



**FARKLI STARTERLERLE ÜRETİLEN HARDALİYELERİN
KARŞILAŞTIRILMASI: BACK-SLOPPING ve KOMBUCHA**

AYŞENUR PEKCAN

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Prof. Dr. Ömer ÖKSÜZ

2022

T.C.
TEKİRDAĞ NAMIK KEMAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



FARKLI STARTERLERLE ÜRETİLEN HARDALİYELERİN
KARŞILAŞTIRILMASI: BACK-SLOPPING ve KOMBUCHA

AYŞENUR PEKCAN

ORCID: 0000-0001-8000-2986

GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ
Danışman: Prof. Dr. Ömer ÖKSÜZ

OCAK-2022

Her hakkı saklıdır.

ÖZET

FARKLI STARTERLERLE ÜRETİLEN HARDALİYELERİN KARŞILAŞTIRILMASI: BACK-SLOPPING ve KOMBUCHA

Ayşenur PEKCAN

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Prof. Dr. Ömer ÖKSÜZ

Hardaliye, besleyici değeri yüksek bir ürün olan üzüm suyuna hardal tohumu ve vişne yaprağı ilave edilerek laktik asit fermantasyonu yoluyla üretilen geleneksel alkolsüz bir içecektir. Geleneksel hardaliye üretiminde maya faaliyetlerini engelleme ve alkol oluşumunu önlemede hardal tohumu yetersiz kalmakta, arzu edilmeyen etanol oluşumu meydana gelmekte ve standart kalitede hardaliye üretimi yapılamamaktadır. Standart kalitede ve endüstriyel çapta hardaliye üretimi için kimyasal koruyucular kullanılmaktadır. Günümüzde tüketiciler ürün satın alırken kimyasal koruyucu ve katkı içermeyen doğal ürünleri tercih etmektedirler. Bu nedenle tez kapsamında; back-slopping ve kombucha mantarı ilavesi olmak üzere 2 farklı yöntemle hardaliye üretimleri gerçekleştirilmiştir. Farklı starterlerle üretilen hardaliyelerin fermantasyon ve depolama süresince fiziksel, kimyasal ve mikrobiyolojik değişimleri incelenmiştir. Back-slopping hardaliye üretiminde fermantasyonun 7. gününde %5,5 alkol oluşumu gözlemlenirken, kombucha mantarı kullanılarak üretilen hardaliyede alkol oluşumu tespit edilememiştir. Hardaliye örneklerinin L^* , a^* ve b^* değerlerinde üretim süresinde düşüşler gözlemlenmiştir. Kombucha mantarı ile üretilen hardaliyenin laktik asit bakteri sayılarının back-slopping metoduyla üretilen hardaliyeye nazaran daha düşük olduğu görülmüştür. Araştırma sonuçlarına göre; kombucha mantarının sahip olduğu mikroorganizmalar ve bunların simbiyotik birlikteliğiyle gerçekleşen metabolik aktiviteler sayesinde herhangi bir koruyucu kimyasal kullanılmadan doğal yolla fermantasyon gerçekleşmekte, back-slopping hardaliyeye nazaran daha güvenilir hardaliye üretim imkânı sağlanmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Hardaliye¹, Kombucha², Back-Slopping³

ABSTRACT

COMPARISON OF HARDALIYE PRODUCED BY DIFFERENT STARTERS: BACK- SLOPPING AND KOMBUCHA

Ayşenur PEKCAN

Department of Food Engineering

MSc.Thesis

Supervisor: Prof. Dr. Ömer ÖKSÜZ

Hardaliye is a traditional non-alcoholic beverage produced by lactic acid fermentation by adding mustard seeds and cherry leaves to grape juice, which is a product with high nutritional value. Mustard seeds are insufficient in preventing yeast activities and alcohol formation in traditional hardaliye production, undesirable ethanol formation occurs and standard quality hardaliye cannot be produced. Chemical preservatives are used for the production of hardaliye of standard quality and on an industrial scale. Today, consumers prefer natural products that do not contain chemical preservatives and additives when purchasing products. Therefore, within the scope of the thesis; Hardaliye production was carried out with 2 different methods, backslopping and adding kombucha mushrooms. Physical, chemical and microbiological changes of hardaliye produced with different starters were investigated during fermentation and storage. While 5.5% alcohol formation was observed on the 7th day of fermentation in back-slopping hardaliye production, no alcohol formation could be detected in hardaliye produced using kombucha mushrooms. Decreases in the production time were observed in the L^* , a^* ve b^* values of the Hardaliye samples. It was observed that the lactic acid bacteria numbers of hardaliye produced with kombucha mushroom were lower than the hardaliye produced by back-slopping method. According to the results of the research; Thanks to the microorganisms of the kombucha mushroom and the metabolic activities that occur with their symbiotic association, fermentation is provided naturally without the use of any preservative chemicals, compared to backslopping hardaliye, it offers a more reliable production of hardaliye.

Keywords: Hardaliye1, Kombucha2, Back-Slopping3

İÇİNDEKİLER

| | |
|--|-------------|
| ÖZET | i |
| ABSTRACT | ii |
| İÇİNDEKİLER | iii |
| ÇİZELGELER DİZİNİ | v |
| ŞEKİLLER DİZİNİ | vi |
| SİMGELER DİZİNİ | vii |
| KISALTMALAR DİZİNİ | viii |
| TEŞEKKÜR | ix |
| 1. GİRİŞ | 1 |
| 1.1 Literatür Özeti | 2 |
| 1.1.1 Üzümün Bileşimi ve Beslenmedeki Önemi | 4 |
| 1.1.2 Kombucha ve Farklı Substratlarda Kullanımı | 6 |
| 1.1.3 Hardaliye | 11 |
| 1.1.4 Hardaliyedeki Koruyucu Baharat: Hardal Tohumu | 13 |
| 1.1.5 Back-Slopping Yöntemi | 15 |
| 1.2 Çalışmanın Amacı ve Kapsamı | 16 |
| 2. MATERYAL VE YÖNTEM | 16 |
| 2.1 Materyal..... | 16 |
| 2.2 Yöntem | 17 |
| 2.2.1 Back-slopping Metoduyla Geleneksel Hardaliye Üretimi | 17 |
| 2.2.2 Kombucha Mantarı ile Hardaliye Üretimi | 18 |
| 2.2.3 Fiziksel ve Kimyasal Analizler | 20 |
| 2.2.3.1 pH Analizi | 20 |
| 2.2.3.2 Titrasyon Asitliği | 20 |
| 2.2.4 İndirgen Şeker Tayini..... | 20 |
| 2.2.4.1 Alkol Tayini | 21 |
| 2.2.4.2 Renk Ölçümü | 21 |
| 2.2.4.3 Toplam Fenolik Bileşenlerin Tayini | 21 |
| 2.2.5 Reolojik Analizler | 22 |
| 2.2.6 Mikrobiyolojik Analizler | 22 |
| 2.2.6.1 Toplam Aerobik Mezofilik Canlı Bakteri Sayımı | 22 |
| 2.2.6.2 Toplam Maya Sayımı | 22 |
| 2.2.6.3 Laktik Asit Bakteri Sayımı | 23 |

| | |
|--|-----------|
| 2.2.6.4 Laktik Streptokok Sayımı..... | 23 |
| 2.2.7 İstatiksel Analiz | 24 |
| 3. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA | 25 |
| 3.1 Hardaliye Örneklerinin Üretim ve Depolama Boyunca Fiziksel ve Kimyasal Analiz Sonuçları..... | 25 |
| 3.1.1 pH Değerleri..... | 25 |
| 3.1.2 Titrasyon Asitliği Değerleri | 27 |
| 3.1.3 İndirgen Şeker Miktarı | 28 |
| 3.1.4 Alkol Miktarı..... | 30 |
| 3.1.5 Fenolik Madde Miktarı..... | 32 |
| 3.1.6 Hardaliye Örneklerinin Renk Değerleri..... | 34 |
| 3.1.6.1 <i>L*</i> değerleri..... | 35 |
| 3.1.6.2 <i>a*</i> değerleri..... | 36 |
| 3.1.6.3 <i>b*</i> değerleri..... | 36 |
| 3.1.7 Reolojik Ölçümler..... | 37 |
| 3.2 Hardaliye Örneklerinin Üretim ve Depolama Boyunca Mikrobiyolojik Analiz Sonuçları..... | 38 |
| 3.2.1 Toplam Aerobik Mezofilik Canlı Bakteri (TMAB) Sayıları..... | 38 |
| 3.2.2 Maya Sayıları | 40 |
| 3.2.3 Laktik Asit Bakteri (LAB) Sayıları | 43 |
| 3.2.3.1 <i>Lactobacillus spp.</i> sayıları | 43 |
| 3.2.3.2 Laktik streptokokların sayıları..... | 44 |
| 4. SONUÇ VE ÖNERİLER..... | 46 |
| KAYNAKLAR | 50 |
| ÖZGEÇMİŞ | 58 |

ÇİZELGELER DİZİNİ

| | |
|---|----|
| Çizelge 2.1. Üzüm posası ununun besin değerleri | 5 |
| Çizelge 2.2. Kombucha mantarının mikrobiyal kompozisyonu..... | 7 |
| Çizelge 2.3. Üzüm kullanılarak üretilen meşrubatlarda toplam fenolik madde miktarı | 12 |
| Çizelge 3.1. Hardaliye örneklerinin üretim ve depolama aşamalarındaki pH değerleri değişimi | 25 |
| Çizelge 3.2. Hardaliye örneklerinin üretim ve depolama süresince tartarik asit cinsinden toplam asitlik miktarlarındaki değişim (g/L) | 27 |
| Çizelge 3.3. Hardaliye örneklerinin üretim ve depolama aşamalarındaki indirgen şeker miktarları (%) | 29 |
| Çizelge 3.4. Hardaliye örneklerinin üretim ve depolama aşamalarındaki alkol miktarları (%) | 30 |
| Çizelge 3.5. Hardaliye örneklerinin üretim ve depolama aşamalarındaki fenolik madde miktarları (mg GAE/L)..... | 32 |
| Çizelge 3.6. Hardaliye örneklerinin üretim ve depolama süresince renk değerleri değişimi .. | 34 |
| Çizelge 3.7. Hardaliye örneklerinin üretim ve depolama boyunca viskozite değişimi (Pa.s) . | 38 |
| Çizelge 3.8. Hardaliye örneklerinin üretim ve depolama süresince toplam mezofilik aerobik bakteri (TMAB) sayılarındaki (log kob/ml) değişim | 39 |
| Çizelge 3.9. Hardaliye örneklerinin üretim ve depolama süresince toplam maya sayılarındaki (log kob/ml) değişim | 40 |
| Çizelge 3.10. Hardaliye örneklerinin üretim ve depolama süresince <i>Lactobacillus</i> spp. sayılarındaki (log kob/ml) değişim..... | 43 |
| Çizelge 3.11. Hardaliye örneklerinin üretim ve depolama süresince laktik streptokokların sayılarındaki (log kob/ml) değişim..... | 45 |

ŞEKİLLER DİZİNİ

| | |
|---|----|
| Şekil 1.3. Kombuchada gerçekleşen metabolik aktiviteler [46]..... | 9 |
| Şekil 2.1. Farklı metotlarla hardaliye üretimi..... | 19 |
| Şekil 3.1. Hardaliye örneklerinin üretim ve depolama aşamalarındaki pH değerleri değişimi | 26 |
| Şekil 3.2. Hardaliye örneklerinin üretim ve depolama süresince toplam asitlik miktarlarındaki değişim..... | 28 |
| Şekil 3.3. Üretim ve depolama süresince hardaliyelerin indirgen şeker miktarında meydana gelen değişim..... | 29 |
| Şekil 3.4. BH örneğinin indirgen şeker ve alkol miktarlarındaki değişim..... | 31 |
| Şekil 3.5. Hardaliye örneklerinde üretim ve depolama süresince toplam fenolik madde miktarındaki değişim..... | 33 |
| Şekil 3.6. Hardaliye örneklerinin üretim ve depolama süresince renk (L*) değişimi..... | 35 |
| Şekil 3.7. Hardaliye örneklerinin üretim ve depolama süresince renk (a*) değişimi..... | 36 |
| Şekil 3.8. Hardaliye örneklerinin üretim ve depolama süresince renk (b*) değişimi..... | 37 |
| Şekil 3.9. Hardaliye örneklerinde üretim ve depolama süresince pH'daki değişimin TMAB sayısına etkisi..... | 40 |
| Şekil 3.10. Hardaliye örneklerinin üretim ve depolama süresince toplam maya sayılarındaki değişim..... | 41 |
| Şekil 3.11. BH örneğinin üretim-depolama süresince indirgen şeker ve etil alkol miktarları, maya sayılarındaki değişim..... | 42 |
| Şekil 3.12. KH örneğinin fermantasyon-depolama süresince indirgen şeker ve etil alkol miktarları, maya sayılarındaki değişim..... | 43 |

SİMGELER DİZİNİ

| | |
|-----|------------------|
| g | Gram |
| L | Litre |
| mg | Miligram |
| ml | Mililitre |
| MPa | Megapascal |
| Pa | Pascal |
| °C | Santigrat derece |



KISALTMALAR DİZİNİ

| | |
|-------|---|
| KOB | Koloni Oluşturan Birim |
| LAB | Laktik Asit Bakterisi |
| MRS | Man Ragosa Sharpe |
| PDA | Patato Dextrose Agar |
| PCA | Plate Count Agar |
| SCOPY | Symbiotic Culture of Bacteria and Yeast |
| TMAB | Toplam Mezofilik Aerobik Bakteri Sayısı |



TEŞEKKÜR

Yüksek lisans öğrenimim süresince mesleki bilgi ve tecrübelerini benden esirgemeyen, insani ve ahlaki değerleri ile örnek aldığım Namık Kemal Üniversitesi öğretim üyesi danışman hocam sayın Prof. Dr. Ömer ÖKSÜZ, hardaliye ile ilgili yapmış olduğu bilimsel araştırmaları ve tecrübesiyle bana yol gösteren sayın Dr. Öğr. Üyesi Fatma COŞKUN, sonuçların istatistiksel olarak yorumlanmasında göstermiş olduğu ilgi ve alakadan dolayı sayın Doç. Dr. İbrahim PALABIYIK hocalarıma bu süreçte göstermiş oldukları hoşgörü ve sabırdan dolayı saygılarımı ve teşekkürlerimi sunarım.

Bugünlere gelmemde büyük emek sahibi sevgili Ailem ve bu uzun süreçte desteğini esirgemeyen sevgili Eőim'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Ayşenur PEKCAN

Gıda Mühendisi

1. GİRİŞ

Dünyada gün geçtikçe insan nüfusunun artışı ile birlikte beslenmede kullanılan doğal kaynaklar sınırlı kalmaktadır. Gelişen teknolojinin yardımı ile sınırlı olan doğal kaynakları daha fazla kişinin yararına sunabilmek için çeşitli çalışmalar yürütülmektedir. Gıdaların muhafaza sürelerini uzatma isteğinin temelinde tüm meyve ve sebze türlerinin her mevsimde ve her bölgede yetiştirilememesi yatmaktadır [1]. Fermantasyonla gıdaların muhafazası; insanların gıdaları saklama bilincine eriştikleri dönemden bu yana uyguladıkları bir yöntemdir [2]. Sezonunda bol miktarda hasat edilen gıdaların fermantasyonla muhafazasının 4000 yıl önceye dayandığı bilinmektedir [3].

Sebzelerin fermantasyon yoluyla korunması, kayıtlı tarihten önce başlamıştır. Konserve ve dondurma gibi muhafaza yöntemleri bulunmadan önce salamura ve fermantasyon başlıca gıda muhafaza yöntemleriydi. Salamura ve fermantasyon, günümüzde doğu ve az gelişmiş bölgelerde en fazla kullanılan gıda muhafaza yöntemi olmasının yanı sıra modern muhafaza yöntemlerine sahip batıda ve son derece gelişmiş ülkelerde sebzeleri korumak için önemli bir yöntem olmaya devam etmektedir. Bunun nedenleri arasında: (a) ürünlere istenilen organoleptik özellik kazandırması, (b) meyve ve sebzeler için işleme sezonunu uzatması, (c) modern, enerjiye duyarlı dünyamızda nispeten az mekanik enerji girdisi gerektirmesi sayılabilir [4]. Laktik asit fermantasyonu sonucu üretilen laktik asitin meyve ve sebzeler üzerinde koruyucu ve dayanıklılığı artırıcı etkiye sahip olduğu bilinmektedir [5].

Son zamanlarda fonksiyonel gıda tüketimine olan ilgi, yeni gıda ürünlerinin tasarlanmasına ve çeşitli gıdaların fonksiyonel özelliklerinin araştırılmasına olanak sağlamıştır. Bu bağlamda fermente gıdalar da önemli bir yere sahiptir. Özellikle probiyotik ve bağırsak fonksiyonları üzerine gösterdikleri etkileri araştırılıp netlik kazandıkça, tüketimi hızla artmıştır [6]. Fermantasyon sayesinde hammaddenin sindirilebilirliğinin arttığı ve hammaddeye nazaran fermente gıdanın vitamin, aminoasit miktarlarında artış olduğu saptanmıştır [7]. Ayrıca çeşitli gıdaların antioksidan özelliğinin fermantasyonla arttığı bildirilmiştir [6]. Fermantasyon laktoz intoleransı olan bireyler için ayrıca bir öneme sahiptir. Yapılan araştırmalar sonucunda laktoz intoleransı olan bireylere laktozun laktik asit bakterileri tarafından parçalandığı fermente süt ve süt ürünlerini tüketmeleri tavsiye edilmiştir [7].

Üzüm, taze veya kuru olarak tüketilmesinin yanı sıra üzüm suyu, şarap, sirke, pekmez, hardaliye vb. ürünlere işlenerek de tüketilmektedir [8]. Bunların arasında yer alan hardaliye,

üzüm suyundan üretilen Trakya Yöresine ait geleneksel bir içecektir. Koyu renkli ve kokulu üzümlerin hardal tohumu ve vişne yaprağı ile laktik asit fermantasyonu sonucu üretilen alkolsüz, buruk, karakteristik bir içecektir [9]. Hardaliye, besleyici değeri yüksek bir ürün olan üzüm suyundan üretilmesi ve fermente bir içecek olmasından dolayı büyük önem taşımaktadır [2].

Günümüze kadar hardaliye üretiminde, gıdaların fermantasyonunda tercih edilen iki ana yöntem ile üretim yapılmıştır. Birinci fermantasyon yöntemi “yabani femantasyon” veya “kendiliğinden fermantasyon” dur. Geleneksel hardaliye üretimi olarak tanımlanan bu yöntemde, hammadde olarak kullanılan üzüm suyu, hardal tohumu ve vişne yaprağında tesadüfen bulunan mikroorganizmaların gerçekleştirdiği fermantasyonla üretim yapılmaktadır. İkinci fermantasyon yönteminde ise önceden fermente edilmiş partiden küçük bir miktar alınıp fermente edilecek gıdaya eklenerek gerçekleştirilen back-slopping denilen yöntem kullanılmaktadır [10]. Araştırmamızda hardaliye fermantasyonu için; (a) back-slopping yöntemine göre önceden fermente edilmiş hardaliyeden bir miktar alınarak ve (b) kombucha mantarı ilave edilerek hardaliye üretimi yapılmıştır. Bu iki üretimin hardaliyenin mikrobiyolojik, fiziksel ve kimyasal kalite özelliklerini nasıl etkileyeceği ortaya konulmaya çalışılmıştır.

1.1 Literatür Özeti

Fermantasyon; hammaddenin mikroflorasında doğal olarak bulunun mikroorganizmalar tarafından veya dışarıdan ilave edilen mikroorganizma ve onun enzimleri ile gerçekleşen bir biyokimyasal reaksiyondur [11]. İlk defa 1595 yılında Libavius fermantasyon ile kokuşmanın ayrı şeyler olduğunu belirtmiştir [12]. Fermantasyon sırasında oluşan organik asitler, etanol ve bakteriyosinler gibi antimikrobiyal metabolitler, fermantasyon ortamına patojenik mikroorganizmaların kontaminasyon riskini azalttığı için fermantasyon bir muhafaza yöntemi olarak tercih edilmiştir [10]. Fermantasyon gıdanın muhafazasında kullanılan en ekonomik ve en eski yöntemlerdendir [13, 14]. Yapılan ilk fermantasyon yöntemlerinin başarısı veya başarısızlığı çoğu zaman rastlantısal olmuştur ve sonuçları insanlar tarafından daima doğa üstü, içinde gizlerin saklı olduğu bir şeylerle bağdaştırılmıştır. İnsanlar, fermantasyon sırasında mikroorganizmaların rol aldığı biyolojik olayları önce bireysel tecrübe etmiş daha sonra bu buluşları buldukları toplumların genel kültürlerine yansımıştır. Fermantasyonun keşfinden önce yaşayan insanların saklanan meyve sularını içtiklerinde keyif duygusu almalarıyla başlayan bu süreç, daha sonraları gıdaları toprak ve ağaç kaplarda, meyve kabuklarında,

tulumlarda fermente etmeleriyle devam etmiştir. Günümüzde hala kullanılmakta olan bu teknikler ilk fermantasyon teknikleridir [12].

Fermente gıdalar dünya çapında sağlık üzerine olumlu etkileri ile bilinmektedirler. Bazı fermente gıdaların üretiminde kullanılan hammaddelerin fermantasyon sonrası sindirilebilirliğinin kolaylaştığı, hammaddeye nazaran vitamin içeriğinde ve aminoasit miktarında artış olduğu gözlemlenmiştir. Fermantasyon ayrıca zeytin gibi bazı gıdaların acı fenolik bileşenlerini ortadan kaldırmak ve organoleptik özelliklerini geliştirmek için de tercih edilmektedir [10].

Dünyadaki hammadde potansiyelinin sınırsız olmadığı son yüzyılda yaşanan olaylarla tecrübelenilmiştir ve mikroorganizmalarda var olan kapasitenin yeni madde sentezinde kullanılabileceği öne sürülmüştür. Fermantasyonla mikroorganizmaların kitleler halinde üretilerek beslenme sorununa, protein yetersizliğine bir çözüm olarak görülmektedir. [12].

Bakteri ve mayalar ağırlıklarının yarısından fazla protein içermektedir. Aynı zamanda insan ve hayvan gibi protein kaynaklarına ihtiyaç duymadan, şeker ve amonyağı kullanarak protein üretebilmektedirler. İyi bir sığırın kendi ağırlığı kadar proteini sentezleyebilmesi için çayırdaki 6-8 haftaya ihtiyaç duyduğu, buna karşılık optimal koşullarda bir fermantörde maya biyokütlesinin iki katına yaklaşık her 2 saatte bir çıkabileceği saptanmıştır [12].

Gıdaların fermantasyonunda iki ana fermantasyon yöntemi vardır. Birincisi fermantasyonun keşfedildiği dönemde de olduğu gibi hammaddenin doğal yapısında veya işlenen ortamda bulunan mikroorganizmalarla dışarıdan müdahale olmadan kendiliğinden gerçekleşen spontane fermantasyondur. Spontane fermantasyona lahana turşusu, kimchi ve bazı fermente soya ürünleri örnek verilebilir. Bir diğer fermantasyon yöntemi de bilinen bir başlangıç kültürünün hammaddeye eklenmesi ile kültüre bağlı fermantasyondur. Bu yöntemde kefir, kombucha ve natto gibi fermente ürünler örnek verilebilir [10, 15]. Kültüre bağlı fermantasyonun bir diğer yolu da back-slopping yöntemidir. Önceden fermente edilmiş gıdadan küçük bir miktar alınarak ham maddeye eklenmesi ile fermantasyon başlatılır. Örneğin; ekşi mayalı ekmek, bira, çeşitli peynirler, natto, tempeh gibi fermente ürünler back-slopping yöntemi ile üretilmektedir [10, 16].

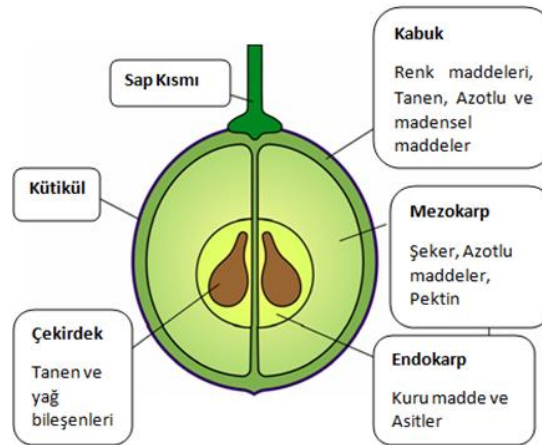
Fermente gıdalar hemen hemen tüm kültürlerde üretilip tüketilmektedir. Batıda son yıllarda fermente gıdaların insan sağlığına olan yararlı etkileri araştırılıp olumlu sonuçlar ortaya kondukça, fermente gıdara olan ilgi giderek artmıştır [10].

1.1.1 Üzümün Bileşimi ve Beslenmedeki Önemi

Üzüm dünyadaki en yaygın kültür bitkilerinden biridir. Üzüm, çoğaltılma yöntemlerinin kolaylığı, yetişeceği iklim ve toprak yapısı yönünden çok seçici olmaması, muhafaza yöntemlerinin çeşitliliği açısından dünyanın birçok bölgesinde yetiştirilmekte ve üretimi denetlenmektedir. Türkiye coğrafi konumu sayesinde dünyada önemli tarımsal ürünlerden birisi olan üzümün anavatanıdır. Türkiye’de üzüm üretimi, TÜİK 2019 yılı verilerine göre 4,1 milyon ton olup bu üretimin 2 milyon 50 bin tonu sofralık, 1 milyon 599 bin tonu kurutmalık (369 bin tonu çekirdekli, 1.230 bin tonu çekirdeksiz) ve 451 bin tonu şaraplık-şıralık olarak değerlendirilmiştir. 2020 yılı üzüm üretimi bir önceki yıla göre %2,7 oranında artarak 4,2 milyon ton olarak açıklanmıştır [17].

Üzüm, yüksek şeker içeriğinden dolayı, kalori değeri yüksek bir besin maddesidir. Ayrıca, mineral maddelerden kalsiyum, potasyum, sodyum ve demir yönünden zengin olduğu gibi, bazı vitaminler (A, B1, B2, Niasin ve C vitaminleri) yönünden de önemli bir kaynak olarak kabul edilmektedir [18]. Üzümün bileşimi üzerine başta üzüm çeşidi olmak üzere toprak ve iklim koşulları, uygulanan teknik, kültürel işlemler ve olgunluk derecesi gibi faktörler etkilidir. Genel olarak üzümlerin bileşiminde su, şekerler, organik asitler, fenol bileşikler, pektik maddeler, aroma maddeleri, azotlu maddeler, enzimler, vitaminler ve mineraller bulunur [19, 20].

Üzüm tanesinin kabuk kısmında çoğunluklu olarak renk maddeleri, tanen, azotlu ve madensel maddeler bulunur. Kabuğun altındaki etli kısımda şeker, azotlu maddeler ve pektin bulunurken, çekirdeğe yakın etli kısımda kuru madde ile asit bulunur. Üzüm çekirdeğinde ise tanen ve yağ mevcuttur [21] (Şekil 2.1).



Şekil 1. 2. Üzüm tanesinin kesiti (21)

Üzüm tanesindeki organik asitlerin %90'ından fazlasını tartarik asit ve malik asit, %5-10'unu sitrik asit oluşturur. Bu oranlarda üzüm tanesinin olgunluk düzeyi büyük öneme sahiptir [22]. Üzümlerin olgunlaşması ile pH'da artış gözlemlenir. Asitlik ve pH pigment oluşumunu etkiler. Kırmızı ve göz alıcı renkli üzüm çeşitlerinde genellikle asit oranı yüksektir. Fermantasyon açısından da şıranın pH'sı önemlidir. Olgunlaşmış üzüm şırasının pH değerleri 3-4 arası değişmektedir [18].

Üzümde meyve suyu randımanı %70-75, çözünen kuru madde %14-21, çözünmeyen kuru madde %1,2-2,0, toplam asitlik %0,4-1,4 arasında değişir [23]. Çizelge 2.1'de üzüm posası ununun besin değerleri verilmiştir [24].

Çizelge 1.1. Üzüm posası ununun besin değerleri

| | |
|------------------------------------|-----------------|
| Fizikokimyasal Parametreler | 100 gram |
| Karbonhidrat | 29,2 g |
| Protein | 8,49 g |
| Lipitler | 8,16 g |
| Fizikokimyasal Parametreler | 100 gram |
| Pektin | 3,92 g |
| Fruktoz | 8,91 g |
| Glikoz | 7,95 g |
| Toplam Diyet Lifi | 46,17 g |
| Toplam Enerji | 224 Kcal |
| Biyoaktif Bileşikler | |
| Vitamin C (askorbik asit) | 26,25 mg |
| Total antosiyanin | 131 mg |
| Çözünür diyet lifi | 9,76 g |
| Mineral Kompozisyon | |
| Demir | 18,08 mg |
| Potasyum | 1,40 mg |
| Kalsiyum | 0,44 mg |
| Magnezyum | 0,13 mg |
| Çinko | 0,98 mg |
| Manganez | 0,817 mg |
| Sülfür | 0,089 mg |

Besleyici değeri oldukça yüksek ve insan sağlığı açısından büyük öneme sahip olan üzümler taze olarak tüketilebildiği gibi, farklı işlemlerden geçirildikten sonra uzun süre muhafaza etmek için kurutulularak ya da üzüm suyu, şarap, sirke, pekmez, hardaliye vb. fermente ürünlere işlenerek de tüketilmektedir [8]. Fermantasyonla üzümün besleyicilik değeri arttırılabilir.

1.1.2 Kombucha ve Farklı Substratlarda Kullanımı

Kombucha; maya ve bakterilerin simbiyotik birlikteliği sonucu meydana gelen selülozik film katmanının şekerli çayla fermente edilmesi ile oluşan asidik rahatlatıcı bir içecektir. Maya ve bakterilerin oluşturduğu selülozik katman SCOBY (Symbiotic Culture of Bacteria and Yeast) olarak adlandırılmaktadır [28]. Başlangıç kültürü olan SCOBY fermente edilecek hammaddeye ilave edilerek fermantasyon başlatılır. Kombucha adı Japonca'da "Kombu" deniz yosunu olan *Laminaria japonica*'yı tanımlamakta ve "Cha" çay anlamına gelmektedir [29].

Farklı kaynaklarda da "Kombu" içeceğinin adının Dr. Kombu'nun adından geldiği öne sürülmüştür [30]. Kombu çayının ilk olarak M.Ö. 221'de Çin, Kore ve Japonya gibi uzak doğu ülkelerinde enerji verici, detoksifiye edici olarak tercih edildiği ve ilk kez Dr. Kombu tarafından Japon İmparatoru'nun sindirim rahatsızlığını düzenlemek için Kore'den Japonya'ya götürüldüğü, oradan da dünyaya yayıldığı varsayılmaktadır [31]. Kombu çayının botanik adlandırılması 1965 yılında Lindau tarafından *Medusomyces gisevii* olarak yapılmıştır [32].

Ülkemizde tüketimi günden güne artan Kombu çayının dünya genelinde 3,5 milyon ton üretim miktarına sahip olduğu bildirilmiştir [33]. Farklı kaynaklarda kökeni Rusya'ya dayandırılan kombucha Rusya'da "kargasok" olarak adlandırılmaktadır. Yine farklı toplumlarda kombucha; red tea fungus, haipao manchuria mushroom, chainii kvass, kocha kinoko gibi farklı adlarla isimlendirilmiştir [34].

Kombucha mantarının mikrobiyal kompozisyonu özet olarak Çizelge 2.2'de verilmiştir. Bakteri ve mayaların simbiyotik birlikteliğiyle oluşan selülozik film tabakasında *Acetobacteraceae* familyasına ait gram negatif aerob basiller (*Acetobacter xylinum*, *A. xylinoides*, *A. aceti*, *A. pasteurianus*, *Bacterium gluconicum* ve *Gluconobacter oxydans*), mayalar (*Saccharomyces cerevisiae*, *S. ludwigii*, *Zygosaccharomyces bailii*, *Z. rouxii*, *Z. kombuchaensis sp.nov.*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Torulospira delbrueckii*, *Brettanomyces bruxellensis*, *B. lambicus*, *B. custerii*, *Candida krusei*, *C. albicans*, *Kluyveromyces africanus*, *Pichia membranaefaciens*, *Kloeckera apiculata*, *Torulopsis sp.*, *Dekkera sp.*) ve laktik asit bakterilerinin (*Lactobacillus sp.*, *Lactococcus sp.*, *Leuconostoc sp.*, *Bifidobacterium sp.*) simbiyotik birlikteliği tespit edilmiştir [31, 34, 35, 36].

Çizelge 1.2. Kombucha mantarının mikrobiyal kompozisyonu

| Bakteri | Fungus | Çalışma | |
|---|--|--|-----------------------|
| <i>Acetobacter sp.</i> | <i>Zygosaccharomyces</i> <i>Candida sp.</i> | sp., Hesseltine, [32] | |
| <i>Acetobacter aceti</i> , <i>Acetobacter pasteurianus</i> | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Zygosaccharomyces bailii</i> , <i>Brettanomyces bruxellensis</i> | Liu vd., [37] | |
| - | <i>Saccharomyces</i> , <i>Zygosaccharomyces</i> , <i>Brettanomyces</i> | Mayser vd., [38] | |
| <i>Komagataeibacter</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Shewanella</i> , <i>Burkholderia</i> | <i>Gluconobacter</i> , <i>Herbaspirillum</i> , <i>Halomonas</i> | <i>Brettanomyces/Dekkera</i> , <i>Pichia</i> , <i>Candida</i> , <i>Yarrowia</i> | Reva vd., [39] |
| <i>Gluconacetobacter</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Leuconostoc</i> , <i>Thermus</i> , <i>Ruminococcaceae Incertae Sedis</i> , <i>Propionibacterium</i> , <i>Enterococcus</i> | <i>Acetobacter</i> , <i>Lactococcus</i> , <i>Bifidobacterium</i> , <i>Allobaculum</i> | <i>Dekkera</i> , <i>Zygosaccharomyces</i> , <i>Davidiella</i> , <i>Wallemia</i> , <i>Lachancea</i> , <i>Leucosporidiella</i> , <i>Kluyveromyces</i> , <i>Naumovozyma</i> , <i>Meyerozyma</i> , <i>Saccharomyces</i> , <i>Hanseniaspora</i> | Marsh vd., [14] |
| <i>Komagataeibacter</i> , <i>Lyngbya</i> , <i>Collinsella</i> , <i>Weissella</i> , <i>Lactobacillus</i> | <i>Gluconobacter</i> , <i>Bifidobacterium</i> , <i>Enterobacter</i> | <i>Candida</i> , <i>Lachancea</i> , <i>Kluyveromyces</i> , <i>Debaryomyces</i> , <i>Pichia</i> , <i>Waitea</i> , <i>Eremothecium</i> , <i>Meyerozyma</i> , <i>Zygowilliopsis</i> , <i>Saccharomyces</i> , <i>Saccharomycopsis</i> , <i>Hanseniaspora</i> , <i>Kazachstania</i> , <i>Starmera</i> , <i>Merimbla</i> , <i>Sporopachydermia</i> , <i>Sugiyamaella</i> | Chakravorty vd., [40] |
| <i>Gluconacetobacter</i> , <i>Leuconostoc</i> , <i>Rothia</i> , <i>Gluconobacter</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Pantoea/Enterobacter</i> , <i>Pseudochrobactrum</i> | <i>Kluyvera</i> , <i>Hydrogenophilus</i> , <i>Oenococcus</i> , <i>Enterobacter</i> , <i>Cellulosimicrobium</i> | <i>Hanseniaspora</i> , <i>Saccharomyces</i> , <i>Zygoascus</i> , <i>Torulaspora</i> , <i>Zygotorulaspora</i> , <i>Aspergillus</i> , <i>Kregervanrija</i> , <i>Wickerhamomyces</i> , <i>Clavispora</i> , <i>Pichia</i> | Coton vd., [41] |

Kombucha fermantasyonunda bulunan bakteriler esas olarak asetik asit, glukonik asit ve selüloz üretmektedirler [42]. Asetik asit bakterileri (*Acetobacter xylinum*) fermantasyon sırasında, selülozik yapıda- kalın “zooglea biyofilm” tabakası oluşturarak simbiyotik maya ve bakteri topluluğunun bir arada kalmasını sağlar. Bakteri ve mayaların oluşturduğu simbiyoz konsorsiyum geliştikçe oluşan selüloz yapı, mikroorganizmaların gelişimi için gerekli oksijen ihtiyacını karşılamanın yanı sıra mikroorganizmaları UV ışınlarından da korumaktadır [43, 30, 44, 45].

Kombucha maya kolonisinde *Brettanomyces*, *Zygosaccharomyces* ve *Saccharomyces* en çok rastlanan maya cinsleridir. Maya kompozisyonları oldukça değişkenlik göstermektedir [42]. Kombucha maya kompozisyonundaki çeşitliliğin; kültürler arasındaki çapraz kontaminasyondan, coğrafi konum, iklimsel ve kültürel şartlardan ileri gelebileceği belirtilmiştir [28].

Kombucha fermantasyonu sırasında mayalar, invertaz enzimleriyle sakkarozu kullanarak glukoz ve fruktoza metabolize ederler. Ortamdaki glukoz *Acetobacter* cinsi bakteriler tarafından glukonik aside dönüştürülürken, fruktoz mayalar tarafından etanole dönüştürülmektedir [46]. Mayalar tarafından üretilen etil alkol yine *Acetobacter* cinsi bakteriler tarafından alkol ve aldehit dehidrogenaz enzimleriyle asetik aside dönüştürülmektedir. *Gluconobacter* ve *Acetobacter*’ler glukonik asit üretimi için glikozu, asetik asit üretimi için fruktoz ve etanolü kullanmaktadırlar [30,44, 47, 48]. Kombuchadaki bu metabolik aktiviteler Şekil 2.2’de özetlenmiştir. Fermantasyon sırasında mayaların ve bakterilerin simbiyotik birlikteliği sonucu ortaya çıkan etanol ve asetik asitin patojenik bakterilere karşı antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu bildirilmiştir [37]. Böylelikle kombuchanın sahip olduğu mikroorganizmalar ve bunların simbiyotik birlikteliği sonucu oluşan fermantasyon ortamının asitliği sayesinde, herhangi bir koruyucu kimyasala ihtiyaç duymadan doğal yolla fermantasyon gerçekleşmektedir.



Şekil 1.1. Kombuchada gerçekleşen metabolik aktiviteler [46]

Kombuchada bulunan mikroorganizmalar çay yapraklarında bağlı formda bulunan fenolik bileşenleri fermantasyon sırasında kullanarak ürünün duyu özelliklerine katkıda bulunan serbest fenolikleri oluşturmaktadırlar. Fermantasyon sırasında insan sağlığı açısından oldukça faydalı vitaminler ve çeşitli organik asitler oluşmaktadır. Oluşan bu metabolitlerin çeşitliliğinde; simbiyotik kültürde bulunan mikroorganizmaların çeşitliliği, kullanılan şeker ve çay yaprağının çeşidi, fermantasyon sıcaklığı ve süresi, üretim sırasındaki hijyenik koşullar, iklim ve coğrafi koşullar önemli faktörlerdir [49, 30, 44, 50, 51].

Dünya çapında popüler bir içecek olan kombuchanın şimdiye kadar bildirilen yararlı etkileri şunlardır;

- Kombuchada bulunan asetik asit bakterilerinin ürettiği asetik asidin gram pozitif ve gram negatif mikroorganizmalarının geniş bir spektrumuna karşı antimikrobiyal aktiviteye sahiptir [28].
- Kombucha fermantasyonu sırasında mayalar ve Acetobacter tarafından üretilen etanol ve asetik asit patojenik mikroorganizmalara karşı antibakteriyel aktiviteye sahip olup, kombucha mantarını olası kontaminasyona karşı korumaktadır [52].
- Kombucha içeceğinde tespit edilen ve önceleri likenlerde tanımlanmış olan usnik asidin bakteri ve virüslerin aktivasyonunu önlediği öne sürülmüştür [53].
- Kombuchanın antimikrobiyal özelliği ile deri hasarlarında da etkili olabileceği öngörülmüştür [52].
- 1951'de Onkoloji Araştırma Merkezi ve Moskova'daki Rusya Bilimler Akademisi tarafından yapılan çalışma, kombuchanın her gün içilmesinin kansere karşı direnç sağladığını ortaya koymuştur [54].

- Siyah ay ile yapılan kombuchada önemli flavonoidlerden biri olan myricetin bulunmaktadır. Myricetin'nin insülini taklit etmesi sebebiyle siyah çay ile yapılan kombuchayı düzenli tüketen grupların kandaki glukoz düzeyleri önemli farklılık göstermiştir [55].
- Gut, romatizma, böbrek taşları vücutta toksinlerin birikmesi sonucu ortaya çıkan hastalıklardır. Ağır metaller ve toksitlerin vücuttan atılmasında glukuronik asit büyük öneme sahiptir. Vücuttaki toksinler glukuronidasyon sonrası böbrekler aracılığıyla vücuttan atılabilmektedir. Kombucha ieinin detoksifiye edici özelliği de glukuronik asite bağlanmakta olup, toksik etkiden dolayı oluşan gut, böbrek taşı, romatizma gibi hastalıklara iyi geldiği ne sürülmektedir [52,56].

Gelişen iletişim ağları ve kombucha ile ilgili sağlığa yararlı etkilerinin rapor edilmesi fermente aylara ilgi ve merakı giderek arttırmıştır [45]. Kombuchaya olan ilginin artmasıyla birlikte sağlığa yararlı etkilerinin yanı sıra toksik etkileri de merak edilmekte ve araştırılmaktadır. Yapılan çalışmalarda kombucha tüketimi sonrası kusma, baş ağrısı, baş dönmesi ve alerjik reaksiyonlar grlmştir. Fermantasyon sırasında seramik kapların tercih edilmesinden dolayı kurşun zehirlenmesi vakaları da rapor edilmiştir. Ayrıca hamile ve emziren annelerin, HIV pozitif bireylerin ve çocukların bu ürünün tüketiminde sıkıntı yaşayabileceği ne srlmştir [30].

Son yıllarda popülerlik kazanan kombucha ieinde; farklı substratlar ve karbon kaynakları kullanılarak çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Bunun yanı sıra bazı çalışmalarda da ideal fermantasyon süresi belirlenerek maksimum yarar sağlamak amaçlanmıştır. Kombucha fermantasyonu sırasında yararlı mikroorganizma sayıları; farklı substratlarda ve farklı fermantasyon sürelerinde ortam asitliğine bağlı olarak değişim göstermiştir [57].

Geçmiş yıllarda yapılan araştırmalar bazı bitkisel çayların kombucha fermantasyonu için alternatif bir nitrojen kaynağı olamayacağını vurgulamış olsa da son yıllarda yapılan araştırmalar aksini göstermektedir. Ekinezya, kış kokulu çaylar gibi bitkisel çaylar ile melisa, dut, yasemin ve nane kullanılarak başarılı bir şekilde kombucha üretimi gerçekleştirilmiştir [58, 59,51].

Kudüs enginar yumrusu ile gerçekleştirilen kombucha fermantasyonunda elde edilen ürünün; sakkaroz içeren kombucha fermantasyonundan elde edilen ürünle hemen hemen aynı metabolitleri içerdiği ve aynı zamanda D-glikoz ve D-fruktoz içeriğinin düşük olması sebebiyle diyetetik ürün olarak kullanılabileceği ne srlmştir [60].

Günümüzde bu yeni substratların bazılarının, orijinal kombucha çayına kıyasla fermantasyonu daha iyi uyardığı ve daha kısa sürede tamamladığı belirtilmiştir [61].

Kayisoglu ve Coşkun [62] kombucha ile ilgili çalışmalarında; siyah çay, yeşil çay, ihlamur, adaçayı ve nane ekstraktlarıyla hazırlanan kombuchalar 14 gün fermente edilmiştir. Fermantasyonun başlangıcında ve sonunda fenolik bileşen analizleri yapılmıştır. Aynı zamanda fermantasyon sonunda ürünlere duyuusal analiz yapılmıştır. Nane çayı hariç tüm çayların toplam fenolik madde miktarında azalma gözlemlenmiştir. Analizler sonucunda nane çayı duyuusal analizlerde en yüksek puanı almıştır.

Kombucha ile ilgili yapılan bir çalışmada; kombuchada bulunan bakteri ve maya kolonisi (SCOBY) ile polen fermantasyonu gerçekleştirilmiştir. Fermantasyon sırasında polen duvarında bulunan silikonun çözünmesi nedeniyle polen duvarı zayıflayarak polen içerisinden kombucha sıvısına besin salınımı arttığı öne sürülmüştür. Ayrıca fermantasyon sırasında polifenollerin arttığı, daha iyi LAB gelişimi olduğu öne sürülmüştür. Kombucha fermantasyonuna polen eklenmesiyle kombuchanın insan sağlığına faydalarının arttırıldığı öne sürülmüştür [63].

1.1.3 Hardaliye

Hardaliye üzüm suyunu uzun süre muhafaza etmek amacıyla yaklaşık 500 yıldır Trakya bölgesinde üretilen geleneksel bir içecektir. Osmanlı zamanında bölgede bulunan Müslümanlar tarafından bulunduğu ve tüketildiği öne sürülmektedir. Trakya bölgesinde genellikle Kırklareli ve Edirne yöresinde üretimi yapılmaktadır. Hardaliye üzüm suyunun hardal tohumu ve vişne yapraklarıyla fermantasyonu sonucu elde edilen alkolsüz, hoş kokulu ve buruk tatta bir içecektir. Trakya bölgesi üzümün yetişmesi için oldukça elverişlidir. Bunun yanı sıra hardaliye yapımında kullanılan vişne yaprağı, hardal tohumu da aynı bölgede yetişmektedir. Mustafa Kemal ATATÜRK'ün 1930 yılında Kırklareli seyahatinde yerli halka “Hardaliyenizi çok beğendim, bu içeceğinizi milli bir ürün haline getirmenizi öğütlerim” şeklinde tavsiyede bulunduğu bilinmektedir [64].

Hardaliye genellikle Trakya Bölgesinde yetişen Merlot, Papazkarası, Alfons, Öküzgözü, Cabernet Sauvignon gibi kırmızı üzümlerden üretilmektedir. Hardaliye; hasat sonrası elde edilen üzüm suyuna öğütülen hardal tohumları ve vişne yaprakları ilave edilmesi sonrasında gerçekleştirilen laktik asit fermantasyonu ile üretilir. Hardaliyenin rengi tercih edilen üzüm çeşidinin orijinal rengini yansıtmaktadır. Rengin yoğunluğu üretim yöntemi ve

üzüm çeşidine bağlı olarak değişir. Fermantasyon sırasında maya faaliyetlerini ve buna bağlı olarak alkol fermantasyonunu önlemek amacıyla hardal tohumu tercih edilmektedir. Hardal tohumu yöresel içeceğe ismini vermesinin yanı sıra, hardaliyenin kendine has tat ve kokusuna da katkı sağlamaktadır. Yine aynı bölgede yetişen vişne ağaçlarının yaprakları hardaliyeye aroma vermek amacıyla kullanılmaktadır [65,66].

Kırmızı üzüm fenolik bileşenler açısından zengindir. Hardaliyenin hem fermente bir içecek olması, hem de üretiminde kırmızı üzüm kullanılması nedeniyle zengin bir fenolik bileşen kaynağıdır [67]. Hardaliyenin alkolsüz olması her yaş grubunun tüketmesine imkân sağlamaktadır. Süt içermemesi nedeniyle süt alerjisi veya laktoz intoleransı olan bireylerin tüketimi için iyi bir seçenektir, ayrıca hardaliye yağ içermemesi sayesinde hiperlipidemik bireyler için alternatif fonksiyonel bir içecek olabilir [68].

Hardaliye, toplam fenolik bileşen ve kuersetin, gallik asit ve trans-resveratrol gibi fenolik bileşenlerce zengindir. Üzüm suyunun kombucha ile fermantasyonuyla değişen parametrelerinin incelendiği bir çalışmada, fermantasyonun başlangıcından 6 gün sonra üzüm suyunun toplam fenolik içeriğinin fermantasyonla %40 arttığı gözlemlenmiştir [69].

Gündüz ve ark. [70] yapmış olduğu çalışmada üzüm suyunun toplam fenolik içeriği 1515,27 mg/L bulunmuştur. Üzüm suyunun fermente edilmesi sonucu üretilen hardaliyenin toplam fenolik bileşeni ev yapımı hardaliyede 2029,20 mg/L, ticari hardaliyede ise 2193,08 mg/L'dir. Üzüm suyunun hardaliyeye işlenmesi sonucu toplam fenolik bileşen miktarı belirgin olarak artmıştır. Aynı zamanda hardaliyenin üzüm suyuna, farklı bir fermente ürün olan üzüm turşusuna nazaran daha yüksek toplam fenolik bileşene sahip olduğu Çizelge 2.3'te görülmektedir.

Çizelge 1.3. Üzüm kullanılarak üretilen meşrubatlarda toplam fenolik madde miktarı

| Test Materyali | Toplam Fenolik Bileşen (mg/L) |
|----------------------------------|--------------------------------------|
| Üzüm Turşusu | 865,27 |
| Üzüm suyundan süpernatant | 1701,97 |
| Üzüm suyu | 1515,27 |
| Ev yapımı hardaliye | 2029,20 |
| Ticari olarak üretilen hardaliye | 2193,08 |

1.1.4 Hardaliyedeki Koruyucu Baharat: Hardal Tohumu

Cruciferae familyasında yer alıp dünyanın her yerinde yetiştirilebilen tek yıllık otsu bir bitki olan hardalın üç tanınmış çeşidi bulunmaktadır. Bunlar; **Brassica nigra (L.) Koch** siyah, **Brassica juncea (L.) Cosson** kahverengi veya kırmızı, **Brassica alba (sinapis alba L.) Boiss** sarı veya beyaz renkli tohumlara sahiptir [71, 72]. Hardal tohumu turşu ve sirke yapımında istenmeyen küf oluşumunu engellemek, fermantasyonu durdurulmuş bira ve şarap yüzeyinde istenmeyen bakteri gelişimini önlemek amacıyla da çeşitli fermente ürünlerde kullanılmıştır [73]. Önceki yıllarda baharatların kullanımı sırasında edinilen tecrübelerin nesilden nesile aktarımı ve kalıplaşmış geleneksel üretim yöntemleri sayesinde baharatların antimikrobiyal özelliklerinden çokça faydalanılmıştır.

Gelişen gıda endüstrisi ile birlikte antimikrobiyal kimyasal katkı maddeleri artmıştır. Kimyasal katkı maddelerinin insan sağlığı üzerine etkileri araştırılıp zararlı etkileri ortaya konduka tüketiciler güvenli gıda tüketimine yönelmiştir. Son yıllarda gıda endüstrisinde antimikrobiyal etkisi, yüksek antioksidan içerikleri, doğal olmaları nedeniyle baharatlarla ilgili çeşitli çalışmalar yürütölmektedir [74, 75, 76].

Hardal tohumu, bürüksel lahanası, turpgiller ve brokoli gibi glikozinolat içeren bitki ve tohumların; bitkisel bütönlüklerinin böcekler, fitopatojenler, herbivorlar tarafından veya kesme, doğrama gibi işlemlerle bozulması sonucu mirosinaz enzimi aktif hale gelmektedir. Glikozinolatın mirosinaz enzimi ile hidrolizi sonucu antikanserojen, bakterisit etkiye sahip, renksiz ve uçucu bir bileşik olan alil izotiyosiyanat oluşturmaktadır [77, 78]. Hardal tohumunda enzim faaliyetleri sonucu meydana gelen alil izotiyosiyanatların *Lactobacillus acidophilus*, *Bacillus cereus*, *Aspergillus niger* ve *Saccharomyces cerevisiae*'ye karşı antimikrobiyal etkisinin karanfil, kimyon, zencefil, fesleğen ve kişniş gibi baharatlardan daha fazla olduğu tespit edilmiştir [79]. Olaimat ve ark. [80] çalışmasında farklı dozlarda alil izotiyosiyanatla işleme tabi tutulan humus içerisinde bulunan *S. enterica* ve *L. monocytogenes* sayılarının azaldığı, aerobik bakterilerinin inhibe edildiği ve humusun raf ömrünün uzadığı bildirilmiştir. Yapılan başka bir çalışmada da hardal yağına karşı *Serratia marcescens*, *Basillus mycoides*'in dayanıklı olmadığı fakat *E. coli*, *Staphylococcus aureus*'un direnç gösterdiği bulunmuştur [73].

Coşkun ve Arıcı [81], Hardaliye ile ilgili yapmış oldukları çalışmada siyah ve beyaz hardal tohumları ile üretilen hardaliyeler arasında laktik asit bakterileri ve toplam mezofil aerob bakteri sayıları açısından önemli bir farkın bulunmadığı, maya ve küf sayılarına siyah hardal

tohumunun daha çok inhibitör etkisinin olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca siyah hardal tohumunun hardaliyeye kendine has tat ve aromayı vermesi nedeniyle hardaliye üretiminde siyah hardal tohumunun kullanımı uygun bulunmuştur.

Cruciferae familyasına ait bitkilerde bulunan, doğal bir bileşik olan alil izotiyosiyanatın, sıvı ortamda ve buhar formunda *Salmonella montevideo*, *Escherichia coli* ve *Listeria monocytogenes* **Scott A**'ya yönelik bakterisidal etkisi ve güçlü antimikrobiyal aktivitesi araştırılmıştır. Alil izotiyosiyanatın tüm gelişme aşamalarındaki bakterileri inhibe etmedeki etkinliği ve buhar fazındaki güçlü aktivitesi, gıda koruma amaçlı kullanılmaya uygunluğunu destekler niteliktedir [82].

Hardal tohumu ile yapılan bir çalışmada; öğütülmüş hardal tohumlarından salınan alil izotiyosiyanatın gıdalar üzerinde gıda duyusunu etkilemeyen bir konsantrasyonda *P. fragi* tarafından bozulmayı kontrol etmede etkili olduğu kanıtlanmıştır. Böylece çeşitli paketli gıdaların raf ömrünün öğütülmüş hardal tohumundan salınan alil izotiyosiyanat ile uzatılmasının mümkün olduğu ifade edilmiştir [83]. Yine farklı bir çalışmada alil izotiyosiyanatın maş fasulyesi filizlerinin ve taze kesilmiş buzdağı marulunun muhafazası için yüksek gaz bariyerli plastik torbalarda saklandı. Araştırma sırasında her iki ürünün mikrobiyal yüklerinin yanı sıra renk değişiklikleri ve solunumu 5 °C'de 9 gün boyunca izlenmiş ve alil izotiyosiyanatın (0.81-1.41 µg / ml) buzdağı marul ve maş fasulyesi filizlerinin doğal mikroflorasına karşı gaz fazı yoluyla güçlü antimikrobiyal özellikler sergilediği gözlemlenmiştir. Bununla birlikte, test edilen her iki üründe renk ve doku değişiklikleri belirlenmiş ve bu da alil izotiyosiyanatın bu tür hassas ürünler için uygulanabilirliğini sınırladığıdır [84].

Ekmekte raf ömrünü uzatmaya yönelik yapılan bir çalışmada hardal ve tarçın esansiyel yağlarının antifungal etkileri test edilmiştir. Hardal esansiyel yağının tarçıninkine kıyasla antifungal aktivitesi daha yüksek bulunmuştur. Duyusal analiz sonuçlarında hardalın tarçın olmadan tek başına koruyucu olarak kullanılması aroma açısından önerilmemiştir. Bu çalışmada hardalın ekmeğin raf ömrünü iki kat uzattığı öne sürülerek endüstriyel ölçekte kullanılması önerilmiştir [85].

Hardaliyede meydana gelen alil izotiyosiyanatın antimikrobiyal etkisi ve gıdalarda doğal koruyucu olarak kullanımı son zamanlarda araştırma konusu olmuştur. Diğer yandan alil izotiyosiyanatın güçlü kokusu ve yüksek uçuculuğu da gıda sistemlerine uygulanmasını

sınırlandırmaktadır. Ko ve ark. [86] yapmış oldukları çalışmada, arap zıncı ve kitosan kullanılarak enkapsülasyon yoluyla alil izotiyosiyanatın uçuculuğunun üstesinden gelmeyi hedeflemişlerdir. Doğal bir katkı maddesi olarak mikrokapsülenmiş alil izotiyosiyanatın kimchinin raf ömrü ve kalitesi üzerine etkisi araştırılmıştır. Araştırma sonuçlarına göre, alil izotiyosiyanatın kimchinin raf ömrünü pozitif yönde etkilediği gözlemlenmiştir. Alil izotiyosiyanatın uçuculuğu üzerine yapılan duyusal analiz sonuçlarına göre, kimchi üretiminde %0,1 ve daha düşük konsantrasyonlarda alil izotiyosiyat kullanımı önerilmiştir.

Okunade [87] tarafından yapılan çalışmada, siyah, kahverengi ve sarı hardal tohumlarından ekstrakte edilen mirosinaz enzimlerinin sıcaklık ve basınç stabilitesi araştırılmıştır. Araştırma sonucunda, tüm hardal tohumlarının enzim inaktivasyon dereceleri sıcaklık (30-70 °C) ve basınç (600-800 MPa) artışına bağlı olarak artmıştır. Düşük basınç (200-400 MPa) ve yüksek sıcaklık (60-80 °C) uygulamasında daha az enzim inaktivasyonu görülmüştür. Sırasıyla sarı, siyah ve kahverengi hardal tohumlarına 10 dakika boyunca 300 MPa ve 70 °C'nin uygulanması sonucu %20, %80 ve %65 enzim aktivitesi gözlemlenirken, sadece ısı uygulandığında %0, %59 ve %35 enzim aktivitesi gözlemlenmiştir. Kahverengi ve siyah hardal tohumlarının mirosinaz enziminin, sarı hardal tohumuna nazaran basınç ve ısı işleme karşı daha dirençli olduğu bildirilmiştir.

1.1.5 Back-Slopping Yöntemi

Back slopping, ham maddenin başarılı bir şekilde fermantasyonu sonucu elde edilen fermente üründen az miktar alınarak yeni ham maddeye ilavesi ile başlatılan fermantasyondur. Fermantasyon süresini azaltmak ve başarısız fermantasyon riskini en aza indirmek amaçlı kullanılır [88,89].

Fermantasyon mikroorganizmalar tanımlanmadan çok önce keşfedildi. Başlarda benzer ürün üretmek amaçlı önceki fermente üründen az miktar alınarak fermantasyon başlatılmaktaydı. Günümüzde de hala sürdürülen bu yöntem pek çok gıda ürünü (ekmek çeşitleri, geleneksel kurutulmuş sosisler ve çeşitli özel peynirler) üretmek amaçlı kullanılmaktadır [90].

Wirawati ve ark. [91] yaptıkları çalışmada, manda sütünden back-slopping fermantasyon tekniğiyle üretilen Dadih örneklerinin LAB sayılarının, kendiliğinden fermente edilmiş Dadih'ten daha yüksek olduğunu ortaya koymuşlardır. Back-slopping ile gerçekleştirilen Dadih beş farklı LAB (*L. lactis* ssp. *lactis*, *L. lactis* ssp. *cremoris*, *L.*

plantarum ssp. *plantarum*, *L. Pentosus* ve *P. pentosaceus*) türünü içerirken, kendiliğinden fermente edilen Dadihde ise üç farklı LAB (*L. lactis* ssp. *lactis*, *L. lactis* ssp. *cremoris* ve *L. plantarum* ssp. *plantarum*) türü tespit edilmiştir.

Kefir üretimini büyük ölçekte yapabilmek için back-slopping yöntemi ile kefir içeceği üretilen bir araştırmada, üretim veriminin geleneksel yöntemlere nazaran 50 kat arttığı belirtilmiştir. Back-slopping yöntemi ile üretilen kefirin geleneksel kefir granülleri ile üretilen kefirle aynı laktik asit ve maya türlerini barındırdığı, ayrıca yöntemin lezzet ve tekstürel stabilite üzerine olumlu etkilerinin olduğu ifade edilmiştir [92].

1.2 Çalışmanın Amacı ve Kapsamı

Kırklareli'nin yöresel bir içeceği olan Hardaliye; üzüm suyu, hardal tohumu ve vişne yaprağı kullanılarak üretilen geleneksel, alkolsüz fermente bir içecektir. Hardaliye ile ilgili literatürde sınırlı sayıda çalışmalar mevcut olup son yıllarda farklı starterlerle hardaliye üretimleri denenmeye başlanmıştır. Bu çalışmada da benzer amaçla; farklı starterlerle üretilen hardaliyelerin üretim ve depolama süresince fiziksel, kimyasal ve mikrobiyolojik özellikleri incelenmiştir. Starter kültür olarak fermantasyonunu tamamlamış hardaliye (back-slopping yöntemi) ve hardaliye üretiminde bir ilk olarak kombucha mantarı ilave edilerek üretimler gerçekleştirilmiştir. Kombucha mantarında bulunan maya ve bakterilerin simbiyotik birlikteliği sayesinde hardaliye üretiminde koruyucu kullanımına ihtiyaç duymadan üretimin sağlanabileceği, farklı starter kültürlerle hardaliyenin fonksiyonelliğinin artırılabilceği ortaya konmuştur.

2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1 Materyal

Araştırma materyallerini; geleneksel yöntemle elde edilmiş hardaliyenin starter olarak kullanılması (back-slopping) (a) ve kombucha mantarı (b) ilavesi olmak üzere iki farklı yöntemle laboratuvar ortamında üretilmiş olan hardaliye örnekleri oluşturmaktadır. Back-slopping metoduyla elde edilen hardaliye “BH” olarak, kombucha mantarı ilavesiyle üretilen hardaliye ise “KH” olarak isimlendirilmiştir. Üretimlerde kullanılan öküzgözü üzümünden üretilmiş olan üzüm suyu Şarköy Mursallı Tarımsal Kalkınma Kooperatifinden, kombucha mantarı Shaman's Secret A.Ş.'den, hardaliyenin aromalandırılmasında kullanılacak hardal tohumu ve vişne yaprağı Arifoğlu aktardan, geleneksel hardaliyenin back-slopping metodu ile

üretiminde gerekli olan fermantasyonunu tamamlamış hardaliye Karlıbağ Hardaliye A.Ş.'den temin edilmiştir.

2.2 Yöntem

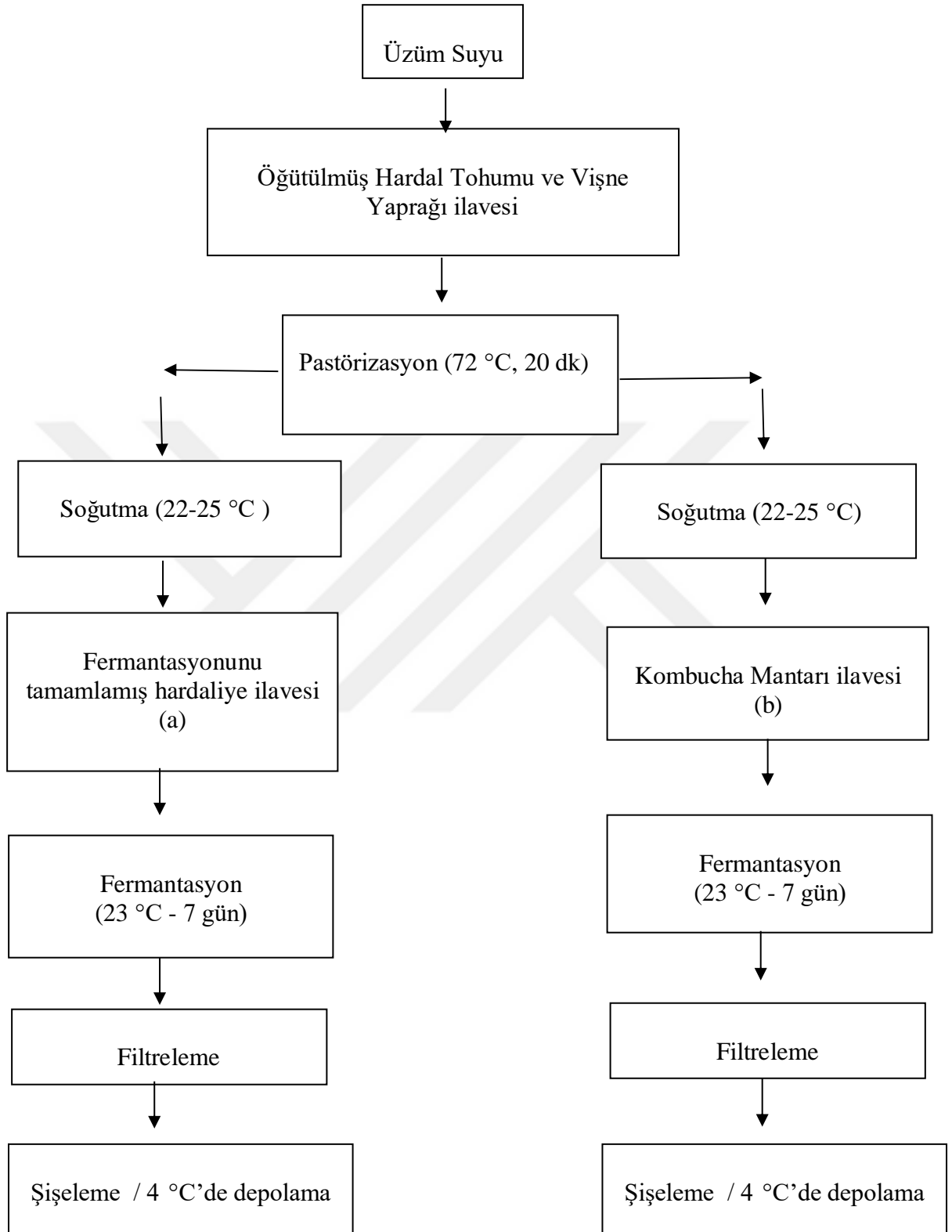
Hardaliye üretiminde kullanılan iki farklı yöntem Şekil 3.1'de verilmiştir. Birinci üretim metodunda fermantasyonunu tamamlamış hardaliyeden bir miktar alınıp, önceden öğütülmüş hardal tohumu, vişne yaprağı ile pastörize edilen ve oda sıcaklığına soğutulan üzüm suyuna ilave edilerek hardaliye üretimi yapılmıştır. İkinci yöntemde; kombucha mantarı, yine önceden öğütülmüş hardal tohumu ve vişne yaprağı ile birlikte pastörize edilip oda sıcaklığına soğutulan üzüm suyuna ilave ederek hardaliye üretimi gerçekleştirilmiştir. İki farklı yöntemde de hardaliye örneklerinin pH 3,10-3,25'e düşene kadar fermantasyon sürdürülmüştür. Üretilen hardaliye örneklerine fermantasyonun başladığı 0. gün ile fermantasyonun tamamlandığı 7. günde ve +4 °C'deki depolamanın 14. gününde bazı fiziksel, kimyasal ve mikrobiyolojik analizler uygulanmıştır.

2.2.1 Back-slopping Metoduyla Geleneksel Hardaliye Üretimi

Mursallı Tarımsal Kalkınma Kooperatifinden temin edilen üzüm suyuna hardaliye üretim metodu gereği siyah hardal tohumu ve vişne yaprağı ilave edilmiştir. Sıvı kısmın %90'ını üzüm suyu, %10'unu fermantasyonunu tamamlamış hardaliye oluşturmuştur. Toplam sıvı ağırlığının %1'i kadar vişne yaprağı, %1'i kadar hardal tohumu ilave edilmiştir. Fermantasyon sırasında hardal tohumu ve vişne yaprağından kaynaklı kontaminasyonu önlenmek amacıyla öncelikle üzüm suyuna vişne yaprağı ve öğütülmüş hardal tohumu ilave edilerek 72 °C'de 20 dk pastörize edilmiştir. Karışım sıcaklığı oda sıcaklığına geldiğinde fermantasyonunu tamamlamış hardaliyeden %10 oranında ilave ederek 23 °C'de, pH değeri 3,10-3,25 aralığına düşene kadar yaklaşık 7 gün fermente edilmiştir. Hardaliyelerde istenilen pH değerine ulaşıldıktan sonra +4 °C'de 14 gün muhafaza edilmiştir [2]. Back-slopping yöntemiyle üretilen hardaliyeye üretimin 0., 7. ve depolamanın 14. günlerinde ilk olarak toplam aerobik mezofilik canlı bakteri sayımı, toplam maya sayımı, laktik asit bakteri sayımı gibi mikrobiyolojik analizler yapılmıştır. Daha sonra pH, titrasyon asitliği, indirgen şeker, alkol tayini, renk ölçümü, toplam fenolik bileşen tayini gibi fizikokimyasal analizler yapılmıştır. Fermantasyonla değişen viskoziteyi görebilmek amaçlı reolojik analizler yapılmıştır.

2.2.2 Kombucha Mantarı ile Hardaliye Üretimi

Mursallı Tarımsal Kalkınma Kooperatifinden temin edilen üzüm suyuna hardaliye üretim metodu gereği siyah hardal tohumu ve vişne yaprağı ilave edilmiştir. İçeriğin %90'ını üzüm suyu, %10'unu kombucha mantarı oluşturmuştur. Hardaliye üretiminde kullanılan üzüm suyu ve kombucha mantarının toplam ağırlığının %1'i kadar vişne yaprağı, %1'i kadar hardal tohumu ilave edilmiştir. Fermantasyon sırasında hardal tohumu ve vişne yaprağından kaynaklı kontaminasyonu önlenmek amacıyla öncelikle üzüm suyuna vişne yaprağı ve öğütülmüş hardal tohumu ilave edilerek 72 °C, 20 dk pastörize edilmiştir. Karışım sıcaklığı oda sıcaklığına geldiğinde %10 oranında kombucha mantarı ilave ederek 23 °C'de, pH değeri 3,10-3,25 aralığına düşene kadar yaklaşık 7 gün fermente edilmiştir. Hardaliyelerde istenilen pH değerine ulaşıldıktan sonra +4 °C'de 14 gün muhafaza edilmiştir [93]. Kombucha mantarı ile üretilen hardaliyeye fermantasyonun 0., 7. ve depolamanın 14. günlerinde ilk olarak toplam aerobik mezofilik canlı bakteri sayımı, toplam maya sayımı, laktik asit bakteri sayımı gibi mikrobiyolojik analizler yapılmıştır. Daha sonra pH, titrasyon asitliği, indirgen şeker, alkol tayini, renk ölçümü, toplam fenolik bileşen tayini gibi fizikokimyasal analizler yapılmıştır. Fermantasyonla değişen viskoziteyi görebilmek amaçlı reolojik analizler yapılmıştır.



Şekil 2.1. Farklı metotlarla hardaliye üretimi

2.2.3 Fiziksel ve Kimyasal Analizler

2.2.3.1 pH Analizi

Hardaliye örneklerinin pH ölçümünde HANNA pH211 model pH metre kullanılmıştır [94]. Her ölçüm öncesi pH metrenin kalibrasyonu sağlanmış ve pH metrenin probu saf su ile temizlenip kurulanmıştır. Homojen olarak alınan örneğe pH probu daldırılarak ekrandaki değer sabitlenene kadar beklenmiş ve sonuçlar kaydedilmiştir. Ölçümler her bir örnek için üç kez yapılmış ve ortalaması alınmıştır.

2.2.3.2 Titrasyon Asitliği

Numuneden 10 ml alınarak üzerine 10 ml saf su ilave edilmiştir, karışım homojen hale geldikten sonra üzerine 0,5 ml fenolftalein indikatörü ilave edilerek 0,1 N NaOH ile titre edilmiştir. Titrasyonda pH 8,1'e gelinceye kadar harcanan NaOH miktarı (3.1) eşitliğinde yerine konularak sonuçlar tartarik asit cinsinden g/L olarak verilmiştir [95].

$$\text{Titrasyon Asitliği (g/L)} = \frac{V \cdot N \cdot E}{M} \times 1000 \quad (3.1)$$

V: Harcanan NaOH miktarı (mL)

N: NaOH'ın normalitesi

E: Tartarik asitin miliekivalent ağırlığı

M: Titrasyonda kullanılan örnek miktarı (mL)

2.2.4 İndirgen Şeker Tayini

Araştırmada kullanılan hardaliye örneklerinin indirgen şeker miktarının belirlenmesi için Luff-Schoorl metodu kullanılmıştır. 1. aşamada her örnekten 100 mL'lik ölçü balonuna 25 mL örnek alınarak üzerine 50 mL damıtık su ve Carrez-I ve Carrez-II çözeltilerinden 5 mL ilave edilmiştir. İyice karıştırıldıktan sonra ölçü balonu çizgisine 20 °C'de damıtık su ile tamamlanmıştır. 10 dakika bekletildikten sonra filtre edilmiş ve 2. aşamada elde edilen filtrattan 300 mL'lik erlenmayer içerisine 25 mL aktarılıp üzerine 25 mL Luff çözeltilisi ilave edilmiştir. İçerisine kaynama taşı atılarak hafifçe çalkalanıp geri soğutucuya bağlanmış, 2 dakika içerisinde kaynamaya başlayacak şekilde açık alevde ısıtılmıştır. Kaynama işlemine 10 dakika daha devam edildikten sonra geri soğutucudan çıkartılarak oda sıcaklığına gelmesi için bekletilmiştir. 3. aşamada ise 10 mL %20'lik KI çözeltilisi ve yavaşça 25 mL %25'lik H₂SO₄

çözültüsü ve 2 mL %1'lik Nişasta çözültüsü ilave edilip, 0,1N Na₂S₂O₃ çözültüsü ile titrasyon işlemi gerçekleştirilmiştir [96].

2.2.4.1 Alkol Tayini

Glisin buffer solüsyonundan içerisinde NAD bulunan tüplere 2,9 ml boşaltılmış, üzerine 0,1 ml distile su konulup 0,1 ml de numune ilavesinden sonra Shimadzu model spektrofotometre 340 nm'de okuma yapılmıştır [97]. Okunan absorpsiyon değerinden aşağıdaki formüle göre etanol miktarı (mg/dl) hesaplanmıştır.

$$\text{ABS- Kontrol ABS} = \Delta A_{340} \Delta A_{340} \times 223 = \dots \text{mg/dl alkol} \quad (3.2)$$

ABS= Absorpsiyon değeri

2.2.4.2 Renk Ölçümü

Hardaliye yapımında kullanılan üzüm suyunun ve hardaliye örneklerinin rengi Konica Minolta Chroma Meter CR-5 renk ölçüm cihazı kullanılarak yapılmış olup, sonuçlar L*, a* ve b* değerleri olarak verilmiştir [63]. Renk değerleri ölçülecek 3 örneğin cihazın ürüne uygun olan (sıvı ürün) haznesi seçilerek, kolorimetrenin cihazının içerisine yerleştirilip cihazın renk değeri okumaları gerçekleştirilmiştir. L*,a*,b* renk koordinat sisteminde L* değeri renk parlaklığını/aydınlığını göstermekte ve değer aralığı 0-100 arasında değişmektedir. Renk koordinat düzlemindeki a* değeri (+) ise kırmızı, (-) ise yeşil rengi ifade ederken değeri -120 ile 120 arasındadır. b* değeri ise renk koordinat düzleminde bulunmasına rağmen değer aralığı yoktur (+) ise sarı, (-) olduğunda ise mavi rengi göstermektedir. Analizler üç paralel şekilde üretimin 0., 7. gününde ve +4 °C depolamanın 14. Gününde gerçekleştirilmiştir.

2.2.4.3 Toplam Fenolik Bileşenlerin Tayini

Toplam fenolik madde miktarı hesaplamak için yaygın olarak kullanılan Folin-Ciocalteu ayracı kullanılmıştır. Standart olarak gallik asit kullanılmıştır. Hardaliye örneğinden 100 µl alınıp, üzerine 500 µl Folin-Ciocalteu ayracı ve 7,5 ml saf su eklenerek karıştırılmış ve 1 dakika beklenmiştir. Ardından 1 ml doymuş Na₂CO₃ çözültüsünden eklenerek toplam hacim 10 ml'ye tamamlanmıştır. Karanlık ortamda oda sıcaklığında bekletilen örnekler 60 dakikanın sonunda absorpsiyon spektrofotometrede 720 nm dalga boyunda okutulmuştur. Toplam fenolik madde içeriği gallik asit kalibrasyon eğrisinden yararlanılarak gallik asit eşdeğeri (GAE) olarak hesaplanmıştır. Deneyler 3 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiş ve sonuçların ortalamaları kaydedilmiştir [98].

2.2.5 Reolojik Analizler

Üzüm suyu ve hardaliye örneklerinin reoloji analizi Namık Kemal Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Bölümü laboratuvarındaki TA Discovery HR-20 reometre cihazı kullanılarak yapılmıştır. Reoloji değerleri 3 farklı örnek ile ölçüm yapılacak cihazın sıvı ürüne uygun olan yuvarlak ölçüm başlığı seçilerek reometrenin ilgili kısmına birkaç damla konulup cihazın bağlı olduğu bilgisayar üzerinden okunmasıyla viskozite değerleri Pa.s cinsinden ölçülmüştür. Analizler 3 paralel olacak şekilde üretimin 0., 7. günlerinde ve depolamanın 14. gününde gerçekleştirilmiştir.

2.2.6 Mikrobiyolojik Analizler

Mikrobiyolojik analizlerde klasik yayma yöntemi tercih edilmiş ve toplam aerobik mezofilik canlı bakterilerin sayımı için Plate Count Agar besiyeri, toplam maya sayımı için Patato Dextrose Agar ve Lactobacillus türlerinin sayımı için De Man Rogosa and Sharpe agar, Laktik Streptokokların sayımı için M17 agar besiyerleri kullanılmıştır [99].

2.2.6.1 Toplam Aerobik Mezofilik Canlı Bakteri Sayımı

Analiz için 8,5 g NaCl 1 L saf su içerisinde çözündürülerek hazırlanan %0,85'lik fizyolojik sudan tüplere 9'ar ml alınarak hermetik kapama yapılmıştır. Hazırlanan tüpler 121 °C'de 15 dakika sterilize edilmiştir. Aseptik koşullar altında hardaliye örneklerinden 1'er ml alınmış ve içerisinde 9 ml steril fizyolojik su bulunan tüplere aktararak 10⁻¹'lik dilüsyon hazırlanmıştır. 10⁻¹'lik dilüsyondan 1 ml alınarak 10⁻² ve bu şekilde 10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵ ve 10⁻⁶ dilüsyonlar hazırlanmıştır. Bir gün önceden hazırlanmış ve petri kaplarına dökülmüş PCA Agar besiyerine seyreltilmiş örneklerden 0,1 ml aktararak yayma yöntemi ile 2 paralel olacak şekilde yayılmıştır. İnkübatörde 30 °C'de, 48 saat inkübe edildikten sonra oluşan koloniler (kob/ml) sayılmıştır. Bakterilerin sayımı ilk olarak fermantasyon ortamı 3,10- 3,25 pH'ya düştüğünde (7. gün) ve daha sonra +4 °C'de 14 gün depolamanın sonunda hardaliye örneklerinin mikrobiyal analizleri gerçekleştirilmiştir [100].

2.2.6.2 Toplam Maya Sayımı

Analiz için 8,5 g NaCl 1 L saf su içerisinde çözündürülerek hazırlanan %0,85'lik fizyolojik su tüplere 9'ar ml aktararak hermetik kapama yapılmıştır. Hazırlanan tüpler 121 °C'de 15 dakika sterilize edilmiştir. Aseptik koşullar altında hardaliye örneklerinden 1'er ml alınmış ve içerisinde 9 ml steril fizyolojik su bulunan tüplere aktararak 10⁻¹'lik dilüsyon

hazırlanmıştır. 10^{-1} 'lik dilüsyondan 1 ml alınarak 10^{-2} ve bu şekilde 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} ve 10^{-6} dilüsyonlar hazırlanmıştır. Bir gün önceden hazırlanmış ve petri kaplarına dökülmüş PDA Agar besiyerine seyreltilmiş örneklerden 0,1 ml aktararak yayma yöntemi ile 2 paralel olacak şekilde yayılmıştır. İnkübatörde $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de, 5 gün inkübe edildikten sonra oluşan koloniler (kob/ml) sayılmıştır. Mayaların sayımı ilk olarak fermantasyon ortamının 3,10- 3,25 pH'ya düştüğünde (7.gün) ve daha sonra $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de 14 gün depolamanın sonunda gerçekleştirilmiştir [101].

2.2.6.3 *Laktik Asit Bakteri Sayımı*

Analiz için 8,5 g NaCl 1 L saf su içerisinde çözündürülerek hazırlanan %0,85'lik fizyolojik su tüplere 9'ar ml aktararak hermetik kapama yapılmıştır. Hazırlanan tüpler $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de 15 dakika sterilize edilmiştir. Aseptik koşullar altında hardaliye örneklerinden 1'er ml alınmış ve içerisinde 9 ml steril fizyolojik su bulunan tüplere aktararak 10^{-1} 'lik dilüsyon hazırlanmıştır. 10^{-1} 'lik dilüsyondan 1 ml alınarak 10^{-2} ve bu şekilde 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} ve 10^{-6} dilüsyonlar hazırlanmıştır. Bir gün önceden hazırlanmış ve petri kaplarına dökülmüş MRS Agar besiyerine seyreltilmiş örneklerden 0,1 ml aktararak yayma yöntemi ile 2 paralel olarak yayılmıştır. İnkübatörde $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de anaerobik jar içerisinde mikroorganizmalara oksijensiz ortam sağlanarak 72 saat inkübe edildikten sonra oluşan koloniler (kob/ml) sayılmıştır [101]. Bakterilerin sayımı ilk olarak fermantasyon ortamının 3.10-3.15 pH'ya düştüğünde (7. gün) ve daha sonra $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de 14 gün depolamanın sonunda gerçekleştirilmiştir.

2.2.6.4 *Laktik Streptokok Sayımı*

Analiz için 8,5 g NaCl 1 L saf su içerisinde çözündürülerek hazırlanan %0,85'lik fizyolojik su 9'ar ml miktarda tüplere aktararak hermetik kapama yapılmıştır. Hazırlanan tüpler $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de 15 dakika sterilize edilmiştir. Aseptik koşullar altında hardaliye örneklerinden 1'er ml alınmış ve içerisinde 9 ml steril fizyolojik su bulunan tüplere aktararak 10^{-1} 'lik dilüsyon hazırlanmıştır. 10^{-1} 'lik dilüsyondan 1 ml alınarak 10^{-2} ve bu şekilde 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} ve 10^{-6} dilüsyonlar hazırlanmıştır. Bir gün önceden hazırlanmış ve petri kaplarına dökülmüş M17 Agar besiyerine seyreltilmiş örneklerden 0,1 ml aktararak yayma yöntemi ile 2 paralel olarak yayılmıştır. İnkübatörde $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de anaerobik jar içerisinde mikroorganizmalara oksijensiz ortam sağlanarak 72 saat inkübe edildikten sonra oluşan koloniler (kob/ml) sayılmıştır [101]. Bakterilerin sayımı ilk olarak fermantasyon ortamının 3.10-3.25 pH'ya düştüğünde (7. gün) ve daha sonra $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de 14 gün depolamanın sonunda mikrobiyal analizleri gerçekleştirilmiştir.

2.2.7 İstatiksel Analiz

Hardaliye örneklerinin üçer paralelli olarak analizleri yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar JMP 5.0.1 (SAS Institute) programından yararlanılarak, ikili ANOVA analizi uygulanarak değerlendirilmiştir. Sonuçlar arasındaki önemli farklılıklar Tukey çoklu karşılaştırma testi ile $p<0.05$ derecesine göre belirlenmiştir.



3. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

İki farklı starter kaynağının kullanıldığı, pastörize üzüm suyu, vişne yaprağı ve hardal tohumu karışımından oluşan hardaliyelere, fermantasyonun 0., 7. ve depolamanın 14. Günlerinde mikrobiyal ve fizikokimyasal analizler yapılarak, ortaya çıkan farklılıklar belirlenmeye çalışılmıştır.

3.1 Hardaliye Örneklerinin Üretim ve Depolama Boyunca Fiziksel ve Kimyasal Analiz Sonuçları

3.1.1 pH Değerleri

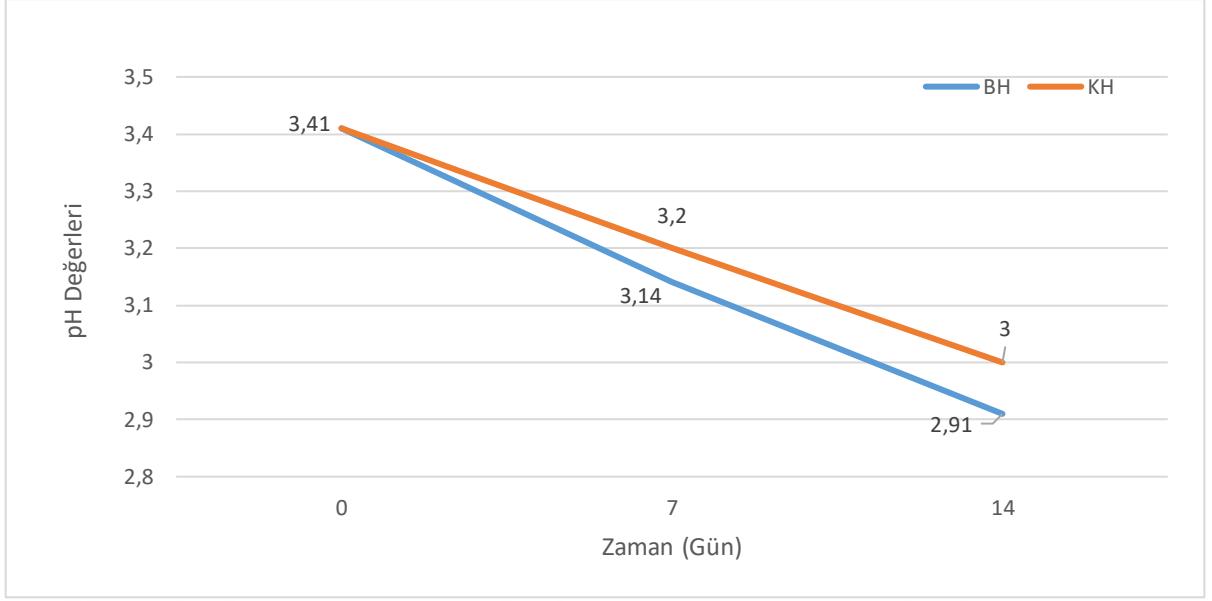
Çizelge 4.1’de görüldüğü gibi, 0. günde üzüm suyunda 3,41 olan pH değeri fermantasyonun tamamlandığı 7. günde BH örneğinde 3,14, KH’de ise 3,20 olarak ölçülmüştür.

Çizelge 3.1. Hardaliye örneklerinin üretim ve depolama aşamalarındaki pH değerleri değişimi

| Örnekler | Üretim | | Depolama |
|----------|------------------------|--------------------------|--------------------------|
| | 0. Gün | 7. Gün | 14. Gün |
| BH | 3,41±0 ^{A,a1} | 3,14±0,01 ^{B,b} | 2,97±0,16 ^{C,a} |
| KH | 3,41±0 ^{A,a} | 3,2 ±0,01 ^{B,a} | 3,00±0,06 ^{C,a} |

¹Her bir sütunda, aynı küçük harflerle gösterilen değerler arasında istatistiksel olarak önemli bir fark yoktur ($p>0,05$)
Her bir satırda, aynı büyük harflerle gösterilen değerler arasında istatistiksel olarak önemli bir fark yoktur ($p>0,05$)

Şekil 4.1’de örnekler ve günler arası değişimler açıkça görülebilmektedir. Farklı kültürlerle üretilen hardaliyelerin üretim ve depolama süresince belirlenen pH değerleri değişimlerinin istatistiksel açıdan önemli ($p<0,05$) olduğu, örnekler arasındaki farklılığın ise üretimin 7. gününde önemli ($p<0,05$), 0. gün ve depolamanın 14. gününde ise önemsiz olduğu ($p>0,05$) belirlenmiştir.



Şekil 3.1. Hardaliye örneklerinin üretim ve depolama aşamalarındaki pH değerleri değişimi

Coşkun [2] hardaliye örneklerinde belirlenen pH düşüşlerini fermantasyon süresince ortamdaki mikroorganizmaların şekerleri kullanarak gerçekleştirdikleri organik asit oluşumu ile ilişkilendirmiştir. pH'daki bu düşüş; polifenollerin kimyasal bozulmasını önleme ve içecek renginin korunması açısından önemlidir. Yanı sıra asidik koşullar altında, antosiyaninler kimyasal yapılarını koruyarak daha kararlı hale gelirler [102].

Ayed ve ark. [69] araştırmasında üzüm suyunun kombucha mantarı ile fermantasyonu boyunca pH değerlerinin azaldığını belirtmişlerdir. Çalışmanın ilk gününde pH değeri 3,95 iken 6. günde 3,18 olarak ölçülmüştür. O çalışmada elde edilen değerlerin, yapmış olduğumuz KH örneklerinin sonuçları ile benzer olduğu görülmektedir. Coşkun [2] Trakya'daki yöre halkının geleneksel hardaliye üretim metoduyla ürettiği hardaliyelerden örnekler toplayarak, hardaliyelerin bazı kimyasal özelliklerini araştırmıştır. İncelenen örneklerin pH değerlerinin 3,21 ile 4,12 aralığında olduğu görülmektedir. Sonuçlar o çalışmayla kıyaslandığında, fermantasyonun 7. gününde pH değeri 3,2 olarak ölçülen KH örneği ile aynı olduğu görülmektedir. Tarhan [103] yapmış olduğu çalışmada; kahve ve çeşitli bitki, meyve çaylarında farklı karbon kaynakları kullanarak kombucha fermantasyonları gerçekleştirmiştir. Yaban mersini çayına ait çalışma sonuçları incelendiğinde; sakkaroz, glukoz, fruktoz karbon kaynakları kullanılarak gerçekleştirilen fermantasyonların 0. gününde pH değerleri sırasıyla 3,30, 3,27 ve 3,09, 8. günde pH değerleri sırasıyla 3,01, 2,94 ve 2,91 olarak ölçülmüştür. Bu çalışmada da yapılan çalışmada olduğu gibi fermantasyon süresince pH düşüşleri

gözlemlenmiştir. Yapılan bu çalışmalara [2,103] istinaden kombucha kültürünün asitlik geliştirme yeteneğinin hardaliye ile benzer olduğu düşünülmektedir.

Aşkın ve Atik [65] hardaliye ile ilgili yapmış olduğu çalışmada +4 °C’de 60 günlük depolama süresince pH değişiminin; 0. gün 3,96 iken 15. günde 3,60 olduğunu bildirmişlerdir. O çalışmada olduğu gibi, +4 °C’de 14 gün depolama sonunda KH ve BH örneklerinin pH değerlerinde de anlamlı düşüşler gözlemlenmiştir.

3.1.2 Titrasyon Asitliği Değerleri

Çizelge 4.2 incelendiğinde BH ve KH örneklerinin fermantasyon başlangıcındaki tartarik asit cinsinden toplam asitliği 5,25 g/L olarak ölçülmüştür. BH örneğinin üretim süresince toplam asitlik değerlerindeki değişim istatistiksel açıdan anlamsız ($p>0,05$), depolama boyunca meydana gelen değişimler istatistiksel açıdan önemli ($p<0,05$) bulunmuştur. KH örneğinin sonuçları incelendiğinde üretim ve depolama süresince toplam asitlikteki değişimlerin istatistiksel açıdan önemsiz olduğu ($p<0,05$) belirlenmiştir. Farklı kültürlerle üretilen hardaliye örneklerinin toplam asitlik değerlerindeki farklılık üretim aşamasında anlamsız ($p<0,05$), depolama sürecinde istatistiksel açıdan önemli bulunmuştur ($p>0,05$).

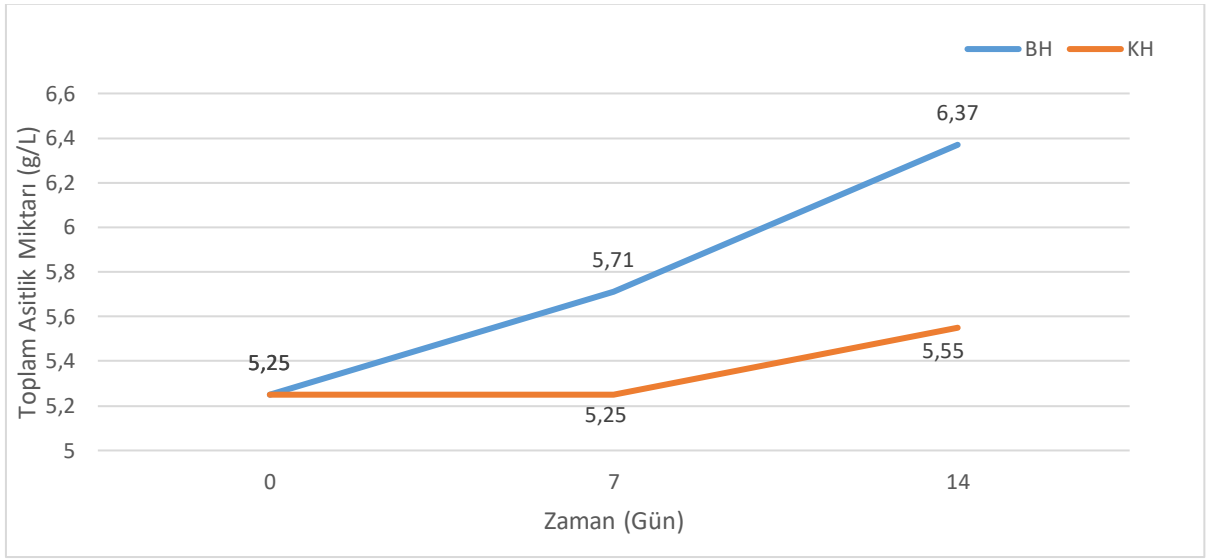
Çizelge 3.2. Hardaliye örneklerinin üretim ve depolama süresince tartarik asit cinsinden toplam asitlik miktarlarındaki değişim (g/L)

| Örnekler | Üretim | | Depolama |
|----------|---------------------------|--------------------------|--------------------------|
| | 0. Gün | 7. Gün | 14. Gün |
| BH | 5,25±0,02 ^{A,a1} | 5,71±0,03 ^{B,a} | 6,37±0,62 ^{A,a} |
| KH | 5,25±0,02 ^{A,a} | 5,25±0,02 ^{A,a} | 5,55±0,32 ^{A,b} |

¹Her bir sütunda, aynı küçük harflerle gösterilen değerler arasında istatistiksel olarak önemli bir fark yoktur ($p>0,05$) Her bir satırda, aynı büyük harflerle gösterilen değerler arasında istatistiksel olarak önemli bir fark yoktur ($p>0,05$)

BH örneğinin toplam asitlik miktarı üretim ve depolama boyunca artış göstermiştir (Şekil 4.2). KH örneğinde ise fermantasyon süresinde artış meydana gelmezken depolamada artış gözlemlenmiştir. Koruyucu madde kullanılmadan farklı miktarlarda hardal tohumu ve starter kültür (*L. plantarum*) ilavesiyle üretilen hardaliye örneklerinin incelendiği bir çalışmada; %1 hardal tohumu ve starter kültür (*L. plantarum*) kullanılan örnekte fermantasyonun 7. gününde toplam asitlik değeri 6,10 g/L olarak ölçülmüştür [104]. Değerlerin bu çalışmadaki BH örneğinin 7. gündeki toplam asitlik değerine yakın olduğu görülmektedir.

Coşkun ve ark. [105] Kırklareli'nin farklı bölgelerinden toplanan yirmi üç hardaliye örneği ve laboratuvar şartlarında geleneksel metotla beş farklı üzüm kullanılarak üretilen hardaliye örneklerinin fizikokimyasal, fonksiyonel ve mikrobiyolojik özellikleri araştırılmıştır. Farklı bölgelerden toplanan hardaliyelerin toplam asitlik değerlerinin en düşük %0,35, en yüksek %0,91 olduğu belirtilmiştir. Laboratuvar şartlarında 7 gün süren fermantasyon sonucu üretilen hardaliye örneklerinde toplam asitlik en düşük %0,56, en yüksek %1,05 olarak belirtilmiştir. Bu değerlerin, bu çalışma BH ve KH örneklerinin 7. gündeki toplam asitlik değerlerine yakın olduğu görülmektedir.



Şekil 3.2. Hardaliye örneklerinin üretim ve depolama süresince toplam asitlik miktarlarındaki değişim

3.1.3 İndirgen Şeker Miktarı

Çizelge 4.3'te üretim ve depolama süresince indirgen şeker miktarlarında belirlenen değişimler verilmiştir. Üretimin başlangıcında (0. gün) %24,96 olan indirgen şeker miktarı fermantasyonun 7. günü sonunda BH örneğinde %7,93, KH örneğinde %16,45 olarak tespit edilmiştir. Depolama sonunda örneklerin indirgen şeker miktarlarında; BH örneğinde %0,23, KH örneğinde %0,35 artış gözlemlenmiştir.

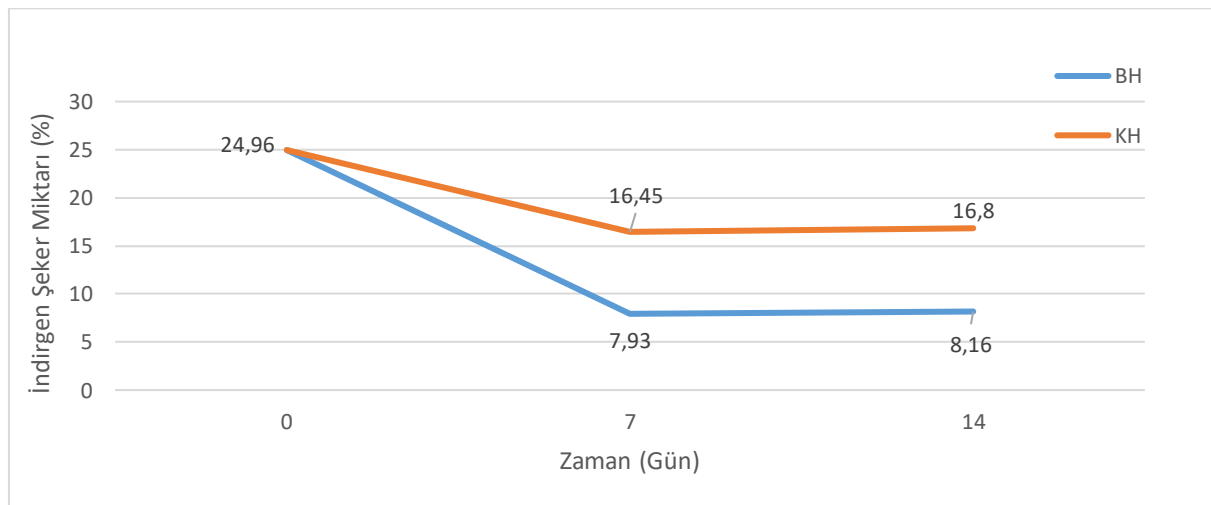
Çizelge 3.3. Hardaliye örneklerinin üretim ve depolama aşamalarındaki indirgen şeker miktarları (%)

| Örnekler | Üretim | | Depolama |
|----------|----------------------------|---------------------------|--------------------------|
| | 0.Gün | 7. Gün | 14. Gün |
| BH | 24,96±1,59 ^{A,a*} | 7,93±0,32 ^{B,b} | 8,16±0,45 ^{B,b} |
| KH | 24,96±1,59 ^{A,a} | 16,45±1,32 ^{B,a} | 16,8±1,42 ^{B,a} |

¹Her bir sütunda, aynı küçük harflerle gösterilen değerler arasında istatistiksel olarak önemli bir fark yoktur ($p>0,05$) Her bir satırda, aynı büyük harflerle gösterilen değerler arasında istatistiksel olarak önemli bir fark yoktur ($p>0,05$)

Sonuçlar incelendiğinde farklı kültürlerle üretilmiş olan hardaliye örneklerinin üretim süresince belirlenen indirgen şeker miktarlarındaki değişimin istatistiksel açıdan önemli ($p<0,05$) olduğu, depolama süresince belirlenen değişimin ise istatistiksel olarak önemsiz ($p>0,05$) olduğu belirlenmiştir. Örnekler arasındaki farklılığın üretimin 7. gününde ve depolamanın 14. gününde önemli ($p<0,05$), 0. günde ise önemsiz olduğu ($p>0,05$) tespit edilmiştir.

Şekil 4.3'te hardaliye örneklerinin indirgen şeker miktarlarının fermantasyonla birlikte azaldığı, depolama sürecinde ise bir miktar arttığı açıkça görülmektedir. Coşkun [2] fermantasyon süresince indirgen şekerdeki bu azalmaları; ortamda bulunan mikroorganizmaların indirgen şekeri substrat olarak kullanmaları, laktik asit, etil alkol, CO₂ ve diğer bazı organik asitlere parçalamaları ile açıklamıştır. Hardaliye örneklerinin +4 °C'de 14 depolama süresince indirgen şeker miktarındaki artış; Coşkun ve ark. [106] antosiyaninlerin degradasyonu sonucu antosiyanidinlere bağlı şekerin serbest kalmasıyla ilişkilendirmişlerdir.



Şekil 3.3. Üretim ve depolama süresince hardaliyelerin indirgen şeker miktarında meydana gelen değişim

Bu çalışmadaki KH örneğinin fermantasyon sonundaki (7.gün) indirgen şeker miktarı ile Coşkun ve ark. [106]'nın geleneksel yöntemle ürettikleri hardaliyelerin indirgen şeker miktarlarının (%17,5-16,88) benzer olduğu görülmektedir. Yine bu çalışmadaki BH örneğinin 7. gündeki indirgen şeker miktarı, Faikoğlu [9]'nun farklı üzüm çeşitleri ile yapmış olduğu hardaliyelerin değerleriyle (8,810 g/L-10,91 g/L) yakın olduğu görülmektedir.

3.1.4 Alkol Miktarı

Hardaliye üretiminin başlangıcında alkol tespit edilmemiştir (Çizelge 4.4). BH örneğinde fermantasyon sonunda (7. gün) %5,5 alkol oluşumu gözlemlenirken, KH örneğinde üretim ve depolama süresince alkol oluşumu gözlemlenmemiştir. BH örneğinin üretim ve depolama süresince alkol miktarındaki değişimin istatistiksel açıdan önemsiz olduğu belirlenmiştir ($P>0,05$).

Çizelge 3.4. Hardaliye örneklerinin üretim ve depolama aşamalarındaki alkol miktarları (%)

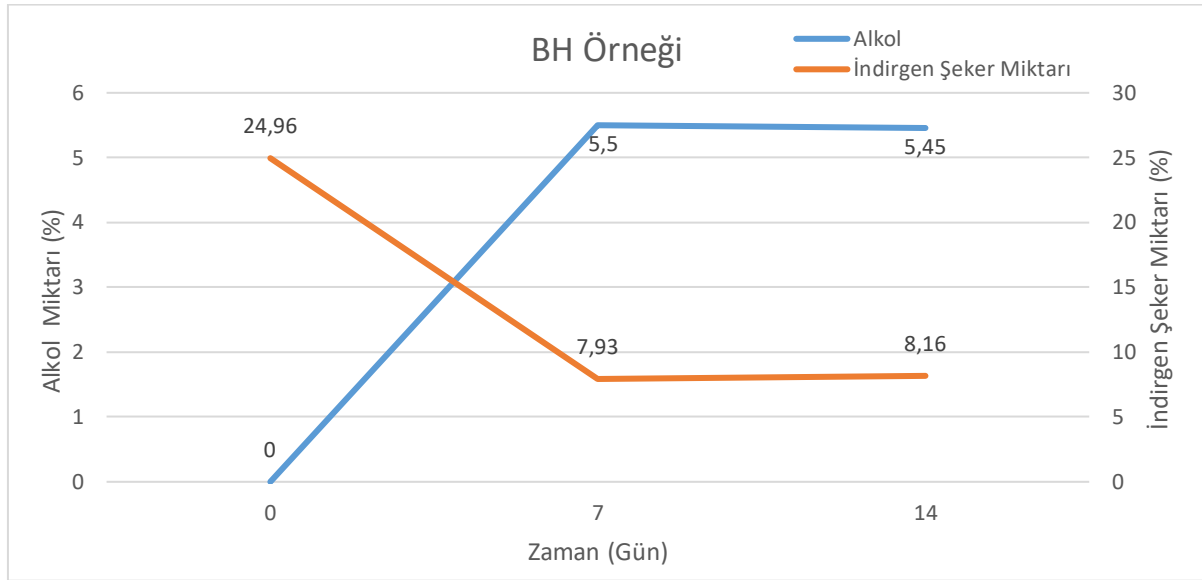
| Örnekler | Üretim | | Depolama |
|----------|-------------------|----------------------|------------------------|
| | 0.Gün | 7. Gün | 14. Gün |
| BH | 0±0 ^{B1} | 5,5±0,3 ^A | 5,45±0,24 ^A |
| KH | 0±0 | 0±0 | 0±0 |

¹Her bir satırda, aynı büyük harflerle gösterilen değerler arasında istatistiksel olarak önemli bir fark yoktur ($p>0,05$)

Coşkun ve ark. [105] tarafından Kırklareli'nin farklı bölgelerinden toplanan yirmi üç hardaliye örneği ve laboratuvar şartlarında geleneksel metotla beş farklı üzüm çeşidi kullanılarak üretilen hardaliye örneklerinin fizikokimyasal, fonksiyonel ve mikrobiyolojik özellikleri araştırılmıştır. Laboratuvar ortamında üretilen hardaliyelerde alkol tespit edilmezken, yöre halkından toplanan hardaliye örneklerinde en çok %6 alkol tespit edilmiştir. Değerlerin bu çalışmadaki BH örneğinin 7. gündeki alkol miktarına yakın olduğu görülmektedir.

Ayed ve ark. [69] yapmış oldukları çalışmada üzüm suyunda kombucha fermantasyonu sırasında etanoldeki değişiklikler gözlemlenmiştir. Yapılan çalışmada 6. günde etanol miktarı 0,52 g/100 ml, 12. günde bu değer 0,29 g/100 ml olarak ölçülmüştür. Tarhan [103]'nin yapmış olduğu çalışmada; kahve ve çeşitli bitki, meyve çaylarında farklı karbon kaynakları kullanarak gerçekleştirdiği kombucha fermantasyonu sonucunda, çalışmamızda KH örneğinde olduğu gibi alkol tespit edilmemiştir. Bu durum, kombucha fermantasyonunda asıl olanın asetik asit

fermantasyonu olduğu ve mayalar tarafından üretilen etanolün asetik aside dönüşümüyle ilişkilendirmişlerdir.



Şekil 3.4. BH örneğinin indirgen şeker ve alkol miktarlarındaki değişim

Şekil 4.4'teki BH örneğinde fermantasyon süresince indirgen şeker miktarında hızlı bir düşüş gözlenirken, alkol miktarında da eş zamanlı artış olduğu görülmektedir. Bu durum; ortamda bulunan mikroorganizmaların indirgen şekeri substrat olarak kullanarak, laktik asit, etil alkol, CO₂ ve diğer bazı organik asitlere parçalamaları ile açıklanabilir[2].

KH örneğinde üretim ve depolama süresince alkol tespit edilememiştir. Bu kombucha mantarında bulunan mayaların ve asetik asit bakterilerinin simbiyotik birlikteliği ile açıklanabilir. Üzüm suyunda bulunan glukoz ortamdaki asetik asit bakterileri tarafından glukonik aside dönüştürülürken, fruktoz mayalar tarafından etanole çevrilir. Mayaların ürettiği etanol ise, yine asetik asit bakterileri tarafından asetik aside dönüştürülür [46].

Türk Gıda Kodeksi Alkolsüz İçecekler Tebliği'ne (Tebliğ No: 2007/26) göre Tebliğ kapsamında yer alan içeceklerde üretimin doğasından kaynaklanabilecek etil alkol miktarının en çok 3,0 g/L (yaklaşık % 0,4 v/v) olması gerektiği belirtilmiştir [107]. Bu çalışmada BH örneğinin alkol miktarı belirlenen sınırın çok üstündedir. Bu açıdan hardaliye fermantasyonu sırasında alkol oluşumunun engellenmesi oldukça önemlidir.

3.1.5 Fenolik Madde Miktarı

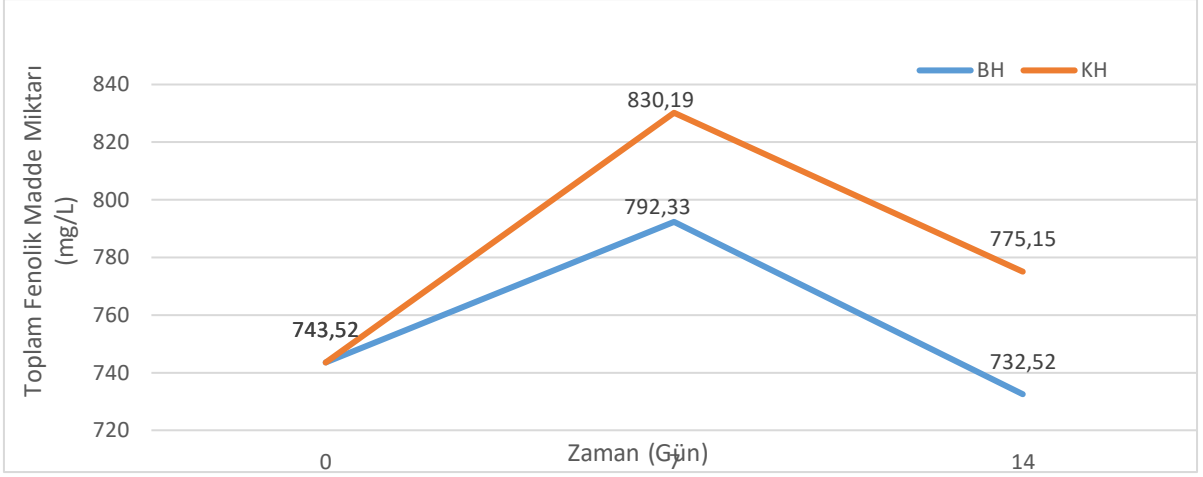
Çizelge 4.5 incelendiğinde hardaliye örneklerinin başlangıçtaki fenolik madde miktarları aynı olup 743,52 mg GAE/L olarak ölçülmüştür. En yüksek fenolik madde miktarları 7. günde; BH’de 792,33 mg GAE/L, KH’de 830,19 mg GAE/L olarak tespit edilmiştir ($p<0,05$). 14 gün +4 °C’de depolanan hardaliye örneklerinin fenolik madde miktarında BH’de %7,6, KH’de %6,6 oranında azalma meydana gelmiştir ($p<0,05$). Hardaliye örnekleri arasındaki farklılık incelendiğinde; üretimin 7. ve depolamanın 14. günlerindeki fenolik madde miktarları istatistiksel açıdan önemli bulunurken ($p<0,05$), 0. günde hardaliler arasındaki farkın önemsiz ($p>0,05$) olduğu saptanmıştır.

Çizelge 3.5. Hardaliye örneklerinin üretim ve depolama aşamalarındaki fenolik madde miktarları (mg GAE/L)

| Örnekler | Üretim | | Depolama |
|----------|-----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| | 0.Gün | 7. Gün | 14. Gün |
| BH | 743,52±1,79 ^{B,a1} | 792,33±6,84 ^{A,b} | 732,52±6,28 ^{C,b} |
| KH | 743,52±1,79 ^{C,a} | 830,19±7,36 ^{A,a} | 775,15±7,56 ^{B,a} |

¹Her bir sütunda, aynı küçük harflerle gösterilen değerler arasında istatistiksel olarak önemli bir fark yoktur ($p>0,05$)
Her bir satırda, aynı büyük harflerle gösterilen değerler arasında istatistiksel olarak önemli bir fark yoktur ($p>0,05$)

Coşkun ve ark. [105] Kırklareli’ nin farklı bölgelerinden toplanan yirmi üç hardaliye ve laboratuvar şartlarında geleneksel metotlarla beş farklı üzüm çeşidi kullanılarak üretilen hardalilerin fizikokimyasal, fonksiyonel ve mikrobiyolojik özelliklerini araştırmışlardır. Yöre halkından toplanan yirmi üç hardaliyede toplam fenolik madde miktarı 368-2727 mg/L aralığında, beş farklı kırmızı üzüm çeşidi ile yapılan hardaliye örneklerinde 961,8-2286 mg/L aralığında bulunmuştur. Bu çalışmada fermantasyon sonunda (7. gün) hardaliye örneklerinde tespit edilen toplam fenolik madde miktarı yöre halkından toplanan hardaliye örnekleriyle benzerlik göstermektedir.



Şekil 3.5. Hardaliye örneklerinde üretim ve depolama süresince toplam fenolik madde miktarındaki değişim

Gündüz ve ark. [70] yapmış olduğu çalışmada üzüm suyunun toplam fenolik madde miktarını 1515,27 mg/L, üzüm suyunun fermente edilmesi sonucu üretilen hardaliyelerin toplam fenolik madde miktarını ev yapımı hardaliyede 2029,20 mg GAE/L, ticari hardaliyede ise 2193,08 mg GAE/L olarak belirlemişlerdir. Bayram ve ark. [108] geleneksel yöntemle müşküle üzümünden ürettikleri hardaliye örneklerinin toplam fenolik bileşen miktarının fermantasyonun ilk gününde 232,85 mg/L, fermantasyonun sonunda ise 272,53 mg/L olduğunu bildirmişlerdir. Yapılan bu çalışmalarda [70, 108] üzüm suyunun hardaliyeye işlenmesi sonucu toplam fenolik bileşen miktarı belirgin olarak artmıştır. Bu çalışmada da fermantasyonla birlikte hardaliye örneklerinin toplam fenolik madde miktarında BH örneğinde %6,7, KH örneğinde ise %11,7 artış gözlemlenmiştir (Şekil 4.5). Bu çalışmada hardaliye üretiminde kullanılan üzüm suyunun fenolik madde miktarının Gündüz ve ark. [70] çalışmasına kıyasla düşük, Bayram ve ark. [108] çalışmasına kıyasla yüksek olduğu görülmektedir. Bu durum; üzüm suyunun fenolik madde miktarının üzüm çeşidine, olgunluğuna, bağcılık uygulamalarına, üzümün yetiştirildiği bölgeye ve işleme yöntemlerine göre değişim göstermesi ile açıklanabilir [65].

Ayed ve ark. [69] yapmış oldukları çalışmada; üzüm suyunun kombucha mantarı ile fermantasyonu sırasında toplam fenolik madde miktarında fermantasyonun 6. gününe kadar artış gözlemlenmiştir. Bu artışı glukonobakterin, polifenollerin biyoerişebilirliğini ve içeceklerin antioksidan aktivitesini arttırmasıyla, 8. günden itibaren meydana gelen düşüşü fenolik bileşiklerin daha düşük polifenol içeriğinin saptanmasına yol açan daha düşük ağırlıklı moleküllere polimerizasyonu ile ilişkilendirmişlerdir. Bu çalışmada da benzer durum

gözlemlenmiş olup KH ve BH örneklerinin toplam fenolik madde miktarlarındaki artış ve azalış Şekil 4.5'te açıkça görülmektedir.

Üretim ve depolama süresince KH ve BH örneklerinin fenolik madde miktarlarındaki farklılık Çam ve ark. [109] yapmış oldukları araştırma ile açıklanabilir. Araştırmada; fermantasyon için uygun kültür seçiminin fermantasyonun sonunda oluşan ürünün fenolik profilini ve fenolik madde miktarını etkileyebileceğini, iyi fenolik profilin elde edilebilmesi için karışık kültür kullanılması gerektiğini ve farklı kültürler kullanılarak ürünün fenolik profilinin kontrol edilebileceğini öne sürmüşlerdir.

3.1.6 Hardaliye Örneklerinin Renk Değerleri

Gıdanın kalitesi ve kabul edilebilirliği açısından renk önemli bir kriterdir. Ham gıdanın işlenmesi ve depolanması süresince renkte meydana gelen değişimlere dikkat edilmelidir [110]. Üzüm sularında istenilen kırmızı renk antosiyanin varlığından kaynaklanmaktadır. Üzümün antosiyanin içeriği; üzümün çeşidi, olgunluğu, hasat yılı, çevre koşulları vb. gibi birçok faktöre bağlı olarak değişim göstermektedir [111]. Bu çalışmadaki hardaliye örneklerinin renk değerleri Çizelge 4.6'da verilmiştir.

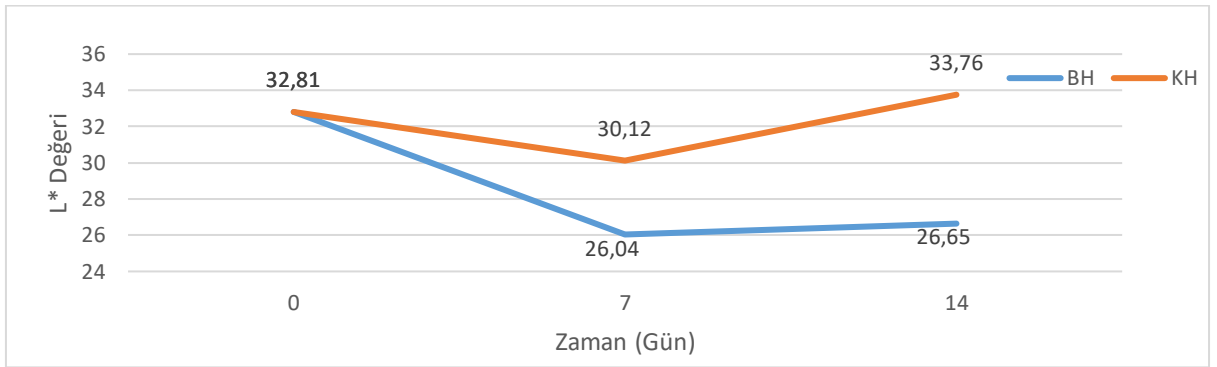
Çizelge 3.6. Hardaliye örneklerinin üretim ve depolama süresince renk değerleri değişimi

| Örnekler | Üretim | | Depolama | |
|-----------|--------|----------------------------|---------------------------|---------------------------|
| | 0.Gün | 7. Gün | 14. Gün | |
| BH | L* | 32,81±0,61 ^{A,a1} | 26,04±2,7 ^{B,b} | 26,65±2,32 ^{B,b} |
| | a* | 52,73±0,10 ^{A,a} | 49,06±0,94 ^{B,a} | 48,93±0,93 ^{B,a} |
| | b* | 33,69±0 ^{C,a} | 36,57±0,51 ^{A,a} | 36,05±0,01 ^{B,a} |
| KH | L* | 32,81±0,61 ^{A,a} | 30,12±2,44 ^{B,a} | 33,76±1,65 ^{A,a} |
| | a* | 52,73±0,10 ^{A,a} | 43,1±0,29 ^{B,b} | 45,76±2,81 ^{B,b} |
| | b* | 33,69±0 ^{A,a} | 33,00 ±1,5 ^{A,b} | 32,21±1,49 ^{A,b} |

¹Her bir sütunda, aynı küçük harflerle gösterilen değerler arasında istatistiksel olarak önemli bir fark yoktur (p>0,05) Her bir satırda, aynı büyük harflerle gösterilen değerler arasında istatistiksel olarak önemli bir fark yoktur (p>0,05)

3.1.6.1 L* değerleri

Fermantasyonda kullanılan üzüm suyunun 0. günde L* değeri 32,81 olarak ölçülmüştür (Çizelge 4.6). Hardaliye örneklerinin L* değerleri incelendiğinde; üretimin 7. gününde ölçülen L* değerleri BH örneğinin 26,04, KH örneğinin 30,12'dir. Fermantasyon süresince her iki hardaliye örneğinin parlaklık düzeyinde istatistiksel olarak önemli kayıpların olduğu belirlenmiştir ($p < 0,05$). 14 gün +4 °C depolanan hardaliye örneklerinin L* değerleri BH 26,65, KH 33,76 olarak ölçülmüştür. Depolama süresince BH örneğinde anlamlı bir değişim gözlenmezken ($p > 0,05$), KH örneğindeki değişim istatistiksel olarak önemli ($p < 0,05$) bulunmuştur.



Şekil 3.6. Hardaliye örneklerinin üretim ve depolama süresince renk (L*) değişimi

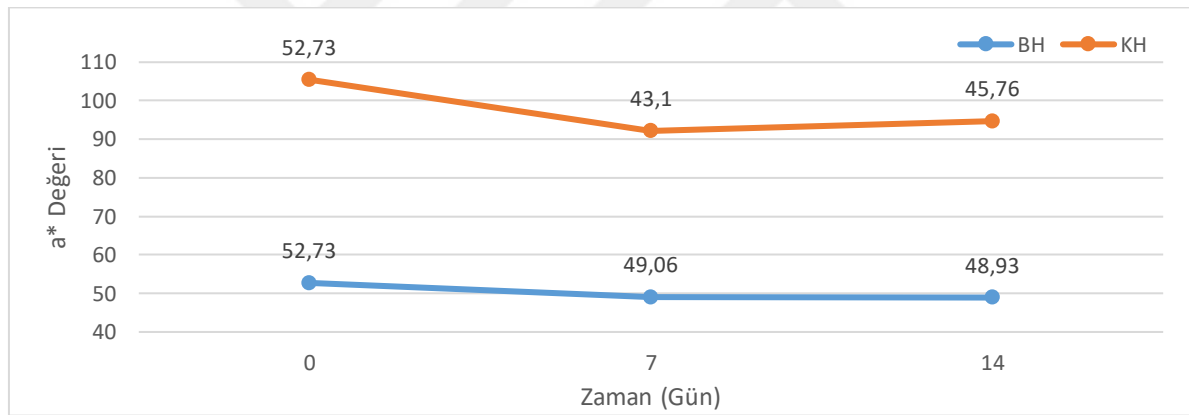
Fermantasyon süresince hardaliye örneklerinin L* değerlerindeki azalma Şekil 4.6'da açıkça görülmektedir. Khoo ve ark. [112] çalışmasında üzümde yüksek miktarda bulunan antosiyenin pigmentinin asidik koşullarda daha kırmızı görüldüğünü ve pH düşüşünün kırmızı rengi daha kararlı hale getirdiğini, bu pigmentlerin renginin ve stabilitesinin; pH, ışık ve sıcaklıktan etkilendiğini bildirmişlerdir. Bunun yanı sıra fermantasyon sırasında mikroorganizma seviyesindeki artışın üzüm suyundaki bulanıklığı arttırmasıyla L* değerinde azalmaya sebep olduğu düşünülmüştür. Bayram ve ark. [108] yapmış olduğu çalışmada müşküle üzümü ile hardaliye üretimi gerçekleştirmişlerdir. Hardaliye üretiminde şıra ve cibre birlikte olacak şekilde, %1.5 hardal tohumu, %0.1 oranında sodyum benzoat ilave edilerek 28-30 °C'de fermantasyona tabi tutulmuştur. Fermantasyonun başlangıcında L* değeri 26,88 iken fermantasyonun sonunda 19,39'a düştüğünü bildirilmişlerdir. Bu çalışmamızda da hardaliye örneklerinin L* değerinde üretim süresince düşüş gözlemlenmiştir.

Watawana ve ark. [113] kombucha ile yapmış oldukları çalışmada L* değerindeki düşüşü fermantasyona bağlı olarak pH'ın azalması ve mikroorganizma gelişmesi sonucunda renk pigmentlerinin ve polifenolik bileşenlerin parçalanmasından kaynaklandığını ileri

sürmüşlerdir. Bu çalışmada üretim ve depolama boyunca L* değerindeki değişimler; ortamdaki mikroorganizma sayılarındaki değişim, pH'da meydana gelen düşüşler, depolama sırasında örneklerin +4 °C'ye alınarak bir miktar ısı değişimine maruz kalmasıyla açıklanabilir.

3.1.6.2 a* değerleri

a* değeri; renkteki yeşilden kırmızıya değişimi göstermekte ve -120 ile 120 arasında değişmektedir. Üretim ve depolama boyunca hardaliye örneklerinin a* değerleri pozitifdir ve bu durum kırmızı rengi temsil etmektedir. Örneklerin a* değerleri Çizelge 4.6'da görülmektedir. Fermantasyon süresince hardaliye örneklerinin a* değerlerinde; BH örneğinde 3,67 birimlik, KH örneğinde ise 9,63 birimlik anlamlı bir azalma saptanmıştır ($p<0,05$). Depolama boyunca KH örneğinin a* değerinde artış, BH örneğinde azalış görülsede bu değişimler istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$) (Şekil 4.7). KH ve BH örnekleri kıyaslandığında; üretimin 7. ve depolamanın 14. günlerinde belirlenen a* değerleri istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$).



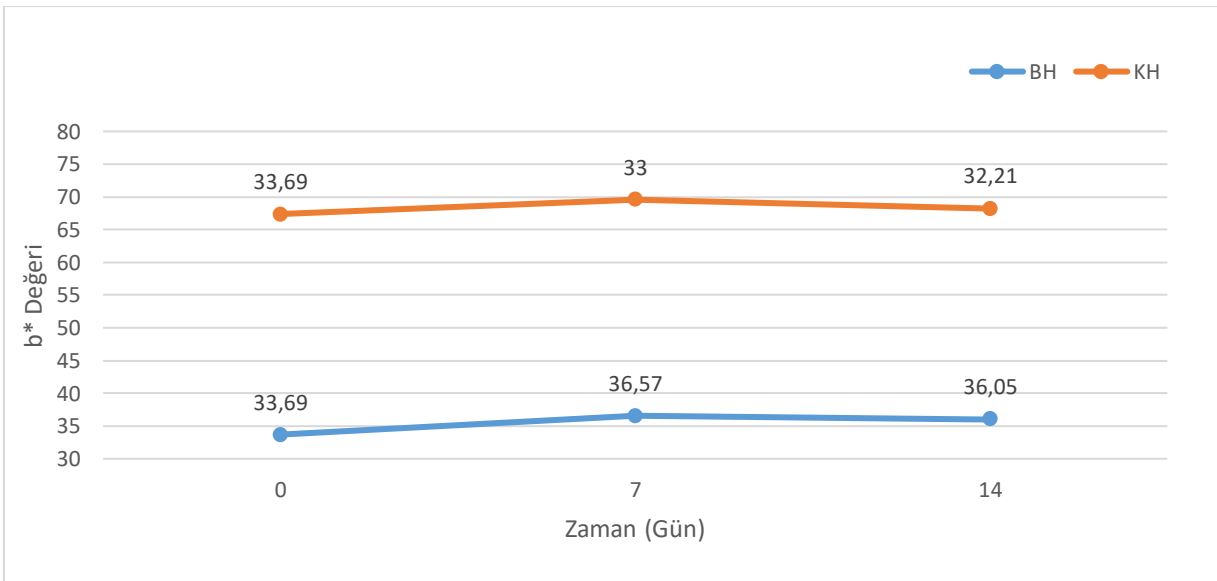
Şekil 3.7. Hardaliye örneklerinin üretim ve depolama süresince renk (a*) değişimi

3.1.6.3 b* değerleri

b* değeri (+) ise sarı, (-) ise mavi rengi göstermektedir. Depolama boyunca ölçülen pozitif sonuçlar hardaliye örneklerinin sarı renk değerini göstermektedir. Kırmızı üzüm suyu kullanılarak üretilen hardaliyelerin başlangıçta renk tonu kırmızıdır ve sarı tonun az olması istenir. Çizelge 4.6'deki istatistiksel veriler incelendiğinde 0. günde b* değerleri 33,69 olarak ölçülmüş ve istatistiksel olarak anlamsız bulunmuştur ($p>0,05$). Üretim ve depolama boyunca hardaliye örneklerinin b* değerleri arasındaki farklılıklar önemli bulunmuştur ($p<0,05$). KH örneğinde üretim ve depolama süresince önemli bir değişim gözlemlenmemiştir ($p>0,05$). BH örneğindeki en yüksek b* değeri 7. günde 36,57 olarak ölçülmüş ve daha sonra depolama sırasında bir miktar azalma gözlemlenerek depolamanın 14. gününde 36,05 olarak ölçülmüştür.

BH örneğindeki üretim ve depolama süresince meydana gelen değişimler önemli bulunmuştur ($p<0,05$).

Tarhan [103] farklı bitki-meyve ve kahvede kombucha mantarının gelişimini ve çeşitli şeker kaynakları ile gelişimdeki farklılıkları araştırmıştır. Araştırmada nar çayına ait tüm karbon kaynaklarında b^* değerinin fermantasyondan etkilenmediği tespit edilmiştir. Aynı çalışmada yaban mersini ve kuşburnu çaylarında yalnız ksiloz şekerine ait örneklerin L^* ve b^* değerlerinde fermantasyona bağlı azalma olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışmadaki KH örneğinde fermantasyon ve depolama boyunca b^* değerinde anlamlı bir farklılık gözlemlenmezken, BH örneğinde farklılık tespit edilmiştir.



Şekil 3.8. Hardaliye örneklerinin üretim ve depolama süresince renk (b^*) değişimi

Watawana ve ark. [113] kombucha ile yapmış oldukları çalışmada a^* değerindeki değişimleri ve L^* , b^* değerindeki düşüşü; fermantasyona bağlı olarak pH'ın azalması, ortamda gelişen mikroorganizmalar tarafından renk pigmentlerinin ve polifenolik bileşenlerin parçalanmasıyla ilişkilendirmişlerdir.

3.1.7 Reolojik Ölçümler

Gıda maddeleri için önemli kalite kriteri olan reolojik özelliklerin bilinmesi; pompalama, karıştırma, ısı alışverişi gibi prosesler ve makine tasarımları için önemlidir. Aynı zamanda gıdaların işlenmesi sırasında giren ve çıkan ürünleri kontrol etmek, işlem hammadde arasındaki ilişkiyi araştırmak ve son ürün yapısını incelemek için gereklidir. Viskozite, sıvı

içerisindeki kayma kuvvetleri nedeniyle oluşan direncin büyüklüğünü tanımlayan, akış karakteri üzerinde büyük bir etkiye sahip olan sıvı özelliğidir [114].

Çizelge 3.7. Hardaliye örneklerinin üretim ve depolama boyunca viskozite değişimi (Pa.s)

| Örnekler | Üretim | | Depolama |
|----------|----------------------------|---------------------------|--------------------------|
| | 0.Gün | 7. Gün | 14. Gün |
| BH | 2,048±0,02 ^{B,a1} | 3,82±1,46 ^{A,a} | 3,79±1,28 ^{A,b} |
| KH | 2,048±0,02 ^{C,a} | 2,77±0,055 ^{B,a} | 5,62±0,43 ^{A,a} |

¹Her bir sütunda, aynı küçük harflerle gösterilen değerler arasında istatistiksel olarak önemli bir fark yoktur ($p>0,05$) Her bir satırda, aynı büyük harflerle gösterilen değerler arasında istatistiksel olarak önemli bir fark yoktur ($p>0,05$)

Hardaliye örneklerinin üretim ve depolama boyunca viskozite değerlerindeki değişim Çizelge 4.8'de verilmiştir. BH ve KH örneklerinin 0. gün viskozite değerleri 2,048 Pa.s olarak ölçülmüştür. BH örneğinin üretim süresince viskozite değerindeki artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$). KH örneğinde en yüksek viskozite değeri depolama sonunda (14. günde) 5,62 olarak ölçülmüştür. Fermantasyon süresince 0,722, depolama boyunca 2,86'lık istatistiksel olarak önemli bir artış tespit edilmiş ($p<0,05$). Farklı starterler kullanılarak üretilen hardaliye örneklerinin viskozite değerleri birbiri ile kıyaslandığında üretimin 0. ve 7. günlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık tespit edilmezken ($p>0,05$), depolamanın 14. gününde örnekler arasındaki farklılık önemli bulunmuştur ($p<0,05$).

Watawana ve ark. [113] çalışmalarında; hindistan cevizi suyunu kombucha mantarı ile 7 gün boyunca fermente etmişlerdir. Bu çalışmada olduğu gibi fermantasyona bağlı olarak viskozitenin arttığını bildirmişlerdir.

3.2 Hardaliye Örneklerinin Üretim ve Depolama Boyunca Mikrobiyolojik Analiz Sonuçları

3.2.1 Toplam Aerobik Mezofilik Canlı Bakteri (TMAB) Sayıları

Bu çalışmada substrat olarak kullanılan üzüm suyu, hardal tohumu ve vişne yaprağı karışımı hammadde kaynaklı mikrobiyal bulaşmayı önlemek amacıyla pastörize edilmiştir. Isıl işlem sonrası 0. günde TMAB'ye rastlanmamıştır (Çizelge 4.9). BH örneğinde TMAB sayısı 7. günde 5,58 log kob/ml olarak bulunmuştur. +4 °C'de 14 gün depolamanın sonunda 4,49 log

kob/ml olarak belirlenmiş ve depolama süresince anlamlı bir azalma olduğu görülmüştür ($p<0,05$). KH örneğinde 7. günde 4,55 log kob/ml, depolamanın 14. gününde anlamlı bir azalma gözlemlenerek 3,1 log kob/ml olarak belirlenmiştir ($p<0,05$). BH ve KH örnekleri arasında 7. günde istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlemlenmezken ($p>0,05$), depolamanın 14. gününde örnekler arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$).

Çizelge 3.8. Hardaliye örneklerinin üretim ve depolama süresince toplam mezofilik aerobik bakteri (TMAB) sayılarındaki (log kob/ml) değişim

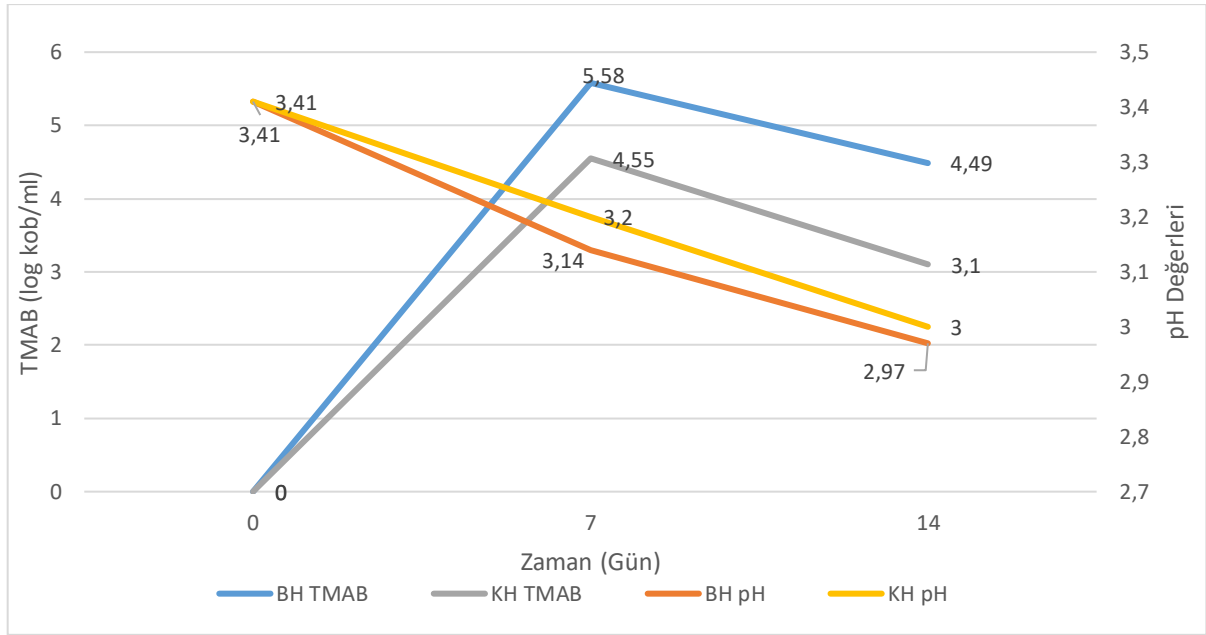
| TMAB Sayıları | Ürünler | Üretim | | Depolama |
|---------------|---------|-------------------|--------------------------|--------------------------|
| | | 0.Gün | 7. Gün | 14. Gün |
| | BH | 0±0 ^{C1} | 5,58±0,06 ^{A,b} | 4,49±0,49 ^{B,a} |
| | KH | 0±0 ^C | 4,55±0,02 ^{A,b} | 3,1 ±0,14 ^{B,b} |

¹Her bir sütunda, aynı küçük harflerle gösterilen değerler arasında istatistiksel olarak önemli bir fark yoktur ($p>0,05$) Her bir satırda, aynı büyük harflerle gösterilen değerler arasında istatistiksel olarak önemli bir fark yoktur ($p>0,05$)

Coşkun [2]'nin çalışmasında, geleneksel metodla üretilen hardaliye örneklerinin canlı bakteri sayıları en az (pH 3,21) 2,04 log kob/ml, en çok (pH 4,12) 5,9 log kob/ml ortalama (pH 3,58) 4,9 log kob/ml olarak belirlenmiştir. O çalışmanın sonuçlarının bu çalışmanınkilerle benzer olduğu görülmektedir.

Coşkun ve ark. [105] çalışmalarında yöre halkından toplanan hardaliyelerin TMAB sayılarının en az 1 log kob/m, en çok 6,5 log kob/ml olduğunu bildirmişlerdir. Bulunan değerlerle bu çalışma sonuçlarının yakın olduğu görülürken, bazı çalışmalarla [104,108] bu çalışma sonuçlarının uyumlu olmadığı görülmüştür. Bu durumu Bayram ve ark. [108] hardaliye üretimi sırasında tercih edilen üretim metodu ve starter kültür ile ilişkilendirmiştir.

KH ve BH örneklerinin depolamada belirlenen TMAB sayılarındaki azalış, ürünlerdeki asitlik artışından kaynaklanabilir. Nitekim Coşkun [2] çalışmasında hardaliye pH'sının düşük olması birçok mikroorganizmaya karşı öldürücü ve/veya inhibe edici etkiye neden olabileceğini ileri sürmüştür. Şekil 4.9'da hardaliye örneklerinde üretim ve depolama süresince pH'da meydana gelen değişim ve buna bağlı olarak TMAB sayılarındaki azalma açıkça görülmektedir.



Şekil 3.9. Hardaliye örneklerinde üretim ve depolama süresince pH'daki değişimin TMAB sayısına etkisi

3.2.2 Maya Sayıları

Çizelge 4.10 incelendiğinde 0. günde pastörize üzüm suyu, hardal tohumu ve vişne yaprağı karışımından oluşan üründe maya tespit edilmemiştir. Hardaliye örneklerinde üretim ve depolama süresince küf gelişimi gözlemlenmemiştir. Farklı starter kültür ilavesi yapılan örneklerden BH örneğinde üretim süresince maya gelişimi görülmüş olup 7. günde bu değer 5 log kob/ml olarak belirlenmiştir. +4 °C'de 14 gün muhafaza edilen BH örneğinin depolama sonunda maya sayısı 4,65 log kob/ml olarak belirlenmiş ve istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$). KH örneğinin maya/ küf sayısı 7. günde 3,7 log kob/ml olarak belirlenmiş ve depolama boyunca anlamlı bir azalma olduğu tespit edilmiştir ($p<0,05$). Hardaliye örneklerinin üretim ve depolama süresince maya sayılarındaki farklılık istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($p<0,05$).

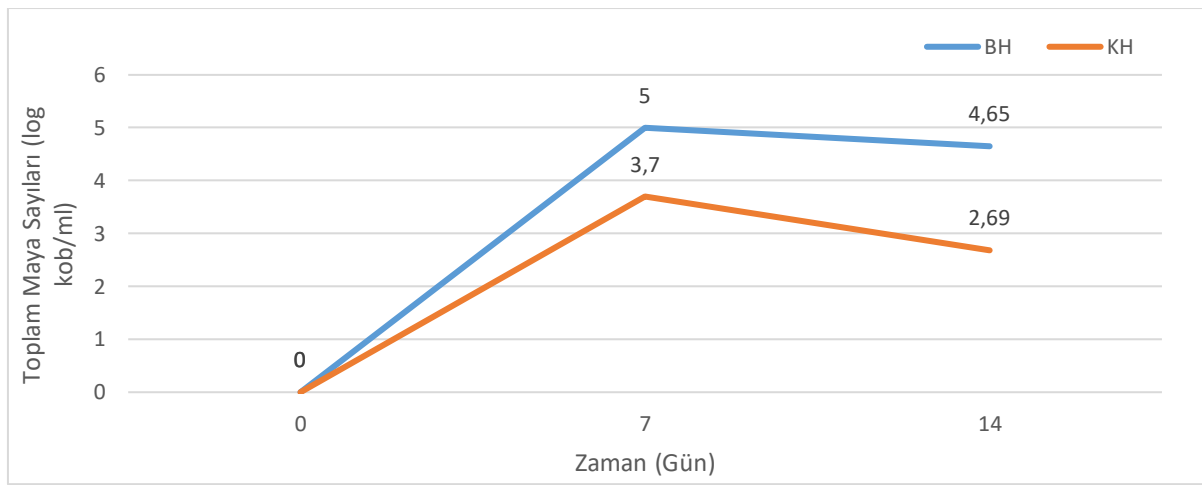
Çizelge 3.9. Hardaliye örneklerinin üretim ve depolama süresince toplam maya sayılarındaki (log kob/ml) değişim

| | Ürünler | Üretim | | Depolama |
|---------------|---------|-------------------|--------------------------|--------------------------|
| | | 0.Gün | 7. Gün | 14. Gün |
| Maya Sayıları | BH | 0±0 ^{C1} | 5,00±0,07 ^{A,a} | 4,65±0,19 ^{B,a} |
| | KH | 0±0 ^C | 3,7±0,11 ^{A,b} | 2,69±0,15 ^{B,b} |

¹Her bir sütunda, aynı küçük harflerle gösterilen değerler arasında istatistiksel olarak önemli bir fark yoktur ($p>0,05$) Her bir satırda, aynı büyük harflerle gösterilen değerler arasında istatistiksel olarak önemli bir fark yoktur ($p>0,05$)

Coşkun [2] yöre halkından topladığı geleneksel yöntemle üretilmiş hardaliye örneklerinin maya sayılarını en çok 6,48 log kob/ml, en az 1 log kob/ml ve ortalama 4,29 log kob/ml olarak bulmuştur. Bu çalışmadan elde edilen sonuçların bu değerlere yakın olduğu görülmektedir.

Gürbüz [104] hardaliye ile ilgili yapmış olduğu çalışmada mayaların optimum gelişme sıcaklığının 20-30°C arasında olduğunu belirterek, hardaliye örneklerinin +4 °C’de depolamada sıcaklığa bağlı olarak maya sayılarında azalma gözlenebileceğini ileri sürmüştür. Bu çalışmada da +4 °C’de depolama süresince KH ve BH örneklerinin maya sayılarında meydana gelen düşüşü sıcaklıkla ilişkilendirebiliriz (Şekil 4.10).

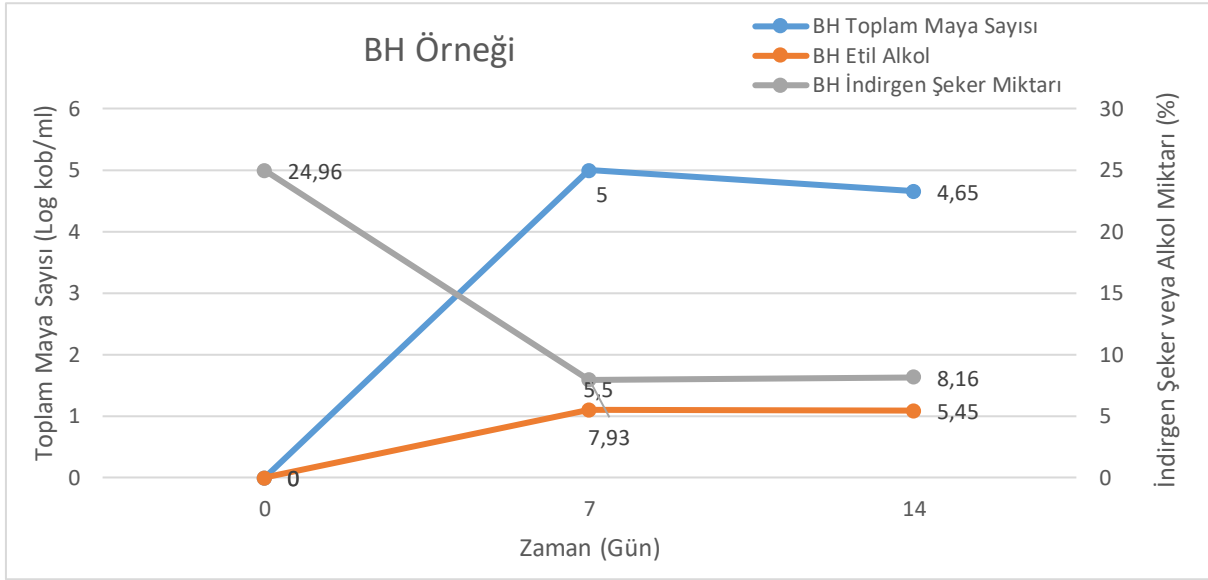


Şekil 3.10. Hardaliye örneklerinin üretim ve depolama süresince toplam maya sayılarındaki değişim

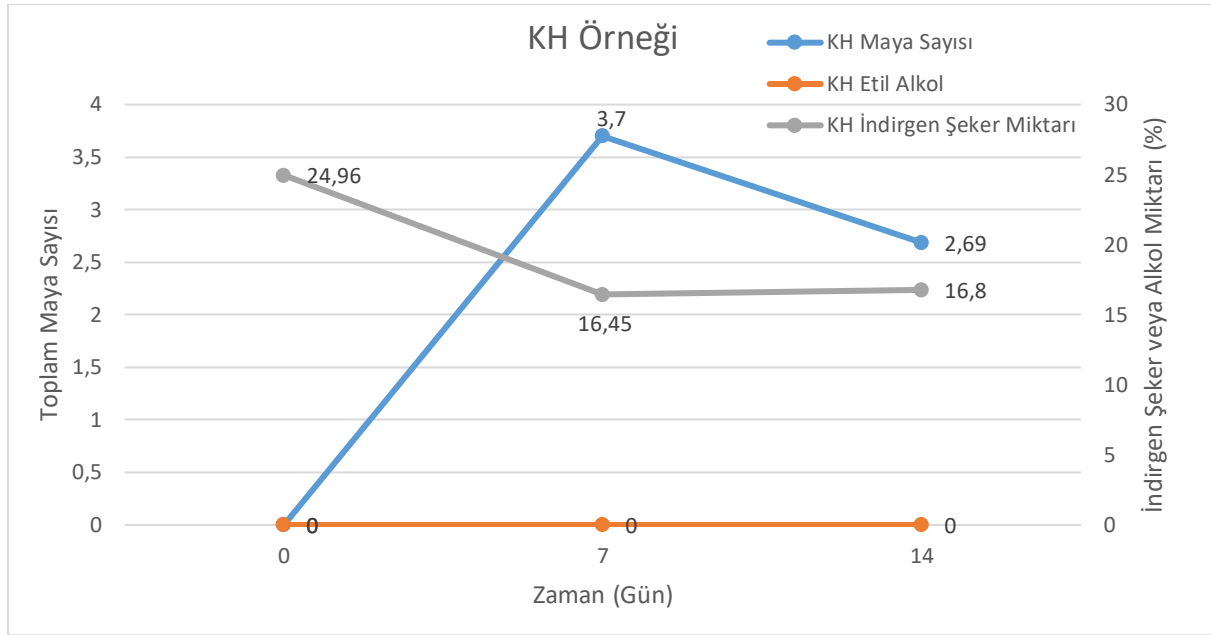
Coşkun ve ark. [106] farklı yöntemlerle üretilen hardaliye örneklerinde +4 °C’de 1 yıl depolama sonrası meydana gelen değişimleri inceledikleri çalışmalarında; geleneksel yöntemle üretilen hardaliye örneğinde maya/ küf sayısı depolama öncesi 4,01 log kob/ml belirlenirken depolama sonrası belirlenememiştir. Pastörize edilmiş üzüm suyu ve kültür ilaveli örnekte depolama öncesi maya gelişimi belirlenemezken, depolama sonrası 3,60 log kob/ml olarak bulunmuştur. Yapılan çalışmadaki maya/ küf değerlerinin bu çalışmadaki değerlerle olan farklılığı hardaliye üretim metodunun ve depolama sürelerinin farklılığından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Türk Gıda Kodeksi Alkolsüz İçecekler Tebliği’ne (Tebliğ No: 2007/26) göre Tebliğ kapsamında yer alan içeceklerde üretimin doğasından kaynaklanabilecek etil alkol miktarı en çok 3,0 g/L olması gerektiği belirtilmiştir [107]. Bu açıdan hardaliye fermantasyonu sırasında maya sayısının inhibe edilmesi ve alkol oluşumunun engellenmesi oldukça önemlidir.

Şekil 4.11'deki BH örneğinde fermantasyon süresince maya gelişimi ile birlikte ortamdaki etil alkol miktarında artış, invert şeker miktarında azalma gözlemlenmiştir. KH örneğinde ise maya gelişimi BH örneğine nazaran daha düşüktür. Şekil 4.12'de KH örneğinde üretim süresince maya sayılarında bir miktar artış gözlemlenirken indirgen şeker miktarında BH örneğine nazaran azalma az görülmüştür. Alkol oluşumu gözlemlenmemiştir. Bu durumun; KH fermantasyonu sırasında mayalar ve asetik asit bakterilerinin simbiyotik birlikteliğinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Üzüm suyunda bulunan glukoz, ortamdaki asetik asit bakterileri tarafından glukonik aside dönüştürülürken, fruktoz mayalar tarafından etanole çevrilir. Mayaların ürettiği etanol ise, yine asetik asit bakterileri tarafından asetik asite dönüştürülür [46].



Şekil 3.11. BH örneğinin üretim-depolama süresince indirgen şeker ve etil alkol miktarları, maya sayılarındaki değişim



Şekil 3.12. KH örneğinin fermantasyon-depolama süresince indirgen şeker ve etil alkol miktarları, maya sayılarındaki değişim

3.2.3 Laktik Asit Bakteri (LAB) Sayıları

3.2.3.1 *Lactobacillus spp.* sayıları

Çizelge 4.11’de hardaliye örneklerindeki laktobasillerin gelişimi incelendiğinde; BH örneğinde üretim süresince gelişim gözlemlenmiş olup 7. günde 5,44 log kob/ml olarak belirlenmiştir. BH örneğinde depolama sonunda meydana gelen azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0,05$). KH örneğinin *Lactobacillus spp.* sayısı üretimin 7. gününde 4,15 log kob/ml olarak belirlenmiştir. 14 günlük depolama süresince meydana gelen değişim istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur ($p > 0,05$). Hardaliye örnekleri arasındaki farklılık üretim süresince istatistiksel olarak önemli ($p < 0,05$), depolama sonunda meydana gelen değişim önemsiz bulunmuştur ($p > 0,05$).

Çizelge 3.10. Hardaliye örneklerinin üretim ve depolama süresince *Lactobacillus spp.* sayılarındaki (log kob/ml) değişim

| Ürünler | Üretim | | Depolama | |
|------------------------------------|--------|-------------------|---------------------------|---------------------------|
| | 0.Gün | 7. Gün | 14. Gün | |
| Lactobacillus spp. sayıları | BH | 0±0 ^{C1} | 5,44±0,05 ^{A,a} | 4,32±0,19 ^{B,a} |
| | KH | 0±0 ^C | 4,15 ±0,13 ^{A,b} | 3,86 ±0,49 ^{A,a} |

¹Her bir sütunda, aynı küçük harflerle gösterilen değerler arasında istatistiksel olarak önemli bir fark yoktur ($p > 0,05$) Her bir satırda, aynı büyük harflerle gösterilen değerler arasında istatistiksel olarak önemli bir fark yoktur ($p > 0,05$)

Coşkun [2] çalışmasında, farklı hardal tohumları ile değişik laktik asit bakteri kültürleri (*Lactobacillus* spp.) aşılansarak hazırlanan hardalilerin 7 gün boyunca laktik asit bakteri sayılarındaki değişimi incelenmiştir. %1 siyah hardal tohumu ve *Lb. sanfransisco* kültürü ilaveli hardalide fermantasyonun 7. gününde laktik asit bakteri sayısı 5,46 log kob/ml olarak bulunmuştur. Belirlenen laktobasillus sayısı ile bu çalışmadaki BH örneğinin 7. gün sonuçları benzerlik göstermektedir. KH örneğinin LAB sayısının yapılan çalışmaya kıyasla düşük olduğu görülmektedir.

Coşkun ve ark. [105] yaptıkları bir araştırmada Kırklareli'nin farklı bölgelerinden toplanan yirmi üç hardalidenin LAB sayıları en az <1 log kob/ml, en çok 5,48 log kob/ml olarak belirlenmiştir. Bu çalışmadaki KH ve BH örneklerinin fermantasyonun 7. günündeki LAB sayıları çalışma ile benzerlik göstermektedir.

Kombuchanın sütteki metabolik aktivitesi ve fonksiyonel bir içecek olabilme yeteneğinin araştırıldığı bir çalışmada; kombucha ile fermente edilen süt ürünleri fermantasyonun sonunda +4 °C'de 30 gün muhafaza edilmiş ve bu süreçteki biyokimyasal ve mikrobiyolojik değişimleri incelenmiştir. Depolamanın ilk 10 gününde *Lactobacillus* spp. sayılarında azalma meydana geldiği bildirilmiştir [115]. Bu çalışmadaki KH örneğinin *Lactobacillus* spp. sayılarında da depolama süresince azalma olduğu gözlemlenmiştir.

Coşkun ve Arıcı [81] çalışmalarında, geleneksel hardaliye üretimine alternatif olarak starter kültür ve siyah/beyaz hardal tohumu kullanımının hardaliye üzerine etkilerini incelemiştir. Starter kültür olarak *Lactobacillus sanfrancisco* (LB16), *Lactobacillus acetotolerans* (LB21), *Lactobacillus pontis* (LB26), *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* (LB30) kullanılmıştır. LB16, LB21, LB26, LB30 suşları ilave edilerek üretilen hardalilerde fermantasyonun 7. gününde LAB sayılarının sırasıyla; 6,60, 7,20, 6,54, 6,77 ve 3,70 log kob/ml olduğu bildirilmiştir. Bu çalışmada farklı starter kültürlerle üretilen hardalilerin LAB sayılarında da o çalışmadaki örneklerde olduğu gibi farklılıklar gözlemlenmiştir.

3.2.3.2 Laktik streptokokların sayıları

Çizelge 4.12'de hardaliye örneklerinin 7. günündeki streptokok sayıları BH örneğinde 4,75 log kob/ml, KH örneğinde 3,91 log kob/ml olarak belirlenmiştir. 14 günlük depolamanın sonunda her iki örnekte de istatistiksel açıdan anlamlı bir azalma meydana gelmiştir (p<0,05). Hardaliye örnekleri birbiri ile kıyaslandığında üretim ve depolama süresince örnekler arası farklılık istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur (p<0,05).

Çizelge 3.11. Hardaliye örneklerinin üretim ve depolama süresince laktik streptokokların sayılarındaki (log kob/ml) değişim

| Laktik streptokokların sayıları | Ürünler | Üretim | | Depolama |
|---------------------------------|---------|-------------------|--------------------------|--------------------------|
| | | 0. Gün | 7. Gün | 14. Gün |
| | BH | 0±0 ^{C1} | 4,75±0,06 ^{A,a} | 3,91±0,05 ^{B,a} |
| | KH | 0±0 ^C | 3,9±0,09 ^{A,b} | 2,97±0,09 ^{B,b} |

¹Her bir sütunda, aynı küçük harflerle gösterilen değerler arasında istatistiksel olarak önemli bir fark yoktur ($p>0,05$) Her bir satırda, aynı büyük harflerle gösterilen değerler arasında istatistiksel olarak önemli bir fark yoktur ($p>0,05$)

Akarca ve Tomar [116] çalışmalarında, kırmızı ve mor sebzelerle 21 gün süren kombucha fermantasyonu gerçekleştirmişlerdir. Fermantasyonun 7. gününde *Streptococcus* spp. sayıları kırmızı havuç ile üretilen kombucha örneğinde 3,75 log kob/ml, kırmızı pancar ile hazırlanan kombucha örneğinde 3,63 log kob/ml olarak belirtilmiştir. Bu çalışmadaki KH örneğinin 7. gün *Streptococcus* spp. sayıları, yapılan çalışma ile benzerlik göstermektedir.

Kombuchanın süttteki metabolik aktivitesi ve fonksiyonel bir içecek olabilme yeteneğinin araştırıldığı bir çalışmada; %100 süt ve 60:40 oranındaki süt-bitki çayı karışımlarına %10 kombucha mantarı ilave edilerek elde edilen fermente süt ürünleri +4 °C'de 30 gün muhafaza edilmiş ve bu süreçteki biyokimyasal ve mikrobiyolojik değişimleri incelenmiştir. Depolamanın ilk 10 gününde *Lactococcus* spp. sayılarında azalma olduğu belirtilmiştir [115]. Bu çalışmada da depolama süresince KH örneğinin *Lactococcus* spp. sayılarında azalma gözlemlenmiştir.

4. SONUÇ VE ÖNERİLER

Kırklareli'nin yöresel bir içeceği olan Hardaliye; üzüm suyu, hardal tohumu ve vişne yaprağı kullanılarak üretilen geleneksel, alkolsüz fermente bir içecektir. Hardaliye ile ilgili literatürde sınırlı sayıda çalışmalar mevcut olup son yıllarda farklı starterlerle hardaliye üretimleri denenmeye başlanmıştır. Bu çalışmada da benzer amaçla; farklı starterlerle üretilen hardaliyelerin üretim ve depolama süresince fiziksel, kimyasal ve mikrobiyolojik özellikleri incelenmiştir. Starter kültür olarak fermantasyonunu tamamlamış hardaliye (back-slopping yöntemi) ve hardaliye üretiminde bir ilk olarak kombucha mantarı ilave edilerek üretimler gerçekleştirilmiştir. Kombucha mantarında bulunan maya ve bakterilerin simbiyotik birlikteliği sayesinde hardaliye üretiminde koruyucu kullanımına ihtiyaç duymadan üretimin sağlanabileceği, farklı starter kültürlerle hardaliyenin fonksiyonelliğinin artırılabilirliği ortaya konmuştur.

Çalışmadan elde edilen sonuçlara göre;

Farklı kültürlerle üretilen hardaliyelerin üretim ve depolama süresince pH değerlerinde azalmalar olmasına rağmen örnekler arasındaki farklılığın 7. günde anlamlı, 0. ve depolamanın 14. gününde ise önemsiz olduğu ($p>0,05$) belirlenmiştir. Hardaliye örneklerinde belirlenen pH düşüşleri fermantasyon süresince ortamdaki mikroorganizmaların şekerleri kullanarak gerçekleştirdikleri organik asit oluşumundan kaynaklanmaktadır. pH'daki düşüşe paralel olarak toplam asitlikte bir miktar artışlar gözlemlenmiştir. KH örneğinde üretim ve depolama süresince toplam asitlikte meydana gelen artış önemsiz bulunurken, BH örneğinde depolama süresince meydana gelen artış istatistiksel olarak önemlidir. pH'daki düşüş hardaliyede bulunan polifenollerin kimyasal bozulmasının önlenmesi, içecek renginin korunması ve antosiyaninlerin kimyasal yapılarının asidik koşullar altında daha iyi korunması ve kararlı hale gelmeleri açısından oldukça önemlidir. Bunun yanı sıra ortamın pH'sının düşük olması birçok mikroorganizmaya karşı öldürücü ve/veya inhibe edici etkiye neden olabilmektedir.

Farklı starter kültürlerle üretilen hardaliye örneklerinin indirgen şeker miktarlarında üretim boyunca istatistiksel olarak önemli bir azalma meydana gelirken, depolama sürecinde istatistiksel olarak anlamsız bir artış meydana gelmiştir. Fermantasyon süresince indirgen şekerdeki bu azalma; ortamda bulunan mikroorganizmaların indirgen şekerini substrat olarak kullanmaları, laktik asit, etil alkol, CO₂ ve diğer bazı organik asitlere parçalamalarından kaynaklanmaktadır. BH örneğinde üretim süresince indirgen şeker miktarında hızlı bir düşüş

gözlenirken, alkol miktarında da eş zamanlı artış olmuştur. KH örneğinde üretim ve depolama süresince alkol tespit edilememiştir. Bu durumun: Kombucha mantarında bulunan mayaların ve asetik asit bakterilerinin simbiyotik birlikteliğinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Farklı starterlerle üretilen hardaliye örneklerinde en yüksek fenolik madde miktarları KH örneğinde 7. günde 830,19 mg GAE/L olarak tespit edilmiştir ($p<0,05$). Depolama süresince hardaliye örneklerinde fenolik madde miktarında BH'de %7,6, KH'de %6,6 oranında anlamlı bir azalma meydana gelmiştir ($p<0,05$). Hardaliye örneklerinin üretim ve depolama sürecinde fenolik madde miktarlarındaki farklılık istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuş ve bu süreçlerde en yüksek fenolik madde miktarı KH örneğinde belirlenmiştir ($p<0,05$). İnsan sağlığı ve beslenmesi üzerinde önemli bir yere sahip olan üzümün toplam fenolik madde miktarı; kullanılan üzüm çeşidine, işlenen ürüne ve işleme sırasında tercih edilen yöntemle ilgili olarak farklılık göstermektedir.

Fermantasyon süresince her iki hardaliye örneğinin L^* (parlaklık) düzeyinde istatistiksel olarak önemli kayıpların olduğu belirlenmiştir. L^* değerlerinde gözlenen bu azalmaların; gıdalardaki kararın reaksiyonlarından ve renk pigmentlerinin fermantasyon süresince yıkıma uğramasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Fermantasyon süresince hardaliye örneklerinin a^* (kırmızılık) değerlerinde; BH örneğinde 3,67 birimlik, KH örneğinde ise 9,63 birimlik anlamlı bir azalma saptanmıştır ($p<0,05$). KH örneğinde fermantasyon ve depolama süresince b^* (sarılık) değerlerinde önemli bir değişim gözlemlenmemiştir ($p>0,05$). BH örneğindeki fermantasyon ve depolama süresince meydana gelen artışlar önemli bulunmuştur ($p<0,05$). L^* , a^* ve b^* değerlerinin fermantasyon süresindeki düşüşünün; fermantasyona bağlı pH'nın azalması, ortamda gelişen mikroorganizmalar tarafından renk pigmentlerinin ve polifenolik bileşenlerin parçalanmasından kaynaklandığı söylenebilir.

BH ve KH örneklerinin ilk gün viskozite değerleri 2,048 Pa.s olarak ölçülmüştür. Her iki örnekte de fermantasyon süresince viskozite değerlerinde istatistiksel olarak önemli artışlar olmuştur. En yüksek viskozite değeri KH örneğinde depolama sonunda belirlenmiştir.

TMAB sayısı 7. günde BH örneğinde 5,58 log kob/ml, KH örneğinde 4,55 log kob/ml olarak bulunmuştur. Depolamanın sonunda (14. gün) BH örneği 4,49 log kob/ml, KH örneği 3,1 log kob/ml olarak belirlenmiş ve depolama süresince her iki örnekte anlamlı bir azalma olduğu görülmüştür ($p<0,05$). Hardaliye örnekleri arasında üretimin 7. gününde istatistiksel olarak

anlamli bir farklılık gözlemlenmezken ($p>0,05$), depolamanın 14. gününde örnekler arasındaki farklılık istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($p<0,05$).

Farklı starter kültür ilavesi ile üretilen hardaliye örneklerinde fermantasyon süresince maya gelişimi gözlemlenmiş olup en yüksek değer BH örneğinde 7. günde 5 log kob/ml olarak belirlenmiştir. +4 °C'de 14 gün muhafaza edilen hardaliye örneklerinde depolama sonunda maya sayılarında sıcaklık ve pH düşüşüne bağlı olarak istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gözlemlenmiştir. KH örneğinin maya/ küf sayısı fermantasyon sonunda 3,7 log kob/ml olarak belirlenmiş ve BH örneğiyle kıyaslandığında daha düşük bulunmuştur. Hardaliye örneklerinin fermantasyon ve depolama süresince maya sayılarındaki farklılık istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($p<0,05$).

Hardaliye örneklerinde laktobasillerin gelişimi üretim süresince en yüksek BH örneğinde (7. günde) 5,44 log kob/ml olarak belirlenmiştir. Depolamanın 14. gününde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma meydana gelmiştir ($p<0,05$). Hardaliye örneklerinde en çok streptokok gelişimi üretim süresince BH örneğinde gözlemlenmiştir. Hardaliye örnekleri birbiri ile kıyaslandığında üretim ve depolama süresince oluşan farklılığın istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edilmiştir. KH örneğinde laktik asit bakteri sayılarının BH örneğine nazaran düşük olmasının; kombucha mantarının mikrobiyal kompozisyonunda asetik asit bakterilerinin çoğunluğundan kaynakladığı düşünülmektedir.

Pandemi nedeniyle hardaliye örneklerine duyuşul analiz yapılamamıştır. Üretim (7. gün) ve depolama sonunda (14. gün) duyuşal değerlendirmesini yaptığım hardaliye örneklerinde; BH örneğinde istenmeyen koku oluşumu gözlemlenirken, KH örneğinde hoş üzüm, hardal kokusu alınmış ve hafif şekerli aromatik bir tada sahip olduğu gözlemlenmiştir.

Elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde hardaliye gibi besleyicilik değeri yüksek fermente bir ürünün koruyucu kullanılmadan kombucha mantarı ile üretilebileceği belirlenmiştir. BH üretimi sırasında maya gelişiminin sadece hardal tohumu ile önlenemediği ve üründe alkolün oluşacağı görülmüştür. Back-slopping üretim metodu koruyucu kullanılmadan hardaliye üretiminde tercih edilmemelidir. Kombucha mantarı ile hardaliye üretiminde cibrelili fermantasyonun tercih edilmesinin ürünün toplam fenolik madde miktarını ve renk değerlerini olumlu yönde etkileyeceği düşünülmektedir. Koruyucuz hardaliye üretimi ile ilgili az sayıda çalışma mevcuttur. Geleneksel olarak üretilen bu ürünle ilgili yasal standart bulunmamaktadır. Bu bağlamda, gelecekte hardaliye ile ilgili yapılacak olan bir yasal

düzenleme için hardaliye üzerine yapılan çalışmalar büyük önem arz etmektedir. Kombucha mantarı kullanılarak üretilen hardaliyenin, koruyucu kullanılarak üretilen hardaliyeye fiziksel, kimyasal ve mikrobiyolojik olarak benzerliği araştırılmalı, kombucha mantarı ile üretilen hardaliyenin mikroflorasının tanımlanması üzerine çalışmalar yapılmalıdır. Hardaliye üretiminde kombucha mantarı kullanımının hardaliyenin uzun süreli muhafazasına nasıl etki ettiği üzerine denemeler yapılmalıdır



KAYNAKLAR

- [1] İ. Şahin, “Meyve ve domates sularında rastlanan laktik asit bakterileri ve mayalarla üzerinde araştırmalar,” *Gıda*, c. 1, s. 3, ss. 88-99, 1976.
- [2] F. Coşkun, “Hardaliye üretim teknolojisi üzerinde bir araştırma,” Doktora Tezi, Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Tekirdağ, Türkiye, 2001.
- [3] Y. Minamiyama, S. Takemura, T. Yoshikawa and S. Okada, “Fermented grain products, production, properties and benefits to health,” *Pathophysiology*, vol. 9, no. 4, pp. 221–227, 2003.
- [4] H.P. Fleming ve R.F. McFeeters, “Use of microbial cultures: Vegetables Products,” *Food a Technology*, pp. 84-88, 1981.
- [5] H.P. Fleming, R.F. McFeeters, R.L. Thompson ve D.C. Sanders, “Storage stability of vegetables fermented with pH control,” *Journal of Food Science*, vol. 48, no. 3, pp. 975-981, 1983.
- [6] Ö. Hancıoğlu ve M. Karapınar, M. “Microflora of boza, a traditional fermented turkish beverage,” *International Journal of Food Microbiology*, vol. 35 no. 3, pp. 271–274, 1997.
- [7] A. Ünlütürk ve F. Turantaş, *Gıda mikrobiyolojisi, İzmir: Türkiye: Mengi Tan Basımevi, 1998.*
- [8] M. Özden ve H. Vardin, “Şanlıurfa Koşullarında Yetiştirilen Bazı Şaraplık Üzüm Çeşitlerinin Kalite ve Fitokimyasal Özellikleri,” *Harran Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, c. 13, s. 2, ss. 21-27, 2009.
- [9] F. Faikoğlu, “Adakarası, papazkarası, kalecikkarası üzüm çeşitleri kullanılarak üretilen hardaliyelerin kalitesinin ve duyuşal özelliklerinin araştırılması,” Yüksek Lisans Tezi, Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Bursa, Türkiye, 2012.
- [10] E. Dimidi, S.R. Cox, M. Rossi ve K. Whelan, “Fermented foods: Definitions and characteristics, impact on the gut microbiota and effects on gastrointestinal health and disease,” *Nutrients*, vol. 11 no. 8, pp. 1806, 2019.
- [11] N. Aloys and N. Angeline, “Traditional fermented foods and beverages in Burundi,” *Food Research International*, vol. 42, no. 5-6, pp. 588–594, 2009.
- [12] H. Pamir, “Fermantasyon mikrobiyolojisi,” *Fermantasyon mikrobiyolojisinin gelişimi*, Ankara, Türkiye: Ankara Üniversitesi Basımevi, 1985, ss. 1-10.
- [13] F. Altay, F. Karbancıoğlu Güler, C. Daskaya-Dikmen and D. Heperkan, “A review on traditional Turkish fermented non-alcoholic beverages: Microbiota, fermentation process and quality characteristics,” *International Journal of Food Microbiology*, vol. 167, no. 1, pp. 44–56, 2013.
- [14] A.J. Marsh, C. Hill, R.P. Ross and P.D. Cotter, “Fermented beverages with health-promoting potential: Past and future perspectives,” *Trends in Food Science and Technology*, vol. 38, no. 2, pp. 113–124, 2014.

- [15] S. Rezac, C.R. Kok, M. Heermann and R. Hutkins, “Fermented foods as a dietary source of live organisms. Front,” *Microbiol*, vol. 9, pp. 1785, 2018.
- [16] M.L. Marco, D. Heeney, S. Binda, C.J. Cifelli, P.D. Cotter, B. Foligné, M. Gänzle, R. Kort, G. Pasin and A. Pihlanto, “Health benefits of fermented foods: Microbiota and beyond,” *Current Opinion in. Biotechnol.*, vol. 44, pp. 94–102, 2017.
- [17] Tarımsal ekonomi ve politika geliştirme enstitüsü, “Tarım Ürünleri Piyasaları Üzüm Üretim Raporu” Türkiye, 2021.
- [18] H. Çelik, S. Çelik, B.M. Kunter, G. Söylemezoğlu, Y. Boz, C. Özer ve A. Atak, “Bağcılıkta gelişme ve üretim hedefleri,” VI. *Türkiye Ziraat Mühendisliği Teknik Kongresi*, Ankara, Türkiye, 2000, ss. 565-588.
- [19] A. Canbaş, “Piyasadan Sağlanan Bazı Kırmızı Şarapların Fenol Bileşikleri Miktarları,” *Gıda*, c. 10, s. 1, ss. 3-10, 1985.
- [20] T. Cabaroğlu ve M. Yılmaztekin, “Üzümün Bileşimi ve İnsan Sağlığı Üzerine Etkileri,” *Buldan Sempozyumu*, Denizli, Türkiye, 2006, ss. 999-1004.
- [21] C. Conde, P. Silva, N. Fontes, A.C.P. Dias, R.M. Tavares, M.J. Sousa, A. Agasse, S. Delrot and H. Geros, “Biochemical changes throughout grape berry development and fruit and wine quality,” *Food*, vol. 1, no. 1, pp. 1-22, 2007.
- [22] A.C. Hulme, “The biochemistry of fruits and their products,” *A.R.C. Food Research Institue*, vol. 2, pp. 172-205, 1971.
- [23] B. Cemeröğlu, *Meyve Suyu Üretim Teknolojisi*, Ankara, Türkiye: Teknik Basım Sanayi Matbaası, 1982.
- [24] E.C. Sousa, A.M.U. Thomaz, J.O.B. Carioca, S.M. Morais, A. Lima, C.G. Martins, C.D. Alexandrino, P.A.T. Ferreira, A.L.M. Rodrigues, S.P. Rodrigues, J.N. Silva and L.L. Rodrigues, “Chemical composition and bioactive compounds of grape pomace (*vitis vinifera* L.), benitaka variety, grown in the semiarid region of northeast brazil,” *Food Science and Technology*, vol. 34, no. 1, pp. 135-142, 2014.
- [25] S. Karakaya ve S.N. El, “Flavonoidler ve Sağlık,” *Beslenme ve Diyet Dergisi*, c. 26, s. 2, ss. 54-60, 1997.
- [26] M. Burak ve M. Çimen, “Flavonoidler ve Antioksidan Özellikleri,” *T Klin Tıp Bilimleri*, no. 2, ss. 296-304, 1999.
- [27] U. Schobinger, *Meyve ve Sebze Üretim Teknolojisi*, Eugen Ulmer GmbH and Co. Stuttgart, Germany, 1988.
- [28] G. Sreeramulu, Y. Zhu ve W. Knol, “Kombucha fermentation and its antimicrobial activity,” *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 48, no. 6, pp. 2589–2594, 2000.
- [29] E.M. El-Taher, “Kombucha: A new microbial phenomenon and industrial benefits,” *African Journal of Biological Sciences*, vol.7, no. 2, pp. 41-60, 2011.

- [30] R. Jayabalan, R.V. Malbasa, E.S., Loncar, J.S. Vitas and M. Sathishkumar, "A review on kombucha tea microbiology, composition, fermentation, beneficial effects, toxicity, and tea fungus," *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, vol. 13, no. 4, pp. 538-550, 2014.
- [31] W.N. Goh, A. Rosma, B. Kaur, B. Fazilah, A.A. Karim and R. Bhat, "Fermentation of black tea broth (kombucha): I. Effects of sucrose concentration and fermentation time on yield of microbial cellulose," *International Food Research Journal*, vol. 19, no. 1, pp. 109-117, 2012.
- [32] C.W. Hesseltine, "A millennium of fungi, food and fermentation," *Mycologia*, vol. 57, pp. 149-197, 1965.
- [33] S.D. Kumar, G. Narayan and S. Hassarajanı, "Determination of anionic minerals in black and kombucha tea using ion chromatography," *Food Chemistry*, vol. 111, no. 3, pp. 784-788, 2008.
- [34] J. Jarrell, T. Cal and J.W. Bennett, "The kombucha consortia of yeasts and bacteria," *Mycologist*, vol. 14, no. 4, pp. 166-170, 2000.
- [35] C.P. Kurtzman, C.J. Robnett and E.B. Powers, "Zygosaccharomyces kombuchaensis, a new ascosporegenous yeast from Kombucha tea," *FEMS Yeast Research*, vol. 1, no. 2, pp. 133-138, 2001.
- [36] A.S. Velicanski, D. Dragoljub, C.S.L. Markov, V.T. Tumbas Šaponjac and J.J. Vulić, "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*, vol. 52, no. 4, pp. 420-429, 2014.
- [37] C.H. Liu, W.H. Hsu, F.L. Lee and C.C. Liao, "The isolation and identification of microbes from a fermented tea beverage, Haipao, and their interactions during Haipao fermentation," *Food Microbiol*, vol. 13, no. 6, pp. 407-415, 1996.
- [38] P. Maysen, F. Stephanie, G. Leitzmann, and K. Gründer, "The yeast spectrum of the 'tea fungus kombucha,'" *Wiley Online Library*, vol. 38, no. 7-8, pp. 289-295, 1995.
- [39] O.N. Reva, I.E. Zaets, L.P. Ovcharenko, O.E. Kukharenko, S.P. Shpylova, O.V. Podolich, J.P. Vera and N.O. Kozyrovska, "Metabarcoding of the kombucha microbial community grown in different microenvironments," *AMB Express*, vol. 5, no. 35, 2015.
- [40] S. Chakravorty, S. Bhattacharya, A. Chatzinotas, W. Chakraborty, D. Bhattacharya and R. Gachhui, "Kombucha tea fermentation: microbial and biochemical dynamics," *International Journal of Food Microbiology*, vol. 220, pp. 63-72, 2016.
- [41] M. Coton, A. Pawtowski, B. Taminiau, G. Burgaud, F. Deniel, L. Coulloume-Labarthe and E. Coton, "Unraveling microbial ecology of industrial-scale Kombucha fermentations by metabarcoding and culture-based methods," *FEMS Microbiology Ecology*, vol. 93, no. 5, 2017.
- [42] C.J. Greenwalt, K.H. Steinkraus and R.A. Ledford, "Kombucha, the fermented tea: microbiology, composition, and claimed health effects," *Journal Food Protection*, vol. 63, no.7, pp. 976-981, 2000.

- [43] R. Jayabalan, K. Malini, M. Sathishkumar, K. Swaminathan and S.E. Yun, "Biochemical characteristics of tea fungus produced during kombucha fermentation," *Food Science Biotechnology*, vol. 19, no. 3, pp. 843–847, 2010.
- [44] J.M. Leal, L.V. Suárez, R. Jayabalan, J.H. Oros and A.E. Aburto, "A review on health benefits of kombucha nutritional compounds and metabolites," *CyTA - Journal of Food*, vol. 16, no. 1, pp. 390-399, 2017.
- [45] H. Mo, Y. Zhu and Z. Chen, "Microbial fermented tea- a potential source of natural food preservatives," *Trends in Food Science & Technology*, vol. 19, no. 3, pp. 124-130, 2008.
- [46] M. Arıkan, "Kombucha'daki (ay mantarı) mikrobiyal kompozisyonun biyoinformatik analizi," Doktora Tezi, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Fakültesi, İstanbul, Türkiye, 2018.
- [47] E. Loncar, M. Djuric, R. Malbasa, L.J. Kolarov and M. Klasnja, "Influence of working conditions upon Kombucha conducted fermentation of black tea," *Food and Bioproducts Processing*, vol. 84, no. 3, pp. 186-192, 2006.
- [48] J. Reiss, "J. Influence of different sugars on the metabolism of the tea fungus," *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung*, vol. 198, no. 3, pp. 258-261, 1994.
- [49] R. Jayabalan, S. Marimuthu and K. Swaminathan, "Changes in content of organic acids and tea polyphenols during kombucha tea fermentation," *Food Chemistry*, vol. 102, no. 1, pp. 392-398, 2007.
- [50] S.A. Villarreal-Soto, S. Beaufort, J. Bouajila, J.P. Souchard and P. Taillandier, "Understanding kombucha tea fermentation: A Review," *Journal of Food Science*, vol. 83, no. 3, pp. 580-588, 2018.
- [51] M.I. Watawana, N. Jayawardena, C.B. Gunawardhana and V.Y. Waisundara, "Health, wellness, and safety aspects of the consumption of kombucha," *Journal of Chemistry*, vol. 1, pp. 1-11, 2015.
- [52] C. Dufresne and E. Farnworth, "Tea, kombucha, and health: a review," *Food Research International*, vol. 33, pp. 409-421, 2000.
- [53] P.J. Blanc, "Characterization of the tea fungus metabolites," *Biotechnology Letters*, vol. 18, pp. 139-142, 1996.
- [54] D. Dutta and R. Gachhui, "Nitrogen-fixing and cellulose-producing *Gluconacetobacter kombucha* sp. nov., isolated from kombucha tea," *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, vol. 57, no. 2, pp. 353-357, 2007.
- [55] M.H. Dashti and A. Morshedi, "A comparison between the effect of black tea and kombucha tea on blood glucose level in diabetic rat," *Med J Islamic Acad Sci*, vol. 13, pp. 83-87, 2000.
- [56] A.L. Teoh, G. Heard and J. Cox, "Yeast ecology of kombucha fermentation," *International Journal of Food Microbiology*, vol. 95, no. 2, pp. 119-126, 2004.

- [57] N. Değirmencioğlu, E. Yıldız, Y. Şahan, M. Gültaş ve O. Gürbüz, "Fermentasyon Süresinin Kombu Çayı Mikrobiyotası ve Canlılık Oranları Üzerine Etkileri," *Akademik Gıda*, c. 17, s. 2, ss. 200-211, 2019.
- [58] N. Hoffmann, "Basic building blocks, nutrients and growth factors, what the kombucha culture needs to survive," *Kombucha Journal*, 2020. [Online]. Erişim adresi: <http://www.kombu.de/nutrient.htm>. [Erişim tarihi: 25 Haziran 2020].
- [59] D. Cvetkovic, S. Markov, M. Djuric, D. Savic and A. Velicanski, "Specific interfacial area as a key variable in scaling-up kombucha fermentation," *Journal of Food Engineering*, vol. 85, no. 3, pp. 387-392, 2008.
- [60] E. Loncar, R. Malbasa and A.L. Kolarov, "Kombucha fermentation on raw extracts of different cultivars of jerusalem artichoke," *APTEFF*, vol. 38, pp. 1-190, 2007.
- [61] J.S. Vitas, R.V. Malbasa, J.A. Grahovac and E.V. Loncar, "The antioxidant activity of kombucha fermented milk products with stinging nettle and winter savory," *Chemical Industry & Chemical Engineering Quarterly*, vol. 19, no. 1, pp. 129-139, 2013.
- [62] S. Kayısoglu and F. Coşkun, "Determination of physical and chemical properties of kombucha teas prepared with different herbal teas," *Food Science and Technology*, 2020.
- [63] E. Utoiu, F. Matei, A. Toma, C.F. Diguța, L.M. Ștefan, S. Mănoiu, V.V. Vrajmasu, I. Moraru, A. Oancea, F.I. Roming, C.P. Cornea, D.C. Aruxandei, A. Moraru and F. Oancea, "Bee collected pollen with enhanced health benefits, produced by fermentation with a kombucha consortium," *Nutrients*, vol. 10, no. 10, pp. 1365, 2018.
- [64] M.S. Bayındır ve S. Önçel, "Gastronomide kültürel miras bakış açısıyla kırklareli hardaliyesi'nin geleneksel üretiminin değerlendirilmesi," *Journal of Tourism and Gastronomy Studies*, c. 7, s. 3, ss. 1867-1886, 2019.
- [65] B. Aşkın ve A. Atik, "Color, phenolic composition, and antioxidant properties of hardaliye (fermented grape beverage) under different storage conditions," *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, vol. 40, no. 6, pp. 803-812, 2016.
- [66] H. Aydogdu, S. Yildirim, A.K. Halkman and T. Durgun, "A study on production and quality criteria of hardaliye; a traditional drink from Thrace region of Turkey," *Gıda*, vol. 39, no. 3, pp. 139-145, 2016.
- [67] J.A. Vinson and B.A. Hontz, "Phenol antioxidant index: comparative antioxidant effectiveness of red and white wines," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 43 no. 2, pp. 401-403, 1995.
- [68] B. Amoutzopoulos, "Sağlıklı bireylerde geleneksel üzüm içeceği hardaliyenin serum antioksidan ve biyokimyasal parametreler üzerine etkisi," Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 2013.
- [69] L. Ayed, S. B. Abid, S. and M. Hamdi, "Development of a beverage from red grape juice fermented with the kombucha consortium," *Annals of Microbiology*, vol. 67, pp. 111-121, 2017.

- [70] G.T. Gündüz, A. Korkmaz, E. Solak and H.D. Sözbir, "Antimicrobial, antioxidant activities and total phenolic contents of the traditional turkish beverages produced by using grapes," *Turkish Journal of Agriculture- Food Science and Technology*, 2019.
- [71] F. Kayaçetin, "Botanical characteristics, potential uses, and cultivation possibilities of mustards in Turkey: a review," *Turkish Journal of Botany*, vol. 44, no. 2, pp. 101-127, March 2020.
- [72] M. Tanker ve N. Tanker, *Farmakognozi*, 1. Baskı, İstanbul, Türkiye: Özışık Matbaası, 1973.
- [73] F. Başoğlu, "Gıdalarda Kullanılan Bazı Baharatların Mikroorganizmalar Üzerine Etkileri ve Kontaminasyondaki Rollerini," *Gıda*, c. 7, s. 1, 1982.
- [74] C.N. Cutter, "Antimicrobial effect of herb extracts against *Escherichia coli* O157: H7, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella typhimurium* associated with beef," *Journal of Food Protection*, vol. 63, no. 5, pp. 601-607, 2000.
- [75] E. Faydaoğlu ve M.S. Sürücüoğlu, "Tıbbi Ve Aromatik Bitkilerin Antimikrobiyal, Antioksidan Aktiviteleri ve Kullanım Olanakları," *Erzincan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, vol. 6, no. 2, pp. 233-265, 2014.
- [76] M. Oussalah, S. Caillet, L. Saucier ve M. Lacroix, "Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* O157: H7, *Salmonella Typhimurium*, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*," *Food control*, vol. 18, no. 5, pp. 414-420, 2007.
- [77] M. Bridges, A.M.E. Jones, A.M. Bones, C.J. Hodgson, R. Cole, E. Bartlet, R.M. Wallsgrove, V.K. Karapapa, N. Watts and J.T. Rossiter, "Spatial organization of the glucosinolate-myrosinase system in brassica specialist aphids is similar to that of the host plant," *Proceedings of the Royal Society of London Series B Biological Sciences*, vol. 269, no. 1487, pp. 187-191, 2002,
- [78] J.W. Fahey, A.T. Zalcmann and P. Talalay, "The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants," *Phytochemistry*, vol. 56, no. 1, pp. 5-51, 2001.
- [79] M. Meena and V. Sethi, "Antimicrobial activity of essential oils from spices," *Journal of food science and technology mysore*, vol. 31, no. 1, pp. 68-70, 1994.
- [80] A.N. Olaimat, M.A. Al-Holy, M. Abu Ghoush, A.A. Al-Nabulsi and R.A. Holley, R.A. "Control of *Salmonella enterica* and *Listeria monocytogenes* in humus using allylisothiocyanate," *International Journal of Food Microbiology*, vol. 278, pp. 73-80, 2018.
- [81] F. Coşkun ve M. Arıcı, "Hardaliyenin Bazı Özellikleri Üzerine Farklı Hardal Tohumları ve Üzüm Çeşitleri Kullanımının Etkisi," *Akademik Gıda Dergisi*, c. 9, s. 3, ss. 6-11, 2011.
- [82] C.M. Lin, J.F. Preston and C.I. Wei, "Antibacterial mechanism of allyl isothiocyanate," *Journal of Food Protection*, vol. 63, no. 6, pp. 727-734, 2000.

- [83] N.A. Bahmid, J. Heising, V. Fogliano and M. Dekker, “Packaging design using mustard seeds as a natural antimicrobial: A study on inhibition of *Pseudomonas fragi* in Liquid Medium,” *Foods*, vol. 9, no. 6, pp. 789, 2020.
- [84] B. Kramer, J. Wunderlich and P. Muranyi, P. “Impact of volatile allyl isothiocyanate on fresh produce,” *Food Packaging and Shelf Life*, vol. 16, pp. 220–224, 2018.
- [85] I. Clemente, M. Aznar and C. Nerin, “Synergistic properties of mustard and cinnamon essential oils for the inactivation of foodborne moulds in vitro and on Spanish bread,” *International Journal of Food Microbiology*, vol. 298, pp. 44–50, 2019.
- [86] J.A. Ko, W.Y. Kim and H.J. Park, “Effects of microencapsulated allyl isothiocyanate (aitc) on the extension of the shelf-life of kimchi,” *International Journal of Food Microbiology*, vol. 153, no. 1-2, pp. 8-92, 2011.
- [87] O.A. Okunade, S.K. Ghawi, L. Methven and K. Niranjana, “Thermal and pressure stability of myrosinase enzymes from black mustard (*Brassica nigra* L. WDJ Koch. var. *nigra*), brown mustard (*Brassica juncea* L. Czern. var. *juncea*) and yellow mustard (*Sinapsis alba* L. subsp. *maire*) seed,” *Food Chemistry*, vol. 187, pp. 485–490, 2015.
- [88] L.J. Harris, “The microbiology of vegetable fermentations,” *Microbiology of Fermented Foods*, vol. 1, pp. 45-72, 1998.
- [89] F. Leroy and L. De Vuyst, “Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry,” *Trends in Food Science and Technology*, vol. 15, no. 2, pp. 67-78, 2004.
- [90] E.B. Hansen, “Commercial bacterial starter cultures for fermented foods of the future,” *International Journal of Food Microbiology*, vol. 78, no.1-2, pp. 119-131, 2002.
- [91] U.C. Wirawati, M.B. Sudarwanto, D.W. Lukman, L. Wientarsih and E.A. Srihanto, “Diversity of lactic acid bacteria in dadih produced by either back-slopping or spontaneous fermentation from two different regions of west sumatra, Indonesia,” *Veterinary World*, vol. 12, no. 6, pp. 823-829, 2019.
- [92] D.H. Kim, D. Jeong, K.Y. Song and K.H. Seo, “Comparison of traditional and backslopping methods for kefir fermentation based on physicochemical and microbiological characteristics,” *LWT- Food Science and Technology*, vol. 97, pp. 503-507, 2018.
- [93] M.R. Roussin, *Analyses of kombucha ferments: report on growers*, Salt Lake City, Utah, 1996.
- [94] E. Atay, L. Pırlak ve A.N. Atay, “Determination of fruit growth in some apple varieties,” *Tarım Bilimleri Dergisi*, vol. 16, no. 1-8, 2009.
- [95] I.E. Mbaeyi-Nwaoha and C.N. Ajumobi, “Production and microbial evaluation of table wine from tamarind (*Tamarindus indica*) and soursop (*Annonamuricata*),” *Journal of Food Science Technology*, vol. 52, pp. 105-116, 2013.
- [96] B. Cemeroğlu, *Meyve ve Sebze İşleme Teknolojisi*, Ankara, Türkiye, 2004.

- [97] B. Mannheim, "UV-Method for the determination of ethanol in foodstuff and other materials and UV- Method for the determination of L-lactic acid and D-lactic acid in foodstuff and other materials," *Methods of biochemical analysis and food analysis usinsingel reagents*, pp. 40-81, 1989.
- [98] B. Cemeroglu, *Gıda Analizleri*, Ankara, Türkiye, 2007.
- [99] A.M.O. Leite, M.A. Miguel, R.S. Peixoto, A.S. Rosado, J.T. Silva and V.M. Paschoalin, "Microbiological, technological and therapeutic properties of kefir: a natural probiotic beverage," *Brazilian Journal of Microbiology*, vol. 44, no. 2, pp. 341–349, 2013.
- [100] A. Temiz, *Genel Mikrobiyoloji Uygulama Teknikleri*, 3. Baskı, Ankara, Türkiye: Hatiboğlu Yayınevi, 2002.
- [101] R.S.D.O. Bergmann, M.A. Pereira, S.M.O.M. Veiga, J.M. Schneedorf, N.D.M.S. Oliveira and J.E. Fiorini, "Microbial profile of a kefir sample preparations: grains in natura and lyophilized and fermented suspension," *Food Science and Technology*, vol. 30, no. 4, pp. 1022-1026, 2010.
- [102] K. Torskangerpoll and M. Oyvind Andersen, "Color stability of anthocyanins in aqueous solutions at various pH values," *Food Chemistry*, vol. 89, no.3 pp. 427-440, 2005.
- [103] K. Tarhan, "Kombucha çayı üretiminde farklı substrat kaynaklarının kullanımı," Yüksek Lisans Tezi, Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Antalya, Türkiye, 2017.
- [104] Ö. Gürbüz, "Hardaliye üretiminde kullanılan antimikrobiyal maddelerin fermantasyon üzerine etkileri," Yüksek Lisans Tezi, Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Edirne, Türkiye, 2018.
- [105] F. Coşkun, M. Arıcı, M. Gulcu, G. Celikyurt ve M. Mırık, "Physicochemical, functional and microbiological properties of hardaliye beverages produced from different grapes and collected from different households," *Journal of Agricultural Sciences*, vol. 24, no. 2, pp. 278-285, 2018.
- [106] F. Coşkun, M. Arıcı, G. Celikyurt ve M. Gülcü, "Farklı Yöntemler Kullanılarak Üretilen Hardaliyelerin Bazı Özelliklerinde Depolama Sonunda Meydana Gelen Değişmeler," *Namık Kemal Üniversitesi Tekirdağ Ziraat Fakültesi Dergisi*, c. 9, s. 3, ss. 62-66, 2012.
- [107] *Alkolsüz içecekler tebliği*, Türk Gıda Kodeksi 26, 2007.
- [108] M. Bayram, Y. Esin, C. Kaya, M. İlhan, G. Akın ve R. Etdöğer, "Geleneksel yöntemle müşküle üzümünden üretilen hardaliyenin bazı özelliklerinin belirlenmesi," *Akademik Gıda*, c. 13, s. 2, ss. 119-126, 2015.
- [109] T. Çam, H.K. Yıldırım, "Üzüm meyvelerindeki fenolik bileşiklerin fermantasyon ile değişimi," *Akademik Gıda*, c. 16, s. 1, ss. 101-108, 2018.
- [110] J. Acar, V. Gökmen, F. Us, *Meyve ve Sebze İşleme Teknolojisi*, Ankara, Türkiye, 2006,
- [111] G. Mazza, Dr. F. J. Francis, "Anthocyanins in grapes and grape products," *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, vol. 35, no. 4, pp. 341-371, 1995.

- [112] H.E. Khoo, A. Azlan, S. T. Tang and S.M. Lim, “Anthocyanidins and anthocyanins: colored pigments as food, pharmaceutical ingredients, and the potential health benefits,” *Food and Nutrition Research*, vol. 61, no. 1, 2017.
- [113] M.I. Watawana, N. Jayawardena, C.B. Gunawardhana, V.Y. Waisundara, “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 and Technology*, vol. 51, no. 2, pp. 490-498, 2015.
- [114] H.N. Yılmaz, “Havuç suyu konsantresinin reolojik özellikleri,” Yüksek Lisans Tezi, Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, Türkiye, 2014.
- [115] P. Şarkaya, “Fermente süt içecekleri üretiminde kombucha kültürü kullanımı,” Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir, Türkiye, 2019.
- [116] G. Akarca ve O. Tomar, “Kırmızı ve Mor Sebzelerle Hazırlana Kombucha Çaylarının Kalite Özelliklerinin Belirlenmesi,” *Mediterranean Agricultural Sciences*, c. 33, s. 2 ss. 215-222, 2020.

