek düzeyde antimikrobiyal aktivite gösterdiği ifade edilmektedir [63, 71]. Yeşil çayda bulunan kateşinlerin ise (özellikle de kateşin, epigallokateşin ve epigallokateşin gallat), metisiline ve ciprofloksasin'e dirençli Stafilokoklar, vankomisine dirençli Enterokoklar, ciprofloksasin'e dirençli *P. aerogenosa*, *S. aureus*, *B. stearothermophilus*, *Clostridium botulinum* gibi Gram (+) ve Gram (-) bakterilere karşı siyah çayla karşılaştırıldığında daha fazla antibakteriyel etkiye sahip olduğu [62-63, 67, 72-77] belirlenmiş, bir diğer çalışmada ise, yeşil ve *pu-erh* çay ekstraktlarının *S. aureus*'a karşı orta düzeyde, oolong ve siyah çay ekstraktlarının ise düşük düzeyde antimikrobiyal etki gösterdiği, *E. coli*'ye karşı ise çay ekstraktlarının hiç etki göstermediği tespit edilmiştir [78]. Michalczyk ve Zawislak [79] tarafından yapılan bir çalışmada ise, siyah çay ekstraktlarının *pu-erh* ve yeşil çay ekstraktlarıyla karşılaştırıldığında barsak kökenli bakterilere daha güçlü inhibe edici etki gösterdiği, *S. enteritidis*'in ise yeşil çaya

kiyasla siyah çayla daha yüksek düzeyde inhibe edilebildiği bildirilmiştir.

Yapılan çalışmada, farklı çay yaprakları kullanılarak üretilen tüm Kombu çaylarının antimikrobiyal etkisinin belirlenmesinde disk difüzyon yöntemi ve pozitif kontrol olarak da *Staphylococcus* spp., *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, *E.coli* gibi mikroorganizmalar üzerinde etki gösteren geniş spektrumlu antibiyotik, kloramfenikol kullanılmıştır. Kloramfenikol, Avrupa Klinik Mikrobiyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Birliği (EUROCAST) tarafından yayınlanan antimikrobiyal duyarlılık testine yönelik disk difüzyon yöntemi kılavuzunda 30 µg'lık dozlar ile önerilen antibiyotikler arasında yer almakta olup, *Escherichia coli* ATCC 25922 ve *Staphylococcus aureus* ssp. *aureus* (ATCC 29213) için hedef zon çapı 24 mm olarak bildirilmektedir [80]. Araştırmada uygulanan pozitif kontrol dozu 20 µL uygulanmış ve patojenlerin tamamı 15-20 mm zon çapı ile hassasiyet göstermiştir. Kombu çaylarına karşı en hassas mikroorganizmanın *E. coli* ($p<0.05$), en dirençli mikroorganizmanın ise *Lac. acidophilus* ($p<0.05$) olduğu (Tablo 2), *pu-erh* çay yaprakları kullanılarak üretilen Kombu çay örneklerinin ($p<0.05$) ise *Lac. acidophilus* dışında diğer mikroorganizmalar üzerine antimikrobiyal

etki gösterdiği tespit edilmiştir. Hu ve ark. [63] tarafından yapılan bir çalışmada, *Listeria monocytogenes*'in çay yapraklarından elde edilen ekstraktlara karşı en hassas mikroorganizma olduğu, sırasıyla *S. typhimurium*, *S. aureus*, *E. coli*'nin takip ettiği belirlenmiştir. Yapılan bu çalışmada ise, *L.monocytogenes*, *S. aureus* ve *S. Typhimurium*'un, *oolong* ve *pu-erh* çay yapraklarıyla üretilen kombu çaylarından etkilendiği tespit edilmiştir. Greenwalt ve ark. [7, 28] ile Sreeramulu ve ark. [81] tarafından yapılan çalışmalarda, kombu çayının antimikrobiyal etkisinin asetik asit içeriğinin bir sonucu olduğu, %0.7 düzeyinde asetik asit içeren Kombu çay örneklerinin *S. aureus*, *E. coli*, *S. cholerasuis* serotype *Typhimurium*, *B. cereus* ve *Agrobacterium tumefaciens* 'e karşı antimikrobiyal etki gösterdiği belirlenmiştir [28]. Sreeramulu ve ark. [8] ise *S. aureus*, *Shigella sonnei*, *E. coli*, *Aeromonas hydrophila*, *Yersinia enterocolitica*, *P. aeruginosa*, *Enterobacter cloacae*, *S. epidermidis*, *Campylobacter jejuni*, *S. enteritidis*, *S. typhimurium*, *B. cereus*, *Helicobacter pylori* ve *L. monocytogenes*'in kombu çayına hassasiyet gösterdiğini, nötr pH ve termal denatürasyondan sonra bile *E. coli*, *S. sonnei*, *S. typhimurium*, *S. enteritidis* ve *C. jejuni*'ye karşı antimikrobiyal etkisinin devam ettiğini ifade etmişlerdir.

Tablo 2. Farklı çay yaprakları kullanılarak üretilen Kombu çay örneklerinin antimikrobiyal aktivite zon çapları (mm)

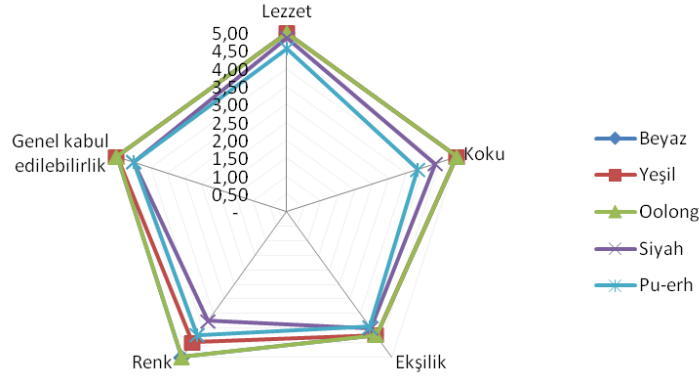
Mikroorganizmalar	Beyaz (mm)	Yeşil (mm)	Oolong (mm)	Siyah (mm)	Pu-erh (mm)	Pozitif kontrol (mm) ¹	Negatif kontrol (mm) ²
<i>Salmonella enteritidis</i>	14±0.51 ^{Aa}	15±0.49 ^{Aa}	-	13±0.21 ^{Bb}	14±0.32 ^{Ab}	19±0.52	-
<i>Escherichia coli</i>	14±0.63 ^{Aa}	14±0.36 ^{Aa}	14±0.63 ^{Aa}	15±0.36 ^{Aa}	14±0.20 ^{Ab}	20±0.89	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	15±0.52 ^{Aa}	-	15±0.50 ^{Aa}	20±0.74	-
<i>Enterobacter aerogenes</i>	-	-	15±0.55 ^{Aa}	-	15±0.26 ^{Aa}	19±0.63	-
<i>Listeria monocytogenes</i>	-	-	14±0.42 ^{Aa}	-	14±0.38 ^{Ab}	20±0.52	-
<i>Salmonella typhimurium</i>	-	-	14±0.78 ^{Aa}	15±0.45 ^{Aa}	15±0.41 ^{Aa}	20±0.74	-
<i>Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus</i>	-	-	-	9±0.12 ^{Ac}	8±0.20 ^{Ac}	14±0.32	-
<i>Lactobacillus casei</i>	-	15±0.22 ^{Aa}	-	-	14±0.48 ^{Ab}	18±0.47	-
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	-	-	-	-	-	20±0.88	-

¹ Kloramfenikol, ² Steril su, -: *inhibe edici etki yok*; +: <10 mm; ++: 10-15 mm; +++: 15-20 mm, Değerler; ortalama ± standart sapma A,B: Aynı satırdaki farklı harfler gruplar arasındaki farklılıkları ($p<0.05$), a-c: Aynı sütündeki farklı harfler gruplar arasındaki farklılıklar ($p<0.05$) ifade etmektedir.

Kombu çay örneklerinin toplam asitlik değerlerinin 11.77-16.99 g/L arasında değiştiği (Şekil 1) göz önünde bulundurulacak olursa, antimikrobiyal etkinin oluşmasında fenolik bileşiklerle birlikte asetik asidin de katkısının olduğu düşünülmekte olup, Mo ve ark. [26], Greenwalt ve ark. [28], Sreeramulu ve ark. [8, 81], Kim ve ark. [39], Mani-Lopez ve ark. [82], Ayed ve ark. [83] ve Battikh ve ark. [84]'nın da ifade ettiği gibi sadece asitlik veya asetik asit ve glukonik asit gibi organik asitler değil aynı zamanda ısıya duyarlı biyoaktif bileşikler (proteinler, antibiyotikler, enzimler vb.), çay yapraklarındaki kateşinlerin ısı nedeniyle epimerizasyonu sonucu değişen kimyasal bileşikler, sitoplazmik asidifikasyon, toksik düzeyde çözünmüş asit

anyon konsantrasyonunun artması ve asetik asit dışındaki diğer metabolitlerin varlığı da antimikrobiyal etkinin oluşmasını desteklemektedir.

Duyusal değerlendirme sonuçları incelendiğinde (Şekil 4), panelistler beyaz, yeşil ve oolong çay yapraklarıyla üretilen Kombu çayları arasında tüm değerlendirme kriterleri açısından farklılık olmadığını ($p>0.05$), siyah çay yapraklarından üretilen Kombu çaylarının daha koyu renkte olduğunu, pu-erh çay yapraklarından elde edilen çaylarda ise çay yapraklarının üretim şartlarındaki farklılığa bağlı olarak keskin bir kokusunun olduğunu ancak genel kabul edilebilirlik açısından örnekler arasında farklılık bulunmadığını ifade etmişlerdir.



Şekil 4. Kombuçay örneklerine ait duysal değerlendirme sonuçları

SONUÇ

Elde edilen sonuçlara göre; çay yapraklarında bulunan serbest ve bağlı fenolik bileşikler ile fermentasyon sırasında oluşan metabolitlerin Kombuçay florasında bulunan mikroorganizmaların canlı kalma oranlarına, laktik asit bakterileri dışında, olumlu yönde etki ettiği; pu-erh çay yaprakları ilavesinin canlı kalma yüzdelerinde artışa neden olduğu; Kombuçay örneklerinden en fazla etkilenen mikroorganizmanın *E.coli*, en dirençli mikroorganizmanın ise *Lactobacillus acidophilus* olduğu; farklı çay yaprakları kullanımının duysal olarak olumsuzluk yaratmadığı; üretimde standardizasyon yaratarak geleneksel çay tüketim alışkanlıklarına alternatif, sağlık üzerindeki etkisi geliştirilmiş probiyotik karakterli kombu çayı üzerinde kapsamlı araştırmalar gerçekleştirilmesi gerektiği sonucuna varılmıştır.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma, Bandırma Onyedü Eylül Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından BAP-18-BMYO-1009-091 nolu projeye desteklenmiştir.

KAYNAKLAR

- [1] Leal, J.M., Suárez, L.V., Jayabalan, R., Oros, J.H., Escalante-Aburto, A. (2018). A review on health benefits of kombucha nutritional compounds and metabolites. *CyTA - Journal of Food*, 16(1), 390-399.
- [2] Goh, W.N.A., Rosma, A., Kaur, B., Fazilah, B., Karim, A.A., Bhat, R. (2012). Fermentation of black tea broth (Kombucha): I. Effects of sucrose concentration and fermentation time on yield of microbial cellulose. *International Food Research Journal*, 19(1), 109-117.
- [3] Jarrell, J., Cal, T., Bennett, J.W. (2000). The Kombucha consortia of yeasts and bacteria. *Mycologist*, 14(4), 166-170.
- [4] Kurtzman, C.P., Robnett, C.J., Basehoar-Powers, E. (2001). *Zygosaccharomyces kombuchaensis*, a new ascosporogenous yeast from Kombucha tea. *FEMS Yeast Research*, 1(2), 133-138.
- [5] İleri-Büyükoğlu, T., Taşçı, F., Şahindokuyucu, F. (2010). Kombucha ve sağlık üzerine etkileri. *Uludağ University Journal of the Faculty of Veterinary Medicine*, 29(1), 69-76.
- [6] Kreutzmann, S., Christensen, L.P., Edelenbos, M. (2008). Investigation of bitterness in carrots (*Daucus carota* L.) based on quantitative chemical and sensory analyses. *LWT – Food Science and Technology*, 41(2), 193-205.
- [7] Greenwalt, C.J., Steinkraus, K.H., Ledford, R.A. (2000). Kombucha, the fermented tea: Microbiology, composition, and claimed health effects. *Journal of Food Protection*, 63(7), 976-981.
- [8] Sreeramulu, G., Zhu, Y., Knol, W. (2000). Kombucha fermentation and its antimicrobial activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(6), 2589-2594.
- [9] Teoh, A.L., Heard, G., Cox, J. (2004). Yeast ecology of kombucha fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 95(2), 119-126.
- [10] Jayabalan, R., Malbaša, R.V., Lončar, E.S., Vitas, J.S., Sathishkumar, M. (2014). A review on kombucha tea—Microbiology, composition, fermentation, beneficial effects, toxicity, and tea fungus. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13(4), 538-550.
- [11] Jayabalan, R., Malini, K., Sathishkumar, M., Swaminathan, K., Yun, S.E. (2010). Biochemical characteristics of tea fungus produced during Kombucha fermentation. *Food Science and Biotechnology*, 19(3), 843-847.
- [12] Chakravorty, S., Bhattacharya, S., Chatzinotas, A., Chakravorty, W., Bhattacharya, D., Gachhui, R. (2016). Kombucha tea fermentation: Microbial and biochemical dynamics. *International Journal of Food Microbiology*, 220, 63-72.
- [13] 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.
- [14] Marsh, A.J., O'Sullivan, O., Hill, C., Ross, R.P., Cotter, P.D. (2014). Sequence-based analysis of the bacterial and fungal compositions of multiple Kombucha (tea fungus) samples. *Food Microbiology*, 38, 171-178.
- [15] İleri-Büyükoğlu, T., Taşçı, F., Şahindokuyucu, F. (2010). Kombucha ve sağlık üzerine etkileri. *Uludağ University Journal of the Faculty of Veterinary Medicine*, 29(1), 69-76.

- [16] 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 and Technology*, 51(2), 490-498.
- [17] Villarreal-Soto, S.A., Beaufort, S., Bouajila, J., Souchard, J.P., Taillandier, P. (2018). Understanding kombucha tea fermentation: A Review. *Journal of Food Science*, 83(3), 580-588.
- [18] Velićanski, A.S., Dragoljub, D., Markov, C.S.L., Tumbas Šaponjac, V.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.
- [19] Baschali, A., Tsakalidou, E., Kyriacou, A., Karavasiloğlu, N., Matalas, A.L. (2017). Traditional low-alcoholic and non-alcoholic fermented beverages consumed in European countries: a neglected food group. *Nutrition Research Reviews*, 30(1), 1-24.
- [20] Reiss J. (1994). Influence of different sugars on the metabolism of the tea fungus. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung*, 198(3), 258-261.
- [21] Loncar, E., Djuric, M., Malbasa, R., Kolarov, L.J., Klasnja, M. (2006). Influence of working conditions upon Kombucha conducted fermentation of black tea. *Food and Bioproducts Processing*, 84(3), 186-192.
- [22] 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.
- [23] Wang, Y., Ji, B., Wu, W., Wang, R., Yang, Z., Zhang, D., Tian, W. (2013). Hepatoprotective effects of Kombucha tea: Identification of functional strains and quantification of functional components. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 94(2), 265-272.
- [24] Watawana, M.I., Jayawardena, N., Waisundara, V.Y. (2015a). Enhancement of the functional properties of coffee through fermentation by "tea fungus" (Kombucha). *Journal of Food Processing and Preservation*, 39(6), 2596-2603.
- [25] Watawana, M.I., Jayawardena, N., Gunawardhana, C.B., Waisundara, V.Y. (2015b). Health, wellness, and safety aspects of the consumption of kombucha. *Journal of Chemistry*, 1, 1-11.
- [26] Mo, H., Zhu, Y., Chen, Z. (2008). Microbial fermented tea- a potential source of natural food preservatives. *Trends in Food Science & Technology*, 19(3), 124-130.
- [27] Göçer E.M.Ç., Ergin, F., Küçükçetin, A. (2016). Sindirim sistemi modellerinde probiyotik mikroorganizmaların canlılığı. *Akademik Gıda*, 14(2), 158-165
- [28] Greenwalt, C.J., Ledford, R. A., Steinkraus, K. (1998). Determination and characterization of the antimicrobial activity of the fermented tea Kombucha. *LWT-Food Science Technology*, 31(3), 291-296.
- [29] Bhattacharya, S., Manna, P., Gachhui, R., Sil, P.C. (2011a). Protective effect of Kombucha tea against tertiary butyl hydroperoxide induced cytotoxicity and cell death in murine hepatocytes. *Indian Journal of Experimental Biology*, 49(7), 511-524.
- [30] Bhattacharya, S., Gachhui, R., Sil, P.C. (2011b). Hepatoprotective properties of Kombucha tea against TBHP-induced oxidative stress via suppression of mitochondria dependent apoptosis. *Pathophysiology*, 18(3), 221-234.
- [31] Bhattacharya, D., Bhattacharya, S., Patra, M.M., Chakravorty, S., Sarkar, S., Chakraborty, W., Koley, H., Gachhui, R. (2016). Antibacterial activity of polyphenolic fraction of Kombucha against enteric bacterial pathogens. *Current Microbiology*, 73(6), 885-896.
- [32] Malbaša, R.V., Lončar, E.S., Vitas, J.S., Čanadanović-Brunet, J.M. (2011). Influence of starter cultures on the antioxidant activity of kombucha beverage. *Food Chemistry*, 127(4), 1727-1731.
- [33] Vina, I., Semjonovs, P., Linde, R., Patetko, A. (2013). Glucuronic acid containing fermented functional beverages produced by natural yeasts and bacteria associations. *International Journal of Recent Research and Applied Studies*, 14(1), 17-25.
- [34] Kovacevic, Z., Davidovic, G., Vuckovic-Filipovic, J., Janicijevic-Petrovic, M., Janicijevic, K., Popovic, A. (2014). A toxic hepatitis caused the kombucha tea – Case report. *Macedonian Journal of Medical Sciences*, 2(1), 128-131.
- [35] AOAC, (2005). Official methods of analysis of the AOAC.(18th ed.). Washington: Association of Official Analytical Chemists.
- [36] Harrigan, W.F, McCance, M.E. (1990). Laboratory methods in food and dairy microbiology. Academic Press, London.
- [37] Asai, T., Lizuka, H., Komagata, K. (1964). The flagellation and taxonomy of genera *Glucanobacter* and *Acetobacter* with reference to the existence of intermediate strains. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 10(2), 95-126.
- [38] Nazzaro, F., Fratianni, F., Nicolaus, B., Poli, A., Orlando, P. (2012). The prebiotic source influences the growth biochemical features and survival under simulated gastrointestinal conditions of the probiotic *Lactobacillus acidophilus*. *Anaerobe*, 18(3), 280-285.
- [39] Valero-Cases, E., Frutos, M.J. (2017). Effect of inulin on the viability of *Lactobacillus plantarum* during storage and *in vitro* digestion and on composition parameters of vegetable fermented juices. *Plant Foods for Human Nutrition*, 72(2), 161-167.
- [40] Kim, E.S., Liang, Y.R., Jin, J., Sun, Q.F., Lu, J.L., Du, Y.Y., Lin, C. (2007). Impact of heating on chemical compositions of green tea liquor. *Food Chemistry*, 103(4), 1263-1267.
- [41] Meilgaard, M. C., Giville, G. V., & Carr, B. T. (1999). The spectrum descriptive analysis method in sensory evaluation techniques. In: Sensory

- Evaluation of Techniques (3rd ed., Chapter 11), p:189-254, Boca Raton, FL: CRC Press. <http://dx.doi.org/10.1201/9781439832271>
- [42] Liu C. H., Hsu W.H., Lee F.L., Liao C.C. (1996). The isolation and identification of microbes from a fermented tea beverage, Haipao, and their interactions during Haipao fermentation. *Food Microbiology*, 13(6), 407-415.
- [43] 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.
- [44] Zubaidaha, E., Afgani, C.A., Kalsum, U., Sriantac, I., Blanc, P. (2019). Comparison of in vivo antidiabetes activity of snake fruit Kombucha, black tea Kombucha and metformin. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 17, 465-469.
- [45] Zubaidah, E., Apriyadi, T.E., Kalsum, U., Widyastuti, E., Estiasih, T., Srianta, I., Blanc, P.J. (2018). In vivo evaluation of snake fruit Kombucha as hyperglycemia therapeutic agent. *International Food Research Journal*, 25(1), 453-457.
- [46] Nefte-Skocińska, K., Sionek, B., Ścibisz, I., Kolożyn-Krajewska, D. (2017). Acid contents and the effect of fermentation condition of Kombucha tea beverages on physicochemical, microbiological and sensory properties. *CyTA - Journal of Food*, 15(4), 601-607.
- [47] Yang, Z., Zhou, F., Ji, B., Li, B., Luo, Y., Yang, L., Li, T. (2010). Symbiosis between microorganisms from Kombucha and Kefir: potential significance to the enhancement of Kombucha function. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 160(2), 446-455.
- [48] Sun, T.Z., Li, J.S., Chen, C. (2015). Effects of blending wheatgrass juice on enhancing phenolic compounds and antioxidant activities of traditional kombucha beverage. *Journal of Food and Drug Analysis*, 23(4), 709-718.
- [49] Gramza-Michałowska, A., Kulczyński, B., Xindi, Y., Gumienka, M. (2016). Research on the effect of culture time on the kombucha tea beverage's antiradical capacity and sensory value. *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*, 15(4), 447-457.
- [50] Jayabalan, R., Subathradevi, P., Marimuthu, S., Satishkumar, M., Swaminathan, K. (2008). Changes in free-radical scavenging ability of kombucha tea during fermentation. *Food Chemistry*, 109(1), 227-234.
- [51] Pure, A.E., Pure, M.E. (2016). Antioxidant and antibacterial activity of kombucha beverages prepared using banana peel, common nettles and black tea infusions. *Applied Food Biotechnology*, 3(2), 125-130.
- [52] Güldane, M., Bayram, M., Topuz, S., Kaya, C., Gök, H.B., Bülbül, M., Koç, M. (2017). Beyaz, siyah ve yeşil çay kullanılarak üretilen kombuchaların bazı özelliklerinin belirlenmesi. *Journal of Agricultural Faculty of Gaziosmanpaşa University (JAFAG)*, 34(1), 46-56.
- [53] Amarasinghe, H., Weerakkody, N.S., Waisundara, V.Y. (2018). Evaluation of physicochemical properties and antioxidant activities of kombucha "Tea Fungus" during extended periods of fermentation. *Food Science and Nutrition*, 6(3), 659-665.
- [54] Primiani, N., Pujiati, M.M., Ardhi, I.S. (2018). Kombucha fermentation test used for various types of herbal Teas. *Journal of Physics: Conference Series*, 1025, 012073, 9p.
- [55] Dufresne, C., Farnworth, E. (2000). Tea, Kombucha, and health: a review. *Food Research International*, 33(6), 409-421.
- [56] Battikh, H., Chaieb, K., Bakhrouf, A., Ammar, E. (2013). Antibacterial and antifungal activities of black and green kombucha teas. *Journal of Food Biochemistry*, 37(2), 231-236.
- [57] Essawet, N.A., Cvetkovic, D., Velicanski, A., Canadanovic-Brunet, J., Vulic, J., Maksimovic, V., Markov, S. (2015). Polyphenols and antioxidant activities of Kombucha beverage enriched with Coffe berry extract. *Chemical Industry and Chemical Engineering Quarterly*, 21(3), 399-409.
- [58] Lv, H.P., Zhang, Y.J., Lin, Z., Liang, Y.R. (2013). Processing and chemical constituents of Pu-erh tea: A review. *Food Research International*, 53(2), 608-618.
- [59] Gladysheva, E.K., Skiba, E.A., Zolotukhin, V.N., Sakovich, G.V. (2018). Study of the conditions for the biosynthesis of bacterial cellulose by the producer *Medusomyces gisevii* Sa-12. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 54(2), 179-187.
- [60] Hubert, B., Eberl, L., Feucht, W. Polster, J. (2003). Influence of polyphenols on bacterial biofilm formation and quorum-sensing. *Zeitschrift für Naturforschung A*, 58(11-12), 879-884.
- [61] Ferrazzano, G.F., Amato, I., Ingenito, A., Zarrelli, A., Pinto, G., Pollio, A. (2011). Plant polyphenols and their anti-cariogenic properties: A review. *Molecules*, 16(2), 1486-1507.
- [62] Siddiqui, Md. W., Sharangi, A.B., Singh, J.P., Thakur, P.K., Ayala-Zaala, J. F., Singh, A., Dhua, R.S. (2016). Antimicrobial properties of teas and their extracts in vitro. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56(9), 1428-1439.
- [63] Hu, Y., Jia, J., Qiao, J., Ge, C., Cao, Z. (2010). Antimicrobial activity of pu-erh tea extracts in vitro and its effects on the preservation of cooled mutton. *Journal of Food Safety*, 30(1), 177-195.
- [64] Hazra, A., Saha, J., Dasgupta, N., Sengupta, C., Kumar, P.M., Das, S. (2017). Health-benefit assets of different Indian processed teas: a comparative approach. *American Journal of Plant Sciences*, 8(7), 1607-1623.
- [65] Padmini, E., Valarmathi, A. Rani, M.U. (2010). Comparative analysis of chemical composition and antibacterial activities of *Mentha spicata* and *Camellia sinensis*. *Asian Journal of Experimental Biological Sciences*, 1(4), 772-781.
- [66] Chan, E.W.C., Soh, E.Y., Tie, P.P. Law, Y.P. (2011). Antioxidant and antibacterial properties of green, black, and herbal teas of *Camellia sinensis*. *Pharmacognosy Research*, 3(4), 266-272.
- [67] Ansari, F., Pourjafar, H., Esmailpour, S. (2017). Study on citric acid production and antibacterial activity of kombucha green tea beverage during production and storage. *Annual Research and Review in Biology*, 16(3), 1-8.

- [68] Jiang, H.Y. (2009) White tea: its manufacture, chemistry, and health effects. In: Chemistry and Health-Promoting Properties, Edited by Chi-Tang Ho, Jen-Kun Lin, Fereidoon Shahidi, CRC Press, Boca Raton-Florida, USA pp.17-29.
- [69] Carloni, P., Tiano, L., Padella, L., Bacchetti, T., Customo, C., Kay, A. Damiani, E. (2013). Antioxidant activity of white, green and black tea obtained from the same tea cultivar. *Food Research International*, 53(2), 900-908.
- [70] Chen, M., Zhu, Y., Zhang, H., Wang, J., Liu, X., Chen, Z., Zheng, M., Liu, B. (2017). Phenolic compounds and the biological effects of Puerh teas with long-term storage, *International Journal of Food Properties*, 20(8), 1715-1728.
- [71] Duh, P.D., Yen, G.C., Yen, W.J., Wang, B.S. Chang, L.W. (2004). Effects of pu-erh tea on oxidative damage and nitric oxide scavenging. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(26), 8169-8176.
- [72] Bancirova, M. (2010). Comparison of the antioxidant capacity and the anti-microbial activity of black and green tea. *Food Research International*, 43(5),1379-82.
- [73] Toda, M., Okubo, S., Hiyoshi, R., Shimamura, T. (1989). The bactericidal activity of tea and coffee. *Letters in Applied Microbiology*, 8(4), 123-125.
- [74] Lee, Y.L., Cesario, T., Wang, Y., Shanbrom, E., Thrupp, L. (2003). Antibacterial activity of vegetables and juices. *Nutrition*, 19(11-12), 994-996.
- [75] Yam, T.S., Shah, S., Hamilton-Miller, J.M.T. (1997). Microbiology activity of whole and fractionated crude extracts of tea (*Camellia sinensis*), and of tea components. *FEMS Microbiology Letters*, 152(1), 169-174.
- [76] Sakanaka, S., Juneja, L.R., Tanigachi, M. (2000). Antimicrobial effects of green tea polyphenols on thermophilic spore-forming bacteria. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 90(1), 81-85.
- [77] Yokihiko, H., Watanabe, M. (1989). Antibacterial activity of tea polyphenols against *Clostridium botulinum*. *Journal of Japanese Society of Food Science Technology*, 36(12), 951-955.
- [78] Wu, S.C., Yen, G.C., Wang, B.S., Chiu, C.K., Yen, W.J., Chang, L.W. Duh, P.D. (2007). Antimutagenic and antimicrobial activities of pu-erh tea. *LWT - Food Science and Technology*, 40(3), 506-512.
- [79] Michalczuk, M. Zawislak, A. (2008). The effect of tea infusions on the proliferation of selected bacteria important for the human intestinal tract. *ACTA Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*, 7(1), 59-65.
- [80] EUCAST, (2018). European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, 20p (Erişim tarihi: 27.07.2019, <https://www.ipna.csic.es/sites/default/files/users/user282/EUCAST%202018.pdf>).
- [81] Sreeramulu, G., Zhu, Y. Knol, W. (2001). Characterization of antimicrobial activity in Kombucha fermentation. *Acta Biotechnologica*, 21(1), 49-56.
- [82] Mani-López, E., García, H.S., López-Malo, A. (2012). Organic acids as antimicrobials to control Salmonella in meat and poultry products. *Food Research International*, 45(2), 713-721.
- [83] Ayed, L., Abid, S.B., Hamdi, M. (2017). Development of a beverage from red grape juice fermented with the Kombucha consortium. *Annals of Microbiology*, 67(1), 111-121.
- [84] Battikh, H., Bakhrouf, A. Ammar, E. (2012). Antimicrobial effect of Kombucha analogues. *LWT - Food Science and Technology*, 47(1), 71-77.
-