



Beyaz, Siyah ve Yeşil Çay Kullanılarak Üretilen Kombuchaların Bazı Özelliklerinin Belirlenmesi

Mehmet GÜLDANE¹ Mustafa BAYRAM¹ Semra TOPUZ^{1*} Cemal KAYA¹
Hatice Burcu GÖK¹ Murat BÜLBÜL¹ Merve KOÇ¹

¹Gaziosmanpaşa Üniversitesi Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesi,
Gıda Mühendisliği Bölümü, 60150, Taşlıçiftlik, Tokat-Türkiye
*e-posta: semra.topuz@gop.edu.tr

Alındığı tarih (Received): 01.08.2016

Kabul tarihi (Accepted): 07.12.2016

Online Baskı tarihi (Printed Online): 04.04.2017

Yazılı baskı tarihi (Printed): 02.05.2017

Öz: Kombucha; maya ve asetik asit bakteri türleri arasındaki simbiyotik ilişkiye bağlı olarak şekerli çayın fermantasyonuyla üretilen bir içecektir. Bu çalışmada beyaz, siyah ve yeşil çay kullanılarak üretilen kombucha içeceklerinin pH'sı, toplam asitlik, alkol, toplam fenolik madde miktarları, kafein ve bazı bireysel fenolik bileşik içerikleri belirlenmiştir. Beyaz, siyah ve yeşil çay içeren kombuchaların fermantasyon sonrası pH değerleri sırasıyla 3,11; 3,22; 3,16 toplam asitlik (% asetik asit) miktarları ise 8,9; 9,2; 9,0 olarak saptanmıştır. Beyaz çayla üretilen kombuchanın toplam fenolik madde miktarı 736,1 mg GAE/L olup diğer kombuchalara göre daha yüksek miktarda tespit edilmiştir. Kombucha örneklerinde analizi yapılan bileşiklerden en yüksek miktarda bulunan kafein olarak belirlenmiştir. Beyaz çay kullanılarak üretilen kombuchaların gallik asit ($4,76 \pm 1,06$ mg/L), kafein ($63,47 \pm 4,64$ mg/L) ve epikateşin ($1,59 \pm 0,06$ mg/L) miktarları yeşil ve siyah çay kullanılarak üretilen kombuchalardan daha yüksek miktarda saptanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Kombucha, beyaz çay, siyah çay, yeşil çay, fenolik bileşik

Determination of Some Properties in Kombucha Produced with White, Black and Green Tea

Abstract: Kombucha is a drink produced by fermentation of sweetened tea due to symbiotic relationship between yeast and acetic acid bacteria species. In this study; pH value, total acidity, alcohol, total phenolic compounds quantities, caffeine and some individual compounds contents of kombucha drinks produced using white, black and green tea were determined. At the end of the fermentation, pH and total acidity (% acetic acid) values of kombuchas including white, black and green tea were found 3,11; 3,22; 3,16 and 8,9; 9,2; 9,0, respectively. Total phenolic compound content of kombuchas produced with white tea (736,1 mg GAE/L) was higher than others. The highest amount of compounds analyzed in the kombucha samples were identified as caffeine. Gallic acid ($4,76 \pm 1,06$ mg/L), caffeine ($63,47 \pm 4,64$ mg/L) and epicatechin ($1,59 \pm 0,06$ mg/L) quantities of kombuchas produced with using white tea were found higher than kombuchas produced with using black and green tea.

Keywords: Kombucha, white tea, black tea, green tea, phenolic compound

1.Giriş

Japonya'da "Kombu" bir deniz yosunu olan *Laminaria japonica*'yı tanımlamakta "Cha" ise çay anlamına gelmektedir (El-Taher 2011). Kombucha, mayalar ve asetik asit bakterilerini simbiyotik olarak içeren kombucha mantarının, şekerli çayı fermente etmesi sonucu oluşan bir

içecektir (Bauer-Petrovska ve Petrushevska-Tozi 2000; Battikh ve ark. 2013; Jayabalan ve ark. 2014). Ayrıca kombucha dünyada: Champignon de longue vie, ling zhi, kocha kinoko, chainii grib ve chainii kvass gibi farklı isimlerle de anılmaktadır (Malbasa ve ark. 2011; Watawana ve ark. 2015).

Kombucha üretiminde kullanılan ve “tea fungus” olarak bilinen kombucha mantarının, M.Ö 220’de, sahip olduğu enerji verici ve detoksifiye edici özelliklerden dolayı kullanıldığı ve Çin kökenli olduğu bilinmektedir. M.S 414 yılında, kombucha mantarı İmparator Inkyo’nun sindirim rahatsızlığını tedavi etmek için Kore’den Japonya’ya getirilmiş, ticaret yollarının genişlemesi ile birlikte Rusya ve daha sonra Doğu Avrupa’ya yayılmıştır. Almanya ve Fransa’da ise 20. yüzyıl başlarında tanınmıştır (Dufresne ve Farnworth 2000; Jayabalan ve ark. 2014).

Birçok ülkede kombucha üretimi, geleneksel üretimin yanı sıra endüstriyel olarak büyük ölçekte de yapılmaktadır (Watawana ve ark. 2015). Kombucha üretiminde mikroorganizmalar fermentasyon süresince sıvı-hava ara yüzeyinde selülozik ince bir biyofilm tabakası üretmektedir (Chakravorty ve ark. 2016). Böylece kombucha selülozik biyofilm tabaka ve tabakanın altında bulunan sıvı olmak üzere iki kısımdan oluşmaktadır (Chu ve Chen 2006; Battikh ve ark. 2013). Her iki kısmın mikrobiyel florasını asetik asit bakterileri ve mayalar oluşturmakla birlikte (Chakravorty ve ark. 2016) bazı çalışmalarda laktik asit bakteri grubuna ait *Lactobacillus bulgaricus*’ un da bu grupta yer aldığı bildirilmektedir (Wang ve ark. 2013).

Kombucha kültürünü *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces inconspicua*, *Saccharomyces ludwigii*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei*, *Debaryomyces hansenii*, *Brettanomyces* spp., *Kloeckera* spp., *Zygosaccharomyces bailii* ve *Zygosaccharomyces kombuchaensis* (Wang ve ark. 2013) *Torulospira* spp., *Pichia* spp., *Mycotorula* spp., *Mycoderma* spp., gibi mayalar (Jayabalan ve ark. 2014) *Acetobacter xylinum*, *Acetobacter xylinoides*, *Bacterium gluconicum*, *Acetobacter suboxydans*, *Gluconobacter liquefaciens*, *Acetobacter aceti* ve *Acetobacter pasteurianus* gibi asetik asit bakterileri ve laktik asit bakterileri grubuna ait *Lactobacillus bulgaricus* oluşturmaktadır (Wang ve ark. 2013).

Kombucha üretiminde substrat olarak genellikle siyah çay kullanıyor olsa da yeşil çay ve oolong çaylarının da substrat olarak kullanımı yaygındır. Ayrıca, bu içecek ender olarak melisa, dut, yasemin ve nane kullanılarak da üretilmektedir (Watawana ve ark. 2015). Kombucha hazırlamak için en uygun substratlar ise siyah ve yeşil çaydır (*Camellia sinensis* L.). Çünkü bu çayların içeriğinde, çay mantar hücrelerinin gelişimi için gerekli olan yüksek nitrojen kaynaklarına sahip kafein, teofilin gibi pürin türevleri bulunmaktadır (Essawet ve ark. 2015).

Kombucha üretiminde kullanılan çayla birlikte mikroorganizmaların kullanması için substrat olarak sakkaroz da eklenmektedir. Daha sonra fermentasyon ortamına aşılama materyali olarak, hacminin %10-20’si kadar daha önceden fermentasyonu gerçekleştirilmiş çay veya çayın fermentasyonu sonucu oluşan ince selülozik biyofilm tabaka inokule edilmektedir. Kombucha üretiminde fermentasyon aerobik şartlar altında, farklı sıcaklık, gün parametreleri kullanılarak yapılmaktadır ve fermentasyon sonunda farklı asitlik değerlerine ulaşılmaktadır (Essawet ve ark. 2015). Greenwalt ve ark. (1998), yaptıkları çalışmada fermentasyon koşullarını 25 °C’de 9 gün olarak belirlemiş, fermentasyon sonunda asetik asit cinsinden toplam asitlik miktarını 7 g/L ve pH değerini 2,5 olarak saptamışlardır. Loncar ve ark. (2001), kombucha fermentasyonunu 28 °C’de 14 günde gerçekleştirmiş ve fermentasyon sonunda üretilen kombuchanın toplam asitlik miktarını 8 g/L ve pH değerini 2,5 olarak tespit etmişlerdir. Kallel ve ark. (2012), yeşil ve siyah çaydan üretecekleri kombuchalar için fermentasyon koşullarını 24 °C’de 15 gün olarak belirlemiş ve fermentasyon sonunda yeşil çayda asetik asit cinsinden toplam asitlik miktarını 5,4 g/L, pH değerini 2,6 siyah çayda toplam asitlik miktarını 8 g/L, pH değerini 2,7 olarak tespit etmişlerdir. Kombucha hafif asit ve alkolün etkisiyle elma şarabına benzer tattadır. Eğer yeterli asitlik gelişiminden sonra fermentasyon durdurulmazsa çayın hoş a giden meyvemsi, hafif ekşi, ferahlatıcı tadı sirkemsi tada

dönüşmektedir (Goh ve ark 2012; Watawana ve ark. 2015).

Kombucha fermentasyonunda, çay mantarında bulunan mayalar invertaz enzimiyle ekstrakta erimiş halde bulunan sakkarozu hidrolize eder. Mayalar sakkarozun hidrolizi ile açığa çıkan glikoz ve fruktozu etanole dönüştürmekte daha sonra etanolde asetik asit bakterileri tarafından asetik asite çevrilmektedir. (Essawet ve ark. 2015). Ayrıca mayalar tarafından etanol üretilirken, asetik asit bakterileri glikozdan glukonik asit, fruktozdan asetik asit de üretebilmektedir (Malbasa ve ark. 2008; Watawana ve ark. 2015). Kombuchanın içeriğini asetik asit, etanol, glukonik asitin yanı sıra okzalik asit, sakkarik asit, laktik asit, 5-ketoglukonik asit, 2,5-ketoglukonik asit, etil glukonat, şekerler B₁, B₆, B₁₂ ve C vitamini gibi suda çözünen vitaminler, kateşinler, teoflavinler, flavonoller gibi çay bileşenleri, invertaz, amilaz gibi hidrolitik enzimler (Essawet ve ark. 2015), aminoasitler, karbondioksit, Na, K, Ca, Cu, Fe, Mn, Ni, ve Zn gibi elementler oluşturmaktadır (Watawana ve ark. 2015).

Kombucha sahip olduğu lezzetin yanı sıra profilaktik ve terapötik etkilerden dolayı da tüketilmektedir (Greenwalt ve ark. 1998; Teoh ve ark. 2004; Battikh ve ark. 2013). Kombuchanın antimikrobiyel (Battikh ve ark. 2013), antioksidan (Malbasa ve ark. 2011), antikanserojenik (Jayabalan ve ark. 2011), hipokolesterolemik (Yang ve ark. 2009), hipoglisemik (Shenoy 2000), hepatoprotektif (Wang ve ark. 2013) gibi etkilere sahip olduğu belirtilmektedir. Kombuchanın sahip olduğu yararlı etkiler; içeriğinde bulunan çay polifenolleri, glukonik asit, glukuronik asit, laktik asit, vitaminler, aminoasitler, antibiyotikler ve fermentasyon süresince üretilen çeşitli mikronütrientlerle ilişkilendirilmektedir (Jayabalan ve ark. 2007).

Bu çalışmada beyaz, siyah, yeşil çay kullanılarak üretilen kombuchaların bazı özelliklerini belirlemek ve literatürde herhangi bir çalışmanın bulunmadığı beyaz çaydan üretilen kombuchanın siyah ve yeşil çaydan üretilen kombuchalardan farkını saptamak amaçlanmıştır.

2. Materyal ve Metot

2.1. Materyal

Bu çalışmada kombucha üretimi için gerekli olan kombucha kültürü, Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Bölümünden, sakkaroz ve çaylar (beyaz, siyah ve yeşil çay) ise Cemre A.Ş'den (Tokat) temin edilmiştir. Kombuchaların üretimi ve analizleri Gaziosmanpaşa Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir.

2.1.1. Kombucha üretimi

Kombuchalar Jayabalan ve ark. (2007)'nin kullandığı yöntemin modifikasyonu ile üretilmiştir. Üretimde 3 farklı çay (beyaz, siyah, yeşil) % 1,5 oranında ve toz şeker (sakkaroz) % 7 oranında kullanılmıştır. Kaynamış suya belirtilen oranlarda çay ilave edilerek 15 dakika süre ile demlenmeye bırakılmıştır. Daha sonra çay ekstraktı süzülerek, ekstrakta belirtilen oranda şeker ilave edilmiştir. Şekerli çay, 24-25°C'ye kadar soğutulduktan sonra kombucha kültürü (%10) ilave edilerek 23-25°C aralığında karanlık bir ortamda fermentasyona bırakılmıştır. Fermentasyon süresince; 0., 2., 3., 4., 7., 8., 9., 10. ve 11. günlerde pH; 0., 3., 6., 9. ve 11. günlerde toplam asitlik miktarı analizleri yapılmıştır. Kombucha üretimleri 3 tekerrürlü olarak gerçekleştirilmiştir.

2.2. Metod

Çalışmada beyaz, siyah ve yeşil çay kullanılarak üretilen kombuchalara aşağıda belirtilen analizler yapılmıştır:

pH tayini: Kombucha örneklerinin pH'sı cam elektrotlu pH-metre (Ino-lab) kullanılarak AOAC (2005)'e göre belirlenmiştir.

Toplam asitlik tayini: Toplam asitlik miktarı, 10 mL örnek üzerine 20 mL saf su eklenip pH 8,2 oluncaya kadar 0,1N NaOH ile titre edilerek belirlenmiştir (AOAC 2005). Toplam asitlik asetik asit cinsinden ifade edilmiştir.

Alkol Tayini: Alkol miktarı, örnekten damıtılarak elde edilen sıvının piknometre ile yoğunluğu belirlenerek hacim alkol (%h/h) olarak ifade edilmiştir (Ough ve Amerine 1988).

Toplam Fenolik Bileşik Miktarı Tayini: Toplam fenolik bileşik miktarı Folin-Ciocalteu yöntemine göre saptanmıştır. Örneklerin

absorbansına karşılık gelen toplam fenolik bileşik miktarı, gallik asit kullanılarak çizilen standart grafik ile belirlenip, gallik asit cinsinden mg GAE/L olarak ifade edilmiştir (Ough ve Amerine 1988; Singleton ve ark. 1999; Ribereau-Gayon ve ark. 2006).

Kafein ve Bazı Bireysel Fenolik Bileşiklerin Tayini: Örneklerde, kafein ve fenolik bileşiklerden; gallik asit (GA), epigallokateşin (EGC), kateşin (C), epikateşin (EC), epigallokateşin gallat (EGCG), gallokteşin gallat (GCG), epikateşin gallat (ECG), kateşin gallat (CG) miktarları Yüksek Basınç Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile belirlenmiştir. Standartlar için stok çözeltiler 1 mg/mL olacak şekilde hazırlanarak metil alkol karışımında çözündürülmüştür. Analizde kullanılan kombucha örneklerinden 100 mL alınıp 0,45 µm gözenek çapına sahip membran filtreden süzümüştür (Millex-HV). Filtratlardan 20 µL alınıp HPLC cihazına (Perkin-Elmer Series 200)

enjekte edilmiştir (Liang ve ark. 2002). Perati ve ark. (2011) tarafından belirlenen analiz koşullarının kısmi modifikasyonu ile çalışmanın analiz koşulları belirlenmiştir.

Kolon: 5 µm , C18 (4,6mm x 250mm)

Sıcaklık: 25°C

Mobil faz A: asetonitril:trikoloro asetik asit:su (5:0,1:94,9)

Mobil faz B: asetonitril:trikoloro asetik asit (99,9:0,1)

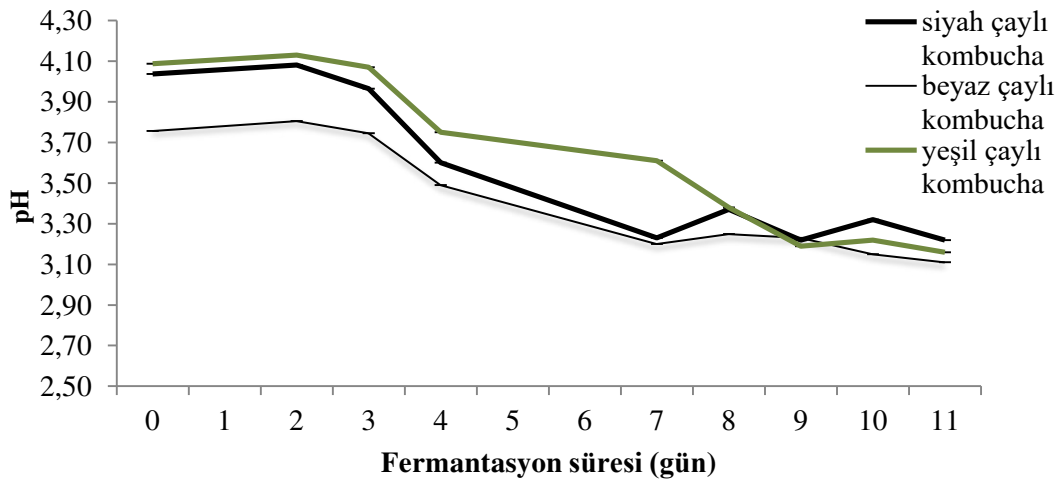
Dalga boyu: 280 nm

2.3. İstatistiksel Analiz Metodu

Araştırmalardan elde edilen sonuçların istatistiksel olarak değerlendirilmesi SPSS 17.0 İstatistik Paket Programı kullanılarak Tukey çoklu karşılaştırma testi uygulanarak gerçekleştirilmiştir.

3. Bulgular ve Tartışma

pH değeri: Farklı çay ekstraktlarından üretilen kombuchaların fermantasyon süresince pH değerleri Şekil 1’de gösterilmiştir.



Şekil 1. Farklı çaylar kullanılarak üretilen kombucha örneklerinin fermantasyon süresince pH değişimi

Figure 1. pH variation of kombucha samples which produced by using different teas during fermentation process

Kombucha üretiminin ilk gününde beyaz, siyah ve yeşil çaya ait örneklerin pH değerleri sırasıyla $3,76 \pm 0,05$; $4,04 \pm 0,05$; $4,09 \pm 0,10$ olarak belirlenmiş olup fermantasyonu sonlandırdığımız 11. günde ise $3,11 \pm 0,02$; $3,22 \pm 0,02$; $3,16 \pm 0,03$ olarak saptanmıştır.

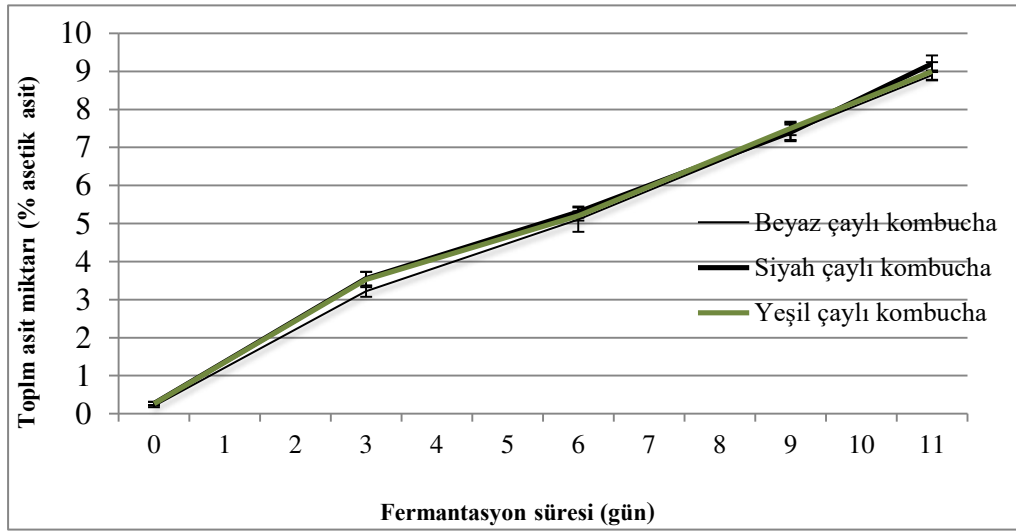
Fermentasyon başlangıcı ve sonundaki pH değerleri arasındaki farklar istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($p < 0,05$). Bu durum, aynı oranda sakkaroz içeren bütün ekstraktların fermantasyonu ile kombuchanın biyolojik aktivitesinden sorumlu olan birçok organik

asitin oluştuğunun (Battikh ve ark. 2013; Chakravorty ve ark. 2016) ve bunun sonucunda kombuchanın pH değerinin düştüğünün göstergesidir (Dufresne ve Farnworth 2000; Jayabalan ve ark. 2014).

Üretimin sonundaki pH değerine ulaşılması için gerekli süre siyah ve beyaz çay ekstraktlarıyla yapılan kombuchalarda 7 gün, yeşil çay ekstraktlarıyla yapılanlarda ise 9 gün olarak belirlenmiştir. Kombuchaların belirtilen sürelerin sonunda [7. gün (siyah, beyaz) 9. gün (yeşil)] ve fermantasyon bitiminde saptanan pH değerleri arasındaki fark istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur ($p>0,05$). Chen ve Liu (2000), Sreeramulu ve ark. (2000) ve Essawet ve ark. (2015) tarafından yapılan çalışmalarda da benzer sonuçlar rapor edilmiştir. Bu durum fermantasyon süresince substratlardan sentezlenen organik asitler ile mineraller arasında meydana gelen reaksiyonların (Malbasa ve ark 2008; Malbasa ve ark. 2011; Velicanski ve ark. 2014) ve karbondioksitten kaynaklanan bikarbonatın tampon etkisinden (Kallel ve ark. 2012; Essawet ve ark. 2015)

kaynaklanmaktadır. Siyah ve beyaz çay kullanılarak üretilen kombuchaların fermantasyon sırasında pH değişimi yeşil çay kullanılarak üretilen kombuchalara göre farklı değerlerde olup bütün kombuchaların son pH değerlerinin fermantasyonu sonlandırdığımız 11. günde benzer olduğu belirlenmiştir. Sun ve ark. (2015), değişik konsantrasyonlarda buğday çimi kullanılarak üretilen 3 farklı kombuchanın fermantasyon süresince pH değerine etkisini araştırdıkları çalışmada, pH değerlerinin fermantasyon günleri boyunca farklı olduğunu ancak fermantasyon sonunda benzer son pH değeriyle sonuçlandığını belirtmiş olup substratlardaki değişimin starter kültürün (maya ve asetik asit) gelişimini etkilemediğini bildirmişlerdir. Sonuçlar Sun ve ark. (2015)'nın yaptığı çalışma ile benzerlik göstermektedir.

Belirli bir zaman sonrasında örneklerin pH değerlerinde kayda değer bir değişim gözlemlenmemesine rağmen ($p>0,05$) toplam asitlik değerlerinde Şekil 2'de de görüldüğü gibi doğrusal bir artışın olduğu belirlenmiştir.



Şekil 2. Kombucha örneklerinin fermantasyon süresince toplam asit miktarındaki değişim
Figure 2. Total acidity variation of kombucha samples during fermentation process

Bundan dolayı kombuchanın fermantasyon süresinin belirlenmesinde pH ile toplam asitliğin kullanılması önerilmektedir. Aksine bazı çalışmalarda, kombuchanın fermantasyon süresinin uzamasına bağlı olarak pH değerinin

belirgin şekilde düştüğü bildirilmiştir (Jayabalan ve ark. 2007; Jayasundara ve ark. 2008; Malbasa ve ark. 2008; Kaczmarczyk ve Lochynski 2014; Chakravorty ve ark. 2016). Eğer fermantasyon esnasında pH değeri ve toplam asitlik miktarı

takip edilmezse üründe bulunan asetik asitin su ve karbondioksit parçalanması olarak bilinen üst oksidasyon meydana gelebilmektedir (Aktan ve Kalkan 1998). İklimsel ve coğrafi farklılıklar ile kültürde bulunan yabancı maya ve bakteriler kombucha kültürünün aktivitesini etkilemektedir. Kombucha ekosistemi çevresel etmenlere karşı çok duyarlıdır. Bundan dolayı ürünün kimyasal ve duyuşal özellikleri değişkenlik gösterebilmektedir (Bauer-Petrovska ve Petrushevska-Tozi 2000). Geleneksel kombucha üretiminde standart üretim için fermentasyon koşullarının optimize edilmesi gerekmektedir.

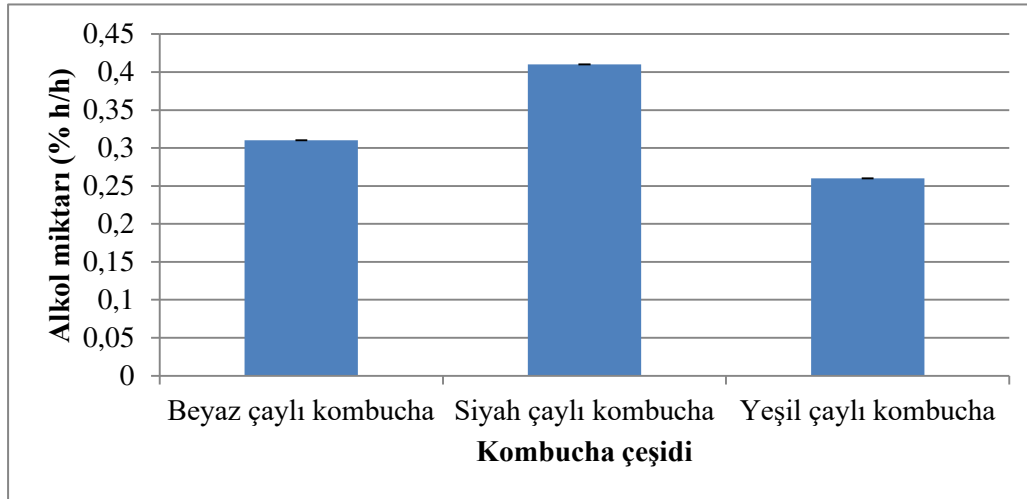
Toplam asit miktarı: Çalışmada her üç çay ekstraktıyla hazırlanan kombuchaların fermentasyon sürecinde toplam asit miktarlarındaki değişim Şekil 2’de gösterilmiştir.

Çalışmada üretimin ilk gününde beyaz, siyah ve yeşil çay örneklerine ait toplam asitlik miktarı sırasıyla $0,20 \pm 0,01$; $0,27 \pm 0,04$; $0,26 \pm 0,04$ g/L olarak belirlenmiş olup bu değerler fermentasyonun sonlandırıldığı 11.

günde, kombuchalarda $8,9 \pm 0,2$; $9,2 \pm 0,3$; $9,0 \pm 0,3$ g/L olarak saptanmıştır. Kombucha örneklerinin fermentasyon başlangıcı ve sonundaki toplam asitlik değerleri arasındaki farklar istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($p < 0,05$). Kallel ve ark. (2012) tarafından yapılan bir çalışmada yeşil ve siyah çay ekstraktlarıyla hazırlanan kombuchaların asetik asit cinsinden toplam asitlik miktarı ilk gün sırasıyla 0,35 ve 0,45 g/L olarak belirlenmiş olup fermentasyonun 15. gününde ise 5,4 ve 8 g/L olarak saptanmıştır.

Jayabalan ve ark. (2007) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada yeşil ve siyah çay kullanılarak üretilen kombuchalarda asetik asit cinsinden toplam asit miktarı fermentasyonun 15. gününde sırasıyla 9,5 g/L ve 6,2 g/L olarak belirlenmiştir. Çalışmamızda siyah, yeşil ve beyaz çay kullanılarak üretilen kombuchaların toplam asitlik miktarları arasındaki fark istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur (Şekil 2).

Alkol miktarı: Beyaz, siyah ve yeşil çay ile üretilen kombuchaların hacim alkol (%h/h) miktarları Şekil 3’te gösterilmiştir.



Şekil 3. Kombucha örneklerinin fermentasyon sonunda hacim alkol (% v/v) miktarları

Figure 3. Volume alcohol quantities(% v/v) of kombucha samples after fermentation process

Çalışmada 11 günlük fermentasyon sonunda beyaz, siyah ve yeşil çay kullanılarak üretilen kombuchaların alkol miktarı sırasıyla $0,31 \pm 0,00$ %h/h, $0,41 \pm 0,00$ %h/h, $0,26 \pm 0,00$ h/h olarak belirlenmiştir. Kombucha örneklerinin alkol miktarları arasındaki farklar istatistiksel

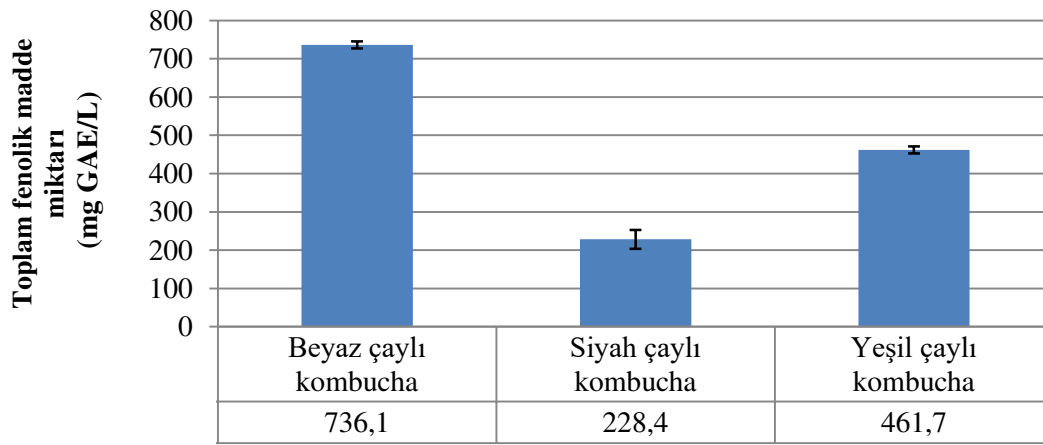
olarak önemli bulunmuştur ($p < 0,05$). Dufresne ve Farnworth (2000) yaptıkları çalışmada benzer sonuçlar elde etmişler ve 15 günlük fermentasyon sonucunda siyah ve yeşil çay kullanılarak üretilen kombuchaların alkol miktarlarını sırasıyla 3 g/L ($\sim 0,41$ %h/h) ve

2 g/L (~0,26 %h/h) olarak belirlemişlerdir. Araştırmacılar ayrıca kültür ortamındaki maya ve bakterilerin kombuchada simbiyotik olarak faaliyet gösterdiğini bildirmişlerdir. Mayalar sakkarozun hidrolizi ile açığa çıkan glikoz ve fruktozu etanole dönüştürmekte, etanolde asetik asit bakterileri tarafından asetik asite çevrilmiştir. (Essawet ve ark. 2015). Ayrıca mayalar tarafından etanol üretilirken, asetik asit bakterileri glikozdan glukonik asit, fruktozdan da asetik asit üretebilmektedir (Malbasa ve ark. 2008; Watawana ve ark. 2015). Kombuchanın pH değeri fermantasyon süresince organik asitlerin üretilmesinden dolayı düşmektedir. Asetik asit mayaların aktivitelerine olumlu etki yaparak etanol konsantrasyonunun artmasına neden olmakta ve bunun sonucunda da asetik asit bakterileri ortama hakim olarak asetik asit üretmektedirler (Dufresne ve Farnworth 2000; Jayabalan ve ark. 2014).

Kombuchada asetik asit ve glukuronik asidin haricinde laktik asidin varlığı da rapor edilmiştir

(Mayser ve ark. 1995; Greenwaltve ark. 1998; Loncar ve ark. 2006; Jayabalanve ark. 2007; Malbasa ve ark. 2008; Maghsoudi ve Mohammadi 2009; Gohve ark. 2012; Srihari ve Satyanarayana 2012; Wangve ark. 2013; Watawanave ark. 2015; Chakravorty ve ark. 2016). Kombuchaların farklı etanol konsantrasyonlarının temel nedeni mikrobiyal koloni ve/veya fermantasyon süresinin değişkenliğinden kaynaklanmaktadır (Kallel ve ark. 2012; Chakravorty ve ark. 2016). Chakravorty ve ark. (2016), etanol konsantrasyonunun fermantasyonun yedinci gününde maksimum değere ulaştığını (0.28 ± 0.014 g/L) fermantasyon süresinin uzamasına bağlı olarak ise azalmaya başladığını belirlemişlerdir (fermantasyonun 21. gününde etanol miktarı $0,073 \pm 0,003$ g/L'dir).

Toplam fenolik madde miktarı: Beyaz, siyah ve yeşil çay kullanılarak üretilen kombuchaların toplam fenolik madde miktarı Şekil 4'te gösterilmiştir.



Şekil 4. Kombucha örneklerinin fermantasyon sonundaki toplam fenolik madde miktarları

Figure 4. Total phenolic matter quantities of kombucha samples after fermentation process

Çalışmada elde edilen sonuçlara göre; beyaz, siyah ve yeşil çay ile üretilen kombuchaların toplam fenolik madde miktarları sırasıyla 736,1 mg GAE/L, 228,35 mg GAE/L, 461,7 mg GAE/L olarak belirlenmiştir (Şekil 4). Çay çeşitlerinin fenolik madde miktarı; iklim koşulları, tarımsal uygulamalar ve diğer faktörlerden (çay çeşidi, çayın kalitesi, çay ekim alanı vb.) etkilenebilmektedir (Kaur ve ark. 2015). Pereira ve ark. (2014) yeşil çay

örneklerinin (55,40 mg pirogallol/g) toplam fenolik madde miktarının, beyaz (46,91 mg pirogallol/g) ve siyah (36,28 mg pirogallol/g) çay örneklerinden daha yüksek olduğunu bildirmiştir. Aksine, Khokhar ve Magnusdottir (2002) ise siyah çayların ($103,0 \pm 22$ mg GAE/g) toplam fenolik madde miktarının yeşil çaylardan ($86,3 \pm 20$ mg GAE/g) yüksek olduğunu rapor etmiştir. Kallel ve ark. 2012, siyah ve yeşil çay kullanılarak üretilen

kombuchaların fermantasyonun 15. gününde toplam fenolik madde miktarlarını sırasıyla 1120 mg GAE/L ve 1080 mg GAE/L belirlemişlerdir. Siyah ve yeşil çay ekstraktları kullanılarak üretilen kombuchaların fermantasyon süresince toplam fenolik madde miktarının doğrusal şekilde artarak fermantasyonun son aşamasında en yüksek değere ulaştığı tespit edilmiştir (Chu ve Chen. 2006; Jayabalan ve ark. 2008; Srihari ve Satyanarayana 2012; Kallel ve ark. 2012; Bhattacharya ve ark. 2013; Jayabalan ve ark.

2014; Hoon ve ark. 2014; Sun ve ark. 2015). Örneğin, Velicanski ve ark. (2014) siyah çay kullanılarak üretilen kombuchaların 0. ve 7. günde toplam fenolik madde miktarlarını sırasıyla 468,6±11,5 mg GAE/L ve 574,6±10,2 mg GAE/L olarak belirlemişlerdir.

Kombuchaların kafein ve bazı bireysel fenolik bileşik miktarlarının belirlenmesi:

Beyaz, siyah ve yeşil çay kullanılarak üretilen kombuchaların fermantasyon sonrası bazı bireysel bileşik miktarlarına ait veriler Tablo 1 ve Şekil 5’de gösterilmiştir.

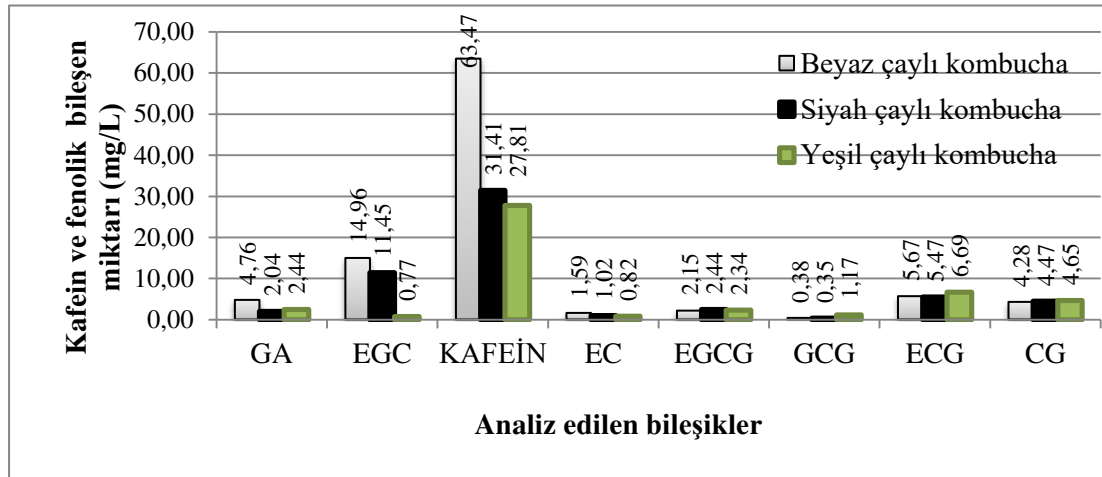
Tablo 1: Kombucha örneklerinin bazı bireysel bileşik miktarları

Table 1: Some individual compound matter quantities of kombucha samples

Örnekler	GA (mg/L)	EGC (mg/L)	Kafein (mg/L)	EC (mg/L)	EGCG (mg/L)	GCG (mg/L)	ECG (mg/L)	CG (mg/L)	Σkateşin (mg/L)
BK	4,76±1,06 ^a	14,96±2,09 ^a	63,47±4,64 ^a	1,59±0,06 ^a	2,15±0,01 ^a	0,38±0,03 ^b	5,67±0,05 ^b	4,28±0,00 ^c	29.03
SK	2,04±0,01 ^b	11,45±1,73 ^b	31,41±0,87 ^b	1,02±0,16 ^b	2,44±0,11 ^a	0,35±0,01 ^b	5,47±0,02 ^b	4,47±0,01 ^b	25.20
YK	2,44±0,39 ^b	0,77±0,09 ^b	27,81±3,56 ^b	0,82±0,23 ^b	2,34±0,31 ^a	1,17±0,13 ^a	6,69±0,27 ^a	4,65±0,10 ^a	16.44

Kombuchaların kafein ve bazı bireysel fenolik bileşik analizinde en yüksek miktarda tespit edilen bileşik kafein olmuştur. Yapılan çalışmada kombuchaların EGCG miktarları arasındaki farkın istatistiksel olarak önemsiz olduğu belirlenmiştir ($p>0,05$). Beyaz çay

kullanılarak üretilen kombuchaların gallik asit ($4,76\pm1,06$ mg/L), kafein ($63,47\pm4,64$ mg/L) ve epikateşin ($1,59\pm0,06$ mg/L) miktarları siyah ve yeşil çay kullanılarak üretilenlere göre daha yüksek bulunmuştur ve bu fark istatistiksel olarak önemlidir ($p<0,05$).



(Kısaltmalar: GA: gallik asit, EGC: epigallokateşin, EC: epikateşin, EGCG: epigallokateşin gallat, GCG: gallokteşin gallat, ECG: epikateşin gallat, CG: kateşin gallat)

Şekil 5. Farklı çaylarla üretilen kombucha örneklerinin 11. gün sonundaki bazı bireysel madde içerikleri

Figure 5. Individual phenolic matter contents of kombucha samples produced by using various teas at the end of 11th day

Yeşil çay kullanılarak üretilen kombuchaların EGC ($0,77 \pm 0,09$ mg/L) miktarları diğer kombuchalara göre istatistiksel olarak daha düşük miktarda saptanmıştır. Jayabalan ve ark. (2014), kombucha fermantasyonunda fenolik bileşiklerden EGCG ve ECG'nin sırasıyla EGC ve EC'ye indirgenliğini bildirmiştir. Aynı çalışmada yeşil çay kullanılarak üretilen kombuchaların siyah çaydan üretilen kombuchalara göre daha düşük miktarda EGC ve EC içerdikleri saptanmıştır. Lin ve ark. (1998) ise 15 adet Çin ve 13 adet Japon yeşil çayındaki EGC miktarını ortalama olarak sırasıyla $0,88 \pm 0,07$ mg/L ve $0,44 \pm 0,06$ mg/L bulmuştur. Jayabalan ve ark. (2014) ve Lin ve ark. (1998)'nin yaptığı çalışma Tablo 1'de bulunan sonuçlar ile benzerlik göstermektedir. Yeşil çayda en fazla bulunan polifenoller; EC, ECG, EGC ve EGCG iken (Jayabalan ve ark., 2007); yeşil çay kullanılarak üretilen kombucha örneklerimizde en fazla bulunan polifenoller ise ECG, CG, GA ve EGCG'dir (Tablo 1).

Chen ve Liu (2000), Chu ve Chen (2006), Jayabalan ve ark. (2008), fermantasyonun ilerlemesi ile birlikte kombucha örneklerinde kateşin miktarının arttığını tespit etmiştir. Blanc (1996) kateşin miktarı artışını, bakteri ve mayalar tarafından sentezlenen enzimlerin etkisi ve fermantasyon süresince asit artışına maruz kalan çaylardaki kompleks fenolik bileşiklerin degradasyonu ile ilişkilendirmiştir.

Kombuchada bulunan fenolik bileşiklerin içerik ve miktarına çay ekstrakt tipinin yanısıra asidik koşullarda hidrolizasyon, izomerizasyon ve polimerizasyon gibi reaksiyonlar da etki etmektedir (Kallel ve ark. 2012). Ayrıca çay bitkisinin türü, olgunlaşma durumu, yetiştiği ortamın coğrafi özellikleri, üretim yöntemleri gibi farklılıklar kateşinlerin biyosentezini etkilemektedir (Velicanski ve ark. 2014). Bundan dolayı beyaz çayların toplam kateşin miktarları 7,99-16,56 (g/100g) arasında değişirken (Hilal ve Engelhard 2007) siyah ve yeşil çayların toplam kateşin miktarları sırasıyla 14,96-23,21 ve 9,52-17,60 arasında değişkenlik göstermektedir (Karori ve ark. 2014). Çay çeşitlerindeki toplam kateşin miktarlarındaki

farklılıklar beyaz, siyah ve yeşil çayla üretilen kombuchalardaki farklı kateşin miktarlarını açıklar niteliktedir.

Çalışmamızda kombuchaların Folin-Ciocalteu yöntemiyle belirlenen toplam fenolik madde miktarları (Şekil 4), HPLC ile belirlenen bireysel fenolik madde miktarları toplamından (Tablo 1) fazladır. Bu farklılık; organik asitler, kalıntı şekerler, amino asitler, proteinler ve diğer hidrofilik bileşiklerin toplam fenolik madde miktarı belirlenmesinde kullanılan Folin-Ciocalteu ayırıcı ile reaksiyona girmesinden (Velicanski ve ark. 2014) ve 5-galloil kinik, 4-*p*-kumaroil kinik asitler gibi bileşiklerin HPLC ile analiz edilmemesinden kaynaklanmaktadır (Bhattacharya ve ark. 2013).

4. Sonuçlar

Literatürde genellikle siyah ve yeşil çay kullanılarak üretilen kombuchaların özelliklerinin araştırıldığı görülmektedir. Bu çalışma ile beyaz, siyah ve yeşil çay kullanılarak üretilen kombuchaların çeşitli özelliklerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Geleneksel kombucha üretiminde standart üretim için fermantasyon koşullarının optimize edilmesi gerekmektedir. Kombucha üretiminde fermantasyon süresinin belirlenmesinde pH ile toplam asitliğin birlikte değerlendirilmesi gerektiği önerilmektedir. Ayrıca fermantasyonun sonlandırılmasında duyu analizlerin de kullanılması gerektiği düşünülmektedir. Üretimin optimize edilmesinde de farklı çay ve karbonhidrat (sakkaroz vb.) konsantrasyonlarının yanı sıra fermantasyon koşullarının (süre, sıcaklık, vb.) kombuchaların özellikleri üzerine etkisi araştırılmalıdır. Avrupa Birliği ülkeleri içinde çay üreten tek ülkenin Türkiye olması ve değişen çay tüketim alışkanlıklarına alternatif olabilecek bir ürün olan kombuchanın özelliklerinin araştırılması açısından önemli olup çalışmanın kombuchanın tanınırlığına katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Kaynaklar

Aktan N ve Kalkan H (1998). Sirke Teknolojisi. Ege Üniversitesi Basımevi, İzmir.

- AOAC (2005). Official Methods of Analysis. Edited W. Horwitz (18th ed.). Association of Official Analytical Chemists, Gaithersburg, USA.
- Battikh H, Chaieb K, Bakhrouf A and Ammar E (2013). Antibacterial and antifungal activities of black and green kombucha teas. *Journal of Food Biochemistry*, 37: 231–236.
- Bhattacharya S, Gachhui R and Sil PC (2013). Effect of kombucha, a fermented black tea in attenuating oxidative stress mediated tissue damage in alloxan-induced diabetic rats. *Food Chem Toxicol*, 60: 328–340.
- Blanc PJ (1996). Characterization of The Tea Fungus Metabolites. *Biotechnology Letters*, 18: 139–142.
- Bauer-Petrovska B and Petrushevska-Tozi L (2000). Mineral and water soluble vitamin content in the Kombucha drink. *International Journal of Food Science and Technology*, 35: 201–205.
- Chakravorty S, Bhattacharya S, Chatzinotas A, Chakraborty W, Bhattacharya D and Gachhui R (2016). Kombucha tea fermentation: Microbial and biochemical dynamics. *International Journal of Food Microbiology*, 220: 63–72.
- Chen C and Liu BY (2000). Changes in Major Components of Tea Fungus Metabolites During Prolonged Fermentation. *J Appl. Microbiol*, 89(5): 834–9.
- Chu SC and Chen C (2006). Effects of origins and fermentation time on the antioxidant activities of kombucha. *Food Chemistry*, 98: 502–507.
- Dufresne C and Farnworth E (2000). Tea, Kombucha, and health: a review. *Food Research International*, 33: 409–421.
- El-Taher EM (2011). Kombucha: A new microbial phenomenon and industrial benefits. *African J. Biol. Sci.* 7(2): 41–60.
- Essawet NA, Cvetkovic D, Velicanski A, Canadanovic-Brunet J, Vulic J, Maksimovic V and Markov S (2015). Polyphenols and antioxidant activities of Kombucha beverage enriched with Coffeaberry extract. *Chem. Ind. Chem. Eng. Q.*, 21 (3): 399–409.
- Goh WN, Rosma A, Kaur B, Fazilah A, Karim AA and Rajeev B (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.
- Greenwalt CJ, Ledford RA and Steinkraus KH (1998). Determination and characterization of the antimicrobial activity of the fermented tea Kombucha. *LWT Food Sci Technol*, 31: 291–296.
- Hilal Y and Engelhardt U (2007). Characterisation of white tea – Comparison to green and black tea. *Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit*, 2: 414–421.
- Hoon LY, Choo C, Watawana MI, Jayawardena N and Waisundara NY (2014). Kombucha ‘tea fungus’ enhances the tea polyphenol contents, antioxidant activity and alpha-amylase inhibitory activity of five commonly consumed teas. *Journal of Functional Foods*, 1: 1–9.
- Jayabalan R, Marimuthu S and Swaminathan K (2007). Changes in content of organic acids and tea polyphenols during kombucha tea fermentation. *Food Chemistry*, 102: 392–398.
- Jayabalan R, Subathradevi P, Marimuthu S, Satishkumar M and Swaminathan K (2008). Changes in Free-Radical Scavenging Ability of Kombucha Tea during Fermentation. *Food Chemistry*, 109: 227–234.
- Jayabalan R, Chen PN, Hsieh YS, Prabhakaran K, Pitchai P, Marimuthu S, Thangaraj P, Swaminathan K and Yun SE (2011). Effect of solvent fractions of kombucha tea on viability and invasiveness of cancer cells- Characterization of dimethyl 2-(2-hydroxy-2-methoxypropylidene) malonate and vitexin. *Indian Journal of Biotechnology*, 10: 75–82.
- Jayabalan R, Malbasa RV, Loncar ES, Vitas JS and Sathishkumar M (2014). A Review on Kombucha Tea-Microbiology Composition, Fermentation, Beneficial Effects, Toxicity, and Tea Fungus. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13: 538–550.
- Jayasundara JW, Phutela RP and Kocher GS (2008). Preparation of an Alcoholic Beverage from Tea Leaves. *J. Inst. Brew*, 114(2): 111–113.
- Kaczmarczyk D and Lochyński S (2014). Products of biotransformation of tea infusion – properties and application. *Pol. J. Natur. Sc.*, 29(4): 381–392.
- Kallel L, Desseaux V, Hamdi M, Stocker P and Ajandouz E (2012). Insights into the fermentation biochemistry of kombucha teas and potential impacts of kombucha drinking on starch digestion. *Food Res. Int.*, 49: 226–232.
- Karori SM, Wachira FN, Ngure RM and Mireji PO (2014). Polyphenolic composition and antioxidant activity of Kenyan Tea cultivars. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 3(4): 105–116.
- Kaur A, Kaur M, Kaur P, Kaur H, Kaur S and Kaur K (2015). Estimation and comparison of total phenolic and total antioxidants in green tea and black tea. *Global Journal of Bio-science and Biotechnology*, 4(1): 116–120.
- Khokhar S and Magnusdottir SGM (2002). Total phenol, catechin and caffeine contents of teas commonly consumed in the United Kingdom. *J. Agric. Food Chem.*, 50: 565–570.
- Liang YR, Lu JL and Zhang LY (2002). Comparative Study Of Cream In Infusions Of Black Tea And Green Tea [Camellia Sinensis (L.) O. Kuntze]. *J Food Sci Technol.*, 37: 627–634.
- Lin JK, Lin CL, Liang YC, Lin-Shiau SY and Juan IM (1998). Survey of catechins, gallic acid and methylxanthines in green, oolong, pu-erh and black teas. *J. Agric. Food Chem.*, 46: 3635–3642.
- Loncar ES, Malbasa RV and Kolarov LA (2001). Metabolic activity of tea fungus on molasses as a source of carbon. *Acta Periodica Technologica*, 32: 21–26.
- Loncar E, Djuric M, Malbasa R, Kolarov LJ and Klasnja M (2006). Influence of Working Conditions upon Kombucha Conducted Fermentation of Black Tea. *Food Bioprod Process*, 84: 186–192.
- Maghsoudi H and Mohammadi HB (2009). The effect of kombucha on post-operative intra-abdominal adhesion formation in rats. *Indian J Surg.*, 71: 73–77.

- Malbasa R, Loncar E and Djuric M (2008). Comparison of the products of Kombucha fermentation on sucrose and molasses. *Food Chem.*, 106: 1039–1045.
- Malbasa RV, Loncar ES, Vitas JS and Canadanovic-Brunet JM (2011). Influence of starter cultures on the antioxidant activity of kombucha beverage. *Food Chemistry*, 127: 1727–1731.
- Mayser P, Fromme S, Leitzmann C and Grunder K (1995). The yeast spectrum of “tea fungus Kombucha”. *Mycodes*, 38: 289–95.
- Ribereau-Gayon P, Dubourdieu D, Doneche B and Lonvaud A (2006). *The Microbiology of Wine and Vinifications*. Wiley, 495, France.
- Ough CS and Amerine MA (1988). *Methods Analysis of Musts and Wines*. Wiley, 400.
- Perati PP, De Borba BM and Rohrer JS (2011). Rapid Separation of Catechins in Tea Using Core-Shell Columns. Thermo Fisher Scientific, Sunnyvale, CA, USA.
- Pereira VP, Knor FJ, Velloso JCR and Beltrame FL (2014). Determination of phenolic compounds and antioxidant activity of green, black and white teas of *Camellia sinensis* (L.) Kuntze, Theaceae. *Revista Brasileira de Plantas Medicinai*s, 16(3): 490-498.
- Ribereau-Gayon P, Dubourdieu D, Doneche B and Lonvaud A (2006). *The Microbiology of Wine and Vinifications*. Wiley, 495, France.
- Shenoy KC (2000). Hypoglycemic activity of bio-tea in mice. *Indian Journal of Experimental Biology*, 38: 278–279.
- Singleton VL, Orthofer R and Lamuela-Raventos RM (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteure agent. *Methods in Enzymology*, 299:152-178.
- Srihari T and Satyanarayana U (2012). Changes in Free Radical Scavenging Activity of Kombucha during Fermentation. *J. Pharm. Sci. and Res.*, 4(11): 1978 – 1981.
- Sun TY, Li JS and Chen C (2015). Effects of blending wheat grass juice on enhancing phenolic compounds and antioxidant activities of traditional kombucha beverage. *Journal of food and drug analysis*, 23(4): 709:718.
- Sreeramulu G, Zhu Y and Knol W (2000). Kombucha Fermentation and It'sAntimicrobial Activity. *J Agric Food Chem*, 48: 2589-2594.
- Teoh AL, Heard G and Cox J (2004). Yeast ecology of Kombucha fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 95: 119-126.
- Velicanski AS, Cvetkovic DD, Markov SL, Saponjac VTS and Vulic JJ (2014). Lemon Balm Kombucha Antioxidant Activity. *Food Technol. Biotechnol.*, 52(4): 420–429.
- Wang Y, Ji B, Wu W, Wang R, Yang Z, Zhang D and Tian W (2013). Hepatoprotective effects of Kombucha tea: identification of functional strains and quantification of functional components. *J Sci Food Agric*, 94: 265-272.
- Watawana MI, Jayawardena N, Gunawardhana CB and Waisundara VY (2015). Health, Wellness, and Safety Aspects of the Consumption of Kombucha. *Journal of Chemistry*, 2015: 1-11.
- Yang ZW, Ji BP, Zhou F, Li B, Luo Y, Yang L and Li T (2009). Hypocholesterolaemic and antioxidant effects of kombucha tea in high-cholesterol fed mice. *J Sci Food Agric*,89: 150–156.