

T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**BAZI FERMENTE ÜRÜNLERDE TRİPTOFAN AMİNOASİDİ
YOLAĞIYLA İLGİLİ METABOLİTLERİN TAYİNİ**

DİDEM MELDA YILMAZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KİMYA ANABİLİM DALI

Tez Danışmanı: PROF. DR. ŞEBNEM SELEN İŞBİLİR

EDİRNE-2022

Didem Melda YILMAZ'ın hazırladığı “Bazı Fermente Ürünlerde Triptofan Aminoasidi Yolağıyla İlgili Metabolitlerin Tayini” başlıklı bu tez, tarafımızca okunmuş, kapsam ve niteliğı açısından Kimya Anabilim Dalında bir Yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri:

İmza

Prof. Dr. H. Hülya ORAK

.....

Prof. Dr. Hülya YAĞAR

.....

Prof. Dr. Şebnem SELEN İŞBİLİR

.....

Tez Savunma Tarihi: 07/04/2022

Bu tezin Yüksek Lisans tezi olarak gerekli şartları sağladığını onaylarım.

İmza

Prof. Dr. Şebnem SELEN İŞBİLİR

Tez Danışmanı

Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü onayı

Prof. Dr. Hüseyin Rıza Ferhat KARABULUT

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

T.Ü. FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANABİLİMDALİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI
DOĞRULUK BEYANI

Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada, 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.

07/04/ 2022

Didem Melda YILMAZ

Yüksek Lisans Tezi

Bazı Fermente Ürünlerde Triptofan Aminoasidi Yolağıyla İlgili Metabolitlerin Tayini

T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü

Kimya Anabilim Dalı

ÖZET

Triptofan insanlar için esansiyel bir amino asittir. Normal şartlarda diyetle triptofan alımında azalma endojen triptofan konsantrasyonunun azalmasına neden olur. Triptofan protein sentezine katılır, serotonin ve melatonin sentezinde başlangıç molekülüdür ve çok büyük bir bölümü son ürün nikotin adenin dinükleotidin (NAD^+) üretildiği kinürenin yolağında kullanılır. Pek çok hastalık azalan triptofan miktarıyla veya triptofanın büyük bir kısmının kullanıldığı kinürenin yolağı ile ilişkilendirilmektedir. Bu sebeple son yıllarda çeşitli gıdalar eksojen triptofan kaynağı olarak ve/veya nöroaktif kinürenin yolağı metabolitleri açısından incelenmektedir.

Ayrıca triptofanın kinürenin yolağı üzerinden yıkımına olan ilgi, bu sırada oluşan metabolitlerin nöroaktif özellikli bileşikler olmasından kaynaklanmaktadır. Bu bileşiklerin özellikle nörolojik temelli hastalıklarda ve bazı kanser türlerinde kan serum seviyelerinin ve oranlarının değiştiği gözlemlenmiştir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda kinürenin yolağında oluşan nöroaktif metabolitlerin kan dolaşımı yoluyla bağırsak ve beyin arasındaki sinyalleri etkileyebildiği de bildirilmiştir.

Fermente ürünler mikroorganizmaların metabolizması sonucu oluşurlar ve fermentasyon yapabilen çeşitli maya ve bakterilerde kinürenin yolağı çalışmaktadır. Bu tez çalışmasında fermentasyon sonucu oluşan ürünlerde bu metabolitlerin bulunabileceği düşünülmüş ve bu sebeple elma ve üzüm sirkeleri, Kırklareli ve Edirne yörelerine ait iki farklı marka hardaliye, kombucha çayı ve bozada LC-MS/MS cihazı kullanılarak triptofan, kinürenin, kinürenik asit, 3-hidroksikinürenin, nikotinik asit ve nikotinamid tayini yapılmıştır. Analiz sonucunda en yüksek triptofan düzeyleri hardaliyelerde (1798

ng/ml ve 2947 ng/ml) ve en düşük kombuchada (5.15 ng/ml) bulunmuştur. Nörotoksik etkisi olan 3-hidroksikinürenine beş üründe rastlanmazken, sadece bozada (12.21 ng/ml) tespit edilmiştir. Sirke çeşitleri ve kombuchada kinürenin tespit edilmemiştir, diğer metabolitler de tüm ürünlerde farklı miktarlarda tayin edilmiştir.

Çalışılan tüm fermente ürünlerde gıdaların nitel ve nicel kalite kontrollerinde kullanılan pH, toplam asitlik (%), yoğunluk, nem ve kuru madde temel analizleri yapılmıştır ve sonuçlar genel olarak ilgili yönetmelik ve literatürle uyumludur. Fermente ürünlerin antioksidan aktivitesi ile ilgili olarak toplam fenolik madde miktarı ve DPPH metodu ile radikal giderme kapasitesi incelenmiştir. Kuru madde bazında hesaplanan toplam fenolik madde miktarları ile serbest radikal giderme aktivitesinden hesaplanan EC₅₀ değerleri birbiriyle uyumlu olup, fenolik madde içeriği (mg GAE/100 g) ve antiradikalik aktivite sıralaması elma sirkesi>üzüm sirkesi>kombucha>hardaliye (Kırklareli) >hardaliye (Edirne) şeklindedir.

Yıl : 2022

Sayfa Sayısı : 149

Anahtar Kelimeler : Fermente gıda, Hardaliye, Kinürenik Asit, Kinürenin, Kombucha, LC-MS/MS, Sirke, Triptofan

Master Thesis

Determination of Tryptophan Pathway Metabolites in Some Fermented Products

Trakya University Institute of Natural and Applied Sciences

Chemistry of Department

ABSTRACT

Tryptophan is an essential amino acid for humans. A decrease in dietary tryptophan intake causes a decrease in endogenous tryptophan concentration in the physiological conditions. Tryptophan participates to protein synthesis and precursor of serotonin and melatonin molecules. However a large amount of tryptophan proceeds along the kynurenine pathway to produce the final product, nicotinamide adenosine dinucleotide (NAD⁺). Many diseases are associated with a reduced amount of tryptophan or the kynurenine pathway. Therefore, in recent years, the foods have been studied as sources of exogenous tryptophan and/or neuroactive metabolites of kynurenine pathway.

Interest in kynurenine pathway recently increased as the metabolites formed during this pathway are neuroactive compounds. It has been observed that the blood serum levels and ratios of these compounds change especially in neurological diseases and cancer. In recent studies, it has been reported that neuroactive metabolites formed in the kynurenine pathway can affect the signals between the gut and the brain via the blood circulation.

Fermented products are formed via to the metabolism of microorganisms and the kynurenine pathway also works in various yeasts and bacteria that are can ferment. In this thesis, it was thought that these metabolites could be found in the products formed as a result of fermentation processes. Therefore tryptophan, kynurenine, kynurenic acid, 3-hydroxykynurenine, nicotinic acid and nicotinamide were determined in apple and grape vinegars, two brands of hardaliye from Kırklareli and Edirne regions, kombucha tea and

boza by using LC-MS/MS instrument. According to result of the study, the highest tryptophan levels were found in hardaliyes (1798 ng/ml and 2947 ng/ml) and the lowest in kombucha (5.15 ng/ml). The 3-hydroxykynurenine, which has a neurotoxic effect, was not detected in other five fermented products, but only in boza (12.21 ng/ml). Kynurenine was not detected in kombucha, apple and grape vinegars, and other metabolites were determined in different amounts in all products.

In all fermented products studied, pH measurement, total acidity (%), density, moisture and dry matter analyzes which indicates qualitative and quantitative quality control of foods were carried out. The obtained results are generally compatible with the relevant standards and the literature. Regarding the antioxidant activity of fermented products, the total phenolic compound and the radical scavenging capacity by DPPH method were investigated. The total phenolic content calculated on the basis of dry matter and the EC₅₀ values calculated from free radical scavenging activity are compatible with each other, and the order of phenolic content and antiradical activity is apple vinegar>grape vinegar>kombucha>hardaliye (Kırklareli)>hardaliye (Edirne).

Year : 2022

Number of Page : 149

Keywords : Fermented Food, Hardaliye, Kynurenic Acid, Kynurenine, Kombucha, LC-MS/MS, Tryptophan, Vinegar

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmam süresi boyunca bilgi birikimi ve tecrübesiyle bıkıp usanmadan yol gösteren danışman hocam Sayın Prof. Dr. Şebnem SELEN İŞBİLİR'e,

Bu yolu yürümemde emeği geçen tüm hocalarıma,

Her zaman arkamda desteklerini hissettiğim canım annem Ülkü ÖZYOL, anneannem Tenzile ÖZYOL ve kardeşim N. Armağan YILMAZ'a

LC-MS/MS analizlerinin gerçekleştirilmesinde çalışmama destek veren T.Ü. Teknoloji Araştırma ve Geliştirme Uygulama ve Araştırma Merkezi (TÜTAGEM)'ne ve çalışanlarına,

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez çalışması, Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi Birimi tarafından TÜBAP 2020/133 numaralı proje ile desteklenmiştir.

Didem Melda YILMAZ

İÇİNDEKİLER

	Sayfa no
KISALTMALAR.....	xii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xiii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xiv
EKLER DİZİNİ.....	xvi
BÖLÜM 1.....	1
GİRİŞ.....	1
BÖLÜM 2.....	4
GENEL BİLGİLER.....	4
2.1.Triptofan.....	4
2.2.Triptofanın Kullanıldığı Yollar.....	7
2.2.1. Protein Sentezi.....	7
2.2.2. Serotonin Sentez Yolu.....	7
2.2.3. Melatonin Sentez Yolu.....	9
2.2.4. Triptamin Sentezi.....	10
2.2.5. Kinürenin Yolağı.....	11
2.2.6. Triptofan ve Kinürenin Serum Konsantrasyonları.....	17
2.3. Kinürenin Yolağının Sağlıkla İlişkisi.....	18
2.4. Mikroorganizmalarda Kinürenin Yolağı.....	22
2.5. Fermantasyon ve Tarihçesi.....	25
2.5.1. Fermantasyonda Kullanılan Mikroorganizmalar.....	26
2.5.1.1. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	27
2.5.1.2. Laktik Asit Bakterileri	27
2.5.1.3. Asetik Asit Bakterileri.....	28
2.5.2. Fermente Gıdalar.....	29
2.5.2.1. Boza.....	30

2.5.2.2. Hardaliye.....	34
2.5.2.3. Sirke.....	37
2.5.2.4. Kombucha çayı.....	43
BÖLÜM 3.....	48
MATERYAL ve METOT.....	48
3.1. Materyal.....	48
3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Cihazlar.....	48
3.1.2. Deneyde Kullanılan Fermente Ürünler.....	48
3.1.3. Kullanılan Çözeltiler.....	50
3.2. Metot.....	51
3.2.1. Kinürenin Metabolitlerinin LC-MS/MS ile Belirlenmesi.....	51
3.2.2. Fermente Ürünlerde Yapılan Diğer Analizler.....	53
3.2.2.1. pH Tayini.....	53
3.2.2.2. Toplam Asitlik Tayini	53
3.2.2.3. Yoğunluk Tayini.....	54
3.2.2.4. Nem/Kuru Madde Tayini.....	54
3.2.2.5. Toplam Fenolik Madde Miktar Tayini.....	54
3.2.2.6. DPPH* Giderme Aktivitesi.....	55
3.2.3. İstatistiksel Analiz.....	56
BÖLÜM 4.....	57
BULGULAR.....	57
4.1. Triptofan ve Kinürenin Metabolitlerinin LC-MS/MS ile Belirlenmesi.....	57
4.2. Fermente Ürünlerde Yapılan Diğer Analizler.....	58
BÖLÜM 5.....	65
TARTIŞMA.....	65
5.1. Triptofan ve Kinürenin Metabolitleri.....	65
5.2. Fermente Ürünlerde Yapılan Diğer Analizler.....	69
5.2.1. pH Tayini.....	70
5.2.2. Toplam Asitlik Tayini.....	72
5.2.3. Yoğunluk Tayini	74
5.2.4. Nem/Kuru Madde Tayini.....	75
5.2.5. Toplam Fenolik Madde ve DPPH* Giderme Tayini.....	77
KAYNAKLAR.....	84

EKLER	96
ÖZGEÇMİŞ	133



KISALTMALAR

3-HAA	: 3-Hidroksi antranilik asit
3-HK	: 3-Hidroksi kinürenin
5-HT	: 5-Hidroksi triptamin (Serotonin)
5-HTP	: 5-Hidroksi triptofan
TFM	: Toplam Fenolik Madde
IDO	: İndolamin 2,3-dioksijenaz
IUPAC	: Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği
KYN	: Kinürenin
KYNA	: Kinürenik asit
MAOI	: Monoamin Oksidaz İnhibitörü
NMDA	: N-metil-D-aspartik asit
QUIN	: Kinolinik Asit
SCOBY	: Simbiyotik Bakteri ve Maya Kültürü
TDO	: Triptofan 2,3-dioksijenaz
TRP	: Triptofan
LC-MS/MS	: Sıvı Kromatografi-Kütle/Kütle Spektroskopisi

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa no
Çizelge 2.1. TDO ve IDO enzimlerinin farklılıkları.....	14
Çizelge 2.2. Çeşitli fermente ürünlerde TRP metabolitleriyle ilgili yapılan diğer çalışmalar.....	24
Çizelge 2.3. Bazı bitkisel fermente gıdalar ve fermentasyondan sorumlu olan mikroorganizmaları.....	26
Çizelge 2.4. TS 9778 Boza standardına göre bozanın kimyasal özellikleri.....	31
Çizelge 2.5. Hardaliyenin antioksidan özelliği, fenolik, besin ve enerji içeriği....	37
Çizelge 2.6. Üzüm ve elma sirkesinin organik asit, fenolik ve mineral içeriği.....	41
Çizelge 2.7. Kombuchanın kimyasal içeriği.....	46
Çizelge 3.1. Cihazın LC ile ilgili parametreleri.....	51
Çizelge 3.2. LC akış gradienti parametreleri.....	51
Çizelge 3.3. Cihazın MS/MS ile ilgili parametreleri.....	52
Çizelge 3.4. Ölçülecek metabolitlere ait LOD ve LOQ değerleri.....	52
Çizelge 3.5. Ölçülecek analitlere ait standart maddelerin geri kazanım oranları...	53
Çizelge 4.1. Fermente ürünlerdeki triptofan ve kinürenin metabolitlerinin miktarları.....	58
Çizelge 4.2. Örneklerin pH, toplam asitlik, kuru madde, nem ve yoğunluk değerleri.....	58
Çizelge 4.3. Fermente ürünlerin toplam fenolik madde miktarları.....	60
Çizelge 4.4. Çeşitli oranlarda seyreltilmiş fermente ürünlerin serbest radikal giderme oranları (% inhibisyon) ve EC ₅₀ değerleri (mg/ml).....	63

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa no
Şekil 2.1. Triptofan'ın kimyasal yapısı.....	4
Şekil 2.2. Triptofan aminoasidinin kullanıldığı yollar.....	5
Şekil 2.3. Serotonin sentezi.....	9
Şekil 2.4. Melatonin sentezi.....	9
Şekil 2.5. Triptamin sentezi.....	10
Şekil 2.6. Santral sinir sistemi ve periferik sistem arasındaki triptofan metabolitlerinin etkileşimi.....	11
Şekil 2.7. Triptofan metabolizmasında kinürenin yolağı.....	13
Şekil 2.8. Kinürenin'in kimyasal yapısı.....	15
Şekil 2.9. Kinürenik asidin kimyasal yapısı.....	15
Şekil 2.10. 3-Hidroksikinürenin'in kimyasal yapısı.....	16
Şekil 2.11. 3-Hidroksiantranilik asidin kimyasal yapısı.....	16
Şekil 2.12. Kinolinik asidin kimyasal yapısı.....	17
Şekil 2.13. Pikolinik asidin kimyasal yapısı.....	17
Şekil 2.14. Boza üretim akış şeması.....	33
Şekil 2.15. Hardaliye üretim akış şeması.....	36
Şekil 2.16. Sirke üretim aşamaları.....	40
Şekil 2.17. SCOBY mayası (Simbiyotik bakteri ve maya kültürü)	44

Şekil 2.18. Kombucha çayı üretim şeması.....	45
Şekil 3.1. Deneyde kullanılan fermente ürünler.....	49
Şekil 3.2. Kombucha çayının hazırlanması.....	50
Şekil 3.3. Ön hazırlık sırasında etanol ile seyreltilen kombucha çayında (solda) ve hardaliyede (sağda) oluşan çökelme veya bulanıklıklar.....	55
Şekil 4.1. Gallik asit standart grafiği.....	59
Şekil 4.2. Fermente ürünlerin toplam fenolik madde içerikleri.....	60
Şekil 4.3. DPPH çözeltisinin 400-600 nm dalgaboyu aralığında spektrum taraması.....	61
Şekil 4.4. Farklı oranlara seyreltilmiş elma ve üzüm sirkelerinin DPPH' süpürme gücü.....	62
Şekil 4.5. Farklı oranlara seyreltilmiş Kırklareli ve Edirne yöresine ait hardaliyelerin DPPH' süpürme gücü.....	62
Şekil 4.6. Farklı oranlara seyreltilmiş kombucha çayının DPPH' süpürme gücü...	63

EKLER DİZİNİ

	Sayfa no
EK-1: Elma sirkesinde LC-MS/MS ile belirlenen triptofan ve metabolitleri (1. ölçüm)	96
EK-2: Elma sirkesinde LC-MS/MS ile belirlenen triptofan ve metabolitleri (2. ölçüm)	100
EK-3: Üzüm sirkesinde LC-MS/MS ile belirlenen triptofan ve metabolitleri (1. ölçüm)	103
EK-4: Üzüm sirkesinde LC-MS/MS ile belirlenen triptofan ve metabolitleri (2. ölçüm)	106
EK-5: Hardaliyede (Edirne) LC-MS/MS ile belirlenen triptofan ve metabolitleri (1.ölçüm)	109
EK-6: Hardaliyede (Edirne) LC-MS/MS ile belirlenen triptofan ve metabolitleri (2.ölçüm)	112
EK-7: Hardaliyede (Kırklareli) LC-MS/MS ile belirlenen triptofan ve metabolitleri (1.ölçüm)	115
EK-8: Hardaliyede (Kırklareli) LC-MS/MS ile belirlenen triptofan ve metabolitleri (2.ölçüm)	118
EK-9: Kombucha çayında LC-MS/MS ile belirlenen triptofan ve metabolitleri (1. ölçüm)	121
EK-10: Kombucha çayında LC-MS/MS ile belirlenen triptofan ve metabolitleri (2. ölçüm)	124
EK-11: Bozada LC-MS/MS ile belirlenen triptofan ve metabolitleri (1. ölçüm)	127
EK-12: Bozada LC-MS/MS ile belirlenen triptofan ve metabolitleri (2. ölçüm)	130

BÖLÜM 1

GİRİŞ

Fermantasyon gıda muhafazasında kullanılan en eski yöntemlerden biridir. Aynı zamanda esansiyel aminoasitler ve vitamin sentezi, fitat ve tanenlerin biyoyararlanımı ve sindirilebilirliğini arttırması yoluyla gıdanın besin değerini artırır, çeşitli tatlar, aromalar ve sosların organoleptik özelliklerini iyileştirir. Ekmek, bira, kırmızı şarap, çay, kahve, turşu, peynir, yoğurt, kefir, sucuk, salam, sirke ve kakao dünyanın birçok yerinde tüketilen fermente ürünlerdir. Bununla birlikte hardaliye, boza, kombucha, kımız, kurut, tarhana gibi çeşitli yerel veya belli bir bölgeye özel fermente ürünler de bulunmaktadır. Fermantasyon işlemi bakteri, küf ve mayaların metabolizmaları tarafından gerçekleştirilmektedir. Bu mikrobiyal etki nedeniyle nihai ürünlerde genellikle ürünün içeriğini ve özelliklerini geliştirici yönde değişiklikler meydana gelmektedir.

İnsanlar için esansiyel aminoasitlerden bir tanesi triptofandır. Triptofan (TRP) aminoasidi insan diyeti için çok önemli bir bileşendir, çünkü insan genomu TRP biyosentezi için gereken enzimleri içermez, ancak yapısındaki indol halkasının biyotransformasyonu için gereken enzimleri içerir. TRP'nin %3-10 kadarı önemli bir nörotransmitter olan serotonin, önemli bir nörohormon olan melatonin ve biyolojik etkili triptamin sentezleri için öncü moleküldür. Ancak metabolizmada triptofan kullanımının çok büyük bir kısmı (%90 kadarı) oksidatif kinürenin yolağı üzerinden gerçekleşen metabolik yoldur ve bu sırada kinürenin, kinürenik asit, 3-hidroksikinürenin, antranilik asit, 3-hidroksiantranilik asit, kinolinik asit ve nikotinik asit metabolitleri ile son ürün olan nikotin adenin dinükleotid sentezlenir.

Normal şartlarda diyetle triptofan alımında azalma endojen triptofan konsantrasyonunun azalmasına neden olur. Pek çok hastalık azalan triptofan miktarıyla veya triptofanın büyük bir kısmının kullanıldığı kinürenin yolağı ile ilişkilendirilmektedir. Bu sebeple son yıllarda çeşitli gıdalar eksojen triptofan kaynağı olarak ve/veya nöroaktif kinürenin yolağı metabolitleri açısından incelenmektedir. Yapılan çalışmalarda ekmek, bira, kırmızı şarap, beyaz peynir, yoğurt, kefir ve kakao fermente ürünlerindeki triptofan, kinürenin, kinürenik asit, niasin ve nikotinamid tayini; ticari olarak satılan 56 çeşit alkollü içecek, 16 çeşit çay, 13 çeşit kahve, çeşitli sebzeler ve arı ürünlerini içeren 37 çeşit gıdada kinürenik asit tayini yapılmıştır. Gıdalardaki triptofan, kinürenin ve kinürenin metabolitlerinin tayini için HPLC, UPLC-MS, LC-MS/MS gibi enstrümental yöntemler kullanılmaktadır.

Kinürenin yolağındaki metabolitlerden kinürenik asit ve pikolinik asit nöroprotektan özellik gösterirken, kinolinik asit, 3-hidroksiantranilik asit ve 3-hidroksikinürenin nörotoksik özelliktedir. Bu yolaktaki metabolitlerin beyindeki çeşitli reseptörler üzerinde agonist veya antagonist etkilerinin olduğu keşfedildikten sonra, yaklaşık otuz yıllık bir süredir araştırmacıların ilgisi kinürenin yolağına çevrilmiştir. Son yıllarda ise santral sinir sisteminin yanında kinürenin yolağının immün sistemle olan ilişkisi de araştırılmaktadır. Bağırsaklardaki mikrobiyota immün sistemle ilişkili olan IDO (indolamin 2,3-dioksijenaz) enziminin aktivasyonu yoluyla kinürenin yolunu etkilemektedir ve aktive olan kinürenin yolağının oluşturduğu nöroaktif metabolitler kan dolaşımına katılarak bağırsak-beyin arasındaki sinyalleri etkileyebilmektedirler. Bağırsak mikrobiyotası ile immün sistem ve TRP metabolizması arasında ilişki vardır. Ayrıca TRP karaciğere ulaşmadan önce bağırsak mikrobiyotası tarafından kinürenin sentezi de gerçekleşir.

Fermantasyon sırasında gıdada meydana gelen değişimler, fermantasyonu yapan mikroorganizmaların metabolizmal faaliyetleri sonucu oluşur ve bazı mikrobiyal metabolitlerin oluşumuna da yol açar. Bu tez çalışmasının ana amacı fermente ürünler olan hardaliye, boza, kombucha çayı, elma ve üzüm sirkelerinde triptofan aminoasidi ve onun ana kullanım yolu olan kinürenin yolağındaki bileşiklerini tayin etmek ve çalışılacak fermente ürünleri bu yolaktaki biyolojik aktif içerikleri yönünden incelemektir. Yeşil çay ve koyu renkli üzümler iyi birer antioksidan kaynağıdır ve doğal ürünlerin antioksidan etkisi geniş bir aile olan polifenolik bileşikler başta olmak üzere

askorbik asit, karotenoidler, glukosinolatlar, tokoferoller gibi bileşenlerinden ileri gelir. Dolayısıyla yeşil çay ve üzümünden üretilen fermente ürünlerin de fenolik içeriği ve antioksidan gücünün yüksek olacağı varsayılarak, çalışmanın devamında tüm fermente ürünlerde toplam fenolik bileşen miktar tayini ve en yaygın kullanılan antioksidan aktivite tayin yöntemlerinden olan DPPH radikalini giderme testi yapılmıştır. Ayrıca bu ürünlere gıdaların nitel ve nicel kalite kontrollerinde kullanılan pH, toplam asitlik (%), yoğunluk, nem ve kuru madde tayinleri gibi temel analizler yapılarak, literatüre ve mevzuata uygunlukları yönünden incelenmiştir.

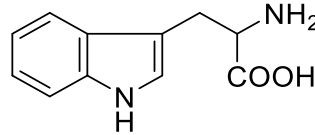
Yapılan literatür taramasına göre çeşitli fermente ürünlerde ağırlıklı olarak kinürenik asit tayini yapılmıştır; boza, sirke, kombucha ve hardaliye fermente ürünlerinde triptofan ve kinürenin yolağıyla ilgili metabolit tayinine rastlanmamıştır. Bu tez çalışmasında L-triptofan, L-kinürenin, kinürenik asit, 3-hidroksi kinürenin, nikotinik asit (niasin) ve nikotinamid bileşikleri LC-MS/MS cihazı ile tayin edilmiştir. Böylece daha önce çalışılmamış olan bu fermente ürünlerdeki triptofan ve bazı kinürenin yolağı metabolitlerinin miktarları hakkında bilgi edinilerek, bu ürünlerin insan diyetine katkıları değerlendirilmiştir.

BÖLÜM 2

GENEL BİLGİLER

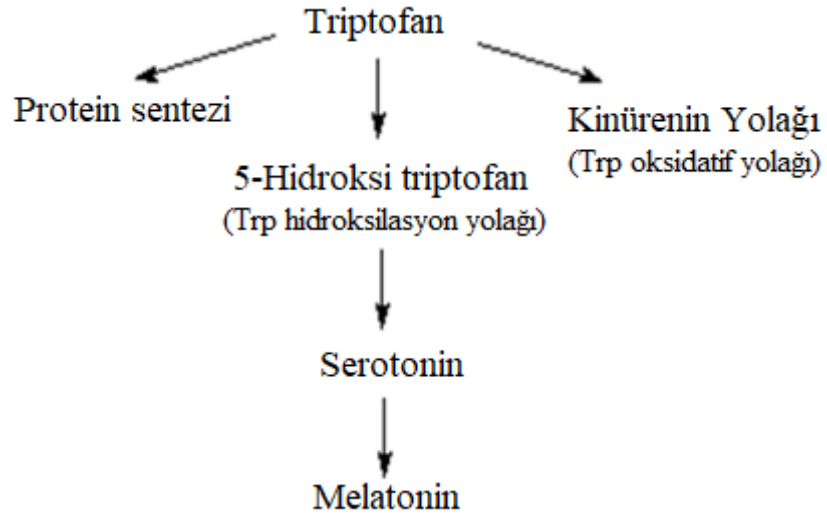
2.1. Triptofan

Triptofan 1900'lerin başında Hopkins ve Cole tarafından kazeinden, Hopkins-Cole ya da triptofan reaksiyonu olarak bilinen işlemler sonrasında izole edildi. Yapısı Ellinger ve Flamand tarafından belirlendi, ilk kez 1949 yılında sentezi yapıldı. Triptofan insanlar için esansiyel bir aminoasit iken, bitki, mantar ve mayalar tarafından sentezlenebilmektedir (Richard vd., 2009).



Şekil 2.1. Triptofan'ın kimyasal yapısı

Yapısında indol halkası bulunduran triptofanın kapalı formülü $C_{11}H_{12}N_2O_2$ olup, IUPAC'a göre 2-amino-3-(1H-indol-3-il) propiyonik asit olarak adlandırılır. Molekül ağırlığı 204,23 g/mol'dür. Triptofan sıcak alkol ve alkalide çözünebilir, glukojenik ve ketojenik bir aminoasittir (Kurtulmuş ve Kök-Taş, 2015; Tryptophan, 2021). L-triptofanın acı bir tadı varken, sentetik D-triptofan sakkarozdan yaklaşık 40 kat daha tatlıdır ve metabolize olmadığı için tatlandırıcı olarak kullanılabilir (Bender, 1982; Richard vd., 2009). Periferik dokular ve santral sinir sisteminde triptofanın temel kullanım yolu kinürenin yolağıdır.



Şekil 2.2. Triptofan aminoasidinin kullanıldığı yollar

Triptofan proteinlerde diğer aminoasitlere göre daha az (yaklaşık %1-1.5) bulunmaktadır. Triptofan miktarının az olması onun protein sentezinde hız kısıtlayıcı özellik ve önemli bir yapı taşı etkisi göstermesine neden olur. Yetişkinler için günlük alım miktarı 250-425 mg/gündür ve bu miktar da 3.5-6 mg/kg vücut ağırlığı ile karşılanabilir. Triptofanca zengin gıdalar yulaf, muz, çikolata, kuru erik, tavuk, yer fıstığı, chia tohumu, ekmek, susam, somon ve bazı peynir türleridir (Peters, 1991; Richard vd., 2009).

Triptofanca yetersiz beslenilmesi halinde eksikliği merkezi, periferik ve serotonerjik yolları etkilediği gibi depresyon, pellegra hastalığı, hartnup hastalığı ve uyku düzeninde bozulmalar da görülebilir. Uyku bozukluğunun melatonin metabolizması üzerinden tedavi edildiği düşünülmektedir (Fukuwatari ve Shibata, 2013; Kałużna-Czaplińska, Gałtarek, Chirumbolo, Chartrand ve Björklund, 2017). Triptofan ve metabolitleri stres durumu, endokrin sistem (Höglund, Overli ve Winberg, 2019), büyüme, davranış ve immün sistem üzerinde etkilidir (Le Floch, Otten ve Merlot, 2011). İnsanlar üzerinde yapılan çeşitli araştırmalar diyetle alınan triptofan miktarının değişmesinin sinirlilik ve saldırganlık gibi agresif davranışlara neden olabileceğini göstermiştir (Höglund vd., 2019). Fazla tüketimi durumunda toksik ve oksidatif etkilerinin olabileceği ve bunların özellikle kinürenin yolağında oluşan bazı toksik etkili metabolitlerden kaynaklanabileceği bildirilmiştir (Le Floch vd., 2011). Triptofanın akut tükenmesi ile oluşan davranışsal, psikolojik ve fiziksel değişikliklerin (taşıt tutması, uyku, ruh hali, görsel ayırt etme, sosyal bilgi işleme, bellek süreçleri, majör depresif

bozukluk, mevsimsel duygulanım bozukluğu, bipolar bozukluk, obsesif-kompulsif bozukluk, şizofreni, bulimia nevroza, premenstrüel sendrom, panik bozukluk gibi) incelenmesi üzerine yapılan çalışmada ruh hali, depresyon ve mevsimsel duygulanım bozukluklarıyla ilgili etkilerinin serotonin metabolizması üzerinden olduğu, özellikle geçmişinde ya da genetik olarak daha önce bu durumları yaşayan kişilerin triptofan tükenmesine karşı daha duyarlı olduğu sonucuna ulaşılmıştır (Richard vd., 2009). Bilişsel süreçler incelendiğinde hem sağlıklı kişilerde hem serotonerjik kırılmaları olan kişilerde triptofan tükenmesinin, öğrenme ve hafıza becerilerinde bozulmalar ve hatırlama güçlüğü üzerine olduğu görülmüştür (Sambeth vd., 2007). Bellekte yaşanan sıkıntıların triptofanın kinürenin metabolitlerinden olan kinürenik asit ve kinolinik asit ile ilgili olabileceği düşünülmektedir (Richard vd., 2009). Dikkat eksikliği-hiperaktivite bozukluğuna (DEHB) sahip ergenler ve sağlıklı kontrol grupla yapılan karşılaştırma çalışmasında, triptofan tükenmesi sonucunda ölçülen saldırganlık davranışı yaş ve DEHB yoğunluğundan bağımsız olarak artmıştır (Stadler vd., 2008).

Triptofanın tedavide kullanımıyla ilgili çeşitli araştırmalar da yapılmıştır. Özellikle depresyonda monoamin oksidaz inhibitörü (MAOI) tek başına ve triptofan ile birlikte kullanıldığında, MAOI ile triptofanı kombine kullanan hastaların büyük bir kısmının iyileştiği görülmüştür (Young, 1996). Mevsimsel duygudurum bozukluklarında, kış döneminde de tekrarlayan majör depresif bozukluklarda ışık tedavisine yanıt vermeyen hastalara, ek olarak triptofan verilmesiyle birlikte iyileşme başladığı görülmüştür (Lam vd., 1997). Premenstrüel disforik bozukluk semptomlarında triptofan verilen hastaların duygu dalgalanmalarında ve sinirliliklerinde azalmalar olduğu görülmüş ve bunun döngü sırasında artan kinürenin sentezinden kaynaklandığı düşünülmüştür (Hrboticky, Leiter ve Anderson, 1989). Sigarayı bırakan kişilerde yüksek karbonhidrat diyetiyle beraber tüketilen triptofanın yoksunluk sıkıntılarını azalttığı ve günlük sigara sayısında azalma olduğu görülmüştür (Bowen, Spring ve Fox, 1991). Triptofan doğal, reçetesiz ilaç olarak ağrı, uykusuzluk, depresyon, mevsimsel duygulanım bozukluğu, bulimia, dikkat eksikliği, hiperaktivite, kronik yorgunluğun tedavisi gibi geniş yelpazeli uygulama alanlarında kullanılmaktadır (Richard vd., 2009).

Vücuda alınıp emilen L-triptofan albümine bağlı ya da serbest halde dolaşıma katılır. Albümine bağlı olarak taşınan triptofan protein sentezi için kullanılırken, serbest triptofan protein sentezinde kullanılmaz. Albümine bağlı taşınan kısım emilen triptofanın

yaklaşık %90'dır. Serbest triptofan kan beyin bariyerini geçebilir ve “büyük nötral aminoasit (LNAA) taşıyıcılar” ile yarışmalı olarak taşınır. Yarışmalı olduğu aminoasitler izöloşin, lösin, metiyonin, fenilalanin, treonin, tirozin ve valindir. Triptofanın beyne girişi aynı taşıyıcıyı kullanan bu aminoasitlerin plazma konsantrasyonlarından etkilenir. Bu aminoasitlerin plazma konsantrasyonları triptofana göre daha yüksek olduğu için, beyne TRP girişi azdır. Ancak diyetle karbonhidrat alımı beyne TRP girişini arttırmaktadır; bu insülin düzeyinin artmasının TRP aksine diğer büyük aminoasitlerin iskelet kasına girişini arttırması ve bunun sonucunda TRP/LNAA oranının artmasıyla gerçekleşmektedir. Ayrıca plazmanın beyin kapiler damarlarından geçişi sırasında triptofan-albümin kompleksinin ayrılması ve triptofanın kan beyin bariyerindeki aminoasit taşıyıcısına affinitesinin albümine olan afinitesinden daha yüksek olması sebebiyle triptofanın beyne geçişi kolaylaşır (Höglund vd., 2019). Serbest triptofanın merkezi sinir sistemine girdikten sonra kullanıldığı metabolik yollar kinürenin, serotonin ve melatonin sentezleridir. Kinürenin yolu triptofan metabolizmasının memelilerdeki ana yolağını oluşturur.

2.2. Triptofanın Kullanıldığı Yollar

2.2.1. Protein Sentezi

Diyetle alınan triptofanın asıl görevi protein sentezine katılmaktır, bu amaçla albümine bağlı olan triptofan kullanılır. Triptofan diğer amino asitlere göre daha küçük miktarlarda bulunduğu için protein sentezini sınırlandırıcı basamak görevinde olduğu düşünülmektedir. Triptofanın karaciğerde protein sentezinin düzenlenmesindeki görevi daha etkili olmakla birlikte, diğer dokularda da protein sentezini etkilemektedir. Karaciğerde mRNA sentezini arttırır ve ribozom agregasyonunu uyarır (Peters, 1991; Richard vd., 2009).

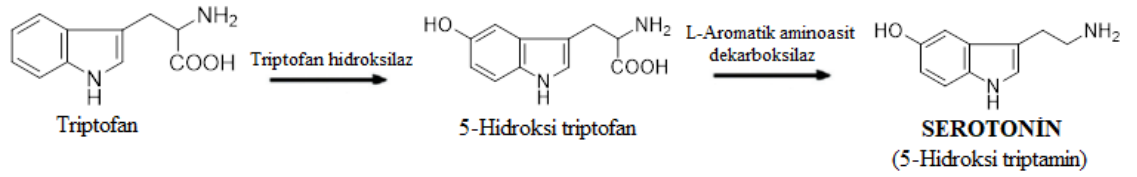
2.2.2. Serotonin Sentez Yolu

Mutluluk hormonu olarak bilinen serotonin kimyasal olarak 5-hidroksitriptamin (5-HT)'dir. İlk olarak Erspamer enterokromafin hücrelerinde bir indol türevine rastlamış ve onu enteramin olarak isimlendirmiştir. 1948 yılında Page ve Rapport trombositlerde rastladıkları maddeyi 1966 yılında serotonin olarak tanımlamışlardır. Merkezi sinir sistemi, enterokromafin hücreleri ve gastrointestinal sistemde sentezlenebilen serotoninin

nörotransmitter etkileri Brodie ve Shore'un yaptıkları araştırma sonucunda ortaya çıkmıştır (Sağlam, Yarış ve Bilge, 2003; Taşkıran, 2019). Merkezi ve periferel sinir sisteminde, kardiyovasküler sistem, organ gelişimi, sindirim sistemi, endokrin fonksiyonlarında, duyu kavrama, kemik metabolizması, karaciğer onarımı, uyku, iştah, duygu durum, cinsellik, obezite, kusma, kronik baş ağrıları, hafıza, biliş sistemi, depresyon, intihar, stres, dürtüsellik ve saldırganlık gibi konularda önemli fizyolojik görevleri olan biyolojik bir monoamindir. Serotoninin az salgılanması otizm, bulimia, anoreksiya ve obeziteyle de ilişkilendirilebilir (Kałużna-Czaplińska vd. 2017; Taşkıran, 2019). Biyokimyasal araştırmalar sonucunda beyinde yedi farklı, toplamda yaklaşık on beş çeşit reseptörü tanımlanmıştır. Bu reseptörler farklı veya zıt etkili olabilirler (Öztepe-Yavaşçı ve Akkaya, 2012).

Serotoninin yaklaşık %95'i gastrointestinal sistemde bulunurken, diyetle alınan triptofanın yaklaşık %3'ü serotonin sentezi için kullanılabilir ve yine diyetle alınan triptofanın %1 kadarı beyinde serotonin sentezinde kullanılmaktadır. Beyinde serotonin sentezi düşük miktarlarda olmasına rağmen serotoninin nörotransmitter olarak ve nöromodülatör olarak geniş ve önemli etkileri vardır (Richard vd., 2009).

Triptofandan 5-HT'nin sentezlenmesi iki aşamada (Şekil 2.3) ve bağırsak hücreleri, trombositler, enterokromafin hücreler ve merkezi sinir sisteminin farklı yerlerinde gerçekleşir. İlk aşamada triptofan hidroksilaz (TPH) (EC.1.14.16.4) enzimiyle triptofan hidroksillenir ve 5-hidroksitriptofan (5-HTP) oluşur. Triptofan hidroksilaz enziminin kofaktörleri tetrahidrobiopteridin ve oksijendir. 5-hidroksitriptofan kofaktör olarak B₆ vitaminini kullanan L-aromatik aminoasit dekarboksilaz enzimi ile 5-hidroksitriptamine dönüştürülür. 5-HT sentezinin hız sınırlandırıcı basamağı ilk aşamadaki triptofan hidroksilaz enzimidir. Triptofan hidroksilazın iki izoformu vardır; TPH1 nöronlarda ve TPH2 enterokromafin hücrelerinde bulunur. Beyindeki triptofan miktarına bağlı olarak triptofan hidroksilaz enziminin aktivitesi değişir. 5-HTP kan beyin bariyerini geçebilirken serotonin geçemez (Höglund., 2019; Le Floch vd., 2011; Kałużna-Czaplińska vd. 2017; Peters, 1991).

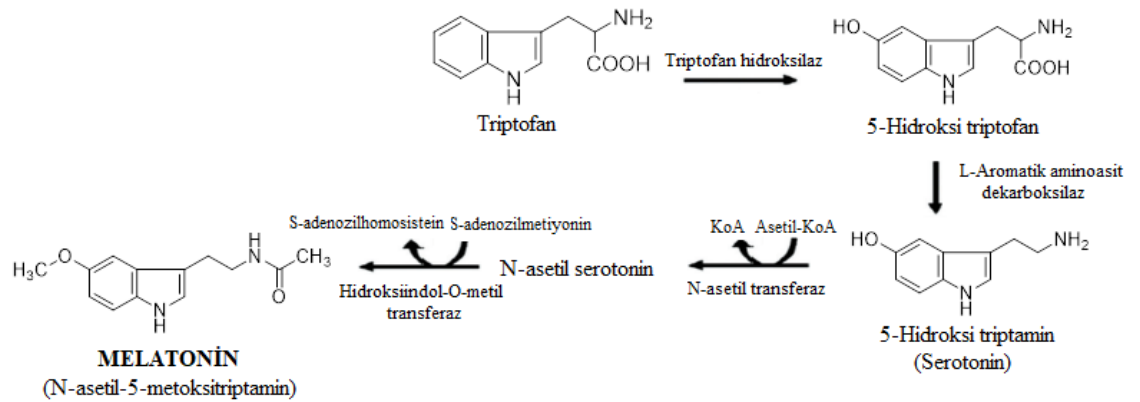


Şekil 2.3. Serotonin sentezi (Kurtulmuş ve Kök-Taş, 2015)

Serotonin muz, domates, avokado, fındık, kahve gibi birçok yiyeceklerde bulunur. Fakat bu gıdaların diyetle alımı sonrasında çeşitli enzimlerce bağırsak ya da karaciğerde parçalandığından serotonin istenilen düzeylerde dolaşıma katılamamaktadır (Kurtulmuş ve Kök-Taş, 2015).

2.2.3. Melatonin Sentez Yolu

Melatoninin ilk keşfi 1958 yılında kurbağa derilerindeki pigmentler üzerine yapılan çalışmalarda olmuştur (Coates vd., 2005). Melatonin (N-[2-(5-metoksi-1H-indol-3-il)etil]) triptofandan epifiz bezi, retina, gastrointestinal sistem, trombosit ve eritrosit gibi çeşitli doku ve hücrelerde sentezlenebilen bir nörohormondur (Kurtulmuş ve Kök-Taş, 2015; Yılmaz ve Gökmen, 2019). Melatonin sentezinde de serotonin sentezi gibi öncü olarak triptofan kullanılır. Serotonin oluşumundan sonra N-asetiltransferaz enziminin asetilleme reaksiyonu ile N-asetil serotonin, sonrasında hidroksiindol-O-metiltransferaz enziminin metillenmesiyle N-asetil-5-metoksitriptamin (melatonin) sentezlenmiş olur (Şekil 2.4) (Yılmaz ve Gökmen, 2019). Sentezlenen melatonin kana ve beyin omurilik sıvısına salgılanır ve ikincil haberci sentezi, uyku-sirkadiyen ritim ve diğer organlara sinyal iletimi gibi fonksiyonları vardır.



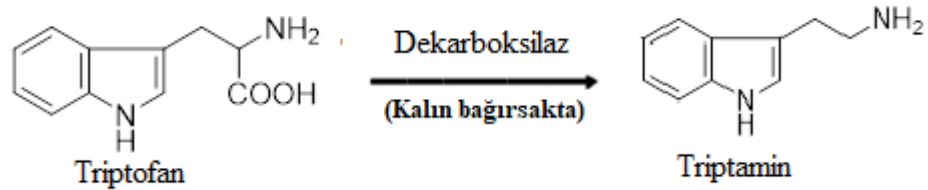
Şekil 2.4. Melatonin sentezi (Öztürk ve Yabancı-Ayhan, 2020)

Melatonin pirinç, arpa gibi tahıllardan, kiraz, muz, üzüm, çilek, domates, portakal, fındık, hardal tohumu ve fermente ürünler gibi besinlerden diyetle de alınabilir. Diyetle alınan melatonin gastrointestinal sistemde emilir ve karaciğerde metabolize olur (Kurtulmuş ve Kök-Taş, 2015).

Melatonin genellikle uyku hormonu olarak bilinmesine karşın sirkadiyen ritim, üreme, bağışıklık ve gastrointestinal sistemleri düzenler, kan şeker seviyesinin dengelenmesinde ve insülin duyarlılığının azaltılmasında görev alır. Ayrıca antioksidan ve antikanser etki gösterir, Alzheimer, Parkinson gibi hastalıklar, yaşlanma ve depresyon karşıtıdır (Kurtulmuş ve Kök-Taş, 2015; Richard vd., 2009). Yaşlanma ile melatonin salınımı azalmaktadır. 55 yaş üzerinde yapılan bir araştırmada dışardan melatonin alımı sonrasında uykuya geçiş sürelerinin kısalması ve uyku kalitesinin arttığı sonucuna ulaşılmıştır (Özçelik, Erdem, Bolu ve Gülsün, 2013). Ülkelere göre kuralları değişmekle birlikte melatonin gıda takviyesi olarakta kullanılmaktadır (Özçelik vd., 2013).

2.2.4. Triptamin Sentezi

Triptofanı substrat olarak kullanan biyolojik aktif bileşiklerden bir diğeri de triptamindir. Triptofanın dekarboksilaz ve triptofanaz enzimlerinin etkisiyle dekarboksilasyona uğraması ile küçük konsantrasyonlarda bağırsak mikrobiyotası tarafından indol türevleri ve triptamin sentezlenir (Şekil 2.5). Triptamin serotoninin nöromodülatörü olarak çalışır. Hayvanlar üzerinde yapılan çalışmalarda triptaminin serotonin uyarıcı ya da inhibitör fonksiyonları arasında denge, kontrol görevi gördüğü ve bunlara ek olarak tek başına bazı reseptörler üzerinde nörotransmitter olarak da etki ettiği tespit edilmiştir. İndoller insan fizyolojisinde metabolik homeostas ve bağışıklık sistemi olgunlaşması ve stimülasyonu gibi bir çok önemli işleve sahiptir (Melhem ve Taleb, 2021; Richard vd., 2009).

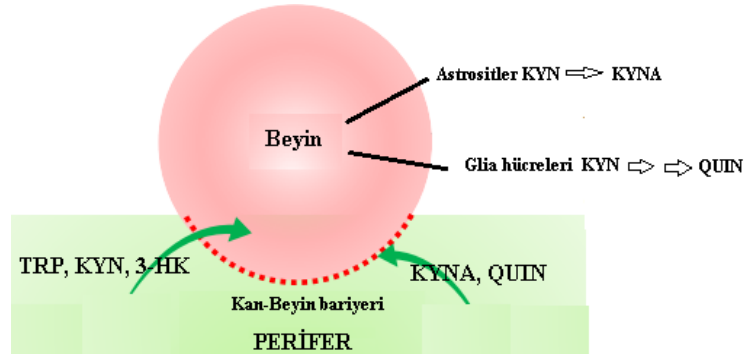


Şekil 2.5. Triptamin sentezi (Melhem ve Taleb, 2021)

2.2.5. Kinürenin Yolağı

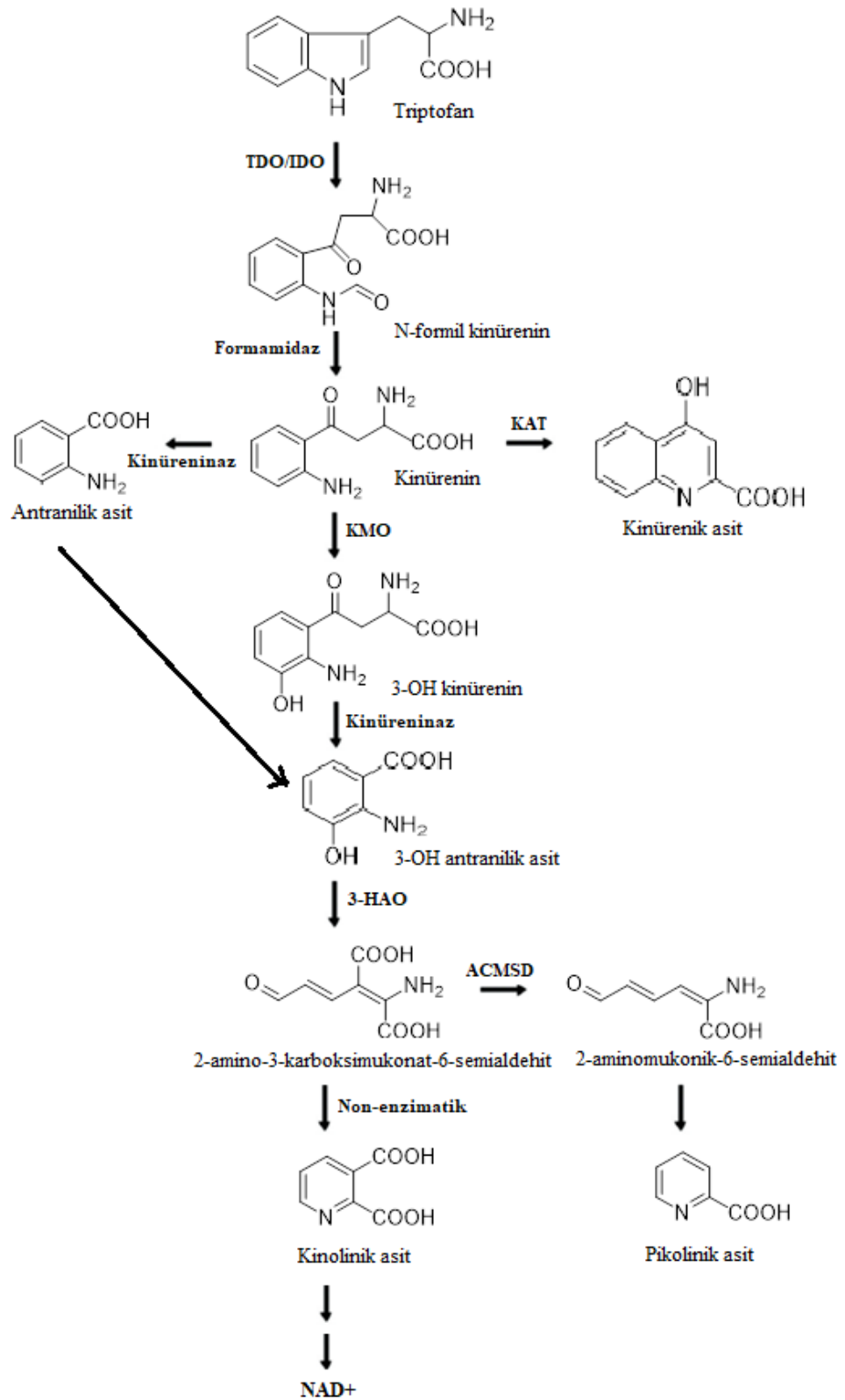
Kinürenin yolağı triptofanın protein sentezinden sonra kullanıldığı ana yoldur. 1853 yılında triptofanla beslenen hayvanların atıklarında metabolitlerin saptanmasıyla bu yolak keşfedilmiştir. 1960'lı yıllarda yolağın enzimleri ve aktiviteleri tamamen aydınlatılmıştır. Bazı bakteri türlerinde de kinürenin yolağının bulunmasıyla enzimlerinin moleküler düzeyde incelenmesi mümkün olmuştur. Bu sayede kinürenin yolunun metabolizması, enzimleri, metabolitleri, kimyasal dönüşümleri ve hastalıklarla ilişkisi aydınlatılmıştır. Bu yolak ilk keşfedildiğinde nikotinamid adenin dinükleotid (NAD) sentezi için çalıştığı düşünülmüşse de yolakta oluşan bileşiklerin nörodejeneratif hastalıklar, tümör proliferasyonu, inflamasyon ve depresyon ile ilişkileri olması sonucunda çalışmalar artmıştır. Kinürenin yolunun aktifleşmesiyle serotonin yolunun çalışması yavaşlar. Protein sentezinde kullanılmayan triptofanın yaklaşık %99'u bu yolakta kullanılır (Davis ve Liu, 2015; Höglund., 2019).

Kinürenin metabolizmasının enzimleri pekçok organ ve dokuda (beyin, barsak, immün sistem hücreleri gibi) bulunmasına rağmen, bu metabolizmanın kinürenin metabolizmasının bütün enzimleri sadece hepatosit hücrelerinde bulunur. Yolağın beyindeki reaksiyonları mikroglia ve astrosit hücrelerinde gerçekleşir. Triptofan metabolitleri periferik ve merkezi sinir sistemi arasında etkileşim halindedir. Triptofan ve yolak boyunca oluşan metabolitlerden kinürenin (KYN), 3-hidroksikinürenin (3-HK) ve antranilik asit (AA) kan beyin bariyerini geçebilirler, bunun sonucunda kandaki konsantrasyonları değişebilir ve beyindeki yolağın aktivasyonu etkilenir. Kinürenik asit (KYNA), 3-hidroksiantranilik asit (3-HAA) ve kinolinik asit (QUIN) metabolitleri ise kan beyin bariyerinden çok az geçebilirler (Şekil 2.6) (Van der Goot ve Nollen, 2013).



Şekil 2.6. Santral sinir sistemi ve periferik sistem arasındaki triptofan metabolitlerinin etkileşimi (Török, Tanaka ve Vecsei, 2020)

Triptofan yıkımını Şekil 2.7’de görüldüğü gibi başlıca iki enzim tarafından başlatılır. Aynı reaksiyonu katalizleyen bu izoenzimler “hem” proteinidirler, sentezlendikleri dokularda ve uyarılarında farklılıklar vardır (Çizelge 2.1). Triptofan 2,3-dioksijenaz (TDO, EC.1.13.11.11) ve indolamin 2,3-dioksijenaz (IDO, EC.1.13.11.52) enzimlerinin triptofanın indol halkasının açarak 2. ve 3. karbonlara iki molekül oksijen ilave eder, böylece kinürenin yolağının ilk bileşiği olan N-formilkinürenin oluşur. N-Formilkinüreninden kinürenin formamidaz enzimiyle ilk kararlı ara bileşik olan kinürenin meydana gelir. Kinürenin çoklu enzimlerin etkisiyle birden fazla metabolite katabolize edilebilir; kinüreninaz enzimiyle antranilik asit, kinürenin-3-monooksijenaz (KMO) enzimiyle 3-hidroksikinürenin ve mikroglia veya astrositlerde kinürenin amino transferaz (KAT) enzimiyle kinürenik asite dönüşür. 3-HK sentezinden sonra oluşan metabolitler mikrogliyalarda oluşurken, kinürenik asit astrositlerde oluşur (Şekil 2.6). 3-HK kinüreninaz enzimi etkisiyle veya antranilik asidin oksidasyonu ile 3-hidroksiantranilik asit sentezlenir. Triptofandan kalan aromatik halkayı açmak için ikinci bir dioksijenaz olan 3-hidroksiantranilik asit dioksijenaz (3-HAO) enzimi 3-HAA’dan 2-amino-3-karboksimukonat-6-semialdehiti (ACMS) sentezler. ACMS’den aminokarboksimukonat semialdehit dekarboksilaz (ACMSD) enzimi ile pikolinik asit sentezini gerçekleştirir. ACMSD enziminin ortamda olmaması halinde ise non-enzimatik olarak NAD öncüsü olan kinolinik asit (QUIN) oluşur. QUIN 5-fosforibosil-1-pirofosfat varlığında kinolinik asit fosforibosiltransferaz (QPRT) enzimiyle nikotinik asit mononükleotidine dönüşür ve nikotinik asit adenin dinükleotidi yoluyla NAD sentezi tamamlanmış olur (Chen ve Guillemin, 2009; Davis ve Liu, 2015; Fukuwatari ve Shibata, 2013; Melhem ve Taleb, 2021).

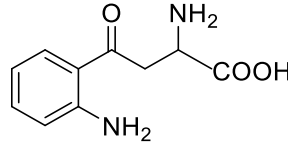


Şekil 2.7. Triptofan metabolizmasında kinürenin yolu (TDO: Triptofan 2,3-dioksijenaz; IDO: İndolamin 2,3-dioksijenaz; KMO: Kinürenin monooksijenaz; KAT: Kinürenin aminotransferaz; 3-HAO: 3-Hidroksiantranilat-3,4-dioksijenaz; ACMSD: Aminokarboksimumkonat-semialdehit dekarboksilaz)

Çizelge 2.1. TDO ve IDO enzimlerinin farklılıkları (Chen ve Guillemin, 2009; Taylor ve Feng, 1991)

	IDO	TDO
Substrat	İndolamin türevleri; triptofan, 5-HTP, 5-HT, triptamin	Triptofan
Oksijen Kaynağı	O ₂ ⁻ ve O ₂	O ₂
Bulunduğu Dokular	Ekstrahepatik hücreler, makrofajlar, mikroglialar, astrositler ve daha birçok hücre	Genellikle Karaciğer
Uyarıcılar	İnterferonlar (INF- γ), İnflamasyon sitokinleri, İnfluenza virüsü, Lipopolisakkaritler, Amiloid peptidler	Triptofan, Tirozin, Histidin, Fenilalanin, Kinürenin, Hidrokortizon, Glukokortikoid
Molekül Ağırlığı	42.000	320.000

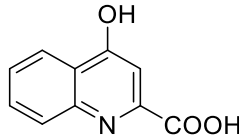
Kinürenin, bu metabolizmada oluşan ilk kararlı bileşiktir ve diğer nöroaktif bileşiklerin oluşumu için anahtar rolündedir (Chen ve Guillemin, 2009). Ayrıca kinüreninin gözün retinasını ultraviyole hasarından koruyan bir UV filtresi olarak görev yaptığı bilinmektedir (Richard vd., 2009). Ayrıca kinüreninin in vitro olarak insan periferik kan lenfositlerini azalttığı tespit edilmiştir. Kinürenin yolu üzerinde oluşan metabolitlerin çeşitli pro ve antioksidan aktiviteleri olduğu bilinmektedir. Özellikle kinolinik ve kinürenik asitler nörotransmitterleri etkileme potansiyelindedirler; kinürenik asit glutamat reseptörlerini yarışmalı şekilde antagonize ve α 7-nikotinik asetilkolin reseptörünü yarışmasız şekilde inhibe ederken, kinolinik asit eksitotoksin ve N-metil-D-aspartik asit (NMDA) reseptör agonisti olarak davranır. Pikolinik asit nöroprotektan özellik gösterirken, 3-HAA ise serbest radikal oluşturuucu özelliktedir (Chen ve Guillemin, 2009; Davis ve Liu, 2015; Richard vd., 2009).



Şekil 2.8. Kinürenin'in kimyasal yapısı

Kinüreninin bir ksenobiyotik reseptörü ve transkripsiyon faktörü olan AhR (aril hidrokarbon reseptörleri) için endojen bir ligand olduğu ve endotel hücrelerinde bir vazodilatör olarak rol oynayabileceği keşfedildikten sonra, fizyolojik olarak inert kabul edilen kinüreneine olan ilgi artmıştır. Çünkü AhR sinyali immün tolerans, tümörlerin hayatta kalması, hücre yapışması ve göçü için kritiktir. KYN-AhR sinyalleşmesine odaklanan çalışmalar, gelecekte beyin tümörleri ve nöroinflamasyon için potansiyel bir terapötik hedef olarak önem arzetmektedir (Mithaiwala, Santana-Coelho, Porter ve O'Connor, 2021).

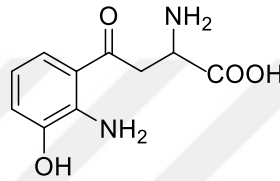
Kinürenik asit, beyinde nanomolar konsantrasyonda bulunan endojen bir nöroprotektandır (Moroni, Russi, Lombardi, Beni ve Carla, 1988). Kinolinik asidin antagonisti olan kinürenik asit, düşük konsantrasyonlarda NMDA reseptörünün glisin modülatör bölgesi üzerinde ve yüksek konsantrasyonlarda NMDA reseptörlerinin glutamat bölgesinde ve ayrıca α -amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazolpropionat (AMPA) reseptörlerinde etki eder. Seçici olarak da G protein kenetli GPR-35'i aktive ederken, $\alpha 7$ nikotinik asetilkolin reseptörünü inhibe eder (Chen ve Guillemín, 2009). Beyindeki kinürenik asit artışlarının yatıştırıcı, antikonvülsan etkili ve beyin iskemisine karşı koruyucu olduğu bulunmuştur (Carpenedo vd., 1994). Şizofreni hastalarında beyin omurilik sıvısındaki kinürenik asit artışı, glutamaterjik ve dopaminerjik sistemlerindeki etkileri ve şizofreni patojenezindeki rolüne dair açıklama sağlamıştır (Chen ve Guillemín, 2009).



Şekil 2.9. Kinürenik asidin kimyasal yapısı

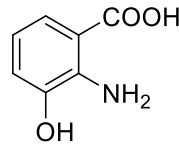
3-Hidroksikinürenin büyük nötr aminoasit taşıyıcıyı devreye sokarak kan beyin bariyerini geçebilir. Yüksek 3-HK seviyeleri, merkezi sinir sistemi inflamatuvar bozukluklarında yaygın bir bulgudur (Mithaiwala vd., 2021). 3-HK, hem pro-oksidan

hem de antioksidan özellikleriyle bilinmektedir; 3-HK'nin oksidasyonu nöronların 3-HK aracılı toksisitesine katkıda bulunan süperoksit anyonu ve hidrojen peroksit üreterek lipid peroksidasyonuna yol açmasının yanında, 3-HK aynı zamanda serbest radikal süpürücü olarak da işlev görebilir. Bu durum 3-HK düşük konsantrasyonlarda kullanıldığında prooksidan olarak davranması, daha yüksek konsantrasyonlarda ise glutatyon-S-transferaz, süperoksit dismutaz ve nükleer faktör eritroidinin uyarılmasıyla ilişkili olmasıyla açıklanmaktadır (Mithaiwala vd., 2021). 3-HK'nin nörotoksik etkileri serbest radikal oluşumuyla ilgilidir, artan 3-HK seviyeleri Alzheimer ve Huntington hastalığı ile ilişkilendirilmiştir (Groth, Venkatakrishnan ve Lin, 2021).



Şekil 2.10. 3-Hidroksikinürenin'in kimyasal yapısı

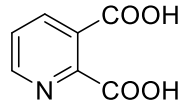
3-Hidroksiantranilik asit, nörotoksik özelliklidir ve immün sistem regülasyonunda rol alır. Bakır varlığında serbest radikal olan süperoksit ve hidrojen peroksit üreticisiyken, askorbik asit veya troloksun eşmolar konsantrasyonlarında peroksil radikallerine karşı antioksidan aktivite gösterir (Chen ve Guillemin, 2009).



Şekil 2.11. 3-Hidroksiantranilik asidin kimyasal yapısı

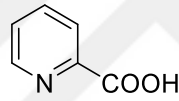
Kinolinik asit, kinürenin yoluna ilgiyi arttıran metabolitlerden birisidir (Davis ve Liu 2015). Glutamat reseptörlerinin nöronal NMDA reseptörlerini seçici olarak aktive eden heterosiklik bir amino asit türevidir (Stone ve Perkins, 1981). Bu özelliğinden dolayı anksiyete, depresyon, epilepsi gibi nörobilişsel bozukluklarla ve Alzheimer hastalığı, Huntington hastalığı gibi çeşitli nörolojik hastalıklarla bağlantısı olduğu düşünülmektedir (Chen ve Guillemin, 2009). Beyinde QUIN konsantrasyonları kan ve diğer dokulara oranla daha düşüktür. Beyinde inflamasyon koşullarında makrofajlar, mikrogliya ve dendritik hücreler QUIN üretiminin ana kaynaklarıdır. Astrositler kinürenin hidroksilaz enzim eksikliği nedeniyle QUIN sentezleyemez, ancak astrosit ve nöronlar QUIN'i alarak

NAD'a katabolize ederler, bundan dolayı nöroprotektif özelliktedirler. Çünkü patolojik durumda üretilen yüksek miktardaki QUIN nöronal hücre ölümüne neden olabilir (Chen ve Guillemine, 2009). QUIN sentez aşaması non-enzimatik olmasına rağmen KMO ve kinüreninaz enzim aktivitelerinin fazla olduğu zamanlarda yüksek miktarlarda QUIN üretimi olduğu tespit edilmiştir (Murakami vd., 2013).



Şekil 2.12. Kinolinik asidin kimyasal yapısı

Pikolinik asit endojen nöroprotektan ve demir, çinko şelatörü olan monokarboksilik asittir (Jhamandas, Boegman, Beninger ve Bialik, 1990). Hücresel büyümeyi kontrol eder, antitümöral, antiviral ve antifungal aktivitelere sahiptir. Pikolinik asit, KYNA'e kıyasla daha az da olsa kinolinik asit kaynaklı nörotoksisiteyi bloke eder (Chen ve Guillemine, 2009).



Şekil 2.13. Pikolinik asidin kimyasal yapısı

NAD (nikotinadenin dinükleotid)'in okside hali NAD^+ ve indirgenmiş formu $NADH$ hücrede önemli görevleri olan redoks kofaktörleridir. NAD^+ glikoliz, oksidatif fosforilasyon ve yağ asitlerinin β -oksidasyonunda elektron taşıyıcısı olarak görev almaktadır. NAD^+ birçok proteinin aktivitesini düzenlemektedir. DNA onarımı, merkezi metabolizma, sirkadiyen ritim, mayoz bölünme ve yaşam süresi gibi hücresel sağlık üzerinde çok önemli etkileri vardır. Hücresel enerji metabolizmasında ve homeostazda merkezi olması nedeniyle, NAD^+ metabolizmasındaki hatalar genellikle diyabet, nörolojik bozukluklar ve çeşitli kanser türlerini de içeren hastalık durumları ile ilişkilidir (Groth vd., 2021).

2.2.6. Triptofan ve Kinürenin Serum Konsantrasyonları

Hepatik TDO (triptofan 2,3-dioksijenaz), triptofan ve kinüreninin fizyolojik konsantrasyonlarının belirli düzeylerde tutulmasında etkilidir. Sağlıklı kişilerde triptofan düzeyi erkeklerde $70 \pm 10 \mu\text{mol/l}$ ve kadınlarda $65 \pm 10 \mu\text{mol/l}$, kinürenin için ise cinsiyet

farkı gözetmeksizin 1.8 ± 0.4 $\mu\text{mol/l}$ olarak bildirilmiştir (Ramprasath, Han, Zhang, Yu ve Zou, 2021). Başka bir çalışmada ise triptofan 73.0 ± 14.9 $\mu\text{mol/l}$, kinürenin 1.92 ± 0.58 $\mu\text{mol/l}$ konsantrasyonlarında ve kinürenin/triptofan (KYN/TRP) oranı 26.9 ± 8.10 $\mu\text{mol/l}$ olarak bildirilmiştir. Triptofan ve kinürenin konsantrasyonları erkeklerde kadınlara göre yaklaşık %15 daha yüksek bulunmuş ve bu farklılık hormonal durumla ilişkilendirilmiştir. hCG (insan koriyogonadotropik) hormonunun gebe olmayan sağlıklı kadınların monositlerinde in vitro olarak IDO gen ifadesini indüklediği bulunmuştur (Schröcksnadel, Wirleitner, Winkler ve Fuchs, 2006). 193 katılımcının (149 erkek ve 44 kadın) kanlarında HPLC ile yapılan ölçümlerde ortalama olarak triptofan düzeyleri 64.8 ± 0.9 $\mu\text{mol/l}$ ve kinürenin düzeyleri 2.4 ± 0.04 $\mu\text{mol/l}$ olarak bulunurken, bu çalışmada da kadınlardaki değerler erkeklere göre istatistiksel olarak anlamlı düşük bulunmuştur (Ünüvar, 2012).

2.3. Kinürenin Yolağının Sağlıkla İlişkisi

Kinüreninden üretilen metabolitler canlılık, adesyon ve göç özellikleri ve ayrıca inflamatuvar potansiyel dahil olmak üzere çeşitli hücre fonksiyonları düzenleyebilir. Bu nedenle TRP metabolizması kronik granümatöz hastalıktan, Alzheimer veya Huntington gibi nörodejeneratif hastalıklara kadar çeşitli hastalıklarda rol almaktadır (Melhem ve Taleb 2021).

TRP katabolizmasının başlangıçta konağı bakteriyel veya viral enfeksiyonlara karşı korumak için doğuştan gelen bir bağışıklık mekanizması olduğu öne sürülmüştür. İnsan fibroblastları tarafından interferon- γ (IFN- γ) ile indüklenen TRP bozunmasının, bu hücrelerde hücre içi parazit *Toxoplasma gondii* büyümesinin bloke edilmesinden sorumlu olduğu gösterilmiştir (Pfefferkorn, 1984).

İnsan serum ve plazmasında IDO enziminin aktivitesinin artması sonucu KYN/TRP oranının da arttığı görülür. Akciğer kanserinin IDO enzim aktivitesiyle olan ilişkisi araştırılmış ve bu amaçla IDO aktivitesini etkileyen başka bir hastalığı olmayan 123 akciğer kanserli hastanın TRP ve KYN oranları LC-ESI/MS/MS ile analizlenmiştir. Çalışma sonucunda akciğer kanserli hastalarda sağlıklı kontrollere göre TRP konsantrasyonlarının çok düşük ve KYN konsantrasyonlarının ise çok yüksek seviyelerde olduğu tespit edilmiştir. Hastalığın ilerlemesiyle de IDO aktivitesi arasında ilişki olduğu gözlemlenmiştir (Suzuki vd., 2010).

TDO ve IDO kinürenin yolunun hız sınırlayıcı enzimleridir ve özellikle IDO1 aktivitesi melanom, kolorektal, meme, akciğer, beyin kanserleri ile ilişkilendirilmiş ve glioma ve glionöronal tümörlerinde yüksek triptofan alımı ve katabolizması olduğu gözlemlenmiştir. Bağırsaklardaki mikrobiyota immün sistemle ilişkili olan IDO1 aktivitesinin regülasyonu vasıtasıyla kinürenin yolunu etkilemektedir ve aktive olan kinürenin yolağının oluşturduğu nöroaktif metabolitler kan dolaşımına katılarak bağırsak beyin arasındaki sinyalleri etkileyebilmektedirler. Bağırsak mikrobiyotası ile immün sistem ve TRP metabolizması arasındaki kolektif ilişki sonucunda; bağırsak mikrobiyotasının TRP katabolizması, inflamatuvar sitokin üretimi, aril hidrokarbon reseptör modülasyonu ve T hücre proliferasyonu yollarıyla direkt veya dolaylı olarak beyin tümör hücrelerinin gelişimine yol açabileceği bildirilmektedir (Dehhagni, Panahi, Heng ve Guillemin, 2020).

Kronik böbrek yetmezliğinde IDO aktivitesi ve KYN/TRP oranının etkisinin araştırıldığı bir çalışmada sabah ve öğleden sonraları IDO, TRP, KYN, KYNA ve 5-HT seviyeleri ölçülmüş ve triptofan seviyesinde önemli bir değişiklik olmazken diğer metabolitlerin miktarlarında büyük oranda artış gözlenmiştir. Bu da IDO'nun inflamasyondan etkilenerek kinürenin yolağını aktifleştirdiğini işaret etmektedir (Scheffold vd., 2009).

Pürin nükleotitlerinden guanozin ürünü olan neopterin vücudun bağışıklık sisteminin, neopterin vücut sıvılarında yüksek konsantrasyonda bulunması ise immün sistemin aktivasyonunun bir göstergesidir. Bu durumun, triptofanın kinürenin yolağında kullanılması ve metabolitlerinin üretimi sonucunda bağışıklık sisteminin çalışmasından dolayı olduğu tespit edilmiştir. İmmün sistem dışında neopterin HIV enfekte kişilerde, yetişkin lösemilerinde, Huntington ve Alzheimer hastalıkları gibi nörodejeneratif hastalıklarda, hamilelik sırasında, malign hastalıklarda ve romatoid artritte de yükselmektedir (Widner, Laich, Sperner-Unterweger, Ledochowski ve Fuchs, 2002).

Romatoit artrit (eklem romatizması) kronik inflamatuvar bir hastalıktır. Romatoit artritte TRP, KYN miktarları ve oranları ile neopterin değişikliklerinin araştırılmasını amaçlayan bir çalışmada, hastalığın 3 farklı evresindeki 38 hasta ile çalışılmış ve TRP, KYN analizleri HPLC ile neopterin miktarı ELISA yöntemi ile ölçülmüştür. Sağlıklı gruba göre romatoit artritli hastalarda TRP konsantrasyonları düşük, KYN

konsantrasyonları ve KYN/TRP oranları daha yüksek bulunmuştur. 2. ve 3. evredeki hastaların sonuçlarında istatistiksel olarak anlamlı fark olmayıp, triptofan değişiklikleri ile neopterin üretimi arasında benzer artışlar gözlemlenmiştir (Schroecksnadel vd., 2003).

Düzensiz çalışan kinürenin yolu çeşitli nörolojik, enfeksiyon ve kardiyovasküler hastalıklarla ilişkilendirilmiştir. Bu yolak merkezi sinir sisteminin dışında dolaşım sistemi, alerji, otoimmünite ve immünolojik sistemleri de etkilemektedir. Hastalıklarda TRP/KYN oranı olduğu gibi KYNA/KYN, KYNA/QUIN ve KYNA/3-HK oranları da kullanılmaktadır ve bu değişimler beyin omurilik sıvısı, plazma veya serumdan tespit edilebilmektedir (Lovelace vd., 2016). Kronik nörolojik bir hastalık olan MS'de hastaların beyin omurilik sıvısı ve serumlarında TRP miktarının azaldığı ve nörotoksositeye karşı koruyucu mekanizma olarak KYNA'nın arttığı gözlemlenmiştir (Hartai vd., 2005). Ölümcül bir nörodejeneratif hastalık olan ALS'de motor nöronların ölümünde kinürenin metaboliti QUIN etkili olup, beyin omurilik sıvısında yapılan analizlerde TRP, KYN ve QUIN oranları artmış ve nöroprotektif etkili olan KYNA ve pikolinik asit konsantrasyonları azalmıştır. Alzheimer hastalığında IDO ve TDO aktivitelerinin QUIN ile birlikte arttığı gözlemlenmiştir (Lovelace vd., 2016). Otozomal dominant kalıtsal, motor, bilişsel ve davranışsal bozuklukların olduğu diğer bir nörodejeneratif hastalık olan Huntington hastalığının, bozulmuş kinürenin yoluyla ilişkisi olduğu tespit edilmiştir. Hayvan ve insanlarda tanımlanan Huntington hastalığında yapılan araştırmalarda nörotoksik özellikli 3-HK ve QUIN konsantrasyonları beyinde artmıştır. Parkinson hastalığında da beyindeki QUIN konsantrasyonu artmıştır (Lovelace vd., 2016). Depresyon ve anksiyetenin QUIN ve KYNA miktarlarındaki değişiklikten kaynaklandığı düşünülmektedir. Beyin kanseri kaynaklı depresyonlarda da kinürenin yolağındaki düzensiz çalışma dikkat çekmiştir. Beynin bazı bölgelerinde 3-HK/KYNA oranının arttığı tespit edilmiştir, talamus, korteks ve hipokampus bölgelerinde ise QUIN'in artan konsantrasyonları gözlenmiştir (Mithaiwala vd., 2021).

IDO ve kardiyovasküler hastalıklar arasında bir bağlantı olduğunu düşündüren klinik veriler, aterosklerozda IDO enziminin rolüne ilişkin araştırmalara yol açmıştır (Melhem ve Taleb 2021). IDO ve TRP metabolitlerinin tromboz oluşumuna neden olduğu ve ileri aterosklerozu olan hastaların serumlarında IDO aktivitesinde anlamlı bir artış tespit edilmiştir (Ramprasath vd., 2021). IDO aktivitesini inhibe ederek tedavi düşünülmüş fakat IDO'nun etkilediği diğer biyolojik yolların varlığı nedeniyle bundan

vazgeçilmiş; yolağın ilerleyen aşamalarında KMO enziminin inhibisyonuyla 3-HK sentezini durdurmanın daha etkili olabileceği düşünülmüştür (Song, Ramprasath, Wang ve Zou, 2017). Hastalarda erken evrelerde KYN, KYNA, 3-HK, AA ve 3-HAA seviyelerinin belirlenmesiyle triptofan türevli bu metabolitlerin ateroskleroz ve abdominal aort anevrizması gibi koroner arter hastalıklarını tanımlamak için erken birer biyobelirteç olarak kullanılma potansiyelleri vardır (Song vd., 2017).

Kornea erozyonu ameliyattan sonra iyileşme süresini uzatan ağrılı olan rahatsızlıktır. Kornea epiteline kinürenik asit etkisinin in vivo ve in vitro etkileri araştırılmış, KYNA içeren damlalarla kornea epitalizasyonunun daha hızlı ve tamamen onarıldığı gözlemlenmiş ve toksik etki de görülmemiştir (Matysik-Wozniak vd., 2021).

Obezite kronik, metabolik bir hastalıktır ve sağlıklı bireylerle karşılaştırıldığında obez bireylerde > %30 oranında depresyon gelişebilmektedir. Depresif hastalarda ve obez bireylerde triptofan konsantrasyonu büyük ölçüde düşükken, triptofan katabolitlerinin (kinürenin, kinürenik asit, quinolik asit gibi) konsantrasyonlarında artış gözlenmiştir. Bu durum depresyon ve obezitede inflamasyon sitokinlerinin fazla üretimi sonucu, TRP metabolizmasında anahtar enzim olan IDO'nun aktive olmasıyla açıklanmaktadır. Ayrıca depresyonlu hastalarda KYN/TRP oranının artması da IDO aktivitesinin bir göstergesidir. Ergen ve genç yetişkin hastalarda IDO aktivitesi ve 3-HK/KYN oranının artması depresyonla pozitif ilişkilidir, yetişkin hastaların serumlarında ise 3-HAA ve QUIN seviyelerinin arttığı tespit edilmiştir (Filho Chaves vd., 2018).

Tip 1 diyabet ile kinürenin yolağı ilişkisinin incelenmesinde yolak metabolitleri LC-MS/MS ile belirlenmiştir. Çalışma sonucunda kinürenin yolağıyla diyabetik ketoasidoz arasında ilişki olduğu gözlenmiştir. Diyabetik ketoasidozdan önce tip 1 diyabetin artan inflamasyon ve TRP yolağı bozulmasını başlattığı düşünülmektedir. İnflamatuvar sitokinler ve muhtemelen keton cismi olan betahidroksi bütirat tarafından yolağın ilk enzimi olan IDO aktivasyonu başlatılmaktadır (Hoffman, Whelan ve Lee, 2021).

Kinürenin yolu metabolitlerinin SARS-CoV-2 enfeksiyonu ile de ilişkili olduğu görülmüştür. COVID-19 hastalarında, SARS-CoV-2 enfeksiyonunun bir özelliği olan interlökin-6'nın (IL-6) serum seviyeleri ile paralel olan artmış serum *de novo* kinürenin ve KYNA seviyeleri kaydedilmiştir. Bu ilişki, bazı kinürenin metabolitlerinin pro-

inflatuar karakteri ve kinürenin yolu enzimlerinin inflamasyon tarafından uyarılmasıyla açıklanabilir (Groth vd., 2021).

2.4. Mikroorganizmalarda Kinürenin Yolağı

Triptofan kinürenin yolağı üzerinden final ürünü olan NAD^+ sentezine gitmektedir. NAD^+ biyosentez yolları, türe özgü birkaç farklılıkla birlikte bakterilerden insanlara kadar büyük ölçüde korunmuştur. Fırın ürünleri ve birada starter kültür olarak kullanılan *Saccharomyces cerevisiae* ve *Saccharomyces uvarum* dışında *Streptomyces antibioticus*, *Cyanidium caldarium*, *Karlingia rosea* ve *Xanthomonas pruni* gibi bazı prokaryotlarda da kinürenin yolu bulunmaktadır. Bazı bitkiler ve bakterilerin ise NAD^+ sentezi için kinürenin yolunu mu yoksa aspartik asit yolunu mu kullandığı tam olarak açıklanamamışken, pirinç bitkisi bu yollardan her ikisini de kullanabilmektedir (Groth vd., 2021; Yılmaz ve Gökmen, 2018; Yılmaz ve Gökmen, 2019).

Mayalar NAD^+ sentezini 3 farklı yol üzerinden gerçekleştirmektedirler. İlki insanlarda da geçerli olan triptofan üzerinden yürüyen kinürenin yolağı olarak bilinen “de novo sentez”dir. Diğerleri ise “NA/NAM (nikotinik asit/nikotinamid) kurtarma” ve “NR (nikotinamid ribozit) kurtarma” olarak adlandırılan hücre dışı nikotinik asitten veya çeşitli hücre içi NAD^+ yıkım ürünlerinden olan biyosentez yoludur (Sporty vd., 2009).

De novo sentezi mantarların yanı sıra solucanlar, sinekler memeli hücreleri ve bazı bakterilerde de geçerlidir. Mayalar da bu yolak sırasında insanlarda olduğu gibi kinürenin metabolitleri üretebilmektedirler (Groth vd., 2021).

Nikotinik asitten başlayan NAD^+ sentezi, Preiss-Handler yolu olarak bilinir (Groth vd., 2021). Mayada, bu yol NAM’ın kurtarılmasını içerir ve bu nedenle NA/NAM kurtarma yolu olarak da adlandırılır. Çoğu maya büyüme ortamında olduğu gibi nikotinik asidin bol olduğu koşullar altında, NA/NAM kurtarma, tercih edilen NAD^+ biyosentez yoludur (Sporty vd., 2009).

Mayalarda kinürenin yolunun çalışması ve fermentasyon esnasında bazı gıdalarda kinürenin bileşiklerinin oluşması üzerine yapılan araştırmalarda, fermente ürünlerde triptofan ve metabolitlerinin çeşitli oranlarda bulunduğu görülmüştür (Yılmaz ve Gökmen, 2018; Yılmaz ve Gökmen, 2019). Gıdalardaki kinürenin yolu metabolitlerini araştıran az sayıdaki araştırmalar çoğunlukla nöroprotektif özelliği nedeniyle kinürenik

asit üzerinde yoğunlaşmıştır. Süt, yoğurt, kefirde kinürenin, 5-HTP, 5-HT ve triptofan miktarları HPLC ile araştırılmış ve karşılaştırılmıştır. 5-HTP miktarı en fazla yoğurtta bulunurken, triptofan miktarı en fazla kefirde ve kinürenin miktarı da sütlerde en yüksek seviyede bulunmuştur. Yoğurtta yüksek 5-HTP değerinin eklenen değişik kültürlerden kaynaklandığı düşünülmektedir. Ürünlerin raf ömrü sırasında ise tespit edilen bu değerlerde önemli değişiklikler olmamıştır (Bertazzo, Ragazzi ve Visioli, 2016).

Peynir, kefir, yoğurt, ekmek gibi fermente ürünler, çeşitli sebzeler ve arı ürünlerini içeren 37 çeşit gıda ürünüde HPLC ile kinürenik asidin araştırıldığı çalışmada ürünlerin tümünde kinürenik asite rastlanmıştır ve en yüksek değerler arı ürünleri olan bal, propolis ve polende bulunmuştur. Propoliste kinürenik asit içeriği 8572.8 pmol/g iken, en düşük miktar 5.1 pmol/g olarak tavukta bulunmuştur (Turski, Turska, Zgrajka, Kuc ve Turski, 2009).

Çeşitli çay ve kahve türlerinde kinürenik asit içeriğinin araştırılmasına ait çalışmada ürünlerin hepsinde kinürenik asit içeriği tespit edilmiştir. 16 çay çeşidinde kinürenik asit içerikleri en yüksek olan Japon yeşil çayı ginkaku senchada 8.693 µg/100 ml ve en düşük olan Vietnam yasemin çayında 0.514 µg/100 ml olarak belirlenmiştir. 13 kahve çeşidinde kinürenik asit oranları çaylara kıyasla biraz daha düşük olup, Tchibo markasının %100 arabica kahvesinde 0.628 µg/100 ml, Dallmayr markasının %100 arabica kahvesinde 0.024 µg/100 ml olarak bulunmuştur. Kinürenik asidin emilimi ve vücutta dağılımıyla ilgili olarak çalışmanın devamında, farelere işaretli kinürenik asit (5,7-³H-KYNA) verilmiş ve doku, kan ve idrar örneklerinde fluorometrik yöntemle KYNA tayini yapılmıştır. Bulgular kinürenik asidin sindirim sisteminden emildiğini ve geçici olarak dalakta depolandığını önermektedir (Turska vd., 2018).

Ticari olarak satılan 56 çeşit alkollü içecekte kinürenik asit içeriğinin HPLC ile analizlendiği çalışmada bira çeşitlerinde KYNA miktarı 5.152-0.454 µg/100 ml, şarap çeşitlerinde 10.9-1.4 µg/100 ml ve likör, viski, votka gibi destillenmiş alkollü içki çeşitlerinde ise 1.624-0.055 µg/100 ml aralığında bulunmuştur. Yaşları 22-25 arasında değişen 12 gönüllü ile yaptıkları çalışmada araştırmacılar, bal likörü içtikten sonra alınan kan örneklerinde KYNA konsantrasyonunun 15-30 dk aralığında pik yaptığını bildirmişlerdir (Turska vd., 2019).

Polonya’da patates çeşitlerinde HPLC ile kinürenik asit miktar tayini ve 6 aylık depolama sonrasındaki KYNA kaybı üzerine yapılan çalışmada, ıslak ve kuru ağırlığa bağlı olarak kinürenik asit içeriklerinin değiştiği belirlenmiştir. Genel olarak kuru ağırlık bazında 3.240–0.239 µg/g, ıslak ağırlık bazında ise 0.648-0.040 µg/g civarında kinürenik asit tespit edilmiştir. 6 ay sonrasında oluşan kinürenik asit kaybı ise %96-27 arasında değişmektedir (Turski, Kaminski, Zgrajka, Turska ve Turski, 2012).

Ekmek, bira, kırmızı şarap, beyaz peynir, yoğurt, kefir ve kakao gibi fermente ürünlerdeki triptofan, kinürenin, kinürenik asit, niasin ve nikotinamid içerikleri LC-MS ile ölçülmüştür. Ekmekte 31.7-72.5 mg/g triptofan, 143.5 mg/g kinürenin, 970-1153 mg/g niasin, 1949-2534 mg/g nikotinamid; birada 4.8-31.1 mg/l, 28.7-86.3 mg/l kinürenin, 16.9-52 mg/l kinürenik asit, 354.5-1056 mg/l niasin, 14.6-141.8 mg/l nikotinamid; kırmızı şarapta 1-1.8 mg/l, 82.4-179.7 mg/l kinürenik asit, 367.2-562.4 mg/l niasin, 36.3-424.4 mg/l nikotinamid; beyaz peynirde 3.8-37.6 mg/g triptofan, 30.3-321.6 mg/g kinürenin, 26.7-76.6 mg/g kinürenik asit, 224.1-481.4 mg/g niasin; yoğurtta 3.2-13.4 mg/l, 288.8-751.9 mg/l kinürenin, 67.5-286.8 mg/l kinürenik asit, 895.8-1516.5 mg/l niasin; kefirde 2.9-5.4 mg/l, 372.8-763.8 mg/l kinürenin, 113.4-241.7 mg/l kinürenik asit, 314.1-1560.5 mg/l niasin ve kakaoda 12.9-37.5 mg/g triptofan, 4000.3-4486.2 mg/g kinürenik asit, 18009-22804.2 mg/g niasin, 2281-2583.9 mg/g nikotinamid tespit edilmiştir (Yılmaz ve Gökmen, 2018).

Çizelge 2.2. Çeşitli fermente ürünlerde TRP metabolitleriyle ilgili yapılan diğer çalışmalar

Gıda	Triptofan	Kinürenin	Kinürenik asit	Niasin	Nikotinamid	Kaynak
Elma			12.1 pmol/g			Turski vd., 2009
Kırmızı şarap	1-1.8 µg/l		82.4-179.7 µg/l	367.2-562.4 µg/l	36.3-424.4 µg/l	Yılmaz ve Gökmen, 2018
Bira	4.8-31.1 µg/l	28.7-86.3 µg/l	16.9-52 µg/l	354.5-1056 µg/l	14.6-141.8 µg/l	Yılmaz ve Gökmen, 2018
Çay			8.693-0.514 µg/100ml			Turska vd., 2018
Ekmek	31.7-72.5 mg/g	143.5 mg/g		970-1153 mg/g	1949-2534 mg/g	Yılmaz ve Gökmen, 2018

2.5. Fermantasyon ve Tarihçesi

Fermantasyon çok uzun yıllardır kullanılan doğal bir koruma yöntemidir (Altay, Karbancıoğlu-Güler, Daskaya-Dikmen ve Heperkan, 2013). Karbonhidrat ya da benzer bileşiklerin elektron alıcısı yokluğunda okside edilerek enerjinin açığa çıktığı metabolik bir olaydır (Kabak ve Dobson, 2011). Fermantasyon gıdaların mikrobiyolojik bozulmasını engeller, tat ve aroma gelişiminde önemlidir, raf ömrünün uzamasında, korunmasında ve gıda güvenliğinde etkilidir. Fermantasyon sırasında gıdanın parçalanmasından dolayı sindirim kolaylaşır, vitamin ve amino asit gibi küçük moleküllerin emilimi daha kolay hale gelir. Ayrıca bu aşamada çiğ haldeki gıdada bulunan tanen, fitat gibi maddelerin detoksifikasyona uğraması gıdanın besin değerini artırır ve gıdaların biyolojik zenginleşmesini sağlar (Altay vd., 2013; Kabak ve Dobson, 2011; Tangüler, 2014).

Fermantasyon arkeologların tahminlerine göre yaklaşık 10000 yıldır kullanılan bir yöntemdir. Mısır ve Mezopotamya arasındaki bölgede çeşitli ürünlerin şaraplarının yapıldığı ve Romalılar tarafından dünyaya yayıldığı tahmin edilmektedir. Babillerin alkol fermantasyonuna ek laktik asit fermantasyonuyla bira benzeri içecek geliştirdikleri, Asyalıların ise M.Ö. 2200 pirinçten sake isimli alkollü içecek ürettikleri bilinmektedir. Sığırcılığın geliştiği Balkan coğrafyasında ise süttten peynir üretimi yaygındı (Karaçıl ve Tek-Acar, 2013; Pamir, 1985).

1595 yılına gelindiğinde fermantasyon ile çürümenin farklı olduğu keşfedildi. 1648’de fermantasyon esnasında çıkan gazın CO₂ olduğu tespit edildi. 1665 Antonius Van Leeuwenhoeck “küçük hayvancıklar” dediği mikroorganizmaları aslına uygun olarak resmetti. 1838’de Meyen alkol fermantasyonundan mayaların sorumlu olduğunu ve bu işlemi şeker mantarı anlamına gelen *Saccharomyces*’in yaptığını belitti. 1857’de Louis Pasteur mikroorganizmaların fermantasyon üzerindeki etkilerini araştırdı, fermantasyonların mikroorganizmaların büyümeleri sonucunda olduğu ve birkaç fermantasyon tipi olduğunu açıkladı. 1877’de Sir John Lister laktik asit bakterilerini ilk kez izole etti (Pamir, 1985).

19. yy ortalarından itibaren fermantasyonun kimyasal olarak anlaşılması, sanayi devrimi ve şehir yaşamının başlamasıyla gıdalardaki fermantasyonun daha endüstriyel

olarak yapılmasını sağladı ve bu alandaki bilimsel çalışmalar da aktif olarak devam etti (Caplice ve Fitzgerald, 1999).

Fermantasyon çeşitleri fermantasyonu gerçekleştiren mikroorganizma türüne göre dört ana başlık altında incelenebilir. Alkol fermentasyonu, Laktik asit fermentasyonu, Asetik asit fermentasyonu, Alkali fermentasyon. Alkolik fermantasyon etanol üretimi ile sonlanan daha çok mayaların kullanıldığı ve şarap, bira üretiminin yapıldığı fermantasyon çeşididir. Laktik asit fermantasyonu laktik asit bakterilerinin sorumlu olduğu ve çeşitli tahıl ve süt ürünlerinde kullanılan fermantasyondur. Asetik asit fermantasyonu Acetobacter bakterilerinin gerçekleştirdiği ve aerobik şartlarda alkolü asetik aside çevirdikleri fermantasyondur, en yaygın sirke üretiminde kullanılır. Alkali fermantasyon ise balık, legümlü ve diğer bitki tohumları gibi yüksek protein içerikli ham materyallerin Bacillus türleriyle gerçekleşen fermantasyon çeşididir (Blandino, Al-Aseeri, Pandiella, Cantero ve Webb, 2002).

2.5.1. Fermantasyonda Kullanılan Mikroorganizmalar

Fermantasyonda küf, maya ve bakteri olmak üzere üç ana sınıf mikroorganizma kullanılır. Başlangıç kültürü olarak kullanılacak mikroorganizmaların hijyenik olması, patojen ve toksik özellikli olmaması, kolay üreyebilmesi, ortamın pH'sını bozmaması, saf, yüksek verimli ve uzun süre kullanılabilir olması beklenir (Arıcı, 2017).

Çizelge 2.3. Bazı bitkisel fermente gıdalar ve fermantasyondan sorumlu olan mikroorganizmaları (Arıcı, 2017; Di Cagno, Coda, De Angelis ve Gobetti, 2013)

Fermente Ürün	Hammadde	Mikroorganizma
Alkollü İçecekler Şarap Şampanya	Üzüm Şarap	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Tahıllar Kwass Bira Boza	Malt Malt, Ekmek Buğday	<i>Sacharomyces cerevisiae</i> Mayalar, laktik asit bakterileri <i>Sacharomyces cerevisiae</i> , <i>leuconostoc</i> , <i>lactobacillus</i>
Damıtık İçkiler Votka Viski Brandi	Patates, tahıllar Tahıllar Şarap	<i>Sacharomyces cerevisiae</i> <i>Sacharomyces cerevisiae</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i>

Alkolsüz Fermente Gıdalar	Şarap, Malt, Etanol	<i>Acetobacter, gluconobacter</i>
Sirke	Çay Yaprakları	Bitkisel enzimler
Çay	Kahve Çekirdekleri	<i>Maya</i> , laktik asit bakterileri,
Kahve	Kakao Çekirdekleri	<i>enterobacter</i> , Asetik asit bakterileri
Kakao		<i>Lactobacillus spp.</i> ,
Turşu	Lahana, Havuç, Salatalık	<i>Leuconostoc spp.</i>

2.5.1.1. *Saccharomyces cerevisiae*

1838’de *Saccharomyces*’in keşfinden sonra, bira ve ekmek yapımında uzun yıllardır kullanılan *Saccharomyces cerevisiae* 1870’te Hansen tarafından tanımlanmıştır. Fungus ailesinden tomurcuklanarak çoğalan, yuvarlak ya da elips şeklinde ökaryotik bir mikroorganizmadır. Genomu ilk dizilenen mayadır. Yaşam döngüleri yaklaşık 26 bölünmedir. İlk olarak üzüm kabuklarından izole edildiği düşünülmektedir (Aran, 2010; Goddard ve Greig, 2015; Stewart, 2014).

Saccharomyces cerevisiae karbon kaynağı olarak indirgen şekerleri ve genellikle heksozları kullanır. Yüksek miktarda etanole dirençlidir. Çalışma koşulları optimum pH 4-6 ve sıcaklık 25-35°C arasındadır (Stewart, 2014).

Gıda sektöründe tat, aroma ve lezzet üzerine olan olumlu etkileri sebebiyle tercih edilmektedir. Ekmek, bira, boza, şarap, kakao, rom fermente gıdalarına başlangıç kültürü olarak eklenir. Özellikle fermente gıda üretimi, probiyotik gıda bileşeni üretimi, endüstriyel etanol üretimi, gıda atıklarının işlenmesi, gıda yan ürün ve atıkların işlenmesiyle etanol üretiminde kullanılmaktadır (Stewart, 2014).

2.5.1.2. Laktik Asit Bakterileri

Glukozdan laktat oluşumunu gerçekleştiren *Lactobacillaceae* ailesine ait bakteriler olarak tanımlanabilirler. Laktik asit bakterilerinin izolasyonunu ilk kez Lister gerçekleştirmiştir. Anadolu’nun geleneksel fermente ürünleri olan tarhana, boza, şalgam, hardaliye, yoğurt, kefir ve sucuğun üretiminde en yaygın kullanılan bakteri grubudur. Gram pozitif, katalaz negatif, aside toleranslı, çubuk, yuvarlak, elipsoid şekilli ve hareketsizdirler. Bakteriler homofermantatif ve heterofermantatif olarak iki gruba ayrılırlar. Homofermantatif yolda sadece laktat üretilirken, heterofermantatif yolda

laktat, CO₂, etanol ve asetat dönüşümlü olarak üretilir (Arıcı, 2017; Ashaolu ve Reale, 2020; Kabak ve Dobson, 2011; Pamir, 1985).

Toplamda 12 çeşit olan laktik asit bakterilerinin (en yaygınları *Lactobacillus*, *lactococcus*, *streptococcus*, *leuconostoc*) optimum koşulları değişiklik gösterebilir. Genel optimum pH ları 5.5-6.5'tir. Anaeropdurlar, fakat aerob koşullar altında da yaşayabilirler. *Lactococcuslar* 10°C'de gelişebilirken 45°C'de gelişmemektedirler. Karbon ihtiyaçlarını laktozdan karşılarlar. *Streptococcuslar* 20 ile 60°C arasında yaşayabilirler fakat optimum sıcaklık 40-45°C arasındadır. *Lactobacilluslar* ise en büyük bakteri grubunu oluştururlar. *Leuconostoclar* genelde süt endüstrisinde starter kültür olarak kullanılırlar ve heterofermantatif özelliklidirler. *Enterococcuslar* ise NaCl ve ısıya dirençli laktik asit bakteri grubudur ve son yıllarda yapılan çalışmalarda probiyotik etkili oldukları anlaşılmıştır (Aran, 2010; Reddy, Altaf, Naveena, Venkateshwar ve Kumar, 2008).

Laktik asit bakterilerinin starter kültür olarak kullanılabilmesi için yüksek verim, hızlı üreme, fazla asit üretimi, az yan ürün oluşturma ve sıcaklığa dayanıklı olmaları beklenir (Pamir, 1985). Fermantasyon, sebze ve meyvelerin besin değerinin artırılması için en kolay yoldur (Di Cagno vd., 2013). Gıda endüstrisinde laktik asit bakterilerinin kullanımı yaygındır. Laktik asit bakterilerinin aktivitesi sonucunda gıdadaki karbonhidrat içeriği azalırken pH 4.0'e kadar düşebilir, bu asitlik seviyesi de hem patojen mikroorganizmaların gelişmesini engeller hem de gıdanın raf ömrünün uzatılmasını sağlar (Reddy vd., 2008). Laktik asit bakterilerinin ve onlardan elde edilen proteazlar da raf ömrüne, besleyici içerik, organoleptik özellikleri ve doku kalitesine olumlu etkileri nedeniyle sıkça kullanılmaktadır (Ashaolu, 2020).

2.5.1.3. Asetik Asit Bakterileri

Asetik asit bakterileri etanolün aerob koşullarda asetik aside ve suya oksitlenmesinden sorumludur. Asetik asit bakterileri *Acetobacteraceae* ailesindendirler ve 19 çeşittirler. Sınıflandırması için ilk çalışmaları 1894 yılında Hansen yapmıştır. *Acetobacter* adını 1898'de Beijerinck vermiştir. Asetik asit bakterileri gram negatif veya değişken, katalaz pozitif, oksidaz negatif, aerobik, elipsoid, çubuk şekilli, hareketli ya da hareketsiz olabilirler (Aran, 2010; Gomes, Borges, Rosa, Castro-Gomez, ve Spinosa, 2018; Yücel-Şengün ve Kılıç, 2016).

Optimum sıcaklık aralıkları 25-30°C iken 5-45°C aralığında yaşamlarını sürdürürler. Düşük pH'ya dayanıklıdır, fakat optimum pH'ları 5.0-6.5'tir. Özellikle sirke üretiminde izole edilenler *Acetobacter*, *Glucanobacter* ve *Gluconacetobacter*lerdir. Yine sirke üretiminde ortamdaki etanol miktarı ile aktiviteleri değişebilir. Ortamda istedikleri yaklaşık alkol oranı %10-13 arasındadır ve oksijen ihtiyaçları oldukça yüksektir (Aran, 2010; Arıcı, 2017; Yücel-Şengün ve Kılıç, 2016).

Asetik asit bakterileri sirke dışında gıda sektöründe hurma şarabı, kakao tozu ve kombucha çayı üretiminde kullanılır. Asetik asit fermentasyonu sonucunda oluşan glukonik asit gıdaların tat ve aromasında etkilidir. Olumsuz yanları ise özellikle şarap, bira ve meyve suyu gibi içeceklerde fermentasyonun devamı sonucunda tat bozulması, bulanık görüntü ve yapışkanlık oluşumudur. Sirkede yeterli koruyucu madde eklenmemesi durumunda fermentasyonun devam etmesi ve selüloz zarları oluşması ve birikmesine neden olabilir (Gomes vd., 2018; Yücel-Şengün ve Kılıç, 2016).

Doğada meyveler üzerinde oldukça yaygın bulunan bakterilerden gıda sanayinin yanında tekstil, medikal ve inşaat sanayilerinde kullanılan ürünlerin üretiminde de yararlanılır. Endüstriyel olarak dihidroksi aseton, sorboz ve selüloz üretiminde de kullanılırlar (Yücel-Şengün ve Kılıç, 2016).

2.5.2. Fermente Gıdalar

Hayvansal ya da bitkisel kaynaklı fermente ürünler kaynağından bağımsız olarak insanların beslenmesinde önemli bir yere sahiptir (Kabak ve Dobson, 2011). Çabuk bozulan gıdalarda fermentasyon uygulanması sonrasında raf ömrü artar, gıdalardaki protein ve karbonhidratların sindirilebilirliği kolaylaşır, vitamin ve minerallerin biyoyararlılığı artar, lezzet, aroma ve tat gelişir (Şanlıer, Başar-Gökçen ve Ceyhun-Sezgin, 2017). İçerdikleri mikroorganizmalar ile fonksiyonel ve probiyotik özellik kazanırken, antioksidan aktiviteleri ve besleyici içeriği de artmış olur (Akyol, Kundakçı ve Ergönül, 2014). Fermente gıdalar;

Fermente süt ürünleri: peynir, yoğurt, kefir, kımız, ayran, kurut

Fermente et ürünleri: sucuk, sosis

Fermente hububat ürünleri: tarhana, boza, ekşi mayalı ekmekler

Fermente sebze ve meyve ürünleri: hardaliye, sirke, turşu, şalgam, zeytinler

Fermente içecekler: çay, kahve, kombucha

Fermente alkollü içecekler: rom, konyak, viski, bira, şarap, rakı, cin, votka şeklinde sınıflandırıp örneklenebilir (Kabak ve Dobson, 2011).

Eski zamanlarda üretilen ürünlerin uzun süre saklanması için kullanılan fermantasyon yöntemi, gıda endüstrisinin gelişmesiyle organoleptik özelliklerin gelişmesi ve besin değeri, sağlığa yararlı olan fonksiyonel ve probiyotik etkilerinin keşfedilmesi ile daha fazla çalışma yapılan bir alan haline gelmiştir. Fermente ürünlerin sağlığa yararlı etkileri fermantasyon aşamasında oluşan B₂ (riboflavin), B₉ (folat), B₁₂ ve K vitamini gibi biyoaktif bileşiklerin sentezlerinin artmasıyla ilişkilidir (Şanlier vd., 2017). Özellikle kefir ve kıymaz gibi içeceklerin gastrointestinal sistemi koruma ve iyileştirme etkileri bilinmektedir (Machado de Oliveira Leite vd., 2013). Gönüllü insan deneylerinde fermente süt ürünlerinin bağışıklığı arttırdığı, yüksek kolesterol ve tansiyonu düşürmeye yardımcı olduğu ve kabızlığa karşı etkili olduğu, ayrıca kanser ve beyin üzerinde de olumlu etkileri olduğu sonucuna ulaşılmıştır (Tabbers vd., 2011). Fermente ürünlerin proteolitik kültürlerin etkileriyle de sindirim, endokrin, kardiyovasküler, bağışıklık ve sinir sistemi üzerinde olumlu etkileri vardır (Marsh, Hill, Ross ve Cotter, 2014). Fermente tahıl ürünleri, tahıllara göre daha düşük yağ, daha yüksek mineral içeriğine sahiptirler. Fermente ürünler lif, mineral, vitamin, flavonoid, fenolik gibi bileşikler içerirler ve oksidatif stres, inflamasyon, hiperglisemi ve karsinojenlere karşı etkilidirler (Wang, Wu ve Shyu, 2014).

2.5.2.1. Boza

Farsça darı anlamına gelen buze kelimesinden türemiştir. Bozanın 8000 yıllık bir geçmişi vardır. İlk üreten Türkler'dir ve göç yoluyla bozanın diğer bölgelerde tanınması sağlanmıştır. Selçuklu devletinde bekni diye bilinen boza Türkiye ve Türki devletlerde boza, Balkan, Kafkas ülkelerinde buha, Rusya'da buza, İngiltere, Almanya, İspanya, Portekiz, Fransa gibi ülkelerde boza/bosa/buza/bousa/bozan diye telaffuz edilirken, Afrika ve Arap ülkelerinde ise buha/merissa, Yunanistan'da ve Romanya'da bozas gibi farklı isimlerle bilinmektedir. Kaşgarlı Mahmut'un Divan-ı Lügat'ıt Türk'te bozadan buhoun diye bahsedilirken, Evliya Çelebi Seyahatnamesinde Anadolu'daki bozahanelerden bahsederek; karanfil, zencefil gibi farklı baharatlarla üretilen bozaları

anlatmıştır (Arıcı, 2017; Bayat ve Yıldız, 2019; Birer, 1987; Songür, Çakıroğlu ve Hakkı, 2016).

Gıda Maddeleri Tüzüğü 10. Kısımda boza “darı, pirinç ve mısırın ezilip kabuklarından ayrıldıktan sonra suyla pişirilmesi, fermantasyona bırakılıp şeker eklendikten sonra hazır hale gelen koyu kıvamlı beyaz veya krem renkli tatlı ya da ekşi lezzetteki içecek” olarak tanımlanır. Şeker miktarının sakkaroz cinsinden gramla %15 ten az, asiditesinin %4 ten fazla olamayacağı belirtilir (Gıda Maddeleri Tüzüğü). TS 9778 boza standartında ise bozanın tanımı “yabancı maddelerinden temizlenen mısır, buğday, darı, pirinç gibi hububatların bir ya da birkaçının öğütülüp su ile pişirilip beyaz şeker eklendikten sonra alkol ve laktik asit fermantasyonlarının gerçekleşmesi sonucu oluşan ürün” olarak yapılır (Levent ve Cavuldak, 2017; Tangüler, 2014).

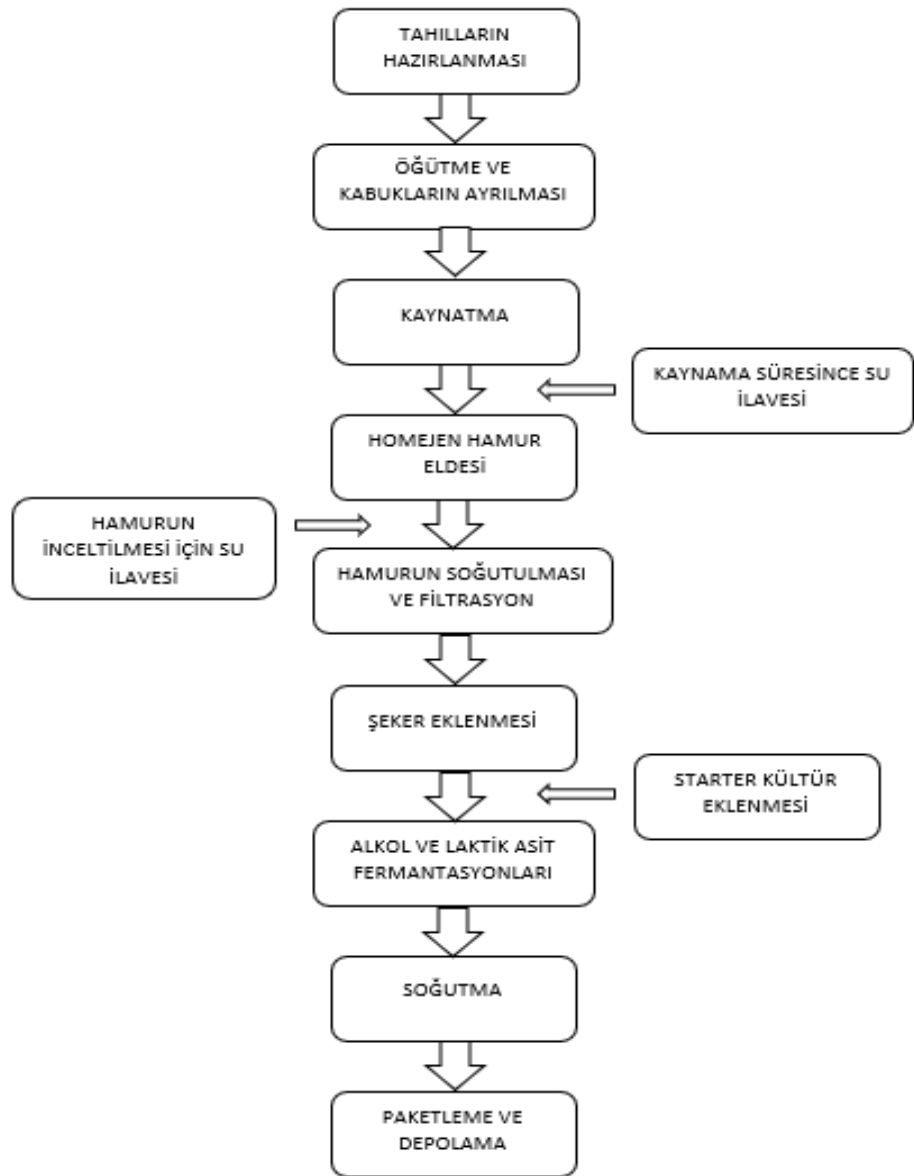
Çizelge 2.4. TS 9778 Boza standardına göre bozanın kimyasal özellikleri

Özellikler	Değerler (g/100g)
Toplam kuru madde	>20
Toplam şeker	>10
Etil alkol	<2
%10'luk HCl'de çözünmeyen kül	<0,2

Ana malzemesi tahıl olan boza geleneksel olarak evlerde üretildiği gibi ticari olarak da üretilmektedir. Üretim yerine göre kullanılan tahılın cinsi değişebilir ya da tahıllar karıştırılarak üretilir. En kaliteli boza ise darıdan üretilendir. Asitliğine bağlı olarak tatlı boza (%0.2-0.5) veya ekşi boza (%0.5-1.0) olarak sınıflandırılır. Fermantasyonların sıcaklık ve süreleri son ürün üzerinde etkilidir. Laktik asit fermantasyonu daha çok ürünün aroması üzerinde etkiliyken, alkol fermantasyonu kıvamında belirleyici olur. Genellikle sonbahar ve kış mevsiminde tüketilir. Yazın da içilebilir ancak sıcak hava maya ve bakterilerin çalışmasını aktive edebilir, bu da depolama süresinde kısılmaya ve organoleptik özelliklerinin değişmesine neden olabilir (Arıcı ve Dağlıoğlu, 2002; Bayat ve Yıldız, 2019; Levent ve Cavuldak, 2017; Songür vd., 2016; Şanlıer vd., 2017; Tangüler, 2014).

Genel olarak bozanın üretim aşamaları; hammaddenin hazırlanması, kaynatma, soğutma, süzme, şeker eklenmesi, fermentasyon, soğutma, paketleme olarak sıralanabilir (Şekil 2.14) (Birer, 1987; Levent ve Cavuldak, 2017). Boza üretiminde kullanılacak hammaddeler elenirler, öğütülür ve tahılın cinsine göre 1-5 saat arasında su ile kaynatılır. Homojen hale gelen boza hamuru soğutma teknelerine alınarak, 12 saat ile 1 gün arasında bekletilir. Soğutma süresince seyreltme ve hamuru inceltme için su ilavesi yapılır. Homojenliğin kaybolmaması için sürekli karıştırılmalıdır. Pütürlü maddeleri almak için süzülür. Süzülen kısma çiğ boza, ham boza, şekersiz ham boza denilir. Fermentasyonların gerçekleşmesi için %15-20 oranında sakkaroz eklenen hali ise şekerli çiğ bozadır. 25-30°C'de 15-18 saat mayalanmaya bırakılır. Starter kültür olarak daha önce üretilen boza, ekşi yoğurt veya ekşi maya kullanılabilir, laktik asit fermentasyonu ve alkol fermentasyonu ayrı ayrı değil aynı anda gerçekleşir (Bayat ve Yıldız, 2019; Birer, 1987; Songür vd., 2016; Tangüler, 2014). Fermentasyon sonrasında 4°C soğutulan boza paketlenir. Bozanın 3-5 gün içinde tüketilmesi tercih edilir, raf ömrü en fazla 15 gündür. Fermentasyonun süresi uzadıkça asitlik artmaktadır. pH 3.5'in altına düşene kadar tüketilebilir. Probiyotik kültür kullanılarak üretilen bozalarda ise raf ömrü en fazla 12 gündür (Altay vd., 2013; Bayat ve Yıldız, 2019; Levent ve Cavuldak, 2017; Songür vd., 2016; Tangüler, 2014).

Alkol fermentasyonundan sorumlu mayalar *Saccharomyce cerevisiae*, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata*, *Geotrichum Penicillium* ve *Geotrichum candidum*; laktik asit fermentasyonundan sorumlu bakteriler ise *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus coprophilus*, *Leuconosto creffinolactis*, *Leuconosto cmesenteroides* ve *Lactobacillus brevis*'dir (Songür vd., 2016).



Şekil 2.14. Boza üretim akış şeması (Tangüler, 2014)

Günlük içilen iki bardak boza B vitamini ihtiyacını karşılayabilmektedir. Bozanın besleyici değerini ana yapıyı oluşturan tahıllar ve fermantasyon oluşturur (Bayat ve Yıldız, 2019). Kullanılan tahıl cinsine göre hem yapı hem de fermantasyon derecesi değişmektedir. Laktik asit fermantasyonu aşamasında kullanılan bakterilerden probiyotik etkili olanların kullanılması ile boza hem probiyotik, hem de fonksiyonel gıda özelliği kazanır (Songür vd., 2016). Todorov ve arkadaşları bozada kullanılan laktik asit bakterilerinin probiyotik etkilerini araştırmış ve bozanın probiyotik etkisinin yanında izole edilen ST284BZ suşunun en yüksek antiviral ve antibakteriyel (bakteriyosin üretimi ile) aktiviteye sahip olduğunu tespit etmişlerdir (Todorov vd., 2008). Bozanın probiyotik

içeriği üzerine yapılan başka bir çalışmada kullanılan mikroorganizmaların hayvan ve insanlarda probiyotik olarak kullanılması ve antibiyotik kaynaklı ishal tedavisinde etkili olduğu gözlenmiştir (Songür vd., 2016).

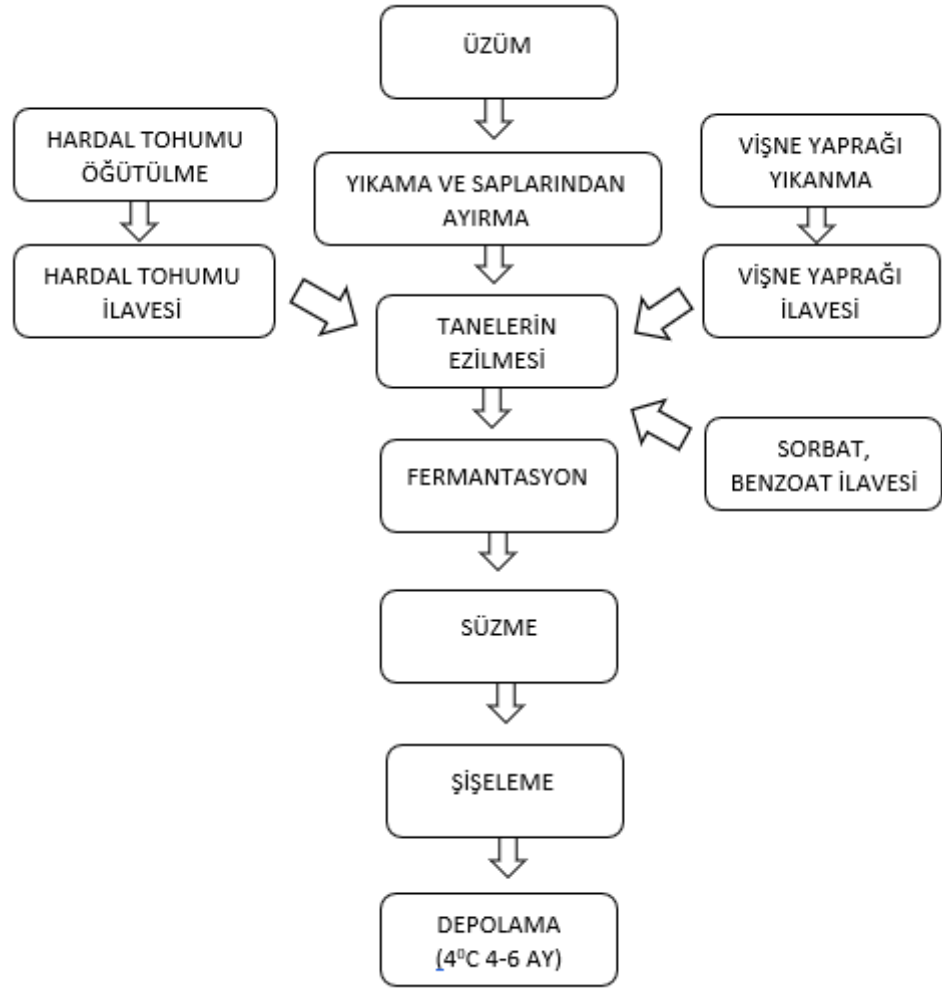
Probiyotik özellikli tüm laktik asit bakterileri starter kültür olarak kullanılamayabilir. Hem probiyotik etkisi olan hem de başlangıç kültürü olarak kullanılabilen suşlar ise *Laccharomyces boulardii*, *Lactobacillus acidophilus* LA-5 ve *Bifidobacterium bifidum* BB-12'dir (Levent ve Cavuldak, 2017). Laktik asit bakterilerinden bazılarının bozadaki ekzopolisakkaritleri üretme kapasitesi çok yüksektir. Çeşitli bakteri ve ökaryotlar tarafından üretilen ekzopolisakkaritler gıda sanayinde kıvam arttırıcı, jelleştirici ve emülsifiye edici olarak rol oynarlar. Bozadaki ekzopolisakkaritler de emülgatör, stabilizatör, prebiyotik etki gösterirken antitümör, immün sistem destekleyici, kolesterol düşürücü ve antioksidan etkili oldukları da bildirilmiştir (Suyuçok, Ekiz ve Başyigit-Kılıç, 2016).

2.5.2.2. Hardaliye

Trakya yöresinde yaklaşık 500 yıllık tarihe sahip olan Osmanlı döneminde özellikle padişahların bu bölgede yaşarken keşfettiği ve kalp hastalıklarına karşı korumada etkili olduğu düşünülen fermente edilmiş üzüm suyundan üretilen bir içecektir. Evliya Çelebi'nin seyahatnamesinin ikinci cildinde hardaliyeden ve Kırklareli ilindeki bağlardan bahsedilmiştir. Mustafa Kemal Atatürk'ün 20 Aralık 1930 yılında Kırklareli'ni ziyareti sırasında ikram edilen ve milli meşrubat olarak tanıtılmasını istediği hardaliye ancak 2017 yılında coğrafi işaret almıştır. Türk Patent Kurumu da hardaliyeyi üzüm suyuna hardal ilavesi ve laktik asit fermentasyonu sonucu oluşan içecek olarak tanımlamıştır (Bayındır ve Önçel, 2019; Coşkun, 2005; Trakya Kalkınma Ajansı Kırklareli Yatırım Destek Ofisi, 2014).

Hardaliye meyve temelli alkol içermeyen fermente içecektir (Coşkun, Arıcı, Gülcü, Çelikyurt ve Mırık, 2018), fermentasyondan probiyotik özellikli olan laktik asit bakterileri sorumludur (Palamutoğlu-İnce ve Baş, 2020). Trakya'da geleneksel olarak hardaliye üretimi evlerde yapılır (Altay vd., 2013; Coşkun, 2017). Hardaliye yapımında kullanılan üzüm (*Vitis vinifera*) çeşitleri Dingil Kara, Kara Üzüm, Cabernet Sauvignon, Yerli İzabella, Siyah Üzüm, Papazkarası, Pamit, Müşküle, Razaki, Kardinal, Merlot, Alphonse, Öküzgözü ve Shiraz'dır (Bayındır ve Önçel, 2019; Coşkun vd., 2018).

Toplanan üzümler temizlenir, yıkanır ve parçalanır. Tane bütünlüğü bozulan üzümler, öğütülmüş siyah hardal (*Brassica nigra* L. Koch) tohumları, aroma vermesi için vişne/kiraz (*Prunus cerasus* L.) yaprakları ve koruyucu (sorbitlar ya da benzoatlar) ilavesi ile meşe fiçılara kat kat olacak şekilde doldurulur. Karışmayı sağlamak için dolum yapılan kapların alt kısmında musluk ve üst kısımda boşluk olması önemlidir. Fermantasyon oda koşullarında ve yaklaşık 5-10 gün sürer (Altay vd., 2013; Bulut-Solak, 2021; Coşkun vd., 2018). Hardaliye üretiminde *Lactobacillus* cinsi bakteriler görev alır. Hardaliye üretimi sırasında mikroorganizmaların alkol fermantasyonu hardal tohumu eklenerek ve mayaların aktivitesi de sorbit/benzoatlar eklenerek engellenir (Coşkun ve Arıcı, 2011; Coşkun, 2017). Fermantasyon ilk başladığında pH 3.86 civarındadır, yaklaşık bir hafta sonra 3.39'a düşer. İnkübasyondan sonra ve tortular çöktükten sonra süzülen hardaliye 4°C'ta 3-4 ay saklanabilir (Şekil 2.15). Hardaliyenin bu saklama süresi içerisinde tadı aşamalı olarak değişime uğrar. Üretim sonrasında yaklaşık ilk 30 gününde acı, sert ve yakıcı tada sahiptir. İkinci aşama ise gerçek hardaliye lezzetinin oluştuğu yakıcılık ve acılığın azaldığı zaman dilimidir. Son aşama da hardaliye aromasının azaldığı sıra aromasına döndüğü ve uygun ortam oluşması halinde alkol fermantasyonunun oluştuğu zaman aralığıdır (Coşkun, 2017).



Şekil 2.15. Hardaliye üretim akış şeması (Faikoğlu, Yavaş, Gürbüz ve İstek, 2016)

Hardaliye probiyotik özellikli laktik asit bakterilerinin kullanımı sonucu fonksiyonel ürün özelliği kazanmaktadır (Coşkun, 2017). Üzüm içerdiği çeşitli polifenoller ve flavonoidler (kuersetin, kamferol, mirisetin, kateşin, kumarik asit, resveratrol) ile güçlü bir antioksidan kaynağıdır (Faikoğlu vd., 2016). Hardal tohumunda bulunan glukozinolatlar (izotiyosiyanatlar, tiyosiyanatlar) antikanser etkili bileşik grubundandır (Coşkun, 2017). Hardaliyenin antikanser aktivitesi üzerine yapılan bir araştırmada kolon kanserini önlemek için gıda takviyesi olabileceği sonucuna varılmıştır. Ayrıca hardaliye magnezyum, selenyum, potasyum ve çinko gibi elementleri de içermektedir (Kahraman-İlkkın, Doğanlar, Doğanlar, Altınoluk-Mimiroğlu ve Soykan-Kırbaş, 2017). Hardaliyedeki antioksidan etkili fenolik bileşenler ve besin içeriği Çizelge 2.5’de verilmiştir.

Çizelge 2.5. Hardaliyenin antioksidan özelliği, fenolik, besin ve enerji içeriği (Amoutzopoulos, 2013; Amoutzopoulos vd., 2013)

Bileşen (mg/l)	Hardaliye	Bileşen (g)	100 ml
Trans-Resveratrol	2.72 ± 0.28	Enerji (kcal)	75.54
Kuersetin	65.5 ± 0.37	Nem	88.51
Toplam fenolik asit	397 ± 13.78	Kül	0.23
Gallik asit	47 ± 0.89	Yağ	0.20
Protokateşik asit	111 ± 1.42	Toplam diyet lifi	0.98
Şiringik asit	40.9 ± 1.15	Karbonhidrat	17.53
p-kumarik asit	21 ± 1.71	Fruktoz	9.51
o-kumarik asit	43.7 ± 5.77	Glukoz	9.43
Gentisik asit	45.1 ± 1.22	Toplam şeker	18.91
Ferulik asit	4.09 ± 2.85	Bileşen (mg)	100 ml
Sinapik asit	21.9 ± 0.55	Potasyum	94.14
Salisilik asit	2.96 ± 0.17	Fosfor	24.50
Cafeik asit	60 ± 1.15	Kalsiyum	13.45
Antioksidan özelliği		Magnezyum	13.59
ORAC (mmol TE/L)	64.0 ± 5.30	Demir	0.91
Toplam fenolik (mg GAE/L)	2128 ± 188.09	Çinko	0.24
Toplam antosiyoinin (mg C3GE/L)	1.7 ± 4.38	B ₁ vitamini	0.003
		B ₂ vitamini	0.01
		B ₆ vitamini	0.05
		Niasin	0.31
		Folat (µg)	1.01

ORAC: Oksijen Radikalı Absorbans Kapasitesi, TE: Troluks eşdeğeri, GAE: gallik Asit Eşdeğeri, C3GE: siyanidin-3-glukozit eşdeğeri

2.5.2.3. Sirke

Sirke, eski şarap anlamına gelen vin ve aigre iki Fransızca kelimedenden türetilmiştir (Budak, Aykın, Seydim, Greene ve Güzel-Seydim, 2014). Genel olarak sirke, şeker içeren kuru ya da yaş meyvelerin öncelikle mayalar ile alkol fermantasyonu, sonrasında ise asetik asit bakterilerince asetik asit fermantasyonu sonucunda oluşan fermente ürün olarak tanımlanmaktadır (Gökırmaklı, Budak ve Güzel-Seydim, 2019). TS 1880 EN 13188 sirke standartında yapılan tanıma göre “tarım kökenli sıvılar ya da diğer maddelerden iki aşamalı alkol ve asetik asit fermantasyon ile biyolojik yolla üretilen kendine has ürün”dür (Bozdemir, Altan-Kemer, Akgül ve Gümüş, 2021). Codex Alimentarius ise sirkeyi insan tüketimi için sağlıklı olan, içinde yalnız şeker ya da nişasta

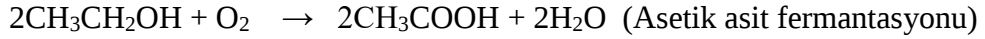
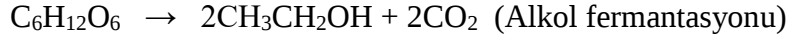
bulunduran gıdalardan alkol ve asetik asit fermantasyonuyla üretilen sıvı şeklinde tanımlamıştır (Bozdemir vd., 2021).

Şarap üretiminin tarihi yaklaşık 10.000 yıl öncesine dayandığı için sirke üretiminin de tarihi o kadar eski sayılmaktadır. Talmud'da Yahudilerin göçü sırasında şarapların sirkeleştiğinden bahsedilir, Eski Ahitte sirkenin kullanıldığı anlatılmaktadır. Babillerin sirkeyi lezzet arttırıcı, asitleyici, koruyucu ve yara tedavisinde kullanmanın yanında çeşitli aromalarda üretip ticaretini yaptıkları bilinir. Yunanlılar ve Romalılar ise yemeklerinde, gıda muhafazasında, zeytin, zeytinyağı üretiminde yaygın olarak kullanmışlardır. 1375 yılındaki modern Avrupa'nın en eski yemek kitabında sirkenin hazırlanması tarif edilmiştir. Hipokrat antibiyotik, öksürük ve ülserin tedavilerinde sirkeyi kullanmıştır (Chen, Chen, Giudici ve Chen, 2016; Connor ve Allgeier, 1976). Tarihi belgelerde kolera salgını zamanında dezenfektan olarak kullanıldığı belirtilmiştir (Gökırmaklı vd., 2019). 1814 yılında Berzelios asetik asit analizini gerçekleştirmesinden sonra 1823'te Schutzenbach sirke üretimi için yöntem geliştirmiştir (Budak vd., 2014). Günümüzde çeşitli meyvelerden ve tahıllardan üretilen sirke çeşitleri et, meyve ve sebze salamuralarında kullanılmanın dışında şekerlemelerde, mayonez, salata ve peynir sosları, hardal, alkolsüz içeceklerde ve gıda çeşnilerinde katkı maddesi, lezzet verici ve fonksiyonel özellikleri sebebiyle kullanılmaktadır (Connor ve Allgeier, 1976; Budak vd., 2014).

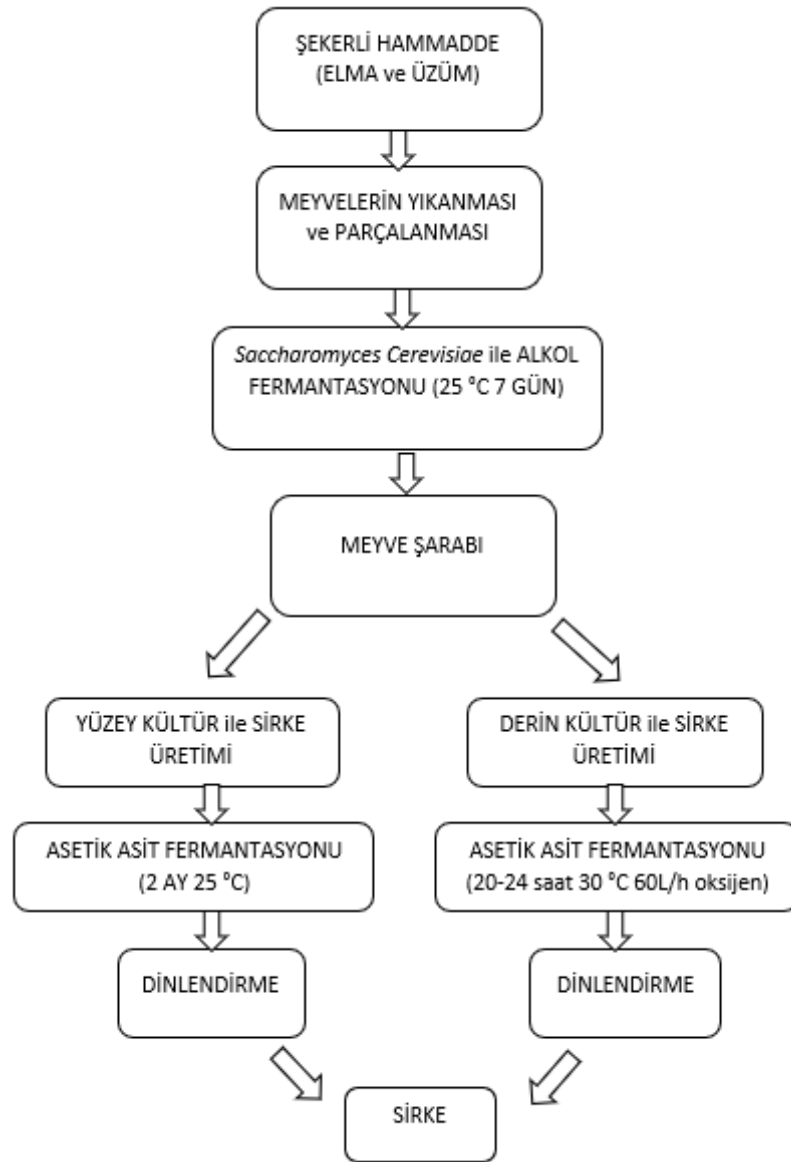
Geleneksel sirke tahıllardan üretilmektedir fakat alkol, şarap, malt, peynir altı suyu, bira, bal, şeker kamışı ve meyvelerden de üretilebilir. Fonksiyonel özellikleri dolayısıyla meyve sirkeleri son yıllarda daha fazla ilgi görmektedirler. Tahıl bazlı sirkeler genellikle Asya ülkelerinde üretilirken batıda üretilmemektedir (Budak vd., 2014; Dabija ve Hatnean, 2014; Liu, Tang, Zhao, Gan ve Li, 2019). Sirkenin üretildiği hammaddeye göre kimyasal ve organoleptik özellikleri değişmektedir (Kahraman, Tutun, Keyvan ve Balkan, 2022).

Sirke üretimi yavaş fermantasyon, hızlı fermantasyon veya derin kültür fermantasyonu yöntemleriyle yapılmaktadır (Bozdemir vd., 2021). Geleneksel sirke üretimine hammaddenin şırası veya şarap önce maya ile etil alkol fermantasyonuna bırakılır. Alkol fermantasyonunda en yaygın olarak kullanılan maya *Saccharomyces cerevisiae*'dir ve fermantasyon genel olarak 25°C'de 7 gün sürmektedir. Etanol

oluşumundan sonra asetik asit bakterileri tarafından etanolden asetaldehit üzerinden asetik asit oluşumu gerçekleşir. Asetik asit fermantasyonunda ve *Acetobacteriaceae* ailesindeki bakteri grubu olan *Acetobacter*, *Gluconacetobacter* ve *Gluconobacter*'ler aktivite göstermektedir (Budak vd., 2014; Şengün ve Kılıç, 2019).



Ev tipi üretimlerde yavaş fermantasyon yöntemi kullanılmaktadır. Bu yöntemde hammaddenin sırası ya da şarap önce maya ile etil alkol fermantasyonuna bırakılır. Mayalar tarafından yüzeyde sirke anası olarak isimlendirilen kıvamlı bir film tabakası oluşur. Etanol oluşumundan sonra ise asetik asit bakterileri tarafından asetaldehit üzerinden asetik asit oluşumu gerçekleşir. Sirke üretilmeye başladıktan sonra sirke anası dibe çöker. Bu yöntemle üretilen sirke verimi düşük olmasına rağmen, aromatik bileşik içeriği daha fazladır (Aran, 2010; Dabija ve Hatnean, 2014; Tangüler, Mert, İlman, Yücel ve Gençtürk, 2021). Hızlı yöntemde ise dolgu maddelerine saf sirke kültürü ya da sirke tutundurulur ve alkollü sıvı püskürtmesi yapılır. Asetik asit fermantasyonu esnasında alttan hava akımı verilir. Ticari sirkelerin üretimi bu yöntemle yapılmaktadır. Derin kültür yönteminde dolgu maddesi kullanılmaz, saf asetik asit bakterileriyle fermantasyon yapılır ve sirkesi yapılacak ürünün içine hava kabarcıkları verilir. Çabuk ve derin kültür yönteminde alkol ve asitlik içerikleri belirli düzeye geldiği zaman fermantasyon kontrollü olarak bitirilir (Aran, 2010; Öztürk, 2021). Yavaş yöntemde asetik asit fermantasyonu yaklaşık 2 ay sürerken, hızlı yöntemde 20-24 saat arasında tamamlanmaktadır (Şekil 2.16) (Budak vd., 2014).



Şekil 2.16. Sirke üretim aşamaları (Budak vd., 2014)

Eski yüzyılda sirkeler daha çok koruyucu özelliği nedeniyle tüketilirken son zamanlarda beslenmedeki yararlı ve fonksiyonel özellikleri nedeniyle tüketilmektedir. Özellikle meyve sirkelerinin antioksidan özelliği eşdeğer meyve sularına göre daha yüksektir. İçerdikleri organik asitler sayesinde antibakteriyel etki göstermektedirler (Öztürk, 2021). Hayvanlar üzerinde yapılan çalışmalarda lipid düzeylerinin ve kan şekerinin düzenlenmesinde (Petsiou, Mitrou, Raptis ve Dimitriadis, 2014), HDL kolesterolü yükseltmede ve LDL kolesterolü düşürmede (Fushimi vd., 2006) etkili olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Farklı kanser türlerinde hücrelerin çoğalmasını önlemede yardımcı olduğu gözlemlenmiştir (Baba, Higashi ve Kanekura, 2013). Ratlarda yapılan çalışmada

ise kilo vermede etkili olduğu gözlemlenmiştir. Kardiyovasküler hastalıklar ve yüksek tansiyona karşı sirkenin olumlu etkileri tespit edilmiştir (Öztürk, 2021). Bu teröpatik özellikleri içerdiği organik asitler, fenolikler, flavonoidler, esansiyel amino asitler, vitamin ve mineral gibi biyoaktif bileşiklerden kaynaklanmaktadır (Kahraman vd., 2022).

Elma ve üzüm sirkesinin organik asit içerikleri birbirlerine çok benzemekle birlikte, her ikisinde de en fazla bulunan asetik asit, ikinci sırada bulunan organik asitler üzüm sirkesinde tartarik asit, elma sirkesinde süksinik asittir. Elma sirkesi üzüm sirkesinden farklı olarak laktik asit de içermektedir (Kahraman vd., 2022; Liu vd., 2019). Fenolik bileşenler açısından ise gallik, protokateşik, kafeik, p-kumarik asit ve kateşin içerirler. En yoğun bulunan fenolik bileşen gallik asit iken, üzüm sirkesi elma sirkesinden farklı olarak klorojenik asit içermektedir (Kahraman vd., 2022; Liu vd., 2019). Mineral olarak Cu, Mg, Cr, Ca, K, P ve Na içerirler (Şekil 2.6). Uçucu bileşenler olarak elma sirkesinde aseton ve 2-metilbütanolü içeren toplam dokuz, üzüm sirkesinde ise etil asetat ve 2,4,5-trimetil-1,3-dioksolanı içeren toplam on sekiz adet uçucu bileşik tespit edilmiştir. Antioksidan ve fenolik özellikler açısından kıyaslanması durumunda üzüm sirkesi daha zengindir (Çizelge 2.6) (Kahraman vd., 2022).

Çizelge 2.6. Üzüm ve elma sirkesinin organik asit, fenolik ve mineral içeriği (Kahraman vd., 2022)

	Bileşenler	Üzüm sirkesi	Elma Sirkesi
Organik Asitler (µg/g)	Asetik asit	17815.8 (%79.9*)	7584.4 (%84.2)
	Tartarik asit	3769.4 (%16.9)	110.8 (%1.2)
	Malik asit	323.8 (%1.4)	101.8 (%1.1)
	Laktik asit	nd	467.9 (%5.2)
	Sitrik asit	67 (%0.3)	167.1 (%1.8)
	Süksinik asit	307.7 (%1.3)	571.8 (%6.3)
Fenolik bileşikler (µg/ml)	Gallik asit	10.8	4.5
	Protokateşik asit	2.4	0.7
	Kateşin	4.4	1.3
	Klorojenik asit	3.1	nd
	Kafeik asit	5.2	0,3
	p-Kumarik asit	0.8	0,03
Mineraller (mg/g)	Mg	5.696±0.4846	5.389±0.2275
	Ca	30.04±0.522	6.715±0.2967
	K	153.8±5.22	131.2±4.29
	Na	21.85±1.502	15.37±0.734
	P	10.90±0.087	6.901±0.1194
Mineraller (ppm)	Cu	<0.006 ppm	<0.006 ppm
	Cr	<0.005 ppm	<0.005 ppm

* % değeri, sirkelerin içindeki organik asit miktarlarının bulunma oranını göstermektedir.

Sirkeler antimikrobiyal özelliğinden dolayı meyve ve sebzelerin temizlenmesinde, bozulmalarının önlenmesinde dezenfektan görevi görebilir (Öztürk vd., 2015). Sirke antimikrobiyal aktivitesini, içerdiği organik asitlerin bakterilerin dış zarına etki ederek zar geçirgenliğini değiştirmesi veya hücre içi ozmotik basıncı değişmesiyle gösterir (Chen vd., 2016). Üzüm sirkesinin organik asit, fenolik içeriği daha yüksek olduğu için antimikrobiyal aktivitesi daha fazladır (Kahraman vd., 2022).

Özellikle kırmızı üzümden üretilen sirkelerin antioksidan aktivite ve radikal temizleme gücü daha etkilidir (Guidici, Gullo, Solieri ve Falcone 2009). Sirkede bulunan fenoliklerin, organik asitlerin ve özellikle polifenollerin oksidatif hasarı baskıladıkları ve antioksidan aktivite gösterdikleri bildirilmiştir. Özellikle üzüm sirkesi içerdiği resveratrol ile elma sirkesine kıyasla daha etkilidir (Chen vd., 2016).

Elma sirkesinin alkol fermantasyonu aşaması atlanarak yani elma suyuna alkol eklenmesi sonrasında asetik asit fermantasyonunun gerçekleşmesi sırasında oluşan α -glikan yapısının antitümör özelliği fareler üzerinde yapılan çalışmalarda ortaya çıkarılmıştır (Abe, Kushibiki, Matsue, Furukawa ve Motomura, 2007).

Sirkenin antidiyabetik etkisi üzerine yapılan çalışmalar da vardır. Sirke ile yapılan çalışmada elma sirkesi ve plasebo içecek içtikten sonra karbondiğeratlı öğün tüketen kişilerden insülin duyarlılığı olanlarda %34 ve tip 2 diyabetli olanlarda %19 oranında postprandiyal değerlerinde iyileşme olduğu gözlemlenmiştir (Johnston, Kim ve Buller, 2004). Yüksek glisemik indeksli diyetle beslenen kişilerde sirke tüketimi tokluk kan şekerini azaltıcı etki gösterirken, düşük glisemik indeksli diyetlerle beslenen ve yemek sonrasında düzenli sirke kullanan kişilerde kan şekerinin düzenlenmesinde önemli bir değişiklik gözlenmemiştir (Johnston ve Buller, 2005). Tip 2 diyabetli kişilerin gece yatmadan düzenli elma sirkesi tüketimi ise açlık kan şekeri konsantrasyonunun düzenlenmesine yardımcı olduğu görülmüştür (Johnston, White ve Kent, 2009).

Toplam ölümlerin büyük bir kısmını oluşturan kolesterol, yüksek tansiyon, sigara ve hareketsizlik kaynaklı olabilen kardiyovasküler hastalıklarda polifenol içeriği zengin gıdalar tüketilmesinin koruyucu etki gösterdiği ve ölümleri azalttığı bilinmektedir (Budak vd., 2014). Aterosklerozun başlamasında ve ilerlemesinde oksidan maddeler ve LDL kolesterolün etkisi büyüktür (Berliner ve Heinecke, 1990; Lee vd., 2007). Özellikle elma sirkesindeki klorojenik asit LDL kolesterolün oksidasyonunu önleyerek antioksidan

aktivite göstermektedir (Laranjinha, Almeida ve Madeira, 1994). Asetik asidin serum kolesterolünü ve trigliseritleri üzerinde azaltıcı etki gösterdiği (Yamashita vd., 2007), VLDL ve HDL kolesterol seviyelerini de arttırdığı gözlemlenmiştir. İnsanlar üzerinde yapılan ve 8 hafta süren araştırmada günde iki kez 30 ml civarında tüketilmesi hiperlipidemili hastaların kolesterol, trigliserit, LDL seviyelerini önemli ölçüde azaltmış, HDL seviyesinde ise hafif bir artış gerçekleşmiştir (Beheshti vd., 2012; Budak vd., 2014).

Sirke anası doku onarımı ve yanıkların tedavi edilmesinde etkilidir (Budak vd., 2014).

2.5.2.4. Kombucha (Kombuça/Kombu Çayı)

Doğu Asya ülkelerinde Çin'in Mançurya bölgesinde yaklaşık MÖ 220 yılında ortaya çıkmıştır. Adını 414 yılında imparatorun sindirim problemlerini iyileştirmek için Kore'den Japonya'ya çay mantarını götüren Dr. Kombu'dan alan, maya ve asetik asit bakterilerinin ortak çalışması sonucu detoksifiye eden, ferahlatıcı ve enerji verici özelliği olan fermente bir içecektir (Gaggia vd., 2018; Jayabalan, Malbasa, Loncar, Vitas ve Sathishkumar, 2014; Loncar, Djuric, Malbasa, Kolarov ve Klasnja, 2006). Ruslara göre ise Rusya'dan Avrupa'ya yayılan, lezzeti elma şarabına benzeyen köpüklü, asitli ve şekerli çaydan maya ve asetik asit bakterisi kombinasyonu (çay mantarı) ile evlerde de üretilen Kargasok çayı, Manchurian Mantarı ve Haipao olarak da tanınan içecektir (Greenwalt, Steinkraus ve Ledford, 2000; İleri-Büyükoğlu, Taşçı ve Şahindokuyucu, 2010; Jayabalan vd., 2014). Probiyotik etkileri ve fonksiyonel özelliği ile tüketici ve araştırmacıların dikkatini çeken kombu çayıyla ilgili olarak siyah, yeşil, oolong melas, nane, ihlamur, kola, limon balsam çayı, kekik, melisa, siyah havuç, civanperçemi, buğday çimi, guava yaprakları, Afrika hardalı yaprakları, kakule, tarçın, şarap, yer elması, sirke, peynir altı suyu, kahve ve meyvelerin (ahududu, kurt üzümü, kırmızı üzüm, hurma, kavun, karpuz, vişne, kaktüs armut ve karaçalı meyvesi) substrat olarak kullanılmasıyla çeşitli araştırmalar yapılmış, fakat bakteri ve mayanın simbiyotik kültürü (SCOBY) için en uygun substratın siyah çay olduğu tespit edilmiştir (Delik, Eroğlu, Ünal ve Tefon-Öztürk, 2021; Greenwalt vd., 2000; İleri-Büyükoğlu vd., 2010; Mousavi vd., 2020; Tamer vd., 2021).

Kombucha çayı mayası (SCOBY, simbiyotik bakteri ve maya kültürü), özellikle mayalar ve bakteriler olmak üzere farklı mikrobiyal grupların simbiyotik biçimde

yaşadığı bir mikrobiyal topluluktur (Şekil 2.17). Bakteriler arasında laktik asit bakterileri bulunmasına rağmen asetik asit bakterileri başlıca fonksiyonel organizmalardır; ayrıca *Saccharomyces* ve *Zygosaccharomyces* cinsi maya suşlarını içermektedir. Kombucha çayı üretiminde, mayalar ve asetik asit bakterileri tarafından yürütülen iki fermantasyon reaksiyonu gerçekleşir. Maya ve bakteri arasındaki simbiyotik ilişki, mayaların Kombucha çayı üretiminde ana substrat olan sakkarozun glukoz ve fruktoza ve daha sonra da etanole hidrolize edildiği fermantasyon işlemiyle kurulur. Asetik asit bakterileri glukonik asit, glukuronik asit, asetik asit ve bakteriyel selüloz üretmek için glukoz, fruktoz ve etanolü kullanır (La China vd., 2021). Ürün olarak şekerli, organik bileşiklerin verdiği ekşi aromalı, hafif gazlı, asidik içecek oluşur.

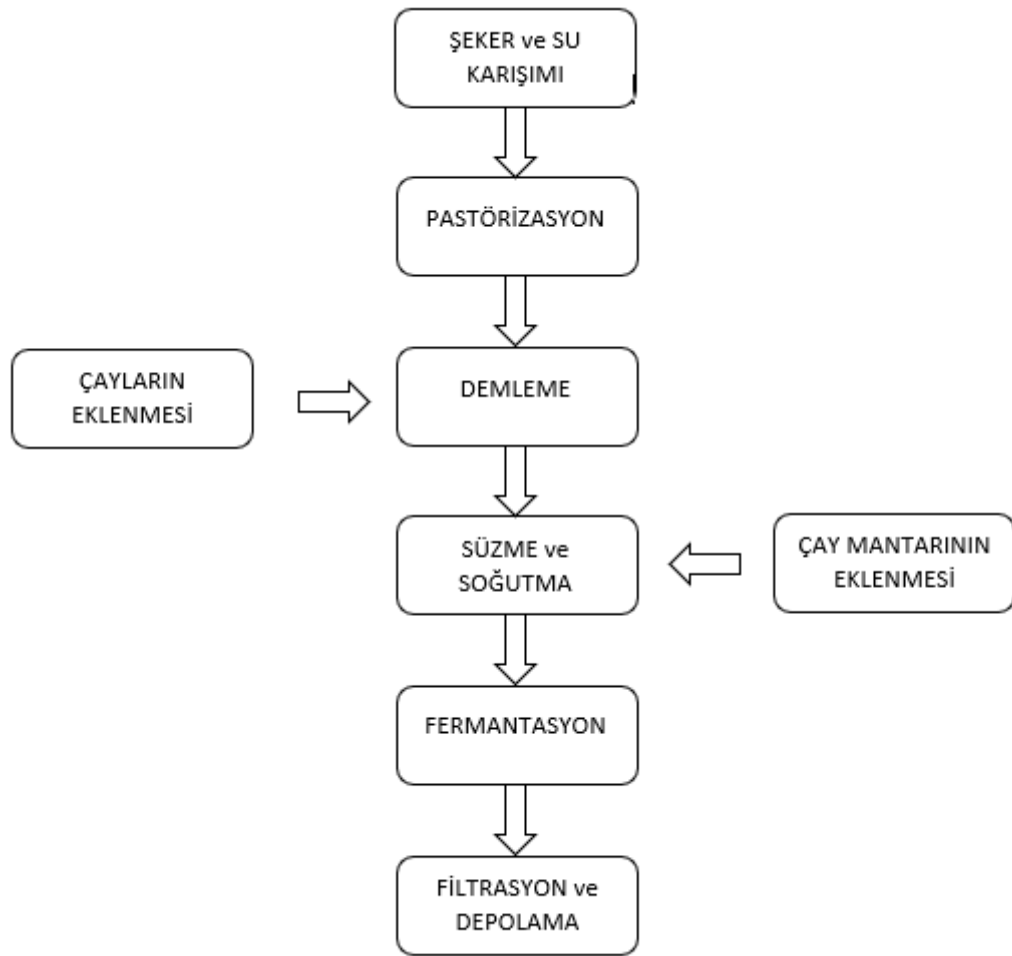


Şekil 2.17. SCOBY (Simbiyotik bakteri ve mayanın kültürü) mayası

Literatüre göre çay mantarında bulunan mayalar; *Pichia spp.*, *Saccharomyces sp.*, *Saccharomyces ludwigii*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Torulopsis sp.*, *Zygosaccharomyces bailii*, *Zygosaccharomyces rouxii*, *Brettanomyces sp.*, *Zygosaccharomyces kombuchaensis*, *Brettanomyces bruxellensis*, *Brettanomyces lambicus*, *Brettanomyces custersii*, *Candida krusei*, *Candida albicans* ve *Kluyveromyces africanus*, *Torulaspora delbrueckii*, *Torula varieties*’tir (Greenwalt vd., 2000; La China vd., 2021). Asetik asit bakterileri ise; *Acetobacter xylinum*, *Acetobacter aceti*, *Acetobacter pasteurianus*, *Acetobacter xylinoides*, *Bacterium gluconicum*, *Gluconobacter oxydans* (İleri-Büyükoğlu vd., 2010)

Genellikle çay mantarı ticari olarak temin edilir. Şeker, su karışımı hazırlanır ve pastörize edilir. 95°C’deki çözeltiye siyah çay ya da yeşil çay karışımları eklenerek demlenir. Süzülen karışım fermantasyonun gerçekleşebilmesi için optimum sıcaklığa

kadar soğutulur. Cam kavanoza alınarak çay mantarı eklenir. Oda koşullarında ve karanlık ortamda fermentasyona bırakılan çaydan yaklaşık 7-14 gün sonrasında mantar alınır ve karışım süzülür, 4°C de depolanır (Şekil 2.18) (İleri-Büyükoğlu vd., 2010; Tamer vd., 2021). Fermentasyon süresi, sıcaklık, çay kalitesi, çayın türü ve yaşı, yaprakların toplanma konumu, iklim, sakkaroz konsantrasyonu, mayanın mikrobiyal bileşimi ürünün kimyasal ve antioksidan içeriğini etkiler (Gaggia vd., 2018). Toksik etkili organik asit oluşabilmesi ihtimaliyle uzun fermentasyon önerilmez (Villarreal-Soto, Beaufort, Bouajila, Souchard ve Taillandier, 2018).



Şekil 2.18. Kombucha çayı üretim şeması (Tamer vd., 2021)

Kombucha genel olarak çaydan gelen ve fermentasyon sırasında oluşan birçok organik asit, vitamin ve mineraller içerir. Lisin, arginin, metiyonin gibi amino asitleri, flor, mangan, demir, nikel, bakır, çinko, kobalt, potasyum gibi mineralleri, B grubu, E, K, C vitaminlerini, çeşitli flavonoid, kateşin, polifenoller, saponinleri, hidrolitik enzimleri

(Gaggia vd., 2018; Mazraedoost ve Banaei 2020; Mousavi vd., 2020; Tamer vd., 2021) ve folik asit (Marsh vd., 2014) içerir. Kombü çay asetik asit, laktik asit, glukuronik asit, glukarık asit, glukonik asit, glukonolakton, etanol, gliserol, süksinik asit, oksalik asit, malik asit, malonik asit, pirüvik asit, tartarik asit, sakkarik asit gibi bileşikler de içerir. Çayın buruk aromasından sorumlu olan kateşinlerden; epikateşin gallat, epigallokateşin, kateşin, epikateşin, epigallo kateşin gallat ve gallokateşini bulundurur. Kerşetin, kamferol, mirisetin ve glukozidlerini içerir. Çay mantarı ise orşinol, antranorin, orsellinik, slazinci, lekaronik ve fumarprotoeketrarik asitleri bulundurur (Greenwalt vd., 2000; İleri-Büyükoğlu vd., 2010; Mousavi vd., 2020).

Fermantasyon süresi, çay ve şeker konsantrasyonu, maya, sıcaklık gibi faktörler kombucha çayının bileşimini ve bileşenlerin konsantrasyonlarını etkilemektedir. Fermantasyon prosesi süresince üretilen bazı bileşenlerin ortalama değerleri Çizelge 2.7’de verilmiştir.

Çizelge 2.7. Kombuchanın kimyasal içeriği (Mousavi vd., 2020)

	Bileşikler	Ortalama miktar	Sükroz (g/l)	Fermantasyon zamanı (gün)
Genel bileşenler	Etanol	5.5 g/l	100	20
	Protein	3 mg/ml	100	12
	Polifenoller	7.8 mm GAE	100	15
Organik asitler (g/l)	Asetik asit	5.6	70	15
	Asetik asit	8.36	100	18
	Asetik asit	11	100	30
	Glukonik asit	39	100	60
	Glukuronik asit	0.0160	70	21
	Laktik asit	0.18	100	18
Mineraller (µg/ml)	Cu, Fe, Mn, Ni, Zn	0.1-0.4	70	15
Vitaminler (mg/ml)	Vitamin B ₁	0.74	70	15
	Vitamin B ₂	0.08	70	10
	Vitamin B ₆	0.52	70	15
	Vitamin B ₁₂	0.84	70	15
	Vitamin C	25	70	10
Anyonlar (mg/g)	F ⁻ , Cl ⁻ , Br ⁻ , I ⁻ , NO ⁻³ , HPO ⁻⁴ , SO ⁻⁴	0.04-3.20	100	7

Kombucha içerikleriyle detoksifiye edici, karaciğer ve immün sistem destekleyici, bağırsak ve gastrointestinal sistemi iyileştirici, kolesterol düşürücü, antidiyabetik, antikanserojen, antioksidan, antiviral özellikleri gösterir (Mazraedoost ve Banaei 2020;

Tamer vd., 2021). Diyet desteği olarak tüketilebilir, günlük tüketim miktarı 100-300 ml arasında olmalıdır (Greenwalt vd., 2000).

Staphylococcus aureus, *Shigella sonnei*, *Candida albicans*, *E. coli*, *Helicobacter* gibi mikroorganizmalar genel olarak ishal ve peptik hastalıklara neden olurlar. Kombucha bu mikroorganizmalara karşı özellikle asetik asit içeriği ile antimikrobiyal, antibakteriyel aktivite gösterir. Asetik asit ayrıca antifungal aktivitenin artmasına da yardımcı olmaktadır (Mousavi vd., 2020). İçeriğindeki usnik asit ise virüslere karşı aktivite göstermektedir. Laktik asit ve B grubu vitaminlerini içermesi bağışıklık sistemini güçlendirici etkisi olarak yorumlanmıştır, probiyotik ve prebiyotik etkilidir (İleri-Büyükoğlu vd., 2010; Mousavi vd., 2020). Kombuchanın içeriğindeki flavonoidler, fenolikler, tanenler ve polifenoller antioksidan etkinin kaynağı olarak kabul edilmektedir (Mousavi vd., 2020).

2. Dünya savaşından sonra Rusya'da sanayi kirliliği ve toksinlerin etkilerine rağmen kombucha tüketen bölgelerde kanser oranlarının daha düşük olduğu bildirilmiştir (Greenwalt vd., 2000).

SCOBY aktivitesi ile üretilen selülozik biyofilmin üretiminde yer alan mikroorganizmaların izole edilerek su, şeker kamışı küspesi karışımına ekilmesi ile biyoselüloz üretilmiştir. Bunun antimikrobiyal aktivitesinden yararlanarak yanıklarda yangıyı azaltmak için ve geçici deri bileşeni olarak kullanılabileceği düşünülmektedir (İleri-Büyükoğlu vd., 2010).

ABD Gıda ve İlaç Dairesi kombucha'nın etkilerini araştırdıktan sonra zararlı etkisinin olmadığını teyit etmiştir (Mousavi vd., 2020). Ancak ev koşullarında hijyene dikkat edilmeden ve uygun fermantasyon koşulları sağlanmadan üretilen kombuchalarda toksik etkiler oluşabilir. Ayrıca yüksek miktarda tüketim sonucunda da kusma, mide bulantısı, baş dönmesi, asitliğe bağlı mide rahatsızlıkları, alerjik reaksiyonlar görülebilir (Mousavi vd., 2020; Villarreal-Soto vd., 2018).

BÖLÜM 3

MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

3.1.1 Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Cihazlar

Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler analitik saflıkta olup, Merck, Riedel-de Haen ve Sigma-Aldrich firmalarından temin edilmiştir. Analizler sırasında kullanılan cihaz ve ekipmanlar spektrofotometre (Therma Scientific), hassas terazi (Precisa XB 220A), pH metre (wtw 330i), çalkalamalı su banyosu (Wisebath Daihan), infrared nem tayin cihazı (Moisture Analyzer MA 30), vorteks (Whırlı mixer), santrifüj (MSE Mistral 2000), buzdolabı, kuvarz küvetler, çeşitli mikropipetler (Eppendorf) ve cam malzemeler (Iso Lab)'dir. Triptofan ve metabolitlerinin analizleri LC-MS/MS (Agilent Technologies 6460 Triple Quad) cihazıyla ölçülmüştür.

3.1.2. Deneyde Kullanılan Fermente Ürünler

Deney materyalleri olan fermente ürünler iki çeşit sirke (elma ve üzüm sirkeleri) ve Trakya yöresine ait olan 2 çeşit hardaliye (Edirne ve Kırklareli'nde üretilen) marketten satın alındı. Kombucha çayının mayası (SCOBY) ve boza internetten satın alındı.



Boza



Üzüm sirkesi



Elma sirkesi



Kombucha çayı



Hardaliye (Kırklareli)



Hardaliye (Edirne)

Şekil 3.1. Deneyde kullanılan fermente ürünler

Kırklareli yöresine ait olan ve ticari olarak üretilen hardaliye Cabarnet, Merlot ve Shiraz türü üzümlerden üretilmektedir. 2017 yılında coğrafi yer işareti olarak Kırklareli iline tescillenmiştir. Edirne yöresine ait olan ve ticari olarak üretilen hardaliye ise Merlot türü üzümden üretilmektedir. Trakya Bölgesine ait olan yerel bir firmadan internet satışıyla alınan klasik sade boza, mısır unu ve darı irmiğinden üretilmiştir. Elma sirkesi pastörize edilmemiş doğal elma suyundan yavaş tip fermentasyon ile üretilmiş ticari bir üründür. Üzüm sirkesi de marketlerde sık bulunan ticari bir üründür.

Kombucha çayının mayası (SCOBY) internet satışından alınarak tarifine göre yapıldı. Hazırlama kitindeki 20 g yeşil çay kaynar suda 10 dakika boyunca demlendi. İnce bir tülbentten süzülen yeşil çay 5 litrelik cam kavanoza alındı, 250 g şeker ve su eklenerek karıştırıldı, soğumaya bırakıldı. Oda sıcaklığına geldiğinde SCOBY mayası ve içinde

geldiği suyu kavanoza eklendi. Kavanozun ağzına kapatılan t lbent gerilerek paket lastiği ile sabitlendi. Oda koşullarında ve karanlık bir ortamda 10 gün fermentasyona bırakıldı. Mayalanma süresi bitiminde kombucha  ayı s z lerek kullanıldı.



Kombucha  ayı kiti



Fermentasyon süreci



10 günlük fermentasyon sonrası SCOBY mayası

şekil 3.2. Kombucha  ayının hazırlanması

3.1.3. Kullanılan   zeltiller

Toplam asitlik tayininde kullanılan   zeltiller

- %1'lik fenolftalein: 0.5 g fenolftalein tartılarak 50 ml etanolde   z ld .
- 0.5 N NaOH   zeltisi: 4g NaOH tartılarak saf suda   z ld  ve 200 ml'ye tamamlandı.
- 0.1 N NaOH   zeltisi: 0.5 N'lık NaOH'tan 40 ml alınarak saf suyla 200 ml'ye tamamlandı.

Toplam fenolik madde tayininde kullanılan   zeltiller

- %2'lik Na₂CO₃   zeltisi: 2 g Na₂CO₃ tartıldı ve saf suda   z lerek balon jodede 100 ml'ye tamamlandı.
- Gallik asit çözeltisi (1 mg/ml): 100 mg gallik asit tartıldı ve saf su ile 100 ml'ye tamamlandı. 50, 100, 200, 250, 300, 400, 500  g/ml konsantrasyonlara seyreltildi.
- Folin Ciocalteu Reaktif  (FCR): Satın alındığı şekilde direk kullanıldı.

DPPH' giderme metodunda kullanılan   zeltiller

- 1 mM DPPH: 0.0394 g DPPH tartılarak balon jöjeye konuldu ve etanolde çözölerek 100 ml'ye tamamlandı. Işıık almaması için etrafı alüminyum folyo ile kaplandı.
- 0.1 mM DPPH: 1 mM DPPH çözeltisinden 25 ml alınıp etanol ile 250 ml'ye tamamlandı.

3.2. Metot

3.2.1. Kinörenin Metabolitlerinin LC-MS/MS ile Belirlenmesi

Triptofan ve kinörenin yolağı metabolitlerinin kantitatif analizleri Agilent Technologies 6460 Triple Quadrupole marka LC-MS/MS cihazıyla yapıldı (Vitalini vd., 2020). Numunelerin hazırlığı aşamasında; herbir numuneden 1 ml alındı ve üzerlerine 9 ml %0.1 formik asitli metanol eklendi. 30 saniye vortekslelendikten sonra 5 dk 13500 rpm'de santrifüj edildi ve 0.22 micron naylon filtreden süzölerek şeffaf süpernatant cam vialle alındı. Ardından LC-MS/MS sistemine 5 µl enjekte edilerek analiz gerçekleştirildi. LC-MS/MS cihazında metod çalışma koşulları Çizelge 3.1, 3.2 ve 3.3'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Cihazın LC ile ilgili parametreleri

Analiz Parametresi	Koşul
Mobil Faz A	5 mM Amonyum Format + %0.1 Formik Asit + Ultra Saf Su
Mobil Faz B	%0.1 Formik Asit + Metanol
Kolon türü	Zorbax-Extend-C18 (4.6x100 mm ve 3.5 micron)
Kolon Sıcaklığı	25°C
Örnekleyici Sıcaklığı	4°C
Enjeksiyon Hacmi	5 µl
Analiz Süresi	12 dk
Akış Hızı	0.600 ml/dk

Çizelge 3.2. LC akış gradienti parametreleri

	Zaman (dk)	Mobil Faz A (%)	Mobil Faz B (%)
Akış gradienti	0.00	90	10
	0.70	90	10
	2.50	95	5
	7.00	5	95
	7.10	90	10
	12.00	90	10

Çizelge 3.3. Cihazın MS/MS ile ilgili parametreleri

Analiz Parametresi	Koşul
İyon Kaynağı	Elektrosprey İyonizasyon (ESI)
İyonlaştırma Türü	Pozitif
Kapiler Voltajı	3000 V
Source Sıcaklığı	375°C
Azot Gazı Sıcaklığı	300°C
Azot Gaz Akışı	10 L/dk
Delta EMV (+)	0 V

Numunelerdeki L-triptofan, L-kinürenin, kinürenik asit, 3-OH-DL-kinürenin, nikotinik asit ve nikotinamid için tespit edilebilen en düşük konsantrasyonu ifade eden LOD (tespit limiti) ve çalışma koşullarında numunelerde belirlenen en düşük analit konsantrasyonlarını ifade eden LOQ (tayin sınırı) değerleri Çizelge 3.4’te verilmiştir.

Çizelge 3.4. Ölçülecek metabolitlere ait LOD ve LOQ değerleri

	LOD	LOQ
L-Triptofan	0,12 ng/ml	0,36 ng/ml
L-Kinürenin	0,17 ng/ml	0,50 ng/ml
Kinürenik asit	0,04 ng/ml	0,13 ng/ml
3-OH-DL-Kinürenin	0,125 ng/ml	0,37 ng/ml
Nikotinik asit	0,18 ng/ml	0,42 ng/ml
Nikotinamid	0,11 ng/ml	0,31 ng/ml

Boza, sirke, kombucha ve hardaliye örneklerine belirli miktarda triptofan, kinürenin, kinürenik asit, 3-OH kinürenin, nikotinik asit ve nikotinamid standart çözeltileri eklenerek, örneklerdeki bu analitlerin miktarları LC-MS/MS cihazıyla belirlendi ve cihazdan elde edilen yüzde geri kazanım oranları Çizelge 3.5’de verilmiştir.

Çizelge 3.5. Ölçülecek analitlere ait standart maddelerin geri kazanım oranları

	1. Geri Kazanım	2. Geri Kazanım	3. Geri Kazanım
L-Triptofan	%106	%105	%105
L-Kinürenin	%110	%107	%105
Kinürenik asit	%115	%113	%112
3-OH-DL-Kinürenin	%110	%112	%113
Nikotinik asit	%124	%122	%125
Nikotinamid	%120	%125	%121

3.2.2. Fermente Ürünlerde Yapılan Diğer Analizler

3.2.2.1. pH Tayini

pH; H^+ iyonu konsantrasyonunun ölçümüdür. Cam ve referans elektrot arasındaki elektrod potansiyelinin ölçülmesiyle tayin edilebilir. Çalışılan örnekler asidik olduğu için pH metre önce pH 4 ve pH 7 olan tampon çözeltiler ile kalibre edildi. Daha sonra pH metrenin elektrodu, magnetle hafifçe karıştırılan örneklerin içine daldırıldı ve sabit kalan pH değeri okundu.

3.2.2.2. Toplam Asitlik Tayini

Titre edilebilen asitlik örnekte bulunan serbest asitleri nötralleştirmek için harcanan ayarlı baz (NaOH veya KOH) çözeltisinin hacminin bulunmasıdır.

Sirke örnekleri 1:1 oranında su ile seyreltildi, fenolftalein indikatörü eklenerek 0.5 N NaOH ile titre edildi. Kombucha çayı 1:1 oranında su ile seyreltildi, fenolftalein indikatörü eklenerek 0.1 N NaOH ile titre edildi. 5 g boza tartılarak 20 ml saf su ile karıştırıldı ve fenolftalein eklendikten sonra 0.1 N NaOH ile titrasyonu yapıldı. Hardaliye örneklerinde 1:20 oranında seyreltme yapıldı, ancak seyreltilmiş hardaliyenin rengi ile dönüm noktasının rengi çok yakın olduğu için pH metre kullanılarak dönüm noktası 8.1 olacak şekilde 0.1 N NaOH ile titre edildi.

Titrasyonda harcanan 1 ml 0.1 N NaOH çözeltisi boza için 0.009 g laktik aside, hardaliyeler için 0.0075 g tartarik aside, sirke ve kombucha çayı için 0.006 g asetik aside eşdeğerdir. % asitlik değerleri aşağıdaki formül kullanılarak, örnekte en fazla bulunan aside uygun olan faktör ve seyreltme katsayısı kullanılarak 100 ml örnekteki gram asit cinsinden hesaplandı.

$$\% \text{ Asitlik} = [(V \times N \times F \times 100) / w] \times \text{Sey.fak.}$$

Formüldeki V titrasyonda kullanılan bazın hacmini (ml); N titrasyonda kullanılan bazın normalitesini; F örnekte bulunan asidin ekivalent gramını; w alınan örnek miktarını (g) ifade etmektedir.

3.2.2.3. Yoğunluk Tayini

Hardaliye, sirke, kombucha çayı ve boza örneklerinin özgül ağırlıklarının tayini için 25 ml'lik Welt tipi piknometre kullanıldı. Piknometre yoğunluğu tayin edilecek örnek ile dolduruldu, kapağı kapatıldı ve dışına taşan kısım silindikten sonra tartım alındı. Tartım değerinden piknometrenin darası çıkarıldıktan sonra $d=m/V$ eşitliğinden örneklerin yoğunlukları g/cm^3 olarak hesaplandı.

3.2.2.4. Nem /Kuru Madde Tayini

Moisture Analyzer MA 30 marka nem tayin cihazı ile nem içeriği ve kuru madde tayini yapılabilmektedir. Cihaz bir terazi ile ısıtıcının kombinasyonu olup, infrared lambaları ile numunenin $105^{\circ}C$ 'de ısıtılması sağlanır ve sabit tartıma ulaşıldığında örneklerin nemi cihazın ekranından % olarak okundu. Boza ve kombucha çayı örneklerinden yaklaşık 2 g, sirke ve hardaliye örneklerinden ise 1 g örnek alınarak analiz gerçekleştirildi.

3.2.2.5. Toplam Fenolik Madde Miktar Tayini

Hardaliye, sirke, kombucha çayı ve bozadan alınan örneklerde toplam fenolik madde tayini Singleton ve Rossi (1965) metoduna göre yapıldı.

Hardaliye, elma ve üzüm sirkeleri, kombucha çayı örneklerinden 0,1 ml alındı. Bozadan, su ile 1:10 seyreltme yapılarak ve $45 \mu m$ membran filtreden süzüldükten sonra 0.1 ml alındı. Üzerlerine 4.5 ml destile su ve 0.1 ml Folin-Ciocalteu reaktifi eklenerek vortekslendi. 3 dk bekletildikten sonra tüplere 0.3 ml %2'lik Na_2CO_3 eklendi ve $25^{\circ}C$ 'de 125 rpm'de 2 saat çalkalamalı su banyosunda bekletildi. $\lambda=760 \text{ nm}$ 'de absorbanları ölçüldü. Kontrol tüpü örnek yerine 0.1 ml su ile hazırlandı.

Örneklerdeki fenolik madde miktarlarını tayin etmek için, standart madde olarak gallik asit kullanıldı. 50, 100, 200, 300, 400, 500 $\mu g/ml$ konsantrasyonlarında hazırlanan gallik asit çözeltilerine aynı deney prosedürü uygulandı. Microsoft Excel programında,

konsantrasyonlara karşı okunan gallik asit absorbanlarının grafiği çizilerek standart grafik elde edildi. Grafik denklemi ($Abs=0.0009Konst-0.0396$ $R^2= 0.9945$) kullanılarak (ve boza için seyreltme oranı kullanılarak) örneklerin toplam fenolik madde miktarları gallik asit ekivalenti olarak hesaplandı.

3.2.2.6. DPPH• Giderme Aktivitesi

Hardaliyeler, sirkeler, kombucha çayı ve bozadan alınan örneklere DPPH• çözeltisi eklenerek radikal giderme aktivite tayini yapıldı (Blois, 1985). Serbest radikal giderme prosedürü öncesinde çeşitli oranlarda su veya alkol ile seyreltilerek örneklerin ön hazırlıkları yapıldı. Sirkeler etanol ile seyreltilirken; hardaliye, kombucha çayı ve bozada etanol ile seyreltmede çökelti veya bulanıklık olması nedeniyle (Şekil 3.3) seyreltme suyla yapıldı. Sirke örnekleri 1:5, 1:10, 1:20, 1:50 ve 1:100 (v/v) oranlarında etanol ile seyreltildi. Hardaliye örnekleri 1:10, 1:20, 1:50 ve 1:100 (v/v) oranlarında su ile seyreltildi. Kombucha çayı 45 µm filtreden süzöldükten sonra 1:5, 1:10, 1:20, 1:50 ve 1:100 (v/v) oranlarında su ile seyreltildi. Boza 1:10, 1:20 ve 1:50 (w/v) oranlarında su ile seyreltildikten sonra 9000 rpm 10°C’de 30 dk santrifüj edildi.



Şekil 3.3. Ön hazırlık sırasında etanol ile seyreltilen kombucha çayında (solda) ve hardaliyede (sağda) oluşan çökelti veya bulanıklıklar

Örnekler bu şekilde hazırlandıktan sonra, her bir örnekten 1 ml alındı. Üzerlerine 4 ml 0.1 mM DPPH• çözeltisi eklendi. Tüpler vortekslendikten sonra 30 dk karanlıkta bekletildi. $\lambda=515$ nm’de absorbanları okundu. Kontrol tüpleri alkolle seyreltilenler için etanol ile, saf suyla seyreltilenler için ise saf su kullanılarak hazırlandı.

Örneklerin serbest radikal giderme kapasiteleri, okunan absorban değerleri kullanılarak;

$$\% \text{ İnhibisyon} = [(Abs_{\text{kontrol}} - Abs_{\text{örnek}}) / Abs_{\text{kontrol}}] \times 100 \text{ formülüne göre hesaplandı.}$$

3.2.3. İstatistiksel Analiz

Tüm çalışmalar 2 paralel örnek şeklinde ikişer kez tekrarlanarak yapıldı. Tüm sonuçların aritmetik ortalamaları ve standart sapma değerleri Microsoft Office-Excel programı kullanılarak hesaplandı.



BÖLÜM 4

BULGULAR

4.1. Triptofan ve Kinürenin Metabolitlerinin LC-MS/MS ile Belirlenmesi

Elma sirkesi, üzüm sirkesi, boza, kambua ayı, Edirne ve Kırklareli yörelerine ait hardaliye örneklerinde L-triptofan, L-kinürenin, kinürenik asit, 3-hidroksikinürenin, nikotinik asit ve nikotinamid miktarları LC-MS/MS cihazı ile analiz edildi. Örneklerin triptofan ve kinürenin metabolit içerikleri ng/ml (ppb) olarak izelge 4.1’de verilmiştir. Analizlenen fermente ürünlerden en yüksek miktarda L-triptofan ve nikotinamid hardaliyelerde, en yüksek miktarda L-kinürenin bozada, en yüksek miktarda kinürenik asit kombucha çayında ve en yüksek miktarda nikotinik asit ise Edirne yöresine ait hardaliyede tayin edildi. Boza hariç diğfer fermente ürünlerde 3-hidroksikinürenine rastlanmadı.

Çizelge 4.1. Fermente ürünlerdeki triptofan ve kinürenin metabolitlerinin miktarları

Metabolitler (ng/ml)	Elma Sirkesi	Üzüm Sirkesi	Hardaliye (Edirne)	Hardaliye (Kırklareli)	Boza	Kombucha çayı
L-Triptofan	19.68±0.98	63.53±1.86	1798.29±59.37	2947.5±11.3	1316.79±1.05	9.15±0.03
L-Kinürenin	nd*	nd	16.21±0.12	1.69±0.04	33.19±0.71	nd
Kinürenik asit	9.56±0.29	13.32±0.12	5.61±0.04	7.54±0.14	10.42±0.21	26.10±0.13
3-OH- kinürenin	Nd	nd	nd	nd	12.21±0.21	nd
Nikotinik asit	5.17±0.29	38.86±0.21	1098.74±13.68	55.05±0.59	48.87±0.08	3.28±0.07
Nikotinamid	2.94±0.26	29.39±0.27	73.3±1.22	69.07±2.32	2.49±0.29	0.78±0.01

*nd: Tayin edilemedi

4.2. Fermente Ürünlerde Yapılan Diğer Analizler

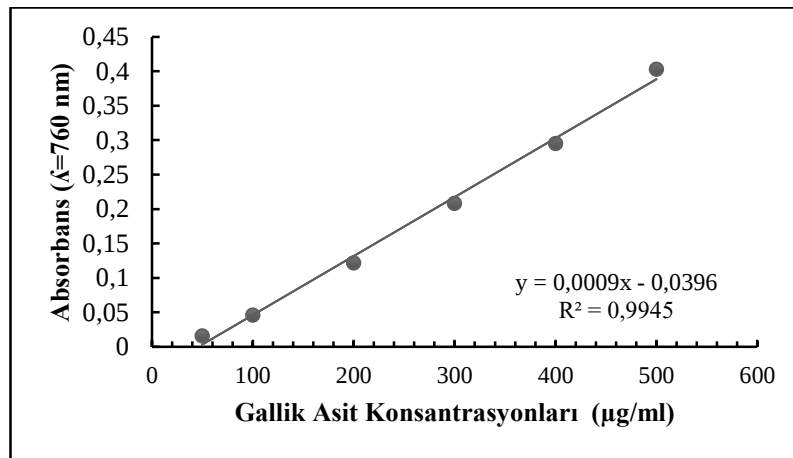
Tez kapsamında triptofan ve bazı kinürenin metabolitlerinin tayin edildiği fermente ürünlerde pH ölçümü, titre edilebilen asitlik, yoğunluk, nem ve kuru madde tayinleri gibi temel analizler yapıldı. Fermente ürünlerin dijital pH metre ile belirlenen pH değerleri, titrasyon ile belirlenen % asitlik değerleri, yoğunlukları, nem ve kuru madde oranları Çizelge 4.2’de görülmektedir. Asitlik değeri boza için laktik asit, hardaliye için tartarik asit, sirkeler ve kombucha çayı için ise asetik asit eşdeğeri cinsinden hesaplandı.

Çizelge 4.2. Örneklerin pH, toplam asitlik, kuru madde, nem ve yoğunluk değerleri

Örnek	pH	% Asitlik	Kuru madde (%)	Nem (%)	Yoğunluk (mg/cm ³)
Boza	3.459	0.193±0.014	19.76±0.30	80.24±0.30	1.0523±0.0011
Elma sirkesi	3.034	4.695±0.106	0.90±0,16	99.10±0.16	0.9965±0.0001
Üzüm sirkesi	2.826	3.960±0.084	1.02±0.06	98.98±0.06	0.9944±0.0001
Hardaliye (Edirne)	3.271	2.438±0.031	19.02±0.09	80.98±0.09	1.0554±0,0003
Hardaliye (Kırklareli)	3.450	1.545±0.021	23.36±0.04	76.64±0.04	1.0745±0.0001
Kombucha çayı	3.100	0.259±0.008	19.06±0.30	80.94±0.30	1.00±0.0001

TS 9778 boza standardına göre bozanın laktik asit cinsinden toplam titre edilebilir asitlik oranı tatlı bozada %0.2-0.5, ekşi bozada ise %0.5-1.0 arasında ve kuru madde içeriği en az %20 olmalıdır (TSE 9778). TS 1880 EN 13188 sirke standardına göre sirkelerin toplam asit içeriği 40 g/l (%4)'den az olmamalı ve pH değeri 2.9-3.1 aralığında olmalıdır. Boza, elma sirkesi ve üzüm sirkesinin pH, titre edilen asitlik ve kuru madde oranları genel olarak mevzuata uygundur. Hardaliye yeni tanıtılmaya başlayan yerel bir fermente ürün olduğundan ve kombucha çayı ise ülkemizde son yıllarda tanınan bir içecek olduğundan, Türk Gıda Tüzüğüne onlara ait bir mevzuat bulunmamaktadır. Gıdaların pH skalasına göre değerlendirildiklerinde, kombucha çayı ve hardaliyeler 3.08-3.45 pH değerleri ile asitli içecek grubuna dahildirler. Kuru madde oranları %19.02-23.36 aralığındadır. Çalışılan fermente ürünlerin yoğunlukları ise 0.9944-1.0745 arasında değişmektedir.

Deneyde kullanılan fermente ürünlerin toplam fenolik madde içerikleri standart olarak en sık kullanılan fenolik bileşeni gallik asit cinsinden tayin edildi. Şekil 4.1'de verilen kalibrasyon grafiğinin doğru denklemi kullanılarak örneklerin toplam fenolik madde miktarları ml'de gallik aside eşdeğer μg olarak hesaplandı. Sıvı örnekte analizlenen ve hesaplanan bu değerler 100 ml'de mg gallik asit eşdeğerine çevrildi. Ayrıca örneklerin kuru madde içerik oranları kullanılarak 100 g'da mg gallik asit eşdeğerine dönüştürüldü ve teorik olarak kuru örnek bazında fenolik madde içerikleri elde edildi (Çizelge 4.3).



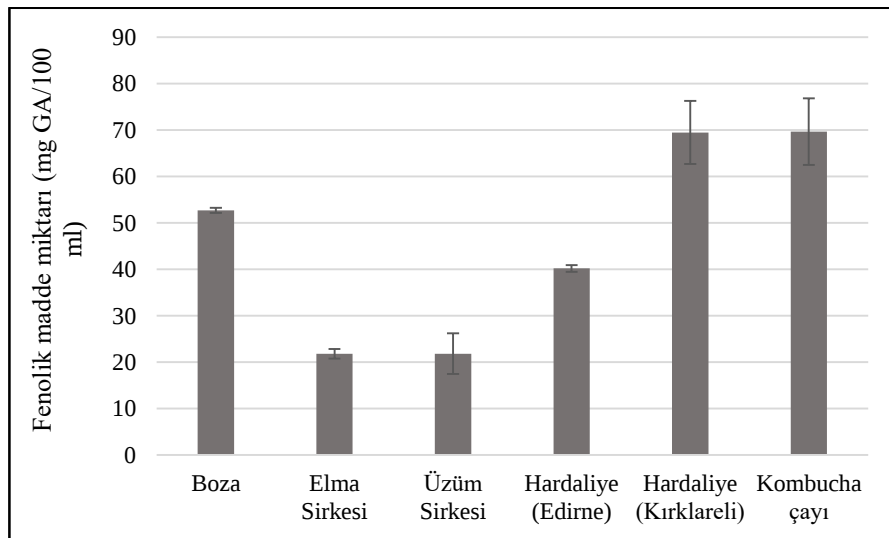
Şekil 4.1. Gallik asit standart grafiği

Çalışılan fermente ürünlerin fenolik madde miktarlarının 100 ml örnekte 21.83-69.63 mg gallik asit aralığında olduğu görülmektedir (Çizelge 4.3). İki yöreye ait hardaliye örneklerinin toplam fenolik madde miktarları (% mg GAE) arasında farklılık bulunurken, çalışılan fermente ürünlerde en yüksek fenolik madde miktarlarının Kırklareli yöresine ait hardaliye ve kombucha çayı örneklerinde olduğu gözlemlendi (Şekil 4.2).

Çizelge 4.3. Fermente ürünlerin toplam fenolik madde miktarları

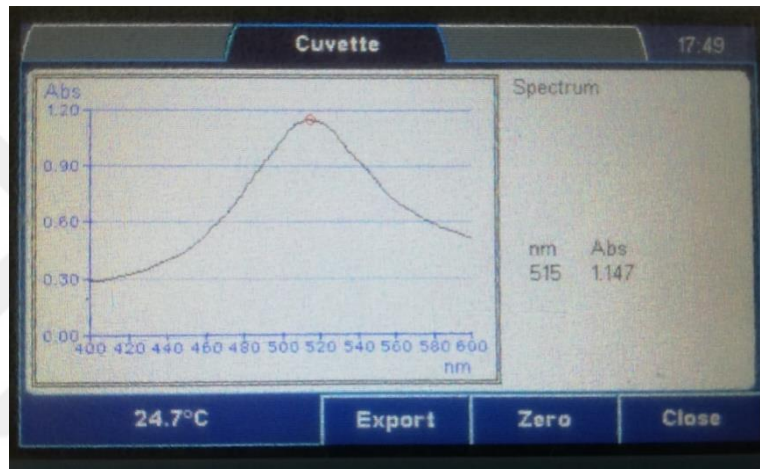
Örnek	Toplam Fenolik Madde (µg GAE/ml FWB)	Toplam Fenolik Madde* (mg GAE/100 ml FWB)	Toplam Fenolik Madde** (mg GAE/100 g DWB)
Boza	520.66±0.55	52.66±0.55	266.49
Elma Sirkesi	218.28±1.02	21.83±1.02	2425.5
Üzüm Sirkesi	218.40±4.40	21.84±4.40	2180
Hardaliye (Edirne)	401.91±0.71	40.19±0.71	211.6
Hardaliye (Kırklareli)	694.51±6.79	69.45±6.79	296.8
Kombucha çayı	696.35±7.15	69.63±7.15	364.4

*Taze/sıvı örnekte (FWB) ve **kuru örnek bazında (DWB) fenolik madde içeriği



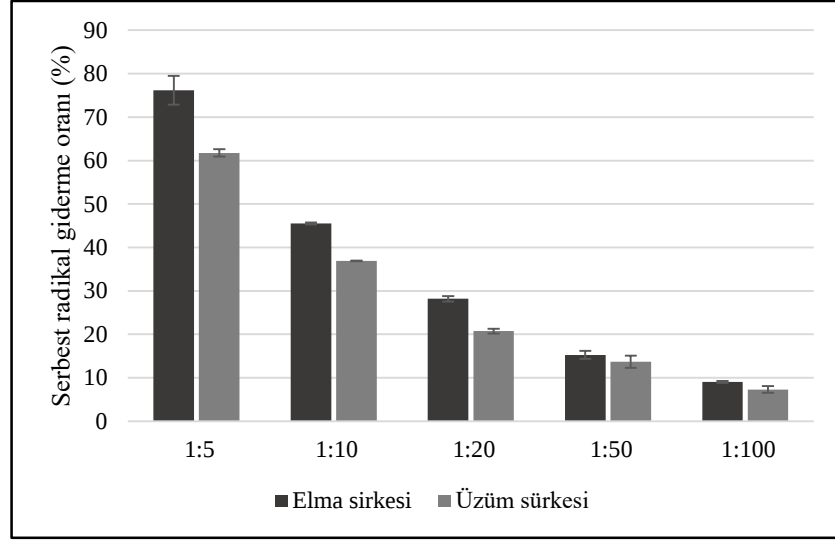
Şekil 4.2. Fermente ürünlerin toplam fenolik madde içerikleri

Fermente ürünlerin serbest radikal giderme gücü, antioksidan aktivite tayin metodlarından biri olan DPPH radikali giderme metodu kullanılarak araştırıldı. Etanol ya da metanolde hazırlanan DPPH çözeltisi 515-517 nm dalgaboyu aralığında maksimum absorpsiyon piki vermektedir (Şekil 4.3). Metod; çalışılan örneğin bir proton veya elektron verebilme yeteneğinin mor renkli DPPH çözeltisinin rengini açması, dolayısıyla reaksiyon karışımının absorbansının düşmesi esasına dayanır. Bölüm 3.2.2.6'da açıklandığı gibi elde edilen absorbans değerlerinden hesaplanan % inhibisyon oranlarının yüksek olması, yüksek serbest radikal giderme aktivitesinin göstergesidir.

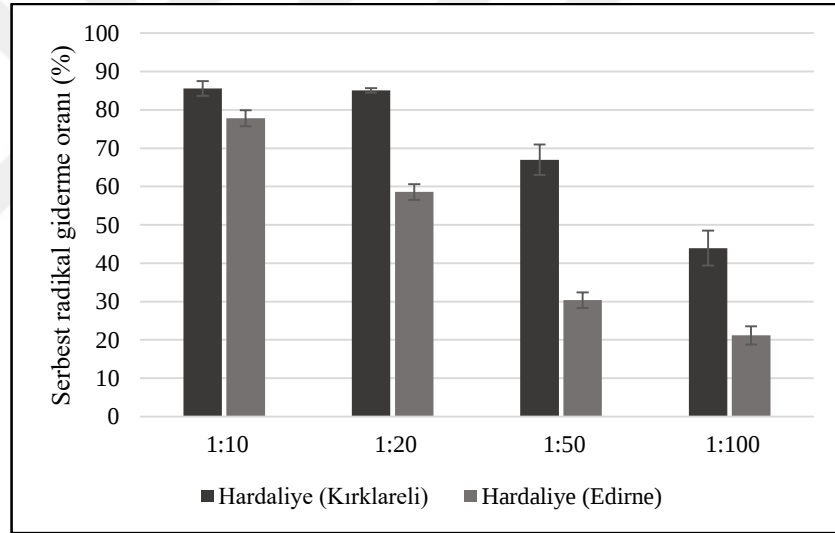


Şekil 4.3. DPPH çözeltisinin 400-600 nm dalgaboyu aralığında spektrum taraması

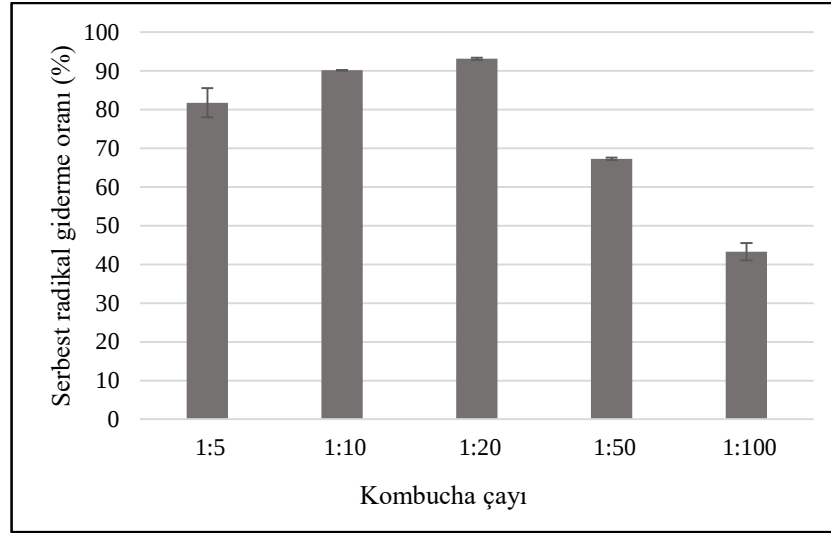
Çalışılan fermente ürünler sıvı oldukları için hacimce çeşitli oranlarda seyreltilmiş ve herbirine DPPH radikali giderme metodu uygulanmıştır. Fermente ürünlerin radikal giderme aktivitesine ait sonuçlar Şekil 4.4-4.6'da verilmektedir. Şekillerden görüldüğü gibi ve Çizelge 4.3'deki inhibisyon yüzdesi oranlarına göre örneklerin seyreltme oranının artmasıyla radikal süpürme gücünün azaldığı görülmektedir. Çeşitli oranlara seyreltilmiş örneklerden elma sirkesi üzüm sirkesinden ve Kırklareli yöresine ait hardaliye Edirne yöresine ait hardaliyeden daha yüksek DPPH' süpürme etkisi göstermiştir.



Şekil 4.4. Farklı oranlara seyreltilmiş elma ve üzüm sirkelerinin DPPH' süpürme gücü



Şekil 4.5. Farklı oranlara seyreltilmiş Kırklareli ve Edirne yöresine ait hardalilerin DPPH' süpürme gücü



Şekil 4.6. Farklı oranlara seyreltilmiş kombucha çayının DPPH* süpürme gücü

Çizelge 4.4. Çeşitli oranlarda seyreltilmiş fermente ürünlerin serbest radikal giderme oranları (% inhibisyon) ve EC₅₀ değerleri (mg/ml)

Örnek	Seyreltme oranı	İnhibisyon (%)	EC ₅₀	Örnek	Seyreltme oranı	EC ₅₀	İnhibisyon (%)
Elma Sirkesi	1:5	76.17±3.33	0.99	Üzüm Sirkesi	1:5	1.50	61.76±0.84
	1:10	45.53±0.23			1:10		36.90±0.11
	1:20	28.19±0.61			1:20		20.75±0.55
	1:50	15.26±0.93			1:50		13.69±1.41
	1:100	9.03±0.23			1:100		7.32±0.78
Hardaliye (Edirne)	1:10	77.82±2.12	7.22	Hardaliye (Kırklareli)	1:10	3.04	85.58±1.89
	1:20	58.57±2.07			1:20		85.11±0.58
	1:50	30.35±2.04			1:50		66.99±3.98
	1:100	21.18±2.37			1:100		43.94±4.54
Kombucha çayı	1:5	81.77±3.77	2.38	Boza	1:10	-	14.20±2.31
	1:10	90.16±0.07			1:20		12.71±0.70
	1:20	93.13±0.27			1:50		5.95±0.19
	1:50	67.26±0.34					
	1:100	43.29±2.20					
BHA			0.06				

Fermente ürünlerin DPPH radikali giderme aktivitesine ait inhibisyon yüzdesi oranları Çizelge 4.4'te verilmiştir. Reaksiyon ortamında bulunan serbest radikallerin yarısını yok eden örnek veya standart madde miktarı EC_{50} değeri olarak bilinmektedir ve her bir örnek için EC_{50} değeri konsantrasyona (mg/ml veya μ g/ml) karşı inhibisyon (%) grafikleri çizilerek bulunmaktadır. Bu çalışmada kullanılan fermente ürünler sıvı olduğundan farklı konsantrasyonlara seyreltilerek çalışıldı. EC_{50} değerleri, örneklerin seyreltme oranlarına karşılık gelen % inhibisyonların grafiğe geçirilmesiyle belirlendi (Öztürk, 2015). Grafikten elde edilen ve seyreltme oranına karşılık gelen bu değerlerden, örneklerin kuru madde oranları kullanılarak teorik olarak %50 inhibisyon sağlayan EC_{50} (mg/ml) değeri hesaplandı. Çizelge 4.4'te görülen düşük EC_{50} değeri örneğin yüksek aktivitesi olduğunun göstergesidir. Elma sirkesinin EC_{50} değeri (0.99 mg/ml) üzüm sirkesinin EC_{50} değerinden (1.50 mg/ml) ve Kırklareli yöresi hardaliyesinin EC_{50} değeri (3.04 mg/ml) Edirne yöresi hardaliyesinin EC_{50} değerinden (7.22 mg/ml) daha düşüktür. Kombucha çayının EC_{50} değeri ise 2.38 mg/ml olarak hesaplanmıştır.

BÖLÜM 5

TARTIŞMA

5.1. Triptofan ve Kinürenin Metabolitleri

Fermente ürünlerde, kullanılan hammaddelerin fermantasyon öncesi ve sonrası kıyaslanan organoleptik özellikleri, besin içeriği ve raf ömrü içeriklerinin daha geliştiği ve iyileştiği görülmüştür (Gotcheva, Pandiella, Angelov, Roshkova ve Webb, 2001). Fermantasyonda kullanılan mikroorganizmalar kendilerine NAD^+ sentezleyebilmek için triptofan üzerinden yürüyen kinürenin yolunu çalıştırarak, bu sırada çeşitli nöroaktif bileşikler de üretebilirler (Yılmaz ve Gökmen, 2019). Bu bileşiklerden kinürenik asit ve pikolinik asit nöroprotektan özellik gösterirken, kinolinik asit, 3-hidroksiantranilik asit ve 3-hidroksikinürenin nörotoksik özelliktedir (Chen ve Guillemin, 2009). Sağlıklı kişilerde triptofan, kinürenin ya da TRP/KYN oranının belirli düzeylerde olması gerekmektedir, bu oranların değişmesi çeşitli hastalıklarla ilişkilendirilmektedir (Schröcksnadel vd., 2006).

Triptofan konsantrasyonu diğer aminoasitlere göre daha düşüktür. Ortalama 900-1000 mg civarında günlük triptofan alımı gerçekleşir bu da 3.5-6.0 mg/kg vücut ağırlığına karşılık gelir (Richard vd., 2009). Dünya Sağlık Örgütü'nün belirlediği günlük aminoasit ihtiyaçlarından triptofan miktarı yaş gruplarına göre değişmekle birlikte, 2-5 yaş arası çocukların günlük triptofan ihtiyaçları 12.5 mg/kg gün-11 mg/g protein, 10-12 yaş aralığındaki çocukların ise 3.3 mg/kg gün-9 mg/g protein, 18 yaş üstü kişilerin ise 3.5 mg/kg gün-5 mg/g proteindir (Young ve El-Khoury, 1996). Gıdalarda kinürenin yolağıyla ilgili metabolitler son yıllarda çalışılmaya başlandığı için bu çalışmada kullanılan

fermente ürünlerde yapılan yeterli çalışma bulunmamaktadır. Bu sebeple fermente ürünün üretildiği hammaddenin metabolit içeriği ile kıyaslama yapılmıştır. Çeşitli meyvelerdeki triptofan miktarlarının araştırıldığı bir çalışmada HPLC ile yapılan analizde triptofan miktarları hardaliye içeceğinin hammaddesi olan kırmızı üzüm ve sirke üretiminde kullanılan yeşil ve kırmızı üzümler için; kırmızı üzümde 5.047 ± 2.34 µg/g taze ağırlık, yeşil üzümde ise 25.36 ± 2.34 µg/g taze ağırlık olarak bulunmuştur. Aynı çalışmada elma sirkesinin üretiminde kullanılan elmada TRP 2.44 ± 1.27 µg/g taze ağırlık olarak bulunmuştur (İslam, Shirakawa, Nguyen, Aso ve Komai, 2016). Çalıştığımız boza darı ve mısır unundan üretilmiştir. Darı ve bazı tahıllardaki TRP içeriğinin HPLC ile analizlendiği çalışmada darının TRP miktarı 74 ± 0.9 mg/100 g kuru ağırlık, mısırın ise 44 ± 2 mg/100 g kuru ağırlık olarak bulunmuştur (Comai vd., 2007). Ayrıca TRP mısırdaki az miktarda bulunan aminoasitlerden biridir ve aminoasit içeriği yetiştiği toprak ve mısırın cinsine göre de değişebilir. Farklı tohum ve toprak tiplerinde yetişen mısırların aminoasit içerikleri HPLC ile araştırıldığında 17 farklı aminoasit tespit edilmiş fakat bu aminoasitlerin içinde triptofan bulunmamıştır (Çağlar, Erekul ve Yiğit, 2017). Çay çeşitlerinde UPLC-MS/MS ile yapılan analizde TRP miktarları yeşil (1-236 mg/kg), siyah (60-224 mg/kg), beyaz (143-390 mg/kg) ve oolong (63-149 mg/kg) çayda farklı oranlarda bulunmuştur (Yılmaz, Özdemir ve Gökmen, 2020). Çalıştığımız fermente ürünler içerisinde en yüksek triptofan miktarı Kırklareli hardaliyesi (2.9475 µg/ml) ve Edirne hardaliyesi (1.798 µg/ml)'nde olup, en düşük oran ise kombucha çayında (9.15 ± 0.03 ng/ml) bulunmuştur. Bu ürünlerde fermentasyon süreci takip edilememesine rağmen, metabolit miktar değişimlerinin hammaddelerin farklı fermentasyon süreçleri ve fermentasyon süresince triptofanın mikroorganizmalar tarafından kullanılması kaynaklı olabilir.

Kinürenin metaboliti olarak üzerinde oluşan ilk kararlı metabolittir ve kinürenin sentezlendikten sonraki basamakta kinürenik asit, 3-hidroksikinürenin ve antranilik asit gibi farklı nöroaktif bileşikler oluşmaktadır (Chen ve Guillemin, 2009). Bu basamakta yolağın dallanması (Şekil 2.7) ve asıl sentezlenmek istenen NAD^+ için kinürenin yıkımının fazla olması dolayısıyla fermente ürünlerdeki kinüreninin daha az miktarda olması ile sonuçlanır. Bu sebeple kinürenin çalışmalarda nadir olarak kullanılan bir metabolik parametredir ve kinüreninin sağlık üzerindeki etkileri nispeten yeni tespit edilmeye başladığı için bu metabolitin gıdalarda bulunması ve miktarı ile ilgili çalışmalar

da sınırlıdır. Çalışmamızda kombucha çayında, elma ve üzüm sirkesinde kinürenine rastlanmamıştır. Yılmaz ve ark.'ın farklı çaylar üzerinde yaptıkları çalışmada hiçbir çay çeşidinde (Yılmaz vd., 2020) ve yine Yılmaz ve Gökmen'in çalışmasında kırmızı şarapta yapılan analizde (Yılmaz ve Gökmen, 2018) kinürenin metabolitine rastlanmamıştır. Bizim çalışmamızda en yüksek kinürenin miktarı bozada 33.19 ± 0.71 ng/ml olarak ve en az miktar ise Kırklareli hardaliyesinde 1.69 ± 0.04 ng/ml olarak tespit edilmiştir. Hardaliye ve şarap aynı cins üzümlerden üretilmektedir. Üzüm sirkesi ise her cins üzümünden üretilmektedir. Hardaliye üretiminde alkol fermantasyonu gerçekleşmez fakat şarap ve sirkede öncelikle alkol fermantasyonu sonrasında, şarap cinsine göre değişmekle birlikte malolaktik fermantasyon (Kaya, 2017), sirkede ise asetik asit fermantasyonu oluşur. Farklı fermantasyon ve maya kullanımı kinürenin miktarı üzerinde etkili olabilir.

Kinürenik asit, mikroglia veya astrositlerde kinüreninden kinürenin amino transferaz enzimiyle sentezlenen ve beyinde nanomolar konsantrasyonlarda bulunan nöroprotektan özellikte bir metabolittir (Chen ve Guillemin, 2009). En sık tüketilen içecekler olan çay ve kahve için 16 çay ve 13 kahve çeşidinin KYNA içerikleri HPLC ile tayin edilmiştir. KYNA içeriği yeşil çaylar arasında en yüksek Ginkaku Sencha'da (Japonya) 86.93 ± 2.115 ng/ml ve en düşük Che Nhac Biet Jasmine'de (Vietnam) 5.14 ± 0.052 ng/ml; siyah çaylarda ise en yüksek Ceylon Kenilworth'de (Sri Lanka) 54.15 ± 0.168 ng/ml ve en düşük China Huang Jing Cha'da (Çin) 18.93 ± 0.292 ng/ml olarak belirlenmiştir (Turska vd., 2018). Bu tez çalışmasında yeşil çay ile hazırlanan kombuchada kinürenik asit içeriği 26.10 ± 0.13 ng/ml olarak tespit edilmiştir. Elmada kinürenik asit miktarı 12.1 pmol/g (Turski vd., 2009), elma şarabında ise 3.15 ng/ml (Turska vd., 2019) olarak hesaplanmıştır. Çalışmada elma sirkesinde KYNA miktarı 9.56 ± 0.29 ng/ml iken, üzüm sirkesinde 13.32 ± 0.12 ng/ml'dir. Literatürde üzümlerdeki kinürenik asit içeriğine dair araştırma yapılmamıştır. Üzüm meyvesi alanındaki araştırmalar daha çok şarap çeşitleri üzerine yoğunlaşmıştır. Kırmızı şaraplardaki KYNA miktarları 100 ve 109 ng/ml, beyaz şaraplarda ise miktarlar 17 ile 14 ng/ml olarak bulunmuştur (Turska vd., 2019). Başka bir çalışmada kırmızı şaraptaki KYNA'nın en düşük miktarı 82.4 ± 6.1 ng/ml, en yüksek miktarı ise 179.7 ± 5.1 ng/ml olarak bulunmuştur (Yılmaz ve Gökmen, 2018). Bu fark kırmızı ve beyaz üzümlerin farklı fenolik bileşikleri içermeleri ve kırmızı üzümlerin fenolik bileşen çeşitliliği yönünden daha zengin olmasından kaynaklanabilir (Gülcü, Demirci ve Güner, 2008). Çalışmada kullanılan darı

ve mısırdan üretilen bozanın KYNA miktarı 10.42 ± 0.21 ng/ml'dir. Literatürde boza ile ilgili çalışma olmayıp, mısırın kinürenik asit miktarı 84.7 pmol/g olarak bildirilmiştir (Turski vd., 2009).

3-Hidroksikinürenin (3-HK), kinüreninden kinürenin-3-monooksijenaz (KMO) enzimi ile sentezlenir. KMO enzimi astrositlerde olmadığı için kinüreninin yıkımı beyindeki mikroglia hücrelerinde gerçekleşir. Metabolitin reseptör hedefi veya nörotransmitter etkili olduğu bilinmemektedir, ancak süperoksit anyonu ve hidrojen peroksit oluşumu ile lipid peroksidasyonuna neden olmasından dolayı nörotoksik olarak bilinen bir metabolittir (Mithaiwala vd., 2021). Ayrıca yüksek miktarlardaki 3-HK çeşitli nörodejeratif hastalıklarla da ilişkilendirilmiştir (Groth vd., 2021), bu sebeple 3-HK'in gıdalarda bulunması istenmemektedir. Çalışılan altı ürünün beş tanesinde 3-HK'e rastlanmazken, bozada 12.21 ± 0.21 ng/ml miktarda tespit edilmiştir. Yeşil çayda bulunan fenolik bileşiklerden epigallokateşin-3-gallatın (EGCG) 3-HK üzerine etkisinin araştırıldığı çalışmada, 3-HK'nın insan nöroblastoma SH-SY5Y hücre hattında nöral hücre ölümünü indüklediği ve epigallokateşin-3-gallatın reaktif oksijen türleri oluşumunu inhibe ederek 3-HK indüklü hücre ölümü üzerinde koruyucu etkisi olduğu bildirilmiştir (Jeong vd., 2004). Kombucha çayı ve hardaliye içeceklerinde, elma ve üzüm sirkelerinde 5-HK'in bulunmaması bu açıdan önem taşımakta olup, ayrıca bu ürünlerin radikal giderme kapasitelerinin de iyi olması diyetle tüketilmeleri gerekliliğini destekleyebilir.

Niasin (Nikotinik asit) 1911'de pirinç kepeğinden izole edilmiştir. Gıdalarda bulunan nikotinik asit piridin halkası içeren monokarboksilli asit türevidir ve suda çözünür önemli bir vitamin (B₃ vitamini)dir. Niasinin günlük alım miktarı 14-16 mg/gün'dür. 1935 yılında eritrositlerden izole edilen nikotinamid ise niasinin amid türevidir. Niasin ve nikotinamidin canlı hücrelerde NAD⁺/NADH ve NADP⁺/NADPH öncüleri olarak önemli metabolik görevleri vardır. NAD⁺ mayalarda ve memeli hücrelerinde L-triptofandan başlayarak de novo sentez yolu (Kinürenin yolağı) ile veya daha önce sentezlenmiş olan öncüleri kullanan salvage (kurtarma) yolu ile üretilmektedir (Orlandi, Alberghina ve Vai, 2020). NAD⁺ çeşitli metabolik reaksiyonlardaki enzimlerin koenzimi olarak rol oynadığı için hücre biyolojisinde önemli bir moleküldür.

En iyi niasin kaynakları mayalar, et, tavuk ürünleri, somon gibi kırmızı balıklar, tahıllar, baklagiller, tohumlar, süt, yeşil yapraklı sebzelerdir. Mısır ve buğday gibi

tahıllarda niasin biyoyararlılığını azaltan şekerle bağlı glikozitler formunda bulunabilir. Nikotinik asit ve nikotinamidin gıdalarda bulunma miktarları farklıdır. Hayvansal gıdalardan en yaygın kullanılan et çeşitlerinde HPLC ile incelendiği çalışmada nikotinik asit ve nikotinamid miktarları dana etinde sırasıyla 3.032 mg/100 g ve 6.650 mg/100 g, tavuk etinde ise 3.739 mg/100 g ve 5.442 mg/100 g olarak bildirilmiştir. Bitkisel kaynaklı gıdalardan arpada 4.523 mg/100 g, durum buğdayında 6.668 mg/100 g, pirinçte 1.767 mg/100 g nikotinik asit ölçülürken nikotinamide rastlanmamıştır (Çatak, 2019). Aamer ve ark. farklı üzüm çeşitlerinin vitamin içeriklerini HPLC ile incelediği çalışmalarında niasin (B₃ vit) içeriklerinin 0.15 ile 0.24 mg/100 g arasında olduğunu bildirmiştir (Aamer ve El-Hameed, 2016). Kırmızı şarap çeşitlerinde LC-MS/MS ile yapılan analizde nikotinamid 36.3±10.5 ve 206.7±16.2 µg/l aralığında, niasin ise 367.2±40.8 ve 562.4±25.2 µg/l aralığında ölçülmüştür (Yılmaz ve Gökmen, 2018). Tezdeki kırmızı üzümden üretilen iki hardaliyede nikotinamid miktarı hardaliye (Kırklareli) ve hardaliye (Edirne) sırasıyla 69.07-73.3 µg/l ve nikotinik asit 55.05-1098.74 µg/l olarak belirlenmiştir. Yürütülen tez çalışmasında materyal olarak kullanılan diğer fermente ürünlerden en düşük nikotinamid ve nikotinik asit içeriği kombucha çayında ölçülmüştür. İki hardaliye çeşidi ve bozada triptofan ile nikotinik asit ve nikotinamid miktarları karşılaştırıldığında, yüksek triptofan miktarına rağmen daha düşük miktarlarda nikotinik asit ve nikotinamid ölçülmesi fermentasyon yapan mikroorganizmaların kinürenin yolunu daha fazla çalıştırdığı ve NAD⁺ ürettiği şeklinde yorumlanabilir. Hücresel NAD⁺ havuzlarının yaşlı ciltlerde daha düşük olduğu bilinmektedir, nikotinamid tedavisinin ise gereken seviyeleri geri kazandırdığı ve böylece hücresel biyoenerjetik bozuklukları azalttığı varsayılmaktadır (Boo, 2021). Diyetteki nikotinik asit (niasin) ve nikotinamid NAD⁺ öncüsü oldukları için yaşlanma süreci veya ciltle ilgili bazı durumlarda NAD⁺ öncülerinin diyetle alınması önerilmektedir. Dolayısıyla tezde çalışılan fermente ürünlerden niasin miktarı en yüksek olan (1098.74 ng/ml) Edirne yöresine ait hardaliyenin günlük diyetle eklenmesi önerilebilir.

5.2. Fermente Ürünlerde Yapılan Diğer Analizler

Gıdalar bitkisel ve hayvansal kaynaklı doğal bileşikler oldukları için hazırlanmaları, işlenmeleri, depolanmaları, aynı zamanda tüketilmeleri sırasında birçok değişikliğe uğrarlar. Ayrıca gıda sanayinin gelişmesiyle birlikte hem insanların beslenme

alışkanlıklarında hem de gıda üretim yöntemlerinde değişiklikler olmuştur. Dolayısıyla gıdaların nitel ve nicel kalite kontrolleri için çeşitli analizler yapılarak, bu analiz yöntemleri ile ilgili tüzük ve yönetmeliklere göre gıdalar değerlendirilmektedir. Çalışmamızda kullanılan fermente ürünlerin pH tayini, titre edilebilen asitlik, yoğunluk, nem ve kuru madde tayinleri gibi temel analizleri yapıldı. Fermente ürünlerde yapılan analizlerden, boza ve sirke için belirlenmiş değerler ve standartlar vardır, fakat hardaliye ve kombucha çayı için belirlenen standartlar bulunmamaktadır. Mevcut standartlarda tüm analizler için değer belirlenmemekle birlikte belirlenen değerler taklit, taşış ve besin değerinin azalmasının önlenmesine yöneliktir.

5.2.1. pH Tayini

Gıdalarda pH ölçümü önemli bir kalite ve gıda güvenliği parametresidir. Fermente ürünlerdeki pH değeri ise laktik asit veya asetik asit bakterileri gibi mikroorganizmaların faaliyetleri sırasında ayrıca önem arz eder. Çalışmamızda kullandığımız boza darı irmiği ve mısır unu karışımından üretilmiş bir boza olup, pH değeri 3.46 olarak ölçülmüştür. Yücel ve Köse piyasadan temin ettikleri 9 adet boza öreğinde pH'nın 3.30 ile 3.80 aralığında olduğunu (Yücel ve Köse, 2002), Pehlivanoğlu, Gündüz, Özülkü ve Demirci ise yaptıkları çalışmada bozaların pH'sının pH 3.16 ile 4.63 aralığında değiştiğini tespit etmişlerdir (Pehlivanoğlu, Gündüz, Özülkü ve Demirci, 2015). Akpınar-Bayizit, Yılmaz-Ersan ve Özcan kullanılan hammaddelerin boza içeriğine etkisini araştırdıkları çalışmalarında mısırdan üretilen bozanın pH değerinin fermantasyon başlangıcında 5 iken fermantasyon sonunda 3.5 seviyelerine indiğini, darıdan üretilen bozada ise başlangıç pH'sı 4.0-4.25 aralığındayken fermantasyon sonunda yine pH 3.5 seviyelerine indiğini bildirmişlerdir (Akpınar-Bayizit, Yılmaz-Ersan ve Özcan, 2009). Yapılan diğer bir çalışmada üretilen bozanın fermantasyon başlangıcında 5 civarı olan pH değeri 24 saatlik fermantasyon sonrasında 3.4 civarına inmiştir (Gotcheva vd., 2001). Türkiye'nin çeşitli bölgelerinden ve Bulgaristan'dan temin edilen boza çeşitlerinde en geniş aralık pH 2.93 ile 3.72 ile laboratuvar üretimi bozada, en yüksek pH'ın ise 3.94-4.63 aralığında Eskişehir'den temin edilen bozalarda olduğu görülmüştür. Trakya'dan 9 farklı üreticiden temin edilen 27 adet boza örneğinin pH aralığı ise 3.11-4.59'dir. Bozanın tüketiminin pH'ın 3.5'in altına inene kadar devam edeceği, sonrasında asitliğin artması kaynaklı tüketilmemesi gerektiği bildirilmiştir (Levent ve Cavuldak, 2017). Bu çalışmada

Trakya'dan bir ticari üreticiden temin edilen boza 3.46 pH değeri ile tüketim için tavsiye edilen 3.50 değerinin çok az altında olup, literatürde yapılan ölçümler ile uyumludur.

TS 1880 EN 13188 sirke standardına göre sirkelerin pH değeri 2.9-3.1 aralığında olmalıdır. Sunulan çalışmadaki ticari ürünlerden elma sirkesinin pH=3.03 ve üzüm sirkesinin pH=2.83'tür. Türkiye'deki farklı illerden toplanan üzüm ve elmalardan ev yapımı yöntemiyle üretilen sirkelerin çeşitli özelliklerinin incelendiği bir çalışmada pH değerleri üzüm sirkeleri için 2.70-3.90 ve elma sirkeleri için 2.71-3.56 olarak tespit edilirken, aynı çalışmada endüstriyel yöntemle üretilmiş elma sirkesinde 3.10 ve üzüm sirkesinde 2.93 olarak ölçülmüştür (Öztürk vd., 2015). Benzer bir çalışmada Türkiye'de yetişen elma ve üzümlerden geleneksel yöntemle ev ortamında üretilen sirkelerin pH değerleri elma sirkesi için 3.03 ± 0.23 , üzüm sirkesi için 2.94 ± 0.11 olarak ölçülmüştür (Kahraman vd., 2022). Sunulan çalışmadaki ticari ürünlerden elma sirkesinin pH=3.03 ve üzüm sirkesinin pH=2.83 olup, sirke standartı ve literatüre uygundur.

Siyah çaydan üretilen kombuchanın farklı sıcaklık ve SCOBY oranlarında pH değişiminin araştırıldığı çalışmada başlangıç pH'sı 6.7 olup, fermentasyon sonrasında pH 3.0-3.6 aralığında ölçülmüştür (Loncar vd., 2006). Delik ve ark. (2021) farklı çayların fermentasyon süresince pH değişimini araştırdıkları çalışmalarında geleneksel kombucha karışımıyla üretilen üründe pH'nın 3.6 ile başlayıp, 7. günde 3.4 ve 14. gün sonunda ise 2.9 olduğunu ölçmüşlerdir. Siyah çaydan üretilen kombuchada ise fermentasyon süresince pH değerleri 6.3, 5.1 ve 4.9 olarak ölçülmüştür (Delik vd., 2021). Ortamdaki şekerlerin organik asitlere dönüşmesi sonucunda fermentasyon süresince pH'nın düşmesi beklenmektedir. Kombuchanın pH ve asitliğinin sınır değerlerinin incelendiği araştırmada sindirim değeri olan pH 3'ün altına düşmesinin tüketim açısından rahatsız edici olduğu (Villarreal-Soto vd., 2018), pH'nın 2.5'in altına düşmesinin ise yüksek organik asit konsantrasyonu sebebiyle tüketim açısından zararlı olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Yüksek pH değerlerinin ise mikrobiyolojik bozulma kaynaklı oluşabileceği bildirilmiştir (Villarreal-Soto vd., 2018). Çalışmamızda kullanılmak üzere hazır SCOBY kültürü ile yeşil çaydan üretilen kombuchada pH 3.10 olarak ölçülmüştür. Hazırladığımız kombucha çayının pH değeri literatürdeki çalışmalarla uyumlu olmasının yanında tavsiye edilen pH değerlerine de uygundur.

Kırklareli yöresine ait ve eski bir içecek olan hardaliye son yıllarda tekrar tanıtılmaya başlanmıştır, bu sebeple henüz ona ait bir mevzuat bulunmamaktadır. Ancak yapılan çeşitli çalışmalar mevcuttur. Bunlardan biri hardaliyenin pH üzerinde hardal tohumu ve üzüm cinsinin etkisinin incelenmesidir. 7 günlük fermantasyon sonunda beyaz üzümden elde edilen örneklerdeki pH'ların siyah üzümlere göre daha yüksek çıkmıştır (Coşkun ve Arıcı, 2011). Siyah ve beyaz hardal tohumları kullanılarak ve beş farklı laktik asit bakteri suşu eklenerek üretilen hardaliyelerin pH'ları kontrol grubunun pH değerleri ile karşılaştırılmıştır. Kontrol grubu hardaliyeleri starter kültür eklenmeden üretilmiştir. Minimum pH'ya her iki hardal tohumunda da *Lb. paracasei subsp. paracasei* suşu ile ulaşılmıştır (Coşkun ve Arıcı, 2006). Arıcı ve Coşkun'un 26 farklı hardaliyenin pH, renk ve bakteri içeriğini incelediği çalışmada pH 3.21-3.97 aralığında bulunmuştur. Coşkun ve ark. tarafından Kırklareli ilinden temin edilen 23 çeşit hardaliyenin pH değerleri incelendiğinde, 3.54-4.33 aralığında olan farklı üzüm çeşitlerinden laboratuvar ortamında hardaliye üretilmiş ve en düşük pH yerli İzabella üzümünden üretilen hardaliyede 3.33 olarak ve en yüksek pH ise Dingil kara üzümden üretilen hardaliyede 3.66 olarak ölçülmüştür (Coşkun vd., 2018). Çalışmamızda Kırklareli ve Edirne illerinden temin edilen hardaliyelerin pH değerleri sırasıyla 3.45 ve 3.27 olarak ölçülmüştür. Kırklareli'nden temin edilen hardaliye Cabernet, Merlot ve Shiraz üzüm çeşitlerinden, Edirne'den temin edilen hardaliye Merlot üzüm türünden üretilmiştir. Coşkun ve ark. (2018) Cabernet üzümünden ürettiği hardaliyenin pH değeri 3.73 olarak ölçülmüştür. Hardaliyelerin pH değerleri yapılan çalışmalarda aralıklarda olup, farklılıklar hardaliye üretiminde kullanılan üzüm türlerinin farklılığından kaynaklı olabilir.

5.2.2. Toplam Asitlik Tayini

Gıdalarda genel veya çeşitli özel sebeplerle toplam asitlik tayini yapılmaktadır. Fermente ürünlerde fermantasyon sınırının belirlenmesi amacıyla veya standartlara uygunluğun belirlenmesi amacıyla titrasyon asitliği olarak adlandırılan toplam asitlik tayini (%) yapılmaktadır. Asitlik TS 9778 Boza Standardı'na göre tatlı boza için %0.2-0.5, ekşi boza için %0.5-1.0 aralığında olmalıdır ve boza için asitlik değeri laktik asit cinsinden hesaplanmaktadır. İzmir'de piyasadan temin edilen 9 farklı bozada yapılan % asitlik analizinde 0.13-0.50 aralığında değişen sonuçlar elde edilmiştir (Yücel ve Köse, 2002). Başka bir araştırmada titre edilebilir asitlik %0.13-0.50 aralığında hesaplanmıştır

(Pehlivanoglu vd., 2015). Farklı hammaddelerden üretilmiş boza çeşitlerindeki asitliğin araştırıldığı çalışmada ise; darıdan elde edilen bozanın en düşük asitliğe sahip olduğu görülmüş, bunun nedeni yüksek karbonhidrat içeriğinden dolayı fazla fermentasyona olanak sağlaması olarak belirtilmiştir. Aynı çalışmada en yüksek asitlikten en düşüğe doğru sıralama buğday bozası (0.61 ± 0.07), pirinç bozası, mısır bozası ve darı bozası (0.32 ± 0.04) şeklindedir (Akpınar- Bayizit, Yılmaz-Ersan ve Özcan, 2009). Türkiye ve Bulgaristan'dan temin edilmiş boza örneklerinde ise en yüksek asitlik 0.92 ile İstanbul'dan temin edilen bozada tayin edilmiştir. Trakya'dan 9 farklı üreticiden temin edilen 27 adet boza örneğinin asitlik aralığı ise $0.13-0.47$ 'dir (Levent ve Cavuldak, 2017). Çalışmamızda kullandığımız boza da Trakya bölgesine ait olup 0.193 ± 0.014 asitlik değeri ile bu çalışmanın sonuçlarıyla tutarlıdır.

TS 1880 EN 13188 Sirke Standardı'nda sirke asitliğinin 4 'ün altında olmaması gerektiği bildirilmiştir, % asitlik çalışmada kullanılan ticari elma sirkesinde 4.69 ve üzüm sirkesinde de 3.96 olarak tayin edilmiştir. Florino cinsi elmalarından geleneksel yöntemle üretilen elma sirkesinin kalite özelliklerinin değerlendirildiği çalışmada toplam asitlik asetik asit cinsinden $3.9-9$ olarak (Dabija ve Hatnean, 2014) ve evde geleneksel yöntemle üretilmiş elma ve üzüm sirkelerinin toplam asitlik değerleri sırasıyla 0.99 ± 0.05 g/100 ml ve 2.43 ± 0.14 g/100 ml olarak belirlenmiştir (Kahraman vd., 2022). Farklı illerden toplanan üzüm ve elmalardan ev yapımı üretilen sirkeler ve endüstriyel olarak üretilen sirkelerin asitliğinin araştırıldığı bir diğer çalışmada; ev yapımı üzüm sirkelerinin asitlik değeri 1.74 ± 0.06 ile 5.72 ± 0.25 , elma sirkelerinin ise 0.66 ± 0.06 ile 7.20 ± 0.12 aralığında, endüstriyel yöntemle üretilen elma sirkesinin 4.40 ± 0.07 , üzüm sirkesinin 5.68 ± 0.09 olarak tayin edilmiştir. Endüstriyel yöntemle üretilen sirkelerin sirke standardına uygun olduğu ev yapımı sirkelerin bazılarının 4 'lük sınırın altında kaldığı görülmüştür (Öztürk vd., 2015). 12 farklı markaya ait üzüm sirkesinin mevzuata uygunluğunun araştırıldığı çalışmada ise pH aralığının 2.63 ile 3.26 aralığında olduğu ölçülmüştür (Akbaş ve Cabaroğlu, 2010). Genel olarak değerlendirildiğinde ticari sirkeler standartlara uyduğu halde, ev yapımı sirkeler için her zaman standart asitlik değerlerini elde etmenin mümkün olmadığı görülmektedir. Ayrıca sirkelerde titrimetrik yöntemle tayin edilen asitlik değerlerinde farklılıkların gözlenmesi, kullanılan elma ve üzüm hammaddelerinin organik asit içeriklerinin farklı olmasından kaynaklanabilir.

Oda koşullarında ve 9 günlük fermentasyon sonucunda üretilen kombucha çayının asitliği asetik asit cinsinden %0.7 ve fermentasyonun devam etmesi durumunda 2.4 g/100 ml olarak hesaplanmıştır (İleri-Büyükoğlu vd., 2010). Bu çalışmada yeşil çay ile oda koşullarında 10 günlük fermentasyon süresince hazırlanan kombucha çayının asitliği asetik asit cinsinden 0.259 ± 0.008 olarak hesaplanmıştır. Loncar ve ark. (2006) siyah çaydan üretilen kombuchanın fermentasyon sıcaklığı ve farklı oranlarda eklenen SCOBY kültürünün fermentasyon süresince asitlik ve pH üzerine olan etkilerini inceledikleri çalışmalarında 10 günlük fermentasyon süresince 22°C’de %10’luk kültürle aşılanan kombuchanın asitliğini 2.2 g/l, %15’lik kültür kullanılan kombuchanın asitliğini ise 2.35 g/l olarak; 30°C’de %10’luk kültür eklenen kombuchada 3.3 g/l ve %15’lik kültür ile başlatılan kombuchada 4 g/l olarak tayin etmişlerdir (Loncar vd., 2006). Kombucha çayı hazırlanırken aynı süre boyunca fermente edilse bile sıcaklık ve başlangıç kültürü oranının artması kombucha çayının asitlik miktarını değiştirmektedir, bu sebeple ürün kıyaslaması net olarak yapılamamaktadır.

Coşkun ve ark. Kırklareli’nden temin ettikleri 23 farklı hardaliye ve 5 farklı üzüm çeşidinden kendilerinin ürettikleri hardaliyelerde yaptıkları toplam asitlik analizi sonucunda 23 hardaliyenin % asitliğinin 0.35 ± 0.00 - 0.91 ± 0.01 aralığında olduğunu bildirmişlerdir. 5 farklı üzümünden üretilen hardaliyelerde ise, bu çalışmadaki Kırklareli hardaliyesinin de hammaddesi olan Cabernet üzümünden üretilen hardaliyenin asitlik değeri 0.56 ± 0.01 olarak hesaplanmıştır. En düşük asitlik bu ürüne ait olup, belirlenen en yüksek asitlik ise 1.05 ± 0.04 ile Kara üzümünden üretilen hardaliyeye aittir (Coşkun vd., 2018). Bu çalışmada satın alınan iki çeşit hardaliyenin asitlik değerleri tartarik asit cinsinden %1.545 (Kırklareli) ve %2.438 (Edirne) olarak belirlenmiştir. Hardaliye üretilirken kullanılan starter kültür, hardal konsantrasyonu, kimyasal koruyucu fermentasyon süresince asitlik değerini etkilemektedir (Gürbüz, 2018).

5.2.3. Yoğunluk Tayini

Gıdaların yoğunluğu, gıda sektöründe genellikle ayırma ve karıştırma tekniklerinin kullanıldığı işlemlerde gerekebilir. Yoğunluk değeri maddelerin spesifik özelliği olmasına rağmen aynı yoğunluk değerine sahip birden fazla madde olabilir. Yapılan literatür taramasında kombucha, hardaliye ve bozanın yoğunluğu ile ilgili araştırmaya rastlanmamıştır. Boza ile ilgili çalışmalar çoğunlukla reolojik özellikleri ve

içeriği; kambucha ve hardaliye ile ilgili çalışmalarda fenolik madde içeriği ve antioksidan kapasiteleri üzerinedir. Geleneksel yöntemle florina elmalarından üretilmiş elma sirkesinin kalitesi üzerine yapılan araştırmada yoğunluk 1013-1024 kg/m³ olarak hesaplanmıştır (Dabija ve Hatnean, 2014). 12 farklı markaya ait üzüm sirkesinin mevzuata uygunluğunun denetlendiği bir araştırmada üzüm sirkelerinin yoğunluk aralığı 1.0016-1.0139 g/cm³ olarak bulunmuştur. Üzüm sirkesi için en uygun aralığın 1.042-1.361 g/cm³ aralığında olması gerektiği başka bir araştırmada açıklanmıştır (Akbaş ve Cabaroğlu, 2010). Farklı araştırmaların derlendiği çalışmada elma sirkelerinin yoğunluklarının 1.013-1.024 g/cm³ ile 0.9987-1.0517 g/cm³ aralığında, üzüm sirkelerinin ise 1.0100-1.0190 g/cm³, 1.0110-1.0135 g/cm³, 1.013-1.020 g/cm³, 0.9955-1.0981 g/cm³ aralığında olduğu gözlemlenmiştir (Bozdemir vd., 2021). Bu tez çalışmasında satın alınan ticari elma sirkesinin (0.9965 g/cm³) ve üzüm sirkesinin (0.9944 g/cm³) yoğunlukları literatürdeki değerlere yakındır.

5.2.4. Nem/Kuru Madde Tayini

Gıdaların bileşiminde temel olarak su ve kuru madde bulunmaktadır, gıdanın suyu uzaklaştırıldığında kuru madde içeriği kalır. Nem ve toplam kuru madde analizi ürünün standartlara uygunluğu, stabilitesi, ticari değeri ve kalite özelliklerinin belirlenmesi amaçlarıyla yapılmaktadır. TS'nin Boza Standardına göre kuru madde içeriği %20'den az olmamalıdır. İzmir ili kapsamında çalışılan bozalardaki % kuru madde 17.26-22.32 aralığında hesaplanmıştır (Yücel ve Köse, 2002). Levent ve Algan-Cavuldak'ın (2017) Türkiye ve Bulgaristan'dan temin ettikleri bozalarda yaptıkları analizlerde çok farklı sonuçlar elde etmişlerdir. En geniş aralık Trakya yöresindeki bozalarda olup, %5.57 ile %29.82 aralığındadır. Bu araştırmada kullanılan ve Trakya'daki bir ticari üreticiden temin edilen bozanın toplam kuru madde oranı %19.76±0.30'dır. Bu değer boza standartının çok az altında olmasına rağmen, diğer araştırmalarda kullanılan bozaların değerleriyle uyumlu ve belirtilen aralıklar içindedir.

Sirkeler için 2003 yılında yürürlüğe giren mevzuatta kuru madde miktarı ile ilgili herhangi bir sınırlama yoktur, fakat önceki mevzuatta kuru madde miktarının şeker hariç 8 g/l'den az olmaması gerektiği bildirilmiştir. Piyasadaki 12 farklı markaya ait üzüm sirkelerinin mevzuata uygunluğunun araştırıldığı bir çalışmada sirkelerin kuru madde miktarları 1.95 g/l ile 17.25 g/l aralığında bulunmuştur (Akbaş ve Cabaroğlu, 2010).

Tangüler ve ark. elma artıklarından sirke üreterek yaptıkları çalışmalarında elma sirkelerinin kuru madde içeriğini %1.03-7.82 aralığında tespit etmişlerdir (Tangüler vd., 2021). Farklı araştırmaların derlendiği çalışmada elma sirkesinin kuru madde miktarları %1.37-10.26 aralığında, çeşitli üzüm sirkelerinin ise %9.9-11.9, %5.44-17.62, %10.85-12.60, %1.66-22.58 aralıklarında olduğu bildirilmiştir (Bozdemir vd., 2021). Farklı illerden temin edilen elma ve üzümler ile üretilen ev yapımı sirkeler ve endüstriyel yöntemle üretilmiş elma ve üzüm sirkelerinin kalite özellikleri araştırılmıştır. Çalışmada kuru madde içeriği refraktometreyle ölçülen ve suda çözünür kuru maddeyi (çözünür katı madde) ifade eden briks değeri olarak analizlenmiş ve kuru maddeleri üzüm sirkelerinin 1.22 ± 0.19 ile 20.80 ± 0.03 , elma sirkelerinin 12.90 ± 0.05 ile 1.02 ± 0.07 , endüstriyel yöntemle üretilen üzüm sirkesinin 4.12 ± 0.04 ve elma sirkesinin 5.55 ± 0.03 olarak bildirilmiştir (Öztürk vd., 2015).

Mürefte bölgesinden toplanan üzümlerden yapılan hardaliyelerde refraktometre ile belirlenen suda çözünür kurumadde miktarları Adakarası cinsi üzümünden üretilende 7.5g/100 ml, Kalecikkarası cinsi üzümünden üretilende 6.8g/100 ml ve Papazkarası cinsi üzümünden üretilende 5.2g/100 ml olarak bulunmuştur (Faikoğlu, 2014). Bu çalışmada kullanılan Kırklareli ilinden temin edilen hardaliye Merlot, Cabernet ve Shiraz cinsi üzümlerden üretilmiş olup, kuru maddesi 23.36 ± 0.04 'dir. Edirne ilinden temin edilen ve Merlot cinsi üzümünden üretilmiş olan hardaliyede ise 19.02 ± 0.09 olarak ölçülmüştür. Infrared lambalı nem tayin cihazı ile ölçülen hardaliyelerin toplam kuru madde içeriklerinin daha yüksek olduğu görülmektedir.

Kombucha ile ilgili olarak, kuru madde içeriği sarı, yeşil, beyaz ve siyah çaylarda yapılan araştırmalarda fermentasyonun 1. gününde en yüksek kuru madde oranı siyah çayda, en düşük ise beyaz çayda tespit edilmiştir. 11 gün süren fermentasyon sonunda kombuchadaki kuru madde oranı %10 ile en yüksek yeşil çaydan üretilende iken, siyah çaydan üretilen %9 ve sarı çaydan üretilende ise %8.2 civarında ölçülmüştür (Gramza-Michalowska, Kulczynski, Xindi ve Gumienna, 2016). Yeşil çay ile hazırlanan tez çalışmasındaki kombucha çayının kuru maddesi 19.06 ± 0.30 ile yapılan çalışmadaki kombuchalardan daha yüksek bulunmuştur.

5.2.5. Toplam Fenolik Madde ve DPPH Giderme Tayini

Polifenolik bileşikler bitkilerin sentezlediği, başlıca fenolik asitler, flavonoidler, antosiyaninler, fenil propanoidler, kinon pigmentlerini kapsayan ikincil metabolitlerdir. Taze meyve, sebze, çay, şarap, tahıl gibi gıdaları içeren bir diyet insanlar için zengin bir antioksidan kaynağıdır. Antioksidan ve diğer biyoaktif bileşenlerin başka bir kaynağı da bakteri, fungus, liken gibi mikroorganizmalardır. Son yıllarda sağlık üzerindeki pozitif etkileri ve oksidatif hasarın önlenmesinde ve/veya geciktirilmesinde etkileri sebebiyle eksojen antioksidanlar önemli hale gelmiştir. Antioksidan moleküller başta serbest radikal giderme olmak üzere geçiş metallerini bağlama, peroksitleri yıkma veya endojen antioksidan sistemleri destekleme gibi çeşitli mekanizmalar üzerinden etki gösterirler. Gıda, içecek, bitki ekstraktı örneklerinde enstrümental analiz yöntemleriyle fenolik bileşen analizi yapılabilmesine rağmen, genellikle ilk adımda örneklerde spektrofotometrik metodla toplam fenolik madde tayini ve antioksidan aktivite metodlarından biri olan serbest radikal giderme aktivite tayini yapılmaktadır. Sunulan tez çalışmasında standart fenolik madde olarak bitkilerde en yaygın bulunan gallik asit kullanılarak toplam fenolik madde tayini yapılmıştır. Örneklerin antioksidan kapasitesinin göstergesi olarak da 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) radikali kullanılarak serbest radikal giderme metodu çalışılmıştır.

Boza hammaddesi olarak kullanılan tahılların fenolik bileşen içeriklerinin ve metod çalışırken kullanılan standart maddenin farklılıkları fenolik madde tayini sonuçlarına yansımaktadır. Ayrıca farklı renkli buğday türlerinin (Liu, Qiu ve Beta, 2010) ve boza üretiminde kullanılan farklı tahılların (Berktaş, 2011) toplam fenolik madde ve antioksidan aktivitelerinin farklı olduğu da bildirilmiştir. Boza üretiminde farklı tahıllar kullanılmasının fenolik madde miktarına etkisinin araştırıldığı çalışmada toplam fenolik madde içeriğinin ve radikal giderme gücünün fermantasyonda farklı oranlarda kültür kullanılmasıyla değişmediğini, ancak hammadde değişiminde bozanın fenolik miktarında ve DPPH radikali gidermesinde farklılıklar olduğu bildirilmiştir (Berktaş, 2011). Ferulik asit eşdeğeri olarak yapılan çalışmada en yüksek fenolik madde miktarı 202.7 mg/100 g olarak bulgur+mısır unu (2:1) kullanılarak üretilen bozada ve en düşük fenolik madde miktarı 123.9 mg/100 g olarak bulgur+beyaz pirinç (2:1) kullanılarak üretilen bozada bulunmuştur. Bozaların antioksidan aktiviteleri karşılaştırıldığında en yüksek DPPH giderme gücü yine bulgur+mısır unundan üretilen bozada (1097.3 µg TE/100 g) ve en

düşük ise darıdan üretilen bozada (900 µg TE/100 g) gözlenmiştir. Bosna Hersek'te içeceklerin toplam fenolik madde miktarlarının hesaplanması üzerine yapılan araştırmada iki farklı bozada fenolik madde miktarları tannik asit eşdeğeri cinsinden hesaplanmış, 278.15 mg TAE/l ve 210.59 mg TAE/l olarak bulunmuştur (Marjanovic vd., 2015). Çalışmamızda kullanılan Trakya yöresine ait bozanın toplam fenolik madde miktarı kuru madde bazında 266.49 mg GAE/100 g olarak hesaplanmıştır. Farklı seyreltme oranlarında çalışılan (1:10, 1:20 ve 1:50) boza örneği, gösterdiği %5.95-14.2 aralığındaki inhibisyon değerleri ile serbest radikal giderme gücü yönünden zayıftır. Benzer şekilde Özpınar da yaptığı çalışmada 100 µg/ml konsantrasyondaki bozanın %10.67 DPPH tutucu etkisi olduğunu bildirmiştir (Özpınar, 2012).

Elma ve üzüm sirkesi organik asit içerikleri yönünden birbirine benzemesine rağmen, sirke yapımında kullanılan hammaddelerin özelliğine bağlı olarak fenolik madde içeriği bakımından farklıdırlar (Çizelge 2.6). Bu sebeple literatürde farklı meyvelerden üretilmiş sirkelerin de toplam fenolik madde miktarları ve bununla ilişkili olarak antioksidan aktiviteleri farklı olabilmektedir. Elma ve üzüm sirkelerinden geleneksel yöntemle evde üretilmiş sirkelerin TFM miktarları Uluğbey Karası türü üzümünden üretilen sirkede 498.36 mg GAE/l olarak bulunurken, Red Delicious elmasından üretilen sirkede 209.10 mg GAE/l olarak hesaplanmıştır. Bu sirkelerin DPPH radikali giderme oranları %100'lük seyreltilen üzüm sirkesindeki %30.14±0.75 ve elma sirkesinde %16.44±0.12 olarak tayin edilmiştir, bu çalışmada kullanılan elma sirkesi fenolik bileşik içeriği diğer elmalara göre daha fazla olan kırmızı elmadan üretilirken, üzüm sirkesi de en fazla fenolik içeriğine sahip üzüm çeşitlerinden biri olan Uluğbey Karası'ndan üretilmiştir (Kahraman vd., 2022). Liu ve ark. (2019) farklı ülkelerin sirkelerinin toplam fenolik içeriklerini araştırdıkları çalışmalarında elma sirkelerinin 66.90±0.87 mg GAE/l - 495.52±20.59 mg GAE/l, elma şarabından üretilen sirkelerin 163±0.15 mg GAE/l - 426.72±14.52 mg GAE/l ve kırmızı üzüm şarabından üretilen sirkelerin ise 654.95±39.52 mg GAE/l - 993.51±23.19 mg GAE/l aralığında fenolik madde içerdiği sonucuna ulaşılmıştır. Bununla uyumlu olarak, meyvelerden üretilen 23 çeşit sirke arasında en yüksek antioksidan kapasite ve fenolik madde içeriğinin kırmızı üzümlerden yapılan balsemik sirkesi ve kırmızı şarap sirkesinde olduğunu bildirilmişlerdir. Farklı sirkelerdeki fenolik içeriğin araştırıldığı bir diğer çalışmada elma şarap sirkesinde 400-1000 mg GAE/l, üzüm sirkesinin 2000-3000 mg GAE/l aralığında TFM içerdiği sonucuna ulaşılmıştır (Budak

vd., 2014). Ülkemizde ise farklı illerden temin edilmiş üzüm ve elmalardan geleneksel yöntemle üretilmiş sirkeler ile endüstriyel yöntemle üretilen elma ve üzüm sirkelerinin TFM miktarlarının karşılaştırıldığında; ev yapımı üzüm sirkelerinde $2228.79 \pm 83.26 - 75.01 \pm 1.27$ mg GAE/l, elma sirkelerinde $434.88 \pm 7.55 - 40.44 \pm 2.58$ mg GAE/l, endüstriyel üzüm sirkesinde 91.17 ± 2.70 mg GAE/l ve elma sirkesinde 55.08 ± 2.48 mg GAE/l gibi geniş bir dağılım olduğu görülmektedir. Çalışmanın devamında DPPH radikal giderme yönteminde ev yapımı üzüm sirkelerinin DPPH radikal süpürme gücü $\%89.53 \pm 0.52$ ile 4.93 ± 0.12 , elma sirkelerinin $\%65.12 \pm 0.73$ ile 0.53 ± 0.10 , endüstriyel üzüm sirkelerinin $\%19.85 \pm 0.66$ ve elma sirkelerinin $\%26.32 \pm 2.00$ olarak belirlenmiştir (Öztürk vd., 2015). Araştırmamızda kullandığımız elma ve üzüm sirkeleri de ticari ürün olup, TFM içerikleri sırasıyla 218.28 ve 218.40 mg GAE/l'dır, kuru madde bazında hesaplandığında ise fenolik içerikleri 2425.5 ve 2180 mg GAE/100 g'dır. Beş farklı oranda seyreltilerek yapılan antioksidan aktivite denemesinde seyreltme oranı arttıkça azalan konsantrasyona bağlı olarak serbest radikal giderme yüzdesi de azalmıştır (Şekil 4.4). Çalışmamızda elma sirkelerinin ($EC_{50}=0.99$ mg/ml) radikal giderme gücünün üzüm sirkesine ($EC_{50}=1.50$ mg/ml) göre daha iyi olduğu görülmektedir, sonuçlar kuru madde bazında hesaplanan toplam fenolik miktarları ile paralellik göstermektedir.

Literatürde yüzey kültür ve derin kültür yöntemiyle üretilen elma ve üzüm sirkelerinin (Budak, 2010) ve farklı hammaddelerden üretilen meyve sirkelerinin (Bozdemir vd., 2021) TFM ve antioksidan kapasitelerinde (ORAK, TEAC, DPPH metodları) önemli düzeyde farklılıklar olduğu bildirilmiştir.

Uzak doğudan köken alan kombucha çayı dünya çapında tüketilmeye başlayan hafif asidik, serinletici bir içecektir. Fermantasyonda yeşil çay kullanılabileceği gibi, siyah çay ve beyaz şeker ile de hazırlanabilir. Ancak fermantasyon süresi, sıcaklık ve maya miktarı fermantasyon ürünlerinin konsantrasyonu üzerinde etkilidir (Loncar vd., 2006). Farklı çay çeşitlerinde fermantasyonun süresinin toplam fenolik madde miktarına etkisinin incelendiği çalışmada siyah çay ile hazırlanan kombuchada fermantasyonun başlangıcında fenolik madde miktarı $1480 \mu\text{g GAE/ml}$ olarak tespit edilmiştir. Bu yüksek fenolik içeriğin siyah çayın sahip olduğu fenolik madde zenginliğinden kaynaklandığı bilinmektedir. Fermantasyon süresince siyah çayı TFM 7. gün $1403 \mu\text{g GAE/ml}$ ve 14. gün $1280 \mu\text{g GAE/ml}$ değerine azalmıştır. Bu azalma fermantasyon sırasında fenolik bileşiklerin mikroorganizmalar tarafından kullanmasından dolayıdır. Geleneksel

kombucha karışımıyla (şekerli siyah çay, SCOBY ve sıvı kısım) üretilen kombuchada ise fermantasyon süresince 0., 7. ve 14. günde 1327 µg GAE/ml, 1453 µg GAE/ml ve 1469 µg GAE/ml şeklinde bir artış gerçekleşmiştir (Delik vd., 2021). Bu çalışmada, siyah çaydan üretilen fermente ürünün daha yüksek antioksidan aktiviteye de sahip olduğu ve bunun da siyah çayın antioksidan kapasitesinin yüksek olmasıyla doğru orantılı olduğu sonucunu doğurmuştur. Siyah çaydan üretilen fermente içeceğin fermantasyon başlangıcı, 7. ve 14. günündeki DPPH radikal yakalama kapasiteleri değişimi %55, %62 ve %53 olarak hesaplanmıştır. Geleneksel kombuchanın ise radikal yakalama kapasiteleri %58, %63 ve %59 olarak değişmiştir. Mayalanmada kullanılan çayların ve mikrobiyaya farklılığının antioksidan aktivite değişimine neden olabileceği düşünülmüştür. Ahmed ve ark. (2020) farklı çay çeşitlerindeki TFM araştırdıkları çalışmalarında en yüksek fenolik madde siyah çay ile üretilen kombuchada 8 günlük fermantasyon sonrasında GAE cinsinden 88.8 µg/ml olarak ölçmüştür. Radikal giderme aktiviteleri ise en yüksek siyah çaydan üretilen kombuchada %89.69 olarak hesaplanmış, onu arpa çayından üretilen (%76.19) ve pirinçten üretilen (%36.04) kombucha çayları izlemiştir (Ahmed, Hikal ve Abou-Taleb, 2020). Polonya’da yapılan sarı, beyaz, yeşil ve siyah çay çeşitlerinin TFM miktarlarının incelendiği araştırmada en yüksek TFM sarı çayda (15.92 mg GAE/200 ml), yeşil çayda (9.89 mg GAE/200 ml), beyaz çayda (5.93 mg GAE/200 ml) ve siyah çayda (5.79 mg GAE/200 ml) bulunmuştur. Ayrıca 11 günlük depolama süresince fenolik madde miktarlarında önemli değişimin olmadığı bildirilmiştir. Örneklerin DPPH radikal giderme aktivitesi fermantasyon öncesi ve sonrası kıyaslandığında ise benzer şekilde sarı çay > sarı çay kombuchası > yeşil çay > yeşil çay kombuchası > beyaz çay > beyaz çay kombuchası > siyah çay > siyah çay kombuchası şeklinde sıralama yapılmıştır (Gramza-Michalowska vd., 2016). Bu tez çalışmasında yeşil çaydan 10 günlük fermantasyon sürecinde hazırlanan kombuchanın TFM miktarı 696.35 ± 7.15 µg GAE/ml olarak bulunmuştur ve 1:5 - 1:50 seyreltme oranları aralığında yüksek radikal giderme gücü ($EC_{50}=2,38$ mg/ml) göstermiştir. Gaggia ve ark. (2018) yeşil çay ve siyah çaydan üretilen kombuchaların fermantasyonlarının başlangıç, 7 ve 14 gün sonrasındaki antioksidan kapasitesinin ve TFM’nin fermantasyonun 7. gününde en iyi olduğunu ve yeşil çaydan üretilmiş kombuchanın siyah çaydan üretilmiş olana göre daha yüksek antioksidan aktivite (DPPH ve FRAP metodu) gösterdiğini rapor etmişlerdir. Fermantasyon başlangıcında artan aktivite 7. gün sonrasında azalmıştır (Gaggia vd., 2018).

Fermentasyon süresince kombuchanın antioksidan içeriğine sıcaklık değişiminin etkisi araştırıldığında en yüksek antioksidan içerik 37-42°C arası sıcaklıkta yapılan fermentasyondan elde edilmiştir (Mousavi vd., 2020).

Hardaliye Trakya'da özellikle Kırklareli ilinde üretilen geleneksel bir içecektir. Bu çalışmada kullanılan Kırklareli yöresine ait hardaliye Merlot, Cabernet ve Shiraz cinsi kırmızı üzümlerden, Edirne yöresine ait hardaliye Merlot cinsi üzümünden üretilen ticari fermente ürünlerdir. Hardaliye fermentasyon tekniği ile üretildiği ve polifenolikçe zengin renkli üzümlerden üretildiği için antioksidan potansiyelinin yüksek olacağı düşünülmektedir, dolayısıyla hardaliye ile ilgili yapılan çalışmalar bu yöndedir.

Coşkun ve ark. (2018) Kırklareli'nden evlerden temin ettikleri 23 farklı hardaliyenin toplam fenolik madde içeriklerini 368.8 ± 0.1 - 2727.5 ± 1.5 mg/l aralığında olduğunu rapor etmişlerdir. Ayrıca laboratuvar ortamında 5 farklı üzüm çeşidinden üretilen hardaliyelerin TFM miktarları en düşük Siyah üzümünden üretilen hardaliyede 961.8 ± 0.40 mg/l olarak ve en yüksek Dingil Siyah üzümünden üretilen hardaliyede 2286.8 ± 2.15 mg/l olarak bulmuşlardır. Tezde kullanılan Kırklareli hardaliyesinin de üretiminde kullanılan Cabernet üzüm çeşidinden üretilen hardaliyede ise TFM miktarı 1165.4 ± 1.40 mg/l olarak hesaplanmıştır (Coşkun vd., 2018). Çok sayıda yerel hardaliye örneğini ve farklı üzüm cinslerinden üretilen hardaliyeleri kapsayan bu çalışma, hardaliye üretim koşullarına ve kullanılan üzümün cinsine bağlı olarak fenolik madde ve monomerik antosiyanin miktarlarının değiştiğini işaret etmektedir. Yine Kırklareli'ne ait geleneksel bir üreticinin hardaliyesinde TFM miktarı 2128 ± 188.09 mg GAE/l'dir (Amoutzopoulos, 2013). Mürefte-Şarköy'den temin edilen Adakarası, Kalecikkarası ve Papazkarası üzümlerinden laboratuvar ortamında üretilen hardaliyelerin toplam fenolik madde içerikleri galik asit eşdeğeri cinsinden sırasıyla 46.11 ± 2.03 mg/l, 39.26 ± 3.03 mg/l ve 36.87 ± 2.20 mg/l olarak ve HPLC-DAD tekniği ile ise 39.63 mg/l, 39.02 mg/l ve 24.01 mg/l olarak belirlenmiştir. Fenolik içeriği en yüksek olan Adakarası hardaliyesinin antioksidan kapasitesinin de en yüksek olduğu ABTS, DPPH ve CUPRAC metodları ile gösterilmiştir (Faikoğlu, 2014). Çok sayıda antioksidan aktivite tayin metodu olmasına rağmen, yapılan antioksidan çalışmaların pek çoğunda örneğin aktivitesi ile toplam fenolik madde içeriği arasında pozitif korelasyon bulunmuştur. Bu çalışmada Edirne'den temin edilen hardaliyenin TFM miktarı 401.91 ± 0.71 mg GAE/l, Kırklareli'nden temin edilen hardaliyede ise 694.51 ± 6.79 mg GAE/l olarak tayin edilmiştir. 1:10-1:100

oranlarından seyreltilen her iki hardaliye örneğinde seyreltme oranının azalması ile DPPH giderme oranı artmıştır. Çalışmamızda da literatürle uyumlu olarak fenolik madde içeriği yüksek olan Kırklareli hardaliyesi ($EC_{50}=3.04$ mg/ml) Edirne hardaliyesinden ($EC_{50}=7.22$ mg/ml) daha yüksek radikal giderme aktivitesi göstermiştir. Kırklareli'ne ait geleneksel bir üreticinin temin edilen hardaliyenin ORAC metoduyla tayin edilen antioksidan kapasitesi 64.0 ± 5.3 mmol TE/l'dir (Amoutzopoulos, 2013). Hardaliyelerin sahip oldukları farklı antioksidan kapasiteleri elde edildikleri farklı üzüm çeşitleri, içerdikleri farklı fenolik bileşiklerinden ve kullanılan aktivite tayin metodundan kaynaklanabilir. Antioksidan aktivite tayin metotları başlıca bir elektron transferi veya bir proton transferi temeline dayansa da farklı substratlar ve reaksiyon şartları kullanılarak çalışılan çok sayıda antioksidan aktivite testi bulunmaktadır.

Hardaliye üretiminde kullanılan üzümler ile ilişkili olarak antioksidan potansiyeli yüksek fermente bir içecek olduğu için, serum antioksidan parametreleri üzerine etkisi ve bağırsak florası üzerine etkisi ile ilgili klinik çalışmalar da yapılmıştır. 89 sağlıklı kişinin katıldığı çalışmada denekler kontrol grubu, 6 hafta süreyle günde 250 ml hardaliye içen grup ve günde 500 ml hardaliye içen grup olmak üzere üçe ayrılmıştır. Çalışmanın başında ve sonunda deneklerin serumlarında yapılan analizlerde hardaliye tüketiminin oksidatif stres göstergesi olan malondialdehit, dien konjugatları ve homosisteinin düzeylerinde azalma olduğu bildirilmiştir (Amoutzopoulos, 2013). Hardaliye fonksiyonel bir gıda olarak bilinmektedir. Hardaliyenin sağlıklı kişilerin bağırsak florası üzerine etkisini incelemek için 15 kişilik bir kontrol ve 15 kişilik deney grubu oluşturularak onlara bir süre sağlıklı beslenme programı uygulanmıştır. Deney grubundaki kişiler 20 gün haftada 3 kez 250 ml hardaliye içerek diyetle devam etmişlerdir. Belirli zamanlarda deneklerden gaita numunesi alınarak, mikrobiyaya analizleri yapılmış ve ayrıca PCR ve 16S rRNA hedefli yeni nesil dizileme yöntemleri kullanılarak mikrobiyaya içeriklerinin tür ve cinsleri belirlenmiştir (Polat-Sarı, 2021). Bu çalışmaya göre hardaliye sağlıklı kişilerin bağırsak florasına olumlu katkı sağlamaktadır.

Bağırsak florası bağırsaklarda simbiyotik bir yaşam sürmektedir. İntestinal bariyerin bütünlüğünün korunması, kısa zincirli yağ asitlerinin sentezlenmesi, bağışıklık yanıtının düzenlenmesi gibi koruyucu, metabolik ve önemli fonksiyonlara sahiptir. Dolayısıyla kişilerin beslenme alışkanlıkları ve diyet bileşenleri de bağırsak mikrobiyatasıyla yakın bir ilişki içindedir. Çalışmada kullanılan boza, sirke, kombucha

çayı ve hardaliyeler fenolik içeriğe sahip birer fonksiyonel ürün olarak değerlendirilebilir. Ayrıca içerdikleri triptofan aminoasidi, kinürenik asit, B₃ vitamini öncüsü ve özellikle NAD⁺ öncüsü olan nikotinik asit ve nikotinamid molekülleri de bu özelliklerine katkı sağlayacaktır. Bu öncüler meyve, sebze, et, süt gibi günlük besinlerde bulunmasına rağmen, sözü geçen fermente ürünler de iyi birer diyet desteği olarak değerlendirilebilir.

Son yıllarda dünya genelinde geleneksel fermente içeceklere karşı artan bir ilgi vardır. Hardaliye de özellikle ülkemizde Trakya Bölgesi'nde üretilen geleneksel bir fermente içecektir. Evlerde yapılan hardaliyenin çok eski bir geçmişi olmasına rağmen son yıllarda ticari olarak yöresel firmalarca üretilmektedir. Üretiminde probiyotik laktik asit bakterileri kullanılması hardaliyeyi değerli bir fonksiyonel ürün yapar. Çalışmamızda kullanılan hardaliyeler Kırklareli ve Edirne'deki yerel firmalarca üretilmiş olup, araştırma sonuçlarımız hardaliye tanıtımına katkıda bulunacaktır.

Çalışmamızda LC-MS/MS cihazı kullanılarak dört çeşit fermente üründe (sirke, boza, hardaliye, kombucha çayı) triptofan ile ilgili altı metabolitin (triptofan, kinürenin, kinürenik asit, 3-hidroksi kinürenin, nikotinik asit, nikotinamid) tayini yapılmıştır. Daha sonraki çalışmalarda örneklerdeki serotonin, melatonin ve kinürenin yolağında yer alan diğer nöroaktif özellikli metabolitlerin (antranilik asit, 3-hidroksi antranilik asit, pikolinik asit, kinolinik asit) de analizleri yapılabilir. Böylelikle ürünün fermentasyonunda kullanılan mikroorganizmaların triptofan metabolizmaları hakkında daha detaylı bilgi edinilebilir.

Aynı fermente ürün farklı maya ve bakteri suşlarıyla üretilebileceği için ve ayrıca fermente ürünler farklı hammaddelerden ve farklı üretim teknikleri kullanarak üretilebileceği için kimyasal bileşimleri içerik ve oran olarak farklılık göstermektedir. Bu da farklı çalışmaları kıyaslama zorluğunu getirmektedir. Konuyla ilgili daha detaylı araştırmalar planlanabilir ve sonuçlar farklı fermente ürünlerin metabolitlerinin karşılaştırılmasıyla değerlendirilebilir.

KAYNAKLAR

- Aamer, R. A. & El-Hameed, A. K. (2016). Preparation and evaluation of dibis from different varieties of grape. *Egyptian Journal of Agricultural Research*, 94(4), <http://dx.doi.org/10.21608/ejar.2016.153137>
- Abe, K., Kushibiki, T., Matsue, H., Furukawa, K. I. & Motomura, S. (2007). Generation of antitumor active neutral medium-sized α -glycan in apple vinegar fermentation. *Bioscience, Biotechnology, Biochemistry*, 71(9), 2124-2129.
- Ahmed, R. F., Hikal, M. S. & Abou-Taleb, K. (2020). Biological, chemical and antioxidant activities of different types kombucha. *Annals of Agricultural Sciences*, 65(1), 35-41.
- Akbaş, M. & Cabaroğlu, T. (2010). Ülkemizde üretilen bazı üzüm sirkelerinin bileşimleri ve gıda mevzuatına uygunlukları üzerine bir araştırma. *Gıda*, 35(3), 183-188.
- Akpınar-Bayizit, A., Yılmaz-Ersan, L. & Özcan, T. (2009). Determination of Boza's organik acid composition as it is affected by raw material and fermentation. *International Journal of Food Properties*, 13(3), 648-656.
- Akyol, V., Kundakçı, A. & Ergönül, B. (2014). Gıdalarda biyojen aminler. *Celal Bayar Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 11(2), 294-305.
- Altay, F., Karbancıoğlu-Güler, F., Daskaya-Dikmen, C. & Heperkan, D. (2013). Areview on traditional Turkish fermented non-alcoholic beverages: Microbiota, fermentation process and quality characteristics. *International Journal of Food Microbiology*, 167, 44-56.
- Amoutzopoulos, B. (2013). Sağlıklı biraylerde geleneksel üzüm içeceği hardaliyenin serum antioksidan ve biyokimyasal parametreler üzerine etkisi (Doktora tezi). Hacettepe Üniversitesi/Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Ankara.
- Amoutzopoulos, B., Loker, G.B., Samur, G., Cevikkalp, S.A., Yaman, M., Kose, T., Pelvan, E. (2013). Effects of a traditional fermented grape-based drink "hardaliye" on antioksidant status of healthy adults: A randomized controlled clinical trial. *Journal Sci. Food Agric.*, 93, 3604–3610.
- Aran, N. (2010). *Gıda Biyoteknolojisi*. Ankara.
- Arıcı, M. & Coşkun, F. (2001). Hardaliye: Fermented grape juice as a traditional Turkish beverage. *Food Microbiology*, 18, 417-421.
- Arıcı, M. & Dağlıoğlu, O. (2002). Boza: A lactic acid fermented cereal beverage as a traditional turkish food. *Food Reviews International*, 18(1), 39-48.

- Arıcı, M. (2017). *Fermantasyon Teknolojisi Bitkisel Fermantasyonlar*. İstanbul.
- Ashaolu, T. J. & Reale, A. (2020). Aholistic review on Euro-Asian lactic acid bacteria fermented cereals and vegetables. *Microorganisms*, 8(8), 1176.
- Ashaolu, T. J. (2020). Safety and quality of bakterially fermented functional foods and beverages: A mini review. *Food Quality and Safety*, 4, 123-124.
- Baba, N., Higashi, Y. & Kanekura, T. (2013). Japanese black vinegar “Izumi” inhibits the proliferation of human squamous cell carcinoma cells via necroptosis. *Nutrition and Cancer*, 65(7), 1093-1097.
- Bayat, G. & Yıldız, G. (2019). The special fermented Turkish drink: Boza. *Journal of Tourism And Gastronomy Studies*, 7(4), 2438-2446
- Bayındır, M. S. & Önçel, S. (2019). Gastronomide kültürel miras bakış açısıyla kırklareli hardaliyesi’nin geleneksel üretiminin değerlendirilmesi. *Journal of Tourism and Gastronomy Studies*, 7 (3), 1867-1886.
- Beheshti, Z., Chan, Y. H., Nia, H. S., Hajihosseini, F., Nazari, R., Shaabani, M. & Omran, M. T. S. (2012). Influence of apple cider vinegar on blood lipids. *Life Science Journal*, 9(4), 2431-2440.
- Bender, A. D. (1982). Biochemistry of tryptophan in health and disease. *Molecular Aspects of Medicine*, 6, 101-197.
- Berktaş, İ. (2011). Bozanın farklı hammaddeler kullanılarak üretilmesinin fenolik içeriğine ve kalitesine etkisi (Yüksek lisans tezi). İstanbul Teknik Üniversitesi/Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Berliner, J. A. & Heinecke, J. W. (1990). The role of oxidized lipoproteins in atherogenesis. *Free Radical Biology & Medicine*, 20(5), 707-727.
- Bertazzo, 2A., Ragazzi, E. & Visioli, F. (2016). Evolution of tryptophan and its foremost metabolites concentrations in milk and fermented dairy products. *Pharma Nutrition*, 4(2), 62-67.
- Birer, S. (1987). Boza yapım ve özellikleri. *Gıda*, 12(5), 341-344.
- Blandino, A., Al-Aseeri, M. E., Pandiella, S. S., Cantero, D. & Webb, C. (2002). Cereal-based fermented foods and beverages. *Food Research International*, 36, 527-543.
- Blois, M. S. (1958). Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, 181, 1199-1200.
- Boo, Y. C. (2021). Mechanistic basis and clinical evidence fort he applications of nicotinamide (niacinamide) to control skin aging and pigmentation. *Antioxidants*, 10(8), 1315, <https://doi.org/10.3390/antiox10081315>
- Bowen, D. J., Spring, B. & Fox, E. (1991). Tryptophan and high-carbohydrate diets as adjuncts to smoking cessation therapy. *Journal of Behavioral Medicine*, 14(2), 97-110.
- Bozdemir, M., Altan-Kemer, D. D., Akgül, G. & Gümüş, T. (2021). Farklı hammaddelerden üretilen sirkelerin bazı fizikokimyasal ve fonksiyonel özellikleri. *Journal of Tekirdag Agricultural Faculty*, 18(1), 32-44.

Budak, N. H. (2010). Elma ve üzümünden üretilen sirkelerin bileşenleri ve fonksiyonel özellikleri üzerine araştırma (Doktora tezi). Süleyman Demirel Üniversitesi/Fen Bilimleri Enstitüsü, Isparta.

Budak, N. H., Aykın, E., Seydim, A. C., Greene, A. K. & Güzel-Seydim, Z. B. (2014). Functional properties of vinegar. *Journal of Food Science*, 79(5), 757-764.

Bulut-Solak, B. (2021). Chapter 16 – Food, nutrition, and health in Turkey, the European part. *Nutritional and Health Aspects of Food in The Balkans*, 263-278.

Caplice, E. & Fitzgerald, G. F. (1999). Food fermentations: Role of microorganisms in food production and preservation. *International Journal of Food Microbiology*, 50, 131-149.

Carpenedo, R., Chiarugi, A., Russi, P., Lombardi, G., Carla, V., Pellicciari, R., Mattoli, L. & Moroni, F. (1994). Inhibitors of kynurenine hydroxylase and kynureninase increase cerebral formation of kynurenate and have sedative and anticonvulsant activities. *Neuroscience*, 61(2), 237-244.

Chen, H., Chen, T., Giudici, P. & Chen, F. (2016). Vinegar functions on health: Constituents, sources, and formation mechanisms. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 15, 1124-1138.

Chen, Y. & Guillemin, G. J. (2009). Kynurenine pathway metabolites in humans: Disease and healthy states. *International Journal of Tryptophan Research*, 2, 1-19.

Coates, P.M., Blackman, M.R., Cragg, G.M., Levine, M., Moss, J. & White, J.D. (2005). *Encyclopedia of Dietary Supplements*. New York.

Comai, S., Bertazzo, A., Bailoni, L., Zancato, M., Costa, C. V. L. & Allegri, G. (2007). The content of proteic and nonproteic (free and protein-bound) tryptophan in quinoa and cereal flours. *Food Chemistry*, 100, 1350-1355.

Connor, H. A. & Allgeier, R. J. (1976). Vinegar: Its history and development. *Advances in Applied Microbiology*, 20, 81-133.

Coşkun, F. & Arıcı, 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. & Arıcı, M. (2011). Hardaliyenin bazı özellikleri üzerine farklı hardal tohumları ve üzüm çeşitleri kullanımının etkisi. *Akademik Gıda*, 9(3), 6-11.

Coşkun, F. (2005). Geleneksel fermente bir içeceğimiz hardaliye. *Hasad Gıda*, 246, 20-25.

Coşkun, F. (2017). A traditional Turkish fermented non-alcoholic grape-based beverage, “Hardaliye”. *Beverages*, 3(1), 2.

Coşkun, F., Arıcı, M., Gülcü, M., Çelikyurt, G. & Mırık, M. (2018). Farklı evlerden toplanan ve farklı üzümlerden üretilen hardaliye örneklerinin fizikokimyasal, fonksiyonel ve mikrobiyolojik özellikleri. *Tarım Bilimleri Dergisi*, 24, 278-285.

Çağlar, H., Erekul, O. & Yiğit, A. (2017). Farklı lokasyonlarda yetiştirilen mısır çeşitlerinin tane verimi ve aminoasit içeriklerinin belirlenmesi. *ADÜ Ziraat Dergisi*, 14(1), 65-70.

Çatak, J. (2019). Determination of niacin profiles in some animal and plant based foods by high performance liquid chromatography: Association with healthy nutrition. *Journal of Animal Science and Technology*, 61(3), 138-146.

Dabija, A. & Hatnean, C. A. (2014). Study concerning the quality of apple vinegar obtained through clasikal method. *Journal of Agroalimentary Processes and Technologies*, 20(4), 304-310.

Davis, I & Liu, A. (2015). What is the tryptophan kynurenine pathway and why is it important to neurotherapeutics? *Expert Review of Neurotherapeutics*, 15(7), 719-721.

Dehhagni, M., Panahi, H. K. S., Heng, B. & Guillemin, G. J. (2020). The gut microbiota, kynurenine pathway, and immune system interaction in the development of brain cancer. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.562812>

Delik, E., Eroğlu, B., Ünal, O. & Tefon-Öztürk, B. E. (2021). *Origanum bilgeri*'nin kombu çayının biyoaktivitesi ve mikrobiyolojik profili üzerindeki etkilerinin incelenmesi. *Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 21(2), 236-249.

Di Cagno, R., Coda, R., De Angelis, M. & Gobetti, M. (2013). Exploitation of vegetables and fruits through lactic acid fermentation. *Food Microbiology*, 33(1), 1-10.

Faikoğlu, F. (2014). Adakarası, papazkarası, kalecikkarası üzüm çeşitleri kullanılarak üretilen hardaliyelerin kalitesinin ve duyuşal özelliklerinin araştırılması (Yüksek lisans tezi). Uludağ Üniversitesi/Fen Bilimleri Enstitüsü, Bursa.

Faikoğlu, F., Yavaş, H., Gürbüz, O. & İstek, N. (2016). Geleneksel içeceğimiz hardaliyenin fenolik bileşiklerinin araştırılması. *Gıda ve Yem Bilimi - Teknolojisi Dergisi*, 16, 16-23.

Filho Chaves A. J. M, Lima Carvalho, C. N., Vasconcelos Mendes, S. M., Freitas de Lucena, D., Maes, M. & Macedo, D. (2018). IDO chronic immune activation and tryptophan metabolic pathway: A potential pathophysiological link between depression and obesity. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 80, 234-249.

Fukuwatari, T. & Shibata, K. (2013). Nutritional aspect of tryptophan metabolism. *International Journal of Tryptophan Research*, 6(1), 3-8.

Fushimi, T., Suruga, K., Oshima, Y., Fukiharu, M., Tsukamoto, Y. & Goda, T. (2006). Dietary acetic acid reduces serum cholesterol and triacylglycerols in rats fed a cholesterol-rich diet. *British Journal of Nutrition*, 95, 916-924.

Gaggia, F., Baffoni, L., Galiano, M., Nielsen, D. S., Jakobsen, R. R., Castro-Mejia, J. L., Bosi, S., Truzzi, F., Musumeci, F., Dinelli, G. & Di Gioia, D. (2018). Kombucha beverage from green, black and rooibos teas: A comparative study looking at microbiology, chemistry and antioxidant activity. *Nutrients*, 11(1) <https://doi.org/10.3390/nu11010001>

Gıda Maddeleri Tüzüğü. Gıda Maddelerinin ve Umumi Sağlığı İlgilendiren Eşya ve Levazımın Hususi Vasıflarını Gösteren Tüzük, 1952.

Goddard, M. R. & Greig, D. (2015). *Saccharomyces cerevisiae*: A nomadic yeast with no niche? *FEMS Yeast Research*, 15(3), <https://dx.doi.org/10.1093%2Ffemsyr%2Ffov009>

Gomes, R. J., Borges, M. F., Rosa, M. F., Castro-Gomez, R. J. H. & Spinosa, W. A. (2018). Acetic acid bacteria in the food industry: Systematics, characteristics and applications. *Food Technology & Biotechnology*, 56(2), 139-151.

Gotcheva, V., Pandiella, S. S., Angelov, A., Roshkova, Z. & Webb, C. (2001). Monitoring the fermentation of the traditional Bulgarian beverage boza. *International Journal of Food Science and Technology*, 36, 129-134.

Gökırmaklı, Ç., Budak, N. H. & Güzel-Seydim, Z. B. (2019). Sirkenin sağlık üzerine etkileri. *Gıda*, 44(6), 1042-1058.

Gramza-Michalowska, A., Kulczynski, B., Xindi, Y. & Gumienna, M. (2016). Research on the effect of culture time on the kombucha tea beverage's antiradical capacity and sensory value. *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*, 15(4), 447-457.

Greenwalt, C. J., Steinkraus, K.H. & Ledford, R. A. (2000). Kombucha, the fermented tea: Microbiology, composition, and claimed health effects. *Journal of Food Protection*, 63(7), 967-981.

Groth, B., Venkatakrishnan, P. & Lin, S. (2021). NAD⁺ metabolism, metabolic stress, and infection. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 8, 686412.

Guidici, P., Gullo, M., Solieri, L. & Falcone, P. M. (2009). Technological and microbiological aspects of traditional balsamic vinegar and their influence on quality and sensorial properties. *Advances in Food and Nutrition Research*, 58, 137-182.

Gülcü, M., Demirci, A. Ş. & Güner, K. G. (2008). Siyah üzüm; zengin besin içeriği ve sağlık açısından önemi. Türkiye 10. Gıda Kongresi, Ankara.

Gürbüz, Ö. (2018). Hardaliye üretiminde kullanılan antimikrobiyal maddelerin fermantasyon üzerine etkileri (Yüksek lisans tezi). Trakya Üniversitesi/Fen Bilimleri Enstitüsü, Edirne.

Hartai, Z., Klivenyi, P., Janaky, T., Penke, B., Dux, L. & Vecsei, L. (2005). Kynurenine metabolism in multiple sclerosis. *Acta Neurologica Scandinavica*, 112, 93-96.

Hoffman, W. H., Whelan, S. A., & Lee, N. (2021). Tryptophan, kynurenine pathway, and diabetic ketoacidosis in type 1 diabetes. *Plos One*, 16(7), <https://dx.doi.org/10.1371%2Fjournal.pone.0254116>

Höglund, E., Øverli, Ø. & Winberg, S. (2019). Tryptophan metabolic pathways and brain serotonergic activity: A comparative review. *Frontiers in Endocrinology*. doi: 10.3389/fendo.2019.00158

Hrboticky, N., Leiter, L. A. & Anderson, G. H. (1989). Menstrual cycle effects on the metabolism of tryptophan loads. *American Journal of Clinical Nutrition*, 50, 46-52.

İleri-Büyükoğlu, T., Taşçı, F. & Şahindokuyucu, F. (2010). Kombucha ve sağlık üzerine etkileri. *Uludağ University Journal of Faculty Veterinary Medicine*, 29, 69-76.

İslam, J., Shirakawa, H., Nguyen, T. K., Aso, H. & Komai, M. (2016). Simultaneous analysis of serotonin, tryptophan and tryptamine levels in common fresh fruits and vegetables in Japan using fluorescence HPLC. *Food Bioscience*, 13, 56-59.

Jayabalan, R., Malbasa, R. V., Loncar, E. S., Vitas, J. S. & Sathishkumar, M. (2014). A review on Kombucha tea-Microbiology, composition, fermentation, beneficial effects, toxicity, and tea fungus. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13(4), 538-550.

Jeong, J. H., Kim, H. J., Lee, T. J., Kim, M. K., Park, E. S. & Choi, B. S. (2004). Epigallocatechin 3-gallate attenuates neuronal damage induced by 3-hydroxykynurenine. *Toxicology*, 195, 53-60.

Jhamandas, K., Boegman, R. J., Beninger, R.J. & Bialik, M. (1990). Quinolate-induced cortical cholinergic damage: Modulation by tryptophan metabolites. *Brain Research*, 529, 185-191.

Johnston, C. S. & Buller, A. J. (2005). Vinegar and peanut products as complementary foods to reduce postprandial glycemia. *Journal of the American Dietetic Association*, 105(12), 1939-1942.

Johnston, C. S., Kim, C. M. & Buller, A. J. (2004). Vinegar improves insulin sensitivity to a high-carbohydrate meal in subjects with insulin resistance or type 2 diabetes. *Diabetes Care*, 27(1), 281-282.

Johnston, C. S., White, A. M. & Kent, S. M. (2009). Preliminary evidence that regular vinegar ingestion favorably influences hemoglobin A1c values in individuals with type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 84, 15-17.

Kabak, B. & Dobson, A. D. W. (2011). An traditional to the traditional fermented foods and beverages of Turkey. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 51(3), 248-260.

Kahraman, H. A., Tutun, H., Keyvan, E. & Balkan, B. M. (2022). Investigation of chemical, antibacterial and antiradical properties of home-made apple and grape vinegars. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, <https://doi.org/10.33988/auvfd.865309>

Kahraman-Ilıkan, Ö., Doğanlar, O., Doğanlar, Z. B., Altınoluk-Mimiroğlu, P. & Soykan-Kırbaş, A. (2017). Anticancer activity of the “Hardaliye” on HT-29 cell line and proliferative activity on CF-1 cell line: Apoptosis and Antioxidant pathway responsive gene expressions. *Integrative Molecular Medicine*, 4(3), 1-8.

Kałużna-Czaplińska, J., Gątarek, P., Chirumbolo, S., Chartrand, M. S. & Björklund, G. (2017). How important is tryptophan in human health? *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 72-88. <https://doi.org/10.1080/10408398.2017.1357534>

Karaçıl, M. Ş. & Tek-Acar, N. (2013). Dünyada üretilen fermente ürünler: Tarihsel süreç ve sağlık ile ilişkileri. *Journal of Agricultural Faculty of Uludağ University*, 27(2), 163-173.

Kaya, Z. (2017). Şarap üretimi ve kalite. *Aydın Gastronomy*, 1(2), 17-30.

Kurtulmuş, S. & Kök-Taş, T. (2015). Gıdalarda bulunan L-triptofan, serotonin, melatonin profilleri ve sağlık üzerine etkileri. *Türk Tarım-Gıda Bilim ve Teknoloji Dergisi*, 3(11), 877-885.

La China, S., De Vero, L., Anguluri, K., Brugnoli, M., Mamlouk, D. & Gullo, M. (2021). Kombucha tea as a reservoir of cellulose producing bacteria: Assessing diversity among *komagataeibacter* isolates. *Applied Sciences*, 11(4), <https://doi.org/10.3390/app11041595>

Laranjinha, J. A. N., Almeida, L. M. & Madeira, V. M. C. (1994). Reactivity of dietary ophenoliic acids with peroxy radicals: Antioxidant activity upon low density lipoprotein peroxidation. *Biochemical Pharmacology*, 48(3), 487-494.

Le Floc'h, N., Otten, W. & Merlot, E. (2011). Tryptophan metabolism, from nutrition to potential therapeutic applications. *Amino Acids*, 41, 1195-1205. doi: 10.1007/s00726-010-0752-7

Lee, M. K., Park, Y. B., Moon, S. S., Bok, S. H., Kim, D. J., Ha, T. Y., Jeong, T. S., Jeong, K. S. & Choi, M. S. (2007). Hypocholesterolemic and antioxidant properties of 3-(4-hydroxyl)propanoic acid derivatives in high-cholesterol fed rats. *Chemico-Biological Interactions*, 170, 9-19.

Levent, H. & Cavuldak, Ö. A. (2017). Geleneksel fermente bir içecek: Boza. *Akademik Gıda*, 15(3), 300-307.

Liu, Q., Qiu, Y. & Beta, T. (2010). Comparison of antioxidant activities of different colored wheat grains and analysis of phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 9235-9241.

Liu, Q., Tang, G. Y., Zhao, C. N., Gan, R. Y. & Li, H. B. (2019). Antioxidant activities, phenolic profiles, and organic acid contents of fruit vinegars. *Antioxidants*, 8(4), 78.

Loncar, E., Djuric, M., Malbasa, R., Kolarov, L. J. & Klasnja, M. (2006). Influence of working conditions upon kombucha conducted fermentation of black tea. *Food and Bioproducts Processing*, 84(3), 186-192.

Lovelace, M. D., Varney, B., Sundaram, G., Lennon, M. J., Kim, C. K., Jacobs, K., Guillemin, G. J., Brew, B. J. (2016). Recent evidence for an expanded role of the kynurenine pathway of tryptophan metabolism in neurological diseases. *Neuropharmacology*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuropharm.2016.03.024>

Machado de Oliveira Leite, A., Lemos Miguel, M. A., Peixoto Silva, R., Rosado Soares, A., Silva Trajano, J. & Paschoalin Flosi, V. M. (2013). Microbiological, technological and therapeutic properties of kefir: A natural probiotic beverage. *Brazilian Journal of Microbiology*, 44(2), 341-349.

Marjanovic, A., Dedibegovic, J., Brcaninovic, M., Omeragic, E., Caklovica, F., Dobraca, A. & Sober, M. (2015). Antioxidant potential of selected traditional plant-based beverages in Bosnia and Herzegovina. *Bulletin of the Chemists and Technologists of Bosnia and Herzegovina*, 45, 9-12.

Marsh, A.J., Hill, C., Ross, R. P., & Cotter, P. D. (2014). Fermented beverages with health-promoting potential: Past and future perspectives. *Trends in Food Science & Technology*, 38(2), 113-124.

Matysik-Wozniak, A., Turski, W. A., Turska, M., Paduch, R., Lancut, M., Piwowarczyk, P., Czuczwar, M. & Rejdak, R. (2021). Kynurenic acid accelerates healing

of corneal epithelium in vitro and in vivo. *Pharmaceuticals*, 14(8), 753. <https://doi.org/10.3390/ph14080753>

Mazraedoost, S. & Banaei, N. (2020). Biochemical composition properties of kombucha SCOBY: Mini reviews. *Advances in Applied Nano-Bio Technologies*, 1(4), 99-104.

Melhem, N. J. & Taleb, S. (2021). Tryptophan: from diet to cardiovascular diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(18), 9904.

Mithaiwala, M. N., Santana-Coelho, D., Porter, G. A. & O'Connor, J.C. (2021). Neuroinflammation and the kynurenine pathway in CNS disease: Molecular mechanisms and therapeutic implications. *Cells*, 10(6), 1548.

Moroni, F., Russi, P., Lombardi, G., Beni, M. & Carla, V. (1988). Presence of kynurenic acid in the mammalian brain. *Journal of Neurochemistry*, 51(1), 177-180.

Mousavi, S. M., Hashemi, S. A., Zarei, M., Gholami, A., Lai, C. W., Chiang, W. H., Omidifar, N., Bahrani, S. & Mazraedoost, S. (2020). Recent progress in chemical composition, production, and pharmaceutical effects of kombucha beverage: A complementary and alternative medicine. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, <https://doi.org/10.1155/2020/4397543>

Murakami, Y., Hoshi, M., Imamura, Y., Arioka, Y., Yamamoto, Y. & Saito, K. (2013). Remarkable role of indolamine 2,3-dioxygenase and tryptophan metabolites in macrophage-mediated inflammatory diseases. *Mediators of Inflammation*, <https://doi.org/10.1155/2013/391984>

Orlandi, I., Alberghina, L. & Vai, M. (2020). Nicotinamide, nicotinamide riboside and nicotinic acid-Emerging roles in replicative and chronological aging in yeast. *Biomolecules*, 10(4) 604, <https://doi.org/10.3390/biom10040604>

Özçelik, F., Erdem, M., Bolu, A. & Gülsün, M. (2013). Melatonin: Genel özellikleri ve psikiyatrik bozukluklardaki rolü. *Psikiyatride Güncel Yaklaşımlar-Current Approaches in Psychiatry*, 5(2), 179-203.

Özpınar, A. (2012). Kefir ve bozanın in vitro antioksidan aktivitelerinin araştırılması (Yüksek lisans tezi). Yıldız Teknik Üniversitesi/Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.

Öztepe-Yavaşçı, E. & Akkaya, C. (2012). Şizofrenide serotoninin rolü. *Psikiyatride Güncel Yaklaşımlar-Current Approaches in Psychiatry*, 4(2), 237-259.

Öztürk, İ., Çalışkan, Ö., Tornuk, F., Özcan, N., Yalçın, H., Başlar, M. & Sağdıç, O. (2015). Antioxidant, antimicrobial, mineral, volatile, physicochemical and microbiological characteristics of traditional home-made Turkish vinegars. *LWT-Food Science and Technology*, 1-8.

Öztürk, M. (2021). Determination of quality in homemade vinegars by spectroscopy and rheology methods. *Düzce University Journal of Science & Technology*, 9(2021), 1493-1506.

Öztürk, M. E. & Yabancı-Ayhan, N. (2020). Triptofan ve sağlık. *Geleneksel ve Tamamlayıcı Tıp Dergisi*, 3(3), 406-414.

Öztürk, S. (2015). Kara havuçtan sirke üretimi üzerine araştırma (Yüksek lisans tezi). Ankara Üniversitesi/Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.

Palamutoğlu-İnce, M. & Baş, M. (2020). Traditional fermented foods of Turkey. *Journal of Health Sciences and Research*, 2(3), 200-220.

Pamir, M. H. (1985). *Fermantasyon Mikrobiyolojisi*. Ankara.

Pehlivanoğlu, H., Gündüz, H. H., Özülkü, G. & Demirci, M. (2015). An investigation of antimicrobial activity of wheat grass juice, barley grass juice, hardaliye and boza. *International Interdisciplinary Journal of Scientific Research*, 2(1), 8-14.

Peters, J. C. (1991). Tryptophan nutrition and metabolism: An overview. New York.

Petsiou, E. I., Mitrou, P. I., Raptis, S. A. & Dimitriadis, G. D. (2014). Effect and mechanisms of action of vinegar on glucose metabolism, lipid profile, and body weight. *Nutrition in Clinical Care*, 72(10), 651-661.

Pfefferkorn, E. R. (1984). Interferon γ blocks the growth of *Toxoplasma gondii* in human fibroblasts by inducing the host cells to degrade tryptophan. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 81, 908-912.

Polat-Sarı, S. (2021). Hardaliye tüketiminin bağırsak mikrobiyota modülasyonuna etkinliği (Doktora tezi). İstanbul Aydın Üniversitesi/Lisanüstü Eğitim Enstitüsü, İstanbul.

Ramprasath, T., Han, Y. M., Zhang, D., Yu C. J. & Zou, M. H. (2021). Tryptophan catabolism and inflammation: A novel therapeutic target for aortic diseases. *Frontiers in Immunology*, 12, 731701.

Reddy, G., Altaf, Md., Naveena, B. J., Venkateshwar, M. & Kumar, E. V. (2008). Amylolytic bacterial lactic acid fermentation-A review. *Biotechnology Advances*, 26, 22-34.

Richard, M.D., Dawes, M.A., Mathias, C.W., Acheson, A., Hill-Kapturczak, N. & Dougherty, D.M. (2009). L-Tryptophan: Basic metabolic functions, behavioral research and therapeutic indications. *International Journal of Tryptophan Research*, 2, 45-60.

Sağlam, E., Yarış, E. & Bilge, S. S. (2003). Serotonin ve gastrointestinal sistem. *Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Dergisi*, 20(4), 217-223.

Sambeth, A., Blokland, A., Harmer, C. J., Kilkens, T. O. C., Nathan, P. J., Porter, R. J., Schmitt, J. A. J., Scholtissen, B., Sjacko, S., Young, A. H. & Riedel, W. J. (2007). Sex differences in the effect of acute tryptophan depletion on declarative episodic memory: A pooled analysis of nine studies. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 31, 516-529.

Schefold, J. C., Zeden, J. P., Fotopoulou, C., Von Haehling, S., Pschowski, R., Hasper, D., Hans-Dieter, V., Schuett, C. & Reinke, P. (2009). Increased indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) activity and elevated serum levels of tryptophan catabolites in patients with chronic kidney diseases: A possible link between chronic inflammation and uraemic symptoms. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 24, 1901-1908.

Schroecksnadel, K., Kaser, S., Ledochowski, M., Neutrauer, G., Mur, E., Herold, M. & Fuchs, D. (2003). Increased degradation of tryptophan in blood of patients with rheumatoid arthritis. *The Journal of Rheumatology*, 30(9), 1935-1939.

Schröcksnadel, K., Wirleitner, B., Winkler, C. & Fuchs, D. (2006). Monitoring tryptophan metabolism in chronic immune activation. *Clinica Chimica Acta*, 364, 82-90.

Singleton, V. L., Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture* 16, 144-158.

Song, P., Ramprasath, T., Wang H. & Zou, M. H. (2017). Abnormal kynurenine pathway of tryptophan catabolism in cardiovascular diseases. *Cellular and Molecular Life Science*, 74, 2899-2916.

Songür, A. N., Çakıroğlu, F. P. & Haklı, G. (2016). From traditional to functionality: Boza. *The Journal of Academic Social Science*, 4(35), 492-500.

Sporty, J., Lin, S. J., Kato, M., Ognibene, T., Stewart, B., Turteltaub, K. & Bench, G. (2009). Quantitation of NAD⁺ biosynthesis from the salvage pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 26, 363-369.

Stadler, C., Zepf, F. D., Demisch, L., Schmitt, M. Landgraf, M. & Poustka, F. (2008). Influence of rapid tryptophan depletion on laboratory-provoked aggression in children with ADHD. *Neuropsychobiology*, 56, 104-110.

Stewart, G. G. (2014). *Saccharomyces/ Saccharomyce cerevisiae*. *Encyclopedia of Food Microbiology (Second Edition)*, 3, 309-315.

Stone, T. W. & Perkins, M. N. (1981). Quinolinic acid: A potent endogenous at amino acid receptors in CNS. *European Journal of Pharmacology*, 72, 411-412.

Suyuçok, A., Ekiz, T. & Başıyigit-Kılıç, G. (2016). Ekzopolisakkaritlerin özellikleri ve gıda sanayindeki önemi. *Nevşehir Bilim ve Teknoloji Dergisi*, 332-344.

Suzuki, Y., Suda, T., Furuhashi, K., Suzuki, M., Fujie, M., Hahimoto, D., Nakamura, Y., Naoki, I., Nakamura, H. & Chida, K. (2010). Increased serum kynurenine/tryptophan ratio correlates with disease progression in lung cancer. *Lung Cancer*, 67, 361-365.

Şanlıer, N., Başar-Gökçen, B. & Ceyhan-Sezgin, A. (2017). Health benefits of fermented foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 59(3), 506-527.

Şengün, İ. Y. & Kılıç, G. (2019). Farklı sirke çeşitlerinin mikroflorası, biyoaktif bileşenleri ve sağlık üzerine etkileri. *Akademik Gıda*, 17(1), 89-101.

Tabbers, M. M., Chmielewska, A., Roseboom, M. G., Crastes, N., Perrin, C., Reitsma, J. B., Norbruis, O., Szajewska, H. & Benninga, M. A. (2011). Fermented milk containing *Bifidobacterium lactis* DN-173 010 in childhood constipation: A randomized, double-blind, controlled trial. *Pediatrics*, 126(6), 1392-1399.

Tamer, C. E., Temel, S. G., Suna, S., Özkan-Karabacak, A., Özcan, T., Yılmaz-Ersan, L., Türkol-Kaya, B. & Çopur, Ö. U. (2021). Evaluation of bioaccessibility and functional properties of kombucha beverages fortified with different medicinal plant extracts. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 45, 13-32.

Tangüler, H. (2014). Traditional Turkish fermented cereal based products: Tarhana, boza and Chickpea bread. *Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology*, 2(3), 144-149.

Tangüler, H., Mert, H., İlman, F., Yücel, B. & Gençtürk, S. (2021). Elma atıklarından elma sirkesi üretimi üzerine bir araştırma. *Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 10(1), 132-139.

Taşkıran, M. (2019). Serotonin ve epilepside rolü. *Sağlık Bilimleri Dergisi*, 28, 182-187.

Taylor, M. W. & Feng, G. (1991). Relationship between interferon- γ , indoleamine 2,3-dioxygenase, and tryptophan catabolism. *The FASEB Journal*, 5, 2516-2522.

Todorov, S. D., Botes, M., Guigas, C., Schilinger, U., Wiid, I., Wachsmann, M. B., Holzapfel, W. H. & Dicks, L. M. T. (2008). Boza, a naturel source of probiotic lactic acid bacteria. *Journal of Applied Microbiology*, 104, 465-477.

Török, N., Tanaka, M. & Vecsei, L. (2020). Searching for periperal biomarkers in neurodegenerative diseases: The tryptophan-kynurenine metabolic pathway. *International Journal of Molecular Science*, 21, 9338, <http://dx.doi.org/10.3390/ijms21249338>

Trakya Kalkınma Ajansı Kırklareli Yatırım Destek Ofisi. (2014). Hardaliye üretimin mevcut durumunu değerlendirme raporu, <https://docplayer.biz.tr/3391436-Hardaliye-uretimin-mevcut-durumunu-degerlendirme-raporu.html>

TS 9778 Boza Standardı

Turska, M., Pelak, J., Turski, M. P., Kocki, T., Dukowski, P., Plech, T. & Turski, W. (2018). Fate and distribution of kynurenic acid administered as beverage. *Pharmacological Reports*, 70, 1089-1096.

Turska, M., Rutyna, R., Paluszkiewicz, M., Terlecka, P., Dobrowolski, A., Pelak, J., Turski, M. P., Muszynska, B., Dobrowski, W., Kocki, T. & Plech, T. (2019). Presence of kynurenic acid in alcoholic beverages—Is this good news, or bad news? *Medical Hypotheses*, 122, 200-205.

Turski, M. P., Kaminski, P., Zgrajka, W., Turska, M. & Turski, W. A. (2012). Potato - An important source of nutritional kynurenic acid. *Plant Foods for Human Nutrition*, 67, 17-23.

Turski, M. P., Turska, M., Zgrajka, W., Kuc, D. & Turski, W. A. (2009). Presence of kynurenic acid in food and honeybee products. *Amino Acids*, 36, 75-80.

Tryptophan. (2012, Şubat) Wikipedia, *The Free Encyclopedia* içinde. Kasım 2021 tarihinde <https://en.wikipedia.org/wiki/Tryptophan> adresinden erişildi.

Ünüvar, S. (2012). Kan donörlerinde olası immün değişikliklerin pteridin yolağı ile ilişkili parametrelerle değerlendirilmesi (Doktora tezi). Hacettepe Üniversitesi/Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.

Van der Goot, A. T. & Nollen, E. A. A. (2013). Tryptophan metabolism: Entering the field of aging and age-related pathologies. *Trends in Molecular Medicine*, 19(6), 336-344.

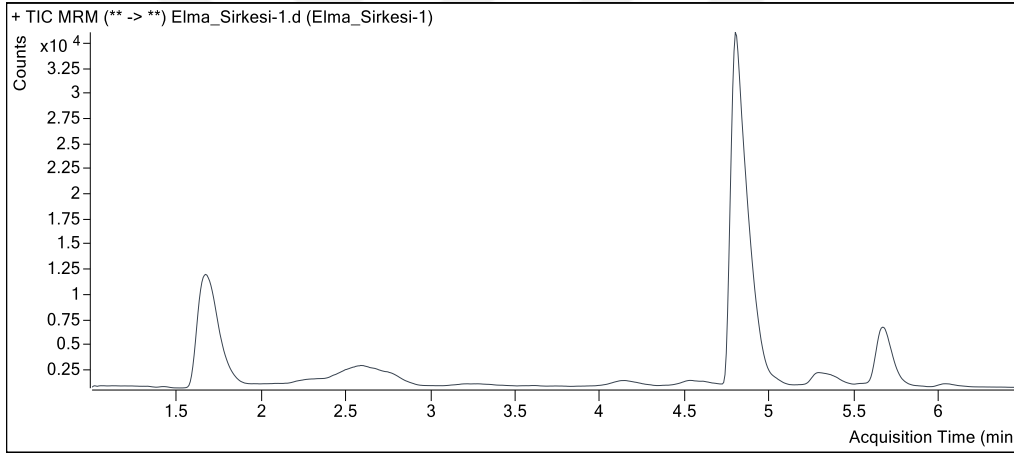
- Villarreal-Soto, S. A., Beaufort, S., Bouajila, J., Souchard, J. P. & Taillandier, P. (2018). Understanding kombucha tea fermentation: A review. *Journal of Food Science*, 83(3), 580-588.
- Vitalini, S., Dei Cas, M., Rubino, F. M., Vigentini, I., Foschino, R., Iriti, M. & Paroni, R. (2020). LC-MS/MS-based profiling of the tryptophan - related metabolites in healthy plant foods. *Molecules*, 25,311.
- Wang, C. Y., Wu, S. J. & Shyu, Y. T. (2014). Antioxidant properties of certain cereals as affected by food-grade bacteria fermentation. *Journal of Bioengineering*, 117(4), 449-456.
- Widner, B., Laich, A., Sperner-Unterwieser, B., Ledochowski, M. & Fuchs, D. (2002). Neopterin production, tryptophan degradation, and mental depression-What is the link? *Brain, Behavior, and Immunity*, 16, 590-595.
- Yamashita, H., Fujisawa, K., Ito, E., Idei, S., Kawaguchi, N., Kimoto, M., Hiemori, m. & Tsuji, H. (2007). Improvement of obesity and glucose tolerance by acetate in type 2 diabetic Otsuka long-evans tokushima fatty (OLETF) rats. *Bioscience, Biotechnology, Biochemistry*, 71(5), 1236-1243.
- Yılmaz, C. & Gökmen, V. (2018). Determination of tryptophan derivatives in kynurenine pathway in fermented foods using liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Food Chemistry*, 243, 420-427.
- Yılmaz, C. & Gökmen, V. (2019). Neuroactive compounds in foods: Occurrence, mechanism and potential health effects. *Food Research International*, <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108744>
- Yılmaz, C., Özdemir, F. & Gökmen, V. (2020). Investigation of free amino acids, bioactive and neuroactive compounds in different types of tea and effect of black tea processing. *LWT-Food Science and Technology*, 117, 108655.
- Young S.N. (1996) Behavioral effects of dietary neurotransmitter precursors: Basic and clinical aspects. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 20, 313-323.
- Young, V. R. & El-Khoury, A. (1996). Human amino acid requirements: A re-evaluation. *Food and Nutrition Bulletin*, 17(3), 1-15.
- Yücel, U. & Köse, E. (2002). İzmir’de üretilen bozaların kimyasal bileşimi üzerine bir araştırma. *Gıda*, 27(5), 395-398.
- Yücel-Şengün, İ. & Kılıç, G. (2016). Isolation, identification and current taxonomy of acetic acid bacteria. *Biological Diversity and Conservation*, 9(1), 154-162.

EKLER

EK-1: Elma sirkesinde LC-MS/MS ile belirlenen triptofan ve metabolitleri (1. ölçüm)

Analysis Info			
Acq Time	2021-06-24 19:32	Data File	Elma_Sirkesi-1.d
Sample Type	Sample	Sample Name	Elma_Sirkesi-1
Dilution	10	Acq Method	Tryptophan_Metabolites.m
Position	Vial 6	Sample Info	
Inj Vol	5,00	Comment	

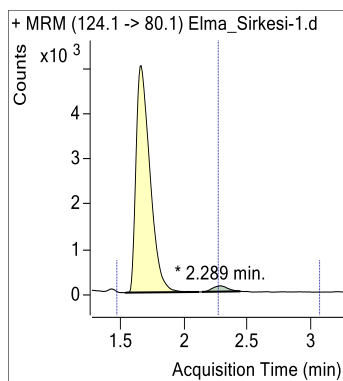
Sample Chromatogram



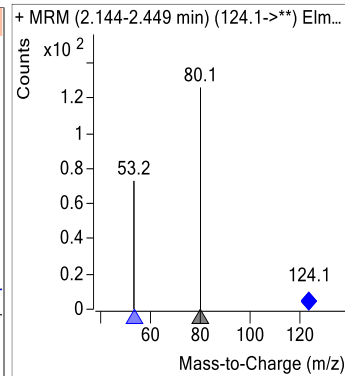
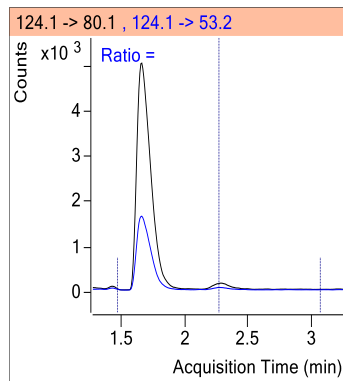
Quantitation Results				
Compound	RT	Response	Final Conc	
Nicotinic Acid	2,289	1085	4,8835	ng/ml
3-OH-Kynurenine	2,421	0	nd	ng/ml
Nicotin Amid	2,809	1565	3,2062	ng/ml
Kynurenine	4,261	0	nd	ng/ml
L-Tryptophan	4,827	1188	20,6772	ng/ml
Kynurenic Acid	4,904	2416	9,8503	ng/ml

Compound Graphics

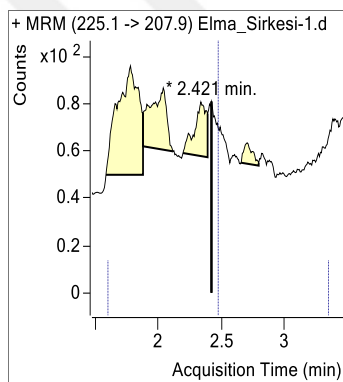
Target Compound



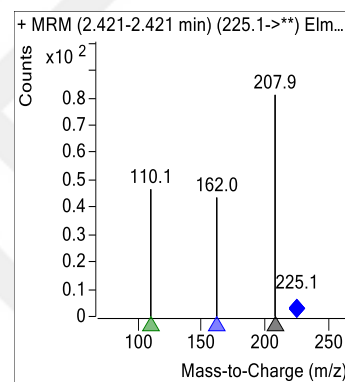
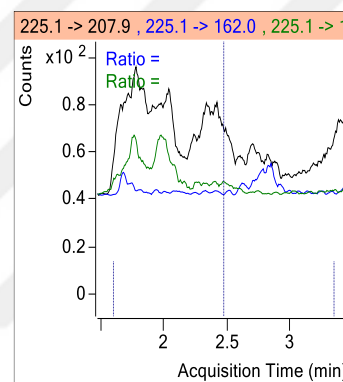
Nicotinic Acid



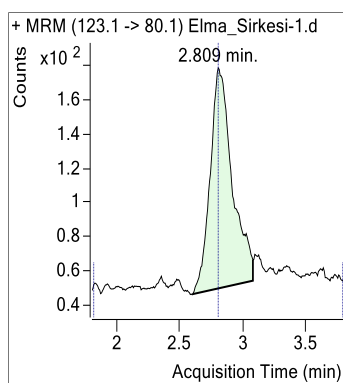
Target Compound



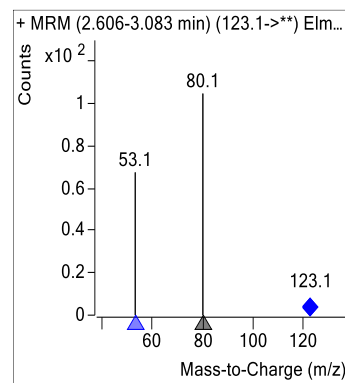
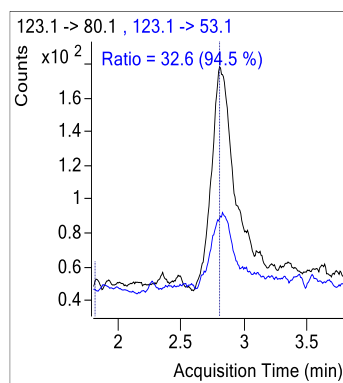
3-OH-Kynurenine



Target Compound

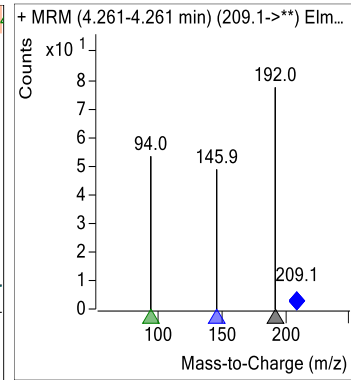
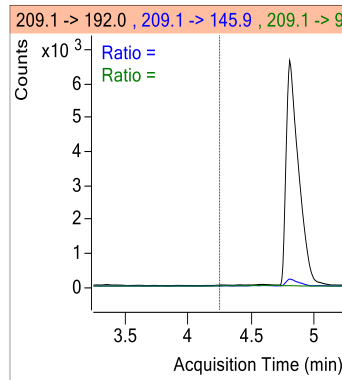
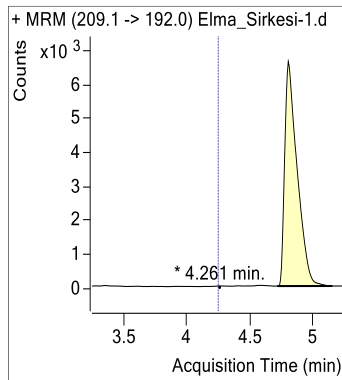


Nicotin Amid



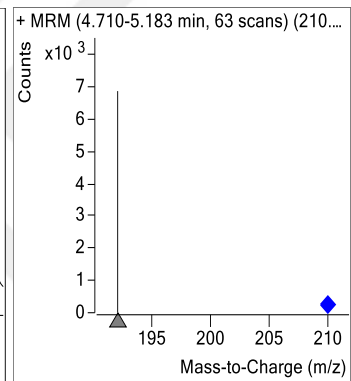
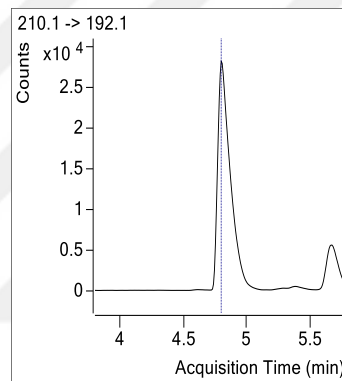
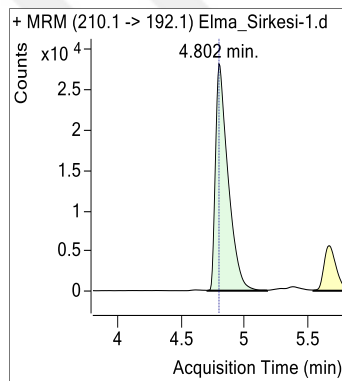
Target Compound

Kynurenine



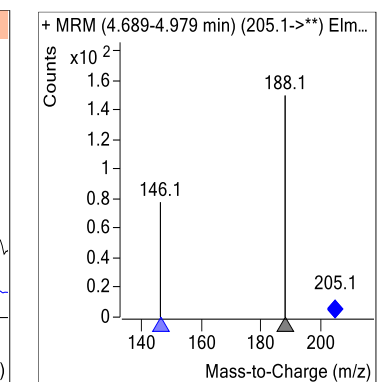
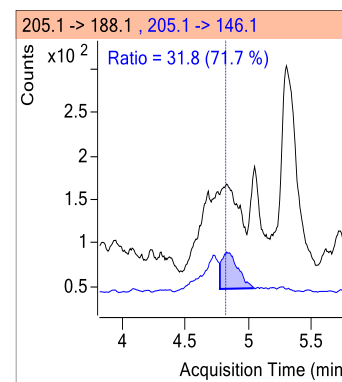
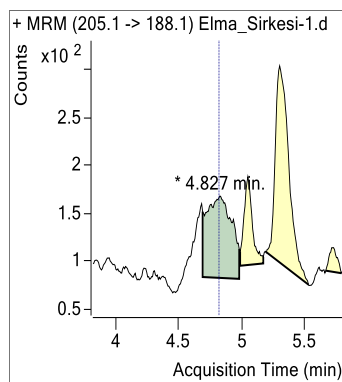
ISTD Compound

L-Tryptophan



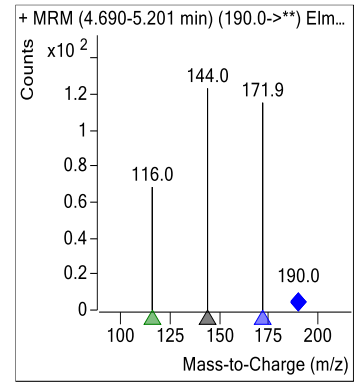
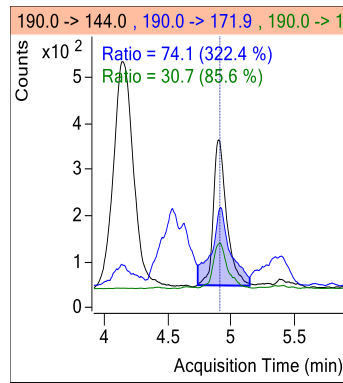
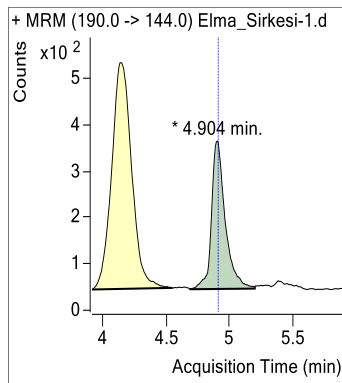
Target Compound

L-Tryptophan



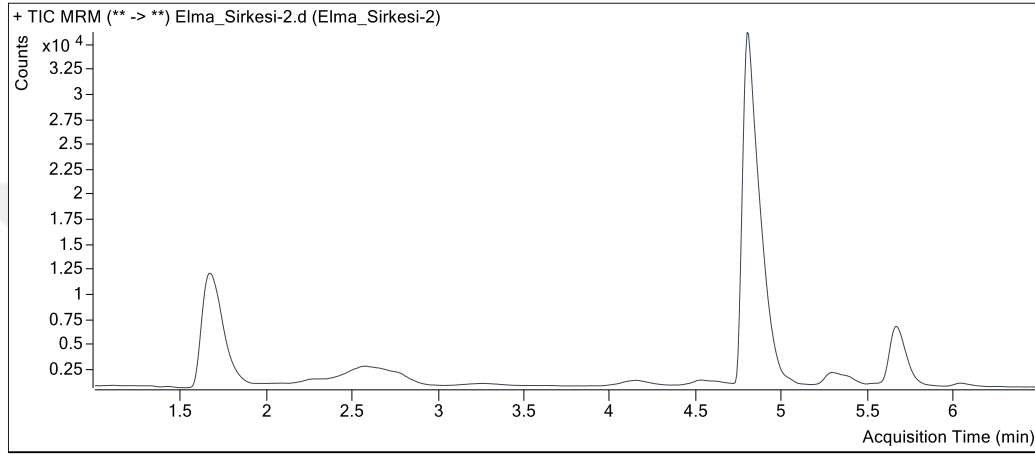
Target Compound

**Kynurenic
Acid**

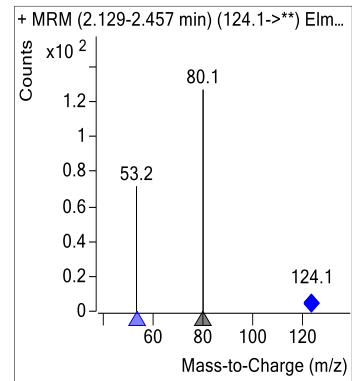
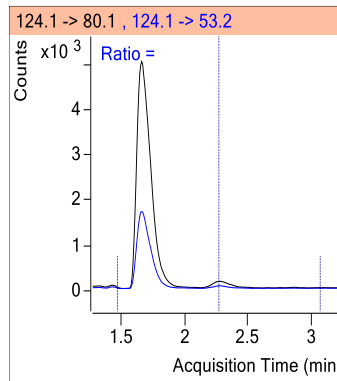
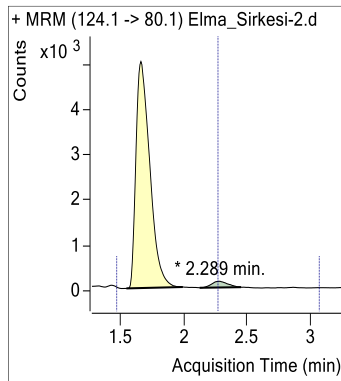


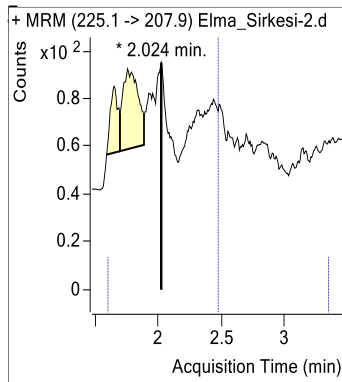
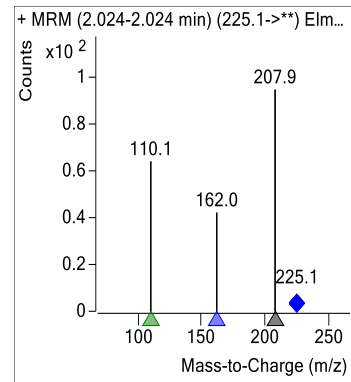
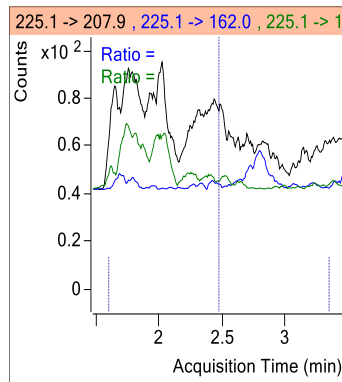
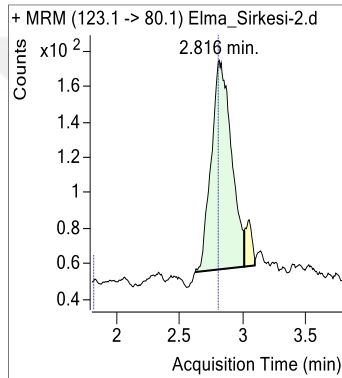
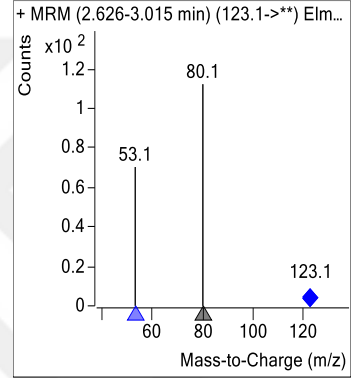
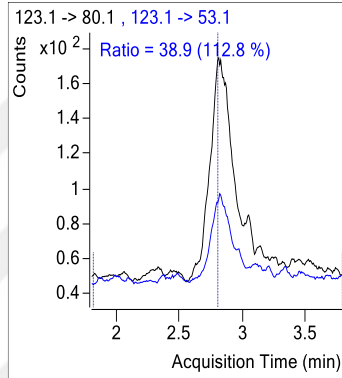
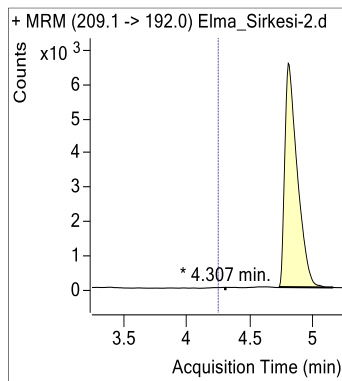
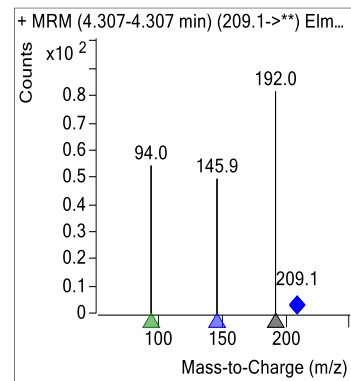
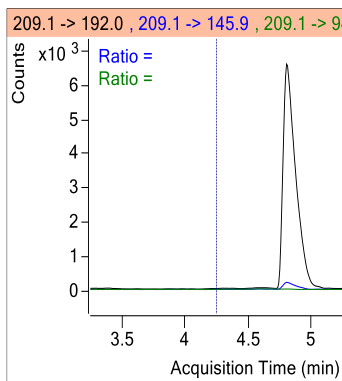
EK-2: Elma sirkesinde LC-MS/MS ile belirlenen triptofan ve metabolitleri (2. ölçüm)

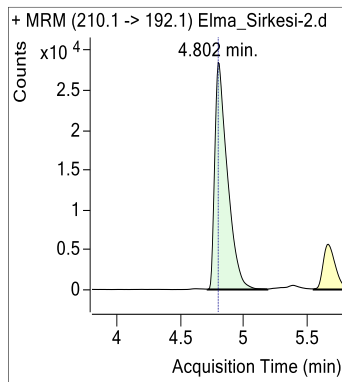
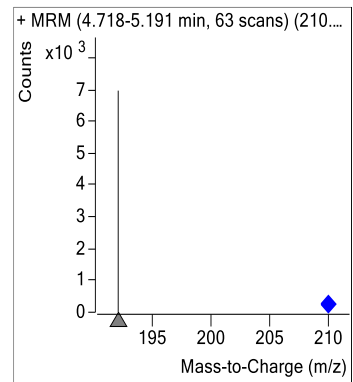
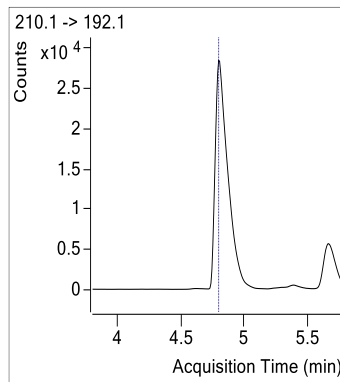
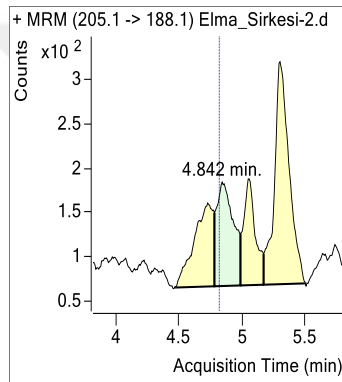
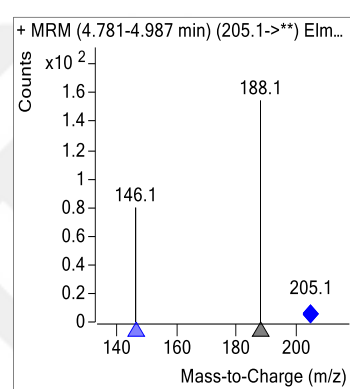
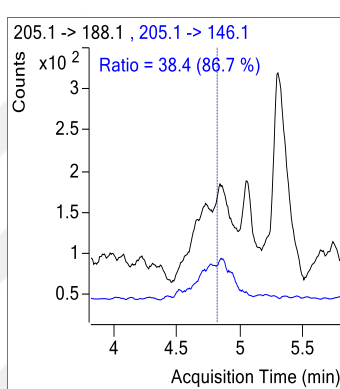
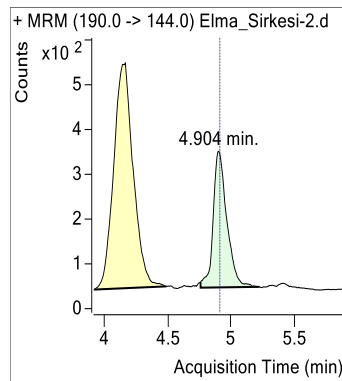
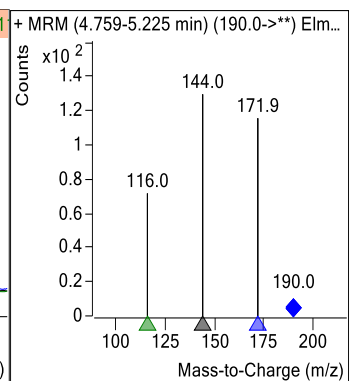
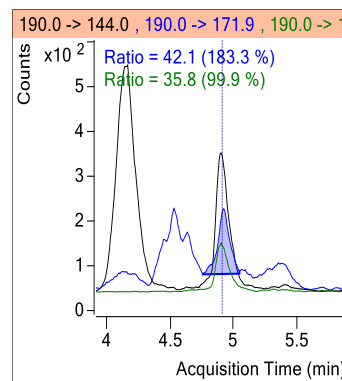
Analysis Info			
Acq Time	2021-06-24 19:45	Data File	Elma_Sirkesi-2.d
Sample Type	Sample	Sample Name	Elma_Sirkesi-2
Dilution	10	Acq Method	Tryptophan_Metabolites.m
Position	Vial 6	Sample Info	
Inj Vol	5,00	Comment	

Sample Chromatogram

Quantitation Results				
Compound	RT	Response	Final Conc	
Nicotinic Acid	2,289	1213	5,4594	ng/ml
3-OH-Kynurenine	2,024	0	Nd	ng/ml
Nicotin Amid	2,816	1310	2,6851	ng/ml
Kynurenine	4,307	0	Nd	ng/ml
L-Tryptophan	4,842	1089	18,7072	ng/ml
Kynurenic Acid	4,904	2274	9,2712	ng/ml

Compound Graphics**Target Compound****Nicotinic Acid**

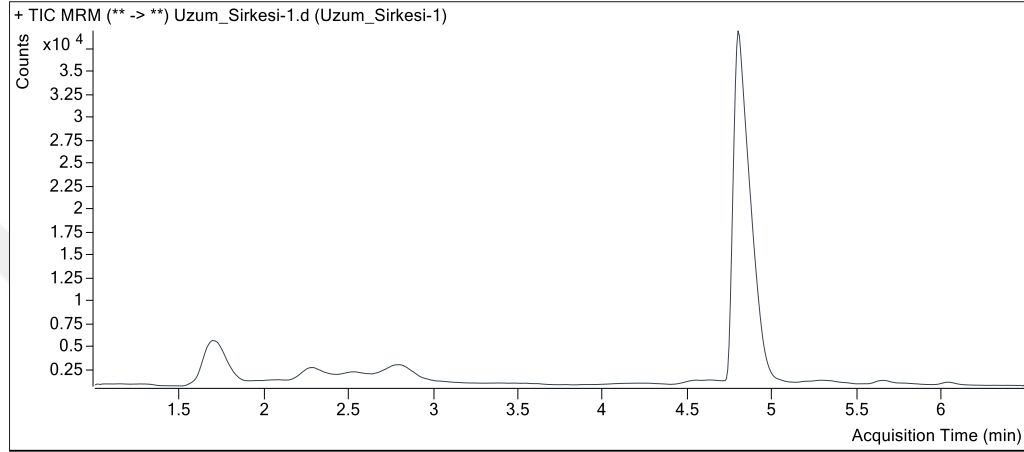
Target Compound**3-OH-Kynurenine****Target Compound****Nicotin Amid****Target Compod****Kynurenine**

ISTD Compound**L-Tryptophan IS****Target Compound****L-Tryptophan****Target Compound****Kynurenic Acid**

EK-3: Üzüm sirkesinde LC-MS/MS ile belirlenen triptofan ve metabolitleri (1. ölçüm)

Analysis Info			
Acq Time	2021-06-24 20:25	Data File	Uzum_Sirkesi-1.d
Sample Type	Sample	Sample Name	Uzum_Sirkesi-1
Dilution	10	Acq Method	Tryptophan_Metabolites.m
Position	Vial 8	Sample Info	
Inj Vol	5,00	Comment	

Sample Chromatogram

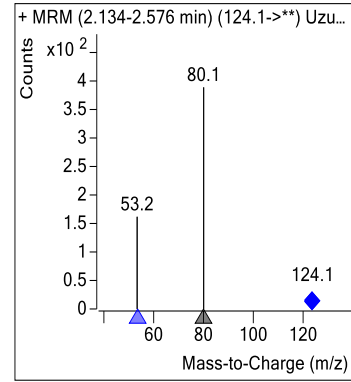
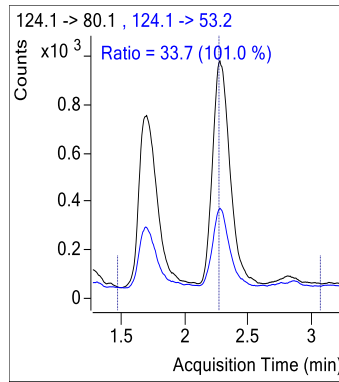
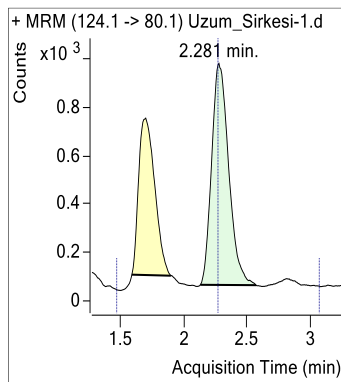


Quantitation Results				
Compound	RT	Response	Final Conc	
Nicotinic Acid	2,281	8583	38,6443	ng/ml
3-OH-Kynurenine	2,337	0	nd	ng/ml
Nicotin Amid	2,824	14208	29,1114	ng/ml
Kynurenine	4,246	0	nd	ng/ml
L-Tryptophan	4,819	4027	65,3994	ng/ml
Kynurenic Acid	4,889	3238	13,2019	ng/ml

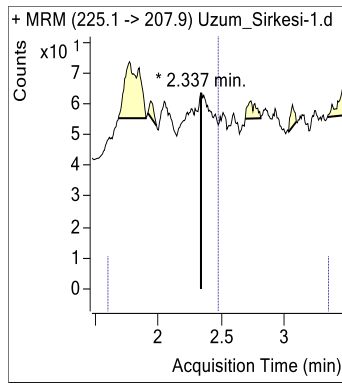
Compound Graphics

Target Compound

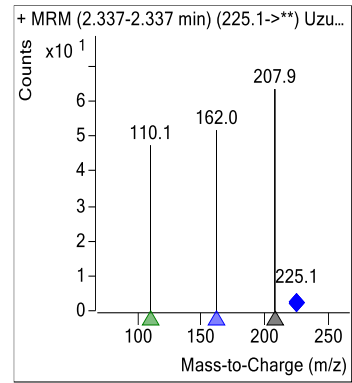
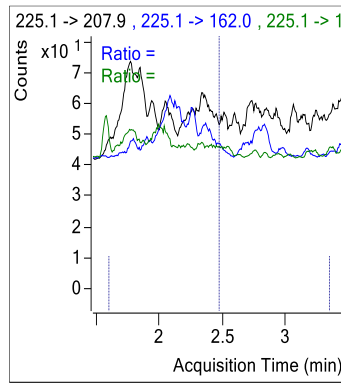
Nicotinic Acid



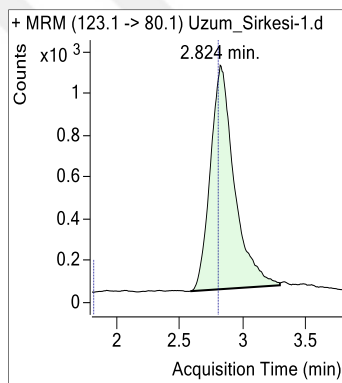
Target Compound



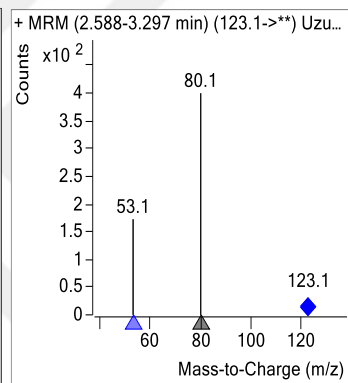
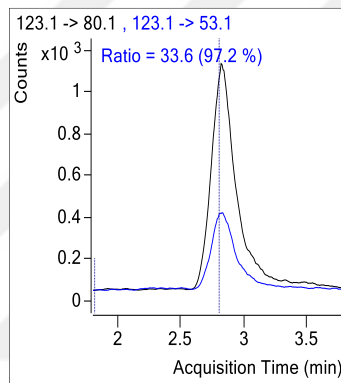
3-OH-Kynurenine



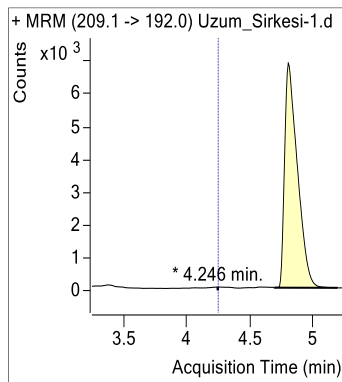
Target Compound



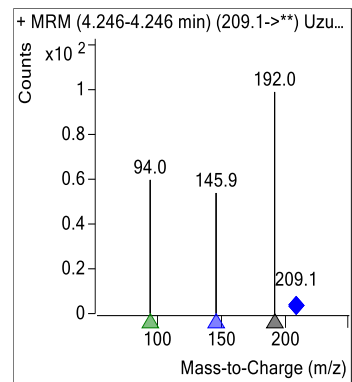
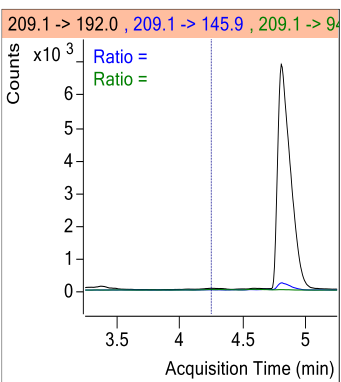
Nicotin Amid

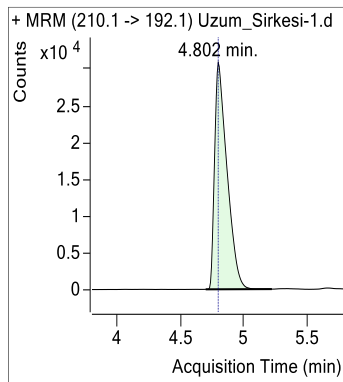
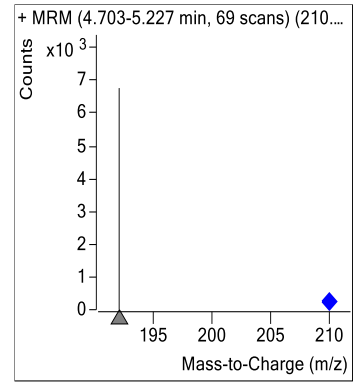
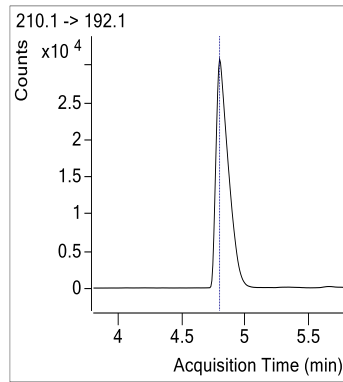
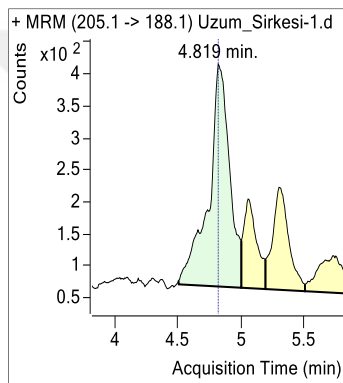
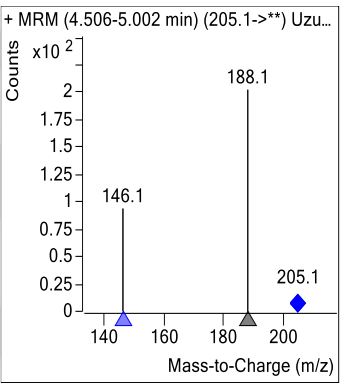
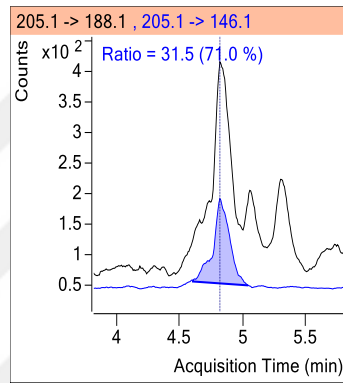
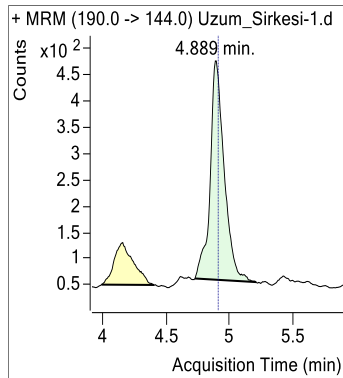
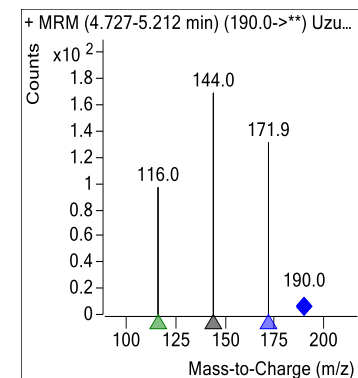
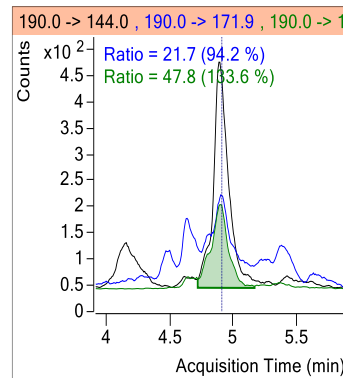


Target Compound



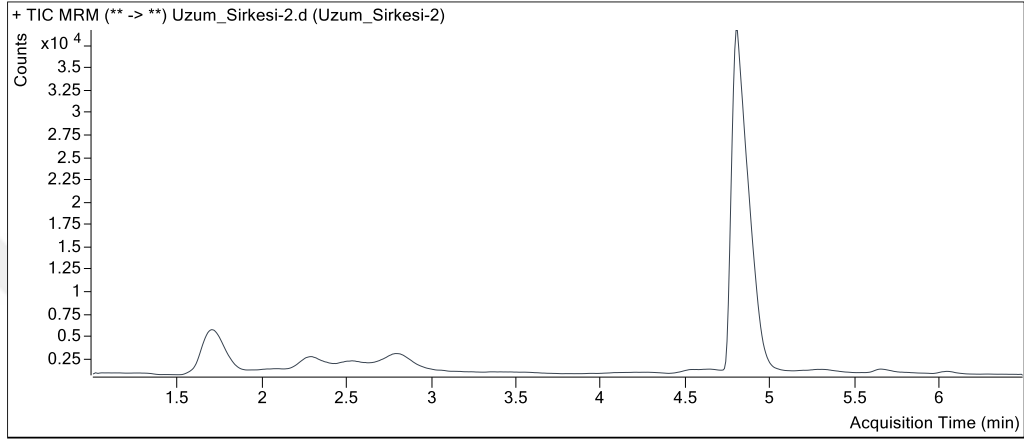
Kynurenine



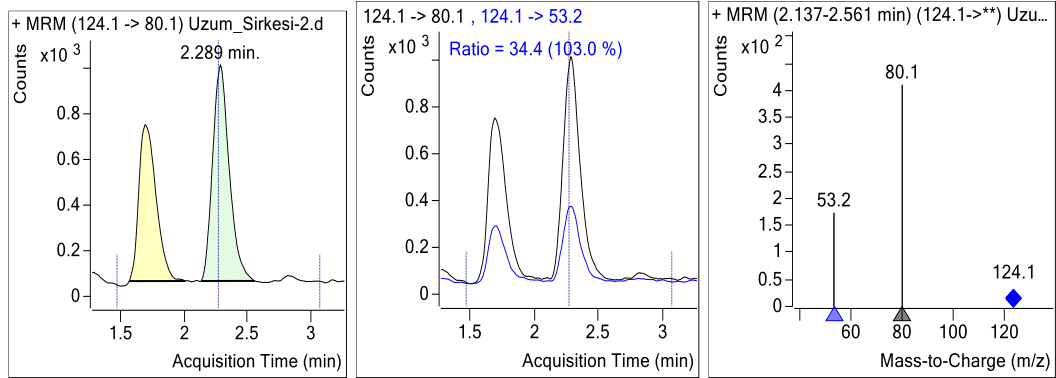
ISTD Compound**L-Tryptophan IS****Target Compound****L-Tryptophan****Target Compound****Kynurenic Acid**

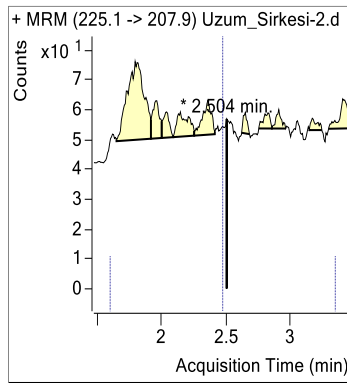
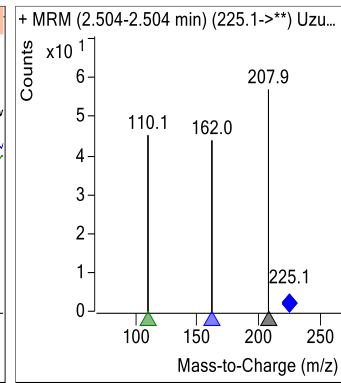
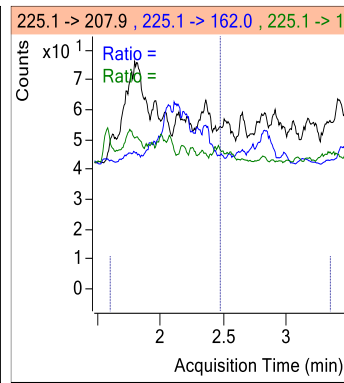
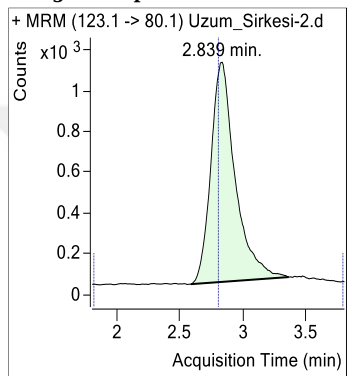
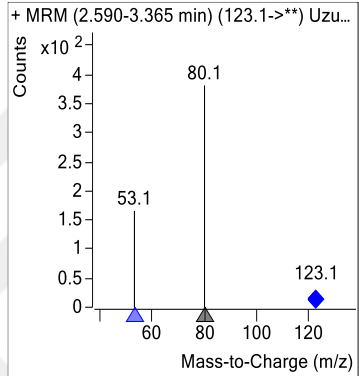
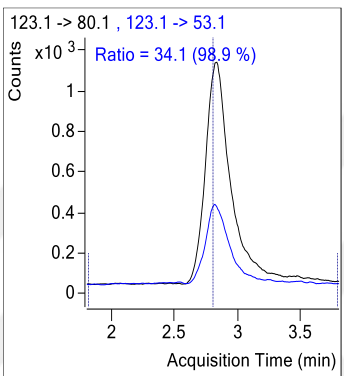
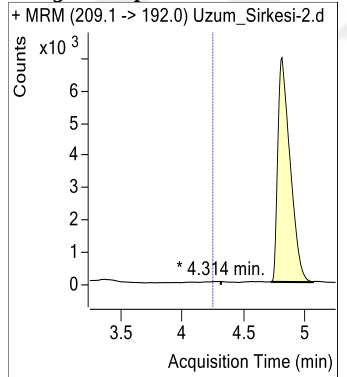
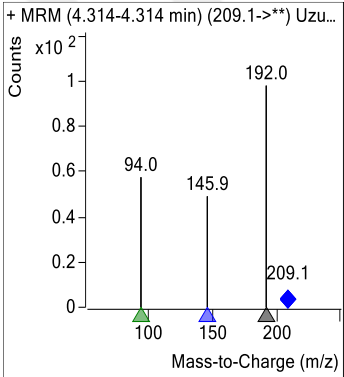
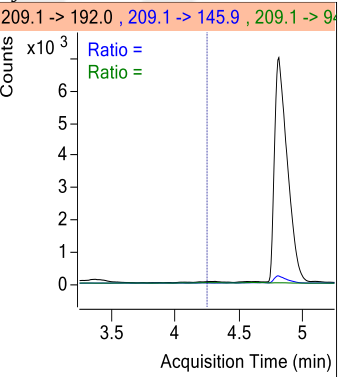
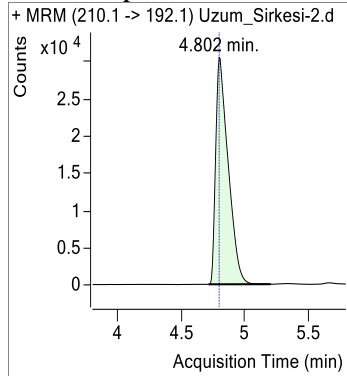
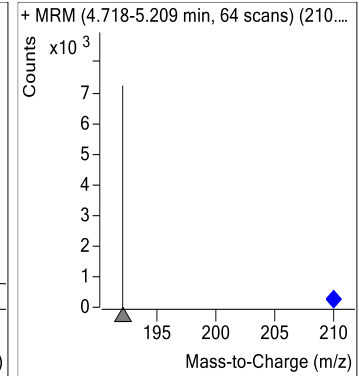
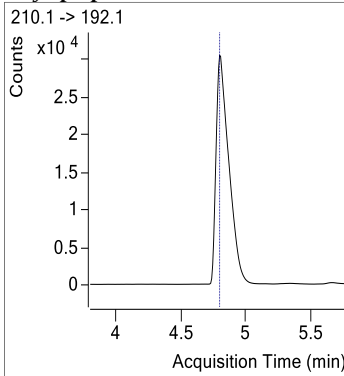
EK-4: Üzüm sirkesinde LC-MS/MS ile belirlenen triptofan ve metabolitleri (2. ölçüm)

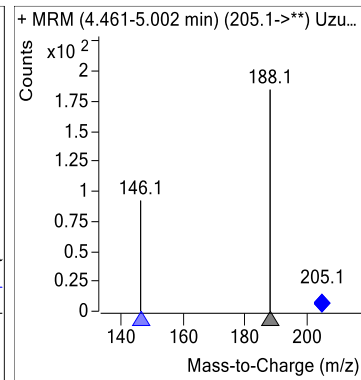
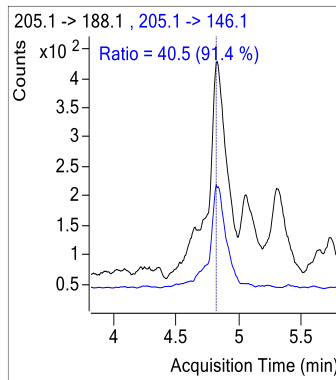
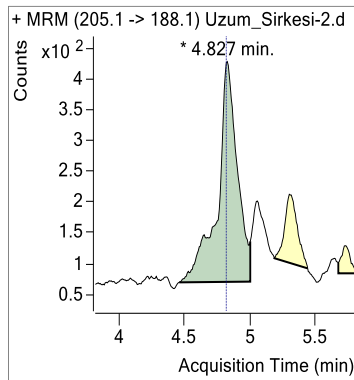
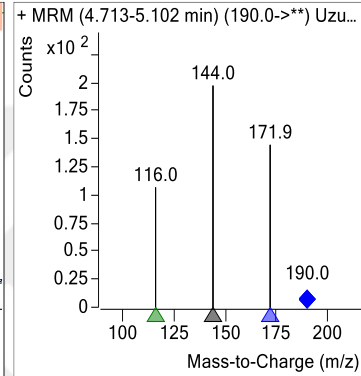
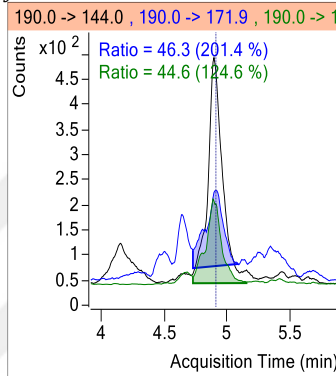
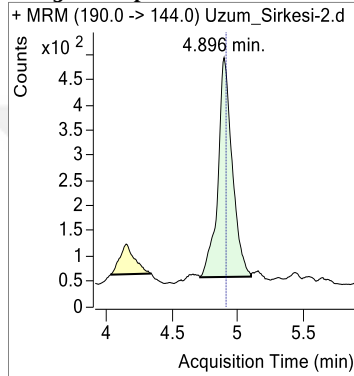
Analysis Info			
Acq Time	2021-06-24 20:38	Data File	Uzum_Sirkesi-2.d
Sample Type	Sample	Sample Name	Uzum_Sirkesi-2
Dilution	10	Acq Method	Tryptophan_Metabolites.m
Position	Vial 8	Sample Info	
Inj Vol	5,00	Comment	

Sample Chromatogram

Quantitation Results				
Compound	RT	Response	Final Conc	
Nicotinic Acid	2,289	8678	39,0750	ng/ml
3-OH-Kynurenine	2,504	0	nd	ng/ml
Nicotin Amid	2,839	14475	29,6587	ng/ml
Kynurenine	4,314	0	nd	ng/ml
L-Tryptophan	4,827	3766	61,6563	ng/ml
Kynurenic Acid	4,896	3297	13,4433	ng/ml

Compound Graphics**Target Compound****Nicotinic Acid**

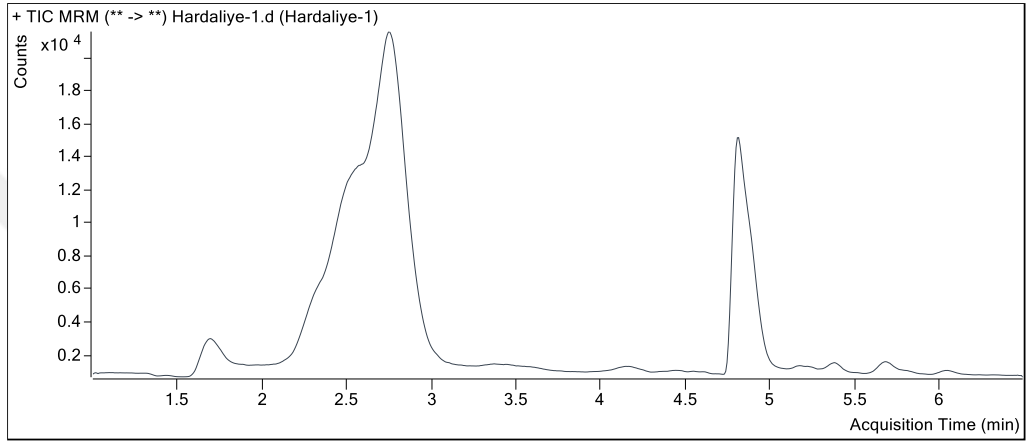
Target Compound**3-OH-Kynurenine****Target Compound****Nicotin Amid****Target Compound****Kynurenine****ISTD Compound****L-Tryptophan IS**

Target Compound**L-Tryptophan****Target Compound****Kynurenic Acid**

EK-5: Hardaliyede (Edirne) LC-MS/MS ile belirlenen triptofan ve metabolitleri (1.ölçüm)

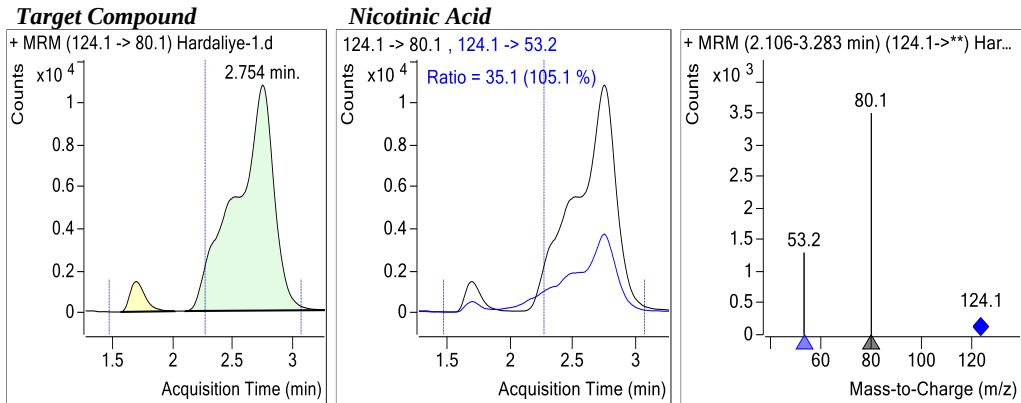
Analysis Info			
Acq Time	2021-06-24 19:58	Data File	E Hardaliye-1.d
Sample Type	Sample	Sample Name	E Hardaliye-1
Dilution	10	Acq Method	Tryptophan_Metabolites.m
Position	Vial 7	Sample Info	
Inj Vol	5,00	Comment	

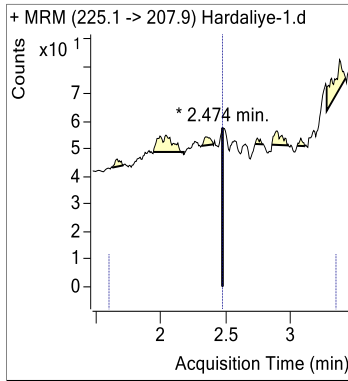
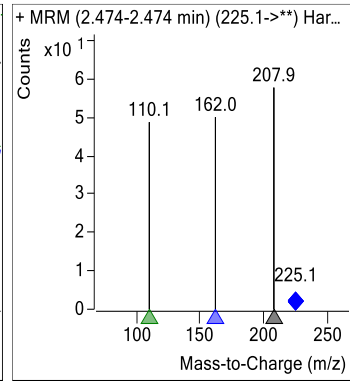
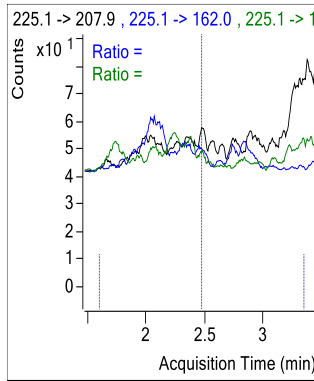
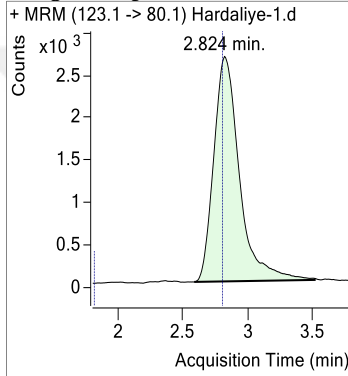
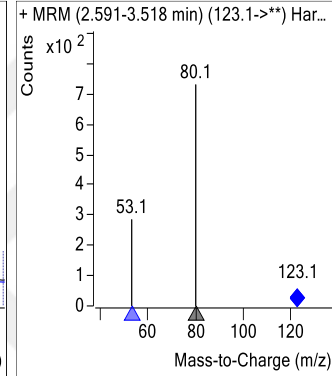
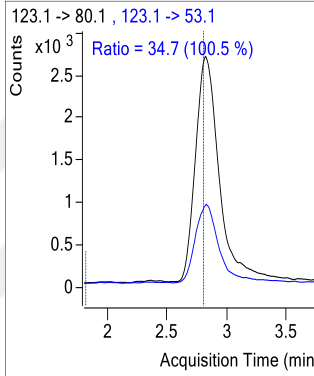
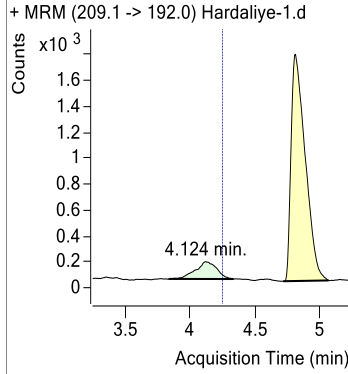
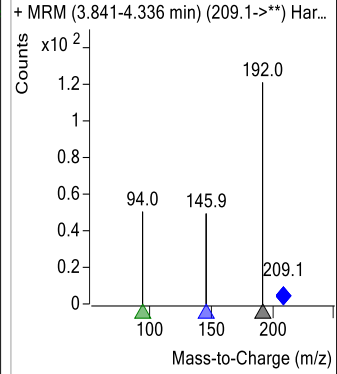
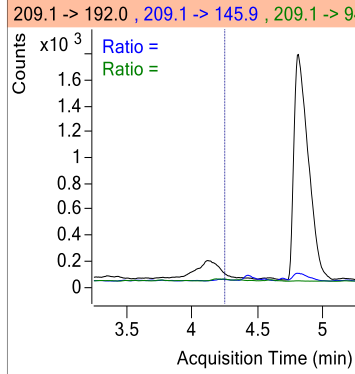
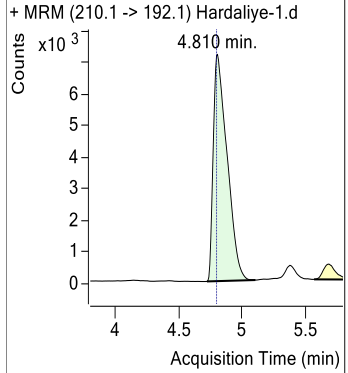
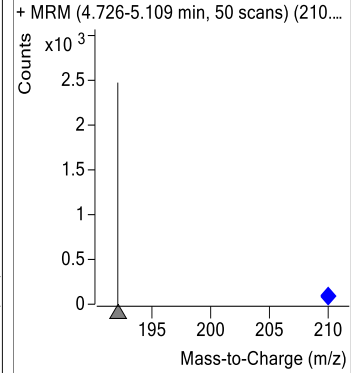
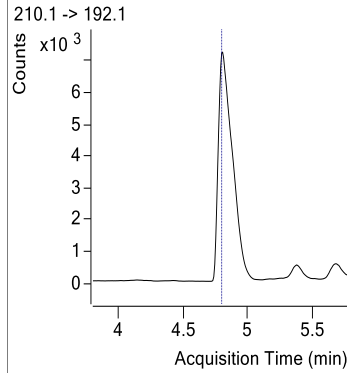
Sample Chromatogram

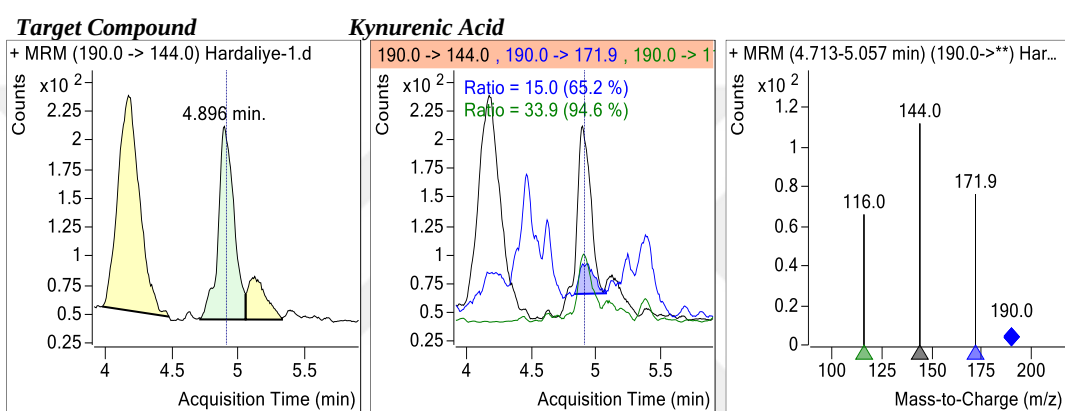
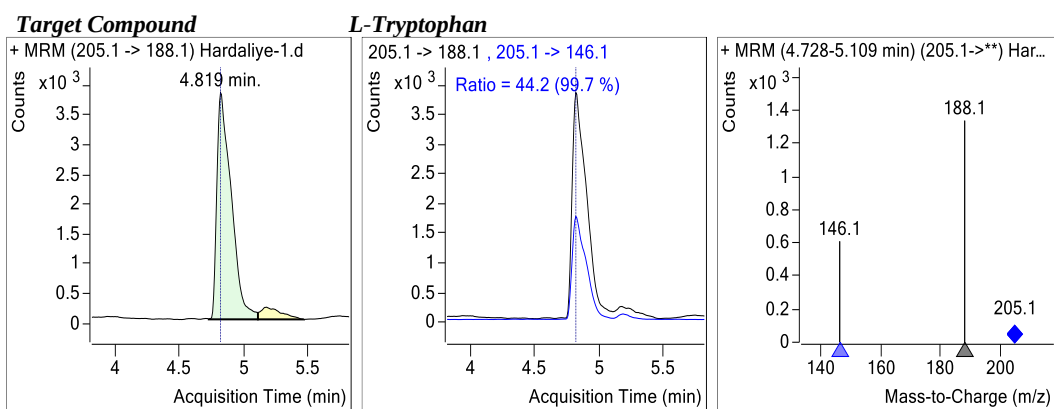


Quantitation Results				
Compound	RT	Response	Final Conc	
Nicotinic Acid	2,754	240988	1085,0616	ng/ml
3-OH-Kynurenine	2,474	0	nd	ng/ml
Nicotin Amid	2,824	36371	74,5247	ng/ml
Kynurenine	4,124	1521	16,0996	ng/ml
L-Tryptophan	4,819	29787	1857,6685	ng/ml
Kynurenic Acid	4,896	1383	5,6401	ng/ml

Compound Graphics



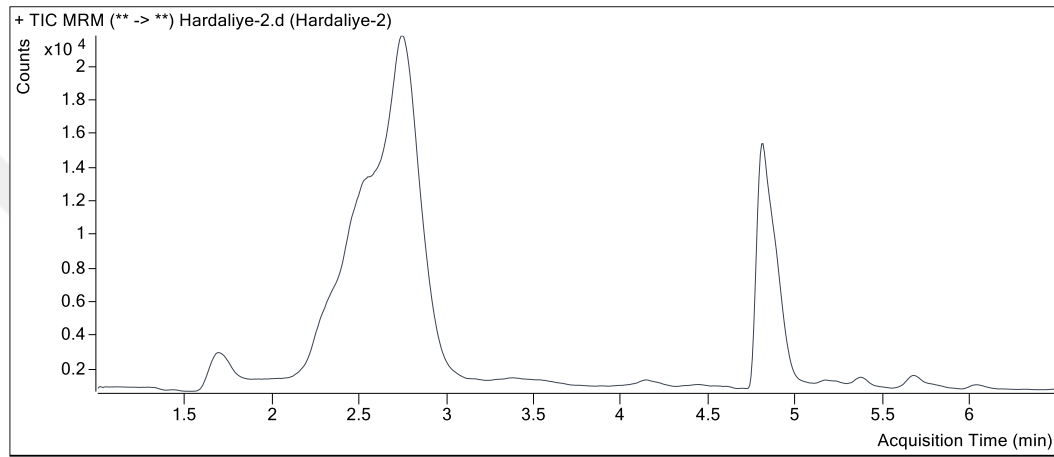
Target Compound**3-OH-Kynurenine****Target Compound****Nicotin Amid****Target Compound****Kynurenine****ISTD Compound****L-Tyriptophan IS**



EK-6: Hardaliyede (Edirne) LC-MS/MS ile belirlenen triptofan ve metabolitleri (2. ölçüm)

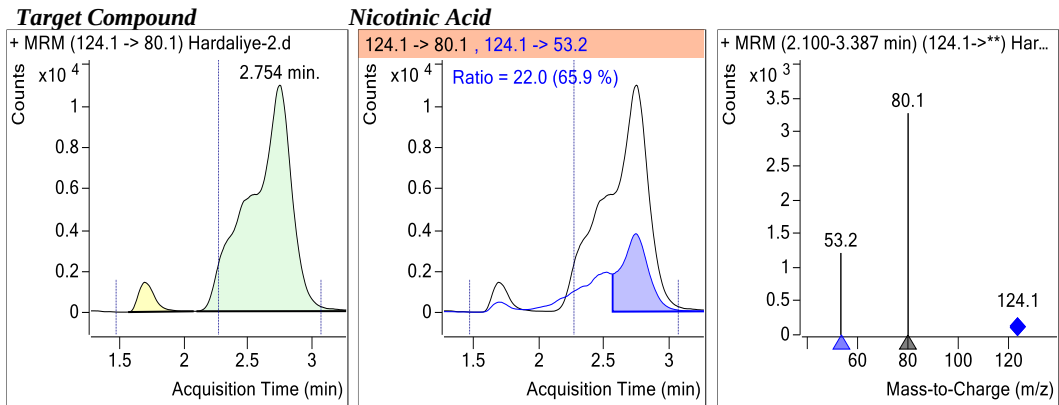
Analysis Info			
Acq Time	2021-06-24 20:12	Data File	E Hardaliye-2.d
Sample Type	Sample	Sample Name	E Hardaliye-2
Dilution	10	Acq Method	Tryptophan_Metabolites.m
Position	Vial 7	Sample Info	
Inj Vol	5,00	Comment	

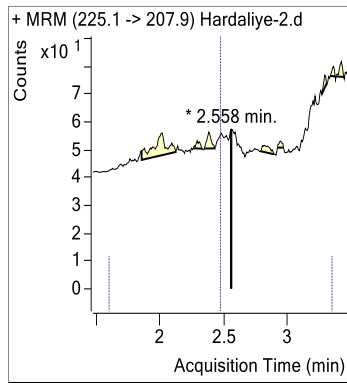
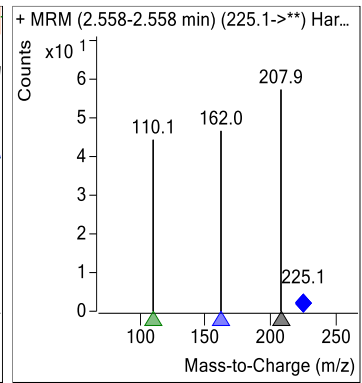
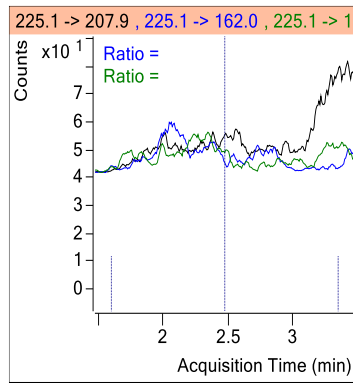
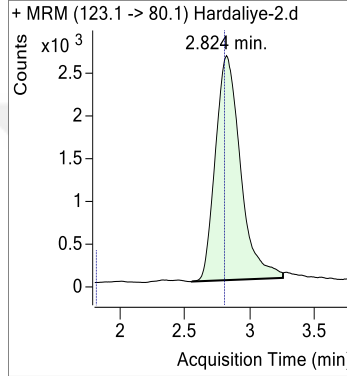
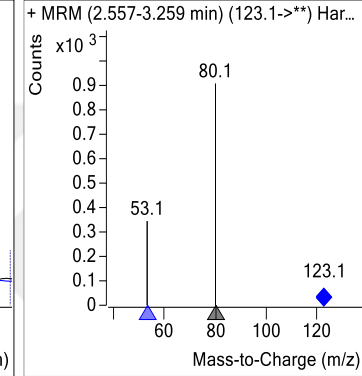
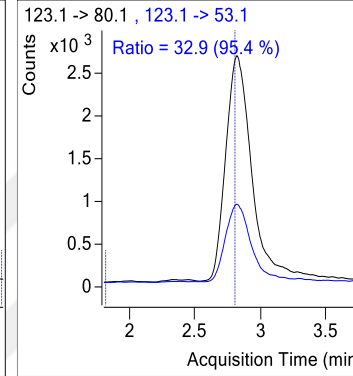
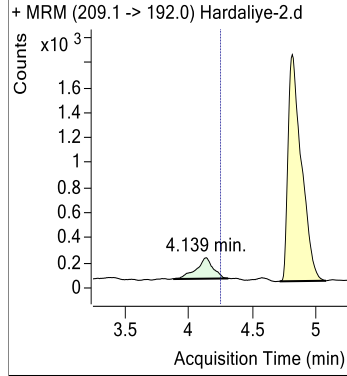
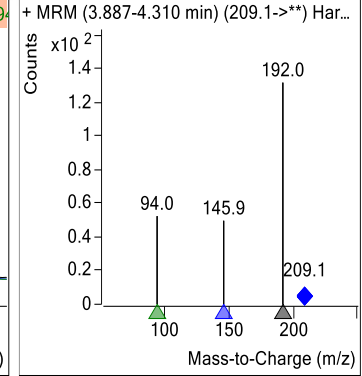
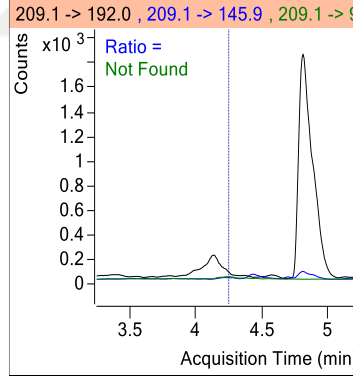
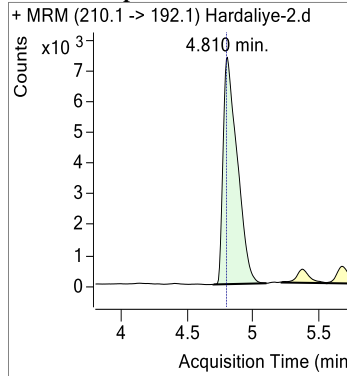
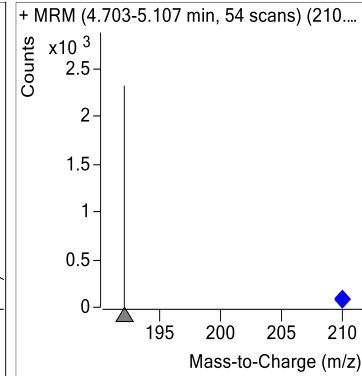
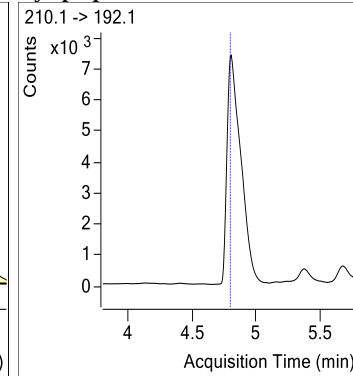
Sample Chromatogram

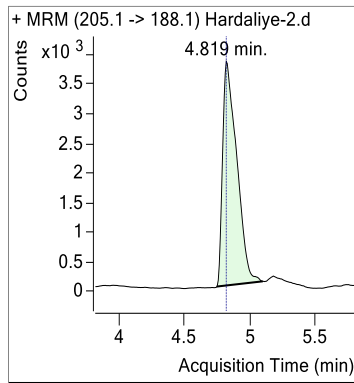
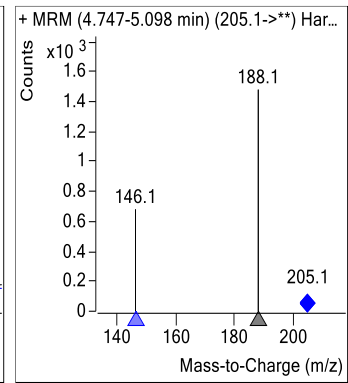
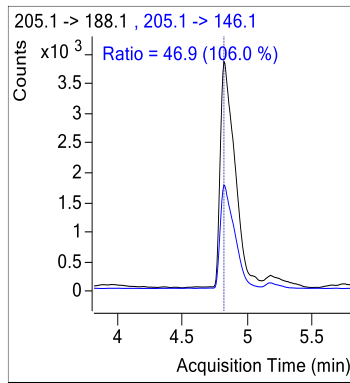
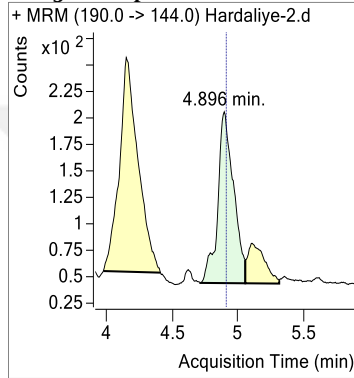
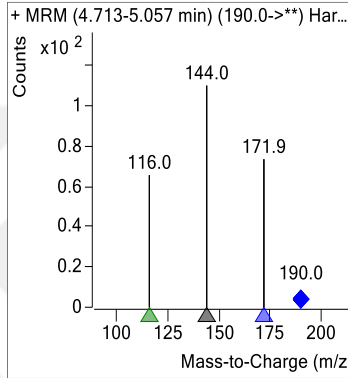
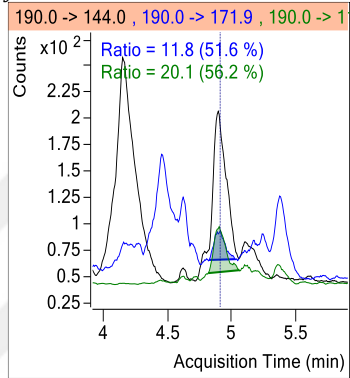


Quantitation Results				
Compound	RT	Response	Final Conc	
Nicotinic Acid	2,754	247064	1112,4159	ng/ml
3-OH-Kynurenine	2,558	0	nd	ng/ml
Nicotin Amid	2,824	35178	72,0794	ng/ml
Kynurenine	4,139	1543	16,3277	ng/ml
L-Tryptophan	4,819	28334	1738,9164	ng/ml
Kynurenic Acid	4,896	1364	5,5625	ng/ml

Compound Graphics



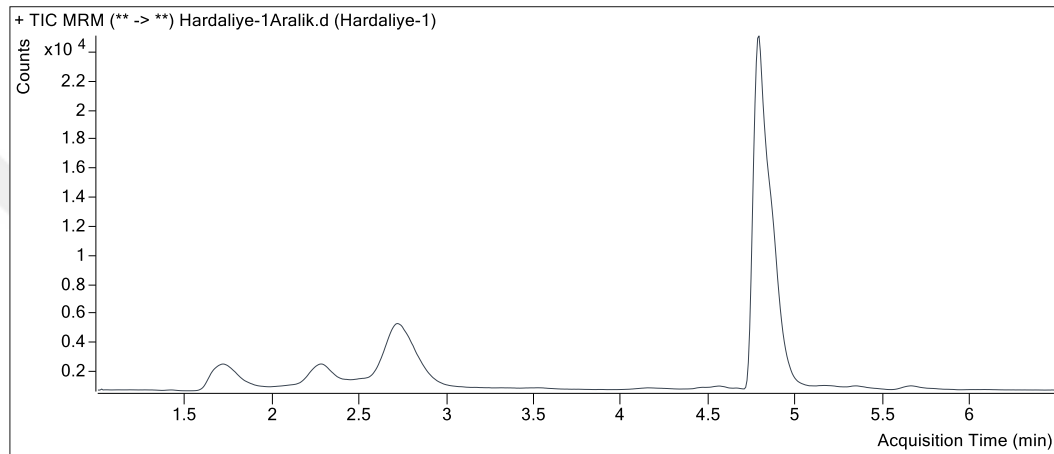
Target Compound**3-OH-Kynurenine****Target Compound****Nicotin Amid****Target Compound****Kynurenine****ISTD Compound****L-Tryptophan IS**

Target Compound**L-Tryptophan****Target Compound****Kynurenic Acid**

EK-7: Hardaliyede (Kırklareli) LC-MS/MS ile belirlenen triptofan ve metabolitleri (1. Ölçüm)

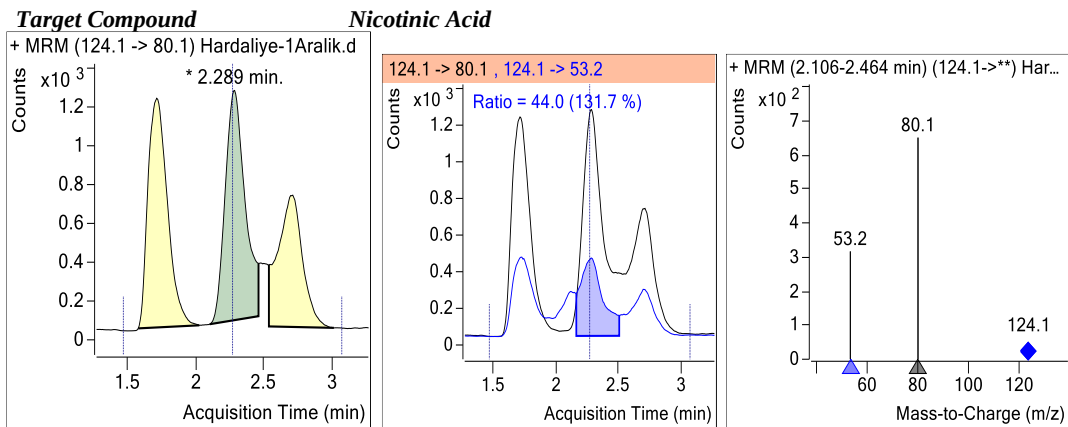
Analysis Info			
Acq Time	2021-12-09 11:42	Data File	K Hardaliye-1Aralik.d
Sample Type	Sample	Sample Name	K Hardaliye-1
Dilution	10	Acq Method	Tryptophan_Metabolites.m
Position	Vial 22	Sample Info	
Inj Vol	5,00	Comment	

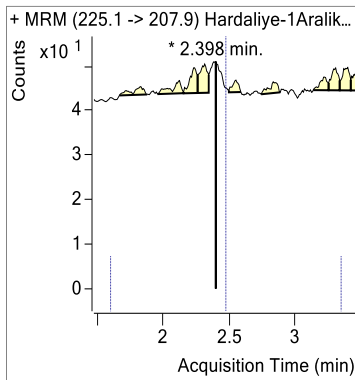
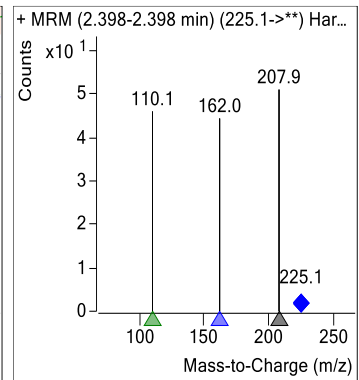
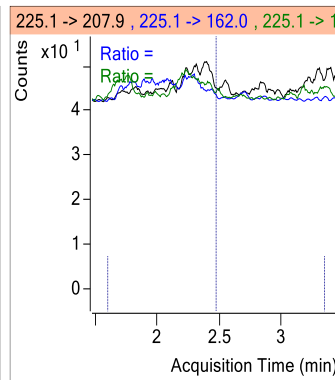
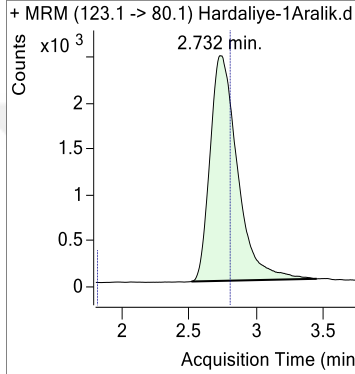
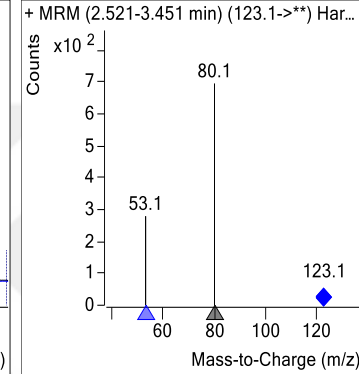
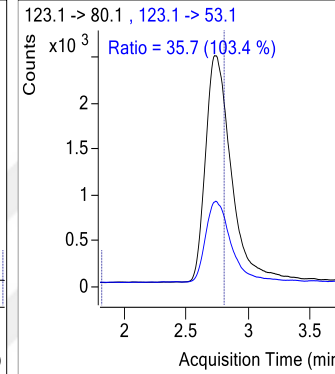
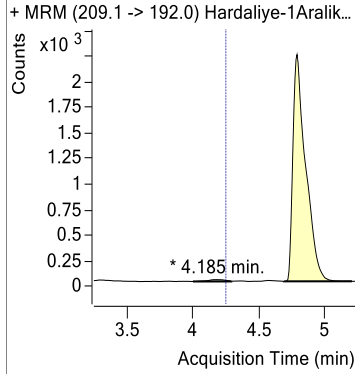
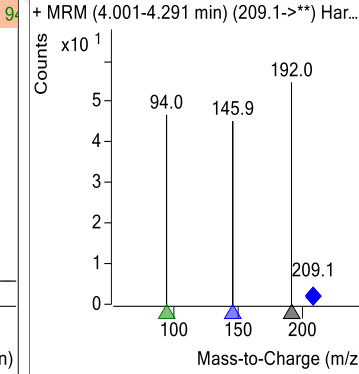
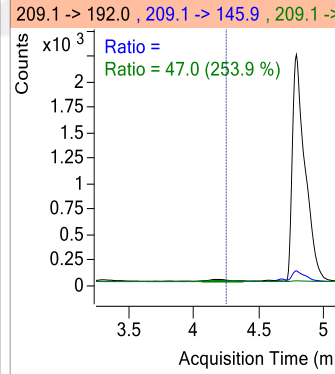
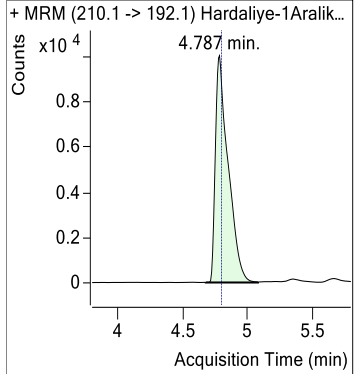
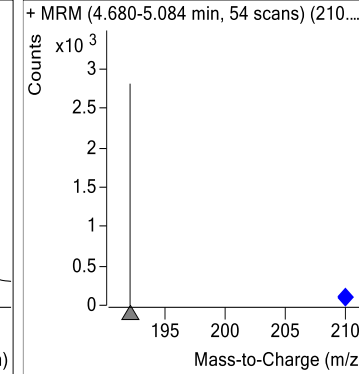
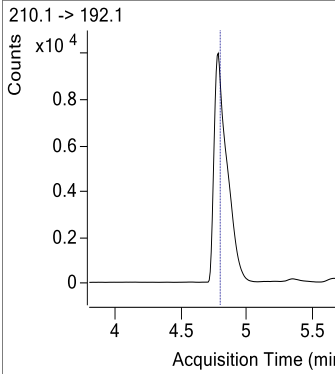
Sample Chromatogram

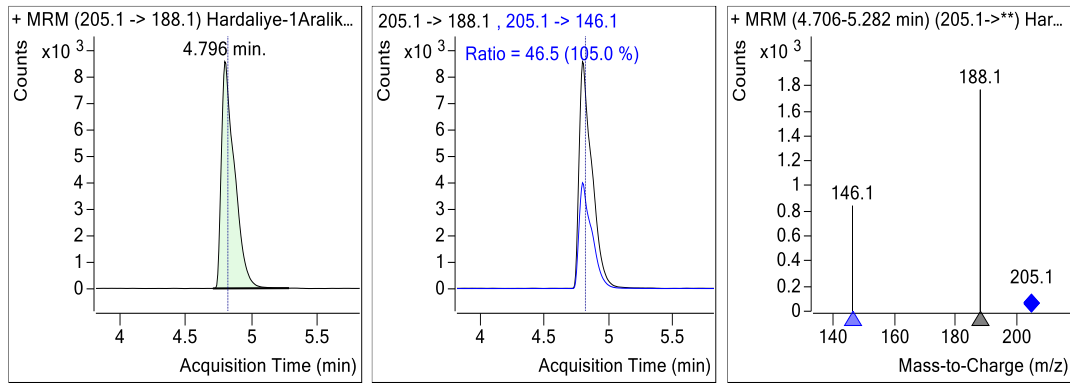
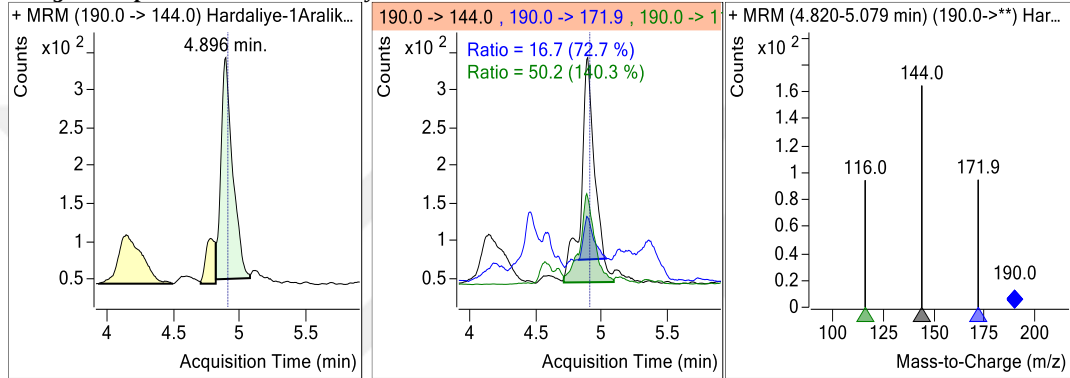


Quantitation Results				
Compound	RT	Response	Final Conc	
Nicotinic Acid	2,289	12095	54,4572	ng/ml
3-OH-Kynurenine	2,398	0	0,0000	ng/ml
Nicotin Amid	2,732	34844	71,3959	ng/ml
Kynurenine	4,185	164	1,7364	ng/ml
L-Tryptophan	4,796	58846	2936,2018	ng/ml
Kynurenic Acid	4,896	1815	7,4004	ng/ml

Compound Graphics



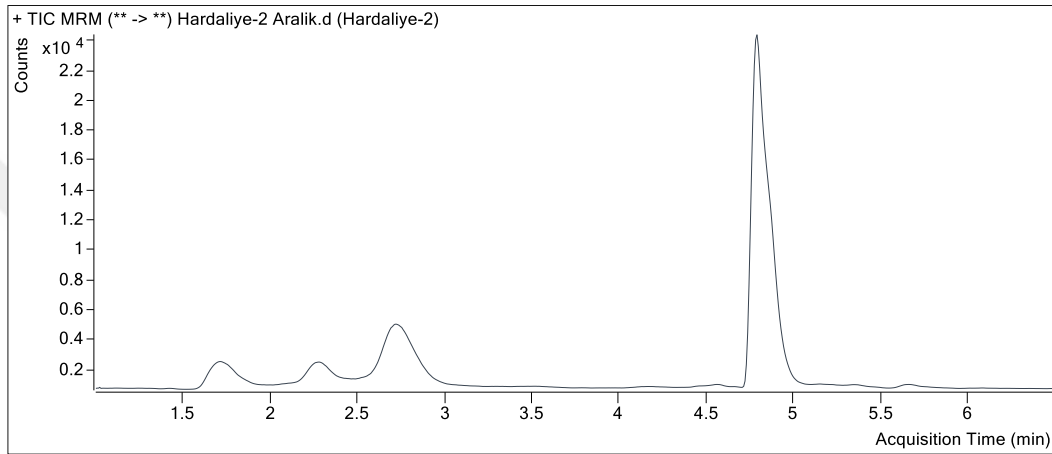
Target Compound**3-OH-Kynurenine****Target Compound****Nicotin Amid****Target Compound****Kynurenine****ISTD Compound****L-Tryptophan IS**

Target Compound**L-Tryptophan****Target Compound****Kynurenic Acid**

EK-8: Hardaliyede (Kırklareli) LC-MS/MS ile belirlenen triptofan ve metabolitleri (2. ölçüm)

Analysis Info			
Acq Time	2021-12-09 11:56	Data File	K Hardaliye-2 Aralik.d
Sample Type	Sample	Sample Name	K Hardaliye-2
Dilution	10	Acq Method	Tryptophan_Metabolites.m
Position	Vial 22	Sample Info	
Inj Vol	5,00	Comment	

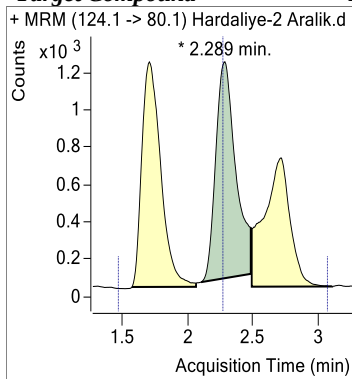
Sample Chromatogram



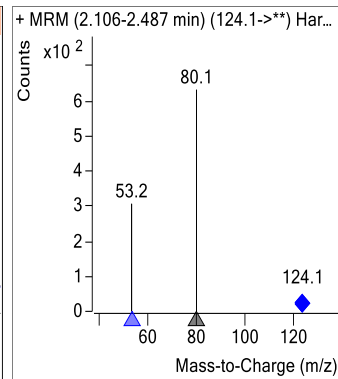
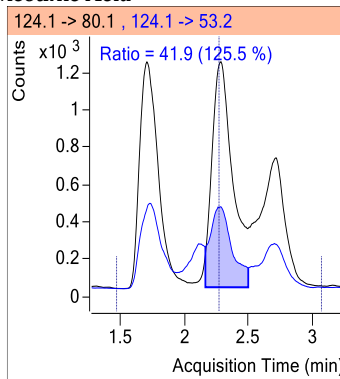
Quantitation Results				
Compound	RT	Response	Final Conc	
Nicotinic Acid	2,289	12358	55,6422	ng/ml
3-OH-Kynurenine	2,443	0	0,0000	ng/ml
Nicotin Amid	2,763	32580	66,7560	ng/ml
Kynurenine	4,162	157	1,6565	ng/ml
L-Tryptophan	4,804	57665	2958,8234	ng/ml
Kynurenic Acid	4,889	1885	7,6854	ng/ml

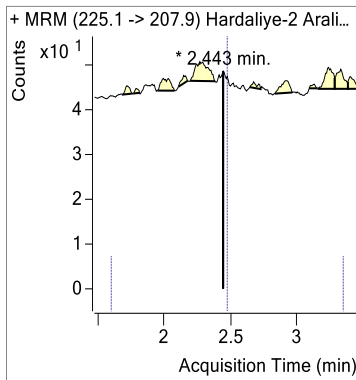
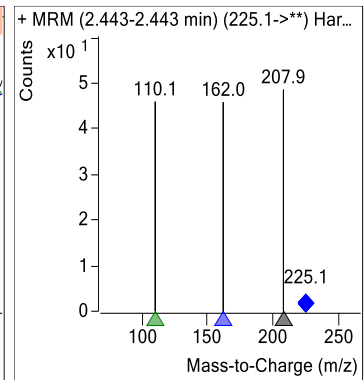
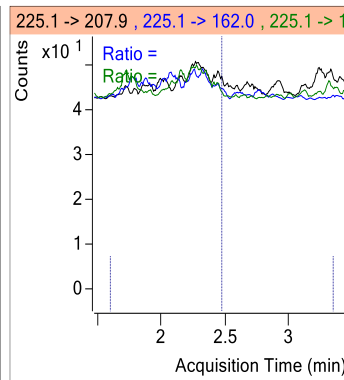
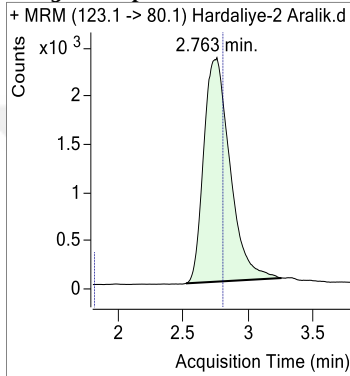
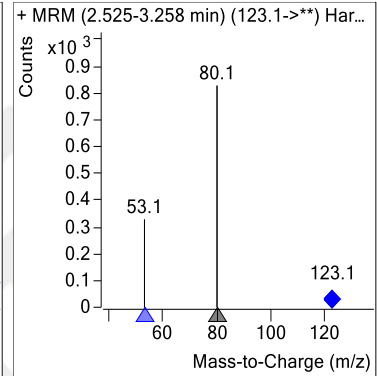
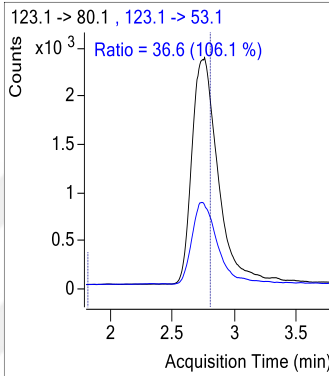
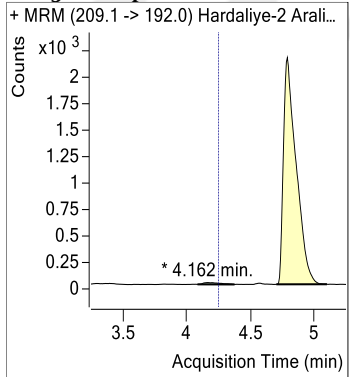
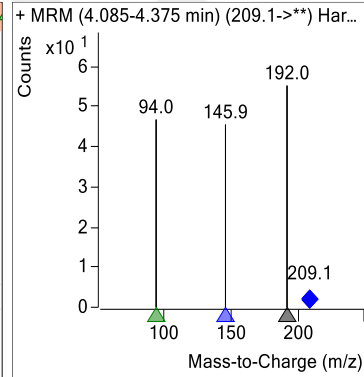
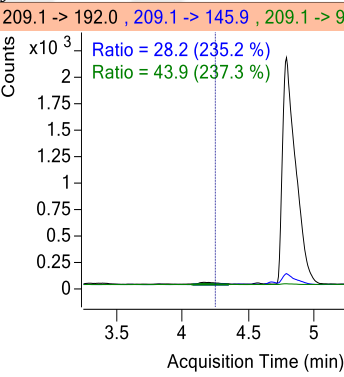
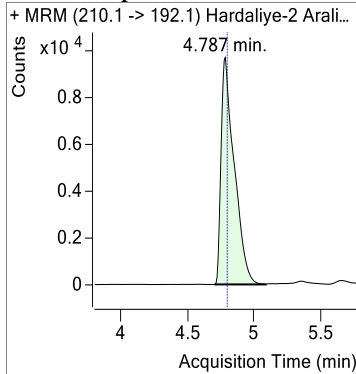
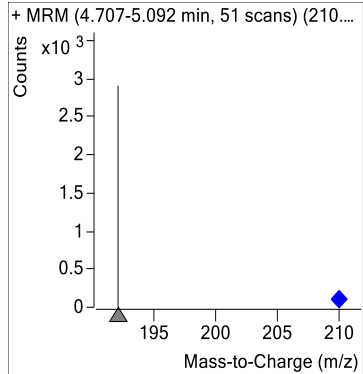
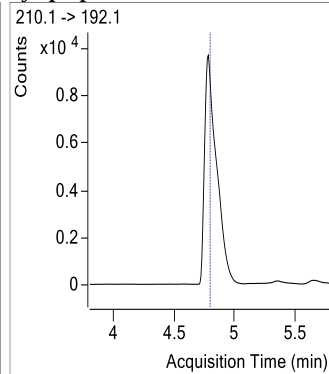
Compound Graphics

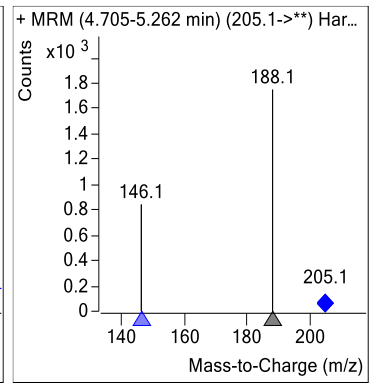
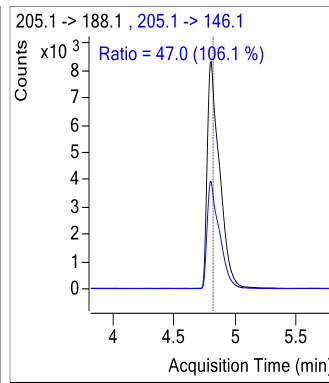
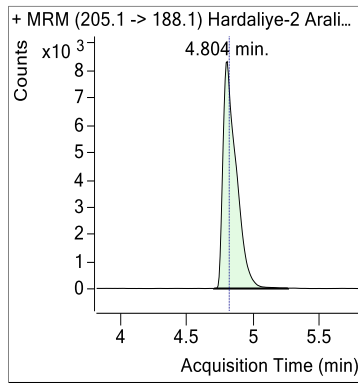
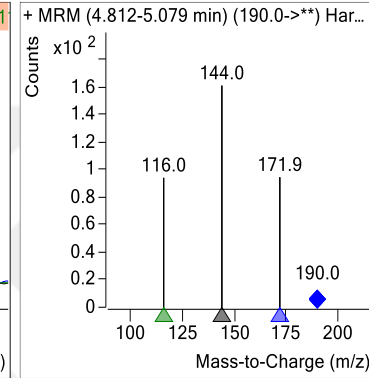
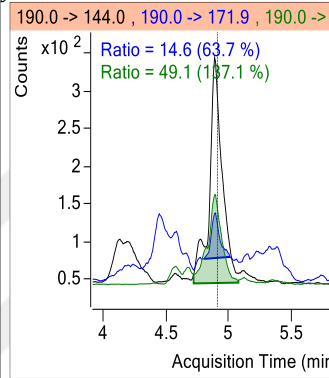
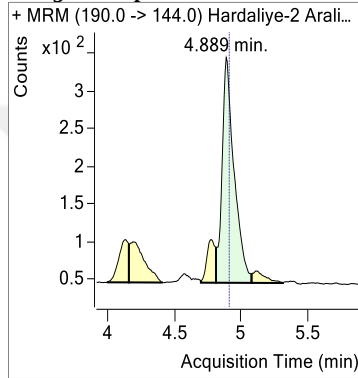
Target Compound



Nicotinic Acid

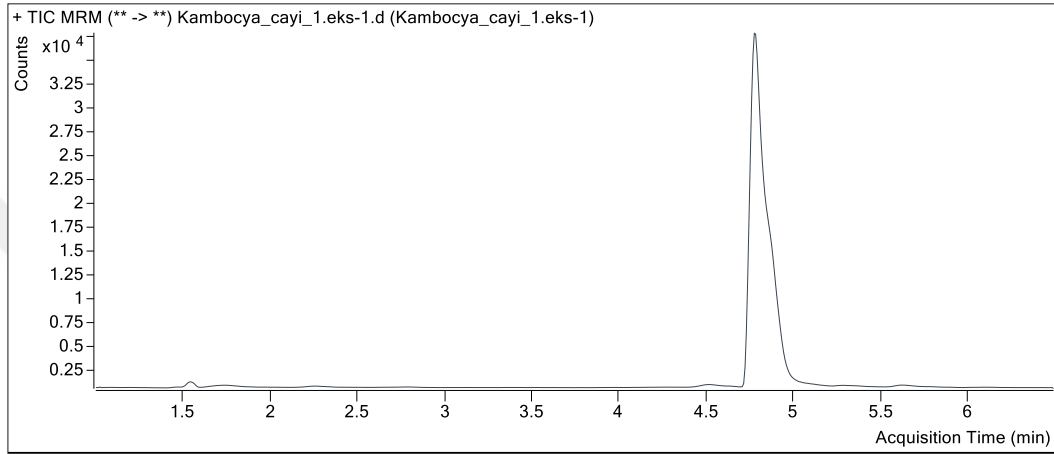


Target Compound**3-OH-Kynurenine****Target Compound****Nicotin Amid****Target Compound****Kynurenine****ISTD Compound****L-Tryptophan IS**

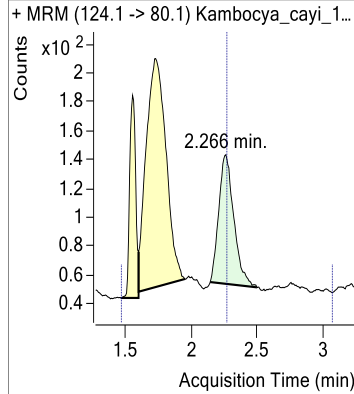
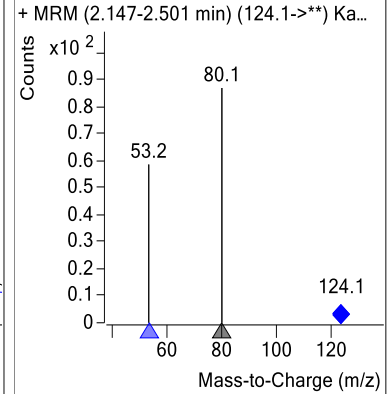
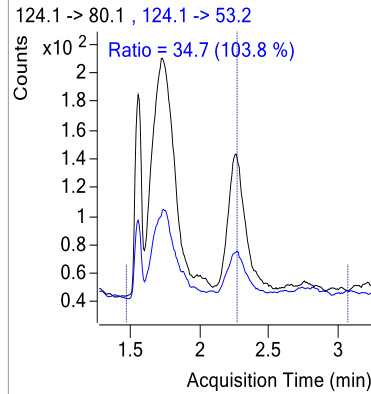
Target Compound**L-Tryptophan****Target Compound****Kynurenic Acid**

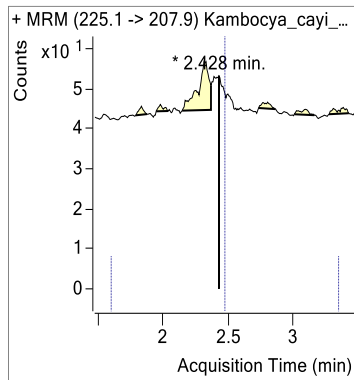
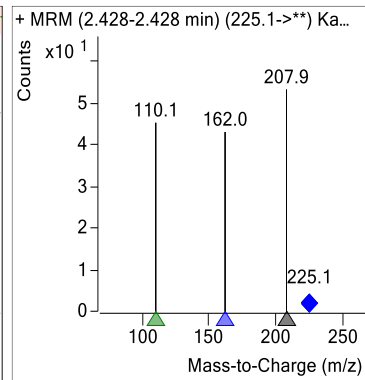
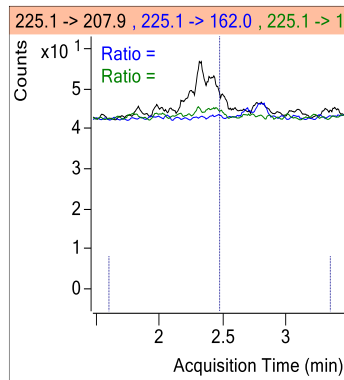
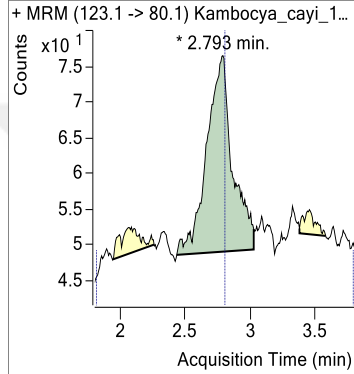
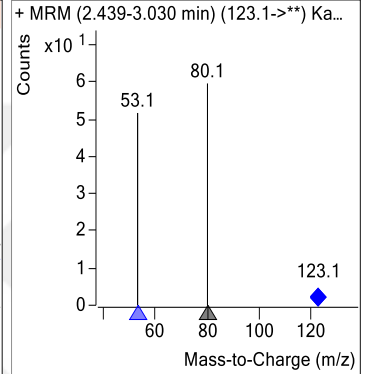
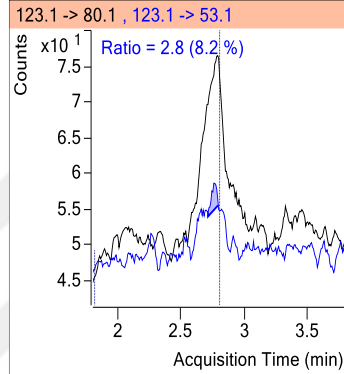
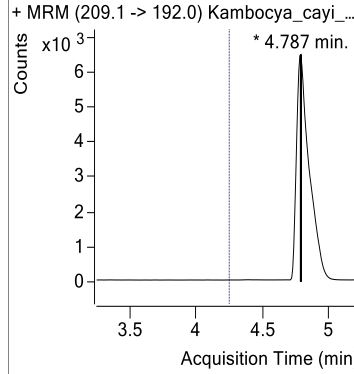
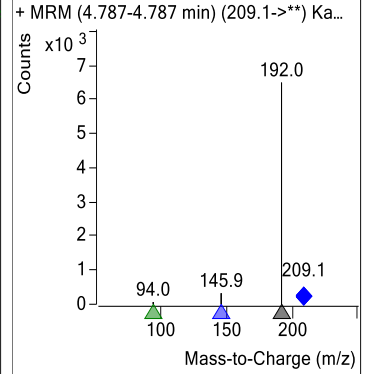
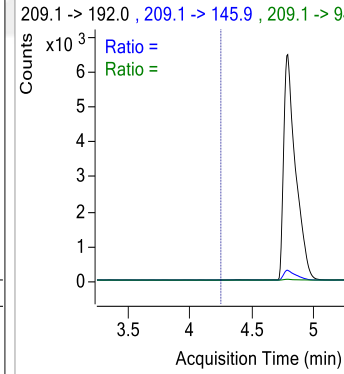
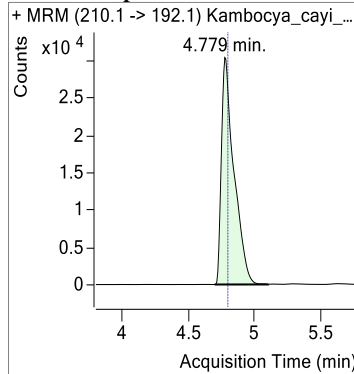
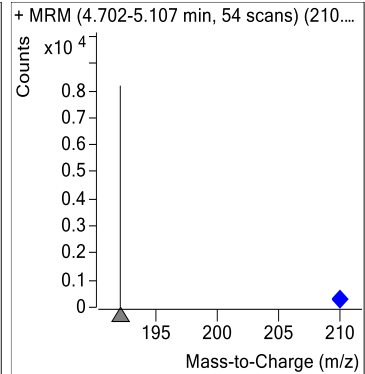
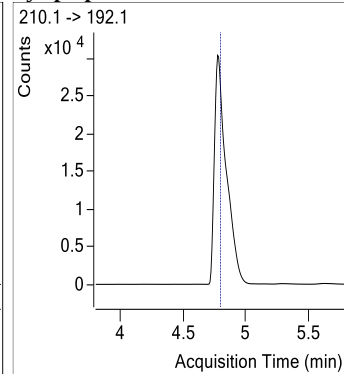
EK-9: Kombucha çayında LC-MS/MS ile belirlenen triptofan ve metabolitleri (1. ölçüm)

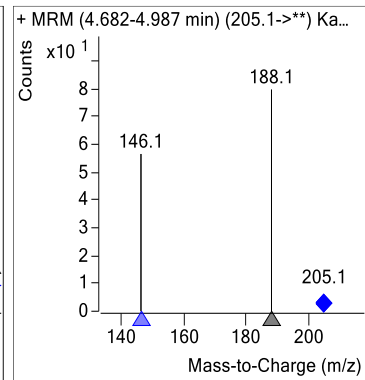
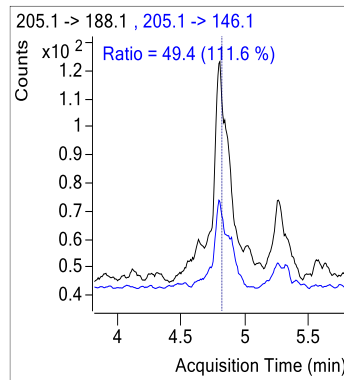
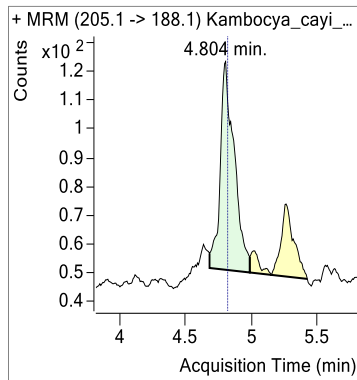
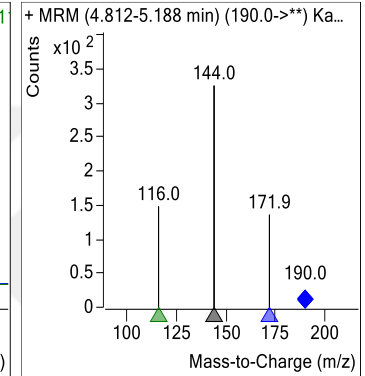
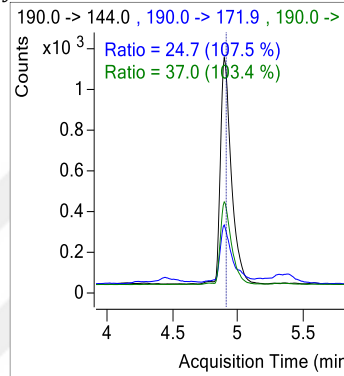
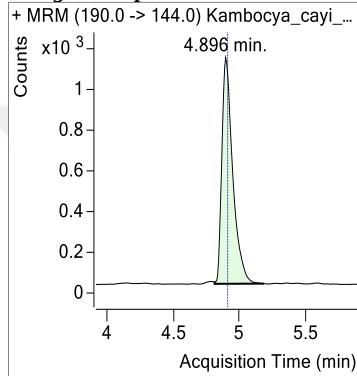
Analysis Info			
Acq Time	2021-12-09 12:22	Data File	Kambocya_cayi
Sample Type	Sample	Sample Name	Kambocya_cayi
Dilution	10	Acq Method	Tryptophan_Metabolites.m
Position	Vial 23	Sample Info	
Inj Vol	5,00	Comment	

Sample Chromatogram

Quantitation Results				
Compound	RT	Response	Final Conc	
Nicotinic Acid	2,266	711	3,1998	ng/ml
3-OH-Kynurenine	2,428	0	0,0000	ng/ml
Nicotin Amid	2,793	378	0,7756	ng/ml
Kynurenine	4,787	0	0,0000	ng/ml
L-Tryptophan	4,804	536	9,1152	ng/ml
Kynurenic Acid	4,896	6370	25,9727	ng/ml

Compound Graphics**Target Compound****Nicotinic Acid**

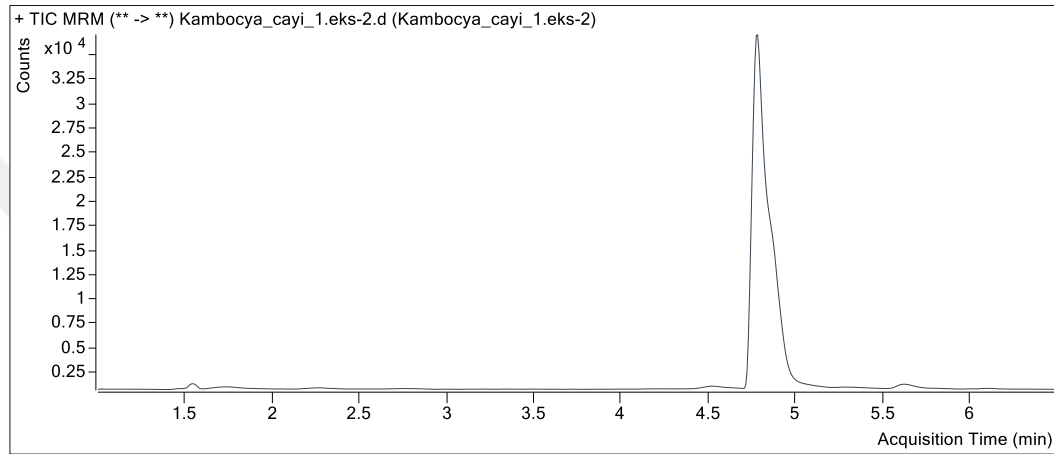
Target Compound**3-OH-Kynurenine****Target Compound****Nicotin Amid****Target Compound****Kynurenine****ISTD Compound****L-Tryptophan IS**

Target Compound**L-Tryptophan****Target Compound****Kynurenic Acid**

EK-10: Kombucha çayında LC-MS/MS ile belirlenen triptofan ve metabolitleri (2. ölçüm)

Analysis Info			
Acq Time	2021-12-09 12:35	Data File	Kambocya_cayi
Sample Type	Sample	Sample Name	Kambocya_cayi
Dilution	10	Acq Method	Tryptophan_Metabolites.m
Position	Vial 23	Sample Info	
Inj Vol	5,00	Comment	

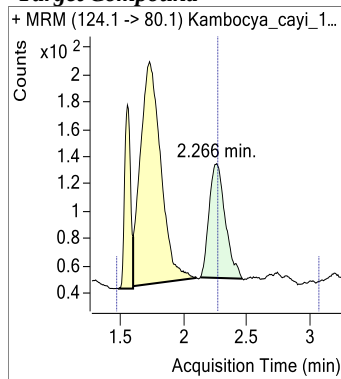
Sample Chromatogram



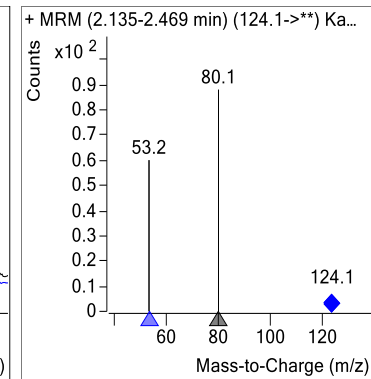
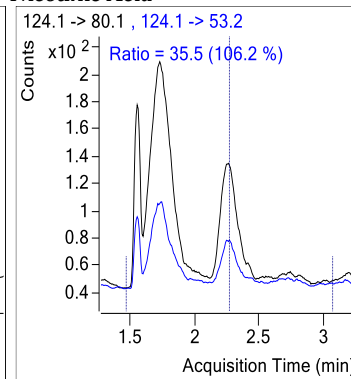
Quantitation Results				
Compound	RT	Response	Final Conc	
Nicotinic Acid	2,266	745	3,3549	ng/ml
3-OH-Kynurenine	2,459	0	0,0000	ng/ml
Nicotin Amid	2,755	387	0,7926	ng/ml
Kynurenine	4,780	0	0,0000	ng/ml
L-Tryptophan	4,804	525	9,1833	ng/ml
Kynurenic Acid	4,896	6432	26,2283	ng/ml

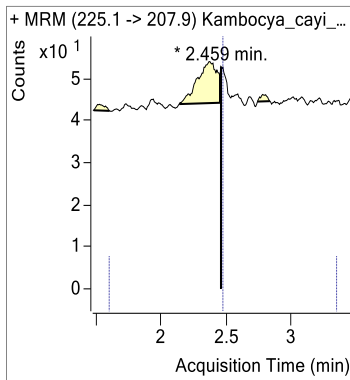
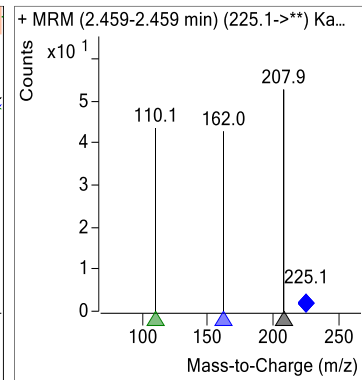
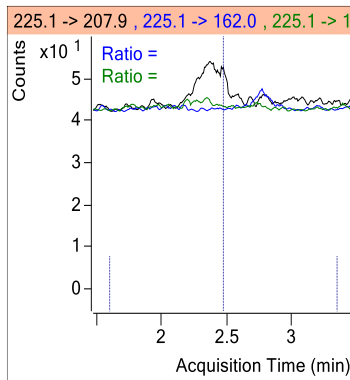
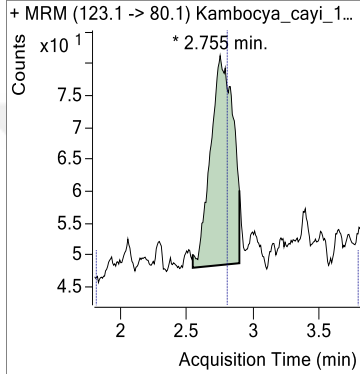
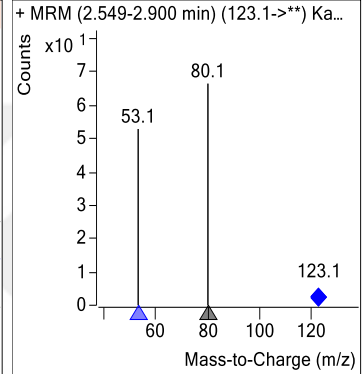
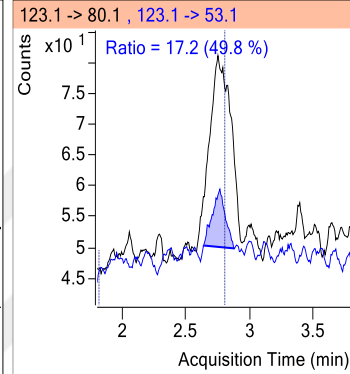
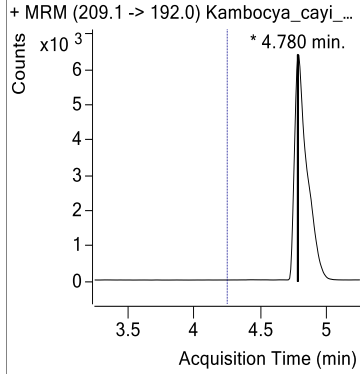
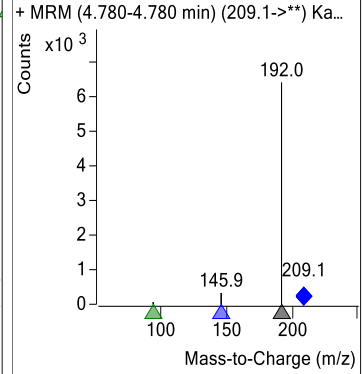
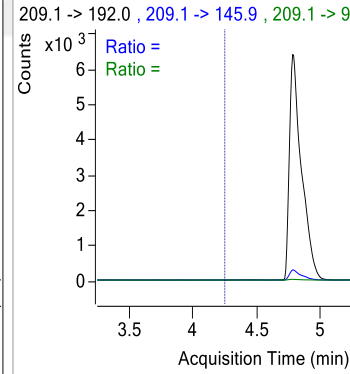
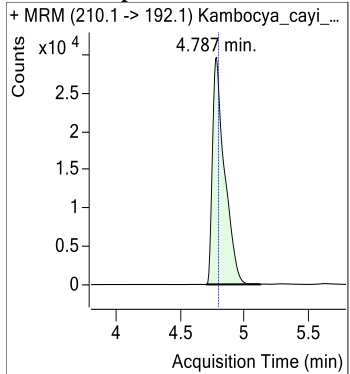
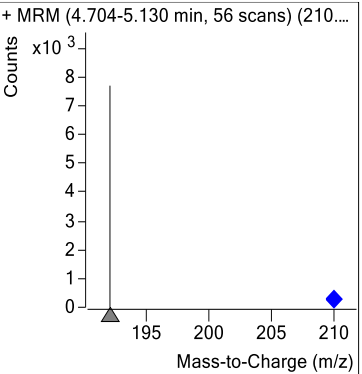
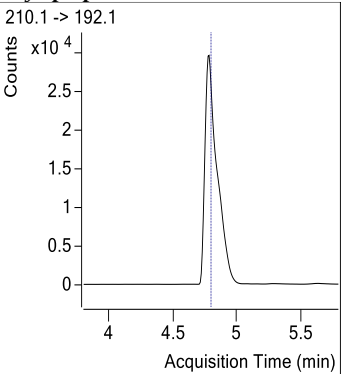
Compound Graphics

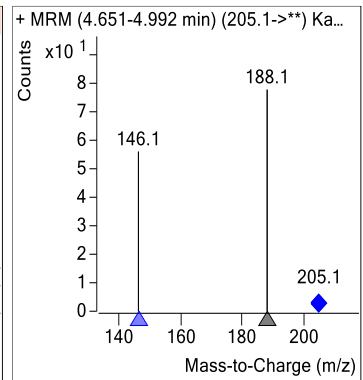
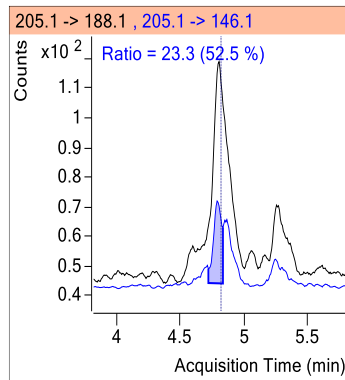
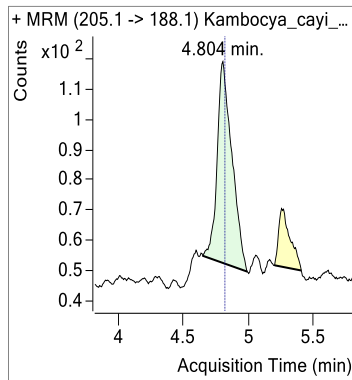
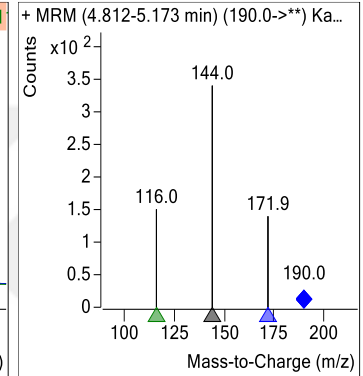
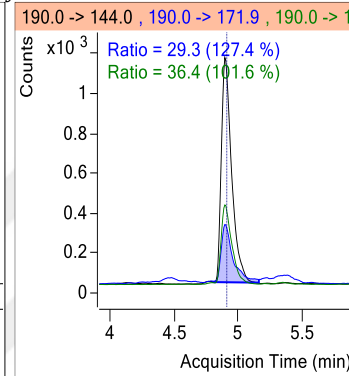
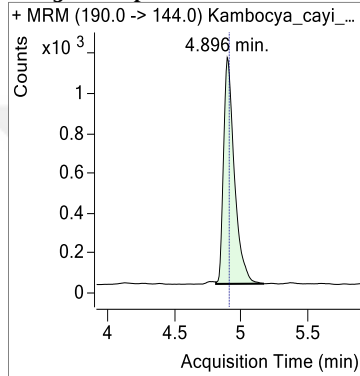
Target Compound



Nicotinic Acid

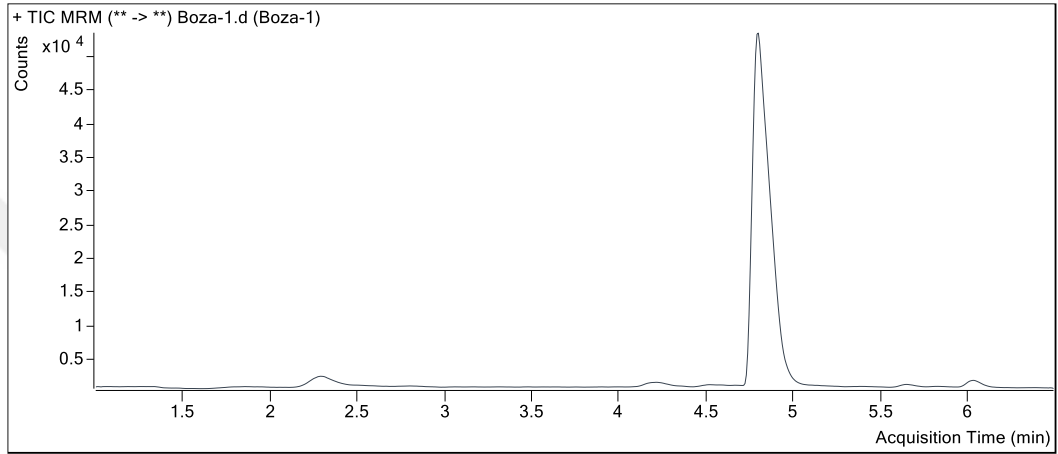


Target Compound**3-OH-Kynurenine****Target Compound****Nicotin Amid****Target Compound****Kynurenine****ISTD Compound****L-Tyriptophan IS**

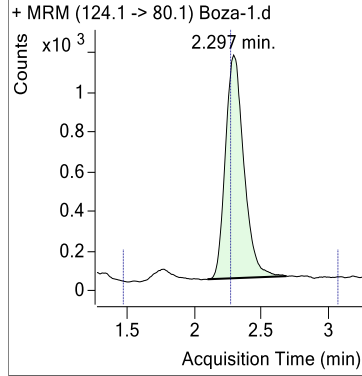
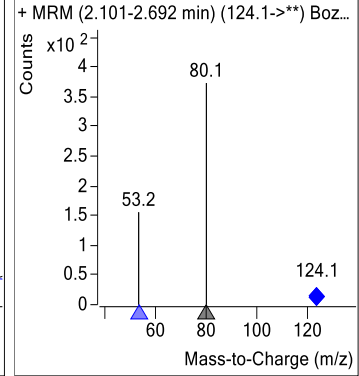
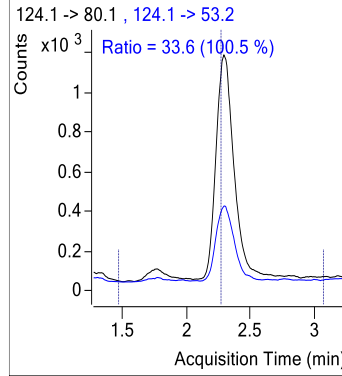
Target Compound**L-Tryptophan****Target Compound****Kynurenic Acid**

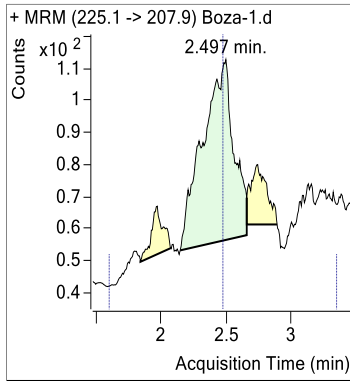
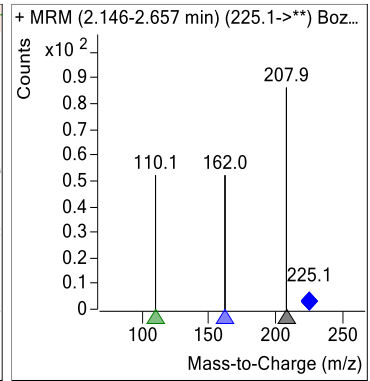
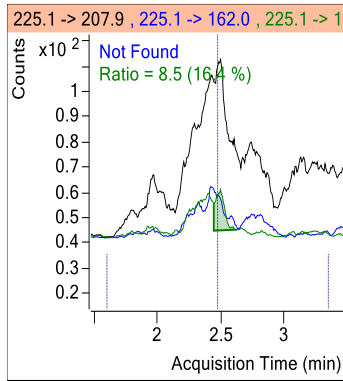
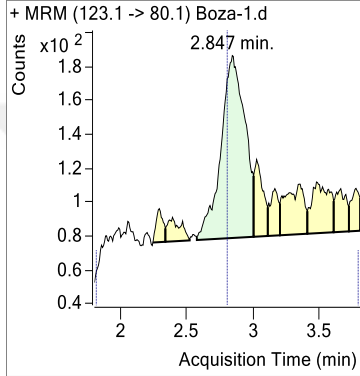
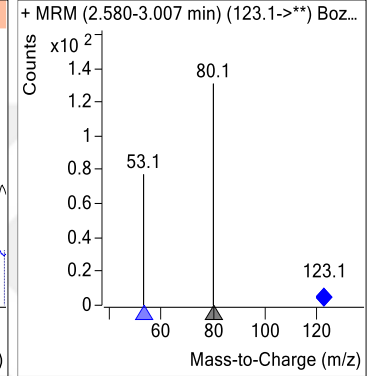
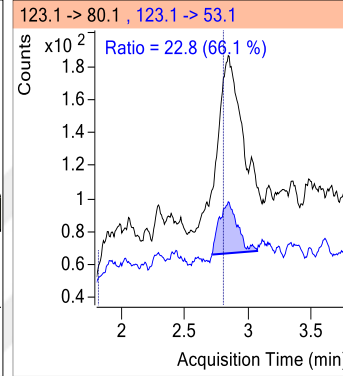
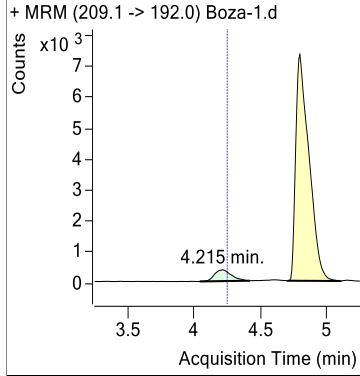
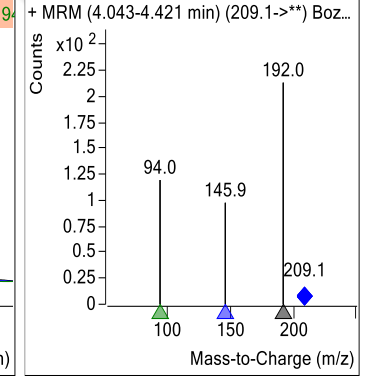
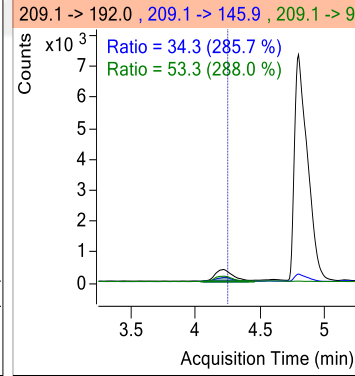
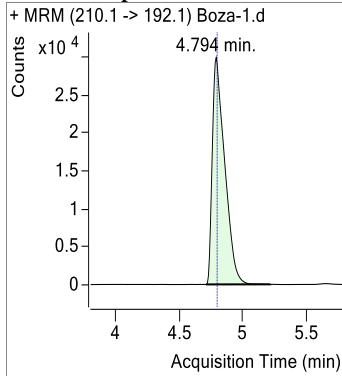
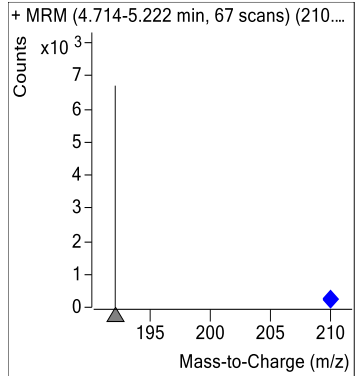
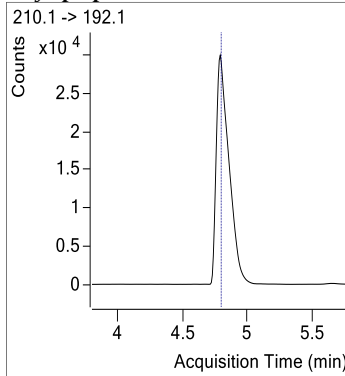
EK-11: Bozada LC-MS/MS ile belirlenen triptofan ve metabolitleri (1. ölçüm)

Analysis Info			
Acq Time	2021-06-30 15:05	Data File	Boza-1.d
Sample Type	Sample	Sample Name	Boza-1
Dilution	10	Acq Method	Tryptophan_Metabolites.m
Position	Vial 41	Sample Info	
Inj Vol	5,00	Comment	

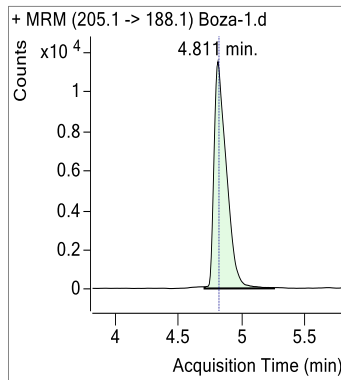
Sample Chromatogram

Quantitation Results				
Compound	RT	Response	Final Conc	
Nicotinic Acid	2,297	10835	48,7841	ng/ml
3-OH-Kynurenine	2,497	938	12,0100	ng/ml
Nicotin Amid	2,847	1355	2,7755	ng/ml
Kynurenine	4,215	3206	33,9329	ng/ml
L-Tryptophan	4,811	78373	1317,8406	ng/ml
Kynurenic Acid	4,866	2504	10,2093	ng/ml

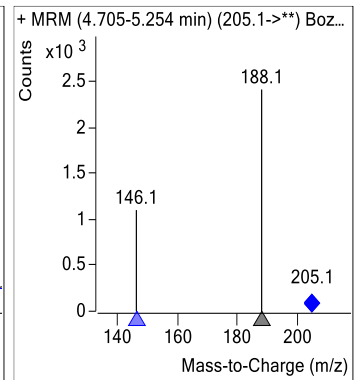
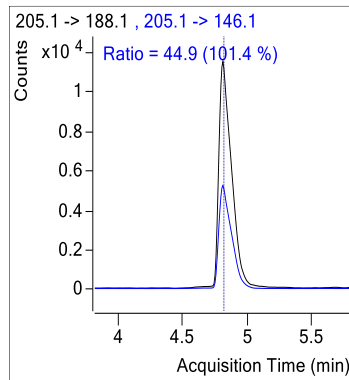
Compound Graphics**Target Compound****Nicotinic Acid**

Target Compound**3-OH-Kynurenine****Target Compound****Nicotin Amid****Target Compound****Kynurenine****ISTD Compound****L-Tyriptophan IS**

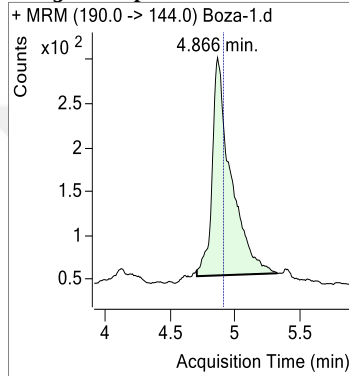
Target Compound



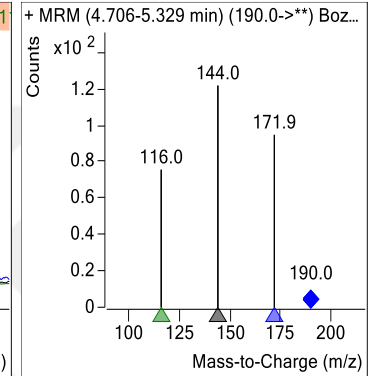
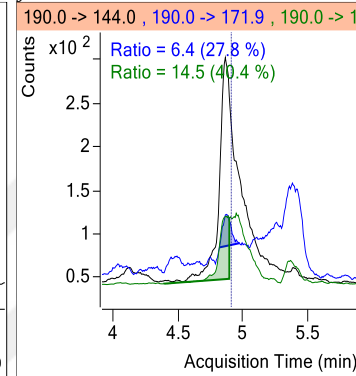
L-Tryptophan



Target Compound

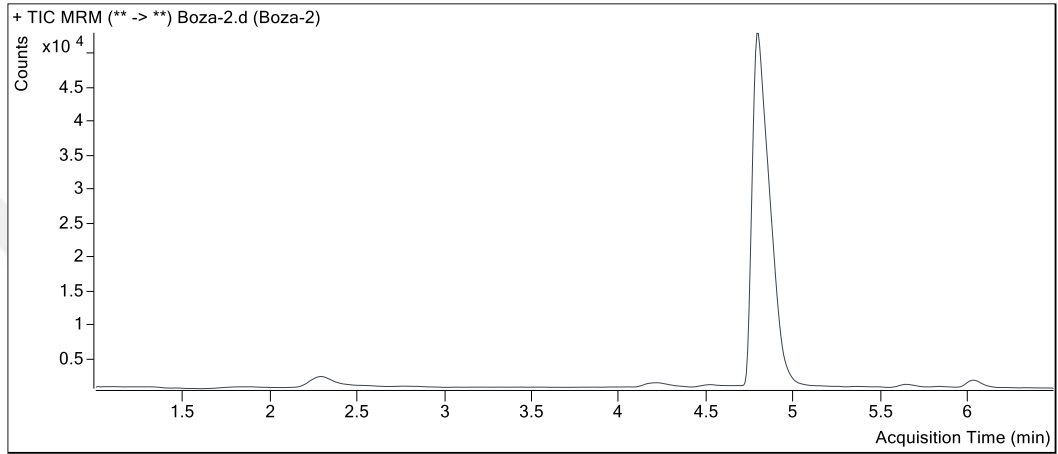


Kynurenic Acid

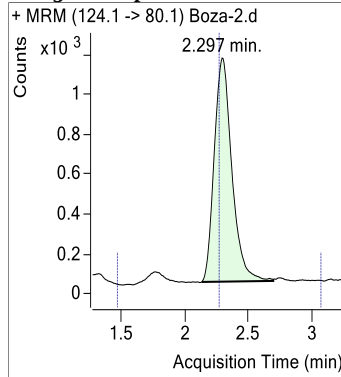
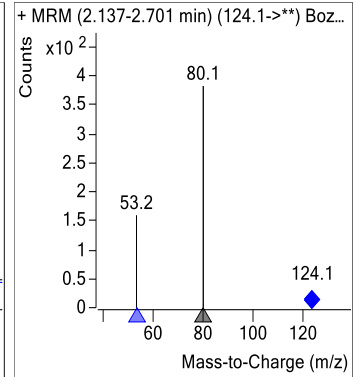
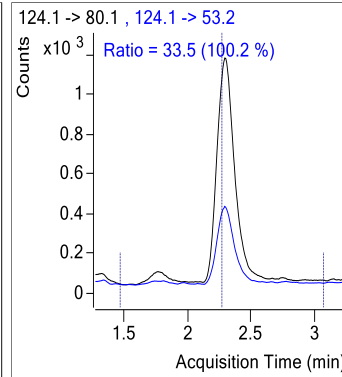


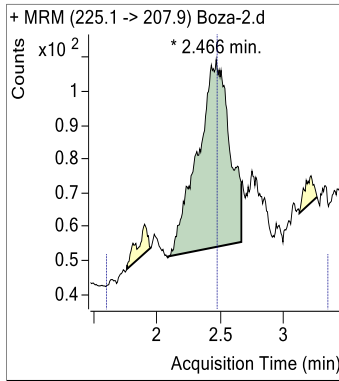
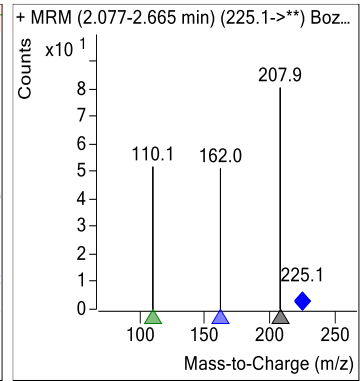
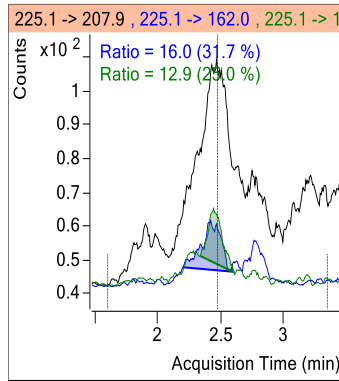
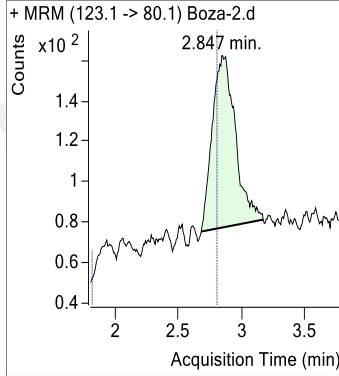
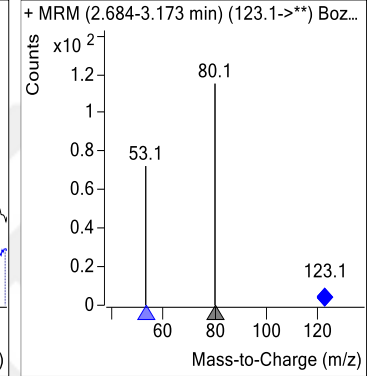
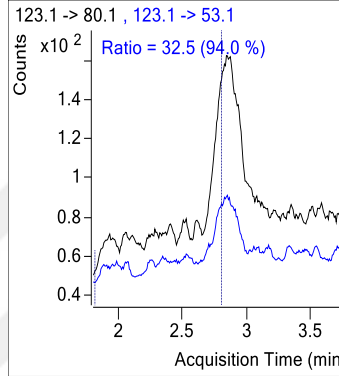
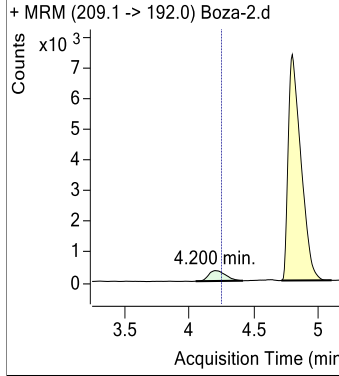
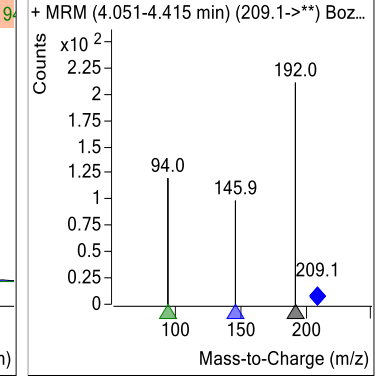
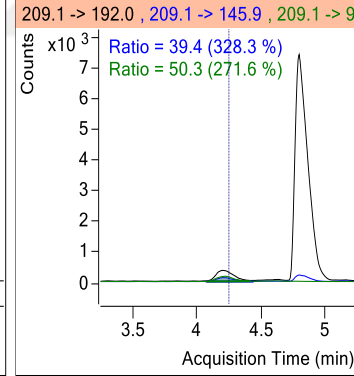
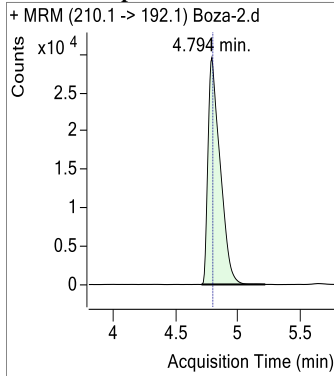
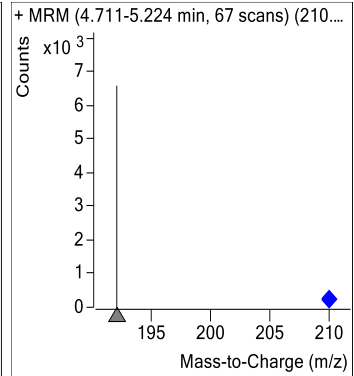
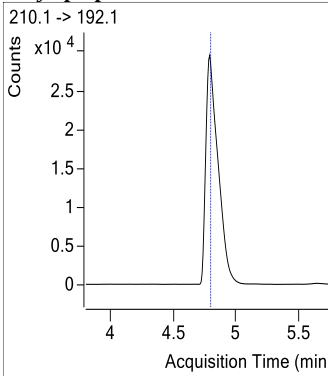
EK-12: Bozada LC-MS/MS ile belirlenen triptofan ve metabolitleri (2. ölçüm)

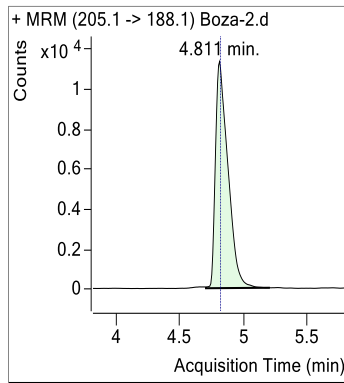
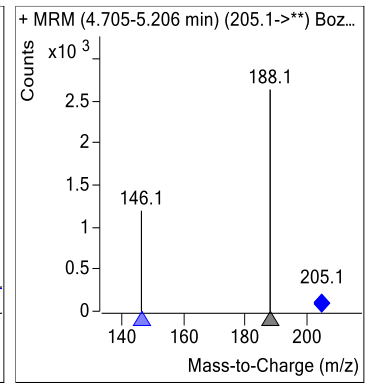
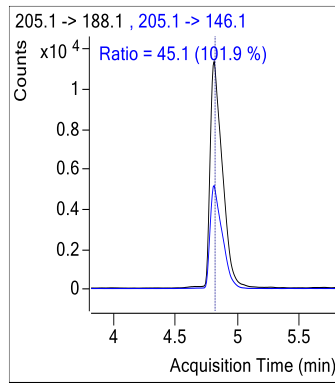
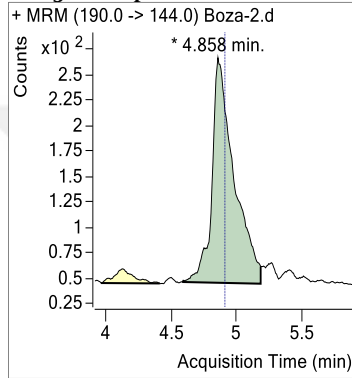
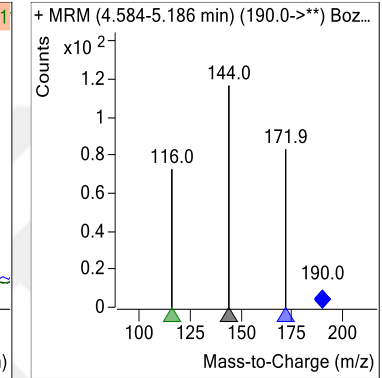
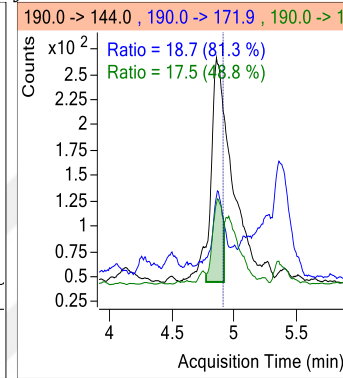
Analysis Info			
Acq Time	2021-06-30 15:18	Data File	Boza-2.d
Sample Type	Sample	Sample Name	Boza-2
Dilution	10	Acq Method	Tryptophan_Metabolites.m
Position	Vial 41	Sample Info	
Inj Vol	5,00	Comment	

Sample Chromatogram

Quantitation Results				
Compound	RT	Response	Final Conc	
Nicotinic Acid	2,297	10872	48,9539	ng/ml
3-OH-Kynurenine	2,466	970	12,4102	ng/ml
Nicotin Amid	2,847	1075	2,2020	ng/ml
Kynurenine	4,200	3069	32,4818	ng/ml
L-Tryptophan	4,811	76942	1315,7388	ng/ml
Kynurenic Acid	4,858	2608	10,6323	ng/ml

Compound Graphics**Target Compound****Nicotinic Acid**

Target Compound**3-OH-Kynurenine****Target Compound****Nicotin Amid****Target Compound****Kynurenine****ISTD Compound****L-Tryptophan IS**

Target Compound**L-Tryptophan****Target Compound****Kynurenic Acid**

ÖZGEÇMİŞ

İlköğrenimim Babaeski İlköğretim Okulunda 2002 yılında okul 2. olarak tamamladım ve sonrasında başladığım Babaeski Anadolu Lise'sini 2006 yılında bitirdim. 2007 yılında Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Mühendislik-Mimarlık Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümünü kazandım ve 2012 yılında mezun oldum. Okulumu bitirdikten sonra Kırklareli Mesleki ve Teknik Anadolu Lise'sinde 1 yıl ücretli öğretmenlik yaptım. Saray Bisküvi ve Gıda Anonim Şirke'inde üretim mühendisi olarak çalıştım. Kırklareli Çınar Hazır Yemek Fabrikası ve KYK Yurtlarının yemekhanelerini işleten farklı catering firmalarında Gıda Mühendisi olarak çalıştım. İş hayatıma Pehlivanköy'de hazır yemek hizmeti veren firmada devam ediyor ve aynı zamanda Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Ana Bilim Dalında Biyokimya bölümünde yüksek lisans eğitimimi sürdürüyorum.

Didem Melda YILMAZ