

AKÜ FEMÜBİD 21 (2021) 021001 (236-249)

AKU J. Sci. Eng. 21 (2021) 021001 (236-249)

DOI: 10.35414/akufemubid.867841

Araştırma Makalesi / Research Article

## *Origanum bilgeri*'nin Kombu Çayının Biyoaktivitesi ve Mikrobiyolojik Profili Üzerindeki Etkilerinin İncelenmesi

Eda DELİK<sup>1</sup>, Berfin EROĞLU<sup>1</sup>, Orhan ÜNAL<sup>1</sup>, Burcu Emine TEFON ÖZTÜRK<sup>1\*</sup><sup>1</sup>Akdeniz Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, AntalyaSorumlu yazar e-posta: burcutefon@akdeniz.edu.tr ORCID ID: <http://orcid.org/0000-0003-1690-9879>edadelk@gmail.com ORCID ID: <http://orcid.org/0000-0002-9047-2874>brfnberfin12@gmail.com ORCID ID: <http://orcid.org/0000-0002-9099-7603>ounal@akdeniz.edu.tr ORCID ID: <http://orcid.org/0000-0001-9633-5726>

Geliş Tarihi: 25.01.2021

Kabul Tarihi: 08.04.2021

### Öz

Kombu çayı, insan sağlığı üzerindeki olumlu etkileri nedeniyle dünya çapında sıklıkla tercih edilen geleneksel fermente bir içecektir. Kombu çayı fermentasyonunda genellikle siyah çay kullanılıyor olsa da günümüzde farklı bitkisel materyaller eklenerek bu fermente ürünün antioksidan özelliklerinin artırılması amaçlanmaktadır. Bu çalışmada, Antalya iline endemik ve tıbbi öneme sahip *Origanum bilgeri* P.H. Davis (Tüylü mercan) ile fermente edilen kombu çayının 0., 7. ve 14. fermentasyon günlerindeki mikrobiyal profili, antibakteriyel etkisi, serbest radikal yakalama kapasitesi, toplam flavonoid ve fenolik madde miktarları incelenmiş ayrıca duyu analizi yapılarak geleneksel kombu çayı ile karşılaştırılmıştır. Sonuç olarak, *O. bilgeri* katkılı kombu çayının antioksidan aktivitesinin geleneksel kombu çayı ile yakın sonuç gösterdiği, toplam flavonoid ve fenolik madde miktarının ise geleneksel kombu çayından daha yüksek olduğu bulunmuştur. Ayrıca fermentasyonun 7. ve 14. gününde *O. bilgeri* katkılı kombu çayının, geleneksel kombu çayının etkili olamadığı bakteri suşlarına karşı antibakteriyel etkiye sahip olduğu ve duyu analizlerdeki genel değerlendirmelere göre daha hoş karşılandığı görülmüştür.

### Anahtar kelimeler

Kombu çayı; *Origanum bilgeri*; Antibakteriyel aktivite; Antioksidan aktivite; Toplam flavonoid madde; Toplam fenolik madde

## Investigation Effect of *Origanum bilgeri* on the Bioactivity and Microbiological Profile of Kombucha Tea

### Abstract

Kombucha is a traditional fermented beverage that is preferred world-wide due to its positive effects on human health. Although black tea is generally used in the fermentation of kombucha, nowadays it is aimed to increase beneficial the health effects of the product by fermenting it with different herbal materials. *Origanum bilgeri*, is endemic to Antalya and used generally in traditional medicine. In this study, traditional kombucha fermented with *Origanum bilgeri*, and the microbial profile, antimicrobial effect, free radical scavenging ability, total flavonoid content, total phenolic content, and sensory analysis of the analogue drink was investigated and compared with traditional kombucha on fermentation days 0, 7 and 14. As a result, it was found that the antioxidant activity of *O. bilgeri* added kombucha was similar to traditional kombucha, and the total amount of flavonoid and phenolic content was higher than that of traditional kombucha. In addition, on the 7<sup>th</sup> and 14<sup>th</sup> days of fermentation, *O. bilgeri* added kombucha had an antibacterial effect against bacterial strains that traditional kombucha tea could not be effective on and was more welcomed in the sensory analysis.

### Keywords

Kombucha; *Origanum bilgeri*; Antibacterial Activity; Antioxidant Activity; Total Flavonoid Content; Total Phenolic Content

## 1. Giriş

Kombu çayı özellikle probiyotik içeceklere olan ilginin son yıllarda artmasıyla birlikte, geçmiş birkaç bin yıla dayanıyor olsa da yakın zamanlarda oldukça ilgi odağı olan, sağlık için yararlı fermente bir içecektir. Doğu Asya kökenli olan bu içecek şekerli siyah çayın (*Camellia sinensis*) asetik asit bakterileri ve çeşitli maya türlerinden (*Saccharomyces*, *Saccharomycodes*, *Schizosaccharomyces*, *Zygosaccharomyces*, *Candida*, *Torulospira*, *Koleckera*, *Pichia*) oluşan simbiyotik kültür fermentasyonu ile üretilmektedir (Battikh *et al.* 2012, Jayabalan *et al.* 2014). Son ürün hafif tatlı ve asidik bir içecektir. Mikroorganizmaların oluşturduğu bu simbiyotik birliğin metabolik aktivitesi sonucu insan sağlığı açısından önem teşkil eden çeşitli laktik asit, asetik asit, glukuronik asit, glukonik asit, vitaminler, amino asitler, antibiyotikler ve çeşitli mikro besinlerin üretimi gerçekleştirilmektedir (Vijayaraghavan *et al.* 2000).

Kombu çayının içeriğindeki mikroorganizmalar içeceğin katı ve sıvı olarak iki kısımdan oluşmasını sağlayan sıvı-hava ara yüzeyinde selülozik bir biyofilm tabakası oluşturur (bakteri ve maya simbiyotik kültürü, SCOBY) (Chu and Chen 2006, Chakravorty *et al.* 2016). Fermentasyon, önceki kültürden alınan selülozik biyofilm zarının ve sıvı kısmındaki mikroorganizmaların hazırlanan yeni şekerli siyah çaya aşılmasıyla başlatılır. Bu yeni kültür ortamı genellikle aerobik koşullarda 7 ile 14 gün arasında fermente edilir. Besiyeri içeriğindeki ana karbon kaynağı olan sakkaroz mikroorganizmalar tarafından fermentasyon sırasında glikoz ve fruktoza dönüştürülür. Ayrıca fermentasyon sonunda oluşan ürün, organik asitleri, etanolü, vitaminleri, mineralleri (Sievers *et al.* 1995, Blanc 1996), ketonları, esterleri, amino asitleri ve çayda bulunan kateşinleri, flavinleri, flavonollerini içerir (Greenwalt *et al.* 2000, Teoh *et al.* 2004).

Fermentasyonda genel olarak kullanılan substrat siyah çay olmasına rağmen yeşil çay ve oolong çaylarının kullanımı da yaygınlık kazanmıştır (Güldane vd. 2017). Kombu çayının farklı bitkiler ile fermente edilmesi sonucunda içinde bulunan

bakteri ve maya popülasyonu bitkiden bitkiye değişkenlik göstermektedir (Akarca ve Tomar 2018, Değirmencioğlu vd. 2019). Ayrıca bu içeceğin antimikrobiyal ve antioksidan özelliklerinin artırılabilmesi amacıyla içeceğin çeşitli aromatik bitkilerle fermentasyonu da yaygınlık kazanmıştır (Ayed and Hamdi 2015, Ulusoy and Tamer 2019, Vitas *et al.* 2019).

*Origanum* türleri antimikrobiyal, antibakteriyel, antiviral ve antifungal etkileri, balgam söktürücü, gaz giderici gibi birçok sağlığa yararlı özellikleri nedeniyle tedavi amaçlı olarak geleneksel tıpta yaygın olarak kullanılmaktadır (Marrelli *et al.* 2018). Aynı zamanda gıda ve sağlık alanında da çeşitli amaçlarla kullanılan yüksek değerli tıbbi aromatik bitkilerdendir (Tanhaş *et al.* 2020). Bu cinse ait birçok tür bulunmakla beraber bu çalışmada kullanılan *Origanum bilgeri* P.H. Davis (Tüylü mercan) Antalya iline bağlı endemik bir türdür ve yetiştiği bölgelerde bitki çayı olarak yaygın şekilde tüketilmektedir (Ünal ve Gökçeoğlu 2005, Cosge *et al.* 2009). Bu türün karvakrol içeriği oldukça yüksektir ve genel olarak kekik türlerinde yaygın olarak bulunan bu bileşik, bitkinin güçlü antiviral, antibakteriyel, antifungal ve antioksidan etkili olmasını sağlamaktadır (Basaran 2005, Leyva-López *et al.* 2017). *O. bilgeri*'nin kombu çayı fermentasyonunda kullanımı hakkında bilimsel bir çalışmaya rastlanmamıştır.

İnsan sağlığı açısından pozitif etkileri ve kombu çayı fermentasyonunda daha önce kullanılmamış olması nedeniyle çalışma için *O. bilgeri* materyal olarak seçilmiştir. Bu çalışmada, geleneksel kombu çayının *O. bilgeri* ile fermentasyonu ile oluşan içeceğin antibakteriyel etkisi, antioksidan aktivitesi, toplam fenolik madde miktarı, toplam flavonoid madde miktarı, mikrobiyolojik profili ve duyu özellikleri incelenerek geleneksel kombu çayıyla karşılaştırılmıştır.

## 2. Materyal ve Metot

### 2.1 *O. bilgeri'nin Toplanması*

*O. bilgeri'nin* yayılış gösterdiği alanlar literatürlerde incelenmiş (Davis 1982, Davis *et al.* 1988, Duman 2000, Ünal ve Gökçeoğlu 2005) ve laboratuvar çalışmaları için gerekli olan örnekler çiçeklenme döneminde C4 Antalya Gündoğmuş, Geyik Dağı yolu üzeri, Vadi içi 1500 m' den toplanmıştır. Toplanan *O. bilgeri* bitki örnekleri laboratuvarda gölgede, oda sıcaklığında kurutulup, +4 °C'de saklanmıştır.

### 2.2 Kombu Çayı Fermentasyonu

Deneyler sırasında hazırlanan örnekler ve içerikleri aşağıda verilmiştir:

- 1- Geleneksel kombu çayı (K): Şekerli siyah çay + kombu çayı biyoselülozik katmanı ve kombu çayının sıvı kısmı,
- 2- *O. bilgeri* katkılı kombu çayı (KO): Şekerli siyah çay ve *O. bilgeri* çay ekstrektü karışımı + kombu çayı biyoselülozik katmanı ve kombu çayının sıvı kısmı,
- 3- Fermente *O. bilgeri* (FO): Şekerli *O. bilgeri* ekstrektü çay + kombu çayı biyoselülozik katmanı ve kombu çayının sıvı kısmı,
- 4- Siyah çay (S): Şekerli Siyah çay,
- 5- *O. bilgeri* ekstrektü (O): Şekerli *O. bilgeri* ekstrektü.

Deneyde lokal izolat (Muratpaşa, Antalya, TÜRKİYE) kombu çayı kullanılmıştır.

Fermentasyon için Marsh vd. (2014) makalesinde belirtilen yöntemler referans alınarak besiyerleri hazırlanmıştır. Buna göre 1 L su 90 g şeker ile kaynatılmıştır. Kaynayan suya hazırlanacak örneğe göre; 5 g siyah çay (Lipton, Türkiye) veya 5 g *O. bilgeri* (Antalya, Türkiye) eklenmiş ve 3 dakika demlenmiştir. Ardından hazırlanan besiyeri oda sıcaklığında soğutulmuş ve süzümüştür. KO örneği için besiyeri hazırlanırken 90 g şeker ile kaynatılmış 1 L su içerisine hem siyah çaydan hem de *O. bilgeri'nin* den 5' er g eklenmiş ve aynı prosedür uygulanarak besiyeri hazırlanmıştır.

Kültürler hazırlanırken her bir cam şişeye %2 (w/v) yerel izolat kombu çayı biyoselülozik katmanı ve %10 (v/v) yerel izolat kombu çayının sıvı kısmından eklenerek fermentasyonlar oda sıcaklığında başlatılmıştır ve hazırlanan örnekler gölgede muhafaza edilmiştir. Örnekler hazırlandıktan sonraki 0., 7. ve 14. günlerde kombu çayı örneklerinin pH' ı, antibakteriyel ve antioksidan aktiviteleri, toplam fenolik ve flavonoid madde miktarlarıyla, mikrobiyolojik profilleri analiz edilmiştir.

### 2.3 Mikrobiyolojik Profil Analizi

Geleneksel kombu çayı (K) ve *O. bilgeri* katkılı kombu çayı (KO) örneklerinin 0., 7. ve 14. günlerdeki mikrobiyolojik profil analizleri yapılmıştır. Deneyler sırasında asetik asit bakterilerinin belirlenmesi için Glucose Yeast Extract (GYC) (Abd El-Salam 2012), total mezofilik bakterilerinin belirlenmesi için Plate Count Agar (PCA) (Merck, Almanya) (Coton *et al.* 2017), mayaların belirlenmesi için Yeast Extract Glucose Chloramphenicol (YGC) Agar (Merck, Almanya) (Coton *et al.* 2017) ve *Lactobacillus'* ların belirlenmesi için De Man Rogosa Sharp Agar (MRS) (Merck, Almanya) (Coton *et al.* 2017) kullanılmıştır. Belirlenen günlerde toplanan kombu çayı örneklerinin 0.85' lik NaCl solüsyonu (Sigma Aldrich, ABD) içerisinde seri dilüsyonları hazırlanarak seçici besiyerlerine ekimler yapılmış ve 5 gün inkübe edilmiştir. Ardından oluşan koloniler sayılmış ve koloni oluşturan birimler (kob/mL) Eşitlik 1'e göre hesaplanmıştır:

$$N = \frac{c}{[V \times (n_1 + (0.1 \times n_2))]} \times d \quad (1)$$

Bu eşitlikte, C; petri kaplarında sayılan toplam koloni sayısını, V; sayılan petri kaplarına aktarılan çözelti hacmini (mL),  $n_1$ ; yüksek konsantrasyonda ekim yapılan toplam petri sayısını,  $n_2$ ; düşük konsantrasyonda ekim yapılan toplam petri sayısını, d; ardışık 2 seyreltiden daha konsantre olanın seyreltme oranını, N; 1 mL' deki toplam mikroorganizma sayısını göstermektedir (Halkman 2000).

### 2.4 pH Ölçümleri

Örneklerin 0., 7. ve 14. günlerdeki pH değerleri dijital pH metre (Isolab, Almanya) ile ölçülmüştür.

## **2.5 Antibakteriyel Aktivitenin Belirlenmesi ve Kullanılan Bakteriyel Suşlar**

Kombu çayı örneklerinin antibakteriyel aktiviteleri disk difüzyon yöntemi ile belirlenmiştir (Bauer 1966). Deneyle sırasında *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883), *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213), *Bacillus cereus* (DSM 22648), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228), *Escherichia coli* (ATCC 35218) suşları kullanılmıştır.

Bakteriler 0.85' lik NaCl solüsyonu (Merck, Almanya) içerisinde 0.5 McFarland' a ayarlanmış ve Nutrien Agar (NA) (Merck, Almanya) besiyerine yayılmıştır. Steril edilmiş kombu çayı örneklerinden boş antibiyotik disklerine (Bioanalyse, Türkiye) 80 µL emdirildikten sonra hazırlanan diskler bakteri yayılmış NA üzerine yerleştirilmiştir. Deneylede pozitif kontrol olarak 20 µL'de 30 µg/mL olacak şekilde amfisilin (Sigma Aldrich, ABD) ve kanamisin (Cayman Chemical, ABD) emdirilmiş antibiyotik diskleri, negatif kontrol olarak boş antibiyotik diskleri kullanılmıştır. Petri kapları 24 saat 37 °C' de inkübe edildikten sonra zon çapları ölçülerek kaydedilmiştir. Deneyle 4 kere tekrar edilmiştir.

## **2.6 Serbest Radikal Yakalama Kapasitesi**

### **2.6.1 DPPH Radikal Yakalama Deneyle**

Kombu çayı örneklerinin serbest radikal yakalama kapasitelerinin belirlenmesi için 2.2.- Difenil-1-pikrihidrazil (DPPH) yöntemi kullanılmıştır (Von Gadow *et al.* 1997). Buna göre kombu çayı kültürlerinden alınan örneklerin sıvı kısımları 0., 7. ve 14. günlerde toplanmış ve 3200 rpm' de santrifüj edilmiştir (Kubota, Japonya). Ardından 0.45 µm por çaplı steril filtrelerden (GVS, ABD) geçirilerek steril edilen 100 µL kombu çayı örneklerinin üzerine 4 mL DPPH' nin metanol çözeltisi (Sigma Aldrich, ABD) eklenerek yarım saat oda sıcaklığında ve karanlık ortamda bekletilmiştir. Örneklerin absorbans değerleri 516 nm' de spektrofotometrede (Optical Instruments, Çin) ölçülmüştür ve ölçülen örneklerin serbest radikal yakalama kapasiteleri aşağıdaki denklem kullanılarak hesaplanmıştır (%) (Hrnjez *et al.* 2014).

$$[ (A(\text{kontrol}) - A(\text{örnek})) / A(\text{kontrol}) ] \times 100$$

A (kontrol) = numunesiz körün absorbansdır

A (örnek) = numunelerin varlığındaki absorbanstır.

### **2.6.2 ABTS Radikal Yakalama Deneyle**

Tu vd. (2019) çalışmaları referans alınarak örneklerin ABTS radikal yakalama deneyle yapılmıştır. 7 mM ABTS (Sigma Aldrich, ABD) ve 2,45 mM potasyum persülfat (K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>) (Sigma Aldrich, ABD) distile su içerisinde hazırlanarak eşit miktarlarda karıştırılmıştır (Thaipong *et al.* 2006, Tanticharakunsiri *et al.* 2020). Hazırlanan karışım karanlıkta oda sıcaklığında 16 saat inkübe edildikten sonra oluşturulan ABTS<sup>+</sup> stok çözeltisi, 734 nm'de 0.70 (± 0.02) absorbans verecek şekilde etanol ile seyreltilmiştir. 600 µL örnek üzerine ABTS<sup>+</sup> stok çözeltisinden 2400 µL eklenerek total hacim 3 mL' ye ayarlanmıştır ve örnekler oda sıcaklığında 6 dk. bekletilmiştir. Ardından 734 nm' de örneklerin absorbans değeri ölçülerek radikal yakalama kapasitesi (%) değerleri aşağıdaki denklem kullanılarak hesaplanmıştır. Ölçümler 3 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir.

$$[ (A(\text{kontrol}) - A(\text{örnek})) / A(\text{kontrol}) ] \times 100$$

A (kontrol) = numunesiz körün absorbansdır

A (örnek) = numunelerin varlığındaki absorbanstır.

### **2.7 Toplam Fenolik Madde Miktarı**

Folin-Ciocalteu (FC) reaktifine dayalı kolorimetrik yöntem örneklerin toplam fenolik madde miktarının hesaplanmasında kullanılmıştır (Skerget *et al.* 2005). FC reaktifi Singleton ve Rossi (1965) makalesindeki protokole göre hazırlanmıştır. Santrifüjlenmiş ve filtrelenmiş 500 µL kombu çayı örnekleri üzerine 2.5 mL 1:10 seyreltilmiş FC reaktifi eklenmiş ve 2 dk. bekletilmiştir. Ardından örnekler üzerine 2 mL %7.5 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (Merck, Almanya) eklenmiş, örnekler 30 sn. vortekslenerek 50 °C' de 5 dk. bekletilmiştir. Hazırlanan örneklerin absorbans değerleri 760 nm'de ölçülmüş ve gallik asit eşdeğerleri (µg/mL GAE) hesaplanmıştır.

### **2.8 Toplam Flavonoid Madde Miktarı**

Örneklerin toplam flavonoid madde miktarının belirlenmesinde alüminyum klorür kolorimetrik yöntemi kullanılmıştır (Dwiputri and Feroniasanti 2019). 500 µL santrifüjlenmiş ve filtrelenmiş kombu

çayı örnekleri sırasıyla 1.5 mL metanol (Isolab, Almanya), 100 µL %10' luk AlCl<sub>3</sub> (Merck, Almanya), 100 µL 1 M' lık potasyum asetat (Merck, Almanya), 2.8 mL distile su ile karıştırılmış ve 25 °C'de 30 dk. inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından örneklerin absorbans değerleri 415 nm' de ölçülmüş ve kuersetin eşdeğerleri (µg KE/mL) hesaplanmıştır.

## 2.9 Duyusal Analiz

Örneklerin duyusal değerlendirmesi için Akdeniz Üniversitesi kampüsünden 19 - 40 yaş arası 20 kişi seçilmiştir. Duyusal analizler kör olarak test edildiğinden, katılımcılar içeceklerin içeriği hakkında bilgilendirilmemiştir. Altuğ (1993) belirtmiş olduğu tekniklere göre analiz yapılmış ve içecekler seçilen kişiler tarafından 1 (çok kötü) ile 5 (çok iyi) arasında derecelendirilmiştir. Katılımcılar içecekleri tat, koku, asitlik ve görüntü özellikleri açısından değerlendirmiştir.

## 2.10 İstatiksel Analiz

Verilerin istatistiksel analizi IBM SPSS 22 ile yapılmış ve verilerin karşılaştırmasında Tek Yönlü Varyans Analizi kullanılmıştır.  $p < 0.05$  değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

## 3. Bulgular ve Tartışma

### 3.1 Mikrobiyolojik Profil Analizi

Geleneksel kombu çayı ve *O. bilgeri* katkılı kombu çayı kültürlerinin 0., 7. ve 14. günlerine ait toplam aerobik mezofilik bakteri, asetik asit bakterisi, maya ve *Lactobacillus* sayım sonuçları Çizelge 1' de gösterilmiştir. Buna göre, fermentasyondan önce tüm örneklerde toplam

aerobik mezofilik bakteri, asetik asit bakterisi, maya ve *Lactobacillus* sayısı  $1.7 \times 10^3$  ile  $3 \times 10^3$  kob/mL arasında belirlenmiştir. Fermentasyonun 7. gününde *O. bilgeri* katkılı kombu çayının geleneksel kombu çayından daha yüksek bakteri ve maya yoğunluğuna sahip olduğu görülmüştür, ancak içecekteki bu mikroorganizma popülasyonu fermentasyonun 14. gününde azalmıştır. Geleneksel kombu çayındaki mikroorganizma sayısı ise 14. günde artmaya devam etmiş ve deney süresindeki en yüksek seviyeye ulaşmıştır.

Zhao vd. (2018) çalışmalarında toplam bakteri sayısının 5. güne kadar, mayalarınsa 7. güne kadar arttığını ve bu günlerden sonra mikroorganizma sayılarında azalmalar meydana geldiğini belirtmiştir. Ancak bu çalışmada benzer sonuçlar *O. bilgeri* katkılı kombu çayı için gözlemlenirken geleneksel kombu çayı için benzer sonuçlar elde edilememiştir. Coton vd. (2017), hem yeşil çay hem de siyah çayla fermente edilmiş kombu çayı örnekleriyle gerçekleştirdikleri 8 günlük fermentasyonda toplam aerobik bakteri, laktik asit bakterisi, maya ve asetik asit bakterisi konsantrasyonunun zamanla arttığını göstermiştir. Ayrıca siyah çay örneğindeki bakteri sayısının yeşil çaydaki bakteri sayısından daha yüksek olduğunu belirtmiştir. Cardoso vd. (2020) 10 günlük kombu çayı fermentasyonunun ardından asetik asit bakterilerinin, laktik asit bakterilerinin, mezofilik bakterilerin ve maya sayılarının  $10^5$ - $10^6$  kob/mL olduğunu belirtmiştir. Aynı zamanda kombu çayı mikrobiyal yükündeki bu artışın, kültürlerinin hazırlanmasında kullanılan şekerin ve SCOBY' nin miktarına bağlı olabileceğini vurgulamışlardır.

**Çizelge 1.** *O. bilgeri* aromalı kombu çayı ve geleneksel kombu çayı kültürlerinin 0., 7. ve 14. günlerine ait mikroorganizma sayısı.

Örnekler	0. Gün		7. Gün		14. Gün
	K	K	KO	K	KO
AAB	$2.3 \pm 0.4 \times 10^3$	$5.4 \pm 0.3 \times 10^6$	$1.4 \pm 0 \times 10^7$	$1.3 \pm 0.1 \times 10^7$	$9.4 \pm 0.3 \times 10^5$
TMB	$3 \pm 0.1 \times 10^3$	$7.4 \pm 0.1 \times 10^6$	$2.9 \pm 0 \times 10^7$	$1.1 \pm 0.6 \times 10^7$	$1.7 \pm 0.1 \times 10^6$
Maya	$1.7 \pm 0.1 \times 10^3$	$6.3 \pm 0 \times 10^6$	$1.4 \pm 0.1 \times 10^7$	$3.6 \pm 0.1 \times 10^7$	$1.6 \pm 0.2 \times 10^5$
<i>Lactobacillus</i>	$3 \pm 0.1 \times 10^3$	$9.7 \pm 0.2 \times 10^6$	$1.6 \pm 0 \times 10^8$	$1.2 \pm 0 \times 10^7$	$4.4 \pm 0.1 \times 10^6$

(AAB: Asetik asit bakterisi, TMB: Toplam aerobik mezofilik bakteri, K: Geleneksel kombu çayı, KO: *O. bilgeri* katkılı kombu çayı)

### 3.2 pH Ölçümleri

Fermentasyon süresine bağlı olarak kültürlerin pH değişimleri Çizelge 2' de belirtilmiştir.

metabolik aktivitelerinin bir sonucu olarak pH değerinde azalma meydana geldiği belirtilmiştir. (Sreeramulu *et al.* 2000, Nguyen *et al.* 2015). Ek

**Çizelge 2.** Çay kültürlerinin 0.,7. ve 14. günlere ait pH değerleri

Örnekler	Günler		
	0. Gün	7. Gün	14. Gün
K	3.6±0	3.4±0	2.9±0.1
KO	3.9±0	3.6±0	3.4±0
FO	3.8±0	3.4±0	3.1±0
S	6.3±2.1	5.1±0	4.9±0.1
O	5.8±0	5.7±0.1	5.6±0.1

(K: Geleneksel kombu çayı, KO: *O. bilgeri* katkılı kombu çayı, FO: Fermente *O. bilgeri*, S: Siyah çay, O: *O. bilgeri* çayı)

Buna göre, fermente ürünlerin başlangıç pH' ları fermente olmayan ürünlere göre daha düşüktür ve fermentasyonla birlikte ürünlerin pH' ında azalma görülmüştür. 14. günün sonunda en düşük pH (pH=2.9) geleneksel kombu çayında belirlenmiştir. Ortamdaki şekerin organik aside dönüşmesi nedeniyle fermentasyon sırasında örneklerin pH' ında düşüş olması beklenmektedir. Kombu çayı ile gerçekleştirilen birçok çalışmada da benzer şekilde fermentasyon süresine bağlı olarak kombu çayı kültürlerinin pH değerinde azalma olduğu belirtilmiştir (Marsh *et al.* 2014, Jayabalan *et al.* 2014, Nguyen *et al.* 2015, Güldane vd. 2017). Aynı zamanda kombu çayı kültürlerinde mikroorganizma miktarındaki yoğunluğun tüketilen sakkaroz miktarını arttırdığı ve mikroorganizmaların

olarak, Marsh vd. (2014), 10 günlük fermentasyon sonunda kombu çayı kültürlerinin pH değerinin 3 - 3.50 arasında olduğunu belirtmiştir. Bu çalışmada da fermente kültürlerin ortalama pH değerleri yaklaşık 3.13 olmuştur. Nummer' e (2013) göre bu çalışmada kombu çaylarının pH değerleri tüketim için güvenlidir ve 4.2' den yüksek pH değerleri fermente ürünün mikrobiyolojik güvenliğinin sorgulanmasına neden olabilirken, 2.5' ten düşük pH değerleri, yüksek organik asit konsantrasyonu nedeniyle tüketiciler için zararlı olabilir.

### 3.3 Antibakteriyel Aktivitenin Belirlenmesi

Antibakteriyel etkinin incelenmesinde disk difüzyon metodu kullanılmıştır. Çalışmadaki 0. gün örneklerinin hiçbirinde inhibisyon bölgesi

**Çizelge 3.** Kültürlerin 7. ve 14. günlerine ait antibakteriyel etkilerinin ortalama zon çapı (mm cinsinden)

	7. Gün							14. Gün						
	AMP	KAN	K	KO	FO	S	O	AMP	KAN	K	KO	FO	S	O
KP	7±0	18±0.1	6±0	7±0	6±0	6±0	6±0	7±0	21±0.1	8±0	7±0	6±0	6±0	6±0
SA	22±0.1	15±0.4	6±0	6±0	6±0	6±0	6±0	21±0.1	14±0.4	6±0	8±0.1	6±0	6±0	6±0
BC	10±0.1	16±0	6±0	6±0	6±0	6±0	6±0	9±0.1	20±0.1	7.3±0.1	7±0	6±0	6±0	6±0
PA	9±0.1	8±0	6±0	6±0	6±0	6±0	6±0	9±0.1	9±0.1	6±0	10±0.1	6±0	6±0	6±0
SE	11±0.1	16±0.1	6±0	7±0	6±0	6±0	6±0	12±0.1	16±0.1	7±0	8±0	6±0	6±0	6±0
EC	6±0	19±0.1	6±0	6±0	6±0	6±0	6±0	6±0	19±0.1	8±0	6±0	6±0	6±0	6±0

\* Çalışmada kullanılan disklerin çapı 6 milimetredir. Çizelgedeki 6 değeri, hiçbir inhibisyon bölgesinin oluşmadığını gösterir. (AMP: Ampisilin, KAN: Kanamisin, KP: *K. pneumonia*, SA: *S. aureus*, BC: *B. cereus*, PA: *P. aeruginosa*, SE: *S. epidermidis*, EC: *E. coli*. K: Geleneksel kombu çayı, KO: *O. bilgeri* katkılı kombu çayı, FO: Fermente *O. bilgeri*, S: Siyah çay, O: *O. bilgeri* çayı)

gözlenmemiştir; 7. ile 14. günlere ait inhibisyon zonları ise Çizelge 3' te belirtilmiştir. Fermentasyonun 7. gününde sadece *O. Bilgeri* katkılı kombu çayı antibakteriyel etki göstermiş ve *K. pneumonia* ile *S. epidermidis* aşılana petrielerde inhibisyon zonu görülmüştür. 14 günün sonunda *O. bilgeri* katkılı kombu çayı *E. coli* dışında çalışmada kullanılan diğer 5 bakteri suşuna karşı antibakteriyel aktivite göstermiştir. Geleneksel kombu çayı ise 14. gün sonunda sadece *S. aureus* ve *P. aeruginosa*' ya karşı etki gösterememiştir. Çay infüzyonları ve fermente *O. bilgeri* ise bu çalışmada kullanılan suşlara karşı etkili olamamıştır. Benzer şekilde Sreeramulu vd. (2000)'de çalışmalarında fermente edilmemiş siyah çayın antibakteriyel etkisinin olmadığını belirtmiştir.

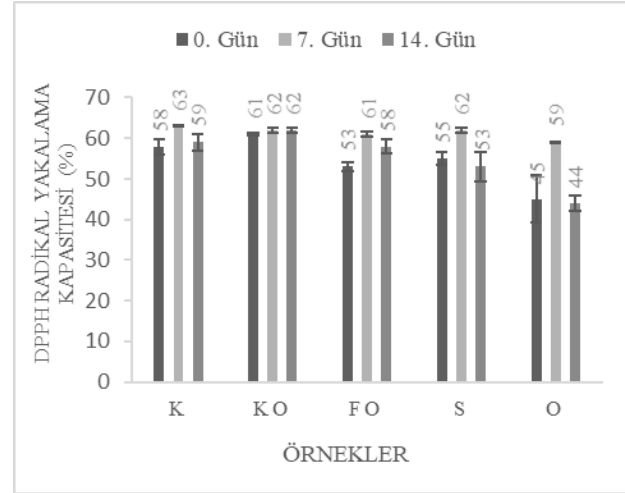
Sözmen vd. (2012) ile Köse vd. (2013) *O. bilgeri*' nin esansiyel yağlarını kullanarak gerçekleştirdikleri çalışmalarında güçlü antibakteriyel etkiye sahip olduğunu belirtmişlerdir, ancak bitkinin infüzyonun kullanıldığı bu çalışmada antibakteriyel etki görülmemiştir. Cardoso vd. (2020) 10 günlük fermentasyon sonunda kombu çayının 250 µL/mL' lik minimum inhibitör konsantrasyonunda *S. aureus* ve *Listeria monocytogenes*' e karşı etkili olduğunu, *E. coli* ve *Salmonella*'ya karşı antibakteriyel etkisinin olmadığını belirtmiştir. Kombu çayının antibakteriyel etkilerinde meydana gelen bu farklılıklara öncelikle kullanılan bakteri suşlarının, kombu çayı kültürlerinin, fermentasyon sürelerinin, kullanılan şeker miktarlarının veya fermentasyon sıcaklıklarının farklılığı neticesinde fermentasyonlarda değişik konsantrasyonlarda ve çeşitlilikte üretilen antibakteriyel maddelerin neden olduğu düşünülmektedir.

### 3.4 Serbest Radikal Yakalama Kapasitesi

#### 3.4.1 DPPH Radikal Yakalama Deneyi

Örneklerin 0. 7. ve 14. günde DPPH serbest radikal yakalama kapasiteleri Şekil 1' de gösterilmiştir. Buna göre, *O. bilgeri* katkılı kombu çayı dışındaki tüm kültürler en yüksek antioksidan aktiviteyi fermentasyonun 7. gününde göstermiştir ve 14. günde azalmıştır. Ancak fermente ürünlerde bu azalma 0. gündeki değerlerin üstünde kalmıştır. *O.*

*bilgeri* katkılı kombu çayının en yüksek serbest radikal yakalama kapasite değeri 7. ve 14. günlerde elde edilmiştir (%62) ancak fermentasyon süresince



**Şekil 1:** Fermente içeceklerin 0., 7. ve 14. günlere ait DPPH radikal yakalama kapasiteleri (%), K: Geleneksel kombu çayı, KO: *O. bilgeri* katkılı kombu çayı, FO: Fermente *O. bilgeri*, S: Siyah çay, O: *O. bilgeri* çayı

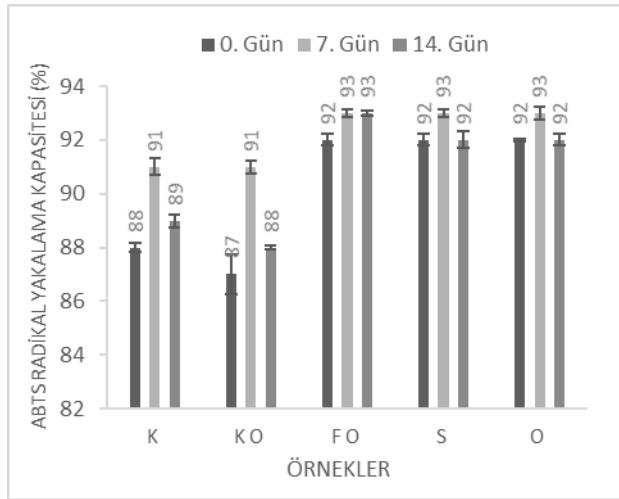
antioksidan aktivitesinde istatistiksel açıdan anlamlı bir değişim olmamıştır ( $p > 0.05$ ). Bu çalışmada genel olarak fermentasyon başlamadan *O. bilgeri* katkılı kombu çayının antioksidan aktivitesinin geleneksel kombu çayına göre daha yüksek olduğu, ancak 7. günde ise aralarında anlamlı bir farklılık olmadığı görülmüştür ( $p > 0.05$ ). Ayrıca fermente örnekler arasında siyah çay ile hazırlanan kültürlerin daha fazla antioksidan aktiviteye sahip olduğu görülmüştür.

Tosun ve Karadeniz (2005)'in belirttiğine göre siyah çayın güçlü bir antioksidan aktivitesi vardır. Dolayısıyla siyah çay bulunduran fermente içeceklerin diğerlerine oranla daha yüksek antioksidan aktivite göstermiş olması anlamlıdır. Chu ve Chen' in 2006 yılında yaptıkları bir çalışmada farklı kültürler kullanarak ürettikleri kombu çaylarındaki DPPH yöntemi ile belirlenen antioksidan aktivitenin fermentasyonla birlikte arttığını ancak fermentasyonun 9. gününde artışın sadece belirli örneklerde istatistiksel açıdan önemli olduğunu göstermiştir ( $p < 0.05$ ). Üretilen kombu çaylarındaki farklı antioksidan aktivitelerine de kombu çayı örneklerinin mikrobiyotasının birbirlerinden farklı olmasının neden olmuş olabileceği belirtilmiştir. Shahbazi vd. (2018), zahter, yeşil çay ve ısırgan otu katkılı kombu çaylarının

radikal temizleme aktivitesinin fermentasyonun üçüncü gününe kadar arttığını ve daha sonra azaldığını göstermiştir. Yapılan bir çalışmada, SCOBY' nin mikrobiyal bileşiminin üretilen kombu içeceği bileşimi üzerinde büyük bir etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (Amarasinghe *et al.* 2018).

### 3.4.2 ABTS Radikal Yakalama Deneyi

Örneklerin 0. 7. ve 14. günde ABTS radikal yakalama kapasiteleri Şekil 2' de verilmiştir. ABTS radikal yakalama kapasitesine göre DPPH ile benzer şekilde tüm örnekler en yüksek antioksidan aktiviteyi fermentasyonun 7. gününde göstermiştir ve 14. günde aktivite tüm örneklerde azalmıştır. Bu azalma siyah çay hariç fermente ürünlerde 0. gündeki değerlerin üstünde kalmıştır. Ancak siyah çayın ve *O. bilgeri* çayının 0. gündeki ABTS radikal yakalama kapasitesi 14. gün ile aynıken, diğer örneklerde ise 14. gün değerleri 0. güne göre daha yüksek



**Şekil 2:** Fermente içeceklerin 0., 7. ve 14. günlere ait ABTS radikal yakalama kapasiteleri (%), K: Geleneksel kombu çayı, KO: *O. bilgeri* katkılı kombu çayı, FO: Fermente *O. bilgeri*, S: Siyah çay, O: *O. bilgeri* çayı

bulunmuştur. DPPH yöntemine göre *O. bilgeri* katkılı kombu çayının en yüksek serbest radikal yakalama kapasite değeri 7. ve 14. günlerde elde edilmiştir (%62) ve fermentasyon süresince antioksidan aktivitesinde istatistiksel açıdan anlamlı bir değişim olmamıştır ( $p > 0.05$ ). Fakat ABTS yöntemine göre en yüksek antioksidan aktivite değeri 7. günde elde edilmiştir (%91) ve fermentasyonun 14. gününde (%84) anlamlı derecede azalmıştır ( $p < 0.05$ ). DPPH yöntemi sonuçlarına göre fermentasyondan önce *O. bilgeri* katkılı kombu çayının antioksidan

aktivitesinin geleneksel kombu çayına göre daha fazla olduğu ancak 7. günde ise aralarında anlamsal bir farklılık olmadığı görülmüştür. Ancak ABTS yöntemine göre fermentasyon öncesi geleneksel kombu çayının antioksidan aktivitesi daha yüksektir ve istatistiksel açıdan anlamlıdır ( $p < 0.05$ ). Ayrıca DPPH yönteminde fermente örnekler arasında siyah çay ile hazırlanan kültürlerin daha fazla antioksidan etkiye sahip olduğu görülürken ABTS sonuçlarına göre siyah çay ile hazırlanan kültürler ilginç şekilde daha az antioksidan aktiviteye sahip olmuştur.

DPPH ve ABTS yöntemleri ile ölçülen antioksidan aktivitenin aynı örnekte değişik sonuçlar verdiğini gösteren çalışmalar literatürde bulunmaktadır: Yıldız vd. (2020) yaptıkları çalışmada havuç eklenmiş kombu çaylarının ABTS ile DPPH yöntemleri ile antioksidan aktivitelerini ölçmüşler ve bu değerlerin aynı örnekte farklı sonuçlar verebildiğini görmüşlerdir. ABTS deneyinde Hatay bölgesinden toplanan siyah havuç suyu içeren kombu çayı en yüksek sonucu verirken DPPH ile yapılan deney sonucunda en yüksek antioksidan aktivitenin Konya bölgesinden toplanan siyah havuç suyu içeren kombu çayı örneğinde olduğu belirtilmiştir. Benzer şekilde Hrnjez vd. (2014) süt ürünlerini kombu çayı ile fermente ettikleri çalışmada, fermentasyonun 14. gününde DPPH ile yapılan ölçümde en yüksek antioksidan aktivitenin kombu çayı örneğinde, ABTS ile yapılan deneyde ise en yüksek antioksidan aktivitenin yoğurt örneklerinde olduğunu belirtilmiştir. Chu ve Chen (2006) yaptıkları çalışmada Tayvan' ın 8 farklı hanesinden kombu çayı örneklerini toplayıp A'dan H'ye rastgele adlandırarak serbest radikal yakalama kapasitelerini karşılaştırmıştır. Fermentasyonun 15. gününde DPPH ile yaptıkları deneyde en yüksek antioksidan aktiviteyi göstermiştir. Örneklerde görülen bu farklılığın çay kateşinlerinin radikal süpürücü etkilerinin, radikal türlerine göre değişken olmasından dolayı olduğunu ileri sürülmüştür.

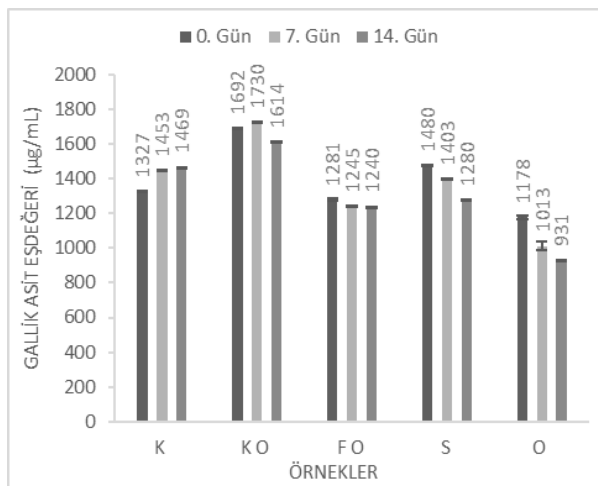
Elde edilen sonuçlar genel olarak değerlendirildiğinde örneklerin antioksidan aktivite yüzdelerinin ABTS' de DPPH' a oranla daha yüksek olduğu görülmüştür. ABTS deneyi hem hidrofilik hem de lipofilik antioksidan sistemlere uygulanabilen mavi / yeşil ABTS<sup>+</sup> radikali oluşumuna



dayanmaktadır; DPPH deneyinde ise özellikle alkol gibi organik çözücülerde çözünen bir radikal kullanılır ve bu nedenle sadece hidrofobik antioksidan sistemlerine uygulanabilir (Kim et al. 2002). Bu nedenle ABTS deneyi ile belirlenen antioksidan kapasitenin DPPH deneyi ile belirlenen antioksidan kapasiteden daha yüksek çıkabilmektedir. Ayrıca literatür çalışmaları incelendiğinde benzer şekilde Hrnjez vd. (2014), Chakravorty vd. (2016), Tu vd. (2019), Tanticharakunsiri vd. (2020) gibi gerçekleştirilmiş olan bazı çalışmalarda ABTS sonuçları DPPH sonuçlarına oranla daha yüksektir.

### 3.5 Toplam Fenolik Madde Miktarı

Örneklerin 0. günde ve 14. günde içerdikleri toplam fenolik madde miktarları Şekil 3' te gösterilmektedir. Toplam fenolik madde miktarına bakıldığı zaman DPPH radikal yakalama deneyi ile benzer sonuçlar elde edilmiştir. Her iki deneyde de en yüksek değerler *O. bilgeri* katkılı kombu çayı ve geleneksel kombu çayında görülmüştür. *O. bilgeri* katkılı kombu çayının fenolik madde miktarının 7. günde en yüksek seviyede (1730 µg GAE/mL) olduğu görülmüştür ( $p < 0.05$ ). Geleneksel kombu çayında fermentasyonla birlikte fenolik madde miktarındaki artış devam etmiş ve en yüksek fenolik madde miktarı fermentasyonun son gününde elde edilmiştir (1469 µg GAE/mL) ( $p < 0.05$ ). Fermente edilmemiş örneklerde ise; *O. bilgeri* çayı ve siyah çayda zamana bağlı olarak fenolik madde miktarlarında azalış görülmüştür ( $p < 0.05$ ).



**Şekil 3:** Fermente içeceklerin 0., 7. ve 14. günlere ait toplam fenolik madde içeriği (µg GAE /mL), K: Geleneksel

kombu çayı, KO: *O. bilgeri* katkılı kombu çayı, FO: Fermente *O. bilgeri*, S: Siyah çay, O: *O. bilgeri* çayı

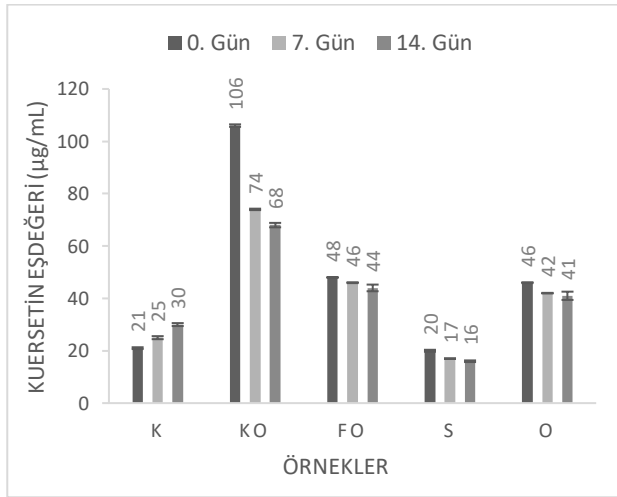
Fenolik bileşikler insan sağlığı açısından antioksidan fonksiyonlarıyla ön plana çıkan maddelerdir ve bitkisel gıdalarda yaygın olarak bulunmakla birlikte siyah çayın fenolik madde içeriği oldukça zengindir (Tosun ve Karadeniz 2005). Velicanski vd. (2014) yaptıkları çalışmada 7 günlük fermentasyon sonunda geleneksel kombu çayı ve siyah çayın toplam fenolik madde miktarında artış olduğunu göstermiştir. Ayrıca Bhattacharya vd. (2011) ürettikleri kombu çaylarında toplam fenolik madde miktarının fermentasyonun 14. gününe kadar arttığını belirtmiştir. Ancak bizim çalışmamızda *O. bilgeri* katkılı kombu çayının fenolik madde miktarı 7. günde artmıştır ve 14. günde azalmıştır ve 0. günle kıyaslandığında daha az fenolik madde miktarına sahip olduğu görülmüştür. Amarasinghe vd. (2018) yaptıkları çalışmada fenolik madde miktarında fermentasyonla birlikte kayda değer bir artış tespit edememiş ve bu azalmanın, fenolik bileşiklerin kombu çayı mikroorganizmaları tarafından kullanılmasının bir sonucu olabileceğini öne sürmüşlerdir. Benzer şekilde Ayed vd. (2017) kırmızı üzüm suyu ile gerçekleştirdikleri 12 günlük kombu çayı fermentasyonunda toplam fenolik madde miktarının 6. güne kadar önemli artış gösterdiğini ve 10. günden sonra azalmaya başladığını bildirerek fenolik bileşiklerin daha yüksek moleküllere polimerizasyonunun daha düşük polifenol içeriğinin saptanmasına yol açabildiğini ileri sürmüşlerdir.

### 3.6 Toplam Flavonoid Madde Miktarı

Örneklerin 0. 7. ve 14. günde toplam flavonoid madde miktarları Şekil 4' te gösterilmiştir. Genel olarak *O. bilgeri* içeren bütün örneklerde toplam flavonoid madde miktarının yüksek olduğu görülmüştür. Ancak bu flavonoid madde miktarı 7. ve 14. günlerde azalma eğilimindedir. En yüksek toplam flavonoid madde miktarının *O. bilgeri* katkılı kombu çayında olduğu görüldüğü de zamanla bu miktarın istatistiksel olarak anlamlı oranda düştüğü görülmüştür ( $p < 0.05$ ). Geleneksel kombu çayındaki toplam flavonoid madde miktarı *O. bilgeri* katkılı kombu çayı ile kıyaslandığında fermentasyonla

birlikte istatistiksel olarak anlamlı şekilde artmıştır ( $p < 0.05$ ).

DPPH deneyi ve toplam fenolik madde deneyine benzer olarak en yüksek toplam flavonoid madde miktarı *O. bilgeri* katkılı kombu çayı örneğinde görülmüştür. Aynı zamanda ABTS deneyi ile benzer olarak fermente *O. bilgeri* ve *O. bilgeri* çayının geleneksel kombu çayı örneğinden daha yüksek toplam flavonoid madde miktarına sahip olduğu görülmüştür.



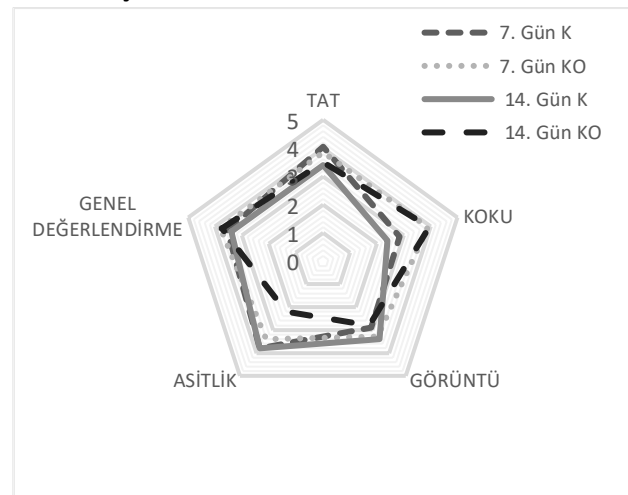
**Şekil 4:** Fermente içeceklerin 0., 7. ve 14. günlere ait toplam flavonoid madde içeriği ( $\mu\text{g KE /mL}$ ), K: Geleneksel kombu çayı, KO: *O. bilgeri* katkılı kombu çayı, FO: Fermente *O. bilgeri*, S: Siyah çay, O: *O. bilgeri* çayı

Flavonoidler, iltihap oluşumunu önleyebilen, serbest radikalleri temizleyebilen veya oksidatif enzimlerin inhibisyonunda etkili olabilen önemli bileşiklerdir (Zhishen *et al.* 1999). Vitas vd. (2018), civanperçemiyle gerçekleştirdikleri 7 günlük kombu çayı fermentasyonunda kültürlerin başlangıca göre daha az flavonoid madde içeriğine sahip olduğunu belirterek, flavonoidlerin infüzyonlarda fazla olmasına rağmen fermentasyonla degrade olduğunu ileri sürmüşlerdir. Yine aynı şekilde 2019 yılına ait başka bir çalışmalarında ise Vitas vd. 10 gün fermente edilen kombu çayı örneklerinde benzer şekilde flavonoid içeriğinin azaldığını rapor etmişlerdir. Ancak Shahbazi vd. (2018), fermente edilmiş tıbbi bitkileri kullanarak yaptıkları çalışmada flavonoid miktarının önemli ölçüde arttığını göstererek, kateşin ve epikateşin izomerlerinin üretiminin flavonoid miktarında artışa neden

olabileceğini öne sürmüştür. Benzer şekilde Dwiputri ve Feroniasanti (2019) kelebek bezelye ile yaptıkları 20 günlük kombu çayı fermentasyonunda, flavonoid madde miktarının fermentasyon sonunda en yüksek olduğunu gözlemiştir. Daha önce de belirtildiği gibi çalışmada kullanılan tıbbi bitkinin ne olduğu ne zaman ekildiği, nasıl büyütüldüğü ve kombu çayında kullanılan kültürün özellikleri bu içeceklerdeki toplam flavonoid miktarındaki değişikliklere neden olabilmektedir.

### 3.7 Duyusal Analiz

Geleneksel kombu çayı ile *O. bilgeri* katkılı kombu çayı örneklerinin 7. ve 14. günde katılımcılardan aldıkları puanlar Şekil 5' te gösterilmiştir. Genel olarak değerlendirildiğinde *O. bilgeri* katkılı kombu çayı 7. günde ve 14. günde daha yüksek puan alarak geleneksel kombu çayına göre daha tercih edilebilir bir içecek olmuştur. Katılımcılar kombu içeceklerinin keskin ve hoş olmayan bir kokuya sahip olduğunu belirtmiştir. Ancak *O. bilgeri* katkılı kombu çayı, bitkinin kendine özgü aromatik tat ve kokusundan dolayı 7. ve 14. günde geleneksel kombu çayına göre daha çok tercih edilmiştir. Geleneksel kombu çayı 7. günde asitlik bakımından *O. bilgeri* katkılı kombu çayından daha az asidik bulunmuş ve hem asitlik hem de tat bakımından daha yüksek puan almıştır (3.8, 4.05). Ancak 14. günde *O. bilgeri* katkılı kombu çayı örneği, geleneksel kombu çayından daha asidik bulunmasına rağmen (2.2), tat bakımından geleneksel kombu çayından daha yüksek puan (3.5) alarak katılımcılar tarafından daha lezzetli bulunmuştur.



**Şekil 5:** Fermente içeceklerin 7. ve 14. günlere ait duyu analizleri

Fermentasyon süresi uzadıkça hoş ve yumuşak tada sahip kombu çayı içecekleri, ekşi ve sirkeye benzer bir tat almaktadır (Reiss 1994). Bu çalışmada da katılımcılar *O. bilgeri* katkılı kombu çayı örneğinin 7. gün fermentasyonunu 14. gün fermentasyonundan daha çok beğenmişlerdir. Benzer şekilde Ayed vd. (2017) kırmızı üzüm suyu ile yaptıkları kombu çayı çalışmalarında duyu analiz sonucunda renk, koku, asitlik, tatlılık, tat ve genel değerlendirme bakımından 6 günlük fermente üzüm suyu örneği, 12 günlük fermente üzüm suyu örneğinden daha yüksek puanlar almıştır.

Loncar vd. (2006) kombu çayı örneklerinde fermentasyon süresine bağlı olarak zamanla asitliğin artmasından ötürü ürünlerin ekşi ve nahoş hale geldiğini belirtmiştir. Ayrıca bu ürünler için kabul edilebilir en düşük pH değerinin, sindirim sistemi için tipik olan pH=3' ün altına düşmemesi gerektiğini vurgulamıştır. Benzer şekilde fermentasyon sonunda bu çalışmada ürünlerin pH değeri 14. günde geleneksel kombu hariç (2.9) 3' ün üzerinde olmuştur.

#### 4. Sonuç

Yeni nesil probiyotik içecek üretiminde farklı substratların kullanılması içeceğin antioksidan, antibakteriyel etkisinde, fenolik ve flavonoid madde miktarında artışa neden olmaktadır. Bu çalışmada hem endemik hem de tıbbi bir bitki olması nedeniyle önemli olan *O. bilgeri'* nin, kombu çayının antimikrobiyal özelliği, toplam fenolik ve flavonoid madde miktarı ve mikrobiyal profili üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Kombu çayı kültürü, bu biyoaktif bileşen kaynağı ile başarılı bir şekilde fermente edilmiştir. *O. bilgeri'* nin eklenmiş olduğu kombu çayının özellikle 14. günde beş bakteriyel suşa karşı göstermiş olduğu antibakteriyel etkisi ve toplam flavonoid madde miktarının yüksek olması nedeniyle, fonksiyonel kombu çayı içeceklerinin geliştirilmesi için umut verici bir substrat olduğu söylenebilir. Bununla birlikte, *O. bilgeri* katkılı kombu çayının duyu özelliklerinin iyileştirilmesi, optimum fermentasyon zamanının, sakkaroz, siyah

çay ve bitki çayı konsantrasyonlarının ve insan sağlığı için faydalı içeriklerinin belirlenmesi ile bu faydalı içeceğin daha da geliştirilmesi mümkündür.

#### 5. Kaynaklar

- Abd El-Salam, S.S., 2012. 16S rRNA gene sequence detection of acetic acid bacteria isolated from tea kombucha. *New York Science Journal*, **5**, 55-61.
- Akarca, G., Tomar, O., 2018. Siyah ve Yeşil Çay ile Üretilen Kombucha Çaylarının Antimikrobiyal ve Antioksidatif Özellikleri. *Avrupa Bilim ve Teknoloji Dergisi*, **14**, 96-101.
- Altuğ, T., 1993, Duyusal test teknikleri, 1. Baskı. *Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Yayınları*, İzmir, 56s.
- 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.
- Ayed, L., Abid, S.B., Hamdi, M., 2017. Development of a beverage from red grape juice fermented with the kombucha consortium. *Annals of Microbiology*, **6 (1)**, 111-121.
- Basaran, D., 2005. An Investigation on Antimicrobial Activity Of Endemic *Origanum solymicum* and *Origanum bilgeri* from Turkey. *African Journal of Traditional*, **2 (3)**, 259 – 263.
- Battikh, H., Bakhrouf, A., Ammar, E., 2012. Antimicrobial effect of kombucha analogues. *LWT-Food Science and Technology*, **47 (1)**, 71-77.
- Bauer, A., 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. *American Journal of Clinical Pathology*, **45**, 149-158.
- Bhattacharya, S., Gachhui, R., Sil, P.C., 2011. Hepatoprotective properties of kombucha tea against TBHP-induced oxidative stress via suppression of mitochondria dependent apoptosis. *Pathophysiology*, **18 (3)**, 221-234.
- Blanc, P.J., 1996. Characterization of the tea fungus metabolites. *Biotechnology Letters*, **18 (2)**, 139-142.
- Bor, Z., Arslan, R., Bektaş, N., Pirildar, S., Dönmez, A.A., 2012. Antinociceptive, antiinflammatory, and antioxidant activities of the ethanol extract of

- Crataegus orientalis* leaves. *Turkish Journal of Medical Sciences*, **42 (2)**, 315-324.
- Cardoso, R.R., Neto, R.O., dos Santos D'Almeida, C.T., do Nascimento, T.P., Pressete, C.G., Azevedo, L., de Barros, F.A.R., 2020. Kombuchas from green and black teas have different phenolic profile, which impacts their antioxidant capacities, antibacterial and antiproliferative activities. *Food Research International*, **128**, 108782.
- Chakravorty, S., Bhattacharya, S., Chatzinotas, A., Chakraborty, W., Bhattacharya, D., Gachhui, R., 2016. Kombucha tea fermentation: Microbial and biochemical dynamics. *International Journal of Food Microbiology*, **220**, 63–72.
- Chu, S.C., Chen, C., 2006. Effects of origins and fermentation time on the antioxidant activities of kombucha. *Food Chemistry*, **98**, 502–507.
- Cosge, B., Turker, A., Ipek, A., Gurbuz, B., 2009. Chemical compositions and antibacterial activities of the essential oils from aerial parts and corollas of *Origanum acutidens* (Hand.-Mazz.) letsvaart, an endemic species to Turkey. *Molecules*, **14 (5)**, 1702-1712.
- Coton, M., Pawtowski, A., Taminiou, 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)**.
- Davis, P.H., 1982, Flora of Turkey and the East Aegean Islands, Volume (7), Edinburgh University Press, 300-307.
- Davis, P.H., Miller, R.R., Tan, K. (Eds), 1988, Flora of Turkey and the East Aegean Islands, Volume (10), Edinburgh University Press, 206-207.
- Değirmencioğlu, N., Yıldız, E., Şahan, Y., Güldaş, M., Gürbüz, O., 2019. Fermentasyon Süresinin Kombu Çayı Mikrobiyotası ve Canlılık Oranları Üzerine Etkileri. *Akademik Gıda*, **17 (2)**, 200-211.
- Duman, H., 2000, *Origanum* L. In: Flora of Turkey and the East Aegean Islands, Volume (11), Güner A, Özhatay N, Ekim T, Baser KHK, (Eds). Edinburgh University Press, 207-208.
- Dwiputri, M.C., Feroniasanti, Y.L., 2019. Effect of Fermentation to Total Titrable Acids, Flavonoid and Antioxidant Activity of Butterfly Pea Kombucha. *In Journal of Physics: Conference Series*, Volume (1241), 1, 012014.
- 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.
- 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**, 976-981.
- Halkman, K.A., 2000, Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları, 2. Baskı, Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü Yayınları, Ankara 522.
- Hrnjez, D., Vaštag, Ž., Milanović, S., Vukić, V., Iličić, M., Popović, L., Kanurić, K., 2014. The biological activity of fermented dairy products obtained by kombucha and conventional starter cultures during storage. *Journal of Functional Foods*, **10**, 336-345.
- 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.
- Kallel, L., Desseaux, V., Hamdi, M., Stocker, P., Ajandouz, E., 2012. Insights into the fermentation biochemistry of kombucha teas and potential impacts of kombucha drinking on starch digestion. *Food Research International*, **49**, 226-232.
- Khokhar, S., Magnusdottir, S.G.M., 2002. Total phenol, catechin, and caffeine contents of teas commonly consumed in the United Kingdom. *Journal of agricultural and food chemistry*, **50 (3)**, 565-570.
- Kim, D.O., Lee, K.W., Lee, H.J., Lee, C.Y., 2002. Vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of phenolic phytochemicals. *Journal of Agricultural and food chemistry*, **50(13)**, 3713-3717.
- Köse, E.O., Öngüt, G., Yanikoglu, A., 2013. Chemical Composition and Antimicrobial Activity of Essential Oil of Endemic *Origanum bilgeri* PH Davis for

- Turkey. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, **16(2)**, 233-242.
- Leyva-López, N., Gutiérrez-Grijalva, E.P., Vazquez-Olivo, G., Heredia, J.B., 2017. Essential oils of oregano: Biological activity beyond their antimicrobial properties. *Molecules*, **22 (6)**, 989.
- Lončar, E., Djurić, M., Malbaša, R., Kolarov, L. J., Klašnja, M., 2006. Influence of working conditions upon kombucha conducted fermentation of black tea. *Food and Bioprocess Processing*, **84 (3)**, 186-192.
- Marrelli, M., Statti, G.A., Conforti, F., 2018. *Origanum* spp.: an update of their chemical and biological profiles. *Phytochemistry Reviews*, **17 (4)**, 873-888.
- 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.
- Nguyen, N.K., Nguyen, P.B., Nguyen, H.T., Le, P.H., 2015. Screening the optimal ratio of symbiosis between isolated yeast and acetic acid bacteria strain from traditional kombucha for high-level production of glucuronic acid. *LWT-Food Science and Technology*, **64 (2)**, 1149-1155.
- 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.
- Reiss, J., 1994. Influence of different sugars on the metabolism of the tea fungus. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und-Forschung*, **198 (3)**, 258-261.
- Sievers, M., Lanini, C., Weber, A., Schuler-Schmid, U., Teuber, M., 1995. Microbiology and fermentation balance in a kombucha beverage obtained from a tea fungus fermentation. *Systematic and Applied Microbiology*, **18 (4)**, 590-594.
- Singleton, V.L., Rossi, J.A., 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, **16**, 144-158.
- Škerget, M., Kotnik, P., Hadolin, M., Hraš, A.R., Simonič, M., Knez, Ž., 2005. Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities. *Food Chemistry*, **89**, 191-198.
- Sözmen, F., Uysal, B., Köse, E.O., Aktaş, Ö., Cinbilgel, I., Oksal, B.S., 2012. Extraction of the essential oil from endemic *Origanum bilgeri* PH Davis with two different methods: comparison of the oil composition and antibacterial activity. *Chemistry and biodiversity*, **9 (7)**, 1356-1363.
- Sreeramulu, G., Zhu, Y., Knol, W., 2000. Kombucha fermentation and its antimicrobial activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **48 (6)**, 2589-2594.
- Tanhaş, E., Martin, E., Korucu, E.N., Dirmenci, T., 2020. Effect of aqueous extract, hydrosol, and essential oil forms of some endemic *Origanum* L. (Lamiaceae) taxa on polyphenol oxidase activity in fresh-cut mushroom samples. *Journal of Food Processing and Preservation*, **44 (10)**, e14726.
- Tanticharakunsiri, W., Mangmool, S., Wongsariya, K., Ochaikul, D., 2020. Characteristics and upregulation of antioxidant enzymes of kitchen mint and oolong tea kombucha beverages. *Journal of Food Biochemistry*, **45 (1)**, e13574.
- Teoh, A.L., Heard, G., Cox, J., 2004. Yeast ecology of Kombucha fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, **95 (2)**, 119-126.
- Thaipong, K., Boonprakob, U., Crosby, K., Cisneros-Zevallos, L., Byrne, D.H., 2006. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *Journal of Food Composition and Analysis*, **19 (6-7)**, 669-675.
- Tosun, İ., Karadeniz, B., 2005. Çay ve çay fenoliklerinin antioksidan aktivitesi. *Anadolu Tarım Bilimleri Dergisi*, **20 (1)**, 78-83.
- Tu, C., Tang, S., Azi, F., Hu, W., Dong, M., 2019. Using the kombucha consortium to turn soy whey into a new and functional beverage. *Functional Foods Journal*, **52**, 81-89.
- Ulusoy, A., Tamer, C.E., 2019. Determination of suitability of black carrot (*Daucus carota* L. spp. *sativus* var. *atrorubens* Alef.) juice concentrate, cherry laurel (*Prunus laurocerasus*), blackthorn (*Prunus spinosa*) and red raspberry (*Rubus ideaus*) for kombucha beverage production. *Journal of Food Measurement and Characterization*, **13 (2)**, 1524-1536.

- Ünal, O., Gökçeoğlu, M., 2005. Antalya ili için endemik olan *Origanum* türlerinin biyolojik özellikleri üzerine bir araştırma. *Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, **18 (1)**, 1-14.
- Velicanski, A.S., Cvetkovic, D.D., Markov, S.L., Saponjac, V.T.S., Vulic, J.J., 2014. Lemon Balm Kombucha Antioxidant Activity. *Food Technology and Biotechnology*, **52 (4)**, 420-429.
- Vijayaraghavan, R., Singh, M.A.N.I.N.D., Rao, P.V.L., Bhattacharya, R., Kumar, P., Sugendran, K., Singh, R., 2000. Subacute (90 days) oral toxicity studies of Kombucha tea. *Biomedical and Environmental Sciences*, **13 (4)**, 293-299.
- Vitas, J.S., Cvetanović, A.D., Mašković, P.Z., Švarc-Gajić, J.V., Malbaša, R.V., 2018. Chemical composition and biological activity of novel types of kombucha beverages with yarrow. *Journal of Functional Foods*, **44**, 95-102.
- Vitas, J., Vukmanović, S., Čakarević, J., Popović, L., Malbaša, R., 2019. Kombucha fermentation of six medicinal herbs: Chemical profile and biological activity. *Chemical Industry and Chemical Engineering Quarterly*, **26(2)**, 157-170.
- Von Gadow, A., Joubert, E., Hansmann, C., 1997. Comparison of the antioxidant activity of rooibos tea (*Aspalathus linearis*) with green, oolong and black tea. *Food Chemistry*, **60**, 73-77.
- Yıldız, E., Guldaz, M., Gurbuz, O., 2020. Determination of in-vitro phenolics, antioxidant capacity and bio-accessibility of Kombucha tea produced from black carrot varieties grown in Turkey. *Food Science and Technology*, (AHEAD), 1-8.
- Zhao, Z.J., Sui, Y.C., Wu, H.W., Zhou, C.B., Hu, X.C., Zhang, J., 2018. Flavour chemical dynamics during fermentation of kombucha tea. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, **30 (9)**, 732-741.
- Zhishen, J., Mengcheng, T., Jianming, W., 1999. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry*, **64 (4)**, 555-559.