T.C.

TRAKYA ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

HARDALİYE ÜRETİMİNDE KULLANILAN ANTİMİKROBİYAL MADDELERİN FERMANTASYON ÜZERİNE ETKİLERİ

ÖZGE GÜRBÜZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

GIDA MÜHENDİSLİĞİ

Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Ufuk BAĞCI

EDİRNE-2018

ÖZGE GÜRBÜZ'ün hazırladığı "HARDALİYE ÜRETİMİNDE KULLANILAN ANTİMİKROBİYAL MADDELERİN FERMANTASYON ÜZERİNE ETKİLERİ" başlıklı bu tez, tarafımızca okunmuş, kapsam ve niteliği açısından Gıda Mühendisliği Anabilim Dalında bir Yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri (Ünvan, Ad, Soyad): İmza

Doç. Dr. Pelin ONSEKİZOĞLU BAĞCI .....

Yrd. Doç. Dr. Sine ÖZMEN TOGAY .....

Yrd. Doç. Dr. Ufuk BAĞCI .....

Tez Savunma Tarihi: 29/01/2018

Bu tezin Yüksek Lisans tezi olarak gerekli şartları sağladığını onaylarım.

İmza

Yrd. Doç. Dr. Ufuk BAĞCI
Tez Danışmanı .....

Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü onayı

.....

Prof. Dr. Murat YURTCAN
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

T.Ü.FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

GIDA MÜHENDİSLİĞİ YÜKSEK LİSANS DOĞRULUK BEYANI

Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmasında, tüm verilerin bilimsel ve akademik kurallar çerçevesinde elde edildiğini, kullanılan verilerde tahrifat yapılmadığını, tezin akademik ve etik kurallara uygun olarak yazıldığını, kullanılan tüm literatür bilgilerinin bilimsel normlara uygun bir şekilde kaynak gösterilerek ilgili tezde yer aldığını ve bu tezin tamamı ya da herhangi bir bölümünün daha önceden Trakya Üniversitesi ya da farklı bir üniversitede tez çalışması olarak sunulmadığını beyan ederim.

29 / 01 / 2018

Özge GÜRBÜZ



Yüksek Lisans Tezi

Hardaliye Üretiminde Kullanılan Antimikrobiyal Maddelerin Fermantasyon Üzerine Etkileri

T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

ÖZET

Hardaliye, siyah yaş üzümleri, hardal tohumu ve vişne yaprağı kullanılarak laktik asit fermantasyonu yoluyla üretilen geleneksel alkolsüz bir içecektir. Geleneksel Hardaliye üretiminde üzüm şırasında maya faaliyetini engelleyerek alkol oluşumunu önlemek amacıyla hardal tohumu ilave edilmektedir. Buna rağmen fermentasyon ve depolama sırasında üründe arzu edilmeyen etanol oluşumu meydana gelebilmekte ve bu durum mevsim sıcaklıklarına da bağlı olarak standart kalitede ürün üretimine engel oluşturmaktadır. Dolayısıyla endüstriyel çapta üretimin yaygınlaşmasıyla beraber sorbat ve benzoatlar gibi kimyasal koruyucular Hardaliye üretiminde kullanılmaktadır. Ancak, günümüzde tüketiciler, katkı içermeyen, yüksek kaliteli, güvenli, daha uzun raf ömrüne sahip ürünleri tercih etmektedirler. Bu nedenle tez kapsamında Hardaliye üretiminde starter kültür ve yüksek derişimde hardal tohumu kullanımının kimyasal koruyuculara bir alternatif olma potansiyeli araştırılmıştır. Bu kapsamda, fermentasyon süresince ve farklı sıcaklıklarda depolama süresince Hardaliye örneklerinin mikrobiyal, fizikokimyasal ve duyusal kalite karakteristiklerinde meydana gelen değişimler de takip edilmiştir. Hardaliye üretiminde % 3 (w/v) konsantrasyona kadar hardal tohumu kullanımının Hardaliye fermentasyonu ve depolanması sırasında maya fermentasyonunu engellemede yeterli olmadığı bulunmuştur. Hardal tohumu ve/veya starter kültür kullanılarak üretilen Hardaliyelerde alkol miktarı, oda sıcaklığında iki ay depolama sonunda % 11 – 13 (v/v) arasında bulunurken, buzdolabı sıcaklığında depolama sonunda % 5 – 13 (v/v) arasında bulunmuştur. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda iki ay süresince depolanan örnekler içerisinde yalnızca kimyasal koruyucu kullanılarak üretilen ve buzdolabı sıcaklığında depolanan Hardaliye örnekleri alkol içerikleri bakımından yasal limitlere uygun

bulunmuştur. Hardal konsantrasyondaki artışın ve starter kültür kullanımının fizikokimyasal kalite üzerine bir etkisi tespit edilememiştir. Hardal konsantrasyonunun % 2'nin üzerinde kullanılması ürünün duyusal kalitesini olumsuz yönde etkilemiştir. Çalışma kapsamında kullanılan miktarlarda hardal tohumu, starter kültür ve kimyasal koruyucunun Hardaliye üretiminde laktik asit fermentasyonu üzerine olumsuz bir etkisi tespit edilmemiştir. Bu tez çalışması kapsamında, oda sıcaklığında depolamanın Hardaliyenin mikrobiyolojik, fizikokimyasal ve duyusal kalitesinin korunmasında yeterli olmadığı, buzdolabı sıcaklığında depolanan ve kimyasal koruyucu kullanılarak üretilen Hardaliyelerin, depolama sonunda en iyi mikrobiyolojik, fizikokimyasal ve duyusal kaliteye sahip olduğu tespit edilmiştir.

Yıl : 2018

Sayfa Sayısı : 91

Anahtar Kelimeler : Hardaliye, Üzüm, Geleneksel gıda, Hardal tohumu, Laktik asit bakterileri

Yüksek Lisans Tezi
Effects of antimicrobial agents used in Hardaliye production on the fermentation
Trakya University Institute of Natural Sciences
Department of Food Engineering

ABSTRACT

Hardaliye is a traditional alcohol-free drink produced by lactic acid fermentation using red grapes, mustard seeds, and cherry leaf. In traditional Hardaliye production, mustard seed is added in order to prevent the formation of alcohol by inhibiting the yeast activity in grape must. Nevertheless, the formation of non-desirable ethanol can occur during fermentation and storage, creating obstacles in standard quality product production due to seasonal temperature variations. Therefore, chemical preservatives such as sorbates and benzoates are used in mustard production along with the widespread industrial production. However, today consumers prefer high quality, safe products with no additives and longer shelf life. Therefore, the possible use of starter culture and of relatively higher amounts of high mustard seed as alternatives to chemical preservatives has been investigated in this thesis. In this context, changes in microbial, physicochemical and sensory quality characteristics of Hardaliye samples during fermentation and storage at different temperatures were also evaluated. The use of mustard seeds up to 3% (w / v) concentration was not found to be sufficient to inhibit yeast fermentation during fermentation of Hardaliye and further storage. In Hardaliye samples produced by using mustard seed and/or starter culture, the amount of alcohol was between 11% and 13% (v / v) at the end of storage for two months at room temperature, while at refrigerator temperature it was determined between 5% and 13% (v / v). Of all the Hardaliye samples stored for two months, only the ones produced by using chemical preservatives and stored at the refrigerator temperature were in compliance with the legal limits of alcohol contents. No significant effect of the use of starter culture and of increased amount of mustard seed have been determined on the physicochemical quality. The use of more than 2% of the mustard concentration adversely affected the sensory quality of the product.

No adverse effects of starter culture, chemical preservatives and mustard seed in quantities used in the study on lactic acid fermentation have been determined. Within the scope of this thesis, it has been determined that storage at room temperature is not enough to protect the microbiological, physicochemical and sensory qualities of the mustard, and that Hardaliye samples produced by using chemical preservative and stored at the refrigerator temperature provides the best microbiological, physicochemical and sensory qualities at the end of storage.

Year : 2018

Number of Pages : 91

Keywords : Hardaliye, Grape, Traditional food, Mustard seed, Lactic acid bacteria

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca ilminden faydalandığım, insani ve ahlaki değerleri ile de örnek edindiğim, yanında çalışmaktan onur duyduğum ve tecrübelerinden yararlanırken göstermiş olduğu hoşgörü ve sabırdan dolayı değerli danışman hocam Yrd. Doç. Dr. Ufuk BAĞCI'ya,

Tez çalışma sürecinde tecrübe ve yardımlarından faydalandığım sayın Prof. Dr. Zeynep KATNAŞ'a, Doç. Dr. Pelin ONSEKİZOĞLU BAĞCI'ya ve Doç. Dr. Hacı Ali GÜLEÇ'e,

Tezin devamlılığını sağlamak için projenin başından sonuna kadar tüm aşamalarda yardımlarını esirgemeyen değerli Arş. Gör. Emel YILMAZ'a, Arş. Gör. Kadir ÇINAR'a ve Arş. Gör. İrem DAMAR HÜNER'e,

Deneysel çalışmalar boyunca bana destek olan arkadaşım Ceren PEKGİRTİNE'ye,

TUBAP 2016/103 no'lu proje kapsamında sağladıkları maddi katkıları ve ilgilerinden dolayı Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne,

Çalışma süresi boyunca tüm zorlukları benimle birlikte göğüsleyen ve hayatımın her anında bana destek olan değerli annem Gülay GÜRBÜZ'e, babam Mustafa GÜRBÜZ'e, kardeşim Gizem GÜRBÜZ'e ve eşim Ozan ÖZKAN'a teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ÖZET iii
ABSTRACT v
TEŞEKKÜR vii
İÇİNDEKİLER viii
SİMGELER DİZİNİ xi
ŞEKİLLER DİZİNİ xiii
ÇİZELGELER DİZİNİ xiv
BÖLÜM 1 1
GİRİŞ 1
BÖLÜM 2 3
GENEL BİLGİLER 3
2.1. Hardaliye 3
2.2. Hardaliye üretiminde kullanılan hammaddeler 4
2.3. Laktik asit bakterileri 18
2.4. Hardaliye ile ilgili çalışmalar 23
BÖLÜM 3 27
MATERYAL VE METOT 27
3.1. Materyal 27
3.1.1. Hardaliye üretiminde kullanılan hammaddeler 27
3.1.2. Starter kültür 27
3.1.3. Mikrobiyolojik analizlerde kullanılan besiyerleri 27
3.1.4. Kimyasallar 28
3.2. Metot 28

3.2.1. Siyah hardal tohumunun *Saccharomyces cerevisiae* üzerine antifungal etkisinin belirlenmesi 28
3.2.2. Hardaliye üretimi 29
3.2.3. Fizikokimyasal analizler 31
3.2.3.1. pH ve titrasyon asitliği 31
3.2.3.2. Suda çözünür kuru madde 31
3.2.3.3. Alkol miktarı tayini 32
3.2.3.4. Toplam antioksidan aktivite analizi 32
3.2.4. Yüksek basınçlı sıvı kromotografisi (HPLC) ile şeker analizi 32
3.2.5. Mikrobiyolojik analizler 33
3.2.5.1. Toplam mezofilik aerobik bakteri sayımı 33
3.2.5.2. Toplam küf-maya sayımı 33
3.2.5.3. Toplam laktik asit bakterisi sayımı 33
3.2.6. Duyusal analizler 34
3.2.7. İstatistiksel analizler 35
BÖLÜM 4 36
BULGULAR 36
4.1 Siyah hardal tohumunun *Saccharomyces cerevisiae* üzerine antifungal etkisi 36
4.2 Hardaliye fermentasyonu 38
4.2.1 Hardaliye fermentasyonu süresince mikrobiyal floradaki değişim 38
4.2.1.1 Toplam mezofilik aerobik canlı bakteri sayısı 38
4.2.1.2 Laktik asit bakteri sayısı 40
4.2.1.3 Toplam küf/maya sayısı 43
4.2.2 Hardaliye fermentasyonu süresince toplam antioksidan aktivitedeki değişim 45
4.2.3. Hardaliye fermentasyonu süresince suda çözünür kuru maddedeki (ºBriks) değişim 47

4.2.4 Hardaliye fermentasyonu süresince glukoz ve fruktoz miktarlarındaki değişimler 48

4.2.5 Hardaliye fermentasyonu süresince pH ve toplam asitlik miktarlarındaki değişimler 51

4.2.6. Hardaliye fermentasyonu süresince alkol miktarlarındaki değişimler 53

4.3. Hardaliye örneklerinin farklı sıcaklıklarda depolanması süresince mikrobiyolojik ve fizikokimyasal özelliklerinde meydana gelen değişimler 54

4.3.1. Depolama süresince Hardaliye örneklerinde mikrofloradaki değişimler 54

4.3.2. Depolama süresince Hardaliye örneklerinde toplam antioksidan aktivitedeki değişimler 59

4.3.3. Depolama süresince Hardaliye örneklerinde fruktoz ve glukoz miktarlarındaki değişimler 61

4.3.4. Depolama süresince Hardaliye örneklerinde suda çözünür kuru madde miktarlarındaki değişimler 63

4.3.5. Depolama süresince Hardaliye örneklerinde alkol miktarlarındaki değişimler 66

4.3.6. Depolama süresince Hardaliye örneklerinde pH ve titrasyon asitliğindeki değişimler 68

4.4. Duyusal analiz 72

BÖLÜM 5 76

SONUÇLAR 76

KAYNAKLAR 81

ÖZGEÇMİŞ 90

BİLİMSEL FAALİYETLER 91

SİMGELER DİZİNİ

GRAS	Generally regarded as safe- Genellikle güvenli olarak kabul edilen
WHO	Dünya Sağlık Örgütü
FAO	Gıda ve Tarım Organizasyonu
JECFA	Katkı Maddeleri Üzerinde Çalışan Ortak Uzmanlar Grubu
FDA	US Food and Drug Administration
E200	Sorbik Asit
E201	Sodyum Sorbat
E202	Potasyum Sorbat
E203	Kalsiyum Sorbat
E210	Benzoik Asit
E211	Sodyum Benzoat
E212	Potasyum Benzoat
E213	Kalsiyum Benzoat
EMP	Embden-Meyerhof-Parnas
ATP	Adenozin Trifosfat
H_2O_2	Hidrojen Peroksit
NaOH	Sodyum Hidroksit
NaCl	Sodyum Klorür
$K_2S_2O_8$	Potasyum Persülfat
TMACB	Toplam Mezofilik Aerobik Canlı Bakteri
PCA	Plate Count Agar
TBX Agar	Chromocult Tryptone Bile X

RBCA	Rose Bengal Chloramphenicol Agar
MRS Agar	De Man, Rogosa and Sharpe Agar
MEB	Malt Extract Broth
MEA	Malt Extract Agar
MRD	Maximum Recovery Diluent
MRS	De Man, Rogosa and Sharpe Broth
SF	Steril Serum Fizyolojik
kob	Koloni Oluşturan Birim
w/v	Hacimde Ağırlıkça Yüzde
v/v	Hacimce Yüzde
Lp	*Lactobacillus plantarum*
T.A.	Tartarik Asit
f	NaOH Faktörü
TEAC	Troloks Eşdeğeri Antioksidan Kapasite
ABTS	2,2'-azinobis (3-etilbenzothiazolin–6-sülfonik asit)
HPLC	Yüksek basınçlı sıvı kromotografisi

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Glukozinolatların kimyasal yapısı 11
Şekil 2.2. Enzimatik parçalanma sonucu oluşan glikozinolat hidroliz ürünleri ve kendiliğinden düzenlenmeleri 12
Şekil 3.1. Hardaliye üretim akış şeması 30
Şekil 4.1. Fermentasyon boyunca Hardaliye örneklerinde toplam mezofilik aerobik canlı bakteri (TMACB) sayılarındaki (log kob/mL) değişimler 40
Şekil 4.2. Fermentasyon boyunca Hardaliye örneklerinde laktik asit bakteri sayısındaki (log kob/mL) değişim 42
Şekil 4.3. Fermentasyon boyunca Hardaliye örneklerinde toplam küf/maya sayısındaki (log kob/mL) değişim 44

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Fermantasyon tiplerine göre laktik asit bakterileri 19
Çizelge 2.2. Fermente gıdalar ve bunların fermantasyonunda kullanılan laktik asit bakterileri 20
Çizelge 3.1. Farklı miktarlarda starter kültür, hardal ve koruyucu madde kullanılarak üretilen Hardaliye örnekleri 31
Çizelge 3.2. Hardaliye örneklerinin duyusal analizinde kullanılan değerlendirme kriterleri ve puanlaması 35
Çizelge 4.1. Farklı hardal tohumu konsantrasyonlarının inkübasyon süresi boyunca Malt Extract Broth ortamındaki Saccharomyces cerevisiae üzerine antifungal etkisi 37
Çizelge 4.2. Farklı hardal tohumu konsantrasyonlarının inkübasyon süresi boyunca serum fizyolojik ortamında (% 0,9 NaCl) bulunan Saccharomyces cerevisiae üzerine antifungal etkisi 37
Çizelge 4.3. Fermentasyon boyunca Hardaliye örneklerinde toplam mezofilik aerobik canlı bakteri (TMACB) sayılarındaki (log kob/mL) değişimler 39
Çizelge 4.4. Fermentasyon boyunca Hardaliye örneklerinde laktik asit bakterileri sayılarındaki (log kob/mL) değişimler 41
Çizelge 4.5. Fermentasyon boyunca Hardaliye örneklerinde toplam küf/maya sayılarındaki (log kob/mL) değişimler 44
Çizelge 4.6. Hardaliye fermentasyonu süresince örneklerin toplam antioksidan aktivite değerleri (mM Trolox mL–1) 46
Çizelge 4.7. Hardaliye fermentasyonu süresince örneklerin suda çözünür kuru madde miktarları (ºBriks) 48
Çizelge 4.8. Hardaliye fermentasyonu süresince örneklerin fruktoz miktarları 49
Çizelge 4.9. Hardaliye fermentasyonu süresince örneklerin glukoz miktarları 50
Çizelge 4.10. Hardaliye fermentasyonu süresince örneklerin toplam asitlik miktarları (g tartarik asit/L) 51
Çizelge 4.11. Hardaliye fermentasyonu süresince örneklerin pH değerleri 52
Çizelge 4.12. Hardaliye fermentasyonu süresince örneklerdeki alkol miktarı (% v/v) 53

Çizelge 4.13. Farklı sıcaklıklarda depolanan Hardaliye örneklerinde toplam mezofilik aerobik canlı bakteri sayıları (log kob/mL) 55
Çizelge 4.14. Farklı sıcaklıklarda depolanan Hardaliye örneklerinde laktik asit bakterileri sayıları (log kob/mL) 57
Çizelge 4.15. Farklı sıcaklıklarda depolanan Hardaliye örneklerindeki toplam küf/maya sayıları (log kob/mL) 58
Çizelge 4.16. Farklı sıcaklıklarda depolanan Hardaliye örneklerinin toplam antioksidan aktivite değerleri (µmol Troloks/mL) 60
Çizelge 4.17. Farklı sıcaklıklarda depolanan Hardaliye örneklerindeki fruktoz miktarları 62
Çizelge 4.18. Farklı sıcaklıklarda depolanan Hardaliye örneklerindeki glukoz miktarları 64
Çizelge 4.19. Farklı sıcaklıklarda depolanan Hardaliye örneklerindeki suda çözünür kuru madde miktarları (ºBriks) 65
Çizelge 4.20. Farklı sıcaklıklarda depolanan Hardaliye örneklerindeki alkol miktarları (%, v/v) 67
Çizelge 4.21. Farklı sıcaklıklarda depolanan Hardaliye örneklerinin toplam asitlik değerleri (g tartarik asit/L) 70
Çizelge 4.22. Farklı sıcaklıklarda depolanan Hardaliye örneklerinin pH değerleri 71
Çizelge 4.23. Fermentasyon sonunda Hardaliye örneklerinin duyusal değerlendirme sonuçları 73
Çizelge 4.24. Buzdolabı sıcaklığında iki ay depolama sonunda Hardaliye örneklerinin duyusal değerlendirme sonuçları 73
Çizelge 4.25. Oda sıcaklığında iki ay depolama sonunda Hardaliye örneklerinin duyusal değerlendirme sonuçları 75

BÖLÜM 1

GİRİŞ

Hardaliye, eski ve köklü bir bağcılık kültürüne sahip Trakya bölgesinde yaklaşık 500 yıldır üretilen geleneksel, fermente ve alkolsüz bir üzüm içeceğidir.

Geleneksel olarak Hardaliye, üzüm, vişne yaprakları ve hardal tohumlarının fermente edilmesiyle üretilir. Diğer fermente içecekler ile kıyaslandığında, alkolsüz, tatlımsı tadı, yağ, süt ve tuz içermemesi nedeniyle çocuklar, kolesterol, tansiyon ve laktoz intoleransı problemi olan bireyler tarafından da tüketilebilir nitelikte, daha geniş kitlelere hitap eden bir fonksiyonel içecektir. Günümüzde hardaliye tüketimi büyük ölçüde bölge halkıyla sınırlı olup, ülke genelinde tanıtılarak yaygınlaştırılmaya çalışılmaktadır. Nitekim Atatürk 1930'da Kırklareli'ne geldiğinde kendisine ikram edilen hardaliyeyi çok beğenmiş ve ulusal içecek haline getirilmesini istemiştir.

Hardaliye üretimi genellikle bağbozumunun başladığı ekim ve kasım aylarında yapılır. Yıkanarak sap ve yabancı maddelerinden ayrılıp hafifçe çatlatılmış üzüm taneleri üzerine siyah hardal tohumu ve aroma vermesi için de vişne yaprağı kat kat doldurularak meşe bir fıçılar içerisinde oda sıcaklığında 1-3 hafta fermentasyona tabi tutulur. Fermantasyon tamamlandıktan sonra süzülüp şişelenen hardaliyenin raf ömrü serin ortamda en fazla 3 aydır. Hardaliye üretiminde hardal tohumu, temelde üzüm şırasında maya faaliyetini engelleyerek alkol fermantasyonunu önlemek amacıyla kullanılırken, aynı zamanda Hardaliye'ye özgü tat ve kokunun oluşmasına da katkı sağlamaktadır. Hardala özgü keskin tat ve kokudan sorumlu temel bileşik allil izotiyosiyanatlardır. Geniş spektrumlu güçlü antimikrobiyal etkiye sahip allil izotiyosiyanat hardaliyede bazı mikroorganizmaların gelişmesini önleyerek ürünün muhafazasına da katkıda bulunur. Glukozinolat yapısındaki sinigrinin hidroliz ürünü olarak açığa çıkan allil izotiyosiyanat aynı zamanda güçlü antioksidan kapasiteye sahip bir bileşik olup, bazı kanser türlerinin önlenmesinde de olumlu etkileri olduğu bildirilmektedir. Doğal olarak glukozinolat

içeren bitkilerde dokunun kesme, doğrama vb. işlemlerle fiziksel bütünlüğünün bozulması durumunda açığa çıkarak aktif hale geçen mirosinaz enzimi glukozinolatları hidrolize ederek izotiyosiyanatları açığa çıkarmaktadır. Ancak laktik asit bakterilerinin de mirosinaz benzeri aktivite göstererek sinigrini hidrolize ettiğine yönelik literatür verileri mevcuttur. Dolayısıyla laktik asit fermentasyonu ile üretilen hardaliye içeceğinde yüksek antioksidan aktiviteye sahip allil izotiyosiyanat miktarının da daha yüksek olması beklenmektedir. Kabuğuyla birlikte fermente edilen üzümün kabuğundan hardaliyeye fenolikler gibi yüksek biyolojik aktiviteye sahip bileşikler de fermentasyon boyunca taşınmaktadır. Tüm bu faktörler nedeniyle hardaliyenin antioksidan kapasitesi üzüm suyundan daha yüksek seviyelerdedir.

Hardaliye üretiminde vişne yaprağı da hardaliyeye özgü aromanın geliştirilmesi amacıyla kullanılmaktadır. Geleneksel hardaliye üretiminde maya faaliyetini önlemek amacıyla hardal tohumu ilave edilmesine rağmen fermentasyon sırasında üründe arzu edilmeyen etanol üretimi meydana gelebilmekte ve bu durum mevsim sıcaklıklarının değişimine de bağlı olarak standart kalitede ürün üretiminde temel problem olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu nedenle günümüzde Hardaliye üretiminde şıradaki maya fermantasyonunu engelleyerek alkol oluşumunun önüne geçmek amacıyla kimyasal koruyucular da (K-Sorbat ve Na-Benzoat) kullanılmaktadır. Böylece buzdolabı koşullarında (4 ºC) Hardaliye'nin raf ömrü 4-6 aya kadar çıkabilmektedir. Ancak Hardaliye üretimi için henüz özel bir yasal düzenleme bulunmadığından, üreticiler tarafından farklı miktarlarda hardal tohumu ve kimyasal koruyucu kullanılabilmektedir. Hardaliye üretiminde hem mikrobiyal açıdan güvenli bir ürün elde etmek hem de ürün formülasyonunda bir standardizasyona gidilmesi açısından kullanılan starter kültür kullanımının ve antimikrobiyal maddelerin etkin konsantrasyonlarının ortaya konulması gerekmektedir. Bu kapsamdaki çalışmalar ileride hardaliye üzerine gerçekleştirilecek yasal düzenlemelere bir alt yapı oluşturabilecektir.

Bu tez çalışmasının amacı, hardaliye üretiminde kullanılan starter kültür, hardal tohumu ve kimyasal koruyucuların ürün üzerine etkilerinin karşılaştırmalı olarak değerlendirilmesidir. Bu kapsamda, fermentasyon süresince ve buzdolabı ve oda sıcaklığında depolama boyunca Hardaliye örneklerinin mikrobiyal, fizikokimyasal ve duyusal kalite karakteristiklerinde meydana gelen değişimler de takip edilmiştir.

BÖLÜM 2

GENEL BİLGİLER

2.1. Hardaliye

Üzüm ve üzüm içerikli ürünler, Türkiye'nin Trakya Bölgesi'nde geçmişten bu yana bol miktarda tüketilen vazgeçilmez gıda ürünleridir (Prado, Parada, Pandey, & Soccol, 2008). Üzümden üretilen geleneksel fermente bir içecek olan Hardaliye bölgede yıllardır geleneksel bir biçimde üretilmektedir. Trakya bölgesinde başlıca Kırklareli ve Edirne'de üretilen ve önemli bir geleneksel fermente içecek olan Hardaliye'nin yurtiçi ve yurtdışında tanıtılmasına yönelik birçok faaliyet yürütülmektedir. Yaklaşık 500 yıllık bir tarihi olan bu geleneksel içeceğin üretimi üzüm şırasının daha uzun süre korunabilmesi amacıyla geliştirilmektedir (Trakya Kalkınma Ajansı, 2014).

Hardaliye, hammaddesi siyah yaş üzüm (Merlot, Papazkarası, Alfons, Öküzgözü, Cabernet Sauvignon) olan, içerisine bütün/öğütülmüş hardal tohumlarının (% 0,2-2 w/v) ve vişne yapraklarının eklenmesi ile laktik asit fermantasyonu sonucunda üretilen alkolsüz fermente bir içecektir. Hardaliye, içeriğindeki laktik asit bakteri florası nedeniyle, süt ve süt ürünleri dışındaki probiyotik içecekler grubunda sınıflandırılmaktadır. Hardaliyenin rengi, üzümlerin orijinal rengini yansıtmakta olup, bu rengin yoğunluğu üzüm çeşidine ve üretim metoduna bağlı olarak değişmektedir. Üzüm şırasında maya faaliyetini engelleyerek alkol fermantasyonunu önlemek amacıyla kullanılan hardal tohumu aynı zamanda Hardaliye'ye özgü tat ve kokunun oluşmasına da katkı sağlamaktadır. Vişne yaprağı da hardaliyeye aroma vermek amacıyla katılabilmektedir (Aşkın ve Atik, 2016; Aydoğdu, Yıldırım, Halkman, & Durgun, 2014; Gucer, Aydogdu, & Durgun, 2009).

Geleneksel hardaliye imalatında; meşeden yapılmış fıçılar içerisine, sırası ile yıkanarak sap ve yabancı maddelerinden ayrılıp hafifçe çatlatılmış üzüm taneleri, siyah hardal

tohumu ve vişne yaprağı olacak şekilde kat kat döşenir. Yüzeyde küf oluşumunu engellemek için fıçının alt musluğundan alınan şıra, yeniden fıçı üzerine dökülerek içeriğin karışması sağlanır. Fıçılardaki hardaliye 20-25ºC'de 20 gün boyunca fermantasyona tabi tutulur. Süre sonunda süzülerek servise hazır hale gelir. Fermantasyonu tamamlanan hardaliyenin soğuk ortamda depolanması gerekmektedir. Geleneksel olarak üretilen hardaliyenin raf ömrü serin ortamda en fazla 3 aydır (Şahin, 2013). Geleneksel hardaliye üretiminde maya faaliyetini önlemek amacıyla hardal tohumu ilave edilmesine rağmen fermentasyon sırasında üründe arzu edilmeyen etanol üretimi meydana gelebilmekte ve bu durum mevsim sıcaklıklarının değişimine de bağlı olarak standart kalitede ürün üretiminde temel problem olarak ortaya çıkmaktadır. Bu nedenle günümüzde geleneksel Hardaliye üretiminden farklı olarak, şıradaki maya fermantasyonunu engellemek amacıyla, kimyasal koruyucular da (K-Sorbat ve Na-Benzoat) alkolsüz fermente içecekler için yasal olarak izin verilen limitlerde şıraya katılmaktadır. Koruyucu kullanıldığında buzdolabı koşullarında (4 ºC) hardaliyenin raf ömrü 4-6 aya kadar çıkabilmektedir.

2.2. Hardaliye üretiminde kullanılan hammaddeler

Üzüm

Asma olarak bilinen Vitis vinifera, Güney Avrupa ve Batı Asya'ya özgü olup bugün dünyanın tüm sıcak bölgelerinde yetiştirilmektedir (Nassiri-Asl ve Hosseinzadeh, 2016). Üzüm, Dünya'da portakaldan sonra üretimi en çok yapılan meyve olup, taze olarak tüketiminin yanı sıra farklı metotlar ile işlenip raf ömrü arttırılarak kuru üzüm, üzüm suyu, şarap, sirke, pekmez, pestil, reçel ve marmelat şeklinde de tüketilebilmektedir (Çelik, 2012). Dünya üzüm üretiminde 1 milyon 920 bin tonluk üretimle Türkiye üçüncü sırada yer almaktadır.

Üzüm kabuğu tanen, azotlu maddeler, renk maddeleri ve mineral maddeleri içermektedir. Üzüm tanesinin çekirdeğe yakın olan kısmında çekirdeksiz kuru madde ve asit, kabuğa yakın olan kısmında şeker, azotlu maddeler ve pektin bulunmaktadır. Tane çekirdeği ise tanen ve yağ içermektedir. Üzümde meyve suyu randımanı % 70-75 olup, kuru madde oranı %14-21'dir (Jale ve Cemeroğlu, 1986).

Üzümde yaklaşık %70-80 oranında su bulunmaktadır. Olgunlaşmamış üzüm tanesi yüksek miktarda asit içerirken, şeker miktarı düşüktür. Kuru madde oranı %17,3 olan bir

üzümün; %5,35 ‘ini glikoz, %5,33’ünü fruktoz, %1,2’sini sakkaroz, %2,19’unu mannoz ve geri kalan %3’e yakın kısmını da şeker olmayan bileşikler (amino asitler ve benzeri bileşikler) oluşturmaktadır (Jale ve Cemeroğlu, 1986). Olgunlaşma ile birlikte şeker miktarı yükselirken, asitlik azalmaktadır. Üzümde bulunan şekerlerin hemen hemen tamamı glukoz ve fruktozdan ibaret olup, üzümün ağırlıkça yaklaşık %20’sini (%8 fruktoz, %12 glukoz) oluşturmaktadırlar. Üzümün olgunlaşması aşamasında fruktoz ve glukoz miktarı kabaca eşit olup, aşırı olgunlaşmış ürünlerde fruktoz miktarı daha fazla olmaktadır (Soleas, Diamandis, & Goldberg, 1997). Meyvede bulunan glukoz ve fruktoz şekerleri difüzyon yolu ile doğrudan kana geçtiği için bebeklerin ve çocukların beslenmesinde önemli bir yer tutmaktadır.

Tartarik asit ve malik asit, üzümdeki asitliğin yaklaşık %62-92’sinden sorumludur. Olgunlaşma ile birlikte malik asit miktarı azalarak tartarik asit ortama baskın hale gelmektedir. Tartarik asit üzümden üretilen içeceklere ferah ve ağız sulandırıcı bir tat vermekle beraber aynı zamanda stabilite sağlamaktadır. Üzümde, tartarik ve malik aside ek olarak çok düşük miktarda asetik asit, sitrik asit ve suksinik asit bulunmaktadır. Amino asit miktarı çok az olmakla beraber, en çok arjinin ve prolin bulunmaktadır. Potasyum üzümde baskın olan mineral olup, miktarı 2500 g/L konsantrasyona kadar ulaşabilmektedir. Üzümde diğer minerallerin (kalsiyum, magnezyum ve sodyum) konsantrasyonu ise 200 mg/L’yi aşmamaktadır (Grainger ve Tattersall, 2016). Üzüm bazı vitaminler (A, B1, B2, Niasin ve C vitaminleri) yönünden de önemli bir kaynak olarak kabul edilmektedir (Çelik, 2012; Gülcü, Demirci, & Güner, 2008).

Üzüm, antimikrobiyal, antioksidan ve anti-inflamatuar etkisinden ötürü sadece beslenme amaçlı değil, aynı zamanda özel terapötik etkisinden dolayı da kullanılan ilk meyvelerdendir (Rauf vd., 2016). Üzümün insan sağlığına olumlu etkileri zengin fenolik madde içeriği ile ilişkilendirilmektedir. Fenolik bileşikler meyve ve sebzelerde renk, tat, koku ve ürüne has özellikleri üzerinde etkileri olan sekonder metabolitlerdir. Kimyasal olarak fenolik bileşikler bir veya birden fazla hidroksil grubu içeren siklik benzenlerdir. Bu bileşikler meyvenin daha çok kabuk ve çekirdek kısmında bulunmaktadır. (Jale ve Cemeroğlu, 1986).

Kırmızı üzümün yapısında tespit edilen başlıca polifenoller, antosiyaninler, beyaz üzümün yapısındaki başlıca polifenoller ise flavan-3-ol’ler olarak bilinmektedir

(Giuseppe Mazza, 1998). Aras (2006) tarafından toplam fenolik içeriği kırmızı üzümlerde 2,88−3,42 mg/g, beyaz çeşitlerde ise 1,87−2,22 mg/g arasında değiştiği tespit edilmiştir. Kırmızı üzüm ile beyaz üzümler karşılaştırıldığında kırmızı üzüm suyundaki fenolik bileşiklerin beyaz üzüm suyuna göre çok daha yüksek olduğu belirtilmiştir. Kırmızı şarabın fenolik içeriğinin (750-1060 mg/L), beyaz şaraptan (25 to 30 mg/L) yaklaşık 10-30 kat fazla olduğu tespit edilmiştir (Covas, Gambert, Fitó, & de la Torre, 2010).

Resveratrol, son yıllarda üzerinde önemle durulan yüksek biyolojik aktiviteye sahip polifenollerdendir. Üzümde özellikle kabuk kısmında yoğun olarak bulunan resveratrolün kemoterapötik ilaçlarla birlikte kullanıldığında antikanser tedavisinde yararlı olduğu bilinmektedir (G Mazza ve Francis, 1995; Rauf vd., 2016). Kırmızı şarabın kanser türleri üzerindeki koruyucu etkisi yüksek resveratrol içeriği ile ilişkilendirilmektedir.

Resveratrolün özellikle hayvan veya patojenlerin bitkilere saldırması, yaralanma veya ultraviyole ışığa maruz kalma sonucunda bitkiler tarafından dayanıklılık mekanizmasının oluşturulması amacıyla üretilen bir bileşik olduğu bilinmektedir. Üzüm ve üzüm suyunda resveratrol miktarı 0.05-3.54 mg/L düzeylerindedir. Kırmızı şarabın polifenol içeriğinin ise üzüm suyundan daha yüksek olduğu bilinmektedir (Amoutzopoulos vd., 2013). Bu farklığın büyük ölçüde kırmızı şarabın üretimindeki fermantasyon aşamasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Yüksek üzüm içeriği, üzümün çekirdek ve zar kısımları ile birlikte fermente edilmesi (Arici ve Coskun, 2001), hardaliyenin üzüm suyundan daha yüksek antioksidan aktiviteye sahip olabileceğinin bir göstergesidir.

Fenolik bileşikler antioksidan etkileri yanında, meyvelerin kendine özgü karakteristik tat, kokularının oluşumunda ve renk değişiminde de etkin rol oynamaktadırlar. Antosiyaninler, hidroksisinamik asit tartaratları, kateşin ve proantosiyanidinler tat ve renk oluşumundan sorumlu temel fenoliklerdir (Jongen, 2002). Üzümde bulunan fenolik bileşiklerin de ürünün görünüşünü, tadını, ağız hissini ve antimikrobiyal özelliklerini etkileyebilmektedir. Üzümsü meyvelerin tat ve lezzet yoğunluğunun fenolik bileşik miktarı ile ilişkili olduğunu ileri süren pek çok çalışma mevcuttur. Örneğin, basit fenoller ekşi tat verirken, kondanse fenoller burukluk vermektedirler.

Dünyada en çok bilinen şaraplık üzüm çeşitlerinden biri olan Cabernet sauvignon, sıcak iklimde yetişen, koyu yakut kırmızısı renge sahip, bordo kökenli bir cinstir. Cabernet sauvignon cinsi üzümün Fransa'dan Avrupa ve Yeni Dünya'ya yayıldığı bilinmekle

birlikte 20. yüzyılda en fazla ekilen üzüm çeşidi olmuştur (Aktan ve Kalkan, 2000; Robinson ve Harding, 2015). "Sauvignon" kelimesi Fransızcada "vahşi" anlamına gelmekte olup, dirençli olmasından dolayı Fransa'ya özgü vahşi bir Vitis vinifera asması olduğu düşünülmektedir. Bu üzümler kalın kabuklara sahip olmakla birlikte asmaları da daha dayanıklıdır. Ayrıca çürüme ve böceklere karşı daha dirençlidirler (Clarke, Rand, Rock, & Riches, 2001).

Üzümlerin mikroflorası, bağın bulunduğu konuma ve mevsim değişikliklerine göre de değişim göstermektedir. Herhangi bir ısıl işlem vb. uygulanmadığı süre üzüm şırası doğal mikroflorasını korur (Canbaş, 1986). Olgunlaşmamış üzüm tanelerinde genellikle çok az sayıda (1-3 log kob/g) mayaya rastlanmaktadır. Ancak, üzüm olgunlaştıkça ve hasat dönemine yaklaşıldıkça maya sayısının 4-6 log kob/g düzeyine ulaştığı belirtilmektedir. Olgunlaşma ile birlikte, şekerlerin üzümün iç dokularından yüzeye doğru sızarak veya difüze olarak maya gelişimini arttırdığı ifade edilmektedir (Fleet, 2003).

Üzüm şırası, yüksek şeker (140-260 g/L), düşük pH değeri (3.0-3.5), sülfit (40-80 mg/L), azot ve lipid içeriği nedeniyle fermantasyona oldukça elverişli bir üründür (Özbaş, 2009). Üzüm ve üzüm şırasında bulunan en yaygın maya türleri Saccharomyces ellipsoides ile Kloeckera apiculata veya Hanseniaspora uvarum'dur. Bunlar üzüm ve şıradaki mayaların %90'ını oluşturmaktadır (Canbaş, 1986). Üzüm ve şarapta bulunan bu mayalar genellikle Saccharomyces ve non-Saccharomyces olarak gruplandırılırlar. Saccharomyces türü içerisinde en fazla bilinen tür Saccharomyces cerevisiae olup, üzüm yüzeyinde az sayıda bulunmaktadır. S. cerevisiae üzümde bulunan şekeri kullanarak alkol ve karbondioksit üretir (Genç ve Çıldır, 2012). Mayalar geniş bir sıcaklık aralığında gelişebilmekle beraber (0-47 ^{o}C), optimum gelişme sıcaklıkları 20-30 ^{o}C arasındadır. Ancak bu değerler maya türüne, ürün pH'sına, ortamdaki koruyucu türü ve miktarına bağlı olarak değişkenlik göstermektedir. Mayaların optimum gelişim pH'larının 4,5-6,5 arasında olduğu gözlemlenmiştir. Bazı maya türleri yüksek asidik koşullara da dayanaklı olup, birçok maya türü pH 3,0'da gelişebilmektedir (Kıvanç ve Akgül, 1988).

Şarap fermantasyonunda üzüm şekerleri öncelikle Kloeckera ve Hanseniaspora türleri tarafından fermente edilerek alkole dönüştürülmektedir. Bu mayalar yüksek alkol miktarına duyarlı olup ancak % 4 alkol derişimine kadar fermantasyonda rol almaktadır.

Daha sonra Saccharomyces türleri özellikle S. cerevisiae ortama hâkim olarak % 15 derişime kadar alkol oluşturabilmektedirler (Grainger ve Tattersall, 2016).

Sağlıklı, hasar görmemiş üzümlerde, Saccharomyces cinsi içerisinde yer alan fermantatif türlerin, özellikle Saccharomyces cerevisiae'nın düşük sayılarda bulundukları belirtilmektedir. Hasar görmüş üzümlerde ise S. cerevisiae sayısının artış gösterdiği belirtilmiştir (Schuller, Alves, Dequin, & Casal, 2005). Üzüm ve üzüm şırasından izole edilen laktik asit bakterileri ise *Lb. plantarum, Lb. brevis, Lb. hilgardii, Leu. mesenteroides* olarak tanımlanmıştır (Rodas, Ferrer, & Pardo, 2005).

Mayaların gelişimleri için gerekli besin gereksinimleri değişkenlik göstermektedir. Özellikle meyve ve meyve suları mayalar için en uygun besiyeri kabul edilmektedir. Bu nedenle meyve ve meyve sularında ürün bozulmasına neden olacak mikroorganizmaların başında mayalar gelmektedir. Alkolsüz fermente içeceklerin bozulmasında çoğunlukla mayaların etkili olduğunu belirtmiştir. Üzüm suyundan üretilen meyve suları yüzden fazla maya türü içerebilmektedir. (Şenses ve Özbaş, 2004). Üzüm şırasında fermantasyonun başlangıcında Saccharomyces dışında mayalar üzüm yüzeyinde daha baskın oldukları için daha fazla bulunmaktadır. Üzümde bulunan Saccharomyces dışındaki bu mayaların konsantrasyonu 3-6 log kob/mL iken, Saccharomyces cinsi mayaların konsantrasyonu 1 – 5 log kob/mL arasında değişmektedir (Bağder ve Özçelik, 2009; Ciani, Beco, & Comitini, 2006). S. cerevisiae suşlarının en önemli özelliklerinden biri de yüksek miktarda etanolü (%15) tolere edebilmesidir. Bu nedenle yüksek şeker miktarına sahip ortamlarda fermantasyonun ilerleyen aşamalarında alkol miktarı arttıkça ortamda daha baskın olmakta ve fermantasyon işlemini tamamlamaktadırlar. S. cerevisiae, üzüm suyunu kuvvetli bir şekilde fermente edebilme ve ortamda çok az miktarda fermente olmamış şeker bırakma yeteneğinden dolayı şarap üretiminde en önemli mayalardan bir tanesidir (Özbaş, 2009).

Fermente alkollü içeceklerin tersine, bir alkolsüz fermente içecek olan Hardaliye üretiminde maya gelişimi ve aktivitesi istenmeyen bir durumdur. Türk Gıda Kodeksi Alkolsüz İçecekler Tebliği'ne göre (Tebliğ no: 2007/26) tebliğ kapsamında yer alan içeceklerde üretimin doğasından kaynaklanabilecek etil alkol miktarı en çok 3,0 g/L, laktik asit miktarı en çok 0,6 g/L, uçucu asit miktarı en çok 0,4 g/L olmalıdır. Hardaliye fermantasyonu sırasında alkol oluşumunun sınırlandırılabilmesi için doğal bir

antimikrobiyal olan hardalın mayaları inhibe edici etkisi sınırlı kalabilmektedir. Bu nedenle ticari üretimde geleneksel üretimden farklı olarak hardalın yanı sıra kimyasal katkı maddeleri (benzoatlar ve sorbatlar) kullanılmaktadır (Aydoğdu vd., 2014; Çoşkun, Arıcı, Çelikyurt, & Gülcü, 2012).

Hardal

Hardal, *Cruciferae* familyasına ait glukozinolat içeriği zengin bir bitkidir. Yaygın hardal türleri sarı hardal (*Sinapsis alba*), kahverengi (*Brassica juncea*) ve siyah hardaldır (*Brassica nigra*) (Okunade, Ghawi, Methven, & Niranjan, 2015). Türk Gıda Kodeksi Baharat Tebliği'ne (Tebliğ No: 2013/12) göre hardal; *Brassica nigra*, *Brassica juncea*, *Sinapis alba* türlerine giren bitkilerin tohumları veya öğütülmüş hali olarak tanımlanmaktadır. Hardal (*Sinapis alba*) tohumu, protein içeriği ve oldukça dengeli amino asit bileşiminin yanısıra, besinsel lif ve doğal antioksidan bakımından da oldukça zengindir. Zengin besin değerinden dolayı hardal unu gıda işlemede yaygın olarak kullanılmaktadır (Ildikó vd., 2006). Hardal, içerdiği glikozitler, sinabin, araşidik asit, ligoserik asit, erusik asit, linamaraz vb. bileşiklerden ötürü eczacılık ve kozmetik sanayiinde de kullanım alanı bulmaktadır (Amirnia, Ghiyasi, & Tajbakhsh, 2012).

Hardal tohumları nispeten yüksek oranda protein (% 28-36) ve yağ (%28-32) içerir ve yüksek enerji değerine sahiptir. Hardal tohumu esansiyel amino asitler açısından da zengin olmakla beraber, amino asit bileşimi de iyi dengelenmiştir. Günümüzde hardal tohumu, nispeten düşük fiyatı nedeniyle lezzet ve aroma vermek amacıyla gıdalara veya hayvan yemlerine doğal katkı maddesi olarak katılmaktadır (Ildikó vd., 2006; Okunade vd., 2015). Hardaliye üretiminde ise hardal tohumu üzüm şırasında maya faaliyetini engelleyerek alkol fermantasyonunu önlemek amacıyla antimikrobiyal ajan olarak kullanılmaktadır.

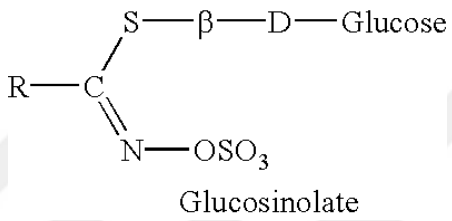
Mikroorganizmaları öldürmek veya gelişimlerini engellemek amacıyla kullanılan katkı maddeleri antimikrobiyal olarak isimlendirilmektedir. Kimyasal katkı maddelerinin insan sağlığı üzerine çeşitli zararlarının ortaya çıkmasıyla beraber tüketicilerin doğal ürünlere olan ilgisi daha da artmıştır. Tüketiciler hem besin değeri yüksek hem de güvenli gıda tüketmek istemektedirler. Bu nedenle son yıllarda hem doğal olmaları hem de kalıntı problemi yaratmamaları nedeniyle bitkilerin ve baharatların gıda endüstrisinde antimikrobiyal olarak kullanımları ve bunların etkileri üzerine birçok çalışma

yapılmaktadır. Tat ve aroma arttırıcı etkilerine ek olarak baharatlar antimikrobiyal etkileri, yüksek antioksidan içerikleri ve sağlık üzerine yararları nedeniyle de gıda endüstrisinde önemli bir kullanım alanı bulmaktadır. Yapılan çalışmalara göre de bazı baharat amacıyla kullanılan bitkilerin küf, maya ve bakterileri inhibe ettiği gösterilmiştir. Literatürde 1300'den fazla bitkinin antimikrobiyal etkisi olduğu rapor edilmiştir. Baharatların antimikrobiyal aktiviteleri, bitki türüne, etki ettiği mikroorganizma türüne, yetiştirilen coğrafya farklılığına, hasat zamanına ve çevresel iklime göre değişkenlik göstermektedir (Cutter, 2000; Faydaoğlu ve Sürücüoğlu, 2013; Oussalah, Caillet, Saucier, & Lacroix, 2007; E. Şahin, 2015).

Baharatların antimikrobiyal etkisi nedeniyle gıdalarda kullanılması ürüne eklenen koruyucu miktarını azaltacaktır. Ancak, baharatların besiyeri gibi model ortamlardaki antimikrobiyal etkisinin gıdalardaki antimikrobiyal etkisinden daha fazla olduğuna yönelik literatür verileri mevcuttur. Baharatların gösterdiği antimikrobiyal etki gıdanın yapısına ve kullanılan baharatların miktarına bağlıdır. Yüksek protein ve yağ içeriğine sahip gıdalar yüksek minimum inhibisyon konsantrasyon değerleri gerektirdiği için ürünün duyusal olarak kabul edilebilirliğini düşürerek baharatların gıdalarda koruyucu olarak kullanımını sınırlamaktadır (E. Şahin, 2015; Valero ve Salmeron, 2003).

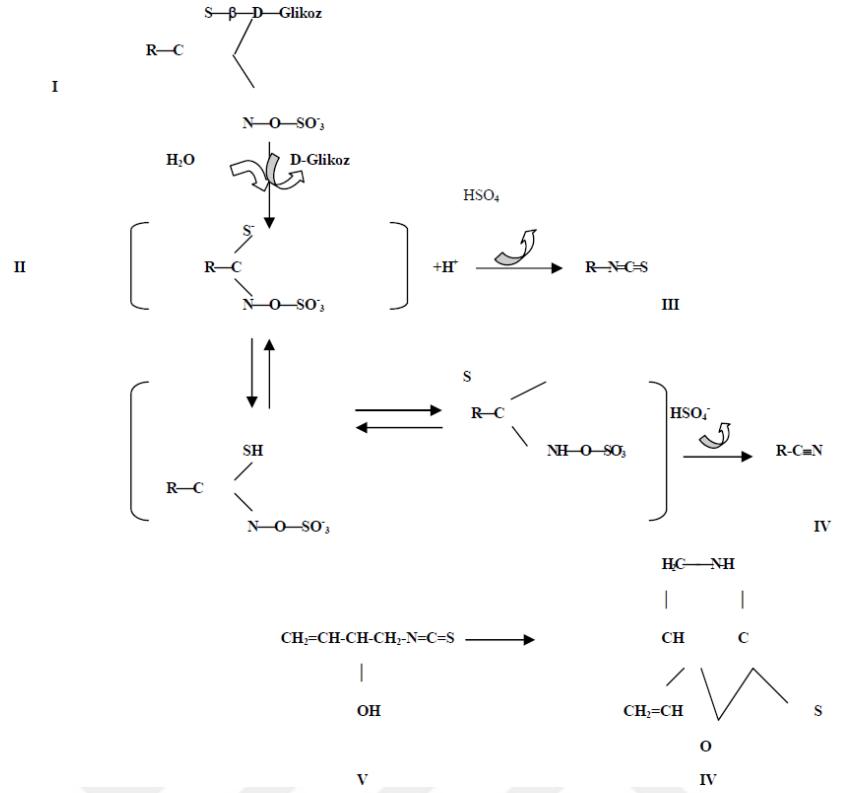
Genel olarak bitkisel essansiyel yağlara Gram negatif bakteriler Gram Pozitif bakterilere göre daha dirençlidir (Lemay vd., 2002; Nasar-Abbas ve Halkman, 2004; Yuste ve Fung, 2002). Gram pozitif bakterilerden en dirençlileri ise laktik asit bakterileridir (Dušan, Marián, Katarína, & Dobroslava, 2006; F Turantaş ve Ünlütürk, 1998). Baharatların antimikrobiyal etkisi, yapılarında çoğunlukla esansiyel yağ fraksiyonunda bulunan fenolik bileşikler ve terpenoidlerden kaynaklanmaktadır (Üner, Aksu, & Ergün, 2000). Benzoat ve sorbatlar gibi kimyasal koruyucular dışında bazı baharatların S. cerevisiae'ye karşı inhibitör etkili olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (Kıvanç ve Akgül, 1988). Bazı baharatların antimikrobiyal etkisinin incelendiği bir çalışmada, hardal tohumundan elde edilen allil izotiyosantlarının Lactobacillus acidophilus, Bacillus cereus, Aspergillus niger ve Saccharomyces cerevisiae'ye karşı antimikrobiyal etkisinin fesleğen, karanfil, kimyon, zencefil ve kişnişten daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Saccharomyces cerevisiae ve Aspergillus niger'in allil izotiyosantlara karşı duyarlı olduğu belirlenmiştir (Meena ve Sethi, 1994).

Cruciferae familyasındaki bitkilerde (brokoli, lahana, hardal vd.) yüksek miktarda glukosinolatlar olarak adlandırılan kükürtlü ve azotlu ikincil bitki metabolitleri bulunmaktadır (Yemiş ve Artık, 2007). Glukozinolatların kimyasal yapısı β-D-tiyoglukoz grubu sulfonlanmış aldoksim grubu ve amino asitlerden oluşmuş bir yan zincirden oluşmaktadır (Şekil 2.*1*). Bu bileşikler yan zincirlerindeki yapıya bağlı olarak glukozinolatlar alifatik, aromatik veya indolik glukozinolatlar olarak sınıflandırılmaktadır (Radojčić Redovniković, Glivetić, Delonga, & Vorkapić-Furač, 2008).



Şekil 2.1. Glukozinolatların kimyasal yapısı

Glukozinolat içeren bitkilerde thioglukosidaz (EC 3.2.3.1) aktivitesine sahip mirosinaz adı verilen enzim bulunmaktadır. Mirosinaz enzimi bitki dokusunun kesme, doğrama vb. işlemlerle fiziksel bütünlüğünün bozulduğu durumda açığa çıkarak aktif hale geçmektedir (Onsekizoglu ve Acar). Aktif hale geçen enzim glukozinolatları hidrolize ederek izotiyosiyanat, tiyosiyanat, nitril, oksazolidin-2-tiyon ve hidroksinitril epitiyonitrillerin oluşumuna neden olmaktadır. Bu bileşiklerden izotiyosiyanatlar ve tiyosiyanatlar geniş bir antibakteriyal ve antifungal aktiviteye sahip olup direkt olarak veya diğer bileşiklerle (organik asitler vb.) birlikte sinerjik olarak kullanılmaktadır (Yemiş ve Artık, 2007). İzotiyosiyanatlar ve tiyosiyanatlar hücredeki metabolik yolları, membran bütünlüğünü ve hücre yapısını bozarak antimikrobiyal etki göstermektedir (Seo vd., 2012; Turgis, Han, Caillet, & Lacroix, 2009). Bitki zararlılarının oluşturduğu fiziksel hasar sonucu dokulardan açığa çıkan mirosinazın glukozinolatları hidrolize etmesi sonucunda oluşan biyoaktif maddeler bitkilerin herbivor, böcekler ve fitopatojenler gibi zararlılara karşı korunmasında rol almaktadır (Bridges vd., 2002).



Şekil 2.2. Enzimatik parçalanma sonucu oluşan glikozinolat hidroliz ürünleri

I=glikozinolat, II=aglikon, III=izotiyosiyanat, IV=nitril, V=2-hidroksi-3-bütenil izotiyosiyanat ve VI=5-vinilokzalidin-2-tiyon (Özkur Ö. vd. 2007)

Hardal tohumları öğütüldüğü zaman çok az kokusu olmasına rağmen suyla karıştırıldığında keskin, karakteristik bir aroma oluşur. Bunun nedeni de hücre içerisinde bulunan mirosinaz enziminin suyun etkisiyle tohumda bulunan glukozinolatları parçalayarak allil izotiyosiyantları oluşturmasıdır (Abul-Fadl, El-Badry, & Ammar, 2011; Çoşkun vd., 2012; Popova ve Morra, 2014). Sinigrin, Brassicaceae familyasındaki hardal, Brüksel lahanası ve brokolilerde en fazla bulunan glukozinolattır (Mazumder, Dwivedi, & Du Plessis, 2016). Sinigrinin hidrolizi ile oluşan allil izotiyosiyanatlar, hardala özgü keskin koku ve lezzetin oluşmasına neden olmaktadır. Glukozinolatlardan meydana gelen biyoaktif izotiyosiyanatların miktarının arttırılması amacıyla mirosinaz enziminin optimum çalışma sıcaklığı üzerine bir çok çalışma yapılmıştır. Stoin vd. (2009), siyah hardaldan elde edilen mirosinazın, 45-50 °C sıcaklık aralığında maksimum aktivite gösterdiğini bildirmiştir.

Farklı hardal tohumlarının (siyah hardal *Brassica nigra,* beyaz hardal *Brassica alba*) ve üzüm çeşitlerinin (siyah üzüm: Hamburg Misketi, kırmızı üzüm: Madam Jean Mathias ve beyaz üzüm: Muskat Otonel) hardaliye özellikleri üzerine etkilerinin incelendiği bir çalışmada, hardaliye örneklerindeki pH değerinin kullanılan üzüm çeşidine göre değişim gösterdiği, kullanılan hardal tohumu çeşidinin ise pH üzerine önemli bir etkisinin olmadığı tespit edilmiştir. Siyah, kırmızı ve beyaz üzüm kullanılarak üretilen hardaliyelerde ürünün ortalama pH değeri sırasıyla 3,56, 3,18 ve 3,83 olarak bulunmuştur. Aynı çalışmada, bir haftalık fermantasyonun ardından, farklı hardal tohumu kullanımının örneklerdeki toplam mezofil aerob bakteri ve laktik asit bakteri sayıları üzerine etkileri arasında önemli bir fark bulunmazken, siyah hardal kullanılan hardaliyedeki toplam maya ve küf sayısı beyaz hardal kullanılan hardaliyeye göre yaklaşık 6 log kob/mL daha düşük bulunmuştur (Çoşkun vd., 2012).

Düşük yoğunluklu polietilen poşetler içerisine konulan allil izotiyosiyanatların, *E. coli* O157:H7 ile inoküle edilmiş (5,6 log kob/yaprak) ıspanak yaprakları üzerine antimikrobiyal etkisinin incelendiği bir çalışmada yapraklardaki *E. coli* O157:H7 sayısının 25 °C'de 5 gün depolama sonunda 2,1–5,7 log kob/yaprak azaldığı tespit edilmiştir. Ispanak yapraklarında başlangıçta 4,7–4,9 log kob/yaprak olan küf ve maya sayısı ise 25 °C'de 5 gün depolama sonucunda 1,7 log kob/yaprak'tan daha düşük bulunmuştur (Seo vd., 2012). Holley (1997) vakum paketlenmiş kürlenmiş etlerde allil izotiyosiyanatların antimikrobiyal etkilerini incelediği çalışmasında, allil izotiyosiyanatların bakteriyel gelişimi geciktirdiğini ancak bu etkilerin laktik asit bakterileri üzerinde çok daha düşük olduğunu tespit etmiştir.

Olaimat ve Holley (2016) *Listeria monocytogenes* ile inoküle edilmiş pişmiş kürlenmiş tavuk göğüslerinde allil izotiyosinat/hardal ekstarktı içeren karragenan ve kitozan film kaplamaların antimikrobiyal etkilerini incelemişlerdir. Söz konusu çalışmada, 50 ml/g allil izotiyosiyanat ve 250 mg/g hardal ekstraktı içeren kaplamalarda *L. monocytogenes* sayılarının 4 ºC de 70 gün depolamanın ardından yaklaşık olarak sırasıyla 6 kob/g ve 3.0 kob/g azaldığını bulunmuştur. Aynı çalışmada laktik asit bakterilerinin allil izotiyosiyanat ve hardal ekstraktına karşı daha dirençli olduğu tespit edilmiştir. Depolama sonucunda örneklerdeki laktik asit bakteri sayısı 50 ml/g allil izotiyosiyanat kullanımı ile yaklaşık 3 log kob/g azalırken, 250 mg/g hardal ekstraktı ile 3 log kob/g azalmıştır.

E. coli O157:H7 ile inoküle edilmiş kürlenmiş salam üzerine allil izotiyosiyanatlın (400 mikg/kg) ve hardal tozunun (60 g/kg) etkisinin incelendiği bir çalışmada E.coli O157:H7 sayısının 5 kob/g azaldığı tespit edilmiştir. Çalışmada salam yüzeyindeki laktik asit bakterilerinin allil izotiyosiyanatlardan etkilenmediği ancak hardal tohumu ile inhibe olduğu belirtilmiştir. Örneklerdeki maya sayısının ise daha düşük konsantrasyonda allil izotiyosiyanat (200 mikg/kg) kullanımı ile azaltılabildiği bildirilmiştir (Graumann ve Holley, 2009).

Shofran, Purrington, Breidt, ve Fleming (1998) bir glukosinolat olan sinigrin ve hidrolizat ürünlerinin antimikrobiyal etkilerinin incelemişlerdir. Çalışma sonucunda sinigrin ve hidrolizat ürünleri olan allil siyanid ve 1-siyano-2,3-epithiopropanın minimum inhibisyon konsantrasyonunun test edilen tüm mikroorganizmalara karşı1000 ppm 'den fazla olduğunu belirtmişlerdir. Ancak diğer bir hidroliz ürünü olan allil izotiyosiyanatın laktik asit bakterilerine (*Pediococcus pentosaceous, Leuconostoc mesenteroides, Lactobacillus brevis, Lactobacillus plantarum*) karşı 500-1000 ppm düzeyinde etki gösterirken, diğer test bakterilerine (*Escherichia coli, Pseudomonas fluorescens, Aeromonas hydrophilia, Staphylococcus aureus, Bacillus subtilis*) karşı 50-2000 ppm ve mayalara (*Saccharomyces cerevisiae, Pichia membranefaciens, Saccharomyces rouxii, Torulaspora delbruekii, Hansenula mrakii*) karşı ise 1-4 ppm konsantrasyonda etki gösterdikleri bulunmuştur.

Tsao, Yu, Potter, ve Chiba (2002) hardal tohumunda sinigrin miktarının 5,17 g/100g , Herzallah ve Holley (2012) ise 4.06 g/100 g olduğunu tespit etmişlerdir. Flamini ve Vedova (2007) Cabarnet Sauvignon üzümlerinden elde edilen şıranın ºBriks'inde 50 mg/L allil izotiyosiyanat kullanımı ile 3 ay, 100 mg/L allil izotiyosiyanat kullanımı ile ise 6 ay boyunca bir değişim göstermediğini ve özellikle maya kaynaklı fermantasyonun allil izotiyosiyanat kullanımı ile engellenebileceğini bildirmişlerdir.

Antimikrobiyal etkilerinin yanı sıra, glukozinolatların insan sağlığı üzerine etkileri üzerine birçok araştırma bulunmaktadır. Glukozinolatların antioksidan, antimutajenik, antikanser ve antiinflamatuar etkiye sahip olduğu rapor edilmiştir (Mazumder vd., 2016). Fareler üzerinde yapılan bir çalışmada, glukozinolatların enzimatik hidroliz ürünü olan tiyosinat iyonunun iyot iyonunun rekabetçisi olması nedeniyle guatrojenik etki gösterebileceği, ancak bu etkinin alınan iyot miktarının arttırılması ile azaltılabileceği

belirtilmiştir (Yemiş ve Artık, 2007). Literatürde, glukozinolatların hidroliz ürünlerinin karaciğer, pankreas, kolon ve ince bağırsakta tümörlerin oluşumunu engellediği bildirilmiştir. Bu bileşikler, antikarsinojenik etkilerini faz II detoksifikasyon enzimlerini (glutatyon-S-transferaz) uyararak göstermektedir (Lozano-Baena vd., 2015; Vig, Rampal, Thind, & Arora, 2009).

Glukozinolatlar mirosinazın yanısıra laktik asit bakterileri tarafından da degrede edilebilmektedir (Luciano, Belland, & Holley, 2011). Palop, Smiths, ve ten Brink (1995) Lactobacillus agilis'in mirozinaz benzeri aktivite sonucu sinigrini degrede edip glukoz ve allil izotiyosiyanat ürettiğini tespit etmişlerdir.

Sorbat ve Benzoatlar

Türk Gıda Kodeksi'nde, gıda katkı maddesi: "Besleyici değeri olsun veya olmasın, tek başına gıda olarak tüketilmeyen ve gıdanın karakteristik bileşeni olarak kullanılmayan, teknolojik bir amaç doğrultusunda üretim, muamele, işleme, hazırlama, ambalajlama, taşıma veya depolama aşamalarında gıdaya ilave edilmesi sonucu kendisinin ya da yan ürünlerinin, doğrudan ya da dolaylı olarak o gıdanın bileşeni olması beklenen maddeleri" şeklinde tanımlanmaktadır. Katkı maddeleri yönetmeliğinde ülkemizde üretilen geleneksel gıdalar içerisinde sadece fermente sucuk, ısıl işlem görmüş sucuk, pastırma, döner, kanatlı döner, köfte, pekmez, çiğ köfte ve mezeler (haydari, arnavut ciğeri, bakla fava, şakşuka, humus ve benzeri), pide ve bazlama ilgili düzenleme yapılmıştır. Üzümden üretilen önemli bir geleneksel ürün olan pekmezde katkı maddesi kullanımı yasaklanmıştır.

Gıda Katkı Maddeleri Yönetmeliği'nde koruyucular ise "Gıdaları, mikroorganizmaların sebep olduğu bozulmalara ve/veya patojen mikroorganizmaların gelişmelerine karşı koruyarak raf ömürlerinin uzatılmasını sağlayan maddeler" olarak tanımlanmıştır (Türk Gıda Kodeksi Gıda Katkı Maddeleri Yönetmeliği, 2013). Sorbatlar ve benzoatlar gıda endüstrisinde küf ve mayaların gelişimini engellemek için çok uzun yıllardır kullanılan koruyucu katkı maddeleridir.

Sorbik asit gıda endüstrisinde 1950'lerden bu yana kullanılmakta olup, bulunduğu ürünün organoleptik özelliklerini etkilememesi ve fizyolojik olarak zararlı olmaması nedeniyle tercih edilmektedir. Serbest asit formunda kullanıldığı gibi potasyum ve kalsiyum tuzları halinde de kullanılabilmektedir (E203 Kalsiyum sorbat, E202 potasyum

sorbat, E201 sodyum sorbat, E200 sorbik asit). Sorbik asidin tuzları suda daha yüksek çözünürlüğe sahip olduğundan genellikle tuz formlarının kullanımı tercih edilmektedir (Lück, 1990). Sorbik asit ve tuzları GRAS (Generally regarded as safe) listelerinde yer alan bir katkı maddesidir. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) ve Gıda ve Tarım Organizasyonu (FAO) tarafından oluşturulan JECFA (katkı maddeleri üzerinde çalışan ortak uzmanlar grubu) meyve sularında maksimum 1000 mg/kg sorbik asit ve sorbatlar kullanımına izin vermektedir. Diğer organik asitlerde olduğu gibi dissosiye olmamış formda en yüksek antimikrobiyal etkiye sahip olup, asidik ortamda (pH 6,5'in altında) etkisi artmaktadır. Sorbatların antimikrobiyal etki mekanizması temel olarak iki ana başlık altında toplanabilir. İlk önerilen mekanizma sorbatların hücre membranının bütünlüğünü etkileyerek taşınım fonksiyonlarını ve metabolik aktiviteyi bozmasıdır. İkinci mekanizma ise sülfidril içeren enzimlerin inhibisyonu sonucu antimikrobiyal etkidir (Davidson, Sofos, & Branen, 2005). Sorbatlar, *Saccharomyces, Candida, Byssochlamys, Hansenula, Oospora, Schizosaccharomyces, Pichia, Torulaspora, Zygosaccharomyces ve Rhodotorula gibi gıda kaynaklı mayaları; Alternaria, Aspergillus, Botrytis, Fusarium, Geotrichum, Mucor, Penicillium, Rhizopus, Sporotrichum* ve *Trichoderm*a gibi küfleri inhibe edebilmektedir. Sorbik asit ve tuzlarının bakterilere karşı olan etkisi ise maya ve küflere göre daha azdır. Hatta laktik asit bakterisine ait türler üzerindeki inhibitör etkisinin çok düşük düzeylerde olduğu belirtilmiştir (Doğruer, Gürbüz, & Nizamlhoğlu, 1996). Bununla beraber sorbatlar bazı katalaz-pozitif bakteriler üzerine etkili olabilmektedir. Sorbatların mayalar üzerine inhibe edici etkilerinin laktik asit bakterilerine göre daha fazla olması nedeniyle laktik fermente ürünlerde koruyucu olarak kullanımı tercih edilmektedir. Sorbatlar hububat, et ve meyve ürünlerinde yüzey küflerini engellemek amacıyla kullanılmaktadır. Bununla beraber reçel, ketçap ve turşu gibi ürünlerde de antimikrobiyal olarak tercih edilmektedir (Davidson vd., 2005; Erich Lück ve Jager, 1997; Öztürkcan ve Sıla, 2017).

Benzoik asit ve tuzları da gıdalarda en çok kullanılan antimikrobiyal gıda katkı maddelerindendir. Çözünürlüklerinin daha yüksek olması (50 g/100 mL) nedeniyle genellikle tuzları benzoik aside (0,34 g/100 mL) göre daha çok kullanılmaktadır. Asidik ortamda (pH 2,5–4,0) daha etkili olan benzoatlar alkolsüz içecekler, meyve ve sebze ürünleri (reçel, meyve suyu, soslar, turşu vb.) gibi ürünlerde antimikrobiyal gıda katkı maddesi olarak kullanılmaktadır. Benzoatların, hücre membrandaki proton taşıma

sistemini bozarak ve enzim inhibisyonuna neden olarak antimikrobiyal etki gösterdiği önerilmektedir (Davidson vd., 2005). JECFA, meyve sularında maksimum 1000 mg/kg benzoik asit ve benzoat (E210 benzoik asit, E211, sodyum benzoat, E212 potasyum benzoat, E213 kalsiyum benzoat) kullanımına izin vermektedir. Kabul edilebilir günlük tüketim miktarının üzerinde benzoat alınması astım, hiperaktivite ve deri döküntülerine neden olabilmektedir (Branen, Davidson, Salminen, & Thorngate, 2001; Öztürkcan ve Sıla, 2017). Benzoatların antimikrobiyal etkisi pH 4,5'in üzerinde azaldığı için küf ve mayalara karşı daha etkilidir.

Benzoatlar ve sorbatlar FDA (US Food and Drug Administration) tarafından güvenli (GRAS, Generally regarded as safe) olarak tanımlanmıştır. Sorbat ve benzoatın gıdalarda kullanılan konsantrasyonlarının herhangi bir genotoksik etkisinin olmadığı belirlenmiştir (Özdemir et al., 2012). Mayalar üzerinde benzoik ve sorbik asitin inhibe etkisi oldukça yüksektir. % 0,05'den daha düşük miktarlarda bile kullanıldığında mayalar üzerinde öldürücü etkisi olduğu görülmüştür. Ancak bu koruyucuların etkisi yüksek pH'larda azalmaktadır (Kıvanç ve Akgül, 1988). Benzoik asit ve sorbik asitin *Debaryomyces hansenii, Yarrowia lipolytica, Kloeckera apiculata, Zygosaccharomyces bailii, Zygosaccharomyces rouxii, Kluyveromyces marxianus, Pichia membranaefaciens, Pichia anomala* ve *Saccharomyces cerevisiae* üzerine etkilerinin incelendiği bir çalışmada pH 3-5 aralığında sorbik asitin benzoik asite göre daha etkili olduğu tespit edilmiştir. Y. lipolytica and Z. Bailii dışında kalan tüm mayalar 250 mg/L benzoik asit ve sorbik asit (pH 3.0) kullanımı ile inhibe edilmiştir (Praphailong ve Fleet, 1997).

Fulya Turantaş vd. (1999) siyah zeytin fermantasyonu üzerine potasyum sorbat (500 ppm) ve sodyum benzoatın (1000 ppm) tek başlarına veya birlikte (500 ppm sodyum benzoat + 250 ppm potasyum sorbat) kullanımlarının laktik asit bakterileri, küf ve mayalara etkilerini incelemişlerdir. Potasyum sorbat ve sodyum benzoat kullanılan zeytinlerdeki laktik asit bakteri sayısı kontrol örneğine göre yaklaşık 1 log kob/mL daha düşük bulunmuştur. Örneklerdeki küf popülasyonu ise her bir kimyasal koruyucu kullanımında tamamen deteksiyon limitinin (<1 log kob/mL) altına düşmüştür. Örneklerdeki maya sayısı kontrol örneğine göre daha fazla düşmüş olup, en yüksek etki (yaklaşık 2 log kob/mL) potasyum sorbat kullanımı ile sağlanmıştır.

2.3. Laktik asit bakterileri

Fermantasyon, gıda maddelerini özellikle de mikroorganizmalar tarafından bozulmaya karşı korunmasına yardımcı olan, gıda üretimi ve gıda muhafazasında bilinen en eski ve en ekonomik yöntemlerden biridir. Fermantasyon işlemi esnasında esansiyel amino asitler ve vitaminler gibi beslenme açısından önemli bileşikler de oluşmaktadır. Dolayısıyla, fermente gıdalar sadece önemli besin kaynaklarını sağlamakla kalmayıp, aynı zamanda sağlığı koruma ve hastalıkları önlemede büyük bir potansiyele sahiptir (Kabak ve Dobson, 2011).

Fermente içecekler üç farklı metodla üretilmektedir; (i) doğal mikroflora ile spontan fermantasyon, (ii) starter kültür ilavesi ile fermantasyon ve (iii) ısıl işlem görmüş hammaddeye starter kültür ilavesi (Breidt, Pérez-Díaz, McFeeters, & Lee, 2013).

Hardaliye üretimi spontan fermantasyona dayalı olarak üretilmekle beraber, doğal mikrofloranın değişim göstermesi nedeniyle üründe kalite problemleri oluşabilmektedir. Hardaliye fermantasyonu laktik asit bakterileri tarafından gerçekleştirilmektedir. Fermantasyonda rol alan laktik asit bakterileri üzümün doğal florasından kaynaklanmakla beraber, Hardaliye üretiminde laktik starter kültür kullanımına ilişkin çalışmalar yapılmaktadır (Coskun ve Arici, 2006; Kılıç, Ağdaş, Karahan, & Çakmakçı, 2016).

Laktik asit bakterileri Gram pozitif, kok veya çubuk şekilli, anaerobik ve aerotolerant, karbonhidratları fermente ederek enerji ve son ürün olarak laktik asit oluşturan bakteriler olarak tanımlanmaktadır (Salminen ve Von Wright, 2004). Genellikle mezofilik yapıda olan laktik asit bakterilerinin bazı türleri 5°C'nin altında gelişim gösterebilirken bazı türleri de 45°C gibi yüksek sıcaklıklarda gelişebilmektedirler. Genellikle 4,0 – 4,5 pH aralığında gelişebilen laktik asit bakterilerinin bazı türleri 3,2 gibi düşük ve 9,6 gibi yüksek pH'larda da gelişebilmektedir (Caplice ve Fitzgerald, 1999).

Laktik asit bakterileri, karbonhidrat metabolizmaları göz önüne alındığında homofermentatif ve heterofermentatif (zorunlu ve fakültatif) olarak iki gruba ayrılmaktadır (Çizelge 2.1). Homofermantatif laktik asit bakterileri heksoz şekerleri Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) yolula laktik asite dönüştürüken, heterofermantatif laktik asit bakterileri heksoz şekerlerden EMP ve pentoz fosfat yolları ile karbondioksit, laktik asit ve etanol veya asetik asit oluşturmaktadır (Stiles, 1996). Alkol fermantasyonu ile 1 mol glukozdan 2 mol ATP üretilmektedir. Mayalar aerobik ortamdan anaerobik ortama

aktarıldığında glukoz yıkım hızları 3-4 kat artmakta ve yüksek oranda alkol üretmektedir. Anaerobik ortamdan aerobik ortama geçildiğinde ise bu hız azalmakta ve alkol üretimi durmaktadır. Bu etkiye "Pastör Etkisi" adı verilmektedir (Breidt vd., 2013).

Çizelge 2.1. Fermantasyon tiplerine göre laktik asit bakterileri (Das, Pandey, Das, & Sarkar, 2016)

Zorunlu Homofermantatif	**Fakültatif Homofermantatif**	**Heterofermantatif**
Lactobacillus casei	Enterococcus faecium	Lactobacillus brevis
Lactobacillus plantarum	Enterococcus faecalis	Lactobacillus fermentum
Lactobacillus sake	Lactobacillus acidophilus	Lactobacillus sanfrancisco
Lactobacillus curvatus	Lactobacillus lactis	Leuconostoc dextranicum
Lactobacillus bavaricus	Lactobacillus delbrueckii	Leuconostoc mesenteroides
	Lactobacillus salivarus	
	Pediococcus acidilactici	
	Streptococcus themophilus	

Laktik asit bakterileri birçok fermente gıdanın üretiminde rol almaktadır (Leroy ve De Vuyst, 2004) (Çizelge 2.2). Meyve ve sebzelerin fermantasyonunda rol alan laktik asit bakterileri *Enterococcus faecalis, Leuconostoc mesenteroides. Lactobacillus brevis. Pediococcus damnosus* ve *Lactobacillus plantarum* türlerdir. Fermantasyon öncesinde meyve ve sebzeler *Pseudomonas, Erwinia* ve *Enterobacter* gibi aerobik bozulma etmeni bakteri ile birlikte birçok küf ve maya içermektedir. Uygun ortam bulduklarında bu mikroorganizmalar gelişerek üründe bozulmaya yol açmaktadır (Nguyen ve Carlin, 1994). Laktik asit bakterileri tarafından gerçekleştirilen fermantasyon sonucunda laktik asit başta olmak üzere bir çok organik bileşik oluşmaktadır. Başlangıçta düşük sayıda olan laktik asit bakterileri asitliğin artması ile beraber ortama hakim hale gelmektedir (Salminen ve Von Wright, 2004). Fermantasyonun başlangıcında *Leu. mesenteroides* diğer laktik asit bakterilerine göre daha hızlı gelişerek heterolaktik fermantasyon yapmaktadır. Bunun sonucunda oluşan laktik asit ve asetik asit ortamın asitliğini arttırırken, oluşan karbondioksit oksijen konsantrasyonunu düşürmektedir. Asitliğin düşmesiyle beraber aside daha dirençli olan homofermantatif *Lb. plantarum* ortama hakim olmaktadır. Artan asitlik ve laktik asit bakterileri tarafından üretilen bakteriyosin ve peroksitler gibi diğer antimikrobiyal maddeler ile diğer mikroorganizmaların gelişimi

baskılanmakta ya da inhibe olmaktadır (Breidt vd., 2013; Salminen ve Von Wright, 2004).

Çizelge 2.2. Fermente gıdalar ve bunların fermantasyonunda kullanılan laktik asit bakterileri (Leroy ve Vuyst, 2004)

Fermente Gıda	**Laktik Asit Bakterisi**
Fermente süt ürünleri	*Lactococcus lactis* subsp. *lactis, Lc. lactis* subsp. *cremoris, Lc. lactis* subsp. *lactis* var. *diacetylactis, Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris, Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis, Lb. helveticus, Lb. casei, Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus, Streptococcus thermophilus, Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus, Lb. acidophilus, Lb. rhamnosus, Lb. johnsonii, Lb. kefir, Lb. kefiranofacies, Lb. brevis*
Fermente Etler	*Lb. sakei, Lb. curvatus, Pediococcus acidilactici, P. Pentosaceus, Lb. alimentarius,*
Fermente Sebzeler	*Leuc. mesenteroides, Lb. plantarum, P. acidilactici, P. cerevisiae, Lb. brevis, Lb. plantarum, Lb. pentosus, P. pentosaceus, Lb. fermentum*
Soya Sosu	*Tetragenococcus halophilus*
Fermente Tahıllar	*Lb. sanfransiscensis, Lb. farciminis, Lb. fermentum, Lb. brevis, Lb. plantarum, Lb. amylovorus, Lb. reuteri, Lb. pontis, Lb. panis, Lb. alimentarius, Weissella cibaria*
Alkollü İçecekler	*Oenococcus oeni, Lb. sakei*

Starter kültür olarak kullanılan laktik asit bakterileri, gıdanın rengine, kokusuna ve tadına katkıda bulunmaktadır. Laktik asit bakterilerinin ürettiği organik asitler gıdaya asidik bir tat vermenin yanında proteolitik ve lipolitik aktiviteler de göstererek aroma bileşiklerinin oluşumuna yol açarlar. Ayrıca, gıda ortamında gelişim ile birlikte protein içeriğinin ve esansiyel amino asitlerin zenginleştirilmesi, vitaminlerin sentezi, bazı bileşenlerin toksisitesinin azaltılması/uzaklaştırılması, karbonhidrat içeriğinde azalma ve protein sindirilebilirliğinin arttırılmasında rol alırlar (Steinkraus, 1997). Laktik asit

bakterilerinin metabolitlerinden biri olan hidrojen peroksitin de (H_2O_2) tatta acılaşmaya ve renk kayıplarına neden olduğu bildirilmiştir (Ammor ve Mayo, 2007; Leroy ve De Vuyst, 2004).

Laktik asit bakterilerinin birçoğu GRAS (Generally Recognized as Safe) listesinde yer almaktadırlar. Laktik asit bakterileri laktik asit, asetik asit, karbondioksit, hidrojen peroksit ve bakteriyosin gibi birçok antimikrobiyal bileşik üretmektedir. Bu özellikleri nedeniyle bulundukları gıdada patojen ve saprofit bozulma etmeni birçok mikroorganizmanın inhibisyonuna neden olurlar. Laktik asit bakterileri ürettikleri bu antimikrobiyal bileşikler nedeniyle antimikrobiyal ajanlar olarak da kullanılmaktadır. Ayrıca laktik asit bakterilerinin biyokoruma ajanları olarak kullanılmalarının en büyük nedenleri, doğal yöntemlerin tüketiciler tarafından sağlıklı olarak kabul görmesi, gıdanın besin değerlerinde az bir kayıp olacağının düşünülmesi, bu yöntemle hem raf ömrünün uzaması hem de işleme maliyetlerinin düşürüleceğine inanılması ve son olarak da patojen mikroorganizmaların biyokontrolü gibi gelişmekte olan alanlar için olanak sağlaması olarak belirtilmektedir (Gálvez, Abriouel, Benomar, & Lucas, 2010).

Zayıf asitlerin antimikrobiyal etkisi nötral pH'larından daha düşük pH'larda daha fazladır. Asetik asitin pK değeri 4,87 iken laktik asitin pK değeri 3,08'dir. Örneğin pH 4 ortamında laktik sitin % 11'i dissosiye olmamış formdayken asetik asidin % 92'si dissosiye olmamış formdadır. Bu nedenle asetik asidin antimikrobiyal etkisi laktik asitten daha fazladır. Bununla beraber, laktik asit oluşumu ortamın pH'ını düşürürken diğer zayıf asitlerin antimikrobiyal etkinliğini de arttırmaktadır (Ouwehand ve Vesterlund, 2004). Nitekim, laktik asit ve asetik asit karışımı *Salmonella* Typhimurium'un ortamdaki sayısını her asidin tek başına kullanılmasına göre daha fazla düşürmüştür (Rubin, 1978).

Oksijen bulunan ortamda laktik asit bakterileri flavoprotein içeren oksidaz enzimleri ile hidrojen peroksit üretebilirler. Laktik asit bakterileri katalaz negatif olduğu için ortamdaki hidrojen peroksit derişimi artmaktadır. Hidrojen peroksit güçlü okside edici etkisiyle bakteri hücresinde sülfidril içeren proteinleri ve membran lipidlerini okside ederek inhibisyona yol açmaktadır (Ouwehand ve Vesterlund, 2004). Hidrojen peroksit oluşumu laktik sit bakterilerinin ürogenital yolda kolonizasyonunda önemli bir rol üstlenmektedir. Laktik asit bakterilerinin kolonizasyonu virüs veya bakteri kaynaklı

ürogenital enfeksiyonların engellenmesini sağlamaktadır (Vallor, Antonio, Hawes, & Hillier, 2001).

Laktik asit fermantasyonu sonucunda oluşan karbondioksitin iki tür antimikrobiyal etkisi vardır. Birincisi anaerobik koşullar yaratarak oksijenli ortamda gelişecek diğer mikroorganizmaların gelişmesini engellemesi, ikincisi de hedef hücrenin çift katlı lipid membranında birikerek hücre zarı geçirgenliğinde fonksiyon bozukluklarına yol açmasıdır (Salminen ve Von Wright, 2004).

Bakteriyosinler ribozomal olarak sentezlenen ve diğer bakterilerin inhibisyonunda rol alan bileşiklerdir. Bakteriyosinlerin en önemli öldürücü etkisi hedef mikroorganizmanın membran bütünlüğünü bozmasından kaynaklanmadır. Bakteriyosin, üreticisi olan bakteriye karşı etkili olmayıp genellikle üretici hücreye yakın türlere karşı öldürücü etki göstermektedir. Laktik asit bakterileri tarafından üretilen bakteriyosinler genellikle diğer Gram pozitif bakterilere karşı öldürücü etki göstermektedir. Farklı sınıflandırmalar bulunmakla beraber bakteriyosinler 3 ana sınıfa ayrılmıştır; (i) antibiyotikler, (ii) küçük ısıya dayanıklı peptidler ve (iii) büyük ısıya duyarlı proteinler. Laktik asit bakterileri tarafından üretilen bakteriyosinlerin *Bacillus*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Enterococcus*, *Listeria*, *Micrococcus*, *Mycobacterium*, *Staphylococcus Campylobacter*, *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia* ve *Neisseria* gibi birçok patojen gram pozitif ve gram negatif bakteri üzerine etkili olduğu tespit edilmiştir (Gillor, Etzion, & Riley, 2008; Parada, Caron, Medeiros, & Soccol, 2007)

Metchnikoff (1908) Bulgaristan'da yaşayan birçok kişinin 100 yıldan fazla yaşayan kişilerin uzun ömrünü yüksek miktarda yoğurt tüketimi ile ilişkilendirmiş ve yoğurttan izole ettiği bakterilerin sağlık üzerine yararlı etkileri olduğunu bildirmiştir. Daha sonra sağlık üzerine yararlı etkileri olan bu mikroorganizmalar "probiyotik" olarak adlandırılmıştır. Dünya Sağlık Örgütü probiyotik bakterileri "vücuda yeterli miktarda alındığında konakçı üzerinde sağlık üzerine yararlı etki gösteren canlı mikroorganizmalar" olarak tanımlamaktadır (De Vuyst, Falony, & Leroy, 2008). Laktik asit bakterilerinin bir çoğu probiyotik olup, sıklıkla kullanılan probiyotik laktik asit bakterileri; *Lactobacillus* spp., *Streptococcus* spp., *Enterococcus* spp., *Leuconostoc* spp. ve *Pediococcus* spp.'dir (Sezen, 2013).

Probiyotiklerin laktoz miktarının azaltılması (laktoz intoleransın önlenmesinde), patojenlerin inhibisyonu, kabızlık, çeşitli tip diyarelerin önlenmesi ve tedavisi, immün sistemin güçlendirilmesi, serum kolesterol seviyesinin azaltılması, antitümör ve antikanserojen etkileri gibi insan sağlığına pek çok olumlu etkileri vardır (Saavedra, 2001; Sezen, 2013).

Probiyotiklerin sağlık üzerine yararlı etkilerini göstermeleri için gıdaların üretimi ve depolanması sırasında canlılıklarını ve fonksiyonel özelliklerini yitirmemeleri ve vücuda alındığında gastrointestinal pasajı canlı olarak geçerek kolona ulaşarak kolonize olabilmeleri gerekmektedir. Probiyotiklerin sağlık açısından sahip olması gereken özellikler kısaca aşağıdaki gibi sıralanabilir (Saarela, Mogensen, Fonden, Mättö, & Mattila-Sandholm, 2000).

1. İnsan tüketiminde kullanılacak olanlar sağlıklı insanlardan izole edilmeli
2. Patojen olmamalı
3. Hastalıklarla bir ilişkisi olmamalı
4. Transfer edilebilir antibiyotik genlerine sahip olmamalı

Fonksiyonel probiyotik gıdalar sağlık üzerine olumlu etkileri nedeniyle tüketiciler tarafından tercih edilmektedir. Bu gıdalarda bulunan probiyotik kültürler üretim ve depolama boyunca canlılıklarını korumalıdırlar. Probiyotiklerin vücuda alımında fermente süt ürünleri başta olmak üzere fermente meyve ve sebze suları, turşular, boza vb. geleneksel fermente gıdalar rol almaktadır. Probiyotik fermente gıdaların üretiminde doğal florada bulunan mikroorganizmalar yer almakla beraber birçok gıdada probiyotik/starter kültür kullanılmaktadır. Probiyotik bakterilerden en önemlileri laktik asit bakterileri olup, *L. delbreuckii* ssp. b*ulgaricus, L. acidophilus, L. casei, L. fermentum, L. plantarum, L. brevis, L. lactis,* ve *L. reuteri* gibi laktobasiller yaygın olarak kullanılan probiyotiklerdir (Naidu, Bidlack, & Clemens, 1999; Saarela vd., 2000).

2.4. Hardaliye ile ilgili çalışmalar

Hardaliye, önemli bir geleneksel fermente içecek olmasına rağmen, literatürde bu ürünle ilgili sınırlı sayıda çalışma yer almaktadır. Coskun ve Arici (2006) geleneksel Hardaliye üretimine alternatif olarak starter kültür kullanımının Hardaliye üzerine etkilerini incelemişlerdir. Starter kültür olarak kullanılan *Lactobacillus sanfrancisco, Lactobacillus*

acetotolerans, Lactobacillus pontis ve *Lactobacillus paracasei ssp. paracasei* suşları pastörize edilmiş şıraya inoküle edilmiştir. Fermantasyon sonunda (oda sıcaklığı, 7 gün) beyaz hardal kullanılan (1 g/L) Hardaliyelerdeki başlangıç laktik asit bakteri sayısı sırasıyla 4,60, 4,69, 4,47, 4,79 kob/mL'den 4,92, 4,94, 5,90, 6,83 kob/mL'ye; siyah hardal kullanılan (1,5 g/L) Hardaliyelerdeki laktik asit bakteri sayısı 4,25, 4,07, 4,07, 4,20 kob/mL'den 6,60, 7,20, 6,54, 6,77 kob/mL'ye değişim göstermiştir. Çalışma sonucunda, kullanılan kültürlerin ürünün toplam şeker içeriğindeki azalmaya önemli bir etkisinin olmadığı ve Hardaliyelerdeki pH değerinin kullanılan kültüre göre 3,15-3,44 arasında değiştiği tespit edilmiştir. Bu sonuçlar siyah veya beyaz hardal tohumu kullanımının laktik asit bakterileri üzerine öldürücü bir etkisi olmadığını göstermiştir.

Piyasadan satışa sunulan 26 adet Hardaliye örneğinde yapılan bir çalışmada, örneklerdeki pH değerinin 3,21-3,97 arasında değiştiği bildirilmiştir. Bu örneklerdeki toplam bakteri sayısı 2-5 log kob/mL, laktik asit bakteri sayısı 2-4 log kob/mL ve küf ve maya sayısı (21 adet örnekte) ise 2-4 log kob/mL arasında bulunmuştur. Örneklerin hiçbirinde koliform grubu bakteri tespit edilmemiştir. Çalışmanın ikinci kısmında 2 g/kg hardal tohumu, 1000 ppm sodyum benzoat ve sodyum sorbat kullanılarak üretilen Hardaliye örneklerinde, 7 gün fermantasyon boyunca pH, etanol ve mikrobiyolojik analizler gerçekleştirilmiştir. Fermantasyon sonucunda pH 3,86'dan 3,39'a düşerken, etanol konsantrasyonu 595,50 mg/dL olarak tespit edilmiştir. Fermantasyon sonunda toplam bakteri, laktik asit bakterisi ve toplam maya küf sayısı sırasıyla 5 log kob/mL'den 2 log kob/mL'ye, 4 log kob/mL'den 3 log kob/mL'ye ve 5 log kob/mL'den 3 log kob/mL'ye düşüş göstermiştir. Fermantasyon sürecinde alınan örneklerdeki laktik asit bakterileri *Lactobacillus paracasei, Lactobacillus casei, Lactobacillus brevis, Lactobacillus acetotolerans, Lactobacillus sanfransisco* ve *Lactobacillus vaccinostercus* olarak tanımlanmıştır (Arici ve Coskun, 2001).

Demre (kırmızı) ve Gimrik (beyaz) üzümlerinden ve starter kültür olarak *Lactobacillus plantarum* AK4-11 kullanılarak üretilen Hardaliye'de 14 gün fermantasyon ve soğukta depolama boyunca pH, fenolik bileşikler ve mikrobiyolojik kalite (toplam bakteri, laktik asit bakterileri ve toplam küf maya) karakteristikleri takip edilmiştir. Çalışma sonucunda kırmızı üzüm kullanılarak üretilen hardaliyelerdeki fenolik madde miktarının beyaz üzümden üretilene göre daha fazla olduğu belirlenmiştir. Kırmızı üzümlerden üretilen Hardaliyelerin pH değeri 90 gün sonunda 4,1 iken, beyaz üzümden üretilen örneklerin pH

değeri 3,8 olarak bulunmuştur. Kontrol grubuna göre starter kültür kullanılarak üretilen Hardaliyelerde laktik asit bakteri sayısı daha yüksek bulunurken, gruplar arasında maya-küf ve toplam bakteri sayısı açısından fark bulunmamıştır (Kılıç vd., 2016).

Coşkun ve Arıcı (2011), Hardaliye üretiminde siyah hardal tohumunun, beyaz hardal tohumuna göre mayalar üzerinde daha yüksek inhibitör etkiye sahip olması nedeniyle siyah hardal tohumu kullanımının daha uygun olduğunu rapor etmişlerdir. Söz konusu çalışmada toplam mezofil aerob bakteri sayıları ile laktik asit bakteri sayılarına etkileri bakımından hardal tohumları arasında bir fark bulunmamıştır.

Alphonse Lavallée ve Papazkarası üzüm çeşitleri kullanılarak üretilen Hardaliye örneklerinde koliform bakteri, E. coli, maya ve küf sayıları ile toplam çözünebilir kuru madde ve asitlik değerleri oda sıcaklığında 29 gün fermantasyon süresince belirlenmiştir. Çalışmada Alphonse Lavallée üzümleri kullanılarak üretilen Hardaliyelerde %2 oranında hardal kullanılırken, Papazkarası üzümleri ile üretimde %1 hardal kullanılmıştır. Her iki üretimde 25 mg/L kükürt ve 0,25 g / 10L konsantrasyonda sodyum benzoat ve potasyum sorbat kimyasal koruyucu olarak kullanılırken, tat ve aroma vermek amacıyla 25 g / 10 L vişne yaprağı eklenmiştir. Hardaliye örneklerinin hiçbirinde E. coli ve koliform bakteri saptanmamıştır. Başlangıç maya sayısı Alphonse Lavallée Hardaliyesinde 6,6 log kob/mL iken, fermantasyonun ikinci günü 4.5 log kob/mL'ye düşmüş ve bu noktadan sonra maya belirlenememiştir. Benzer şekilde Papazkarası Hardaliyesinde başlangıçta 5.7 kob/mL olan maya sayısı, ikinci günden sonra deteksiyon limitlerinin altına düşmüştür. Her iki Hardaliye üretiminde de toplam canlı bakteri ve laktik asit bakteri sayıları fermantasyonun 10. gününe kadar artış gösterdikten (6-8 kob/mL) sonra fermantasyon sonuna kadar yaklaşık olarak 1- 2 log (5-6 kob/mL) azalma göstermiştir. Alphonse Lavallée ve Papazkarası Hardaliyelerinde pH fermantasyon başlangıcında ve sonunda sırasıyla 4,24 - 3,28 ve 3,82 - 3,73 olarak bulunmuştur. Örneklerdeki ºBriks ve indirgen şeker içeriği fermantasyon boyunca istatiksel olarak önemli değişim göstermemiştir (Aydoğdu vd., 2014).

Aşkın ve Atik (2016), Papazkarası üzümü, % 1 Hardal tohumu, % 0.1 sodyum benzoat, potasyum sorbat ve % 1 vişne yaprağı kullanılarak ürettikleri Hardaliye örneklerinde 4 ºC ve 20 ºC sıcaklıkta 60 gün depolama süresince fenolik madde bileşimi ve antioksidan aktivitedeki değişimi takip etmişlerdir. 4 ºC ve 20 ºC'de 60 gün depolama sonucunda

antosiyanin içeriğinde sırasıyla %60 ve % 78'lik azalma meydana gelmiştir. Toplam fenolik madde içeriği ise depolama sıcaklığından bağımsız olarak 60 gün depolama sonucunda azalma göstermiştir.

Diğer taraftan özellikle üzüm suları için önemli bir organik asit olan tartarik asit, küf ve birkaç tür laktik asit bakterisi tarafından parçalanabilmektedir. Homo ve heterofermentatif laktik asit bakterileri ile tartarik asidin parçalanması, farklı ürünlerin oluşmasına neden olur. Birincisinde; laktik asit, asetik asit ve CO_2 oluştuğu halde, ikincisinde; süksinik asit, asetik asit ve CO_2 ortaya çıkar. Ayrıca meyve sularında dihidroşikimik asit varlığı da laktik asit bakterisi bozulmasının göstergesidir (Jale ve Cemeroğlu, 1986; Schobinger, 1987).

BÖLÜM 3

MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Hardaliye üretiminde kullanılan hammaddeler

Bu çalışmada Hardaliye üretiminde kullanılan Cabarnet Sauvignon cinsi 2016 yılına ait Eylül ayında hasat edilmiş siyah üzüm, Edirne ilinde bulunan Arda Şarapçılık Bağcılık Gıda Sanayi Turizm ve Ticaret Limited Şirketi'nden; siyah hardal (*Sinapsis nigra*) tohumu ve vişne ağacı (*Prunus cerasus*) yaprakları da Edirne piyasasından temin edilmiştir. Kimyasal koruyucu olarak ise sodyum benzoat (Sigma-Aldrich, Almanya) ve potasyum sorbat (Sigma-Aldrich) kullanılmıştır.

3.1.2. Starter kültür

Hardaliye üretiminde starter kültür olarak *Lactobacillus plantarum* Lp-115 (Danisco, Danimarka) suşu kullanılmıştır. *L. plantarum* Lp-115 kültürü liyofilize formda derin dondurucuda (-20 ºC) depolanmıştır. Stok kültür Hardaliye üretimi öncesinde 20 mL MRS broth besiyerine ekilmiş, 35 ºC'de 24 saat inkübe edilerek canlandırılmıştır. Canlandırma işlemi 2 kere tekrar edilmiştir. Daha sonra kültür santrifüjlenerek (5000 g, 4 ºC, Christ, Almanya) süpernatant kısmı atılmış ve aynı hacimde üzüm suyu eklenerek inokülasyona hazır hale getirilmiştir.

3.1.3. Mikrobiyolojik analizlerde kullanılan besiyerleri

Bakteri sayımları ile izolasyonu ve tanımlanmasında PCA (Plate Count Agar, Merck, Almanya), TBX Agar (Chromocult Tryptone Bile X-glucuronide Agar, Merck), RBCA (Rose Bengal Chloramphenicol Agar, Merck), MRS Agar (De Man, Rogosa and Sharpe Agar, Merck 1.10660), MEB (Malt Extract Broth, Merck), MEA (Malt Extract Agar,

Merck), MRD (Maximum Recovery Diluent, Merck) ve MRS Broth (Merck) besiyerleri kullanılmıştır.

Kullanılan besiyerleri üretici firmaların direktiflerine göre hazırlanmıştır.

3.1.4. Kimyasallar

Trolox, ABTS (2,2′-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid), kromotografik glukoz standardı, kromotografik fruktoz standardı, kimyasal antimikrobiyal koruyucu olarak kullanılan sodyum benzoat ve potasyum sorbat Sigma-Aldrich (Almanya) firmasından temin edilmiştir.

3.2. Metot

3.2.1. Siyah hardal tohumunun *Saccharomyces cerevisiae* üzerine antifungal etkisinin belirlenmesi

Hardaliye üretiminde %0.1 - %2 (w/w) arasında Hardal tohumu kullanılabilmektedir (Aydoğdu vd., 2014; Coşkun ve Arıcı, 2011). Çalışmada öğütülmüş siyah hardal tohumunun antimikrobiyal etkisi test kültürü olarak seçilen *Saccharomyces cerevisiae*'ya karşı serum fizyolojik (SF, %0,85 NaCl) ve besiyeri (MEB) ortamında belirlenmiştir. Bu amaçla tüp dilüsyon yöntemi kullanılmıştır.

Saccharomyces cerevisiae stok kültüründen 10 mL MEB besiyerine bir öze dolusu ekim yapılmış ve 25 ºC'de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında kültürdeki hücre konsantrasyonu spektrofometreyle (Shimadzu) optik yoğunluğu (OD, 600 nm) ölçülerek belirlenmiş ve steril serum fizyolojik (SF, % 0,85) kullanılarak hücre konsantrasyonu yaklaşık 10^7 kob/mL'ye ayarlanmıştır.

Öğütülmüş siyah hardal tohumu son konsantrasyonları %1, %2 ve %3 (w/v) olacak şekilde 10 mL SF ve 10 mL MEB besiyerine katılmıştır. Daha sonra hardaldaki mirosinaz aktivitesinin en fazla olduğu 60 ºC'de 1 saat bekletilmiştir (Van Eylen, Oey, Hendrickx, & Van Loey, 2008). Sıcaklık uygulamasının ardından öğütülmüş hardal tohumu içeren çözeltiler musluk suyu altında oda sıcaklığına soğutulmuş ve ardından her bir tüpe *Saccharomyces cerevisiae* kültüründen 100 µL ekilerek 25 ºC'de 48 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyonun 24. ve 48. saatlerinde tüplerden 1'er mL örnek alınarak dökme

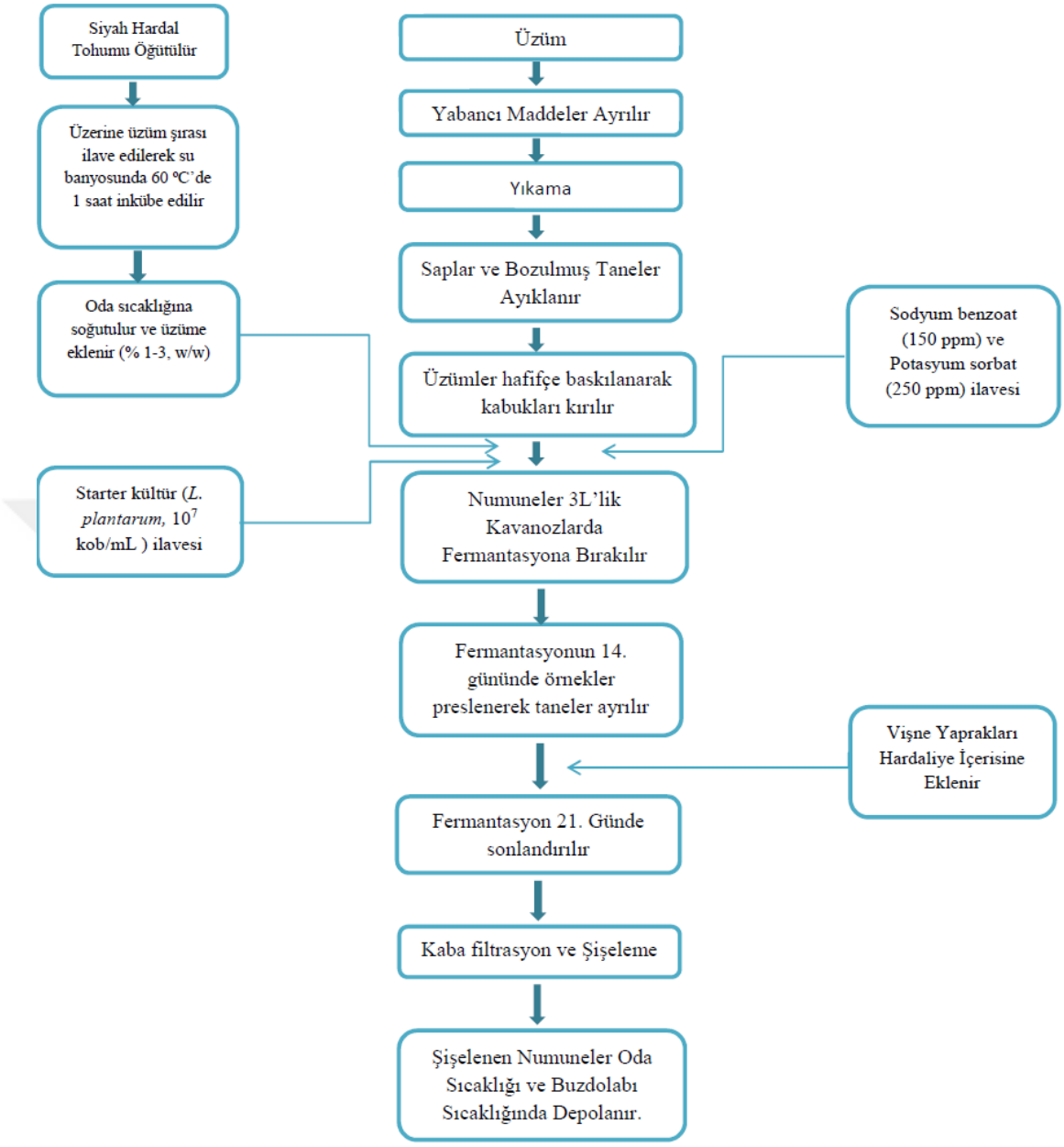
plak yöntemiyle MEA besiyerine ekilmiştir. Maya sayısı (kob/mL) 25 ºC'de 72 saat inkübasyonun ardından belirlenmiştir.

3.2.2. Hardaliye üretimi

Hardaliye üretiminde Cabarnet Sauvignon üzümleri kullanılmış olup, üretim akış şeması Şekil 3.1'de verilmiştir. Öncelikle, üzümler temizlenmiş ve çeşme suyu altında yıkandıktan sonra sap ve bozulmuş taneler ayıklanmıştır. Üzüm taneleri hardaliyeye acımsı tat vermemesi amacıyla çekirdeğe zarar vermeden el ile çatlatılmıştır. Üretimde, 3 farklı konsantrasyonda öğütülmüş siyah hardal tohumu (%1-%2-%3, w/v) kullanılmıştır. Üzümlere ilave edilmeden önce hardalın üzerini kaplayacak kadar üzüm suyu ilave edilerek 60 °C'de 1 saat inkübe edilmiştir. Koruyucu kullanılarak üretilen Hardaliye örneklerine son konsantrasyonları sırasıyla 250 ppm ve 150 ppm olacak şekilde potasyum sorbat ve sodyum benzoat ilave edilmiştir. Starter kültür kullanılarak Hardaliye üretiminde ise üretimin başlangıcında ortama diğer bileşenlerden farklı olarak ortamdaki konsantrasyonu 10^7 kob/mL olacak şekilde *Lactobacillus plantarum* Lp-115 kültürü ilave edilmiştir.

Fermentasyon öncesinde üzüm taneleri üzerine diğer bileşenler Çizelge 3.1'de belirtilen miktarlarda eklenmiş ve karıştırıldıktan sonra 3 L'lik steril cam kavanozların içerisine aktarılmıştır. Oda sıcaklığında (20 ºC) iki hafta fermentasyonun ardından örnekler tülbent ile hafifçe baskı yapılarak süzülmüştür. Süzüntü bir başka steril kavanoz içerisinde toplanmış ve üzerine tat ve aroma vermesi amacıyla 1 litre Hardaliye başına 2 g vişne yaprağı ilave edilmiş ve bir hafta süresince daha fermentasyona devam edilmiştir. Fermentasyon sonunda örnekler çift katlı tülbent kullanılarak süzülmüş ve steril şişelere (100 mL) aktarılmıştır. Şişelenen örneklerin yarısı buzdolabında (+4 °C) diğer yarısı ise oda sıcaklığında (20 °C) 2 ay depolanmıştır.

Fermentasyonun 1, 4, 7, 14 ve 21. günlerinde ve depolama süresince ayda bir kez olmak üzere fiziksel, kimyasal ve mikrobiyolojik analizler 3 tekerrürlü olarak gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.1. Hardaliye üretim akış şeması

Çizelge 3.1. Farklı miktarlarda starter kültür, hardal ve koruyucu madde kullanılarak üretilen Hardaliye örnekleri

Örnek No	Hardal (w/w)	Koruyucu (Sodyum benzoat, 150 ppm - Potasyum sorbat, 250 ppm)	Starter Kültür (*L. plantarum* Lp-115)
1A	% 1	Yok	Yok
1B		Yok	Var
1C		Var	Yok
1D		Var	Var
2A	% 2	Yok	Yok
2B		Yok	Var
2C		Var	Yok
2D		Var	Var
3A	% 3	Yok	Yok
3B		Yok	Var
3C		Var	Yok
3D		Var	Var

3.2.3. Fizikokimyasal analizler

3.2.3.1. pH ve titrasyon asitliği

Hardaliye örneklerinin pH değerleri dijital pH metre (Mettler-Toledo, İsviçre) kullanılarak ölçülmüştür.

Titrasyon asitliğinin belirlenmesinde, 20 mL örnek alınarak ayarlı 0,1 N NaOH çözeltisi ile pH 8.1 olana kadar titrasyon gerçekleştirilmiştir. Harcanan 0,1 N NaOH miktarı tespit edilerek, aşağıda verilen formül ile titrasyon asitliği hesaplanmış ve g tartarik asit/L Hardaliye cinsinden ifade edilmiştir (Y. Soyer, Koca, & Karadeniz, 2003) .

T.A. (g tartarik asit/L) = [(NaOH Normalitesi)*(Harcanan NaOH)*f*75)]/Örnek Hacmi

75 : tartarik asit eşdeğer gramı; f : NaOH faktörü

3.2.3.2. Suda çözünür kuru madde

Hardaliye örneklerinin çözünür kuru madde değerleri dijital refraktometre (Atago PAL-3, Japonya) ile ölçülerek °Briks cinsinden ifade edilmiştir.

3.2.3.3. Alkol miktarı tayini

Hardaliye örneklerindeki alkol miktarı, su ve alkolün kaynama noktaları farkından yararlanarak, ebülyometre (EON TRADING, Ebulliometer) ile belirlenmiştir (Çoşkun vd., 2012). Ebülyometre kaynama haznesine 35 ml numune konulmuş, işlem sonrasında okunan değer üzerinden Hardaliye örneklerindeki % alkol (v/v) miktarı hesaplanmıştır.

3.2.3.4. Toplam antioksidan aktivite analizi

Antioksidan aktivite Re vd. (1999) tarafından önerilen Troloks eşdeğeri antioksidan kapasite (TEAC) yöntemine göre belirlenmiştir. Bu yöntemin prensibi; 2,2'-azinobis(3-etilbenzothiazolin–6-sülfonik asit) (ABTS) ile potasyum persülfatın ($K_2S_2O_8$) oksidasyon reaksiyonu sonucu oluşturulan ABTS radikalinin (ABTS*+), ortama ilave edilen antioksidan maddelerle inhibisyonuna dayanmaktadır. ABTS radikalinin inhibisyonu aşağıdaki formüle göre hesaplanmaktadır:

%ABTS inhibisyonu=[(Başlangıç absorbansı- Son absorbans)/ Başlangıç absorbansı]x100*

Bu yönteme göre, 3 mL radikal çözeltisi ile 30 µL Hardaliye örneği/Troloks standardı ile karıştırılmış ve 734 nm dalga boyunda 6 dk boyunca absorbans değerindeki azalma spektrofotometre (Shimadzu, Japonya) ile ölçülmüştür. Farklı konsantrasyonlarda Troloks kullanılarak elde edilen % inhibisyon değerleri grafiğe geçirilerek standart eğri çizilmiştir. Bu eğriden yararlanarak hardaliye örneklerin antioksidan aktivite değerleri µmol Troloks/mL cinsinden tespit edilmiştir.

3.2.4. Yüksek basınçlı sıvı kromotografisi (HPLC) ile şeker analizi

Hardaliye örneklerindeki şekerlerin HPLC (Agilent, ABD) ile analizinde refraktif indeks dedektör kullanılmıştır. Analiz öncesinde Hardaliye örnekleri 1:5 oranında mobil faz ile seyreltilmiş ve 10000 g'de 10 dak süresince santrifüjlenmiştir. Elde edilen supernatant 0.45 µm naylon filtreden (Agilent) geçirilerek HPLC'ye enjekte edilmiştir. HPLC sistemi çalışma koşulları aşağıda verilmiştir.

Kolon	: Agilent Hi-Plex Ca (300 mm x7.8µm)
Mobil faz	: Asetonitril:Su (70:30) karışımı
Akış hızı	: 1 mL/dak
Kolon sıcaklığı	: 85 ºC

Dedektör sıcaklığı : 30 ºC

Enjeksiyon hacmi : 20 µL

Glukoz ve fruktoz standartlarının kromatogramındaki piklerin alıkonma süreleri ve alanları ile Hardaliye örneklerinin kromatogramları karşılaştırılarak örneklerdeki şeker miktarları belirlenmiştir. Hardaliye örneklerindeki glukoz ve fruktoz miktarları, standart çözeltilere ait kalibrasyon eğrilerinden faydalanarak hesaplanmıştır (Sharma, Rajput, Dogra, & Tomar, 2009).

3.2.5. Mikrobiyolojik analizler

3.2.5.1. Toplam mezofilik aerobik bakteri sayımı

Toplam mezofilik aerobik bakteri (TMAB) sayısı analizi PCA besiyeri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Hardaliye örneklerinin uygun dilüsyonları MRD ile hazırlanarak, dökme plak yöntemiyle (1 mL örnek) PCA besiyerine ekim yapılmıştır. TMAB sayısı 37 °C'de 48 saat inkübasyon sonucunda kob/mL cinsinden ifade edilmiştir (Bagci ve Temiz, 2011).

3.2.5.2. Toplam küf-maya sayımı

Hardaliye içeceği alkolsüz fermente bir içecek olduğundan, mayaların laktik asit fermentasyonu sırasında gelişmesi ve alkol oluşturması ürünün bozulmasında en önemli etmendir. Hardaliye örneklerinin uygun dilüsyonları MRD ile hazırlanarak, yüzeye yayma yöntemiyle (0.1 mL örnek) RBCA besiyerine ekim yapılmıştır. Örneklerdeki toplam küf ve maya sayısı 25 °C'de 5 gün inkübasyon ardından kob/mL cinsinden ifade edilmiştir (Taniwaki, Silva, Banhe, & Iamanaka, 2001).

3.2.5.3. Toplam laktik asit bakterisi sayımı

Hardaliye örneklerindeki toplam laktik asit bakteri sayısı çift katlı dökme plak yöntemiyle MRS Agar besiyeri kullanılarak belirlenmiştir (A. Soyer, Ertaş, & Üzümcüog˘lu, 2005). MRD kullanılarak uygun dilüsyonları hazırlanan Hardaliyelerden 1 mL örnek Petri kutusuna aktarıldıktan sonra üzerine MRS Agar dökülmüştür. Besiyerinin katılaşmasının ardından tüm yüzeyi kaplayacak miktarda ikinci kat MRS Agar besiyeri dökülmüştür. İkinci kat katılaştıktan sonra ekim yapılan Petri kutuları 30

^{o}C'de 48 saat inkübasyona bırakılmış ve sayım sonuçları dilüsyon faktörü de dikkate alınarak kob/mL şeklinde belirlenmiştir.

3.2.6. Duyusal analizler

Duyusal analizler, Gülcü (2008) tarafından belirtilen değerlendirme kriterlerinde modifikasyon yapılarak gerçekleştirilmiştir. Analizler, fermentasyon ve depolamanın sonunda olmak üzere 2 kere gerçekleştirilmiştir. Duyusal değerlendirmeler Trakya Üniversitesi Gıda Mühendisliği akademik personeli ve lisansüstü öğrencilerinden oluşan 10 panelist tarafından gerçekleştirilmiştir. Hardaliye örneklerine 3 haneli rastgele kod verilmiş ve panelistlere 50 mL'lik şeffaf sert plastik bardaklar içerisinde (15 °C'de) sunulmuştur. Her tadımdan sonra panelistlere tuzsuz kraker verilmiş, ardından ağızlarını su ile çalkalayarak diğer örneği değerlendirmeye başlamaları istenmiştir. Hardaliye örnekleri panelistler tarafından renk (görünüş), koku, tat ve toplam kabul edilebilirlik bakımından değerlendirilmiştir (Çizelge 3.2).

Çizelge 3.2. Hardaliye örneklerinin duyusal analizinde kullanılan değerlendirme kriterleri ve puanlaması

Duyusal Analiz	Duyusal Değerlendirme Puanlaması
Tat	1 (en kötü) -10 (en iyi) değerleri arasında puanlama yapılmıştır. Panelistlerden ayrıca örneklerde belirledikleri "Metalik, Oksidite, Alkol, Aşırı Hardal, Acılık, Fazla Şekerli ve diğer" tatları belirtmeleri istenmiştir.
Renk	1 (en kötü) - 5 (en iyi) değerleri arasında puanlama yapılmıştır.
Koku	1 (en kötü) - 5 (en iyi) değerleri arasında puanlama yapılmıştır. Panelistlerden ayrıca örneklerde belirledikleri "Metalik, Oksidite, Alkol, Aşırı Hardal ve diğer kokuları" belirtmeleri istenmiştir.
Asitlik	1 (en kötü) - 5 (en iyi) değerleri arasında puanlama yapılmıştır.
Toplam kabul edilebilirlik	1 (en kötü) -10 (en iyi) değerleri arasında puanlama yapılmıştır.

3.2.7. İstatistiksel analizler

Hardaliye örneklerine uygulanan tüm analizler (duyusal analiz hariç) üç tekerrürlü olarak gerçekleştirilmiştir. Araştırma sonuçları SPSS 16 (IBM, USA) istatistik paket programı kullanılarak %5 önemlilik düzeyinde tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile değerlendirilmiştir. Ortalamalar arasındaki farkların tespitinde ise Duncan's Multiple Range testi kullanılmıştır.

BÖLÜM 4

BULGULAR

4.1 Siyah hardal tohumunun *Saccharomyces cerevisiae* üzerine antifungal etkisi

Bu tez çalışması kapsamında, Hardaliye üretiminde kullanılacak olan hardal tohumunun antifungal etkisinin belirlenmesi amacıyla tez mikroorganizması olarak *Saccharomyces cerevisiae* kullanılmıştır. Bu amaçla öğütülmüş hardal tohumu *Saccharomyces cerevisiae* ile inoküle edilmiş serum fizyolojik (% 0,9 NaCl) ortamına ve besiyeri ortamına % 1-3 w/v oranlarında katılmıştır. Kullanılan hardal tohumu konsantrasyonu, son üründeki tat ve aromanın olumsuz olarak etkilenmemesi için en fazla % 3 w/v ile sınırlandırılmıştır.

Besiyeri (Malt Extract Broth) ortamında hardal tohumunun *S. cerevisiae* üzerine antifungal etkisi incelendiğinde, 24 ve 48 saat inkübasyon sonunda, hardal tohumu içermeyen kontrol örneği ile hardal tohumu içeren tüm örnekler arasındaki fark istatiksel olarak önemli bulunmuştur ($P < 0,05$) (Çizelge 4.1). Hardal tohumu konsantrasyonları arasında ise en fazla etki % 3 w/v hardal tohumunu içeren örnekte gözlenirken, % 1 ve % 2 w/v hardal tohumu içeren örneklerin antifungal etkileri arasında istatiksel olarak önemli bir fark bulunmamıştır ($P > 0,05$).

Serum fizyolojik ortamında hardal tohumunun *S. cerevisiae* üzerine antifungal etkisi incelendiğinde, hardal içerermeyen kontrol örneğinde *S. cerevisiae* sayısı 48 saat inkübasyon sonunda yaklaşık 5 log kob/mL iken, hardal tohumu içeren tüm örneklerde *S. cerevisiae* tespit edilememiştir (≤1,0 kob/mL) (Çizelge 4.2). 24 saat inkübasyon sonucunda ise sadece % 1 w/v hardal tohumu içeren örnekte 1,7 log kob/mL *S. cerevisiae* bulunurken, % 2 ve 3 w/v hardal tohumu içeren örneklerde *S. cerevisiae* tespit edilememiştir.

Çizelge 4.1. Farklı hardal tohumu konsantrasyonlarının inkübasyon süresi boyunca Malt Extract Broth ortamındaki Saccharomyces cerevisiae üzerine antifungal etkisi

Hardal Tohumu Konsantrasyonu	**Saccharomyces cerevisiae sayısı (log kob/mL)***	
	24 saat	**48 saat**
% 0 (Kontrol)	6,3±0,4 ^{Aa}	7,1±0,2 ^{Ab}
% 1 Hardal	5,6±0,3 ^{Ba}	6,1±0,1 ^{Bb}
% 2 Hardal	5,7±0,5 ^{Ba}	6,2±0,3 ^{Ba}
% 3 Hardal	5,0±0,1 ^{Ca}	5,2±0,2 ^{Ca}

*Örneklerdeki başlangıç *S. cerevisiae* konsantrasyonu aynıdır (~5 log kob/mL).
* Her bir sütunda, aynı büyük harf/harflerle gösterilen değerler arasında Duncan testi sonuçlarına göre istatiksel olarak önemli bir fark yoktur (*P > 0,05*).
* Her bir satırda, aynı küçük harf/harflerle gösterilen değerler arasında Duncan testi sonuçlarına göre istatiksel olarak önemli bir fark yoktur (*P > 0,05*).

Çizelge 4.2. Farklı hardal tohumu konsantrasyonlarının inkübasyon süresi boyunca serum fizyolojik ortamında (% 0,9 NaCl) bulunan Saccharomyces cerevisiae üzerine antifungal etkisi

Hardal tohumu konsantrasyonu	**Saccharomyces cerevisiae sayısı (log kob/mL)***	
	24 saat	**48 saat**
% 0 (Kontrol)	5,1±0,5 ^{Aa}	5,0±0,6 ^{Aa}
% 1 Hardal	1,7±0,4 ^{Ba}	- ^{Bb}
% 2 Hardal	- ^{Ca}	- ^{Ba}
% 3 Hardal	- ^{Ca}	- ^{Ba}

*Örneklerdeki başlangıç *S. cerevisiae* konsantrasyonu aynıdır (~5 log kob/mL).
* Her bir sütunda, aynı büyük harf/harflerle gösterilen değerler arasında Duncan testi sonuçlarına göre istatiksel olarak önemli bir fark yoktur (*P > 0,05*).
* Her bir satırda, aynı küçük harf/harflerle gösterilen değerler arasında Duncan testi sonuçlarına göre istatiksel olarak önemli bir fark yoktur (*P > 0,05*).

Hardal tohumunun serum fizyolojik ortamındaki antifungal etkileri, besiyeri ortamındaki etkilerine kıyasla daha yüksek bulunmuştur. Literatür verileri incelendiğinde, ortamda bulunan organik maddelerin antimikrobiyal maddelerin etkinliklerini azalttığı görülmektedir (Castro-Rosas vd., 2017; Persson, Flock, & van der Linden, 2003). Gıda bileşenleri essansiyel yağlar gibi doğal antimikrobiyallerin etkilerini olumsuz yönde etkileyebilmektedir ((Meira, Holley, Bordin, de Macedo, & Luciano,

2017). Antimikrobiyal ajanlardan zarar gören bakteriler kendilerini daha hızlı bir şekilde iyileştirebilmekte ya da krema gibi ürünlerde bulunun yağ bakteri hücrelerini antimikrobiyallere karşı koruyabilmektedir. Ayrıca antimikrobiyal maddeler gıda ortamında daha zor dağılmakta ayrıca çözünebilirlik gibi özellikleri değişebilmektedir. Gıda ortamında bulunan protein ve yağ gibi bileşikler fenolik özellikteki antimikrobiyal bileşikler ile reaksiyona girerek bunların etkilerini önemli ölçüde azaltabilmektedir (Seow, Yeo, Chung, & Yuk, 2014).

Hammer, Carson, ve Riley (1999) çeşitli organik kirlilik öğelerinin çay ağacından elde edilen yağın *Staphylococcus aureus, Escherichia coli* ve *Candida albicans* üzerine antimikrobiyal etkilerini incelemişlerdir. Çalışmada, antimikrobiyal test ortamında katılan % 5 - 10 oranında yağsız süt, ekmek mayası ve at serumunun çay ağacı yağının *S. aureus, E. coli* ve *C. albicans* üzerinde tespit edilen minimum inhibisyon konsantrasyonunu 2-4 kat arttığı tespit edilmiştir. Antimikrobiyal etkideki düşüşün, organik maddeler ile antimikrobiyal madde etkileşimleri ve organizmaya özgü faktörlerin etkisiyle oluşabileceği belirtilmiştir. Mikroorganizma ve organik kirleticiler arasında hücre duvarında hidrostatik etkileşimler sonucunda bir bariyer oluşmakta ve antimikrobiyal maddelerin hücre duvarına etki etmesi önlenmektedir.

4.2 Hardaliye fermentasyonu

Hardaliye üretiminde, Cabarnet Sauvignon üzümleri kullanılmış olup, üretim akış şeması Bölüm 3.2.2 ve Şekil 3.1'de verilmiştir. Üretimde, 3 farklı konsantrasyonda öğütülmüş siyah hardal tohumu (% 1, 2 ve 3 w/w), kimyasal koruyucu (potasyum sorbat ve sodyum benzoat) ve starter kültür (*Lactobacillus plantarum* Lp-115) kullanılmıştır (Bölüm 3.2.2 ve Çizelge 3.1). Fermentasyon süresi boyunca 1., 4., 7., 14. ve 21. günlerde Hardaliyelerden örnek alınarak, örneklerdeki toplam mezofilik aerobik canlı bakteri sayısı, küf-maya sayısı ve laktik asit bakteri sayısı belirlenmiştir.

4.2.1 Hardaliye fermentasyonu süresince mikrobiyal floradaki değişim

4.2.1.1 Toplam mezofilik aerobik canlı bakteri sayısı

Hardaliye fermentasyonu süresince toplam mezofilik aerobik bakteri (TMAB) sayısındaki değişim Çizelge 4.3'de verilmiştir.

Çizelge 4.3. Fermentasyon boyunca Hardaliye örneklerinde toplam mezofilik aerobik bakteri (TMAB) sayılarındaki (log kob/mL) değişimler

Örnek No	Fermentasyon süresince TMACB sayıları (log kob/mL)				
	1. Gün	4. Gün	7. Gün	14. Gün	21. Gün
1A	3,1±0,4 ^{Aa}	7,2±0,5 ^{CDEb}	7,6±0,2 ^{Cb}	7,9±0,4 ^{Db}	7,3±0,2 ^{Cb}
1B	6,6±0,6 ^{Ba}	7,6±0,2 ^{CDEa}	7,3±0,3 ^{Ca}	6,5±0,4 ^{Ba}	7,1±0,2 ^{Ca}
1C	3,7±0,1 ^{Aa}	5,2±0,1 ^{Bb}	6,6±0,5 ^{BCc}	8,2±0,1 ^{Dd}	7,6±0,2 ^{Ccd}
1D	6,9±0,2 ^{Bb}	7,7±0,2 ^{DEc}	7,1±0,2 ^{Cb}	6,7±0,2 ^{Bb}	5,5±0,1 ^{Aba}
2A	3,2±0,2 ^{Aa}	6,5±0,1 ^{Ca}	7,4±0,3 ^{Cab}	7,1±0,1 ^{BCb}	7,5±0,2 ^{Cb}
2B	7,1±0,3 ^{Bab}	7,8±0,2 ^{Ec}	7,5±0,1 ^{Cbc}	6,9±0,2 ^{Ba}	7,2±0,2 ^{Cabc}
2C	3,3±0,2 ^{Aa}	4,6±0,1 ^{Bab}	5,2±0,2 ^{ABbc}	6,8±0,8 ^{Bc}	6,9±0,6 ^{BCc}
2D	6,5±0,1 ^{Ba}	7,6±0,2 ^{CDEa}	6,9±0,1 ^{Ca}	7,6±0,1 ^{CDa}	7,1±1,2 ^{Ca}
3A	3,2±0,2 ^{Aa}	6,5±0,7 ^{CDb}	7,0±0,1 ^{Cb}	5,7±0,3 ^{Ab}	5,1±0,1 ^{Aab}
3B	7,2±0,4 ^{Ba}	7,4±0,1 ^{CDEa}	7,1±0,3 ^{Ca}	7,1±0,1 ^{BCa}	7,0±0,1 ^{BCa}
3C	2,9±0,2 ^{Aa}	3,2±0,3 ^{Aa}	4,5±0,2 ^{Ab}	5,5±0,2 ^{Ac}	8,2±0,1 ^{Cd}
3D	6,6±0,1 ^{Ba}	7,5±0,3 ^{CDEab}	7,2±0,2 ^{Cab}	7,8±0,1 ^{Db}	6,7±0,4 ^{BCa}

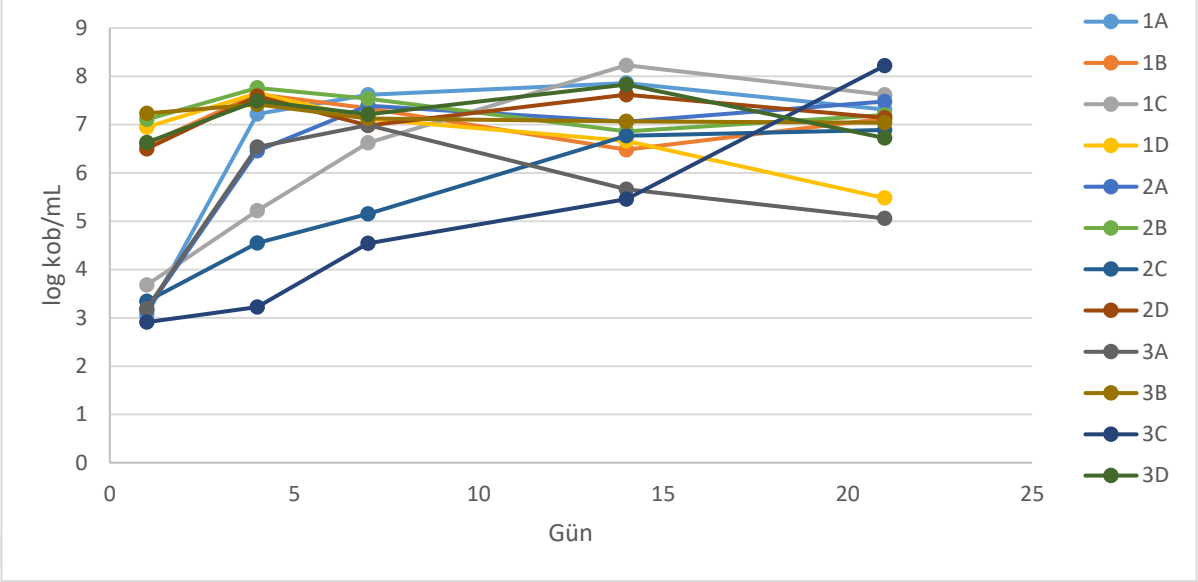
[*] Her bir sütunda, aynı büyük harf/harflerle gösterilen değerler arasında Duncan testi sonuçlarına göre istatiksel olarak önemli bir fark yoktur (P > 0,05).

[*] Her bir satırda, aynı küçük harf/harflerle gösterilen değerler arasında Duncan testi sonuçlarına göre istatiksel olarak önemli bir fark yoktur (P > 0,05).

[*]Örnek kodlarında 1, 2 ve 3 hardal konsantrasyonunu (% w/v) belirtmektedir. A: koruyucu yok, starter kültür yok; B: koruyucu yok, starter kültür var; C: koruyucu var, starter kültür yok; D: koruyucu var, starter kültür var

A ve C kodlu örneklerde Hardaliye içerisine starter kültür ilavesi olmadığı için başlangıç TMAB sayıları B ve D kodlu örneklerden yaklaşık 3 log kob/mL az bulunmuştur. Genel olarak A ve C kodlu (starter kültür içermeyen) tüm örneklerde TMAB sayısı fermentasyonun 14. gününe kadar artış göstermiştir. Fermentasyonun 21. gününde TMAB sayısı 1D ve 3A örnekleri haricinde yaklaşık 7-8 log kob/mL olarak bulunmuştur (Şekil 4.1). Hardaliye fermentasyonu sonunda, kimyasal koruyucu ve/veya starter kültür kullanımının istatiksel olarak TMACB sayısı üzerine önemli bir etkisi bulunmamıştır (*P > 0,05*).

Koruyucu olarak sadece siyah hardal tohumu (% 0,1) ve beyaz hardal tohumu (%0,15) kullanılarak gerçekleştirilen bir çalışmada, yedi gün fermentasyon sonunda hardaliye örneklerindeki TMAB sayısı 4,5-7,5 log kob/mL bulunmuştur (Coşkun ve Arıcı, 2011). Müşküle üzümünden % 1,5 hardal ve % 0,1 sodyum benzoat kullanarak 28-30 ºC'de 14 gün fermentasyon ile üretilen hardaliye örneğinde ise TMACB sayısı 1,51 x 10^6 kob/mL olarak tespit edilmiştir (Bayram vd., 2015).



Şekil 4.1. Fermentasyon boyunca Hardaliye örneklerinde toplam mezofilik aerobik bakteri (TMAB) sayılarındaki (log kob/mL) değişimler

*Örnek kodlarında 1, 2 ve 3 hardal konsantrasyonunu (% w/v) belirtmektedir. A: koruyucu yok, starter kültür yok; B: koruyucu yok, starter kültür var; C: koruyucu var, starter kültür yok; D: koruyucu var, starter kültür var

Hardal tohumunda bulunan antimikrobiyal etkili allil izotiyosiyanatların Gram-negatif bakteriler, küf ve mayalar üzerine daha etkili olduğu bildirilmiştir (Lin, Preston III, & Wei, 2000). Hardaliye fermentasyonunda genel olarak Gram-pozitif laktik asit bakterileri rol aldığından, çalışma kapsamında kullanılan farklı hardal konsantrasyonlarının TMACB sayısı üzerine önemli bir etkisi bulunmamıştır.

4.2.1.2 Laktik asit bakteri sayısı

Hardaliye fermentasyonu süresince laktik asit bakteri sayısındaki değişim Çizelge 4.4'de verilmiştir.

Hardaliye üretiminde starter kültür kullanımının, Hardaliye örneklerinin mikrobiyolojik, kimyasal ve fiziksel kalitesi üzerine etkilerini belirlemek amacıyla B ve D kodlu örneklere Lactobacillus plantarum Lp-115 kültürü eklenmiştir. Bunun sonucunda, A ve C kodlu örneklerde başlangıç laktik asit bakteri sayıları B ve D kodlu örneklerden yaklaşık 4 log kob/mL az bulunmuştur. Genel olarak A ve C kodlu (starter kültür içermeyen) tüm örneklerde TMAB sayısı fermentasyonun 14. gününe kadar artış göstermiştir (Şekil 4.2). Fermentasyonun sonunda, 1D ve 3A örnekleri hariç, tüm

örneklerdeki laktik asit bakteri sayısı 21. gününde yaklaşık olarak 7-8 log kob/mL bulunmuştur. Hardaliye fermentasyonu sonunda, kimyasal koruyucu ve/veya starter kültür kullanımı ile örneklerdeki laktik asit bakteri sayısının değişimi arasında doğrudan bir ilişki bulunamamıştır.

Literatürde, hardal tohumunda bulunan allil izotiyosiyanatların laktik asit bakterileri üzerine antimikrobiyal etkilerinin diğer bakterilere göre daha düşük olduğu bildirilmiştir (Holley, 1997). Tez çalışması kapsamında, hardal konsantrasyonunun arttırılması ile fermentasyon sonunda Hardaliye içerisinde bulunan laktik asit bakterileri sayısında bir azalma tespit edilmemiştir.

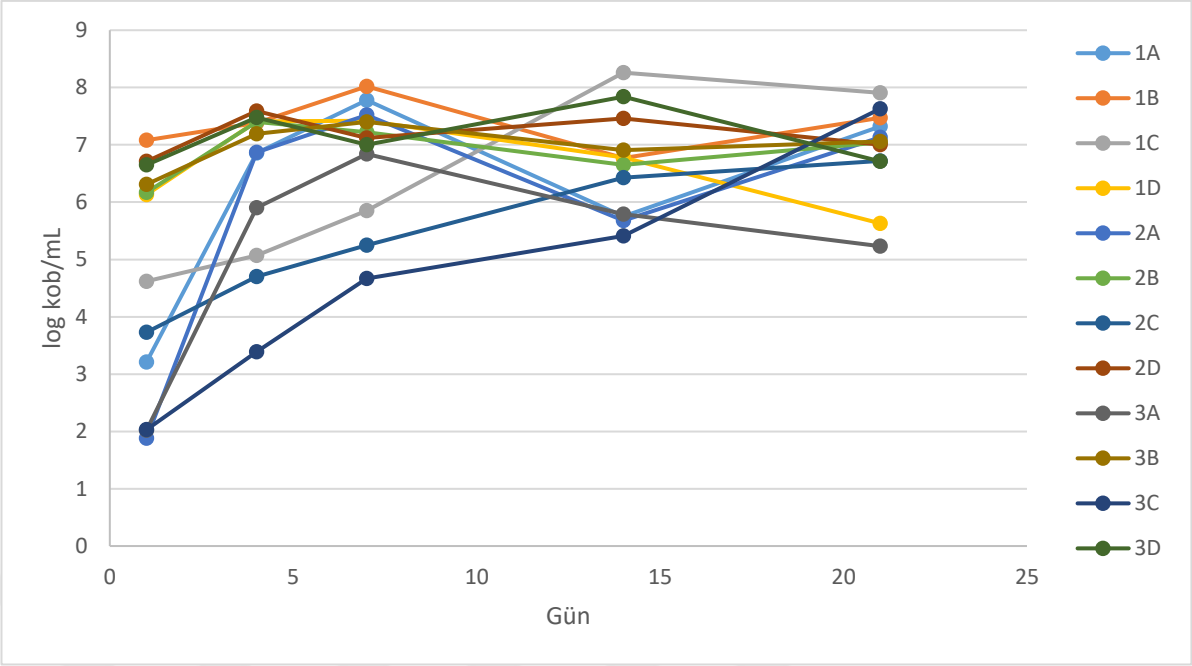
Çizelge 4.4. Fermentasyon boyunca Hardaliye örneklerinde laktik asit bakterileri sayılarındaki (log kob/mL) değişimler

Örnek No	Fermentasyon süresince laktik asit bakteri sayıları (log kob/mL)				
	1. Gün	4. Gün	7. Gün	14. Gün	21. Gün
1A	3,2±0,1 ^{Ba}	6,9±0,2 ^{Dc}	7,8±0,4 ^{ABc}	5,8±0,1 ^{Ab}	7,3±0,3 ^{BCDEc}
1B	7,1±0,3 ^{Eab}	7,4±0,1 ^{Eab}	8,0±0,4 ^{Cb}	6,8±0,1 ^{Ba}	7,5±0,2 ^{CDEab}
1C	4,6±0,3 ^{Ca}	5,1±0,1 ^{Ba}	5,9±0,3 ^{Cb}	8,3±0,2 ^{Dc}	7,9±0,1 ^{Ec}
1D	6,1±0,2 ^{Dab}	7,4±0,2 ^{Ec}	7,4±0,3 ^{Cc}	6,8±0,3 ^{Bbc}	5,6±0,4 ^{Aa}
2A	1,9±0,1 ^{Aa}	6,9±0,1 ^{Dc}	7,5±0,5 ^{Cc}	5,7±0,1 ^{Ab}	7,1±0,2 ^{BCDc}
2B	6,2±0,1 ^{Da}	7,4±0,2 ^{Ec}	7,2±0,2 ^{Cc}	6,7±0,1 ^{Bb}	7,0±0,1 ^{BCDb}
2C	3,7±0,1 ^{Ba}	4,7±0,2 ^{Bb}	5,3±0,2 ^{Ab}	6,4±0,1 ^{Bc}	6,7±0,2 ^{BCc}
2D	6,7±0,2 ^{DEa}	7,6±0,2 ^{Eb}	7,1±0,3 ^{Cab}	7,5±0,1 ^{Cb}	7,0±0,1 ^{BCDab}
3A	2,0±0,1 ^{Aa}	5,9±0,1 ^{Cb}	6,8±0,4 ^{BCc}	5,8±0,1 ^{Ab}	5,2±0,1 ^{Ab}
3B	6,3±0,1 ^{Da}	7,2±0,1 ^{DEb}	7,4±0,3 ^{Cb}	6,9±0,2 ^{Bb}	7,1±0,1 ^{BCDb}
3C	2,1±0,1 ^{Aa}	3,4±0,1 ^{Ab}	4,7±0,5 ^{Ac}	5,4±0,2 ^{Ac}	7,6±0,2 ^{DEd}
3D	6,7±0,2 ^{DEa}	7,5±0,2 ^{Eb}	7,0±0,1 ^{BCa}	7,8±0,1 ^{CDb}	6,7±0,2 ^{Ba}

[*] Her bir sütunda, aynı büyük harf/harflerle gösterilen değerler arasında Duncan testi sonuçlarına göre istatiksel olarak önemli bir fark yoktur (P > 0,05).

[*] Her bir satırda, aynı küçük harf/harflerle gösterilen değerler arasında Duncan testi sonuçlarına göre istatiksel olarak önemli bir fark yoktur (P > 0,05).

[*]Örnek kodlarında 1,2 ve 3 hardal konsantrasyonunu (%, w/v) belirtmektedir. A: koruyucu yok, starter kültür yok; B: koruyucu yok, starter kültür var; C: koruyucu var, starter kültür yok; D: koruyucu var, starter kültür var



Şekil 4.2. Fermentasyon boyunca Hardaliye örneklerinde laktik asit bakteri sayısındaki (log kob/mL) değişim,

*Örnek kodlarında 1, 2 ve 3 hardal konsantrasyonunu (%) belirtmektedir. A: koruyucu yok, starter kültür yok; B: koruyucu yok, starter kültür var; C: koruyucu var, starter kültür yok; D: koruyucu var, starter kültür var

Hardaliye fermentasyonu laktik asit bakterileri tarafından gerçekleştirilmekte olup, üründe kullanılan hardal tohumu ve kimyasal koruyucuların laktik asit bakteri gelişimini fermentasyonunu olumsuz etkilememesi gerekmektedir (Coskun ve Arici, 2006; Kılıç vd., 2016). Bu kapsamda tez çalışmasında kullanılan miktarlarda hardal tohumu ve kimyasal koruyucuların üründeki laktik asit bakteri sayısı üzerine doğrudan bir etkisi bulunmadığı tespit edilmiştir. Aydoğdu vd. (2014), Alphonse Lavallée ve Papazkarası üzümleri kullanılarak üretilen hardaliye örneklerinde fermentasyon süresince TMAB sayısı ile laktik asit bakteri sayısınını birbirine çok yakın bulmuşlar ve TMAB sayısının büyük bir kısmını laktik asit bakterilerinin oluşturduğunu belirtmişlerdir. Çalışmada koruyucu olarak kullanılan % 2 hardal tohumu, 25 mg/L potasyum metabisülfit, 0,25 g/10 L potasyum sorbat ve sodyum benzoatın TMAB ve laktik asit bakteri sayısını azaltmadığı tespit edilmiştir.

4.2.1.3 Toplam küf/maya sayısı

Meyve ve meyve suları mayalar için en uygun besiyeri kabul edilmektedir. Hardaliye gibi, meyvelerden elde edilen alkolsüz fermente içeceklerin bozulmasında çoğunlukla mayaların etkili olduğunu belirtilmiştir (Şenses ve Özbaş, 2004). Hardal tohumu, Hardaliye'ye özgü tat ve kokuyu vermesinin yanı sıra antifungal etkisi ile üründeki maya faaliyetini engelleyerek alkol fermentasyonunu önlemek amacıyla kullanılmaktadır (Coskun ve Arici, 2006). Günümüzde geleneksel Hardaliye üretiminden farklı olarak şıradaki maya fermentasyonunu engellemek amacıyla kimyasal koruyucular da (K-Sorbat ve Na-Benzoat) şıraya katılmaktadır (Çoşkun vd., 2012).

Tez çalışması kapsamında, starter kültür kullanımı, hardal konsantrasyonu (% 1-3 w/v) ve kimyasal koruyucu kullanımının Hardaliye fermentasyonu süresince toplam küf/maya sayısı üzerindeki etkileri incelenmiştir (Çizelge 4.5). Fermentasyon boyunca, kimyasal koruyucu içermeyen A ve B kodlu tüm örneklerdeki toplam küf/maya sayısındaki artış istatiksel olarak önemli bulunmuştur ($P < 0,05$). Bu örneklerdeki toplam küf/maya sayısı fermentasyon sonunda başlangıç miktarına göre yaklaşık 4-5 log kob/mL artış göstermiştir. Bununla beraber hardal tohumu konsantrasyonunun % 1'den % 3'e kadar arttırılmasının tek başına küf/maya sayısındaki artışı engelleyemediği tespit edilmiştir. Hardaliye üretiminde starter laktik asit bakterisi kültürü kullanımının ise fermentasyon süresince örneklerdeki küf/maya sayısının değişimi üzerine bir etkisi tespit edilememiştir.

Kimyasal koruyucu kullanılan C ve D kodlu tüm örneklerde fermentasyon sonunda küf/maya sayısında fermentasyon başlangıcına göre genel olarak bir azalma gözlenmiştir (Şekil 4.3). Fermentasyon sonunda, kimyasal koruyucu kullanılarak üretilen Hardaliye örneklerindeki (C ve D kodlu) toplam küf/maya sayısı, kimyasal koruyucu kullanılmayan (A ve B kodlu) örneklerden yaklaşık olarak 5-6 log kob/mL daha düşük bulunmuştur. Genel olarak, Hardaliye üretiminde küf/maya sayısındaki artışın engellenebilmesi için sadece % 3 w/v hardal tohumunun yeterli olmadığı ve bu artışın kontrol altına alınabilmesi için kimyasal koruyucu kullanımının zorunlu olduğu görülmektedir.

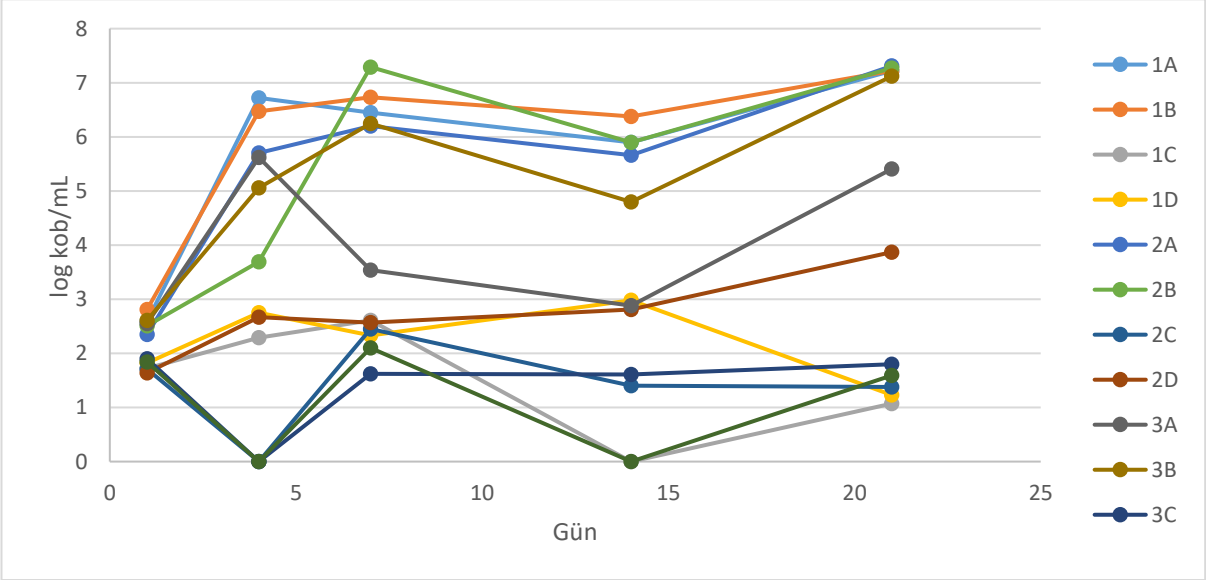
Çizelge 4.5. Fermentasyon boyunca Hardaliye örneklerinde toplam küf/maya sayılarındaki (log kob/mL) değişimler

Örnek No	Fermentasyon süresince toplam küf/maya sayıları (log kob/mL)				
	1. Gün	4. Gün	7. Gün	14. Gün	21. Gün
1A	2,6±0,1 ^{Ba}	6,7±0,8 ^{Fb}	6,5±0,1 ^{BCb}	5,9±0,1 ^{Eb}	7,2±0,2 ^{Eb}
1B	2,8±0,2 ^{Ba}	6,5±0, ^{Fb}	6,7±0,4 ^{Cb}	6,4±0,5 ^{Eb}	7,2±0,1 ^{Eb}
1C	1,7±0,2 ^{Ac}	2,3±0,2 ^{Bd}	2,6±0,2 ^{Ad}	≤1 ^{Aa}	1,1±0,1 ^{Ab}
1D	1,8±0,1 ^{Ab}	2,8±0,1 ^{BCcd}	2,3±0,3 ^{Ac}	3,0±0,1 ^{Cd}	1,2±0,1 ^{Aa}
2A	2,6±0,2 ^{Ba}	5,7±0,2 ^{EFb}	6,2±0,4 ^{BCb}	5,7±0,1 ^{DEb}	7,3±0,2 ^{Ec}
2B	2,5±0,2 ^{Ba}	3,7±0,4 ^{CDb}	7,3±0,3 ^{Cd}	5,9±0,2 ^{Ec}	7,2±0,1 ^{Ed}
2C	1,7±0,1 ^{Ab}	≤1 ^{Aa}	2,5±0,1 $^{A c}$	1,4±0,2 ^{Bb}	1,4±0,1 ^{Ab}
2D	1,6±0,3 ^{Aa}	2,7±0,2 ^{BCab}	2,6±0,2 ^{Aab}	2,8±0,6 ^{Cbc}	3,9±0,3 ^{Cc}
3A	2,6±0,1 ^{Ba}	5,6±0,2 ^{EFc}	3,5±0,5 ^{ABb}	2,9±0,1 ^{Ca}	5,4±0,3 ^{Dc}
3B	2,6±0,2 ^{Ba}	5,1±0,1 ^{DEb}	6,3±0,2 ^{BCc}	4,8±0,1 ^{Db}	7,1±0,1 ^{Ed}
3C	1,9±0,2 ^{Abc}	≤1 ^{Aa}	1,6±0,1 ^{Ab}	1,6±0,1 ^{Bb}	1,8±0,1 ^{Bc}
3D	1,8±0,1 ^{Ab}	≤1 ^{Aa}	2,1±0,3 ^{Ab}	≤1 ^{Aa}	1,6±0,1 ^{ABb}

* Her bir sütunda, aynı büyük harf/harflerle gösterilen değerler arasında Duncan testi sonuçlarına göre istatiksel olarak önemli bir fark yoktur ($P > 0,05$).

* Her bir satırda, aynı küçük harf/harflerle gösterilen değerler arasında Duncan testi sonuçlarına göre istatiksel olarak önemli bir fark yoktur ($P > 0,05$).

*Örnek kodlarında 1,2 ve 3 hardal konsantrasyonunu (%) belirtmektedir. A: koruyucu yok, starter kültür yok; B: koruyucu yok, starter kültür var; C: koruyucu var, starter kültür yok; D: koruyucu var, starter kültür var.



Şekil 4.3.. Fermentasyon boyunca Hardaliye örneklerinde toplam küf/maya sayısındaki (log kob/mL) değişim

*Örnek kodlarında 1,2 ve 3 hardal konsantrasyonunu (%) belirtmektedir. A: koruyucu yok, starter kültür yok; B: koruyucu yok, starter kültür var; C: koruyucu var, starter kültür yok; D: koruyucu var, starter kültür var.

Coşkun ve Arıcı (2011) siyah ve beyaz hardal tohumu kullanımının Hardaliye fermentasyonu üzerine etkilerini incelemişlerdir. Çalışmada, Hardaliye fermentasyonu süresince siyah hardal tohumu (%1, w/v) kullanılan örneklerdeki toplam maya/küf sayısında fermentasyon başlangıcından sonuna kadar azalma tespit edilmiş, beyaz hardal tohumu (% 1,5) kullanılan ürünlerde ise küf/maya sayısında artış gözlenmiştir. Bayram vd. (2015), müşküle üzümünden % 1,5 hardal ve % 0,1 sodyum benzoat kullanarak 28-30 ºC'de 14 gün fermentasyon ile üretilen hardaliye örneğinde toplam maya/küf sayısını 1,8 x 10^6 kob/mL olarak tespit etmişlerdir. Aydoğdu vd. (2014), Alphonse Lavallée (% 2 hardal tohumu, 25 mg/L potasyum metabisülfit, 0,25 g/10 L potasyum sorbat ve sodyum benzoat) ve Papazkarası üzümleri (% 1 hardal tohumu, 0,25 g/10 L potasyum sorbat ve sodyum benzoat) kullanarak Hardaliye üretimi gerçekleştirmişlerdir. Alphonse Lavallée üzümleri ile üretilen Hardaliye örneklerinde fermentasyonun 3. gününden sonra küf/maya tespit edilemezken, Papazkarası üzümlerinden elde edilen ürünlerde fermentasyon süresince yüksek miktarda küf/maya tespit etmişlerdir.

Hardal tohumunun antimikrobiyal etkisindeki en önemli faktör içeriğinde bulunan allil izotiyosiyanatlar olup, farklı kaynaklardan elde edilen hardal tohumlarında allil izotiyosiyanat miktarları değişiklik göstermektedir. Farklı bölgelerden elde edilen siyah hardal tohumlarındaki allil izotiyosiyanat miktarlarının 0,60 ile 2,98 mg/g kuru madde arasında değiştiği bildirilmiştir (Olivier, Vaughn, Mizubuti, & Loria, 1999). Literatür bulgularından farklı olarak tez kapsamında incelenen hardal tohumu konsantrasyonlarında bir antifungal etki bulunmamasının, hardal tohumunda antifungal etkiden sorumlu allil izotiyosiyanat konsantrasyonunun tohum kaynağına bağlı olarak değişiklik göstermesinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

4.2.2 Hardaliye fermentasyonu süresince toplam antioksidan aktivitedeki değişim

Hardaliye yüksek antioksidan özelliğe sahip taze üzümler ve hardal tohumu kullanılarak elde edilen alkolsüz fermente bir içecek olduğundan, yüksek antioksidan aktiviteye sahiptir. Tez çalışması kapsamında fermentasyon süresi boyunca Hardaliye örneklerinin toplam antioksidan aktivite değerlerindeki değişim Çizelge 4.6'da verilmiştir. Fermentasyon başlangıcında ve sonunda örnekler arasında toplam antioksidan aktivite değerleri açısından istatiksel olarak önemli bir fark bulunmamıştır ($P > 0,05$). Tüm örneklerde fermentasyon süresi boyunca toplam antioksidan aktivite değerleri artış

göstermiştir. Bu artışın fermentasyon boyunca üzüm kabuklarında bulunan fenolik vb. antioksidan bileşiklerin şıraya geçmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Tez çalışması kapsamında kullanılan starter kültürün, kimyasal koruyucuların ve farklı oranlardaki hardal tohumunun fermentasyon süresince üründeki toplam antioksidan aktiviteyi etkilemediği tespit edilmiştir.

Çizelge 4.6. Hardaliye fermentasyonu süresince örneklerin toplam antioksidan aktivite değerleri (mM Trolox mL–1)

Örnek No	Toplam Antioksidan Aktivite (mM Trolox mL^{-1})			
	1. Gün	**7. Gün**	**14. Gün**	**21. Gün**
1A	1,70±0,06 ^{Aa}	3,35±0,08 ^{Ab}	3,68±0,03 ^{Ac}	4,02±0,03 ^{Ad}
1B	1,79±0,10 ^{Aa}	3,33±0,02 ^{Ab}	3,76±0,21 ^{Ab}	3,95±0,05 ^{Ab}
1C	1,59±0,05 ^{Aa}	3,17±0,19 ^{Ab}	3,68±0,17 ^{Abc}	4,03±0,09 ^{Ac}
1D	1,77±0,21 ^{Aa}	3,32±0,13 ^{Ab}	3,73±0,16 ^{Ab}	3,94±0,02 ^{Ab}
2A	1,83±0,12 ^{Aa}	3,25±0,13 ^{Ab}	3,84±0,08 ^{Ac}	4,05±0,01 ^{Ac}
2B	1,97±0,15 ^{Aa}	3,30±0,01 ^{Ab}	3,89±0,05 ^{Ac}	4,03±0,05 ^{Ac}
2C	1,71±0,07 ^{Aa}	3,20±0,04 ^{Ab}	3,88±0,06 ^{Ac}	4,01±0,13 ^{Ac}
2D	1,80±0,03 ^{Aa}	3,16±0,13 ^{Ab}	3,86±0,08 ^{Ac}	4,03±0,05 ^{Ac}
3A	2,27±0,10 ^{Aa}	3,36±0,09 ^{Ab}	4,03±0,04 ^{Ac}	3,97±0,05 ^{Ac}
3B	2,19±0,09 ^{Aa}	3,28±0,03 ^{Ab}	3,99±0,12 ^{Ac}	4,09±0,03 ^{Ac}
3C	2,08±0,19 ^{Aa}	3,39±0,03 ^{Ab}	4,02±0,06 ^{Ac}	4,08±0,09 ^{Ac}
3D	2,10±0,18 ^{Aa}	3,36±0,08 ^{Ab}	3,99±0,16 ^{Ab}	4,04±0,08 ^{Ab}

[*] Her bir sütunda, aynı büyük harf/harflerle gösterilen değerler arasında Duncan testi sonuçlarına göre istatiksel olarak önemli bir fark yoktur ($P > 0,05$).

[*] Her bir satırda, aynı küçük harf/harflerle gösterilen değerler arasında Duncan testi sonuçlarına göre istatiksel olarak önemli bir fark yoktur ($P > 0,05$).

[*]Örnek kodlarında 1,2 ve 3 hardal konsantrasyonunu (%, w/v) belirtmektedir. A: koruyucu yok, starter kültür yok; B: koruyucu yok, starter kültür var; C: koruyucu var, starter kültür yok; D: koruyucu var, starter kültür var

Hardaliye'nin antioksidan aktivitesi büyük ölçüde üzüm içerisinde bulunan fenolik maddelerden kaynaklanmaktadır. Bu nedenle, Hardaliyenin antioksidan içeriği direkt olarak elde edildiği üzüm çeşidi ile ilişkilidir (Aşkın ve Atik, 2016). Aşkın ve Atik (2016), papazkarası üzümlerinden elde edilen hardaliye örneklerinde toplam antioksidan aktivite değerini 8.53 ± 0.05 (mM Trolox mL^{-1}) olarak tespit etmişlerdir. Amoutzopoulos (2013), 10 gün fermentasyon sonunda Hardaliye örneklerinde toplam antioksidan aktiviteyi 6.40 mmol Trolox/100 mL olarak bulmuşlardır. Tez çalışmamız kapsamında ise toplam antioksidan aktivite fermentasyon sonunda ortalama 4 mM Trolox mL^{-1} olarak tespit edilmiştir.

4.2.3. Hardaliye fermentasyonu süresince suda çözünür kuru maddedeki (ºBriks) değişim

Tez çalışması kapsamında, fermentasyon süresince Hardaliye örneklerinde tespit edilen suda çözünür kuru madde içerikleri Çizelge 4.7'de verilmektedir.

Fermentasyonun başlangıcında örneklerdeki suda çözünür kuru madde değerleri 23-25 º Briks arasında bulunmuştur. A ve B kodlu kimyasal koruyucu içermeyen tüm örneklerde suda çözünür kuru madde miktarı fermentasyon sonunda 3-7 ºBriks düşüş göstermiş ve bu azalma istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($P < 0,05$). Kimyasal koruyucu içeren C ve D kodlu örneklerde ise suda çözünür kuru madde miktarındaki azalma en fazla 1,5 ºBriks olarak bulunmuş ve örneklerin çoğunda azalma miktarı istatiksel olarak önemsiz bulunmuştur. A ve B kodlu Hardaliye örneklerindeki suda çözünür kuru madde miktarındaki azalma bu örneklerdeki yüksek maya sayısı ve bunun sonucunda meydana gelen maya fermentasyonu ile ilgilidir. C ve D kodlu Hardaliyelerde kullanılan K-sorbat ve Na-benzoat karışımı, Hardaliye fermentasyonu sırasında maya faaliyetini engelleyerek alkol oluşumunu önlemektedir (Aydoğdu vd., 2014). Hardaliye örneklerinde fermentasyon sonundaki toplam küf/maya sayısı kimyasal koruyucu kullanılmayan örneklerde 5,4-7,3 log kob/mL arasında iken, kimyasal koruyucu kullanılan örneklerde bu sayı 1,1-3,9 log kob/mL arasında bulunmuştur. Coşkun ve Arıcı (2011), siyah hardal tohumu kullanılarak üretilen Hardaliyelerdeki toplam mikroorganizma sayısını beyaz hardal kullanılarak üretilen Hardaliyelerden daha düşük bulmuşlardır. Çalışmada beyaz hardal kullanılarak üretilen Hardaliye örneklerindeki toplam şeker miktarındaki yüksek orandaki bu düşüş, bu örneklerin yüksek mikroorganizma sayısı ile ilişkilendirilmiştir.

Çizelge 4.7. Hardaliye fermentasyonu süresince örneklerin suda çözünür kuru madde miktarları (ºBriks)

Örnek No	Suda çözünür kuru madde miktarı (º Briks)				
	1. Gün	4. Gün	7. Gün	14. Gün	21. Gün
1A	25,05±0,20 ^{Aa}	24,23±0,03 ^{Aa}	22,5±0,15 ^{ABCb}	22,34±0,16 ^{CDb}	20,14±0,16 ^{Ec}
1B	25,03±0,08 ^{Aa}	23,9±0,35 ^{ABb}	22,85±0,15 ^{ABCc}	22,1±0,05 ^{CDc}	18,1±0,05 ^{Gd}
1C	23,34±0,44 ^{Ba}	23,71±0,15 ^{ABCa}	23,05±0,15 ^{ABa}	23,17±0,19 ^{ABa}	23,51±0,04 ^{Aba}
1D	24,18±0,03 ^{ABa}	23,43±0,23 ^{ABCab}	23,20±0,10 ^{Ab}	23,3±0,25 ^{Ab}	23,81±0,15 ^{Aab}
2A	24,25±0,25 ^{Aa}	23,5±0,35 ^{ABCa}	22,28±0,13 ^{BCb}	22,34±0,04 ^{CDb}	17,32±0,07 ^{Hc}
2B	24,18±0,32 ^{ABa}	23,51±0,14 ^{ABCab}	22,65±0,4 ^{ABCbc}	21,91±0,21 ^{CDcd}	21,02±0,14 ^{Dd}
2C	23,27±0,14 ^{Ba}	23,28±0,17 ^{ABCa}	23,25±0,31 ^{Aa}	23,26±0,05 ^{Aa}	23,18±0,07 ^{Aba}
2D	23,15±0,22 ^{Ba}	22,97±0,23 ^{BCa}	23,1±0,41 ^{ABa}	23,06±0,09 ^{ABa}	21,66±0,18 ^{Db}
3A	23,45±0,15 ^{Ba}	23,3±0,25 ^{ABCa}	22,45±0 ^{ABCb}	22,17±0,02 ^{CDb}	17,19±0,16 ^{Hc}
3B	23,98±0,17 ^{ABa}	23,4±0,15 ^{ABCa}	22,17±0,02 ^{Cb}	21,72±0,16 ^{Db}	19,30±0,15 ^{Fc}
3C	23,11±0,21 ^{Ba}	22,63±0,07 ^{Ca}	22,51±0,09 ^{ABCa}	22,55±0,1 ^{BCa}	22,49±0,16 ^{Ca}
3D	23,69±0,04 ^{Ba}	22,53±0,23 ^{Cb}	22,59±0,09 ^{ABCb}	22,56±0,04 ^{BCb}	23,05±0,1 ^{BCab}

[*] Her bir sütunda, aynı büyük harf/harflerle gösterilen değerler arasında Duncan testi sonuçlarına göre istatiksel olarak önemli bir fark yoktur ($P > 0,05$).

[*] Her bir satırda, aynı küçük harf/harflerle gösterilen değerler arasında Duncan testi sonuçlarına göre istatiksel olarak önemli bir fark yoktur ($P > 0,05$).

[*]Örnek kodlarında 1,2 ve 3 hardal konsantrasyonunu (%, w/v) belirtmektedir. A: koruyucu yok, starter kültür yok; B: koruyucu yok, starter kültür var; C: koruyucu var, starter kültür yok; D: koruyucu var, starter kültür var.

4.2.4 Hardaliye fermentasyonu süresince glukoz ve fruktoz miktarlarındaki değişimler

Fermentasyon süresince Hardaliye örneklerindeki fruktoz miktarlarındaki değişim Çizelge 4.8'de verilmiştir. Fermentasyonun başlangıcında örneklerdeki fruktoz miktarları arasında istatiksel olarak önemli bir fark bulunmamıştır ($P > 0,05$). Örneklerdeki başlangıç ve fermentasyon sonundaki fruktoz değerleri incelendiğinde, kimyasal koruyucu kullanılmayan (A ve B kodlu) örneklerde fruktoz miktarı istatiksel olarak önemli ($P < 0,05$) derecede azalırken, kimyasal koruyucu kullanılan (C ve D kodlu) ürünlerde bu değişim önemsiz ($P > 0,05$) bulunmuştur.

Çizelge 4.8. Hardaliye fermentasyonu süresince örneklerin fruktoz miktarları

Örnek No	Fruktoz miktarı (mg/mL)				
	1. Gün	4. Gün	7. Gün	14. Gün	21. Gün
1A	119,45±1,25 ^{Aa}	116,57±0,47 ^{Aab}	106,42±1,92 ^{Ab}	94,49±1,13 ^{ABc}	70,50±3,24 ^{BCd}
1B	118,77±2,45 ^{Aa}	119,45±2,24 ^{Aa}	110,70±1,29 ^{Aa}	91,05±0,81 ^{ABb}	63,59±1,17 ^{Bc}
1C	118,11±3,89 ^{Aa}	115,56±2,56 ^{Aa}	114,08±9,96 ^{Aa}	105,64±5,54 ^{Aa}	104,35±6,14 ^{Da}
1D	118,28±4,84 ^{Aa}	115,79±3,21 ^{Aa}	110,16±10,86 ^{Aa}	111,85±14,45 ^{Aa}	103,61±11,16 ^{Da}
2A	116,13±3,87 ^{Aa}	118,83±1,17 ^{Aa}	103,64±1,36 ^{Aa}	97,26±3,26 ^{Aba}	69,10±7,10 ^{BCb}
2B	118,66±0,98 ^{Aa}	114,72±1,85 ^{Aab}	100,21±1,52 ^{Abc}	91,18±5,92 ^{ABc}	70,37±2,83 ^{BCd}
2C	114,62±8,84 ^{Aa}	115,18±2,71 ^{Aa}	112,57±12,39 ^{Aa}	107,36±9,68 ^{Aa}	103,85±8,57 ^{Da}
2D	116,07±2,94 ^{Aa}	118,53±3,48 ^{Aa}	114,96±10,96 ^{Aa}	107,88±7,64 ^{Aa}	95,02±1,4 ^{CDa}
3A	115,18±4,83 ^{Aa}	117,60±3,60 ^{Aa}	112,57±5,44 ^{Aa}	91,22±8,78 ^{Aba}	28,88±3,12 ^{Ab}
3B	119,93±3,93 ^{Aa}	117,77±1,77 ^{Aab}	101,66±1,66 ^{Ab}	79,70±1,30 ^{Bc}	74,21±5,21 ^{BCDc}
3C	112,40±6,60 ^{Aa}	115,72±2,72 ^{Aa}	107,04±10,04 ^{Aa}	105,08±6,08 ^{Aa}	102,39±3,18 ^{Da}
3D	110,96±9,04 ^{Aa}	117,82±1,18 ^{Aa}	105,47±4,47 ^{Aa}	98,83±1,83 ^{Aba}	97,80±3,20 ^{CDa}

[*] Her bir sütunda, aynı büyük harf/harflerle gösterilen değerler arasında Duncan testi sonuçlarına göre istatiksel olarak önemli bir fark yoktur ($P > 0,05$).

[*] Her bir satırda, aynı küçük harf/harflerle gösterilen değerler arasında Duncan testi sonuçlarına göre istatiksel olarak önemli bir fark yoktur ($P > 0,05$).

[*]Örnek kodlarında 1,2 ve 3 hardal konsantrasyonunu (%, w/v) belirtmektedir. A: koruyucu yok, starter kültür yok; B: koruyucu yok, starter kültür var; C: koruyucu var, starter kültür yok; D: koruyucu var, starter kültür var

Fermentasyon başlangıcında Hardaliye örneklerindeki glukoz miktarları 110,56 – 119,09 mg/mL arasında değişmektedir (Çizelge 4.9). Örnekler arasında istatiksel olarak önemli bir fark bulunmamıştır ($P > 0,05$). Fermentasyon süresi boyunca, fruktoz değişimindekine benzer olarak, kimyasal koruyucu kullanılan Hardaliye örneklerinde glukoz miktarındaki değişim istatiksel olarak önemsiz ($P > 0,05$) bulunurken, kimyasal koruyucu kullanılmayan örneklerde glukoz miktarı önemli ($P < 0,05$) derecede azalmıştır.

Tüm Hardaliye örnekleri incelendiğinde starter kültür kullanımı ve hardal konsantrasyonlarındaki değişim ile örneklerdeki glukoz/fruktoz miktarlarındaki değişim arasında bir ilişki bulunmamıştır.

Çizelge 4.9. Hardaliye fermentasyonu süresince örneklerin glukoz miktarları

Örnek No	Glukoz miktarı (mg/mL)				
	1. Gün	4. Gün	7. Gün	14. Gün	21. Gün
1A	117.87±4.27 ^{Aa}	118.28±4.08 ^{Aa}	122.03±3.83 ^{Aa}	119.46±2.76 ^{Ba}	81.73±7.33 ^{BCb}
1B	116.99±1.39 ^{Aa}	120.33±3.93 ^{Aa}	119.41±3.01 ^{Aa}	111.87±1.54 ^{ABa}	71.94±4.27 ^{ABb}
1C	116.74±1.67 ^{Aa}	117.47±7.97 ^{Aa}	118.53±8.33 ^{Aa}	115.64±4.24 ^{ABa}	104.35±4.15 ^{CDEa}
1D	115.72±1.49 ^{Aa}	115.26±4.86 ^{Aa}	119.29±6.29 ^{Aa}	118.66±4.46 ^{Ba}	105.83±5.63 ^{DEa}
2A	119.09±3.99 ^{Aa}	117.54±0.87 ^{Aa}	117.71±1.81 ^{Aa}	118.09±4.69 ^{Ba}	57.84±4.56 ^{Ab}
2B	115.03±4.73 ^{Aa}	116.49±2.19 ^{Aa}	113.81±5.09 ^{Aa}	116.22±2.02 ^{ABa}	81.28±7.08 ^{ABCb}
2C	113.45±3.86 ^{Aa}	115.7±0.9 ^{Aa}	116.93±8.03 ^{Aa}	116.69±4.29 ^{Ba}	118.39±2.19 ^{Ea}
2D	113.97±0.27 ^{Aa}	114.85±4.05 ^{Aa}	118.69±8.19 ^{Aa}	116.7±10.3 ^{Ba}	115.35±2.95 ^{Ea}
3A	114.29±5.82 ^{Aa}	114.37±7.97 ^{Aa}	115.14±1.74 ^{Aa}	94.67±2.27 ^{ABab}	83.87±1.27 ^{BCDb}
3B	117.9±4.5 ^{Aa}	115.72±14.92 ^{Aa}	112.3±2.01 ^{Aa}	91±1.91 ^{Aab}	70.57±1.74 ^{ABb}
3C	113.11±6.29 ^{Aa}	117.27±4.77 ^{Aa}	115.96±2.86 ^{Aa}	116.08±0.12 ^{ABa}	111.23±1.18 ^{Ea}
3D	110.56±8.34 ^{Aa}	114.66±0.46 ^{Aa}	112.1±4.31 ^{Aa}	108.42±6.09 ^{ABa}	111.78±2.03 ^{Ea}

[*] Her bir sütunda, aynı büyük harf/harflerle gösterilen değerler arasında Duncan testi sonuçlarına göre istatiksel olarak önemli bir fark yoktur ($P > 0,05$).

[*] Her bir satırda, aynı küçük harf/harflerle gösterilen değerler arasında Duncan testi sonuçlarına göre istatiksel olarak önemli bir fark yoktur ($P > 0,05$).

[*]Örnek kodlarında 1,2 ve 3 hardal konsantrasyonunu (%, w/v) belirtmektedir. A: koruyucu yok, starter kültür yok; B: koruyucu yok, starter kültür var; C: koruyucu var, starter kültür yok; D: koruyucu var, starter kültür var

Suda çözünür kuru madde, fruktoz ve glukoz sonuçları bir arada incelendiğinde, yüksek küf/maya sayısına sahip A ve B kodlu örneklerde suda çözünür kuru madde, fruktoz ve glukoz miktarları önemli derecede azalmıştır. Ancak, kimyasal koruyucu kullanılan ve düşük küf/maya sayısına sahip C ve D kodlu örneklerde suda çözünür kuru madde, fruktoz ve glukoz miktarlarındaki değişim düşük seviyede kalmıştır. Bu sonuçlar Hardaliye üretiminde maya fermentasyonunun engellenebilmesi için kimyasal koruyucu kullanımının zorunlu olduğuna işaret etmektedir.

4.2.5 Hardaliye fermentasyonu süresince pH ve toplam asitlik miktarlarındaki değişimler

Hardaliye örneklerinde toplam asitlik miktarı tüm örneklerde fermentasyon süresince artış göstermiştir (Çizelge 4.10). Toplam asitlik miktarındaki bu artış örneklerde laktik asit fermentasyonu sonucu meydana gelmiştir. Fermentasyonun birinci ve yirmi birinci günlerinde örneklerin toplam asitlik miktarları arasında istatiksel olarak önemli bir fark bulunmamıştır ($P > 0,05$).

Çizelge 4.10. Hardaliye fermentasyonu süresince örneklerin toplam asitlik miktarları (g tartarik asit/L)

Örnek No	Toplam asitlik miktarı (g tartarik asit/L)				
	1. Gün	4. Gün	7. Gün	14. Gün	21. Gün
1A	5,56±0,41 ^{Aa}	5,25±0,19 ^{ABa}	7,75±0,21 ^{Cb}	10,01±0,24 ^{Fc}	10,22±0,32 ^{Ac}
1B	5,45±0,21 ^{Aa}	5,39±0,25 ^{Ba}	6,10±0,55 ^{ABCa}	8,88±0,31 ^{DEFb}	9,74±0,21 ^{Ab}
1C	5,50±0,29 ^{Aab}	5,14±0,53 ^{ABa}	5,47±0,41 ^{ABab}	7,52±0,24 ^{CDbc}	8,77±0,37 ^{Ac}
1D	4,74±0,43 ^{Aa}	4,77±0,34 ^{ABa}	5,15±0,27 ^{Aa}	5,77±0,44 ^{ABa}	9,50±0,29 ^{Ab}
2A	5,26±0,25 ^{Aa}	5,61±0,17 ^{Bab}	7,09±0,23 ^{BCb}	9,44±0,32 ^{EFc}	9,54±0,35 ^{Ac}
2B	5,27±0,13 ^{Aa}	5,10±0,12 ^{ABa}	5,37±0,19 ^{Aba}	9,02±0,37 ^{DEFb}	9,58±0,28 ^{Ab}
2C	5,20±0,32 ^{Aa}	4,73±0,30 ^{ABa}	4,72±0,41 ^{Aa}	5,82±0,31 ^{ABa}	8,84±0,38 ^{Ab}
2D	4,92±0,27 ^{Aa}	4,60±0,29 ^{ABa}	4,98±0,29 ^{Aa}	7,12±0,17 ^{BCb}	9,53±0,41 ^{Ac}
3A	5,61±0,35 ^{Aa}	5,33±0,12 ^{Ba}	6,07±0,14 ^{ABCa}	8,03±0,12 ^{CDEb}	8,73±0,22 ^{Ab}
3B	5,35±0,29 ^{Aa}	5,37±0,22 ^{Ba}	6,02±0,21 ^{ABCab}	7,01±0,22 ^{ABCbc}	7,98±0,25 ^{Ac}
3C	5,17±0,26 ^{Aa}	4,99±0,19 ^{ABa}	4,77±0,38 ^{Aa}	5,53±0,24 ^{Aa}	9,96±0,51 ^{Ab}
3D	4,74±0,39 ^{Aab}	3,50±0,65 ^{Aa}	5,09±0,33 ^{Aab}	5,85±0,30 ^{ABb}	9,81±0,25 ^{Ac}

[*] Her bir sütunda, aynı büyük harf/harflerle gösterilen değerler arasında Duncan testi sonuçlarına göre istatiksel olarak önemli bir fark yoktur ($P > 0,05$).

[*] Her bir satırda, aynı küçük harf/harflerle gösterilen değerler arasında Duncan testi sonuçlarına göre istatiksel olarak önemli bir fark yoktur ($P > 0,05$).

[*]Örnek kodlarında 1,2 ve 3 hardal konsantrasyonunu (%, w/v) belirtmektedir. A: koruyucu yok, starter kültür yok; B: koruyucu yok, starter kültür var; C: koruyucu var, starter kültür yok; D: koruyucu var, starter kültür var

Hardaliye örneklerinde fermentasyon süresince örneklerdeki pH değerleri de fermentasyon boyunca azalma göstermiştir ($P < 0,05$) (Çizelge 4.11). Bu tez çalışması kapsamında starter kültür, hardal tohumu ve kimyasal koruyucu kullanımı ile Hardaliye örneklerinde toplam asitlik ve pH değerlerinin değişimi arasında direkt bir ilişki bulunamamıştır.

Çizelge 4.11. Hardaliye fermentasyonu süresince örneklerin pH değerleri

Örnek No	pH			
	1	4	7	14
1A	3,78±0,03 ^{Aa}	3,72±0,01 ^{Aba}	3,61±0,00 ^{Ab}	3,55±0,04 ^{Abc}
1B	3,79±0,02 ^{Aa}	3,74±0,01 ^{ABab}	3,66±0,03 ^{ABb}	3,50±0,03 ^{Ac}
1C	3,81±0,01 ^{Aa}	3,73±0,00 ^{ABb}	3,74±0,02 ^{ABab}	3,59±0,03 ^{ABc}
1D	3,83±0,01 ^{Aa}	3,76±0,00 ^{Aab}	3,71±0,05 ^{ABab}	3,68±0,01 ^{Cbc}
2A	3,76±0,03 ^{Aa}	3,71±0,02 ^{Aba}	3,68±0,04 ^{Aba}	3,52±0,01 ^{Ab}
2B	3,82±0,01 ^{Aa}	3,80±0,04 ^{Aa}	3,74±0,01 ^{Aba}	3,55±0,01 ^{Ab}
2C	3,81±0,02 ^{Aa}	3,64±0,03 ^{Bb}	3,74±0,04 ^{ABab}	3,76±0,02 ^{Dab}
2D	3,83±0,01 ^{Aa}	3,76±0,01 ^{Ab}	3,77±0,00 ^{Bb}	3,64±0,01 ^{BCc}
3A	3,77±0,02 ^{Aa}	3,71±0,01 ^{ABab}	3,72±0,01 ^{ABab}	3,65±0,04 ^{BCc}
3B	3,75±0,03 ^{Aa}	3,71±0,00 ^{Aba}	3,72±0,01 ^{ABa}	3,71±0,03 ^{CDa}
3C	3,80±0,02 ^{Aa}	3,77±0,02 ^{Aa}	3,76±0,02 ^{ABa}	3,77±0,01 ^{Da}
3D	3,82±0,01 ^{Aa}	3,74±0,03 ^{Aba}	3,79±0,01 ^{Ba}	3,79±0,03 ^{Da}

[*] Her bir sütunda, aynı büyük harf/harflerle gösterilen değerler arasında Duncan testi sonuçlarına göre istatiksel olarak önemli bir fark yoktur ($P > 0,05$).
[*] Her bir satırda, aynı küçük harf/harflerle gösterilen değerler arasında Duncan testi sonuçlarına göre istatiksel olarak önemli bir fark yoktur ($P > 0,05$).
[*]Örnek kodlarında 1,2 ve 3 hardal konsantrasyonunu (%, w/v) belirtmektedir. A: koruyucu yok, starter kültür yok; B: koruyucu yok, starter kültür var; C: koruyucu var, starter kültür yok; D: koruyucu var, starter kültür var

Alphonse Lavallée üzümleri kullanılarak üretilen Hardaliye (% 2 hardal tohumu, 0,25 g/10L benzoat ve sorbat, 25 mg/L potasyum metabisülfit) örneklerinde başlangıç pH değeri 29 gün fermentasyon sonunda 4,24'den 3,79'a düşmüş ve toplam asitlik değeri de 2,80 g/L'den 11,93 g/L'ye yükselmiştir. Papazkarasi üzümleri kullanılarak üretilen Hardaliye (% 1 hardal tohumu, 0,25 g/10L benzoat ve sorbat) örneklerinde ise 29 gün fermentasyon sonunda başlangıç pH değeri 3,82'den 3,73'e düşmüş ve toplam asitlik 5,93 g/L'den 11,4 g/L'ye yükselmiştir (Aydoğdu vd., 2014).

Güven ve Aksoy (2009), sadece hardal tohumu kullanılarak üretilen Hardaliyelerde fermentasyonunun 3. günü ve 21. günü arasında üründeki pH değerinin 4,02'den 3,94'e düştüğünü bildirmişlerdir. Coşkun (2001) geleneksel yöntemlerle üretilen Hardaliyelerin pH değerlerinin 3,21 ile 4,12 arasında değiştiğini bildirmiştir. Çalışmada, % 0,2 siyah hardal tohumu, % 0,1 sodyum benzoat ve % 0,1 potasyum sorbat kullanılarak üretilen Hardaliyelerde fermentasyon başlangıcında ortalama 3,74 olan pH'ın, bir hafta fermentasyonun ardından 3,28'e düştüğü tespit edilmiştir. Çalışmada pH'daki düşüş fermentasyon süresince ortamdaki mikroorganizmaların şekerleri kullanarak

gerçekleştirdikleri organik asit oluşumu ile ilişkilendirilmiştir. Aynı çalışmada, daha yüksek miktarda koruyucu (% 1,5 siyah hardal tohumu ve % 0,2 sodyum benzoat) kullanılan Hardaliyelerde örneklerin pH değerinin 3,18'den 3,71'e yükseldiği tespit edilmiştir.

4.2.6. Hardaliye fermentasyonu süresince alkol miktarlarındaki değişimler

Hardaliye fermentasyonunun başlangıcında hiçbir örnekte alkol bulunmamıştır (Çizelge 4.12). Kimyasal koruyucu kullanılan C ve D kodlu tüm örneklerde fermentasyonun 21. gününe kadar alkol oluşumu tespit edilmemiştir. Yalnızca 2D örneğinde fermentasyon sonunda % 0,6 alkol oluşumu tespit edilmiştir. Kimyasal koruyucu kullanılmayan tüm örneklerde 4. ve 7. günden itibaren alkol oluşumu başlamıştır. Bu örneklerde fermentasyon sonunda alkol miktarları % 2,3-6,4 arasında değişim göstermiştir. Hardal tohumunun tek başına koruyucu olarak kullanıldığı örneklerde, hardal konsantrasyonunun arttırılması ile alkol oluşumu engellenememiştir. Hardal konsantrasyonundaki artış oluşan alkol miktarı üzerine istatiksel olarak önemli bir etki göstermemiştir ($P > 0,05$). Alkol oluşumu tespit edilen örneklerde toplam küf/maya sayısı 5,4-7,3 log kob/mL arasında iken, alkol oluşumu tespit edilmeyen örneklerdeki toplam küf/maya sayısı 1,1-1,8 log kob/mL arasında bulunmuştur. Bu sonuçlar Hardaliye üretiminde alkol oluşumunun toplam küf/maya sayısındaki artışla ilişkili olduğunu göstermektedir.

Çizelge 4.12. Hardaliye fermentasyonu süresince örneklerdeki alkol miktarı (% v/v)

Örnek No	Alkol miktarı (% v/v)				
	1. GÜN	4. GÜN	7.GÜN	14.GÜN	21. GÜN
1A	-	-	0,8±0,1 ^{Ba}	1,1±0,2 ^{ABa}	3,7±0,3 ^{Cb}
1B	-	-	0,5±0,2 ^{Aba}	1,4±0,1 ^{Bb}	5,1±0,1 ^{Dc}
1C	-	-	-	-	-
1D	-	-	-	-	-
2A	-	-	0,7±0,2 ^{Ba}	1,0±0,1 ^{ABa}	6,4±0,2 ^{Eb}
2B	-	0,5±0,1 ^{Aa}	0,6±0,1 ^{Bab}	1,1±0,1 ^{ABb}	2,3±0,1 ^{Bc}
2C	-	-	-	-	-
2D	-	-	-	-	0,6±0,1 ^{Ab}
3A	-	-	0,4±0,1 ^{Aba}	0,8±0,1 ^{Aa}	5,7±0,3 ^{DEb}
3B	-	-	0,5±0,1^{Ba}	1,3±0,2 ^{Bb}	3,4±0,2 ^{Cc}
3C	-	-	-	-	-
3D	-	-	-	-	-

[*] Her bir sütunda, aynı büyük harf/harflerle gösterilen değerler arasında Duncan testi sonuçlarına göre istatiksel olarak önemli bir fark yoktur ($P > 0,05$).

[*] Her bir satırda, aynı küçük harf/harflerle gösterilen değerler arasında Duncan testi sonuçlarına göre istatiksel olarak önemli bir fark yoktur (*P > 0,05*).
[*]Örnek kodlarında 1,2 ve 3 hardal konsantrasyonunu (%, w/v) belirtmektedir. A: koruyucu yok, starter kültür yok; B: koruyucu yok, starter kültür var; C: koruyucu var, starter kültür yok; D: koruyucu var, starter kültür var

Coşkun (2001), % 0,2 siyah hardal tohumu, % 0,1 sodyum benzoat ve % 0,1 potasyum sorbat kullanılarak üretilen Hardaliyelerde 7 gün fermentasyon sonunda ortalama % 0,63 alkol bulmuşlardır. Aynı çalışmada, daha yüksek miktarda koruyucu (% 1,5 siyah hardal tohumu ve % 0,2 sodyum benzoat) kullanılan Hardaliyelerde 7 gün fermentasyon sonunda % 1,6 alkol tespit edilmiştir. Bu örneklerde fermentasyon sonunda yaklaşık 3 log kob/mL küf/maya tespit edilmiştir.

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 (yaklaşık % 0,4 v/v) olmalıdır. Bu çerçevede, Hardaliye üretiminde küf/maya gelişiminin inhibe edilmesi ve alkol oluşumunun engellenmesi büyük önem arz etmektedir.

4.3. Hardaliye örneklerinin farklı sıcaklıklarda depolanması süresince mikrobiyolojik ve fizikokimyasal özelliklerinde meydana gelen değişimler

4.3.1. Depolama süresince Hardaliye örneklerinde mikrofloradaki değişimler

Oda sıcaklığı ve buzdolabı sıcaklığında iki ay depolama süresince Hardaliye örneklerinde TMAB ve laktik asit bakteri sayılarındaki değişim sırasıyla Çizelge 4.13 ve Çizelge 4.14'de verilmiştir. Hem oda sıcaklığı, hem de soğukta depolama süresince Hardaliye örneklerinde TMAB ve laktik asit bakteri sayıları, ortamdaki besin öğelerinin zamanla azalmasına bağlı olarak, düşüş göstermiştir. Hardaliye üretiminde hardal tohumu ve kimyasal koruyucu kullanımının depolama süresince TMAB ve laktik asit bakteri sayısı üzerine istatiksel olarak önemli bir etkisi bulunamamıştır.

Çizelge 4.13. Farklı sıcaklıklarda depolanan Hardaliye örneklerinde toplam mezofilik aerobik canlı bakteri sayıları (log kob/mL)

ÖRNEK NO	ODA SICAKLIĞI				BUZDOLABI SICAKLIĞI		
	0.Gün	15. Gün	30. Gün	60. Gün	15. Gün	30. Gün	60. Gün
1A	7,31±0,24 ^{Ca}	6,00±0,24 ^{BCDEb}	4,91±0,06 ^{Bb}	2,18±0,20 ^{Ae}	6,88±0,05 ^{FGa}	6,7±0,29 ^{Eab}	3,62±0,23 ^{Cd}
1B	7,13±0,19 ^{Ca}	7,04±0,15 ^{EFa}	5,73±0,05 ^{Cb}	3,90±0,08 ^{Bd}	7,16±0,06 ^{GHa}	7,23±0,04 ^{Ea}	4,87±0,10 ^{EFc}
1C	7,62±0,21 ^{Ca}	5,51±0,30 ^{ABCDb}	4,74±0,37 ^{Bbc}	1,80±0,00 ^{Ae}	3,89±0,08 ^{Ccd}	3,39±0,86 ^{ABd}	2,68±0,22 ^{ABde}
1D	5,48±0,00 ^{ABbc}	6,64±0,23 ^{DEFa}	6,23±0,04 ^{Da}	4,04±0,62 ^{Bd}	5,77±0,11 ^{Eab}	4,58±0,22 ^{BCcd}	3,82±0,17 ^{CDd}
2A	7,48±0,18 ^{Ca}	7,17±0,18 ^{EFa}	7,19±0,06 ^{Ea}	5,51±0,04 ^{Cb}	7,18±0,07 ^{GHa}	7,12±0,08 ^{Ea}	5,08±0,11 ^{Fb}
2B	7,20±0,15 ^{Ca}	4,60±0,06 ^{Ac}	5,85±0,11 ^{CDb}	4,07±0,10 ^{Bc}	6,61±0,19 ^{Fab}	6,37±0,09 ^{DEab}	3,21±0,16 ^{BCd}
2C	6,89±0,58 ^{BCa}	7,41±0,04 ^{Fa}	6,33±0,63 ^{Dab}	5,29±0,01 ^{Cbc}	7,54±0,10 ^{Ha}	7,12±0,39 ^{Ea}	4,40±0,11 ^{DEc}
2D	7,14±1,15 ^{Ca}	7,15±0,95 ^{EFa}	4,80±0,14 ^{Bbcd}	3,58±0,14 ^{Bd}	7,02±0,03 ^{FGab}	6,73±0,18 ^{Eabc}	4,67±0,21 ^{EFcd}
3A	5,06±0,08 ^{Aa}	5,01±0,01 ^{ABCa}	4,25±0,07 ^{Aa}	1,86±0,06 ^{Ab}	2,17±0,21 ^{Ab}	5,10±0,96 ^{CDa}	2,17±0,15 ^{Ab}
3B	7,04±0,06 ^{BCa}	6,28±0,28 ^{CDEFb}	4,86±0,11 ^{Bc}	1,96±0,00 ^{Ad}	7,06±0,22 ^{FGa}	7,14±0,05 ^{Ea}	5,29±0,02 ^{Fc}
3C	8,22±0,11 ^{Ca}	4,93±0,22 ^{ABb}	3,94±0,02 ^{Ac}	1,86±0,06 ^{Ae}	2,90±0,06 ^{Bd}	2,94±0,51 ^{Ad}	2,12±0,12 ^{Ade}
3D	6,72±0,39 ^{BCa}	6,19±0,27 ^{BCDEFa}	5,16±0,22 ^{Bb}	3,16±0,23 ^{Bc}	4,9±0,08 ^{Db}	3,75±0,10 ^{ABCc}	3,19±0,21 ^{BCc}

[*] Her bir sütunda, aynı büyük harf/harflerle gösterilen değerler arasında Duncan testi sonuçlarına göre istatiksel olarak önemli bir fark yoktur ($P > 0,05$).
[*] Her bir satırda, aynı küçük harf/harflerle gösterilen değerler arasında Duncan testi sonuçlarına göre istatiksel olarak önemli bir fark yoktur ($P > 0,05$).
[*]Örnek kodlarında 1, 2 ve 3 hardal konsantrasyonunu (%, w/v) belirtmektedir. A: koruyucu yok, starter kültür yok; B: koruyucu yok, starter kültür var; C: koruyucu var, starter kültür yok; D: koruyucu var, starter kültür var

Kimyasal koruyucu kullanmadan üretilen A ve B kodlu Hardaliye örneklerindeki toplam küf/maya sayıları oda sıcaklığında depolama süresince azalma göstermiştir. Kimyasal koruyucu kullanılan C ve D kodlu örneklerde ise oda sıcaklığında depolamanın 15. gününe kadar genel olarak küf/maya artış göstermiş, daha sonra ortamda fermente edilebilir şekerlerin azalmasına paralel olarak 30. günden itibaren azalmıştır. Depolamanın başlangıcında fermente edilebilir şeker miktarı C ve D kodlu Hardaliye örneklerinde daha yüksek olduğu için bu örneklerde toplam küf/maya sayısındaki artış fermente edilebilir şeker miktarı azalana kadar devam etmiştir. Oda sıcaklığında 60 gün depolama sonunda, kimyasal koruyucu kullanılan C ve D kodlu örneklerdeki toplam küf/maya sayısı A ve B kodlu örneklere göre daha düşük bulunmuştur.

Mayaların genel olarak optimum gelişim sıcaklıkları 20-30ºC arasında olup, şarap mayalarının gelişim sıcaklıkları 25-33ºC arasındadır (Yalcin ve Ozbas, 2008). Bu nedenle buzdolabı sıcaklığında depolamada, toplam küf maya sayısında depolama süresince genel bir azalma gözlenmiştir (Çizelge 4.15). Ayrıca, kimyasal koruyucu kullanılan Hardaliye örneklerinde (2D ve 3C hariç) buzdolabı sıcaklığında depolama sonunda küf/maya varlığı tespit edilmemiştir.

Çizelge 4.14. Farklı sıcaklıklarda depolanan Hardaliye örneklerinde laktik asit bakterileri sayıları (log kob/mL)

ÖRNEK NO	ODA SICAKLIĞI				BUZDOLABI SICAKLIĞI		
	0.Gün	15. Gün	30. Gün	60. Gün	15. Gün	30. Gün	60. Gün
1A	7,32±0,28 ^{BCDEa}	6,10±0,28 ^{CDc}	5,22±0,12 ^{BCd}	1,96±0,08 ^{Af}	7,00±0,01 ^{CDab}	6,54±0,09 ^{Cbc}	3,4±0,14 ^{Be}
1B	7,47±0,22 ^{CDEa}	6,97±0,03 ^{DEFb}	6,06±0,08 ^{DEc}	2,26±0,12 ^{Ae}	7,19±0,03 ^{CDab}	7,26±0,04 ^{EFab}	4,97±0,04 ^{EFd}
1C	7,91±0,02 ^{Ea}	5,50±0,28 ^{BCb}	4,69±0,30 ^{Bc}	2,10±0,22 ^{Ae}	3,52±0,11 ^{Ad}	2,56±0,11 ^{Ae}	1,84±0,12 ^{Ae}
1D	5,63±0,38 ^{Ab}	6,92±0,05 ^{DEFa}	6,37±0,20 ^{DEFab}	4,60±0,26 ^{BCc}	5,74±0,08 ^{Bb}	3,78±0,01 ^{Bd}	2,08±0,05 ^{Ae}
2A	7,13±0,19 ^{BCDa}	4,99±0,12 ^{Bb}	7,03±0,02 ^{Fa}	2,48±0,00 ^{Ad}	7,07±0,04 ^{CDa}	7,00±0,06 ^{DEa}	4,08±0,12 ^{BCc}
2B	7,04±0,05 ^{BCDa}	7,12±0,01 ^{EFa}	6,13±0,25 ^{DEb}	4,06±0,08 ^{Bc}	6,79±0,13 ^{CDab}	6,26±0,26 ^{Cb}	4,16±0,23 ^{CDc}
2C	6,72±0,14 ^{BCb}	6,98±0,13 ^{DEFab}	5,65±0,12 ^{CDc}	5,25±0,35 ^{Cc}	7,65±0,15 ^{Da}	7,47±0,04 ^{Fab}	4,84±0,23 ^{DEFc}
2D	7,00±0,11 ^{BCDab}	7,37±0,14 ^{Fa}	6,39±0,36 ^{DEFb}	4,25±0,10 ^{Bc}	7,17±0,09 ^{CDa}	6,98±0,02 ^{DEab}	4,69±0,22 ^{CDEc}
3A	5,23±0,12 ^{Ab}	5,07±0,15 ^{Bbc}	4,70±0,13 ^{Bbc}	1,91±0,19 ^{Ad}	6,57±0,81 ^{BCa}	3,88±0,10 ^{Bc}	2,19±0,21 ^{Ad}
3B	7,06±0,11 ^{BCDa}	6,74±0,23 ^{DEFab}	5,89±0,27 ^{CDEbc}	2,03±0,12 ^{Ad}	7,20±0,17 ^{CDa}	7,25±0,10 ^{EFa}	5,44±0,05 ^{Fc}
3C	7,63±0,21 ^{DEa}	3,90±0,60 ^{Ab}	2,81±0,11 ^{Abcd}	1,86±0,15 ^{Ad}	3,24±0,21 ^{Abc}	6,60±0,17 ^{CDa}	2,27±0,11 ^{Acd}
3D	6,71±0,16 ^{Ba}	6,35±0,07 ^{CDEa}	6,53±0,07 ^{EFa}	4,46±0,17 ^{BCb}	3,11±0,11 ^{Ac}	2,77±0,08 ^{Ac}	1,98±0,14 ^{Ad}

* Her bir sütunda, aynı büyük harf/harflerle gösterilen değerler arasında Duncan testi sonuçlarına göre istatiksel olarak önemli bir fark yoktur ($P > 0,05$).
* Her bir satırda, aynı küçük harf/harflerle gösterilen değerler arasında Duncan testi sonuçlarına göre istatiksel olarak önemli bir fark yoktur ($P > 0,05$).
*Örnek kodlarında 1, 2 ve 3 hardal konsantrasyonunu (%, w/v) belirtmektedir. A: koruyucu yok, starter kültür yok; B: koruyucu yok, starter kültür var; C: koruyucu var, starter kültür yok; D: koruyucu var, starter kültür var

Çizelge 4.15. Farklı sıcaklıklarda depolanan Hardaliye örneklerindeki toplam küf/maya sayıları (log kob/mL)

ÖRNEK NO	ODA SICAKLIĞI				BUZDOLABI SICAKLIĞI		
	0.Gün	15. Gün	30. Gün	60. Gün	15. Gün	30. Gün	60. Gün
1A	7,22±0,18 ^{Ea}	5,91±0,01 ^{BCDb}	5,07±0,10 ^{DEc}	2,30±0,31 ^{ABe}	6,89±0,16 ^{Da}	6,15±0,21 ^{Eb}	3,44±0,14 ^{Dd}
1B	7,22±0,13 ^{Ea}	7,02±0,08 ^{Ea}	5,67±0,11 ^{EFb}	2,55±0,10 ^{BCc}	7,04±0,01 ^{Da}	7,22±0,01 ^{Fa}	5,21±0,37 ^{Eb}
1C	1,07±0,10 ^{Acd}	6,53±0,24 ^{DEa}	2,61±0,19 ^{Ab}	1,63±0,22 ^{Abc}	2,46±0,77 ^{Bb}	2,26±0,17 ^{BCbc}	-
1D	1,23±0,12 ^{Abc}	6,48±0,12 ^{DEa}	2,12±0,16 ^{Abc}	1,91±0,15 ^{ABbc}	1,12±0,16 ^{Acd}	1,74±0,20 ^{ABbc}	-
2A	7,31±0,11 ^{Ea}	7,15±0,07 ^{Ea}	6,98±0,27 ^{Ga}	5,62±0,12 ^{Eb}	7,13±0,02 ^{Da}	7,14±0,09 ^{Fa}	5,29±0,27 ^{Eb}
2B	7,27±0,13 ^{Ea}	5,12±0,17 ^{Ac}	6,09±0,12 ^{FGb}	6,37±0,16 ^{Eb}	7,12±0,20 ^{Da}	6,6±0,25 ^{EFab}	2,08±0,11 ^{BCd}
2C	1,38±0,11 ^{Ac}	5,59±0,15 ^{ABCa}	4,36±0,35 ^{BCDb}	3,57±0,18 ^{Db}	1,76±0,22 ^{ABc}	1,61±0,21 ^{ABc}	-
2D	3,87±0,04 ^{Cc}	5,80±0,07 ^{ABCDa}	4,82±0,12 ^{CDEb}	3,69±0,00 ^{Dc}	2,15±0,11 ^{Be}	2,96±0,08 ^{Cd}	1,71±0,2 ^{BCe}
3A	5,41±0,26 ^{Da}	5,21±0,38 ^{ABa}	4,86±0,63 ^{CDEa}	3,30±0,17 ^{CDb}	5,16±0,22 ^{Ca}	5,11±0,27 ^{Da}	2,40±0,09 ^{Cb}
3B	7,12±0,09 ^{Ea}	6,54±0,34 ^{DEa}	3,87±0,24 ^{Bc}	2,62±0,07 ^{BCd}	7,29±0,18 ^{Da}	7,15±0,07 ^{Fa}	5,44±0,36 ^{Eb}
3C	2,07±0,10 ^{Bc}	6,44±0,20 ^{DEa}	3,97±0,02 ^{BCb}	1,84±0,09 ^{ABcd}	1,87±0,03 ^{ABc}	2,07±0,15 ^{Bc}	1,4±0,28 ^{Bd}
3D	1,59±0,07 ^{ABbc}	6,07±0,10 ^{CDa}	1,87±0,06 ^{Ab}	1,71±0,12 ^{Abc}	1,33±0,64 ^{ABb}	1,06±0,43 ^{Ac}	-

* Her bir sütunda, aynı büyük harf/harflerle gösterilen değerler arasında Duncan testi sonuçlarına göre istatiksel olarak önemli bir fark yoktur ($P > 0,05$).
* Her bir satırda, aynı küçük harf/harflerle gösterilen değerler arasında Duncan testi sonuçlarına göre istatiksel olarak önemli bir fark yoktur ($P > 0,05$).
*Örnek kodlarında 1, 2 ve 3 hardal konsantrasyonunu (%, w/v) belirtmektedir. A: koruyucu yok, starter kültür yok; B: koruyucu yok, starter kültür var; C: koruyucu var, starter kültür yok; D: koruyucu var, starter kültür var

4.3.2. Depolama süresince Hardaliye örneklerinde toplam antioksidan aktivitedeki değişimler

Hardaliye örneklerinin tümünde oda sıcaklığında depolama süresince toplam antioksidan aktivitedeki azalma istatiksel olarak önemli bulunmuştur (Çizelge 4.16). Altmış gün oda sıcaklığında depolama sonunda ise farklı üretim yöntemleri ile üretilen Hardaliye örneklerinin antioksidan akitiviteleri arasında istatiksel ($P > 0.05$) olarak önemli bir fark bulunmamıştır.

Buzdolabı sıcaklığında depolama süresince Hardaliye örneklerinin toplam antioksidan aktivitesinde istatiksel olarak önemli oranda ($P > 0.05$) azalma gözlenmiştir. Ancak, bu azalma oda sıcaklığında depolanan örneklere göre daha düşük düzeyde kalmıştır. Buzdolabı sıcaklığında iki ay depolama sonucunda ise farklı yöntemlerle üretilen Hardaliye örneklerinin toplam antioksidan aktiviteleri arasında istatistiksel olarak önemli bir fark bulunmamıştır ($P > 0.05$). Sonuç olarak, incelenen tüm örneklerde, altmış gün depolama sonunda buzdolabı sıcaklığında depolanan Hardaliye örneklerindeki toplam antioksidan aktivite değerleri oda sıcaklığında depolanan örneklere kıyasla daha yüksek bulunmuştur.

Aşkın ve Atik (2016), farklı sıcaklıklarda (4 °C ve 20 °C) iki ay depolanan Hardaliye örneklerinin toplam antioksidan aktiviteleri arasında istatiksel olarak önemli ($P > 0.05$) bir fark tespit etmemişlerdir. Ancak hem 4 °C hem de 20 °C'de depolanan örneklerde, depolama süresince toplam antioksidan aktivite yaklaşık olarak % 12-13 arasında düşüş göstermiştir.

Çizelge 4.16. Farklı sıcaklıklarda depolanan Hardaliye örneklerinin toplam antioksidan aktivite değerleri (µmol Troloks/mL)

ÖRNEK NO	ODA SICAKLIĞI				BUZDOLABI SICAKLIĞI		
	0.Gün	15. Gün	30. Gün	60. Gün	15. Gün	30. Gün	60. Gün
1A	4,02±0,03 ^{Aa}	3,55±0,01 ^{Ac}	3,46±0,03 ^{ABc}	3,02±0,01 ^{Ad}	3,84±0,01 ^{ABCb}	3,78±0,10 ^{Ab}	3,62±0,05 ^{Ac}
1B	3,95±0,05 ^{Aa}	3,56±0,02 ^{Abc}	3,53±0,06 ^{ABc}	3,10±0,06 ^{Ad}	3,79±0,03 ^{ABCab}	3,70±0,04 ^{Abc}	3,53±0,02 ^{Ac}
1C	4,03±0,09 ^{Aa}	3,41±0,10 ^{Acd}	3,26±0,02 ^{Ad}	2,94±0,04 ^{Ae}	3,76±0,03 ^{ABab}	3,67±0,02 ^{Abc}	3,55±0,02 ^{Abcd}
1D	3,94±0,02 ^{Aa}	3,55±0,02 ^{Acd}	3,47±0,02 ^{ABd}	3,02±0,02 ^{Ae}	3,71±0,07 ^{Ab}	3,62±0,06 ^{Abc}	3,47±0,02 ^{Ad}
2A	4,05±0,01 ^{Aa}	3,61±0,02 ^{Ab}	3,62±0,11 ^{Bb}	3,19±0,10 ^{Ac}	3,89±0,01 ^{ABCab}	3,83±0,01 ^{Aab}	3,66±0,06 ^{Aab}
2B	4,03±0,05 ^{Aa}	3,55±0,04 ^{Ac}	3,54±0,10 ^{ABc}	3,12±0,07 ^{Ad}	3,90±0,03 ^{ABCab}	3,81±0,05 ^{Aabc}	3,63±0,02 ^{Abc}
2C	4,01±0,13 ^{Aa}	3,45±0,05 ^{Ab}	3,42±0,09 ^{ABbc}	3,03±0,06 ^{Ac}	3,95±0,03 ^{BCa}	3,85±0,05 ^{Aa}	3,66±0,02 ^{Aab}
2D	4,03±0,05 ^{Aa}	3,55±0,04 ^{Ab}	3,49±0,04 ^{ABb}	3,08±0,03 ^{Ac}	3,83±0,09 ^{ABCab}	3,73±0,12 ^{Aab}	3,49±0,01 ^{Ab}
3A	3,97±0,05 ^{Aa}	3,54±0,01 ^{Ac}	3,46±0,02 ^{ABc}	3,01±0,01 ^{Ad}	3,80±0,03 ^{ABCab}	3,63±0,06 ^{Abc}	3,51±0,05 ^{Ac}
3B	4,09±0,03 ^{Aa}	3,54±0,05 ^{Ac}	3,46±0,04 ^{ABc}	3,06±0,01 ^{Ad}	3,75±0,03 ^{ABb}	3,62±0,02 ^{Abc}	3,51±0,01 ^{Ac}
3C	4,08±0,09 ^{Aa}	3,44±0,05 ^{Abcd}	3,36±0,04 ^{ABd}	2,98±0,08 ^{Ae}	3,98±0,04 ^{Ca}	3,87±0,08 ^{Aab}	3,67±0,02 ^{Abc}
3D	4,04±0,08 ^{Aa}	3,60±0,05 ^{Abc}	3,54±0,06 ^{ABc}	3,14±0,03 ^{Ad}	3,83±0,02 ^{ABCab}	3,77±0,01 ^{Aabc}	3,60±0,05 ^{Abc}

[*] Her bir sütunda, aynı büyük harf/harflerle gösterilen değerler arasında Duncan testi sonuçlarına göre istatiksel olarak önemli bir fark yoktur ($P > 0,05$).
[*] Her bir satırda, aynı küçük harf/harflerle gösterilen değerler arasında Duncan testi sonuçlarına göre istatiksel olarak önemli bir fark yoktur ($P > 0,05$).
[*]Örnek kodlarında 1,2 ve 3 hardal konsantrasyonunu (%, w/v) belirtmektedir. A: koruyucu yok, starter kültür yok; B: koruyucu yok, starter kültür var; C: koruyucu var, starter kültür yok; D: koruyucu var, starter kültür var

4.3.3. Depolama süresince Hardaliye örneklerinde fruktoz ve glukoz miktarlarındaki değişimler

Üzümde temel olarak bulunan şekerler glukoz ve fruktoz olup, olgunluk aşamasında bu şekerlerin miktarı yaklaşık olarak birbirine eşittir. Sukroz üzümde çok az miktarda olup, diğer şekerler ise önemsiz miktarda bulunmaktadır. Genel olarak üzümde bulunan şeker konsantrasyonu 22–24 ºBriks miktarda olup, çözünür kuru madde miktarının büyük bir çoğunluğunu oluşturmaktadır. Şarap oluşumunda en önemli maya olan *Saccharomyces cerevisiae* metabolik olarak enerjisinin çoğunu fruktoz ve glukozdan elde etmekte olup, diğer organik bileşikleri fermente etme yeteneği düşüktür (Soleas vd., 1997).

Hardaliye örneklerinde oda ve buzdolabı sıcaklığında iki ay depolama süresince fruktoz ve glukoz miktarlarındaki değişimler sırasıyla Çizelge 4.17 ve Çizelge 4.18'de verilmiştir. Depolama başlangıcında kimyasal koruyucu kullanılan C ve D kodlu Hardaliye örneklerindeki fruktoz miktarı A ve B kodlu örneklerden daha yüksek bulunmuştur. Oda sıcaklığıda depolamanın 30. gününe kadar örneklerdeki fruktoz miktarı önemli derecede azalmış ve bu düşüş 60. güne kadar devam etmiştir. Depolama sonunda ise örneklerdeki fruktoz miktarı 6,5 mg/mL'nin altına düşmüştür.

Buzdolabı sıcaklığında depolamanın 15. gününde genel olarak depolamanın başlangıcına göre fruktoz miktarında önemli bir azalma tespit edilmemiştir. Diğer taraftan, depolamanın sonunda kimyasal koruyucu kullanılmayan örneklerde fruktoz miktarı başlangıç miktarına göre önemli derecede azalmıştır. Yalnızca kimyasal koruyucu kullanılan örneklerde depolama başlangıcı ile sonu arasında örneklerin fruktoz miktarları arasında istatiksel olarak önemli bir fark bulunmamıştır.

Depolama başlangıcında kimyasal koruyucu kullanılan C ve D kodlu Hardaliye örneklerindeki glukoz miktarı A ve B kodlu örneklerden daha yüksek bulunmuştur. Oda sıcaklığında depolanan koruyucu kullanılmayan Hardaliye örneklerinde glukoz miktarı depolamanın sonuna kadar yüksek miktarda düşüş gösterirken, kimyasal koruyucu kullanılan örneklerde glukoz miktarındaki düşüş daha düşük olmuştur.

Çizelge 4.17. Farklı sıcaklıklarda depolanan Hardaliye örneklerindeki fruktoz miktarları

ÖRNEK	ODA SICAKLIĞI				BUZDOLABI SICAKLIĞI		
NO	0.Gün	15. Gün	30. Gün	60. Gün	15. Gün	30. Gün	60. Gün
1A	70,5±3,24 ^{BCa}	14,55±1,66 ^{Ad}	7,13±0,59 ^{DEde}	-	63,89±1,31 ^{ABCa}	51,31±0,91 ^{Cb}	40.34±0.84 ^{Cc}
1B	63,59±1,17 ^{Ba}	3,32±0,90 ^{Ae}	-	-	43,57±0,73 ^{ABb}	29,02±0,82 ^{ABc}	21.25±0.27 ^{ABd}
1C	104,35±6,14 ^{Da}	92,19±2,05 ^{Ca}	5,06±0,07 ^{BCDEb}	2,78±0,34 ^{Cb}	111,49±12,29 ^{Da}	114,06±2,35 ^{GHa}	113.29±1.51 ^{Fa}
1D	103,61±11,16 ^{Da}	84,71±13,74 ^{BCa}	5,97±0,16 ^{CDEb}	4,25±0,27 ^{DEb}	115,22±2,82 ^{Da}	117,41±1,01 ^{Ga}	115.22±4.72 ^{Fa}
2A	69,1±7,1 ^{BCa}	4,32±0,37 ^{Ac}	-	-	40,51±2,10 ^{ABb}	31,24±1,34 ^{Bb}	28.34±1.14 ^{Bb}
2B	70,37±2,83 ^{BCa}	22,58±3,12 ^{Ac}	14,38±2,15 ^{Fcd}	5,07±0,32 ^{Ed}	65,66±1,16 ^{BCab}	63,9±0,36 ^{Dab}	58.65±0.85 ^{Db}
2C	103,85±8,57 ^{Da}	95,03±2,69 ^{Ca}	40,72±1,4 ^{Gb}	6,5±0,29 ^{Fc}	105,33±1,57 ^{Da}	107±1,31 ^{Ha}	96.74±1.26 ^{Ea}
2D	95,02±1,4 ^{CDa}	12,75±0,9 ^{Ab}	8,95±0,25 ^{Eb}	2,66±0,21 ^{BCc}	91,11±0,51 ^{Da}	89,97±0,44 ^{Ea}	90±2,55 ^{Ea}
3A	28,88±3,12 ^{Aab}	7,21±0,20 ^{Ab}	4,63±0,43 ^{BCDEb}	3,33±0,35 ^{CDb}	36,98±11,78 ^{ABa}	29,56±3,36 ^{ABab}	22.13±2.27 ^{Bab}
3B	74,21±5,21 ^{BCDa}	1,43±0,19 ^{Ad}	1,05±0,11 ^{ABd}	-	36,14±1,94 ^{Ab}	22,03±0,43 ^{Ac}	11.32±0.52 ^{Acd}
3C	102,39±3,18 ^{Da}	7,00±0,55 ^{Ab}	3,63±0,49 ^{ABCDb}	-	100,93±1,73 ^{Da}	98,85±0,95 ^{Fa}	97.75±1.76 ^{Ea}
3D	97,80±3,20 ^{CDa}	64,83±5,13 ^{Bb}	2,46±0,15 ^{ABCc}	1,32±0,41 ^{ABc}	101,67±0,63 ^{CDa}	98,86±0,74 ^{Fa}	98.51±1.49 ^{Ea}

* Her bir sütunda, aynı büyük harf/harflerle gösterilen değerler arasında Duncan testi sonuçlarına göre istatiksel olarak önemli bir fark yoktur ($P > 0,05$).
* Her bir satırda, aynı küçük harf/harflerle gösterilen değerler arasında Duncan testi sonuçlarına göre istatiksel olarak önemli bir fark yoktur ($P > 0,05$).
*Örnek kodlarında 1,2 ve 3 hardal konsantrasyonunu (%, w/v) belirtmektedir. A: koruyucu yok, starter kültür yok; B: koruyucu yok, starter kültür var; C: koruyucu var, starter kültür yok; D: koruyucu var, starter kültür var

Buzdolabı sıcaklığında depolanan Hardaliyeler incelendiğinde, kimyasal koruyucu kullanılan örneklerdeki glukoz miktarında istatiksel olarak önemli bir azalma gözlenmezken ($P > 0,05$), kimyasal koruyucu kullanılmayan örneklerdeki glukoz miktarı istatiksel olarak önemli derecede azalmıştır.

Hardaliye örneklerinin depolanması süresince, fruktoz ve glukoz miktarlarındaki değişimlerin örneklerdeki toplam küf/maya sayısına paralel olarak seyrettiği gözlenmiştir. Düşük sayıda küf/maya içeren örneklerde glukoz/fruktoz miktarı çok düşük düzeyde değişim gösterirken, yüksek sayıda küf/maya içeren örneklerde glukoz/fruktoz miktarı hızlı bir şekilde düşmüştür.

Farklı hardal tohumu konsantrasyonu (% 1-3 w/v) ve starter kültür kullanımının oda sıcaklığı ve buzdolabı sıcaklığında depolanan Hardaliye örneklerinde glukoz ve fruktoz miktarlarındaki değişim üzerine direkt bir etkisi tespit edilememiştir.

4.3.4. Depolama süresince Hardaliye örneklerinde suda çözünür kuru madde miktarlarındaki değişimler

Hardaliye örneklerinde depolama süresince çözünür kuru madde içeriğindeki değişim Çizelge 4.19'da verilmiştir. Üzümde çözünür kuru madde içeriğinin çok büyük bir bölümünü fruktoz ve glukoz oluşturmaktadır (Soleas vd., 1997). Bu çerçevede depolama süresince Hardaliye örneklerinde suda çözünür kuru madde miktarındaki değişim glukoz ve fruktoz miktarlarındaki değişime paralel olarak gerçekleşmiştir.

Depolamanın başlangıcında Hardaliye örneklerindeki suda çözünür kuru madde miktarı kimyasal koruyucu kullanılmayan örneklerde 17-21 ºBriks arasında değişirken, kimyasal koruyucu kullanılan örneklerde 21-24 ºBriks arasında bulunmuştur. Oda sıcaklığında depolama süresince tüm örneklerde suda çözünür kuru madde miktarı istatiksel olarak önemli derecede azalmıştır. Genel olarak kimyasal koruyucu kullanılan örneklerde oda sıcaklığında depolama sonucunda suda çözünür kuru madde miktarı kimyasal koruyucu kullanılmayan örneklere kıyasla daha fazla bulunmuştur.

Çizelge 4.18. Farklı sıcaklıklarda depolanan Hardaliye örneklerindeki glukoz miktarları

ÖRNEK NO	ODA SICAKLIĞI				BUZDOLABI SICAKLIĞI		
	0.Gün	15. Gün	30. Gün	60. Gün	15. Gün	30. Gün	60. Gün
1A	81.73±7.33 ^{BCa}	23.19±2.41 ^{Ad}	13.21±1.40 ^{ABd}	11.31±1.12 ^{Ad}	63.80±1.75 ^{Cb}	52.62±0.52 ^{Bbc}	44.82±0.61 ^{Bc}
1B	71.94±4.27 ^{ABa}	12.12±0.31 ^{Ac}	11.36±0.28 ^{Ac}	10.41±0.54 ^{Ac}	33.10±1.50 ^{Bb}	19.05±0.45 ^{Ac}	15.32±1.12 ^{Ac}
1C	104.35±4.15 ^{CDEab}	100.78±4.28 ^{DEab}	91.61±2.01 ^{Eb}	71.50±1.75 ^{Fc}	117.37±4.77 ^{Ea}	116.11±0.3 ^{Da}	114.67±2.07 ^{Da}
1D	105.83±5.63 ^{DEa}	113.53±2.33 ^{DEa}	81.5±1.22 ^{Db}	54.91±1.29 ^{DEc}	114.69±0.72 ^{Ea}	116.8±0.40 ^{Da}	115.32±1.42 ^{Da}
2A	57.84±4.56 ^{Aa}	16.51±2.19 ^{Abc}	10.45±0.80 ^{Ac}	10.75±0.77 ^{Ac}	27.23±0.92 ^{ABb}	20.92±1.02 ^{Abc}	18.93±0.53 ^{ABbc}
2B	81.28±7.08 ^{ABCa}	77.56±2.96 ^{Ca}	65.56±3.35 ^{Ca}	26.86±7.65 ^{BCb}	84.29±1.19 ^{Da}	78.12±0.48 ^{Ca}	74,00±1.90 ^{Ca}
2C	118.39±2.19 ^{Ea}	117.12±7.22 ^{DEa}	103.51±1.21 ^{Fa}	74.92±2.82 ^{Fb}	115.64±2.24 ^{Ea}	112.90±5.76 ^{Da}	112.69±6.31 ^{Da}
2D	115.35±2.95 ^{Ea}	74.83±4.63 ^{Cb}	60.46±0.86 ^{Cbc}	41.58±1.22 ^{CDc}	113.10±2.91 ^{Ea}	113.73±4.28a	107.30±8.71 ^{Da}
3A	83.87±1.27 ^{BCDa}	45.12±1.62 ^{Bc}	21.1±0.70 ^{Bd}	14.23±0.43 ^{ABe}	65.21±0.91 ^{Cb}	43.98±0.63 ^{Bc}	21.48±1.18 ^{ABd}
3B	70.57±1.74 ^{ABa}	11.28±0.92 ^{Abc}	6.92±0.48 ^{Ac}	6.73±0.63 ^{Ac}	17.59±1.41 ^{Ab}	12.35±1.65 ^{Abc}	9.37±0.63 ^{Ac}
3C	111.23±1.18 ^{Ea}	96.26±1.06 ^{Db}	80.31±0.91 ^{Dc}	76.11±1.91 ^{Fc}	118.12±1.32 ^{Ea}	114.51±2.01 ^{Da}	110.98±0.02 ^{Da}
3D	111.78±2.03 ^{Ea}	102.96±2.06 ^{DEa}	94.25±1.65 ^{Eab}	62.49±2.29 ^{EFb}	117.54±4.34 ^{Ea}	119.63±9.43 ^{Da}	112.53±11.63 ^{Da}

* Her bir sütunda, aynı büyük harf/harflerle gösterilen değerler arasında Duncan testi sonuçlarına göre istatiksel olarak önemli bir fark yoktur ($P > 0,05$).
* Her bir satırda, aynı küçük harf/harflerle gösterilen değerler arasında Duncan testi sonuçlarına göre istatiksel olarak önemli bir fark yoktur ($P > 0,05$).
*Örnek kodlarında 1,2 ve 3 hardal konsantrasyonunu (%, w/v) belirtmektedir. A: koruyucu yok, starter kültür yok; B: koruyucu yok, starter kültür var; C: koruyucu var, starter kültür yok; D: koruyucu var, starter kültür var

Çizelge 4.19. Farklı sıcaklıklarda depolanan Hardaliye örneklerindeki suda çözünür kuru madde miktarları (ºBriks)

ÖRNEK NO	ODA SICAKLIĞI				BUZDOLABI SICAKLIĞI		
	0.Gün	15. Gün	30. Gün	60. Gün	15. Gün	30. Gün	60. Gün
1A	20,14±0,16 ^{Ea}	10,60±0,16 ^{Fc}	10,35±0,04 ^{Ecd}	9,87±0,07 ^{Gd}	16,13±0,13 ^{Eb}	16,04±0,09 ^{Db}	15,94±0,04 ^{Eb}
1B	18,10±0,05 ^{Ga}	9,92±0,07 ^{FGe}	9,63±0,07 ^{EFe}	9,09±0,07 ^{Hf}	13,29±0,09 ^{Fb}	12,54±0,29 ^{Ec}	11,87±0,42 ^{Fc}
1C	23,51±0,04 ^{ABa}	22,05±0,25 ^{Ab}	16,52±0,37 ^{Bc}	14,06±0,16 ^{Cd}	23,59±0,14 ^{Aa}	23,62±0,18 ^{Aa}	23,20±0,36 ^{Aa}
1D	23,81±0,15 ^{Aa}	20,51±0,11 ^{Bb}	15,06±0,16 ^{Cc}	11,79±0,09 ^{Ed}	23,87±0,37 ^{Aa}	23,93±0,07 ^{Aa}	23,37±0,07 ^{Aa}
2A	17,32±0,07 ^{Ha}	9,68±0,18 ^{Gd}	9,66±0,04 ^{EFd}	9,24±0,09 ^{Hd}	13,07±0,12 ^{Fb}	12,82±0,07 ^{Eb}	11,66±0,09 ^{Fc}
2B	21,02±0,14 ^{Da}	17,01±0,11 ^{Cd}	16,79±0,07 ^{Bd}	14,88±0,08 ^{Be}	18,82±0,06 ^{Db}	18,36±0,06 ^{Cb}	17,84±0,06 ^{Dc}
2C	23,18±0,07 ^{ABa}	21,74±0,06 ^{Ab}	19,23±0,42 ^{Cc}	16,17±0,16 ^{Ad}	23,37±0,17 ^{Aa}	23,45±0,25 ^{Aa}	22,96±0,09 ^{Aa}
2D	21,66±0,15 ^{Da}	12,72±0,17 ^{Ed}	11,69±0,09 ^{De}	11,75±0,11 ^{EFe}	19,81±0,09 ^{Cb}	18,87±0,12 ^{Cc}	18,24±0,19 ^{Dc}
3A	17,19±0,16 ^{Ha}	12,15±0,20 ^{Ec}	11,65±0,11 ^{Dcd}	11,16±0,06 ^{Fd}	13,54±0,09 ^{Fb}	13,18±0,07 ^{Eb}	12,26±0,09 ^{Fc}
3B	19,30±0,15 ^{Fa}	9,27±0,12 ^{Gc}	8,84±0,09 ^{Fc}	8,84±0,11 ^{Hc}	11,48±0,18 ^{Gb}	10,02±0,52 ^{Fc}	8,81±0,09 ^{Gc}
3C	22,49±0,16 ^{Ca}	14,98±0,13 ^{Dd}	14,55±0,11 ^{Cd}	14,24±0,11 ^{Cd}	20,36±0,11 ^{Cb}	19,25±0,11 ^{Cc}	19,49±0,26 ^{Cc}
3D	23,05±0,18 ^{BCa}	20,09±0,06 ^{Bc}	14,84±0,14 ^{Cd}	13,29±0,11 ^{De}	22,11±0,11 ^{Bb}	21,98±0,13 ^{Bb}	21,77±0,09 ^{Bb}

* Her bir sütunda, aynı büyük harf/harflerle gösterilen değerler arasında Duncan testi sonuçlarına göre istatiksel olarak önemli bir fark yoktur ($P > 0,05$).
* Her bir satırda, aynı küçük harf/harflerle gösterilen değerler arasında Duncan testi sonuçlarına göre istatiksel olarak önemli bir fark yoktur ($P > 0,05$).
*Örnek kodlarında 1,2 ve 3 hardal konsantrasyonunu (%, w/v) belirtmektedir. A: koruyucu yok, starter kültür yok; B: koruyucu yok, starter kültür var; C: koruyucu var, starter kültür yok; D: koruyucu var, starter kültür var

Buzdolabı sıcaklığında depolama süresince kimyasal koruyucu kullanılmayan örneklerin tümünde suda çözünür kuru madde miktarı istatiksel olarak önemli miktarda (3-10 ºBriks azalma) azalmıştır. Kimyasal koruyucu kullanılan 1C, 1D ve 2C örneklerinde suda çözünür kuru madde miktarındaki azalma istatiksel olarak önemsiz bulunurken, 2D, 3C ve 3D örneklerinde en fazla 3 ºBriks kadar bir azalma gözlenmiştir.

Aşkın ve Atik (2016), % 1 hardal tohumu ve % 0,1 benzoat-sorbat kullanarak ürettikleri Hardaliyelerde 4 ºC ve 20 ºC'de 2 ay süresince depolama sonucunda, suda çözünür kuru madde içeriğinde önemli bir miktarda değişim (0,4 ºBriks) olmadığını bildirmişlerdir. Ancak tez çalışması kapsamında özellikle oda sıcaklığında depolanan örneklerde 2 ay depolama süresince suda çözünür kuru madde miktarı 7 – 10 ºBriks arasında azalmıştır. Hardaliye örneklerinde suda çözünür kuru madde miktarını etkileyen en önemli faktör örneklerdeki maya miktarıdır. Hardaliye üretiminde maya gelişimini engellemek için en çok kullanılan yöntem kimyasal koruyucu kullanımıdır (Aydoğdu vd., 2014). Tez çalışması kapsamında sırasıyla 250 ppm ve 150 ppm olacak şekilde potasyum sorbat ve sodyum benzoat kullanılırken, Aşkın ve Atik (2016) tarafından 1000 ppm potasyum sorbat ve sodyum benzoat kullanılmıştır. Bu nedenle Hardaliye örneklerinde maya gelişimi daha az miktarda olduğundan suda çözünür kuru madde miktarında depolama süresince bir değişim gözlenmemiştir.

4.3.5. Depolama süresince Hardaliye örneklerinde alkol miktarlarındaki değişimler

Hardaliye örneklerinde depolama süresince alkol miktarlarındaki değişim Çizelge 4.20'de verilmiştir. Depolamanın başlangıcında kimyasal koruyucu kullanılmadan üretilen Hardaliyelerde alkol oranı % 2 – 6,5 arasında değişirken, kimyasal koruyucu kullanılarak üretilen örneklerde alkol (2D örneği hariç) tespit edilememiştir. Oda sıcaklığında depolanan tüm örneklerde alkol miktarı depolamanın 15. gününden itibaren artış göstermiştir. Kimyasal koruyucu kullanılan Hardaliyelerde oda sıcaklığında depolama sonunda tespit edilen alkol miktarı % 6 – 9 (v/v) arasında değişirken, kimyasal koruyucu kullanılmayan örneklerde % 11 – 13 (v/v) arasında bulunmuştur.

Çizelge 4.20. Farklı sıcaklıklarda depolanan Hardaliye örneklerindeki alkol miktarları (%, v/v)

ÖRNEK NO	ODA SICAKLIĞI				BUZDOLABI SICAKLIĞI		
	0.Gün	15. Gün	30. Gün	60. Gün	15. Gün	30. Gün	60. Gün
1A	3,70±0,25 ^{Ca}	12,5±0,39 ^{Ad}	12,85±0,29 ^{Ed}	13,11±0,15 ^{Cd}	6,71±0,45 ^{Cb}	7,67±0,22 ^{Cbc}	8,98±0,26 ^{Cc}
1B	5,11±0,12 ^{Da}	12,23±0,58 ^{Acd}	13,14±0,46 ^{Ed}	13,24±0,25 ^{Cd}	9,56±0,32 ^{DEb}	10,17±0,42 ^{Db}	10,40±0,26 ^{Dbc}
1C	-	0,49±0,1 ^{Da}	6,50±0,24 ^{Bb}	8,39±0,16 ^{ABc}	-	-	-
1D	-	2,35±0,21 ^{Db}	7,74±0,19 ^{Bc}	8,28±0,18 ^{ABc}	-	-	-
2A	6,44±0,15 ^{Ea}	12,46±0,59 ^{Acd}	12,82±0,47 ^{Ecd}	13,14±0,19 ^{Cd}	10±0,55 ^{DEb}	10,06±0,23 ^{Db}	11,18±0,24 ^{Dbc}
2B	2,31±0,13 ^{Ba}	9,39±0,23 ^{Bc}	9,91±0,43 ^{Ccd}	11,34±0,41 ^{Cd}	4,56±0,22 ^{Bb}	4,62±0,17 ^{Bb}	5,29±0,27 ^{Bb}
2C	-	0,32±0,13 ^{Da}	3,83±0,16 ^{Ab}	6,55±0,12 ^{Ac}	-	-	-
2D	0,56±0,14 ^{Aa}	5,78±0,43 ^{Cb}	6,57±0,13 ^{Bb}	8,28±0,18 ^{ABc}	0,41±0,15 ^{Aa}	0,63±0,14 ^{Aa}	0,72±0,13 ^{Aa}
3A	5,70±0,27 ^{DEa}	9,82±0,72 ^{ABbc}	10,52±0,31 ^{CDbc}	11,61±0,34 ^{Cc}	8,67±0,56 ^{Db}	9,22±0,11 ^{Db}	10,25±0,27 ^{Dbc}
3B	3,43±0,22 ^{Ca}	11,92±0,94 ^{ABb}	12,32±0,57 ^{DEb}	13,24±0,30 ^{Cb}	10,32±0,57 ^{Eb}	11,93±0,55 ^{Eb}	12,63±0,22 ^{Eb}
3C	-	6,33±0,44 ^{Cb}	6,83±0,38 ^{Bbc}	8,77±0,91 ^{Bc}	-	-	-
3D	-	1,25±0,17 ^{Db}	5,98±0,14 ^{Bc}	7,36±0,15 ^{ABd}	-	-	-

[*] Her bir sütunda, aynı büyük harf/harflerle gösterilen değerler arasında Duncan testi sonuçlarına göre istatiksel olarak önemli bir fark yoktur ($P > 0,05$).
[*] Her bir satırda, aynı küçük harf/harflerle gösterilen değerler arasında Duncan testi sonuçlarına göre istatiksel olarak önemli bir fark yoktur ($P > 0,05$).
[*]Örnek kodlarında 1,2 ve 3 hardal konsantrasyonunu (%, w/v) belirtmektedir. A: koruyucu yok, starter kültür yok; B: koruyucu yok, starter kültür var; C: koruyucu var, starter kültür yok; D: koruyucu var, starter kültür var

Buzdolabı sıcaklığında iki ay depolama sonunda kimyasal koruyucu kullanılarak üretilen Hardaliyelerde (2D hariç) alkol oluşumu tespit edilmemiştir. Kimyasal koruyucu kullanılmayan örneklerde tespit edilen ise alkol miktarı % 5 – 12 arasında değişim göstermiştir.

Oda sıcaklığında ve buzdolabı sıcaklığında depolama süresince, örneklerdeki hardal konsantrasyonundaki artışın ve starter kültür kullanımının alkol oluşumu üzerine direkt bir etkisi tespit edilememiştir.

Türk Gıda Kodeksi Alkolsüz İçecekler Tebliği'ne göre bu içeceklerde üretimin doğasından kaynaklanabilecek etil alkol miktarı en çok 3,0 g/L (yaklaşık % 0,4 v/v) olarak belirlenmiştir.

Bu çerçevede 2 ay süresince depolanan örnekler içerisinde sadece kimyasal koruyucu kullanılarak üretilen ve buzdolabı sıcaklığında depolanan Hardaliye örnekleri (2D hariç) Türk Gıda Kodeksi Alkolsüz İçecekler Tebliği'ne alkol içerikleri bakımından uygun bulunmuştur.

4.3.6. Depolama süresince Hardaliye örneklerinde pH ve titrasyon asitliğindeki değişimler

Hardaliye örneklerinde depolama süresince toplam asitlik miktarındaki değişimler Çizelge 4.21'de verilmiştir. Depolamanın başlangıcında örneklerin toplam asitlik miktarları arasında istatiksel olarak önemli bir fark bulunmamıştır. Oda sıcaklığında depolama süresince toplam asitlik miktarı Hardaliye örneklerinin birçoğunda (1A, 1C, 2A, 2B, 2C, 2D, 3B ve 3D) depolamanın 30. gününe kadar artış göstermiş, daha sonra azalmıştır. Oda sıcaklığında iki ay depolama sonunda, toplam asitlik değerleri depolama başlangıcı ile aynı seviyelere kadar gerilemiştir. Depolama başlangıcı ile kıyaslandığında oda sıcaklığında 2 ay depolanan örneklerin toplam asitlik miktarında istatiksel olarak önemli bir değişim bulunmamıştır ($P > 0,05$). Buzdolabı sıcaklığında depolanan Hardaliye örneklerinde ise iki ay depolama sonunda toplam asitlik miktarı (1A hariç) başlangıç miktarına göre azalma göstermiştir.

Üzüm suyunda temel olarak tartarik, malik ve sitrik asit bulunmaktadır. Fermentasyon sırasında süksinik, laktik, asetik asit, az miktarda glukuronik ve galakturonik vb. asitler de oluşmaktadır (Denli, 1999).

Üzüm fermentasyonunda laktik asit bakterileri tarafından gerçekleştirilen malolaktik fermentasyon sonucunda L-malik asitin L-laktik asite dekarboksilasyonu sonucunda ortamdaki asitlik azalmakta ve pH 0,3 ile 0,5 birim arasında artış göstermektedir (Wood, 2012).

Hardaliye örneklerinin oda ve buzdolabı sıcaklığında iki ay depolanması sonucunda örneklerin pH değerleri başlangıç miktarına göre genel olarak artış göstermiştir (Çizelge 4.22). Ancak bu artış toplam asitlik miktarındaki azalmaya göre daha düşük seviyede gerçekleşmiştir. Titre edilebilir asitlik ve pH üzüm suyu ve şarap kalitesi açısından önemli bir kalite kriteridir. Genel olarak pH'daki küçük bir değişim titre edilebilir asitlikte çok daha büyük bir değişimi yansıtmaktadır (De La Maturation ve Surlacde, 2006).

Çizelge 4.21. Farklı sıcaklıklarda depolanan Hardaliye örneklerinin toplam asitlik değerleri (g tartarik asit/L)

ÖRNEK	ODA SICAKLIĞI				BUZDOLABI SICAKLIĞI		
NO	0.Gün	15. Gün	30. Gün	60. Gün	15. Gün	30. Gün	60. Gün
1A	10,22±0,32 ^{Aa}	10,82±0,32 ^{Dab}	13,13±0,97 ^{Db}	8,51±0,26 ^{BCa}	9,64±0,11 ^{CDa}	9,79±0,15 ^{Ca}	11,11±0,56 ^{Eab}
1B	9,74±0,21 ^{Aab}	9,91±0,35 ^{BCDb}	9,54±0,39 ^{ABCab}	8,45±0,39 ^{BCab}	7,92±0,53 ^{ABCa}	10,29±0,26 ^{Cb}	9,20±0,16 ^{DEab}
1C	8,77±0,37 ^{Ab}	9,38±0,19 ^{ABCDb}	11,05±0,39 ^{CDc}	8,71±0,2 ^{Cb}	8,43±0,25 ^{CDab}	8,43±0,33 ^{BCab}	7,01±0,22 ^{BCa}
1D	9,50±0,29 ^{Aa}	8,13±0,33 ^{ABCab}	8,04±0,39 ^{ABabc}	8,3±0,18 ^{ABCa}	6,15±0,49 ^{ABbcd}	6,02±0,47 ^{Acd}	4,84±0,38 ^{Ad}
2A	9,54±0,35 ^{Aab}	9,17±0,17 ^{ABCDab}	10,44±0,43 ^{ABCDa}	8,06±0,26 ^{ABCbc}	8,35±0,21 ^{BCDbc}	8,67±0,31 ^{Cbc}	7,38±0,16 ^{BCDc}
2B	9,58±0,28 ^{Aa}	8,62±0,33 ^{ABCDab}	9,74±0,25 ^{ABCa}	9,04±0,19 ^{Cab}	8,92±0,19 ^{CDab}	9,22±0,22 ^{Cb}	8,01±0,18 ^{BCDab}
2C	8,84±0,38 ^{Aab}	9,83±0,27 ^{BCDab}	11,06±0,31 ^{CDb}	8,88±0,39 ^{Cab}	5,9±0,42 ^{Aab}	6,14±0,59 ^{ABab}	4,72±0,52 ^{Aa}
2D	9,53±0,41 ^{Aab}	10,1±0,22 ^{CDab}	10,93±0,48 ^{BCDb}	9,52±0,23 ^{Cab}	10,42±0,31 ^{Dab}	10,13±0,57 ^{Cab}	8,59±0,31 ^{BCDa}
3A	8,73±0,22 ^{Ac}	7,27±0,56 ^{Aabc}	7,69±0,23 ^{Aabc}	6,64±0,15 ^{Aab}	8,1±0,34 ^{ABCbc}	8,34±0,24 ^{ABCbc}	6,11±0,22 ^{ABa}
3B	7,98±0,25 ^{Ab}	7,56±0,43 ^{ABb}	9,47±0,25 ^{ABCc}	6,98±0,15 ^{ABab}	7,71±0,25 ^{ABCb}	9,77±0,22 ^{Cc}	6,05±0,16 ^{ABa}
3C	9,96±0,51 ^{Aa}	8,79±0,46 ^{ABCDa}	9,41±0,07 ^{ABCa}	8,02±0,17 ^{ABCa}	9,54±0,31 ^{CDa}	8,79±0,15 ^{Ca}	7,64±0,12 ^{BCDa}
3D	9,81±0,25 ^{Aa}	10,39±0,26 ^{CDa}	11,00±0,18 ^{CDa}	9,3±0,19 ^{Ca}	9,26±0,19 ^{CDa}	9,75±0,11 ^{Ca}	8,96±0,28 ^{CDa}

* Her bir sütunda, aynı büyük harf/harflerle gösterilen değerler arasında Duncan testi sonuçlarına göre istatiksel olarak önemli bir fark yoktur ($P > 0,05$).
* Her bir satırda, aynı küçük harf/harflerle gösterilen değerler arasında Duncan testi sonuçlarına göre istatiksel olarak önemli bir fark yoktur ($P > 0,05$).
*Örnek kodlarında 1,2 ve 3 hardal konsantrasyonunu (%, w/v) belirtmektedir. A: koruyucu yok, starter kültür yok; B: koruyucu yok, starter kültür var; C: koruyucu var, starter kültür yok; D: koruyucu var, starter kültür var

Çizelge 4.22. Farklı sıcaklıklarda depolanan Hardaliye örneklerinin pH değerleri

ÖRNEK	ODA SICAKLIĞI				BUZDOLABI SICAKLIĞI		
NO	0.Gün	15. Gün	30. Gün	60. Gün	15. Gün	30. Gün	60. Gün
1A	3,47±0,03 ^{Aa}	3,64±0,03 ^{CDbc}	3,66±0,03 ^{BCc}	3,54±0,03 ^{Aab}	3,55±0,01 ^{Aabc}	3,62±0,02 ^{BCbc}	3,59±0,01 ^{ABbc}
1B	3,53±0,04 ^{Aab}	3,61±0,02 ^{Cc}	3,64±0,01 ^{BCc}	3,63±0,04 ^{ABCc}	3,50±0,02 ^{Aa}	3,59±0,02 ^{ABbc}	3,61±0,02 ^{ABc}
1C	3,46±0,04 ^{Aa}	3,51±0,01 ^{Aa}	3,48±0,04 ^{Aab}	3,53±0,02 ^{Ab}	3,52±0,02 ^{Aa}	3,52±0,03 ^{Aa}	3,53±0,02 ^{Aa}
1D	3,56±0,05 ^{Abc}	3,51±0,02 ^{Bab}	3,59±0,02 ^{ABc}	3,49±0,05 ^{Aa}	3,59±0,01 ^{ABc}	3,62±0,01 ^{BCc}	3,72±0,01 ^{Dd}
2A	3,56±0,04 ^{ABa}	3,63±0,02 ^{CDab}	3,67±0,02 ^{BCb}	3,74±0,03 ^{Cc}	3,57±0,00 ^{Aa}	3,62±0,03 ^{BCab}	3,65±0,01 ^{ABb}
2B	3,51±0,02 ^{Aa}	3,61±0,04 ^{Ccd}	3,58±0,01 ^{ABbc}	3,65±0,01 ^{BCd}	3,54±0,01 ^{Aab}	3,62±0,01 ^{BCcd}	3,58±0,01 ^{ABbc}
2C	3,78±0,02 ^{Ea}	3,41±0,01 ^{Ae}	3,49±0,01 ^{Ad}	3,59±0,02 ^{Ac}	3,72±0,01 ^{Cab}	3,71±0,03 ^{Dab}	3,67±0,02 ^{CDb}
2D	3,50±0,03 ^{Aa}	3,59±0,01 ^{Cbc}	3,62±0,04 ^{BCc}	3,57±0,03 ^{ABabc}	3,53±0,02 ^{Aab}	3,59±0,02 ^{ABbc}	3,54±0,01 ^{Aab}
3A	3,67±0,05 ^{Dab}	3,59±0,02 ^{Ca}	3,73±0,02 ^{Cb}	3,73±0,01 ^{Cb}	3,70±0,01 ^{Cb}	3,71±0,01 ^{CDb}	3,67±0,02 ^{CDab}
3B	3,55±0,02 ^{ABa}	3,69±0,02 ^{Db}	3,72±0,01 ^{Cb}	3,74±0,02 ^{Cb}	3,66±0,01 ^{BCb}	3,73±0,02 ^{Db}	3,72±0,01 ^{Db}
3C	3,60±0,01 ^{Ca}	3,54±0,04 ^{BCa}	3,57±0,02 ^{ABa}	3,61±0,02 ^{ABCa}	3,51±0,03 ^{Aa}	3,56±0,01 ^{ABa}	3,58±0,01 ^{ABa}
3D	3,52±0,03 ^{Aa}	3,58±0,02 ^{Cab}	3,58±0,02 ^{ABab}	3,66±0,02 ^{BCb}	3,55±0,01 ^{Aa}	3,53±0,02 ^{Aa}	3,56±0,02 ^{Aa}

[*] Her bir sütunda, aynı büyük harf/harflerle gösterilen değerler arasında Duncan testi sonuçlarına göre istatiksel olarak önemli bir fark yoktur ($P > 0,05$).
[*] Her bir satırda, aynı küçük harf/harflerle gösterilen değerler arasında Duncan testi sonuçlarına göre istatiksel olarak önemli bir fark yoktur ($P > 0,05$).
[*]Örnek kodlarında 1,2 ve 3 hardal konsantrasyonunu (%, w/v) belirtmektedir. A: koruyucu yok, starter kültür yok; B: koruyucu yok, starter kültür var; C: koruyucu var, starter kültür yok; D: koruyucu var, starter kültür var

4.4. Duyusal analiz

Tez çalışması kapsamında fermantasyon bitiminde, oda sıcaklığında ve soğukta iki ay depolama sonunda duyusal analiz testleri aynı panelistler tarafından gerçekleştirilmiştir. Fermantasyon sonunda gerçekleştirilen duyusal analiz testi sonuçları incelendiğinde, hardal tohumu ve starter kültür kullanımının genel olarak sonuçlar üzerine doğrudan bir etkisi olmadığı görülmüştür (Çizelge 4.23) Fermantasyon sonunda toplam kabul edilebilirlik, tat ve asitlik değerleri incelendiğinde, özellikle kimyasal kouruyucu kullanılmadan üretilen ve fermantasyon sonunda alkol oranı % 5 v/v üzerinde bulunan (1B, 2A, 3A) Hardaliye örneklerinin en düşük skoru aldığı görülmektedir. Renk sonuçları incelendiğinde, aralarında istatiksel olarak önemli bir fark olmamasına rağmen kullanılan hardal konsantrasyonu arttıkça ürünün renk beğenisinin azaldığı görülmektedir. Fermantasyon sonunda duyusal analiz testi sonuçlarına göre özellikle kimyasal koruyucu kullanımının Hardaliyenin duyusal kalitesinin sağlanması açısından önemli olduğu ve hardal konsantrasyonunun artışı ile ürün renginde beğeninin azaldığı görülmektedir.

Üzümlerin kırmızı rengi, bileşiminde bulunan antosiyaninlerden kaynaklanmakta olup, üzüm çeşitleri arasında antosiyanin miktarı büyük farklılıklar gösterebilmektedir. Antosiyaninler, oksidasyona duyarlı olup, proses ve depolama esnasında gerçekleşen oksidasyon reaksiyonları sonucunda kahverengi bileşikler oluştururlar (Süzme et al., 2014). Ayrıca antosiyaninlerin tannenlerle polimerizasyonu sonucunda da renkte bozulma görülebilir. Rengin bozulmasında bir diğer önemli faktör ise depolama sıcaklığı ve süresidir (Acar ve Gökmen, 2005).

Buzdolabı ve oda sıcaklığında iki ay depolama sonunda Hardaliye örnekleriyle gerçekleştirilen duyusal analiz testlerinin sonuçları sırasıyla Çizelge 4.24 ve Çizelge 4.25'de verilmiştir. Oda sıcaklığında depolama sonucunda özellikle koku, tat ve toplam kabul edilebilirlik açısından Hardaliye örneklerindeki beğeni fermantasyon sonunda elde edilen taze Hardaliye örneklerine göre düşüş göstermiştir. Duyusal analiz sonuçlarında beğeninin azalmasının en önemli sebebi örneklerde maya fermantasyonu sonucu yüksek miktarda alkol oluşumudur. Bu örneklerde fermantasyon sonunda alkol oranları % 6 – 13 (v/v) arasında değişmektedir.

Çizelge 4.23. Fermentasyon sonunda Hardaliye örneklerinin duyusal değerlendirme sonuçları

Duyusal Analiz	Örnek No											
	1A	**1B**	**1C**	**1D**	**2A**	**2B**	**2C**	**2D**	**3A**	**3B**	**3C**	**3D**
Koku	4±0,7^{abc}	4±0,8 ^{abc}	3,4±1,1^{abc}	3,9±1^{abc}	4,1±0,7^{abc}	4,5±0,5^{c}	3,1±0,9^{a}	4,4±0,5^{bc}	3,8±0,6^{abc}	3,7±0,8^{abc}	3,3±0,8^{ab}	3,8±0,6^{abc}
Renk	4,6±0,7^{c}	4,3±0,8 ^{bc}	4,1±0,6^{abc}	4,2±0,4^{abc}	4,2±0,8^{abc}	4,4±0,7^{bc}	3,1±1,1^{a}	4,2±0,8^{abc}	3,7±0,7^{abc}	3,6±1^{abc}	3,4±1,1^{ab}	3,7±0,7^{abc}
Tat	7,7±1,1^{cd}	6±1,6 ^{abcd}	7,4±1,4^{bcd}	7,8±1^{d}	5±2,4^{ab}	7,6±1,2^{cd}	6,3±1,8^{abcd}	6,9±1,7^{abcd}	4,5±2,1^{a}	5,3±2,2^{abc}	7±1,1^{bcd}	7,4±1,4^{bcd}
Asitlik	3,7±1,3^{ab}	3,2±0,8 ^{ab}	4,2±0,9	3,9±1^{b}	2,9±1,2^{ab}	4,1±0,9^{b}	3,5±1,4^{ab}	3,3±1,2^{ab}	2,3±0,9^{a}	3,4±0,8^{ab}	3,7±1,3^{ab}	4±0,8^{b}
Toplam Kabul Edilebilirlik	7,8±1,1^{b}	6,4±1,3 ^{ab}	7,9±1,3^{b}	8±1,1^{b}	5,7±2,4^{ab}	7,8±1,1^{b}	6,6±2^{ab}	7,1±1,9^{ab}	5,1±2^{a}	6,3±1,9^{ab}	7,2±1,2^{ab}	7,7±1,4^{b}

*Koku 1-5, Renk 1-5, Tat 1-10, Asitlik 1-5, Toplam Kabul Edilebilirlik 1-10 arası puanlanmıştır.
* Her bir satırda, aynı küçük harf/harflerle gösterilen değerler arasında Duncan testi sonuçlarına göre istatiksel olarak önemli bir fark yoktur ($P > 0,05$).
*Örnek kodlarında 1,2 ve 3 hardal konsantrasyonunu (%, w/v) belirtmektedir. A: koruyucu yok, starter kültür yok; B: koruyucu yok, starter kültür var; C: koruyucu var, starter kültür yok; D: koruyucu var, starter kültür var

Çizelge 4.24. Buzdolabı sıcaklığında iki ay depolama sonunda Hardaliye örneklerinin duyusal değerlendirme sonuçları

Duyusal Analiz	Örnek No											
	1A	**1B**	**1C**	**1D**	**2A**	**2B**	**2C**	**2D**	**3A**	**3B**	**3C**	**3D**
Koku	3,4±1 ^{a}	4±1,2 ^{a}	3,2±1,5 ^{a}	3,6±1,4 ^{a}	3,1±0,9 ^{a}	3,2±0,9 ^{a}	3,5±1,2 ^{a}	3,3±1,1 ^{a}	3,4±0,8 ^{a}	2,7±0,7 ^{a}	3,2±1,1 ^{a}	3,7±1,1 ^{a}
Renk	3,7±1,3 ^{ab}	4,2±0,8 ^{ab}	3,9±1,1 ^{ab}	4,3±0,9 ^{ab}	4,2±0,8 ^{ab}	3,8±0,9 ^{ab}	3±1,3 ^{a}	4,5±0,5 ^{b}	3,7±0,8 ^{ab}	3,7±0,9 ^{ab}	3,4±1 ^{ab}	3,7±1,2 ^{ab}
Tat	4,8±2,3 ^{bcd}	4,2±1,5 ^{abc}	8,1±1,3 ^{e}	7,9±1,9 ^{e}	4,2±1,8 ^{abc}	6,4±2,1 ^{cde}	8,2±1,3 ^{e}	7,7±1,8 ^{de}	3,5±1,2 ^{ab}	1,9±1,2 ^{a}	6,8±2,2 ^{de}	8,4±1,5 ^{e}
Asitlik	3,1±0,9 ^{abcd}	2,7±1,2 ^{ab}	4,3±1,1 ^{cd}	4,2±1,2 ^{bcd}	2,8±1,2 ^{abc}	3,8±0,9 ^{bcd}	4,5±0,7 ^{d}	2,7±0,7 ^{ab}	2,8±1,2 ^{abc}	2,2±1,2 ^{a}	4±0,9 ^{bcd}	4,5±0,7 ^{d}
Toplam Kabul Edilebilirlik	4,8±2,1 ^{bc}	4±1,3 ^{ab}	7,6±2,5 ^{d}	8,2±1,8 ^{d}	4,5±1,6 ^{abc}	6,5±1,6 ^{bcd}	7,7±1,3 ^{d}	7,4±1,6 ^{d}	4±1,3 ^{ab}	2,2±1,5 ^{a}	6,9±1,6 ^{cd}	8±1,6 ^{d}

*Koku 1-5, Renk 1-5, Tat 1-10, Asitlik 1-5, Toplam Kabul Edilebilirlik 1-10 arası puanlanmıştır.
* Her bir satırda, aynı küçük harf/harflerle gösterilen değerler arasında Duncan testi sonuçlarına göre istatiksel olarak önemli bir fark yoktur ($P > 0,05$).
*Örnek kodlarında 1,2 ve 3 hardal konsantrasyonunu (%, w/v) belirtmektedir. A: koruyucu yok, starter kültür yok; B: koruyucu yok, starter kültür var; C: koruyucu var, starter kültür yok; D: koruyucu var, starter kültür var

Buzdolabı sıcaklığında iki ay depolama sonucunda ise özellikle kimyasal koruyucu kullanılan C ve D kodlu Hardaliye örneklerindeki toplam kabul edilebilirlik ve tat değerleri fermantasyon sonunda elde edilen taze Hardaliye örneklerine yakın bulunmuştur. Ancak kimyasal koruyucu kullanılmayan Hardaliyelerde, alkol oluşumuna paralel olarak beğeni değerlerinde düşüş gözlenmiştir.

Duyusal analiz sonuçları genel olarak incelendiğinde, Hardaliye örneklerinde beğeniyi etkileyen en önemli faktörün alkol fermantasyonu olduğu görülmektedir. Maya fermantasyonunun engellenmesi için sadece hardal tohumu kullanımı yetersiz bulunduğundan, üründeki duyusal kalitenin korunması açısından kimyasal koruyucu kullanımının önemli olduğu tespit edilmiştir. Kullanılan hardal tohumu miktarının tat üzerine önemli bir etkisi olmazken, hardal tohumu konsantrasyonu arttıkça ürün rengine yönelik beğeni düşüş göstermiştir. Starter kültür kullanımının ise duyusal kalite üzerine direkt bir etkisi tespit edilmemiştir. Ayrıca kimyasal koruyucu kullanılmasına rağmen oda sıcaklığında depolanan ürünlerde maya fermantasyonu sonucu alkol oluşumu engellenemediğinden, Hardaliye'nin buzdolabı sıcaklığında depolanması ürünün duyusal kalitesinin korunmasını sağlamaktadır.

Çizelge 4.25. Oda sıcaklığında iki ay depolama sonunda Hardaliye örneklerinin duyusal değerlendirme sonuçları

Duyusal Analiz	Örnek No											
	1A	**1B**	**1C**	**1D**	**2A**	**2B**	**2C**	**2D**	**3A**	**3B**	**3C**	**3D**
Koku	2,4±1,1^{a}	2,9±1,2^{a}	2,8±1,1^{a}	3,5±1,1^{a}	2,8±0,9^{a}	3,3±0,7^{a}	2,8±1^{a}	2,7±0,5^{a}	3,3±0,5^{a}	2,3±0,7^{a}	2,2±0,8^{a}	2,8±0,9^{a}
Renk	4,8±0,4^{c}	4,2±0,8^{bc}	4±0,7^{bc}	3,2±0,8^{ab}	4,1±0,7^{bc}	4,1±0,6^{bc}	3,5±0,5^{ab}	4±0,8^{bc}	3,5±0,8^{ab}	3,4±1^{ab}	2,6±1,0^{a}	3,4±0,8^{ab}
Tat	3,4±1,7^{ab}	3,4±1,9^{ab}	4,2±1,6^{ab}	4,8±1,6^{b}	2,8±1,4^{ab}	4,1±1,8^{ab}	4,6±1,6^{b}	2,8±1,0^{ab}	2,9±1,5^{ab}	2,1±0,6^{a}	3,7±2,1^{ab}	4,5±1,5^{b}
Asitlik	2,4±1^{a}	2,7±0,9^{a}	2,8±0,8^{a}	4,3±0,9^{b}	2,5±0,8^{a}	2,7±0,9^{a}	2,7±0,7^{a}	2,2±1,1^{a}	1,9±1,1^{a}	2,1±1,0^{a}	3±1,2^{ab}	3,1±0,9^{ab}
Toplam Kabul Edilebilirlik	3,9±1,7^{ab}	3,7±2^{ab}	4,5±2^{b}	4,8±0,9^{b}	2,6±1^{ab}	3,3±1,8^{ab}	3,3±1,3^{ab}	2,7±1,1^{ab}	2,7±1,2^{ab}	2,2±0,9^{ab}	3,9±2,1^{ab}	4,2±1,6^{ab}

*Koku 1-5, Renk 1-5, Tat 1-10, Asitlik 1-5, Toplam Kabul Edilebilirlik 1-10 arası puanlanmıştır.

* Her bir satırda, aynı küçük harf/harflerle gösterilen değerler arasında Duncan testi sonuçlarına göre istatiksel olarak önemli bir fark yoktur (P > 0,05).

*Örnek kodlarında 1,2 ve 3 hardal konsantrasyonunu (%, w/v) belirtmektedir. A: koruyucu yok, starter kültür yok; B: koruyucu yok, starter kültür var; C: koruyucu var, starter kültür yok; D: koruyucu var, starter kültür var

BÖLÜM 5

SONUÇLAR

Hardaliye; başlıca üzüm, hardal tohumu ve vişne yaprağı kullanılarak üretilen geleneksel, alkolsüz fermente bir içecektir. Bununla beraber, günümüzde endüstriyel çapta üretime geçilmesiyle beraber Hardaliye üretimi ve depolanması sırasında alkol fermentasyonunun engellenmesi ve ürünün bozulmadan korunması için üretimde kimyasal koruyucu (benzoat/sorbat) da kullanılmaktadır. Ancak, günümüzde tüketiciler, katkı içermeyen, yüksek kaliteli, güvenli, daha uzun raf ömrüne sahip ürünleri tercih etmektedirler. Bu amaçla tez kapsamında Hardaliye üretiminde starter kültür ve yüksek derişimde hardal tohumu kullanımının kimyasal koruyuculara bir alternatif olma potansiyeli araştırılmıştır. Bu kapsamda, hardaliye üretiminde 3 farklı hardal tohumu konsantrasyonu (% 1, 2 ve 3), starter kültür (L. plantarum Lp-115) ve kimyasal koruyucu (150 ppm sodyum benzoat ve 250 ppm potasyum sorbat) kullanılmıştır.

Tez çalışması kapsamında, hardal tohumunun *Saccharomyces cerevisiae* üzerine antifungal etkisinin serum fizyolojik ve besiyeri ortamında eklenen hardal tohumu konsantrasyonu arttıkça arttığı tespit edilmiştir. Ancak hardal tohumunun besiyeri ortamındaki antifungal etkisi, organik bileşiklerden dolayı, serum fizyolojik ortamına göre daha az bulunmuştur.

Fermantasyon süresince kullanılan hardal tohumu konsantrasyonlarının toplam mezofilik canlı bakteri (TMACB), laktik asit bakteri ve toplam küf/maya sayısı üzerine direkt bir antimikrobiyal etkisi tespit edilememiştir.

Starter kültür kullanılan Hardaliyelerde, fermentasyon başlangıcında TMACB ve laktik asit bakteri sayıları starter kültür kullanılmayan örneklere göre daha yüksek bulunmuştur. Ancak fermentasyon sonunda, starter kültür kullanımının örneklerdeki TMACB ve laktik

asit bakteri sayıları üzerine bir etkisi bulunmamıştır. Aynı zamanda starter kültür kullanımının Hardaliye örneklerindeki küf/maya gelişimi üzerine bir etkisi tespit edilememiştir.

Hardaliye üretiminde kullanılan kimyasal koruyucular TMACB ve laktik asit bakteri gelişimi üzerine antimikrobiyal bir etki göstermezken, kimyasal koruyucu kullanılan Hardaliye örneklerinde küf/maya sayısı koruyucu kullanılmayan örneklere göre istatiksel olarak önemli ölçüde daha düşük bulunmuştur.

Fermantasyon sonunda Hardaliye örneklerinin toplam antioksidan özellikleri açısından bir fark tespit edilememiştir.

Hardaliye örneklerindeki glukoz ve fruktoz derişimi fermantasyonun birinci haftasına kadar önemli bir değişim göstermemiştir. Fermantasyonun ikinci haftasından sonra kimyasal koruyucu kullanılmayan Hardaliyelerde glukoz ve früktoz miktarında istatiksel olarak önemli derecede azalma gözlemlenirken, kimyasal koruyucu kullanılan örneklerde istatiksel olarak önemli bir değişim bulunmamıştır.

Hardaliye örneklerinde glukoz ve früktoz miktarlarındaki değişime paralel olarak, fermantasyon süresince kimyasal koruyucu kullanılmayan Hardaliye örneklerinde suda çözünür kuru madde miktarı ikinci haftadan itibaren istatiksel olarak önemli derecede azalmıştır. Bununla beraber, hardal tohumu konsantrasyonunun ve starter kültür kullanımının örneklerdeki suda çözünür kuru madde, früktoz ve glukoz miktarları üzerine bir etkisi tespit edilememiştir.

Kimyasal koruyucu kullanılmadan üretilen Hardaliye örneklerinde, fermentasyonun birinci haftasından itibaren alkol oluşumu başlamış, fermentasyon sonunda bu örneklerin tümünde alkol miktarı yasal olarak izin verilen limitlerin üzerinde bulunmuştur. Kimyasal koruyucu kullanılarak üretilen Hardaliyelerde ise alkol oluşumu (2D örneği hariç) tespit edilememiştir.

Fermantasyon süresince Hardaliye örneklerinin pH değerleri istatiksel olarak önemli ölçüde azalmıştır. pH'daki düşüşe paralel olarak Hardaliyelerin toplam asitlik değerleri fermentasyon süresince istatiksel olarak önemli derecede artmıştır. Fermentasyon sonunda ise Hardaliye örneklerinin toplam asitlik miktarları arasında bir fark bulunmamıştır.

Tez çalışmasının ikinci kısmında, farklı sıcaklıklarda iki ay depolamanın Hardaliye kalitesi üzerine etkileri incelenmiştir.

Depolama süresince Hardaliye örneklerinin tümünde TMACB ve laktik asit bakteri sayısı azalırken, oda sıcaklığında depolama ile buzdolabı sıcaklığında depolama arasında bir ilişki tespit edilememiştir. Örneklerdeki TMACB ve laktik asit bakteri sayısındaki azalma ortamdaki besin öğelerinin azalması ile ilişkilendirilmiştir.

Oda sıcaklığında depolanan Hardaliyelerde küf/maya gelişimi kimyasal koruyucu kullanılan örneklerde dahil olmak üzere engellenememiştir. Oda sıcaklığında depolama süresince Hardaliye örneklerindeki küf/maya sayısı, besin öğelerinin azalması ile birlikte, depolamanın başlangıcına göre düşüş göstermiş, depolama sonunda toplam küf/maya sayısı kimyasal koruyucu kullanılan Hardaliyelerde daha düşük bulunmuştur.

Buzdolabı sıcaklığında depolanan ve kimyasal koruyucu kullanılarak üretilen Hardaliye örneklerinde küf/maya gelişimi engellenirken, depolama sonunda bu örneklerin çoğunda küf/maya sayısı tespit edilebilir miktarın altına düşmüştür. Ancak, soğukta depolanan ve kimyasal koruyucu kullanılmadan üretilen Hardaliye örneklerinde küf/maya gelişimi engellenememiştir.

Hem oda sıcaklığında depolama, hem de buzdolabı sıcaklığında depolama süresince Hardaliyelerin toplam antioksidan aktivite değerleri istatiksel olarak önemli ölçüde azalmıştır. Ancak antioksidan aktivitedeki azalma buzdolabı sıcaklığında depolanan örneklerde daha az bulunmuştur.

Oda sıcaklığında depolanan Hardaliye örneklerinin tümünde, yüksek küf/maya sayısına paralel olarak, glukoz ve fruktoz miktarı depolama süresince önemi derecede azalmıştır. Buzdolabı sıcaklığında depolanan ve kimyasal koruyucu kullanılmadan üretilen Hardaliye örneklerinin glukoz ve fruktoz miktarları istatiksel olarak önemli ölçüde azalırken, kimyasal koruyucu kullanılan örneklerde istatiksel olarak önemli bir değişim tespit edilmemiştir.

Depolama süresince glukoz ve fruktoz miktarındaki değişime paralel olarak, oda sıcaklığında depolanan örneklerinin suda çözünür kuru madde içerikleri depolama süresince önemli derecede azalmıştır. Buzdolabı sıcaklığında depolanan Hardaliyelerde, kimyasal koruyucu kullanılan örneklerde suda çözünür kuru madde miktarında önemli

bir değişim gözlenmezken, kimyasal koruyucu kullanılmayan Hardaliyelerde azalma göstermiştir.

Oda sıcaklığında depolama sonunda Hardaliye örneklerindeki alkol miktarı % 6-14 arasında bulunmuştur. Buzdolabı sıcaklığında depolama sonunda, kimyasal koruyucu kullanılmayan örneklerde alkol miktarı %5-12 arasında bulunurken, kimyasal koruyucu kullanılan Hardaliyelerde alkol oluşumu tespit edilmemiştir.

Tez çalışması kapsamında sonuçlar toplu olarak incelendiğinde:

Hardaliye üretiminde tek başına hardal tohumu kullanımının maya fermentasyonunu engellemede yeterli olmadığı bulunmuştur. Hardal konsantrasyondaki artışın fizikokimyasal kalite üzerine bir etkisi tespit edilememiş olup, %2'nin üzerinde Hardal konsantrasyonu kullanıldığında örneklerin renk beğenisi azalmıştır.

Starter kültür kullanımının Hardaliye örneklerinin mikrobiyolojik, fizikokimyasal ve duyusal kalitesi üzerine bir etkisi tespit edilememiştir.

Kimyasal koruyucu kullanımının Hardaliye fermentasyonunda TMACB ve laktik asit bakteri gelişimi üzerine olumsuz bir etkisi bulunmazken, maya fermentasyonu ve alkol oluşumu sadece kimyasal koruyucu kullanılan örneklerde engellenebilmiştir. Kimyasal koruyucu kullanımının Hardaliye örneklerinin fizikokimyasal ve duyusal özellikleri üzerine bir etkisi bulunmamıştır.

Oda sıcaklığında depolamanın Hardaliyenin mikrobiyolojik, fizikokimyasal ve duyusal kalitesinin korunmasında yeterli olmadığı,

Buzdolabı sıcaklığında depolanan ve kimyasal koruyucu kullanılarak üretilen Hardaliyelerin, depolama sonunda en iyi mikrobiyolojik, fizikokimyasal ve duyusal kaliteye sahip olduğu tespit edilmiştir.

Hardaliye üretimi ile ilgili olarak en önemli sorunlardan biri geleneksel olarak üretilen bu ürünle ilgili yasal bir standart bulunmamasıdır. Bu kapsamda ileride yapılacak olan bir yasal düzenleme için Hardaliye üzerine yapılan çalışmalar büyük önem arz etmektedir. Tez çalışması kapsamında kullanılan hardal tohumu konsantrasyonları tek başına üründe maya gelişimini engelleyememiştir. Bu çerçevede özellikle ülkemizde üretilen farklı hardal tohumlarının antifungal etkisi incelenmeli ve en yüksek antifungal etkiye sahip hardal tohumlarının Hardaliye üretimi üzerine etkileri belirlenmelidir. Ayrıca kimyasal

koruyucu kullanımına alternatif olarak, Hardaliye duyusal özelliklerini etkilemeyen farklı doğal antifungal maddelerin Hardaliye üretiminde kullanım potansiyellerinin araştırılması gerekmektedir. Bununla beraber Hardaliye üretiminde rol alan, maya ve laktik asit bakterileri başta olmak üzere ürün mikroflorasının tanımlanması, Hardaliye üretiminde farklı stratejilerin belirlenebilmesine olanak sağlayacaktır.

KAYNAKLAR

Abul-Fadl, M., El-Badry, N., & Ammar, M. (2011). Nutritional and chemical evaluation for two different varieties of mustard seeds. *World Applied Sciences Journal, 15*(9), 1225-1233.

Aktan, N., & Kalkan, H. (2000). *Şarap Teknolojisi*. Ankara: Kavaklıdere.

Amirnia, R., Ghiyasi, M., & Tajbakhsh, M. (2012). Effect of different altitude on some biological parameter of wild mustard (Sinapis arvensis L.). *Tarım Bilimleri Araştırma Dergisi, 5*(2), 144-147.

Ammor, M. S., & Mayo, B. (2007). Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as functional starter cultures in dry sausage production: An update. *Meat science, 76*(1), 138-146.

Amoutzopoulos, B. (2013). *Sağlıklı Bireylerde Geleneksel Üzüm İçeceği Hardaliyenin Serum Antioksidan ve Biyokimyasal Parametreler Üzerine Etkisi*. Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi/Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.

Amoutzopoulos, B., Löker, G. B., Samur, G., Çevikkalp, S. A., Yaman, M., Köse, T., & Pelvan, E. (2013). Effects of a traditional fermented grape-based drink 'hardaliye'on antioxidant status of healthy adults: a randomized controlled clinical trial. *Journal of the Science of Food and Agriculture, 93*(14), 3604-3610.

Aras, Ö. (2006). *Üzüm ve üzüm ürünlerinin toplam karbonhidrat, protein, mineral madde ve fenolik bileşik içeriklerinin belirlenmesi*. Yüksek Lisans Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi/Fen Bilimleri Enstitüsü, Isparta.

Arici, M., & Coskun, F. (2001). Hardaliye: fermented grape juice as a traditional Turkish beverage. *Food Microbiology, 18*(4), 417-421.

Aşkın, B., & Atik, A. (2016). Color, phenolic composition, and antioxidant properties of hardaliye (fermented grape beverage) under different storage conditions. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry, 40*(6), 803-812.

Aydoğdu, H., Yıldırım, Ş., Halkman, A. K., & Durgun, T. (2014). A study on production and quality criteria of hardaliye; a traditional drink from Thrace region of Turkey. *Gıda, 39*, 139-145.

Bagci, U., & Temiz, A. (2011). Microbiological quality of fresh-squeezed orange juice and efficacy of fruit surface decontamination methods in microbiological quality. *Journal of Food Protection, 74*(8), 1238-1244.

Bağder, S., & Özçelik, F. (2009). Saccharomyces Dışındaki Mayaların Şarap Aromasına Etkileri. *Gıda Dergisi, 34*(4), 251-258.

Branen, A. L., Davidson, P. M., Salminen, S., & Thorngate, J. (Ed.) (2001). *Food additives* (2. Baskı). CRC Press.

Breidt, F., Pérez-Díaz, I., McFeeters, R. F., & Lee, C.-H. (2013). Fermented vegetables. *Food Microbiology: American Society of Microbiology*, 841-855.

Bridges, M., Jones, A. M., Bones, A. M., Hodgson, C., Cole, R., Bartlet, E., Wallsgrove, R., Karapapa, V. K., Watts, N., & Rossiter, J. T. (2002). 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 B: Biological Sciences, 269*(1487), 187-191.

Canbaş, A. (1986). Bira, şarap ve yüksek alkollü içkilerin üretiminde mikroorganizmalar. *Gıda Dergisi, 11*(5).

Caplice, E., & Fitzgerald, G. F. (1999). Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. *International journal of food microbiology, 50*(1), 131-149.

Castro-Rosas, J., Ferreira-Grosso, C. R., Gómez-Aldapa, C. A., Rangel-Vargas, E., Rodríguez-Marín, M. L., Guzmán-Ortiz, F. A., & Falfan-Cortes, R. N. (2017). Recent advances in microencapsulation of natural sources of antimicrobial compounds used in food-A review. *Food Research International*, 102, 575-587.

Ciani, M., Beco, L., & Comitini, F. (2006). Fermentation behaviour and metabolic interactions of multistarter wine yeast fermentations. *International journal of food microbiology, 108*(2), 239-245.

Clarke, O., Rand, M., Rock, M., & Riches, L. (2001). Encyclopedia of grapes. *Websters Int Publ, 192*.

Coskun, F., & Arici, M. (2006). The effects of using different mustard seeds and starter cultures on some properties of hardaliye. *Annals of microbiology, 56*(4), 335-337.

Coşkun, F. (2001). Hardaliye Üretim Teknolojisi Üzerinde Bir Araştırma. Doktora Tezi, *Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Tekirdağ*.

Coşkun, F., & Arıcı, M. (2011). Hardaliyenin Bazı Özellikleri Üzerine Farklı Hardal Tohumları ve Üzüm Çeşitleri Kullanımının Etkisi. *Akademik Gıda Dergisi,* 9(3), 6-11.

Covas, M. I., Gambert, P., Fitó, M., & de la Torre, R. (2010). Wine and oxidative stress: up-to-date evidence of the effects of moderate wine consumption on oxidative damage in humans. *Atherosclerosis, 208*(2), 297-304.

Cutter, C. N. (2000). Antimicrobial effect of herb extracts against Escherichia coli O157: H7, Listeria monocytogenes, and Salmonella typhimurium associated with beef. *Journal of Food Protection, 63*(5), 601-607.

Çelik, H. (2012). Üzümün Besin Değeri. *Türkiye Tohumcular Birliği Dergisi,* 18-21.

Çoşkun, F., Arıcı, M., Çelikyurt, G., & Gülcü, M. (2012). Farklı yöntemler kullanılarak üretilen hardaliyelerin bazı özelliklerinde depolama sonunda meydana gelen değişmeler. *Journal of Tekirdag Agricultural Faculty, 9*(3), 62-66.

Davidson, P. M., Sofos, J. N., & Branen, A. L. (Ed.) (2005). *Antimicrobials in food* (3. Baskı). CRC press.

De La Maturation, E., & Surlacde, R. (2006). The effect of grape ripening stage on red wine color. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin, 40*(1), 15-24.

De Vuyst, L., Falony, G., & Leroy, F. (2008). Probiotics in fermented sausages. *Meat science, 80*(1), 75-78.

Doğruer, Y., Gürbüz, Ü., & Nizamlhoğlu, M. (1996). Potasyum sorbatnn beyaz peynirin kimyasal ve mikrobiyolojik kalitesine etkisi. *Selçuk Univ Vet Bil Derg, 12*(1), 109-116.

Dušan, F., Marián, S., Katarína, D., & Dobroslava, B. (2006). Essential oils—their antimicrobial activity against Escherichia coli and effect on intestinal cell viability. *Toxicology in vitro, 20*(8), 1435-1445.

Faydaoğlu, E., & Sürücüoğlu, M. S. (2013). Tıbbi Ve Aromatik Bitkilerin Antimikrobiyal, Antioksidan Aktiviteleri Ve Kullanım Olanakları. *Erzincan University Journal of Science and Technology, 6*(2), 233-265.

Flamini, R., & Vedova, A. D. (2007). Preservation of Cabernet Sauvignon grape must samples destined for chemical analysis: addition of sodium azide, allyl isothiocyanate, octanoic acid and ethyl bromoacetate, and effect of pasteurization. *Journal of food processing and preservation, 31*(3), 345-355.

Fleet, G. H. (2003). Yeast interactions and wine flavour. *International journal of food microbiology, 86*(1), 11-22.

Gálvez, A., Abriouel, H., Benomar, N., & Lucas, R. (2010). Microbial antagonists to food-borne pathogens and biocontrol. *Current opinion in biotechnology, 21*(2), 142-148.

Genç, T., & Çıldır, İ. (2012). Non-Saccharomyces yeast diversity on Bozcaada grape varieties. *Biyoloji Bilimleri Araştırma Dergisi, 5*(1), 115-120.

Gillor, O., Etzion, A., & Riley, M. (2008). The dual role of bacteriocins as anti-and probiotics. *Applied microbiology and biotechnology, 81*(4), 591-606.

Grainger, K., & Tattersall, H. (2016). *Wine Production and Quality* (2. Baskı). Wiley Online Library.

Graumann, G. H., & Holley, R. A. (2009). Survival of E. coli O157: H7 during manufacture of dry-cured Westphalian ham surface-treated with allyl isothiocyanate or hot mustard powder. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *89*(4), 617-624.

Gucer, Y., Aydogdu, H., & Durgun, T. (2009). A traditional Thracian beverage:'hardaliye'. *Trakia J Sci*, *7*, 208-210.

Gülcü, M. (2008). *Durultma yardımcı maddelerinin üzüm suyu kalitesi üzerine etkileri.* Yüksek Lisans Tezi. Namık Kemal Üniversitesi/Fen Bilimleri Enstitüsü, Tekirdağ.

Gülcü, M., Demirci, A. Ş., & Güner, K. G. (2008). Siyah üzüm; zengin besin içeriği ve sağlık acısından önemi. *Türkiye 10. Gıda Kongresi,* 179-182.

Güven, S., & Aksoy, M. (2009). *Some modifications in hardaliye production.* II. Paper presented at the Traditional Foods Symposium Abstract Book. Van, Turkey.

Hammer, K., Carson, C., & Riley, T. (1999). Influence of organic matter, cations and surfactants on the antimicrobial activity of Melaleuca alternifolia (tea tree) oil in vitro. *Journal of Applied Microbiology*, *86*(3), 446-452.

Herzallah, S., & Holley, R. (2012). Determination of sinigrin, sinalbin, allyl-and benzyl isothiocyanates by RP-HPLC in mustard powder extracts. *LWT-Food Science and Technology*, *47*(2), 293-299.

Holley, R. (1997). Impact of slicing hygiene upon shelf life and distribution of spoilage bacteria in vacuum packaged cured meats. *Food Microbiology*, *14*(3), 201-211.

Ildikó, S.-G., Klára, K. A., Marianna, T.-M., Ágnes, B., Zsuzsanna, M.-B., & Bálint, C. (2006). The effect of radio frequency heat treatment on nutritional and colloid-chemical properties of different white mustard (Sinapis alba L.) varieties. *Innovative food science & emerging technologies*, *7*(1), 74-79.

Jale, A., & Cemeroğlu, B. (1986). Meyve ve Sebze İşleme Teknolojisi. *Gıda Teknolojisi Derneği Yayınları, Ankara*.

Jongen, W. (Ed.) (2002). *Fruit and vegetable processing: Improving quality*: England: Cambridge.

Kabak, B., & Dobson, A. D. (2011). An introduction to the traditional fermented foods and beverages of Turkey. *Critical reviews in food science and nutrition*, *51*(3), 248-260.

Kılıç, G. B., Ağdaş, K., Karahan, A. G., & Çakmakçı, M. L. (2016). Effect of Lactobacillus plantarum AK4-11 and Different Grape Varieties on the Properties of Hardaliye. *Tarım Bilimleri Dergisi, 22*(4), 512-521.

Kıvanç, M., & Akgül, A. (1988). Mayaların gelişmesi üzerine baharatların etkisi. *Gida/The Journal Of Food, 13*(2) 145-152.

Lemay, M.-J., Choquette, J., Delaquis, P. J., Gariépy, C., Rodrigue, N., & Saucier, L. (2002). Antimicrobial effect of natural preservatives in a cooked and acidified chicken meat model. *International journal of food microbiology, 78*(3), 217-226.

Leroy, F., & De Vuyst, L. (2004). Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends in food science & technology, 15*(2), 67-78.

Lin, C.-M., Preston III, J. F., & Wei, C.-I. (2000). Antibacterial mechanism of allyl isothiocyanate. *Journal of Food Protection, 63*(6), 727-734.

Lozano-Baena, M.-D., Tasset, I., Obregón-Cano, S., de Haro-Bailon, A., Muñoz-Serrano, A., & Alonso-Moraga, Á. (2015). Antigenotoxicity and tumor growing inhibition by leafy Brassica carinata and sinigrin. *Molecules, 20*(9), 15748-15765.

Luciano, F. B., Belland, J., & Holley, R. A. (2011). Microbial and chemical origins of the bactericidal activity of thermally treated yellow mustard powder toward Escherichia coli O157: H7 during dry sausage ripening. *International journal of food microbiology, 145*(1), 69-76.

Lück, E. (1990). Food applications of sorbic acid and its salts. *Food Additives & Contaminants, 7*(5), 711-715.

Lück, E., & Jager, M. (1997). *Antimicrobial food additives: characteristics, uses, effects.* (Baskı 2). S. Laichena (Çev). Springer.

Mazumder, A., Dwivedi, A., & Du Plessis, J. (2016). Sinigrin and its therapeutic benefits. *Molecules, 21*(4), 416.

Mazza, G. (Ed.) (1998). *Functional foods: biochemical and processing aspects* (Baskı 1). CRC Press.

Mazza, G., & Francis, F. (1995). Anthocyanins in grapes and grape products. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition, 35*(4), 341-371.

Meena, M., & Sethi, V. (1994). Antimicrobial activity of essential oils from spices. *Journal of food science and technology. Mysore, 31*(1), 68-70.

Meira, N. V., Holley, R. A., Bordin, K., de Macedo, R. E., & Luciano, F. B. (2017). Combination of essential oil compounds and phenolic acids against Escherichia coli O157: H7 in vitro and in dry-fermented sausage production. *International journal of food microbiology, 260*, 59-64.

Metchnikoff, E. (1908). The Prolongation of Life, GP Putnam's Sons. *New York, NY*.

Naidu, A., Bidlack, W., & Clemens, R. (1999). Probiotic spectra of lactic acid bacteria (LAB). *Critical reviews in food science and nutrition, 39*(1), 13-126.

Nasar-Abbas, S., & Halkman, A. K. (2004). Antimicrobial effect of water extract of sumac (Rhus coriaria L.) on the growth of some food borne bacteria including pathogens. *International journal of food microbiology, 97*(1), 63-69.

Nassiri-Asl, M., & Hosseinzadeh, H. (2016). Review of the pharmacological effects of Vitis vinifera (grape) and its bioactive constituents: an update. *Phytotherapy Research, 30*(9), 1392-1403.

Nguyen, C., & Carlin, F. (1994). The microbiology of minimally processed fresh fruits and vegetables. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition, 34*(4), 371-401.

Okunade, O. A., Ghawi, S. K., Methven, L., & Niranjan, K. (2015). Thermal and pressure stability of myrosinase enzymes from black mustard (Brassica nigra LWDJ Koch. var. nigra), brown mustard (Brassica juncea L. Czern. var. juncea) and yellow mustard (Sinapsis alba L. subsp. maire) seeds. *Food chemistry, 187*, 485-490.

Olaimat, A. N., & Holley, R. A. (2016). Inhibition of Listeria monocytogenes on cooked cured chicken breasts by acidified coating containing allyl isothiocyanate or deodorized Oriental mustard extract. *Food Microbiology, 57*, 90-95.

Olivier, C., Vaughn, S. F., Mizubuti, E. S., & Loria, R. (1999). Variation in allyl isothiocyanate production within Brassica species and correlation with fungicidal activity. *Journal of Chemical Ecology, 25*(12), 2687-2701.

Oussalah, M., Caillet, S., Saucier, L., & Lacroix, M. (2007). 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, 18*(5), 414-420.

Ouwehand, A. C., & Vesterlund, S. (2004). Antimicrobial components from lactic acid bacteria. *Food Science And Technology-New York-Marcel Dekker-, 139*, 375-396.

Özbaş, Z. Y. (2009). Şarap Fermantasyonlarında Endojen Çoklu Starter Kültürlerin Kullanılma Olanakları. *Gida/The Journal Of Food, 34*(3), 183-191.

Öztürkcan, A., & Sıla, A. (2017). Yaygın Olarak Kullanılan Antimikrobiyal Gıda Katkı Maddeleri ile İlgili Genel Bir Değerlendirme. *Igusabder*, 1, 1-17.

Palop, M. L., Smiths, J. P., & ten Brink, B. (1995). Degradation of sinigrin by Lactobacillus agilis strain R16. *International journal of food microbiology, 26*(2), 219-229.

Parada, J. L., Caron, C. R., Medeiros, A. B. P., & Soccol, C. R. (2007). Bacteriocins from lactic acid bacteria: purification, properties and use as biopreservatives. *Brazilian Archives of Biology and Technology, 50*(3), 512-542.

Persson, M., Flock, J.-I., & van der Linden, J. (2003). Antiseptic wound ventilation with a gas diffuser: a new intraoperative method to prevent surgical wound infection? *Journal of Hospital Infection, 54*(4), 294-299.

Popova, I. E., & Morra, M. J. (2014). Sinigrin and sinalbin quantification in mustard seed using high performance liquid chromatography–time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Food Composition and Analysis, 35*(2), 120-126.

Prado, F. C., Parada, J. L., Pandey, A., & Soccol, C. R. (2008). Trends in non-dairy probiotic beverages. *Food Research International, 41*(2), 111-123.

Praphailong, W., & Fleet, G. (1997). The effect of pH, sodium chloride, sucrose, sorbate and benzoate on the growth of food spoilage yeasts. *Food Microbiology, 14*(5), 459-468.

Radojčić Redovniković, I., Glivetić, T., Delonga, K., & Vorkapić-Furač, J. (2008). Glucosinolates and their potential role in plant. *Periodicum biologorum, 110*(4), 297-309.

Rauf, A., Imran, M., Butt, M. S., Nadeem, M., Peters, D. G., & Mubarak, M. S. (2016). Resveratrol as an anticancer agent: A review. *Critical reviews in food science and nutrition.* 23(5): 566-577.

Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free radical biology and medicine, 26*(9), 1231-1237.

Robinson, J., & Harding, J. (Ed.) (2015). *The Oxford companion to wine* (Baskı 4). American Chemical Society.

Rodas, A., Ferrer, S., & Pardo, I. (2005). Polyphasic study of wine Lactobacillus strains: taxonomic implications. *International journal of systematic and evolutionary microbiology, 55*(1), 197-207.

Rubin, H. E. (1978). Toxicological model for a two-acid system. *Applied and environmental microbiology, 36*(4), 623.

Saarela, M., Mogensen, G., Fonden, R., Mättö, J., & Mattila-Sandholm, T. (2000). Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *Journal of biotechnology, 84*(3), 197-215.

Saavedra, J. M. (2001). Clinical applications of probiotic agents. *The American journal of clinical nutrition, 73*(6), 1147S-1151S.

Salminen, S., & Von Wright, A. (2004). *Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects* (4. baskı). CRC Press.

Schobinger, U. (1987). Production of Fruit Juices. *Fruit and Vegetable Juices, Handbook of Food Technology, 2*, 89-102.

Schuller, D., Alves, H., Dequin, S., & Casal, M. (2005). Ecological survey of Saccharomyces cerevisiae strains from vineyards in the Vinho Verde Region of Portugal. *FEMS Microbiology Ecology, 51*(2), 167-177.

Seo, H.-S., Bang, J., Kim, H., Beuchat, L. R., Cho, S. Y., & Ryu, J.-H. (2012). Development of an antimicrobial sachet containing encapsulated allyl isothiocyanate to inactivate Escherichia coli O157: H7 on spinach leaves. *International journal of food microbiology, 159*(2), 136-143.

Seow, Y. X., Yeo, C. R., Chung, H. L., & Yuk, H.-G. (2014). Plant essential oils as active antimicrobial agents. *Critical reviews in food science and nutrition, 54*(5), 625-644.

Sezen, A. G. (2013). Prebiyotik, probiyotik ve sinbiyotiklerin insan ve hayvan sağlığı üzerine etkileri. *Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi, 8*(3), 248-258.

Sharma, R., Rajput, Y. S., Dogra, G., & Tomar, S. K. (2009). Estimation of sugars in milk by HPLC and its application in detection of adulteration of milk with soymilk. *International journal of dairy technology, 62*(4), 514-519.

Shofran, B., Purrington, S., Breidt, F., & Fleming, H. (1998). Antimicrobial properties of sinigrin and its hydrolysis products. *Journal of food science, 63*(4), 621-624.

Soleas, G. J., Diamandis, E. P., & Goldberg, D. M. (1997). Wine as a biological fluid: history, production, and role in disease prevention. *Journal of clinical laboratory analysis, 11*(5), 287-313.

Soyer, A., Ertaş, A. H., & Üzümcüogˇlu, Ü. (2005). Effect of processing conditions on the quality of naturally fermented Turkish sausages (sucuks). *Meat science, 69*(1), 135-141.

Soyer, Y., Koca, N., & Karadeniz, F. (2003). Organic acid profile of Turkish white grapes and grape juices. *Journal of Food Composition and Analysis, 16*(5), 629-636.

Steinkraus, K. H. (1997). Classification of fermented foods: worldwide review of household fermentation techniques. *Food control, 8*(5-6), 311-317.

Stiles, M. E. (1996). The lactic acid bacteria, volume 2. The genera of lactic acid bacteria. BJB Wood and WH Holzapfel (Ed), *Blackie Academic and Professional* (pp.398). London Elsevier.

Stoin, D., Pirsan, P., Radu, F., Poiana, M.-A., Alexa, E., & Dogaru, D. (2009). Studies regarding the myrosinase enzymatic activity from black mustard (Brassica nigra) seeds. *J Food Agric Environ, 7*(1), 44-47.

Şahin, E. (2015). *Bitkisel kaynaklı antimikrobiyallerin gıda kaynaklı bazı patojen mikroorganizmalar üzerinde etkileri.* (Yüksek Lisans Tezi). İstanbul Teknik Üniversitesi/ Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.

Şahin, G. (2013). Coğrafi İşaretlerin Önemi Ve Vize (Kırklareli)'Nin Coğrafi İşaretleri. *Pamukkale Üniversitesi Sosyal Bilimler Enstitüsü Dergisi,* (15), 23-37.

Şenses, Ş., & Özbaş, Z. Y. (2004). Yüksek Şeker İçerikli Gıdalarda Kserotolerant Mayaların Önemi. *Gida/The Journal Of Food, 29*(1), 79-87.

Taniwaki, M. H., Silva, N. d., Banhe, A. A., & Iamanaka, B. T. (2001). Comparison of culture media, simplate, and petrifilm for enumeration of yeasts and molds in food. *Journal of Food Protection, 64*(10), 1592-1596.

Tsao, R., Yu, Q., Potter, J., & Chiba, M. (2002). Direct and simultaneous analysis of sinigrin and allyl isothiocyanate in mustard samples by high-performance liquid chromatography. *Journal of agricultural and food chemistry, 50*(17), 4749-4753.

Turantaş, F., Göksungur, Y., Dinçer, A. H., Ünlütürk, A., Güvenç, U., & Zorlu, N. (1999). Effect of potassium sorbate and sodium benzoate on microbial population and fermentation of black olives. *Journal of the Science of Food and Agriculture, 79*(9), 1197-1202.

Turantaş, F., & Ünlütürk, A. (1998). Gıda Mikrobiyolojisi. İzmir: Tan.

Turgis, M., Han, J., Caillet, S., & Lacroix, M. (2009). Antimicrobial activity of mustard essential oil against Escherichia coli O157: H7 and Salmonella typhi. *Food control, 20*(12), 1073-1079.

Üner, Y., Aksu, H., & Ergün, Ö. (2000). Baharatın çeşitli mikroorganizmalar üzerine etkileri. *İstanbul üniversitesi veteriner fakültesi dergisi, 26*(1), 1-10.

Valero, M., & Salmeron, M. (2003). Antibacterial activity of 11 essential oils against Bacillus cereus in tyndallized carrot broth. *International journal of food microbiology, 85*(1), 73-81.

Vallor, A. C., Antonio, M. A., Hawes, S. E., & Hillier, S. L. (2001). Factors associated with acquisition of, or persistent colonization by, vaginal lactobacilli: role of hydrogen peroxide production. *The Journal of infectious diseases, 184*(11), 1431-1436.

Van Eylen, D., Oey, I., Hendrickx, M., & Van Loey, A. (2008). Behavior of mustard seed (Sinapis alba L.) myrosinase during temperature/pressure treatments: a case study on enzyme activity and stability. *European food research and technology, 226*(3), 545-553.

Vig, A. P., Rampal, G., Thind, T. S., & Arora, S. (2009). Bio-protective effects of glucosinolates–A review. *LWT-Food Science and Technology, 42*(10), 1561-1572.

Yalcin, S. K., & Ozbas, Z. Y. (2008). Effects of pH and temperature on growth and glycerol production kinetics of two indigenous wine strains of Saccharomyces cerevisiae from Turkey. *Brazilian Journal of Microbiology, 39*(2), 325-332.

Yemiş, O., & Artık, N. (2007). Glukosinolatlar ve insan sağlığı. *Gıda Dergisi,* 32 (6) : 293-303.

Yuste, J., & Fung, D. (2002). Inactivation of Listeria monocytogenes Scott A 49594 in apple juice supplemented with cinnamon. Journal of Food Protection, 65(10), 1663-1666.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Özge GÜRBÜZ

Doğum Yeri : Kadıköy/ İstanbul

Doğum Tarihi : 15.06.1992

Medeni Hali : Evli

E-Posta : gurbuzozgee@gmail.com

Eğitim ve Akademik Durumu

Lise : 2006-2010 Habire Yahşi Anadolu Lisesi

Lisans : 2010-2014 Celal Bayar Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü

Yabancı Dil : İngilizce

İş Tecrübesi

6.2014-11.2014; Altıntop Kuruyemiş Gıda San. Tic. A.Ş.

Gıda Kalite Kontrol Mühendisi

8.2015-5.2016; Arda Bağcılık ve Şarapçılık Limited Şirketi.

Üretim Mühendisi

13.09.2017-Devam; PnR Danışmanlık Şirketi-DQS Şirketi

Denetçi

BİLİMSEL FAALİYETLER

Bildiri (Poster)

Bağcı, U., Gürbüz, Ö. 2017. Effects of Black Mustard Seed Concentration on the Viability of Yeasts During Fermentation of Hardaliye. International Conference on Agriculture, Forest, Food Sciences and Technologies (ICAFOF 2017 Cappadocia / Turkey).