



T.C.
NİĞDE ÖMER HALİSDEMİR ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

FARKLI ENDEMİK BİTKİLER KULLANILARAK KOMBU ÇAYI ÜRETİMİ VE
FERMENTE ÜRÜNLERİNİN BİYOLOJİK AKTİVİTELERİNİN BELİRLENMESİ

CİHAN DÜŞGÜN

Aralık 2020

T.C.
NİĞDE ÖMER HALİSDEMİR ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

FARKLI ENDEMİK BİTKİLER KULLANILARAK KOMBU ÇAYI ÜRETİMİ VE
FERMENTE ÜRÜNLERİNİN BİYOLOJİK AKTİVİTELERİNİN BELİRLENMESİ

CİHAN DÜŞGÜN

Doktora Tezi

Danışman

Prof. Dr. Teoman KANKILIÇ

Aralık 2020

Cihan DÜŞGÜN tarafından **Prof. Dr. Teoman KANKILIÇ** danışmanlığında hazırlanan “**Farklı Endemik Bitkiler Kullanılarak Kombu Çayı Üretimi ve Fermente Ürünlerinin Biyolojik Aktivitelerinin Belirlenmesi**” adlı bu çalışma jürimiz tarafından Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Biyoteknoloji** Ana Bilim Dalı’nda Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Hüseyin POLAT
Aksaray Üniversitesi

Üye : Prof. Dr. Teoman KANKILIÇ
Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi

Üye : Prof. Dr. Ayten ÖZTÜRK
Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi

Üye : Doç. Dr. Fadime KIRAN
Ankara Üniversitesi

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Dilara Fatma BALI
Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi

ONAY:

Bu tez, Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunca belirlenmiş olan yukarıdaki jüri üyeleri tarafından/...../20.... tarihinde uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu’nun/...../20.... tarih ve sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

...../...../20...

Prof. Dr. Murat BARUT
MÜDÜR

TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin bilimsel ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

Cihan DÜŞGÜN

ÖZET

FARKLI ENDEMİK BİTKİLER KULLANILARAK KOMBU ÇAYI ÜRETİMİ VE FERMENTE ÜRÜNLERİNİN BİYOLOJİK AKTİVİTELERİNİN BELİRLENMESİ

DÜŞGÜN, Cihan

Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Danışman : Prof. Dr. Teoman KANKILIÇ

İkinci Danışman : Doç. Dr. Fadime KIRAN

Aralık 2020, 137 sayfa

Kombu çayı yüzyıllardır halk tarafından kullanılan, hafif ekşimsi-tatlı lezzete sahip fermente bir içecektir. Çeşitli bakteri ve mayaların simbiyotik birlikteliğinin oluşturduğu kombucha kültürünün şekerli siyah veya yeşil çayı fermente etmesi ile elde edilmektedir. Bu tez çalışmasında geleneksel olarak kullanılan siyah ve yeşil çayın (*Camellia sinensis*) yanı sıra endemik olan *Sideritis bilgerana* ve *Galium nigdeense* bitki örnekleri ile endemik olmayan *Plantago lanceolata* bitki örnekleri kullanılarak hazırlanan kombu çaylarının anti-oksidan, anti-mikrobiyal ve anti-kanserojen özelliklerini araştırılmıştır. Hazırlanan kombu çaylarından fermantasyonun 1., 7. ve 14. günü alınan örneklerin liyofilizatları hazırlanmıştır. Anti-oksidan özelliklerini araştırmak için DPPH, CUPRAC ve indirgeme gücü ölçümü metotları kullanılmıştır. Anti-mikrobiyal aktivite bazı patojen suşlar üzerinde test edilmiştir. Anti-kanserojen etkilerini belirlemek için insan kolorektal adenokarsinoma hücre hatları üzerinde XTT testi uygulanmıştır. Kombucha kültürü ile yapılan fermantasyon sonucunda bütün örneklerde anti-oksidan ve anti-mikrobiyal aktivitelerde artış olduğu gözlenmiştir. Kombu çayı örnekleri insan kolorektal adenokarsinoma hücre hatlarında sitotoksik etki göstermemiştir.

Anahtar Sözcükler: Kombucha, fermente içecek, endemik bitkiler, anti-oksidan, anti-mikrobiyal, anti-kanserojen

SUMMARY

PRODUCTION OF KOMBU TEA BY USING DIFFERENT ENDEMIC PLANTS AND DETERMINATION OF THE BIOLOGICAL ACTIVITIES OF IT'S FERMENTED PRODUCTS

DÜŞGÜN, Cihan

Niğde Ömer Halisdemir University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Biotechnology

Supervisor : Prof. Dr. Teoman KANKILIÇ

Co-Advisor : Associate Prof. Dr. Fadime KIRAN

December 2020, 137 pages

Kombucha is a fermented beverage that has been used by the public for centuries and has a mild sour-sweet flavor. It is obtained by fermenting sugary black or green tea with the kombucha culture, which is formed by the symbiotic association of various bacteria and yeasts. In this thesis study, the anti-oxidant, anti-microbial and anti-carcinogenic properties of the traditionally used black and green tea (*Camellia sinensis*), as well as the endemic *Sideritis bilgerana* and *Galium nigdeense* plant samples and the non-endemic *Plantago lanceolata* plant samples were investigated. The lyophilisates of the samples taken on the 1st, 7th and 14th days of the fermentation were prepared from the kombu teas. DPPH, CUPRAC and reducing power measurement methods were used to investigate the anti-oxidant properties. Anti-microbial activity has been tested on some pathogenic strains. XTT test was performed on human colorectal adenocarcinoma cell lines to determine their anti-carcinogenic effects. As a result of fermentation with Kombucha culture, an increase in anti-oxidant and anti-microbial activities was observed in all samples. Kombucha samples did not show cytotoxic effects in human colorectal adenocarcinoma cell lines.

Keywords: Kombucha, fermented beverage, endemic herbs, anti-oxidant, anti-microbial, anti-carcinogen

ÖN SÖZ

Tez çalışmamın her aşamasında desteğiyle bana yardımcı olan, bilimsel gelişimime tecrübe ve önerileriyle katkıda bulunan, yanısıra sosyal hayatımdaki dokunuşları ile de bir hocadan çok bir arkadaş bir abi olan danışman hocam Sayın Prof. Dr Teoman KANKILIÇ'a, çalışmalarımın tamamlanması sürecinde, ihtiyacım olan her türlü bilgi, birikim konusunda çok yardımcı olan ve laboratuvar imkanlarını benimle paylaşmaktan çekinmeyen eş danışmanım Sayın Doç. Dr. Fadime KIRAN'a (Ankara Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı), dönemlik tez toplantılarında bilimsel yönlendirmeleri ile tezin ilerleyişine önemli katkıları olan değerli hocalarım Prof. Dr. Ayten ÖZTÜRK ve Dr. Öğr Üyesi Dilara Fatma BALI'ya, bugüne kadar arkadaşlığının yanı sıra maddi ve manevi her zaman destek olan değerli arkadaşım Oğuzhan YILMAZ'a, aynı evi paylaştığım, yaşadığım her sıkıntıda destekleriyle beni ayakta tutan değerli arkadaşlarım Soner KAYA ve İbrahim Hakkı İŞLER'e, tez çalışmalarım sırasında bilgi, birikim ve tecrübelerini paylaşan, ayrıca sağlıklı ve güvenilir kombucha kültürü temininde sponsorluk desteği sağlayan Shaman's Secret firmasının kurucusu Beril TURHAN hanıma, laboratuvarında birlikte çalıştığım mesai arkadaşlarım Zeynep DÜZELTEN BALLI ve Hüseyin TÜRKER'e, hayatım boyunca bana inanan, maddi manevi desteklerini her zaman gördüğüm ve her zaman arkamda olan annem Ayfer TOSUN ve kız kardeşlerim Seren DÜŞGÜN ve Seda DÜŞGÜN'e, pozitif düşünceleri ve bana olan inancıyla kalben ve ruhen desteğini her zaman gördüğüm Nurdan FIRAT'a ve isimlerini buraya sığdıramayacağım, maddi manevi desteği olan tüm insanlara kalpten sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tezimin gerçekleşmesinde 120Z331 numaralı proje ile maddi destek sağlayan TÜBİTAK'a teşekkür ederim.

Bu çalışma, FMT2015/05-LÜTEP numaralı "Farklı Endemik Bitkiler Kullanılarak Kombu Çayı Üretimi ve Fermente Ürünlerinin Biyolojik Aktivitelerinin Belirlenmesi" isimli LÜTEP projesinden üretilmiş olup, projeye destek sağlayan Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimine katkılarından dolayı teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
SUMMARY	v
ÖN SÖZ	vi
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
SİMGE VE KISALTMALAR	xii
BÖLÜM I GİRİŞ	1
BÖLÜM II GENEL BİLGİLER VE LİTERATÜR TARAMASI.....	4
2.1 Kombu Çayının Tarihi	4
2.2 Kombu Çayının Biyolojik Bileşimi	5
2.3 Kombu Çayının Metabolitleri	6
2.4 Kombu Çayının Faydalı Yönleri.....	9
2.4.1 Antioksidan özelliği.....	9
2.4.2 Antidiyabetik özelliği	10
2.4.3 Hepatoprotektif özelliği	12
2.4.4 Antimikrobiyal özelliği.....	13
2.4.4.1 Antibakteriyel	13
2.4.4.2 Antifungal	14
2.4.5 Antienflamatuvar özelliği	15
2.4.6 Antikanser özelliği.....	16
2.5 Kombu Çayının Hazırlanma Teknikleri	17
2.6 Kombucha Fermantasyonu İçin Kullanılan Bitki Türleri	21
2.6.1 Çay (<i>C. sinensis</i>).....	21
2.6.2 Altınbaşçayı (<i>S. bilgerana</i>).....	23
2.6.3 Niğde yoğurtotu (<i>G. nigdeense</i>)	25
2.6.4 Derman otu (<i>P. lanceolata</i>)	27
2.7 Literatür Özeti.....	29
2.8 Tezin Amacı.....	43
BÖLÜM III MATERYAL VE METOT	44

3.1 Araziden Örneklerin Toplanması.....	44
3.2 Bitki Örneklerinin Özütlelerinin Hazırlanması	46
3.2.1 Soxhlet ekstraksiyonu	46
3.3 Kombu Çaylarının Hazırlanması	48
3.4 Anti-mikrobiyal Özelliklerin Belirlenmesi	55
3.5 DPPH Radikal Süpürücü Aktivite Tayini	55
3.6 Bakır (II) İndirgeyici Antioksidan Kapasite Yöntemi (CUPRAC)	56
3.7 İndirgeme Gücü Ölçümü	56
3.8 Total Fenol İçeriği	57
3.9 Anti-kanserojen Aktivitenin Belirlenmesi	57
3.9.1 Kolon adenokarsinoma (CaCo-2) hücre hattının hazırlanması	57
3.9.2 Hücrelerin pasajlanması.....	58
3.9.3 Hücre yoğunluğunun belirlenmesi ve hücre canlılık analizi	58
BÖLÜM IV BULGULAR VE TARTIŞMA	61
4.1 Anti-oksidan Çalışma Sonuçları	61
4.1.1 DPPH radikal süpürücü aktivite	61
4.1.2 İndirgeme gücü ölçümü	66
4.1.3 CUPRAC metodu antioksidan tayini.....	71
4.2 Anti-mikrobiyal Test Sonuçları	79
4.3 Total Fenol İçeriği	89
4.4 Anti-kanserojen Test Sonuçları	92
BÖLÜM V SONUÇLAR.....	103
KAYNAKLAR	105
ÖZ GEÇMİŞ	121
TEZ ÇALIŞMASINDAN ÜRETİLEN ESERLER	122

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Kombucha kültürünün metabolitleri ve faydaları.....	8
Çizelge 4.1. Bitki özütlerinin DPPH giderimi sonuçları	61
Çizelge 4.2. Kombu çayı 1. gün örneklerinin DPPH giderimi sonuçları.....	62
Çizelge 4.3. Kombu çayı 7. gün örneklerinin DPPH giderimi sonuçları.....	63
Çizelge 4.4. Kombu çayı 14. gün örneklerinin DPPH giderimi sonuçları.....	65
Çizelge 4.5. Bitki özütlerinin indirgeme gücü ölçümü sonuçları	66
Çizelge 4.6. Kombu çayı 1. gün örneklerinin indirgeme gücü ölçümü sonuçları	67
Çizelge 4.7. Kombu çayı 7. gün örneklerinin indirgeme gücü ölçümü sonuçları	68
Çizelge 4.8. Kombu çayı 14. gün örneklerinin indirgeme gücü ölçümü sonuçları	70
Çizelge 4.9. Bitki özütlerinin CUPRAC sonuçları	72
Çizelge 4.10. Kombu çayı 1. gün örneklerinin CUPRAC ölçümü sonuçları	73
Çizelge 4.11. Kombu çayı 7. gün örneklerinin CUPRAC ölçümü sonuçları	74
Çizelge 4.12. Kombu çayı 14. gün örneklerinin CUPRAC ölçümü sonuçları	75
Çizelge 4.13. Kombucha örneklerinin <i>E.coli</i> suşunda oluşturduğu zon çapları.....	80
Çizelge 4.14. Kombucha örneklerinin <i>S. enterica</i> subsp. <i>enteritica</i> suşunda oluşturduğu zon çapları	81
Çizelge 4.15. Kombucha örneklerinin <i>S. aureus</i> suşunda oluşturduğu zon çapları.....	83
Çizelge 4.16. Kombucha örneklerinin <i>P. aeruginosa</i> suşunda oluşturduğu zon çapları	84
Çizelge 4.17. Kombucha örneklerinin <i>L. monocytogenes</i> suşunda oluşturduğu zon çapları.....	86
Çizelge 4.18. Total fenolik içeriği ($\mu\text{g GAE/mg}$).....	90
Çizelge 4.19. Siyah çay kombuchanın XTT absorbans değerleri.....	92
Çizelge 4.20. Yeşil çay kombuchanın XTT absorbans değerleri	94
Çizelge 4.21. <i>S. bilgerana</i> kombuchanın XTT absorbans değerleri.....	95
Çizelge 4.22. <i>G. nigdeense</i> kombuchanın XTT absorbans değerleri.....	97
Çizelge 4.23. <i>P. lanceolata</i> kombuchanın XTT absorbans değerleri	98

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Kombucha kültürünün genel görüntüsü	6
Şekil 2.2. Kombuchanın faydalı etkilerinin şematik gösterimi	9
Şekil 2.3. Yavru SCOBY oluşumunun ilk aşamasının görünümü.....	18
Şekil 2.4. Yavru oluşumunu tamamlamış SCOBY görüntüsü.....	18
Şekil 2.5. Kombucha üretimi akış diyagramı	20
Şekil 2.6. Çay (<i>C. sinensis</i>) bitkisinin genel görünümü.....	22
Şekil 2.7. Altınbaşçayı (<i>S. bilgerana</i>) bitkisinin görünümü	25
Şekil 2.8. Niğde yoğurtotu (<i>G. nigdeense</i>) bitkisinin görünümü.....	26
Şekil 2.9. Derman otu (<i>P. lanceolata</i>) bitkisinin görünümü.....	29
Şekil 3.1. Çalışma alanının genel görünümü	44
Şekil 3.2. Örnek bir bitki kurutma görüntüsü	45
Şekil 3.3. Bitki örneklerinin soxhlet ekstraksiyonu genel görünümü.....	47
Şekil 3.4. Rotari evaporatör ile çözücünün uzaklaştırılması	48
Şekil 3.5. Canlı hücrelerin plate içindeki görünümü	59
Şekil 3.6. Kombu çayı örneklerinin hücre kültürüne eklenmesi.....	60
Şekil 4.1. Bitki özütleri DPPH radikal giderici aktivite sonuçları.....	62
Şekil 4.2. Kombu çayı 1. gün DPPH radikal giderici aktivite sonuçları	63
Şekil 4.3. Kombu çayı 7. gün DPPH radikal giderici aktivite sonuçları	64
Şekil 4.4. Kombu çayı 14. gün DPPH radikal giderici aktivite sonuçları	65
Şekil 4.5. Bitki özütleri indirgeme gücü ölçümü sonuçları	67
Şekil 4.6. Kombu çayı 1. gün indirgeme gücü ölçümü sonuçları.....	68
Şekil 4.7. Kombu çayı 7. gün indirgeme gücü ölçümü sonuçları.....	69
Şekil 4.8. Kombu çayı 14. gün indirgeme gücü ölçümü sonuçları.....	70
Şekil 4.9. CUPRAC yöntemi ile Cu(II)-Nc reaktifinin Cu(I)-Nc kelatının oluşumu	71
Şekil 4.10. Bitki özütleri CUPRAC ölçümü sonuçları	73
Şekil 4.11. Kombu çayı 1. gün CUPRAC ölçümü sonuçları.....	74
Şekil 4.12. Kombu çayı 7. gün CUPRAC ölçümü sonuçları.....	75
Şekil 4.13. Kombu çayı 14. gün CUPRAC ölçümü sonuçları.....	76
Şekil 4.14. Kombucha örneklerinin <i>E.coli</i> suşunda oluşturduğu zonların görünümü	80

Şekil 4.15. Kombucha örneklerinin <i>S. enterica</i> subsp. <i>enteritica</i> suşunda oluşturduğu zonların görünümü	82
Şekil 4.16. Kombucha örneklerinin <i>S. aureus</i> suşunda oluşturduğu zonların görünümü	83
Şekil 4.17. Kombucha örneklerinin <i>P. aeruginosa</i> suşunda oluşturduğu zonların görünümü	85
Şekil 4.18. Kombucha örneklerinin <i>L. monocytogenes</i> suşunda oluşturduğu zonların görünümü	86
Şekil 4.19. Liyofilizatların total fenolik içeriği	91
Şekil 4.20. Siyah çay kombucha canlı hücre sayısı	93
Şekil 4.21. Yeşil çay kombucha canlı hücre sayısı	94
Şekil 4.22. <i>S. bilgerana</i> kombucha canlı hücre sayısı	96
Şekil 4.23. <i>G. nigdeense</i> kombucha canlı hücre sayısı	97
Şekil 4.24. <i>P. lanceolata</i> kombucha canlı hücre sayısı	99

SİMGE VE KISALTMALAR

Simgeler	Açıklama
°C	Santigrad derece
g	Gram
mL	Mililitre
µL	Mikrolitre
%	Yüzde
pH	Alkalilik ve asitlik faktörü
Kısaltmalar	Açıklama
DPPH	1,1-difenil-2-pikrilhidrazil
FRAP	Demir indirgeme gücü
CUPRAC	Bakır (II) İndirgeyici Antioksidan Kapasite Yöntemi
XTT	2,3-bis-(2-metoksi-4-nitro-5-sülfofenil)-2H-tetrazolyum-5-karboksianilid

BÖLÜM I

GİRİŞ

Tüm canlı formları, var olmak için besine ihtiyaç duyar. Dünyamızın kütlelerinin ~% 70'ini oluşturan su, yeryüzündeki yaşamın devamı için vazgeçilmezdir. Dolayısıyla ortalama bir yetişkinin vücut kütlelerinin ~% 60'ını oluşturan su, dünyanın en çok tüketilen içeceğidir. Medeniyetin ilerlemesiyle, insan sayısız farklı türde içecek formüle etti. Toplumumuzda içeceklerin önemi o kadar geniş ki, içilecek en az bir madde olmadan hiçbir toplantı hayal edilemez. Bununla birlikte, dünya çapındaki muazzam içecek çeşitliliği, çoğu zaman uygun bilimsel literatürle desteklenmemektedir.

Standart bir sözlük, fermantasyonu şu şekilde tanımlar: “bakteriler, mantarlar ve diğer mikroorganizmalar aracılığıyla kimyasal değişim yoluyla bir şeyleri değiştirmek”. Doğal fermantasyon insanlık tarihinden önce gelir. İnsanların fermantasyondan yararlanmasının ortaya çıkışı, antik çağın sisinde kaybolmuştur. Arkeolojik bulgular, etanol fermantasyonunun ortaya çıkışının ilkel insanların yerleşik hayata geçişine ve tarıma başlamaya teşvik ettiğine işaret etmektedir. Meyve, pirinç ve baldan yapılan bir alkollü içeceğin en eski referansı, Neolitik Çin köyü Jiahu'da MÖ 7000-6600'e, şarap yapımı ise Kafkasya bölgesinde Gürcistan'da yaklaşık MÖ 6000'e kadar uzanmaktadır (McGovern, 2003; McGovern vd., 2004). Fermantasyon, ılıman ve kutup iklimindeki atalarımızın sert kışlarda hayatta kalmasına yardımcı olmuştur. Benzer şekilde, süreç tarih öncesi insanların tropiklerin kuraklık dönemlerine göçsü germelerine yardımcı olmuştur (Swain vd., 2014). Fermantasyon aynı zamanda evlerde, küçük ölçekli gıda endüstrilerinde ve büyük işletmelerde dünya çapında en eski ve yaygın olarak kullanılan gıda koruma yöntemlerinden biridir. Mikrobiyal fermantasyonlar, insan uygarlığının birçok yönünde büyük bir rol oynamıştır ve sonuç olarak her insan toplumu, büyümesinin ve karmaşıklığının her düzeyinde, çeşitli fermente içecek ve yiyeceklerin hazırlanmasında yerel şeker kaynaklarını kullanmanın yollarını keşfetmiştir. Ayrıca, korumaya ek olarak fermantasyonun da genellikle hoş tat, aroma, koku, gelişmiş besleyici değerler ve ortam koşullarında iyi muhafaza kalitesi ile sonuçlandığı bilinmektedir. (Law vd., 2011).

Kombucha; dünya çapında tüketilen, kısmen tatlı, hafif asidik olan fermente alkolsüz bir içecektir ve sağlıklı yaşam bilincine sahip insanlar arasında önemli bir popülerlik

kazanmaktadır (Chakravorty vd., 2016). Kombucha hem siyah hem de yeşil çay kullanılarak hazırlanabilir. Ancak siyah çaydan hazırlanan kombucha en popüler uygulamadır ve kombucha için en çok tercih edilen bileşen olarak kabul edilir. Benzer şekilde, beyaz şeker veya sükröz tercih edilen karbon kaynağıdır (Jayabalan vd., 2014). Fermantasyon, hem maya hem de bakteri konsorsiyumu tarafından mikrobiyal aktivitenin ürünüdür. Sistemde bulunan maya, önce mevcut karbon kaynağını etanole dönüştürür ve daha sonra bakteriler tarafından asitlere dönüştürülmektedir.

Günümüzde yaşanan teknolojik gelişmeler insanoğlunun hayatını olumlu yönde kolaylaştırırken bazı olumsuzlukları da beraberinde getirmiştir. Tıbbi gelişmelerin sonucu olarak pek çok ilaç geliştirilmiş olsa da her geçen gün farklı yeni hastalıklar ortaya çıkmaktadır. Bu durumun sonucu olarak toplum yaşamı olumsuz etkilenmektedir (Apaolaza vd., 2018). Ayrıca modern toplumun iş ve sosyal yaşamda daha aktif hale gelmesi, beslenme alışkanlıklarında üretimden ziyade tüketimin tercih edilmesine yol açmıştır. Buna bağlı olarak da işlenmiş gıdaların, fast-food ürünlerinin ve sağlıksız yiyeceklerin çok fazla tüketilmesinden kaynaklanan sağlıksız yaşam, son zamanlarda yerini, doğal gıdalar, organik ürünler ve sağlıklı tüketim maddelerinin kullanımının tercih edildiği bir döneme bırakmıştır. Kombü çayı antik çağlardan beri kullanılan doğal fermente bir içecektir (Martinez Leal vd., 2018). Ülkemizde kombü çayı fazla bilinmemektedir. Ayrıca bu konu ile ilgili bilimsel çalışmaların pek fazla yapılmadığı görülmektedir. Kombü çayının antik çağlarda ilaç olarak tüketildiği bilinmektedir (Dufresne ve Farnworth, 2000). Kombü çayı genellikle siyah çay ve yeşil çay ile üretilmektedir. Bunun yanı sıra farklı substratlar kullanılarakta üretilen kombü çayları literatürde bulunmaktadır. Bunlara birkaç örnek olarak arpa ve pirinç (Ahmed vd., 2020), geyikotu (*Satureja montana* L.) (Četojević-Simin vd., 2008; Četojević-Simin vd., 2012), adaçayı (*Salvia fruticosa* Mill.), nane (*Mentha piperita* L.) ve ıhlamur (*Tilia cordata*) (Coskun ve Kayisoglu, 2020), robusta kahve (Fibrianto vd., 2020), kırmızı (rooibos) çay (Gaggia vd., 2019), kırmızı ve beyaz çay (Jakubczyk vd., 2020), Afrika hardalı (*Brassica tournefortii*) (Rahmani vd., 2019), peynir altı suyu (Tu vd., 2019), siyah havuç (Ulusoy ve Tamer, 2019), geyikotu (*Satureja montana*), nane (*Mentha x piperita*), ısırğan otu (*Urtica dioica*), yabancı kekik (*Thymus serpyllum*), mürver (*Sambucus nigra*) ve ayva (*Cydonia oblonga*) (Vitas vd., 2019), Köpek üzümü (*Solanum nigrum*) verilebilir.

Bu özellikleri açısından bakıldığında hem tüketim, hem de sağlığa olumlu etkileri açısından Kombu çayı araştırmaları önem kazanmaktadır. Bu tez çalışmasında ise geleneksel olarak üretilen siyah çay ve yeşil çay (*C. sinensis*) ile Niğde ilinde bulunan *S. bilgerana* (endemik), *G. nigdeense* (endemik) ve *P. lanceolata* (endemik değil) bitki örnekleri kullanılarak farklı kombu çayları elde edilmiş ve fermantasyon ürünlerinin anti-mikrobiyal, anti-oksidan ve anti-kanserojenik özellikleri test edilmiştir.



BÖLÜM II

GENEL BİLGİLER VE LİTERATÜR TARAMASI

2.1 Kombu Çayının Tarihi

Kombu çayının kaynağı zaman içinde kaybolmuştur. Kombuchanın MÖ 220'de Tsin Hanedanlığı (Ling Chi) sırasında kuzeydoğu Çin'de (Mançurya) ortaya çıktığına, detoksifiye edici ve enerji verici özellikleriyle önemli bir popüleriteye sahip olmuş olduğuna inanılmaktadır. Kombu adlı bir hekimin, İmparator Inkyo'nun sindirim sistemi rahatsızlıklarını tedavi etmek için çay mantarını MS 414 yılında Kore'den Japonya'ya getirmiş olduğu söylenmektedir. Bu çay daha sonra Japonya'da kombucha yani Dr. Kombu'nun çayı olarak popülerlik kazanmıştır. O dönemde kombu çayının halk arasında yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır. Hatta japon savaşçıların enerji verici ve güçlendirici olarak savaş meydanlarına bile götürmüşlerdir. Dünyanın, doğu ülkeleri ile ticaret yollarını geliştirmeye başlanmasıyla, Mo-Gu ticari adını alan kombucha, hızla Rus ticaret sınıfı arasına girmiştir. Kombu çayı 1800'lerde Rusya'da popüler olmuştur ve birçok kırsal toplulukta etkili bir ilaç olarak kabul edilmiştir. Bu nedenle, muhtemelen Rusya modern kombu çayının beşiğidir. Rusya'da Kombucha kültürüne çay mantarı, içeceğe ise Grib (mantar), "çay kvası" veya açıkça "kvas" denmiştir. Çin, Kore ve Japonya dışında Rusya'nın Kargasok bölgesinde kombucha kültürü ile çay tüketimi çok yaygınlaşmıştır. Kombu çayı daha sonra 19. yüzyılın sonlarında Japonya'da yeniden ortaya çıkmıştır ve "Çay Mantarı" veya "Çay Kvası" olarak adlandırılmıştır. Diğer verilen isimler şu şekildedir; Doğu Çayı, Fungus Japonicus, Olinca, Pichia Fermentans, Cembuya Orientalist, Combucu, Tschambucco, Volga Spring, Mo-Gu, Champignon de longue vie, Teekwas, Kwassan ve Kargasok çayı. Kombu çayı 20. yüzyılın başlarında doğu avrupa ülkeleri arasında ve son olarak da Almanya'da popülerlik kazanmıştır. Almanya'da ortaya çıkan kombu çayı bir metafor olmuştur, Heldenpilz ve Kombuchaschwamm olarak adlandırılmıştır. Bununla birlikte, kombucha kültürü Avrupa'da çay yaprağı ve şeker kıtlığının yaşandığı II. Dünya Savaşı'nda kaybolmuştur. Kombu çayı savaşın ardından 1950'lerde Fransa'ya ulaşmıştır ve Kuzey Afrika'nın Fransız kolonilerinde popülerlik kazanmıştır. Kombu çayı savaş sonrası bir başka metafor Funkochinese olarak İtalya'ya ulaştığında, gizemli doğu kökenli sağlıklı bir içecek olarak oldukça hızlı bir şekilde popüler hale gelmiştir. Kombu çayı toksik olduğu söylentisinin yayıldığı 1950'lere kadar

dünyanın her yerinde yüksek talep gören doğal sağlıklı bir ürün haline gelmiştir. Bunun bir sonucu olarak, İsviçreli bilim insanları tarafından araştırma başlatılmıştır, yapılan araştırmalar sonucunda kombucha içmenin yoğurt yemeye benzer şekilde faydalı olduğu 1960'larda bildirilmiştir (Jayabalan vd., 2014). 1986'da Rusya'da meydana gelen Çernobil felaketinden sonra, düzenli olarak yapılan hasar tespit çalışmalarında, kombu çayı tüketen insanların nükleer radyasyon etkilerine karşı dirençli oldukları görülmüştür.

Kombucha hakkında daha az bilgi olmasının tarihsel nedenlerinden birisi de içecek ve çay mantarı ile ilgili etnik dini inanç ve tabular olmuştur. Bu durum özellikle kombu çayını ortaya çıktığı Asya ülkelerinde görülmüştür. Kombu çayı genellikle ibadet yapılan tapınaklarda hazırlanmıştır. Moravya manastırlarının fermente edilmiş içecek Olinca'yı çok sıkı korunan bir sır olarak sakladığına dair güçlü kanıtlar tespit edilmiştir. Bu uygulama, zamanla kombu çayının ilahi bir uygulama haline gelmesine yol açmıştır.

Kombu çayı son yıllarda popülaritesini yeniden kazanmıştır ve şu anda ticari üretimi yapılarak dünyanın her yerinde bulunan perakende mağazalarında satışı yapılmaktadır. Ayrıca kombu çayı tüketenlerin kombucha kültürünü ticari olarak temin etmeleri ile evde de hazırlayarak tükettikleri bilinmektedir.

2.2 Kombu Çayının Biyolojik Bileşimi

Kombucha kültürü büyük bir zar gibi oluşmaktadır ve literatürdeki adı SCOBY olarak bilinmektedir. SCOBY İngilizce adı olan Symbiotic Colony of Bacteria and Yeast (simbiyotik bakteri ve maya kolonisi) baş harflerinden oluşmaktadır. SCOBY çeşitli maya ve bakteri türlerini içeren zoogleal bir mattır. Kombucha kültüründeki bakteri ve mantar arasında oluşan simbiyotik ilişki, kontaminant bakterilerin büyümesini etkili bir şekilde engellemektedir (Liu vd., 1996). Kombucha kültürü içerisindeki baskın bakteri cinsleri Asetobakter ve Glukonasetobakterlerdir. SCOBY kültürü yapısındaki mikroorganizmaların analizleri sonucunda baskın asit bakterisinin *Acetobacter xylinum* olduğu belirlendi (Marsh vd., 2014). Diğer asit bakterileri arasında *Acetobacter xylinoides*, *Bacterium gluconicum*, *Acetobacter pasteurianus* ve *Acetobacter aceti* bulunmaktadır (Liu vd., 1996). Bu bakteriler asetik asit üretirler ve sirke aroması verirler. Son araştırmalar ile *Gluconacetobacter* sp. A4 (Wang vd., 2010), *Gluconobacter oxydans* (Kurtzman vd., 2001), *Acetobacter nitrogenifigens*, *Gluconacetobacter kombuchae*

(Dutta ve Gachhui, 2006) ve *Komagataeibacter* (Chakravorty vd., 2016) gibi yeni bakteri suşları tanımlanmıştır.



Şekil 2.1. Kombucha kültürünün genel görüntüsü

Kombucha mikrobiyotası, çeşitli kültürlerin sekans temelli analizinde büyük bir mantar çeşitliliği göstermiştir (Marsh vd., 2014). Kombucha kültürü içerisindeki yaygın maya türleri *Zygosaccharomyces bailii*, *Saccharomyces ludwigii*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Kloeckera apiculata*, *Brettanomyces bruxellensis*, *Brettanomyces lambicus*, *Brettanomyces custersii*, *Candida stellata*, *Pichia fermentans*, *Torulasporea delbrueckii*, *Saccharomyces bisporus* (Balentine vd., 1997; Liu vd., 1996; Markov vd., 2001; Ramadani ve Abulreesh, 2010) ve *Brettanomyces clausenii*'dir (Jayabalan vd., 2008a).

2.3 Kombu Çayının Metabolitleri

Kombucha içeceğindeki önemli miktardaki fonksiyonel moleküller, içeceği çok yönlü biyokimyaya sahip bir ürün haline getirmektedir. Bu tür moleküllerin insan metabolizmasını hızlandırma kapasitesine sahip olduğu kanıtlanmıştır. Kombu çayı metabolitlerinin çoğunun substrat maddeden geldiği bilinmektedir. Kombucha bir dizi polifenoller, flavonoller (theaflavinler ve thearubiginler), kateşinler, kafein, kateşin galatlar, adenin, teobromin, teofilin, gallik asitler, tanenler ve gallotannin içerir ve bu da onu potansiyel olarak yüksek antioksidan özelliğe sahip karmaşık bir sistem haline

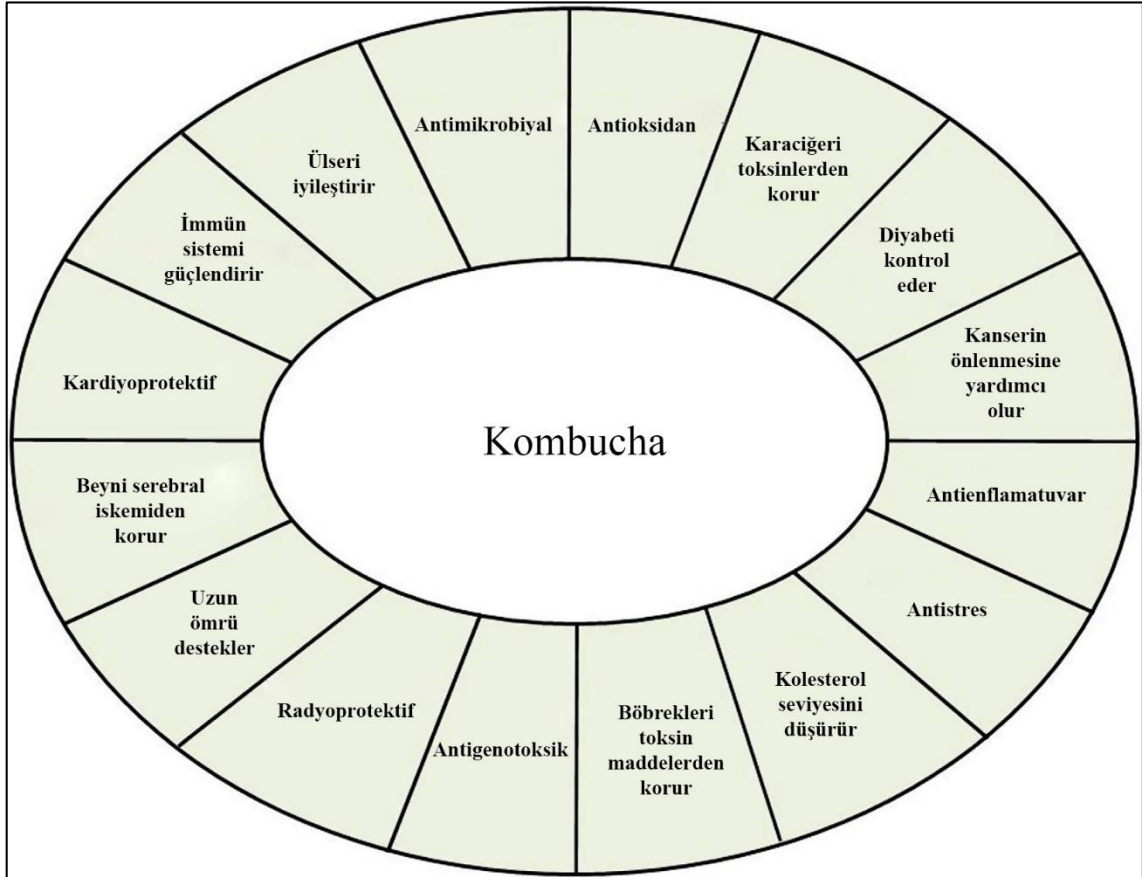
getirmektedir. Bir molekülün antioksidan aktivitesi, serbest radikal temizleme özelliğinin ölçüsüdür. Ayrıca izomerik yapıya, flavonoid halkalara bağlı gruplara ve bunların polimerizasyon derecesine de bağlıdır (Loganayaki vd., 2013). Bu metabolitlerin birçoğunun yapısı dönüştürülür ve kombucha çayının asit-alkolik fermantasyonu sırasında yeni yapılar oluşur. Fermente demlemede oluşan yeni fonksiyonel bileşikler arasında asetik asit, laktik asit, glukonik asit ve glukuronik asit karakteristik olanlardır. SCOBY'de mayalar tarafından salgılanan invertaz enzimleri, şeker substratını monomerlerine, yani glikoz ve fruktoza hidrolize eder ve ayrıca bunları glikoliz yoluyla etanole dönüştürür. Jayabalan vd. (2014) yaptığı çalışmada; sitrik asit, tartarik asit, malonik asit, oksalik asit, süksinik asit, pirüvik asit, B kompleks vitaminleri, temel mineraller, askorbik asit, amino asitler, biyojenik aminler, pürinler, antibiyotikler gibi diğer ürünlerin de oluşturulduğu bildirmiştir. Biyolojik moleküllerin oluşumlarının kesin mekanizması henüz tanımlanmamıştır. Karakteristik olmayan metabolitlerin yanı sıra bu özelliklerin değişken oluşu ve oranları, çoğunlukla SCOBY'deki mikrobiyal dağılım, substrat olarak kullanılan maddelerin bileşimi, şeker konsantrasyonu ve fermantasyon oranındaki farklılık olduğu düşünülmüştür. Kombucha çayında bulunan metabolitlerin birçok sağlığı geliştirici aktivitesi tanımlanmıştır. Kombucha tüketicilerinin fizyolojik yollarındaki tüm kombucha çayı metabolitlerinin tam metabolizması henüz ayrıntılı olarak çalışılmamıştır. Bununla birlikte, kombucha içeceğinin biyoaktif potansiyeli ile ilgili bir dizi genel beslenme özellikleri ve faydaları incelenmiştir. Kombucha çayının metabolitlerinin etkileri Çizelge 2.1'de listelenmiştir.

Çizelge 2.1. Kombucha kültürünün metabolitleri ve faydaları

Metabolitler	Biyolojik Etkileri	Kaynak
Çeşitli enzimler	Güçlü bir antioksidan olan glutatyon gibi enzimler üretir. Normal metabolik fonksiyon için gerekli	(Tietze, 1996)
Asetik asit	Detoksifikatör: antiseptik ve zararlı bakterileri baskılayıcı	(Blanc, 1996; Liu vd., 1996)
Karbonik asit	CO ₂ salınımı ve kan pH seviyelerinin düzenlenmesi	(Tietze, 1996)
Folik asit	Kalp hastalığı için bir risk faktörü olan homosisteini azaltır. Yaşlanma, kanser, bağışıklık, hafıza kaybı ve osteoporoz için etkilidir.	(Chandrakala vd., 2019)
Glukonik asit	Kandidiyazis gibi birçok maya enfeksiyonuna karşı etkilidir.	(Blanc, 1996; Liu vd., 1996)
Glukuronik asit	Vücudun güçlü bir detoksifikatörü, cilt dokusunun yaşlanmasını önler.	(Blanc, 1996; Liu vd., 1996)
Glukarik asit	Kanserin önlenmesinde rol oynar.	(Blanc, 1996; Liu vd., 1996)
Laktik asit	Detoksifikatör, kan dolaşımına yardımcı olur, bağırsak çürümesini ve kabızlığı önler, Vücuttaki asit ve alkalinin dengelenmesine, kanserin önlenmesine yardımcı olur; normal sindirim süreçlerine yardımcı olur.	(Blanc, 1996; Liu vd., 1996)
Sitrik asit	Bir askorbik asit türevidir.	(Jayabalan vd., 2014)
Oksalik asit	Hücreler arası enerji üretimine katkı sağlar.	(Jayabalan vd., 2014)
Butirik asit	Hücre zarlarını korur	(Thornton vd., 1996)
Malik asit	Vücudun detoksifikasyonunda karaciğere yardımcı olur.	(Srihari ve Satyanarayana, 2012)
Usnik asit	Virüsleri inhibe eder. antiviral, antipatozoal, antimitotik, antiinflamatuvar ve analjezik aktivite gösterir.	(Blanc, 1996)
d-sakkarik asit	Antioksidan, oksidatif stresi azaltır.	(Wang vd., 2010)
Amino asitler (çeşitli)	Yaşlanma önleyici özellikler içerir.	(Chandrakala vd., 2019)
Vitamin B1 (Tiamin)	Artrit durumlarının önlenmesi, ateroskleroz, kanser, serbest radikal hasarı, cilt yaşlanması, felç, beyin hücresi yaşlanması ve bağışıklık sistemi uyarıcısı olarak rol oynar.	(Bauer-Petrovska ve Petrushevska-Tozi, 2000)
B2 Vitamini (Riboflavin)	Alerjilerin ve artrit durumları önlenmesinde rol alır.	(Bauer-Petrovska ve Petrushevska-Tozi, 2000)
B3 Vitamini (Niasin, niasinamid)	Artrit durumları, saç dökülmesini ve serbest radikal hasarını önler	(Chandrakala vd., 2019)
B6 Vitamini (Piridoksin)	Ateroskleroz, serbest radikal hasarı, obezite, romatizma ve felcin önlenmesinde rol alır.	(Bauer-Petrovska ve Petrushevska-Tozi, 2000)
B12 Vitamini (Kobalamin, siyanokobalamin)	Hafıza ve öğrenme işlevlerinde yardım eder.	(Bauer-Petrovska ve Petrushevska-Tozi, 2000)
C vitamini	Sağlığa faydalı pek çok bilinen özelliği vardır.	(Bauer-Petrovska ve Petrushevska-Tozi, 2000)
Epikateşin (EK), Epigallokateşin (EGK), Epigallokateşin gallate (EGKG), Gallokateşin (GK) ve Gallokateşin gallate (GKG) gibi kateşinler	Güçlü antioksidan aktivite gösterir ve serbest radikallerin neden olduğu oksidatif stresle mücadele eder.	(Jayabalan vd., 2007; Lobo vd., 2017)
Beta-glukan (hücre zarı bileşeni)	Güçlü bir serbest radikal temizleyici, insülin uyarıcısı ve bağışıklık sistemi tepkisini teşvik eder.	(Thornton vd., 1996)

2.4 Kombu Çayının Faydalı Yönleri

Kombucha kullanımının insan sağlığı üzerine çok fazla olumlu etkileri olduğu bilinmektedir. Kombuchanın sağladığı faydalı etkiler başlıca antioksidan, antidiyabetik, hepatoprotektif, antimikrobiyal, antienflamatuvar ve antikanser özellik olarak sıralanabilir.



Şekil 2.2. Kombuchanın faydalı etkilerinin şematik gösterimi (Chakravorty vd., 2019)

2.4.1 Antioksidan özelliği

Oksidatif stres, çeşitli patolojik durumların patofizyolojisine önemli bir katkıda bulunur (de Araújo vd., 2016). Antioksidatif özelliklere sahip moleküller, oksidatif stres ile ilişkili hastalıklar için terapötik ajanlar olarak bilinmektedir. Son zamanlarda, sentetik antioksidanların, geleneksel gıdalar ve antioksidan moleküller içeren doğal kaynaklardan türetilen ilaçlar gibi doğal alternatiflerle değiştirilmesine çok dikkat edilmiştir (Kumari vd., 2011). Kombuchanın antioksidan özelliği birçok araştırmacı tarafından

araştırılmıştır. Jayabalan vd. (2008b) yaptıkları çalışmada yeşil çay, siyah çay ve çay atık maddelerinden hazırlanan kombuchanın güçlü serbest radikal temizleme aktivitesine sahip olduğunu bildirmiştir. Bu çalışmada kombucha örneklerinin; DPPH radikali, süperoksit radikali ve hidroksil radikali üzerindeki süpürücü aktivitesi gösterilmiştir. Gramza-Michałowska vd. (2016) yaptıkları çalışmada beyaz, yeşil, sarı ve siyah çaydan hazırlanan Kombucha içeceğinin anti-radikal kapasitesini incelemiştir. En yüksek toplam fenolik içerik ve DPPH radikal süpürme kabiliyeti sarı çay ile hazırlanan kombucha örneklerinde tespit edilmiştir. Malbaša vd. (2011) asetik bakteri kültürü ve *Zygosaccharomyces* sp., asetik bakteri kültürü ve *Saccharomyces cerevisiae* ve geleneksel kombucha kültüründen oluşan üç farklı başlangıç kültürü ile yeşil çay ve siyah çayı kullanarak hazırladıkları kombucha çayının hidroksil ve DPPH radikallerine karşı antioksidan aktiviteleri üzerindeki etkisini araştırmışlardır. En yüksek antioksidan aktivite asetik ait ve *Zygosaccharomyces* sp. kombinasyonu ile hazırlanan kombucha çayında gözlenmiştir. Ayrıca geleneksel kombucha kültürü kullanılarak hazırlanan yeşil çay kombucha örneğinde ise maksimum biyoaktivite sağlanmıştır. Chakravorty vd. (2016) yaptıkları çalışmada bir radikal olan nitrik oksit temizleme aktivitesini ortaya koymuşlardır. Kombucha ayrıca kurşun ve kromat kaynaklı oksidatif strese karşı güçlü antioksidan aktivite göstermiştir. Örneklerin çoğunda, kombucha çayının antioksidan aktivitesinin fermente edilmemiş çaydan daha yüksek olduğu bulunmuştur. Bazı düşük molekül ağırlıklı bileşenlerin üretildiği ve çay polifenollerinin fermantasyon sırasında Kombucha konsorsiyumunun enzimleri tarafından yapısal olarak modifiye edildiği varsayılmıştır. Kombucha içeceğinin biyolojik aktivitesinin fermantasyon süresi ile arttığı bulunmuştur. Bu nedenle, biyolojik aktivitenin kapsamı, esas olarak kombucha hazırlamak için kullanılan substratın türüne, kombucha kültürünün mikrobiyal bileşimine ve metabolitlerin yapısını belirleyen fermantasyon süresine bağlıdır. Bununla birlikte, uzun süreli fermantasyon, doğrudan tüketildiğinde zararlı olabilecek organik asitlerin birikmesine neden olmaktadır. Bu özelliklerinden dolayı, kombucha kültürü ile hazırlanan fermente içecek, uygun şekilde hazırlanması ve korunması koşuluyla, birçok patofizyolojik koşul için bir antioksidan kaynağı olarak kullanılabilir.

2.4.2 Antidiyabetik özelliği

Diabetes mellitus, 2019 yılı itibariyle dünya çapında 463 milyon insanı etkileyen ve 2030'a kadar 578 milyon insanı etkileyeceği öngörülen en yaygın endokrin hastalıktır

(Saeedi vd., 2019). İnsülinin sekresyonunda, etkisinde veya her ikisindeki sorunlardan kaynaklanan hiperglisemi ile karakterize bir hastalıktır. Oksidatif stres, diyabette önemli bir rol oynar, diyabetik komplikasyonların ilerlemesine ve farklı organ hasarına yol açar (Asmat vd., 2016). Diyabetik oksidatif strese karşı koruma olarak birçok antioksidan veya antioksidan içeren gıda araştırılmış ve bazı antioksidanların diabetes mellitusta oksidatif stresi azaltmak konusunda önemli rol oynadığı bildirilmiştir (Ghosh vd., 2016; Pal vd., 2015). Geleneksel fermente bir içecek olan ve birçok antioksidan molekülü içeren kombuchanın antidiyabetik aktiviteye sahip olduğu bulunmuştur (Shenoy, 2000). Kombuchanın oral uygulaması, hem alloksan hem de streptozotosin (STZ) ile indüklenen diyabetik sıçanlarda kan şekeri seviyesini düşürmüştür (Aloulou vd., 2012; Bhattacharya vd., 2013; Srihari vd., 2013b). Ayrıca diyabetik sıçanlarda kilo kaybını da engellediğini görülmüştür (Morshedi vd., 2006). Srihari ve Satyanarayana (2012) yaptıkları çalışmada deney hayvanlarının kombucha ile beslenmesinin glikolize hemoglobini (HbA1c) önemli miktarda azalttığını, streptozotosin uygulaması ile azalan doku glikojen, hemoglobin ve plazma insülin seviyesini arttırdığını, glikoz-6-fosfataz, fruktoz-1,6-bifosfataz gibi glukoneojenik enzimlerin ve heksokinaz gibi glikolitik enzimlerin değişen aktivitelerini önemli ölçüde tersine çevirdiğini ortaya koymuşlardır. Bhattacharya vd. (2013) yaptıkları çalışmada diyabetik hayvanlarda kombuchanın lipid peroksidasyonun son ürünleri, protein karbonil içeriği, glutasyon içeriği gibi alloksan ile indüklenen oksidatif stresle ilgili parametreleri ve pankreastan salgılanan antioksidan enzimleri, böbrek, kalp ve karaciğer dokularını etkili bir şekilde onardığını bildirmişlerdir. Ayrıca kombuchanın alloksan enjekte edilmiş diyabetik sıçanların pankreas dokusundaki DNA parçalanmasını iyileştirebileceğini ve kaspaz-3 aktivasyonunu inhibe edebileceğini gösterdiler. Kombuchanın antiglikasyon aktivitesinin de fermantasyon süresi ile arttığı bulunmuştur. Bu durumun fermantasyon sırasında bakteriler veya mayalar tarafından üretilen antioksidan özellik gösteren metabolitlerin üretiminden dolayı kaynaklandığı düşünülmektedir (Chakravorty vd., 2016). Hosseini vd. (2016) yaptıkları çalışmada yeşil ve siyah çaylardan hazırlanan kombuchanın diyabetik sıçanların kan şekeri ve lipid profili düzeylerine etkisinin karşılaştırmalı çalışmasını gerçekleştirmiş ve yeşil çaydan hazırlanan kombuchanın siyah çaydan hazırlanan kombuchadan daha iyi olduğunu göstermişlerdir. Tüm bu çalışmalar, kombuchanın diyabet ve ikincil komplikasyonlarının tedavisi ve önlenmesi için potansiyel bir fonksiyonel gıda olarak düşünülebileceğini göstermektedir.

2.4.3 Hepatoprotektif özelliği

Karaciğer, tüm omurgalılar için detoksifikasyonda büyük rol oynayan önemli bir organdır. Karaciğerin en bol bulunan hücreleri olan hepatositler, eksojen kimyasallar ve toksin metabolizmasında önemli rol oynar ve bundan dolayı karaciğer toksik maddeler için bir hedef haline gelir (Ghosh vd., 2016; Pal vd., 2015). Hepatoproteksiyon, toksik maddelerle karaciğerde oluşan hasarı önleyebilme yeteneği olarak tanımlanmaktadır (Adewusi ve Afolayan, 2010). Kombuchanın karbon tetraklorür (Murugesan vd., 2009), kadmiyum klorür (Ibrahim, 2013), TBHP (tert-butil hidroperoksit) (Bhattacharya vd., 2011b), tiyoasetamid (Kabiri ve Setorki, 2016), trikloroetilen (Gharib ve Gharib, 2008), asetaminofen (Abshenas vd., 2012; Wang vd., 2014), aflatoksin B1 (Jayabalan vd., 2010) ve parasetamol (Pauline ve Kavimani, 2001) gibi çeşitli çevresel kirleticiler ve toksinlere karşı hepatoprotektif aktivitesini göstermek için hücre hatları ve hayvan modelleri üzerinde birçok çalışma yapılmıştır. Tüm bu çalışmalarda, kombuchanın karaciğer toksik maddelerinin toksik etkilerini etkili bir şekilde iyileştirebildiği gösterilmiştir. Yakın zamanda yapılan bir çalışmada kombuchanın obez farelerin hepatik steatoz geliştirmesini ve ardından karaciğer hasarını önlediğini gösterilmiştir (Hyun vd., 2016). Ancak yukarıda belirtilen tüm çalışmalarda kombuchanın konsantrasyonu, doz sayısı, tedavi süresi ve uygulama şekli farklıydı. Kombuchanın hepatoprotektif etkinliği serum glutamik piruvat transaminaz, serum glutamik oksaloasetik transaminaz, alkalın fosfataz vb. enzimler ile indirgenmiş glutatyon, antioksidan enzim aktiviteleri, nitrik oksit seviyeleri ve karaciğer dokusunun histopatolojik analizi gibi karaciğer toksisitesi ile ilişkili belirteçler ölçülerek incelenmiştir. Sonuçlara göre, kombuchanın tüm bu parametreleri kombucha kültürü ile fermente edilmemiş siyah çaydan daha verimli bir şekilde normalleştirebileceği gösterilmiştir. Kombucha tarafından sağlanan hepatoproteksiyon mekanizması, karaciğerdeki hem antioksidan hem de detoksifikasyon süreçlerini kolaylaştırma kabiliyetine bağlanabilir. Dahası, kombuchanın hepatoprotektif etkisinde yer alan ayrıntılı moleküler mekanizmaların araştırılması, antiapoptotik yeteneğinin mitokondriye bağımlı yolağı baskılama özelliği ile ortaya çıkarıldı (Bhattacharya vd., 2011a). Kombuchanın fermantasyonu sırasında mikroorganizmalar tarafından üretilen enzimler, bakteriyel asitler ve diğer ikincil metabolitler vücudu detoksifiye etme yeteneği sergilemiştir (Dufresne ve Farnworth, 2000). Birçok bilimsel çalışma, kombuchanın detoksifikasyon yeteneğinin, esas olarak karaciğerdeki toksinlere bağlanabilen ve onları vücuttan atmaya teşvik eden glukuronik asit varlığına atfedildiğini bildirmiştir (Nguyen

vd., 2014). Böylece, kombuchanın oksidatif stresin yol açtığı hepatotoksisiteye karşı önleyici ve iyileştirici bir ajan olarak kullanılabilceği sonucuna ulaşılmaktadır.

2.4.4 Antimikrobiyal özelliği

2.4.4.1 Antibakteriyel

Kombucha potansiyel bir antimikrobiyal kaynak olarak kabul edilmiş ve farklı patojenik mikroorganizmalara karşı inhibe edici etkinliği birçok araştırmacı tarafından çalışılmıştır. Steinkraus vd. (1996) yaptıkları çalışmada kuru çay (4,36 g/L) ve % 10 sakaroz içeren fermente çay içeceğinin, fermantasyonun ana ürünü olan asetik asitin neden olduğu etkinin ötesinde hiçbir antibakteriyel etki göstermediğini belirledi. Greenwalt vd. (1998) yaptıkları çalışmada toplam 33 g/L asit içeriğinde 7 g/L asetik asit içerecek şekilde fermente edilen kombucha örneklerinin, *S. aureus*, *Bacillus cereus* gibi gram-pozitif ve *E. coli*, *S. choleraesuis* serotip *typhimurium* ve *Agrobacterium tumefaciens* gibi gram-negatif organizmalara karşı yüksek antimikrobiyal aktivite gösterdiğini belirlemişlerdir. Sreeramulu vd. (2001) yaptıkları çalışmada kombuchanın *Enterobacter cloacae*, *P. aeruginosa*, *Aeromonas hydrophila*, *E. coli*, *S. enteritidis*, *S. typhimurium*, *Yersinia enterocolitica*, *Shigella sonnei*, *Campylobacter jejuni*, *H. pylori* gibi farklı patojenik gram-negatif bakterilere ve *B. cereus*, *S. epidermidis* ve *S. aureus* gibi gram-pozitif bakterilere karşı inhibitör aktivite uyguladığını bulmuşlardır. Talawat vd. (2006) siyah çaydan hazırlanan kombuchanın, Japon yeşil çayı, dut çayı, yasemin çayı ve oolong çayından hazırlananlara kıyasla en yüksek antibakteriyel aktivite gösterdiğini bildirmişlerdir. *Vibrio parahaemolytica*'nın *Vibrio cholerae*, *S. typhi*, *P. aeruginosa*, *Vibrio harveyi*, *Vibrio alginolyticus* ve *Vibrio vulnificus* gibi birçok insan ve karides patojeni arasında en duyarlı olduğu bulunmuştur (Talawat vd., 2006). Ayrıca, 21 gün boyunca hem yeşil hem de siyah çayların fermente edilmesi ile hazırlanan kombucha örnekleri, gram-pozitif *S. epidermidis*, *S. aureus*, *Micrococcus luteus* ve *L. monocytogenes* ve gram-negatif *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. Typhimurium* (LT2) gibi çeşitli insan patojenik mikroorganizmalarına karşı antimikrobiyal etkinlik göstermiştir ve yeşil çaydan hazırlanan kombucha daha fazla antimikrobiyal aktivite sergilemiştir (Battikh vd., 2012). Ayrıca *Melissa officinalis* L. fermantasyonu ile hazırlanan kombucha örneklerinin gram-pozitif *S. aureus* ve *B. cereus* bakterilerine ve gram-negatif *S. enteritidis*, *E. coli*, *Proteus mirabilis*, *P. aeruginosa* ve *Erwinia carotovora* bakterilerine karşı güçlü

antimikrobiyal aktivite gösterdiği belirlenmiştir (Četojević-Simin vd., 2012; Velićanski vd., 2007). *E. coli*, *P. aeruginosa* ve *S. enterica serovar typhimurium* gibi Gram-negatif basillere ve *Enterococcus faecalis*, *M. luteus*, *S. aureus* ve *S. epidermidis* gibi Gram-pozitif basillere karşı hem yeşil çayın hem de siyah çayın 12 gün fermantasyonundan hazırlanan kombucha örneklerinin önemli antibakteriyel aktivite sergilediği gözlenmiştir (Deghrigue vd., 2013). Son zamanlarda yapılan bir çalışmada, 14 gün fermente edilen siyah çay kombuchanın enterotoksijenik *E. coli*, *V. cholerae*, *Shigella flexneri* ve *S. typhimurium*'a karşı maksimum antibakteriyel aktivite gösterdiği bildirilmiştir. *V. cholerae*'nin kombucha uygulamasına en duyarlı bakteri olduğu tespit edilirken, *S. Typhimurium*'un en dirençli bakteri olduğu tespit edildi (Bhattacharya vd., 2016).

2.4.4.2 Antifungal

Sreeramulu vd. (2000) yaptıkları çalışmada siyah çay kullanılarak hazırlanan kombucha çaylarının *Candida albicans*'a karşı inhibe edici aktivitesini bildirdi. Ancak aynı çalışmada kombuchanın *Z. Bailii*'ye karşı inhibe edici aktivitesi olmadığı gösterildi. Hem yeşil hem de siyah çayların 21 günlük fermantasyonu sonucu elde edilen kombucha örneklerinin *Candida krusei* hariç *C. albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, *Candida glabrata*, *Candida dubliniensis* ve *Candida sake*'nin büyümesini inhibe ettiği gözlenmiştir (Battikh vd., 2012). Bu nedenle, kombuchanın farklı Gram-pozitif ve Gram-negatif patojenik mikroorganizmalara karşı güçlü antimikrobiyal aktivite gösterdiği bulunmuştur. Kombuchanın farklı gram-pozitif ve gram-negatif patojenik mikroorganizmalara karşı güçlü antimikrobiyal aktivite gösterdiği bulunmuştur. Greenwalt vd. (1998) yaptıkları çalışma ile kombuchanın antimikrobiyal aktivitesine, kombuchanın önemli bir antimikrobiyal bileşiği olan asetik asitin katkıda bulunduğunu iddia etmişlerdir. Ancak Sreeramulu vd. (2000) ve Battikh vd. (2013) kombuchanın antimikrobiyal aktivitesinden asetik asit veya diğer organik asitlerin yanı sıra polifenoller, bakteriyosinler, proteinler, enzimler vb. gibi diğer biyoaktif bileşenlerin de sorumlu olabileceğini öne sürmüştür. Dahası, Bhattacharya vd. (2016), yaptıkları çalışmada 14 günlük kombuchanın etil asetat ekstraktının önemli antimikrobiyal aktivite gösteren bir polifenolik fraksiyonunu bildirdi. Bu fraksiyonun katekin ve izorhamnetinden oluştuğu tespit edilmiştir. Bu bulgu, kombuchanın antimikrobiyal aktivitesinin, içeriğinde bulunan bol miktarda polifenollerden kaynaklandığının bir göstergesidir.

2.4.5 Antienflamatuvar özelliği

Birçok araştırmacı, farklı deneysel model sistemleri kullanarak kombucha ieeğinin antienflamatuvar aktivitesini araştırmıştır. Siyah ayın fermente edilmesinden hazırlanan kombuchanın erkek Sprague-Dawley albino sıçanlarında kromat (VI) uygulamasının neden olduğu oksidatif strese karşı önemli aktiviteye sahip olduğu bulunmuştur. Kromat uygulaması, glutasyon peroksidaz, katalaz aktivitelerini, plazma ve doku malondialdehit (MDA) seviyelerini önemli ölçüde artırdı ve gecikmiş aşırı duyarlılık (DTH) yanıtını azalttı. Bununla birlikte, kombucha ile beslenen sıçanlarda bu değişikliklerin tamamen tersine döndüğu gözlemlendi (Ram vd., 2000). Siyah ay fermantasyonu ile hazırlanan kombucha örneklerinin, lipid peroksidasyonunu (MDA seviyeleri) ve DNA hasarını azaltarak, azalmış glutasyon ve glutasyon peroksidaz aktivitesindeki artışla ilişkili antioksidan enzim seviyelerini artırarak erkek Sprague-Dawley albino sıçanlarında kurşun kaynaklı oksidatif strese karşı antienflamatuvar aktivite göstermiştir (Dipti vd., 2003). Siyah aydan elde edilen kombucha erkek albino sıçanlarda trikloroetilen kaynaklı nefrotoksisiteye karşı koruyucu aktivite göstermiştir (Gharib, 2009). 2010 yılında yapılan histopatolojik ve biyokimyasal çalışmalar ile siyah çay fermantasyonu ile hazırlanan kombuchanın erkek İsviçre albino farelerinde nonsteroid antiinflamatuvar ilaç (NSAID) indometasin ile indüklenen mide ülserine karşı iyileştirici etki üretebileceğini tespit edildi. Ayrıca antioksidan aktivitesinin, mide mukusunu koruma kabiliyetinin ve içecek tarafından mide asidi salgılanmasının azaltılmasının, ülser iyileştirme yeteneklerinin arkasındaki önemli hususlar olabileceği sonucuna vardılar (Banerjee vd., 2010). Ayrıca, siyah çay fermantasyonu ile hazırlanan kombucha örneklerinin, diři C57BL/6 farelerinde deneysel otoimmün ensefalomyelit modelini multipl skleroz için iyileştirmiştir (Marzban vd., 2015). Ayrıca, her ikisi de 12 gün fermente edilen siyah çay ve yeşil çay kombucha antioksidan aktivitesi sayesinde yetişkin erkek Wistar sıçanlarında hiperkolesterolemik diyete karşı koruyucu etkiler gösterdi (Bellassoued vd., 2015). Yakın zamanda yapılan bir çalışmada, meşe yapraklarından hazırlanan kombuchanın NO düzeylerini düşürerek uyarılmış makrofajlardaki lipopolisakkaritlerde (LPS), tümör nekroz faktöründe (TNF)- α ve interlökin-6'da (IL-6) güçlü antiinflamatuvar aktivite ürettiğini göstermiştir (Vázquez-Cabral vd., 2017). Kombuchanın antiinflamatuvar aktivitesi temel olarak çeşitli fenolik bileşiklerine ve flavonoidlerine atfedilmiştir (Banerjee vd., 2010; Bellassoued vd., 2015).

2.4.6 Antikanser özelliği

Kombucha kullanımının kişisel gözlemlere ve tanıklıklara dayanarak uzun yıllar antikanser aktiviteye sahip olduğu iddia edildi. Rusya'da, Merkez Onkolojik Araştırma Birimi ve Rusya Bilimler Akademisi tarafından 1951'de yapılan bir popülasyon çalışması, kombuchanın antikanser özelliği olduğunu iddia etti (Dufresne ve Farnworth, 2000; Jayabalan vd., 2014). Ćetojević-Simin vd. (2008) HT-29 (kolon adenokarsinoma), HeLa hücreleri (serviks epitel karsinoma) ve MCF-7 (göğüs adenokarsinoma) gibi farklı hücre hatlarında sulforhodamin B kolorimetrik testi kullanarak geleneksel siyah çay ve geyikotundan (*Satureja montana* L.) hazırlanan birkaç kombucha örneğinin antiproliferatif aktivitesini inceledi. Yazarlar, hem geyikotu kombuchanın hem de geleneksel siyah çay kombuchanın antiproliferatif özelliklerinin karşılaştırılabilir olduğunu belirttiler ve ayrıca geyikotundan elde edilen kombuchanın, geyikotunun su özütlerinden daha aktif antiproliferatif bileşenlerden oluşabileceği sonucuna vardılar. Ayrıca, her biri 100 µg/mL konsantrasyonda dimetil 2-(2-hidroksi-2-metoksipropiliden) malonat ve viteksin içeren siyah çaydan hazırlanan kombuchanın etil asetat özütünün 786-O üzerinde önemli sitotoksik etkiler oluşturduğu bulunmuştur. Uygulama ek olarak A549 hücrelerinde matris metaloproteinaz-2 (MMP-2) ve 786-O hücrelerinde matris metaloproteinaz-9 (MMP-9)'un etkilerindeki azalmayı takiben, A549 (insan akciğer karsinoma), U2OS (insan kemik osteosarkomu) ve 786-O (insan böbrek karsinoma) hücrelerinde hücre invazyonu (metastaz) ve hücre hareketliliğinde azalma ile sonuçlandı (Jayabalan vd., 2011). Yakın zamanda yapılan bir çalışma, siyah çayın fermente edilmesinden hazırlanan liyofilize kombucha özütünün, siklooksijenaz-2, matris metaloproteinaz, endotelial büyüme faktörü, interlökin-8 ve insan indüklenbilir faktör-1α gibi anjiyogenez uyarıcılarının ekspresyonunu azaltarak prostat kanseri hücre hattı PC-3'ün hücre canlılığını önemli ölçüde azalttığını göstermiştir. Bu nedenle kombucha farklı anjiyojenik uyarıcıların ekspresyonunu değiştirerek anjiyogenezin inhibisyonuna neden olabilir (Srihari vd., 2013a). Yeşil çaydan hazırlanan kombuchanın insan kanser hücre hatları A549 ve Hep-2'ye (epidermoid karsinoma) karşı önemli sitotoksik aktivite gösterirken, siyah çaydan hazırlanan kombuchanın sadece Hep-2'ye karşı etkili olduğu bulunmuştur (Deghrigue vd., 2013). Çođu araştırmacı tarafından mutabık kalınan kombuchanın antikanser aktivitesinin olası mekanizmaları başlıca; (1) kanser hücresi proliferasyonunun inhibisyonu; (2) gen mutasyonunun inhibisyonu; (3) metastazın sona ermesi ve (4) kanser hücresi apoptozunun uyarılması olarak sıralanmaktadır (Jayabalan

vd., 2014). Polifenoller, glukuronik asit, glukonik asit, laktik asit, vitamin C gibi vitaminler ve d-sakkarik asit-1,4-lakton (DSL) gibi çeşitli bileşiklerin varlığı kombuchanın antikanser özelliklerine katkıda bulunabilmektedir (Deghrigue vd., 2013).

2.5 Kombu Çayının Hazırlanma Teknikleri

Sükroz ile tatlandırılmış siyah çayın, kombucha içecek fermantasyonu için ideal substrat olduğu düşünülmektedir. Yeşil çay, siyah çayın popüler bir alternatifidir. Eklene SCOBY kültürünün miktarı ve boyutu da değişebilir. Jayabalan vd. (2014) yaptıkları çalışmada standart bir yöntem oluşturmuşlardır. Oluşturulan standart metodun akış diyagramı Şekil 2.3'te gösterilmektedir. Kombuchanın hazırlanması kısaca, 50 g sukroz, 1 L kaynar musluk suyunda çözülür. Bununla birlikte, 70 g/L'lik konsantrasyon da, çoğu kombu çayı araştırmacısı tarafından yaygın bir şekilde uygulanmaktadır (Gaggia vd., 2019; Malbaşa vd., 2011; Martínez-Leal vd., 2020). Hazırlanan solüsyona 5 gr çay yaprağı eklenir, karıştırılır ve 5 dakika sonra elenerek çıkarılır. Alternatif olarak, işlemi kolaylaştırmak için çay poşetleri de kullanılabilir (Morshedi vd., 2006). Karışım, 24 g kombucha kültürü inoküle edilmeden önce 20°C'ye soğutulur. pH'ı düşürmek için önceden fermente edilmiş kombucha içeceğinden 200 mL eklenir. Düşük pH (<4,6) istenmeyen kontaminasyonu önler. Drosophila meyve sinekleri asidik tatlı solüsyonlara saldırır ve sıklıkla onları kontamine ederler. Bu tür bir kontaminasyonu önlemek için, kombuchanın fermantasyona bırakıldığı cam kavanozun ağzı kağıt havlu veya tül bir bez ile kapatılır. Karışım daha sonra 18°C ile 28°C sıcaklık aralığında inkübe edilir. Birkaç gün içinde inoküle edilmiş olan SCOBY mayasından "yavru" SCOBY çıkar ve karışım içerisinde asılı durur. Yavru SCOBY, anne SCOBY'nin tepesinde yüzen şeffaf, ince jel benzeri bir zardır ve belirli noktalarda anne SCOBY'ye bağlanabilir. Bu aşamada farklı gaz kabarcıkları ve fermente koku hissedilir. Fermantasyonun ilerlemesi ile anne SCOBY, fermantasyon kabının dibine batma eğilimi gösterir. Yavru SCOBY, düşük pH seviyesiyle birlikte, inkübasyonun 10 ila 14. Günü itibari ile boyut olarak artar ve sıvının yüzeyini kaplar. Süre, SCOBY kompozisyonuna ve fermantasyon hızına bağlı olarak değişebilir. Daha sonra yavru SCOBY tahta bir kaşıkla dikkatlice çıkarılır ve kurumasını önlemek ve ileride kullanmak için az miktarda fermente çay içinde saklanır. Kalan fermente kombucha süzülür, kapaklı şişelere doldurulur ve tüketim için 4°C'de saklanır. Çapraz kontaminasyonu önlemek için şişeleri sterilize etmek gerekir. Araştırmacılar, kombuchada gerekli etanol ve laktik asit üretimi için 50 g sukroz/L solüsyonun optimum

olduğunu belirtiyor. Bununla birlikte, en iyi kalite ve güvenli kombu ayı için fermantasyon suresinin optimize edilmesi gerekliliği de onerilmektedir.



Şekil 2.3. Yavru SCOBY oluşumunun ilk aşamasının görünümü

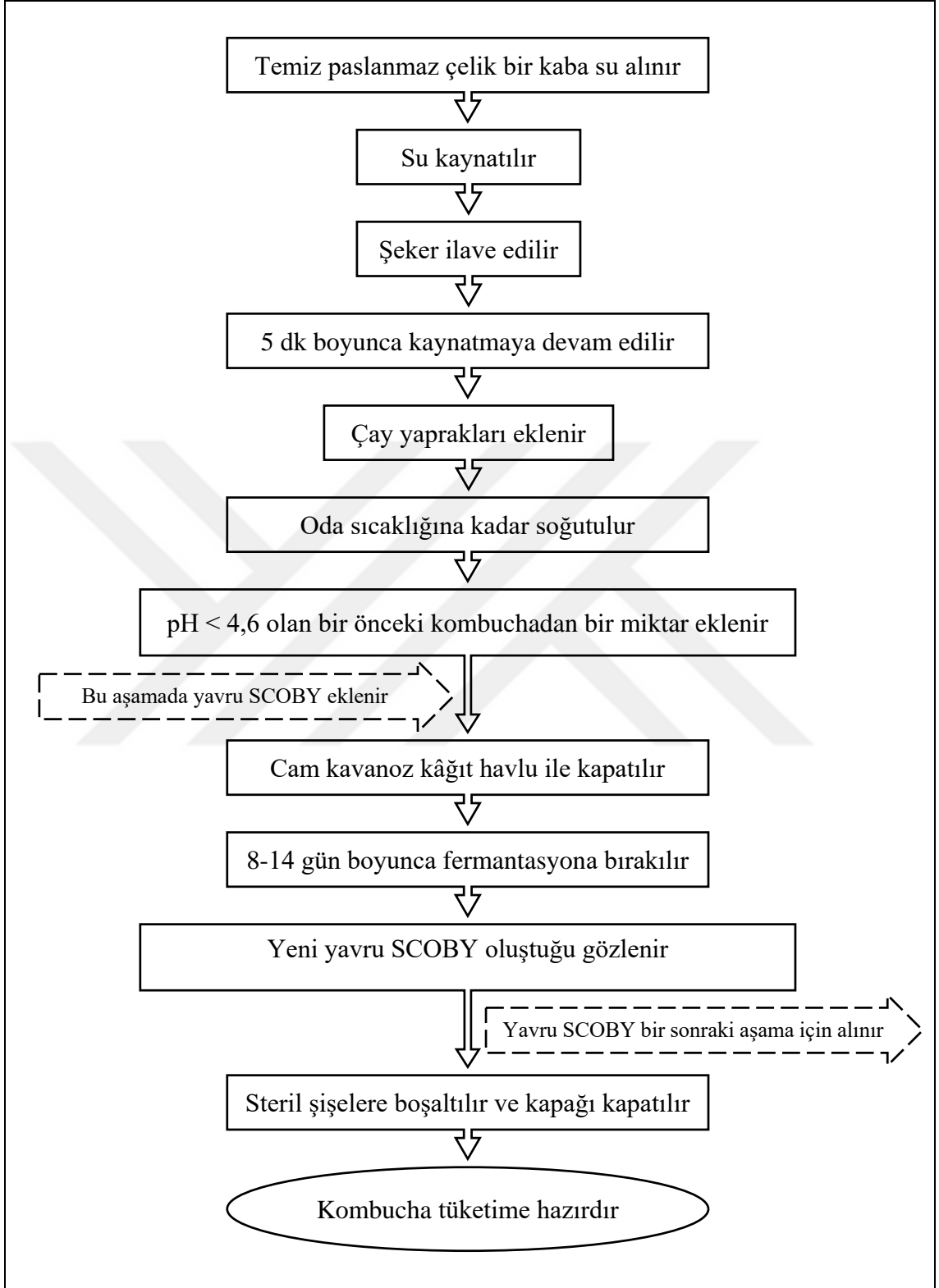


Şekil 2.4. Yavru oluşumunu tamamlamış SCOBY grntŐ

Malbaša vd. (2006) yaptıkları çalışmada siyah çay fermantasyonunu farklı boyutlardaki fermantasyon kaplarına göre ölçeklendirmiş ve kombucha fermantasyonu değişkenlerini ve kapların geometrik şekli ile pH'ı değiştirmiştir. Benzer geometriye sahip büyük ölçekli kaplar, pH değişiminin bir fonksiyonu olarak kap boyutu ile işlem süresi arasında korelasyon gösterdi. Yüksek hacimli kombucha çayı fermantasyonu mantar, elektrik, makine ve arazi kira giderlerinin girdi maliyetlerini önemli ölçüde azaltabilir (Mohammadshirazi ve Kalhor, 2016). Pek çok modern kombucha fabrikası, endüstriyel ölçekli üretim için büyük ölçekli toplu fermantasyon sistemleri kurdu. Evsel ölçekli yöntem ve fermantasyon koşulları, büyük ölçekli işlemler için hemen hemen aynı kalmış olsa da, ürün güvenliği için büyük özen gösterilmelidir. İdeal olarak temiz su, fermente cihazının ve şişelerin verimli sterilizasyonu sağlanmalıdır. Çözünmüş mineraller, tuz ve alkali içeren sert su, SCOBY'nin büyümesini engelleyebilir. Otomatik fermantasyon cihazı kullanılmazsa ve geniş ağızlı bir kaptaki fermantasyon yapılırsa, fermantasyon sırasında kabın ağzı bir kağıt havlu ile kapalı tutulmalıdır. Havlu kuru steril olmalıdır. Kapak, böcek ve havadaki mikropları önlemek için uygun ve yeterli olmalı, ancak gaz geçişine izin vermelidir. Kombucha fermantasyonu, karakteristik asitleri ve metabolitleri üretmek için fermantasyon sırasında oluşan kısmi aerobik koşulları ve yeterli CO₂ salınımını gerektirmektedir.

Alternatif olarak kombucha kültürlerinin fermantasyon sonucu alındığı ve ikincil fermantasyon olarak adlandırılan bir fermantasyonda vardır. Bu fermantasyon türünde 14 günlük fermantasyonun ardından karışımdaki kombucha kültürleri alınarak sıvı içerisinde bulunan mikroorganizmaların daha fazla karbondioksit ürettiği bir süreç olarak tanımlanır. Bazı ev kullanıcıları bu aşamada meyve parçaları ilave ederek ikincil fermantasyonun kombuchayı daha lezzetli ve kaliteli bir içecek haline getirdiğini belirtmektedir.

Şekil 2.5. Kombucha üretimi akış diyagramı



2.6 Kombucha Fermantasyonu İçin Kullanılan Bitki Türleri

2.6.1 Çay (*C. sinensis*)

Antik çağlardan beri bitkiler doğal ilaç kaynağı olarak kullanılmıştır. Nüfus artışından dolayı kaynaklanan sentetik ilaçlarda yeterli ilaç temini ve yan etkide yüksek tedavi maliyetlerinden dolayı insanlar ilaç kullanımına karşı bir direnç göstermeye başlamıştır ve bunun sonucunda hastalıkları tedavi etmek için bitkilerin kullanımına önem artmıştır. *C. sinensis*, yaprakları ve yaprak tomurcukları Çin çayı üretmek için kullanılan bitki türüdür. Theaceae familyasından bir çiçekli bitki cinsi olan *Camellia* cinsindedir. Beyaz çay, yeşil çay, oolong ve siyah çay bu türden hasat edilir, ancak farklı oksidasyon seviyelerine ulaşmak için farklı şekilde işlenir. Kukicha (dal çayı) da *C. sinensis*'ten hasat edilir, ancak yapraklar yerine ince dallar ve saplar kullanır. Yaygın isimler arasında çay bitkisi, çay ağacı ve çay çalıları bulunur.

Yeşil çay, Theaceae familyasına ait *C. sinensis* çay bitkisinden elde edilir. Çay dünyada sudan sonra en çok tüketilen içecektir. Yeşil çay, fermente edilmemiş bir çaydır ve siyah çay veya oolong çayından daha fazla kateşin içerir. Kateşinler *in vitro* ve *in vivo* güçlü antioksidanlardır. Ayrıca içerdiği bazı mineral ve vitaminler de bu tür çayın antioksidan potansiyelini artırır. Halen dünya çapında en az 30 ülkede yetiştirilmektedir. Çay içeceği, *C. sinensis*'in kurutulmuş yapraklarının infüzyonudur. Hindistan ve Çin'deki denemelerde yaygın olarak kullanılan tıbbi bir bitkidir ve Ayurveda, Unani ve Homeopati gibi çeşitli yerel tıp sistemlerinde popülerdir Yeşil çay Hindistan, Çin, Japonya ve Tayland'da çağlar boyunca tüketilmiştir. Çay bitkisinin bilimsel sınıflandırması aşağıdaki gibidir;

Âlem	: Plantae (Bitkiler)
Bölüm	: Magnoliophyta (Kapalı tohumlular)
Sınıf	: Magnoliopsida (İki çenekliler)
Takım	: Ericales
Familya	: Theaceae (Çaygiller)
Cins	: <i>Camellia</i>
Tür	: <i>C. sinensis</i>

C. sinensis, Çin, Güney ve Güneydoğu Asya'ya özgüdür, ancak bugün dünya çapında tropikal ve subtropikal bölgelerde yetiştirilmektedir. Yaprakları için ekildiğinde genellikle iki metrenin altına kadar kesilen yaprak dökmeyen bir çalı veya küçük ağaçtır. Güçlü bir kazık kökü vardır. Çiçekler, sarı-beyaz, 2,5-4 cm çapında, 7-8 yapraklıdır. *C. sinensis* ve *C. oleifera* tohumları, tıbbi ve kozmetik amaçlar için kullanılan ve bitkinin yapraklarından elde edilen uçucu bir yağ olan çay ağacı yağı ile karıştırılmaması gereken tatlı bir baharat ve yemeklik yağ olan çay yağı elde etmek için preslenebilir. Yapraklar 4-15 cm uzunluğunda ve 2-5 cm genişliğindedir. Genç, açık yeşil yapraklar tercihen çay üretimi için hasat edilir; altlarında kısa beyaz tüyleri vardır. Yaşlı yapraklar daha koyu yeşildir. Farklı yaprak yaşları, kimyasal bileşimleri farklı olduğu için farklı çay kaliteleri ortaya çıkarır. Genellikle uç (tomurcuk) ve ilk iki ila üç yaprak işlenmek üzere hasat edilir. Bu işlem her iki haftada bir tekrarlanır.



Şekil 2.6. Çay (*C. sinensis*) bitkisinin genel görünümü

Çay bitkisinin dünya çapında yaygın olarak kullanılan bazı isimleri;

Hindistan: Chha

Çin: Cha

Rusya: Chai

Afrika: Itye

İtalya: Te

İngiltere: Tea plant

ABD: Tea

Çayın yaklaşık 4000 biyoaktif bileşik içerdiği bildirilmektedir, bunların üçte biri polifenollerin katkıda bulunmaktadır (Mahmood vd., 2010). Diğer bileşikler alkaloidler (kafein, teofilin ve teobromin), amino asitler, karbonhidratlar, proteinler, klorofil, uçucu organik bileşikler (kolayca buhar üreten ve çayın kokusuna katkıda bulunan kimyasallar), florür, alüminyum, mineraller ve eser elementlerdir (Cabrera vd., 2003). Çayda bulunan polifenoller çoğunlukla flavonoidlerdir (Sumpio vd., 2006). Kateşinleri de içeren büyük bir bitki kimyasalları grubu olan polifenollerin, geleneksel olarak çaya, özellikle yeşil çaya atfedilen sağlığa faydalarından sorumlu olduğu düşünülmektedir (Cabrera vd., 2006).

Başlıca kateşinler epikateşin gallat (EKG), epikateşin (EK), epigallokateşin (EGK) ve epigallokateşin gallattır (EGKG). Yeşil çaydaki en aktif ve en bol kateşin epigallokateşin-3-gallattır (EGKG). Siyah çay, bu kateşinlerin yeşil çaydan daha düşük oranda konsantrasyonlarını içerir (Wu ve Yu, 2006). Oolong çayı, kateşinler ve kompleks polifenoller gibi basit polifenollerin bir karışımını içerir. Siyah, yeşil ve oolong çayı son derece iyi C vitamini kaynaklarıdır (Mahmood vd., 2010).

2.6.2 Altınbaşçayı (*S. bilgerana*)

Cins adı olan *Sideritis* L., antik çağlarda metal kullanılarak yapılan silahların neden olduğu yaraları iyileştirmek için kullanılmasına atıfta bulunularak Yunanca “sideros” (demir) kelimesinden türemiştir. Bu iyileştiri özelliğe ek olarak, *Sideritis* türleri, antiinflamatuvar, anti-ülserojenik, sindirim ve antimikrobiyal özellikleri nedeniyle yüzyıllardır popüler bir şekilde kullanılmaktadır (González-Burgos vd., 2011). *Sideritis* cinsi Labiateae familyası içerisinde yer almaktadır. Bu cins, Kuzey Yarımküre'nin ılıman ve tropikal bölgelerinde, Bahamalar'dan Batı Çin'e ve Almanya'dan Fas'a kadar çok geniş bir yayılım gösteren 150'den fazla türü içermektedir. Türlerin çoğu, Kanarya Adaları ve Madeira'dan Kafkasya'ya kadar Akdeniz bölgesinde bulunur; İspanya ve Türkiye en fazla sayıda farklı türe sahiptir. *Sideritis* (Lamiaceae) cinsi Türkiye'de 40'ı endemik olan 60 tür ile temsil edilmektedir.

Sideritis türleri halk arasında tıbbi ve aromatik özelliklerinden dolayı kullanılmıştır. *Sideritis* türleri Anadolu'da hem tıbbi amaçlı hem de aromatik özelliklerinden dolayı çay olarak kullanılmış olup, "dağ çayı" veya "yayla çayı" olarak isimlendirilmiştir. Halk arasında tıbbi olarak sedatif (yatıştırıcı), sinir sistemi düzenleyici, antiinflamatuvar, antispazmodik, diüretik, bağırsak sistemi düzenleyici olarak kullanılmaktadırlar (Ertan vd., 2001; Özcan vd., 2001). Akdeniz bölgesinde yetişen *Sideritis condensata* Boiss. & Heldr. bitkisi mide ve kalp problemlerinin giderilmesinde kullanılmaktadır (Davis, 1982). Ayrıca *S. mugronensis*'in arteriyel kan basıncını düşürdüğü ve otonom sinir sistemi üzerinde etkili olduğu açıklanmıştır (Başer vd., 1986).

Sideritis cinsinde kimyasal bileşeninde; terpenler, flavonoidler, uçucu yağlar, iridoidler, kumarinler, lignanlar ve steroller gibi birçok kimyasal bileşen tanımlanmıştır. Farmakolojik aktivitenin ana sorumlusu olan diterpenler, flavonoidler ve uçucu yağlar hemen hemen her türde bulunmaktadır (González-Burgos vd., 2011).

Altınbaşçayının bilimsel sınıflandırılması aşağıdaki gibidir;

Âlem : Plantae (Bitkiler)
Bölüm : Magnoliophyta (Kapalı tohumlular)
Sınıf : Magnoliopsida (İki çenekliler)
Takım : Lamiales
Familya : Lamiaceae (Ballıbabagiller)
Cins : *Sideritis*
Tür : *Sideritis bilgerana*

S. bilgerana çok yıllık otsu yapıdadır. Gövdesi dik yapıda olup 25-110 cm arasındadır. Basit veya nadiren dallanmış, gövdenin alt kısmı yoğun uzun basık tomentoz örtü tüylüken, üst kısımları ise hemen hemen örtü tüysüz veya kısa dik salgı tüylüdür. Yaprakların her iki yüzü yoğun uzun basık örtü ve seyrek küçük salgı tüylüdür. İnternodyumlar 2-7,5 cm boyunda, altta kalanlar ise daha kısadır. Çiçek durumu basit veya dallanmıştır.



Şekil 2.7. Altınbaşçayı (*S. bilgerana*) bitkisinin görünümü (Dereli, 2016)

2.6.3 Niğde yoğurtotu (*G. nigdeense*)

İsmi Yunanca ‘gala’ ve ‘milk’ kelimelerinden alan *Galium* L. cinsinin bazı türleri sütün mayalanmasını sağlar (de Rosa vd., 2000). Alçak yarıçalılar olup çok ya da tek yıllık otlardır. Yapraklar genellikle 4-14 yapraktan oluşan halkalar biçimindedir. Çiçek durumu tirsoid, genişçe panikulat veya indirgenmiştir. Çiçekler genellikle ovaryumdan daha uzun pediselli, brakteolsüz; hermafrodit, nadir olarak poligam veya dioiktir. Kaliks genellikle belirsiz, nadiren kalıcı veya meyvada büyümüştür. Korolla 3-4 parçalı, rotat, kratiformdan infundibulara kadar değişen şekilde, loblar tüpten daha uzun, beyaz, beyazımsı, soluk sarıdan parlak sarıya kadar değişen renklerde, sarımsı-yeşil, pembe veya koyu kırmızımsı-kahverengidir. Stilus bifid veya bipartid küremsi stigmalıdır. Meyve iki kuru merikarplı, merikarplar yarı küresel, ovoid veya silindirik, düz yüzeyli veya kırışık, çıplak veya tüylü (bazen çengel tüylü) nadiren az çok etlidir (Davis, 1982).

Galium cinsi çoğunlukla ılıman bölgelerde görülmekle birlikte alpin ve arktik bölgelerde, daha yüksek yükseltilerde subtropik ve tropik bölgelerde de yayılımı vardır. *Galium* cinsi Türkiye Florası’nda 10 seksiyona bağlı 101 tür (116 takson) ile temsil edilmektedir. Son yıllarda eklenen yeni türler (*G. babadaghense* Yıld., *G. cankireense* Yıld., *G. nigdeense* Yıld., *G. tuncelianum* Yıld., *G. shinasii*) ve 1 alt tür (*G. canum* ssp. *ulukislaense* Yıld.) ile birlikte ülkemizdeki *Galium* cinsine ait takson sayısı 122’ye yükselmiştir ve bunlardan 61’i endemiktir (Güner vd., 2012).

Âlem : Plantae (Bitkiler)
Bölüm : Magnoliophyta (Kapalı tohumlular)
Sınıf : Magnoliopsida (İki çenekliler)
Takım : Gentianales
Familiya : Rubiaceae (Kökboyasıgiller)
Cins : *Galium*
Tür : *Galium nigdeense*

Çok yıllık, çok gövdeli ve alçak yastıkçık şeklinde tabanda odunsudur. Çoklu gövde 2-4 cm kadar, dik, beyaz yayık-pürüzlü ve internodlar 4-5 mm olup yapraklardan daha uzundur. Yapraklar dairesel dizilişli, her nodda 6 adet, 3-4 mm boyunda, şeritsiden-biz şekline değişir, kenarları geriye kıvrık, tek damarlı ve iğnelidir. Çiçek durumu koltuklarda genelde saplı ve çoklu dairesel bir kümedir. En uçtaki dallanmış çiçek durumu braktesizdir. Çiçek sapları 0,5-1,5 mm kadar olup, pürüzlü ve diktir. Kaliks dişli değil. Korolla beyaz tüysüz, petaller yumurtamsı-mızraksı, kenarları içe kıvrık, sivri uçlu, tüysüz ve iç tarafında üç esmer çizgi var. Stamen 4, korollayı aşmaz, filament beyaz, anter sarı ve tüysüz. Meyve bilinmiyor. Çiçeklenme 7-8. aylar. Güçlü kayalarda ve çatlaklarında hayat bulur.



Şekil 2.8. Niğde yoğurtotu (*G. nigdeense*) bitkisinin görünümü

2.6.4 Derman otu (*P. lanceolata*)

Plantaginaceae ailesinin içinde otsu bitkiler ya da bodur çalılar bulunur ve yaprakları basit haldedir. Genel olarak yapraklar bitkinin taban kısmında rozet şeklinde yer alırlar. Yaprak dizilişi oppozit, fasikulat veya alternat şeklindedir. Çiçekler brakteat spikalarda bulunur, 2-4 veya daha çok olabilirler. Ovaryumları üst haldedir (Hipogin). Genellikle hermafrodittirler. Sepaller meyvede kalıcıdır. Korolla gamopetal (simpetal), zarsı özellik gösterir. Stamenler korolla tüpüne gömülüdür. Ovaryum 1-4 lokulusludur. Plasentasyon aksillar veya bazaldır. Ovüller birden fazladır. Genel olarak meyveler kapaklı bir kapsül halinde veya kendiliğinden açılmayan akel halindedir. Tohumlarında endosperm bulunur. Embriyo düzdür.

Plantaginaceae ailesinden olan *P. lanceolata*, tıp alanında yapraklarının tamamı yahut plantago türlerinin polar ekstraktları kullanılarak fitoterapi alanında sindirim ve solunum sistemindeki kanser ile alakalı problemlerin ve ağrıların giderilmesinde kullanılmaktadır. Bunun yanı sıra deri ve enfeksiyon hastalıklarının tedavisinde de kullanıldığı bilinmektedir (Samuelsen, 2000).

P. lanceolata ve *P. major* Türkiye’de en yaygın bulunan türler olup, Anadolu’da yara, çıban ve sivilceler için haricen, kanser, diyabet, idrar yolu enfeksiyonlarında, soğuk algınlığı ve viral enfeksiyonlarında ise çayı tüketilmektedir. Plantago türlerinin yaprakları ve tohumları, Fransa, İtalya, Güney Afrika ve Türkiye gibi ülkelerde salata malzemesi veya çocuk maması olarak tüketilir (Kuranel, 2012).

Bunun yanında Plantago türlerinin antiinflamatuvar, antitümöral, antifungal, antibakteriyel, antispazmodik, analjezik, antiviral ve karaciğeri koruyucu etkileri olduğu bildirilmiştir (Fons vd., 1998). İdrar söktürücü olarak, böcek sokmalarına karşı, güneş yanığı, deri hastalıkları, göz tahrişi, ağız ve boğaz iltihabı yaralarını tedavi etmek amacıyla bu bitkinin yaprakları kullanılmaktadır. Ayrıca soğuk algınlığı, öksürük, ses kısıklığı, astım, amfizem, bronşit, ateş, gastrit, ülser, mesane problemleri, böbrek taşı, bağırsak şikâyetleri, düzensiz adet, hipertansiyon, romatizma ve saman nezlesi gibi hastalıkların tedavilerinde etkili olduğu görülmüştür (Fleer ve Verspohl, 2007). Kurutulmuş tohum suya geçirilmesiyle yatıştırıcı olarak, göz kremi, ishal ve dizanteri

veya çocuklarda bağırsak solucanları için bir tedavi şekli olarak kabul edilmekte ve uygulanmaktadır (Koçak, 2011).

Âlem : Plantae (Bitkiler)
Bölüm : Magnoliophyta (Kapalı tohumlular)
Sınıf : Magnoliopsida (İki çenekliler)
Takım : Lamiales
Familya : Plantaginaceae (Sinirotugiller)
Cins : *Plantago*
Tür : *Plantago lanceolata*

P. lanceolata yaprakları, tahrişi azaltmak için öksürük şurupları içine katılmaktadır. Taze bitkiden elde edilen maseratlar, sıvı ekstraktları ve şurupları ağız ve boğaz iltihabı tedavisinde ve iltihaplı cilt içinde kullanılmaktadır (Koçak, 2011). Özellikle, *P. major* Türkiye’de ülser tedavisinde kullanılmaktadır. Kurutulup toz haline getirilmiş yaprakları sabah kahvaltısından önce bal ile karıştırılarak yenmektedir. Yapılan in vivo deneylerde sulu ve metanolik ekstraktların karışımının (1,2 g/kg) gastrik ülser oluşumunu % 40 azalttığı belirlenmiştir (Yesilada, 1993).

Boyu 7-90 cm uzunluğunda çok yıllık otsu bir bitkidir. Yapraklar rozet halinde, mızraklı şeklinde, belirgin 3-7 damara sahip, bütün kenarlı ve kenarı kısa diş yapısına sahiptir. Yaprakları çıplak ve tüylüdür. Yaprak rozet durumu ortasından dik ve yapraksız gövde çıkar. Bu yapının uç kısmında küçük ve silindirik yapılı çiçek gelişir. Çiçekler 4 parçalı, beyaza yakın veya soluk sarı renklidir. Çanak yapraklar kiremitvari kapanmıştır ve kaburgalıdır. Taç yayvan veya yuvarlaktır. Ovaryum 2-4 gözlüdür. Her bir gözünde 1-çok sayıda tohum tomurcuğu vardır. Meyve kapsül tipindedir (Dawis, 1982). Halk arasında ince yapraklı damar otu olarak bilinmektedir. Tabanda çok sayıda rozet biçiminde yaprakları bulunan çok yıllık bir bitkidir (Şekil 2.9). Çiçeklenme zamanı nisan-ekim aylarıdır. Deniz kıyılarında, kumlu sahillerde, çayırlarda, bataklıklarda, dere kenarlarında, koruluk alanlarda, Pinus ormanlarında, 1-3000 m yükseklik aralığında yayılış gösterir. Hemen hemen Türkiye’nin her yerinde yayılış gösterir (Davis, 1982).

P. lanceolata daha çok çayırlar bahçeler, tarlalar ve yol kenarında, özellikle nem oranının yüksek olduğu açık alanlarda hiçbir müdahale gerektirmeden, kendiliğinden yetişen bir

bitki türüdür. Organik bileşiklerin bol bulunduğu nemli topraklarda daha fazla büyüme hızına sahiptir. Bu bitkinin tohumları doğada çok uzun süre canlı kalabilme özelliğine sahiptir.



Şekil 2.9. Derman otu (*P. lanceolata*) bitkisinin görünümü

2.7 Literatür Özeti

Kombu çayı yüzyıllardır geleneksel olarak siyah çay ve yeşil çay fermente edilerek hazırlanmaktadır. Siyah çay ve yeşil çay aynı bitkiden geldiği için ortak substrat olduğu söylenebilir. Kombucha kültürü ile farklı bitki örneklerinden infüze edilen sakkaroz içeren karışımın fermente edildiği bilinmektedir. Hatta sadece bitki örnekleri değil başka organik bileşikler de kullanılmıştır. Literatürde bu çalışmalara sıklıkla rastlanmaktadır. Bu bölümde literatürde farklı substratla kullanılarak hazırlanan kombu çaylarının bir derlemesi bulunmaktadır. Bu bölümün derlemesinde her bir çalışmanın kombucha hazırlarken kullandığı yöntemler ve yaptıkları çalışmalar dikkate alınmıştır.

Četojević-Simin vd. (2008) yaptıkları çalışmada siyah çay ve geyikotu (*Satureja montana* L.) bitkilerini substrat olarak kullanarak kombucha hazırlamışlardır. Kombucha hazırlamak için kullandıkları protokol şu şekildedir; 1 litre musluk suyuna 70 g sukroz

ilave ederek 5 dakika kaynatılmıştır. Ardından 5 gram kurutulmuş bitki örneğini eklenip 15 dakika demlenmeye bırakılmıştır. Demlenme ardından bitki örneklerinin süzülerek sıcaklığı yaklaşık 30°C olana kadar oda sıcaklığında soğuması beklenmiştir. Daha sonra %10 inokulasyon ile kombucha kültürü eklenmiş ve 28°C’de fermantasyona bırakılmıştır. Kombu çayı tüketilebilir optimum asitlik derecesine ulaşınca kadar (3,5-4,5 g/L) fermantasyona bırakılmıştır. Çalışma ekibi hazır hale gelen kombu çaylarının kuru ağırlıklarını siyah çay kombuchada 65,8 mg/mL ve geyikotu kombuchada (*Satureja montana* L.) 70,8 mg/mL olarak belirlemişlerdir. Hazırlanan kombucha örneklerinin antiproliferatif etkisini belirlemek için uygun konsantrasyonlara (0.0195-10 mg/mL) dilüe etmişlerdir. Daha sonra 0,22 µm filtreden geçirerek mikroorganizmaların geçmesini önlemişlerdir. Daha sonra hazırladıkları konsantrasyonlardaki kombucha örneklerini HT-29 (kolon adenokarsinoma), HeLa hücreleri (serviks epitel karsinoma) ve MCF-7 (göğüs adenokarsinoma) gibi farklı hücre hatlarına uygulamışlardır. Hazırlanan kombucha örnekleri 250 µg/mL konsantrasyonda HT-29 (kolon adenokarsinoma) ve MCF-7 (göğüs adenokarsinoma) hücre hatlarında sırasıyla %15 ve %10 inhibisyon göstermiştir. Bu hücre hatlarında istatistiksel bir fark gözlenmemiştir. HeLa hücreleri (serviks epitel karsinoma) hücre hatlarında ise 1000 µg/mL konsantrasyonlarda 550’ye yakın inhibisyon gözlenmiştir. Hazırlanan kombucha örnekleri arasında istatistiksel olarak ($p \leq 0,05$) anlam belirlenmiştir. Siyah çay ile hazırlanan kombuchanın HeLa hücreleri (serviks epitel karsinoma) hücre hatlarında çok az miktarda geyikotu ile hazırlanan kombuchadan daha fazla antiproliferatif etki gösterdiği belirlenmiştir. Ayrıca hazırladıkları kombucha çaylarının antimikrobiyal özelliklerini belirlemek için Gram negatif bakteriler: *P. aeruginosa* (ATCC 27853), *Proteus mirabilis* (ATCC 35659), *E. coli* (ATCC 25922), *S. enteritidis* (ATCC 13076); Gram pozitif bakteriler: *S. aureus* (ATCC 25923), *Bacillus cereus* (ATCC 10876), *Sarcina lutea* (ATCC 9341); mayalar: *Saccharomyces cerevisiae* (112, Hefebank Weihenstephan), *Candida pseudotropicalis*, *Rhodotorula* spp. ve küfler: *Penicillium aurantiogriseum*, *Aspergillus niger* ve *Aspergillus flavus* kültürleri üzerinde test etmişlerdir. Siyah çay ile hazırlanan kombucha örneklerinden *Proteus mirabilis* hariç bütün patojenlerde antimikrobiyal aktivite belirlenmiştir. *Satureja montana* L. ile hazırlanan kombucha örneklerinden ise *Proteus mirabilis* ve *S. aureus* suşları hariç bütün patojenlerde antimikrobiyal aktivite tespit etmişlerdir. En iyi sonuçlar siyah çay için *S. enteritidis* (12,33 mm çap zon) ve *E. coli* (13,67 mm çap zon) olmuştur. *Satureja montana* L. için ise *S. enteritidis* (13,33 mm çap zon) ve *E. coli* (14 mm çap zon) olmuştur.

Četojević-Simin vd. (2012) yaptıkları çalışmada *Melissa officinalis* L. bitkisi kullanılarak hazırlanan kombucha örneklerinin antimikrobiyal, antiproliferatif, genotoksik ve antigenotoksik özelliklerini çalışmayı amaçlamışlardır. Bu amaç için *Melissa officinalis* L. bitkisini substrat olarak kullanarak kombucha hazırlamışlardır. Kombucha hazırlamak için kullandıkları protokol şu şekildedir; 1 litre musluk suyuna 70 g sukroz ilave ederek 5 dakika kaynatılmıştır. Ardından 5 gram kurutulmuş bitki örneğini eklenip 15 dakika demlenmeye bırakılmıştır. Demlenme ardından bitki örneklerinin süzülerek sıcaklığı yaklaşık 30°C olana kadar oda sıcaklığında soğuması beklenmiştir. Daha sonra %10 inokulasyon ile kombucha kültürü eklenmiş ve 28°C’de fermantasyona bırakılmıştır. Fermantasyon süresini tüketilebilir asitlik derecesi olan 3,5-4,5 g/L olana kadar tutulmuştur. 3 günlük fermantasyon sonucunda asitlik seviyesi 4,56±0,03 g/L haline gelen örnekleri kullanmışlardır. Kuru ağırlığı 47,5 g/L olarak belirlenen örneklerden sırasıyla 0,045, 0,18, 0,73 and 0,295, 1,185, 4,75 µg/mL konsantrasyonda çözeltiler hazırlanmıştır. Fermantasyon süresi sonunda hazır hale gelen kombucha örneklerini 0,22 µm çaplı filtreden geçirerek steril hale getirmişlerdir. Steril hale getirilen kombucha örneklerini gram negatif bakteriler: *P. aeruginosa* (ATCC 27853), *Proteus mirabilis* (ATCC 35659), *E. coli* (ATCC 25922), *S. enteritidis* (ATCC 13076), *Erwinia carotovora* (NCPPB 595); Gram pozitif bakteriler: *S. aureus* (ATCC 25923), *Bacillus cereus* (ATCC 10876), *Sarcina lutea* (ATCC 9341); mayalar: *Saccharomyces cerevisiae* (112, Hefebank Weihenstephan), *Candida pseudotropicalis*, *Rhodotorula* spp. ve küfler: *Penicillium aurantiogriseum*, *Aspergillus niger* ve *Aspergillus flavus* suşları üzerine 100 µL pipetleyerek sonuçları belirlemişlerdir. 3 günlük fermantasyon sonucunda asitlik seviyesi 4,56±0,03 g/L haline gelen örnekleri kullanmışlardır. Sonuç olarak *S. enteritidis*, *E. coli*, *Proteus mirabilis*, *P. aeruginosa*, *Erwinia carotovora*, *S. aureus*, *Bacillus cereus* suşları üzerinde antimikrobiyal etki belirlemişlerdir. En iyi antimikrobiyal etkiyi *Erwinia carotovora* üzerinde 17,83 mm çapta zonla belirlemişlerdir. *S. enteritidis*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *Bacillus cereus* suşları üzerinde ise yaklaşık 14 mm çapta zon olmak üzere antimikrobiyal aktivite tespit edilmiştir. Hazırladıkları kombucha örneklerini HT-29 (kolon adenokarsinoma), HeLa hücreleri (serviks epitel karsinoma) ve MCF-7 (göğüs adenokarsinoma) hücre hatlarına uygulamışlardır. Uygulama süresi 72 saat olarak tutulmuştur. Uygulaması yapılan örnekler bütün hücre hatlarında hücre büyümesini uyarmıştır. Gözlemlenen tüm hücre büyümesi etkileri, daha yüksek konsantrasyonlarda hücre büyümesi inhibisyonunda ortaya çıkan daha düşük konsantrasyonlarda hücre büyümesi uyarımı ile karakterize edilen tipik hormetik, iki fazlı yanıt göstergesi olarak

yorumlanmıştır. Hücre büyümesi üzerindeki en belirgin etki HeLa hücre hattında gözlenmiştir. Hazırlanan kombucha daha düşük konsantrasyon aralığında (1,95–30 µg/mL) HeLa hücre hattında hücre çoğalmasının uyarılmasına neden olmuştur. 100 µg/mL'den yüksek konsantrasyonlarda HeLa hücre hattında hücre büyümesi inhibisyonu gözlenmiştir. Ancak IC20'ye 500 µg/mL konsantrasyonda ulaşıldı. Kombucha ayrıca düşük konsantrasyon aralığında (10 µg/mL'nin altında) MCF7 hücrelerinin büyümesini uyarmıştır, ancak yüksek konsantrasyonda (500 µg/mL) hücre büyümelerini inhibe etmiştir. Kombucha örnekleri, araştırılan konsantrasyon aralığında HT-29 hücre hattının ne büyümesi ne de inhibisyonu üzerinde etki göstermemiştir. Genotoksik ve antigenotoksik etkiler, Çin hamsteri hücre hattı CHO-K1'de kromozom sapma deneyi kullanılarak belirlenmiştir. Hem hasar görmemiş hem de Mitomisin C ile tahrip edilmiş CHO-K1 hücre hatlarında 24 saat Kombucha uygulaması yapılmıştır ve kontrol değerlerine kıyasla kromozom sapma sıklığında konsantrasyona bağlı bir azalmaya neden olduğu gözlenmiştir. Hasar görmemiş hücrelerde kromozom sapma sıklığının azalması, 0.295 µg/mL'den yüksek kombucha konsantrasyonlarında istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenmişti (p <0,05). Mitomisin C 'den zarar görmüş hücrelerde kromozom sapma sıklığının azalması, melisa kullanılarak hazırlanan kombuchanın incelenen tüm konsantrasyonları için oldukça anlamlı bulunmuştur (p<0,001).

Gamboa-Gómez vd. (2016) yaptıkları çalışmada okaliptüs (*Eucalyptus camaldulensis*) ve Meksika defneyaprağı (*Litsea glaucescens*) kullanarak hazırlamış oldukları kombucha örneklerinin antioksidan ve anjiyotensin-dönüştürücü enzim (ACE) inhibitör aktivitelerini araştırmışlardır. Bitki örnekleri oda sıcaklığında kurutulmuştur. Kombucha hazırlamak için 200 mL suyu kaynatmış ve 2 g kuru materyali ekleyerek 10 dk boyunca infüzyona bırakmışlardır. Ardından bitki örneklere süzerek uzaklaştırmışlardır. İnfüzyon edilen karışıma 10 g sakkaroz ekleyerek oda sıcaklığına kadar soğumaya bırakılmıştır. Kombucha kültüründen 2,5 g inoküle edilmiş ilaveten 100 mL daha önceden hazırlanmış kombucha çayı eklenmiştir. Ardından 25°C'de 7 gün boyunca fermantasyona bırakılmıştır. Fermantasyonu tamamlanan örneklerin içinden kombucha kültürü alınıp filtre kağıdı ile süzölmüştür. Antioksidan aktivitenin belirlenmesi için DPPH serbest radikal süpürücü aktivite ve nitrik oksit süpürücü aktivite metodu kullanılmıştır. Okaliptüs ve Meksika defneyaprağı kullanılarak hazırlanan kombucha örneklerinin DPPH süpürücü aktivite sonuçları kontrole ve birbirlerine yakın olarak sırasıyla 2.70±0.01 ve 2.7±0.1 olarak bulunmuştur. Nitrik oksit süpürücü aktivite sonuçları ise

okliptus için 11.4 ± 1.3 ve Meksika defneyaprağı için 5.8 ± 0.8 olarak bulunmuştur. Çalışma ekibi antioksidan özelliğın fermantasyon sürecine bağılı olarak pozitif olarak arttığı sonucuna varmışlardır. Ayrıca nitrik oksit süpürücü aktivite sonuçlarına atıfta bulunarak uygulanan her metodun aynı sonucu vermediğı görüşünü vurgulamışlardır. Son olarak, fermente içeceklerin antihipertansif potansiyeli, anjiyotensin-dönüştürücü enzim (ACE) aktivitesinin inhibisyonu yoluyla *in vitro* değerlendirilmiştir. Okaliptus için ACE inhibisyon değeri 1.08 ± 0.01 olarak bulunurken Meksika defneyaprağı için 2.61 ± 0.01 bulunmuştur. Araştırma ekibi Meksika defneyaprağı ile hazırlanan kombucha örneklerinin antihipertansif etkisinin daha fazla olduğı sonucunu vurgulamışlardır. Bu sonuçla farklı substratlar kullanılarak hazırlanan kombucha örneklerinin *in vitro* olarak antihipertansif etki gösterdiği belirlenmiştir.

Watawana vd. (2016) yaptıkları çalışmada Kral Hindistan cevizi (*Cocos nucifera* var. *aurantiaca*) suyunu kombucha kültürü ile fermantasyona tabii tutmuşlardır. Bu çalışmada kullanılan Hindistan cevizi suyunun ve bu suyun fermantasyonu sonucu oluşan fermente ürünün antioksidan aktiviteleri araştırılmıştır. Bu çalışmada 7 aylık olgunluğa ulaşmış olan Hindistan cevizleri kullanılmıştır. Hindistan cevizlerin suyu çıkarılarak 300 mL'lik 2 porsiyona ayrılmıştır. 1. örnek %3 kombucha kültürü ile inoküle edilerek $24 \pm 3^\circ\text{C}$ 'de 7 gün boyunca fermantasyona bırakılmıştır. 2. örnek ise aynı koşullarda saklanmıştır. Her iki örnek için kontaminasyondan kaçınılmış ve aseptik koşullar sağlanmıştır. Örneklerin Folin-Ciocalteu yöntemi ile total fenolik madde miktarları tayin edilmiştir. Fermantasyona bırakılan örnekte 1. gün sonu itibariyle total fenolik madde miktarlarında artış olduğı gözlenmiştir. Fermente edilmeyen Hindistan cevizi suyu için total fenolik madde miktarı 15 mg GAE/g bulunurken fermente edilen Hindistan cevizi suyunun 26 mg GAE/g bulunmuştur. Antioksidan aktiviteleri belirlemek için demir indirgeme gücü (FRAP), oksijen radikal antioksidan kapasitesi (ORAC), troloks eşiti antioksidan kapasite (ABTS) ve DPPH radikal süpürücü aktivite metodları kullanılmıştır. Sonuçlar incelendiğinde DPPH metodu hariç diğeri tüm yöntemlerde fermente Hindistan cevizi suyunun antioksidan kapasite yeteneğinde ilk günden başlamak kaydı ile doğrusal bir artış olduğı gözlenmektedir. DPPH metodunda ise ilk günden başlayan bir antioksidan özellik düşüşü belirlenmiştir. Araştırmacılar bu çalışmada kombucha kültürü ile fermente edilen ve fermente dilmeyen Hindistan cevizi suyunun antioksidan özelliklerini çalışmış olup, kombucha kültürü ile fermantasyon sonucunda Hindistan cevizi suyunun antioksidan özellik bakımından artış gösterdiği sonucuna ulaşmışlardır.

Pure ve Pure (2016) yaptıkları çalışmada siyah çay, muz kabuğu ve ısırgan otu kullanarak hazırladıkları kombucha örneklerinin antioksidan ve antimikrobiyal özelliklerini araştırmışlardır. Kombucha hazırlamak için 10 g kuru bitkisel materyali 20 g sükröz ile 1 litre suyun içinde 15 dk infüzyona bırakmışlardır. İnfüzyon sonunda bitkisel materyali süzerek uzaklaştırmışlardır. Ardından 30 g aktif kombucha kültürü ve 90 mL kombucha sıvısından ilave edip 21 gün boyunca fermentasyona bırakmışlardır. Fermentasyon sonunda total fenolik içeriklerine bakmışlardır. Total fenolik içeriklerini siyah çay kombucha 265,5, muz kabuğu kombucha 155 ve ısırgan otu kombucha 188 ppm gallik asit olarak bulmuşlardır. Antioksidan aktivite ölçümü için DPPH metodu ile % giderim olarak uygulamışlardır. Hazırladıkları kombucha örneklerinden 2 mL alarak yaptıkları test sonuçlarında radikal giderici aktivite fermente siyah çay için %92,9, fermente muz kabuğu için %94,6 ve ısırgan otu için %92,4 olarak belirlemişlerdir. Antibakteriyel test için *E. coli* ptcc 1395, *S. typhimurium* ptcc 1596, *S. aureus* ptcc 1436, *S. saprophyticus* ptcc 1440, *B. stearothermophilus* ptcc 1359 ve *P. aeruginosa* ptcc 1430 suşlarını kullanmışlardır. Yaptıkları testler sonucunda antimikrobiyal aktivite belirleyememişlerdir.

Artanti vd. (2017) yaptıkları çalışmada kombucha hazırlamak için brokoli (*Brassica oleracea* L.) ve ıspanak (*Amaranthus spp.*) kullanmışlardır. Taze brokoli ve ıspanak akan su altında 5 dk boyunca yıkanmıştır. Ardından 1:4 oranında su ilave edilerek 80°C'de 15 dk boyunca infüzyona bırakılmıştır. Hazırlanan karışım süzölmüştür. Oluşan süzöntü 121°C'de 15 dk otoklavlanmış ve oda sıcaklığına kadar soğutulmuştur. İnfüzyonu tamamlanmış karışımın içine %15 kombucha kültürü ve %10 sükröz eklenip aseptik koşullarda fermentasyona bırakılmıştır. Antioksidan aktivite için DPPH radikal süpürücü aktivite metodu uygulanmıştır. Sonuçlar % giderimi olarak hesaplanmıştır. Sonuç olarak brokoli fermentasyonu ile hazırlanan kombucha örneği %12,51 giderim sağlarken ıspanak ile hazırlanan kombucha %20,80 giderim sağlamıştır. Sonuç olarak brokoli ve ıspanak kullanılarak hazırlanan fermente kombucha ürünlerinde antioksidan özellik gözlenmiştir. Ispanak ile hazırlanan kombucha ürünü daha fazla antioksidan özellik göstermiştir.

Vázquez-Cabral vd. (2017) yaptıkları çalışmada siyah çay ve meşe ağacı yapraklarını kullanarak hazırladıkları kombucha örneklerinin oksidatif strese karşı ve antienflamatuvar özelliklerini araştırmışlardır. Kombucha hazırlamak için 1 g kuru materyali 100 mL su içerisinde 80°C'de 10 dk boyunca infüzyona bırakmışlardır. 4500

rpmde 10 dk santrifüj ettikleri örnekleri 0,5 mm membran filtre yardımıyla süzmüşlerdir. Elde ettikleri süzüntüye %10 sükröz, %2,5 kombucha kültürü ve %10 kombucha ekleyerek 25°C'de 7 gün boyunca fermantasyona bırakmışlardır. Aktive edilmiş monositlerde (makrofajlar) H₂O₂'nin neden olduğu oksidatif hasara karşı numunelerin antioksidan aktivitesi araştırılmıştır. Yapmış oldukları deney sonucunda 2 µg/mL konsantrasyondaki kombucha örneklerinin oksidatif strese karşı sonuçları meşe ağacı yapraklarından hazırlanan kombucha için 998 pmol Nitrat eşdeğeri iken siyah çay ile hazırlanan kombucha için 1003 pmol Nitrat eşdeğeri olarak bulunmuştur. Lipopolisakkarit (LPS) ile uyarılan makrofajlar kullanılarak anti-enflamatuar aktivite belirlenmiştir. Sonuçlar meşe ağacı yaprağı için 1935 pmol TNF alfa eşdeğeri iken siyah çay için 2015 pmol TNF alfa eşdeğeri olarak bulunmuştur.

Gaggia vd. (2019) yaptıkları çalışmada yeşil, siyah ve kırmızı (rooibos, *Aspalathus linearis*) çayı kullanarak hazırladıkları kombucha örneklerinin antioksidan özelliklerini araştırmışlardır. Kombucha örnekleri için 8 g kuru bitki örneğini 1000 mL suda infüzyona bırakarak hazırlamışlardır. Fermantasyon süresinin 7. ve 14. gününde örnekler alıp antioksidan testlerini yapmışlardır. Antioksidan aktiviteyi belirlemek için DPPH radikal süpürücü aktivite ve demir indirgeme gücü (FRAP) metodunu uygulamışlardır. Sonuçlar troloks standart antioksidanına karşı eşdeğerlik olarak ölçülmüştür. DPPH radikal süpürücü aktivite sonuçları fermantasyonun 7. gününde alınan örneklerdeki en yüksek antioksidan aktivite yeşil çayda (1,31±0,01 te/g) görülmüştür. Siyah çayda 0,87±0,01 te/g tespit edilirken kırmızı çayda 0,45±0,03 te/g olarak belirlenmiştir. 14. gün sonuçlarında ise yeşil çayda 0,98±0,01 te/g siyah çayda 0,85±0,02 te/g ve kırmızı çayda 0,41±0,01 te/g olarak ölçülmüştür. Demir indirgeme gücü sonuçları 7. gün fermantasyon ürünleri için yeşil çayda 1,75±0,06 te/g siyah çayda 0,90±0,04 te/g ve kırmızı çayda 0,52±0,01 te/g olarak ölçülmüştür. 14. gün fermantasyon ürünleri için demir indirgeme gücü ölçümleri yeşil çayda 1,13±0,06 te/g siyah çayda 0,86±0,03 te/g ve kırmızı çayda 0,47±0,04 te/g olarak belirlenmiştir. Burada elde edilen sonuçlara göre en iyi antioksidan aktiviteyi 7. günde alınan yeşil çay örneği göstermiştir. İkinci sırada siyah çay bulunurken üçüncü sırada ise kırmızı çay bulunmuştur. 14 günlük fermantasyonun ardından yapılan bütün testlerde antioksidan aktivite oranlarında düşüş gözlenmiştir.

Rahmani vd. (2019) yaptıkları çalışmada Kuzey Afrikadaki insanlar tarafından yaygın tüketilen bir lahana türü olan *Brassica tournefortii* bitkisini kullanarak kombucha

hazırlamışlardır. Bu çalışmada 7 g bitki örneği ile 1 litre kombucha hazırlanmış ve 14 gün fermantasyona bırakılmıştır. Fermantasyon süresi sonucunda alınan örneklerde DPPH radikal süpürücü aktivite metodu kullanılarak antioksidan aktivite belirleme çalışması yapılmıştır. Fermente edilmeden yapılan çalışmada DPPH radikal süpürücü aktivite *Brassica tournefortii* bitkisi için %10 iken kombucha fermantasyonu sonucu %25'e çıkmıştır. Kombucha kültürü ile yapılan fermantasyonun antioksidan kapasiteye etkisi olduğu sonucuna ulaşılmıştır.

Villarreal-Soto vd. (2019) yaptıkları çalışmada fermantasyon şartlarının kombucha üzerindeki sonuçlarını araştırmışlardır. Bu çalışmada siyah çay kullanarak hazırladıkları kombucha örneklerinden 7. ve 14. günde aldıkları numulardan DPPH radikal süpürücü aktivite tayini yapmışlardır. Fermente edilmeyen siyah çay ile karşılaştırılan antioksidan aktivite sonuçlarında 7 günlük fermantasyon ürünü %96,4, 14 günlük fermantasyon ürünü ise % 96,3 olarak tespit edilmiştir. Kombucha kültürü ile fermantasyona maruz bırakılmayan siyah çayın DPPH radikal süpürücü aktivitesi ise %70,9 olarak ölçülmüştür. Sonuç olarak fermantasyona maruz bırakılan siyah çayın antioksidan özelliğinde artış olduğu gözlemlenmiştir.

Tu vd. (2019) yaptıkları çalışmada soya peynir altı suyu kullanarak kombucha hazırlamışlardır. Soya peynir altı suyu Asyada yaygın olarak tüketilen soyafasülyesinden yapılan bir çeşit peynir olan Tofunun hazırlanması sırasında oluşan peynir altı suyu, kombucha üretimi için kullanılmıştır. Hazırladıkları kombucha çaylarının antioksidan ve anti-bakteriyel özelliklerini çalışmışlardır. 1:10 oranında peynir altı suyuyla kombucha hazırlamadan önce otoklavda steril etmişlerdir. %1 oranında siyah çay ile infüze ederek kombucha kültürünü eklemişlerdir. Hazırlanan karışımı 7 gün boyunca fermantasyona bırakmışlardır. Antioksidan aktiviteyi test etmek için DPPH metodu, ABTS radikal süpürücü aktivite, demir indirgeme gücü ölçümü (FRAP) ve indirgeme gücü ölçümü metotlarını kullanmışlardır. Antioksidan testler için farklı konsantrasyonları test etmişlerdir. Test ettikleri konsantrasyonlar 2, 4, 6, 8, 10 mg/mL'dir. Deney sonuçlarının tümünde antioksidan aktivitenin artan konsantrasyon ile doğrusal bir artış gösterdiğini belirlemişlerdir. DPPH metodu sonuçları fermente edilmemiş peynir altı suyu için %5,22 ile %58,25 arasında iken kombucha kültürü ile fermente edilmiş peynir altı suyu için %15,19 ile %93,19 arasında bulunmuştur. ABTS radikal giderici aktivite için sonuçlar fermente edilmemiş peynir altı suyu için %18,31 ile %59,45 arasında iken kombucha

kültürü ile fermente edilmiş peynir altı suyu için %30,01 ile %81,72 arasında bulunmuştur. ABTS radikal süpürücü aktivite için 4 mg/mL konsantrasyona kadar antioksidan aktivitede doğrusal bir artış olmuştur. Bu değerler 4 mg/mL'den fazla konsantrasyonlar için doygunluğa ulaştığından dolayı daha fazla artmamıştır. Demir indirgeme gücü ölçümü (FRAP) sonuçları fermente edilmemiş peynir altı suyu için 15,37 ile 253,24 μM FeSO_4 arasında iken kombucha kültürü ile fermente edilmiş peynir altı suyu için 7,70 ile 681,03 μM FeSO_4 arasında tespit edilmiştir. İndirgeme gücü ölçümü metodunun sonuçları fermente edilmemiş peynir altı suyu için 0,08 iken kombucha kültürü ile fermente edilmiş peynir altı suyu için 0,27 olarak bulunmuştur. Antimikrobiyal aktivitenin belirlenmesi için Gram pozitif: *S. aureus* ATCC6538 ve Gram negatif: *E. coli* ATCC8099 ve *Bacillus subtilis* JMH-1 suşları kullanılmıştır. Hazırlanan suşlar üzerine açılan 9 mm çaptaki kuyucuklara 100 μL örnek ekleyerek sonuçları test etmişlerdir. Hazırlanan kombucha örnekleri bütün suşlarda anlamlı derecede antimikrobiyal etki göstermiştir. Peynir altı suyundan hazırlanan kombucha örnekleri içinde en yüksek antimikrobiyal aktivite *E. coli* üzerinde 190 mm çapta zonla gözlemlenmiştir. Ayrıca *S. aureus*'ta 183 mm ve *Bacillus subtilis* ise 123 mm çapta zon gözlemlenmiştir. Kombucha kültürü ile fermente edilmeyen peynir altı suyunda ise her 3 suş için 90 mm çapta zon gözlemlenmiştir.

Ulusoy ve Tamer (2019) yaptıkları çalışmada siyah havuç (*Daucus carota* L. ssp. *sativus* var. *atrorubens* Alef.), karayemiş (*Prunus laurocerasus*), güvem (*Prunus spinosa*) ve ahududu (*Rubus idaeus*) kullanılarak üretilen kombucha çaylarının antioksidan aktivitelerini araştırmışlardır. Kombucha örneklerini hazırlamak için 98°C'de kaynamış 1 litre musluk suyuna 60 g süzkroz ilave ederek 15 dk sterilize edilmiştir. 10 g yeşil çay ilave edilerek 10 dk infüzyonu sağlanmıştır. Yeşil çay süzülerek uzaklaştırılmıştır. Hazırlanan karışım oda sıcaklığına kadar soğumaya bırakılmıştır. Oda sıcaklığına gelen karışımın içine karayemiş, güvem, ahududu örneklerinde %10 ilave edilirken siyah havuç konsantresinden %1 ilave edilmiştir. Bu karışımının içerisine %10 kombucha kültürü eklenerek 28±2°C'de fermantasyona 40 saat fermantasyona bırakılmıştır. Fermantasyonun ardından süzülerek +4°C'de tutulmuştur. Antioksidan aktivitenin belirlenmesi için DPPH, FRAP ve CUPRAC metotları kullanılmıştır. Fermente edilmemiş örneklerin sonuçları DPPH için siyah havuç 65, karayemiş 64, güvem 65 ve ahududu için 73 μmol Trolox/g olarak bulunmuştur. FRAP sonuçları ise siyah havuç 66, karayemiş 55, güvem 58 ve ahududu için 65 μmol Trolox/g olarak belirlenmiştir.

CUPRAC metodu sonuçları siyah havuç 61, karayemiş 43, güvem 32 ve ahududu için 42 $\mu\text{mol Trolox/g}$ olarak tespit edilmiştir. Kombucha kültürü ile fermente edilen örneklerin sonuçları; DPPH için siyah havuç 112, karayemiş 82, güvem 98 ve ahududu için 122 $\mu\text{mol Trolox/g}$, FRAP metodu sonuçları siyah havuç 285, karayemiş 180, güvem 161 ve ahududu için 101 $\mu\text{mol Trolox/g}$, CUPRAC metodu için ise siyah havuç 80, karayemiş 15, güvem 25 ve ahududu için 38 $\mu\text{mol Trolox/g}$ olarak bulunmuştur. Çalışma ekibi fermantasyon süresinin farklı substratlar kullanılarak hazırlanan kombucha örneklerinin antioksidan özelliklerinde artış olduğunu ileri sürmüşlerdir.

Vitas vd. (2019) yaptıkları çalışmada siyah çay ve yeşil çayın yanında 6 tane farklı substrat kullanarak kombucha hazırlamışlardır. Bunlar geyikotu (*Satureja montana*), nane (*Mentha x piperita*), ısırgan otu (*Urtica dioica*), yabancı kekik (*Thymus serpyllum*), mürver (*Sambucus nigra*) ve ayva (*Cydonia oblonga*)'dır. Bu çalışma için kullanılan örnekler fermantasyonun 3. günü ve 10. günü alınmıştır. Hazırladıkları kombucha örneklerinin antioksidan aktivitesini belirlemek için DPPH radikal süpürücü aktivite, Hidroksil radikali süpürme aktivitesi ve indirgeme gücü ölçümü metotları kullanılmıştır. Antioksidan aktivite için siyah çay ve yeşil çay için en iyi antioksidan aktiviteyi gösterirken sıralamanın devamı şu şekildedir; yabancı kekik>ayva>ısırgan otu>nane>geyikotu>mürver olarak belirlenmiştir. Fermantasyon sürecinin antioksidan aktiviteyi arttırdığını görüşünü ileri sürmüşlerdir.

Xia vd. (2019) yaptıkları çalışmada soya sütünü kullanarak kombucha hazırlamışlardır. Soya sütü hazırlamak için soya fasülyesini 1:8 oranında su ile 24 saat maserasyona tabii tutmuşlardır. Hazırladıkları karışımı 4 defa süzerek 121°C'de 15 dk otoklavda steril etmişlerdir. Soyasütü içerisine %5 oranında kombucha sıvısı ilave ederek 10 gün fermantasyona bırakmışlardır. Ardından 72 ve 96 saat 28-37°C'de inkübasyona bırakarak oluşturdukları fermente ürünler üzerinde testler yapmışlardır. Antioksidan aktiviteyi belirlemek için DPPH, FRAP ve ABTS radikal süpürücü aktivite metotlarını kullanmışlardır. DPPH metodu için sonuçlar 28°C'deki fermantasyonda serbest radikal giderimi %75 iken 37°C'deki sonuçta %68 bulunmuştur. ABTS radikal giderici sonuçlar ise 28°C'deki fermantasyon ürününde %90 iken 37°C'deki üründe %86 olarak belirlenmiştir. FRAP metodu sonuçları 28°C'deki ürün için 0,9 mM Trolox/g iken 37°C'deki ürün için 0,82 mM Trolox/g olarak gözlenmiştir. Sonuç olarak fermantasyon

süresine bağlı olarak soyasütü ile hazırlanan ombucha örneklerinin antioksidan aktivitesinde bir artış gözlenmiştir.

Yıkılmış ve Tuğgüm (2019) yaptıkları çalışmada siyah çay ve fesleğen (*Ocimum basilicum*) kullanarak hazırladıkları kombucha örneklerini araştırmışlardır. Kombucha hazırlamak için 1 litre suya %10 sükröz ve bitki materyalini ekleyerek 80°C'de 10 dk infüzyona bırakmışlardır. 0,5 mm por açıklığı bulunan filtre kâğıtlarından süzerek %10 kombucha kültürü inoküle etmişlerdir. Hazırladıkları örnekleri aseptik koşullarda $24 \pm 3^{\circ}\text{C}$ 'de 10 fermentasyona bırakmışlardır. Kombucha hazırlamak için %100 siyah çay (A), %100 fesleğen (B), %75 fesleğen+%25 siyah çay (C) ve %50 fesleğen+%50 siyah çaydan (D) oluşan 4 grup oluşturmuşlardır. Antioksidan aktiviteyi belirlemek için DPPH ve CUPRAC metodunu uygulamışlardır. DPPH serbest radikal % giderim sonuçları A örneği için $61,11 \pm 0,80$, B örneği için $66,23 \pm 0,19$, C örneği için $64,19 \pm 0,21$ ve D örneği için $63,42 \pm 1,21$ bulunmuştur. CUPRAC serbest radikal % giderim sonuçları A örneği için $40,22 \pm 0,44$, B örneği için $42,97 \pm 0,48$, C örneği için $41,46 \pm 0,32$ ve D örneği için $41,24 \pm 0,48$ olarak tespit edilmiştir. Total fenolik madde içeriğini belirlemek için Folin-Ciocalteu yöntemi uygulanmıştır. Total fenolik madde içeriği sonuçları A örneği için $231,92 \pm 0,66$ mg GAE/L, B örneği için $263,92 \pm 1,32$ mg GAE/L, C örneği için $247,92 \pm 0,66$ mg GAE/L ve D örneği için $233,83 \pm 4,12$ mg GAE/L olarak bulunmuştur. Sonuç olarak fesleğen bitkisinin kombucha fermantasyonunda başarılı bir şekilde kullanılacağı görüşüne ulaşmışlardır. Ayrıca fermantasyon sürecinin fesleğen bitkisinin total fenolik içeriği ve antioksidan aktivite özelliğini arttırdığı görüşünü bildirmişlerdir.

Ziska ve Agustina (2019) yaptıkları çalışmada köpek üzümü (*Solanum nigrum* L.) bitkisini kullanarak bir kombucha fraksiyonu hazırlayarak MCF-7 göğüs kanseri hücre hatları üstündeki etkilerini araştırmışlardır. Kombucha hazırlamak için öncelikle köpek üzümü bitkisinin n-hekzan ile özütü oluşturulmuştur. Bunun için bitki materyali 40°C'de su içeriği %10'dan daha az olacak şekilde kurutulmuştur. Bitki özütü için 1:4 oranında n-hekzan ile 48 saat boyunca oda sıcaklığında ekstraksiyonu yapıldı. Elde edilen özütün çözücüsü rotari evaporatör ile uzaklaştırıldıktan sonra $+4^{\circ}\text{C}$ 'de kullanılmaya kadar saklandı. Daha sonra kombucha fermantasyonu için kaynayan 3 litre suya %10 sükröz ve %5 yeşil çay yapraklarını ekleyerek 15 dk infüzyona bırakmışlardır. İnfüzyon sonucunda bitki yaprakları uzaklaştırılmış ve kombucha kültürü eklenerek 25°C 'de steril bir ortamda 8 gün boyunca fermantasyona bırakılmıştır. 8 günlük fermantasyonun sonucunda oluşan

kombucha ieeğinden %20 alınmış ve %20 sükroz eklenmiştir. Bu karışımaya hazırlanan köpek üzümü ekstraktından %1,5 eklenerek toplam hacim distile su ile 200 mL'ye tamamlanmıştır. Fermantasyon için ürün 25°C'de steril bir ortamda 8 gün boyunca bırakılmıştır. Sitotoksik etkiyi belirlemek için MTT metodu uygulanmıştır. Uygulama için 10-500 µg/mL konsantrasyonlarda 200 µL pipetlenmiştir. Test sonuçlarında göre sitotoksik aktivite bulunamamıştır. Bunun nedeni olarak hazırladıkları kombucha örneklerine SCOBY eklenmeden fermantasyona bırakılması olduğunu ileri sürmüşlerdir. Ayrıca köpek üzümü içerisinde bulunan etken biyoaktif maddelerin suda çözünebilir gibi görünmesine rağmen çözünmemesi olduğu düşünülmüştür. Sitotoksik aktivitenin belirlenmesi için daha uygun fermantasyon koşullarının sağlanması gerektiğini önermişlerdir.

Zubaidah vd. (2019) yaptıkları çalışmada yılan meyvesi (*Salacca zalacca* (Gaerth.) Voss) kullanarak hazırladıkları kombucha örneklerinin antidiyabetik etkilerini *in vivo* olarak araştırmışlardır. Kombucha hazırlamak için yılan meyvelerinin kabuğu soyulmuş, yıkanmış ve küçük parçalara ayrılmıştır. 1:1 oranında su ilave edilmiş ve %10 sükroz eklenmiştir. Hazırlanan karışım 65°C'de 30 dk pastörize edilmiştir. Ardından %10 oranında kombucha ieeğinden eklenmiş ve 28±3°C'de aseptik koşullarda 14 gün boyunca fermantasyona bırakılmıştır. Hayvan deneyleri için erkek albino wistar ratlar (yaş: 2,5-3,0 aylık, vücut ağırlığı:150-200 g) kullanılmıştır. Deney hayvanları streptozotosin kullanılarak diyabetik hale getirilmiştir. Plasma glukoz seviyesi 250 mg/dL üzerinde olanlar diyabetik olarak sınıflandırılmışlardır. Ardından yılan meyvesi kullanılarak hazırlanan kombucha örnekleri hergün 5 mL/kg olacak şekilde oral olarak 28 gün boyunca uygulanmıştır. Biyokimyasal analizler için SOD aktivitesi ve MDA seviyeleri ölçülmüştür. 28 gün sonunda kontrol grubu ratların plasma glukoz seviyesi 104,3±3,4 mg/dL, diyabetik ratların 413,3±8,3 mg/dL iken kombucha uygulanan grupta ise 110,3±2,9 mg/dL olarak bulunmuştur. Ayrıca SOD seviyeleri kontrol grubu için 52,7±1,8 unit/100 µL, diyabetik grup için 18,7±1,4 unit/100 µL iken kombucha uygulanan grup için 44,6±1,9 unit/100 µL olarak tespit edilmiştir. MDA seviyeleri kontrol grubu için 0,28±0,04 ng/100 µL, diyabetik grup için 0,84±0,02 ng/100 µL iken kombucha uygulanan grup için 0,37±0,03 ng/100 µL olarak ölçülmüştür. Sonuç olarak oksidatif stres göstergesi olan SOD ve MDA seviyeleri diyabetik grupta çok yüksek belirlenmişken, yılan meyvesi kullanılarak hazırlanan kombucha uygulanan ratlarda kontrol grubuna yakın bulunmuştur. Çalışma ekibi yılan meyvesi kullanılarak hazırlanan

kombuchanın oksidatif strese karşı biyokimyasal etkisi olduğunu önermişlerdir. Ayrıca plazma glukoz seviyesi diyabetik grupta çok yüksek iken, yılan meyvesi kullanılarak hazırlanan kombucha uygulanan ratlarda kontrol grubuna yakın ölçülmüştür. Bu sonuçlarla yılan meyvesi ile hazırlanan kombuchanın anti-diyabetik etkisi olduğu tespit edilmiştir.

Ahmed vd. (2020) yaptıkları çalışmada siyah çay, arpa ve pirinç olmak üzere farklı substratlar kullanarak hazırladıkları kombucha örneklerinin biyolojik aktivitelerini araştırmışlardır. Kombucha hazırlamak için 4 g substratı 1 L kaynayan suda 15 dk infüzyona bırakmışlardır. Daha sonra filtre kâğıdı ile süzerek %7 sükröz ilave etmişlerdir. Hazırladıkları karışıma %10 kombucha kültürü ekleyerek $28 \pm 02^{\circ}\text{C}$ 'de 12 gün boyunca fermantasyona bırakmışlardır. Antioksidan aktiviteyi belirlemek için DPPH metodu kullanılmıştır. Çalışma ekibi her 2 günde örnek alıp test etmişlerdir. Sonuçlar 6. ve 8. günde en yüksek değerlerine ulaşmıştır. Serbest radikal giderimi 8. günde Siyah çay kombucha %89,37, arpa kombucha %76,19 ve pirinç kombucha %36,04 olarak bulunmuştur. Ayrıca hazırladıkları kombucha örneklerini 76°C ve 100°C 'de 10 dk ısıtmışlardır. Sıcaklıkla birlikte antioksidan aktivitede düşüş gözlenmiştir. Sonuç olarak fermantasyon sürecinin antioksidan etki gösterdiğini vurgulamışlardır. Ek olarak sıcaklık uygulamasının antioksidan etkiyi düşürdüğünü tespit etmişlerdir.

Coskun ve Kayisoglu (2020) yaptıkları çalışmada siyah çay, yeşil çay, adaçayı (*Salvia fruticosa* Mill.), nane (*Mentha piperita* L.) ve ıhlamur (*Tilia cordata*) yapraklarını kullanarak kombucha hazırlamışlardır. Kombucha hazırlamak için 10 g bitki örneğini 1 L suda 15 dk kaynatarak infüze etmişlerdir. İnfüzyon sonunda bitki materyali uzaklaştırılarak 70 g sükröz ilave edilmiştir. Hazırladıkları karışımı 121°C 'de 20 dk otoklavda steril etmişlerdir. Daha sonra örneklerin oda sıcaklığına kadar soğumasını beklemişlerdir. Hazırladıkları karışıma 7 g kombucha kültürü ekleyerek $24 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de fermantasyona bırakmışlardır. Hazırladıkları kombuchaların fermantasyonun 3, 7, 10 ve 14. gününde örnekler alıp antimikrobiyal testlerini yapmışlardır. Hazırladıkları örnekleri *Lactobacillus*, *Lactococcus*, maya ve asetik asit bakteri suşlarına uygulamışlardır. Antimikrobiyal aktivite sonuçlarını, oluşan zon çaplarını ölçerek belirlemişlerdir. Uygulanan bütün suşlarda antimikrobiyal aktivite belirlenmiştir. 3 günlük fermantasyon sonucunda *Lactobacillus* suşlarında en iyi antimikrobiyal aktivitenin ıhlamur ile hazırlanan kombucha olduğunu tespit etmişler. *Lactococcus* ve maya için ise 3 günlük

fermantasyon sonucunda siyah çayın en iyisi olduğu belirlenirken asetik asit bakterileri için 3 günlük fermentasyon sonucunda adaçayı ile hazırlanan kombuchanın en iyisi olduğunu belirlemişlerdir. 7 günlük fermentasyon ürünlerine bakıldığında *Lactobacillus* ve *Lactococcus* için en iyi örneğin yeşil çay ile hazırlanan kombucha örneği olduğu görülürken maya için ıhlamur asetik asit bakterisi için ise adaçayı olduğu görülmektedir. 10 günlük fermentasyon ürünleri incelendiğinde *Lactobacillus* için en iyi örneğin ıhlamur olduğu gözlemlenirken *Lactococcus* için yeşil çayın maya ve asetik asit bakterisi için adaçayının en iyi antimikrobiyal aktivite gösterdiği belirlenmiştir. 14 günlük fermentasyon ürünleri incelendiğinde *Lactobacillus* ve maya için yeşil çay *Lactococcus* için adaçayı asetik asit bakterisi için ıhlamur ile hazırlanan kombuchanın en iyi olduğu görülmüştür.

Zhang vd. (2020) yaptıkları çalışmada japon gülü (*Rosa rugosa* Thunb.) ve hünnap (*Ziziphus jujuba* Mill.) bitkilerini kullanarak hazırladıkları kombucha örneklerinin biyolojik aktivitelerini araştırmışlardır. Kombucha hazırlamak için önce inokül hazırlamışlardır. 10 g sükroz ve 1 g siyah çayı 100 mL steril suyun içinde 85°C’de 20 dk infüze etmişlerdir. Ardından siyah çayı süzerek uzaklaştırmışlardır. Daha sonra kombucha kültürü ekleyerek 30°C’de fermentasyona bırakmışlardır. Bitki örneklerinden kombucha hazırlamak için 10 g toz haline getirilmiş bitki örneği ile 2 g sükroz, 0,02 g askorbik asit ve 2 mL infüze edilmiş siyah çayı 180 mL suya ekleyerek 121°C’de 15 dk otoklavda steril etmişlerdir. Daha önceden hazırladıkları inokülden 20 mL ekleyerek 30°C’de 10 gün boyunca fermentasyona bırakmışlardır. Antioksidan aktivite için DPPH ve indirgeme gücü ölçümü metotlarını kullanmışlardır. DPPH radikal giderim sonuçları 10 günlük fermentasyonun ardından hünnap bitkisinden hazırlanan kombucha için %77,8 bulunurken japon gülü için %73 olarak bulunmuştur. İndirgeme gücü ölçümü absorbans sonuçları ise hünnap bitkisinden hazırlanan kombucha için 0,76 bulunurken japon gülü için 0,64 olarak tespit edilmiştir. Sonuç olarak araştırma ekibinin bulguları hünnap bitkisi ve japon gülü kullanılarak hazırlanan kombucha örnekleri için fermentasyonun ilk günlerine göre 10. gün daha fazla antioksidan aktivite gösterdiği yönündedir. Kombucha kültürü ile yapılan fermentasyon sonucunda antioksidan özellik bakımından artış gözlenmiştir.

2.8 Tezin Amacı

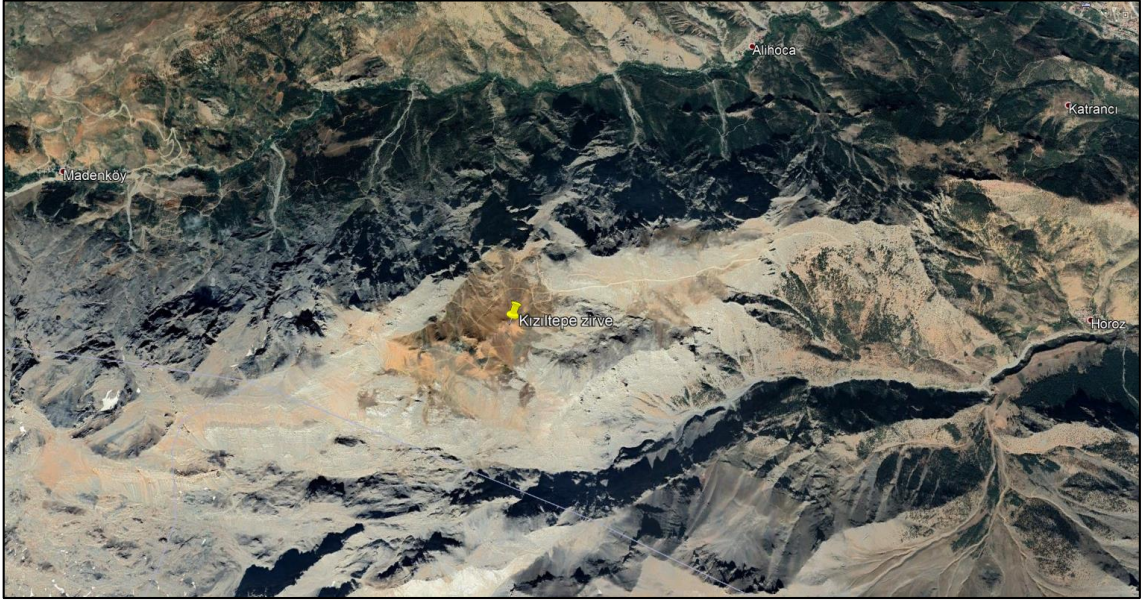
Bu çalışma kapsamında yüzyıllardır geleneksel olarak tüketilen siyah ve yeşil çay ile hazırlanan kombu çayının yanında alternatif olarak üretilebilecek yeni fermente ürünler amaçlanmaktadır. Bu amaç için halk arasında dağ çayı olarak bilinen ve endemik altınbaş çayı (*S. bilgerana*) kullanılacaktır. Ayrıca Niğde bölgesine özgü bir endemik olan Niğde yoğurtotu (*G. nigdeense*) kullanılacaktır. Endemik bitkilerin yanı sıra içerisindeki allantoin maddesinden dolayı terapötik etkilere sahip olan derman otu (*P. lanceolata*) kullanılacaktır. Hazırlanan kombu çaylarında elde edilen fermente ürünlerin biyolojik aktiviteleri araştırılacaktır. Biyolojik aktivitelerin araştırılması için fermente ürünlerin anti-oksidan ve anti-mikrobiyal özellikleri çalışılacaktır. Ayrıca elde edilen fermente ürünlerin anti-kanserojen etkilerini belirlemek için kolon kanseri hücre hatlarında (CaCo-2) sitotoksik aktiviteleri araştırılacaktır. Elde edilecek sonuçların literatüre kazandırılması ve daha ileri çalışmalarda kullanılması da önemli çıktılardan olacaktır.

BÖLÜM III

MATERYAL VE METOT

3.1 Araziden Örneklerin Toplanması

Çalışma alanı olarak seçilen Kızıltepe, Bolkar Dağları'nın alpin kuşağında (2500-3500 m) yer almaktadır. Alanın çok önemli endemik ve lokal endemik bitki türlerini barındırdığı saptanmıştır. Çalışma alanını Bolkar Dağlarının Niğde il sınırları içerisinde kalan Kızıltepe ve çevresi oluşturmaktadır. Kızıltepe, Ulukışla İlçesinin Güneyinde Maden, Alihoca ve Horoz Köyleri üzerinde bulunmaktadır.



Şekil 3.1. Çalışma alanının genel görünümü

S. bilgerana ve *G. niğdeense* endemik bitkileri bu lokaliteden toplanmıştır. *P. lanceolata* bitki örneği ise Niğde ili kent ormanı civarından toplanmıştır. Siyah çay ve yeşil çay (*C. sinensis*) örnekleri ise lokal bir marketten satın alınmıştır. Toplanan bitki örnekleri yabancı ot parçaları, toprak ve böceklerden arındırılmak için ayıklanmıştır. Daha sonra bitki örnekleri bol su ile 3 defa yıkanmıştır. Yıkanan bitki örnekleri fosfat tamponu (PBS) ile temizlenmiştir. En son distile sudan geçirilerek kurutma kâğıtları üzerinde suyu kuruyana kadar bekletilmiştir. Bu süre yaklaşık 60-90 dakika arasındadır.



Şekil 3.2. Örnek bir bitki kurutma görüntüsü

Üzerindeki distile su uzaklaştırılan bitki örnekleri uygun kaplara konularak -80°C dondurucuya yerleştirilerek 24 saat boyunca donduruldu. Ardından liyofilizasyon işlemine tabi tutularak, yapısında bulunan aromatik sekonder bileşiklerin uzaklaştırılması engellenerek, sadece doku içerisinde bulunan su uzaklaştırılarak, bitki örneklerinin kırılgan olan kuru hali elde edilmiş oldu. Bitki örneklerinin liyofilize edilmesindeki en önemli amaç bitki örneklerinin içinde bulunan bileşiklerin normal kurutmaya uzaklaşmasının önüne geçmektir. Bu metod ile bitkileri asıl biyoaktif özelliğini kazandıran sekonder metabolitlerin miktarının azalması önlenmiş oldu. Daha sonra liyofilizasyon metodu ile kullanılarak kurutulan bitki örnekleri mekanik parçalayıcı ile parçalanıp toz haline getirilmiştir. Toz haline getirilen örnekler uygun kaplara konularak deneyler yapıncaya kadar -20°C 'de muhafaza edilmiştir.

3.2 Bitki Örneklerinin Özütlerinin Hazırlanması

3.2.1 Soxhlet ekstraksiyonu

Bitki materyallerinden biyoaktif bileşiklerin kalitatif ve kantitatif çalışmaları çoğunlukla uygun ekstraksiyon yönteminin seçimine dayanır (Sasidharan vd., 2011). Ekstraksiyon, herhangi bir bitki çalışmasının ilk adımıdır ve nihai sonuç üzerinde önemli bir rol oynar. Biyoaktif bileşikler, yapraklar, gövde, çiçek ve meyveler gibi çeşitli bitki kısımlarından tanımlanabilir ve karakterize edilebilir. Bitki materyallerinin ekstraksiyonu çeşitli ekstraksiyon prosedürleri ile yapılabilir. Sentetik ve organik kimyasalların kullanımının azalması, çalışma süresinin kısalması ve daha iyi ekstrakt verimi ve kalitesi nedeniyle daha çevre dostu olan geleneksel olmayan yöntemler son 50 yılda geliştirilmiştir.

Tipik olarak, bitkilerin biyoaktif bileşikleri ikincil metabolitler olarak üretilir. Biyolojik sistemin tüm bileşikleri iki geniş alana bölünebilir. Biri, karbonhidratlar, amino asitler, proteinler ve lipitler gibi büyümeyi ve gelişmeyi amaçlayan kimyasal maddeler olan birincil metabolitlerdir. Bir diğeri, bitkilerin çevreleriyle etkileşime girmelerine izin vererek zorlukların üstesinden gelme ve hayatta kalma yeteneklerini artırmaya yardımcı olduğuna inanılan birincil metabolitler dışındaki bileşik grubu olan ikincil metabolitlerdir. İkincil metabolitler arasında bu maddelerin bazıları biyoaktif olarak kabul edilen biyolojik sistemler üzerinde etkiye sahiptir. Bu nedenle bitkilerdeki biyoaktif bileşiklerin basit bir tanımı şudur: insan ve hayvanlarda farmakolojik veya toksikolojik etkiler ortaya çıkaran ikincil bitki metabolitleridir (Bernhoft, 2010).

Bitki materyallerinden biyoaktif bileşikler, çeşitli klasik ekstraksiyon teknikleriyle ekstrakte edilebilir. Bu tekniklerin çoğu, kullanımdaki farklı çözücülerin özütleme gücüne ve ısı veya karıştırma uygulamasına dayanmaktadır. Bitkilerden biyoaktif bileşikler elde etmek için, mevcut klasik teknikler: (1) Soxhlet ekstraksiyonu, (2) Maserasyon ve (3) Hidrodistilasyondur. Soxhlet ekstraktör ilk olarak Alman kimyager Franz Ritter Von Soxhlet (1879) tarafından icat edildi. Esas olarak lipit ekstraksiyonu için tasarlanmıştı, ancak günümüzde sadece bununla sınırlı değil. Soxhlet ekstraksiyonu, çeşitli doğal kaynaklardan değerli biyoaktif bileşikleri çıkarmak için yaygın olarak kullanılmaktadır. Yeni ekstraksiyon alternatiflerinin karşılaştırılmasında model olarak kullanılır.

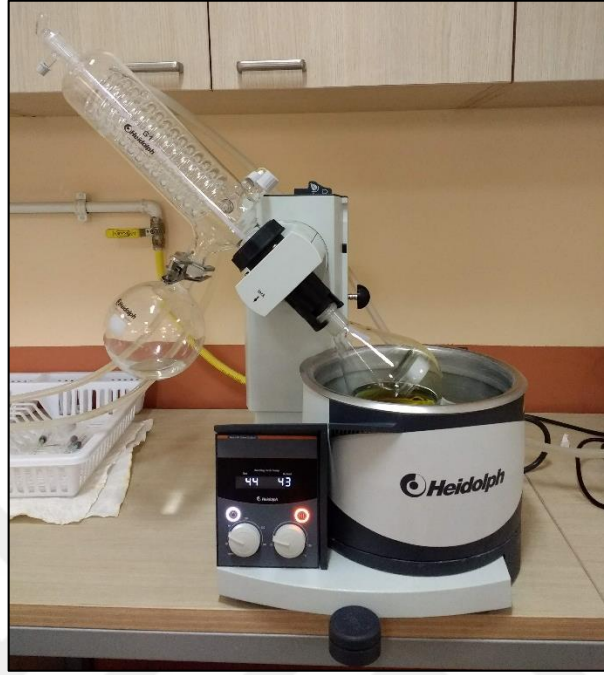
Soxhlet ekstraksiyon yöntemini uygulayabilmek için bitki örneği kurutulur, bir parçalayıcı yardımıyla küçük parçalara ayrılır ve bu parçacıklar selülozdan yapılmış olan ekstraksiyon kartuşuna doldurulur. Ekstraksiyon kartuşu daha sonra özellikle ilgili çözücüyle içeren damıtma şişesine yerleştirilir ve bir ısıtıcı ile çözücünün buharlaşması sağlanır. Buharlaşan çözücü ekstraksiyon kolundan geçerek geri soğutucuya ulaşır. Geri soğutucu aracılığıyla yoğunlaşan çözücü tekrar ekstraksiyon koluna gelerek kartuş içerisinde bulunan materyalin çözünmesini sağlar. Bir taşma seviyesine ulaştıktan sonra, ekstraksiyon kartuşu içinde bulunan çözünmüş madde bir sifon ile aspire edilir. Sifon, çözeltiliyi damıtma şişesine geri yükler. Bu sayede çözünen madde damıtma şişesine geçer ve orada kalır. Çözücü tekrar buharlaşarak bu işlem ekstraksiyon tamamlanana kadar devam eder (Azmir vd., 2013).



Şekil 3.3. Bitki örneklerinin soxhlet ekstraksiyonu genel görünümü

Bu tez çalışmasında kullanılan bitki örneklerinin değerli biyoaktif bileşenlerinin çıkartılacak olan özütte daha fazla miktarda elde edilmesi için soxhlet ekstraksiyonu tercih edildi. Soxhlet ekstraksiyonu için bitki örnekleri 30 g tartıldı ve 250 mL hacimdeki ekstraksiyon kartuşu içerisine yerleştirildi. Damıtma şişesi içerisine 250 mL etanol eklendi. Çözücü olan etanolün kaynama noktasına kadar ısıtıldı ve bu sıcaklıkta 6 saat

boyunca ekstraksiyon işlemine tabi tutuldu. Ekstraksiyon işlemi 6 saatte tamamlanan örnekler alınarak çözücü rotari evaporatör aracılığı ile uzaklaştırıldı.



Şekil 3.4. Rotari evaporatör ile çözücünün uzaklaştırılması

3.3 Kombu Çaylarının Hazırlanması

Kombucha hazırlamak için daha önce yapılan çalışmalardan faydalanılmıştır. Bu çalışmalar sonucunda veriler değerlendirilerek ideal şartlar belirlenmiş ve kombucha hazırlanmıştır. Kombucha hazırlanması ile ilgili literatür bilgileri derlenerek aşağıda sunulmuştur.

Cetojevic-Simin vd. (2008) yaptıkları çalışmada 1 litre musluk suyuna 70 g sukroz ilave ederek 5 dakika kaynatmıştır. Ardından 5 gram kurutulmuş bitki örneğini ekleyip 15 dakika demlenmeye bırakmıştır. Demlenme ardından bitki örneklerinin süzülerek sıcaklık yaklaşık 30°C olana kadar bekletmiştir. Daha sonra %10 inokulasyon ile kombucha mantarı eklemiş ve 28°C'de fermantasyona bırakmıştır (Četojević-Simin vd., 2008).

Fu vd. (2014) yaptıkları çalışmada 3 gram kuru materyali 400 mL kaynayan su içine daldırıp 20 dk kaynatmış ve süzmüş ardından %5 sukroz ilave edip çözünmesi sağlamış.

Daha sonra 200 mL hazırlanan çayı 500 mL erlenmayere koyup 115°C'de 15 dk steril etmiştir. Oda sıcaklığına kadar soğuduktan sonra %5 inokülasyonla kombucha kültürü ilave edilmiş ve 30°C'de 90 saat inkübe edilmiştir (Fu vd., 2014).

Rahmani vd. (2019) yaptığı çalışmada 77 gram sukrozu 1100 mL musluk suyunda çözdükten sonra 90°C'ye ısıtıp 10,5 gram kuru bitki yaprağını küçük pamuk kese içerisinde ilave etmiş ve 15 dk kaynatmıştır. Ardından hazırlanan çayın 25-30°C arasında oda sıcaklığında soğumaya bırakmıştır. Daha sonra 7 gram kombucha kültürünü ilave edip aynı ortamda 14 gün fermantasyona bırakmışlardır (Rahmani vd., 2019).

Gaggia vd. (2019) yaptıkları çalışmada 3 farklı denleme süresi kullanmışlardır. Birincisinde 1 L musluk suyu içerisinde 80 g sukroz çözdürdükten sonra 8 g bitki örneği ilave ederek 3 dk 74°C'de, ikincisinde 3 dk 95°C'de ve üçüncüsünde ise 10 dk 95°C'de demlemiştir. Hazırlanan çayları 121°C'de 20 dk steril ettikten sonra %10 kombucha kültürü ile inoküle ederek 27±1°C'de 14 gün fermantasyona bırakmıştır (Gaggia vd., 2019).

Vohra vd. (2019) yaptıkları çalışmada %2 demleme materyali ve %10 karbon kaynağı (sukroz) içeren suyu 10 dk kaynatmıştır. Ardından oda sıcaklığına kadar soğumasını beklemiştir. Daha sonra %10 inokülasyonla oda sıcaklığında fermantasyona bırakmıştır. Fermantasyon süreleri ise 7, 14, 28, 60 gün olarak uygulamışlardır (Vohra vd., 2019).

Vitas vd. (2019) yaptıkları çalışmada 1 L musluk suyunu kaynatıp içine 1,5 g örnek ve 70 g sukroz ekleyip 5 dk kaynatmışlar. daha sonra çay alınmış ve 15 dk daha kaynatılmıştır. Ardından 25°C'de soğumaya bırakılmıştır. %10'luk inokülasyonla 3, 7 ve 10 günlük fermantasyona bırakılmıştır (Vitas vd., 2019).

Tu vd. (2019) yaptıkları çalışmada 100°C'de kaynayan suyun içerisine %10 sukroz koyup 5 dk daha kaynatarak çözünmesini sağlamışlardır. Ardından %1 bitki materyali konularak 15 dk demlenmiştir ve oda sıcaklığında soğumaya bırakılmıştır. %10 oranında kombucha kültürü eklenip 28°C'de 7 gün fermantasyona bırakılmıştır (Tu vd., 2019).

Yıkımlı ve Tuğgüm (2019) yaptığı çalışmada 10 g bitki metaryali ve 100 g sukrozu 1 L suda 80°C’de 10 dk bekletmiştir. Ardından %10 kombucha kùltùrù ekleyerek 27°C’de 10 gùn fermentasyona bırakmıştır (Yıkımlı ve Tuğgüm, 2019).

Villarreal-Soto vd. (2019) yaptıkları çalışmada 10 g siyah çay yapraklarını 1 L kaynayan suya ekleyerek 80°C’de 15 dk infüzyona bırakmışlardır. ay yaprakları alınarak 70 g sukroz eklenmiştir ve infüzyon oda sıcaklığına gelene kadar (25°C) soğumaya bırakılmıştır. 40 g/L kombucha kùltùrù ile inokùle edilmiştir ve oda sıcaklığında (25°C) 21 gùn fermentasyona bırakılmıştır (Villarreal-Soto vd., 2019).

Ziska ve Agustina (2019) yaptıkları çalışmada kaynamakta olan 3 L suya %10 sukroz ve %5 yeşil çay ekleyerek homojen olana kadar karıştırmışlardır. Karışım oda sıcaklığında 15 dk soğumaya bırakılmıştır. %10 kombucha kùltùrù ile inokùle edilmiş ve 25°C’de 8 gùn fermentasyona bırakılmıştır (Ziska ve Agustina, 2019).

Literatùrdeki çalışmalardan yola çıkılarak kombu çayları hazırlandı. Kombu çaylarını demlemek için kullanılacak olan su otoklavda steril edildi ayrıca fermentasyon süresince içinde bulunacak olan kavanozlarda otoklavda steril edildi. Her bir örnek için 3 L kombucha hazırlandı. Kombu aylarının hazırlanmasında literatùrde belirtilen litre başına 7 g kuru örnek tercih edildi. Tez alışması kapsamında 5 grup hazırlandı. Bunlar siyah çay, yeşil ay, *S. bilgerana*, *Galium niğdeense* (endemik) ve *P. lanceolata* (endemik değil) bitkileridir.



Şekil 3.1. Örneklerin infüzyonu

Kombu çayı için her örnekten litre başına 7 g olmak üzere 21 g örnek hassas terazide tartılarak çay demlemek için kullanılan süzgecin içerisine yerleştirildi. Daha sonra litre başına 70 g sukroz olacak şekilde 4 grup için 210 g şeker tartılarak hazır hale getirildi. Steril edilmiş olan sudan 3 L temiz bir tencereye alınarak kaynayana kadar ısıtılmıştır. Kaynayan suyun içine sukroz atılarak 5 dk daha şeker tamamen çözülene kadar kaynatılmıştır. Ardından ısı kaynağından alınan suyun içine hazırlanmış olan bitki örnekleri daldırılmış ve 60 dk infüzyona bırakılmıştır. Örneklerin infüzyonu Şekil 3.1.'de gösterilmiştir. 60 dk sonra daldırılan bitki örnekleri çıkarılarak çayın temiz bir ortamda oda sıcaklığına 25-30°C'ye gelene kadar soğumasına izin verilmiştir. Ardından demlenmiş olan çaylar steril edilmiş olan 3 litrelik kavanozlara alınmıştır ve içine %10 inokülasyon için kombu çayı kültürü konulmuştur. Kombu çayı kültürleri Shaman's Secret isimli İstanbul ilinde faaliyet gösteren bir firmadan temin edilmiştir. Alınan kültürler steril ortamda paketlenmiş ve kullanılıncaya kadar hiç açılmamıştır. İnokülasyon yapılacağı zaman paketleri açılarak infüzyon olan çaylara eklenmiştir. Shaman's secret firmasından temin edilen kombu çayı kültürleri Şekil 3.2.'de gösterilmektedir.



Şekil 3.2. Kullanılacak olan kombu kültürleri

Daha sonra içerisine kombu mantarı ilave edilmiş olan örnekler sıcaklığı 28°C olarak ayarlanan iklim dolabında temiz ve steril bir ortamda fermantasyona bırakıldı. Örneklerin iklim dolabında görüntüsü Şekil 3.3.'te gösterilmektedir.



Şekil 3.3. Örneklerin iklim dolabında fermantasyona bırakılması

Çalışma kapsamında 1., 7. ve 14. gün fermantasyon süreleri için ilgili zamanlarda 1 L örnek kavanozlardan çekildi. Alınan örnekler vakum pompası kullanılarak nuçe hunisi ve whatman kağıdı ile süzülerek temiz ve steril edilmiş kaplara nakledilerek dondurulmaya hazırlandı. 250 mL'lik uygun kaplara konularak hızlıca -80°C 'ye taşında ve 72 saat boyunca donduruldu. Örneklerin vakum altında süzülmesi Şekil 3.4.'te gösterilmektedir.



Şekil 3.4. Örneklerin süzülmesi ve dondurulmaya hazırlanması



Şekil 3.5. Örneklerin -80°C 'de dondurulması

Dondurma işleminin ardından örnekler 24 saat liyofilize edilerek toz formları hazır hale getirildi. Stok olan bu örnekler kullanılıncaya kadar -20°C 'de muhafaza edildi. Liyofilizasyon işlemi Telstar LyoQuest marka cihaz ile gerçekleştirildi.



Şekil 3.6. Örneklerin liyofilizasyonu

Kombu çayı örnekleri liyofilize edildikten sonra toz haline getirilme ve -20°C 'de kullanılıncaya kadar depolandı. Liyofilize edilen örneklerin toz formları Şekil 3.7.'de gösterilmektedir. Örnekler daha sonra spatül yardımıyla mekanik olarak ezilerek daha da küçük toz haline getirilmiştir.



Şekil 3.7. Liyofilizasyon sonunda toz haline gelen örnekler

3.4 Anti-mikrobiyal Özelliklerin Belirlenmesi

Fermente metabolitleri içeren liyofilizatın, antimikrobiyal aktivitesi, bazı önemli patojen bakterilere (*Escherichia coli* O157:H7-ATCC 35150, *Salmonella enterica* subsp. *enteritica* ATCC13311, *Staphylococcus aureus* MRSA ATCC 43300, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27809, *Listeria monocytogenes*) karşı araştırılmıştır. Bu amaçla; BHI sıvı besiyerinde 37°C'de 18 saat geliştirilen patojen suşlar 5 mL yarı-katı besiyerine inoküle edildi (10^7 kob/mL) ve aynı besiyerini içeren katı agar yüzeyine yayıldı. Katı agar yüzeyinde açılan 6 mm boyutundaki kuyulara, fermente metabolitleri içeren liyofilizat (1mg/mL) 100 µL olacak şekilde aktarıldı. 37°C'de 24 saat inkübasyon süresi sonunda kuyucukların etrafında meydana gelen inhibisyon zonları mm olarak ölçüldü.

3.5 DPPH Radikal Süpürücü Aktivite Tayini

Solüsyonların serbest radikal giderim aktiviteleri 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) serbest radikali kullanılarak belirlendi. Brand-Williams vd. (1995), tarafından önerilen yöntem deney şartlarının gerektirdiği bazı değişiklikler yapılarak gerçekleştirildi (Brand-Williams vd., 1995). Deney tüplerine 1 mg/mL konsantrasyonlarda 150 µL örnek pipetlendi. Deney tüplerinin üzerine 1mM DPPH çözeltisinden 100 µL pipetlenerek oda

sıcaklığında ışık geçirmeyen bir yerde 30 dk inkübasyona bırakıldı. Kontrol olarak askorbik asit kullanıldı. Askorbik asitin distile su ile 1 mg/mL konsantrasyonlarında hazırlandı. Deneyler 3 paralel olarak gerçekleştirildi. İnkübasyonun ardından 517 nm'deki absorbanı metanolden oluşan köre karşı kaydedilmiştir. Azalan absorban geriye kalan DPPH çözeltisi miktarını yani serbest radikal giderme aktivitesini vermiştir. Yüzde DPPH radikal süpürücü aktivite aşağıdaki denkleme göre hesaplanmıştır:

$$\text{Radikal süpürme gücü (\%)} = \left(\frac{A_0 - A_i}{A_0} \right) * 100$$

3.6 Bakır (II) İndirgeyici Antioksidan Kapasite Yöntemi (CUPRAC)

Bu çalışma için 2,5 mL'lik santrifüj tüplerine 500 µL Bakır (II) Klorür (CuCl₂) çözeltisi ve 500 µL Amonyum Asetat (1 M pH:7,0) çözeltisi konuldu. Her tüpe 500 µL Neokuproin (C₁₄H₁₂N₂) (7,5x10⁻³ M) çözeltisi eklendi. Tüplere 1 mg/mL konsantrasyonda 100 µL liyofilizat çözeltisi konuldu ve distile su ile 550 µL'ye tamamlandı. Kör numuneleri için ekstrakt yerine distile su konuldu. Oda sıcaklığında ve su banyosunda (50°C'da) 30 dk inkübe edildi. 450 nm'deki absorbanı kör numune'ye karşı okundu ve standart olarak askorbik asit kullanıldı (Apak vd., 2006).

3.7 İndirgeme Gücü Ölçümü

Kombu çayı örnekleri liyofilizatları 1 mg/mL konsantrasyonlarda hazırlanarak 5 mL'lik tüplere kondu. Örneklerden 100 µL alındı. Kontrol tüpüne ise örnek yerine etanol yerleştirildi. Her tüpe 2,5 mL 0,2 M fosfat tamponu (pH: 6,6) ve 2,5 mL % 1'lik potasyum ferri siyanür ilave edilerek karışım su banyosunda 50 C'de 30 dk. inkübasyona bırakıldı. Su banyosundan alınan tüplerin üzerine 2,5 mL % 10'luk Trikloro asetik asit (TCA) eklenip tüpler, 6000 rpm'de 15 dk santrifüj işlemine tabii tutuldu. Santrifüj sonucu ayrılan süpernatandan 2,5 mL alınarak üzerine 2,5 mL distile su ve 0,5 mL % 0,1'lik FeCl₃.6H₂O çözeltisi ilave edildi. Örneklerin 700 nm'deki absorbanı distile suya karşı okundu.

3.8 Total Fenol İçeriği

Total fenol içeriği, Folin–Ciocalteu reaktifi kullanılarak, Singleton ve Rossi'nin yöntemine göre uyarlanmıştır. Folin-Ciocalteu yöntemi, fenolik bileşiklerden alkali ortamda elektronların fosfomolibtik ve fosfotungistik asitlere taşınarak mavi renkli bileşiklerin oluşumuna dayanmaktadır, oluşan bu bileşikler ortalama 760 nanometre'de (nm) spektrofotometrik olarak okunmaktadır. 1 mg/mL hazırlanan kombu çayı liyofilizatlarında 0,1 mL alınarak 1 mL Folin–Ciocalteu çözeltisine (10 kez seyreltilmiş) eklenerek 5 dk inkübe edildi. Üzerine 1 mL %7,5 lik sodyum bikarbonat solüsyonu eklendi. Örnekler 90 dk inkübasyondan sonra 765 nm'de absorbansları okundu. Sonuçlar gallik asit standartlarına göre hesaplandı (Singleton ve Rossi, 1965).

3.9 Anti-kanserojen Aktivitenin Belirlenmesi

3.9.1 Kolon adenokarsinoma (CaCo-2) hücre hattının hazırlanması

Çalışmamızda kolon adenokarsinomada farklı substratlar kullanılarak hazırlanan kombu çayı örneklerinin sitotoksik etkilerini belirlemek üzere CaCo-2 hücre hattı kullanılmıştır. CaCo-2 Ankara Üniversitesi Biyoloji bölümünden temin edilmiştir. Hücre hattı çalışmaları Ankara Üniversitesi Hücre Kültürü Laboratuvarı'nda yürütülmüştür. Kriyotüp içinde saklanan hücreler 37°C'deki steril su banyosunda kısa sürede çözdürüldü ve kriyotüpler olası bir kontaminasyonu önlemek için %70'lik alkolle silinerek laminar akımlı kabine alınmıştır. Hücreler hafifçe pipetlenerek homojen hale getirilmiştir. Homojen haline gelen karışım %20 Fetal Bovine Serum (FBS) (Sigma-Aldrich, USA), %1 Penisilin/Streptomisin (Sigma-Aldrich, USA), 2,2 g/L Sodyum bikarbonat içeren DMEM (pH 7) (Sigma-Aldrich, USA) kültür besiyerinin olduğu 15 ml'lik steril tüpe alınmıştır. 1000 RPM devirde 5 dakika süreyle santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında tüp alkolle silinerek laminar akımlı kabine tekrar alınmıştır. Falkon tüpündeki süpernant pipet yardımıyla çekilip alınmış, altta kalan pellet kısmına %20 fetal bovine serum (FBS), %1 penisilin/streptomisin içeren DMEM besiyeri eklenerek homojen hale getirilmiştir. Hücreler 25 cm²'lik hücre üretme kabına (flask) alınmıştır. Flask 37°C'deki %5 karbondioksit ortamını sağlayan inkübatöre koyulmuştur. Flasklar her gün invert mikroskop altında kontrol edilmiş ve 2-3 günde bir mediumları değiştirilmiş, konfluent duruma geçtiğinde pasajlanarak çoğaltılmışlardır.

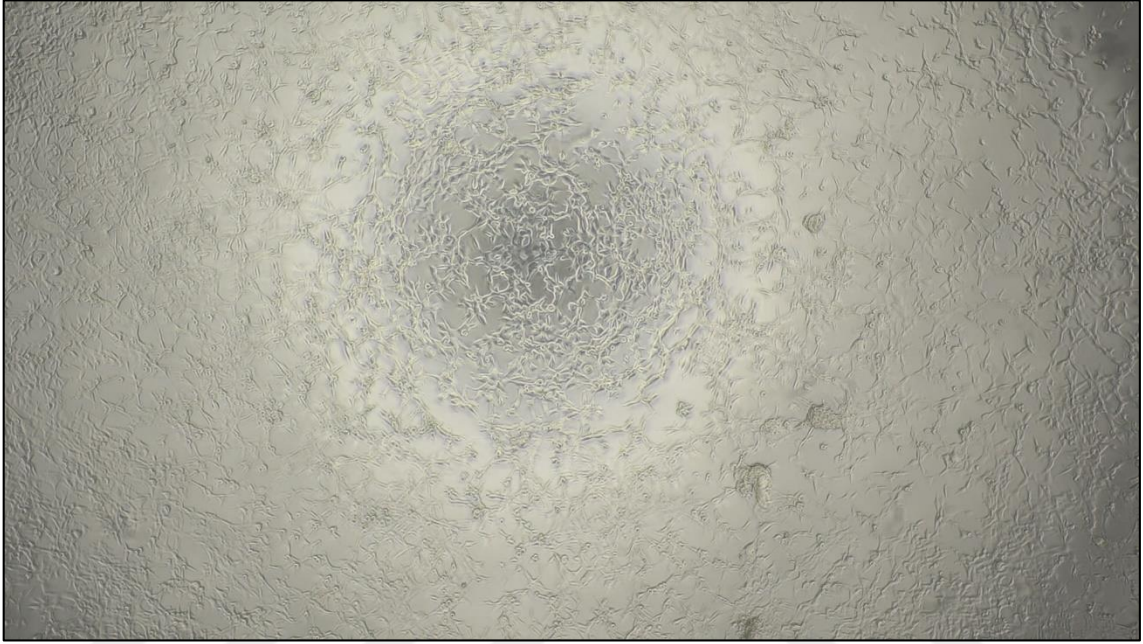
3.9.2 Hücrelerin pasajlanması

Hücrelerin pasajlanma (subkültüre) işlemleri amacıyla, flasklar inkübatörden alınarak alkolle silinmiş ve laminar akımlı kabine alınmıştır. Hücreleri kaplayan kültür ortamı (medium) pipet vasıtasıyla ortamdaki uzaklaştırılmıştır. Hücre ve serum artıklarının ortamdaki uzaklaştırılması amaçlanarak flaska fosfat tampon solüsyonu (PBS) eklenmiştir. PBS pipet yardımıyla uzaklaştırılmış ve 3 mL tripsin EDTA solüsyonu eklenmiştir. Tripsin EDTA eklenmiş flasklar inkübatöre alınarak 8-10 dakika bekletilmiştir. Bu süre sonunda invert mikroskopta hücrelerin kültür kabından ayrıldığı görüldüğünde flaska besiyeri ilave edilmiştir, karışım steril tüpe alınarak 5 dakika 1000 RPM'de santrifüj edilmiştir. Süpernatant atılmış, pellet kısmına kültür ortamı eklenerek homojenizasyonu sağlamıştır. Hücrelerin bir kısmı ilerleyen zamanlarda kullanılmak üzere %20 Fetal Bovine Serum (FBS) (Sigma-Aldrich, USA) ve %10 dimetil sülfoksit (DMSO) (Sigma-Aldrich, USA) içeren dondurma kültür vasatında 1,5 ml'lik vialler içerisinde dondurularak -80°C'de muhafaza edilmiştir. Hücrelerin diğer kısmına %20 fetal bovine serum (FBS), %1 penisilin/streptomisin içeren DMEM besiyeri eklenerek homojen hale getirilmiş ve 75 cm²'lik hücre kültür kaplarına alınarak inkübatöre konulmuştur.

3.9.3 Hücre yoğunluğunun belirlenmesi ve hücre canlılık analizi

Hücre kültür kaplarında (75 cm²) %70-80 oranında yoğunluğa ulaşan hücreler tripsin ile muamele edilip hücre kültür kabından ayrılması sağlanarak falkon tüpüne alınmış ve santifüj işlemi uygulanmıştır. 1 mL FBS içermeyen hücre kültür besiyeri eklenen hücre süspansiyonu 1:1 oranında Tripan Blue boyası ile karıştırılmış ve karışım Thoma lamına alınarak sayılmıştır. Tripan Blue ile boyama sonrasında görülen mavi-lacivert hücreler ölü, boyanmayan hücreler ise renksiz olarak izlenir. Ölü hücrelerdeki membran hasarları nedeniyle Tripan Blue boyası hücre içine girerek hücrenin boyanmasına neden olur, canlı hücrelerin ise yarı geçirgen membran özelliği boyanın hücre içine alınmasına engel olur. Böylece Tripan Blue boyaması ile canlı ya da ölü hücre sayıları belirlenebilmektedir. Hücre canlılık analizi için çalışmamızda XTT (2,3-bis-[2-metoksi-4-nitro-5-sülfenil]-2H-tetrazolyum-5-karboksianilid) testi uygulanmıştır. XTT analizi canlı hücreler tarafından XTT'nin formazon kristallerine indirgenmesine dayanır, metabolik aktiviteyi belirlemek üzere uygulanır. Hücre canlılığını belirlemek üzere XTT testi 96 kuyucuklu

plaklarda gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, tripsinize edilen hücreler santrifüj sonrasında sayılmış ve her kuyucukta 1×10^4 hücre olacak şekilde besiyeri ile sulandırılarak homojenize edilmiştir. Her kuyucuğa eşit miktarda hücre ekimi yapılmıştır. Hücre ekimi yapılan plakalar 24 saat 37°C 'lik %5 CO_2 içeren inkübatörde bekletilmiştir. Süre sonunda hücreler invert mikroskopta kontrol edilmiştir.

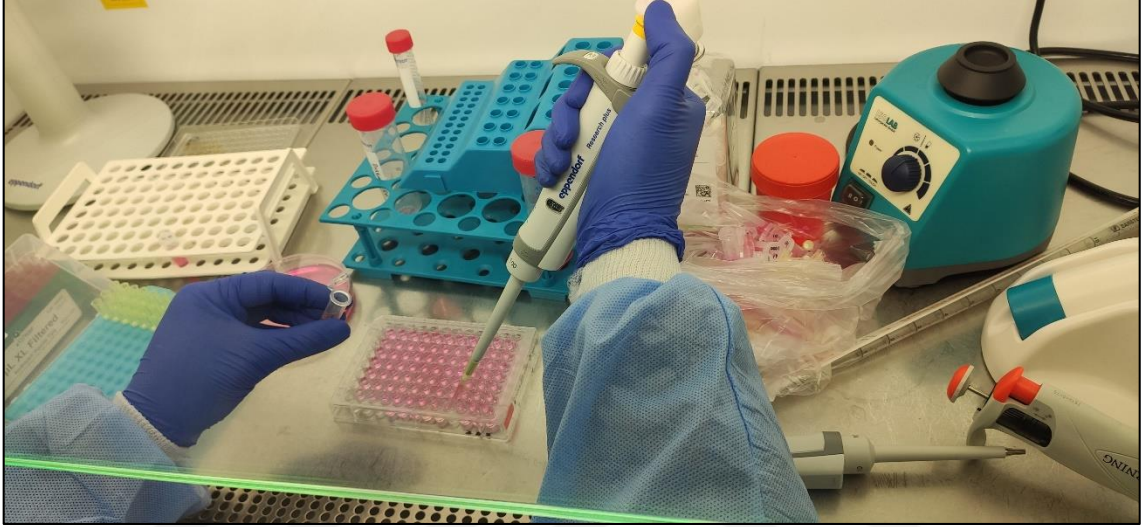


Şekil 3.5. Canlı hücrelerin plate içindeki görünümü

Daha sonra laminar akımlı kabine alınan 96 kuyucuklu plakadaki besiyeri uzaklaştırılmış ve kuyucuklara 100 μl hacminde %1 FBS içeren besiyeri eklenerek 2 saat 37°C 'lik %5 CO_2 içeren inkübatörde bekletilmiştir. Sonrasında kuyucuklardaki besi yeri uzaklaştırılmış ve farklı konsantrasyonlarda kombu çayı içeren besiyeri her kuyucuğa 100 μL olacak şekilde eklenmiştir. Liyofilize kombu çayı örnekleri 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ve 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ dozunda olacak şekilde seri dilüsyonla %1 FBS içeren besi yeri içerisinde çözülmüştür ve hücreye uygulama öncesinde 0,2 μm lik filtreden geçirilmiştir. Kontrol kuyucuğuna kombu çayı eklenmemiş yalnızca besi yeri ilave edilmiştir. Kombu çayı örnekleri içeren plaka 24 saat 37°C 'lik %5 CO_2 içeren inkübatörde bekletilmiştir. Süre sonunda kuyucuklardaki besiyeri uzaklaştırılmış ve kuyucuklara 90 μl besiyeri ile birlikte 10 μl XTT çözeltisi eklenerek 4 saat 37°C 'lik %5 CO_2 içeren inkübatörde bekletilmiştir. Sonrasında formazon kristallerinin çözünmesini sağlamak amacıyla kuyucuklara çözücü solüsyon eklenmiş ve 3 saat inkübatörde

bekletilmiştir. Süre sonunda mikropate okuyucuda 450 nm’de absorbanları okunmuştur. Kombu çayı uygulanmayan kontrol hücrelerin canlılığı %100 olarak kabul edilmiştir. Hücrelere ait canlılık oranları aşağıda belirtilen formül ile hesaplanmıştır;

% canlı hücre = Kombu çayı uygulanan hücre absorbanı / Kontrol hücre absorbanı × 100.



Şekil 3.6. Kombu çayı örneklerinin hücre kültürüne eklenmesi

BÖLÜM IV

BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1 Anti-oksidan Çalışma Sonuçları

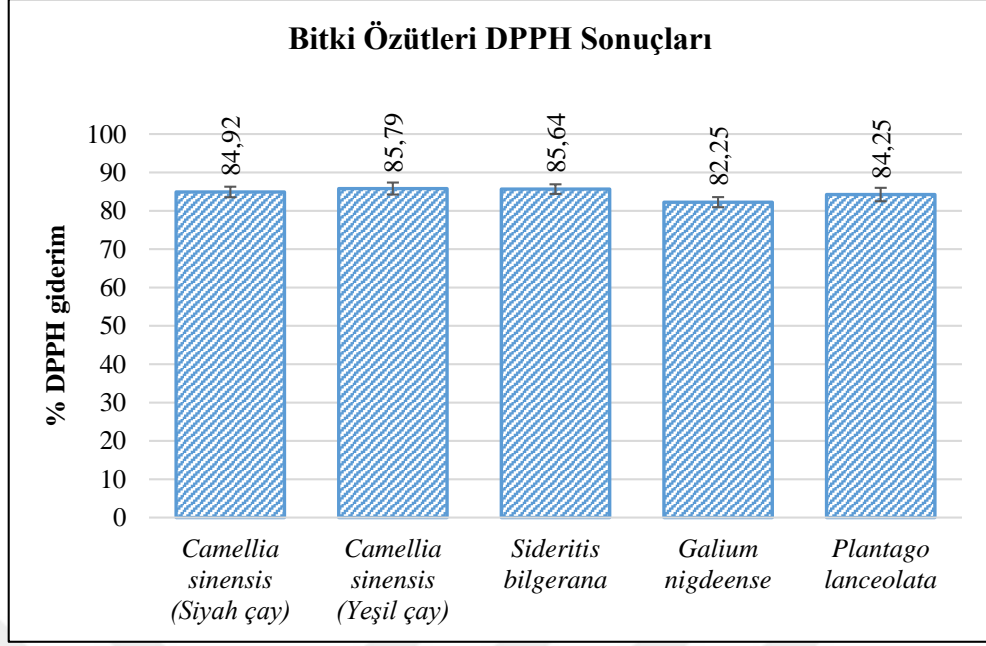
4.1.1 DPPH radikal süpürücü aktivite

Bu çalışmada kullanılan siyah çay, yeşil çay (*C. sinensis*) ile altınbaşçayı (*S. bilgerana*), Niğde yoğurtotu (*G. nigdeense*) ve derman otu (*P. lanceolata*) bitki örneklerinin soxhlet ekstraksiyonu sonucu özütleri elde edildi. Elde edilen özütlerden 1 mg/mL konsantrasyonlarında çözeltiler hazırlandı ve DPPH radikal giderici aktiviteleri çalışıldı. Sonuçlar Çizelge 4.1’de gösterilmiştir.

Çizelge 4.1. Bitki özütlerinin DPPH giderimi sonuçları

Bitki Türü	Türkçe adı	Konsantrasyon	Çözücü	% DPPH giderimi
<i>C. sinensis</i>	Siyah çay	1 mg/mL	%70 etanol	84,92±1,38
<i>C. sinensis</i>	Yeşil çay	1 mg/mL	%70 etanol	85,79±1,56
<i>S. bilgerana</i>	Altınbaş çayı	1 mg/mL	%70 etanol	85,64±1,25
<i>G. nigdeense</i>	Niğde yoğurtotu	1 mg/mL	%70 etanol	82,25±1,32
<i>P. lanceolata</i>	Derman otu	1 mg/mL	%70 etanol	84,25±1,75

Sonuçlar incelendiğinde %70 etanol kullanılarak hazırlanan bitki özütlerinin hepsinin DPPH radikal süpürücü aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Antioksidan aktivite değerleri %50’in üzerinde olduğu için hazırlanan özütlerin antioksidan aktivite özelliklerinin güçlü olduğu söylenebilir. En yüksek DPPH radikali giderici aktivitenin %85,79±1,56 değer ile yeşil çay (*C. sinensis*) olduğu görülürken en düşük aktivite ise %82,25±1,32 ile Niğde yoğurtotu (*G. nigdeense*) özütü olduğu belirlenmiştir. Diğer örneklerin ise DPPH radikali süpürücü özellikleri siyah çay (*C. sinensis*) %84,92±1,38, altınbaş çayı (*S. bilgerana*) %85,64±1,25 ve derman otu (*P. lanceolata*) %84,25±1,75 olarak belirlenmiştir. Etanol kullanılarak hazırlanan özütlerin daha fazla biyoaktif maddeyi çözdüğü düşünüldüğünden antioksidan değerleri yüksek bulunmuştur.



Şekil 4.1. Bitki özütleri DPPH radikal giderici aktivite sonuçları

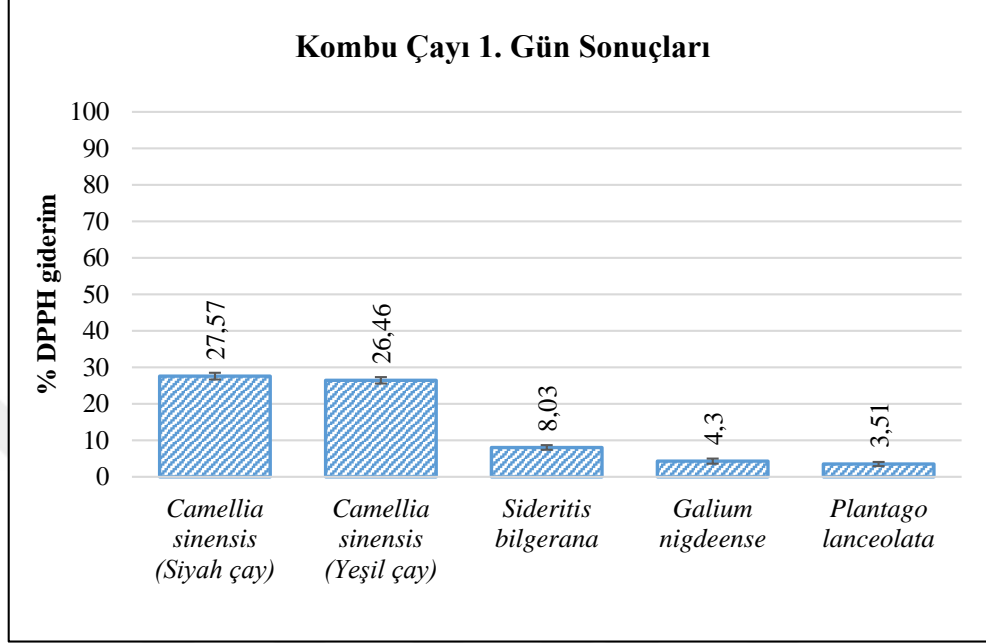
Hazırlanan kombu çaylarının 1 gün sonra alınan örnekleri -80°C 'de 72 saat boyunca donduruldu. Dondurulan örnekler 24 saat liyofilize edildikten sonra 1 mg/mL konsantrasyonlarında çözeltiler hazırlandı ve örneklerin DPPH serbest radikali giderim aktivitesi çalışıldı. Sonuçlar Çizelge 4.2'de verilmiştir.

Çizelge 4.2. Kombu çayı 1. gün örneklerinin DPPH giderimi sonuçları

Kombu Çayı Örneği	Konsantrasyon	% DPPH giderimi
Siyah çay kombucha	1 mg/mL	27,57±0,92
Yeşil çay kombucha	1 mg/mL	26,46±0,88
<i>S. bilgerana</i> kombucha	1 mg/mL	8,03±0,63
<i>G. nigdeense</i> kombucha	1 mg/mL	4,30±0,71
<i>P. lanceolata</i> kombucha	1 mg/mL	3,51±0,57

Sonuçlar incelendiğinde infüzyon edildikten sonra kombucha kültürü eklenerek fermentasyona bırakılan örneklerden 1 gün (24 saat) sonunda alınan örneklerin DPPH serbest radikali giderim aktivitesi gösterdiği belirlenmiştir. Test edilen örnekler arasında en yüksek antioksidan aktiviteyi %27,57±0,92 ile siyah çay kombucha gösterirken en düşük aktiviteyi ise %3,51±0,57 değer ile *P. lanceolata* kombucha göstermiştir. Yeşil çay kombucha ise %26,46±0,88 değer ile diğer yüksek antioksidan kapasiteye sahip örnek olmuştur. *S. bilgerana* kombucha ve *G. nigdeense* kombucha ise sırasıyla %8,03±0,63 ve

%4,30±0,71 oranında DPPH radikali giderim aktivitesi göstermiştir. Örneklerin hepsi antioksidan özellik göstermiştir. Ancak antioksidan özellikleri %50'in altında kaldığı için test edilen konsantrasyonlar yetersiz kalmıştır.



Şekil 4.2. Kombu çayı 1. gün DPPH radikal giderici aktivite sonuçları

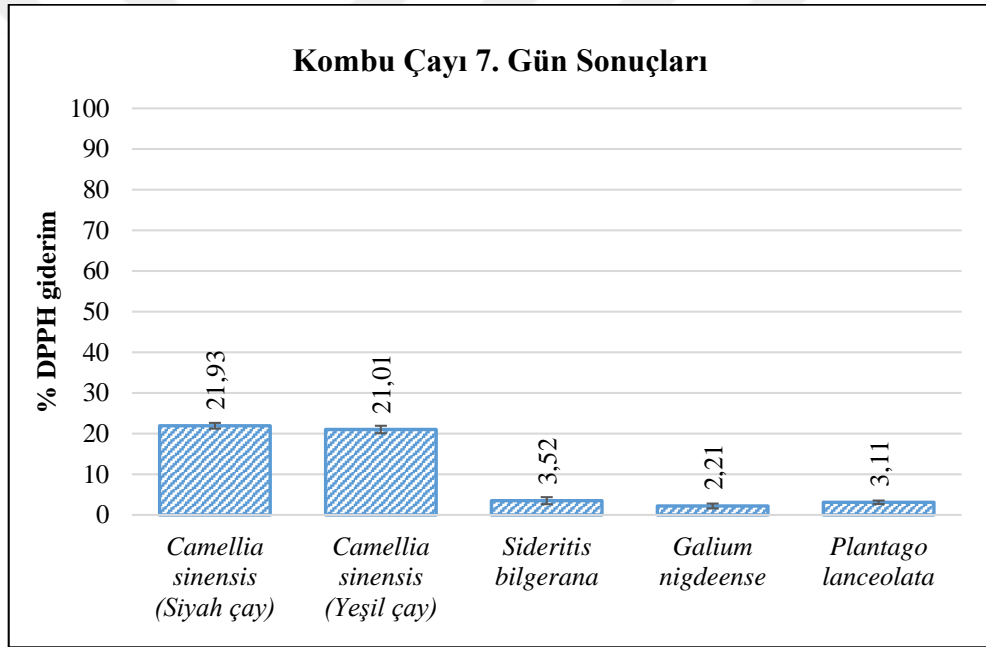
Hazırlanan kombu çaylarının 7 gün sonunda alınan örnekleri -80°C'de 72 saat boyunca donduruldu. Dondurulan örnekler 24 saat liyofilize edildikten sonra 1 mg/mL konsantrasyonlarında çözeltiler hazırlandı ve örneklerin DPPH serbest radikali giderim aktivitesi çalışıldı. Sonuçlar Çizelge 4.3'te verilmiştir.

Çizelge 4.3. Kombu çayı 7. gün örneklerinin DPPH giderimi sonuçları

Kombu Çayı Örneği	Konsantrasyon	% DPPH giderimi
Siyah çay kombucha	1 mg/mL	21,93±0,72
Yeşil çay kombucha	1 mg/mL	21,01±0,91
<i>S. bilgerana</i> kombucha	1 mg/mL	3,52±0,86
<i>G. nigdeense</i> kombucha	1 mg/mL	2,21±0,59
<i>P. lanceolata</i> kombucha	1 mg/mL	3,11±0,43

Sonuçlar incelendiğinde infüzyon edildikten sonra kombucha kültürü eklenerek fermantasyona bırakılan örneklerden 7 gün sonunda alınan örneklerin DPPH serbest radikali giderim aktivitesi gösterdiği belirlenmiştir. Test edilen örnekler arasında en

yüksek antioksidan aktiviteyi $21,93 \pm 0,72$ ile siyah çay kombucha gösterirken en düşük aktiviteyi ise $3,11 \pm 0,43$ değer ile *G. nigdeense* kombucha göstermiştir. Yeşil çay kombucha ise $21,01 \pm 0,91$ değer ile diğer yüksek antioksidan kapasiteye sahip örnek olmuştur. *S. bilgerana* kombucha ve *P. lanceolata* kombucha ise sırasıyla $3,52 \pm 0,86$ ve $3,11 \pm 0,43$ oranında DPPH radikali giderim aktivitesi göstermiştir. Örneklerin hepsi antioksidan özellik göstermiştir. Ancak antioksidan özellikleri 1. gün örnekleri ile karşılaştırıldığında 7. gün örneklerinde nispeten daha düşük gözlenmiştir. Bunun nedeni olarak 1. gün sonunda bitki materyallerinden gelen biyoaktif maddelerin kombucha kültürünü oluşturan mikroorganizmalar tarafından kullanılması söylenebilir. Ama mikroorganizmalar tarafından sentezlenen metabolitlerin miktarının az olmasından dolayı 7. gün örneklerinin antioksidan aktivitesi daha düşüktür.



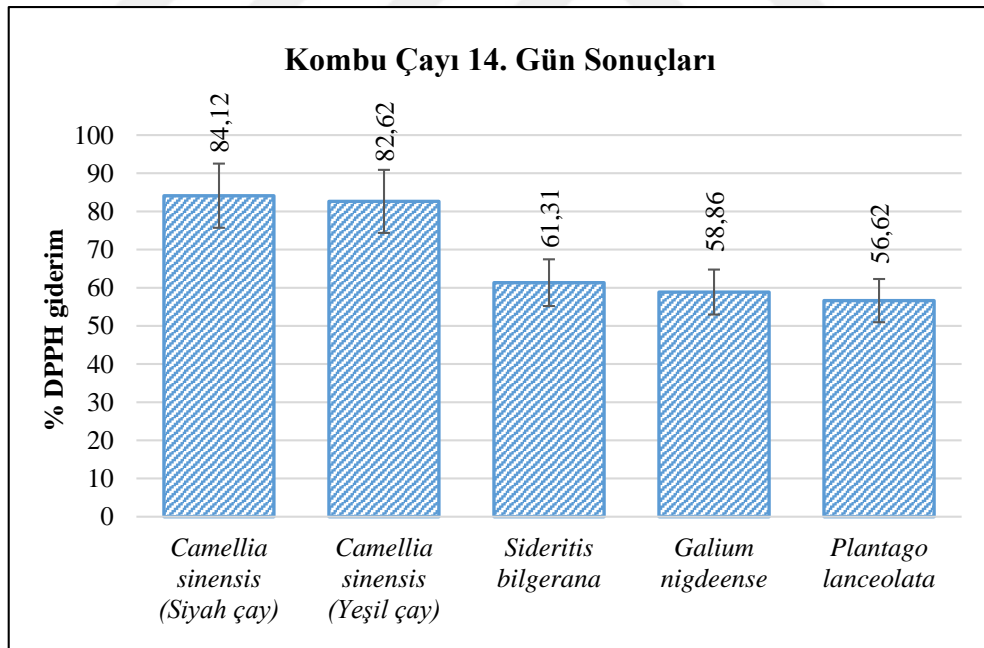
Şekil 4.3. Kombu çayı 7. gün DPPH radikal giderici aktivite sonuçları

Hazırlanan kombu çaylarının 14 gün sonunda alınan örnekleri -80°C 'de 72 saat boyunca donduruldu. Dondurulan örnekler 24 saat liyofilize edildikten sonra 1 mg/mL konsantrasyonlarında çözeltiler hazırlandı ve örneklerin DPPH serbest radikali giderim aktivitesi çalışıldı. Sonuçlar Çizelge 4.4'te verilmiştir.

Çizelge 4.4. Kombü çayı 14. gün örneklerinin DPPH giderimi sonuçları

Kombü Çayı Örneği	Konsantrasyon	% DPPH giderimi
Siyah çay kombücha	1 mg/mL	84,12±1,02
Yeşil çay kombücha	1 mg/mL	82,62±0,99
<i>S. bilgerana</i> kombücha	1 mg/mL	61,31±0,87
<i>G. nigdeense</i> kombücha	1 mg/mL	58,86±0,94
<i>P. lanceolata</i> kombücha	1 mg/mL	56,62±0,69

Sonuçlar incelendiğinde infüzyon edildikten sonra kombücha kültürü eklenerek fermantasyona bırakılan örneklerden 14 gün sonunda alınan örneklerin DPPH serbest radikali giderim aktivitesi gösterdiği belirlenmiştir. Test edilen örnekler arasında en yüksek antioksidan aktiviteyi %84,12±1,02 ile siyah çay kombücha gösterirken en düşük aktiviteyi ise %56,62±0,69 değer ile *P. lanceolata* kombücha göstermiştir. Yeşil çay kombücha ise %82,62±0,99 değer ile diğer yüksek antioksidan kapasiteye sahip örnek olmuştur. *S. bilgerana* kombücha ve *G. nigdeense* kombücha ise sırasıyla %61,31±0,87 ve %58,86±0,94 oranında DPPH radikali giderim aktivitesi göstermiştir.



Şekil 4.4. Kombü çayı 14. gün DPPH radikal giderici aktivite sonuçları

Örneklerin hepsi 14 günlük fermantasyon süreci boyunca antioksidan özellik göstermiştir. Antioksidan özellik fermantasyon sürecine bağlı olarak artış göstermiştir. En yüksek DPPH radikali giderimi oranına fermantasyonun tamamlandığı 14. gün

ulaşmıştır. Kombu çayı içerisinde bulunan mikroorganizmaların ürettikleri metabolitlerin antioksidan özelliği arttırdığı düşünülmüştür.

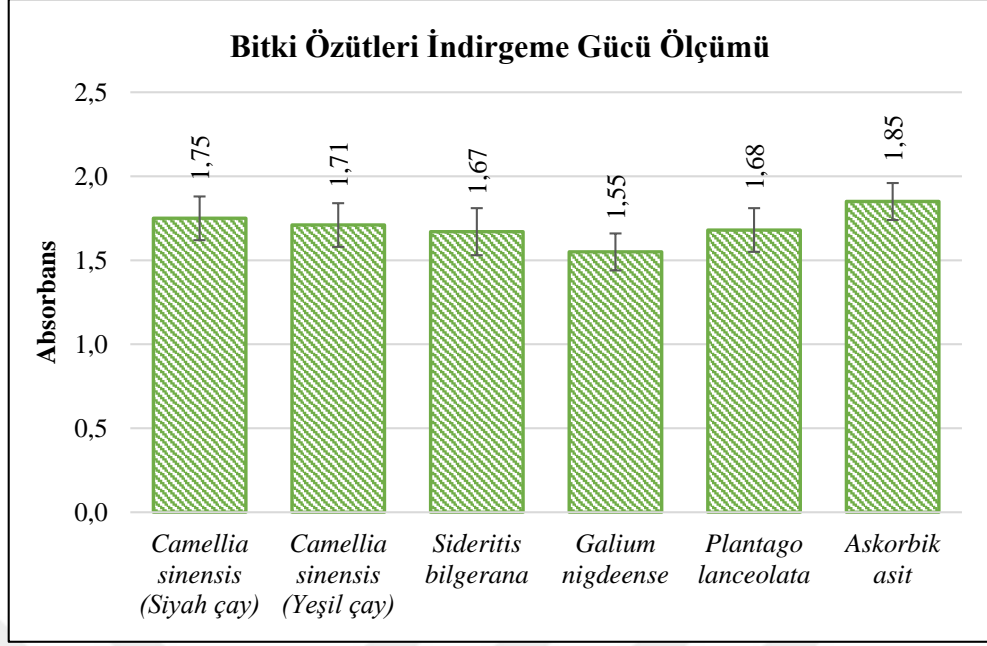
4.1.2 İndirgeme gücü ölçümü

Bu çalışmada kullanılan siyah çay, yeşil çay (*C. sinensis*) ile altınbaşçayı (*S. bilgerana*), Niğde yoğurtotu (*G. nigdeense*) ve derman otu (*P. lanceolata*) bitki örneklerinin soxhlet ekstraksiyonu sonucu özütleri elde edildi. Elde edilen özütlerden 1 mg/mL konsantrasyonlarında çözeltiler hazırlandı ve indirgeme gücü ölçümü metodu ile antioksidan aktiviteleri çalışıldı. Standart olarak askorbik asit kullanıldı. Sonuçlar Çizelge 4.5'te gösterilmiştir.

Çizelge 4.5. Bitki özütlerinin indirgeme gücü ölçümü sonuçları

Bitki Türü	Türkçe adı	Konsantrasyon	Çözücü	İndirgeme gücü ölçümü
<i>C. sinensis</i>	Siyah çay	1 mg/mL	%70 etanol	1,75±0,13
<i>C. sinensis</i>	Yeşil çay	1 mg/mL	%70 etanol	1,71±0,13
<i>S. bilgerana</i>	Altınbaş çayı	1 mg/mL	%70 etanol	1,67±0,14
<i>G. nigdeense</i>	Niğde yoğurtotu	1 mg/mL	%70 etanol	1,55±0,11
<i>P. lanceolata</i>	Derman otu	1 mg/mL	%70 etanol	1,68±0,13
Askorbik asit	C vitamini	1 mg/mL	Distile su	1,85±0,11

Sonuçlar incelendiğinde %70 etanol kullanılarak hazırlanan bitki özütlerinin hepsinin indirgeme gücü ölçümü antioksidan aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Antioksidan aktivite değerleri absorbans değerlerine göre ölçülmektedir. Absorbans değeri ne kadar yüksekse o kadar iyi antioksidan aktivite vardır. En yüksek indirgeme gücü değeri 1,75±0,13 ile siyah çay (*C. sinensis*)'da görülürken en düşük indirgeme gücü değeri ise 1,55±0,11 ile Niğde yoğurtotu (*G. nigdeense*) özütünde belirlenmiştir. Diğer örneklerin ise indirgeme gücü ölçümü absorbans değerleri ise yeşil çay (*C. sinensis*) 1,71±0,13, altınbaş çayı (*S. bilgerana*) 1,67±0,14 ve derman otu (*P. lanceolata*) 1,68±0,13 olarak belirlenmiştir. Standart olarak kullanılan askorbik asitin ise indirgeme gücü absorbans değeri 1,85±0,11 olarak bulunmuştur. Etanol kullanılarak hazırlanan özütlerin daha fazla biyoaktif maddeyi çözdüğü düşünüldüğünden antioksidan değerleri yüksek bulunmuştur.



Şekil 4.5. Bitki özütleri indirgeme gücü ölçümü sonuçları

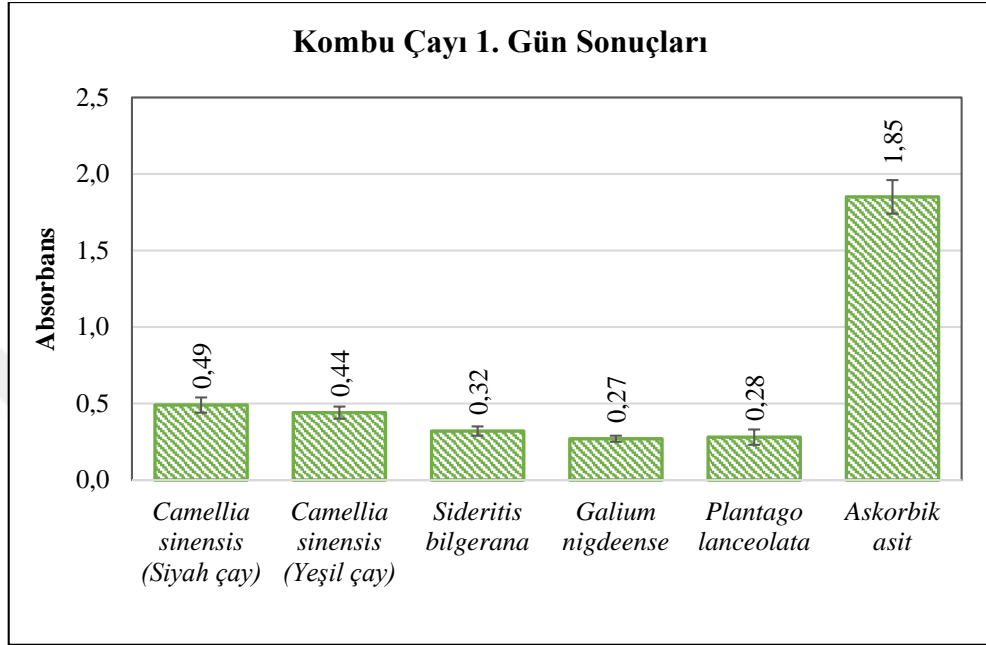
Hazırlanan kombu çaylarının 1 gün sonra alınan örnekleri -80°C 'de 72 saat boyunca donduruldu. Dondurulan örnekler 24 saat liyofilize edildikten sonra 1 mg/mL konsantrasyonlarında çözeltiler hazırlandı ve indirgeme gücü ölçümü metodu ile antioksidan aktiviteleri çalışıldı. Standart olarak askorbik asit kullanıldı. Sonuçlar Çizelge 4.6'da gösterilmiştir.

Çizelge 4.6. Kombu çayı 1. gün örneklerinin indirgeme gücü ölçümü sonuçları

Kombu Çayı Örneği	Konsantrasyon	İndirgeme gücü ölçümü
Siyah çay kombucha	1 mg/mL	0,49±0,05
Yeşil çay kombucha	1 mg/mL	0,44±0,04
<i>S. bilgerana</i> kombucha	1 mg/mL	0,32±0,03
<i>G. nigdeense</i> kombucha	1 mg/mL	0,27±0,02
<i>P. lanceolata</i> kombucha	1 mg/mL	0,28±0,05
Askorbik asit	1 mg/mL	1,85±0,11

Sonuçlar incelendiğinde infüzyon edildikten sonra kombucha kültürü eklenerek fermentasyona bırakılan örneklerden 1 gün sonunda alınan örneklerin indirgeme gücü ölçümü sonuçları değerlendirildiğinde kombu çayı örneklerinin antioksidan aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Test edilen örnekler arasında en yüksek antioksidan aktiviteyi $0,49\pm 0,05$ ile siyah çay kombucha gösterirken en düşük aktiviteyi ise $0,27\pm 0,02$ değer ile

G. nigdeense kombucha göstermiştir. Yeşil çay kombucha ise $0,44\pm 0,04$ değer ile diğer yüksek antioksidan kapasiteye sahip örnek olmuştur. *S. bilgerana* kombucha ve *P. lanceolata* kombucha ise sırasıyla $0,32\pm 0,03$ ve $0,28\pm 0,05$ oranında indirgeme gücü göstermiştir. Örneklerin hepsi antioksidan özellik göstermiştir.



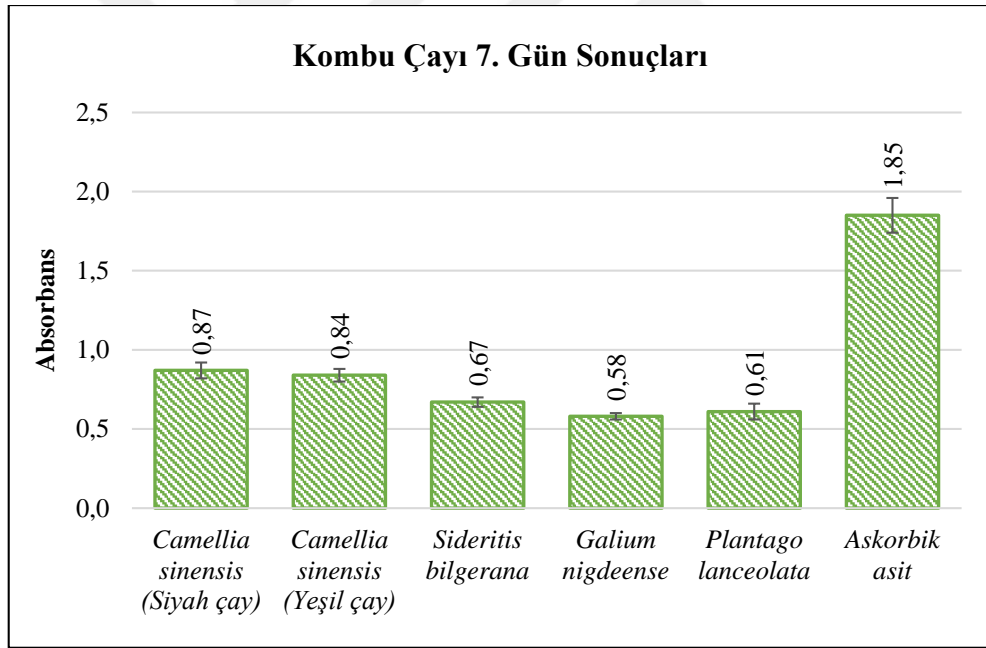
Şekil 4.6. Kombu çayı 1. gün indirgeme gücü ölçümü sonuçları

Hazırlanan kombu çaylarının 7 gün sonra alınan örnekleri -80°C 'de 72 saat boyunca donduruldu. Dondurulan örnekler 24 saat liyofilize edildikten sonra 1 mg/mL konsantrasyonlarında çözeltiler hazırlandı ve indirgeme gücü ölçümü metodu ile antioksidan aktiviteleri çalışıldı. Standart olarak askorbik asit kullanıldı. Sonuçlar Çizelge 4.7'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.7. Kombu çayı 7. gün örneklerinin indirgeme gücü ölçümü sonuçları

Kombu Çayı Örneği	Konsantrasyon	İndirgeme gücü ölçümü
Siyah çay kombucha	1 mg/mL	$0,87\pm 0,05$
Yeşil çay kombucha	1 mg/mL	$0,84\pm 0,04$
<i>S. bilgerana</i> kombucha	1 mg/mL	$0,67\pm 0,03$
<i>G. nigdeense</i> kombucha	1 mg/mL	$0,58\pm 0,02$
<i>P. lanceolata</i> kombucha	1 mg/mL	$0,61\pm 0,05$
Askorbik asit	1 mg/mL	$1,85\pm 0,11$

Sonuçlar incelendiğinde infüzyon edildikten sonra kombucha kültürü eklenerek fermantasyona bırakılan örneklerden 7 gün sonunda alınan örneklerin indirgeme gücü ölçümü sonuçları değerlendirildiğinde kombu çayı örneklerinin antioksidan aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Test edilen örnekler arasında en yüksek antioksidan aktiviteyi $0,87\pm 0,05$ ile siyah çay kombucha gösterirken en düşük aktiviteyi ise $0,58\pm 0,02$ değer ile *G. nigdeense* kombucha göstermiştir. Yeşil çay kombucha ise $0,84\pm 0,04$ değer ile diğer yüksek antioksidan kapasiteye sahip örnek olmuştur. *S. bilgerana* kombucha ve *P. lanceolata kombucha* ise sırasıyla $0,67\pm 0,03$ ve $0,61\pm 0,05$ oranında indirgeme gücü göstermiştir. Örneklerin hepsi antioksidan özellik göstermiştir. Ancak antioksidan özellikleri 1. gün örnekleri ile karşılaştırıldığında 7. gün örneklerinde nispeten daha yüksek antioksidan aktivite gözlenmiştir. Bunun nedeni olarak 1. gün sonunda kombucha kültürünü oluşturan mikroorganizmalar tarafından sentezlenen metabolitlerin 7. güne oranla daha az olmasındandır.



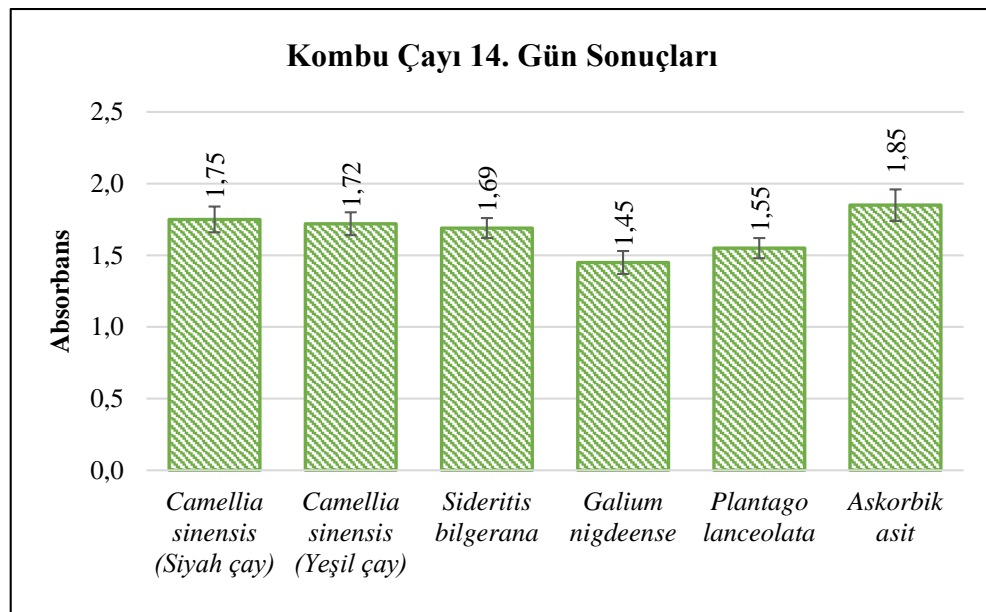
Şekil 4.7. Kombu çayı 7. gün indirgeme gücü ölçümü sonuçları

Hazırlanan kombu çaylarının 14 gün sonra alınan örnekleri -80°C 'de 72 saat boyunca donduruldu. Dondurulan örnekler 24 saat liyofilize edildikten sonra 1 mg/mL konsantrasyonlarında çözeltiler hazırlandı ve indirgeme gücü ölçümü metodu ile antioksidan aktiviteleri çalışıldı. Standart olarak askorbik asit kullanıldı. Sonuçlar Çizelge 4.8'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.8. Kombü çayı 14. gün örneklerinin indirgeme gücü ölçümü sonuçları

Kombü Çayı Örneği	Konsantrasyon	İndirgeme gücü ölçümü
Siyah çay kombücha	1 mg/mL	1,75±0,09
Yeşil çay kombücha	1 mg/mL	1,72±0,08
<i>S. bilgerana</i> kombücha	1 mg/mL	1,69±0,07
<i>G. nigdeense</i> kombücha	1 mg/mL	1,45±0,08
<i>P. lanceolata</i> kombücha	1 mg/mL	1,55±0,07
Askorbik asit	1 mg/mL	1,85±0,11

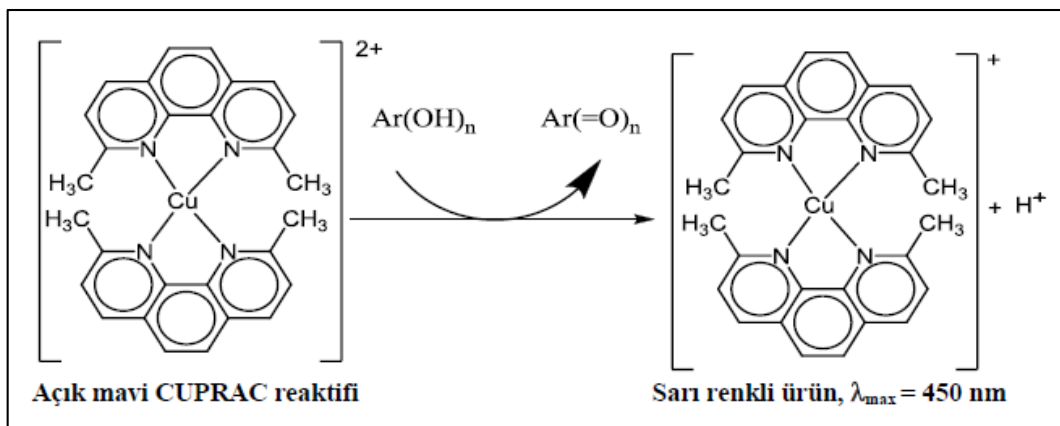
Sonuçlar incelendiğinde infüzyon edildikten sonra kombücha kültürü eklenerek fermentasyona bırakılan örneklerden 14 gün sonunda alınan örneklerin indirgeme gücü ölçümü sonuçları değerlendirildiğinde kombü çayı örneklerinin antioksidan aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Test edilen örnekler arasında en yüksek antioksidan aktiviteyi 1,75±0,09 ile siyah çay kombücha gösterirken en düşük aktiviteyi ise 1,45±0,08 değer ile *G. nigdeense* kombücha göstermiştir. Yeşil çay kombücha ise 1,72±0,08 değer ile diğer yüksek antioksidan kapasiteye sahip örnek olmuştur. *S. bilgerana* kombücha ve *P. lanceolata* kombücha ise sırasıyla 1,69±0,07 ve 1,55±0,07 oranında indirgeme gücü göstermiştir. Örneklerin hepsi antioksidan özellik göstermiştir. 14 günlük fermentasyonun ardından bütün örneklerin antioksidan aktivitesinde önemli oranda artış gözlenmiştir. Kombücha kültürü ile yapılan fermentasyonun bitki örneklerinin biyolojik aktivitesini arttırdığını gözlenmiştir.



Şekil 4.8. Kombü çayı 14. gün indirgeme gücü ölçümü sonuçları

4.1.3 CUPRAC metodu antioksidan tayini

Apak ve çalışma arkadaşları tarafından kromojenik bir yükseltgen olan Cu(II)-neokuproin (Nc) reaktifi kullanılarak, plazma antioksidanları, flavonoidler, gıda polifenolleri, C vitamini ve E vitamini için basit, geniş alanda uygulanabilen bir antioksidan kapasite tayin yöntemi geliştirilmiştir. Bu reaktif, kararlı, ucuz, kolay ulaşılabilen, hidrofilik ve lipofilik antioksidanlara cevap verebilen bir reaktiftir. Toplam antioksidan kapasite (TAC) tayininde kullanılan bu yöntem dünya literatürüne **CUPric Reducing Antioxidant Capacity: CUPRAC** (bakır(II) iyonu indirgeme antioksidan kapasite) adıyla 2004 yılında kazandırılmıştır. Uygun konumlanmış fenolik hidroksiller, CUPRAC redoks reaksiyonu ile tekabül eden kinon yapılarına dönüşür ve bu redoks reaksiyonu sonucunda oluşan Cu(I)-Nc kelatı (Şekil 1), 450 nm'de maksimum absorbans verir. Oluşan renk, metal→ligand yönünde bir yük aktarımının sonucudur. Cu(I)-Nc kelat kompleksinin daha düzgün tetraedral yapısı nedeniyle Cu(II)-Nc kompleksine göre moleküler gerginliği azalmış ve stabilize olmuştur. Cu(I) ve Cu(II) iyonlarının Nc ligandıyla verdikleri 1:2 komplekslerin kararlılık sabitleri sırasıyla 10^{19} ve 10^{12} düzeyinde olduğundan Cu(I)'in Cu(II)'ye göre seçimli stabilizasyonu sonucu Cu(II)-Cu(I) standart redüksiyon potansiyeli 0,17 V'dan (Nc varlığında) yaklaşık 0,60 V'a çıkar ve bu da Cu(II)-Nc reaktifinin biyolojik bakımdan önemli antioksidanları ve çoğu polifenolik bileşiği etkinlikle yükseltmesini sağlar. Yöntem çeşitlemeleri ile birlikte çok sayıda atıf almıştır ve dünyanın önde gelen gıda antioksidanları araştırma laboratuvarlarında kullanılmaktadır (Apak vd., 2006).



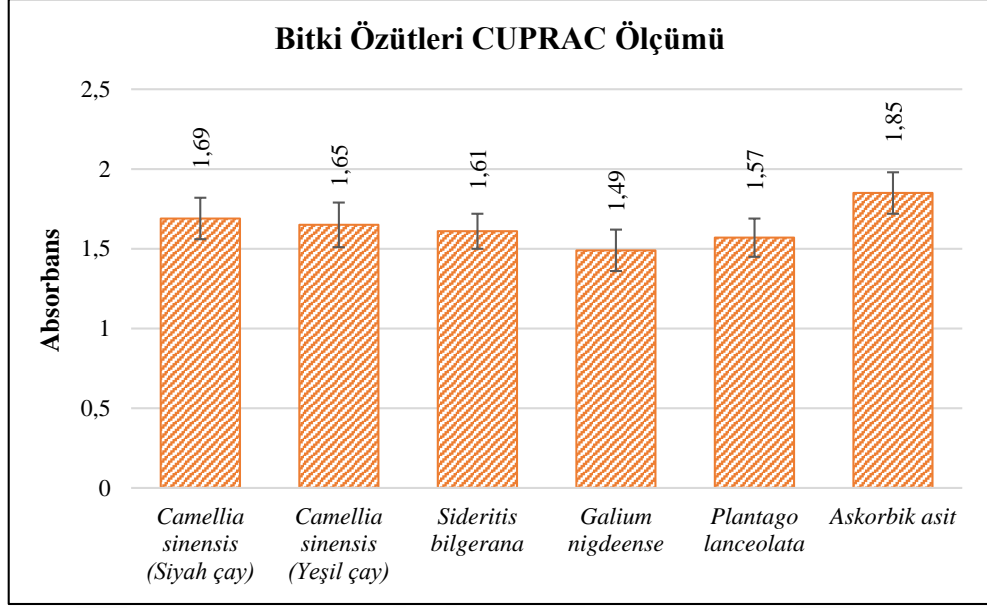
Şekil 4.9. CUPRAC yöntemi ile Cu(II)-Nc reaktifinin Cu(I)-Nc kelatının oluşumu

Bu çalışmada kullanılan siyah çay, yeşil çay (*C. sinensis*) ile altınbaşçayı (*S. bilgerana*), Niğde yoğurtotu (*G. nigdeense*) ve derman otu (*P. lanceolata*) bitki örneklerinin soxhlet ekstraksiyonu sonucu özütleri elde edildi. Elde edilen özütlerden 1 mg/mL konsantrasyonlarında çözeltiler hazırlandı ve indirgeme gücü ölçümü metodu ile antioksidan aktiviteleri çalışıldı. Standart olarak askorbik asit kullanıldı. Sonuçlar Çizelge 4.9'da gösterilmiştir.

Çizelge 4.9. Bitki özütlerinin CUPRAC sonuçları

Bitki Türü	Türkçe adı	Konsantrasyon	Çözücü	CUPRAC ölçümü
<i>C. sinensis</i>	Siyah çay	1 mg/mL	%70 etanol	1,69±0,13
<i>C. sinensis</i>	Yeşil çay	1 mg/mL	%70 etanol	1,65±0,14
<i>S. bilgerana</i>	Altınbaş çayı	1 mg/mL	%70 etanol	1,61±0,11
<i>G. nigdeense</i>	Niğde yoğurtotu	1 mg/mL	%70 etanol	1,49±0,13
<i>P. lanceolata</i>	Derman otu	1 mg/mL	%70 etanol	1,57±0,12
Askorbik asit	C vitamini	1 mg/mL	Distile su	1,85±0,11

Sonuçlar incelendiğinde %70 etanol kullanılarak hazırlanan bitki özütlerinin hepsinin CUPRAC ölçümü sonuçlarına göre antioksidan aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Antioksidan aktivite değerleri absorbans değerlerine göre ölçülmektedir. Absorbans değeri ne kadar yüksekse o kadar iyi antioksidan aktivite vardır. En yüksek indirgeme gücü değeri 1,69±0,13 ile siyah çay (*C. sinensis*)'da görülürken en düşük indirgeme gücü değeri ise 1,49±0,11 ile Niğde yoğurtotu (*G. nigdeense*) özütünde belirlenmiştir. Diğer örneklerin ise indirgeme gücü ölçümü absorbans değerleri ise yeşil çay (*C. sinensis*) 1,65±0,14, altınbaş çayı (*S. bilgerana*) 1,61±0,11 ve derman otu (*P. lanceolata*) 1,57±0,12 olarak belirlenmiştir. Standart olarak kullanılan askorbik asitin ise indirgeme gücü absorbans değeri 1,85±0,11 olarak bulunmuştur. Etanol kullanılarak hazırlanan özütlerin daha fazla biyoaktif maddeyi çözdüğü düşünüldüğünden antioksidan değerleri yüksek bulunmuştur.



Şekil 4.10. Bitki özütleri CUPRAC ölçümü sonuçları

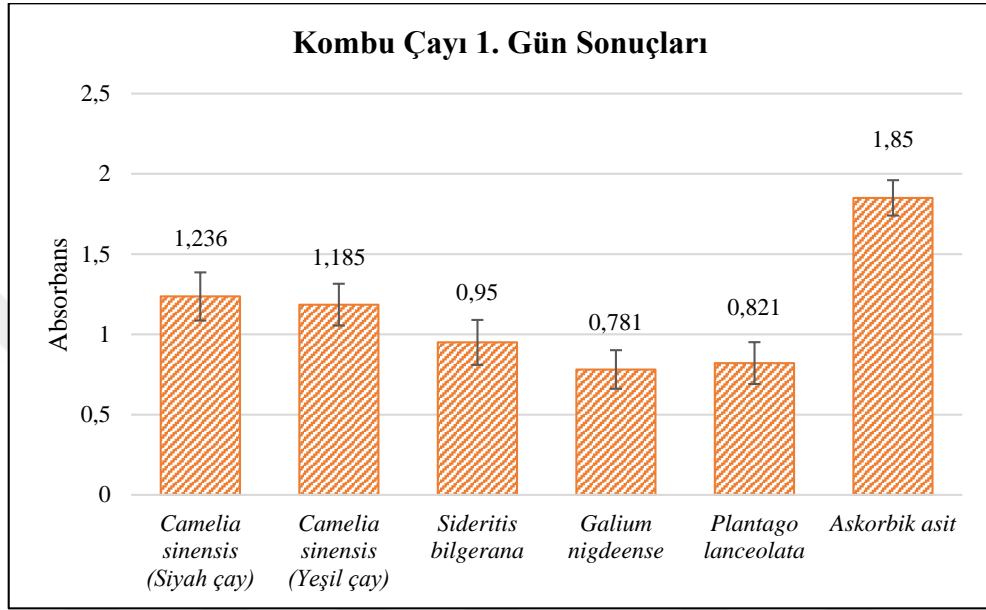
Bu çalışmada siyah çay, yeşil çay, *S. bilgerana* ve *G. nigdeense* substratları kullanılarak hazırlanan kombucha çaylarından fermantasyonun 1., 7. ve 14. günlerinde alınarak hazırlanan liyofilizatların anti-oksidan özelliklerini belirlemek amacıyla CUPRAC metodu kullanılmıştır. Çalışma için hazırlanan liyofilizatlardan 1mg/mL konsantrasyonlarda stok solüsyonlar hazırlanmış ve çalışmada kullanılmıştır. Sonuçlar değerlendirilerek aşağıda verilmiştir.

Çizelge 4.10. Kombu çayı 1. gün örneklerinin CUPRAC ölçümü sonuçları

Kombu Çayı Örneği	Konsantrasyon	CUPRAC ölçümü
Siyah çay kombucha	1 mg/mL	1,236±0,15
Yeşil çay kombucha	1 mg/mL	1,185±0,13
<i>S. bilgerana</i> kombucha	1 mg/mL	0,95±0,14
<i>G. nigdeense</i> kombucha	1 mg/mL	0,781±0,12
<i>P. lanceolata</i> kombucha	1 mg/mL	0,821±0,13
Askorbik asit	1 mg/mL	1,85±0,11

Fermantasyonun 1. gününde alınan örneklerin CUPRAC antioksidan sonuçları Çizelge 4.10'da gösterilmektedir. Standart olarak kullanılan askorbik asitin absorbansı $1,85 \pm 0,11$ olarak bulunmuştur. Siyah çay ve yeşil çay ile hazırlanan kombucha örneklerinin 1. gün fermantasyon sonucu alınan absorbans değerleri diğer bitki örnekleri kullanılarak hazırlanan kombucha örneklerine göre nispeten daha yüksektir. Siyah çay kombuchanın

absorbansı $1,236 \pm 0,15$ iken yeşil çayın absorbansı $1,185 \pm 0,13$ olarak ölçülmüştür. Bunun yanında *S. bilgerana* kombuchanın absorbansı $0,950 \pm 0,14$, *G. nigdeense* kombuchanın absorbansı $0,781 \pm 0,12$ ve *P. lanceolata* kombuchanın absorbansı $0,821 \pm 0,13$ olarak ölçülmüştür. Elde edilen bu sonuçlara göre 1. gün fermantasyon ürünlerinin Cu(II)'yi Cu(I)'e indirgeyerek antioksidan özellik gösterdiğini belirtmektedir.



Şekil 4.11. Kombu çayı 1. gün CUPRAC ölçümü sonuçları

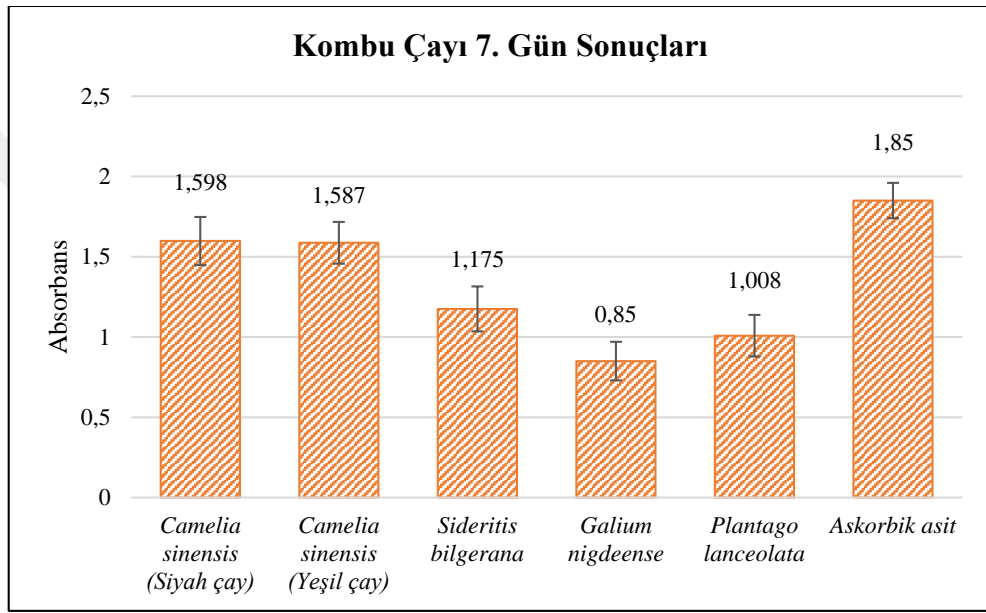
Fermantasyon sürecinin 7. gününde alınan örneklerin absorbans değerleri Çizelge 4.11'de gösterilmektedir.

Çizelge 4.11. Kombu çayı 7. gün örneklerinin CUPRAC ölçümü sonuçları

Kombu Çayı Örneği	Konsantrasyon	CUPRAC ölçümü
Siyah çay kombucha	1 mg/mL	$1,598 \pm 0,15$
Yeşil çay kombucha	1 mg/mL	$1,587 \pm 0,13$
<i>S. bilgerana</i> kombucha	1 mg/mL	$1,175 \pm 0,14$
<i>G. nigdeense</i> kombucha	1 mg/mL	$0,85 \pm 0,12$
<i>P. lanceolata</i> kombucha	1 mg/mL	$1,008 \pm 0,13$
Askorbik asit	1 mg/mL	$1,85 \pm 0,11$

Elde edilen veriler değerlendirildiğinde fermantasyon süresinin artmasıyla indirgeme gücünün arttığını görülmektedir. 7. gün fermantasyon ürünleri içerisinde siyah çay ve yeşil çay ile hazırlanan kombucha örneklerinin daha yüksek antioksidan özelliğe sahip

olduğu belirlenmiştir. Siyah çay ile hazırlanan kombucha örneğinin absorbanansı $1,598 \pm 0,15$ olarak ölçülürken yeşil çayın absorbanansı $1,587 \pm 0,13$ olarak ölçülmüştür. Bunun yanısıra *S. bilgerana* kombuchanın absorbanansı $1,175 \pm 0,14$, *G. nigdeense* kombuchanın absorbanansı $0,850 \pm 0,12$ ve *P. lanceolata* kombuchanın absorbanansı $1,008 \pm 0,13$ olarak ölçülmüştür. Elde edilen bu sonuçlara göre 7. gün fermantasyon ürünlerinin Cu(II)'yi Cu(I)'e indirgeyerek antioksidan özellik gösterdiğini belirtmektedir. Ayrıca fermantasyon sürecine bağlı olarak hazırlanan tüm örneklerin antioksidan aktivitelerinde doğrusal bir artış gözlenmiştir.



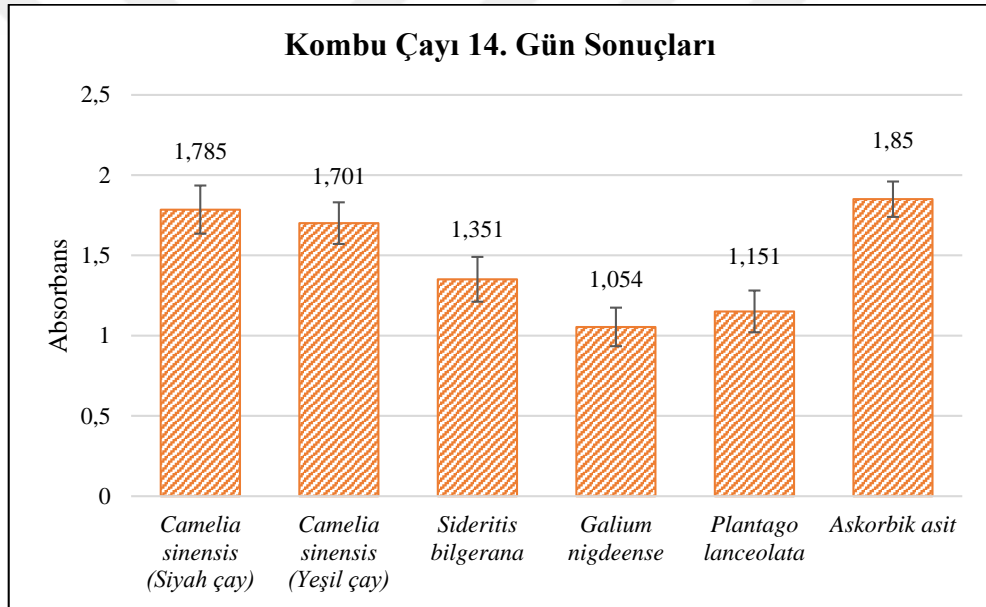
Şekil 4.12. Kombu çayı 7. gün CUPRAC ölçümü sonuçları

Fermantasyon sürecinin 14. gününde alınan örneklerin absorbanans değerleri Çizelge 4.12'de gösterilmektedir.

Çizelge 4.12. Kombu çayı 14. gün örneklerinin CUPRAC ölçümü sonuçları

Kombu Çayı Örneği	Konsantrasyon	CUPRAC ölçümü
Siyah çay kombucha	1 mg/mL	$1,785 \pm 0,15$
Yeşil çay kombucha	1 mg/mL	$1,701 \pm 0,13$
<i>S. bilgerana</i> kombucha	1 mg/mL	$1,351 \pm 0,14$
<i>G. nigdeense</i> kombucha	1 mg/mL	$1,054 \pm 0,14$
<i>P. lanceolata</i> kombucha	1 mg/mL	$1,151 \pm 0,13$
Askorbik asit	1 mg/mL	$1,85 \pm 0,11$

Elde edilen veriler değerlendirildiğinde fermantasyon süresinin artmasıyla indirgeme gücünün arttığını görülmektedir. 14. gün fermantasyon ürünleri içerisinde siyah çay ve yeşil çay ile hazırlanan kombucha örneklerinin daha yüksek antioksidan özelliğe sahip olduğu belirlenmiştir. Siyah çay ile hazırlanan kombucha örneğinin absorbansı $1,785 \pm 0,15$ olarak ölçülürken yeşil çayın absorbansı $1,701 \pm 0,13$ olarak ölçülmüştür. Bunun yanısıra *S. bilgerana* kombuchanın absorbansı $1,351 \pm 0,14$, *G. nigdeense* kombuchanın absorbansı $1,054 \pm 0,15$ ve *P. lanceolata* kombuchanın absorbansı $1,151 \pm 0,13$ olarak ölçülmüştür. Elde edilen bu sonuçlara göre 14. gün fermantasyon ürünlerinin Cu(II)'yi Cu(I)'e indirgeyerek antioksidan özellik gösterdiğini belirtmektedir. Ayrıca fermantasyon sürecine bağlı olarak hazırlanan tüm örneklerin antioksidan aktivitelerinde doğrusal bir artış gözlenmiştir.



Şekil 4.13. Kombu çayı 14. gün CUPRAC ölçümü sonuçları

Bu çalışmada antioksidan aktiviteyi belirlemek için kullanılan CUPRAC metodu kullanılarak yapılan hiçbir çalışmaya literatürde rastlanmamıştır. Çalışma bu özelliği açısından özgün değer taşımaktadır. Elde edilen verilerin kombucha örneklerinin antioksidan özelliğini belirlenmesi açısından önemli sonuçlar ortaya çıkarmıştır.

Fu vd. (2014) yaptığı çalışmada düşük maliyetli yeşil çay siyah çay ve çay tozlarından kombucha hazırlamışlardır. Bu çalışma için 3 g örneği 400 ml'de 20 dk kaynattıktan sonra kombucha kültürlerini ekleyerek 90 saat fermantasyona bırakmışlardır. Elde edilen

örnekleri 10.000 rpm'de 10 dk santrifüje tabi tuttuktan sonra süpernatantlarını alarak antioksidan aktivitesini test etmişlerdir. Antioksidan aktiviteyi belirlemek için DPPH radikal süpürücü aktivite, süperoksit radikal süpürücü aktivite ve total indirgeme gücü ölçümü metotlarını kullanmışlardır. Sonuç olarak elde ettikleri verilerde en iyi antioksidan kapasitenin yeşil çay ile hazırlanan kombucha olduğunu, ardından çay tozu ile hazırlanan ve son sırada da siyah çay olduğu sonucu tespit etmişlerdir. Bu çalışma yaptığımız çalışma ile elde edilen verilerde kombucha örneklerinin antioksidan özellik gösterdiğini desteklemektedir.

Gaggia vd. (2019) yaptıkları çalışmada yeşil, siyah ve kırmızı (rooibos) çayı kullanarak kombucha hazırlamışlardır. Kombucha örnekleri için 8 g kuru bitki örneğini 1000 mL suda infüzyona bırakarak hazırlamışlardır. Fermantasyon süresinin 7. ve 14. gününde örnekler alıp antioksidan testlerini yapmışlardır. Antioksidan aktiviteyi belirlemek için DPPH radikal süpürücü aktivite ve demir indirgeme gücü (FRAP) metodunu uygulamışlardır. Sonuçlar troloks standart antioksidanına karşı eşdeğerlik olarak ölçülmüştür. DPPH radikal süpürücü aktivite sonuçları fermantasyonun 7. gününde alınan örneklerdeki en yüksek antioksidan aktivite yeşil çayda ($1,31 \pm 0,01$ te/g) görülmüştür. Siyah çayda $0,87 \pm 0,01$ te/g tespit edilirken kırmızı çayda $0,45 \pm 0,03$ te/g olarak belirlenmiştir. 14. gün sonuçlarında ise yeşil çayda $0,98 \pm 0,01$ te/g siyah çayda $0,85 \pm 0,02$ te/g ve kırmızı çayda $0,41 \pm 0,01$ te/g olarak ölçülmüştür. Demir indirgeme gücü sonuçları 7. gün fermantasyon ürünleri için yeşil çayda $1,75 \pm 0,06$ te/g siyah çayda $0,90 \pm 0,04$ te/g ve kırmızı çayda $0,52 \pm 0,01$ te/g olarak ölçülmüştür. 14. gün fermantasyon ürünleri için demir indirgeme gücü ölçümleri yeşil çayda $1,13 \pm 0,06$ te/g siyah çayda $0,86 \pm 0,03$ te/g ve kırmızı çayda $0,47 \pm 0,04$ te/g olarak belirlenmiştir. Burada elde edilen sonuçlara göre en iyi antioksidan aktiviteyi 7. günde alınan yeşil çay örneği göstermiştir. İkinci sırada siyah çay bulunurken üçüncü sırada ise kırmızı çay bulunmuştur. 14 günlük fermantasyonun ardından yapılan bütün testlerde antioksidan aktivite oranlarında düşüş gözlenmiştir. Bizim yaptığımız çalışmada ise fermantasyon süresine bağlı olarak doğrudan bir artış söz konusu olmuştur. Çalışma bu özelliği açısından yaptığımız çalışma ile farklılık göstermektedir.

Rahmani vd. (2019) yaptıkları çalışmada Kuzey Afrikadaki insanlar tarafından yaygın tüketilen bir lahana türü olan *Brassica tournefortii* bitkisini kullanarak kombucha hazırlamışlardır. Bu çalışmada 7 g bitki örneği ile 1 L kombucha hazırlanmış ve 14

fermantasyona bırakılmıştır. Fermentasyon süresi sonucunda alınan örneklerde DPPH radikal süpürücü aktivite metodu kullanılarak antioksidan aktivite belirleme çalışması yapılmıştır. Fermente edilmeden yapılan çalışmada DPPH radikal süpürücü aktivite *Brassica tournefortii* bitkisi için %10 iken kombucha fermentasyonu sonucu %25'e çıkmıştır. Fermentasyonun antioksidan kapasiteye etkisi olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Çalışma bu yönüyle bizim yaptığımız çalışmayla benzerlik göstermektedir. Kombucha fermentasyonun antioksidan aktiviteyi artırıcı özellik gösterdiği bu çalışma ile desteklenmektedir.

Villarreal-Soto vd. (2019) yaptıkları çalışmada fermentasyon şartlarının kombucha üzerindeki sonuçlarını araştırmışlardır. Bu çalışmada siyah çay kullanarak hazırladıkları kombucha örneklerinden 7. ve 14. günde aldıkları numulardan DPPH radikal süpürücü aktivite tayini yapmışlardır. Fermente edilmeyen siyah çay ile karşılaştırılan antioksidan aktivite sonuçlarında 7 günlük fermentasyon ürünü %96,4, 14 günlük fermentasyon ürünü ise % 96,3 olarak tespit edilmiştir. Kombucha kültürü ile fermentasyona maruz bırakılmayan siyah çayın DPPH radikal süpürücü aktivitesi ise %70,9 olarak ölçülmüştür. Sonuç olarak fermentasyona maruz bırakılan siyah çayın antioksidan özelliğinde artış olduğu gözlemlenmiştir. Elde edilen sonuçlar yaptığımız çalışma ile karşılaştırıldığında fermentasyon sürecinin antioksidan özelliğin arttırdığı sonucunu ulaşılmaktadır. Çalışma bu yönüyle bizim çalışmanın doğruluğunu destekler niteliktedir.

Vitas vd. (2019) yaptıkları çalışmada siyah çay ve yeşil çayın yanında 6 tane farklı substrat kullanarak kombucha hazırlamışlardır. Bunlar geyikotu (*Satureja montana*), nane (*Mentha x piperita*), ısırgan otu (*Urtica dioica*), yabani kekik (*Thymus serpyllum*), mürver (*Sambucus nigra*) ve ayva (*Cydonia oblonga*)'dır. Bu çalışma için kullanılan örnekler fermentasyonun 3. günü ve 10. günü alınmıştır. Hazırladıkları kombucha örneklerinin antioksidan aktivitesini belirlemek için DPPH radikal süpürücü aktivite, Hidroksil radikali süpürme aktivitesi ve indirgeme gücü ölçümü metotları kullanılmıştır. Antioksidan aktivite için siyah çay ve yeşil çay için en iyi antioksidan aktiviteyi gösterirken sıralamanın devamı şu şekildedir; yabani kekik>ayva>ısırgan otu>nane>geyikotu>mürver olarak belirlenmiştir. Bu sonuçlar fermentasyon sürecinin antioksidan aktiviteyi arttırdığını göstermektedir. Ayrıca geleneksel olarak siyah çay ve yeşil çay dışında farklı substratlar kullanılarak hazırlanan kombucha örneklerinin de antioksidan aktivite gösterdiğini belirtmektedir. Çalışma bu özellikleri açısından

fermantasyon süresinin ve farklı substratların kullanılarak kombucha hazırlanmasıyla yaptığımız çalışmayı desteklemektedir.

Yapılan tüm anti-oksidan testlerin sonucunda hazırlanan kombu çaylarında serbest radikalleri indirgeyici özellik tespit edilmiştir. Fermentasyonun başladığı ilk günlerde anti-oksidan aktivite az iken fermentasyonun ilerleyen günlerinde doğrusal olarak artış göstermiştir.

4.2 Anti-mikrobiyal Test Sonuçları

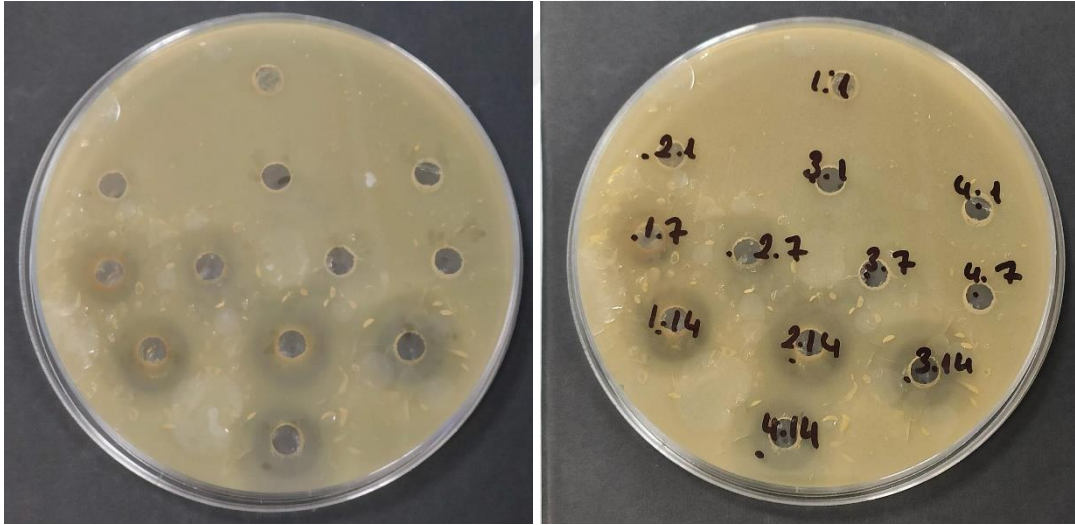
Siyah çay, yeşil çay, *S. bilgerana*, *G. nigdeense* ve *P. lanceolata* substratları kullanılarak hazırlanan kombu çaylarından 1., 7. ve 14. günlerinde alınarak hazırlanan liyofilizatların anti-mikrobiyal aktivitelerini belirlemek için önemli patojenler arasında yer alan *E. coli* O157:H7-ATCC 35150, *S. enterica* subsp. *enteritica* ATCC13311, *S. aureus* MRSA ATCC 43300, *P. aeruginosa* ATCC 27809, *L. monocytogenes* suşlarına karşı besiyerlerinde denenmiştir. Deneylerin yapılması aşamasında besiyerlerinde açılan 6 mm çapındaki kuyucuklara 1 mg/mL konsantrasyondaki örneklerden 100 µL pipetlenerek zon oluşturma kapasiteleri test edilmiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda elde edilen veriler fotoğraflanarak oluşturulan zon çapları cetvel yardımı ile ölçülerek kaydedilmiştir. Sonuçlar değerlendirilerek aşağıda sırayla verilmiştir.

Hazırlanan kombu çayı örneklerinin *E. coli* O157:H7-ATCC 35150 suşu üzerinde gösterdiği anti-mikrobiyal aktiviteler Çizelge 4.13'te gösterilmektedir. Sonuçlar incelendiğinde 1. gün fermentasyon ürünlerinin hiçbir anti-mikrobiyal özellik göstermediği görülmektedir. 7 günlük fermentasyonun ardından anti-mikrobiyal etki görülmeye başlanmıştır. 7. gün fermentasyon ürünleri içerisinde siyah çay ve yeşil çay ile hazırlanan kombucha örneklerinde anti-mikrobiyal aktivite tespit edilmiştir. Siyah çay ile hazırlanan kombucha 16 mm çapta zon yapmıştır. Yeşil çay ile hazırlanan kombucha ise 12 mm çapta zon oluşturmuştur. 14 günlük fermentasyonun tamamlanması sonucu elde edilen örneklerin tamamında anti-mikrobiyal aktivite tespit edilmiştir. Siyah çay kombucha 20 mm, yeşil çay kombucha 21 mm, *S. bilgerana* kombucha 19 mm, *G. nigdeense* kombucha 19 mm ve *P. lanceolata* kombucha 18 mm çapta zon oluşturmuştur. Fermentasyon süresine bağlı kalarak anti-mikrobiyal özellik fermentasyon süresi ile doğru orantılı bir şekilde artış göstermektedir. Ayrıca 1. ve 7. gündeki fermentasyon

ürünlerinde anti-mikrobiyal özellik göstermeyen *S. bilgerana* kombucha, *G. nigdeense* ve *P. lanceolata* kombucha 14 günlük fermantasyonun sonunda önemli derecede anti-mikrobiyal özellik göstermiştir. 14 günlük fermantasyon sonucunda elde edilen kombucha örneklerinin *E. coli* O157:H7-ATCC 35150 suşu üzerinde anti-mikrobiyal özellik gösterdiği tespit edilmiştir. Şekil 4.14'te ise kombucha örneklerinin oluşturdukları zonlar görülmektedir.

Çizelge 4.13. Kombucha örneklerinin *E.coli* suşunda oluşturduğu zon çapları

<i>E. coli</i> O157:H7-ATCC 35150 Suş			
Kombu Çayı Örnekleri	1. gün fermantasyon	7. gün fermantasyon	14. gün fermantasyon
Siyah çay kombucha	X	16 mm	20 mm
Yeşil çay kombucha	X	12 mm	21 mm
<i>S. bilgerana</i> kombucha	X	X	19 mm
<i>G. nigdeense</i> kombucha	X	X	19 mm
<i>P. lanceolata</i> kombucha	X	X	18 mm
Asetik asit	16 mm	16 mm	16 mm



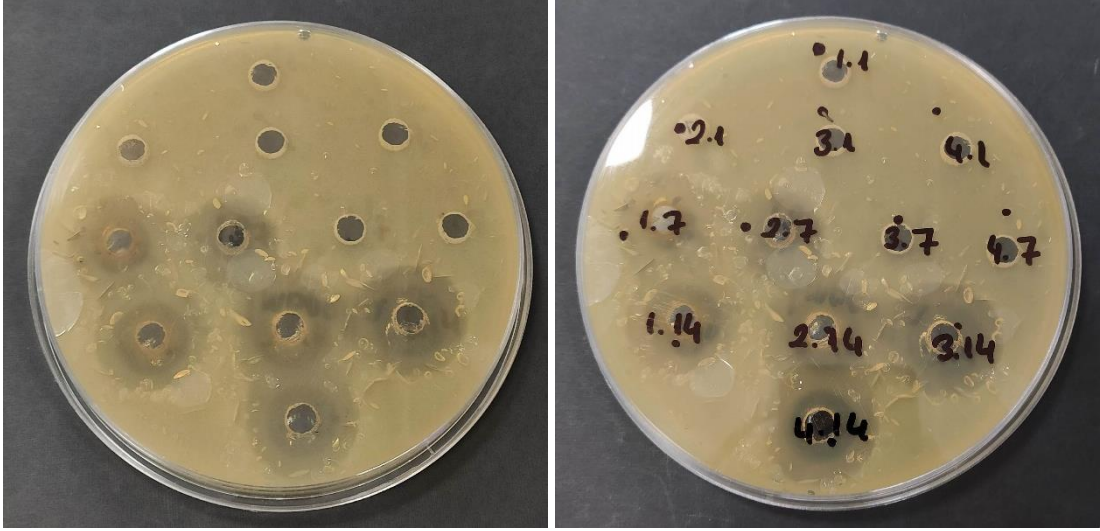
Şekil 4.14. Kombucha örneklerinin *E.coli* suşunda oluşturduğu zonların görünümü

Kombucha örneklerinin *S. enterica* subsp. *enteritica* ATCC13311 suşu üzerine uygulanması sonucu ortaya çıkan anti-mikrobiyal aktiviteler Çizelge 4.14'te gösterilmektedir. Sonuçlara bakıldığında fermantasyonun 1. günü alınan örneklerin hiç biri anti-mikrobiyal özellik göstermemiştir. Fermantasyonun 7. günü itibariyle anti-mikrobiyal etki görülmeye başlanmıştır. 7. gün fermantasyon ürünleri içerisinde siyah çay ve yeşil çay ile hazırlanan kombucha örneklerinde anti-mikrobiyal aktivite tespit

edilirken *S. bilgerana* kombucha, *G. nigdeense* kombucha ve *P. lanceolata* kombucha örneklerinin bir etki göstermediği görülmektedir. Siyah çay ile hazırlanan kombucha 15 mm çapta zon yapmıştır. Yeşil çay ile hazırlanan kombucha ise 12 mm çapta zon oluşturmuştur. Fermantasyon sürecinin 14. gününde alınan kombucha örneklerinin hepsinde anti-mikrobiyal aktivite gözlenmiştir. Siyah çay kombucha 20 mm, yeşil çay kombucha 21 mm, *S. bilgerana* kombucha 20 mm, *G. nigdeense* kombucha 19 mm ve *P. lanceolata* kombucha 18 mm çapta zon oluşturmuştur. Fermantasyon süresine bağlı olarak anti-mikrobiyal özelliğin *S. enterica* subsp. *enteritica* ATCC13311 suşu üzerinde etkisi belirlenmiştir. Ortaya çıkan bu etki fermantasyon süresi bağlı olarak doğrusal bir artış göstermiştir. Fermantasyonun ilk günlerinde etki göstermeyen *S. bilgerana* kombucha, *G. nigdeense* kombucha ve *P. lanceolata* kombucha fermantasyonun 14. günü itibari ile etki göstermeye başlamıştır. 14 günlük fermantasyon sonucunda hazırlanmış olan bütün kombucha örneklerinin *S. enterica* subsp. *enteritica* ATCC13311 suşu üzerinde anti-mikrobiyal etkiye sahip olduğu belirlenmiştir. Şekil 4.15'te ise kombucha örneklerinin oluşturdukları zonlar görülmektedir.

Çizelge 4.14. Kombucha örneklerinin *S. enterica* subsp. *enteritica* suşunda oluşturduğu zon çapları

<i>S. enterica</i> subsp. <i>enteritica</i> ATCC13311 Suş			
Kombu Çayı Örnekleri	1. gün fermantasyon	7. gün fermantasyon	14. gün fermantasyon
Siyah çay kombucha	X	15 mm	20 mm
Yeşil çay kombucha	X	12 mm	21 mm
<i>S. bilgerana</i> kombucha	X	X	20 mm
<i>G. nigdeense</i> kombucha	X	X	19 mm
<i>P. lanceolata</i> kombucha	X	X	18 mm
Asetik asit	17 mm	17 mm	17 mm



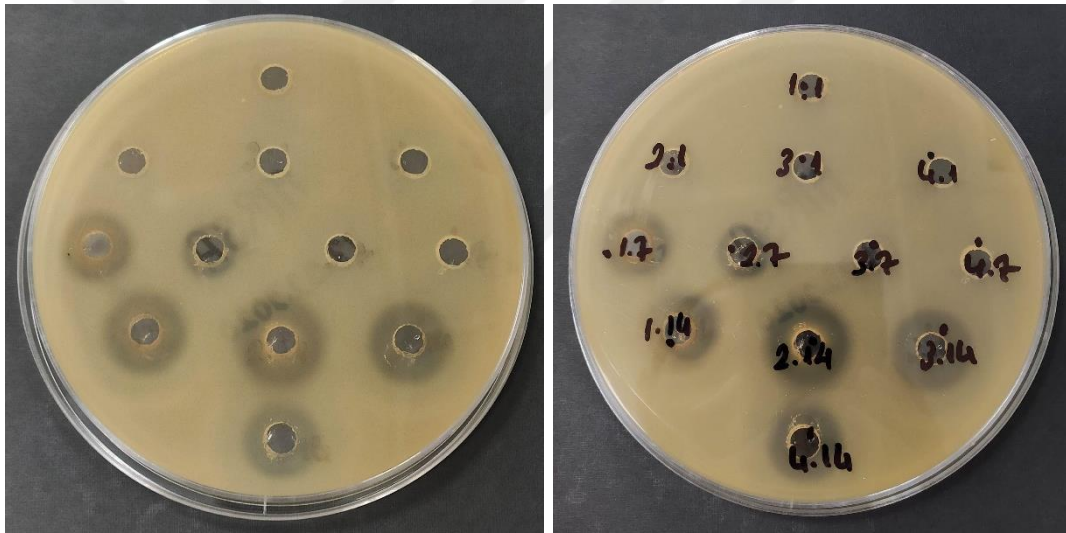
Şekil 4.15. Kombucha örneklerinin *S. enterica* subsp. *enteritica* suşunda oluşturduğu zonların görünümü

Kombucha örneklerinin liyofilizatları *S. aureus* MRSA ATCC 43300 suşu üzerine anti-mikrobiyal özelliklerini belirlemek için uygulanmıştır. Sonuçlar Çizelge 4.15'te gösterilmektedir. Elde edilen veriler değerlendirildiğinde kombucha hazırlanması sırasındaki fermantasyonun 1. gününde alınan örneklerin uygulanması sonucu besiyerinde hiç zon oluşmadığı gözlemlenmiştir. Bundan dolayı 1. gün örneklerinin *S. aureus* MRSA ATCC 43300 suşu üzerinde anti-mikrobiyal etkisi olduğu söylenemez. Ancak 7. gün fermantasyon ürünlerinden siyah çay ve yeşil çay ile hazırlanan kombucha liyofilizatları zon oluşturmuştur. Siyah çay kombucha 19 mm çapta zon oluştururken yeşil çay kombucha 15 mm çapta zon oluşturmuştur. Bu sonuçların yanında 7. gün fermantasyon ürünleri alınan *S. bilgerana* kombucha, *G. nigdeense* kombucha ve *P. lanceolata* kombucha örnekleri zon oluşturmamıştır. 14 günün sonunda oluşan fermantasyon ürünlerinin uygulanması sonucu elde edilen sonuçlara bakıldığında bütün kombucha örneklerinin zon oluşturduğu görülmektedir. Siyah çay kombucha 21 mm, yeşil çay kombucha 23 mm, *S. bilgerana* kombucha 21 mm, *G. nigdeense* kombucha 19 mm ve *P. lanceolata* kombucha 18 mm çapta zon oluşturmuştur. Fermantasyon süresi göz önünde bulundurularak anti-mikrobiyal özelliğin *S. aureus* MRSA ATCC 43300 suşu üzerinde etkisi belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar anti-mikrobiyal aktivitenin fermantasyon süresiyle alakalı olarak doğrusal bir artış gösterdiğini tespit etmiştir. Fermantasyonun ilk günlerinde etki göstermeyen *S. bilgerana* kombucha, *G. nigdeense* kombucha ve *P. lanceolata* kombucha fermantasyonun 14. günü itibari ile etki göstermeye başlamıştır. 14 günlük fermantasyon sonucunda hazırlanmış olan bütün

kombucha örneklerinin *S. aureus* MRSA ATCC 43300 suşu üzerinde anti-mikrobiyal etkiye sahip olduğu belirlenmiştir. Şekil 4.16'da ise kombucha örneklerinin oluşturdukları zonlar görülmektedir.

Çizelge 4.15. Kombucha örneklerinin *S. aureus* suşunda oluşturduğu zon çapları

<i>S. aureus</i> MRSA ATCC 43300 Suş			
Kombu Çayı Örnekleri	1. gün fermantasyon	7. gün fermantasyon	14. gün fermantasyon
Siyah çay kombucha	X	19 mm	21 mm
Yeşil çay kombucha	X	15 mm	23 mm
<i>S. bilgerana</i> kombucha	X	X	21 mm
<i>G. nigdeense</i> kombucha	X	X	19 mm
<i>P. lanceolata</i> kombucha	X	X	18 mm
Asetik asit	17 mm	17 mm	17 mm



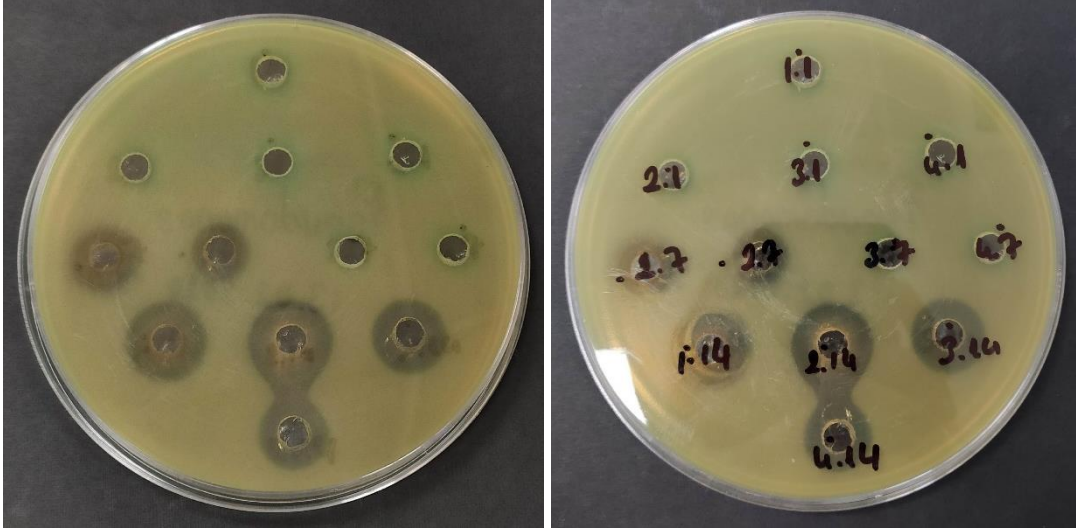
Şekil 4.16. Kombucha örneklerinin *S. aureus* suşunda oluşturduğu zonların görünümü

Kombucha örneklerinin liyofilizatları *P. aeruginosa* ATCC 27809 suşu üzerine anti-mikrobiyal özelliklerini belirlemek için test edilmiştir. Elde edilen veriler Çizelge 4.16'da gösterilmektedir. Sonuçlar değerlendirildiğinde fermantasyonun 1. gününde alınan örnekler besiyerlerinde açılan kuyucuklara 100 µL pipetlenmiştir. 1. gün liyofilizatların uygulanması sonucu kuyucuklarda hiç zon oluşmamıştır. Bu sonuçlardan yola çıkarak 1. gün liyofilizatların *P. aeruginosa* ATCC 27809 suşu üzerinde anti-mikrobiyal etkisi olduğu gözlenmemiştir. Fakat 7. gün fermantasyon ürünlerinden siyah çay ve yeşil çay ile hazırlanan kombucha liyofilizatları zon oluşturmuştur. Siyah çay kombucha 18 mm çapta zon oluştururken yeşil çay kombucha 15 mm çapta zon oluşturmuştur. Bu

sonuçların yanında 7. gün fermantasyon ürünleri alınan *S. bilgerana* kombucha, *G. nigdeense* kombucha ve *P. lanceolata* kombucha örnekleri zon oluşturmamıştır. 14 günün sonunda oluşan fermantasyon ürünlerinin uygulanması sonucu elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde, bütün kombucha liyofilizatlarının zon oluşturduğu belirlenmiştir. Siyah çay kombucha 22 mm, yeşil çay kombucha 22 mm, *S. bilgerana* kombucha 20 mm, *G. nigdeense* kombucha 19 mm ve *P. lanceolata* kombucha 18 mm çapta zon oluşturmuştur. Fermantasyon süresi göz önünde bulundurularak anti-mikrobiyal özelliğin *P. aeruginosa* ATCC 27809 suşu üzerinde etkisi belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar anti-mikrobiyal aktivitenin fermantasyon süresiyle ilişkili olarak doğrusal bir artış göstermiştir. Fermantasyonun ilk günlerinde etki göstermeyen *S. bilgerana* kombucha, *G. nigdeense* kombucha ve *P. lanceolata* kombucha fermantasyonun 14. günü itibari ile anti-mikrobiyal aktivite göstermiştir. 14 günlük fermantasyon sonucunda hazırlanmış olan bütün kombucha örneklerinin *P. aeruginosa* ATCC 27809 suşu üzerinde anti-mikrobiyal etkiye sahip olduğu sonucunu ulaşılmıştır. Şekil 4.17’de ise kombucha örneklerinin oluşturdukları zonlar görülmektedir.

Çizelge 4.16. Kombucha örneklerinin *P. aeruginosa* suşunda oluşturduğu zon çapları

<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27809 Suş			
Kombu Çayı Örnekleri	1. gün fermantasyon	7. gün fermantasyon	14. gün fermantasyon
Siyah çay kombucha	X	18 mm	22 mm
Yeşil çay kombucha	X	15 mm	22 mm
<i>S. bilgerana</i> kombucha	X	X	20 mm
<i>G. nigdeense</i> kombucha	X	X	19 mm
<i>P. lanceolata</i> kombucha	X	X	18 mm
Asetik asit	17 mm	17 mm	17 mm



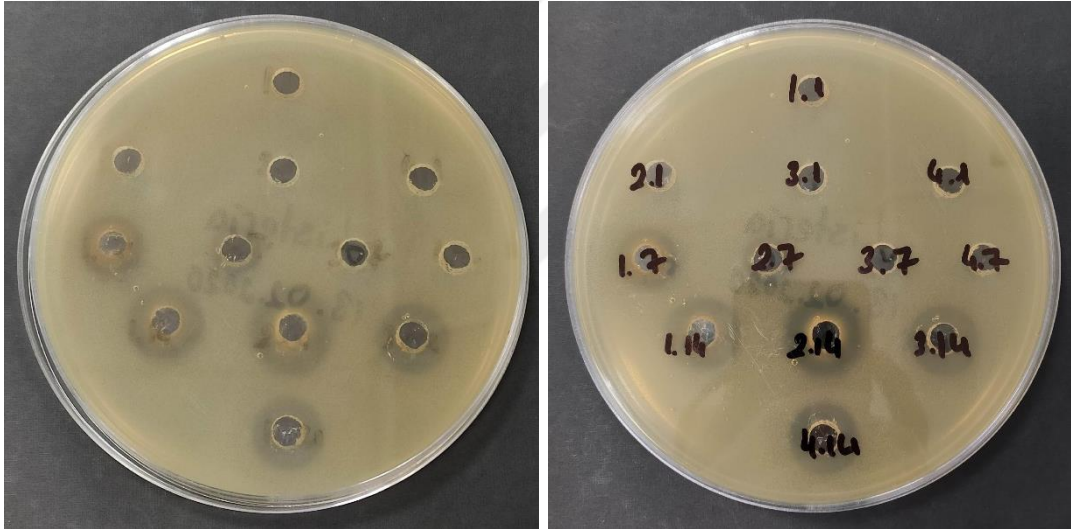
Şekil 4.17. Kombucha örneklerinin *P. aeruginosa* suşunda oluşturduğu zonların görünümü

Kombucha örneklerinin liyofilizatları *L. monocytogenes* suşu üzerine anti-mikrobiyal özelliklerini belirlemek için uygulanmıştır. Sonuçlar Çizelge 4.17’de gösterilmektedir. Elde edilen veriler değerlendirildiğinde kombucha hazırlanması sırasındaki fermantasyonun 1. gününde alınan örneklerin uygulanması sonucu besiyerinde hiç zon oluşmadığı gözlemlenmiştir. Bundan dolayı 1. gün örneklerinin *L. monocytogenes* suşu üzerinde anti-mikrobiyal etkisi olduğu söylenemez. Ancak 7. gün fermantasyon ürünlerinden siyah çay ve yeşil çay ile hazırlanan kombucha liyofilizatları zon oluşturmuştur. Siyah çay kombucha 17 mm çapta zon oluştururken yeşil çay kombucha 13 mm çapta zon oluşturmuştur. Bu sonuçların yanında 7. gün fermantasyon ürünleri alınan *S. bilgerana* kombucha, *G. nigdeense* kombucha *P. lanceolata* kombucha örnekleri zon oluşturmamıştır. 14 günün sonunda oluşan fermantasyon ürünlerinin uygulanması sonucu elde edilen sonuçlara bakıldığında bütün kombucha örneklerinin zon oluşturduğu görülmektedir. Siyah çay kombucha 20 mm, yeşil çay kombucha 22 mm, *S. bilgerana* kombucha 19 mm, *G. nigdeense* kombucha 19 mm ve *P. lanceolata* kombucha 17 mm çapta zon oluşturmuştur. Fermantasyon süresi göz önünde bulundurularak anti-mikrobiyal özelliğin *L. monocytogenes* suşu üzerinde etkisi belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar anti-mikrobiyal aktivitenin fermantasyon süresiyle alakalı olarak doğrusal bir artış gösterdiğini tespit etmiştir. Fermantasyonun ilk günlerinde etki göstermeyen *S. bilgerana* kombucha, *G. nigdeense* kombucha ve *P. lanceolata* kombucha fermantasyonun 14. günü itibari ile etki göstermeye başlamıştır. 14 günlük fermantasyon sonucunda hazırlanmış olan bütün kombucha örneklerinin *L. monocytogenes* suşu

üzerinde anti-mikrobiyal etkiye sahip olduğu belirlenmiştir. Şekil 4.18’de ise kombucha liyofilizatlarının oluşturdukları zonlar görülmektedir.

Çizelge 4.17. Kombucha örneklerinin *L. monocytogenes* suşunda oluşturduğu zon çapları

<i>L. monocytogenes</i> Suş			
Kombu Çayı Örnekleri	1. gün fermantasyon	7. gün fermantasyon	14. gün fermantasyon
Siyah çay kombucha	X	17 mm	20 mm
Yeşil çay kombucha	X	13 mm	22 mm
<i>S. bilgerana</i> kombucha	X	X	19 mm
<i>G. nigdeense</i> kombucha	X	X	19 mm
<i>P. lanceolata</i> kombucha	X	X	17 mm
Asetik asit	17 mm	17 mm	17 mm



Şekil 4.18. Kombucha örneklerinin *L. monocytogenes* suşunda oluşturduğu zonların görünümü

Četojević-Simin vd. (2008) yaptıkları çalışmada siyah çay ve *Satureja montana* L. bitkisini substrat olarak kullanarak kombucha hazırlamışlardır. Kombuchaların hazır olduğu noktanın tüketilebilir asitlik derecesi olan 3,5-4,5 g/L olana kadar tutmuşlardır. Fermantasyon süresinin sonunda hazırlanan kombucha örneklerinin 0,22 µm filtreden geçirerek hazırladıkları besiyerlerine 100 µL olarak pipetlemişlerdir. Gram negatif bakteriler: *P. aeruginosa* (ATCC 27853), *Proteus mirabilis* (ATCC 35659), *E. coli* (ATCC 25922), *S. enteritidis* (ATCC 13076); Gram pozitif bakteriler: *S. aureus* (ATCC 25923), *Bacillus cereus* (ATCC 10876), *Sarcina lutea* (ATCC 9341); mayalar:

Saccharomyces cerevisiae (112, Hefebank Weihenstephan), *Candida pseudotropicalis*, *Rhodotorula* spp. ve küfler: *Penicillium aurantiogriseum*, *Aspergillus niger* ve *Aspergillus flavus* kültürleri üzerinde test etmişlerdir. Siyah çay ile hazırlanan kombucha örneklerinden *Proteus mirabilis* hariç bütün patojenlerde antimikrobiyal aktivite belirlemişlerdir. *Satureja montana* L. ile hazırlanan kombucha örneklerinden ise *Proteus mirabilis* ve *S. aureus* suşları hariç bütün patojenlerde antimikrobiyal aktivite tespit etmişlerdir. En iyi sonuçlar siyah çay için *S. enteritidis* (12,33 mm çap zon) ve *E. coli* (13,67 mm çap zon) olmuştur. *Satureja montana* L. için ise *S. enteritidis* (13,33 mm çap zon) ve *E. coli* (14 mm çap zon) olmuştur. Yaptığımız çalışmada siyah çay ile hazırlanan kombucha örneklerinin *S. enteritidis* ile aynı genusa sahip *S. enterica* subsp. *enteritica* suşu üzerinde 7. gün fermantasyon ürünlerinin benzer sonuçlar (15 mm çap zon) ortaya çıkardığı görülmektedir. Ayrıca *E. coli* suşu üzerinde yaptığımız çalışmada ise aynı şekilde benzer sonuçların 7. gün fermantasyon ürünlerinde gözlemlendiği belirlenmiştir. Genel olarak patojen suşlar üzerine yapılan antimikrobiyal aktivitelerin belirlenmesinde yapılan bu çalışma bizim çalışmamızı destekler niteliktedir.

Četojević-Simin vd. (2012) yaptıkları çalışmada *Melissa officinalis* L. bitkisini substrat olarak kullanarak kombucha hazırlamışlardır. Fermantasyon süresini tüketilebilir asitlik derecesi olan 3,5-4,5 g/L olana kadar tutmuşlardır. 3 günlük fermantasyon sonucunda asitlik seviyesi 4,56±0,03 g/L haline gelen örnekleri kullanmışlardır. Fermantasyon süresi sonunda hazır hale gelen kombucha örneklerini 0,22 µm çaplı filtreden geçirerek steril hale getirmişlerdir. Steril hale getirilen kombucha örneklerini gram negatif bakteriler: *P. aeruginosa* (ATCC 27853), *Proteus mirabilis* (ATCC 35659), *E. coli* (ATCC 25922), *S. enteritidis* (ATCC 13076), *Erwinia carotovora* (NCPBB 595); Gram pozitif bakteriler: *S. aureus* (ATCC 25923), *Bacillus cereus* (ATCC 10876), *Sarcina lutea* (ATCC 9341); mayalar: *Saccharomyces cerevisiae* (112, Hefebank Weihenstephan), *Candida pseudotropicalis*, *Rhodotorula* spp. ve küfler: *Penicillium aurantiogriseum*, *Aspergillus niger* ve *Aspergillus flavus* suşlar üzerine 100 µL pipetleyerek sonuçları belirlemişlerdir. 3 günlük fermantasyon sonucunda asitlik seviyesi 4,56±0,03 g/L haline gelen örnekleri kullanmışlardır. Sonuç olarak *S. enteritidis*, *E. coli*, *Proteus mirabilis*, *P. aeruginosa*, *Erwinia carotovora*, *S. aureus*, *Bacillus cereus* suşları üzerinde antimikrobiyal etki belirlemişlerdir. En iyi antimikrobiyal etkiyi *Erwinia carotovora* üzerinde 17,83 mm çapta zonla belirlemişlerdir. *S. enteritidis*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *Bacillus cereus* suşları üzerinde ise yaklaşık 14 mm çapta zon olmak üzere antimikrobiyal aktivite tespit

edilmiştir. Yaptığımız çalışmada ise 7 günlük fermantasyon ürünlerinde benzer sonuçlara ulaşılmıştır. Siyah çay ve yeşil çay ile hazırlanan kombucha örneklerimiz anti-mikrobiyal aktivite göstermeye başlamıştır. Fermantasyon süresinin artması ile antimikrobiyal özellik artmıştır. Bu çalışma sonuçları açısından bizim yaptığımız çalışma ile paralellik göstermektedir.

Tu vd. (2019) yaptıkları çalışmada peynir altı suyu kullanarak kombucha hazırlamışlardır. 1:10 oranında peynir altı suyuyla kombucha hazırlamadan önce otoklavda steril etmişlerdir. Ardından kombucha kültürünü ekleyerek 7 gün boyunca fermantasyona bırakmışlardır. Gram pozitif: *S. aureus* ATCC6538 ve Gram negatif: *E. coli* ATCC8099 ve *Bacillus subtilis* JMH-1 suşları üzerine açılan 9 mm çaptaki kuyucuklara 100 µL ekleyerek sonuçları belirlemişlerdir. Hazırlanan kombucha örnekleri bütün suşlarda anlamlı derecede antimikrobiyal etki göstermiştir. Peynir altı suyundan hazırlanan kombucha örnekleri içinde en yüksek antimikrobiyal aktivite *E. coli* üzerinde 190 mm çapta zonla gözlemlenmiştir. Ayrıca *S. aureus*'ta 183 mm ve *Bacillus subtilis*' ise 123 mm çapta zon gözlemlenmiştir. Kombucha kültürü ile fermente edilmeyen peynir altı suyunda ise her 3 suş için 90 mm çapta zon gözlemlenmiştir. Bu sonuçlara bakarak kombucha kültürü ile fermantasyona uğratılan doğal ürünlerin antimikrobiyal özelliklerin arttığı söylenebilir. Bu sonuçlar yaptığımız çalışmada elde edilen verileri destekler niteliktedir.

Coskun ve Kayisoglu (2020) yaptıkları çalışmada siyah çay, yeşil çay, adaçayı (*Salvia fruticosa* Mill.), nane (*Mentha piperita* L.) ve ıhlamur (*Tilia cordata*) yapraklarını kullanarak kombucha hazırlamışlardır. Hazırladıkları kombuchaların fermantasyonun 3, 7, 10 ve 14. gününde örnekler alıp antimikrobiyal testlerini yapmışlardır. Hazırladıkları örnekleri *Lactobacillus*, *Lactococcus*, maya ve asetik asit bakteri suşlarına uygulamışlardır. Antimikrobiyal aktivite sonuçlarını, oluşan zon çaplarını ölçerek belirlemişlerdir. Uygulanan bütün suşlarda antimikrobiyal aktivite belirlenmiştir. 3 günlük fermantasyon sonucunda *Lactobacillus* suşlarında en iyi antimikrobiyal aktivitenin ıhlamur ile hazırlanan kombucha olduğunu tespit etmişler. *Lactococcus* ve maya için ise 3 günlük fermantasyon sonucunda siyah çayın en iyisi olduğu belirlenirken asetik asit bakterileri için 3 günlük fermantasyon sonucunda adaçayı ile hazırlanan kombuchanın en iyisi olduğunu belirlemişlerdir. 7 günlük fermantasyon ürünlerine bakıldığında *Lactobacillus* ve *Lactococcus* için en iyi örneğin yeşil çay ile hazırlanan

kombucha örneği olduğu görülürken maya için ıhlamur asetik asit bakterisi için ise adaçayı olduğu görölmektedir. 10 günlük fermantasyon ürünleri incelendiğinde *Lactobacillus* için en iyi örneğin ıhlamur olduğu gözlemlenirken *Lactococcus* için yeşil çayın maya ve asetik asit bakterisi için adaçayının en iyi antimikrobiyal aktivite gösterdiği belirlenmiştir. 14 günlük fermantasyon ürünleri incelendiğinde *Lactobacillus* ve maya için yeşil çay *Lactococcus* için adaçayı asetik asit bakterisi için ıhlamur ile hazırlanan kombuchanın en iyi olduğu görölmüştür. Bu sonuçlardan yola çıkarak yaptığımız çalışmadaki gibi geleneksel kombucha hazırlama ürünü olan siyah çay ve yeşil çay dışında farklı substratlar kullanılarak hazırlanan kombucha örneklerinin antimikrobiyal özellik gösterdiği söylenilebilir. Ayrıca yaptığımız çalışma ile elde edilen fermantasyon süresine bağlı olarak antimikrobiyal aktivitede doğrusal bir artış olabileceği ifadesi bu çalışma ile desteklenmektedir.

Yapılan anti-mikrobiyal testler sonucunda farklı substralar kullanılarak hazırlanan kombucha örnekleri çalışılmıştır. Elde edilen verilere göre fermantasyonun 1. günü anti-mikrobiyal etki gözlenmemiştir. Anti-mikrobiyal etkinin ortaya çıktığı ilk zaman fermantasyonun 7. günüdür. 7. gün örneklerinde ise sadece siyah çay ve yeşil çay ile hazırlanan örneklerin anti-mikrobiyal etki gösterdiği belirlenmiştir. Fermantasyonun 14. günü bütün örneklerde anti-mikrobiyal özellik gözlenmiştir. Bunun en önemli nedeni olarak fermantasyon süresi boyunca üretilen asetik asit olduğu düşünölmüştür.

4.3 Total Fenol İçeriği

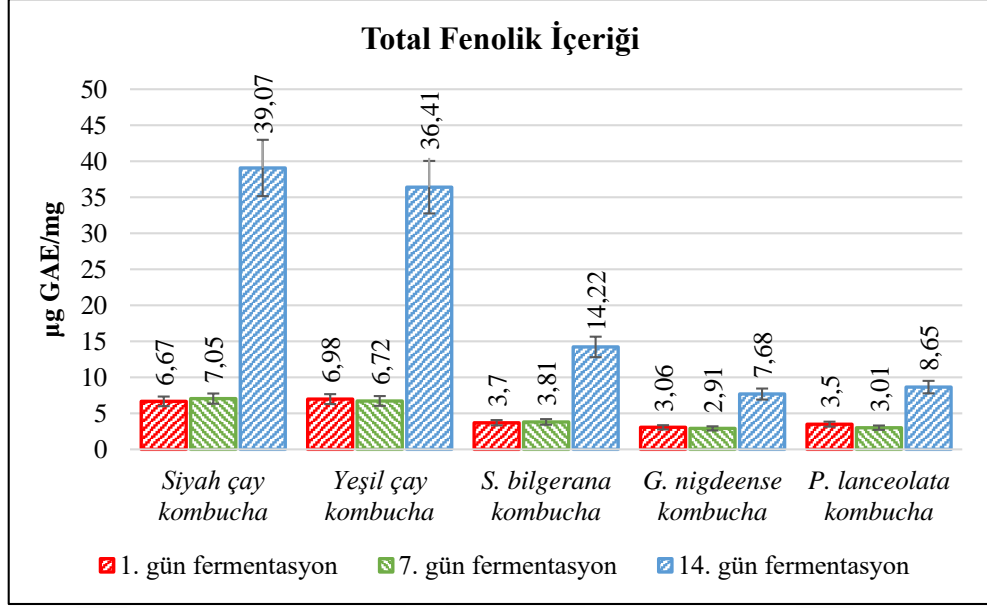
Siyah çay, yeşil çay, *S. bilgerana*, *G. nigdeense* ve *P. lanceolata* substratları kullanılarak hazırlanan kombucha çaylarından 1., 7. ve 14. günlerinde alınarak hazırlanan liyofilizatların total fenolik madde içeriğini belirlemek amacı ile Folin–Ciocalteu metodu uygulanmıştır. Bu metot sonucu elde edilen veriler gallik asit eşdeğerleri olarak hesaplanmıştır. Fenolik maddelerin radikal süpürücü aktivitesi aromatik halkada bulunan hidroksil gruplarının sayısıyla yakından ilişkilidir. Çok sayıda hidroksil grubu içeren bileşikler daha yüksek antioksidan aktiviteye sahiptir. Antioksidan aktivitenin yüksek olması örneğin bünyesinde ihtiva ettiği fenollerle yakından ilişkilidir. Total fenol içeriklerine bakıldığında fermantasyonun 1. günü alınarak hazırlanan liyofilizatlarla fermantasyonun son günü olan 14. gün alınan liyofilizatların tümünde total fenolik içerik belirlenmiştir. 1. gün örneklerdeki total fenolik içerikleri siyah çay kombucha

örneklerinde 6,67 µg GAE/mg, yeşil çay kombucha örneklerinde 6,98 µg GAE/mg, *S. bilgerana* kombucha örneklerinde 6,98 µg GAE/mg ve *G. nigdeense* kombucha örneklerinde 3,06 µg GAE/mg olarak tespit edilmiştir. Fermantasyonun 7. günün de alınan örneklerde ise total fenolik içeriği siyah çay kombucha örneklerinde 7,05 µg GAE/mg, yeşil çay kombucha örneklerinde 6,72 µg GAE/mg, *S. bilgerana* kombucha örneklerinde 3,81 µg GAE/mg ve *G. nigdeense* kombucha örneklerinde 2,91 µg GAE/mg olarak belirlenmiştir. Fermantasyonun son günü olan 14. günde alınan örneklerin total fenolik içerikleri ise siyah çay kombucha örneklerinde 39,07 µg GAE/mg, yeşil çay kombucha örneklerinde 36,41 µg GAE/mg, *S. bilgerana* kombucha örneklerinde 14,22 µg GAE/mg ve *G. nigdeense* kombucha örneklerinde 7,68 µg GAE/mg olarak ölçülmüştür. Fermantasyon süresine bağlı olarak kombucha liyofilizatlarının total fenolik içeriği anlamlı şekilde artmıştır. Sonuçlar Çizelge 4.18’de gösterilmektedir.

Çizelge 4.18. Total fenolik içeriği (µg GAE/mg)

Kombu Çayı Örnekleri	1. gün fermantasyon	7. gün fermantasyon	14. gün fermantasyon
Siyah çay kombucha	6,67	7,05	39,07
Yeşil çay kombucha	6,98	6,72	36,41
<i>S. bilgerana</i> kombucha	3,70	3,81	14,22
<i>G. nigdeense</i> kombucha	3,06	2,91	7,68
<i>P. lanceolata</i> kombucha	3,50	3,01	8,65

Ahmed vd. (2020) yaptıkları çalışmada siyah çay, arpa ve pirinç olmak üzere farklı substratlar kullanarak hazırladıkları kombucha örneklerinde total fenolik içeriklerini analiz etmişlerdir. Bu çalışma da fermantasyon süresi olarak 6. ve 8. günü tercih etmişlerdir. Bu günlerde alınan örneklerdeki total fenolik madde miktarını tayin etmişlerdir. Çalışmanın sonucunda siyah çay ile hazırlanan kombucha örneklerinin 6. gündeki total fenolik madde miktarı 36,22 ppm iken 8. günde 45,69 ppm olarak ölçülmüştür. Fermantasyon süresi arttıkça total fenolik madde miktarının arttığını tespit etmişlerdir. Bu sonuçlar bizim elde ettiğimiz sonuçlar ile paralellik göstermektedir.



Şekil 4.19. Liyofilizatların total fenolik içeriği

Fibrianto vd. (2020) yaptıkları çalışmada siyah çay ve normal kahveden daha sert olan robusta kahve yapraklarını kullanılarak kombucha hazırlamışlardır. 3 günlük fermentasyon süresine tabii tuttıkları örneklerin total fenolik içeriklerini Folin–Ciocalteu metodu ile belirlemişlerdir. Fermentasyon süresi sonunda siyah çay ile hazırlanan kombucha örneklerinin total fenolik içeriğinin 291,3 µg GAE/mg olarak belirlerken robusta kahve yapraklarından hazırladıkları kombucha örneklerinin total fenolik madde miktarını 125,3 µg GAE/mg olarak belirlemişlerdir. Yapılan bu çalışma farklı bitki yapraklarının kullanımı sonucu kombucha hazırlanması açısından yaptığımız çalışma ile benzerlik göstermiştir. Sonuç olarak farklı substratlar kullanılarak hazırlanan kombucha örneklerinde yaptığımız çalışmada ki gibi total fenolik madde içeriği belirlenmiştir.

Total fenolik içeriği belirlemek için yapılan analizler sonucunda bütün örneklerde fenolik içerik belirlenmiştir. Fenolik içeriğin pek çok biyolojik aktivite ile ilişkisi olduğu bilinmektedir. Fermentasyonun ilk günlerinde fenolik içerik miktarı az bulunurken 14. günde artış göstermiştir.

4.4 Anti-kanserojen Test Sonuçları

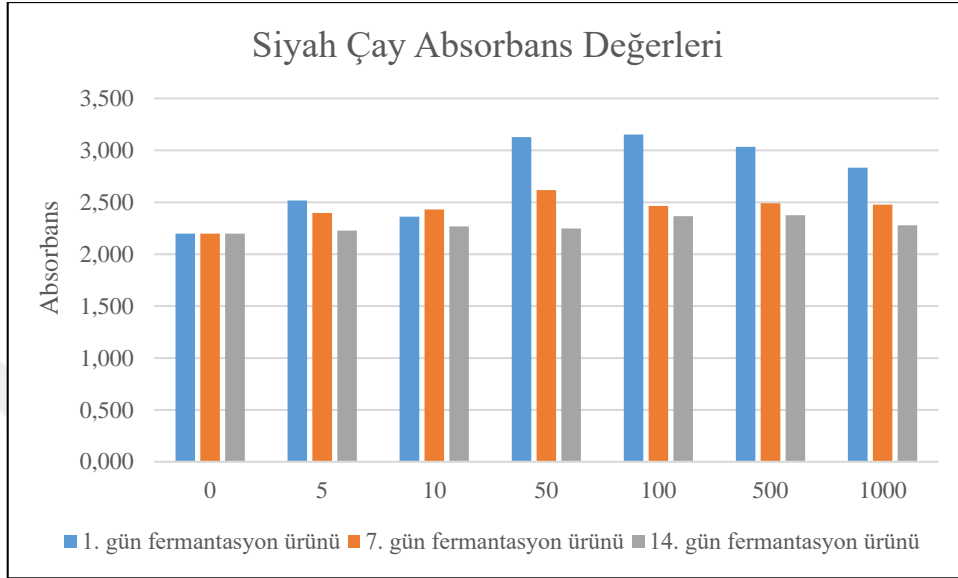
Siyah çay kullanılarak hazırlanan kombu çayı örneklerinin antikanserojen aktivitelerini belirlemek için 24 saat inkübe edilen kolon kanseri (CaCo-2) hücrelerinin sitotoksosite ve canlılık değişimleri XTT canlılık testi ile analiz edilmiştir. Yapılan analizlerde 5, 10, 50, 100, 500 ve 1000 µg/mL konsantrasyonlarda çözeltiler kullanılmıştır. Kontrol olarak 0 µg/mL kombu çayı örneklerinin canlı hücre sayıları tüm zaman dilimlerinde 10^4 olarak kabul edilmiştir. Hücre canlılığının hesaplanmasında % giderim elde edilemediği için absorbans değerleri verilmiştir. CaCo-2 hücreleri 24 saat siyah çay ile hazırlanan kombu çayının 1. gün fermantasyon ürünleri ile inkübe edildiğinde doza bağlı olarak (5, 10, 50, 100, 500 ve 1000 µg/mL) absorbans değerleri sırasıyla 2,518±0,029, 2,362±0,120, 3,127±0,115, 3,153±0,176, 3,033±0,085 ve 2,834±0,151 olarak belirlenmiştir. CaCo-2 hücreleri 24 saat siyah çay ile hazırlanan kombu çayının 7. gün fermantasyon ürünleri ile inkübe edildiğinde doza bağlı olarak (5, 10, 50, 100, 500 ve 1000 µg/mL) absorbans değerleri sırasıyla 2,397±0,021, 2,431±0,069, 2,618±0,151, 2,464±0,340, 2,491±0,192 ve 2,478±0,153 olarak belirlenmiştir. CaCo-2 hücreleri 24 saat siyah çay ile hazırlanan kombu çayının 14. gün fermantasyon ürünleri ile inkübe edildiğinde doza bağlı olarak (5, 10, 50, 100, 500 ve 1000 µg/mL) absorbans değerleri sırasıyla 2,228±0,029, 2,268±0,108, 2,247±0,072, 2,367±0,129, 2,376±0,091 ve 2,278±0,063 olarak belirlenmiştir. Analiz edilen örneklerin absorbans değerleri Çizelge 4.19’da gösterilmiştir.

Çizelge 4.19. Siyah çay kombuchanın XTT absorbans değerleri

Siyah çay kombucha			
Kons. (µg/mL)	1. gün fermantasyon	7. gün fermantasyon	14. gün fermantasyon
0	2,198±0,120	2,198±0,120	2,198±0,120
5	2,518±0,029	2,397±0,021	2,228±0,029
10	2,362±0,120	2,431±0,069	2,268±0,108
50	3,127±0,115	2,618±0,151	2,247±0,072
100	3,153±0,176	2,464±0,340	2,367±0,129
500	3,033±0,085	2,491±0,192	2,376±0,091
1000	2,834±0,151	2,478±0,153	2,278±0,063

Elde edilen veriler analiz edildiğinde canlı hücre sayısında azalma olmadığı gözlenmiştir. Artan konsantrasyona bağlı olarak canlı hücre sayısında artış gözlenmiştir. Özellikle fermantasyonun 1. gününde alınan örneklerin 50 µg/mL ve üzeri konsantrasyonlarda artış

olmuştur. Fermantasyonun 7. ve 14. gününde alınan örnekler için de 50 µg/mL ve üzeri konsantrasyonlarda artış olduğu belirlenmiştir. Bu verilere göre siyah çay ile hazırlanan kombu çayı örneklerinin anti-kanserojen aktivitesi olmadığı sonucuna ulaşılmıştır. Sonuçlar Şekil 4.20’de gösterilmiştir.



Şekil 4.20. Siyah çay kombucha canlı hücre sayısı

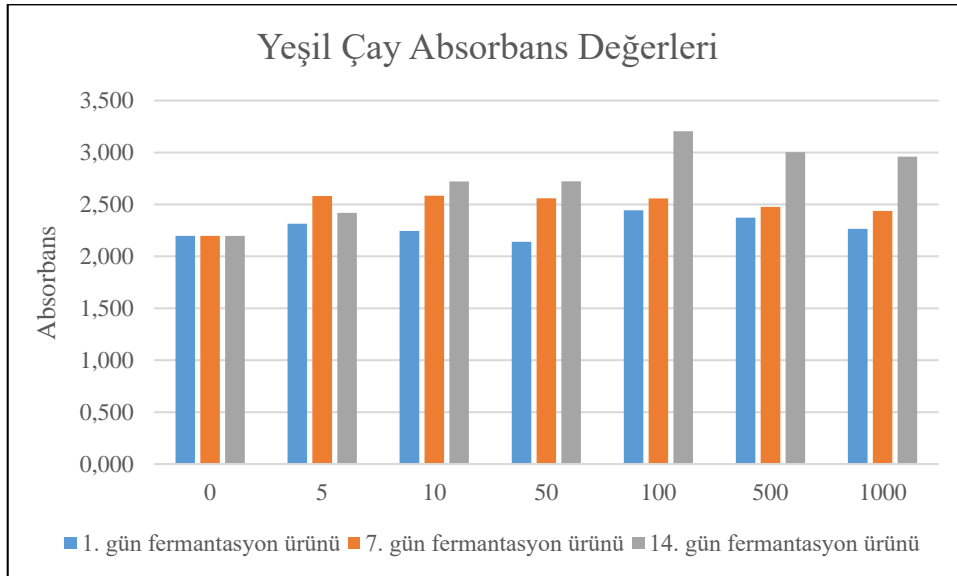
Yeşil çay kullanılarak hazırlanan kombu çayı örneklerinin antikanserojen aktivitelerini belirlemek için 24 saat inkübe edilen kolon kanseri (CaCo-2) hücrelerinin sitotoksisite ve canlılık değişimleri XTT canlılık testi ile analiz edilmiştir. Yapılan analizlerde 5, 10, 50, 100, 500 ve 1000 µg/mL konsantrasyonlarda çözeltiler kullanılmıştır. Kontrol olarak 0 µg/mL kombu çayı örneklerinin canlı hücre sayıları tüm zaman dilimlerinde 10^4 olarak kabul edilmiştir. Hücre canlılığının hesaplanmasında % giderim elde edilemediği için absorbans değerleri verilmiştir. CaCo-2 hücreleri 24 saat siyah çay ile hazırlanan kombu çayının 1. gün fermantasyon ürünleri ile inkübe edildiğinde doza bağlı olarak (5, 10, 50, 100, 500 ve 1000 µg/mL) absorbans değerleri sırasıyla $2,314 \pm 0,077$, $2,246 \pm 0,076$, $2,140 \pm 0,053$, $2,444 \pm 0,105$, $2,372 \pm 0,099$ ve $2,266 \pm 0,063$ olarak belirlenmiştir. CaCo-2 hücreleri 24 saat siyah çay ile hazırlanan kombu çayının 7. gün fermantasyon ürünleri ile inkübe edildiğinde doza bağlı olarak (5, 10, 50, 100, 500 ve 1000 µg/mL) absorbans değerleri sırasıyla $2,581 \pm 0,029$, $2,585 \pm 0,066$, $2,559 \pm 0,207$, $2,557 \pm 0,164$, $2,476 \pm 0,223$ ve $2,438 \pm 0,289$ olarak belirlenmiştir. CaCo-2 hücreleri 24 saat siyah çay ile hazırlanan kombu çayının 14. gün fermantasyon ürünleri ile inkübe edildiğinde doza bağlı olarak (5, 10, 50, 100, 500 ve 1000 µg/mL) absorbans değerleri sırasıyla $2,420 \pm 0,135$, $2,722 \pm 0,152$,

2,724±0,107, 3,206±0,079, 3,004±0,067 ve 2,960±0,290 olarak belirlenmiştir. Analiz edilen örneklerin absorbans değerleri Çizelge 4.20’de gösterilmiştir.

Çizelge 4.20. Yeşil çay kombuchanın XTT absorbans değerleri

Yeşil çay kombucha			
Kons. (µg/mL)	1. gün fermantasyon	7. gün fermantasyon	14. gün fermantasyon
0	2,198±0,120	2,198±0,120	2,198±0,120
5	2,314±0,077	2,581±0,029	2,420±0,135
10	2,246±0,076	2,585±0,066	2,722±0,152
50	2,140±0,053	2,559±0,207	2,724±0,107
100	2,444±0,105	2,557±0,164	3,206±0,079
500	2,372±0,099	2,476±0,223	3,004±0,067
1000	2,266±0,063	2,438±0,289	2,960±0,290

Elde edilen veriler analiz edildiğinde canlı hücre sayısında azalma olmadığı gözlenmiştir. Artan konsantrasyona bağlı olarak canlı hücre sayısında artış gözlenmiştir. Özellikle fermantasyonun 14. gününde alınan örneklerin 10 µg/mL ve üzeri konsantrasyonlarda artış olmuştur. Fermantasyonun 7. ve 14. gününde alınan örnekler için de artış olduğu belirlenmiştir. Bu verilere göre yeşil çay ile hazırlanan kombucha örneklerinin anti-kanserojen aktivitesi olmadığı sonucuna ulaşılmıştır. Sonuçlar Şekil 4.21’de gösterilmiştir.



Şekil 4.21. Yeşil çay kombucha canlı hücre sayısı

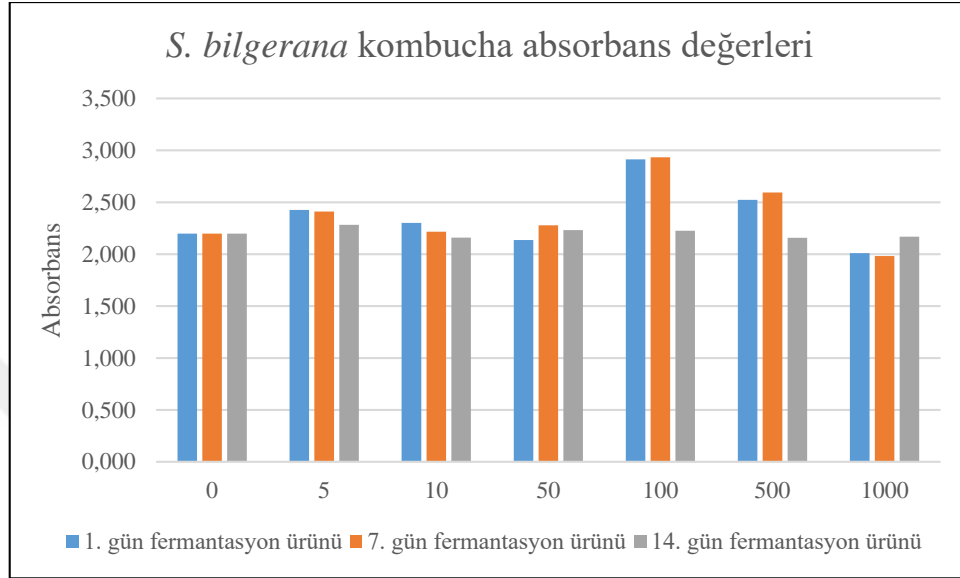
S. bilgerana kullanılarak hazırlanan kombu çayı örneklerinin antikanserojen aktivitelerini belirlemek için 24 saat inkübe edilen kolon kanseri (CaCo-2) hücrelerinin sitotoksosite ve canlılık değişimleri XTT canlılık testi ile analiz edilmiştir. Yapılan analizlerde 5, 10, 50, 100, 500 ve 1000 µg/mL konsantrasyonlarda çözeltiler kullanılmıştır. Kontrol olarak 0 µg/mL kombu çayı örneklerinin canlı hücre sayıları tüm zaman dilimlerinde 10^4 olarak kabul edilmiştir. Hücre canlılığının hesaplanmasında % giderim elde edilemediği için absorbans değerleri verilmiştir. Diğer örneklere ait canlılık değerleri ortalama absorbans değerlerinden orantısal olarak hesaplanmıştır. CaCo-2 hücreleri 24 saat siyah çay ile hazırlanan kombu çayının 1. gün fermantasyon ürünleri ile inkübe edildiğinde doza bağlı olarak (5, 10, 50, 100, 500 ve 1000 µg/mL) absorbans değerleri sırasıyla 2,427±0,120, 2,302±0,093, 2,137±0,086, 2,913±0,287, 2,524±0,319 ve 2,010±0,035 olarak belirlenmiştir. CaCo-2 hücreleri 24 saat siyah çay ile hazırlanan kombu çayının 7. gün fermantasyon ürünleri ile inkübe edildiğinde doza bağlı olarak (5, 10, 50, 100, 500 ve 1000 µg/mL) absorbans değerleri sırasıyla 2,411±0,029, 2,217±0,096, 2,279±0,137, 2,934±0,043, 2,595±0,362 ve 1,983±0,053 olarak belirlenmiştir. CaCo-2 hücreleri 24 saat siyah çay ile hazırlanan kombu çayının 14. gün fermantasyon ürünleri ile inkübe edildiğinde doza bağlı olarak (5, 10, 50, 100, 500 ve 1000 µg/mL) absorbans değerleri sırasıyla 2,283±0,165, 2,160±0,038, 2,232±0,034, 2,226±0,085, 2,158±0,085 ve 2,169±0,075 olarak belirlenmiştir. Analiz edilen örneklerin absorbans değerleri Çizelge 4.21’de gösterilmiştir.

Çizelge 4.21. *S. bilgerana* kombuchanın XTT absorbans değerleri

<i>S. bilgerana</i> kombucha			
Kons. (µg/mL)	1. gün fermantasyon	7. gün fermantasyon	14. gün fermantasyon
0	2,198±0,120	2,198±0,120	2,198±0,120
5	2,427±0,120	2,411±0,029	2,283±0,165
10	2,302±0,093	2,217±0,096	2,160±0,038
50	2,137±0,086	2,279±0,137	2,232±0,034
100	2,913±0,287	2,934±0,043	2,226±0,085
500	2,524±0,319	2,595±0,362	2,158±0,085
1000	2,010±0,035	1,983±0,053	2,169±0,075

Eldedilen veriler analiz edildiğinde canlı hücre sayısında azalma olmadığı gözlenmiştir. Artan konsantrasyona bağlı olarak canlı hücre sayısında artış gözlenmiştir. Özellikle fermantasyonun 1. ve 7. gününde alınan örneklerin 100 µg/mL artış gözlenirken 500 ve

1000 µg/mL konsantrasyonlarda bu artış azalma göstermiştir. Fermantasyonun 14. gününde alınan örnekler için de herhangi bir artış belirlenmemiştir. Bu verilere göre *S. bilgerana* ile hazırlanan kombu çayı örneklerinin anti-kanserojen aktivitesi olmadığı sonucuna ulaşılmıştır. Sonuçlar Şekil 4.22’de gösterilmiştir.



Şekil 4.22. *S. bilgerana* kombucha canlı hücre sayısı

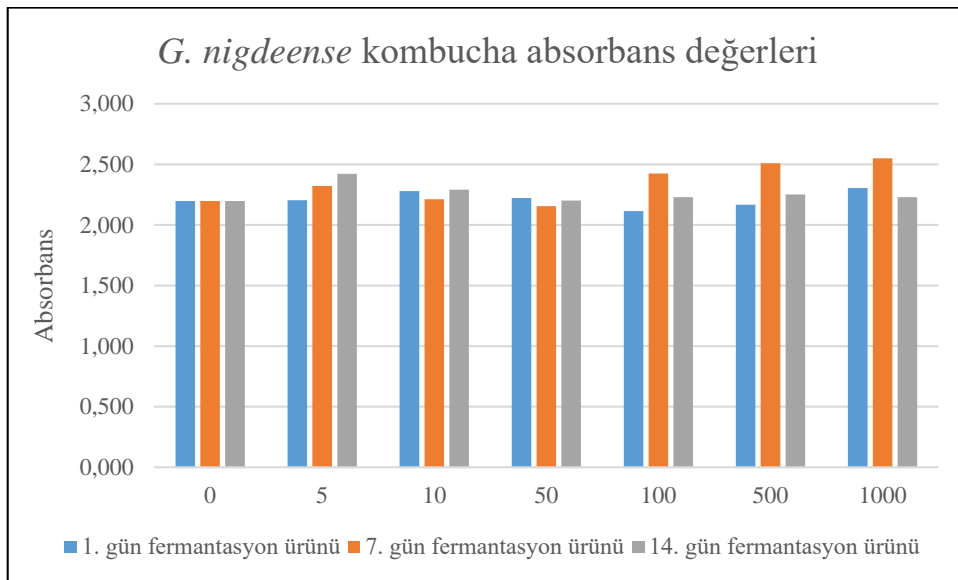
G. nigdeense kullanılarak hazırlanan kombu çayı örneklerinin antikanserojen aktivitelerini belirlemek için 24 saat inkübe edilen kolon kanseri (CaCo-2) hücrelerinin sitotoksosite ve canlılık değişimleri XTT canlılık testi ile analiz edilmiştir. Yapılan analizlerde 5, 10, 50, 100, 500 ve 1000 µg/mL konsantrasyonlarda çözeltiler kullanılmıştır. Kontrol olarak 0 µg/mL kombu çayı örneklerinin canlı hücre sayıları tüm zaman dilimlerinde 10^4 olarak kabul edilmiştir. Hücre canlılığının hesaplanmasında % giderim elde edilemediği için absorbans değerleri verilmiştir. CaCo-2 hücreleri 24 saat siyah çay ile hazırlanan kombu çayının 1. gün fermantasyon ürünleri ile inkübe edildiğinde doza bağlı olarak (5, 10, 50, 100, 500 ve 1000 µg/mL) absorbans değerleri sırasıyla 2,204±0,023, 2,279±0,086, 2,222±0,158, 2,114±0,203, 2,168±0,120 ve 2,305±0,155 olarak belirlenmiştir. CaCo-2 hücreleri 24 saat siyah çay ile hazırlanan kombu çayının 7. gün fermantasyon ürünleri ile inkübe edildiğinde doza bağlı olarak (5, 10, 50, 100, 500 ve 1000 µg/mL) absorbans değerleri sırasıyla 2,322±0,238, 2,213±0,010, 2,155±0,166, 2,425±0,040, 2,510±0,096 ve 2,551±0,042 olarak belirlenmiştir. CaCo-2 hücreleri 24 saat siyah çay ile hazırlanan kombu çayının 14. gün fermantasyon ürünleri ile inkübe edildiğinde doza bağlı olarak (5, 10, 50, 100, 500 ve 1000 µg/mL) absorbans

değerleri sırasıyla $2,422\pm 0,107$, $2,291\pm 0,095$, $2,202\pm 0,107$, $2,230\pm 0,141$, $2,253\pm 0,125$ ve $2,229\pm 0,069$ olarak belirlenmiştir. Analiz edilen örneklerin absorbans değerleri Çizelge 4.22’de gösterilmiştir.

Çizelge 4.22. *G. nigdeense* kombuchanın XTT absorbans değerleri

<i>G. nigdeense</i> kombucha			
Kons. (µg/mL)	1. gün fermantasyon	7. gün fermantasyon	14. gün fermantasyon
0	$2,198\pm 0,120$	$2,198\pm 0,120$	$2,198\pm 0,120$
5	$2,204\pm 0,023$	$2,322\pm 0,238$	$2,422\pm 0,107$
10	$2,279\pm 0,086$	$2,213\pm 0,010$	$2,291\pm 0,095$
50	$2,222\pm 0,158$	$2,155\pm 0,166$	$2,202\pm 0,107$
100	$2,114\pm 0,203$	$2,425\pm 0,040$	$2,230\pm 0,141$
500	$2,168\pm 0,120$	$2,510\pm 0,096$	$2,253\pm 0,125$
1000	$2,305\pm 0,155$	$2,551\pm 0,042$	$2,229\pm 0,069$

Elde edilen veriler analiz edildiğinde canlı hücre sayısında azalma olmadığı gözlenmiştir. Artan konsantrasyona bağlı olarak canlı hücre sayısında artış gözlenmiştir. Özellikle fermantasyonun 7. gününde alınan örneklerin 100 µg/mL artış gözlenmiştir. Fermantasyonun 1. ve 14. gününde alınan örnekler için de herhangi bir artış belirlenmemiştir. Bu verilere göre *G. nigdeense* ile hazırlanan kombu çayı örneklerinin anti-kanserojen aktivitesi olmadığı sonucuna ulaşılmıştır. Sonuçlar Şekil 4.23’te gösterilmiştir.



Şekil 4.23. *G. nigdeense* kombucha canlı hücre sayısı

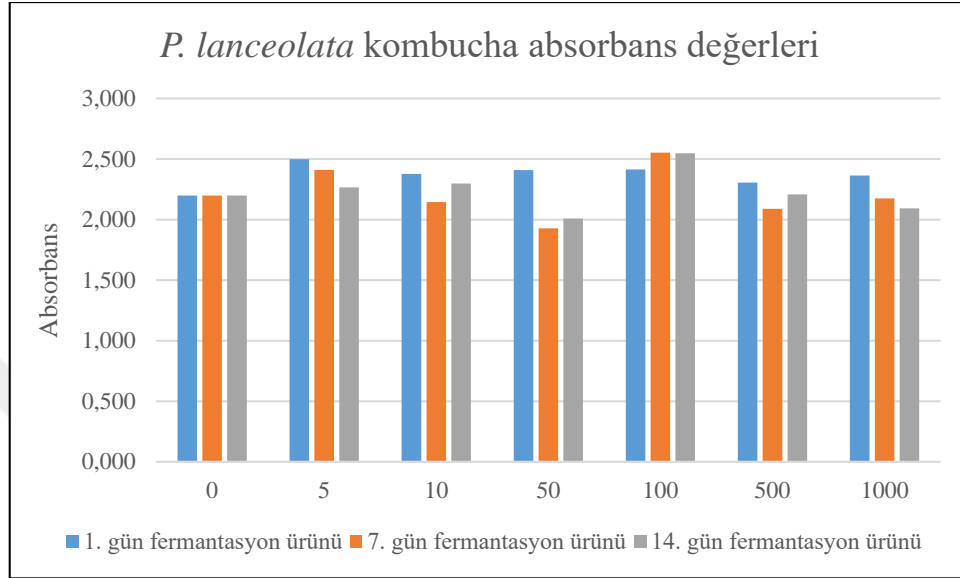
P. lanceolata kullanılarak hazırlanan kombu çayı örneklerinin antikanserojen aktivitelerini belirlemek için 24 saat inkübe edilen kolon kanseri (CaCo-2) hücrelerinin sitotoksosite ve canlılık değişimleri XTT canlılık testi ile analiz edilmiştir. Yapılan analizlerde 5, 10, 50, 100, 500 ve 1000 µg/mL konsantrasyonlarda çözeltiler kullanılmıştır. Kontrol olarak 0 µg/mL kombu çayı örneklerinin canlı hücre sayıları tüm zaman dilimlerinde 10⁴ olarak kabul edilmiştir. Hücre canlılığının hesaplanmasında % giderim elde edilemediği için absorbans değerleri verilmiştir. CaCo-2 hücreleri 24 saat siyah çay ile hazırlanan kombu çayının 1. gün fermantasyon ürünleri ile inkübe edildiğinde doza bağlı olarak (5, 10, 50, 100, 500 ve 1000 µg/mL) absorbans değerleri sırasıyla 2,499±0,025, 2,377±0,144, 2,408±0,124, 2,414±0,111, 2,306±0,194 ve 2,363±0,227 olarak belirlenmiştir. CaCo-2 hücreleri 24 saat siyah çay ile hazırlanan kombu çayının 7. gün fermantasyon ürünleri ile inkübe edildiğinde doza bağlı olarak (5, 10, 50, 100, 500 ve 1000 µg/mL) absorbans değerleri sırasıyla 2,410±0,083, 2,145±0,013, 1,928±0,071, 2,553±0,315, 2,089±0,078 ve 2,175±0,200 olarak belirlenmiştir. CaCo-2 hücreleri 24 saat siyah çay ile hazırlanan kombu çayının 14. gün fermantasyon ürünleri ile inkübe edildiğinde doza bağlı olarak (5, 10, 50, 100, 500 ve 1000 µg/mL) absorbans değerleri sırasıyla 2,266±0,098, 2,298±0,095, 2,008±0,049, 2,548±0,229, 2,208±0,254, 2,093±0,13 olarak belirlenmiştir. Analiz edilen örneklerin absorbans değerleri Çizelge 4.23'te gösterilmiştir.

Çizelge 4.23. *P. lanceolata* kombuchanın XTT absorbans değerleri

<i>P. lanceolata</i> kombucha			
Kons. (µg/mL)	1. gün fermantasyon	7. gün fermantasyon	14. gün fermantasyon
0	2,198±0,120	2,198±0,120	2,198±0,120
5	2,499±0,025	2,410±0,083	2,266±0,098
10	2,377±0,144	2,145±0,013	2,298±0,095
50	2,408±0,124	1,928±0,071	2,008±0,049
100	2,414±0,111	2,553±0,315	2,548±0,229
500	2,306±0,194	2,089±0,078	2,208±0,254
1000	2,363±0,227	2,175±0,200	2,093±0,136

Elde edilen veriler analiz edildiğinde canlı hücre sayısında azalma olmadığı gözlenmiştir. Artan konsantrasyona bağlı olarak canlı hücre sayısında artış gözlenmiştir. Fermantasyonun 7. ve 14. gününde alınan örneklerin 50 µg/mL konsantrasyonlarında nispeten azalma gözlenmiştir. Bu azalmanın %50'den az olmasından dolayı bir

inhibisyon olduğu söylenemez. Fermantasyonun 1. gününde alınan örnekler için herhangi bir artış belirlenmemiştir. Bu verilere göre *P. lanceolata* ile hazırlanan kombucha örneklerinin anti-kanserojen aktivitesi olmadığı sonucuna ulaşılmıştır. Sonuçlar Şekil 4.24'te gösterilmiştir.



Şekil 4.24. *P. lanceolata* kombucha canlı hücre sayısı

Hazırlanan kombucha örneklerinin anti-kanserojen aktivitelerini belirlemek için XTT metodu kullanıldı. Elde edilen verilere göre hazırlanan kombucha örneklerinden herhangi biri insan kolorektal kanser hücre hattı (CaCo-2) üzerine sitotoksik etki göstermedi. Srihari vd. (2013a) yaptıkları çalışmada siyah çay kullanarak kombucha hazırlamışlardır. Elde ettikleri kombucha çayını etil asetat (1:2 v/v) ile fraksiyona tabi tutmuşlardır. Daha sonra çözücüyü uzaklaştırarak hazırladıkları örnekleri distile su ile çözerek liyofilize etmişlerdir. Hazırladıkları liyofilizatları 100, 200, 300, 400 ve 500 µg/mL konsantrasyonlarda hazırlayarak prostat kanser hücre hatları (PC-3) üzerinde test etmişlerdir. Sonuç olarak artan konsantrasyonla birlikte yüksek oranda inhibisyon tespit etmişlerdir. Özellikle 500 µg/mL konsantrasyonda hazırlanan örneklerde %60'a yakın inhibisyon elde etmişlerdir. Yaptığımız çalışmada elde edilen verilere göre siyah çay ile hazırlanan kombucha örnekleri insan kolorektal kanser hücre hattı (CaCo-2) üzerinde inhibisyon göstermemiştir. Bunun nedeni olarak örneklerin etil asetat ile fraksiyona tabi tutulmamış olmaması düşünülmektedir. Ayrıca kullanılan kanser hücre hatlarının farklı olmasından dolayı da benzer etkiyi göstermediği düşünülmektedir.

Četojević-Simin vd. (2008) yaptıkları çalışmada siyah çay ve geyikotu (*Satureja montana* L.) kullanarak kombucha hazırlamışlardır. Kombucha hazırlamak için 1 litre suya 70 g şükro ve 5 g kuru bitki materyali kullanmışlardır. Hazırladıkları kombu çayı örneklerini HT-29 (kolon adenokarsinoma), HeLa hücreleri (serviks epitel karsinoma) ve MCF-7 (göğüs adenokarsinoma) hücre hatları üzerinde test etmişlerdir. Hücre hatları üzerine hazırladıkları kombu çayı örneklerinden 20 µL uygulamışlardır. Sülfrodamin B (SRB) yöntemiyle incelenmiş ve % canlılık belirlenmiştir. Sonuç olarak HeLa hücreleri (serviks epitel karsinoma) üzerinde %20'den fazla inhibisyon belirlerken HT-29 (kolon adenokarsinoma) ve MCF-7 (göğüs adenokarsinoma) hücre hatları üzerinde çok daha düşük inhibisyon belirlemişlerdir. Elde ettikleri verilere göre hazırladıkları kombu çaylarının %50 inhibisyonun altında kalmasından dolayı anti-kanserojen özellik göstermediğini ileri sürmüşlerdir. Bu sonuçlar bizim yaptığımız çalışmanın sonuçları ile paralellik göstermektedir. Bu tez çalışmasında insan kolorektal kanser hücre hattı (CaCo-2) hücre hatları üzerine uygulanan kombu çayı örneklerinin de inhibisyon göstermediği belirlenmiştir.

Četojević-Simin vd. (2012) yaptıkları çalışmada *Melissa officinalis* L. kullanarak kombu çayı hazırlamışlardır. Kombucha hazırlamak için 1 litre suya 70 g şükro ve 5 g kuru bitki materyali kullanmışlardır. Hazırladıkları kombu çayı örneklerini HT-29 (kolon adenokarsinoma), HeLa hücreleri (serviks epitel karsinoma) ve MCF-7 (göğüs adenokarsinoma) hücre hatları üzerinde test etmişlerdir. Hücre hatları üzerine hazırladıkları kombu çayı örneklerinden 5-500 µg/mL konsantrasyonlarında uygulamışlardır. Ayrıca aynı konsantrasyonlarda *Melissa officinalis* L. bitkisi uygulamışlardır. Sülfrodamin B (SRB) yöntemiyle incelenmiş ve % canlılık belirlenmiştir. Sonuç olarak hazırladıkları kombu çayı örneklerinden herhangi birisi %50 inhibisyon göstermemiştir. Bitki örneğinin hücre hatlarından HeLa hücreleri (serviks epitel karsinoma) üzerine %20 inhibisyon gösterdiği belirlenmiştir. Bitki örneğinin de kombu çayı örneği gibi diğer hücre hatları üzerinde inhibisyon göstermediğini belirlemişlerdir. Elde ettikleri sonuçlardan yola çıkarak *Melissa officinalis* L. bitkisi kullanılarak hazırlanan kombu çayı örneklerinin anti-kanserojen etkisi olmadığını belirlemişlerdir. Bu çalışmadan elde edilen veriler yaptığımız çalışmanın verileri ile paralellik göstermiştir.

Kaewkod vd. (2019) yaptıkları çalışmada yeşil, siyah ve oolong çayını kullanarak kombucha çayı hazırlamışlardır. Ayrıca bu çayların kombucha kültürü ile fermente edilmemiş ancak içerisini daha önceden hazırlanmış kombucha çayının sıvısından ilave edilen hallerini de kullanmışlardır. Bir deney grubunda ise hazırladıkları kombucha çaylarını 100°C'de 5 dk kaynatmışlardır. Kombucha çaylarını %1 kuru çay örneği ve %10 sükröz kullanarak hazırlamışlardır. Hazırladıkları kombucha çaylarını insan kolorektal kanser hücre hattı (CaCo-2) üzerinde test etmişlerdir. Sonuçları MTT metodu kullanarak analiz etmişlerdir. Sonuç olarak yeşil, oolong ve siyah çay kullanarak hazırladıkları kombucha çaylarının %0 inhibisyon değerleri (IC₅₀) %2,851, %1,922 ve %6.697 olarak bulunmuştur. Fermente edilmeyen örnekler içinde IC₅₀ değeri tespit edilmiştir. Isı uygulaması yaptıkları kombucha çaylarında da inhibisyon gözlemlenmiştir. Önce kombucha çaylarının içeriğinde bulunan konsantrasyonda asetik asit uygulaması yapmış ve ardından örnekleri uygulayarak inhibisyon değerlerini hesaplamışlardır. Asetik asit uygulamasının inhibisyon değerleri %50'in altında kalarak sırasıyla şu şekildedir; yeşil çay %33,155, oolong çay %12,610 ve siyah çay %8,720. Asetik asit uygulamasının inhibisyon değerlerinin kombucha çayı uygulamasından düşük olduğunu gözlemlenmiştir. Sonuç olarak hazırlanan kombucha çaylarının insan kolorektal kanser hücre hattı (CaCo-2) üzerinde inhibisyon etkisi olduğunu belirlemişlerdir. Yalnızca asetik asit uygulamasının da inhibisyon özelliği gösterdiği ama kombucha çayı değerleri kadar yüksek olmadığı belirlenmiştir. Bunun nedeni olarak kombucha çaylarının içeriğinde bulunan diğer organik asitlerin (glukuronik, glukonik, askorbik, asetik, D-sakkarik asit 1,4-lakton (DSL) ve suksinik asit) rol oynadığı ileri sürülmüştür. Yaptığımız çalışmada insan kolorektal kanser hücre hattı (CaCo-2) üzerine kombucha çayı uygulamasının benzer sonuçlar göstermediği ortaya konmuştur.

Villarreal-Soto vd. (2019) yaptıkları çalışmada siyah çay kullanarak hazırladıkları kombucha çayının antikanser özelliğini araştırmışlardır. Hazırladıkları kombucha çayını insan kolon kanseri (HCT-116) ve göğüs adenokarsinoma (MCF-7) üzerinde MTT metodunu uygulayarak test etmişlerdir. Kombucha çaylarını etil asetat ve bütanol ile fraksiyona tabii tutmuşlardır. Hazırladıkları kombucha çayı her iki kanser hücre hattında inhibisyon göstermiştir. Kombucha çayının inhibisyonu göğüs adenokarsinoma (MCF-7) hücre hattında %50'in altında kalmıştır. MCF-7 için etil asetat fraksiyonu %19 bütanol fraksiyonu %32 ve normal kombucha çayı %17 inhibisyon göstermiştir. İnsan kolon kanseri (HCT-116) hücre hattı üzerinde etil asetat fraksiyonu %55 bütanol fraksiyonu %20 ve normal kombucha çayı %23 inhibisyon göstermiştir. Bu çalışmada çözücü kullanılarak hazırlanan fraksiyonların

hücre hatları üzerinde inhibisyon etkisi gösterdiği ortaya konmuştur. Bizim yaptığımız çalışmada çözücü kullanılarak fraksiyon hazırlanmadığı için benzer sonuçlar elde edilememiştir. Çözücü kullanımının inhibisyon etkisini arttırdığı öne sürülmüştür.



BÖLÜM V

SONUÇLAR

Bu tez çalışmasında, literatürde bulunana daha önceki yapılmış olan çalışmalarda insan sağlığı üzerine pek çok faydalı özelliği olduğu bildirilen kombu çayının farklı substratlar kullanılarak geliştirilmesi amaçlanmıştır. Yapmış olduğumuz çalışmada geleneksel olarak üretilen siyah ve yeşil çayın yanısıra endemik olan bitki örnekleri ile endemik olmayan bitki örnekleri kullanılmıştır. Uygun koşullarda hazırlanan bitki örnekleri kombucha kültürü ile fermantasyona tabii tutulmuştur. Kombu çayı örneklerinden 1., 7. ve 14. günü alınan örneklerinin anti-oksidan aktivitesi, anti-mikrobiyal aktivitesi, toplam fenolik madde miktarı ve anti-oksidan özellikleri çalışılmıştır.

Yapılan analiz sonuçlarına göre:

Tüm kombu çayı örneklerinde fermantasyon süresine bağlı olarak anti-oksidan aktivitede artış gözlenmiştir. Fermentasyonun 1. gününde yapılan analizlerde antioksidan özelliğin çok düşük olduğu belirlenmiştir. Kombu çaylarından 7. gün alınan örneklerde ise antioksidan aktivitenin arttığı görülmüştür. Fermentasyonun son günü olan 14. günde yapılan analizlerde bütün örnekler için antioksidan aktivitenin ciddi oranda arttığı gözlenmiştir. Özellikle siyah ve yeşil çay ile hazırlanan kombu çaylarında yüksek antioksidan aktivite belirlenmiştir. Endemik olan altınbaş çayı (*S. bilgerana*) ile hazırlanan kombu çayı örnekleri de bir diğer yüksek antioksidan özellik gösteren kombu çayı örneğidir. Niğde yoğurtotu (*G. nigdeense*) ve derman otu (*P. lanceolata*) kombu çayı örnekleri ise antioksidan aktivite göstermesine rağmen diğer örneklerin gerisinde kalmıştır.

Hazırlanan kombu çayı örneklerinin antioksidan aktivite göstermesinde içeriğinde bulunan fenolik maddelerin etkisi olduğu düşünülmektedir. Yapılan fenolik madde analizlerinde bütün örneklerde fenolik madde içeriği tespit edilmiştir. Bütün örnekler için fenolik madde miktarı, fermantasyonun 1. ve 7. gününde çok düşük olarak belirlenirken 14. günde çok yüksek seviyelere ulaşmıştır. Özellikle siyah ve yeşil çay ile hazırlanan kombu çaylarında fenolik madde içeriğinde anlamlı derecede artış olmuştur. Endemik olan altınbaş çayı (*S. bilgerana*) ile hazırlanan kombu çayı örneklerinde ise fenolik madde

içeriği siyah ve yeşil çayın gerisinde kalırken diğer örneklerle oranla yüksektir. Niğde yoğurtotu (*G. nigdeense*) ve derman otu (*P. lanceolata*) kombu çayı örneklerinin ise fenolik madde içeriği sahip olduğu tespit edilmesine rağmen diğer örneklerle göre nispeten düşük olduğu belirlenmiştir.

Anti-mikrobiyal etkileri belirlemek için, bazı patojen suşlar üzerinde hazırlanan kombu çayı örnekleri test edilmiştir. Hazırlanan kombu çaylarından fermantasyonun 1. gününde alınan örneklerden hiçbiri anti-mikrobiyal etki göstermemiştir. Ancak fermantasyonun 7. gününde alınan örneklerde siyah ve yeşil çay antimikrobiyal etki göstermiştir. Diğer bitki örnekleri ile hazırlanan kombu çayı örnekleri fermantasyonun 7. gününde herhangi bir anti-mikrobiyal etki göstermemiştir. Fermantasyonun 14. gününde alınan örneklerin tümünde anti-mikrobiyal etki gözlenmiştir. Bunun nedeni olarak kombu çaylarının içeriğinde bulunan asetik asidin olduğu düşünülmüştür.

Anti-kanserojen etkileri belirlemek için insan kolon kanseri hücre hatları üzerinde hazırlanan kombu çayları test edilmiştir. Yapılan analizler sonucunda hiçbir örneğin insan kolon kanseri hücre hatları üzerinde öldürücü etki gösterdiği gözlenmemiştir.

Bu çalışma sonucunda elde edilen verilere göre, kombu çayının farklı substratlar kullanılarak hazırlanmasına kaynak olabileceği düşünülmektedir. Anti-oksidan, anti-mikrobiyal ve fenolik madde içeriği sayesinde üretilecek olan kombu çaylarının fonksiyonel gıda bileşenleri içeren alternatif bir içecek olarak kullanılabilmesi ortaya konmuştur. Kombu çayının, toplumda halk tarafından sıklıkla kullanılan fermantasyon ürünlerinden biri olarak yer alabileceği ve tüketimi açısından bir sakınca olmadığı belirlenmiştir. Bütün bu özelliklerinin yanı sıra, kombu çayı ile ilgili olarak yapılacak olan yeni ve daha farklı çalışmalar için bilim insanlarına yol gösterici ve yararlı bir kaynak olduğu düşünülmüştür.

KAYNAKLAR

Abshenas, J., Derakhshanfar, A., Ferdosi, M. H. and Hasanzadeh, S., "Protective effect of kombucha tea against acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice: a biochemical and histopathological study", *Comparative Clinical Pathology* 21(6), 1243-1248, 2012.

Adewusi, E. A. and Afolayan, A. J., "A review of natural products with hepatoprotective activity", *Journal of Medicinal Plants Research* 4(13), 1318-1334, 2010.

Ahmed, R. F., Hikal, M. S. and Abou-Taleb, K. A., "Biological, chemical and antioxidant activities of different types Kombucha", *Annals of Agricultural Sciences* In Press, Corrected Proof, 2020.

Aloulou, A., Hamden, K., Elloumi, D., Ali, M. B., Hargafi, K., Jaouadi, B., Ayadi, F., Elfeki, A. and Ammar, E., "Hypoglycemic and antilipidemic properties of kombucha tea in alloxan-induced diabetic rats", *BMC Complementary and Alternative Medicine* 12(1), 63-71, 2012.

Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., Esin Karademir, S. and Erçağ, E., "The cupric ion reducing antioxidant capacity and polyphenolic content of some herbal teas", *International Journal of Food Sciences and Nutrition* 57(5/6), 292-304, 2006.

Apaolaza, V., Hartmann, P., D'Souza, C. and López, C. M., "Eat organic—Feel good? The relationship between organic food consumption, health concern and subjective wellbeing", *Food Quality Preference* 63, 51-62, 2018.

Artanti, N., Susilowati, A., Aspiyanto, L. P. D. N. and Maryati, Y., Antioxidant activity of fermented broccoli and spinach by Kombucha culture, In: AIP Conference Proceedings, *AIP Publishing LLC*, India, 2017.

Asmat, U., Abad, K. and Ismail, K., "Diabetes mellitus and oxidative stress—A concise review", *Saudi Pharmaceutical Journal* 24(5), 547-553, 2016.

Azmir, J., Zaidul, I. S. M., Rahman, M. M., Sharif, K. M., Mohamed, A., Sahena, F., Jahurul, M. H. A., Ghafoor, K., Norulaini, N. A. N. and Omar, A. K. M., "Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review", *Journal of Food Engineering* 117(4), 426-436, 2013.

Balentine, D. A., Wiseman, S. A. and Bouwens, L. C. M., "The chemistry of tea flavonoids", *Critical Reviews in Food Science & Nutrition* 37(8), 693-704, 1997.

Banerjee, D., Hassarajani, S. A., Maity, B., Narayan, G., Bandyopadhyay, S. K. and Chattopadhyay, S., "Comparative healing property of kombucha tea and black tea against indomethacin-induced gastric ulceration in mice: possible mechanism of action", *Food & Function* 1(3), 284-293, 2010.

Başer, K. H. C., Honda, G. and Miki, W., Herb drugs and herbalists in Turkey, *Institute for the Study of Languages and Cultures of Asia and Africa*, Tokyo, Japan, 1986.

Battikh, H., Bakhrouf, A. and Ammar, E., "Antimicrobial effect of Kombucha analogues", *LWT-Food Science and Technology* 47(1), 71-77, 2012.

Battikh, H., Chaieb, K., Bakhrouf, A. and Ammar, E., "Antibacterial and antifungal activities of black and green kombucha teas", *Journal of Food Biochemistry* 37(2), 231-236, 2013.

Bauer-Petrovska, B. and Petrushevska-Tozi, L., "Mineral and water soluble vitamin content in the Kombucha drink", *International Journal of Food Science & Technology* 35(2), 201-205, 2000.

Bellassoued, K., Ghrab, F., Makni-Ayadi, F., Pelt, J. V., Elfeki, A. and Ammar, E., "Protective effect of kombucha on rats fed a hypercholesterolemic diet is mediated by its antioxidant activity", *Pharmaceutical Biology* 53(11), 1699-1709, 2015.

Bernhoft, A., A brief review on bioactive compounds in plants, In: Bioactive Compounds in Plants—Benefits and Risks for Man and Animals, *The Norwegian Academy of Science and Letters*, Oslo, Norway, 2010.

Bhattacharya, D., Bhattacharya, S., Patra, M. M., Chakravorty, S., Sarkar, S., Chakraborty, W., Koley, H. and Gachhui, R., "Antibacterial activity of polyphenolic fraction of kombucha against enteric bacterial pathogens", *Current Microbiology* 73(6), 885-896, 2016.

Bhattacharya, S., Gachhui, R. and Sil, P. C., "Hepatoprotective properties of kombucha tea against TBHP-induced oxidative stress via suppression of mitochondria dependent apoptosis", *Pathophysiology* 18(3), 221-234, 2011a.

Bhattacharya, S., Gachhui, R. and Sil, P. C., "Effect of Kombucha, a fermented black tea in attenuating oxidative stress mediated tissue damage in alloxan induced diabetic rats", *Food and Chemical Toxicology* 60, 328-340, 2013.

Bhattacharya, S., Manna, P., Gachhui, R. and Sil, P. C., "Protective effect of kombucha tea against tertiary butyl hydroperoxide induced cytotoxicity and cell death in murine hepatocytes", *Indian Journal of Experimental Biology* 49, 511-524, 2011b.

Blanc, P. J., "Characterization of the tea fungus metabolites", *Biotechnology Letters* 18(2), 139-142, 1996.

Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E. and Berset, C., "Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity", *LWT-Food Science and Technology* 28(1), 25-30, 1995.

Cabrera, C., Artacho, R. and Giménez, R., "Beneficial effects of green tea—a review", *Journal of the American College of Nutrition* 25(2), 79-99, 2006.

Cabrera, C., Giménez, R. and López, M. C., "Determination of tea components with antioxidant activity", *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51(15), 4427-4435, 2003.

Četojević-Simin, D. D., Bogdanović, V. V., Cvetković, D. D. and Velićanski, A. S., "Antiproliferative and antimicrobial activity of traditional kombucha and *Satureja montana* L. kombucha", *Journal of Buon* 13(3), 395-401, 2008.

Četojević-Simin, D. D., Velićanski, A. S., Cvetković, D. D., Markov, S. L., Mrđanović, J. Ž., Bogdanović, V. V. and Šolajić, S. V., "Bioactivity of lemon balm kombucha", *Food and Bioprocess Technology* 5(5), 1756-1765, 2012.

Chakravorty, S., Bhattacharya, S., Bhattacharya, D., Sarkar, S. and Gachhui, R., Kombucha: A promising functional beverage prepared from tea, In: Non-Alcoholic Beverages, *Woodhead Publishing*, India, 2019.

Chakravorty, S., Bhattacharya, S., Chatzinotas, A., Chakraborty, W., Bhattacharya, D. and Gachhui, R., "Kombucha tea fermentation: Microbial and biochemical dynamics", *International Journal of Food Microbiology* 220, 63-72, 2016.

Chandrakala, S. K., Lobo, R. O. and Dias, F. O., Kombucha (Bio-Tea): An Elixir for Life?, In: Nutrients in Beverages, *Elsevier*, India, 2019.

Coskun, F. and Kayisoglu, S., "Determination of Some Microbiological Properties of Kombucha Produced from Different Herbal Teas", *Global Journal of Research In Engineering* 20(2), 17-25, 2020.

Davis, P. H., Flora of Turkey and East Eagean Island 7, *Edinburgh University Press*, Edinburg, UK, 1982.

de Araújo, R. F. F., Martins, D. B. G. and Borba, M. A. C. S. M., Oxidative stress and disease, In: A Master Regulator of Oxidative Stress-The Transcription Factor nrf2, *IntechOpen*, Online Publish, 2016.

de Rosa, S., Iodice, C., Mitova, M., Handjieva, N., Popov, S. and Anchev, M., "Triterpene saponins and iridoid glucosides from *Galium rivale*", *Phytochemistry* 54(8), 751-756, 2000.

Deghrigue, M., Chriaa, J., Battikh, H., Kawther, A. and Bakhrouf, A., "Antiproliferative and antimicrobial activities of kombucha tea", *African Journal of Microbiology Research* 7(27), 3466-3470, 2013.

Dereli, S., *Sideritis bilgerana* P. H. Davis bitkisinin fitokimyasal analizleri, Yüksek Lisans Tezi, **Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü**, Balıkesir, s. 16, 2016.

Dipti, P., Yogesh, B., Kain, A., Pauline, T., Anju, B., Sairam, M., Singh, B., Mongia, S. S., Kumar, G. I. and Selvamurthy, W., "Lead induced oxidative stress: beneficial effects of Kombucha tea", **Biomedical and Environmental Sciences: BES** 16(3), 276-282, 2003.

Dufresne, C. and Farnworth, E., "Tea, Kombucha, and health: a review", **Food Research International** 33(6), 409-421, 2000.

Dutta, D. and Gachhui, R., "Novel nitrogen-fixing *Acetobacter nitrogenifigens* sp. nov., isolated from Kombucha tea", **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology** 56(8), 1899-1903, 2006.

Ertan, A., Azcan, N., Demirci, B. and Baser, K. H. C., "Fatty acid composition of *Sideritis* species", **Chemistry of Natural Compounds** 37(4), 301-303, 2001.

Fibrianto, K., Zubaidah, E., Muliandari, N. A., Wahibah, L. Y., Putri, S. D., Legowo, A. M. and N, A.-B. A., "Antioxidant activity optimisation of young Robusta coffee leaf kombucha by modifying fermentation time and withering pre-treatment", **IOP Conference Series: Earth and Environmental Science** 420, 012029, 2020.

Fleer, H. and Verspohl, E. J., "Antispasmodic activity of an extract from *Plantago lanceolata* L. and some isolated compounds", **Phytomedicine** 14(6), 409-415, 2007.

Fons, F., Gargadennec, A., Gueiffier, A., Roussel, J. L. and Andary, C., "Effects of cinnamic acid on polyphenol production in *Plantago lanceolata*", **Phytochemistry** 49(3), 697-702, 1998.

Fu, C., Yan, F., Cao, Z., Xie, F. and Lin, J., "Antioxidant activities of kombucha prepared from three different substrates and changes in content of probiotics during storage", **Food Science Technology** 34(1), 123-126, 2014.

Gaggia, F., Baffoni, L., Galiano, M., Nielsen, D., Jakobsen, R., Castro-Mejía, J., Bosi, S., Truzzi, F., Musumeci, F. and Dinelli, G., "Kombucha beverage from green, black and rooibos teas: a comparative study looking at microbiology, chemistry and antioxidant activity", *Nutrients* 11(1), 1-22, 2019.

Gamboa-Gómez, C. I., González-Laredo, R. F., Gallegos-Infante, J. A., Pérez, M. L., Moreno-Jiménez, M. R., Flores-Rueda, A. G. and Rocha-Guzmán, N. E., "Antioxidant and angiotensin-converting enzyme inhibitory activity of *Eucalyptus camaldulensis* and *Litsea glaucescens* infusions fermented with kombucha consortium", *Food Technology and Biotechnology* 54(3), 367-374, 2016.

Gharib, O. A., "Effects of Kombucha on oxidative stress induced nephrotoxicity in rats", *Chinese Medicine* 4(1), 23-29, 2009.

Gharib, O. A. and Gharib, M. A., "Kombucha tea ameliorates trichloroethylene induced hepatic damages in rats via inhibition of oxidative stress and free radicals induction", *Egyptian Journal of Radiation Sciences and Applications* 21(2), 481-498, 2008.

Ghosh, S., Sarkar, A., Bhattacharyya, S. and Sil, P. C., "Silymarin protects mouse liver and kidney from thioacetamide induced toxicity by scavenging reactive oxygen species and activating PI3K-Akt pathway", *Frontiers in Pharmacology* 7, 481-496, 2016.

González-Burgos, E., Carretero, M. E. and Gómez-Serranillos, M. P., "*Sideritis* spp.: Uses, chemical composition and pharmacological activities—A review", *Journal of Ethnopharmacology* 135(2), 209-225, 2011.

Gramza-Michałowska, A., Kulczyński, B., Xindi, Y. and Gumienna, M., "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, 2016.

Greenwalt, C. J., Ledford, R. A. and Steinkraus, K. H., "Determination and characterization of the antimicrobial activity of the fermented tea kombucha", *LWT-Food Science and Technology* 31(3), 291-296, 1998.

Güner, A., Aslan, S., Ekim, T., Vural, M. and Babaç, M. T., Türkiye Bitkileri Listesi (Damarlı Bitkiler), *Flora Araştırmaları Derneği ve Nezahat Gökyiğit Botanik Bahçesi Yayını*, İstanbul, 2012.

Hosseini, S. A., Rasouli, L., Gorjian, M. and Yadollahpour, A., "A comparative study of the effect of Kombucha prepared from green and black teas on the level of blood glucose and lipid profile of diabetic rats", *International Journal of Pharmaceutical Research & Allied Sciences* 5(2), 93-102, 2016.

Hyun, J., Lee, Y., Wang, S., Kim, J., Kim, J., Cha, J., Seo, Y.-S. and Jung, Y., "Kombucha tea prevents obese mice from developing hepatic steatosis and liver damage", *Food Science and Biotechnology* 25(3), 861-866, 2016.

Ibrahim, N. K., "Possible protective effect of kombucha tea ferment on cadmium chloride induced liver and kidney damage in irradiated rats", *International Journal of Biology and Life Sciences* 9, 8-11, 2013.

Jakubczyk, K., Kaldunska, J., Kochman, J. and Janda, K., "Chemical Profile and Antioxidant Activity of the Kombucha Beverage Derived from White, Green, Black and Red Tea", *Antioxidants* 9(5), 447-461, 2020.

Jayabalan, R., Baskaran, S., Marimuthu, S., Swaminathan, K. and Yun, S. E., "Effect of kombucha tea on aflatoxin B₁ induced acute hepatotoxicity in albino rats—prophylactic and curative studies", *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry* 53(4), 407-416, 2010.

Jayabalan, R., Chen, P.-N., Hsieh, Y.-S., Prabhakaran, K., Pitchai, P., Marimuthu, S., Thangaraj, P., Swaminathan, K. and Yun, S. E., "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, 2011.

Jayabalan, R., Malbaša, R. V., Lončar, E. S., Vitas, J. S. and Sathishkumar, M., "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, 2014.

Jayabalan, R., Marimuthu, S. and Swaminathan, K., "Changes in content of organic acids and tea polyphenols during kombucha tea fermentation", *Food Chemistry* 102(1), 392-398, 2007.

Jayabalan, R., Marimuthu, S., Thangaraj, P., Sathishkumar, M., Binupriya, A. R., Swaminathan, K. and Yun, S. E., "Preservation of kombucha tea effect of temperature on tea components and free radical scavenging properties", *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56(19), 9064-9071, 2008a.

Jayabalan, R., Subathradevi, P., Marimuthu, S., Sathishkumar, M. and Swaminathan, K., "Changes in free-radical scavenging ability of kombucha tea during fermentation", *Food Chemistry* 109(1), 227-234, 2008b.

Kabiri, N. and Setorki, M., "Protective effect of Kombucha tea on brain damage induced by transient cerebral ischemia and reperfusion in rat", *Bangladesh Journal of Pharmacology* 11(3), 675-683, 2016.

Kaewkod, T., Bovonsombut, S. and Tragoolpua, Y., "Efficacy of kombucha obtained from green, oolong, and black teas on inhibition of pathogenic bacteria, antioxidation, and toxicity on colorectal cancer cell line", *Microorganisms* 7(12), 700-718, 2019.

Koçak, M. S., Sinirli ot (*Plantago lanceolata* L.) bitkisinin çözücü özütlerinin antioksidan aktivitelerinin belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, *Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Isparta, s. 15, 2011.

Kumari, R., Meyyappan, A., Nandi, D., Agrawalla, B. K., Chowdhury, A. A., Selvamani, P., Latha, S., Giri, V. S., Mukherjee, J. and Bandyopadhyay, S., "Antioxidant and antibacterial activities of bark extracts from *Commiphora berryi* and *Commiphora caudata*", *Natural Product Research* 25(15), 1454-1462, 2011.

Kuranel, E., *Plantago lanceolata* bitkisinin yara iyileştirici özelliklerinin araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, **İnönü Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü**, Malatya, s. 13, 2012.

Kurtzman, C. P., Robnett, C. J. and Basehoar-Powers, E., "Zygosaccharomyces kombuchaensis, a new ascosporegenous yeast from 'Kombucha tea'", **FEMS Yeast Research** 1(2), 133-138, 2001.

Law, S. V., Abu Bakar, F., Mat Hashim, D. and Abdul Hamid, A., "Popular fermented foods and beverages in Southeast Asia", **International Food Research Journal** 18(2), 475-484, 2011.

Liu, C. H., Hsu, W. H., Lee, F. L. and Liao, C. C., "The isolation and identification of microbes from a fermented tea beverage, Haipao, and their interactions during Haipao fermentation", **Food Microbiology** 13(6), 407-415, 1996.

Lobo, R. O., Dias, F. O. and Shenoy, C. K., "Kombucha for healthy living: evaluation of antioxidant potential and bioactive compounds", **International Food Research Journal** 24(2), 541-546, 2017.

Loganayaki, N., Siddhuraju, P. and Manian, S., "Antioxidant activity and free radical scavenging capacity of phenolic extracts from *Helicteres isora* L. and *Ceiba pentandra* L.", **Journal of Food Science and Technology** 50(4), 687-695, 2013.

Mahmood, T., Akhtar, N. and Khan, B. A., "The morphology, characteristics, and medicinal properties of *Camellia sinensis* tea", **Journal of Medicinal Plants Research** 4(19), 2028-2033, 2010.

Malbaša, R., Lončar, E., Djurić, M., Klašnja, M., Kolarov, L. J. and Markov, S., "Scale-up of black tea batch fermentation by kombucha", **Food and Bioprocess Technology** 84(3), 193-199, 2006.

Malbaša, R. V., Lončar, E. S., Vitas, J. S. and Čanadanović-Brunet, J. M., "Influence of starter cultures on the antioxidant activity of kombucha beverage", **Food Chemistry** 127(4), 1727-1731, 2011.

Markov, S. L., Malbasa, R. V., Hauk, M. J. and Cvetkovic, D. D., "Investigation of tea fungus microbe associations, 1: the yeasts", *Acta Periodica Technologica (Yugoslavia)* 32, 133-138, 2001.

Marsh, A. J., O'Sullivan, O., Hill, C., Ross, R. P. and Cotter, P. D., "Sequence-based analysis of the bacterial and fungal compositions of multiple kombucha (tea fungus) samples", *Food Microbiology* 38, 171-178, 2014.

Martínez-Leal, J., Ponce-García, N. and Escalante-Aburto, A., "Recent evidence of the beneficial effects associated with glucuronic acid contained in kombucha beverages", *Current Nutrition Reports*, 2020.

Martinez Leal, J., Valenzuela Suárez, L., Jayabalan, R., Huerta Oros, J. and Escalante-Aburto, "A review on health benefits of kombucha nutritional compounds and metabolites", *CyTA-Journal of Food* 16(1), 390-399, 2018.

Marzban, F., Azizi, G., Afraei, S., Sedaghat, R., Seyedzadeh, M. H., Razavi, A. and Mirshafiey, A., "Kombucha tea ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis in mouse model of multiple sclerosis", *Food and Agricultural Immunology* 26(6), 782-793, 2015.

McGovern, P., *Ancient Wine: The Search for the Origins of Viniculture*, **Princeton University Press**, Princeton, USA, 2003.

McGovern, P. E., Zhang, J., Tang, J., Zhang, Z., Hall, G. R., Moreau, R. A., Nuñez, A., Butrym, E. D., Richards, M. P. and Wang, C.-s., "Fermented beverages of pre- and proto-historic China", *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101(51), 17593-17598, 2004.

Mohammadshirazi, A. and Kalhor, E. B., "Energy and cost analyses of kombucha beverage production", *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 55, 668-673, 2016.

Morshedi, A., Dashti, M. H., Rafati, A., Mosaddegh, M. H. and Salami, A. S., "The chronic effect of Kombucha Tea consumption on weight loss in diabetic rats", *Journal of Medicinal Plants* 1(17), 17-22, 2006.

Murugesan, G. S., Sathishkumar, M., Jayabalan, R., Binupriya, A. R., Swaminathan, K. and Yun, S., "Hepatoprotective and curative properties of Kombucha tea against carbon tetrachloride-induced toxicity", *Journal of Microbiology and Biotechnology* 19(4), 397-402, 2009.

Nguyen, N. K., Dong, N. T. N., Le, P. H. and Nguyen, H. T., "Evaluation of the glucuronic acid production and other biological activities of fermented sweeten-black tea by kombucha layer and the co-culture with different *Lactobacillus* sp. strains", *International Journal of Modern Engineering Research* 4, 12-17, 2014.

Özcan, M., Chalchat, J. C. and Akgül, A., "Essential oil composition of Turkish mountain tea (*Sideritis* spp.)", *Food Chemistry* 75(4), 459-463, 2001.

Pal, S., Sarkar, A., Pal, P. B. and Sil, P. C., "Protective effect of arjunolic acid against atorvastatin induced hepatic and renal pathophysiology via MAPK, mitochondria and ER dependent pathways", *Biochimie* 112, 20-34, 2015.

Pauline, T. and Kavimani, S., "Studies on toxicity, anti-stress and hepato-protective properties of Kombucha tea", *Biomedical and Environmental Sciences* 14(3), 207-213, 2001.

Pure, A. E. and Pure, M. E., "Antioxidant and antibacterial activity of kombucha beverages prepared using banana peel, common nettles and black tea infusions", *Applied Food Biotechnology* 3(2), 125-130, 2016.

Rahmani, R., Beaufort, S., Villarreal-Soto, S. A., Taillandier, P., Bouajila, J. and Debouba, M., "Kombucha fermentation of African mustard (*Brassica tournefortii*) leaves: Chemical composition and bioactivity", *Food Bioscience* 30, 1-9, 2019.

Ram, M. S., Anju, B., Pauline, T., Prasad, D., Kain, A. K., Mongia, S. S., Sharma, S. K., Singh, B., Singh, R. and Ilavazhagan, G., "Effect of Kombucha tea on chromate (VI)-induced oxidative stress in albino rats", *Journal of Ethnopharmacology* 71(1-2), 235-240, 2000.

Ramadani, A. S. and Abulreesh, H. H., "Isolation and identification of yeast flora in local kombucha sample: AL NABTAH", *Umm Al-Qura University Journal of Applied Sciences* 2, 42-51, 2010.

Saeedi, P., Petersohn, I., Salpea, P., Malanda, B., Karuranga, S., Unwin, N., Colagiuri, S., Guariguata, L., Motala, A. A. and Ogurtsova, K., "Global and regional diabetes prevalence estimates for 2019 and projections for 2030 and 2045: Results from the International Diabetes Federation Diabetes Atlas", *Diabetes Research and Clinical Practice* 157, 107843-107853, 2019.

Samuelsen, A. B., "The traditional uses, chemical constituents and biological activities of *Plantago major* L. A review", *Journal of Ethnopharmacology* 71(1-2), 1-21, 2000.

Sasidharan, S., Chen, Y., Saravanan, D., Sundram, K. M. and Latha, L. Y., "Extraction, isolation and characterization of bioactive compounds from plants' extracts", *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines* 8(1), 1–10, 2011.

Shenoy, C., "Hypoglycemic activity of bio-tea in mice", *Indian Journal of Experimental Biology* 38(3), 278-279, 2000.

Singleton, V. L. and Rossi, J. A., "Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents", *American journal of Enology and Viticulture* 16(3), 144-158, 1965.

Sreeramulu, G., Zhu, Y. and Knol, W., "Kombucha fermentation and its antimicrobial activity", *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48(6), 2589-2594, 2000.

Sreeramulu, G., Zhu, Y. and Knol, W., "Characterization of antimicrobial activity in Kombucha fermentation", *Acta Biotechnologica* 21(1), 49-56, 2001.

Srihari, T., Arunkumar, R., Arunakaran, J. and Satyanarayana, U., "Downregulation of signalling molecules involved in angiogenesis of prostate cancer cell line (PC-3) by kombucha (lyophilized)", *Biomedicine & Preventive Nutrition* 3(1), 53-58, 2013a.

Srihari, T., Karthikesan, K., Ashokkumar, N. and Satyanarayana, U., "Antihyperglycaemic efficacy of kombucha in streptozotocin-induced rats", *Journal of Functional Foods* 5(4), 1794-1802, 2013b.

Srihari, T. and Satyanarayana, U., "Changes in free radical scavenging activity of kombucha during fermentation", *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research* 4(11), 1978-1981, 2012.

Steinkraus, K. H., Shapiro, K. B., Hotchkiss, J. H. and Mortlock, R. P., "Investigations into the antibiotic activity of tea fungus/kombucha beverage", *Acta Biotechnologica* 16(2-3), 199-205, 1996.

Sumpio, B. E., Cordova, A. C., Berke-Schlessel, D. W., Qin, F. and Chen, Q. H., "Green tea, the "Asian paradox," and cardiovascular disease", *Journal of the American College of Surgeons* 202(5), 813-825, 2006.

Swain, M. R., Anandharaj, M., Ray, R. C. and Rani, R. P., "Fermented fruits and vegetables of Asia: a potential source of probiotics", *Biotechnology Research International* 2014, 1-19, 2014.

Talawat, S., Ahantharik, P., Laohawiwattanukul, S., Premasuk, A. and Ratanapo, S., "Efficacy of fermented teas in antibacterial activity", *Agriculture and Natural Resources* 40(4), 925-933, 2006.

Thornton, B. P., Větvicka, V., Pitman, M., Goldman, R. C. and Ross, G. D., "Analysis of the sugar specificity and molecular location of the beta-glucan-binding lectin site of complement receptor type 3 (CD11b/CD18)", *The Journal of Immunology* 156(3), 1235-1246, 1996.

Tietze, H. W., Kombucha: The Miracle Fungus, *Phree Books*, Australia, 1996.

Tu, C., Tang, S., Azi, F., Hu, W. and Dong, M., "Use of kombucha consortium to transform soy whey into a novel functional beverage", *Journal of Functional Foods* 52, 81-89, 2019.

Ulusoy, A. and Tamer, C. E., "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, 2019.

Vázquez-Cabral, B. D., Larrosa-Pérez, M., Gallegos-Infante, J. A., Moreno-Jiménez, M. R., González-Laredo, R. F., Rutiaga-Quiñones, J. G., Gamboa-Gómez, C. I. and Rocha-Guzmán, N. E., "Oak kombucha protects against oxidative stress and inflammatory processes", *Chemico-Biological Interactions* 272, 1-9, 2017.

Velićanski, A. S., Cvetković, D. D., Markov, S. L., Tumbas, V. T. and Savatović, S. M., "Antimicrobial and antioxidant activity of lemon balm Kombucha", *Acta Periodica Technologica* (38), 165-172, 2007.

Villarreal-Soto, S. A., Beaufort, S., Bouajila, J., Souchard, J.-P., Renard, T., Rollan, S. and Taillandier, P., "Impact of fermentation conditions on the production of bioactive compounds with anticancer, anti-inflammatory and antioxidant properties in kombucha tea extracts", *Process Biochemistry* 83, 44-54, 2019.

Vitas, J., Vukmanović, S., Čakarević, J., Popović, L. and Malbaša, R., "Kombucha fermentation of six medicinal herbs: Chemical profile and biological activity", *Chemical Industry and Chemical Engineering Quarterly* 25(0), 1-34, 2019.

Vohra, B. M., Fazry, S., Sairi, F. and Babul-Airianah, O., "Effects of medium variation and fermentation time on the antioxidant and antimicrobial properties of Kombucha", *Malaysian Journal of Fundamental Applied Sciences* 15(2-1), 298-302, 2019.

Wang, K., Gan, X., Tang, X., Wang, S. and Tan, H., "Determination of d-saccharic acid-1, 4-lactone from brewed kombucha broth by high-performance capillary electrophoresis", *Journal of Chromatography B* 878(3-4), 371-374, 2010.

Wang, Y., Ji, B., Wu, W., Wang, R., Yang, Z., Zhang, D. and Tian, W., "Hepatoprotective effects of kombucha tea: identification of functional strains and quantification of functional components", *Journal of the Science of Food and Agriculture* 94(2), 265-272, 2014.

Watawana, M. I., Jayawardena, N., Gunawardhana, C. B. and Waisundara, V. Y., "Enhancement of the antioxidant and starch hydrolase inhibitory activities of king coconut water (*Cocos nucifera* var. *aurantiaca*) by fermentation with kombucha 'tea fungus'", *International Journal of Food Science & Technology* 51(2), 490-498, 2016.

Wu, A. H. and Yu, M. C., "Tea, hormone-related cancers and endogenous hormone levels", *Molecular Nutrition & Food Research* 50(2), 160-169, 2006.

Xia, X., Dai, Y., Wu, H., Liu, X., Wang, Y., Yin, L., Wang, Z., Li, X. and Zhou, J., "Kombucha fermentation enhances the health-promoting properties of soymilk beverage", *Journal of Functional Foods* 62, 103549, 2019.

Yıkılmış, S. and Tuğgüm, S., "Evaluation of microbiological, physicochemical and sensorial properties of purple basil kombucha beverage", *Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology* 7(9), 1321-1327, 2019.

Zhang, S., Cheng, M., Li, Z., Guan, S., Cai, B., Li, Q. and Rong, S., "Composition and biological activity of rose and jujube kernel after fermentation with kombucha SCOBY", *Journal of Food Processing and Preservation* 44(10), 1-11, 2020.

Ziska, R. and Agustina, A., "Cytotoxic activity assay of N-hexane extract of *Solanum nigrum* L. fruits fermented by kombucha against MCF-7 breast cancer cell line", *Journal of Physics: Conference Series* 1338(1), 1-9, 2019.

Zubaidah, E., Ifadah, R. A., Kalsum, U., Lyrawati, D., Putri, W. D. R., Srianta, I. and Blanc, P. J., "Anti-diabetes activity of Kombucha prepared from different snake fruit cultivars", *Nutrition & Food Science* 49(2), 333-343, 2019.



ÖZ GEÇMİŞ

Cihan Düşgün 1988 yılında Gaziantep’te doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Gaziantep’te tamamladı. 2008 yılında Niğde Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünde lisans eğitimine başladı. 2012 yılında mezun oldu. Aynı yıl Niğde Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü’nde Biyokimya anabilim dalında tezli yüksek lisansa başladı. 2013 yılında Gaziantep Üniversitesi Sosyal Bilimler Enstitüsü’nde iş sağlığı ve güvenliği tezsiz yüksek lisansına başladı ve aynı yıl tamamladı. 2016 yılında Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoteknoloji anabilim dalında doktora eğitimi başladı. Doktora eğitimini YÖK 100/2000 öncelikli alanlardan Gıda Biyoteknolojisi alanında tamamladı. İyi derecede İngilizce bilmektedir.

TEZ ÇALIŞMASINDAN ÜRETİLEN ESERLER

Bu tez çalışmasından, 1 (bir) adet uluslararası makale ile 1 (bir) adet uluslararası bildiri üretilmiştir. Bu üretilen çalışmalar aşağıda sunulmuştur.

Selamoglu, Z., Dugun, C., Akgul, H. and Gulhan, M.F., “In-vitro antioxidant activities of the ethanolic extracts of some contained-allantoin plants”, *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 16(Suppl), 92-98, 2017.

Düşgün, C., Kankılıç, T., İşlek, C. and Balı, D. F., “Antioxidant activities and total phenolic content of kombucha prepared from different substrates”, *INSAC Natural and Health Sciences (INHS-2020)*, Online Conference, 22-23 May, 2020.

