

## Use of Agave (*Agave salmiana*) Syrup in Kombucha Fermentation

Mehmet Fuat Gülhan\*

\*Aksaray University, Department of Plant and Animal Production, Türkiye

### Keywords

Agave syrup, Kombucha, Fermentation, Beverage, Functional food

### Article information

Received: Mar 21, 2024

Revised: May 02, 2024

Accepted: June 12, 2024

Online: Sep 12, 2024

### Abstract

In this study, the potential of using different concentrations of agave syrup (AS) as a substrate in kombucha fermentation was investigated. After adding AS at concentrations of 3% (AS3), 5% (AS5), and 7% (AS7) to kombucha, some physicochemical, antioxidant, and microbiological analyses were conducted, alongside the determination of total phenolic content. The lowest pH value was measured as  $3.13 \pm 0.13$  and  $2.91 \pm 0.15$  in AS7 kombucha after fermentation for 7th and 14th days, respectively. The highest total soluble solids content was determined as  $7.81 \pm 0.28$  °Bx in AS7 kombucha on our 48th. The highest DPPH activity was observed in AS7 after 14 days ( $71 \pm 1.02\%$ ), metal chelating activity was highest in AS7 kombucha on day 14th (71.5%), and the total phenolic content was found to be  $412 \pm 0.81$  mg GAE/L and  $438 \pm 0.89$  mg GAE/L in AS7 on days 7th and 14th, respectively. The highest levels of acetic acid, lactic acid, and yeast counts were detected in AS7 on days 7th and 14th. The results showed that agave syrup may be an alternative sugar source to sucrose for kombucha, and polyphenols from agave may contribute to antioxidant capacity. Particularly, consumption between 7th and 14th days is recommended due to the highest functional properties observed during this period.

doi: [10.29002/asujse.1456495](https://doi.org/10.29002/asujse.1456495)

## Kombu çayı Fermantasyonunda Agave (*Agave salmiana*) Şurubunun Kullanımı

### Anahtar Kelimeler

Agave şurubu, Kombu çayı, Fermantasyon, İçecek, Fonksiyonel gıda

### Özet

Bu çalışmada, farklı konsantrasyonlardaki agave şurubunun (AŞ) kombu çayı fermantasyonunda substrat olarak kullanılma potansiyeli araştırıldı. Kombu çayına %3 (AŞ3), %5 (AŞ5) ve %7 (AŞ7) konsantrasyonlarda AŞ ilave edildikten sonra bazı fizikokimyasal, antioksidan ve mikrobiyolojik analizlerin yanı sıra toplam fenolik madde miktarları belirlendi. En düşük pH değeri AŞ7 fermantasyonun 7. ve 14. günlerinde sırasıyla  $3.13 \pm 0.13$  ve  $2.91 \pm 0.15$  olarak ölçüldü. En yüksek suda çözünür kuru madde AŞ7 kombu çayının 48. saatinde  $7.81 \pm 0.28$  °Bx olarak tespit edildi. En yüksek DPPH aktivitesi AŞ7'de 14. günde  $71 \pm 1.02$ , metal şelatlama aktivitesi AŞ7 kombu çayında fermantasyonun 14. gününde  $71.5$  ve toplam fenolik madde miktarının AŞ7'nin 7. ve 14. günlerinde sırasıyla  $412 \pm 0.81$  mg GAE/L ve  $438 \pm 0.89$  mg GAE/L seviyelerinde olduğu görüldü. En yüksek asetik asit, laktik asit ve maya sayıları AŞ7'nin 7. ve 14. günlerinde tespit edildi. Sonuçlar, agave şurubunun kombu çayı fermantasyonunda kullanılabilmesi için iyi bir substrat kaynağı olabileceğini ve agaveden gelen polifenollerin antioksidan kapasiteye katkıda bulunabileceğini göstermiştir. Özellikle, AŞ7'nin 7 ve 14 günlük fermantasyon sürelerinde belirlenen en yüksek fonksiyonel özelliklerden dolayı bu süreler arasında tüketilmesi tavsiye edilebilir.

## 1. Giriş

Toplumsal dinamiklerin değişimi, insanların yeme alışkanlıklarını da etkilemektedir. Sağlık sorunlarının artması ile birlikte insanlar doğal ve fonksiyonel gıdalara yönelmektedir. Geleneksel olarak hazırlanan fermente ürünler, doğal ve fonksiyonel gıdaların temelini oluşturmaktadır. Son dönemlerde araştırmacılar, geleneksel gıdalara fonksiyonellik kazandıran etkili bileşikleri ortaya çıkarmak için yoğun bilimsel çalışmalar yürütmektedir [1]. Fermente içecek endüstrisi için son dönemlerin popüler bir ürünü olan kombu çayı fonksiyonel içeceklerden birisidir. Kombu çayı, çeşitli çayların

\*Corresponding Author: [mfuatgulhan@aksaray.edu.tr](mailto:mfuatgulhan@aksaray.edu.tr)  0000-0003-4838-1597



(özellikle siyah, yeşil ve oolong çay), *Symbiotic culture of bacteria and yeast (SCOBY)* fermantasyonu sonucu elde edilen bir içecektir [2]. Yeşil çay, kersetin, kampferol ve mirisetin flavonoidleri ile birlikte diğer çay bileşenlerini, proteinleri ve amino asitleri içerdiği için fermantasyon için elverişli bir ortam olarak kabul edilir. Çay polifenoller, çeşitli hastalıkların önlenmesi ve tedavisinde önemli etkilere sahip oldukları için birçok bilimsel çalışmanın odağında yer almıştır [3]. Kombu çayı kültüründeki mayalar (*Brettanomyces*, *Zygosaccharomyces* ve *Saccharomyces* cinsleri), çaydaki şekerleri fermente ederken, bakteriler (*Gluconacetobacter* ve *Lactobacillus* cinsleri) oluşan alkolü asetik aside çevirirler. Asetik aside ek olarak, glukonik, laktik, glukuronik, malik, sitrik ve tartarik gibi organik asitler de meydana gelir [2,4]. Bazı araştırmacılar, kombu çayı fermantasyonunda tatlandırılmış siyah çayın yanı sıra birçok bitkisel substratı (meyve, şarap, süt, bitki çayları vb.) kullanarak simbiyotik kültüre daha fazla fonksiyonellik kazandırmayı amaçlamışlardır [5-7]. Bu çalışmada, farklı konsantrasyonlardaki agave şurubunun (AŞ) kombu çayı fermantasyonunda substrat olarak kullanılma potansiyeli araştırılmıştır.

Son zamanlarda, doğal kaynaklardan elde edilen tatlandırıcılar, onları karakterize etmeyi, biyolojik ve teknolojik işlevselliklerinin yanı sıra insan sağlığı üzerindeki etkilerini belirlemeyi amaçlayan çalışmaların odak noktası olmuştur. Örneğin bal ve *Stevia rebaudiana* Bertoni, besin değeri, fonksiyonel özellikleri ve insan sağlığına olumlu etkileri nedeniyle geniş çapta araştırılmıştır [8]. Ancak, AŞ'nin teknolojik ve fonksiyonel özelliklerin geliştirilmesine yönelik az da olsa fırıncılık, şekerleme ve içecek endüstrilerinde çalışmalar vardır [9]. AŞ, agave nektarı olarak da bilinen, agave bitkisinin özünden, özellikle *Agave salmiana* ve *Agave tequilana* (Asparagaceae) türlerinin çiçeklerinden elde edilen bir ekstrattır [10,11]. *A. salmiana* yüksek sakkaroz, düşük glisemik indeks ve vegan statüsü göz önüne alındığında, bu ürün sakkaroz ve bal gibi geleneksel tatlandırıcıların yerine geçen bir ürün olarak popüler hale gelmiştir. *A. salmiana* şurupları, 997-1054 cm<sup>3</sup> arasında belirgin bir absorpsiyon ile yüksek sakkaroz içeriğine sahiptir [12]. 17. yüzyıldan beri AŞ Meksika'da tekila, mezcal, sotol, pulque ve henequen gibi damıtılmış alkollü içecekler üretmek için kullanılmaktadır. AŞ, Meksika ekonomisine 2021'de 156 milyon dolar kazandırmış ve 2026'ya kadar 272 milyon dolar kazandırması beklenmektedir [13]. Son zamanlarda gıda endüstrisinde, agave fruktanları olarak bilinen agavinlerden fruktopolisakkaritlerin ekstraksiyonu önem kazanmıştır [14].

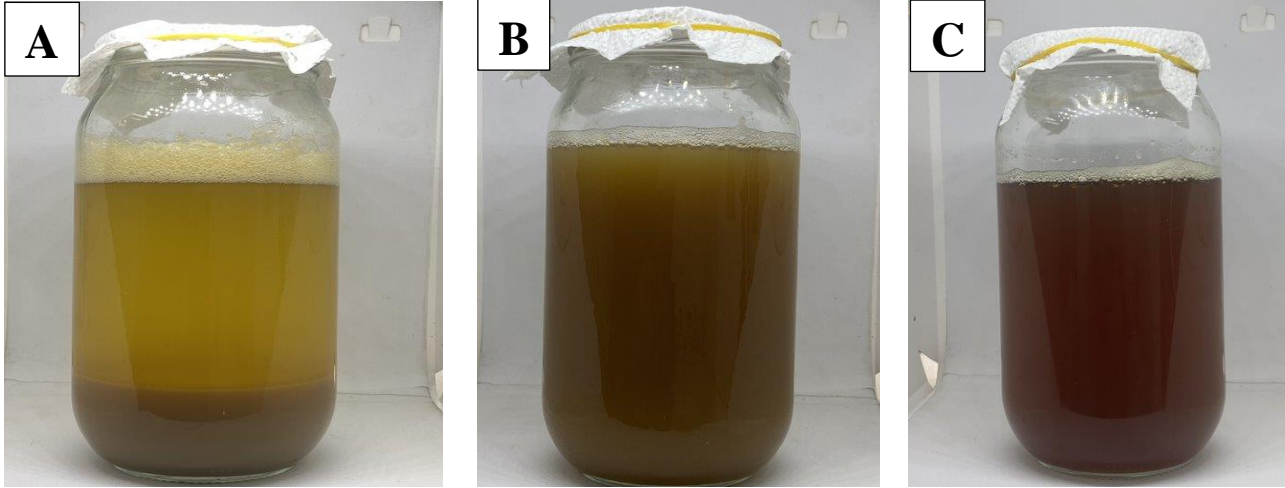
Agavinler, molekül sayısının tatlılıkla ters orantılı olduğu fruktoz polimerleridir: tatlılık ne kadar düşükse, polimerizasyon derecesi o kadar uzun olmaktadır [15]. Bu düşük molekül sayısına sahip karbonhidratların varlığı, prebiyotiklerin, fermente ürünlerin ve/veya şurupların elde edilmesini sağlamaktadır [16]. Fruktanlar, agave türlerinde suda çözünen ana karbonhidrattır; toplam çözünür karbonhidratların > %60'ını temsil ederler [17]. Agave şurupları, agave fruktanlarından asit hidrolizi, termal hidroliz veya glikozidik enzimler tarafından üretilebilir [18]. Muniz-Marquez ve arkadaşları [19], agave öz suyunun 5 dakika 121°C'ye tabi tutulmasının, elde edilen şurubun sakkaroz konsantrasyonunu 1.66 g/L'den 41.39 g/L'ye önemli ölçüde artırdığını bildirmiştir. Agave fruktanları, gıda teknolojisi için düşük kalorili tatlandırıcılar, yağ ikame maddeleri, çözünür lif, mikrokapsülleme taşıyıcıları, doku ve viskozite değiştiriciler dahil olmak üzere çeşitli teknolojik özellikler sunmaktadır [14]. Unlu mamullerde, agave şurubunun kısmen veya tamamen sakkaroz ikamesi olarak kullanımı, kurabiye [20], limonata [21], glutensiz kekler [22] ve tahıl barlarının [23] hazırlanmasında kullanılmıştır. Agave şurubundaki amino asitler, biyoaktif bileşikler (polifenoller, flavonoidler, tanenler ve saponinler) [24] ve mineraller (Fe, Ca, K, Mg ve Na) [25] gibi mikro besinlerden dolayı fonksiyonel özelliklere sahip bir ürün olduğu bildirmiştir. Bunun yanı sıra fruktanlar, gıdalardaki yağ ve şekerin yerine teknolojik olarak kullanılan prebiyotik maddelerdir. Laktik asit, bütirik asit ve propiyonik asit gibi kısa zincirli yağ asitlerinin üretimi yoluyla insan sağlığını destekleyen bağırsak mikrobiyotası tarafından tüketilirler [26]. Bu çalışmada, AŞ'nin farklı konsantrasyonlarda (%3, %5 ve %7) ve fermantasyon sürelerinde (48. saat, 7., ve 14. gün) kombu çayı için şeker ikamesi olarak kullanılabilirliğinin yanı sıra üretilen içeceğin bazı fizikokimyasal, antioksidan ve mikrobiyolojik özellikleri belirlenmiştir.

## 2. Materyal ve Metodlar

### 2.1. Kombu çayı başlangıç kültürü ve Agave şurubu katkılı fermente içeceklerinin üretimi

Kombu çayı üretimi için yerel marketten temin edilen yeşil çay (Lipton, Türkiye), toz şeker (Torku, Türkiye) ve ticari olarak satışa sunulan "Symbiotic culture of bacteria and yeast (SCOBY)" olarak bilinen kombu çayı mantarı (Shaman's Secret şirketi, İstanbul/Türkiye) kullanılmıştır. Agave şurubu, Türkiye'nin İstanbul-Sarıyer bölgesinde bulunan "The LifeCo well-being" adlı bir şirketten satın alınmıştır. Satın alınan AŞ, %100 organik ve vegan, koruyucu madde içermeyen, yapay renklendirici içermeyen, gluten içermeyen, GDO içermeyen, tatlandırıcı içermeyen bir üründür. 330 mL AŞ, 0 g yağ, 71 g karbonhidrat, 5.7 g lif, 0 g protein, 297 kcal enerji içermektedir. Başlangıç kültürü, bir buzdolabında (+4 °C) saklanmış ve asidik bir sıvı içeren bir kültür ortamı ve sıvı yüzeyinde yüzen bir SCOBY'den oluşmaktadır. Kombu çayı başlangıç kültürünün aktivasyonu şu şekilde gerçekleştirilmiştir. Kombu çayı elde etmek için, steril cam kavanozun içine 1 L içme suyu (100 °C) eklenip, 70 g sakkaroz (%7) eklenerek çözündürüldü. Daha sonra 7 g yeşil çay

yaprakları eklendi ve 30 dakika demlendikten sonra çay yaprakları süzülüp oda sıcaklığında soğumaya bırakıldı. Steril cam kavanozlara alınan yeşil çaylara, satın alınan SCOBY içinde bulunduğu mikrobiyal koloni içeren sıvıdan olan "fermented broth" (%10 oranında) ilave edildi. Hijyenik pamuklu bez ile üzeri kapatılıp iklimlendirme test kabininde 25±2 °C sıcaklıkta 14 gün inkübasyona bırakıldı [27]. 14 günlük inkübasyonun ardından, hazırlanan yeşil çay örneklerinin yüzeyinde SCOBY oluşumu gözlemlendi. Ön fermentasyonun ardından AŞ kombü çayı içeceğinin üretimine başlandı. Her üç ayrı üretim için kavanozlara inkübasyon sonunda elde edilen SCOBY'nin içinde bulunduğu kombü çayına %3, %5 ve %7 oranlarında (v/v) ayrı ayrı AŞ ilave edildi. Çalışmada AŞ kombü çayı konsantrasyonları %3 (AŞ3; Şekil 1A), %5 (AŞ5; Şekil 1B) ve %7 (AŞ7; Şekil 1C) olarak ifade edildi. Kavanozların üzeri hijyenik pamuklu bez ile kapatıldıktan sonra 25±2 °C sıcaklıkta 14 gün boyunca inkübasyona bırakıldı. 14 günlük fermentasyon periyodu boyunca 48. saat, 7. ve 14. günlerde örnekler alınarak belirtilen analizler yapıldı.



Şekil 1A) AŞ3 kombü çayı

Şekil 1B) AŞ5 kombü çayı

Şekil 1C) AŞ7 kombü çayı

## 2.2. pH, TA ve Suda çözünen kuru madde analizleri

pH değerleri bir Mettler Toledo pH ölçer (Model: Seven Easy GmbH 8603, İsviçre) kullanılarak ölçülmüştür. Numunelerin titre edilebilir asitliği (TA), pH 8.1'e ulaşana kadar ayarlanmış 0.1 N NaOH çözeltisi ile titre edilerek belirlenmiştir. Örneklerin TA'ları asetik asit cinsinden hesaplandı ve sonuçlar "g asetik asit/100 mL kombü çayı" olarak ifade edildi. Suda çözünen kuru madde (SÇKM) değerleri bir refraktometre (Atago, PAL-3, Japonya) ile ölçülmüştür [28].

## 2.3. 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) radikal süpürme aktivitesi

Numunelerin serbest radikalleri temizleme yeteneği, Brand-Williams ve arkadaşları [29] tarafından bildirilen DPPH tekniğinin değiştirilmiş bir versiyonu kullanılarak değerlendirildi. 1:20 oranında seyreltilmiş numunenin 20 µL'si (0.5 mg/mL), 96 oyuklu bir mikropalakadaki (Micro Well, Thermo Fisher Scientific, Fransa) 180 µL 0.2 mM metanolik DPPH çözeltisine ilave edildi ve karışım beklemeye bırakıldı. Thermo Fisher Scientific'in Multiskan Go, F1-01620 mikropalaka okuyucusu, en fazla DPPH'nin emildiği dalga boyu olan 517 nm'de absorbansı ölçmek için kullanıldı. Oda sıcaklığında (15-20°C) 25 dakikalık inkübasyonun ardından spektrofotometre ile okuma yapıldı. DPPH inhibisyonu şu şekilde hesaplandı: Denklem 1: % inhibisyon=100 x (kör numune - örnek)/kör numune

## 2.4. Metal şelatlama aktivitesi

Metal şelatlama aktivitesi (MŞA) Decker ve Welch'in belirlediği yöntemle gerçekleştirildi [30]. Stok solüsyon 800 µL örnek +100 µL solüsyon (2 mM FeCl<sub>2</sub>) olarak hazırlandı. Reaksiyonu başlatmak için 400 uL (5 mM) ferrozin ilave edildi ve oda sıcaklığında 10 dakika süreyle inkübe edildi. Absorbans değerleri 562 nm'de spektrofotometrik olarak ölçüldü. Hesaplamalar aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır. % Şelatlama={[A-(B-C)/A]\*100}

A= Negatif kontrolden okunan absorbans değeri

B= Örnekten okunan absorbans değeri

C= Pozitif kontrolden okunan absorbans değeri

## 2.5. Toplam fenolik madde tayini

Toplam fenolik madde (TFM), Singleton ve Rossi'ye [31] göre Folin-Ciocalteu reaktif yöntemi kullanılarak belirlendi. Alınan 0.2 mL örnek üzerine %7 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> ve 10 mL %10'luk Folin-Ciocalteu çözeltisi ilave edilmiş ve karışım karanlıkta 25°C'de 2 saat süreyle inkübe edildi. İnkübasyondan sonra UV-Vis spektrofotometre kullanılarak 760 nm dalga boyundaki absorbans değerleri üç tekrar olarak ölçüldü. Standart olarak gallik asit kullanıldı ve sonuçlar mg GAE/L cinsinden ifade edildi.

## 2.6. Mikrobiyolojik analizler

Kombu çayı örneklerinde asetik asit bakterileri (AAB) ve laktik asit bakterileri (LAB)'nin mikrobiyal sayıları belirlendi. Seri seyreltmeler hazırlanmadan önce, analiz edilen numunelerin bir mililitresine dokuz mililitre steril fizyolojik salin çözeltisi (%0.85 NaCl) ilave edildi. LAB sayısını tespit etmek için dökme plaka yöntemi kullanıldı. Hazırlanan uygun dilüsyonlardan (10<sup>-1</sup>-10<sup>-7</sup>) 100 µL alınarak petri kaplarına ilave edildi ve üzerine Man-Rogosa-Sharpe (MRS) agar döküldü, 37°C'de 48 saat inkübe edildi. AAB'yi saymak için yayılmış plaka yöntemi kullanıldı. Glucose yeast extract (GYC) agar, 50 g/L glikoz, 10 g/L maya ekstraktı, 30 g/L CaCO<sub>3</sub>, 15 g/L agar ve 50 mg/L natamisin ile karıştırıldı. Numunelerin uygun dilüsyonları plakalara yerleştirildi ve bunlar daha sonra 28 °C'de 72 saat süreyle inkübe edildi. Maya sayımlarında Yeast Extract Glucose Chloramphenicol (YGC) agar ve yayma plak yöntemi kullanıldı. Aşılardan petri kapları 25°C'de 5 gün süreyle inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında 30-300 koloni içeren petri kaplarındaki tipik koloniler sayılarak hesaplama yapıldı. Mikrobiyal popülasyonlar log kob/mL olarak ifade edildi [32,33].

## 2.7. İstatistiksel analizler

Veriler Minitab 21.3 kullanılarak istatistiksel olarak analiz edildi. Tüm veriler üç çalışmanın (n ≥ 3) ortalamaları (SEM) kullanılarak sunulmuştur. Araştırma her örnek için üç tekrarlama içermektedir. Verilerin ortalama varyasyonunu belirlemek için ANOVA ve Tukey'in çok değişkenli varyans analizi kullanıldı. İstatistiksel anlamlılık düzeyi p <0.05 olarak belirlendi.

## 3. Sonuçlar ve Tartışma

### 3.1. pH, TA ve SÇKM analizleri

AŞ3, AŞ5 ve AŞ7 fermente içeceklerinin 25°C'de, fermantasyonun 48. saat, 7. ve 14. günlerindeki pH değerleri Tablo 1'de gösterilmiştir. Yapılan araştırma sonuçlarına göre, yeşil çay ile hazırlanan kombu çayının başlangıç pH'ı yaklaşık 3.45 olup, 14 günlük fermantasyon sürecinin sonunda bu değerlerin yaklaşık 3.0 olduğu bildirilmiştir [27]. AŞ'nin türüne, şeker içeriğine ve miktarına bağlı olarak pH değişim aralığı 3.6 ile 5.8 arasında belirlenmiştir [34]. Mevcut çalışmada, AŞ3, AŞ5 ve AŞ7 içeceklerinin 48. saatteki pH düzeyleri sırasıyla 4.54, 4.27 ve 3.78 olarak ölçülmüştür. Fermantasyon süresindeki artışa bağlı olarak tüm infüzyon gruplarında pH değerlerinde azalma gözlemlenmiştir (p<0.05). Fermantasyon sırasında kombu çayı örneklerinde pH seviyesinin düşmesinin temel nedeninin organik asit içeriğindeki artıştan kaynaklandığı düşünülmektedir. Gıdalarda bazı mikroorganizma türlerinin gelişmesine katkıda bulunabilecek veya gelişimini önleyebilecek faktörlerden biri ortamdaki H<sup>+</sup> konsantrasyonudur. Asetik asit bakterileri, ortamın 3.6 ile 6.3 arasındaki pH değerlerini tolere eder ve pH'nın 5.4'ten az olmaması, büyümelerini kolaylaştırır. Mayalar için optimum pH, türe ve türe bağlı olarak 4.5 ile 6.5 arasındadır [35]. Ek olarak, pH'nın 4.5'ten düşük olması, gıda kaynaklı hastalıklardan sorumlu olan temel mikroorganizmaların çoğalmasını önlemektedir [36]. AŞ7 kombu çayı'nın pH değeri, fermantasyonun 7. ve 14. günlerinde sırasıyla 3.13±0.13 ve 2.91±0.15 olarak ölçülmüştür. Bu sonuçlar, AŞ7'nin diğer gruplara göre ortamdaki organik asit üretiminde daha fazla artış olduğunu ve fermantasyonun 7. ve 14. günlerinde pH'nın daha hızlı azaldığını göstermektedir. AŞ3 ve AŞ5 gruplarındaki pH değişimlerinin sebebi, fermantasyon ortamındaki sıvı konsantrasyonuna bağlı olarak mikrobiyal faaliyetler sonucu üretilen bazı moleküllerin tamponlayıcı etki göstermesi olabilir. Jakubczyk ve arkadaşları [37], beyaz, yeşil, siyah ve kırmızı çaylarla hazırlanan kombu çaylarının başlangıç pH'nın 5.34 ile 6.53 arasında olduğunu rapor etmişlerdir. Fermantasyonun 14. gününde ise bu değerlerin 2.31 ile 2.53 arasına düştüğü belirtilmiştir. Bu çalışmada, 14. gün pH değerleri içilebilir asitlik aralığında, 2.91 ile 3.06 düzeyinde belirlenmiştir. Çok düşük pH'ta tüketilen içeceklerin sindirim sistemi üzerinde olumsuz etkilere neden olabileceği unutulmamalıdır. Bu nedenle, kombu çayının fermantasyon süresi kadar elde edilen içeceğin tüketim miktarı da önemlidir. Mevcut bulgular, kombu çayındaki mikroorganizmaların AŞ'a adapte olabileceğini ve bu ortamda canlı kalabileceğini göstermektedir. Sievers ve arkadaşlarının [38], Yavari ve arkadaşlarının [39], Gülhan'ın [27], Ayed ve Hamdi'nin [40] araştırma sonuçları kombu çayındaki mikroorganizmaların çeşitli substratlarda aktivite gösterebildiğini ortaya koymuştur. TA'nın içeceğin tadı ve aroması üzerinde daha önemli bir etkisi vardır. Bununla birlikte, asitleştirme

bileşiklerinin karışımı genellikle karmaşıktır ve zaman içindeki gelişimi, büyük miktarlarda birden fazla asit içermesine bağlıdır. Tüm gruplardaki çay infüzyonlarının TA'sı  $0.27 \pm 0.07$  ila  $0.82 \pm 0.45$  g/100 mL arasında değişmiştir. Fermantasyonun 14. gününde tüm içeceklerin TA'sında zamana bağlı bir artış meydana gelmiştir (Tablo 1). Fermantasyon sonunda, AŞ7 içeceğinde en yüksek TA değerleri sırasıyla 7. ve 14. günlerde belirlenmiştir (Tablo 1). En düşük TA seviyeleri AŞ3 ve AŞ5'in 48. saat örneklerindedir (Tablo 1). Çeşitli substratlarda üretilen kombucha çaylarının duyu analizi verileri, asidite parametresinin farklı puanlar aldığı göstermiş ve ortaya çıkan tat oluşumunun tüketici tercihiyle ilgili olarak değiştiği ortaya konmuştur [41,42]. TA'nın 0.25 g/100 mL ve daha düşük seviyelere ulaştığında kombucha çayı içmenin zorlaştığı bilinmektedir [43]. Velicanski ve arkadaşları [6], *Melissa officinalis* ile hazırlanan geleneksel kombucha çayının pH ve TA düzeylerindeki değişiklikleri, SCOBY gelişimi için yeterli nitrojen sağlayan bitki olarak ifade etmişlerdir. Bazı çalışmalarda pH ve TA'daki uyumsuzluklar fermantasyon ortamının tampon kapasitesi ile açıklanmaktadır; yani fermantasyon sırasında açığa çıkan karbondioksit, su çözeltisini parçalayarak amfiprotik hidrokarbonat anyonu ( $\text{HCO}_3^-$ ) üretmektedir. Bu anyonların fermantasyon ortamındaki organik asitlerden kaynaklanan hidrojen iyonları ile reaksiyona girebileceği ve pH değişimlerini önleyerek sistemin tamponlama kapasitesine katkıda bulunabileceği düşünülmektedir. pH ve TA parametrelerindeki bu tür eğilimler, kombucha çayı fermantasyonunda tipiktir ve bazı yazarlar tarafından gözlemlenmiştir [44,45]. Fermantasyon boyunca TA'da bir artış gözlemlenmesine rağmen, bazı yazarlar uzun süreli fermantasyon sırasında (60 gün) asetik asit konsantrasyonunda sınırlı bir artış olduğunu bildirmiştir [46]. Bu bilgiler ışığında, bazı çalışmalarda kombucha çayı fermantasyonunun sonlanma sürecini belirleyen kritik parametre olarak pH yerine TA kullanılmıştır. Tüm kombucha çayı örnekleri değerlendirildiğinde SÇKM'nin  $7.27 \pm 0.09$  ile  $7.81 \pm 0.28$  °Bx arasında değiştiği belirlendi (Tablo 1). Tüm içecekler için en düşük SÇKM değerleri 14. gündeydi (Tablo 1). En yüksek SÇKM ise AŞ7 içeceğinin 48. saatinde tespit edildi. Mayalar, kombucha çayı ortamında glikozu ve fruktozu etanole dönüştürür. Asetik asit bakterileri ise ortamdaki etanolü glukonik asit üretmek için kullanır [40,47]. Mayalar ve bakteriler, fermantasyon sırasında sakkarozu metabolize ettiğinden bir süre sonra infüzyon gruplarının SÇKM seviyelerinde azalmalar meydana gelmiştir (Tablo 1). Bu araştırmanın sonuçlarıyla paralel olarak, Tamer ve arkadaşları [48], şekerli siyah ve yeşil çay infüzyonu ile hazırlanan kombucha çayının yanı sıra bazı şifalı bitki infüzyonlarıyla, fermantasyon sonrası mikroorganizma faaliyetleri nedeniyle şeker miktarının azaldığını, buna bağlı olarak SÇKM seviyelerinde azalma olduğunu belirtmişlerdir.

**Tablo 1.** Farklı konsantrasyonlarda agave şuruplarıyla hazırlanan kombucha çayında farklı fermantasyon sürelerindeki fizikokimyasal değişiklikler

Kombucha çayı Konsantrasyonları	Fermantasyon Süresi	pH	TA (g/100 mL)	SÇKM (°Bx)
AŞ3	48. saat	4.54±0.19Aa	0.27±0.07Ec	7.65±0.25Ba
	7. gün	3.97±0.14Bb	0.35±0.14Db	7.56±0.21Bb
	14. gün	3.06±0.15Dc	0.76±0.34Ba	7.48±0.15Cc
AŞ5	48. saat	4.27±0.08Aa	0.25±0.06Ec	7.60±0.16Ba
	7. gün	3.56±0.14Cb	0.49±0.19Db	7.37±0.11Db
	14. gün	3.09±0.17Dc	0.64±0.26Ca	7.27±0.09Ec
AŞ7	48. saat	3.78±0.10Ca	0.44±0.17Dc	7.81±0.28Aa
	7. gün	3.13±0.13Db	0.54±0.21Db	7.59±0.14Bb
	14. gün	2.91±0.15Ec	0.82±0.45Aa	7.42±0.13Cc

Aynı sütunda her grubun kendi içerisinde (a, b ve c) ve gruplar arasındaki (A,B,C,D ve E) farklı harflerle ifade edilen değerler anlamlı derecede farklıdır ( $p < 0.05$ ) ( $n = 3 \pm \text{SD}$ ).

### 3.2. Antioksidan parametreler

Kombucha çayı fermantasyonunun antioksidan aktivite üzerindeki etkisi, sadece çay mantarının kimyasal ve mikrobiyolojik bileşimine değil, aynı zamanda eklenen substratın veya şeker kaynağının biyokimyasal bileşimine de bağlı olarak değişkenlik gösterebilmektedir [25, 49]. Tablo 2'de gösterildiği gibi, tüm AŞ içeceklerinde en düşük DPPH aktiviteleri 48. saatte, en yüksek aktiviteler ise 14. günde tespit edilmiştir ( $p < 0.05$ ). AŞ kombucha çayı örnekleri arasında en yüksek DPPH aktivitesi AŞ7'de 14. günde  $71 \pm 1.02$ %, en düşük DPPH aktivitesi ise AŞ3'te 48. saatte  $29 \pm 0.54$  olarak hesaplandı. İçecekler karşılaştırıldığında, AŞ ilavesinin kombucha çayı içeceğinin antioksidan aktivitesine %29-%71 oranlarında radikal süpürme kapasitesi sağladığı görülmektedir. Tek başına AŞ'nin DPPH radikal süpürme aktivitesi ~%10 inhibisyon olarak belirlenmiştir [49]. Dolayısıyla, AŞ'den kombucha çayı hazırlanması DPPH radikal süpürme aktivitesini arttırmıştır. Araştırmada analiz edilen bir diğer antioksidan kapasite belirleme yöntemi olarak MŞA belirlenmiştir. Bu yöntem, serbest ağır metallerin yıkıcı etkilerini engellemek amacıyla ortamdaki antioksidan

moleküllerin bu metal iyonlarını inhibe etme kapasitesi esasına dayanmaktadır. En yüksek MŞA aktivitesi AŞ7 içeceğinde fermantasyonun 14. gününde %71.5 oranında belirlenmiştir. Diğer konsantrasyon gruplarından AŞ3 ve AŞ5 kombü çayı içeceklerinin demir iyonlarını bağlama yeteneği AŞ7 kombü çayına göre daha düşüktü. Bu sonuç, hem yeşil çaydaki polimerik kateşinlerin hem de agave şurubundaki diğer antioksidatif bileşiklerin fermantasyon işlemi sırasında depolimerizasyona uğramış olabileceğini ve bunun sonucunda daha yüksek antioksidan potansiyeli uygulayan daha küçük moleküllerin salınmasının göstergesi olabilir. Gıdalardaki fenolik bileşiklerin çeşitliliği ve miktarı antioksidan aktiviteye önemli ölçüde katkıda bulunmaktadır. AŞ'nin baskın fenolikleri ellagik asit ve kateşinler olarak belirlenmiştir. AŞ'nin toplam fenolik bileşiklerin konsantrasyonu ~323 µg/g numune olarak ölçülmüştür [49]. Bunu yanı sıra saponinler ve tanenlerde AŞ'nin antioksidan kapasitesine katkıda bulunmaktadır [25]. Mevcut çalışmanın istatistikleri, TFM'nin en düşük AŞ3 içeceğinde 48. saatte (238±0.22 mg GAE/L) ve 7. (245±0.34 mg GAE/L) günlerinde olduğunu ortaya koymuştur. En yüksek TFM'nin AŞ7'nin 7. ve 14. günlerinde sırasıyla 412±0.81 mg GAE/L ve 438±0.89 mg GAE/L seviyelerinde olduğu belirlenmiştir. Gıdalardaki primer fenolik bileşikler genellikle toplam fenolik içerik ile yüksek bir korelasyon göstermektedir. Bunun yanı sıra, bu bileşikler sıklıkla antioksidan aktivite ile pozitif bir ilişkiye sahiptir [50]. Genel olarak, fermente içeceklerin indirgeme gücü kapasiteleri, fermantasyon süresine bağlı olarak değişme eğilimindedir. Mevcut araştırma bulgularına paralel olarak, Chakravorty ve arkadaşları [51], kombü çayının DPPH temizleme oranının 3 haftalık bir fermantasyon süresi boyunca kademeli olarak %3.7'den %44'e yükseldiğini bulmuşlardır. Ancak Amarasinghe ve arkadaşları [43], fermantasyon sürelerinin uzamasıyla (8 hafta) kombü çayının antioksidan aktivitesinde önemli bir azalma olduğunu ortaya koymuştur. Jayabalan ve arkadaşları [52], antioksidan aktivitenin yüksek oranda fermantasyon koşullarına ve analiz edilen substratlara veya ürünlere bağlı olduğunu bildirmiştir. Bu nedenle tüm antioksidan aktivite analiz yöntemleri benzer sonuçlar vermeyebilir. Başka bir çalışmada, Gaggia ve arkadaşları [53], DPPH testi ile 7 günlük fermantasyondan sonra alınan numunelerde yeşil çay, siyah çay ve rooibos yapraklarıyla hazırlanan kombü çayının antioksidan aktivitelerini sırasıyla 1.30, 0.87 ve 0.45 mmol TE/g kuru ağırlık olarak belirlediler. Ayed ve Hamdi [40], kaktüs armut suyuyla hazırlanan kombü çayının toplam fenolik içeriğinin 6 günlük fermantasyondan sonra %23 arttığını bildirmişlerdir. Aynı araştırmacılar, ürettikleri kombü çayı içeceğinin antioksidan aktivitesinin DPPH ve ABTS tarafından sırasıyla %81 ve %65 oranında arttığını bildirdiler. Fermantasyon sırasında, kombü çayı konsorsiyumundaki asetik asit bakterileri ve mayalar gibi çeşitli mikroorganizmalar, salınan enzimleri ve polifenolik bileşikleri yüksek antioksidan aktiviteye sahip daha küçük moleküllere parçalayabilir. Bu alanda araştırma yapan birçok araştırmacının da açıkladığı gibi fermantasyon karmaşık bileşiklerin daha basit formlara dönüştürülmesine önemli ölçüde katkıda bulunmaktadır [54-56].

**Tablo 2.** Farklı konsantrasyonlarda agave şuruplarıyla hazırlanan kombü çayında farklı fermantasyon sürelerindeki TFM, DPPH ve MŞA değişimleri

Kombü çayı Konsantrasyonları	Fermantasyon Süresi	TFM (mg GAE/L)	DPPH (% inhibisyon)	MŞA (% inhibisyon)
AŞ3	48. saat	238±0.22Ec	29±0.54c	43.2±0.09Db
	7. gün	245±0.34Eb	33±0.59Eb	45.5±0.15Db
	14. gün	308±0.56Da	42±0.74Da	52.7±0.34Ca
AŞ5	48. saat	298±0.49Dc	37±0.67Ec	50.3±0.21Cc
	7. gün	367±0.62Cb	46±0.76Db	56.1±0.39Bb
	14. gün	398±0.72Ba	56±0.84Ca	65.4±0.57Aa
AŞ7	48. saat	378±0.66Cd	51±0.79Cc	60.2±0.49Bc
	7. gün	412±0.81Ab	64±0.92Bb	67.8±0.63Ab
	14. gün	438±0.89Aa	71±1.02Aa	71.5±0.85Aa

Aynı sütunda her grubun kendi içerisinde (a, b ve c) ve gruplar arasındaki (A,B,C,D ve E) farklı harflerle ifade edilen değerler anlamlı derecede farklıdır (p<0.05) (n=3±SD).

### 3.3. Mikrobiyolojik analizler

AŞ'nin üretim verimini ve kalitesini artırmak için yeni yöntemler geliştirilmiştir. Vicente-Magueyal ve arkadaşları [57], agave özsuyunun doğal mikroorganizmalarını (*Kluyveromyces marxianus* ve *Saccharomyces paradoxus*) kullanarak agave suyu fruktanlarının yönlendirilmiş enzimatik hidrolizi yoluyla agave özsuyu elde etmek için bir süreç oluşturmuşlardır. Bu yeni enzimatik yöntem, nihai ürünün kalitesinden ödün vermeden AŞ üretim sürecinin standardize edilmesine ve veriminin artmasına katkıda bulunmaktadır. Bu araştırma verileri, AŞ'nin farklı mikrobiyolojik konsorsiyumlara uyum sağlayabilme kabiliyetini göstermiştir. Kaewkod ve arkadaşları [58], yeşil ve siyah çay kullanılarak üretilen kombü çaylarda maksimum AAB sayısına (7.80 log kob/mL) fermantasyonun 12. gününde ulaşıldığını bildirmiştir. Bu çalışmada, AŞ7 kombü çayı örneklerinin bu mikrobiyal büyümeye fermantasyonun 14.

gününde ulaştığı (7.56 log kob/mL) gözlemlendi (Tablo 3). Bu sonuç, AŞ7'nin mikrobiyal flora için AŞ3 ve AŞ5'ten daha iyi bir şeker kaynağı konsantrasyonuna sahip olduğunu gösterdi. Tüm AŞ kombü çayı içeceklerinde asetik asit bakterileri (AAB), fermantasyon sürecinde laktik asit bakterilerinden (LAB) sayısal olarak üstündü (Tablo 3). De Filippis ve arkadaşları [59], kombü çayı kültüründe AAB ve mayaların baskın mikroorganizmalar olduğunu belirtmiştir. Bu mikroorganizmalar, sakkarozu fruktoza ve glikoza dönüştüren mayalarda aktiftir ve bunlar daha sonra AAB tarafından asetik asitlere ve diğer organik asitlere dönüştürülür. Bu sonuçlar, AŞ7 kombü çayının diğer içecek konsantrasyonlarına göre daha yüksek organik asit içeriğine sahip olabileceğini göstermiştir. Mikrobiyal sayılardaki değişimin bir diğer göstergesi de TA verileridir. Tablo 1'de AŞ7'nin 7. ve 14. günlerdeki yüksek TA seviyelerini göstermektedir. AAB ve LAB, ortamdaki asitliğin artmasına katkıda bulunan ana faktörlerdir ve TA, fermantasyonun 7. gününden sonra hızla arttı (Tablo 1). Aayed ve arkadaşları [60] ve Goh ve arkadaşları [61], ideal substratlarda (siyah çay ve üzüm suyu) bakteri ve mayanın yaşayabilmesi için optimum aralığın 5.0-7.0 log kob/mL olması gerektiğini ve bu koşulların yaklaşık 10 günlük fermantasyon sonrasında gerçekleşebileceğini belirtmişlerdir. Araştırma bulguları, bu yazarların çalışma verilerini doğrulamaktadır. Fermantasyonun ilk aşamalarında (48. saat ve 7. gün) mevcut çevre koşullarının mikroorganizmaların büyümesine ve gelişmesine elverişli olmadığı ve canlı mikrobiyal sayılarının düşük olduğu kaydedilmiştir. Bu sonuçlar, kombü çayı ortamına farklı substratların eklenmesinin, fermantasyon işlemi sırasında mikrobiyal kompozisyon üzerinde önemli bir etkiye sahip olduğunu göstermektedir. Mevcut çalışmanın bulgularıyla tutarlı olarak, Meng ve arkadaşları [62], kombü çayı fermantasyonunun ilk gününde maya, LAB ve AAB mikrobiyal koloni sayılarının arttığını, 3. günde ise bu mikrobiyal koloni sayılarında azalma meydana geldiğini gözlemlemiştir. Daha sonra 7. günde maya ve LAB mikrobiyal koloni sayısında azalma, aksine AAB mikrobiyal koloni sayısında artış tespit ettiler. Cvetkovic ve arkadaşları [63], LAB'nin kombü çaylarındaki canlılığını test etmiş ve fermantasyonun 24. saatinde 3.93 ile 5.36 log kob/mL arasında değişen değerler bulmuşlardır. Bu düşük değerler LAB'ın fermantasyon sürecinin başlarında ortama iyi uyum sağlayamadığını göstermektedir. Maya sayımı sonuçlarına göre en yüksek değerlere AŞ7'de 7. ve 14. günlerde sırasıyla 7.09 log kob/mL ve 7.14 log kob/mL ulaşıldı (Tablo 3). Bu sonuçların olası nedeni, fermantasyon sürecinin başlarında besin sınırlamaları ve pH düşüşleri nedeniyle canlılığın azalmasıyla ilişkilendirilebilir.

**Tablo 3.** Farklı konsantrasyonlarda agave şuruplarıyla hazırlanan kombü çayının farklı fermantasyon sürelerinde mikroorganizma sayılarındaki değişimler

Kombü çayı Konsantrasyonları	Fermantasyon Süresi	AAB (log kob/mL)	LAB (log kob/mL)	MAYA (log kob/mL)
AŞ3	48. saat	5.64±0.27Db	4.78±0.18Eb	5.68±0.12Eb
	7. gün	5.78±0.32Db	4.99±0.23Eb	5.84±0.15Eb
	14. gün	6.29±0.45Ca	5.67±0.51Ca	6.42±0.34Ca
AŞ5	48. saat	5.98±0.38Dc	5.12±0.37Dc	6.05±0.24Db
	7. gün	6.31±0.48Cb	5.94±0.65Ba	6.32±0.31Ca
	14. gün	7.09±0.67Ba	5.59±0.46Cb	6.39±0.32Ca
AŞ7	48. saat	6.55±0.54Cb	5.84±0.60Bb	6.66±0.38Bb
	7. gün	7.23±0.78Aa	6.49±0.82Aa	7.09±0.54Aa
	14. gün	7.56±0.83Aa	6.25±0.72Aa	7.14±0.56Aa

Aynı sütunda her grubun kendi içerisinde (a, b ve c) ve gruplar arasındaki (A,B,C,D ve E) farklı harflerle ifade edilen değerler anlamlı derecede farklıdır ( $p<0.05$ ) ( $n=3\pm SD$ ).

#### 4. Sonuç

Son yıllarda, doğal kaynaklardan elde edilen tatlandırıcılar, onları karakterize etmeyi ve biyolojik ve teknolojik işlevselliklerinin yanı sıra insan sağlığı üzerindeki etkilerini belirlemeyi amaçlayan çalışmaların odak noktası olmuştur. Agave özü konsantresi veya agave nektarı konsantresi olarak da bilinen AŞ, doğal kaynağı, varsayılan nutrasötik özellikleri ve düşük glisemik indeksi nedeniyle sağlıklı, organik ve fonksiyonel gıdalar pazarında popülerlik kazanmıştır. Gıda endüstrisinde, teknolojik özelliklerinden dolayı fırıncılık, şekerleme ve fonksiyonel içecek endüstrilerinde kullanılmaktadır. Şu anda, gıda endüstrisi, tüketici refahına katkıda bulunan ürünler sunmak için yiyecek ve içeceklerin yeniden formüle edilmesine büyük ilgi göstermiştir. Ancak AŞ'nin teknolojik ve fonksiyonel özelliklerine odaklanan çalışmalar azdır. Bu çalışma ile AŞ'nin farklı konsantrasyonları ile hazırlanan kombü çayı içeceklerinin bazı fizikokimyasal, biyoaktif ve mikrobiyolojik özelliklerine ilişkin kanıtlar sunarak bilimsel katkı sağlanması amaçlanmıştır. Sonuçlar, agave şurubunun kombü çayı fermantasyonunda kullanılabilmesi için iyi bir substrat kaynağı olabileceğini ve agaveden gelen polifenollerin antioksidan kapasiteye katkıda bulunabileceğini göstermiştir. Özellikle, AŞ7'nin 7 ve 14 günlük fermantasyon sürelerinde belirlenen en yüksek fonksiyonel özelliklerden dolayı bu süreler arasında tüketilmesi tavsiye edilebilir. AŞ'nin teknolojik profiline ve piyasadaki diğer tatlandırıcılara kıyasla tüketiciler üzerindeki etkilerine

ilişkin bilgiyi artırmak için ürün geliştirme ve yenilik alanlarında bilimsel ve gıda endüstrisi profesyonelleri arasında daha çok işbirliğine ihtiyaç vardır.

### Kaynaklar

- [1] Teoh, A.L., Heard, G., Cox, J. (2004). Yeast ecology of kombucha fermentation, *International Journal of Food Microbiology*, 95, 119–126.
- [2] Martinez, L.J., Suárez, L.V., Jayabalan, R., Orosa, J.H., Escalante-Aburto, A. (2018). A review on health benefits of kombucha nutritional compounds and metabolites, *CyTA-Journal of Food*, 16, 390–399.
- [3] Yang, C.S., Maliakal, P., Meng, X. (2002). Inhibition of carcinogenesis by tea, *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 42, 25–54.
- [4] Neffe-Skocińska, K., Sionek, B., Ścibisz, I., Kołożyn-Krajewska, D. (2017). Acid contents and the effect of fermentation condition of kombucha tea beverages on physicochemical, microbiological and sensory properties, *CyTA-Journal of Food*, 15, 601–607.
- [5] Vitas, J.S., Malbaša, R.V., Grahovac, J.A., Lončar, E.S. (2013). The antioxidant activity of kombucha fermented milk products with stinging nettle and winter savory, *Chemical Industry and Chemical Engineering Quarterly*, 19, 129–139.
- [6] Velicanski, A.S., Cvetković, D.D., Markov, S.L., Šaponjac, V.T.T., Vulić, J.J. (2014). Antioxidant and antibacterial activity of the beverage obtained by fermentation of sweetened lemon balm (*Melissa officinalis* L.) tea with symbiotic consortium of bacteria and yeasts, *Food Technology and Biotechnology*, 52, 420–429.
- [7] Yavari, N., Assadi, M.M., Moghadam, M.B., Larijani, K. (2011). Optimizing glucuronic acid production using tea fungus on grape juice by response surface methodology, *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 5, 1788–1794.
- [8] Mora, M.R., Dando, R. (2021). The sensory properties and metabolic impact of natural and synthetic sweeteners, *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 20, 1554–1583.
- [9] Deliza, R., Lima, M. F., Ares, G. (2021). Rethinking sugar reduction in processed foods, *Current Opinion in Food Science*, 40, 58–66.
- [10] Santos-Zea, L., Leal-Díaz, A.M., Cortés-Ceballos, E., Gutiérrez-Urbe, J.A. (2012). Agave (*Agave* spp.) and its traditional products as a source of bioactive compounds, *Current Bioactive Compounds*, 8, 218–231.
- [11] Martínez-Herrera, R.E., Rutiaga-Quiñones, O.M., Alemán-Huerta, M.E. (2021). Integration of Agave plants into the polyhydroxybutyrate (PHB) production: A gift of the ancient Aztecs to the current bioworld, *Industrial Crops and Products*, 174, 114188.
- [12] Mellado-Mojica, E., Lopez-Perez, M.G. (2015). Identification, classification, and discrimination of agave syrups from natural sweeteners by infrared spectroscopy and HPAEC-PAD, *Food Chemistry*, 167, 349–357.
- [13] Global Agave Market, Market Report on Agave Nectar. (2021). Available online: <https://www.marketdataforecast.com/marketreports/agave-nectar-market> (accessed on 12 December).
- [14] Espinosa-Andrews, H., Urías-Silva, J.E., Morales-Hernández, N. (2021). The role of agave fructans in health and food applications: A review, *Trends in Food Science and Technology*, 114, 585–598.
- [15] Mellado-Mojica, E., López, M.G. (2013). Comparative analysis between blue Agave syrup (*Agave tequilana* Weber var. azul) and other natural syrups, *Agrociencia*, 47, 233–244.
- [16] Aldrete-Herrera, P.I., López, M.G., Medina-Torres, L., Ragazzo-Sánchez, J.A., Calderón-Santoyo, M., González-Ávila, M., Ortiz-Basurto, R.I. (2019). Physicochemical composition and apparent degree of polymerization of fructans in five wild agave varieties: Potential Industrial Use, *Foods*, 8, 404.
- [17] Escamilla-Treviño, L.L. (2012). Potential of plants from the genus agave as bioenergy crops, *Bioenergy Research*, 5, 1–9.



- [18] Maldonado-Guevara, B.I., Martín del Campo, S.T., Cardador-Martínez, A. (2018). Production process effect on Mexican agave syrups quality: A preliminary study, *Journal of Food Research*, 7, 50–57.
- [19] Muniz-Marquez, D.B., Contreras, J.C., Rodríguez, R., Mussatto, S.I., Wong-Paz, J.E., Teixeira, J. A., Aguilar, C.N. (2015). Influence of thermal effect on sugars composition of Mexican Agave syrup, *CyTA - Journal of Food*, 13, 1–6.
- [20] Liang, S., Were, L.M. (2018). Chlorogenic acid oxidation-induced greening of sunflower butter cookies as a function of different sweeteners and storage conditions, *Food Chemistry*, 241, 135–142.
- [21] Gülhan, A. (2024). Use of ice teas formulated with black teas prepared with different infusion methods and grape juice in the production of water kefir beverages, *Food and Humanity*, 2, 100219.
- [22] Rothschild, J., Rosentrater, K.A., Onwulata, C., Singh, M., Menutti, L., Jambazian, P., Omary, M.B. (2015). Influence of quinoa roasting on sensory and physicochemical properties of allergen-free, gluten-free cakes, *Internationa Journal of Food Science and Technology*, 50, 1873–1881.
- [23] Zamora-Gasga, V.M., Bello-Pérez, L.A., Ortíz-Basurto, R.I., Tovar, J., Sáyo-Ayerdi, S.G. (2014). Granola bars prepared with agave tequilana ingredients: Chemical composition and in vitro starch hydrolysis, *LWT Food Science and Technology*, 56, 309–314.
- [24] Gutierrez-Urbe, J.A., Santos-Zea, L., Serna-Saldívar, S.O. (2017). US8470858B2 - Agave syrup extract having anticancer activity - Google Patents (Patent No. US9585928B2).
- [25] Hernandez-Ramos, L., García-Mateos, R., Ybarra-Moncada, M.C., Colinas-Le'on, M.T. (2020). Nutritional value and antioxidant activity of the maguey syrup (Agave salmiana and A. mapisaga) obtained through three treatments, *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 48, 1306–1316.
- [26] Ribeiro, J.A., dos Santos Pereira, E., de Oliveira Raphaelli, C., Radünz, M., Camargo, T.M., da Rocha Concenço, F.I.G., Cantillano, R.F.F., Fiorentini, Â.M., Nora, L. (2022). Application of prebiotics in apple products and potential health benefits, *Journal of Food Science and Technology*, 59, 1249–1262.
- [27] Gülhan, M.F. (2023). A new substrate and nitrogen source for traditional kombucha beverage: Stevia rebaudiana leaves, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 195(7), 4096–4115.
- [28] AOAC (Association of Official Analytical Chemists). (2012). *Official methods of analysis of AOAC International, 19th ed. Arlington: Association of official analytical chemists.*
- [29] Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., Berset, C.L.W.T. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity, *LWT-Food Science and Technology*, 28, 25–30.
- [30] Decker, E.A., Welch, B. (1990). Role of ferritin as a lipid oxidation catalyst in muscle food, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38, 674-677.
- [31] Singleton, V.L., Rossi, J.A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents, *American Journal of Enology and Viticulture*, 16, 144-158.
- [32] Du Toit, W.J., Lambrechts, M.G. (2002). The enumeration and identification of acetic acid bacteria from South African red wine fermentations, *International Journal of Food Microbiology*, 74(1), 57–64.
- [33] Kruk, M., Trzaskowska, M., Scibisz, I., Pokorski, P. (2021). Application of the “SCOBY” and kombucha tea for the production of fermented milk drinks, *Microorganisms*, 9, 123.
- [34] Ozuna, C., Franco-Robles, E. (2022). Agave syrup: An alternative to conventional sweeteners? A review of its current technological applications and health effects, *LWT-Food Science and Technology*, 162, 113434.
- [35] Yıkımsı, S., Tuğgum, S. (2019). Evaluation of microbiological, physicochemical and sensorial properties of purple basil kombucha beverage, *Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology*, 7, 1321–1327.
- [36] da Silva, C.F.G., Santos, F.L., de Santana, L.R.R., Silva, M.V.L., de Araujo, C.T. (2018). Development and characterization of a soymilk kefir-based functional beverage, *Food Science and Technology*, 38(3), 543–550.

- [37] Jakubczyk, K., Kałduńska, J., Kochman, J., Janda, K. (2020). *Chemical profile and antioxidant activity of the kombucha beverage derived from white, green, black and red tea*. *Antioxidants*, 9, 447.
- [38] Sievers, M., Lanini, C., Weber, A., Schuler-Schmid, U., Teuber, M. (1995). Microbiology and fermentation balance in a kombucha beverage obtained from a tea fungus fermentation, *Systematic and Applied Microbiology*, 18, 590–594.
- [39] Yavari, N., Assadi, M. M., Moghadam, M. B., Larijani, K. (2011). Optimizing glucuronic acid production using tea fungus on grape juice by response surface methodology, *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 5, 1788–1794.
- [40] Ayed, L., Hamdi, M. (2015). Manufacture of a beverage from cactus pear juice using “tea fungus” fermentation, *Annals of Microbiology*, 65, 2293–2299.
- [41] Kluz M. I., Pietrzyk, K., Pastuszczyk, M., Kacaniova, M., Kita, A., Kapusta, I., Zaguła, G., Zagrobelna, E., Strus, K., Marciniak-Lukasiak, K., Stanek-Tarkowska, J., Timar, A.V., Puchalski, C. (2022). Microbiological and physicochemical composition of various types of homemade kombucha beverages using alternative kinds of sugars, *Foods*, 11, 1523.
- [42] Dartora, B., Hickert, L.R., Fabricio, M.F., Ayub, M.A.Z., Furlan, J.M., Wagner, R., Perez, K.J., Sant’Anna, V. (2023). Understanding the effect of fermentation time on physicochemical characteristics, sensory attributes, and volatile compounds in green tea kombucha, *Food Research International*, 174, 113569.
- [43] Amarasinghe, H., Weerakkody, N.S., Waisundara, V.Y. (2018). Evaluation of physicochemical properties and antioxidant activities of kombucha “tea fungus” during extended periods of fermentation, *Food Science & Nutrition*, 6, 659–665.
- [44] Cvetkovic, D.D. (2008). *Kombucha made from medical herbs-biological activity and fermentation parameters*. [Doctoral dissertation].
- [45] Sreeramulu, G., Zhu, Y., Knol, W. (2000). Kombucha fermentation and its antimicrobial activity, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 2589–2594.
- [46] Belloso-Morales, G., Hernandez-Sanchez, H. (2003). Manufacture of a beverage from cheese whey using a "tea fungus" fermentation, *Revista Latinoamericana de Microbiologia*, 45, 5.
- [47] Chen, C., Liu, B. (2000). Changes in major components of tea fungus metabolites during prolonged fermentation, *Journal of Applied Microbiology*, 89, 834–839.
- [48] Tamer, C., Temel, S.G., Suna, S., Karabacak, A.O., Ozcan, T., Ersan, L.Y., Kaya, B.T., Copur, O.U. (2021). Evaluation of bioaccessibility and functional properties of kombucha beverages fortified with different medicinal plant extracts, *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 45, 13–32.
- [49] Eggleston, G., Boue, S., Bett-Garber, K., Verret, C., Triplett, A., Bechtel, P. (2021). Phenolic contents, antioxidant potential and associated colour in sweet sorghum syrups compared to other commercial syrup sweeteners, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 101, 613–623.
- [50] Que, F., Mao, L.C., Pan, X. (2006). Antioxidant activities of five Chinese rice wines and the involvement of phenolic compounds, *Food Research International*, 39(5), 581–587.
- [51] Chakravorty, S., Bhattacharya, S., Chatzinotas, A., Chakraborty, W., Bhattacharya, D., Gachhui, R. (2016). Kombucha tea fermentation: Microbial and biochemical dynamics, *International Journal of Food Microbiology*, 220, 63-72.
- [52] Jayabalan, R., Marimuthu, S., Swaminathan, K. (2007). Changes in content of organic acids and tea polyphenols during kombucha tea fermentation, *Food Chemistry*, 102, 392–8.
- [53] Gaggia, F., Baffoni, L., Galiano, M., Nielsen, D.S., Jakobsen, R.R., Castro-Mejía, J.L., Bosi, S., Truzzi, F., Musumeci, F., Dinelli, G., Di Gioia, D. (2018). Kombucha beverage from green, black and rooibos teas: a comparative study looking at microbiology, chemistry and antioxidant activity, *Nutrients*, 11, 1.

- [54] Bhattacharya, D., Bhattacharya, S., Patra, M.M., Chakravorty, S., Sarkar, S., Chakraborty, W., Koley, H., Gachhui, R. (2016). Antibacterial activity of polyphenolic fraction of kombucha against enteric bacterial pathogens, *Current Microbiology*, 73, 885–896.
- [55] Gamboa-Gomez, C. I., González-Laredo, R.F., Gallegos-Infante, J.A., del Mar Larrosa Pérez, M.Ş., Moreno-Jiménez, M.R., Flores-Rueda, A.G., Rocha-Guzmán, N.E. (2016). Antioxidant and angiotensin-converting enzyme inhibitory activity of *Eucalyptus camaldulensis* and *Litsea glaucescens* infusions fermented with kombucha consortium, *Food Technology and Biotechnology*, 54, 367.
- [56] Jayabalan, R., Subathradevi, P., Marimuthu, S., Sathishkumar, M., K, Swaminathan. (2008). Changes in free-radical scavenging ability of kombucha tea during fermentation, *Food Chemistry*, 109, 227–234.
- [57] Vicente-Magueyal, F. J., Bautista-Mendez, A., Villanueva-Tierrablanca, H. D., García- Ruíz, J.L., Jimenez-Islas, H., Navarrete-Bolanos, J.L. (2020). Novel process to obtain agave sap (aguamiel) by directed enzymatic hydrolysis of agave juice fructans, *Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie*, 127,109387.
- [58] Kaewkod, T., Bovonsombut, S., Tragoolpua, Y. (2019). 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.
- [59] De Filippis, F., Troise, A.D., Vitaglione, P., Ercolini, D. (2018). Different temperatures select distinctive acetic acid bacteria species and promotes organic acids production during Kombucha tea fermentation, *Food Microbiology*, 73, 11–16.
- [60] Ayed, L., Ben Abid, S., Hamdi, M. (2017). Development of a beverage from red grape juice fermented with the Kombucha consortium, *Annals of Microbiology*, 67(1), 111–121.
- [61] Goh, W.N., Rosma, A., Kaur, B., Fazilah, A., Karim, A.A., Bhat, R. (2012). Fermentation of black tea broth (kombucha): I. effects of sucrose concentration and fermentation time on the yield of microbial cellulose, *International Food Research Journal*, 19 (1), 109–117.
- [62] Meng, Y., Wang, X., Li, Y., Chen, J., Chen, X. (2014). Microbial interactions and dynamic changes of volatile flavor compounds during the fermentation of traditional kombucha, *Food Chemistry*, 430, 137060.
- [63] Cvetkovic, D., Ranitovic, A., Savic, D., Jokovic, N., Vidakovic, A., Pezo, L., Markov, S. (2019). Survival of wild strains of lactobacilli during kombucha fermentation and their contribution to functional characteristics of beverage, *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 69 (4), 407–415.