

KAMBOÇYA ÇAYINDAN İZOLE EDİLEN MAYALARIN ANTİMİKROBİYAL AKTİVİTELERİNİN İNCELENMESİ

STUDY ON ANTIMICROBIAL ACTIVITIES OF YEASTS ISOLATED FROM KOMBUCHA TEA

Sibel ŞAFAK¹, Z. Nur YÜKSEKDAĞ¹, Belma ASLİM¹, Yavuz BEYATLI¹

¹Gazi Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü - Ankara

ÖZET: Bu araştırmada, Kombucha çayından 15 adet maya izole edilmiştir. İdentifikasyon sonuçları bunların *Saccharomyces cerevisiae* (8), *Candida krusei* (2), *Kloeckera apiculata* (2) ve *Kluyveromyces africanus* (1) olduğunu göstermiştir.

Mayaların genel inhibisyon etkileri bazı kontaminant ve patojen bakteriler (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Yersinia enterocolitica*) üzerinde agar difüzyon yöntemi ile belirlenmiştir. Araştırma sonuçları, mayaların *S. aureus* üzerinde değişik oranlarda inhibisyon etkilerinin olduğunu göstermiştir. Mayaların diğer test bakteriler üzerinde antimikrobiyal etki göstermedikleri tespit edilmiştir.

ABSTRACT: In this research, total of 15 yeasts were isolated from Kombucha tea. Identification results showed that 8 species of *Saccharomyces cerevisiae*, 2 species of *Candida krusei*, 2 species of *Kloeckera apiculata* and 1 species of *Kluyveromyces africanus*.

Inhibition activity of the yeasts against some contaminants and pathogen bacteria (*E.coli*, *S.aureus*, *P. aeruginosa* and *Y. enterocolitica*) were determined by agar diffusion method. Results showed that some of the strains were produced antimicrobial activity of *S. aureus*. It was observed that the other yeast strains were not inhibited the others test bacteria.

Giriş

Kamboçya çayı olarak bilinen fungus çayı, hafif tatlı, karbonatlı, asidik ve ticari olarak kullanılan bir kültür çayıdır (GREENWALT et al., 2000; SREERAMULA et al., 2000).

Fermente edilmiş çayın tüketimi ilk olarak M.Ö.220'de Manchuria'da olmuştur. Daha sonra Rusya'da ve Almanya'da kullanılmıştır. Son yıllarda ABD'de kullanımı yaygınlaşmıştır. Bu popularite onun düşük etanol içeriği sebebiyle hayat verici, canlandırıcı gücüyle bağlantılıdır (GREENWALT et al., 2000; BLANC,1996).

Kamboçya çayı, B grubu vitaminlerce zengin olup, vitamin C, lipitler, aminoasitler, biyojenik aminler ve purinlerin yanı sıra, heparin, L-laktik asit, asetik asit, tartarik asit, süksinik asit, malik asit, pürivik asit ve tannik asitin bulunduğu ve %1'den daha az alkol içerdiği belirtilmiştir (FRANK, 1990; STEINKRAUS et al., 1996; LONCAR et al., 2000). Birçok araştırmacı, kamboçya çayının ömrü uzattığını, tüm salgı bezlerini ve hormon savunmasını uyardığını vücuttaki atık madde ve zehirlerin suda çözünebilir hale gelerek atılmasını sağladığını, kan dolaşımını hızlandırdığını ve metabolizmayı uyardığını, sinir sistemini düzenlendiğini, safra taşlarını düşürdüğünü, öksürük, balgam, baş ağrıları ve uykusuzluğu giderdiğini, saç dökülmesini önlediğini bildirmişlerdir. (ANONYMOUS, 1983; BLANC, 1996; FRANK, 1990).

Kamboçya, maya ve bakterilerin simbiyotik bir kültürüdür (GREENWALT et al., 2000; LONCAR et al., 2000). Fungus çayı, şeker ile tatlandırılan siyah çayın içine mantarın aşılması ve karanlık bir yerde 4 ila 8 gün fermentasyona bırakılması ile elde edilmiştir (LONCAR et al., 2000; ANONYMOUS, 1983).

Kamboçya çayının bileşiminde etanol, glukonik asit, L-laktik asit, asetik asit, pürivik asit, purinler, pigmentler, lipitler, aminoasitler, biojenik aminler, monosakkaritler, proteinler, enzimler, B grubu vitaminler, vitamin C, antibiyotik olarak aktif maddeler, usnik asit ve karbon (IV)- oksit bulunduğu belirlenmiştir (FRANK, 1990; LONCAR et al., 2000).

Bu çalışmada, Kamboçya çayından izole edilen mayaların antimikrobiyal aktivitelerinin incelenmesi hedeflenmiştir.

MATERYAL VE YÖNTEM

Çalışmada, Kamboçya çayı örnekleri Ankara ve İstanbul piyasasından temin edilmiştir. Denemelerde kullanılan mayaların kaynakları Çizelge 1'de verilmiştir.

Çizelge 1. İzole Edilen Mayaların Temin Edildiği Kaynaklar

Mayalar	Kaynak
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> S ₁	Ankara Piyasası
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> S ₂	Ankara Piyasası
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> S ₃	Ankara Piyasası
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> S ₄	Ankara Piyasası
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Z ₁	İst. Mısır çarşısı
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Z ₂	İst. Mısır çarşısı
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Z ₄	İst. Mısır çarşısı
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Z ₅	İst. Mısır çarşısı
<i>Candida krusei</i> S ₆	Ankara piyasası
<i>Candida krusei</i> S ₇	Ankara piyasası
<i>Candida krusei</i> N ₁	Ankara piyasası
<i>Candida krusei</i> N ₂	Ankara piyasası
<i>Kloeckera apiculata</i> Z ₃	İst. Mısır çarşısı
<i>Kloeckera apiculata</i> N ₃	Ankara piyasası
<i>Kluyveromyces africanus</i> N ₄	Ankara piyasası

Örneklerden mayaları izole etmek amacıyla 1 ml alınıp steril 9 ml fizyolojik suda vorteksle iyice karıştırılmıştır. Her bir örnekten uygun dilisyon hazırlanıp YEPD agar besiyerine yayma plak yöntemiyle ekimler yapılmış ve plaklar 30±1 °C'de 24 saat inkübe edilmiştir (SANNI and LONNER, 1993; BECKER et al., 1990). Besiyerinde üreyen maya olduğu kanısı ile seçilen koloniler YEPD sıvı besiyerine aşılansarak aktiveleştirilmiştir. Aktif kültürler mikroskopik olarak incelenmiş ve maya örnekleri YEPD yatık Agar'da +4°C'de buzdolabında muhafazaya alınmıştır.

Mayaların İdentifikasyonu

İzole edilen mayaların teşhisinde, mayaların morfolojik özellikleri saptanmış ve biyokimyasal testlerden yararlanılmıştır.

Maya'ların türlerini ayırmak için, izolatin göstermiş olduğu fizyolojik ve biyokimyasal özelliklerden yararlanılmıştır. 26°C'de, 30°C'de 37°C'de ve 50°C'de üreme, arabinoz, trehaloz, ksiloz, rafinoz, maltoz, melezitoz, sorbitol, galaktoz, selibiyoz, mellibiyoz, sukroz, glukoz, laktoz, mannitol, ramnoz, nişasta hidrolizi, jelatin hidrolizi, nitrat redüksiyonu ve üreaz testleri yapılmıştır.

Mayaların bütün tanımlama testleri ve değerlendirmeleri genel identifikasyon yöntemleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir (SANNI and LONNER, 1993; ROHM and LECHNER, 1990; DEAK and BEUCHAT, 1987).

Mayaların Genel İnhibasyon Etkileri

Çalışmada, test bakterisi olarak kullanılan *Escherichia coli* N-R-R,L B-704 Refik Saydam Merkez Hıfızısıha Enstitüsünden, *Staphylococcus aureus* Prof. Dr. Mehmet ŞABANOĞLU'dan (Muğla Ü. Fen Ed. Fak., Biyoloji Bölümü), *Pseudomonas aeruginosa* Gülhane Askeri Tıp Akademisinden *Yersinia enterocolitica* ATTC 1501 Orta Doğu Teknik Üniversitesi'nden temin edilmiştir.

Mayaların test bakterileri üzerine olan genel inhibasyon etkileri agar diffüzyon yöntemi ile belirlenmiştir. Aktif suşlar 10 ml'lik YEPD Broth besiyerine %2 oranında inoküle edilip, 30°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon bitiminde besiyeri 5000 rpm'de 15 dk santrifüj edilip, süpernatant 0,2 µm'lik membran filtreden süzölmüştür.

Test bakterileri Nutrient Broth besiyerinde aktiveleştirilmiştir. Mayaların inhibasyon etkisini test etmek için test bakterileri içeren agarlı besiyerlerinde açılmış kuyulara 100 µl maya kültür filtratı doldurulmuş ve 30°C'de 48 saat inkübe edilmiştir. Oluşan zonların çapları (mm) kumpas yardımıyla ölçölmüştür (REINHEIMER et al., 1990).

BULGULAR ve TARTIŞMA

Çalışmada 15 adet maya elde edilmiştir. İdentifikasyon sonuçları bunların *Saccharomyces cerevisiae* (8), *Candida krusei* (2), *Kloeckera apiculata* (2) ve *Kluyveromyces africanus* (1) olduğunu göstermiştir.

GREENWALT ve ark. (2000), Kamboçya çayında *Saccharomyces cerevisiae*, *S. cerevisiae* subps. *aceti*, *Zygosaccharomyces boiili*, *Z. raxii*, *Brettanomyces intermedius*, *B. bruxellensis*, *Candida famata*, *Pichia membranaefaciens* ve *Torulaspora delbrueckii* mayalarının bulunduğunu bildirmişlerdir.

CHEN and LIU (2000), Kombocha çayının mikroflorası üzerine yapmış oldukları araştırmada *Acetobacter aceti* ve *A. pasteurianus* bakterilerini ve mayalardan da *Saccharomyces cerevisiae* ve *Brettanomyces bruxellensis* mayalarını tanımlamışlardır.

Mayaların indikatör bakteriler üzerine olan genel inhibisyon etkileri Çizelge 2'de gösterilmiştir.

Çalışmamızda *Esherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Yersinia enterocolitica* bakterileri üzerinde toplam 15 adet mayanın inhibisyonik etkisi araştırılmıştır. Çalışma sonucu değerlendirildiğinde bazı mayaların *S. aureus* üzerinde değişik oranlarda inhibisyonik etki gösterdiği tespit edilirken, bu mayaların diğer test bakterileri üzerinde inhibisyonik etki göstermediği belirlenmiştir.

Saccharomyces cerevisiae ve *Candida albicans* mayalarının *E.coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *Bacillus megaterium*, *B. subtilis*, *B. brevis* ve *B. cereus* mikroorganizmalarına karşı antagonistik etki gösterdikleri saptanmıştır (BAGCI and DIGRAK, 1996).

Çizelge 2. Mayaların İndikatör Bakterileri Üzerine Genel İnhibisyon Etkisi (Zon Çapı mm).

Mayalar	<i>S.aureus</i>	<i>E.coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>Y. enterocolitica</i>
<i>S. cerevisiae</i> S ₁	3,20	a	a	a
<i>S. cerevisiae</i> S ₂	7,50	a	a	a
<i>S. cerevisiae</i> S ₃	9,10	a	a	a
<i>S. cerevisiae</i> S ₄	7,70	a	a	a
<i>S. cerevisiae</i> Z ₁	7,70	a	a	a
<i>S. cerevisiae</i> Z ₂	8,60	a	a	a
<i>S. cerevisiae</i> Z ₄	9,30	a	a	a
<i>S. cerevisiae</i> Z ₅	9,30	a	a	a
<i>C. krusei</i> S ₆	10,00	a	a	a
<i>C. krusei</i> S ₇	11,00	a	a	a
<i>C. krusei</i> N ₁	10,60	a	a	a
<i>C. krusei</i> N ₂	11,00	a	a	a
<i>K. apiculata</i> Z ₃	11,00	a	a	a
<i>K. apiculata</i> N ₃	7,80	a	a	a
<i>K. apiculata</i> N ₄	9,30	a	a	a

Shokuhin and GAKKAISHI (1993), yapmış oldukları çalışmada, mayaların (*Saccharomyces cerevisiae*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei*) test mikroorganizmaları üzerinde (*S. aureus*, *B. subtilis*, *B. cereus*, *Yersinia enterocolitica*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *P. fluorescens*) antimikrobiyal aktivitelerinin diğer mikroorganizmalara (fungus, gram pozitif, ve gram negatif bakterilere) göre daha az olduğunu belirlemişlerdir.

Kamboçya çayının başağrıları, hemaroid, damar tıkanıklıkları, metabolik rahatsızlıklar, gut hastalığı, artritler, diyabetler, stress ve kanser gibi hastalıklara iyi geldiği düşünülmektedir. Bu etkilerin Kamboçya çayının antimikrobiyal aktivitesinden kaynaklandığını bildirmişlerdir (GREENWALT et al., 2000; SREERAMULA et al., 2000; STEINKRAUS et al., 1996).

STEINKRAUS ve ark. (1996), Kamboçyanın *Helicobacter pylori*, *E.coli*, *S. aureus* ve *Agrobacterium tumefaciens*'e karşı antimikrobiyal aktivitesini göstermişlerdir.

GREENWALT ve ark. (2000), Kamboçyanın *E.coli*, *S. aureus*, *Salmonella*, *B. cereus* ve *Agrobacterium tumefaciens* 'e karşı karşı antimikrobiyal aktiviteye sahipken *Candida albicans*'ın test edilen Kamboçya örnekleri tarafından inhibe edilmediğini bildirmişlerdir.

Genel olarak sonuçlara bakıldığında *C. krusei*'nin diğer maya türlerine göre daha yüksek inhibisyon etkisi gösterdiği belirlenmiştir.

KAYNAKLAR

- ANONYMOUS. 1983. Tea fungus, In Handbook of indigenous fermented food., K.H. Steinkraus Ed., Marcel Dekker Inc. New York, p. 421.
- BAGCI, E., DIGRAK, M. 1996. Antimicrobial activity of essential oils of some Abies species from Turkey flavour and fragrance. Journal, 11(4) 251-256.
- BECKER, J.M., CALDWELL, G.A., ZACHO, E.A. 1990. Biotechnology, Academic Press, Inc. New York, London, 223p.
- BLANC, P.J. 1996. Characterization of the tea fungus metabolites. Biotechnol. Lett., 18 (2) 139-142.
- CHEN, C., LIU, B.Y. 2000. Changes in major components of tea fungus metabolites during prolonged fermentation. J. Appl. Microbiol. 89: 834-839.

- DEAK, T., BEUCHAT, I.R., 1987, Identification of Foodborne Yeasts, *J. Food Protect.* 50:243-264.
- FRANK, G. 1990. *Kombucha, la boisson au champion de langue vie.* W. Enssthaler Ed., Steyr. Austria.
- GREEMWALT, C.J., STEINKRAUS, K.H., LEDRORD, R.A. 2000. Kombucha, the fermented tea: Microbiology, composition and claimed health effects. *J. Food Protec.*, 63 (7) 976-981.
- LONCAR, E.S., PETROVIC, S.E., MALBASA, R.V., VERAC, R.M. 2000. Biosynthesis of glucuronic acid by means of tea fungus. *Nahrung*, 44: 138-139.
- REINHEIMER, J.A., DEMKOW, M.R., CONDIOTI, M.C. 1990. Inhibition of Coliform bacteria b lactic cultues. *The Aust. J. Dairy Technol.* May: 5-9.
- ROHM, H., LECHNER, F. 1990. Evaluation an reliability of a simplified method for identification of food-borne yeasts. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 1290-1295.
- SANNI, A.I., LÖNNER, C. 1993. Identification of yeasts isolated from Nigerian traditional alcoholic beverages. *Food Microbiol.* 10: 517-523.
- SHOKUHIN, N., GAKKAISHI, K., 1993. Antimicrobial activity of watersoluble products derived from radish mustard oil and identif of on active component therein, *J. Japanese Soc. Food.* 40 (11), 801-806.
- SREERAMULU, G., ZHU, Y., KNOL, W. 2000 Kombucha fermentation and its antimicrobial activity. *J. Agric. Food Chem.*, 48: 2589-2594.