



# Siyah ve Yeşil Çay İle Üretilen Kombucha Çaylarının Antimikrobiyal ve Antioksidatif Özellikleri

Gökhan Akarca<sup>1\*</sup>, Oktay Tomar<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Afyon Kocatepe Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Afyonkarahisar, Türkiye

(İlk Geliş Tarihi 2 Kasım 2018 ve Kabul Tarihi 12 Kasım 2018)

(DOI: 10.31590/ejosat.478054)

## Öz

Bu çalışmada iki farklı çay ile üretilen Kombucha çaylarının fermantasyon süresi sonundaki antimikrobiyal ve antioksidatif özelliklerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. 18 günlük fermantasyon süresi sonunda siyah çay ile üretilen çayların Serbest radikal giderme aktivitesinin (% 62.4±0.8) ve Toplam fenolik madde miktarlarının (7.8±1.3 GAE, mM) yeşil çay ile üretilenlere kıyasla daha yüksek olduğu belirlenmiştir. 8 farklı gıda kaynaklı patojen bakteri üzerinde yapılan antimikrobiyal aktivite testi sonucunda en fazla etkinin yine siyah çay ile üretilen Kombucha çaylarında Staphylococcus aureus (24 mm zon çapı) üzerinde olduğu, bunu Escherichia coli'nin (20 mm zon çapı) izlediği tespit edildi. Aynı bakteriler üzerinde siyah çay kullanılarak üretilen çeşidin MIC değerleri ise sırasıyla 24 ve 48 µg/mL olarak belirlendi.

**Anahtar kelimeler:** Kombucha çayı, antioksidan aktivite, toplam fenolik madde, antimikrobiyal aktivite, mic.

## Antimicrobial and Antioxidative Properties of Kombucha Teas Produced with Black and Green Tea

### Abstract

In this study, it is aimed to determine the antimicrobial and antioxidative properties of the Kombucha teas produced by two different teas at the end of the fermentation period. At the end of the fermentation period of 18 days, it was determined that the free radical removal activity (% 62.4 ± 0.8) and total phenolic content (7.8 ± 1.3 GAE, mM) of teas produced with black tea were higher than those produced with green tea. The antimicrobial activity test on 8 different foodborne pathogenic bacteria was found to have the highest effect on the Staphylococcus aureus (24 mm zone diameter) in the Kombucha teas produced by black tea, followed by the Escherichia coli (20 mm zone diameter). MIC values of the same bacteria were determined as 24 and 48 µg / mL, respectively.

**Key words:** Kombucha tea, antioxidant activity, total phenolic substance, antimicrobial activity, mic.

<sup>1</sup> Sorumlu Yazar: Afyon Kocatepe Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Afyonkarahisar, [gakarca@aku.edu.tr](mailto:gakarca@aku.edu.tr)

## 1. Giriş

Kombucha, Combuchu, ya da mantar çayı genellikle Asya'da tüketilen geleneksel bir içecektir (Sreeramulu ve ark., 2000). Çay ayrıca Rusya ve Almanya'da sevilerek tüketilmektedir (Dipti ve ark.,2003). Çayın kökeninin Çin olduğu ve ilk kez M.Ö.221 yılı civarında üretildiği tahmin edilmektedir (Frank, 1991). Hafif asitli, karbonatlı ve tatlı bir tada sahip olan çay, çoğunlukla ev ortamında hazırlanarak tüketilmektedir.

Kombucha çayı *Acetobacter xylinum* gibi karakteristik bakteri türleri ile *Brettanomyces*, *Zygosaccharomyces*, *Saccharomyces* sınıfına ve *Pichia* cinsine bağlı olarak çeşitli mayaları içeren simbiyoz üründür (Marsh ve ark., 2014; Reva ve ark., 2015; Jayabalan ve ark., 2014). Ayrıca *Gluconacetobacter* ve *Lactobacillus* türleri de bazen izole edilen diğer bakteri türleri arasındadır (Trovatti ve ark., 2011).

Fermentasyon sürecinde, en yaygın olarak kullanılan substratlar tatlandırılmış siyah veya yeşil çay olmasına karşın üretimde % 80 siyah çay kullanılmaktadır (Stoner & Mukhtar, 1995). Fermentasyon süresi genellikle 8 ila 10 gün arasında değişmektedir. Fermentasyonun ürünlerini başlıca asetik asit, glukonik asit, etanol ve CO<sub>2</sub> dir. Bunun yanı sıra laktik asit, glukuronik asit, fenolik asit, yanında B vitamini grupları ve enzimler gibi minör bileşenlerde fermentasyon ortamında üretilmektedir (Rousin,1996).

Kombucha çayı fermentasyon süreci sonunda iki kısımdan oluşur; yüzen bir selülozik pelet tabakası ve ekşi sıvı kısım. Selülozik pelet tabakası asetik asit bakterileri tarafından üretilir ve bu biyofilm sayısız uygulamaya sahiptir (Jayabalan ve ark.,2016). Fermente sıvı yüzeyinde oluşan bu selülozik (biyofilm) tabaka inokulumların başka ortamlara aktarılmasında kullanılabilir (Dutta ve Gachhui, 2006; El Salam, 2012).

Çay yaklaşık olarak 30 ülkede yetiştirilen, yeşil ya da siyah olarak tüketilen ve sudan sonra en fazla tüketilen bir içecektir (Stoner ve Mukhtar, 1995). (-) - Epikateşin (EC), (-) - epikateşin-3 gallat (EKG), (-) - epigallokatekin (EGC), (-) - epigallokatekin-3-gallat (EGCG) yeşil çayda mevcut dört ana polifenolik bileşenlerdir. Theaflavin ve thearubiginler ise siyah çayda bulunan polifenolik bileşenlerdir (Yang,ve ark., 2001; Yang ve ark., 2002). Demlenmiş çayın da kateşin flavonoidlerini de önemli seviyelerini ihtiva ettiği belirlenmiştir. Demlenmiş çay, potansiyel olarak bu önemli bileşikler grubu için ana besin kaynağıdır. Kateşinler, birkaç flavanoid bileşiği grubundan birisi olup, önemli oranda biyoyararlanım derecesine sahiptirler (Bronner ve Beecher, 1981).

Bu çalışmada siyah ve yeşil çay kullanılarak üretilen Kombucha çaylarının bazı önemli gıda kaynaklı patojen bakteriler üzerindeki antibakteriyel etkilerinin varlığının araştırılması amaçlanmıştır.

## 2. Materyal ve Metot

### 2.1 Çay

Bu çalışmada *Camellia sinensis* L. Türü yeşil ve siyah çay kullanılmıştır. Çaylar Türkiye'de çay üretimi yapan yabancı kaynaklı bir firmadan temin edilmiştir.

### 2.2 Kombucha Çaylarının Üretimi

Yaklaşık 20g siyah ve yeşil çay içerisinde 1 L 95 °C de sıcak su bulunan bir kavanoz içerisine ilave edildi. Ardından bu karışım içerisine 100 g sakkaroz ilave edilerek sakkaroz tamamen eriyene kadar karıştırıldı. Karışım 15 dakika süre ile demlenmeye bırakıldı. Süre sonunda karışım içeriği sterilize 22 mm filtre kağıdından süzülerek otoklavda ( Nüve-OT 90L) 15 dakika boyunca 121 ° C'de sterilize edildi. Steriliz edilen karışım oda sıcaklığına kadar soğutulduktan sonra içerisine 30 ml/L oranında biyofilm ilave edildi. Kavanozların kapakları dikkatli bir şekilde kapatıldıktan sonra 18 gün boyunca 24 ± 3 ° C'de karanlık bir inkubatörde fermentasyona bırakıldı.

### 2.3 DPPH Sertbest Radikal Giderme Aktivitesi

Kombucha çay örneklerinden 0,025 ml alınarak 4 mL metanolde (0.0625 mg / mL) çözüldürüldü. Daha sonra 0.5 mL metanolik bir  $\alpha,\alpha$ -diphenyl- $\beta$ -picrylhydrazyl (DPPH) (1 mM) çözeltisi ile karıştırıldı ve oda sıcaklığında 30 dakika beklemeye bırakıldı. Ardından karışımın optik yoğunluğu spektrofotometre ile (Hitachi U-2000) 517 nm'de ölçüldü (Chu ve Chen, 2006).

Kombucha çaylarının sertbest radikal giderme aktivitesi aşağıdaki denklemle hesaplandı

$$\text{Süpürme Kapasitesi (\%)} = [1 - (As - Ab)/(Ac - Ab)] \cdot 100$$

As: Örneklerin Absorbans değeri

Ab: Kör Numune

Ac: Kontrol Numunesi

### 2.4 Toplam Fenolik Madde Miktarının Belirlenmesi

Kombucha çay örneklerinden 0.05 ml' alınarak üzerine 2 ml % 2'lik sodyum karbonat eklenmiştir. 2 dakika beklendikten sonra sonra, yukarıdaki çözelti ile 0.1 ml Folin-Ciocalteu reaktif karıştırıldı, 30 dk beklenildikten sonra spektrofotometre ile (Hitachi U-2000) 750 nm'de absorbans ölçüldü. Toplam fenolik madde içeriği, kalibrasyon eğrisinden gallik asit eşdeğerleri (GAE, mM) olarak ifade edildi (Chu ve Chen, 2006).

### 2.5 Antimikrobiyal Analizler

Araştırmada; *Esherichia coli* ATCC 25922, *Listeria monocytogenes* ATCC 51774, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Enterococcus aerogenes* ATCC 13048, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145, *Enterococcus faecalis* ATCC 51299, *Salmonella Typhi* ATCC 6539 ve *Bacillus subtilis* ATCC 6633

bakterileri kullanıldı. Bakteri suşları kanlı agarda 4-7 ° C'de muhafaza edilmiş ve 35 ± 0.1 °C'de 24 saat Mueller-Hinton Broth (Merck 110293) kültüre alınmıştır.

## 2.6. Disk Difüzyon Metodu ile Antimikrobiyal Aktivitenin Belirlenmesi

Mueller-Hinton Broth içerisindeki her bir bakteri suşundan ayrı ayrı 0.1 mL alınarak (106- 107 KOB/mL) Muller Hinton Agar (Merck 1,05437) (MHA) yüzeyine cam drigalski spatülü

yardımı ile inokulum homojen olarak emilene kadar yayılmıştır. Besiyerinin inokulasyonu emmesi için 10 dakika beklendikten sonra 10 µL çay örnekleri emdirilmiş diskler (Bio-Disk 316010001) petri agar yüzeyine birbirlerinden yeterli uzaklıkta olacak şekilde yerleştirilmiştir (Cruz-Gálvez et al. 2018). Daha sonra petri kutuları Tablo 1'de belirtilen koşullarda inkübasyona bırakılmıştır (Anonim, 2018). İnkübasyon süresi sonunda oluşan zonlar, yeterli ışık altında digital bir kumpas yardımıyla ölçülmüştür.

Tablo 1. Çalışmada Kullanılan Bakteriler ve İnkübasyon Koşulları

Bakteri	İnkübasyon Koşulları	Kullanılan Metot
<i>Esherichia coli</i>	35±1 °C de aerobik 16-20 saat.	Eucast.org (Anonim 2018)
<i>Staphylococcus aureus</i>		
<i>Salmonella Typhi</i>		
<i>Enterobacter aerogenes</i>		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		
<i>Bacillus subtilis</i>	35±1 °C 'de hava ve % 5 CO <sub>2</sub> karışımı 16-20 saat.	
<i>Enterococcus faecalis</i>		
<i>Listeria monocytogenes</i>		

## 2.7. Minimum Inhibitory Concentration (MIC) Değerinin Belirlenmesi

Bakteriyel suşlar, Mueller-Hinton broth (Merck 110293) üzerinde inoküle edildi ve 24 saat 37±0.1 °C'de inkübe edildi. Bakteriyel suşların inokulasyonu 24 saatlik genç kültür kültürlerinden hazırlandı ve süspansiyonlar 0.5 McFarland standart turbiditeye ayarlandı. Steril tüpler A, 2, 3, 4, 5 olarak işaretlenmiş, ayrıca + ve - kontrol tüpleri oluşturuldu. 2 numaralı tüpten başlayarak (A hariç) her tüpe 2 şer ml nutrient broth (Merck 1.05443) ilave edildi. A tüpüne kambuch çay örneklerinden 4 ml ilave edildikten sonra, 2 ml si alınarak 2 numaralı tüpe aktarıldı ve homojen bir karışım oluşana kadar karıştırıldı. 2 numaralı tüpteki çay ve besiyeri karışımından 2 ml alınarak 3 numaralı tüpe aktarıldı ve bu işleme 5 numaralı tüpe kadar aynı şekilde devam edildi. Son olarak 5 numaralı tüpten de 2 ml çay ve besiyeri karışımından alınarak atıldı. Böylece her tüpte eşit miktarda ancak bir öncekine göre yarı yarıya azalmış konsantrasyonlar elde edildi. Buna göre ilk tüpteki çayın konsantrasyonu 1024 µg/mL, devam eden tüplerde ise konsantrasyon sırasıyla; 512, 256, 128, 64, 32, 16, 8, 4, 2, 1 ve 0.5 µg / mL olması sağlandı. "- kontrol" tüpü hariç tüm tüplere, Mueller-Hinton broth (Merck 110293) içerisinde inoküle edilen

bakteri kültürlerinden 1 µl (106-107 kob/mL) ilave edildi Tüm tüpler 37 °C'de 16-20 saat inkübasyona bırakıldı, inkübasyon sonunda bulanıklık ve yüzeyde zar oluşumu gözlenen tüpler gelişme (+) olarak değerlendirildi.

Gelişmenin gözlemlendiği ilk tüp ile öncesindeki gelişme gözlenmeyen tüpün konsantrasyonlarının toplamının yarısı alınarak MIC değeri belirlendi. Ayrıca; inkübasyon sonunda "- kontrol" tüpünde herhangi bir gelişme olmadığı "+ kontrol" tüpünde ise gelişme olduğu gözlemlendi (El Mahmood, 2009; By Aamer ve ark., 2015; Chikezie, 2017).

## 3. Araştırma Sonuçları ve Tartışma

### 3.1. DPPH sertbest radikal giderme aktivitesi

Kambucha çay örneklerinin fermantasyon süresi sonundaki DPPH radikal süpürücü aktivite analiz sonuçları Tablo 2 de gösterilmiştir.

Tablo 2. Siyah ve Yeşil Çay ile Üretilen Kambucha Çaylarının DPPH Sertbest Radikal Giderme Aktivite Değerleri

Örnek	DPPH Serbest Radikal Giderme Aktivitesi (%)	Toplam Fenolik Madde (GAE, mM)
Siyah Çay	62.4±0.8	7.8±1.3
Yeşil Çay	49.6±2,4	5.4±1.6

Araştırma ile hem yeşil çayın hem de siyah çayın iyi bir antioksidan aktiviteye sahip olduğu ortaya konulmuştur. Ancak siyah çay ile üretilen Kambucha çayının antioksidan aktivitesinin yeşil çay ile üretilene kıyasla daha yüksek olduğu görülmektedir (Tablo 2).

Yeşil çay içerisinde bulunan dört epikateşin izomeri (EC, EKG, EGC ve EGCG) ve siyah çayda mevcut Theaflavin ve thearubiginler yüksek antioksidan aktiviteye sahiptir. Ancak fermentasyon süresince yeşil çayda bulunan bütün kateşinlerin yıkıma uğradığı (Jayabalan, 2007), buna karşın siyah çay içerisinde mevcut Theaflavin ve thearubiginlerin fermentasyon boyunca stabil kaldığı belirtilmiştir (Su ve ark.,2003). 18 günlük fermentasyon sonucunda siyah çayın antioksidan etkisinin yeşil çaya kıyasla daha yüksek olarak tespit edilmesinin nedeninin yeşil çayda mevcut kateşinlerin yıkıma uğramasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Chu ve Chen (2006), sekiz farklı Kambucha çay örneğinin 15 günlük fermentasyon süresince antioksidan aktivitesinin artış gösterdiğini, fermentasyonun son gününde örneklerin antioksidan aktivite değerlerinin  $39.0 \pm 9.1$  ile  $69.2 \pm 3.6$  arasında olduğunu belirtmişlerdir. Elde ettikleri sonuçlar araştırma sonuçlarımız ile paraleldir.

Tablo 3. İki Farklı Çay Kullanılarak Üretilen Kambucha Çaylarının Bazı Gıda Patojenleri Üzerindeki Antimikrobiyal Aktiviteleri (Mm Zon Çapı)

Bakteri	Antimikrobiyal Aktivite (mm zon çapı)	
	Siyah Çay	Yeşil Çay
<i>Esherichia coli</i>	20	16
<i>Staphylococcus aureus</i>	24	16
<i>Salmonella Typhi</i>	17	13
<i>Enterobacter aerogenes</i>	10	9
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	13	9
<i>Bacillus subtilis</i>	15	10
<i>Enterococcus faecalis</i>	17	12
<i>Listeria monocytogenes</i>	14	10

Siyah çay ile yapılan Kambucha çaylarının antimikrobiyal aktivitesinin yeşil çaylar ile yapılan çaylara kıyasla daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Siyah çayla yapılan Kambucha çaylarında en yüksek antimikrobiyal aktivitenin 24 mm zon çapı ile *Staphylococcus aureus* üzerinde olduğu, bunu 20 mm zon çapı *Esherichia coli* ve 17 mm zon çapları ile *Salmonella Typhi* ve *Enterococcus faecalis*'in izlediği belirlenmiştir. Yeşil çay ile yapılan Kambucha çaylarında ise en yüksek aktivitenin 16 mm zon çapı ile *Staphylococcus aureus* ve *Esherichia coli* üzerinde olduğu bu iki bakteriyi 13 mm zon çapı ile *Salmonella Typhi*'nin izlediği tespit edilmiştir.

Araştırma sonuçlarımıza benzer şekilde, Battikh ve ark. (2012) siyah çay kullanarak ürettikleri Kambucha çaylarının fermentasyon süresi sonunda *Staphylococcus aureus* üzerinde 14,5 mm, *Salmonella Typhi* üzerinde 14 mm ve *Esherichia coli* üzerinde ise 11 mm ve zon çapı oluşturduğunu belirlemişlerdir. Kambucha çaylarının antimikrobiyal aktivitesinin, fermentasyon sürecinde oluşan asitlerden (özellikle asetik asit) (Sreeramulu ve ark.,2001) ile çayların içerisinde fermentasyon sonrasında kalan

### 3.2. Toplam Fenolik Madde Miktarının Belirlenmesi

İki farklı çay örneği ile üretilen Kambucha çaylarının 18 günlük fermentasyon süresi sonundaki toplam fenolik madde miktarları tablo 2 de verilmiştir. Toplam fenolik madde miktarı siyah çay ile yapılan Kambucha çaylarında yeşil çay ile yapılanlara kıyasla daha yüksek değerde bulunmuştur. Chu ve Chen (2006), siyah çay ile ürettikleri Kambucha çaylarında 15 günlük fermentasyon süresi sonunda toplam fenolik madde miktarlarının sonuçlarımıza benzer şekilde 6 ile 8.5 GAE, mM arasında değişiklik gösterdiğini belirtmişlerdir.

### 3.3. Antimikrobiyal Aktivite

İki farklı çay örneği kullanılarak üretilen Kambucha çaylarının, disk difüzyon metodu ile bazı gıda patojenleri üzerindeki antimikrobiyal aktiviteleri Tablo 3 de gösterilmiştir.

bileşenlerden (kateşinler, theaflavin ve thearubiginler) (Kim ve ark., 2007) kaynaklandığı yapılan araştırmalar ile ortaya konulmuştur.

Çalışmamızda en fazla antimikrobiyal etki *Staphylococcus aureus* üzerinde (24 mm zon çapı) siyah çay ile üretilen Kambucha çayında gözlemlenmiştir. Bu değer gerek CLSI Microbiological ve gerekse Eucast Clinical tarafından belirlenen *Staphylococcus aureus* üzerinde en yüksek antimikrobiyal aktiviteye sahip olan antibiyotikler olan Eritromisin ve Klindamisinden daha yüksektir.

### 3.4. Minimum Inhibitory Concentration (MIC) Değeri

MIC Testinin temel amacı, mikrobiyal aktiviteyi, inokulumları, antimikrobiyal ajanı ve dezenfektanı içeren numunelerin absorbansını kontrol etmektir. MIC Testi verilen

anti-mikrobik ajanın etkinliğini anlatmaktadır. Buna göre 8 farklı gıda kaynaklı patojen bakteri üzerinde iki farklı çay kullanılarak üretilen Kambucha çaylarının en düşük MIC değerinin (Tablo 4) 24 ( $\mu\text{g/mL}$ ) *Staphylococcus aureus* üzerinde

olduğu bunu sırasıyla, 48 ( $\mu\text{g/mL}$ ) ile *Esherichia coli* ve 96 ( $\mu\text{g/mL}$ ) ile *Salmonella Typhi*, *Enterococcus faecalis* ve *Bacillus subtilis*'in izlediği belirlenmiştir.

Tablo 4. İki Farklı Çay Kullanılarak Üretilen Kambucha Çaylarının MIC Değerleri ( $\mu\text{g/mL}$ )

Bakteri	MIC değerleri ( $\mu\text{g/mL}$ )	
	Siyah Çay	Yeşil Çay
<i>Esherichia coli</i>	48	96
<i>Staphylococcus aureus</i>	24	96
<i>Salmonella Typhi</i>	96	384
<i>Enterobacter aerogenes</i>	384	768
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	192	768
<i>Bacillus subtilis</i>	96	384
<i>Enterococcus faecalis</i>	96	192
<i>Listeria monocytogenes</i>	192	384

Vitas ve ark. (2018) farklı Kambucha çaylarının bazı gıda patojenleri üzerindeki MIC değerlerini. *Staphylococcus aureus* üzerinde 78.13 ile 312.50 arasında, *Esherichia coli* üzerinde 39.10 ile 312.50 arasında ve *Bacillus subtilis* üzerinde 9.77 ile 312.50 arasında değişim gösterdiğini bildirmiştir. Araştırmada elde edilen veri aralıkları çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlar ile paralellik göstermektedir.

Çalışmamızda en düşük MIC değerinin siyah çayla üretilen Kambucha çayında *Staphylococcus aureus* üzerinde olduğu (24 $\mu\text{g/mL}$ ) tespit edilmiştir. Bu değer Eucast Clinical tarafından belirtilen en düşük MIC aktivitesine sahip olan Gentamisin den daha düşüktür (Anonim, 2018).

#### 4. Sonuç

Türk toplumu tarafından bugüne kadar çok fazla tanınmayan, Kambucha çaylarının fonksiyonel özellikleri, antioksidant ve toplam fenolik madde miktarları bakımından değerli içecekler olduğu araştırmacılar tarafından ortaya konulmuştur. Bu amaçla günlük düzenli tüketimlerinin sağlık üzerinde faydalı etkiler yaratacağı ortadadır. Ayrıca araştırmalarda elde edilen sonuçlar Kambucha çaylarının antimikrobiyal özelliklerinin de oldukça etkili olduğunu göstermektedir. Bu nedenle antimikrobiyal ajanlar olarak kullanılma potansiyeli de son derece yüksektir. Çok farklı çay, baharat ve faydalı bitki ve bunların karışımı ile ve farklı fermantasyon koşulları altında üretilebilme özelliğinde olmaları iyi bir alternatif olarak görülmektedir. Ancak fermantasyon sırasında oluşan birçok asitlerden kaynaklanabilen sağlık sorunlarının oluşabileceği unutulmamalı, mide hassasiyeti ve rahatsızlığı olan bireylerin tüketimde dikkatli olması gerektiğinden, fermantasyon süresi 15-18 günün üzerinde tutulmamalıdır.

#### Kaynaklar

Anonim, 2018. Eucast, European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing,

[http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST\\_files/Breakpoint\\_tables/v\\_8.0\\_Breakpoint\\_Tables.pdf](http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_8.0_Breakpoint_Tables.pdf)

Battikh H., Bakhrouf A. and Ammar E. 2012. Antimicrobial effect of Kombucha analogue. LWT - Food Science and Technology. 47, 71-77.

Bronner W.E. and Beecher G.R. 1981. Method for determining the content of catechins in tea infusions by high performance liquid chromatography. Journal of Chromatography. 6805, 137-142.

By Aamer A.A., Abdul-Hafeez M.M. and Sayed S.M. 2015. Minimum inhibitory and bactericidal concentrations (MIC & MBC) of Honey and bee propolis against multidrug resistant (mdr) *Staphylococcus* spp. isolated from bovine clinical mastitis. Global Journal of Science Frontier Research: D Agriculture and Veterinary. 15, 2 Version 1.0 .

Chikezie I.O., 2017. Determination of minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) using a novel dilution tube method. African Journal of Microbiology Research. 11(23), 977-980.

Chu S.C. and Chen C. 2006. Effects of origins and fermentation time on the antioxidant activities of Kombucha. Food Chemistry. 98, 502-507.

Cruz-Gálvez A.M., Castro-Rosas J., Rodríguez-Marín M.L., Cadena-Ramírez A., Tellez-Jurado A., Tovar-Jiménez X., Chavez-Urbiola E.A., Abreu-Corona A. and Gómez-Aldapa C.A. 2018. Antimicrobial activity and physicochemical characterization of a potato starch-based film containing acetic and methanolic extracts of *Hibiscus sabdariffa* for use in sausage. LWT Food Science and Tecnology. 93, 300-305. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.02.064>.

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



- Dutta D. and Gachhui R. 2006. Novel nitrogen-fixing *Acetobacter nitrogenifigens* spp nov., isolated from Kombucha tea. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56, 1899-1903.
- El-Mahmood M.A., 2009. Antibacterial efficacy of stem bark extracts of *Mangifera indica* against some bacteria associated with respiratory tract infections. *Sci Res Essays.* 4(10), 1031-1037.
- El-Salam S.S.A., 2012. 16S rRNA gene sequence detection of acetic acid bacteria isolated from tea Kombucha. *New York Sci. J.* 5, 55-61.
- Frank G., 1995. *Kombucha, healthy beverage and natural remedy from the far east*, Great Britain Published, Wilhelm Ennsthaler, Steyr.
- Jayabalan R., Malba\_sa R.V., Lon\_car E.S., Vitas J.S. and Sathishkumar M. 2014. A review on Kombucha tea - microbiology, composition, fermentation, beneficial effects, toxicity, and tea fungus. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 13, 538 - 550.
- Jayabalan R., Malbaša R. and Sathishkumar M. 2016. *Kombucha. reference module in food sciences.* Elsevier 1–8.
- Kim E.S., Liang Y.R., Jin J., Sun Q.F., Lu J.L., Du Y.Y. and Lin D.C. 2007. Impact of heating on chemical compositions of green tea liquor. *Food Chemistry.* 103, 1263-1267.
- Marsh A.J., O'Sullivan O., Hill C., Ross R.P. and Cotter P.D. 2014. Sequence-based analysis of the bacterial and fungal compositions of multiple Kombucha (tea fungus) samples. *Food Microbiol.* 38, 171-178.
- Jayabalan R.S., Marimuthu S. and Swaminathan K. 2007. Changes in content of organic acids and tea polyphenols during kombucha tea fermentation, *Food Chemistry* 102, 392–398.
- Reva ON, Zaets I.E., Ovcharenko L.P., Kukharenko O.E., Shpylova S.P., Podolich O.V., de Vera J.-P. and Kozyrovska N.O. 2015. Metabarcoding of the Kombucha microbial community grown in different microenvironments. *Amb. Express* 5, 35.
- Roussin M.R., 1996. *Analyses of Kombucha ferments: report on growers.* Salt Lake City, Utah: Information Resources, LC.
- Sreeramulu G., Zhu Y. and Knol K. 2001. Characterization of antimicrobial activity in Kombucha fermentation. *Acta Biotechnologica.* 21,49- 56.
- Sreeramulu G., Zhu Y. and Knol W., 2000. Kombucha fermentation and its antimicrobial activity. *J. Agric. Food Chem.* 48, 2589 - 2594.
- Stoner D.G. and Mukhtar H., 1995. Polyphenols as cancer chemopreventive agents. *Journal of Cellular Biochemistry.* 22, 169–180.
- Stoner D.G. and Mukhtar H., 1995. Polyphenols as cancer chemopreventive agents. *Journal of Cellular Biochemistry.* 22, 169–180.
- Su Y.L., Leung L.K., Huang Y. and Chen Z., 2003. Stability of tea theaflavins and catechins. *Food Chemistry.* 83, 189–195.
- Trovatti E., Serafim L.S., Freire C.S.R., Silvestre A.J.D. and Neto C.P. 2011. *Gluconacetobacter sacchari: an efficient bacterial cellulose cell-factory.* *Carbohydr. Polym.* 86, 1417 - 1420.
- Vitasa J.S., Cvetanovića A.D., Maškovič P.Z., Švarc-Gajića J.V. and Malbašaa R.V. 2018. Chemical composition and biological activity of novel types of Kombucha beverages with yarrow. *Journal of Functional Foods.* 44, 95–102.
- Yang S.C., Maliakal P. and Meng X. 2002. Inhibition of carcinogenesis by tea. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology.* 42, 25–54.
- Yang S.C., Prabhu S. and Landau J. 2001. Prevention of carcinogenesis by tea polyphenols. *Drug Metabolism Reviews.* 33(3), 237–253.