T.C.

YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

HARDALİYE BİYOAKTİF BİLEŞİKLERİNİN POTANSİYEL BİYOLOJİK ETKİLERİNE *in vitro* METABOLOMİK YAKLAŞIMLAR

Ayşe Semra AKSOY

DOKTORA TEZİ

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Gıda Mühendisliği Programı

Danışman

Prof. Dr. Muhammet ARICI

Temmuz, 2022

T.C.

YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

HARDALİYE BİYOAKTİF BİLEŞİKLERİNİN POTANSİYEL BİYOLOJİK ETKİLERİNE *in vitro* METABOLOMİK YAKLAŞIMLAR

Ayşe Semra AKSOY tarafından hazırlanan tez çalışması 26.07.2022 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Gıda Mühendisliği Programı **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Muhammet ARICI
Yıldız Teknik Üniversitesi
Danışman

Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Muhammet ARICI, Danışman
Yıldız Teknik Üniversitesi _____

Doç. Dr. Salih KARASU, Üye
Yıldız Teknik Üniversitesi _____

Doç. Dr. Ayşe KARADAĞ, Üye
Yıldız Teknik Üniversitesi _____

Doç. Dr. Mustafa YAMAN, Üye
İstanbul Sabahattin Zaim Üniversitesi _____

Doç. Dr. İbrahim PALABIYIK, Üye
Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi _____

Danışmanım Prof. Dr. Muhammet ARICI sorumluluğunda tarafımca hazırlanan Hardaliye Biyoaktif Bileşiklerinin Potansiyel Biyolojik Etkilerine *in vitro* Metabolomik Yaklaşımlar başlıklı çalışmada veri toplama ve veri kullanımında gerekli yasal izinleri aldığımı, diğer kaynaklardan aldığım bilgileri ana metin ve referanslarda eksiksiz gösterdiğimi, araştırma verilerine ve sonuçlarına ilişkin çarpıtma ve/veya sahtecilik yapmadığımı, çalışmam süresince bilimsel araştırma ve etik ilkelerine uygun davrandığımı beyan ederim. Beyanımın aksinin ispatı halinde her türlü yasal sonucu kabul ederim.

Ayşe Semra AKSOY

İmza

Bu çalışma, Yıldız Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Koordinatörlüğü'nün FDK- 2019-3604 numaralı projesi ile desteklenmiştir. Ayşe Semra AKSOY YÖK 100/2000 Gıda - Metabolizma etkileşim alanında Doktora Burs Programı tarafından desteklenmiştir.

Canım Aileme…

TEŞEKKÜR

Öncelikle akademik tecrübelerini bana aktaran ve öğreten, kendimi geliştirmem için birçok yönden beni cesaretlendiren, akademisyenliği ve karakteriyle örnek aldığım kıymetli hocam, danışmanım Prof. Dr. Muhammet Arıcı'ya teşekkürlerimi sunarım.

Tez izleme jürimde bulunan, gerek bilgi birikimiyle gerekse de laboratuvar olanakları ile çalışmama destek olan, özverili ve pozitif yaklaşımlarıyla motive eden Doç. Dr. Mustafa YAMAN'a, ve yine tez izleme komitemde yer alarak görüş ve önerileri ile katkı sunan Doç. Dr. Ayşe KARADAĞ'a teşekkür ederim.

"YÖK 100/2000" Gıda – Metabolizma Etkileşim Alanı Doktora Burs Programı kapsamında destekleri için YÖK'e ve tez çalışmamı FDK- 2019-3604 numaralı projesi kapsamında destekleyen Yıldız Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Koordinatörlüğü'ne teşekkür ederim.

Hayatım ve eğitimim boyunca gösterdikleri sevgi, sabır, yardım ve destekleri için, ilim üzere ilerlemeye verdikleri önem ile istikâmetimi şekillendiren, her şeyim, canım, annem Sâriye AKSOY ve babam Mahmut AKSOY'a; enerjisi ve sevgisiyle her dâim özel hissettiren canım, birtanecik ablam H. Kübra AKSOY'a teşekkürlerimi ve sevgilerimi sunarım.

Hayatımın her ânında olduğu gibi doktora çalışmam boyunca da beni bir an olsun yalnız bırakmayarak maddi ve manevi destek veren, benimle birlikte en önemli emek ve pay sahibi, en büyük tâlihim, her şeyim, can içim, ikizim Gıda Yüksek Mühendisi F. Sema AKSOY'a teşekkürlerimi ve sevgilerimi sunarım.

Sağlıcakla…

A. Semra AKSOY

İÇİNDEKİLER

SİMGE LİSTESİ ix
KISALTMA LİSTESİ x
ŞEKİL LİSTESİ xi
TABLO LİSTESİ xii
ÖZET xiii
ABSTRACT xvi
1 GİRİŞ 1
1.1 Literatür Özeti ... 1
1.1.1 Hardalaliye ... 1
1.1.2 Hardaliye Ham Maddeleri ... 2
1.1.3 Fermantasyon ve Laktikasit Bakterileri ... 9
1.1.4 *In vitro* Sindirim ve Biyoerişilebilirlik ... 13
1.1.5 Metabolomik ... 16
1.1.6 Lipit Oksidasyonu ve Malondialdehit ... 24
1.2 Tezin Amacı ... 27
1.3 Hipotez ... 28
2 MATERYAL VE YÖNTEM 30
2.1 Hardaliye Örneklerinin Hazırlanması ... 30
2.2 Hardaliye Örneklerinin Kimyasal Analizleri ... 30
2.2.1 Hardaliye Örneklerinde pH Tayini ... 30
2.2.2 Hardaliye Örneklerinde Asitlik Tayini ... 30
2.2.3 Hardaliye Örneklerinde Kuru Madde Tayini ... 30
2.2.4 Hardaliye Örneklerinde Renk Ölçümü ... 31
2.2.5 Hardaliye Örneklerinde Toplam Şeker Tayini ... 31
2.2.6 Hardaliye Örneklerinde İnvert Şeker Tayini ... 31
2.2.7 Hardaliye Örneklerinde Alkol Tayini ... 33
2.3 Hardaliye Örneklerinin Mikrobiyolojik Analizleri ... 34
2.4 Hardaliye Örneklerinde Uçucu Bileşen Analizi ... 34
2.5 *In vitro* Sindirim Prosedürü ve Biyoerişilebilirliğin Hesaplanması ... 35
2.6 Ekstrakstların Hazırlanması ... 36
2.7 Hardaliye ve Sindirim Ekstraktlarının Spektrofotometrik Analizleri ... 37

2.7.1 Toplam Fenolik Madde Miktarı Tayini 37
2.7.2 Toplam Flavonoid Madde Miktarı Tayini..... 37
2.7.3 Toplam Monomerik Antosiyanin Miktarı Tayini 38
2.7.4 DPPH (1,1-difenil-2 pikrilhidrazil) Yöntemiyle Toplam Antioksidan Kapasite Tayini..... 38
2.7.5 CUPRAC Yöntemiyle Toplam Antioksidan Kapasite Tayini 39
2.8 Hardaliye Örneklerinde *in vitro* Glisemik İndeks Belirlenmesi..... 39
2.9 Malondialdehit (MDA) Analizi 40
2.10 HPLC ile Fenolik Bileşiklerin Profili..... 42
2.11 LC-QTAF-MS ile Metabolit Profili 42
2.12 İstatistiksel Değerlendirme..... 43
3 BULGULAR VE TARTIŞMA 44
3.1 Hardaliye Örneklerinin Kimyasal Analiz Bulguları 44
3.1.1 Hardaliye Örneklerinin pH Değerleri..... 44
3.1.2 Hardaliye Örneklerinin Asitlik Değerleri 44
3.1.3 Hardaliye Örneklerinin Kuru Madde Değerleri 44
3.1.4 Hardaliye Örneklerinin Renk Değerleri 45
3.1.5 Hardaliye Örneklerinin Toplam Şeker ve İnvert Şeker Değerleri ... 45
3.1.6 Hardaliye Örneklerinin Alkol Değerleri 46
3.2 Hardaliye Örneklerinin Mikrobiyolojik Özellikleri 47
3.3 Hardaliye Örneklerinde Uçucu Bileşen Profili 47
3.4 Hardaliye Ekstraktlarının Biyoaktif Bileşen Buguları 52
3.4.1 Hardaliye Ekstraktlarının Toplam Fenolik Madde Miktarları..... 52
3.4.2 Hardaliye Ekstraktlarının Toplam Flavonoid Madde Miktarları..... 53
3.4.3 Hardaliye Ekstraktlarının Toplam Monomerik Antosiyanin Miktarları 54
3.4.4 Hardaliye Ekstraktrlarında CUPRAC ve DPPH (1,1-difenil-2 pikrilhidrazil) Yöntemiyle Toplam Antioksidan Kapasite Değerler. 55
3.5 Sindirim Ekstraktlarının Biyoaktif Bileşen Buguları..... 56
3.5.1 Sindirim Ekstraktlarının Toplam Fenolik Madde Değerleri..... 56
3.5.2 Sindirim Ekstraktlarının Toplam Flavonoid Madde Değerleri..... 59
3.5.3 Sindirim Ekstraktlarının Toplam Monomerik Antosiyanin Değerleri 61
3.5.4 Sindirim Ekstraktlarının CUPRAC ve DPPH Yöntemiyle Toplam

Antioksidan Kapasite Değerleri 64
3.6 *In vitro* Sindirim Sonrası % Biyoerişilebilirlik Değerleri..... 69
3.7 Hardaliye Örneklerinin *in vitro* Glisemik İndeksi..... 75
3.8 Hardaliye Örneklerinde *in vitro* Sindirim Öncesi ve Sonrası Fenolik Bileşiklerin Profili ve % Biyoerişilebilirlik Değerleri 77
3.9 Hardaliye Örneklerinde *in vitro* Sindirim Öncesi ve Sonrası LC-MS Tabanlı Metabolomik Yaklaşım İle Metabolitlerin Tanımlanması..... 86
3.10 Hardaliye Muamelesinin Et Ürünlerinde Malondialdehit (MDA) Değerine Etkisi..... 95
4 SONUÇ VE ÖNERİLER **104**
KAYNAKÇA **108**
A HPLC Kromatogram ve Pikleri **139**
B LC-MS Kromatogramları **143**
TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR **146**

SİMGE LİSTESİ

α	Alfa
β	Beta
g	Gram
*a**	Kırmızılık
kob	Koloni oluşturan birim
L	Litre
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
mg	Miligram
mL	Mililitre
M	Molar
Nm	Nanometre
N	Normal
*L**	Parlaklık
°C	Santigrad derece
*b**	Sarılık
U	Ünite
%	Yüzde

KISALTMA LİSTESİ

AAE	Askorbik Asit Eşdeğeri
ABTS	2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)
CUPRAC	Cupric Reducing Antioxidant Capacity
DPPH	1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl radical
DRBC	Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol Agar
FRAP	Ferric Reducing Ability of Plasma
GAE	Gallik Asit Eşdeğeri
GI	Glisemik İndeks
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
KE	Kateşin Eşdeğeri
LAB	Laktik Asit Bakterisi
MDA	Malondialdehit
mM	mili Molar
MRS	Man Rogosa Sharpe Agar
Mv-3-glu	Malvidin-3-glukozit
ORAC	Oksijen Radikali Absorbans Kapasitesi
QE	Kuersetin Eşdeğeri
RE	Rutin Eşdeğeri
Syn-3-glu	Siyanidin-3-glukozi
TBARS	Tiyobarbitürik Asit Reaktif Maddeler
TE	Trolox Eşdeğeri
TEAC	Trolocks Eşdeğer Antioksidan Kapasite

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1 Etil alkol standardına ait kalibrasyon eğrisi 34
Şekil 3.1 Hardaliye örneklerinin sindirim aşamalarındaki toplam fenolik madde değerleri 59
Şekil 3.2 Hardaliye örneklerinin sindirim aşamalarındaki toplam flavonoid madde değerleri.....61
Şekil 3.3 Hardaliye örneklerinin sindirim aşamalarındaki toplam monomerik antosiyanin değerleri 64
Şekil 3.4 Hardaliye örneklerinin sindirim aşamalarındaki CUPRAC değerleri..69
Şekil 3.5 Hardaliye örneklerinin sindirim aşamalarındaki DPPH değerleri 69
Şekil 3.6 Antosiyanin standartlarına ait HPLC kromatogramı.....83
Şekil 3.7 Merlot hardaliye örneğine ait HPLC kromatogramı 83
Şekil 3.8 Üç hardaliye çeşitinin sindirim öncesi ve sonrası metabolitlerinin nispi değişimine dayanan temel bileşen analizi (PCA biplot).....88

TABLO LİSTESİ

Tablo 2.1 Et ve içecek ürünlerinde bildirilen makro besin miktarları 41
Tablo 3.1 Hardaliye örneklerinin pH, toplam asitlik, kuru madde, renk, alkol, toplam şeker ve imvert şeker değerleri 46
Tablo 3.2 Gelişme tespit edilen örneklerin koloni sayıları 47
Tablo 3.3 GC-MS ile hardaliye örneklerinin kompozisyonunda belirlenen uçucu bileşenler ve yüzde (%) konsantrasyonları.....49
Tablo 3.3 GC-MS ile hardaliye örneklerinin kompozisyonunda belirlenen uçucu bileşenler ve yüzde (%) konsantrasyonları (devamı) 50
Tablo 3.3 GC-MS ile hardaliye örneklerinin kompozisyonunda belirlenen uçucu bileşenler ve yüzde (%) konsantrasyonları (devamı) 51
Tablo 3.4 Hardaliye örneklerinin toplam fenolik madde, toplam flavonoid madde toplam monomerik antosiyanin, toplam antioksidan kapasite değerleri 56
Tablo 3.5 Hardaliye örneklerinin sindirim aşamalarındaki toplam fenolik madde değerleri.....58
Tablo 3.6 Hardaliye örneklerinin sindirim sonrası toplam flavonoid madde değerleri 61
Tablo 3.7 Hardaliye örneklerinin sindirim sonrası toplam monomerik antosiyanin değerleri 64
Tablo 3.8 Hardaliye örneklerinin toplam antioksidan kapasite (mmol Trolox/L) değerleri 68
Tablo 3.9 Hardaliye örneklerinin sindirim sonrası % Biyoerişilebilirllik değerleri 75
Tablo 3.10 Hardaliye örneklerinin GI değerleri.....75
Tablo 3.11 Hardaliye örneklerinde sindirim öncesi ve sonrası fenolik bileşiklerin profili ve % biyoerişilebilirllik değerleri 84
Tablo 3.11 Hardaliye örneklerinde sindirim öncesi ve sonrası fenolik bileşiklerin profili ve % biyoerişilebilirllik değerleri (devamı).....85
Tablo 3.12 Hardaliye örneklerinin *in vitro* sindirim öncesi metabolit profili ...89
Tablo 3.12 Hardaliye örneklerinin *in vitro* sindirim öncesi metabolit profili (devamı).....90
Tablo 3.12 Hardaliye örneklerinin *in vitro* sindirim öncesi metabolit profili (devamı).....91
Tablo 3.13 Hardaliye örneklerinin *in vitro* sindirim sonrası metabolit profili ..92
Tablo 3.13 Hardaliye örneklerinin *in vitro* sindirim sonrası metabolit profili (devamı).....93
Tablo 3.13 Hardaliye örneklerinin *in vitro* sindirim sonrası metabolit profili (devamı).....94
Tablo 3.14 Hardaliye ve diğer içeceklerle muamele edilmiş et ürünlerinde MDA (μg/100g) değerleri..... 101
Tablo 3.14 Hardaliye ve diğer içeceklerle muamele edilmiş et ürünlerinde MDA (μg/100g) değerleri (devamı).....102
Tablo 3.14 Hardaliye ve diğer içeceklerle muamele edilmiş et ürünlerinde MDA (μg/100g) değerleri (devamı).....103

ÖZET

Hardaliye Biyoaktif Bileşiklerinin Potansiyel Biyolojik Etkilerine *in vitro* Metabolomik Yaklaşmlar

Ayşe Semra AKSOY

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Doktora Tezi

Danışman: Prof. Dr. Muhammet ARICI

Hardaliye koyu renkli siyah/kırmızı üzümlerden fermentasyon işlemiyle üretilen geleneksel bir içecektir. Üzüm meyvesinin biyoaktif bileşenlerce zengin olması ve üretiminin, biyoaktiviteyi geliştiren ve fitokimyasal içerikleri zenginleştiren fermentasyon tekniğine dayanması, hardaliyeyi önemli bir ürün yapmaktadır.

Bu tez çalışmasının amacı, üç farklı üzüm çeşidiyle (Shiraz, Merlot ve Cabernet Sauvignon) geleneksel üretim metodu kullanılarak hazırlanan hardaliyelerde *in vitro* gastrointestinal sindirim öncesi ve sonrasında; hardaliye biyoaktif bileşenlerinin miktarsal tayini ve antioksidan kapasitesinin tespit edilerek biyoerişilebilirliklerinin belirlenmesi, başta fenolik bileşikler olmak üzere metabolit profillerindeki degişikliklerin incelenmesi ayrıca hardaliyenin *in vitro* sindirim sonrası lipid peroksidasyonu üzerindeki inhibe edici etkisini farklı içecek türleriyle karşılaştırarak araştırmaktır.

In vitro gastrointestinal sindirim koşullarının etkisiyle bütün hardaliye örneklerinde toplam fenolik, flavonoid ve antosiyanin miktarları azalmıştır. Toplam fenolik madde değeri Shiraz, Merlot ve Cabernet Sauvignon hardaliyelerinde sırasıyla; 1639,74±82,85'den 751,02±9,92'ye,

2471,92±37,85'den 808,14±33,19'e ve 2347,87±69,23'den 760,79±3,15'a düşmüştür. Toplam flavonoid madde değeri Shiraz, Merlot ve Cabernet Sauvignon hardaliye için sırasıyla; %60,63 , %70,65 ve %72,73 azalmıştır. Antosiyanin miktarları ise Shiraz, Merlot ve Cabernet Sauvignon hardaliye için sırasıyla; 187,55±20,33'den 28,63±2,6'e, 264,59± 26,89'dan 23,93±9,44'e ve 339,68±10,50'den 33,83±2,26'e düşmüştür. *In vitro* sindirim antioksidan kapasite biyoerişilebilirliği de Shiraz hardaliyesinde CUPRAC testine göre %73,49±12,81 ve DPPH testine göre %151,57±2,03 olarak diğer hardaliyelere kıyasla önemli derecede daha yüksek bulunmuştur.

Sindirim öncesi hedefli fenolik bileşenlerin profili analizinde örneklerin benzer fenolik profiline sahip oldukları bulunmuştur. Sindirim sonrası örnekler kalitatif açıdan sindirim öncesi durum ile benzerlik gösterse de *in vitro* sindirim koşullarının, genel itibariyle fenolik bileşiklerin konsantrasyonunu azaltma yönünde etki yaptığı belirlenmiştir. Özellikle antosiyanin bileşiklerinin biyoerişilenilirliği bakımından Shiraz hardaliyenin öne çıktığı tespit edilmiştir. Hardaliyelerin kalitatif hedefsiz metabolit profili analiziyle 59 farklı metabolit tanımlanmıştır. Sindirim öncesi ve sonrası metabolit profilinde tespit edilen değişimlerin, üzüm çeşitinden kaynaklanan farklılıkların yanı sıra *in vitro* gastrointestinal sindirim koşullarının etkisiyle gerçekleştiği belirlenmiştir. Çalışmada, et ürünlerinin sindirimi sırasında meydana gelen lipid oksidasyonunun bir ürünü olan Malondialdehit (MDA)'in biyoerişilebilirliğini azaltmada hardaliye muamelesinin diğer içeceklere kıyasla daha etkili olduğu ortaya konulmuştur. MDA biyoerişilebilirliği açısından en düşük değerler 10,27±0,05 ile D1 de Shiraz muamelesi sonrası, 22,40±0,11 ile H2 de Shiraz muamelesi sonrası ve 7,12±0,05 ile K2 de Cabernet Sauvignon muamelesi sonrası tespit edilmiştir. Ayrıca Shiraz hardaliyesinin önceki sonuçlarında desteklediği gibi, MDA biyoerişilebilirliğini düşürmede de genel itibariyle en etkili hardaliye olduğu belirlenmiştir.

Hardaliyelerin; biyoaktif bileşenleri, metabolit profili ve lipid oksidasyonundaki etkinliği gibi antioksidan özellikleri, *in vitro* sindirim koşulları çerçevesinde değerlendirilerek, literatüre hardaliyenin potansiyel sağlık yararlarına ışık tutan bilimsel bilgi sağlanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Hardaliye, biyoaktif bileşikler, *in vitro* sindirim, metabolomik.

ABSTRACT

In vitro Metabolomic Approaches to the Potential Biological Effects of Hardaliye Bioactive Compounds

Ayşe Semra AKSOY

Department of Food Engineering

Doctor of Philosophy Thesis

Supervisor: Prof. Dr. Muhammet ARICI

Hardaliye is a traditional beverage produced by fermentation from dark black/red grapes. Producing from grape fruit rich in bioactive components by fermentation technique that improves bioactivity and enriches phytochemical contents makes hardaliye an important product.

The aim of this thesis study is, Before and after *in vitro* gastrointestinal digestion in hardaliyes prepared by traditional production method with three different grape varieties; Quantitative determination of hardaliye bioactive components, determination of antioxidant capacity and determination of bioaccessibility, to examine the changes in metabolite profiles, especially phenolic compounds, and to investigate the inhibitory effect of hardaliye on lipid peroxidation after *in vitro* digestion by comparing it with different beverage types.

Total phenolic, flavonoid and anthocyanin amounts decreased in all hardaliye samples under the influence of *in vitro* gastrointestinal digestion conditions. Total phenolic content values decreased in Shiraz, Merlot and Cabernet Sauvignon hardaliye, respectively; from 1639.74±82.85 to 751.02±9.92, from 2471.92±37.85 to 808.14±33.19, and from 2347.87±69.23 to 760.79±3.15.

Total flavonoid content values decreased for Shiraz, Merlot and Cabernet Sauvignon hardaliye, respectively; by 60.63%, 70.65% and 72.73%. Anthocyanin amounts decreased for Shiraz, Merlot and Cabernet Sauvignon hardaliye respectively; from 187.55±20,33 to 28.63±2,6, from 264.59±26.89 to 23.93±9.44, and from 339.68±10.50 to 33.83±2.26. Shiraz hardaliye was less affected by *in vitro* digestion conditions than Merlot and Cabernet Sauvignon hardaliyes. Antioxidant capacity increased in hardaliyes after *in vitro* digestion, and similar to previous results, the antioxidant capacity bioavailability of Shiraz hardaliye was found to be significant higher.

In the profile analysis of the targeted phenolic compounds in Hardaliye samples before digestion, it was found that the samples had similar phenolic profiles. Although the post-digestion samples were qualitatively similar to the pre-digestion state, it was determined that *in vitro* digestion conditions had an effect on reducing the concentration of phenolic compounds in general. It was determined that Shiraz hardaliye stands out especially in terms of bioaccessibility of anthocyanin compounds. After the qualitative untargeted metabolite profile analysis of Hardaliyes, 59 different metabolites were identified. It has been determined that the changes detected in the metabolite profile before and after digestion occur with the effect of *in vitro* gastrointestinal digestion conditions and differences arising from the grape variety. In the study, it was revealed that hardaliye treatment is more effective than other beverages in reducing the bioaccessibility of Malondialdehyde (MDA), a product of lipid oxidation that occurs during the digestion of meat products. The lowest values in terms of MDA bioaccessibility were determined after Shiraz treatment in D1 with 10,27±0,05, after Shiraz treatment in H2 with 22.40±0.11 and after Cabernet Sauvignon treatment in K2 with 7.12±0.05. In addition, Shiraz hardaliye was determined to be the most effective hardaliye in general in reducing MDA bioavailability, as supported by previous results.

Hardaliyes; bioactive components, metabolite profile and antioxidant properties such as efficacy in lipid oxidation were evaluateing within the framework of *in vitro* digestion conditions, scientific information that sheds light on the potential health benefits of hardaliye was provided.

Keywords: Hardaliye, bioactive compounds, *in vitro* digestion, metabolomics.

1
GİRİŞ

1.1 Literatür Özeti

1.1.1 Hardaliye

Üzüm ve üzüm içerikli gıdalar, yüz yıllardır bol miktarda üretilen ve tüketilen vazgeçilmez ürünlerdir (Prado vd., 2008). Ana hammaddesi yaş üzüm olan hardaliye; fermente, aynı zamanda alkolsüz bir içecektir (TGK, 2007). Hardaliyenin, tüketimi antik çağlara dayanan geleneksel bir içecek olduğu bilinmektedir. Üretiminin ve tüketiminin çokça olduğu Trakya Bölgesi'nin özellikle Kırklareli ve çevresiyle özdeşleşmiştir (Prado vd., 2008; Gucer vd., 2009).

Üretiminde özellikle koyu renkli üzümlerin tercih edildiği hardaliye, laktik asit fermantasyonundan elde edilmektedir. Geleneksel bir ürün olması sebebiyle üretim teknikleri değişkenlik gösterse de aşamaları; üzümlerin yıkanması ve ezilmesi, ezilmiş üzümler ile %1-2 oranında hardal tohumunun karıştırılarak fermantasyona tabi tutulması ve karışımın süzülmesi olarak sıralanabilir (Prado vd., 2008; Gucer vd., 2009; Coşkun, 2001). Hardaliyenin geçmişte; üzüm şırası ile dolu küp içerisine öğütülmüş ve bir tülbent içerisine konulmuş hardal tohumlarının sarkıtılması suretiyle veya bir miktar şıra ile ısıtılıp soğutulan hardal tohumlarının fıçı içerisindeki şıraya ilave edilmesi şeklinde fermente edildiği rapor edilmiştir (Coşkun, 2001).

Hardal tohumu kullanılmasındaki birincil amaç ürünün muhafazasına katkı sağlamasıdır. Hardal tohumunun türüne göre değişiklik gösteren yapısındaki, uçucu yağın en etkin maddesi allil izotiyosiyanat bakterisidal etki gösterir (Demiray, 2019). Sülfür bileşiklerinin bir grubu olan glukosinolatların enzimatik reaksiyonla parçalanması sonucu ortaya çıkan allil izotiyosiyanat hardalın kendine has aromasından büyük ölçüde sorumludur (Mithen vd., 2000). Ayrıca allil izotiyosiyanatların maya aktivitesini engellediğinden alkol oluşumunu

azaltmada etkili olabileceği düşünülmektedir (Coşkun, 2001; Arici ve Coşkun, 2001; Amoutzopoulos, 2013).

Üretim sırasında hardaliyenin asitliğini arttırarak antimikrobiyal etki sağlayan laktik asit bakterileri genel itiberiyle; *Lactobacillus paracasei subsp. paracasei, Lactobacillus casei subsp. pseudoplantarum, Lactobacillus brevis, Lactobacillus pontis, Lactobacillus acetotolerans, Lactobacillus sanfrancisco* ve *Lactobacillus vaccinostercus* izolatları olarak tanımlanmıştır (Arici ve Coşkun, 2001; Amoutzopoulos, 2013).

Taze üzümlerden fermantasyon yöntemiyle üretilmesi nedeniyle, hardaliyenin yapısında antioksidan özelliklere sahip çeşitli fenolik bileşikleri bulundurabileceği ön görülmektedir. Hardaliyenin sahip olduğu özellikler, onu geniş bir popülasyon tarafından tüketilebilen fonksiyonel bir içecek haline getirir. Hardaliye; alkolsüz olması ve tatlımsı tadı nedeniyle küçük çocuklar için; yağ içermemesi nedeniyle hiperlipidemik bireyler için; süt içermemesi nedeniyle süt alerjisi ya da laktoz intoleransı olan bireyler için; tuz içermemesi nedeniyle tansiyon problemi olan bireyler için uygundur ayrıca vejetaryenler tarafından da tüketilebilir (Amoutzopoulos, 2013).

1.1.2 Hardaliye Hammaddeleri

1.1.2.1 Üzüm, Üzümde Bulunan Biyoaktif Bileşenler ve Sağlık Etkileri

Dünyadaki en değerli meyvelerden biri olan üzümün, taze ve işlenmiş ürünleri tüketim için yaygın olarak yetiştirilmektedir. Botanikte *Vitis* cins adı verilen asma bitkisinin meyvesi olan üzümün dünya çapında *Vitis vinifera* grubuna ait 3000'den fazla çeşidi yetiştirilmesine rağmen, toplam alanın %50'sinden fazlasını yaklaşık 35 elit çeşit oluşturmaktadır. Taze tüketim için en popüler asma çeşidi 'Thompson Seedless' iken; popüler şaraplık çeşitler , 'Chardonnay', 'Cabernet Sauvignon', 'Merlot' ve 'Shiraz' dır (Dhekney, 2016). Dünya'da en çok üretilen meyvelerden biri olan üzüm, taze olarak tüketilmesinin yanında farklı metotlar ile işlenip raf ömrü arttırılarak da tüketilebilmekte; büyük bir kısmı şarap üretimi için kullanılmakta, bunu taze tüketim ve reçel, jöle ve meyve suyu gibi diğer işlenmiş ürünler izlemektedir (Dhekney, 2016; Çelik, 2012).

Azotlu bileşikler, mineral maddeler, renk maddeleri ve tanenler üzüm kabuğunda bulunurken; kabuğa yakın kısımda yine azotlu maddeler, şeker ve pektin; çekirdeğe yakın olan kısmında kuru madde ve asit bulunmakta; çekirdek ise tanen ve yağ içermektedir. Yaklaşık %70-80 oranında su içeriğine sahip üzümde meyve suyu randımanı % 70-75 ve kuru madde oranı %14-21'dir. Üzüm yapısındaki şekerler büyük çoğunlukla glukoz ve fruktozdan oluşmakta ve ağırlığın yaklaşık %20'sini oluşturmaktadır. Üzümün olgunlaşması aşamasında; başlangıçta yüksek olan asit miktarı azalmakta ve düşük olan şeker miktarı ise artmaktadır, bu aşamada difüzyon yolu ile doğrudan kana geçen fruktoz ve glukoz miktarı hemen hemen eşit ise de aşırı olgunlaşmış üzümlerde fruktoz miktarı daha fazla olmaktadır (Gürbüz, 2013; Jale ve Cemeroğlu, 1986; Soleas vd., 1997). Üzümün; kalsiyum, potasyum, sodyum ve demir gibi mineral maddelerce zengin olduğu ayrıca A, B1, B2, ve C gibi vitaminler yönünden de önemli bir kaynak olarak kabul edilmektedir (Çelik vd., 1998).

Üzüm, antioksidan, antimikrobiyal ve anti-inflamatuar etkileri sebebiyle beslenme dışında terapötik amaçlı kullanılan ilk meyvelerdendir (Rauf vd., 2016). Sahip olduğu bu olumlu sağlık etkileri üzümün zengin fenolik içeriği ile ilişkilendirilmektedir. Fenolik bileşikler özellikle meyve ve sebzelerde renk, tat ve koku gibi ürüne has özellikler üzerinde de etkili olan sekonder metabolitlerdir. Kimyasal yapıl olarak genel itibariyle bir veya daha çok hidroksil grubuna sahip siklik yapıdaki benzenlerden oluşurlar. Bu bileşikler üzüm meyvesinin özellikle kabuk ve çekirdek kısmında yoğun bulunmaktadır (Gürbüz, 2013; Jale ve Cemeroğlu, 1986). Üzümde bulunan fenolik bileşiklerin de üzümün rengini, tadını, ağızda bıraktığı hissi, kokusunu ayrıca antimikrobiyal ve antioksidan etkiler gibi birçok özelliğini değiştirebildiği bilinmektedir.

Biyoaktif bileşikler, başta meyve, sebze ve kepekli tahıllar olmak üzere gıdalarda az miktarda bulunur ve temel besin değerinin ötesinde sağlık yararları sağlar (Gökmen, 2016). Bu bileşikler, proinflamatuar durumu, oksidatif stresi ve metabolik bozuklukları azaltırken, enerji alımını etkileyen terapötik potansiyel sunabilen moleküllerdir (Siriwardhana vd., 2013). Epidemiyolojik çalışmalar, vitaminler, fitokimyasallar ve flavonoidler ve karotenoidler gibi fenolik bileşikler gibi antioksidan aktiviteye sahip biyoaktif bileşiklerce zengin gıdaların yüksek

miktarda tüketilmesinin insan sağlığı üzerinde olumlu bir etkiye sahip olduğunu; kanser, kalp hastalığı, felç, alzheimer, diyabet, katarakt ve yaşa bağlı fonksiyonel çöküş gibi birçok hastalık riskini azaltabileceğini göstermektedir (Siriwardhana vd., 2013; Hassimotto vd., 2009). Üzümün kimyası, fenilpropanoidler, izoprenoidler ve alkaloidler gibi ikincil metabolitler dahil olmak üzere oldukça karmaşıktır. Bitkide ve buna bağlı olarak üzüm ürünlerinin yapımında kullanılan çeşitlerde üretimi verimli bir şekilde yönetmek için, fenolik bileşiklerin biyosentezini anlamak önemlidir (Dhekney, 2016).

Fenolik bileşikler, bitki ve mantar dokusundan elde edilen ikincil metabolitlerdir. Bütün fenolik bileşikler, hidroksil sübstitüentli en az bir aromatik halka içerir (Crozier vd., 2009; Tsao, 2010). Üzümdeki fenolik maddelerin önemli bir kısmını flavonoid bileşikler oluşturur. Flavonoidler, bitkisel kaynaklı gıdaları içeren bitki dokusundaki geniş dağılımları nedeniyle ana fenolik gruptur (Barba vd., 2014). Antosiyaninler, flavanoller (flavan-3-ol monomerleri ve proantosiyanidinler) ve flavonoller, birçok enzimin ve flavonoid biyosentezinin ürünleridir ve üzüm meyvelerinde bulunan en önemli flavonoidlerdir (Boss vd., 1996) . Üzüm kökenli flavonoid olmayan fenolikler, başlangıçta fenilalanin'den sentezlenir (Hrazdina vd., 1984). Üzümlerde bulunan bu bileşikler, esas olarak hidroksibenzoik ve hidroksisinamik asitlere karşılık gelir bununla birlikte, hidroksisinamik asitler dışında, düşük konsantrasyonlarda bulunurlar (Peña-Neira, 2017). Tanenler (proantosiyanidinler) üzüm meyvelerinde en bol bulunan diğer bir fenolik sınıfıdır ve üzüm içeceklerinde tatdaki burukluğun baskın belirleyicileridir (Souquet vd., 1996; Cheynier vd., 1997). Üzümdeki diğer önemli fenolik bileşikler arasında antosiyaninler, benzoik asitler, sinnamik asitler ve flavonoller bulunur (Flanzy, 1998).

Antosiyaninler, bazı üzüm çeşitlerinin kırmızı ve mor renklenmesini sağlar ve bu nedenle sofralık üzüm ve şarapta önemli kalite faktörleridir. Malvidin türevleri genellikle üzümlerde en bol bulunan antosiyaninlerdir (Chervin vd., 2012). Antosiyaninler üzümden üretilen içeceklerin renginden sorumludur. Üzüm meyvelerinde en yaygın flavonoid sınıflarından biri olan antosiyaninler; güneş ışığına ve ultraviyole radyasyona karşı koruma, serbest radikal temizleme ve antioksidatif kapasite, birçok farklı patojene karşı savunma, predatörlerin tohum

yayılımı için çekiciliği ve ayrıca önerilen sinyal kaskadlarının yeni modülasyonu dahil çok sayıda biyolojik role sahiptir (Chalker-Scott, 1999; Schaefer vd., 2004; Takahama, 2004). Antosiyanin biyosentezi, yalnızca meyvenin olgunlaşması başladığında başlar ve normal olarak büyümenin olgunlaşma aşaması boyunca devam eder. Çeşitlilik, büyüme bölgesi, çevre ve büyüme koşulları gibi faktörler antosiyanin seviyelerini etkileyebilir (Peña-Neira vd., 2007; Matus vd., 2009). Bu faktörlerin yanı sıra sıcaklık ve ışık da bitkilerde antosiyanin biyosentezini etkiler. Yüksek sıcaklıkta (>35 °C) antosiyanin birikimindeki azalma, antosiyanin degradasyonu gibi faktörlerin yanı sıra antosiyanin biyosentetik genlerinin mRNA transkripsiyonunun inhibisyonundan kaynaklanmaktadır (Mori vd., 2007). Kabuklarında antosiyanin sentezi için mutlak ışık gereksinimi olan bazı meyvelerin aksine, üzümler kabuklarında ışıklı veya ışıksız antosiyaninler biriktirebilir (Peña-Neira, 2017).

Antioksidan aktiviteler, üzümlerden elde edilen fenolik bileşiklerin en dikkate değer biyoaktivitesidir ve bu nedenle, diğerleri arasında, serbest radikallerin temizlenmesi, lipid oksidasyonunun inhibisyonu ve hidroperoksit oluşumunun azaltılması dahil olmak üzere, antioksidatif özellikler geniş çapta çalışılmıştır (Meyer vd., 1997; Dolara vd., 2005). Üzümün farklı kısımlarında, en yüksek antioksidan kapasite üzüm çekirdeğinde bulunurken, bunu kabuk takip etmekte ve en düşük antioksidan kapasiteyi ise etli kısım göstermektedir (Pastrana-Bonilla vd., 2003). Birçok araştırmacı, üzüm ekstraktlarının antioksidan aktivitelerinden esas olarak hangi fenolik bileşiklerin ve kimyasal yapıların sorumlu olduğunu keşfetmeye çalışmıştır. Bir üzüm örneğinin antioksidan aktivitesi, tek bir bileşikten ziyade birkaç bileşik arasındaki sinerjik bir etkiye bağlı olabilmektedir (Maier vd., 2009).

Üzüm ve işlenmiş ürünleri, sağlığa faydalı bileşikler açısından zengin bir kaynaktır. Su, şekerler, asitler, amino asitler ve mineral elementlere ek olarak bir takım fitokimyasallar mevcuttur. Üzüm, sodyum ve kolesterol içermemesine rağmen önemli bir mineral element ve vitamin kaynağıdır. Üzüm tüketiminin faydalı etkileri, mevcut polifenollerin mevcudiyetine de bağlıdır. Üzüm ve üzüm ürünlerinin tüketilmesiyle bir dizi polifenolün emildiği ve metabolize edildiği

bildirilmektedir. Emilim oranları, bu tür bileşiklerin kimyasal yapısından, alınan miktardan ve diyet kaynaklarından etkilenir (Dhekney, 2016).

Üzüm ürünlerinin faydalı özellikleri, yoğun bir çalışmanın konusu olmuştur. Çeşitli fenolik bileşikler, farklı antioksidan kapasiteler sergiler; bu nedenle, üzüm ve üzüm ürünlerinin antioksidan aktivitesi, mevcut polifenollerin içeriği ve seviyesi ile doğrudan ilişkilidir. Bu tür antioksidanlar, sindirim sisteminde yiyeceklerin lipid oksidasyonunu önleyebilir. Üzüm ve üzüm suyunda bulunan bazı fitokimyasallar antikanser özellikler sergiler. Örneğin resveratrol, üzüm ürünlerinde sağlığa yararlı özellikleri nedeniyle yoğun olarak araştırılan önemli bir anti-inflamatuar stilbenoiddir. Ayrıca resveratrolün, bir dizi stres sinyal molekülüne dahil olması nedeniyle, çeşitli kanser türlerinin kemoterapiye karşı kemosensitivitesini arttırdığı da gösterilmiştir. Kateşin ve epikateşin gallat gibi diğer fitokimyasallar, nöroinflamasyonu baskılayabilir ve endojen nörotoksinlerin üretimi nedeniyle beyin yaralanmalarından kaynaklanan Parkinson hastalığına karşı koruma sağlayabilir. Antosiyaninler ayrıca bilişsel beyin işlevini iyileştirebilir ve yaşa bağlı oksidatif stresi azaltarak nöroprotektif yetenekler sağlayabilir. Üzüm ürünlerini tüketmekten elde edilen diğer sağlık yararları arasında diyabetin daha iyi yönetilmesine yol açan; kan şekeri dengesinde daha iyi bir kontrol, insülin regülasyonu ve artan insülin duyarlılığı yer alır. Üzüm, düşük glisemik indeksli bir gıda olarak sınıflandırılır ve kan şekeri dengesini korumakta güçlük çeken kişiler tarafından tüketilebilir. Düzenli olarak koyu renkli üzüm suyu tüketimi, patojen tespitinden sorumlu olan ve patojen saldırısında acil savunma hattı görevi gören bağışıklık gözetim hücrelerinin dolaşımını önemli ölçüde iyileştirerek bağışıklığı iyileştirebilir (Dhekney, 2016).

1.1.2.2 Hardal tohumu

Hardal, Türk Gıda Kodeksi Baharat Tebliği'ne (Tebliğ No: 2013/12) göre; *Brassica nigra, Brassica juncea, Sinapis alba* türlerine dahil bitkilerin tohumları veya bunların öğütülmüş formu olarak tanımlanır. Hardal tohumunun hardaliye üretiminde kullanılmasındaki amaç üzüm şırasında oluşabilecek maya faaliyetini önleyerek alkol fermantasyonunu engellemektir (Gürbüz, 2013).

Baharatların sahip olduğu antimikrobiyal etkinlikleri, bitki türüne, yetiştirilen coğrafya koşulları ve iklime, hasat zamanına ve etki ettiği mikroorganizma türüne ayrıca eklendiği gıdanın yapısına ve kullanılan baharatların miktarına göre farklılık gösterebilmektedir (Cutter, 2000; Faydaoğlu ve Sürücüoğlu, 2013; Oussalah vd., 2007; Şahin, 2015). Antimikrobiyal etkiye sahip baharatların gıdalarda kullanılmasıyla, muhafaza amacıyla kullanılması gereken yapay koruyucu miktarı azaltılabilmektedir.

Hardal bitkisinin glukozinolat içeriği zengindir (Gürbüz, 2013). Glukozinolatların antimikrobiyal etkilerinin yanı sıra, antikanser, antiinflamatuar, antioksidan ve antimutajenik etkiler sergilediği bildirilmiştir (Mazumder vd., 2016). Glukozinolatların hidrolizyle oluşan ürünleri pankreas, karaciğer, ince bağırsak ve kolonda tümör oluşumunu önlediğine dair literatür bilgileri mevcuttur (Mazumder vd., 2016). Öğütüldüğünde çok az kokusu olmasına karşın, hardal tohumları suyla karıştırıldığında hücre içerisinde bulunan mirosinaz enzimi tohumdaki glukozinolatları parçalayarak allil izotiyosiyantları oluşturmasıyla, hardala özgü keskin koku ve lezzetin oluşmasına neden olmaktadır (Abul-Fadl vd., 2011; Coşkun vd., 2012; Popova ve Morra, 2014). Siyah hardal uçucu yağları allil izotiyosiyanat içeriğinden dolayı çok kuvvetli bir antimikrobiyaldir (Coşkun ve Arici, 2011). Coşkun (2001), hardaliye üretiminde kullanılması için siyah hardal tohumunun mikrobiyolojik özellikler ve aroma bakımından daha uygun olduğunu, hafif aroma istendiği takdirde siyah hardal tohumu ile beyaz hardal tohumunun karşımı olarak kullanılabileceğini bildirmiştir.

Hardaliyenin en önemli karakteristik özelliklerinden biri alkolsüz fermente içecek olmasıdır, bu nedenle hardaliye üretiminde maya gelişimi ve aktivitesi istenmeyen bir durumdur. Hardaliye üretimindeki fermantasyon aşamasında, mayaları inhibe etme açısından hardaliye etkisi yetersiz olabilir bu nedenle geleneksel üretimden olmasa da özellikle ticari üretim sırasında kimyasal katkı maddelerine (benzoatlar ve sorbatlar) ihtiyaç duyulmaktadır (Aydoğdu vd., 2014; Coşkun vd., 2012).

1.1.2.3 Sorbat ve Benzoatlar

Koruyucular Gıda Katkı Maddeleri Yönetmeliği'ne göre "Gıdaları, mikroorganizmaların sebep olduğu bozulmalara ve/veya patojen mikroorganizmaların gelişmelerine karşı koruyarak raf ömürlerinin uzatılmasını sağlayan maddeler" olarak tanımlanmıştır (Türk Gıda Kodeksi Gıda Katkı Maddeleri Yönetmeliği, 2013). Küf ve maya gelişimini önlemek amacıyla koruyucu katkı maddeleri olarak sorbatlar ve benzoatlar uzun yıllardır gıda endüstrisinde kullanılmaktadır (Gürbüz, 2013).

Sorbik asit ürünün organoleptik özelliklerini etkilemeyen ve fizyolojik olarak zararlı olmayan 1950'lerden bu yana gıda endüstrisinde kullanılan bir koruyucudur. Sodyum, potasyum ve kalsiyum tuzları formunda kullanılmasının yanı sıra serbest asit formunda da kullanılabilmektedir (Gürbüz, 2013). Sorbatlar metabolik aktiviteyi bozmak, hücre membranının bütünlüğünü etkilemek suretiyle taşınım fonksiyonlarını bozmak veya sülfidril içeren enzimlerin inhibisyonu sonucu etki şeklinde mekanizmalarla antimikrobiyal etki gösterebilmektedir (Davidson vd., 2005). Laktik asit bakterilerine kıyasla mayalar üzerine daha çok inhibe edici etki göstermeleri nedeniyle Sorbatlar laktik asit fermantasyonu gerçekleşen ürünlerde; yüzey küflerini engellemek için hububat, et ve meyvelerde; antimikrobiyal olarak da reçel, ketçap ve turşu gibi ürünlerde tercih edilmektedir (Davidson vd., 2005; Lück ve Jager, 1997; Öztürkcan ve Sıla, 2017).

Gıda endüstrisinde en çok kullanılan diğer bir antimikrobiyal katkı maddeleri benzoik asit ve tuzlarıdır. Benzoik asit tuzları yüksek çözünürlükleri nedeniyle daha çok tercih edilmektedir. pH 2,5–4,0 gibi asidik ortamlarda daha iyi etki gösterirler. Alkolsüz içecekler, meyve ve sebze ürünlerinde antimikrobiyal gıda katkı maddesi olarak kullanılmaları yaygındır. Etki mekanizmalarının proton taşıma sistemini bozmak ve enzim inhibisyonuna neden olmak şeklinde olduğu belirtilmiştir (Davidson vd., 2005).

Sorbatlar ve benzoatların FDA (US Food and Drug Administration) tarafından güvenli (GRAS, Generally regarded as safe) olarak tanımlandığı ayrıca gıdalarda

kullanılmalarının genotoksik bir etki oluşturmadığı bilinmektedir (Gürbüz, 2013).

1.1.3 Fermantasyon ve Laktik Asit Bakterileri

Fermantasyon, mikroorganizmaların etkisiyle gerçekleşen; gıdaların bozulmaya karşı korunmasına yardımcı olarak raf ömrünü uzatmaya ve organoleptik özellikleri iyileştirmeye katkıda bulunan; makro besinlerin dönüştürülmesi ve antioksidan peptitlerin ve fenolik bileşiklerin salınması yoluyla gıdanın beslenme profilini değiştiren en eski ve en ekonomik gıda biyoişleme yöntemlerinden biridir (Leonard vd., 2021).

Bozulabilir gıdaları muhafaza etmek amacıyla insanlık tarihi boyunca en yaygın kullanılan yöntem fermantasyon işlemidir. Fermantasyon ile bir gıdanın besin değeri korunabilir hatta bazı durumlarda iyileştirilebilir (Holzapfel, 2015). Enzim ve mikroorganizmaların aktiviteleriyle gerçekleşen fermantasyon, birincil gıda ürünlerinde biyokimyasal modifikasyon için tercih edilen bir işlemdir. Gıdaların muhafazasına katkıda bulunarak raf ömrünü iyileştirmenin yanında besin değeri, tat, aroma ve doku gibi çeşitli özellikleri de geliştirebilir (Gotcheva vd., 2000). Bu özelliklerinin yanı sıra fermantasyon işlemi, esansiyel amino asitler ve vitaminler gibi beslenme açısından kritik öneme sahip bileşiklerin oluşmasına da katkıda bulunur. Böylelikle fermente edilmiş gıdalar sağlığı korumak ve hastalıkları önlemek için önemli bir potansiyele sahip olur (Kabak ve Dobson, 2011).

Fermente gıdalar, sahip oldukları fitokimyasalların (fenolik bileşikler, flavonoidler, biyoaktif peptitler, vb.) ve bunların yanı sıra besleyici moleküllerin (besinler, vitaminler, mineraller, lifler vb.) sayesinde tüketiciye çeşitli sağlık yararları sağlarlar. Fermente içecekler de yiyecekler gibi dünya çapında çokça tercih edilmektedir. Gıdanın sahip olduğu biyoaktif bileşiklerin profilinde ve türlerinde değişikliklere sebep olan bu süreçte, şeker içeriği veya antibesinsel bileşikler azalırken, biyoaktif peptitler, kısa zincirli yağ asitleri ve polisakkaritler gibi moleküller üretilir ve fenolik bileşikler biyolojik değeri yüksek moleküllere dönüştürülür. Prebiyotik ve/veya probiyotik potansiyel mevcudiyeti ile ilgili olan bu dönüşümler ve gıda bileşenlerinin biyoerişilebilirliğinin ve biyoyararlanımının

iyileştirilmesi, sağlıkla ilgili özelliklerde olumlu değişikliklere neden olur (Septembre-Malaterre vd., 2018).

Fermente içeceklerin üretiminde de laktik asit bakterilerinin fermantasyonu, çeşitli fermantasyon süreçleri arasında yaygındır. Laktik asit bakterileri gram pozitif, kok veya çubuk şekilli, anaerobik ve aerotolerant, karbonhidratları fermente ederek enerji ve son ürün olarak laktik asit oluşturan bakteriler olarak tanımlanmaktadır (Salminen ve Von Wright, 2004). Birçok fermente gıdanın üretiminde laktik asit bakterileri rol almaktadır (Leroy ve De Vuyst, 2004). Başlangıçta meyve ve sebzelerde aerobik bozulma etmeni bakteriler ile birlikte birçok küf ve maya bulunmaktadır. Gıda içerisinde bulunan mikroorganizmalar uygun ortam bulduklarında gelişerek üründe bozulmaya neden olurlar (Nguyen ve Carlin, 1994). Laktik asit bakterileri başlangıçta düşük sayıda olsa da fermantasyonun gerçekleşmesiyle laktik asit oluşmaya başlar ve asitliğin artması ayrıca laktik asit bakterilerinin ürettiği bakteriyosin gibi antimikrobiyal maddeler nedeniyle ortamdaki diğer mikroorganizmaların gelişiminin baskılanması veya inhibe olmaları sonucu laktik asit bakterileri hakim tür haline gelir (Breidt vd., 2013; Salminen ve Von Wright, 2004).

Laktik asit bakterileri, gıdanın kokusuna, rengine ve faaliyetleri sırasında ürettikleri organik asitlerin verdiği asidik tat ile tadına etki eder ayrıca lipolitik ve proteolitik aktiviteleri sayesinde aroma bileşiklerinin oluşumuna neden olurlar. Laktik asit bakterilerinin gıda ortamında gelişmesi karbonhidrat içeriğinde azalmaya, esansiyel amino asitlerin zenginleşmesine, protein içeriğinin ve sindirilebilirliğinin arttırılmasına bunların yanı sıra ortamındaki bazı bileşenlerin toksisitesinin azalmasına veya uzaklaşmasına neden olmaktadır (Steinkraus, 1997).

Starter kültür olarak kullanılan laktik asit bakterilerinin birçoğu GRAS listesinde bulunmaktadır. Laktik asit bakterileri antimikrobiyal ajanlar olarak da görev yaparlar; bunun nedeni içeriğinde bulundukları gıdada bozulmaya sebep olabilecek mikroorganizmaların inhibisyonunda rol alan bakteriyosin, karbondioksit, hidrojen peroksit, laktik asit ve asetik asit gibi çeşitli antimikrobiyaller üretmeleridir. Laktik asit bakterileri, gıdalarda raf ömrünü

uzatması, patojen mikroorganizmaları biyokontrolü, doğal olması sebebiyle sağlıklı bir yöntem olarak görülmesi, işleme maliyetlerinin düşürüleceğine inanılması ve gıdaların besin değerlerindeki azalmaların küçük olacağının düşünülmesi gibi nedenlerle biyokoruma ajanları olarak kullanılmaktadır (Gálvez vd., 2010).

1.1.3.1 Fermantasyonun Bitkisel Gıdaların Fitokimyasal İçerikleri ve Antioksidan Özellikleri Üzerine Etkisi

Fermantasyon sırasında, besleyici ve besleyici olmayan bileşenlerin oranının değişmesine yol açan birçok biyokimyasal değişiklik meydana gelir ve sonuç olarak biyoaktivite ve sindirilebilirlik gibi ürün özellikleri etkilenir (Zhang vd., 2012).

Bitkisel gıdalarda doğal olarak bulunan fitokimyasallar çoğunlukla, serbest forma göre daha az biyoyararlanımı olan bağlı formda bulunurlar. Fermentasyon sırasında mikroorganizmalar, kimyasal olarak bağlı bir bileşiği serbest bırakmak suretiyle bitki bileşenlerini değiştirebilir. Bu şekilde, fermente edilmiş bitki gıdalarında, tekstür ve organoleptik özellikler geliştiği gibi besleyici ve besleyici olmayan bileşenlerin oranları değişir ayrıca geliştirilmiş biyoyararlanım ve biyoaktivite ile fitokimyasal içeriklerler zenginleştirilir (Yeo ve Ewe, 2015).

Fermentasyonun gıda fenolikleri üzerindeki etkileri, çok sayıda çalışmada araştırılmış ve tutarsız sonuçlar elde edilmiştir. Bunun nedeni fenolik bileşiklerin farklı mikroorganizmalar tarafından biyotransformasyonunun karmaşıklığı, farklı fermantasyon koşulları ve gıda matrisi olabilir. Genel olarak, yayınlanmış literatürde, çeşitli gıdaların laktik asit bakterileri, mayalar ve küfler dahil çeşitli mikroorganizmalar tarafından fermantasyonunu takiben toplam fenolik içeriğin daha yüksek olduğu gösterilmiştir. Bu, fermentasyon işlemi sırasında ana fenolik bileşiklerin bozulmasını telafi eden metabolitlerin oluşumu ve gıda matrisinden fenoliklerin serbest bırakılması ile açıklanabilmektedir (Leonard vd., 2021).

Fermentasyon ile üretilen glukozidaz, amilaz, selülaz, kitinaz, inulinaz, fitaz, ksilanaz, tanaz, esteraz, invertaz veya lipaz gibi mikrobiyal enzimler, glikozitleri hidrolize edebilir ve bitki hücre duvarlarını veya nişastayı parçalayabilir. Glikozitlerin fermentasyon yoluyla aglikon formuna dönüştürülmesi, bitki bazlı

gıdalarda antioksidan aktiviteyi arttırmanın başlıca yoludur. Bu enzimler, bitki hücre duvarı matrisinin parçalanmasında ve sonuç olarak flavonoidlerin ekstraksiyonunu kolaylaştırmada rol oynar. Fermentasyon kullanarak bitki bazlı gıdaların antioksidan aktivitesini arttırmanın bir başka olası mekanizması, fitokimyasallardaki yapısal değişiklikler olabilir. Fermantasyon, bitki bazlı gıdalardan flavonoidlerin salınımını artırarak antioksidan aktiviteyi geliştirdiğinden, doğal antioksidanların arzını artırmak için faydalı bir yöntemdir (Hur vd., 2014). Kontrollü fermentasyonda laktik asit bakterilerinin varlığı, basit fenolik dönüşüme ve yüksek moleküler ağırlıklı fenolik bileşiklerin depolimerizasyonuna katkıda bulunur (Othman vd., 2009). Hur vd. (2014) bitki bazlı gıdaların antioksidatif aktivitesinin fermantasyon yoluyla arttırılmasının mikroorganizma türleri, pH, sıcaklık, çözücü, su içeriği, fermantasyon süresi, gıda türü ve aerobik koşullar dahil olmak üzere çeşitli faktörlerden etkilenebileceğini önermiştir.

Meyve suları veya meyve ile ilgili ürünler polifenolik bileşikler bakımından zengin birer kaynaktır. Duyusal özelliklerde ve sağlık yararlarında polifenoller, antioksidanlar, antitümöral ajanlar ve koroner kalp hastalığının önleyicileri olarak kritik bir rol oynarlar. Bitkisel gıdalarda, flavonoidler, fenolik asitler, lignanlar ve tanenler gibi fenolikler antioksidan özelliklere sahipken, fermantasyon işleminin bu içeriklerin miktarını değiştirdiği bilinmektedir. Örneğin kırmızı üzümlerin fermantasyonuyla üretilen içecekler, yüksek miktarda polifenolik bileşikler içerir ve flavonollerin ve flavonların iyi bir kaynağıdır (Yeo ve Ewe, 2015).

Çok sayıda çalışma, fermente meyve ve sebzelerin tüketiminin sağlığı koruyucu etkiler gösterebileceğini belirtmiştir. Fermente meyve ve sebzelerin çoğu, low-density lipoprotein (LDL) oksidasyonunun önlenmesi için faydalı olan zengin antioksidan kaynaklarıdır. Baklagiller, tahıllar, sebzeler, otlar ve meyveler gibi bitkisel gıdalardaki fitokimyasalların seviyeleri ve biyoyararlanımı, fermentasyon gibi işlemlerden büyük ölçüde etkilenebilir. Bu daha sonra ateroskleroz ve kanser gibi hastalıkların tedavisi ve/veya önlenmesi için faydalı olabilecek antioksidan özelliklerin artmasına yol açar. Bu nedenle, özellikle fermantasyon, sadece koruma için değil, aynı zamanda gelişmiş biyoaktif ve antioksidan

özelliklere sahip fonksiyonel gıdaların üretimi için de önemli bir süreç olarak hizmet edebilir (Yeo ve Ewe, 2015).

1.1.4 *In vitro* Sindirim ve Biyoerişilebilirlik

İnsan sindirimi, alınan gıdaların mekanik ve enzimatik değişiklikler yoluyla besin maddelerine dönüştürüldüğü, bu sayede makromoleküllerin kan dolaşımına emilen yapı taşlarına hidrolize edildiği karmaşık bir süreçtir. Besinlerin parçalanması ağırlıklı olarak ağız ve midede meydana gelirken, besinlerin ve suyun enzimatik sindirimi ve emilimi ağırlıklı olarak ince ve kalın bağırsakta meydana gelir (Guerra vd., 2012).

Biyoaktif bileşiklerin, biyoyararlı miktarının belirlenmesi, bu bileşiklerin gıdalarda bulunan miktarının belirlenmesinden daha önemlidir. Biyoaktif bileşiklerin ve besinlerin potansiyel sağlık etkileri, biyoaktif bileşiklerin stabilitesini ve sonuç olarak biyoyararlanımı ve sağlık üzerindeki potansiyel faydalarını etkilediği için sindirim sürecine bağlıdır (Carbonell-Capella vd., 2014). Miktar ve biyoyararlanım, diyet polifenollerinin sağlıktaki önemini aydınlatmanın anahtarıdır. Hedef dokulardaki biyoaktivitelerini değerlendirmek için çeşitli polifenollerin biyoyararlanım ve metabolizma bilgisi gereklidir (Manach vd., 2004). Biyoyararlanım, normal yollardan sindirilen, emilen ve metabolize edilen besinin oranıdır (McGhie ve Walton, 2007). Biyoerişilebilirlik, katı gıda matrisinden salınmasının bir sonucu olarak bağırsakta bulunan ve bağırsak bariyerini geçebilen bir gıda bileşeninin miktarı olarak tanımlanır (De Freitas ve Maróstica Junior, 2019). Bu tanım, gıda matrislerinden bileşiklerin salınımını ve ilgili bileşiklerin gastrointestinal ortam altında stabilitesini içerir (Gawlik-Dziki, 2012; Tagliazucchi vd., 2010). Biyoerişilebilirliğin daha kesin ve daha az kullanılan alternatif bir tanımı, biyoerişilebilirliği, bir bileşiğin gastrointestinal sistemdeki gıda matrisinden salınan, böylece epitel hücrelerinin bağırsak metabolizmasına alım/asimilasyon ve ayrıca sistem öncesi metabolizma (karaciğer ve bağırsak) dahil olmak üzere bağırsak emilimi için erişilebilir hale gelen kısmı olarak tanımlar (Cardoso vd., 2015).

Yalnızca sindirim enzimlerinin (ince bağırsak) ve mikrobiyotanın (kalın bağırsak) etkisiyle gıda matrisinden salınan polifenollere bağırsakta biyolojik

olarak erişilebilir ve bu nedenle yalnızca bu polifenoller biyolojik olarak kullanılabilir (Hithamani ve Srinivasan, 2014). Ek olarak, fitokimyasalların biyoyararlanımı, stabilitelerine, gıda matrisinden salınmalarına ve transepitelyal geçişlerinin verimliliğine bağlıdır (Rubió vd., 2014). Polifenollerin faydalı etkileri, ancak ilgili dokulara ulaşmaları ve biyolojik bir etkiye sahip olmak için yeterli konsantrasyonda etkilerini göstermeleri durumunda gerçekten etkili olabilir (Rueda vd., 2017).

Besin maddelerinin biyoyararlanımını ve/veya biyoerişilebilirliğini ölçmeye yönelik yöntemler, insanlarda ve hayvanlarda (*in vivo*) araştırmaları veya laboratuvar deneylerinde (*in vitro*) simülasyonu ifade eder (Parada ve Aguilera, 2007). Besin maddelerinin ve biyoaktif bileşiklerin biyoyararlanımı ve biyoerişilebilirliği, *in vitro* metodolojiler (simüle edilmiş gastrointestinal sindirim, Caco-2 hücresi, hücre zarları ve diğerleri), *ex vivo* metodolojiler (kontrollü laboratuvar koşulları altında gastrointestinal organlar), *in situ* metodolojiler (hayvanlarda bağırsak perfüzyonu) ve *in vivo* metodolojiler (insan ve hayvan çalışmaları) gibi çeşitli prosedürlerle belirlenebilir (Carbonell-Capella vd., 2014). En sık kullanılan metodolojilerden biri, *in vitro* sindirim süreçleridir ve bunu, biyoaktif bileşiklerin ince bağırsakta alımını simüle etmeyi amaçlayan Caco-2 hücre kültürleriyle yapılan deneyler takip eder (Barba vd., 2017).

In vitro sindirim modelleri, simüle edilmiş gastrointestinal koşullar altında yapısal modifikasyonları, sindirilebilirliği ve gıda bileşenlerinin salınımını araştırmak ayrıca basit, ekonomik ve tekrarlanabilir olması için insan fizyolojisine dayalı olarak geliştirilmiştir (Oomen vd., 2002). Numunenin özellikleri, iyonik bileşim, enzimatik aktivite, sindirim süresi ve mekanik stresler, *in vitro* sindirim yöntemleriyle elde edilen sonuçlar üzerinde önemli bir etkiye sahiptir. Enzim özellikleri, *in vitro* sindirimde en önemli faktördür ve sıcaklık, konsantrasyon, inkübasyon süresi, pH, stabilite, inhibitörler ve aktivatörler gibi çeşitli faktörlere bağlıdır. Enzimlerin ve inkübasyon koşullarının seçimi, çalışmanın amaçlarına bağlıdır. Karmaşık bir biyolojik karışım yerine saflaştırılmış bir enzimin kullanılması avantajlıdır çünkü *in vitro* sindirim modellerinin standardizasyonuna ve laboratuvar karşılaştırmalarına izin verir. Bununla birlikte, bir besinin sindirimi, diğer besinlerin sindiriminden etkilenir ve

bazen saflaştırılmış bir enzimden ziyade karmaşık bir enzim kombinasyonunun kullanılması daha temsilidir (Coles vd., 2005).

Simüle edilmiş sindirim yöntemleri tipik olarak oral, gastrik ve ince bağırsak fazlarını ve bazen de kalın bağırsak fermantasyonunu içerir (Gawlik-Dziki, 2012). Sindirim süreci ağızda çiğneme ile başlar ve yiyeceklerde bulunan biyoaktif bileşiklerin salınmasına neden olur (Tagliazucchi vd., 2012). Gıdaların çiğneme yoluyla küçük parçacıklara indirgenmesi, sindirim enzimlerinin etkisine uygun yüzeyi arttırır, böylece sindirim etkinliğini ve antioksidanların gastrointestinal emilimini arttırır (Saura vd., 2007). Daha sonra gastrointestinal sindirim sırasında, salgıların hidrolitik enzimleri ve fizikokimyasal özellikleri gıda bolusu üzerinde etki eder ve biyoerişilebilirliği etkiler (Tagliazucchi vd., 2012). Yüksek bir *in vitro* aktivite her zaman *in vivo* karşılaştırılabilir aktiviteye çevrilmez, bu nedenle ilgili bileşiğin biyoerişilebilirliğini ve biyoyararlanımını belirlemek çok önemlidir (Gawlik-Dziki, 2012).

Diyetteki fenolik bileşiklere atfedilen sağlık yararlarının kullanımı, gıda işleme ve depolama sırasında bunların uygun şekilde korunmasını ve ardından sindirim sırasında salınmasını/absorpsiyonunu gerektirir (Carbonell-Capella vd., 2014; Van Boekel vd., 2010; Li vd., 2017). Geniş dağılımlarına rağmen, diyet polifenollerinin sağlık üzerindeki etkileri, gıdalardan nasıl ekstrakte edildiklerine ve bağırsak absorpsiyonlarına, metabolizmalarına ve hedef dokularla biyolojik etkilerine bağlıdır (Tressera-Rimbau vd., 2017). Besin matrisindeki bir bileşiğin başlangıç konsantrasyonu, matris bileşimi ve gastrointestinal sıvıların fizikokimyasal özellikleri ve sindirim enzimlerinin varlığı gibi konakçıyla ilişkili faktörler, bileşiklerin biyoerişilebilirliğini etkiler (Tagliazucchi vd., 2012). Besinler potansiyel olarak biyoerişilebilirdir, ancak gerçekte çok az besin sindirim sırasında tamamen emilebilir formlara dönüştürülür. Besin maddelerinin biyoerişilebilirliği ve biyoyararlanımı, fiziksel, kimyasal ve enzimatik sindirim süreçlerinin verimliliğini etkileyen gıda matrisinin fiziksel özellikleri ile sınırlıdır (Boyer ve Liu, 2004). *In vitro* biyoerişilebilirlik deneyleri, *in vivo* analizlerin yerine geçmez, ancak gastrointestinal sindirimin ve gıda matrislerinin bileşiklerin sistemik biyoyararlanımı üzerindeki etkisini incelemek için önemlidir (Chandrasekara ve Shahidi, 2012).

1.1.5 Metabolomik

Metabolomik, bir hücre, doku, organ veya organizmada bulunabilen bütün küçük molekül, metabolit veya kimyasalların toplanması, kapsamlı niteliksel ve niceliksel analizi olarak tanımlanır (Ahad ve Nissar, 2017). Metabolomik, analitik kimya, teknoloji, farklı ekstraksiyon protokolleri ve veri analizini birleştiren disiplinler arası bir bilimdir (Zhang vd., 2012; Yeung vd., 2019; González-Riano vd., 2020). Metabolomik terimi, seçilen bir numunedeki tüm metabolit setini belirtmek için kullanılır (Adamski, 2012). Alan geliştikçe, literatürde esasen metabolitleri ölçmek için aynı analitik yaklaşımların kullanımına atıfta bulunan farklı terimler ortaya çıkmıştır. Örneğin, metabolomik, metabonomik ve nutrimetabolomiklerin tümü değiştirilebilir terimler olarak kullanılmıştır. Benzer şekilde, metabolomik parmak izi, metabolik veya besinsel fenotipleme ve metabolik profil oluşturma, hedeflenmiş veya hedeflenmemiş yaklaşımlara atıfta bulunmak için sıklıkla kullanılmıştır (González-Peña ve Brennan, 2019). Metabolomik, biyolojik numunelerde bulunan genellikle metabolitler olarak adlandırılan tüm düşük moleküler ağırlıklı moleküllerin analizi ve çalışması ile ilgilenir; kapsamlı bir profil tanımı için güçlü bir yaklaşım ve böylece analiz edilen numunenin, hücrelerin veya organın metabolik fenotipinin anlık görüntüsünü sağlar (Brennan vd., 2015; Begou vd., 2017). Bu teknoloji, küçük moleküllerin tespiti etrafında toplanmıştır ve tanım gereği, proteinler ve yağ asitleri gibi organik biyopolimerleri hariç tutar. Önemli küçük metabolitler arasında örneğin amino ve diğer organik asitler, şekerler, uçucu metabolitler ve alkaloidler, karotenoidler ve antosiyaninler gibi renkli metabolitler ve fenolik bileşenler gibi bitkilerde bulunan çeşitli ikincil metabolitlerin çoğu vardır (Ahad ve Nissar, 2017). Az sayıda analizle karmaşık biyolojik numunelerin biyokimyasal bileşimi hakkında mümkün olan en geniş genel bakışı elde etmeyi amaçlayan metabolomik analiz, ilk olarak 1999 yılında Jeremy Nicholson tarafından önerilmiş olarak ortaya çıkmıştır (Ahad ve Nissar, 2017; Utpott vd., 2022). Bu araç başlangıçta biyolojik bir sistemde mümkün olduğu kadar çok metabolitin tanımlanmasını ve nicelleştirilmesini içeren kapsamlı bir analiz olarak tanımlanmıştır (Fiehn vd., 2000; Zhang vd., 2020). Son birkaç on yılda, metabolomik alanı, metabolik

değişiklikleri ölçmek ve yorumlamak için önemli teknolojik ilerlemelerin bir sonucu olarak gelişmiştir (Nagana Gowda vd., 2017). Gıda ve beslenme çalışmaları, farmakoloji, erken hastalık teşhisi, ilaç hedefi belirleme ve geliştirme, çevre çalışmaları ve toksikoloji dahil ancak bunlarla sınırlı olmamak üzere, giderek artan sayıda alanda uygulamalar rapor edilmiştir (Nagana Gowda ve Raftery, 2013; Clayton vd., 2006; Robertson, 2005).

Metabolomik stratejiler, her birinin kendine özgü faydaları ve sınırlamaları olan, hedeflenen ve hedeflenmeyen metabolomik olmak üzere iki farklı kapsamda yürütülür (Fraga-Corral vd., 2020). İlk stratejide, sınırlı sayıda bilinen metabolitler veya bileşik sınıfları ölçülür (Diamantidou vd., 2018). Hedeflenen analiz, uygun ve optimize edilmiş analitik yöntemler kullanılarak yüksek kaliteli veriler sağlar (Buescher vd., 2010; Michopoulos vd., 2014; Virgiliou vd., 2015). Hipoteze dayalıdır; genellikle önceden belirlenmiş metabolitlerin çalışmasına atıfta bulunur, bir dizi bileşiğe ve bir nicelleştirme (miktar belirtmesi) yaklaşımına odaklanır (Utpott vd., 2022; Fraga-Corral vd., 2020). Bu yaklaşımın en büyük sınırlaması, tanımlanmış bileşikler için kimyasal standartların gerekliliğidir; bununla birlikte, malzemede gözlemlenen değişiklikler ile bilinen, iyi karakterize edilmiş analitler arasındaki ilişkiye izin verir (Shi vd., 2019; Begou vd., 2017; Leon ve Vald´es, 2018; Pezzatti vd., 2020). Hedeflenmeyen stratejiler, ilgilenilen örneklerde bulunan özelliklerin kimliği hakkında önceden bilgi sahibi olmadan, nitel analize dayalı, metabolik değişikliklere bütünsel bir genel bakış sağlamayı amaçlar (Theodoridis vd., 2011; Gika vd., 2014; Rainville vd., 2014). Hedeflenmemiş yaklaşım keşif amaçlıdır ve daha geniş bir molekül yelpazesini kapsadığı ve yeni metabolitleri tanımlamak için faydalı olabileceği için daha yaygın bir seçim olan bir hipotez oluşturur (Liu ve Locasale, 2017; Pezzatti vd., 2020). Hedeflenmemiş analiz iki türe ayrılabilir: parmak izi ve profil oluşturma. Parmak izi, tanımlama ve nicelleştirmeye ihtiyaç duymadan bir matriste mümkün olan en fazla sayıda bileşiğin analizini, bunların tespiti ve sonuçların istatistiksel olarak işlenmesini içerir. Tipik bir numune parmak izi elde etmek için metabolit modellerine dayalı olarak farklı bölgelerde numune bileşenlerini sınıflandırmaya izin verir, daha hızlı ve daha uygun olur (Utpott vd., 2022). Öte yandan, profil oluşturma, veritabanları veya yazılım araçları

aracılığıyla sıklıkla tanımlanan ve nicelenen bir metabolit sınıfının analizine odaklanır (Castro-Puyana vd., 2017; Ib´ anez vd., 2013; Lopez-Ruiz vd., 2019). Hedeflenmemiş metabolomikler büyük veri setleri ürettiğinden, veri karmaşıklığını azaltmak için çok değişkenli analiz gibi etkili istatistiksel araçlar gereklidir (Lacalle-Bergeron vd., 2021). Ayrıca, numunede bulunan metabolitlerin kapsamlı bir analizini sağlamasına rağmen, elde edilen sonuçları birleştirmek ve doğrulamak için hala zorluklar vardır, genellikle gerekli olan doğrulayıcı, tercihen kantitatif hedefli analizdir (Begou vd., 2017). İki strateji, belirli bir araştırma sorusuyla ilgili veri sağlamada birbirini tamamlayabilir. Sınırlamaları nedeniyle hedeflenen analizlerle elde edilemeyen metabolitler ve ilgili yollar hakkındaki bilgiler, hedeflenmeyen yaklaşımlarla araştırılabilir (Want vd., 2010; Gika vd., 2014). Bu stratejilerin avantaj ve dezavantajlarını özetlemek gerekirse: Hedeflenen analizler; yüksek hassasiyet ve kararlılık, geniş dinamik alan, düşük karmaşıklıta veri işleme avantajlarını; bilinmeyen metabolitleri tanımlayamama, dar aralık ve standartların önemli ölçüdeki maliyeti dezavantajlarını sunar. Hedeflenmeyen analizler; yüksek metabolom kapsamı ve düşük karmaşıklık avantajlarını; düşük yeniden üretilebilirlik ve güvenilmez niceleme dezavantajlarını sunar (Fraga-Corral vd., 2020).

Omik bilimler, genler (genomik), proteinler (proteomik), lipidler (lipidomik) ve metabolitleri (metabolomik) dahil olmak üzere canlı bir organizmanın gelişimi ve bakımında yer alan farklı moleküllerin çalışmasını kapsar (Lay vd., 2006; Rizo vd., 2020). Metabolomik, ilk ortaya çıktığı zamanlarda bitki bilimlerinde büyük bir uygulama alanı bulmuş, son zamanlarda gıda bilimi de dahil olmak üzere özellikle orijinallik, kalite ve güvenlik amaçları için kullanılmış ve çeşitli alanlarda daha da genişlemiştir (Castro-Puyana vd., 2017; Kim vd., 2016; Sundekilde vd., 2013; Yuliana, vd., 2021). Gıda analizinde başlıca metabolomik uygulamaları şöyle sıralanabilir; gıda güvenliği kontrolünde metabolomikler, mikrobiyal kontaminasyonun tespitinde metabolomikler, kimyasal kirleticilerin tespitinde metabolomikler, gıda kalitesi ve özgünlüğünün değerlendirilmesinde metabolomikler, gıda izlenebilirliğinde metabolomikler (Li vd., 2020). Gıda biliminde sağlam, verimli ve hassas bir analitik araç olarak metabolomik potansiyeli, halihazırda yaygın olarak kabul edilmektedir ve iki ana araştırma

hattında uygulanmaktadır: gıdanın insan sağlığı üzerindeki etkisine ilişkin çalışmalar ve gıda işleme ve dönüşümüne ilişkin çalışmalar (Lacalle-Bergeron vd., 2021; Rizo vd., 2020). Gıda matrisinde bulunan birçok bileşik, gıdanın dışsal (sıcaklık, nem, basınç değişimleri, oksijen ve ışığın varlığı) ve içsel (pH, su aktivitesi, bileşim) faktörleri nedeniyle hasat, işleme ve depolama sırasında fiziksel, kimyasal ve mikrobiyolojik değişikliklere uğrar (Utpott vd., 2022). Bu değişiklikler, beslenme kalitesi, güvenlik ve duyusal kabul edilebilirlik gibi ürünlerin nihai özelliklerini tanımlar. Bu nedenle, metabolomik yaklaşım, kimyasal değişiklikleri istenen nihai ürün kalite özellikleriyle tanımlamak ve ilişkilendirmek için büyük önem taşımaktadır (Cevallos-Cevallos ve Reyes-De-Corcuera, 2012). Metabolomiklerin, farklı gıdalardaki yüzlerce biyoaktif bileşiğin tanımlanması ve bunların özgünlüğünün, kalitesinin ve güvenliğinin değerlendirilmesinin yanı sıra gıda işlemenin sonuçlarını incelemek için önemli bir araç olduğu kanıtlanmıştır (Rangel-Huerta ve Gil, 2016). Ayrıca gıda biyoaktif maddelerinin insan sağlığı üzerindeki etkilerine ilişkin bilgileri geliştirmek için moleküllere biyolojik aktiviteler sağlayabilen sindirim sürecini anlamak gerekir (Bayram vd., 2018). Metabolomik, sindirim sırasında salınan bileşiklerin ve vücut sıvılarında bulunan metabolitlerin daha kapsamlı bir görünümünü sağlar (Pimentel vd., 2018).

Besinler ve besinlerin yanı sıra diyet kalıplarının metabolik süreçlerle etkileşime girdiği ve bir dizi önemli hastalık riskinin azalmasına veya artmasına katkıda bulunduğu iyi bilinmektedir (Mozaffarian ve Ludwig, 2010). Son yıllarda metabolomik, yeni diyet biyobelirteçlerinin tanımlanması için anahtar bir teknoloji olarak gelişmiştir. Çok sayıda metabolomik araştırma, gıdaların bileşiminin yanı sıra idrar ve kan gibi biyolojik örneklerde diyete bağlı metabolik değişikliklerin gösterilmesine odaklanmıştır (Gibbons ve Brennan, 2016). Besin metabolomikleri, yalnızca biyolojik örneklere odaklanma eğiliminde olan beslenme çalışmalarıyla birlikte yürütülür. Metabolomik çalışmalar, yutulan test ürünlerinin moleküler bileşimini bilmek, sindirim süreçleri sırasında meydana gelen değişiklikleri anlamak ve böylece deneklerin sağlığı üzerinde gözlemlenebilecek diyet etkilerini yorumlamak için anahtardır. Bir test gıdasından elde edilen metabolomik veriler, bir beslenme müdahalesinden elde

edilen biyolojik verilerle ilişkilendirildiğinde, benzer metabolik profillere (doğal olarak veya benzer teknolojik işlemlerden) sahip gıdaların "biyoaktif potansiyelini" tahmin etmek için kullanılabilir (Pimentel vd., 2018). Literatürün incelenmesi, diyet biyobelirteç keşfi için genel olarak kullanılan üç yaklaşımın olduğunu ortaya koymaktadır (Gibbons ve Brennan, 2016). Bunlar şu şekilde özetlenebilir: (i) katılımcıların belirli miktarlarda test gıdası tükettiği ve tüketim sonrasında biyolojik örneklerin toplandığı akut veya orta müdahaleler, (ii) belirli bir gıdayı tüketenler ve tüketmeyenler arasında metabolik profillerin karşılaştırıldığı kohort çalışmaları ve (iii) besin tiplerini ve biyobelirteçleri belirlemek için diyet kalıplarının ve metabolik profillerin analizi (Gibbons ve Brennan, 2016). Diyet etkileri, metabolit profillerinin varyasyonlarında yansıtılır ve biyoakışkanlardaki metabolitler ölçülerek spesifik etkiler saptanabilir (Rezzi vd., 2007). Diyet biyobelirteçlerinin keşfi, çeşitli diyetlerin insan sağlığı üzerindeki yararlı veya zararlı etkilerini belirlemek için yeni yollar sunar. Metabolomiklerin beslenme çalışmaları için bir avantajı, tek bir ölçümde çok sayıda diyet belirtecinin araştırılabilmesidir. Yüzlerce metaboliti aynı anda analiz etme yeteneği sayesinde, metabolomik yaklaşımlar, biyolojik durumlar, hastalıklar ve sağlık riskleri hakkında ayrıntılı bilgi sağlamanın yanı sıra, gıda ve beslenme ile ilişkili çoklu biyobelirteçlerin oluşturulması için sayısız yol vaat eder (Nagana Gowda vd., 2017).

Metabolomik analiz süreci, numune hazırlama, metabolit ekstraksiyonu, türevlendirme, metabolit ayırma ve saptama ve veri işlemeyi içeren bir dizi adımdan oluşur. Ancak, her adım her zaman gerekli değildir. Bildirilen tüm metabolomik çalışmalarda yalnızca saptama ve veri analizi temel adımlar olmuştur. Adımların seçimi, çalışmanın türüne (hedeflenmeyen veya hedeflenen), numunenin türüne (katı veya sıvı), ayırma için kullanılacak enstrümantasyona (GC veya LC) ve saptama yöntemine (MS veya NMR) bağlıdır. Örnek hazırlama aşamasında uygun öğütme, ekstraksiyon sırasında metabolitlerin salınımını arttırır. Ekstraksiyon prosedürü, ilgilenilen bileşiklerin miktarını ve konsantrasyonunu maksimize etmeyi amaçlar (Ahad ve Nissar, 2017). Ayırma ve algılama; metabolitlerin ayrılması ve tespiti, metabolik profillemede anahtar adımlar olarak kabul edilmiştir (Ahad ve Nissar, 2017) .

Metabolomik araştırmalarda ayırma ve saptama için, yüksek verim ile tek bir ölçümde çok sayıda metaboliti analiz etme yetenekleri nedeniyle en yaygın kullanılan analitik platformlar, nükleer manyetik rezonans (NMR) spektroskopisi ve gaz kromatografisi (GC) veya sıvı kromatografisi (LC) gibi kromatografik bir adımla birleştirilmiş kütle spektrometrisi (MS) dir (Gibbons ve Brennan, 2016; Fan ve Lane, 2016).

NMR tekniği, atom çekirdeğinin içsel bir manyetik özelliği aracılığıyla moleküler özellikleri tespit eder ve daha çok hedeflenen yaklaşımlar için kullanılan nicel veriler sağlar. Yüksek kalite, yüksek tekrarlanabilirlik ve invaziv olmayan bir yöntem olma avantajlarına sahiptir. Ek olarak, tüm organik kimyasal sınıflarını algılar, güvenilir bileşik tanımlaması sağlar ve yeşil solventlerin (döteryumlu su olarak) kullanımına ve basitleştirilmiş ekstraksiyon prosedürlerinin ve süreç otomasyonunun kullanımına izin verdiği için çevre dostu bir analitik teknoloji olarak kabul edilir (Utpott vd., 2022). NMR yaklaşımları, farklı organik bileşikleri aynı anda tanımlamak ve ölçmek, benzer kütlelere sahip bileşikleri tanımlamak, bilinmeyen bileşiklerin yapılarını değerlendirmek, metabolik yolları ve etkileşimleri ayrıca belirli yolların akışını ölçerek metabolik hızı aydınlatmak için yararlıdır (Markley vd., 2017; Emwas vd., 2019; Lane vd., 2008). Yüksek çözünürlüklü NMR spektroskopisinin metabolit profili çıkarma için güçlü ve çok güvenilir bir teknik olduğu kanıtlanmıştır (Fan ve Lane, 2016; Nagana Gowda ve Raftery, 2015). Bu tekniğin basit, hızlı, otomatik ve tahribatsız olduğu kabul edilir, bu da numunelerin (canlı organizmalarda bile) daha fazla analiz yapılmasına izin verir (Fraga-Corral vd., 2020). Ayrıca, çok az ön işlem gerekir veya hiç gerekmez ve yüksek düzeyde tekrarlanabilirlik sunar (Markley vd., 2017; Emwas vd., 2019). NMR spektroskopisi, metabolomik alanı için çok faydalı olan sayısız benzersiz ve uygun özellik sergiler (Nagana Gowda ve Raftery, 2015). Artan sayıda metabolomik çalışma, NMR'nin toksikoloji, ilaç keşfi, hastalık teşhisi, çevresel çalışmalar, enerji, gıda ve beslenme dahil olmak üzere çeşitli alanlarda yeteneklerini göstermiştir (Nagana Gowda vd., 2017). Öte yandan, bu tekniğin ana dezavantajı, MS ile karşılaştırıldığında nispeten daha az duyarlılığıdır (Fraga-Corral vd., 2020) . Bu nedenle, numunenin hedef bileşikleri düşük konsantrasyonlarda (tespit sınırının altında) mevcut olduğunda ve

gereken numune miktarı daha büyük olduğunda NMR uygun değildi (Kim vd., 2010). Zayıf yönleri, sınırlı hassasiyet, düşük spektral çözünürlük, geniş cihaz ayak izi, yüksek bakım maliyetleri ve analiz protokollerinin zor yeniden üretilme ve standardizasyon zorluğudur (Fraga-Corral vd., 2020; Böhme vd., 2019; Feizi vd., 2021; Mielko vd., 2021).

Kütle spektrometrisi, bilinen ve bilinmeyen metabolitlerin tanımlanmasına ve/veya yapısal olarak aydınlatılmasına izin verir ve hedeflenen ve hedeflenmeyen analizler için yararlı bir araç olarak, bunların göreceli nicelleştirilmesine izin verir (Zhang vd., 2012; Shi vd., 2019; Nagana Gowda ve Djukovic, 2014; Chace vd., 2002). MS tabanlı testler, tek bir ölçümde yüzlerce bileşik tespit edilebildiğinden çoklu tespit özellikleri sunarken yüksek seçicilik ve hassasiyet sağlar (Fraga-Corral vd., 2020). MS'ye bağlı ana araçlar sıvı kromatografisi (LC), gaz kromatografisi (GC), kılcal elektroforez (CE) ve iyon hareketlilik spektrometrisidir (IMS) (Zhang vd., 2012; Nagana Gowda ve Djukovic, 2014). Bu ayırma yöntemleri arasında, LC ve GC yöntemleri genellikle metabolomik alanında uygulanır ve genellikle numunede bulunan moleküllerin analizini kolaylaştıran bir iyonizasyon kaynağına bağlanır (Oomen vd., 2002; Coles vd., 2005). İyonizasyon, moleküller nedeniyle kritik bir adım haline gelir. Kütle-yük (m/z) oranına dayalı olarak seçici olarak ayrılmaları ve tanımlanması için belirleyici olacak yüklü parçacıklardan oluşan bir demet halinde buharlaştırılır ve iyonlaştırılır (Fraga-Corral vd., 2020). MS tespitinin verimliliği, seçilen alete, iyonizasyon kaynağına, numunenin doğasına ve yapılan analize bağlı olarak karmaşıklığı değişebilen ön işlemine bağlıdır. Bu nedenle, LC, GC, CE ve IM teknikleri farklı kalitatif ve kantitatif sonuçlar sağlar, bu nedenle, kapsamlı bir metabolomik çalışma elde etmek için mümkün olduğunda numuneler farklı teknikler kullanılarak analiz edilebilir (Zhang vd., 2012; Nagana Gowda ve Djukovic, 2014; Ramautar vd., 2013).

Gaz kromatografisi-kütle spektrometrisi (GC-MS) verileri çok sağlamdır ve yüksek çözünürlüklü kromatografiyi görüntülemek için karakterize edilir, spesifik parçalanma modelleri ve güvenilir niceleme değerleri sunar. Böylece, GC-MS verilerinin karşılaştırılması ve veri tabanlarının oluşturulması, LC-MS tekniklerinden daha kolaydır (Fraga-Corral vd., 2020). GC-MS, özellikle yağ

asitleri, amino asitler ve steroller gibi düşük polariteye sahip bileşiklere uygun bir tekniktir. Bileşikler, belirli zamanlarda (tutma süresi) elute edilmelerine neden olan kimyasal özelliklerine göre bir kolon üzerinde ayrılır (Collins vd., 2019). Elute edilen bileşikler iyonize edilir ve kütle/yük oranı (m/z) belirlenir (Sparkman vd., 2011). Bu teknik özellikle lipidler ve tüm polar olmayan bileşikler için uygundur (Halket vd., 2005).

Metabolomikte en yaygın kullanılan tekniklerden biri sıvı kromatografi-kütle spektrometrisidir (LC-MS) (Diamantidou vd., 2018). Metabolitler, mobil fazlar tarafından tahrik edilen bir kolondan akarken kromatografik olarak ayrılırlar (Fraga-Corral vd., 2020). Ayrıştırılan bileşikler iyonize edilir ve çıktı olarak m/z ve alıkonma süreleri saptanır (Collins vd., 2019). LC–MS'de kullanılan tipik iyonizasyon kaynağı, elektrosprey iyonizasyondur (ESI), atmosferik basınçlı kimyasal iyonizasyon (APCI) ise çok daha az oranda kullanılır (Diamantidou vd., 2018). LC analizi için numune ön işlemi genellikle basit bir seyreltme, filtrasyon ve daha nadiren bir ekstraksiyon prosedürüdür (Nasi vd., 2008; Flamini vd., 2013; Vrhovsek vd., 2012; Millán vd., 2016; Sternad vd., 2013). LC-MS' in GC tabanlı analize karşı ana avantajı, LC-MS'nin metabolitlerin uçucu olmasını veya numunenin türevlendirilmesini gerektirmemesidir (Mak vd., 2020; Ramautar vd., 2013; Roriz vd., 2017).

Geçmişte birçok çalışma farklı yaklaşımların avantajlarını ve dezavantajlarını detaylandırırken, artık tek bir platformun tek başına kullanılmasının metabolit profilini tam olarak kapsamayacağının farkına varılmıştır (Gibbons ve Brennan, 2016). Çalışmanın temel amacı ve numunenin türü, analitik yöntemin seçimini belirleyecektir (Fraga-Corral vd., 2020). Bu nedenle, optimum kapsama alanı için genellikle teknolojilerin ve yaklaşımların bir kombinasyonu önerilir (Gibbons ve Brennan, 2016).

Metabolom verilerinin enstrümantasyonu ve analizi oldukça karmaşıktır. Bu nedenle, biyolojik araştırmalarda önemli keşifler ve ilerlemeler elde etmek için metabolomiklerin en büyük ihtiyacı verimli bir işleme teknolojisidir (Zhang vd., 2013; Bino vd., 2004; Mak vd., 2020). Analitik yöntemlere ek olarak, gelişmiş istatistiksel ve tipik olarak çok değişkenli yöntemler, metabolit profili

oluşturmada önemli bir rol oynar ve bu çok değişkenli sonuçların yorumlanmasına yardımcı olmak için artan sayıda veri tabanı ve araç seçeneği vardır (Trygg vd., 2007; Johnson ve Wichern, 2002; Scalbert vd., 2014). Çok değişkenli yöntemler, NMR/MS verilerinin boyutsallığını azaltmak ve maksimum bilgiyi çıkarmak için çok faydalıdır (Nagana Gowda vd., 2017). Diskriminant analizi (DA), temel bileşen analizi (PCA), kümeleme ve regresyon analizi gibi üretilen büyük miktarda veriyi yorumlamak için çok değişkenli analizin matematiksel araçları kullanılır (Böhme vd., 2019).

1.1.6 Lipid Oksidasyonu ve Malondialdehit

Gıdalarda meydana gelen her türlü etki, bileşiminde bulunan öğelerin biyoerişilebilirliğini etkileyebileceğinden özel dikkat gerektirir. Gıdaların gastrointestinal sindirimi sırasında çoklu doymamış yağ asitlerinde peroksidasyon meydana gelir ve lipid hidroperoksitler ve lipid oksidasyonu son ürünleri gibi insan sağlığını olumsuz yönde etkileyebilecek toksik bileşikler oluşur (Sies vd., 2005; Perše, 2013; Nogueira vd., 2016). Lipid oksidasyonu (mikrobiyal kontaminasyonla birlikte) gıdaların kalitesinin bozulmasının ana nedenlerinden biri olarak kabul edilir, bu da kötü kokulara ve kötü tatlara, ayrıca renk bozulmasına veya doku değişikliklerine yol açar (Gong vd., 2010). Ek olarak oksidasyon, besin değerlerini düşürür ve insan sağlığı için sürekli risk oluşturabilecek bileşiklerin oluşumunu indükler (Kanner, 1994; Min ve Ahn, 2005; Vandamme vd., 2015). Lipit oksidasyonu, yağların esansiyel yağ asitleri içeriğini azaltır, bu da daha düşük besin değerine neden olur (Lorenzo vd., 2017). Gıdadaki lipid oksidasyonunu iki faktör büyük ölçüde etkiler: yağ içeriği ve yağ asidi bileşimi. Yağın yağ asidi profili, yağ miktarından daha önemlidir, çünkü gıda lipidlerinin lipid peroksidasyonuna duyarlılığı, yağ asitlerindeki çoklu doymamışlık derecesine bağlıdır (Min vd., 2008).

Lipid oksidasyonu, işleme ve depolama sırasında etlerde bulunan yağların parçalanarak ortamdaki pro-oksidan maddeler tarafından oksidatif ürünler oluşturur (Taub, 1984). Et ve et ürünlerinde lipid oksidasyonu, fiziko-kimyasal parametreleri, duyusal özellikleri (koku, renk ve tat) ve raf ömrünü değiştirebilen kimyasal reaksiyonlar üretir (Liu vd., 1995). Lipit oksidasyonunun,

oksijen aktif türler tarafından doymamış lipitlerin, birincil lipit oksidasyon ürünleri olarak kabul edilen lipit hidroperoksitlere dönüşümü ile başladığı genel olarak kabul edilmektedir. Bu lipid hidroperoksitler, üç farklı yolla üretilebilir: (1) bir serbest radikal zincir mekanizması veya otooksidasyon yoluyla; (2) görünür ışığın ve bir ışığa duyarlılaştırıcının (örneğin riboflavin, klorofil) varlığını gerektiren fotooksidasyon yoluyla; veya (3) lipoksijenazların varlığını gerektiren bir enzimatik reaksiyon yoluyla (Vandemoortele ve De Meulenaer, 2018). Etin kalitesi esas olarak depolama, pişirme ve sindirim sırasında hidroperoksitler ve lipoksidasyon son ürünleri de dahil olmak üzere toksik bileşikler oluşturan PUFA'ların oksidasyonu nedeniyle bozulur (Papuc vd., 2016; Van Hecke vd., 2016). Etin lipid oksidasyon seviyesini belirlemek için kullanılan biyobelirteçlerden biri, iki veya üç çift bağ içeren PUFA'ların oksidasyonunun ikincil bir ürünü olarak üretilen malondialdehittir (MDA) (Karabudak, 2002; Janero vd., 1990; Kumar vd., 2015; Tsikas, 2017). Malondialdehit (MDA), genellikle ω-3 ve ω-6 yağ asitlerinin oksidasyonu sırasında oluşmasıyla tanınır. Sulu ve organik çözeltilerde esas olarak enolü olarak bulunan üç karbonlu bir dialdehittir (George ve Mansell, 1968; Xu vd., 2015). MDA, DNA ve proteinlerle eklentiler oluşturduğu bilinen reaktif bir aldehittir (Sobral vd., 2020). Yağ asitlerinin doymamışlık derecesi ve zincir uzunluğu, antioksidanlar, oksijen türleri, geçiş metalleri ve sıcaklık ortamda oluşan MDA miktarını etkiler (Karabudak, 2002). Mide suyunun düşük pH'ı, metalik iyonlar ve çiğneme sırasında yiyeceğe eklenen oksijen gibi gastrointestinal sistemdeki pro-oksidan koşullar, mide sindirimi sırasında lipidlerin oksidasyon sürecini arttırır (Nieva-Echevarría vd., 2020). Lipid peroksidasyon ürünleri, birçok hastalığın mekanizması ile ilişkili biyolojik olarak gerekli molekülleri değiştirerek hücre zarı hasarına neden olur ve insan vücudunda iltihaplanmaya neden olur; ayrıca bu son oksidasyon ürünlerinin kısmi absorpsiyonu bağırsak seviyesinde meydana gelebilir ve proaterojenik ve sitotoksik/genotoksik aktiviteleri nedeniyle bir takım patolojik durumlara neden olabilir (Niki, 2010; Van Hecke vd., 2019). Bu bileşikler, özellikle et ürünleri sindirilirken oluştuğunda, kardiyovasküler hastalıklar ve kolorektal kanser dahil olmak üzere kronik hastalıklarla ilgili teorik epidemiyolojik riskle sonuçlanabilir (Van Hecke vd., 2019; Micha vd.,

2010). Bu olumsuz etkiler göz önüne alındığında gıdalarda lipid peroksidasyonunu önlemek önemlidir (Gumus ve Decker, 2021).

MDA içeriğini değerlendirmek için spektrofotometrik veya florimetrik teknikler, yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC), gaz kromatografisi ve immünolojik teknikler dahil olmak üzere çeşitli yöntemler geliştirilmiştir (Del Rio vd., 2005). Gıdalarda MDA tayini için en yaygın yöntem pembe renkli floresan MDA tiobarbitürik asit (TBA) kompleksinin spektrofotometrik ölçümüdür (Botsoglou vd., 1994). Bununla birlikte, spektrofotometrik TBA yöntemi, duyarlılık eksikliği nedeniyle eleştirilmiştir (Mendes vd., 2009; Papastergiadis vd., 2012). Bu nedenle, yüksek ayırma gücü, özgüllüğü ve doğruluğu nedeniyle MDA içeriğini ölçmek için kromatografik teknikler (örneğin, HPLC-floresan tespiti) tercih edilir (Grotto vd., 2009).

Antioksidanlar, serbest radikallerin neden olduğu lipid peroksidasyonu üzerinde baskılayıcı bir etki gösterir (Niki, 2010). Fenolik antioksidanlar bu lipid alkoksil radikallerini bağlar ve böylece lipid peroksidasyonunu engeller (Senanayake, 2013). Bazı araştırmalar, gıdalardaki fenolik bileşiklerin, et sindirimi sırasında meydana gelebilecek lipid peroksidasyonunu önlemede çok önemli bir rol oynadığını göstermiştir (Van Hecke vd., 2017; Kanner vd., 2017). Yakın tarihli bir rapor, fenolik bileşiklerin farklı moleküler yapılarına bağlı olarak lipid peroksidasyon inhibitör aktivitesinin farklılık gösterebileceğini belirtmiştir (Martini vd., 2019). Diyete et hazırlama aşamasında veya et tüketimi sırasında veya gıda hazırlama yöntemlerini değiştirerek antioksidanların eklenmesinin, yüksek et tüketimi ile ilişkili kanser ve damar hastalıkları insidansını azaltabileceği öne sürülmüştür (Vieira vd., 2017).

Gastrointestinal sistemin kimyasal koşulları ve enzimatik etkiler, antioksidanların biyoyararlanımını ve aktivitesini önemli ölçüde etkiler. Bu nedenle daha sağlıklı et ürünleri oluşturma girişimleri sırasında gastrointestinal sindirimin etkisi de dikkate alınmalıdır (Van Hecke vd., 2017). Et bazlı yemeklerin bitki polifenolleri ile takviye edilmesi, potansiyel sağlık risklerini azaltmak için iyi bir strateji olabilir (Pešić vd., 2019). Plazmada MDA düzeylerinin azalması, vücutta lipid peroksidasyon ürünlerinin birikiminin

azalması ve dolayısıyla hücrelere verilen hasarın azalması anlamına gelmektedir (Büyükbaş vd., 2000; Cadenas ve Packer, 2001; Karataş vd., 2002). Bu nedenle, *in vitro* sindirim koşullarından sonra MDA oluşumunu değerlendirmek önemlidir.

1.2 Tezin Amacı

Biyoaktif bileşikler, gıdalarda küçük miktarlarda bulunur ve insan sağlığının korunması için besleyici olmayan ancak hayati bileşenler olarak kabul edilir (Patil vd., 2009). Sebzeler ve meyveler, ikincil metabolitler veya biyoaktif bileşikler açısından zengin kaynaklardır. Biyoaktif bileşiklerin tüketimi, insanın varoluşunun başlangıcında başlamıştır. Aynı şekilde, antik çağlardan özel sağlık koşullarını tedavi etmek amacıyla tıbbi bitkilerin kullanıldığına dair kanıtlar vardır. İnsan tüketimi için biyoaktif bileşenler üzerine araştırmalar, sağlıklı yaşam için sağladığı faydaları ile ilişkili tüketici bilincinin oluşması nedeniyle yakın geçmişte artmıştır. Çok sayıda çalışma, bu biyoaktif bileşiklerin ve sebze ve meyve tüketiminin faydalı etkilerine dair kanıtlar sağlamıştır.

Biyoaktif bileşikler içeren gıdaların veya bitkilerin sık tüketilmesi ve ayrıca bu bileşiklerin doğrudan takviyesi, yaşlanma karşıtı etkiler, kardiyovasküler hastalıklara karşı koruma, metabolik hastalıkların kontrolü ve önlenmesi, kanserin önlenmesi ve tedavisi ve ayrıca nörodejeneratif hastalıklara karşı koruma dahil olmak üzere sağlığa birçok yararlı etki sunar. Bu bileşiklerden antioksidan aktivite ile ilgili olanlar, insan sağlığındaki büyük önemlerinden dolayı çeşitli araştırmaların konusudur.

Hardaliye; ana hammaddesi yaş üzüm olan, fermente, aynı zamanda alkolsüz bir içecektir (TGK, 2007). Hardaliyenin, en önemli hammaddesinin taze üzümler olması ve üretimindeki fermantasyon süreci nedeniyle, biyoaktif bileşiklerin zengin bir kaynağı olduğu, dolayısıyla antioksidan özelliklere sahip olabileceği ön görülmektedir. Ülkemize özgü geleneksel bir içecek olan hardaliyenin, fonksiyonel özelliklerinin incelenmesi, sağlıklı beslenme üzerindeki etkilerinin bilimsel bulgulara dayanarak ortaya koyulması gerekmektedir.

Hardaliye konusunda yayınlanmış çalışma sayısı oldukça az olmakla birlikte, mevcut kaynaklar hardaliyenin üretim teknolojisi, mikrobiyolojik ve

fizikokimyasal özellikleri üzerinde yoğunlaşmıştır (Coşkun, 2001; Arici ve Coşkun, 2001). Bu çalışmada; geleneksel metot ile ve farklı üzüm çeşitlerinden üretilen hardaliyelerin, gıda kompozisyonunda yer alan biyoaktif bileşiklerinin tanımlanması, karakterizasyonu, antioksidan özelliklerinin belirlenmesi, *in vitro* sindirim öncesi ve sonrası metabolomik çalışmalar ile fonksiyonel özelliğe sahip bileşenlerinin biyoerişilebilirliğini tespit ederek potansiyel sağlık yararlarını bilimsel bulgularla açıklamak amaçlanmıştır.

1.3 Hipotez

Hardaliye, hammaddesi üzüm olan fermente bir üzüm içeceğidir. Üzüm meyvesinin biyoaktif bileşenlerce zengin olması ve üretiminin geliştirilmiş biyoyararlanım ve biyoaktivite ile fitokimyasal içerikleri zenginleştiren fermentasyon işlemiyle yapılması hardaliyeyi önemli bir ürün yapar. Diğer fermente üzüm içeceklerinin aksine üretimi sırasında maya faaliyetlerinin engellenerek alkolsüz olarak üretilmesi, sağlık yararları açısından hardaliyeyi diğer içeceklerden daha avantajlı hale getirir.

Çalışmada başta fenolik bileşikler olmak üzere hardaliye biyoaktif bileşenlerinin miktarsal tayini ve antioksidan kapasitesinin tespiti yapılmış ayrıca HPLC yöntemi ile biyoaktif bileşenlerinin profili tespit edilerek hardaliyenin yapısındaki hangi biyoaktif ögelerin antioksidan özellik gösterdiği ele alınmıştır. LC-MS yöntemi ile gıda matriksinde var olan metabolitler tanımlanmış, farklı üzüm çeşitleriyle üretilen hardaliyelerin metabolit profillerindeki farklılıklar tespit edimiştir.

Hardaliye örneklerine uygulanacak *in vitro* gastrointestinal sindirim ile biyoaktif bileşenlerin miktarında ve profilinde sindirimin etkisi belirlenmiştir. *In vitro* gastrointestinal sindirimin hardaliyenin biyoaktif bileşen ve metabolit profili üzerindeki etkisiyle ilgili ulaşılan bilimsel bilgiden hareketle insan sindirimiyle meydana gelecek etkileri tahmin etmek adına referans bilgisi oluşturulmuştur. Gastrointestinal sindirimin ve gıda matrislerinin bileşiklerin sistemik biyoyararlanımı üzerindeki etkisini incelemek yapılan *in vitro* gastrointestinal sindirim çalışmasını daha iyi anlamak ve yorumlamak için önemlidir. Biyoerişileblirliğin tespiti ile hangi bileşenlerin sindirim sonrası antioksidan

aktiviteye katkıda bulunabileceği tespit edilmiş, sindirim kanalında biyoerişilebilir olan metabolitler belirlenmiştir.

Hardaliye örneklerinin sahip oldukları antioksidan aktivite gösteren bileşenleriyle *in vitro* sindirim sonrası lipid peroksidasyonu üzerindeki inhibe edici etkisi araştırılmıştır. *In vitro* gastrointestinal sindirim sonrası farklı et örneklerinde bir lipid peroksidsyon biyobelirteci olan Malondialdehit (MDA) miktarı HPLC yöntemi ile tespit edilmiştir. Ayrıca hardaliyenin etkisi farklı içecek türleriyle tekrarlanan analiz sonrası karşılaştırılarak değerlendirilmiştir.

Yapılan çalışma ile kimyasal profili ve *in vitro* gastrointestinal sindirim sonrası özellikleri gibi daha önce araştırılmamış yönleriyle geleneksel bir üzüm içeceği olan hardaliye hakkında literatüre bilimsel bilgi katkısında bulunulmuş ayrıca antioksidan aktivitesi, lipid peroksidasyonu üzerindeki etkisi ve biyoerişileblirlik gibi hardaliyenin sağlık etkilerine ışık tutan araştırmalar ile bu önemli içeceğin daha iyi tanınması ve tüketiminin teşvik edilmesi sağlanmıştır.

2
MATERYAL VE YÖNTEM

2.1 Hardaliye Örneklerinin Hazırlanması

Tarım Orman Bakanlığı Tekirdağ Bağcılık Araştırma Enstitüsü'nden temin edilmiş olan Shraz, Merlot ve Cabernet Sauvignon cinsi üzümler ile hardaliye üretimi gerçekleştirilmiştir (Arici ve Coşkun, 2001). Numune deseni; Shraz üzüm cinsi kullanılarak %1,5 hardal tohumu ilaveli, Merlot üzüm cinsi kullanılarak %1,5 hardal tohumu ilaveli ve Cabernet Sauvignon üzüm cinsi kullanılarak %1,5 hardal tohumu ilaveli hardaliyelerden ikişer paralel olacak şekilde hazırlanmıştır. 6 haftalık olgunlaşma sürecinden sonra hardaliye örnekleri süzülmüş ve durultmaya bırakılmıştır daha sonra şişelenerek +4 ºC de muhafaza edilmiştir.

2.2 Hardaliye Örneklerinin Kimyasal Analizleri

2.2.1 Hardaliye Örneklerinde pH Tayini

Örneklerin pH değeri WTW-Inolab Weilheim (Almanya) pH metre ile ölçülmüştür.

2.2.2 Hardaliye Örneklerinde Asitlik Tayini

Toplam asitlik Cemeroğlu (2007) tarafından bildirilen titrasyon yöntemine göre belirlenmiştir. Örneklerin toplam asitlik değerlerinin belirlenmesi için her örnekten, 100 mL'lik balon jojeye 5 mL alınmıştır. Alınan örnekler distile su ile hacme tamamlanmış, iyice çalkalandıktan sonra 10 mL örnek alınarak 0,1 N NaOH çözeltisi ile titre edilmiştir. pH metre kullanılarak 8,1 değerine kadar titrasyon yapılmış her bir örneğin titre edilebilir asitliği tespit edilmiştir.

2.2.3 Hardaliye Örneklerinde Kuru Madde Tayini

Numunelerin suda çözünür kuru madde miktarları el refraktometresi kullanılarak belirlenmiştir (Cemeroğlu, 2007).

2.2.4 Hardaliye Örneklerinde Renk Ölçümü

Numunelerin rengi Konica Minolta CR400 (Japonya) kullanılarak ölçülmüştür.

2.2.5 Hardaliye Örneklerinde Toplam Şeker Tayini

Hardaliye örneklerinde toplam şeker tayini Cemeroğlu (2007)'nun belirttiği Lane-Eynon yöntemine göre yapılmıştır. Toplam şeker analizinin hesaplamasında kullanılmak üzere invert şeker tayini kısmında anlatıldığı şekilde faktör tayini yapılmıştır. Hardaliye örneklerinden invert şeker tayini kısmında anlatıldığı şekilde berrak filtrat hazırlanmıştır. Berrak filtrattan 50 mL alınmış ve 100 mL'lik balona koyulmuş, üzerine yavaşça ve karıştırarak 5 mL HCl eklenmiştir. Balon içerisindeki örnekler kapakları kapatılarak 65-67°C deki su banyosunda 5 dk. tutulmuş ve daha sonra hızlıca soğutulmuştur. Analiz yapılacak örneğe 1-2 damla fenol fitalein indikatörü damlatılmıştır. 4 N NaOH ile renk pembe olana kadar nötrleştirilmiştir, hacim çizgisine kadar saf suyla tamamalanmış ve bu çözelti bürete doldurulmuştur. Erlene 5 mL Fehling A, 5 mL Fehling B ve 20-25 mL saf su koyulmuştur. Hazırlanan erlen içeriği elektrikli ısıtıcının üzerinde 3 dk. içerisinde kaynatılmıştır. Kaynamanın 2. dakikası içinde 2-3 damla metilen mavisi eklenmiş ve büretteki çözeltiyle titre edilmiştir. Renk kırmızı olduğunda titrasyon bitirilmiştir. Titrasyon işlemi 2 kez tekrarlanmış, daha az olan sarfiyat 'V' değeri olarak hesaplamada kullanılmıştır.

$$\text{Toplam Şeker} = V2.F/V.V \qquad (2.1)$$

V = sarfiyat, V2 = 250 , V1 = 25 , F = faktör

2.2.6 Hardaliye Örneklerinde İnvert şeker Tayini

Hardaliye örneklerinde invert şeker tayini Cemeroğlu (2007)'nun belirttiği Lane-Eynon yöntemine göre yapılmıştır. Lane-Eynon yöntemine göre invert şeker tayini, invert şekerin fehling çözeltisinde bulunan suda çözünen Cu-2 oksit (CuO)'i suda çözünmeyen Cu-1 oksit (Cu_2O)'e indirgemesi ilkesine dayanır. İnvert şeker analizinin hesaplamasında kullanılmak üzere faktör tayini yapılır. Öncelikle stok invert şeker çözeltisi hazırlanmıştır: %1'lik stok invert şeker çözeltisi hazırlamak için, 9,50±0,01 g saf sakkaroz hassas olarak tartılarak litrelik ölçülü balonda 100±5 mL damıtık su ile çözülmüş, çözeltiye, balon

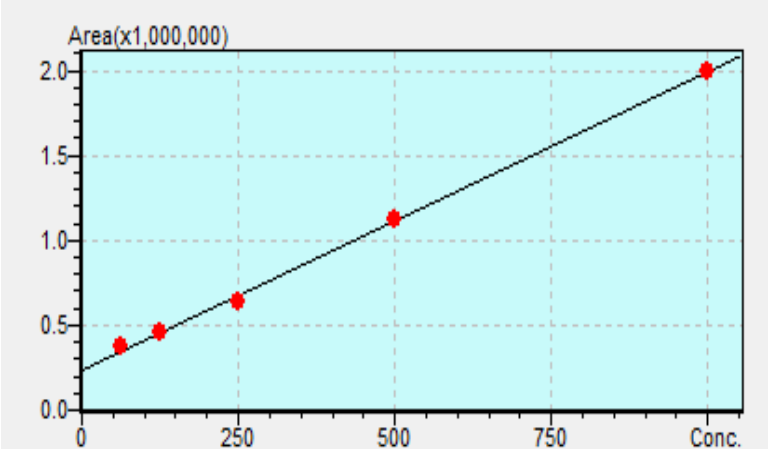
döndürülerek karıştırmak sureti ile 5 mL derişik HCl (d=1,18 g/mL) ilave edilmiş, 20-25ºC sıcaklıkta 3 gün veya 12-15ºC sıcaklıkta 8 gün inversiyona tabi tutulmuştur. Damıtık su ile yaklaşık 800 mL' ye seyreltilmiştir. Sonra 2 g benzoik asit 75 mL sıcak suda çözülerek ilave edilmiş, 20 ºC'de litreye tamamlanıp çalkalanarak karıştırılmıştır. %0,25'lik standart invert şeker çözeltisi hazırlamak için: 200 mL' lik ölçü balonuna %1'lik invert şeker çözeltisinden 50 mL alınmış, 2 damla fenol ftalein damlatılarak soluk pembe renge kadar 1 N NaOH ile (yaklaşık 2,6 mL) nötrleştirilmiştir. Sodyum hidroksit ilavesi sırasında çözelti hafifçe çalkalanarak karıştırılarak 1 - 2 damla 0,5 N HCl ilavesi ile pembe renk giderilmiş ve 20 ºC'de 200 mL' ye tamamlanmıştır (Çözeltinin 1 mL' si 2,5 mg invert şeker ihtiva eder). Faktör tayini işlem basamakları şunlardır: Büret standart şeker çözeltisi ile doldurulmuş, erlene Fehling A ve Fehling B çözeltilerinden 5 mL alınarak üzerine 20-25 mL saf su eklenmiştir. Standart invert şeker çözeltisinden 15 mL erlene koymuş, erlen bek alevi üzerine konarak çözelti kaynamaya başladıktan sonra büretteki standart şeker çözeltisi ile titre edilmiştir. Kaynamaya başladıktan 2 dakika sonra 2-3 damla metilen mavisi damlatılmış, (çözeltinin rengi mavi olur) büretteki çözelti ile titrasyona başlanmıştır. Renk, maviden bakır kırmızısına döndüğü anda titrasyona son verilmiştir. Harcanan hacim kaydedilmiştir (V). Titrasyonun duyarlı yapılması için 2 dakika kaynadıktan sonra 1 dakika içerisinde titrasyon bitirilmiştir. Sonuç, harcanan şeker çözeltisinin mL' sinde bulunan mg şeker ile titrasyonda harcanan çözelti miktarının (V) çarpılması ile faktörü (F veya K) verir. Harcanan standart şeker çözeltisinin ml'sinde bulunan mg şeker. Hardaliye örneklerinde berrak filtrat elde etmek için; 25 mL örnek 250 mL'lik balona alınır ve üzerine 50 mL saf su eklenir ardından 5 mL Carrez I ve 5mL Carrez II eklenir ve 30 dk. beklendikten sonra saf su ile 250 mL ye tamamlanır daha sonra süzülerek berrak filtrat elde edilir. İnvert şeler tayininde berrak filtrattan 50 mL alınarak bürete konmuş, erlene 5'er mL Fehling A ve Fehling B çözeltilerinden + 10 mL su + 5 mL büretten deney çözeltisi konmuş, 3 dakika içerisinde kaynaması sağlanmıştır. Kaynamada 2 dakika dolmadan 2-3 damla metilen mavisi damlatılıp büretteki çözelti ile titre edilmiştir. Renk kırmızı olunca titrasyon kesilerek yaklaşık harcanan miktar tespit edilmiştir (titrasyonda harcanan miktar +5 mL). Önce bir

ön deneme yapılmış, ikinci kez daha duyarlı deney yapılarak ve bu sefer ilk titrasyonda harcanan hacimden 1 mL eksiği kaynamadan önce fehling çözeltilerinin üzerine koyulmuştur. Böylece az miktarda bir titrasyon sarfiyatıyla dönüm noktasına ulaşılmış ve aynı şekilde titrasyon yapılarak harcanan hacim (V) not edilmiştir.

$$\text{İnvert Şeker} = (V2 \times F) / (V \times V1) \quad (2.2)$$

2.2.7 Hardaliye Örneklerinde Alkol Tayini

Etil alkolün miktarsal olarak tespitinde gaz kromatografisi kütle spektroskopisi tekniğinden yararlanılmıştır. GC-MS-QP2010 (Shimadzu, Milan, Italy) gaz kromatografisi-kütle spektroskopisi cihazı kullanılmıştır. Bileşen doğruluk testi cihazın sahip olduğu ticari kütüphaneler (NIST27 ve WILEY7) kullanılmıştır. GCMS-QP2010 birlikteliğinde CTC-Combi-PAL-oto örnekleyici kullanılmıştır. Uçucu bileşen analizlerinde kromatografik ayırmanın sağlanması için Restec (Bellefonte, USA) Rtx-5MS silika kapiler kolon (30 m × 0,25 mm (iç çap) x 0,25 μm) kullanılmıştır. Sistemdeki taşıyıcı gaz 1 mL/dk akış hızı ile Helyumdur. Enjektör ve dedektör sıcaklıkları 250°C olarak ayarlanmıştır. Kolon sıcaklık programı 4°C değerinde 10 dk. süre olacak şekilde ayarlanmıştır, iyonizasyon voltaj değeri 35-375 amu kütle tarama aralığında 70 eV olarak tercih edilmiştir. Çalışmalarda gaz kromatografisine uygun saflıkta (GC-grade) etil alkol standardı (Sigma-Aldrich) kullanılmıştır. Kalibrasyon eğrisinin oluşturulması için 100 ppm, 50 ppm, 25 ppm, 5 ppm ve 1 ppm konsantrasyonlarında etil alkol standartları hazırlanmıştır. Beş seviyeli kalibrasyon eğrisi çizilmiştir. Çözücü olarak saf su kullanılmıştır. Hazırlanan kalibrasyon standartları 1,5 ml hacmindeki vialler kullanılarak cihaza enjekte edilmiştir. Elde edilen toplam iyon kromatogramları kullanılarak etil alkole ilişkin kalibrasyon eğrisi elde edilmiştir. Kalibrasyon R2 katsayısı 0,99 olarak tespit edilmiştir. Kalibrasyon eşitliği ise $Y=1758{,}858X+235234{,}7$ olarak hesaplanmıştır. Kalibrasyon eğrisi Şekil ’de verilmiştir. Alkol tayini yapılacak hardaliye örnekleri 0,45 mikronluk filtrelerden geçirilmiş ve vorteks karıştırıcıda homojenize edilmiştir. Daha sonra 100 μL hardaliye örneğine çözücü olarak 900 μL saf su ilave edilerek her bir örnek seyreltilmiştir.



Şekil 2.1 Etil alkol standardına ait kalibrasyon eğrisi

2.3 Hardaliye Örneklerinin Mikrobiyolojik Analizleri

Örneklerde LAB (laktik asit bakterisi), maya ve küf sayımı yapılmıştır. Maya ve küf sayımı için DRBC besiyerine yayma ekim yöntemi ile ekim yapılmış ve örnekler 30°C'de 72 saat aerobik ortamda inkübe edilmiştir (Anonymous, 2001). LAB sayımı için MRS agar besiyerine damlatma ekim yöntemi ile ekim yapılmış, örnekler 37°C'de 72 saat hem aerobik hem anaerobik ortamda inkübe edilmiştir (De Man vd., 1960).

2.4 Hardaliye Örneklerinde Uçucu Bileşen Analizi

Hardaliye örneklerinin uçucu bileşen içeriğinin belirlenmesinde GC-MS (Gaz kromatografisi-Kütle spektroskopisi) tekniğinden yararlanılmıştır. GC-MS analizleri bazı modifikasyonlar ile Zhu vd. (2018) tarafından önerilen yöntem kullanılarak gerçekleştirilmiştir. GC-MS analizlerinde sıvı enjeksiyon verilerek GCMS-QP2010 (Shimadzu, Japonya) gaz kromatografisi-kütle spektroskopisi cihazı kullanılmıştır. Çalışmalarda GCMS-QP2010 birlikteliğinde CTC-Combi-PAL-Autosampler (Bender ve Hobein, Zurich, İsviçre) kullanılmıştır. Uçucu bileşen analizlerinde kromatografik ayırmanın sağlanması için Restec (Bellefonte, ABD) Rtx-5MS silika kapiler kolon (30 m × 0,25 mm (iç çap) x 0,25 μm) kullanılmıştır. Tespit edilen bileşenler cihazın sahip olduğu ticari kütüphaneler kullanılarak tanımlanmıştır. Sistemdeki taşıyıcı gaz 1 mL/dk akış hızı ile helyumdur. Kütle spektrumları 35-650 (m/z) kütle aralığında toplanmıştır. Enjektör ve dedektör sıcaklıkları 250 °C olarak ayarlanmıştır. Fırın sıcaklığı 3 dk süresince 40°C olarak başlatılmıştır. Dakikada 8°C artış ile fırın

sıcaklığı 100°C sıcaklığa yükseltilmiştir. Sonrasında fırın sıcaklığı dakikada 5°C artış ile 200°C sıcaklığa yükseltilmiştir, son olarak dakikada 10°C artış ile 250°C sıcaklığa yükseltilmiştir ve son sıcaklık 10 dakika süresince sabit tutulmuştur. Enjeksiyon bloğu ve iyon kaynağı sıcaklığı 250°C olarak ayarlanmıştır. Hardaliye numuneleri saf su ile seyreltilerek sıvı enjeksiyon modunda 4 μL hacim olarak cihaza enjekte edilmiştir. Uçucu bileşenlerin tanımlamaları GC-MS kütle spektrumu kütüphanelerindeki (NIST27 ve WILEY7) spektrumlar ile eşleştirme yaparak gerçekleştirilmiştir. Hardaliyelerin bileşiminde bulunan önemli uçucu bileşenler kalitatif olarak belirlenmiştir.

2.5 *In vitro* Sindirim Prosedürü ve Biyoerişilebilirliğin Hesaplanması

In vitro sindirimde Lee vd. (2016) tarafından bildirilen yöntem küçük modifikasyonlarla uygulanmıştır. Örneklerden 100 mL'lik erlenlere 5'er mL alınmış ve sıra ile ağız, mide ve ince bağırsak ortamı solüsyonları ilave edilerek *in vitro* ortamda sindirim gerçekleştirilmiştir.

Ağız ortamı: 1,7 mL NaCl (175,3 g/L), 8 mL üre (25 g/L), 15 g ürik asit, 280 mg a-amilaz ve 25 mg müsin, 500 mL'lik bir erlende deiyonize su ile çözülmüş, daha sonra hacim deiyonize su ile tamamlanmış ve pH yaklaşık 6,8 ± 0,2 olarak ayarlanmıştır. pH istenen değerde değilse, HCl veya NaOH çözeltisi kullanılarak istenilenen aralığa getirilmiştir.

Mide ortamı: 6,5 mL HCl (37 g/L), 18 mL $CaCl_2.H_20$ (22 g/L), 1 g sığır serumu albümini, 2,5 g pepsin ve 3 g musin, 500 mL'lik bir erlen içerisinde deiyonize su ile çözündürülmüştür. Daha sonra, hacim deiyonize su ile tamamlanmış ve pH 1,5'e (± 0,02) getirilmiştir. pH istenen aralıkta değilse, HCl veya NaOH çözeltisi ile ayarlanmıştır.

İnce bağırsak ortamı: 6,3 mL KCl (89,6 g/L), 9 mL $CaCl_2.2H_2O$ (22,2 g/L), 2 g sığır serum albümini, 1 g pankreatin ve 1,5 g lipaz, deiyonize su ile 500 mL'lik bir erlen içerisinde çözülmüştür. Hacim deiyonize su ile tamamlanmış ve pH 8,0 ± 0,2'e ayarlanmıştır. pH istenilen değerde değilse, HCl veya NaOH çözeltisi ile ayarlanmıştır.

Safra solüsyonu: 68,3 mL $NaHCO_3$ (84,7 g/L), 10 mL $CaCl_2.2H_2O$ (22,2 g/L), 1,8 g sığır serum albümini ve 30 g safra, 500 mL'lik bir erlende deiyonize su ile çözdürülmüğ, daha sonra hacim, deiyonize su ile tamamlanmış ve pH 7,0 ± 0,2'ye ayarlanmıştır.

Ağız ortamında; 100 mL'lik bir beher içerisinde 5 mL alınan örneklerin üzerine, hazırlanan ağız solüsyonundan 5 mL eklenerek karıştırılmış, daha sonra 30 saniye boyunca vorteks ile karıştırılarak homojen hale getirilmiştir. Daha sonra bu karışım 5 dakika boyunca 37°C'de çalkalamalı su banyosunda inkübe edilmiştir.

Mide ortamında; ağız ortamından gelen karışıma 12 mL mide solüsyonu ilave edilmiş, bu karışım, 30 saniye boyunca bir vorteks ile karıştırılmış ve 2 saat boyunca 37°C'de çalkalamalı su banyosunda tekrar inkübe edilmiştir.

İnce bağırsak ortamında; mide ortamından sonra elde edilen karışıma 10 mL ince bağırsak solüsyonu ve 5 mL safra solüsyonu eklenmiştir. Bu karışım 2 saat süre ile 37°C'de tekrar çalkalamalı su banyosunda inkübe edilmiştir. Sindirim işlemi tamamlandıktan sonra, son hacim, 50 mL'ye deiyonize su ile tamamlanarak seyreltilmiştir. Daha sonra numuneler 8000 rpm'de 10 dakika boyunca santrifüj edilmiş ve 0,45 μm CA filtreden süzülmüş ve analiz edilene kadar -20°C'de dondurucuda muhafaza edilmiştir.

Biyoerişilebilirliğin hesaplanması: Simüle edilmiş sindirimden sonra biyoerişilebilir bileşiklerin yüzdesi biyoerişilebilirlik indeksi kullanılarak hesaplandı. BI biyoerişilebilirlik indeksi, CF bağırsak fazındaki bileşiklerin konsantrasyonu, CI ise sindirilmemiş numunedeki başlangıç konsantrasyonudur (Ortega vd., 2011).

$$BI = 100 \cdot CF/(CI) \quad (2.3)$$

2.6 Ekstraktlarının Hazırlanması

Ekstraktların hazırlanmasında Mulero vd. (2010) tarafından bildirilen yöntem modifiye edilerek uygulanmıştır. 5 mL hardaliye veya sindirim örneğine 15 mL çözücü (0,1 HCl + 79,9 mL metanol + 20 mL H_2O) ilave edilmiş ve karanlıkta 25 ^oC sıcaklığa ayarlanmış çalkalamalı su banyosunda 15 saat süreyle bekletilmiştir. Süre sonunda 15 dakika ultrasonik su banyosunda bekletilen

örnekler önce 2000 rpm devirde 10 dakika santrifüj edilmiştir. Daha sonra ise ilk santrifüjden elde edilen berrak kısımlar 6000 rpm devirde 20 dakika süreyle ikinci bir santrifüjleme işlemine tabi tutulmuştur. Ekstraksiyon işleminden sonra elde edilen ekstraktlar kullanılmak üzere ayrı ayrı örnek tüplerine konularak -20 ^{o}C sıcaklıkta muhafaza edilmiştir.

2.7 Hardaliye ve Sindirim Ekstraktlarının Spektrofotometrik Analizleri

2.7.1 Toplam Fenolik Madde Miktarı Tayini

Hazırlanan hardaliye ekstraktlarında Folin–Ciocalteu yöntemi kullanılarak toplam fenolik madde tayini yapılmıştır. Yöntem, fenolik bileşiklerin Folin Ciocalteu ayıracı ile bazik ortamda reaksiyon vermesine dayanmaktadır. Gerçekleşen reaksiyon sonucunda indirgenen ayracın oluşturduğu mavi rengin, spektrofotometrik olarak ölçülmesi ile örnek içerisindeki toplam fenolik madde miktarı hesaplanmıştır. Yöntemde %10 (v/v)'luk Folin–Ciocalteu reaktifi, bazik ortamı sağlamak için %7,5 (v/v)'lik Na_2CO_3 çözeltisi kullanılmıştır. Uygun oranda destile suyla seyreltilen 0,5 mL hardaliye ekstraktlarına %10'luk 2,5 mL Folin–Ciocalteu reaktifi eklendikten sonra 5 dk. beklenmiş ve 2 mL %7,5'lik Na_2CO_3 çözeltisi eklenmesinin ardından vorteks karıştırıcıda karıştırılmış, 90 dk. oda sıcaklığında ve karanlık ortamda bekletilen örneklerin absorbans değerleri UV- spektrofotometrede (Shimadzu UV- 1800, Japonya) 765 nm' de ölçülmüştür (Singleton ve Rossi, 1965; Singleton vd., 1999). Analiz üç paralelli gerçekleştirilmiştir.

2.7.2 Toplam Flavonoid Madde Miktarı Tayini

Hazırlanan hardaliye ekstraktlarında Zhishen vd. (1999)'nin yöntemine göre toplam flavonoid madde tayini yapılmıştır. Analizde, 1 mL hardaliye ekstraktına 5 mL destile su ardından %5 (w/v)'lik $NaNO_2$' den 0,3 mL eklenip karıştırılmış, 5 dk. bekledikten sonra %10 (w/v)'luk $AlCl_3$'den 0,3 mL eklenmiş ve tekrar karıştırılmıştır. Sonra 6 dk. daha beklenmiş ve 1 M'lık NaOH çözeltisinden 2 mL ve 1,4 mL destile su ilave edilmiştir. Örneklerin absorbans değerleri hemen UV-spektrofotometrede (Shimadzu UV-1800, Japonya) 510 nm dalga boyunda ölçülmüştür. Analiz üç paralelli gerçekleştirilmiştir.

2.7.3 Toplam Monomerik Antosiyanin Miktarı Tayini

Toplam monomerik antosiyanin içeriğinin belirlenmesi için analiz Giusti ve Wrolstad (2001) tarafından tarif edilen pH-diferansiyel metodu kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Hardaliye örnekleri, KCI (0,025 M, pH = 1,0) ve CH_3-COONa (0,4 M, pH = 4,5) tampon çözeltileri ile seyreltilmiş ve her örneğin UV-spektrofotometrede (Shimadzu UV- 1800, Japonya) 400-600 nm arasında maksimum olduğu absorbans değeri ve 700 nm'deki absorbans değeri belirlenmiştir. Antosiyanin miktarı Malvidin-3-glukozid cinsinden hesaplanmıştır. Analiz üç paralelli gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar aşağıda verilen eşitlik ile hesaplanmıştır.

$$MAM\ (mg/L) = A(MA)(SF)*1000/(\varepsilon)(L) \qquad (2.4)$$

(MAM: Monomerik antosiyanin miktarı, A: Absorbans farkı (pH 1,0 ve 4,5 değerlerinde ölçülen absorbans farkı) A= (A515-A700)pH1 - (A515-A700)pH4.5 , MA: Antosiyaninin molekül ağırlığı (MAmalvidin-3- glukozid=493,5g/mol), SF: Seyreltme faktörü, ε: Molar absorpsiyon katsayısı (28000), L: Absorbans ölçüm küvetinin tabaka kalınlığı (cm))

2.7.4 DPPH (1,1-difenil-2 pikrilhidrazil) Yöntemiyle Toplam Antioksidan Kapasite Tayini

DPPH (1,1-difenil-2 pikrilhidrazil) analizi Kumaran vd. (2006)'nin yöntemine göre yapılmıştır. DPPH radikal yakalama yöntemi antioksidan bileşiklerin mor renkli stabil bir bileşik olan DPPH radikalini indirgeme yetenekleri ile ilişkilidir. Deney tüpüne 100 μL örnek (ekstrakt) koyulmuş üzerine 3,9 ml 0,1 mM DPPH eklenmiş ve vorteks karıştırıcıda karıştırılmıştır. Karıştırma ve 30 dk oda sıcaklığında ve karanlık ortamda bekletilen örneklerin absorbans değerleri spektrofotometrede 517 nm de metanole karşı (100 μL metanole 200 μL 0,1 mM DPPH) ölçülmüştür. Analiz üç paralelli gerçekleştirilmiştir. Örneklerin DPPH yöntemiyle belirlenen toplam antioksidan aktivitesi mmol Trolox / L olarak ifade edilmiştir.

2.7.5 CUPRAC Yöntemiyle Toplam Antioksidan Kapasite Tayini

CUPRAC (bakır azaltıcı antioksidan kapasite) analizi Apak vd. (2004)'nin yöntemine göre yapılmıştır. 10 mM $CuCl_2.2H_2O$ çözeltisi, 7,5 mM Neocuproine çözeltisi ve 1 M amonyum asetat çözeltisi hazırlanmıştır. Deney tüpüne sırasıyla 1 mL $CuCl_2.2H_2O$ çözeltisi, 1 mL Neocuproine çözeltisi, 1 mL amonyum asetat çözeltisi ve 0,1 mL örnek (ekstrakt) konulmuş, üzerine son hacim 4,1 mL olacak şekilde 1 mL su ilave edilmiş ve vorteks karıştırıcıda karıştırılmıştır. 60 dk. oda sıcaklığında ve karanlık ortamda bekletilen örneklerin absorbans değerleri spektrofotometrede 450 nm'de ölçülmüştür. Analiz üç paralelli gerçekleştirilmiştir.

2.8 Hardaliye Örneklerinde *in vitro* Glisemik İndeks Belirlenmesi

Hardaliye örneklerinde *in vitro* glisemik indeks tayininde Englyst vd. (1999) yöntemi modifiye edilerek kullanılmıştır. 1 g beyaz ekmek üzerine 1 mL hardaliye eklenerek hazırlanan örneklerin üzerine pepsin-guar gum çözeltisi eklenmiş ve 37°C'de 30 dk inkübe edilmiştir. Daha sonra sodyum asetat ile pH değeri 5'e getirilmiş, pankreatin ve amiloglukozidazdan oluşan enzim solüsyonu ilave edilerek 37°C'de inkübasyona bırakılmıştır. 20, 30, 60, 90, ve 120. dk'larda 0,5 mL örnek alınarak ısıl işlemle denatüre edilmiştir. Sonrasında tüpler içindeki örneklerin hacimleri 5 mL'ye tamamlanmış ve 4000xg 5 dk koşullarında santrifüj edilmiştir. Örneklere GOPOD (Megazyme Int. İrlanda) ilave edilerek 50°C'de 20 dk inkübe edildikten sonra spektrofotometrede 510 nm dalga boyunda (Optima, SP300nano, Itabashi, Tokyo) absorbans değerleri tespit edilmiştir. Hardaliye örneklerinin 0-180 dk arasındaki glukoz salımlarının zamana karşı grafiğinin altında oluşan alan standart olarak satın alınan beyaz ekmeğe ait grafiğin altında kalan alan ile oranlanarak hidroliz indeksi hesaplanmıştır.

Glisemik indeks (GI) değerleri ise aşağıda yer alan denkleme göre hesaplanmıştır (Goñi vd., 1997).

$$GI = 39{,}71 + 0{,}549 \times HI \qquad (2.5)$$

2.9 Malondialdehit (MDA) Analizi

Sindirilmiş ve sindirilmemiş içecek ve et ürünlerinde MDA analizi için Bertolín vd. (2019) ve Zhang vd. (2015) metodu bazı değişikliklerle uygulanmıştır.

Deney Çözümlerinin Hazırlanması: Trikloroasetik asit (%10 TCA) çözeltisi için; 100 g trikloroasetik asit deiyonize su içinde çözülmüş ve 1000 mL'ye tamamlanmıştır. Tiobarbitürik asit (%0,67 TBA) çözeltisi için; 1,675 g tiyobarbitürik asit distile su içinde çözülerek 250 mL'ye tamamlanmıştır. Tetraetoksipropan standardı için; 0.5 mL tetraetoksipropan standardı alınmış ve 100 mL etanol ile tamamlanmıştır. Bu çözeltiden 0.1 mL alınarak 100 mL deiyonize su içinde hazırlanan TCA ile tamamlanmıştır. Standart çözeltinin konsantrasyonu 20 μL/L'dir.

Numune Hazırlama: 5 g / 5 mL sindirilmiş ve sindirilmemiş içecek ve et ürünleri 50 mL'lik falcon tüplere alınmış ve 25 mL %10 TCA eklenmiştir. 150 μL %7,2 BHT de sindirilmemiş ürünlere eklenmiştir. Örnekler UltraTurrax® parçalayıcıda 16.000 rpm'de 1 dakika homojenize edilmiş ve hacim 50 mL'ye tamamlanmıştır. Daha sonra örnekler 8000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj edilen süpernatanttan 1 ml alınarak türevlendirme için 1 ml TBA asit solüsyonu ilave edilmiştir. 90°C'de 30 dakika su banyosunda tutulmuş ve oda sıcaklığında soğutulmuştur. 0,45 mikron şırınga uçlu selüloz asetat filtreden süzülerek 2 mL vidalı kapaklı amber şişelere alınmış ve HPLC'ye gönderilmiştir.

Standart Hazırlama: 0,1 mL Tetraetoksipropan standart solüsyonu alınarak deney tüpüne ilave edilmiştir. 1 mL TCA solüsyonu eklendi. 90°C'de 10 dakika su banyosunda tutuldu ve oda sıcaklığında soğutulmuştur. 0,45 mikronluk bir şırınga uçlu selüloz asetat filtreden süzüldü, 2 mL vidalı kapaklı amber şişelere alındı ve HPLC'ye gönderilmiştir.

HPLC parametreleri: Yüksek performanslı sıvı kromatografi sistemi, bir Shimadzu SPD-20A UV/VIS dedektörü (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japonya) tarafından bir Shimadzu LC 20AT pompasından oluşumuştur. Mobil faz, 0,05M KH_2P0_4 tampon solüsyonu/metanol/asetonitril (72/17/11) karışımından oluşturulmuştur. Dedektör dalga boyu 540 nm'ye ayarlanmıştır. Enjeksiyon

hacmi 10 μL ve akış hızı 1 mL/dk olan bir Inersil ODS-3 (4,6 mm x 150 mm) kolonu kullanılmıştır.

Diğer içecek örnekleri: Ayran, şalgam ve kola örnekleri İstanbul, Türkiye'deki farklı süpermarketlerden satın alınmıştır. İçeceklerin makro besin içerikleri Tablo 2.1'de verilmiştir.

Et örnekleri: Araştırmada kullanılan 3 farklı marka et döner (et kaynağı dana ve kuzu eti), 3 farklı marka hamburger köftesi ve 3 farklı marka köfteden (et kaynağı dana eti) oluşan et örnekleri İstanbul, Türkiye'deki farklı süpermarketlerden satın alınmıştır. Et numuneleri, ısıtıldıktan sonra tüketime uygun dondurulmuş ürünlerdir. Kullanılan et numuneleri, analizden önce 4 dakika boyunca 180°C'de bir fırında ısıtılmıştır. Et ürünlerinin makrobesin içerikleri de Tablo 2.1'de verilmiştir.

Tablo 2.1 Et ve içecek ürünlerinde bildirilen makro besin miktarları

Örnek	**Enerji** (kcal/100 g)	**Yağ** (g/100 g)	**Doymuş yağ** (g/100 g)	**Karbon hidrat** (g/100 g)	**Protein** (g/100 g)	**Tuz** (g/100 g)
D1 (Döner 1)	285	24,8	17	0,4	13,7	2
D2 (Döner 2)	293	25	16	1	16	2
D3 (Döner 3)	292	24,5	16	0,4	16,6	2
H1 (Hamburger köftesi 1)	285	23	11	5	10	2
H2 (Hamburger köftesi 2)	237	25	16.9	2	13	0,5
H3 (Hamburger köftesi 3)	279	25	12	5	13	1,6
K1 (Köfte 1)	258	26	8,3	7	16,5	1,2
K2 (Köfte 2)	332	22	13	8	12	1,3
K3 (Köfte 3)	254	28	5	1	13	1,3
	(kcal/100 mL)	(g/100 mL)	(g/100 mL)	(g/100 mL)	(g/100 mL)	(g/100 mL)
Ayran	32	1,8	1,2	2	2	0,6
Şalgam	12,6	0,12	0,12	0,16	0,24	0,76
Kola	45	0	0	11,2	0	0

2.10 HPLC ile Fenolik Bileşiklerin Profili

Fenolik bileşikler, HPLC sistemi (LC-20AD pompası, SIL-20A HT otomatik numune alıcısı, CTO-10ASVP fırını, DGU-20A5R gaz giderici, CMB-20 A iletişim modülü bir diyot dizi dedektörü, SPDM20A DAD (Shimadzu, Japonya) kullanılarak Uçar ve Karadağ (2019)'a göre belirlenmiştir. Ayırmalar, bir Inertsil® ODS C-18 ters fazlı kolonda (250 × 4.6mmx5um, GL Sciences, Japonya) 40°C'de gerçekleştirilmiştir. Kullanılan mobil fazlar, su içinde asetik asit (0,1:99,9, v:v) ve asetonitril içinde asetik asit (0,1:99,9, v:v) dir. Fenolik asitleri, flavonoidleri ve antosiyaninleri ölçmek için 278, 320, 360 ve 520 nm'de kromatogramlar alınmıştır. Tanımlama ve miktar tayini, UV absorpsiyon spektrumları ve her bileşiğin alıkonma süreleri harici standartlarınkilerle karşılaştırılarak yapılmıştır. Tüm analizler üç kopya halinde yapılmış ve sonuçlar mg/ L olarak verilmiştir. Antosiyanin bileşikler Simões vd. (2009) tarafından bildirilen metodun modifiye edilmesi ile belirlenmiştir. Analiz parametreleri şu şekildedir; Kolon: C18 Supelco Dalga boyu: 520 nm Sıcaklık: 20°C Mobil faz A: %7,5 formik asit içeren asetonitril Mobil faz B: %7,5 formik asit içeren saf su Akış hızı: 1 mL Enjeksiyon hacmi: 20 ppm Akış programı: 1 dakika: 3% A + 97% B 11 dakika: 3-15% A + 97-85% B (toplam 12 dakika) 12 dakika: 15-25% A + 85-75% B (toplam 24 dakika) 4 dakika: 25-30% A + 75-70% B (toplam 28 dakika) 58 7 dakika: 30% A + 70% B (toplam 35 dakika) 10 dakika: %3 A + 97% B (toplam 45 dakika).

2.11 LC-QTOF-MS ile Metabolit Profili

Sıvı kromatografi kuadropol uçuş zamanlı kütle spektrometresi Q-TOF-LC/MS sisteminde (Agilent 6530, CA, Amerika) elektrospray iyonlaştırıcı (ESI) kaynağı (G6530B model, Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) kullanılmıştır. Poroshell 120 EC-C18 (3,0X150mm, 2,7 micron) (Agilent) kolonda kromatografik olarak ayrılmıştır. Su ve % 0,1 formik asit karışımı mobil faz A ve MeOH mobil faz B olarak kullanılmıştır. Çalışma parametreleri şu şekilde optimize edildi: kurutucu gaz akış hızı 10 L/dk, nebilözör gaz basıncı 40 psi, kurutucu gaz sıcaklığı 300 °C, kapiler voltajı 3500 V’ dur. Kütle spektrumları analizi için pozitif iyon modları kullanılmış ve kütle aralığı ise 50-3200 m/z’ye kadar çalışılmıştır.

2.12 İstatistiksel Değerlendirme

İstatistik analizler için SPSS paket programı kullanılmıştır. Tek faktörlü varyans analizi uygulanmış, farklılıklar % 5 güven aralığında ($p<0,05$) belirlenmeye çalışılmıştır. Varyans analizi sonucuna göre, gerekli olduğu durumda varyasyon kaynaklarının ortalamalarının karşılaştırılmasında çoklu karşılaştırma testi (Tukey) uygulanmıştır.

3
BULGULAR VE TARTIŞMA

3.1 Hardaliye Örneklerinin Kimyasal Analiz Bulguları

3.1.1 Hardaliye Örneklerinin pH Değerleri

Örneklerin pH ölçümleri oda sıcaklığında üç tekerrürlü gerçekleştirilmiş, her bir örnek için sonuçların ortalaması Tablo 3.1' de verilmiştir. Örneklerin pH değerleri 3,31±0,054 ile 3,45±0,079 arasında değişmiştir. Yapılan varyans analizi sonucunda hardaliye örneklerinin pH değerleri arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$). Belirlenen pH değerleri literatür bulguları ile uyumludur (Arici ve Coşkun, 2001; Coşkun vd., 2018; Aydoğdu vd., 2014; Coşkun vd., 2009; Gündüz vd., 2019; Başyiğit vd., 2016).

3.1.2 Hardaliye Örneklerinin Asitlik Değerleri

Hardaliye örneklerinde toplam asitlik tayini yapılmış, bu amaçla örnekler 0,1 N NaOH çözeltisi ile titre edilmiş ve harcanan baz çözeltisi miktarına göre titrasyon asitliği tartarik asit cinsinden hesaplanmıştır. Analiz üç tekerrürlü gerçekleştirilmiş, her bir örnek için sonuçların ortalaması Tablo 3.1'de verilmiştir. Örneklerin titrasyon asitliği 0,73±0,06 ile 0,98±0,14 arasında değişmiştir. Yapılan varyans analizi sonucunda hardaliye örneklerinin asitlik değerleri arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$). Belirlenen asitlik değerleri literatür bulguları ile uyumludur (Coşkun vd., 2018; Aşkın ve Atik 2016).

3.1.3 Hardaliye Örneklerinin Kuru Madde Değerleri

Hardaliye örneklerinin kuru madde içeriği belirlenmiş, sonuçlar °Briks değerleri olarak ifade edilmiştir. Ölçümler üç tekerrürlü gerçekleştirilmiş, her bir örnek için sonuçların ortalaması Tablo 3.1' de verilmiştir. Örneklerin °Briks değerleri 20,25±0,28 ile 22,25±0,28 arasında değişmekle birlikte her üç üzüm çeşidinden üretilen hardaliyelerin °Briks değerleri birbirlerine oldukça yakındır. Yapılan varyans analizi sonucunda hardaliye örneklerinin kuru madde değerleri

arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$). Belirlenen °Briks değerleri literatür bulguları ile uyumludur (Aşkın ve Atik 2016; Altay, 2013; Vardar vd., 2015).

3.1.4 Hardaliye Örneklerinin Renk Değerleri

Hardaliye örneklerinin renk değerleri belirlenmiş, bu amaçla kolorimetre kullanılmıştır. Ölçümler sonunda parlaklığı belirten *L*,* kırmızılığı belirten *a*,* ve sarılığı belirten *b** değerleri belirlenmiştir. Analiz üç tekerrürlü gerçekleştirilmiş, her bir örnek için sonuçların ortalaması Tablo 3.1'de verilmiştir. *L** değeri dikey eksende parlaklıktan koyuluğa gidişi belirtirken *+a** kırmızılığa, *-a** yeşilliğe, *+b** sarılığa, *-b** ise maviliğe gidişi göstermektedir. Bütün hardaliye örneklerinde *L** değerleri birbirlerine yakındır bu örneklerin neredeyse eşit derecede saydam olduğunu ifade etmektedir. *a** değeri en yüksek Shiraz hardaliye örneklerinde ve *b** değerleri de en yüksek Merlot hardaliye örneklerinde belirlenmiştir. Bu da Shiraz hardaliye örneklerinin diğer örneklere kıyasla daha kırmızı, Merlot hardaliye örneklerinin ise diğer örneklere kıyasla daha sarı olduğunu göstermektedir. Yapılan varyans analizi sonucunda hardaliye örneklerinin renk değerleri arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır ($p>0.05$). Belirlenen *a** ve *b** değerleri literatür bulguları ile uyumludur (Coşkun vd., 2018; Vardar vd., 2015).

3.1.5 Hardaliye Örneklerinin Toplam Şeker ve İnvert Şeker Değerleri

Örneklerin toplam şeker ve invert şeker değerleri Lane-Eynon yöntemine göre tespit edilmiştir. Ölçümler üç tekerrürlü gerçekleştirilmiş, her bir örnek için sonuçların ortalaması Tablo 3.1' de verilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre örneklerin toplam şeker değerleri 27±0,00 ile 28,5±0,00 arasında ve invert şeker değerleri 16,35± 0,5ile 18,9± 1,2 arasında değişmiştir. Yapılan varyans analizi sonucunda hardaliye örneklerinin toplam şeker değerleri arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmamış ($p>0,05$) invert şeker değerleri arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$). Belirlenen toplam şeker ve invert şeker değerleri literatür bulguları ile

uyumludur (Coşkun vd., 2018; Altay, 2013; Coşkun vd., 2012; Coşkun ve Arici, 2011).

3.1.6 Hardaliye Örneklerinin Alkol Değerleri

Hardaliye örneklerinin etil alkol içeriği belirlenmiş, sonuçlar % olarak ifade edilmiş ve Tablo 3.1'de verilmiştir. Yapılan varyans analizi sonucunda hardaliye örneklerinin etil alkol değerleri arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$). Örneklerin alkol değerlerinin % 0,03 ile 0,16 arasında değiştiği ve alkolsüz içecekler tekniğine (TEBLİĞ NO: 2007/26) uygun olduğu belirlenmiştir (Mevzuat Bilgi Sistemi, 2021).

Tablo 3.1 Hardaliye örneklerinin pH, toplam asitlik, kuru madde, renk, alkol, toplam şeker ve invert şeker değerleri

Analiz		Hardaliye		
		Shiraz	**Merlot**	**Cabernet Sauvignon**
	pH	3,31±0,05[a]	3,39±0,08[c]	3,45±0,07[b]
	Titrasyon asitliği (%)	0,98±0,14[a]	0,91±0,09[ab]	0,73±0,06[b]
	°Briks	22,25±0,28[a]	21,75±0,28[c]	20,25±0,28[b]
	Alkol (%)	0,03	0,07	0,16
Renk	***L****	27,98±0,44[a]	27,76±0,37[a]	27,69±0,2[a]
	a*	1,81±0,96[a]	1,00±0,79[a]	0,73±0,41[a]
	b*	1,8±0,23[a]	1,84±0,23[a]	1,78±0,05[a]
	Toplam şeker (g/100mL)	27,5±0,00[a]	27±0,00[a]	28,5±0,00[a]
	İnvert şeker (g/100mL)	16,9±0,6[a]	16,35± 0,5[a]	18,9± 1,2[b]

*Aynı satırda farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$).

3.2 Hardaliye Örneklerinin Mikrobiyolojik Özellikleri

LAB sayımı için MRS agar besiyerine damlatma ekim yöntemi ile ekim yapılmış, örnekler 37ºC'de 72 saat hem aerobik hem anaerobik ortamda inkübe edilmiştir. Maya ve küf sayımı için ise DRBC besiyerine yayma ekim yöntemi ile ekim yapılmış ve örnekler 30ºC'de 72 saat aerobik ortamda inkübe edilmiştir. LAB için gelişme yalnızca aerobik ortamda inkübasyona bırakılan örneklerde tespit edilmiştir. Gerçekleştirilen denemelerde Shiraz hardaliye örneklerinin LAB sayısı 2,87 x 10^3 kob/mL bulunmuştur. Cabernet Sauvignon hardaliye örneklerinin LAB sayısı 5,36 x 10^3 kob/mL olarak belirlenmiştir. Merlot hardaliye örneklerinin LAB sayısı 3,74 x 10^3 kob/mL bulunmuştur. Örneklerde maya ve küf gelişimi tespit edilmemiştir. Hardaliye örneklerinin koloni sayısı değerleri arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$). Coşkun vd. (2018), 23 hardaliye örneğinin 18'inde $1x10^1$-$2,3x10^4$ kob/mL arasında maya-küf tespit etmiş, 16'sında ise $1x10^2$ -$3x10^5$ kob/mL arasında LAB tespit etmişlerdir. Arıcı ve Coşkun (2001), LAB sayısını $1,2x10^2$-$6,0x10^4$ kob/mL aralığında belirlemişlerdir.

Tablo 3.2 Gelişme tespit edilen örneklerin koloni sayıları

Hardaliye	Koloni sayısı
Shiraz	$2,87^{a}$ x 10^3
Merlot	$3,74^{c}$ x 10^3
Cabernet Sauvignon	$5,36^{b}$ x 10^3

*Aynı satırda farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$).

3.3 Hardaliye Örneklerinde Uçucu Bileşen Profili

Hardaliyelerin uçucu bileşen komposizyonları yönünden tanımlamaları elde edilen kütle spektrumlarının GC-MS cihazının sahip olduğu ticari (NIST27 ve WILEY7) kütüphaneler ile karşılaştırılması ile gerçekleştirilmiştir. Uçucu bileşen analizi kromatogramkarı ekte verilmiştir. GC-MS cihaz kütüphaneleri kullanılarak tespit edilen uçucu bileşenler (% içerik), % eşleşme ve kimyasal isimleri Tablo 3.3'de gösterilmiştir. Hardaliye örneklerinde en yüksek % içerik 2-

Furankarboksilaldehit, 5-(hidroksimetil)-(CAS - HMF) ve 9- Oktadekenoik asit (Z)-, 9-oktadesenil ester, (Z)- (CAS - oleyl oleate) bileşenlerine ait bulunmuştur. Shiraz hardaliyesinde 28, Merlot hardaliyesinde 26 ve Cabernet Sauvignon hardaliyesinde 24 farklı bileşen belirlenmiş; toplamda 57 farklı bileşen tespit edilmiştir. HMF gıdalarda Maillard reaksiyonu esnasında enzimatik olmayan esmerleşme reaksiyon ürünlerinden biri olarak veya heksoz şekerlerin asidik ortamda parçalanması sonucu meydana gelir. Maillard reaksiyonu asidik şartlarda, oda sıcaklığında dahi gerçekleşebildiğinden, indirgen şekerleri içeren asidik meyve sularında tespit edilmektedir. Oleik asit oleyl ester (oleyl oleate) molekül formülü $C_{36}H_{68}O_2$ olan üzüm çekirdeğinde bulunan bir yağ asididir.

Tablo 3.3 GC-MS ile ha rdaliye örneklerinin kompozisyonunda belirlenen uçucu bileşenler ve yüzde (%) konsantrasyonları

Shiraz Hardaliye					
R.T.	**Eşleşme (%)**	**İçerik (%)**	**Kimyasal İsim**	**Kimyasal Formül**	**Molekül Ağırlığı (g/mol)**
3,13	98	0,68±0,07	Asetik asit	$C_2H_4O_2$	60,05
3,84	96	0,165±0,03	Hidroksiaseton	$C_3H_6O_2$	74,07
7,95	98	4,54±1,67	L-Laktik asit (2-hidroksipropanoik asit)	$C_3H_6O_3$	90,08
9,88	76	0,27±0,01	Etil Undec-2-enoate	$C_{13}H_{24}O_2$	212,33
9,88	76	0,24±0,01	3,5-Dimetil-3-heksanol	$C_8H_{18}O$	130,23
10,97	93	0,17±0,03	1,3,3-trimetil-2-oksabicyclo[2.2.2]oktan (Ökaliptol)	$C_{10}H_{18}O$	154,25
12,21	79	0,33±0,01	3-Hidroksi-2-metil-4-piron (Maltol)	$C_6H_6O_3$	126,11
12,24	83	0,3±0,01	1,3,5-Triazin-2,4,6-triamin (Melamin)	$C_3H_6N_6$	126,11
12,35	87	0,26±0,10	2-Furankarboksilik asit, metil ester	$C_6H_6O_3$	126,11
12,41	81	0,225±0,13	4-hidroksi-2,5-dimetil-3(2H)-furanon (HDMF) (Furaneol)	$C_6H_8O_3$	128,12
13,87	81	0,17±0,00	2-asetil-2-hidroksi-.gama.-bütirolakton (2-Asetilbutirolakton)	$C_6H_8O_3$	128,13
14,13	91	5,74±1,18	3,5-Dihidroksi-6-metil-2,3-dihidro-4H-piran-4-one (DDMP)	$C_6H_8O_4$	144,12
14,69	93	0,6±0,04	Benzenecarboksilik asit (Benzoik asit)	$C_7H_6O_2$	122,12
16,60	95	31,43±8,93	2-Furankarboksilaldehit, 5-(hidroksimetil) (HMF)	$C_6H_6O_3$	126,11
17,02	90	0,57±0,28	1,2,3-Propanetriol, monoasetat (gliserol asetat)	$C_5H_{10}O_4$	134,13
17,1	80	0,17±0,00	2,2-Dimetilsikloheksanon	$C_8H_{14}O$	126,20
18,15	80	0,88±0,06	3,5-dihidroksi-2-metil-5,6-dihidroksipiran-4-one	$C_6H_8O_4$	144,12
19,07	73	2,05±0,10	4-Metil-1-piperazin etanol	$C_7H_{16}N_2O$	144,21
19,07	73	1,09±0,05	1,3-dimetil-1,3-diazinan-2-thione	$C_6H_{12}N_2S$	144,24
20,82	81	1,86±0,09	Tetrahidrol[2,2']bifuranil-5-one	$C_8H_{12}O_3$	156,18
20,84	80	1,87±0,09	Butanoik asit, (tetrahidro-2-furanil)metil ester (Tetrahidrofurfurilbutirat)	$C_9H_{16}O_3$	172,22
22,49	74	2,35±0,11	Ksantin riboz (Ksantosin)	$C_{10}H_{12}N_4O_6$	284,22
22,7	75	3,41±0,17	Guanosin	$C_{10}H_{13}N_5O_5$	283,24
22,89	83	9,56±0,47	β-D-Fruktofuranosil α-D-glukopiranosit (Sukroz)	$C_{12}H_{22}O_{11}$	342,30
39,06	75	0,19±0,00	9,12-Oktadekadienoik asit (Z,Z)-, metil ester (Metil linoleat)	$C_{19}H_{34}O_2$	294,47
39,07	77	0,12±0,00	1-bromoheptadek-5-en	$C_{17}H_{33}Br$	317,3
39,19	87	0,74±0,24	9-Oktadesenoik asit (Z) (Oleik asit)	$C_{18}H_{34}O_2$	282,5
55,38	77	34,88±1,74	9- Oktadekenoik asit (Z)-, 9-oktadesenil ester, (Z)- (Oleik asit, cis-9-oktadesenil ester)	$C_{36}H_{68}O_2$	532,92

Tablo 3.3 GC-MS ile hardaliye örneklerinin kompozisyonunda belirlenen uçucu bileşenler ve yüzde (%) konsantrasyonları (devamı)

Merlot Hardaliye					
R.T.	**Eşleşme (%)**	**İçerik (%)**	**Kimyasal İsim**	**Kimyasal Formül**	**Molekül Ağırlığı (g/mol)**
3,17	98	1±0,89	Asetik asit	$C_2H_4O_2$	60,05
3,85	97	0,48±0,024	2-Propanon, 1-hidroksi (Hidroksiaseton)	$C_3H_6O_2$	74,07
6,56	81	0,93±0,04	2-Furankarboksilaldehit (Furfural)	$C_5H_4O_2$	96,08
6,84	71	0,52±0,00	2- Furankarboksilaldehit (Furfural)	$C_5H_4O_2$	96,08
7,92	98	0,62±0,23	L-Laktik asit (2-hidroksipropanoik asit)	$C_3H_6O_3$	90,08
12,35	87	0,53±0,02	Metil furan-2-karboksilat (Metil 2-furoat)	$C_6H_6O_3$	126,11
12,41	83	0,5±0,02	4-hidroksi-2,5-dimetil-3(2H)-furanon (HDMF) (Furaneol)	$C_6H_8O_3$	128,12
14,14	90	9,26±0,46	3,5-Dihidroksi-6-metil-2,3-dihidro-4H-piran-4-one (DDMP)	$C_6H_8O_4$	144,12
14,69	93	0,85±0,04	Benzenekarboksilik asit (Benzoik asit)	$C_7H_6O_2$	122,12
16,64	95	32,17±30,97	2-Furankarboksilaldehit, 5-(hidroksimetil) (HMF)	$C_6H_6O_3$	126,11
17,01	90	0,625±0,38	1,2,3-Propanetriol, monoasetat (Gliseril monoasetat)	$C_5H_{10}O_4$	134,130
18,12	80	0,825±0,84	2,3-Dihidro-3,5-dihidroksi-6-metil-4H-piran-4-one	$C_6H_8O_4$	144,12
19,07	73	0,33±0,01	1-(2-Hidroksietil)-4-metilpiperazin (4-Metil-1-piperazinetanol)	$C_7H_{16}N_2O$	144,21
19,07	71	2,09±0,10	Pentanedioik asit, 2,2-dimetil-, bis(1-metilpropil) ester	$C_{15}H_{28}O_4$	272,38
20,83	78	2,07±0,10	2-(1-hidroksietil)-tetrahidrofuran	$C_7H_{14}O_3$	146,18
20,84	80	0,33±0,01	Tetrahidro[2,2']bifuranil-5-one	$C_8H_{12}O_3$	156,18
22,49	70	5,77±0,28	3-Pentanol, 2-kloro-4-metil	$C_6H_{13}ClO$	136,62
22,85	75	2,3±0,11	.alfa.-D-Glukopiranosit, O-.alfa.-D-glukopiranosil-(1.fwdarw.3)-.beta.-D-fruktofuranosil	$C_{18}H_{42}O_{21}$	594,5
22,99	72	1,48±0,07	Ksantin riboz (Ksantosin)	$C_{10}H_{12}N_4O_6$	284,22
39,19	88	0,61±0,56	9-Oktadesenoik asit (Z) (Oleik asit)	$C_{18}H_{34}O_2$	282,5
42,02	87	1,40±0,60	Trisiklo[20.8.0.0E7,16]Triakontan, 1(22),7(16)-Diepoksi-	$C_{30}H_{52}O_2$	444,7
42,27	79	2,79±0,13	(R)-(-)-14-Metil-8-heksadesin-1-ol	$C_{17}H_{32}O$	252,4
42,77	85	4,71±1,60	Trisiklo[20.8.0.0E7,16]Triakontan, 1(22),7(16)-Diepoksi-	$C_{30}H_{52}O_2$	444,7
42,92	81	6,6±0,33	Koiganal II	$C_{18}H_{32}O$	264,5
43,57	81	6,6±0,33	Koiganal I	$C_{18}H_{34}O$	266,46
43,78	79	16,46±1,82	9- Oktadekenoik asit (Z)-, 9-oktadesenil ester, (Z)-	$C_{36}H_{68}O_2$	532,92
45,64	77	0,42±0,02	Flavon 4'-OH,5-OH,7-DI-O-Glukosit	$C_{27}H_{30}O_{15}$	428
46,40	81	0,4±0,02	Sikloheksen, 4-Pentil-1-(4-Propilsikloheksil)	$C_{20}H_{36}$	276,5

Tablo 3.3 GC-MS ile hardaliye örneklerinin kompozisyonunda belirlenen uçucu bileşenler ve yüzde (%) konsantrasyonları (devamı)

Cabernet Sauvignon Hardaliye					
R.T.	**Eşleşme (%)**	**İçerik (%)**	**Kimyasal İsim**	**Kimyasal Formül**	**Molekül Ağırlığı (g/mol)**
3,18	98	0,58±0,15	Asetik asit	$C_2H_4O_2$	60,05
6,63	93	1,15±0,05	2-Furankarboksilaldehit (Furfural)	$C_5H_4O_2$	96,08
10,96	93	0,16±0,00	Ökaliptol (1,8-Sineol)	$C_{10}H_{18}O$	154,24
12,17	88	1,11±1,04	1,3,5-Triazin-2,4,6-triamin (Melamin)	$C_3H_6N_6$	126,11
12,33	86	0,74±0,03	2-Furankarboksilik asit, metil ester (Metil 2-furoat)	$C_6H_6O_3$	126,11
12,39	71	0,52±0,02	3-Isopropil-6-metil-2,5-dioksopiperazin	$C_8H_{14}N_2O_2$	170,21
14,11	90	6,47±0,32	2,3-Dihidro-3,5-dihidroksi-6-metil-4H-piran-4-one	$C_6H_8O_4$	144,12
14,67	93	0,5±0,07	Benzenecarboksilik asit (Benzoik asit)	$C_7H_6O_2$	122,121
16,62	95	40,865±1,15	2-Furankarboksilaldehit, 5-(hidroksimetil) (HMF)	$C_6H_6O_3$	126,11
18,11	91	3,07±3,40	Benzenecarboksilik asit (Benzoik asit)	$C_7H_6O_2$	122,12
19,05	73	1,13±0,05	1-(2-Hidroksietil)-4-metilpiperazin (4-Metil-1-piperazinetanol)	$C_7H_{16}N_2O$	144,21
19,06	72	1,59±0,07	1-Amino-4-metilpiperazin	$C_5H_{13}N_3$	115,18
20,81	81	1,73±0,46	Tetrahidro[2,2']bifuranil-5-one	$C_8H_{12}O_3$	156,18
22,79	80	9,82±0,60	.alfa.-D-Glukopiranosit.beta.-D-fruktofuranosil (Sukroz)	$C_{24}H_{46}O_{13}$	542,6
23,53	85	2±0,1	1,6-Anhidro-.beta.-D-glukopiranos (levoglikosan)	$C_6H_{10}O_5$	162,14
39,04	76	0,4±0,02	cis-7-Dodesen-1-yl asetat	$C_{14}H_{26}O_2$	226,35
39,18	83	1,25±0,06	9-Tetradesenal, (Z)-	$C_{14}H_{26}O$	210,35
39,19	85	1,04±0,05	9-Oktadesenoik asit (Z) (Oleik asit)	$C_{18}H_{34}O_2$	282,5
41	81	0,49±0,02	1-Hentetrakontanol	$C_{41}H_{84}O$	593,1
41,72	77	2,32±0,11	Kolest-5-ene, 3-bromo-, (3.beta.)-	$C_{27}H_{46}O$	386,66
44,67	71	0,17±0,00	9-Oktadesenoik asit (Z) -, metil ester (Metil oleat)	$C_{19}H_{36}O_2$	296,5
44,87	71	1,51±0,07	Stigmast-5-en-3-ol, (3.beta.)	$C_{29}H_{50}O$	414,7
46,82	85	13,68±0,68	Stigmast-5-en-3-ol, oleat	$C_{47}H_{82}O_2$	679,2
49,14	80	3,59±0,17	(R)-(-)-14-Metil-8-heksadesin-1-ol	$C_{17}H_{32}O$	252,4
49,15	85	20,7±1,03	9-Oktadesenoik asit (Z)-, 2,3-dihidroksipropil ester	$C_{21}H_{40}O_4$	356,5

3.4 Hardaliye Ekstraktlarının Biyoaktif Bileşen Bulguları

3.4.1 Hardaliye Ekstraktlarının Toplam Fenolik Madde Miktarları

Hardaliye ekstraktlarının toplam fenolik madde tayini sonuçları gallik asit eşdeğeri (GAE) cinsinden mg/L olarak Tablo 3.4'de verilmiştir. Merlot hardaliye ekstraktında toplam fenolik madde miktarı 2471,92±37,85 mg GAE /L ile en yüksek değerdir. En düşük toplam fenolik madde miktarı 1639,74±82,85 mg GAE /L ile Shiraz hardaliye ekstraktında belirlenmiştir. Hardaliye örneklerinin toplam fenolik madde değerleri arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$).

Fenolik bileşiklerin antioksidan aktiviteye katkıda bulunduğu ve dolayısıyla insan sağlığını olumlu yönde etkilediği; kanser, diyabet, inflamatuar ve kardiyovasküler hastalıklar gibi kronik hastalıklara yakalanma riskini azalttığı bilinmektedir (Yu ve Ahmedna 2013).

Aşkın vd. (2016) hardaliye örneklerinin toplam fenolik madde değerini ortalama 1743±08,67 mg GAE/L, 4°C de 60 gün depolama sonrası 1370±03,06 mg GAE/L olarak belirlemişlerdir. Gündüz vd. (2019) çalışmalarında ev yapımı hardaliye örneklerinin toplam fenolik madde değerini ortalama 2029,30±4,53 mg GAE/L ve ticari hardaliye örneklerinin bu değerini ortalama 2193,08±2,25 mg GAE/L olarak bildirmişlerdir. Coşkun vd. (2012) yaptıkları çalışmada farklı hardaliye örneklerinin toplam fenolik madde değerlerini depolama öncesi 1392,5 ile 2852,5 mg KE/L aralığında depolama sonrası ise 1067,5 ile 2727,5 mg KE/L aralığında belirlemişlerdir. Coşkun vd. (2018) diğer bir çalışmalarında farklı evlerden toplanan hardaliyelerin toplam fenolik madde değerlerini 368,8±0,10 ile 2727,5±1,50 mg GAE/L arasında, laboratuvarda üretilen Cabernet Sauvignon hardaliyesinde 1165,4±1,40 mg GAE/L ve laboratuvarda üretilen diğer hardaliyelerde 961,8±0,40 ile 2286,8±2,15 mg GAE/L olarak tespit etmişlerdir.

Fenolik bileşiklerin sınırsız metabolizması, üzüm meyvesinin özellikleri (boyut, kabuk kalınlığı, tohum miktarı ve meyve suyu oranı) ve fermantasyon süreci gibi faktörlere bağlı olabilir. Tüm bu faktörler, çok daha çeşitli ve karmaşık yeni fenolik yapılara katkıda bulunan, fermentasyon sırasında çok sayıda oksidasyon,

polimerizasyon, siklo ekleme ve kopigmentasyon reaksiyonlarına yol açabilir (Guadalupe ve Ayestarán 2008; Pérez-Magariño ve González-San José 2004). Çalışmamızda belirlenen toplam fenolik madde değerlerinin literatür değerleri ile uyumlu olduğu görülmüştür ayrıca bu değerler ile kıyaslandığında örneklerimizin zengin fenolik içeriğe sahip hardaliye örnekleri olduğu söylenebilir.

3.4.2 Hardaliye Ekstraktlarının Toplam Flavonoid Madde Miktarları

Hazırlanan hardaliye ekstraktlarında toplam flavonoid değerleri mg/L kateşin eşdeğeri (KE) cinsinden hesaplanmış ve sonuçlar Tablo 3.4'de verilmiştir. Hardaliye örneklerinin toplam flavonoid madde değerleri arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$). Merlot üzüm çeşidiyle hazırlanan hardaliye ekstraktlarında toplam flavonoid madde miktarı 358,85 ± 13,28 mg KE /L ile en yüksek değerdir. En düşük toplam flavonoid madde miktarı 199,35 ± 12,9 mg KE/L ile Shiraz üzüm çeşidiyle hazırlanan hardaliye ekstraktlarında bulunmuştur. Milinčić vd. (2021) Prokupac kırmızı üzüm çeşidinden elde edilen üzüm posası özütlerinin toplam flavonoid içeriğini 5,6±0,16 – 14,5±0,24 mg KE/g kuru ağırlık aralığında; Pintać vd. (2018) 80% MeOH çözücüsüyle hazırlanan Cabernet Sauvignon ve Merlot üzüm posası ekstraktlarının toplam flavonoid içeriğini sırasıyla 6,78 ± 0,30 ve 6,11 ± 0,04 mg QE/g kurutulmuş ekstrakt olarak belirlemişlerdir. Moreno-Montoro vd. (2015) toplam flavonoid değerini beyaz ve kırmızı üzümlerden üretilen üzüm sularında sırasıyla ortalama 62,7±12,4 ve 98,0±9,8 mg KE /L, şaraplarda ise sırasıyla ortalama 28,7±7,2 ve 228±11,8 mg KE/L bulmuşlardır. Ivić vd. (2021) Cabernet Sauvignon şarabının toplam flavonoid içeriğini 0,71 ± 0,01 g KE/L olarak belirlemişlerdir. Romero-Díez vd. (2018) yıllanan şarap tortularının metanol çözücüsü ile hazırlanan ekstraktlarında toplam flavonoid içeriği ortalama 112±12, 62,7±12,4 ve 98,0±9,8 mg KE/kuru ekstrakt olarak; Zhang vd. (2017) muscadine (misket) üzümünden üretilen şarapların bu içeriğini 50 gün fermantasyon sonrasında 115±8 ile 484±4 mg/mL aralığında belirlemişlerdir. Capanoglu vd. (2013) üzümün toplam flavonoid içeriğini 264±42 100 mg KE/100 g kuru ağırlık bulmuşlardır. Constantinou vd. (2017) Xyisteri ve Mavro üzüm sularında toplam flavonoid içeriğini 120,1 ± 14,0 ve

219,9 ± 48,9 mg RE/L olarak tespit etmişlerdir. Literatür değerleri üzüm çeşidine ve formuna (posa, üzüm suyu, şarap vb.) bağlı olmakla birlikte geniş bir aralıkta değişmiştir. Bu değerler ile kıyaslandığında özellikle Merlot ve Cabernet Sauvignon hardaliyelerinin, genellikle OH grubu (O-glikozitler) veya C-C bağları (C-glikozitler) yoluyla bir veya birden fazla şeker kısmı ile bağlı bulunan falvonoid madde açısından zengin bir içeriğe sahip olduğu görülmüştür (Acosta-Estrada vd., 2014).

3.4.3 Hardaliye Ekstraktlarının Toplam Monomerik Antosiyanin Miktarları

Hardaliye ekstraktlarının toplam monomerik antosiyanin tayini sonuçları mg/L olarak malvidin-3-glukozit (Mv-3-glu) cinsinden Tablo 3.4'de verilmiştir. En yüksek toplam monomerik antosiyanin değeri Cabernet Sauvignon üzüm çeşidiyle hazırlanan hardaliye ekstraktlarında belirlenmiş bunu sırasıyla Merlot ve Shiraz üzüm çeşidiyle hazırlanan hardaliye ekstraktları takip etmiştir. Hardaliye örneklerinin antosiyanin değerleri arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$). Coşkun vd. (2018) farklı evlerden toplanan hardaliyelerin toplam monomerik antosiyanin değerlerini 4,5±0,03 ile 198,0±0,00 mg Mv-3-glu /L arasında, laboratuvarda üretilen hardaliyelerin bu değerlerini 116,3±1,3 ile 210,8±1,33 mg Mv-3-glu /L arasında tespit etmişlerdir. Coşkun vd. (2012) diğer bir çalışmalarında farklı hardaliye örneklerinin toplam monomerik antosiyanin değerlerini depolama öncesi 114,1 - 229,1 mg Mv-3-glu /L aralığında depolama sonrası ise 44,6 - 118,4 mg Mv-3-glu /L aralığında belirlemişlerdir. Aşkın vd. (2016) hardaliye örneklerinin toplam monomerik antosiyanin değerini ortalama 86 ± 0,58 mg Mv-3-glu /L belirlemiş, 4 °C de 60 gün depolama sonrası ise 34 ± 0,58 mg Mv-3-glu /L olarak belirlemişlerdir. Amoutzopoulos vd. (2013) yaptıkları çalışmada hardaliyenin toplam antosiyanin içeriğini 41,7 ± 4,38 mg Syn-3-glu /L bulmuşlardır. Üzümlerdeki antosiyaninlerin konsantrasyonu ve bileşimi, başta üzüm çeşiti olmak üzere, tür, olgunluk, üretim alanı, iklim, toprak tipi ve yetiştirme koşullarına göre büyük farklılıklar gösterir (Yang vd., 2009; Sivilotti vd., 2016; Ramos, 2015).

3.4.4 Hardaliye Ekstraktrlarında CUPRAC ve DPPH (1,1-difenil-2 pikrilhidrazil) Yöntemiyle Toplam Antioksidan Kapasite Değerler

Örneklerin toplam antioksidan aktivitesi mmol / L Trolox eşdeğeri (TE) olarak ifade edilmiş ve sonuçlar Tablo 3.4'de verilmiştir. CUPRAC ve DPPH yöntemiyle en yüksek toplam antioksidan kapasite değeri Merlot üzüm çeşidiyle hazırlanan hardaliye ekstraktında belirlenmiş bunu sırasıyla Cabernet Sauvignon ve Shiraz üzüm çeşidiyle hazırlanan hardaliye ekstraktları takip etmiştir. Hardaliye örneklerinin antioksidan kapasite değerleri arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$). Gündüz vd. (2019) çalışmalarında ev yapımı ve ticari hardaliye örneklerinin DPPH yöntemi ile serbest radikal temizleme potansiyellerinin % 70-90 arasında olduğunu belirlemişlerdir. Aşkın vd. (2016) ABTS•+ testi ile hardaliye örneklerinin antioksidan aktivitelerini 8,53 ± 0,05 mM TE/mL, 4 °C de 60 gün depolama sonrası 7,45 ± 0,08 mM TE /mL olarak tespit etmişlerdir. Amoutzopoulos vd. (2013) ORAC değerini 64,0 ± 5,30 mmol TE /L bulmuşlardır. Tzanova vd. (2019) çalışmalarında DPPH yöntemiyle farklı bölgelerden temin edilmiş olan Shiraz, Merlot ve Cabernet Sauvignon üzümlerinin antioksidan aktivitelerini sırasıyla; 42,2 ± 4,1– 59,9 ± 5,5; 23,2 ± 1,9 – 37,7 ± 2,4 ve 24,1 ± 2,0 – 41,4 ± 3,9 mmol TE /kg kuru madde aralığında belirlemişlerdir. Cabernet Sauvignon şarabının antioksidan kapasitesini Panceri vd. (2015) DPPH testi ile 3,76 ± 0,03 mmol TEAC /L, Ivić vd. (2021) DPPH ve CUPRAC yöntemleriyle sırasıyla; 10,34 ± 0,53 ve 69,46 ± 3,45 μmol TE /100 mL olarak belirlemişlerdir. Shiraz şarabının antioksidan kapasitesini Alencar vd. (2017) DPPH yöntemleriyle 15,50 ± 1,74 μmol TE / L olarak belirlemiş; Merlot şarabının antioksidan kapasitesini ise Panceri vd. (2015) DPPH testi ile 2,67 ± 0,08 mmol TEAC /L, Osrečak vd. (2016) farklı yıllarda hasadı yapılmış Merlot üzümlerinden üretilen şaraplarda FRAP testi ile 8,54 ve 4,89 mmol TE/L olarak belirlemişlerdir. Fenolik bileşiklerin kimyasal yapısı serbest radikalleri yok etme kapasitesinde rol oynar ve esas olarak polifenollerin aromatik halkalarındaki hidroksil gruplarının sayısı ve konumundan kaynaklanır (Chen vd., 2016). Coğrafi konum ve üzüm çeşidi gibi faktörlerin yanı sıra, çeşitli yazarlar tarafından bildirildiği üzere miktar belirleme

yöntemlerindeki farklılıklar da antioksidan aktivite sonuçlarının farklılaşmasına katkıda bulunabilir. Farklı kimyasal yapılara sahip fenolik bileşikler, farklı antioksidan tahlil sistemlerinde benzer şekilde işlev görmeyebilir. Her tahlil antioksidan aktivitenin bir ölçüsdür ancak farklı radikaller kullanılır, dolayısıyla çalışmalar arasındaki farklı sonuçlar kısmen kullanılan farklı tahlil metodolojilerinden kaynaklanıyor olabilir (Romero-Díez vd., 2018; Zhang vd., 2017).

Tablo 3.4 Hardaliye örneklerinin toplam fenolik madde, toplam flavonoid madde, toplam monomerik antosiyanin, toplam antioksidan kapasite değerleri

Analiz	Hardaliye		
	Shiraz	**Merlot**	**Cabernet Sauvignon**
Toplam Fenolik Madde (mg GAE/L)	1639,74±82,85^{c}	2471,92±37,85^{a}	2347,87±69,23^{b}
Toplam Flavonoid Madde (mg/L Kateşin)	198,26±13,88^{b}	358,36±11,41^{a}	353,52±9,80^{a}
Toplam Monomerik Antosiyanin (mg Mv-3-glu / L)	187,55±20,33^{c}	264,59± 26,89^{b}	339,68±10,50^{a}
Toplam Antioksidan Kapasite			
CUPRAC (mmol Troloks /L)	20,00±2,87^{c}	35,52±2,69^{a}	29,96±0,97^{b}
DPPH (mmol Troloks /L)	10,73±0,19^{b}	12,23±0,04^{a}	12,02±0,07^{a}

*Aynı satırda farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$).

3.5 Sindirim Ekstraktlarının Biyoaktif Bileşen Bulguları

3.5.1 Sindirim Ekstraktlarının Toplam Fenolik Madde Değerleri

Sindirim aşamalarından (ağız, mide, bağırsak) alınan örneklerde toplam fenolik madde tayini yapılmış, her bir örnek için sonuçların ortalaması mg GAE /L olarak Tablo 3.5'de ve Şekil 3.1'de verilmiştir. Sindirimin her aşamasında üç üzüm çeşidinden yapılan hardaliyede de fenolik madde miktarı azalırken en yüksek değer ağız sindirimi sonunda en düşük değer bağırsak sindirimi sonunda

belirlenmiştir. Ağız sindiriminin sonrasında en yüksek toplam fenolik madde değeri 1303,97±13,98 mg GAE/L ile Cabernet Sauvignon hardaliyesinde belirlenirken; bağırsak sindirimi sonunda en yüksek toplam fenolik madde değeri 808,14±33,19 mg GAE/L ile Merlot hardaliyesinde belirlenmiştir. Hardaliye örneklerinin sindirim aşamalarında toplam fenolik madde değerleri arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$). Fenolik bileşiklerin çoğu, bağırsak fazında önemli ölçüde azalmıştır; bu kimyasal yapıda bozunma, artan veya azalan çözünürlük veya fenolik bileşiklerin konsantrasyonunu etkileyen diğer maddeler ile etkileşimlerle çeşitli değişikliklerin meydana geldiğini düşündürmektedir. Bermudez-Soto vd. (2007) tarafından fenolik bileşiklerin bir kısmının farklı kimyasal özelliklere sahip yapısal formlara dönüştürüldüğü bağırsak gibi hafif alkali koşullara karşı oldukça hassas olduğu bulunmuştur. Ek olarak fenolik bileşikler, sindirim sırasında fitokimyasalların azalmasına yol açabilen demir gibi mineraller ile diyet lifi veya proteinler gibi diğer salınan gıda bileşenleriyle etkileşime duyarlıdır (Bouayed vd., 2012).

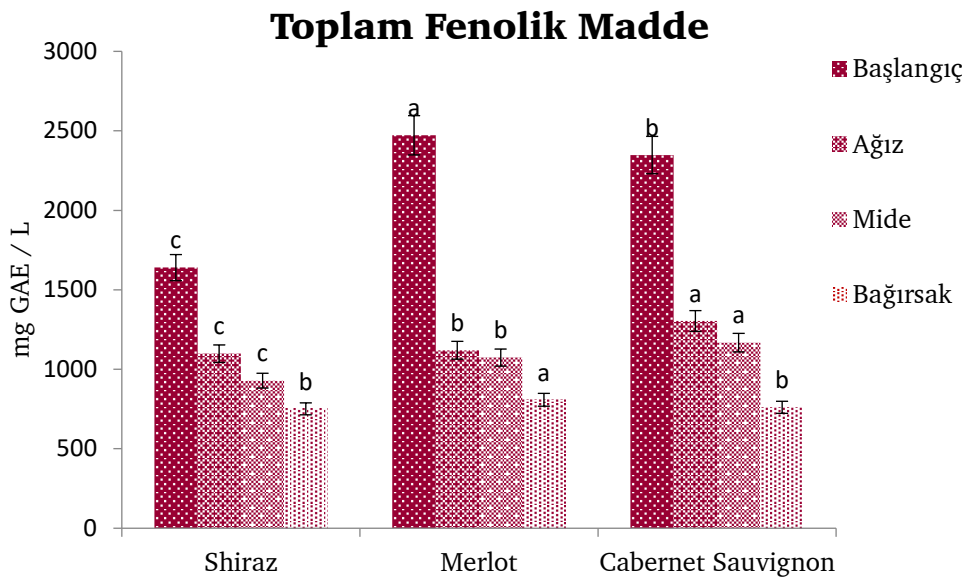
Lingua vd. (2018) Shiraz üzümü ve şarabında toplam polifenol miktarının ağız sindirimi sonrası başlangıca kıyasla azaldığını, mide sindirimi sonrası bir miktar arttığını ve bağırsak sindirimi sonrası en düşük seviyede tespit edildiğini ayrıca üzüm örnekleri için en önemli düşüşün ağız sindirimi sonrası, şarap örnekleri için ise en önemli düşüşün bağırsak sindirimi sonrası olduğunu bildirmişlerdir. Pešić vd. (2019) toplam polifenol içeriği, üzüm kabuğu ekstraktlarında başlangıçta 100-150 mg GAE/100 mL ve sindirim uygulandıktan sonra 200-250 mg GAE/100 mL aralığında; üzüm çekirdeği ekstraktlarında başlangıçta 400-450 mg GAE/100 mL ve sindirim uygulandıktan sonra 200-250 mg GAE/100 mL aralığında olduğunu belirlemişlerdir. Beres vd. (2019) üzüm prina ekstraktında ve üzüm prina ununda toplam fenolik içeriği sindirimden önce sırasıyla; 100,42 ve 49,66 mg GAE /g, mide fazından sonra sırasıyla; 58,22 ve 0,82 mg GAE /g ve bağırsak fazından sonra sırasıyla; 68,32 ve 24,16 mg GAE /g olarak belirlemişlerdir. Gomes vd. (2019) *in vitro* sindirim sonrası Folin-Ciocalteu azaltma kapasitesinin; Bordo cinsi bütün üzüm, kabuk ve çekirdeklerinde başlangıca kıyasla arttığını, Niagara cinsi bütün üzüm, kabuk ve çekirdeklerinde ise başlangıca kıyasla anlamlı bir fark oluşmadığını bildirmişlerdir. Costa vd.

(2019) ise Shiraz üzümü prina ekstraktında toplam fenolik madde miktarını başlangıçta 239,01 ± 4,44 mg GAE/g ve sindirim uygulanmış örneklerde 13,59 ± 0,23 mg GAE/g olarak belirlemişlerdir. Literatür değerlerine de bakıldığında, bizim sonuçlarımızla uyumlu olarak, *in vitro* gastrointestinal sindirimin etkisiyle fenolik madde miktarının genel itibariyle azaldığı görülmektedir. Meyve ve sebzeler gibi katı gıda matrisinde polifenoller; karbonhidratlara, proteinlere ve hücre duvarlarının yapısal bileşenlerine ve ayrıca kovalent bağlar, hidrojen bağı ve hidrofobik ve hidrofilik etkileşimler yoluyla diğer fenolik bileşiklere bağlanır. Sıvı matristeki fenolik stabilitenin, fizikokimyasal özelliklerine, diyet ve/veya sindirim ortamı bileşenleri ile etkileşim gibi bazı faktörlere bağlı olabileceği düşünülmektedir (Lingua vd., 2018). Hardaliyede olduğu gibi sıvı gıda matrisinde fenolikler bozulmaya daha açık ve daha kararsızdır (Podsędek vd., 2014).

Tablo 3.5 Hardaliye örneklerinin sindirim aşamalarındaki toplam fenolik madde değerleri

Toplam fenolik madde (mg GAE / L)	**Hardaliye**		
	Shiraz	**Merlot**	**Cabernet Sauvignon**
Başlangıç	1639,74±82,85^{c}	2471,92±37,85^{a}	2347,87±69,23^{b}
Ağız	1098±19,79^{c}	1119,78±27,03^{b}	1303,97±13,98^{a}
Mide	928,65±76,67^{c}	1073,94±38,98^{b}	1167,53±37,04^{a}
Bağırsak	751,02±9,92^{b}	808,14±33,19^{a}	760,79±3,15^{b}

*Aynı satırda farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$).



Şekil 3.1 Hardaliye örneklerinin sindirim aşamalarındaki toplam fenolik madde değerleri

3.5.2 Sindirim Ekstraktlarının Toplam Flavonoid Madde Değerleri

Sindirim aşamalarından (ağız, mide, bağırsak) alınan örneklerde toplam flavonoid madde tayini yapılmış, her bir örnek için sonuçların ortalaması mg KE/L olarak Tablo 3.6'da ve Şekil 3.2'de verilmiştir. Sindirimin her aşamasında üç üzüm çeşidinden yapılan hardaliyede de flavonoid miktarı azalırken en yüksek değer ağız sindirimi sonunda en düşük değer bağırsak sindirimi sonunda belirlenmiştir. Shiraz üzüm çeşidinden üretilen hardaliye sindirimin her aşamasında en düşük toplam flavonoid madde değerine sahipken; ağız ve mide sindiriminden sonra sırasıyla 234,36±10,09 ve 201,45±1,06 mg KE /L ile Cabernet Sauvignon, bağırsak sindiriminden sonra ise Merlot hardaliyesi 105,17±1,93 mg KE /L ile en yüksek değere sahip bulunmuştur. Hardaliye örneklerinin sindirim aşamalarında toplam flavonoid madde değerleri arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$).

Pešić vd. (2019) toplam flavonoid içeriği, üzüm kabuğu ekstraktlarında başlangıçta 20-40 mg KE /100 mL ve sindirim uygulandıktan sonra 0-20 mg KE /100 mL aralığında; üzüm çekirdeği ekstraktlarında başlangıçta 120-140 mg KE /100 mL ve sindirim uygulandıktan sonra 40-60 mg KE /100 mL aralığında belirlemişlerdir. Stinco vd. (2020) taze portakal suyunda *in vitro* sindirim sonrası biyoerişilebilir flavonoid içeriği 19,65±1,44 mg/L olarak belirlemişlerdir. Xie vd.

(2020) çarkıfelek meyve sularının *in vitro* sindirim sonrası toplam flavonoid madde içeriğini 49,57-190,98 mg QE/L aralığında belirlemişlerdir. Maduwanthi vd. (2020) doğal olgunlaşmış muzda başlangıçta 2,18 ± 0,18 mg QE/100 g olan toplam falvonoid seviyesini mide sindirimi sonrası 3,03 ± 0,54 mg QE/100 g taze ağırlık olarak belirlerken, bağırsak sindirimi sonrası önemli bir azalma ve diyalize fraksiyonda bu içeriği %7,8 olarak tespit etmişlerdir. Corona-Leo vd. (2021) Starking ve Granny Smith elma çeşitlerinde toplam flavonoid içeriği sindirim öncesi sırasıyla; 343,33 ± 2,33 ve 226,39 ± 2,91 mg KE /100 g taze ağırlık, ağız sindirimi sonrası sırasıyla; 79,44 ± 0,83 ve 85,17 ± 1,04 mg KE /100 g taze ağırlık, bağırsak sindirimi sonrası ise 171,94 ± 1,49 ve 97,53 ± 1,18 olarak belirlemişlerdir. Literatürde yer alan sonuçlar değerlendirildiğinde, çeşitli meyve örneklerine uygulanan *in vitro* sindirimin etkisiyle toplam flavonoid madde miktarının azaldığı görülmektedir ve bu çalışmamızda hardaliye örnekleri için belirlenen durum ile uyumludur. Bağırsakta alkali koşullar altında flavonoidlerin kararsızlığı, azalmasıyla ilişkilendirilebilir (Ketnawa vd., 2021). *In vitro* sindirim sırasında özellikle bağırsak sindiriminden sonra flavonoid bileşiklerindeki büyük azalmalar;

(i) lif, protein, karbonhidrat ve mineraller gibi diğer diyet bileşikleri ile etkileşimler,

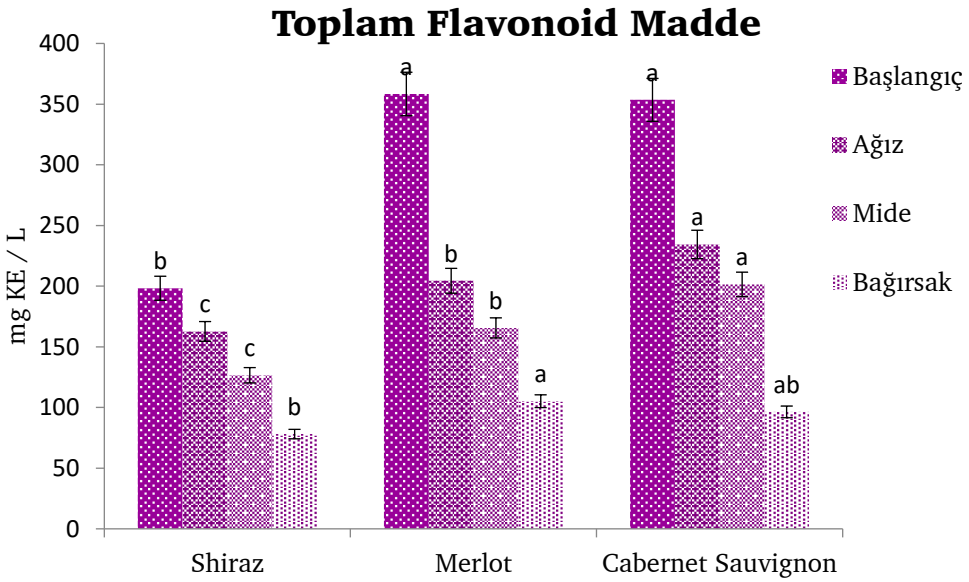
(ii) kalkonlar gibi diğer fenolik türevlerin oluşumunu sağlayan başlıca oksidasyon ve polimerizasyon gibi kimyasal reaksiyonlar veya,

(iii) enzimatik etki nedeniyle moleküler yapılarda ve dolayısıyla çözünürlüğünde değişiklikler gibi farklı faktörlerden kaynaklanabilir (Gil-Izquierdo vd., 2001; Kroll vd., 2003).

Tablo 3.6 Hardaliye örneklerinin sindirim sonrası toplam flavonoid madde değerleri

Toplam flavonoid madde (mg KE / L)	Hardaliye		
	Shiraz	**Merlot**	**Cabernet Sauvignon**
Başlangıç	198,26±13,88^{b}	358,36±11,41^{a}	353,52±9,80^{a}
Ağız	162,67±18,93^{c}	204,43±9,65^{b}	234,36±10,09^{a}
Mide	126,54±13,92^{c}	165,57±9,46^{b}	201,45±1,06^{a}
Bağırsak	78,06±2,40^{b}	105,17±1,93^{a}	96,38±0,64^{ab}

*Aynı satırda farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$).



Şekil 3.2 Hardaliye örneklerinin sindirim aşamalarındaki toplam flavonoid madde değerleri

3.5.3 Sindirim Ekstraktlarının Toplam Monomerik Antosiyanin Değerleri

Sindirim aşamalarından (ağız, mide, bağırsak) alınan örneklerde toplam monomerik antosiyanin tayini yapılmış, her bir örnek için sonuçların ortalaması mg Mv-3-glu /L olarak Tablo 3.7'de ve Şekil 3.3'de verilmiştir. Sindirim ile üç üzüm çeşidinden yapılan hardaliyede de antosiyanin miktarı azalırken en yüksek değer ağız sindirimi sonunda en düşük değer bağırsak sindirimi sonunda belirlenmiştir. Sindirimin her aşamasında en yüksek antosiyanin değeri Cabernet

Sauvignon hardaliyesine aittir. Shiraz hardaliyesinin antosiyanin değeri Merlot hardaliyelerine kıyasla ağız sindiriminden sonra daha yüksek (sırasıyla; 87,53±9,85 ve 83,23±7,77 mg Mv-3-glu/L), mide sindiriminden sonra daha düşük (sırasıyla; 52,11±4,72 ve 56,5±8,89 mg Mv-3-glu/L) ve bağırsak sindirimi aşamalarından sonra yine daha yüksek (sırasıyla; 28,63±2,6 ve 23,93±9,44 mg Mv-3-glu/L) bulunmuştur. Hardaliye örneklerinin sindirim aşamalarında toplam monomerik antosiyanin değerleri arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$). Antosiyaninlerin, diğer fenolik bileşikler gibi, insan gastrointestinal sistemi yoluyla absorbe edilebildiği ve sindirim kanalındaki bozunma yüzdesinin, antosiyaninlerin yapısı ile yakından ilişkili olduğu kabul edilmiştir (Yang vd., 2018). Absorplanan antosiyaninlerin karaciğer, akciğer, böbrek, prostat, kalp ve beyin dahil olmak üzere farklı organlara kolaylıkla dağılabileceği bildirilmektedir (Pojer vd., 2013; Garcia-Alonso vd., 2009; Fang, 2014; Felgines vd., 2009).

Lingua vd. (2018) antosiyanin miktarının Shiraz üzümünde ağız sindirimi sonrası başlangıca kıyasla azaldığını şarabında ise bir miktar arttığını, mide sindirimi sonrası üzümde artarken şarapta ağız sindirimine kıyasla daha düşük ancak başlangıç değerinin üzerinde olduğunu, bağırsak sindirimi sonrası ise her iki örnekte de en düşük seviyede tespit edildiğini bildirmişlerdir. Gomes vd. (2019) Bordo cinsi bütün üzüm ve çekirdeklerinde antosiyanin miktarının en yüksek mide fazında en düşük ise bağırsak fazında tespit edildiğini; David vd. (2019) kızılcık meyvesinde toplam antosiyanin miktarının mide sindirimi sonrası meyve ekstraktında belirlenen değere kıyasla anlamlı ölçüde değişmediği ancak bağırsak sindirimi sonrası antosiyanin miktarının önemli ölçüde azaldığını tespit etmişlerdir. Toplam antosiyanin miktarını, Ryu vd. (2018) kara ahududu şarap ekstraktında 19,34 mg Syn-3-glu /g kuru ağırlık, mide sindiriminden sonra 19,13 mg Syn-3-glu /g kuru ağırlık, bağırsak sindiriminden sonra ise 8,75 mg Syn-3-glu /g kuru ağırlık; Martini vd. (2018) Celeste ve Durone Nero I kiraz ekstraktlarında sırasıyla 76,60 ± 0,74 ve 816,92 ± 13,24 μmol Syn-3-glu /100 g taze ağırlık; sindirim uygulanmış kirazlarda ise sırasıyla 0,59 ± 0,02 ve 449,53 ± 2,22 μmol Syn-3-glu /100 g olarak; Pešić vd. (2019) üzüm kabuğu ekstraktlarında başlangıçta 165,5 μg/L sindirim uygulandıktan sonra 48 μg/L;

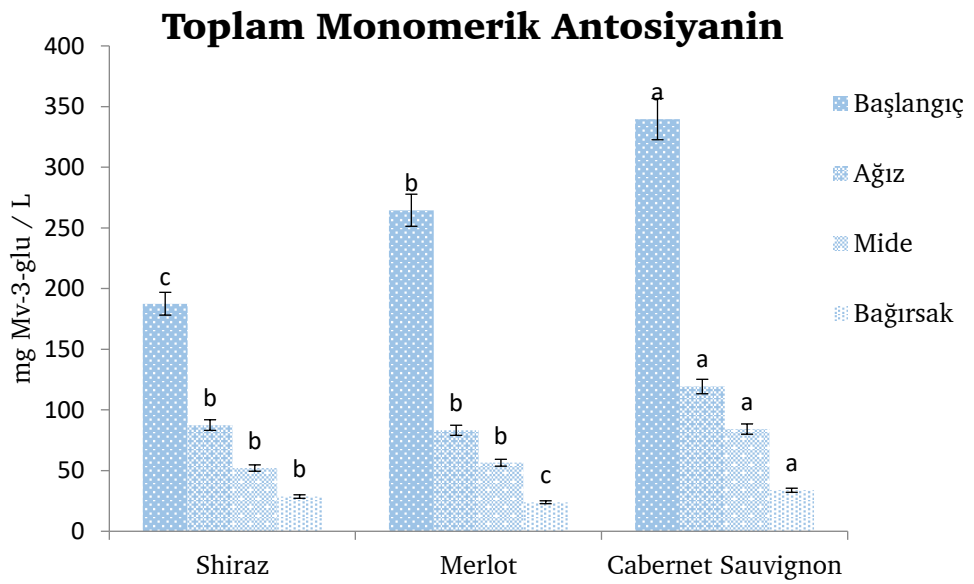
Phan vd. (2019) ise taze kırmızı lahanada 80,9 ± 5,0 mg / 100 g *in vitro* sindirimden sonrası 41,1 ± 3,3 mg / 100 g olarak belirlemişlerdir. Gardeli vd. (2019) *in vitro* bağırsak sindirimi uygulaması ile nar suyunda antosiyanin miktarının azaldığını; Yang vd. (2018) Cabernet Sauvignon kırmızı şarabında tanımlanan çoğu antosiyaninin *in vitro* mide sindirimi altında stabil kaldığını ancak simüle edilmiş bağırsak sindirimi sırasında bu antosiyaninlerin konsantrasyonlarında çarpıcı bir düşüş meydana geldiğini; Zang vd. (2021) yabanmersini antosiyanin monomerlerinin simüle edilmiş ağız ve mide sindiriminden sonra nispeten stabil kaldığını, simüle edilmiş ince bağırsak sindirimden sonra bütün monomer içeriklerinin azaldığını bildirmişlerdir.

Literatür sonuçları bizim sonuçlarımızla uyumlu olarak *in vitro* sindirimin, özellikle bağırsak ortamının, antosiyanin içeriğini azaltma yönünde etki yaptığını göstermektedir. Antosiyanin moleküllerinin farklı pH koşulları altında farklı bir dengeye sahip olduğu, daha düşük pH ortamının çoğu antosiyaninlerin flavilyum katyon konformasyonuna neden olabileceği bilinmektedir (Março ve Scarminio, 2007). Antosiyaninler bağırsak sindirimine tabi tutulduklarında da salınmasına rağmen, salınan antosiyaninler yüksek kararsızlığa sahiptir ve alkali ortam nedeniyle büyük miktarlarda ayrışır (Liu vd., 2020; Pérez-Vicente vd., 2002). Böylece, antosiyanin içeriği önemli ölçüde azalır. Yapılan çalışmalar, antosiyaninlerin alkali koşullar altında bozunma hızının yapıları ile yakın bir ilişkisi olduğuna işaret etmiştir (Liu vd., 2020). Simüle edilmiş bağırsak yolunda, toplam antosiyanin konsantrasyonundaki azalma, daha önceki çalışmalarda bildirildiğ gibi, esas olarak antosiyaninlerin aromatik halkalarını parçalayarak bozunmasından kaynaklanır (Kay vd., 2009; Forester ve Waterhouse, 2008). Antosiyaninlerin yapısındaki hidroksil grubunun fazlalığının sindirim sisteminde antosiyaninlerin parçalanmasını hızlandırdığı bilinmektedir (Woodward vd., 2009; Kamonpatana vd., 2014). Ek olarak, simüle edilmiş bağırsak yolundaki bazik durumun, antosiyanin molekülleri ile diğer bileşikler arasındaki etkileşimleri tetikleyerek polimerik bileşikler oluşturduğu rapor edilmiştir (Hanske vd., 2013; Keppler ve Humpf, 2005). Bu tür etkileşimler ayrıca da toplam antosiyanin konsantrasyonunun azalmasına neden olabilir (Yang vd., 2018).

Tablo 3.7 Hardaliye örneklerinin sindirim sonrası toplam monomerik antosiyanin değerleri

Toplam monomerik antosiyanin (mg Mv-3-glu / L)	Hardaliye		
	Shiraz	**Merlot**	**Cabernet Sauvignon**
Başlangıç	187,55±20,33^{c}	264,59± 26,89^{b}	339,68±10,50^{a}
Ağız	87,53±9,85^{b}	83,23±7,77^{b}	119,3±8,72^{a}
Mide	52,11±4,72^{b}	56,5±8,89^{b}	84,23±9,93^{a}
Bağırsak	28,63±2,6^{b}	23,93±9,44^{c}	33,83±2,26^{a}

*Aynı satırda farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$).



Şekil 3.3 Hardaliye örneklerinin sindirim aşamalarındaki toplam monomerik antosiyanin değerleri

3.5.4 Sindirim Ekstraktlarının CUPRAC ve DPPH Yöntemiyle Toplam Antioksidan Kapasite Değerleri

Sindirim aşamalarından (ağız, mide, bağırsak) alınan örneklerde CUPRAC ve DPPH yöntemleriyle toplam antioksidan kapasite tayini yapılmış, her bir örnek için sonuçların ortalaması Troloks cinsinden mmol/L olarak Tablo 3.8 ile Şekil 3.4 ve Şekil 3.5'de verilmiştir. Sindirimin ağız ve mide aşamasından sonra üç üzüm çeşidinden yapılan hardaliyede de CUPRAC antioksidan kapasite değeri azalırken bağırsak sindirimi sonunda artmıştır. En yüksek CUPRAC değeri

bağırsak sindirimi sonunda 16±0,62 mmol Trolox/L ile Merlot hardaliyesine aittir; bunu sırasıyla 15,58±0,23 mmol Trolox/L ve 14,57±0,06 mmol Trolox/L ile Cabernet Sauvignon ve Shiraz hardaliyeleri takip etmiştir. DPPH değeri ise ağız sindirimi sonrası Shiraz ve Merlot hardaliyelerinde başlangıç değerine kıyasla azalırken Cabernet Sauvignon hardaliyesinde artmıştır. Mide ve bağırsak sindirimi sonrasında ise DPPH değeri her üç üzüm çeşidinden yapılan hardaliyede de yükselmiştir. Ağız ve mide sindirimi sonrası Merlot hardaliyesinin DPPH değeri Cabernet Sauvignon hardaliyesine kıyasla daha düşük iken bağırsak sindiriminden sonra 16,85±0,91 mmol Trolox/L ile en yüksek bulunmuştur. Hardaliye örneklerinin sindirim aşamalarında toplam antioksidan kapasite değerleri arasındaki farklılıklar CUPRAC testine göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmuş ($p<0,05$); DPPH testine göre bağırsak sindirimi sonrası istatistiksel olarak anlamlı bulunmamış ($p>0,05$) ağız ve mide sindiriminden sonra istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$).

Serbest radikaller insan vücudunun metabolizması tarafından üretilir ve biyolojik moleküllerin normal durumunu değiştirmek için sağlıklı hücrelere saldırabilir (Lobo vd., 2010). Antioksidanlar, serbest radikallere karşı koymak için bir elektron veya hidrojen atomu sunabildikleri için insanların sağlığını iyileştirebilir (Liu vd., 2020). Farklı antioksidan kapasite yöntemlerinin farklı etki mekanizmaları vardır. Yöntemlerin her biri antioksidan aktivitenin farklı bir yönünü ölçer örneğin; numunelerin asitlik değerlerine veya etanol içeriğine farklı tepki verebilir ve böylece fenolik bileşiklerin içeriğinden bağımsız olarak değerleri değiştirebilir (Frankel ve Meyer, 2000).

Lingua vd. (2018) Shiraz üzümü ve şarabında DPPH testiyle belirlenen antioksidan kapasitenin ağız sindirimi sonrası azaldığını, mide sindirimi sonrası önemli bir fark olmamakla birlikte ağız sindiriminden küçük bir farkla daha yüksek bulunduğunu ve bağırsak sindirimi sonrası diyaliz edilebilir fraksiyonda en düşük antioksidan kapasitenin tespit edildiğini bildirmişlerdir. Da Silva Haas vd. (2018) DPPH testi ile antioksidan kapasiteyi; Bordo üzüm suyunda ağız fazında 12 ±1 μmol/g, mide fazında 22 ±1 μmol/g ve bağırsak fazında 15 ±1 μmol/g olarak, Isabel üzüm suyunda ise ağız fazında 6,0 ±0,5 μmol/g, mide fazında 8,6 ±0,6 μmol/g ve bağırsak fazında 4,3 ± 0,5 μmol/g olarak

belirlemişlerdir. Zoubiri vd. (2019) kırmızı ve beyaz taze üzümlerde antioksidan kapasiteyi başlangıçta DPPH metodu ile sırasıyla 2706±37,5 ve 2296±20,7 mg TAC/100 g kuru ağırlık, CUPRAC metodu ile sırasıyla 3359,4±101,8 ve 2884±14,8 mg TAC/100 g kuru ağırlık olarak, ağız kısmında azalmayla beraber DPPH testi ile sırasıyla 201,1±13,2 ve 265,3±20,7 mg TAC/100 g kuru ağırlık, CUPRAC testi ile sırasıyla 328±24,4 ve 244,8±28,1 mg TAC/100 g kuru ağırlık, mide sonrası fraksiyonda artış ile DPPH metoduyla sırasıyla 642,2±40,6 ve 503,7±44,5 7 mg TAC/100 g kuru ağırlık CUPRAC metoduyla sırasıyla 1379,2±81,7 ve 985±64,9 mg TAC/100 g kuru ağırlık, diyaliz edilebilir bağırsak fraksiyonunda tekrar bir düşüşle DPPH metoduyla sırasıyla 405,7±40,6 ve 357,7±62,3 mg TAC/100 g kuru ağırlık CUPRAC testi ile sırasıyla 433,7±35,1 ve 396,5±19 mg TAC/100 g kuru ağırlık olarak belirlemişlerdir. Pešić vd. (2019) ABTS radikal süpürücü aktivite değerini, üzüm kabuğu ekstraktlarında başlangıçta 0-20 μg AAE/mL ve sindirim sonrası 60-80 μg AAE/mL aralığında; üzüm çekirdeği ekstraktlarında başlangıçta 60-80 μg AAE/mL ve sindirim sonrası 80-100 μg AAE/mL aralığında belirlemişlerdir. Costa vd. (2019) Shiraz üzümü prina ekstraktında ABTS radikal süpürme aktivitesini sindirim öncesi 33,98 ± 0,464 mg AAE /g ve sindirim sonrası 16,77 ± 0,15 mg AAE / g olarak belirlemişler; ORAC değerini ise sindirim öncesi 3500 ± 0,058 μmol TE/ g ve sindirim sonrası 385,80 ± 0,150 μmol TE/ g olarak belirlemişlerdir. Beres vd. (2019) üzüm prina ekstraktında ve üzüm prina ununda antioksidan kapasitesi değerini sindirim öncesi sırasıyla; 154,37 ve 79,59 μmol Trolox/g, mide fazından sonra sırasıyla; 451,64 ve 88,00 μmol Trolox/g, ve bağırsak fazından sonra sırasıyla; 487,27 ve 227,82 μmol Trolox/g olarak belirlemişlerdir. Gomes vd. (2019) *in vitro* sindirim sonrası antioksidan kapasitenin; Bordo cinsi bütün üzüm, kabuk ve çekirdeklerinde arttığını, Niagara cinsi bütün üzümde artarken, kabuk ve çekirdeklerinde ise azaldığını tespit etmişlerdir. David vd. (2019) kızılcık meyvesinde toplam antioksidan kapasitenin mide sindirimi sonrası meyve ekstraktında belirlenen değere kıyasla anlamlı ölçüde değişmediği ancak bağırsak sindirimi sonrası antosiyanin miktarının önemli ölçüde azaldığını tespit etmişlerdir. Xie vd. (2020) çarkıfelek meyve sularının antioksidan kapasitesini DPPH testi ile belirlemiş *in vitro*

sindirim etkisiyle iki meyve suyunda bu değer artarken dört meyve suyunda azalma tespit etmişlerdir. Wang vd. (2020) DPPH testi ile belirlenen antioksidan kapasite değerini taze kırmızı pancarda ve kırmızı pancar reçelinde ağız sindirimi sonrası azalmış, mide sindirimi sonrası başlangıç değerine yakın bir değere yükselmiş ve bağırsak sindirimi sonrası en düşük seviyede tespit etmişlerdir. Mihaylova vd. (2021) %10 siyah üzüm ve %12 aloe vera içeren ticari meyve suyunun DPPH ve CUPRAC testleriyle belirlenen antioksidan kapasitesinin *in vitro* sindirim sonrası düştüğünü rapor etmişlerdir. Maduwanthi vd. (2020) doğal olgunlaşmış muzda antioksidan kapasiteyi ABTS testi ile başlangıçta 1422,57 ± 3,98 mg TE/100 g sindirim sonrası 1313,50 ± 4,02 mg TE/100 g olarak belirlemişlerdir. Kashyap vd. (2021) geleneksel solvent ekstraksiyonu uygulanan Megalaya kirazı prina özlerinde DPPH testi ile antioksidan aktiviteyi sindirim öncesi % 74,87 ± 1,80 ağız sindirimi sonrası % 54,44 ± 1,72 mide sindirimi sonrası % 45,57 ± 0,76 ve bağırsak sindirimi sonrası % 40,62 ± 0,86 olarak belirlemişlerdir.

Literatür sonuçları, çalışmamızın sonuçlarının işaret ettiği gibi kullanılan antioksidan kapasite belirleme metodunun önemli bir faktör olmasıyla beraber *in vitro* sindirim uygulamasının bu değeri farklı yönlerde etkileyebildiğini ortaya koymaktadır. *In vivo* sindirimi simüle ederek biyolojik bir sistemdeki gıda antioksidanlarının mevcudiyetine dair bir gösterge veren *in vitro* sindirim, gıda maddelerinin antioksidan özellikleri üzerinde çeşitli etkilere sahiptir (Podio vd., 2015). Çalışma sonuçlarımıza göre simüle edilmiş sindirimin etkisiyle hardaliye örneklerinde toplam fenolik madde miktarı azalırken antioksidan kapasite yükselmiştir. Bu durum, fenolik maddelerin moleküler değişimlerinden, antioksidan aktivite test yöntemlerinden veya proteinler, karbonhidratlar ve vitaminler gibi sindirim numunelerindeki diğer bileşenlerden kaynaklanıyor olabilir.

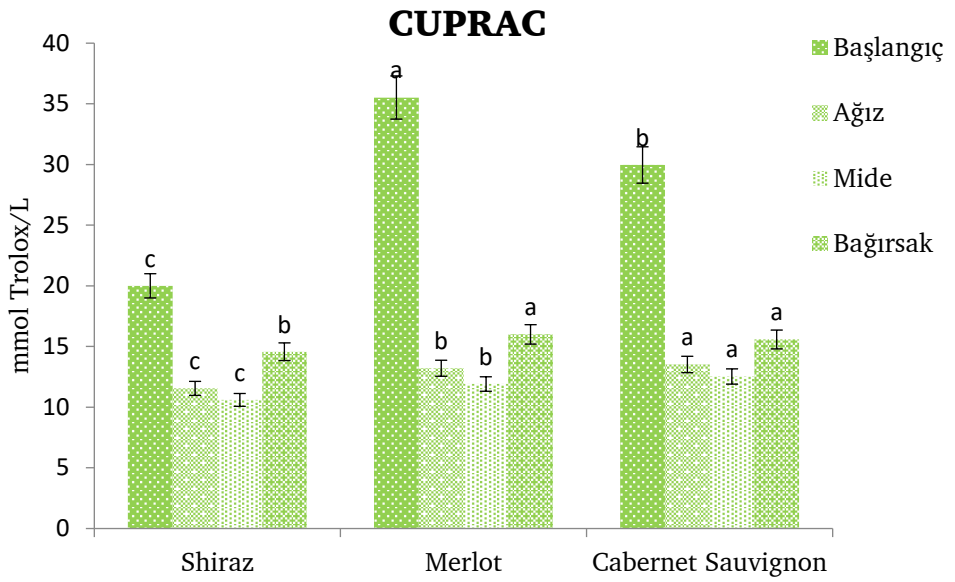
Gıda maddelerindeki fenolik maddeler genellikle gıda matrisi tarafından bloke edilir ve simüle edilmiş sindirim ortamında kararsızdır (Huang vd., 2017). Ancak gıda hammaddeleri sindirildiğinde, gıda matriksine gömülü olan fenolik bileşikler, sindirim süreci ile kademeli olarak salınmakta, böylece sindirim sonrası bu fenolik bileşiklerin antioksidan aktiviteleri artmaktadır (Liu vd.,

2020). Polifenollerin radikal süpürücü aktivitesi, pH'a da güçlü bir şekilde bağlıdır. pH değişikliği, gıda mideden bağırsağa aktarıldığında meydana gelir ve fenolik bileşiklerin aromatik halkalarında bulunan hidroksil kısımlarının deprotonasyonu ile polifenollerde yapısal değişiklikler yapar (Tagliazucchi vd., 2010). Bağırsak fazı sırasındaki daha alkali koşulların, diyet lifi veya şeker parçasına bağlı polifenollerin salınımını arttırmış olması mümkündür (Kamiloglu vd., 2016). Sindirim enzimlerinin rolü ve hidroliz etkisi dikkate değerdir. Sindirim sürecine eklenen enzimler, bazı indirgeyici ürünler üretmek için gıda matrisindeki diğer bileşenleri hidrolize edebilir, böylece genel antioksidan aktiviteyi yükseltebilir. Diğer bileşiklerin etkileri de dikkate alınmalıdır. Besin matriksindeki çeşitli doğal bileşikler, örneğin tokoferoller, karbonhidratları ve karotenoidleri azaltır, iyi antioksidan aktiviteye sahiptir ve gıda matriksinden kademeli olarak salınarak antioksidan kapasitelerini arttırır (Su vd., 2019).

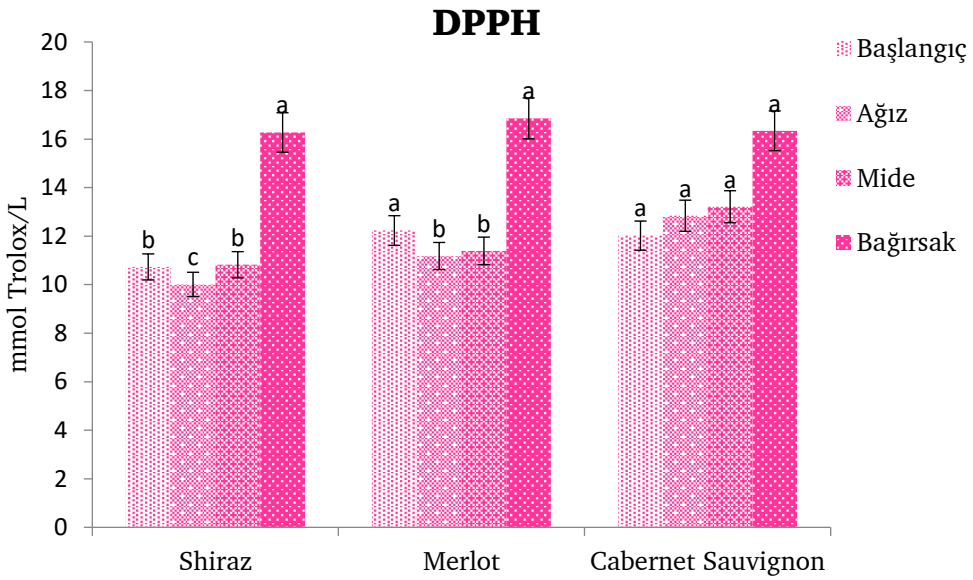
Tablo 3.8 Hardaliye örneklerinin toplam antioksidan kapasite (mmol Trolox/L) değerleri

Toplam antioksidan kapasite (mmol Trolox/L)	Hardaliye		
	Shiraz	**Merlot**	**Cabernet Sauvignon**
CUPRAC			
Başlangıç	20,00±2,87^{c}	35,52±2,69^{a}	29,96±0,97^{b}
Ağız	11,55±0,56^{c}	13,21±0,10^{b}	13,52±0,21^{a}
Mide	10,6±0,87^{c}	11,91±0,42^{b}	12,53±0,58^{a}
Bağırsak	14,57±0,06^{b}	16±0,62^{a}	15,58±0,23^{a}
DPPH			
Başlangıç	10,73±0,19^{b}	12,23±0,04^{a}	12,02±0,07^{a}
Ağız	10,01±0,79^{c}	11,18±0,13^{b}	12,84±0,02^{a}
Mide	10,82±0,39^{b}	11,39±0,06^{b}	13,21±0,15^{a}
Bağırsak	16,27±0,07^{a}	16,85±0,91^{a}	16,34±1,3^{a}

*Aynı satırda farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$).



Şekil 3.4 Hardaliye örneklerinin sindirim aşamalarındaki CUPRAC değerleri



Şekil 3.5 Hardaliye örneklerinin sindirim aşamalarındaki DPPH değerleri

3.6 *In vitro* Sindirim Sonrası % Biyoerişilebilirllik Değerleri

In viro sindirim uygulanan hardaliye örneklerinin biyoerişilebilirlik değerleri hesaplanmış ve Tablo 3.9'da verilmiştir. En yüksek biyoerişilebilirlik değerleri Shiraz üzüm çeşitiyle üretilen hardaliye örneklerinde belirlenmiştir. Merlot ve Cabernet Sauvignon üzüm çeşidiyle üretilen hardaliyelerin biyoerişilebilirlik değerleri birbirine oldukça yakın olmakla beraber; Merlot üzüm çeşidiyle üretilen hardaliyelerin toplam fenolik, toplam flavonoid ve DPPH biyoerişilebilirlik değerleri Cabernet Sauvignon üzüm çeşidinden üretilen

hardaliyelere kıyasla bir miktar daha yüksek belirlenmiştir. Hardaliye örneklerinin % Biyoerişilebilirlik değerleri arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$).

Shiraz hardaliyesinde toplam fenolik madde biyoerişilebilirliği 45,87±2,92 ile en yüksek iken Merlot ve Cabernet Sauvignon hardaliyelerinde bu değer sırasıyla 32,68±1,15 ve 32,41±1,09 dir.

Fenolik içeriğin biyoerişilebilirlik yüzdesi, bağırsaktaki hücre zarından geçen ve gıda numunesindeki başlangıç fenolik içeriğine göre hücreler içinde eylem için mevcut olan fenoliklerin miktarı anlamına gelir (Gunathilake vd., 2018). Mihaylova vd. (2021) %10 siyah üzüm ve %12 aloe vera içeren ticari meyve suyunun *in vitro* sindirim sonrası toplam fenolik madde biyoerişilebilirliğini %13,83 olarak; Maduwanthi vd. (2020) ise doğal olgunlaşmış muzda bu değeri %5,95 ile %6,05 arasında belirlemişlerdir. Lingua vd. (2018) Shiraz üzümünün toplam polifenol biyoerişilebilirliğini ağız sindiriminden sonra %24, mide sindiriminden sonra artışla %29, bağırsak sindiriminden sonra kolonda mevcut bileşikleri temsil eden diyaliz edilemeyen fraksiyonda %10 ve diyaliz membranından geçen ve dolayısıyla potansiyel olarak biyoyararlı bileşikleri temsil eden diyaliz edilebilir fraksiyonlarda %6 bulmuşlardır. Shiraz şarabında ise toplam polifenol içeriğinin bağırsak sindiriminden sonra diyaliz edilemeyen fraksiyonda %31'inin ve diyaliz edilebilir fraksiyonda %21'inin bulunduğunu bildirmişlerdir. Camara vd. (2019) Tempranillo ve Graciano kırmızı şaraplarının sindirim sonrası toplam fenolik indeksinin *in vitro* biyoyararlanımını sırasıyla; % 10,20 ± 0,82 ve % 9,75 ± 0,83 olarak belirlemişlerdir. Literatürde yer alan bu sonuçlar ile kıyaslandığında çalışmamızdaki hardaliye örneklerinin daha yüksek fenolik biyoerişilebilirliğine sahip olduğu görülmektedir. Bazı farklı örnekler için belirlenen değerler ise şöyledir; Corona-Leo vd. (2021) Starking ve Granny Smith elma çeşitlerinde *in vitro* sindirim sonrası toplam fenolik madde biyoerişilebilirliğini sırasıyla % 35,02 ve % 20,79 olarak belirlemişler; Martini vd. (2018) Celeste ve Durone Nero I kirazlarında bu değeri sırasıyla %39,7 ve %29,9 olarak; Kashyap vd. (2021) ise geleneksel solvent ekstraksiyonu uygulanan Megalaya kirazı prina özlerinde sindirim sonrası toplam fenol içeriğin biyoerişilebilirlik indeksini % 63,05 olarak belirlemişlerdir. Ketnawa vd. (2021)

farklı Trabzon hurması çeşitlerinde toplam fenolik madde biyoerişilebilirlik indeksini sindirim enzimleri ile *in vitro* sindirime tabi tutulan örneklerde; % 316,1 ± 6,1 ve % 209,3 ± 2,6 olarak belirlemişlerdir.

Bitkilerde, ikincil metabolitler olarak fenolik bileşikler, genellikle ya proteinler ve karbonhidratlar gibi bazı makromoleküllerle birleşerek kopolimerler oluştururlar veya bu makromoleküller tarafından bloke edilirler. Gastrointestinal sindirim sırasında, asit, alkali ve ayrıca bazı sindirim enzimlerinin etkileri, bitki hücre duvarını tahrip edebilir ve bağları hidrolize edebilir, böylece daha fazla fenolik maddenin salınmasına izin verir ve biyoerişilebilirliğini arttırır (Liu vd., 2020).

Toplam flavonoid madde biyoerişilebilirliği 39,51±3,98 ile en yüksek Shiraz hardaliyesinde belirlenmiş bunu 29,35±0,39 ve 27,3±0,61 değerleriyle sırasıyla Merlot ve Cabernet Sauvignon hardaliyeleri takip etmiştir.

Mihaylova vd. (2021) %10 siyah üzüm ve %12 aloe vera içeren ticari meyve suyunun *in vitro* sindirim sonrası toplam flavonoid madde biyoerişilebilirliğini %35,53 olarak; Corona-Leo vd. (2021) ise Starking ve Granny Smith elma çeşitlerinde bu değeri sırasıyla % 50,08 ve % 43,08 olarak belirlemişlerdir. Barak vd. (2019) kızılcıkta *in vitro* sindirim sonrası flavonoid biyoyararlanım indeksini % 93.06 olarak belirlerken; Ovando-Martínez vd. (2018) kırmızı chiltepin biberinde biyoerişilebilirliği mide sindirimi sonrası % 16,97 ± 3,47 bağırsak sindirimi sonrası ise % 13,53 ± 2,36 olarak belirlemişlerdir. Ketnawa vd. (2021) farklı Trabzon hurması çeşitlerinde toplam flavonoid biyoerişilebilirlik indeksini sindirim enzimleri ile *in vitro* sindirime tabi tutulan örneklerde; % 310,4 ± 3,6 ve % 83,6 ± 6,1 olarak belirlemiş; Lucas-González vd. (2018) ise aynı meyvenin çeşitlerinin yan ürünlerinden elde edilen unlarda sindirim sonrası toplam flavonoid biyoerişilebilirliğini %45,31 ve %21,54 olarak bildirmişlerdir.

Araştırmacılar *in vitro* sindirim aşamasındaki toplam flavonoid miktarının esas olarak gıda matrisi bileşiminden kaynaklandığını, biyoerişilebilirliğinin proteinler, lipidler, lif, karbonhidratlar veya mineraller gibi diğer bileşiklerle etkileşime girdiğinde değişebileceğini bildirmişlerdir (Corona-Leo vd., 2021). Sindirim sonrası flavonoid biyoerişilebilirliğinin ortamda bulunan ve bunlar

üzerinde koruyucu etkileri olabilecek diğer polifenollere de bağlı olduğu belirtilmiştir (Pešić vd., 2019).

Toplam monomerik antosiyanin biyoerişilebilirliği toplam fenolik ve toplam flavonoid madde biyoerişilebilirliklerine benzer şekilde Shiraz hardaliyesinde 15,52±3,61 ile en yüksek değere sahiptir. Merlot ve Cabernet Sauvignon hardaliyelerinde ise toplam fenolik ve toplam flavonoid madde biyoerişilebilirliklerinden farklı olarak 9,97±0,89 ile Cabernet Sauvignon hardaliyesi Merlot hardaliyesine kıyasla daha yüksek antosiyanin biyoerişilebilirliği sergilemiştir.

Mohamedshah vd. (2020) Concord üzümlerinde ve %100 Concord üzüm sularından *in vitro* sindirim sonrası toplam antosiyanin biyoerişilebilirliğini sırasıyla %14-39 ve %86-135 arasında belirlemişler; Mihaylova vd. (2021) ise %10 siyah üzüm ve %12 aloe vera içeren ticari meyve suyunda bu değeri %50,36 olarak belirlemişlerdir. Lingua vd. (2018) Shiraz üzümünün antosiyanin biyoerişilebilirliğini ağız sindiriminden sonra %22, mide sindiriminden sonra artışla %45 ve bağırsak sindiriminden sonra diyaliz membranından geçen dolayısıyla potansiyel olarak biyoyararlı bileşikleri temsil eden diyaliz edilebilir fraksiyonda ise mide sindirimine kıyasla önemli ölçüde azaldığını bulmuşlardır. Camara vd. (2019) Tempranillo ve Graciano kırmızı şaraplarının *in vitro* sindirim sonrası antosiyanin, biyoyararlanımını sırasıyla; % 11,06 ± 2,31 ve % 19,06 ± 1,87 olarak belirlemişlerdir. Martini vd. (2018) Durone Nero I kirazlarında *in vitro* sindirim sonrası antosiyanin biyoerişilebilirliğini %55,0; Phan vd. (2019) kırmızı lahanada bu değeri % 50,8 ± 4,1; David vd. (2019) kızılcık meyvesinde bağırsak sindirimi sonrası antosiyanin % geri kazanım değerini 26,46; Corona-Leo vd. (2021) ise Starking ve Granny Smith elma çeşitlerinde toplam antosiyanin biyoerişilebilirliğini sırasıyla % 46,07 ve % 0 olarak belirlemişlerdir.

Antosiyaninler gibi gıda polifenollerinin stabilitesi ve dolayısıyla biyoerişilebilirliği, orijinal matris ile etkileşimlerine sıkı sıkıya bağlıdır, bu durum farklı bitki bazlı gıdalar ve farklı üzüm çeşitlerinin biyoerişilebilirlik değerleri arasındaki varyasyonları açıklamaktadır (Da Silva Haas vd., 2018). İnsan

bağırsak sisteminde antosiyaninlerin sindirimi, temel olarak bağırsak pH'ından, sıcaklığından, bağırsak hücrelerinden salgılanan enzimlerden ve mikrobiyota türleri ve popülasyonundan etkilenir (Hidalgo vd., 2012; Hribar ve Ulrih, 2014). Antosiyanin bozunması bağırsak yolunun pH ve sıcaklık koşullarında kendiliğinden meydana gelebilir (Han vd., 2018). Bununla birlikte, bağırsak mikroflorası, şeker parçaları ve aglikonlar arasındaki bölünmeyi tetikleyerek, antosiyanin aglikonlarının salınmasına neden olabilir (De Ferrars vd., 2014; Hanske vd., 2013). Başka bir bozunma yoluda, bağırsak mikroflorası olmadan kimyasal koşullar altında kendiliğinden meydana gelebilen bozunmadır (Han vd., 2018). Antosiyaninler, pasif taşıma ve aktif taşıma yoluyla bağırsak epitel hücreleri tarafından emilebilir. Antosiyaninlerin moleküler boyutunun ve yapısının da ince bağırsak epitel hücreleri yoluyla emilmelerini etkilemede rol oynadığını belirtmek gerekir (Fernandes vd., 2012).

CUPRAC ve DPPH yöntemleriyle belirlenen antioksidan kapasitenin *in vitro* sindirim sonrası biyoerişilebilirliği uygulanan metoda göre farklılık göstermiştir. Bağırsak sindirimi sonrası DPPH yöntemiyle belirlenen antioksidan kapasite değeri başlangıç değerine kıyasla oldukça yüksektir ve Shiraz, Merlot ve Cabernet Sauvignon hardaliyeleri için sırasıyla 151,57±2,03 , 137,78±7,99 ve 135,91±10,02 olarak bulunmuştur. Bağırsak sindirimi sonrası CUPRAC yöntemiyle belirlenen antioksidan kapasite değeri DPPH yöntemiyle belirlenenin aksine, ağız ve mide sindirimi sonrası belirlenen değerlere kıyasla daha yüksek olsada, başlangıç değerinden daha düşük bulunmuştur. CUPRAC yöntemiyle belirlenen antioksidan kapasite değerlerinin biyoerişilebilirlikleri Shiraz, Merlot ve Cabernet Sauvignon hardaliyeleri için sırasıyla 73,49±12,81 , 45,11±1,68 ve 52,03±0,91 olarak belirlenmiştir.

Camara vd. (2019) Tempranillo ve Graciano kırmızı şaraplarının sindirim sonrası antioksidan aktivitenin *in vitro* biyoyararlanımını sırasıyla; % 1,33 ± 0,09 ve % 1,98 ± 0,13 olarak belirlemişler; Zoubiri vd. (2019) kırmızı (Cardinal) ve beyaz (Sabel) taze üzümlerde *in vitro* sindirim sonrası antioksidan kapasite % geri kazanım değerlerini DPPH metodu ile yapılan analiz sonrası sırasıyla % 15±1,6 ve % 15,5±1,9, CUPRAC metodu ile yapılan analiz sonrası ise sırasıyla % 12,9±1,4 ve % 13,7±0,6 olarak bildirmişlerdir. Literatürde yer

alan bu değerler sonuçlarımıza kıyasla oldukça düşüktür. Kashyap vd. (2021) geleneksel solvent ekstraksiyonu uygulanan Megalaya kirazı prina özlerinde sindirim sonrası antioksidan aktivite biyoerişilebilirlik indeksini % 50,20; Maduwanthi vd. (2020) doğal olgunlaşmış muzda *in vitro* sindirim sonrası ABTS testi ile belirlenmiş olan antioksidan kapasitenin biyoerişilebilirliğini % 92,33; Corona-Leo vd. (2021) ise Starking ve Granny Smith elma çeşitlerinde DPPH testi ile ölçülen antioksidan kapasitenin biyoerişilebilirliğini sırasıyla % 28,45 ve % 24,05 olarak belirlemişlerdir.

Sonuçlar arasındaki farklılıklar, antioksidan özellikler sergileyebilen biyoaktif bileşiklerin biyoerişilebilirliklerinin gıda matrisine, gıda matrisi üzerindeki birikme biçimlerine, güçlü bir şekilde bağlı olduğunu göstermektedir (Lingua vd., 2018).

Polifenol bileşiklerinin biyoaktiviteleri –OH gruplarının düzenlenmesine, hidroksilasyon modellerine ve fenolik halkalardaki varyasyonlara bağlı olarak çeşitlenir ayrıca, bir fenol halkası üzerinde bulunan orto (o-) veya para (p-) pozisyonundaki ikinci bir –OH nedeniyle antioksidan aktivite artar (Ketnawa vd., 2021). Polifenollerin antioksidan özellik gösterebilmeleri için öncelikle biyoerişilebilir olması, yani gıda matrisinden salınması ve çözünmesi gerekir (Lingua vd., 2018). Antioksidanların biyoerişilebilirliği, antioksidanla ilgili faktörlere (kimyasal yapı, moleküler bağlantı vb.), gıda matrisi ve kullanılan işleme yöntemi gibi daha fazla araştırmaya ihtiyaç duyan çeşitli faktörlere bağlıdır (Lingua vd., 2010).

Tablo 3.9 Hardaliye örneklerinin sindirim sonrası % Biyoerişilebilirllik değerleri

Biyoerişilebilirllik (%)	Hardaliye		
	Shiraz	**Merlot**	**Cabernet Sauvignon**
Toplam Fenolik	45,87±2,92[a]	32,68±1,15[b]	32,41±1,09[b]
Toplam Flavonoid	39,51±3,98[a]	29,35±0,39[b]	27,3±0,61[b]
Antosiyanin	15,52±3,61[a]	8,4±3,68[b]	9,97±0,89[b]
Antioksidan Kapasite			
CUPRAC	73,49±12,81[a]	45,11±1,68[b]	52,03±0,91[b]
DPPH	151,57±2,03[a]	137,78±7,99[b]	135,91±10,02[b]

*Aynı satırda farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$).

3.7 Hardaliye Örneklerinin *in vitro* Glisemik İndeksi

Örneklerin glisemik indeks (GI) değerleri Tablo 3.10'da verilmiştir. Hesaplamalarda test gıdası olarak satın alınan beyaz ekmek kullanılmıştır. Çalışmada hardaliye örneklerinin GI değerleri kontrol ekmeğine göre istatistiksel olarak daha yüksektir ($p<0,05$). Hardaliye örneklerinin değerleri biribirine oldukça yakın olmakla beraber 69,63 ile 71,48 arasında değişmiştir. %5,13 ile Shiraz hardaliyesi GI değerlerini en az yükselten örnektir. Bunu %6,52 ile Cabernet Sauvignon ve %8,37 ile Merlot hardaliyesi takip etmiştir.

Tablo 3.10 Hardaliye örneklerinin GI değerleri

Örnek	GI
Ekmek	66,23±1,54[b]
Shiraz	69,63±2,09[a]
Merlot	71,48±1,75[a]
Cabernet Sauvignon	70,55±2,00[a]

*Aynı satırda farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$).

Glisemik indeks, belirli bir gıdayı yedikten sonra kan şekerindeki artışı ölçmek ve yiyecekleri postprandiyal glisemiyi yükseltme yeteneklerine göre sistematik olarak sınıflandırmak için Jenkins ve diğerleri tarafından geliştirilmiş (Jenkins vd., 1981), diyabetik popülasyonlara yiyecek seçiminde yardımcı olmak amacıyla formüle edilmiştir (Jenkins vd., 1983). Birçok gıda, biyoaktif bileşiklerin varlığı ile sindirim enzimi aktivitesini ve bağırsak geçiş hızını modüle ederek daha düşük bir glisemik indeks ile sonuçlanan antidiyabetik özellikler göstermiştir (Alongi vd., 2018). Bunlardan bazıları insülin ve glikoz metabolizmasını ve bu hastalıkta indüklenen oksidatif stresi düzenleme yeteneğine sahip olan bol miktarda antioksidan moleküle sahip üzüm veya üzümden elde edilen ürünlerdir (Zunino, 2009). Düşük GI'li gıdalardaki karbonhidratlar daha yavaş sindirilir ve emilir (Schwingshackl ve Hoffmann, 2013). Polifenollerin gıdalardaki nişasta parçalanması üzerinde etkisi olduğu düşünülmektedir (Coe vd., 2013).

Banini vd. (2019) sağlıklı veya tip 2 diyabetli bireylerin diyetlerini 28 gün boyunca 150 mL muscadine üzüm suyu veya alkolü alınmış muscadine üzüm şarabı ile desteklemişler, açlık plazma insülin, glukoz veya glislenmiş hemoglobin seviyelerinde herhangi bir değişiklik gözlemlememişlerdir. Kim vd. (2008) sağlıklı sedanter, aerobik olarak eğitilmiş ve prediyabetik yetişkin insan grupları ile yaptıkları çalışmalarında kuru üzüm tüketimi sonrası GI'i sırasıyla 49,4 ± 7,4, 62,3 ± 10,5 ve 49,6 ± 4.8 olarak ölçmüşlerdir. Bays vd. (2012) 46 sağlıklı denekle yaptıkları çalışmada günde üç kez kuru üzüm içeren atıştırmalıkların tüketilmesiyle postprandiyal glisemide önemli bir azalma (%16) olduğunu belirlemişlerdir. Anderson vd. (2014) 12 hafta boyunca günde 3 kez uygulanan 28 g kuru üzüm tüketiminin, tokluk glisemiyi 13,1 mg/dL oranında önemli ölçüde azalttığını belirtmişlerdir. Tolve vd. (2020) muhtemel *in vivo* glisemik tepkiyi belirlemek için tahmini glisemik indeksi (pGI) pişmiş kontrol makarnasında 57,46 ± 0,41, 0,5 gr/100 gr üzüm prinası ilaveli pişmiş makarnada 55,56 ± 0,22 ve 10 gr/100 gr üzüm prinası ilaveli pişmiş makarnada 53,15 ± 1,37 olarak belirlemişlerdir.

Ceriello vd. (2001) tip 2 diyabet hastalarında açlık sırasında tüketilen kırmızı şarabın plazma glukozu ve insülini önemli ölçüde artırdığını; Bantle vd. (2008) tip 2 diyabetli kişilerde akşam yemekleriyle birlikte tüketilen şarabın plazma

glukozu veya serum insülini üzerinde hiçbir etkisi olmadığını; Williams vd. (2004) kırmızı şarap ve beyaz şarap alımının koroner arter hastalığı bulunan erkek gönüllülerde plazma glukozu önemli ölçüde azalttığını; Naissides vd. (2004) kadın gönüllülerde yemek ile birlikte kırmızı şarap tüketilmesinin insülin seviyelerinde %54'lük bir artışa neden olduğunu, alkolsüz kırmızı şarap tüketilmesinin ise suya kıyasla insülin seviyesini önemli ölçüde değiştirmediğini; Vauzour vd. (2009) şampanya şarabı tüketilmesi sonrası glukoz seviyesinin dğişmediğini; Bulut vd. (2013) sağlıklı erkekler ile yaptıkları çalışmalarında yemekle birlikte şarap tüketilmesi sonrası alınan kan örneklerinde kan şekerinin 5,5 mmol/L' den 6,7 mmol/L' ye ve insülin kan seviyesinin 54,6 pmol/ L' den 219,4 pmol/ L' ye arttığını; Xanthopoulou vd. (2016) sağlıklı erkeklerde şarap tüketimi sonrası alınan kan örneklerinde glukoz ve insülin konsantrasyonlarının önemli ölçüde artırdığını bildirmişlerdir.

3.8 Hardaliye Örneklerinde *in vitro* Sindirim Öncesi ve Sonrası Fenolik Bileşiklerin Profili ve % Biyoerişilebilirllik Değerleri

Hardaliye örneklerinde *in vitro* sindirim öncesi ve sonrası fenolik bileşenlerin profili belirlenmiş, sonuçlar Tablo 3.11'de verilmiştir. Farklı üzüm çeşitleriyle hazırlanan hardaliyelerin fenolik kompozisyonları, miktarsal farklılıklarıyla ortaya koyulmuştur. Ayrıca *in vitro* sindirim uygulamasının hardaliye örneklerinin fenolik profili ve konsantrasyonuna etkisi tespit edilmiştir.

Hardaliye örneklerinde antosiyanin olmayan fenolik bileşikler arasında en yüksek konsantrasyonda tespit edilen epikateşindir (Shiraz, Merlot ve Cabernet Sauvignon hardaliyelerinde sırasıyla; 47,52±2,37, 70,08±3,50 ve 30,16±1,50 mg/L). Shiraz ve Merlot hardaliyelerinde epikateşin için aynı durum, *in vitro* sindirim etkisiyle azalsa da, devam etmiştir (sırasıyla; 24,97±1,24, ve 24,70±1,23 mg/L). Shiraz ve Merlot hardaliyelerinde 3-hidroksibenzoik asit sırasıyla 17,85±0,89 ve 66,03±3,30 mg/L ile en yüksek değere sahip fenolik asit olmuştur. Cabernet Sauvignon hardaliyesinde ise en yüksek değere sahip fenolik asit 23,70±1,18 mg/L ile gallik asittir. 3-hidroksibenzoik asit sindirim sonrası Shiraz ve Cabernet Sauvignon hardaliyelerinde tespit edilmezken Merlot hardaliyesinde 16,87±0,84 mg/L ile en yüksek fenolik asit olmaya devam

etmiştir. Gallik asit ise sindirim sonrası Shiraz ve Merlot hardaliyelerinde sırasıyla %52,02 ve %46,69 azalırken Cabernet Sauvignon hardaliyesinde tespit edilmemiştir. Vanilik asit konsantrasyonu en yüksek Merlot hardaliyesinde belirlenmiş, bunu birbirine oldukça yakın olmakla beraber Shiraz ve Cabernet Sauvignon hardaliyeleri takip etmiştir. *In vitro* sindirim koşulları Shiraz hardaliyesinde %82,59, Merlot hardaliyesinde %65,36 ve Cabernet Sauvignon hardaliyesinde %87,63 olmak üzere önemli ölçüde azalmaya neden olmuştur. Sindirim öncesi üç hardaliyede de en düşük değere sahip fenolik asit olan p-kumarik asit (Shiraz, Merlot ve Cabernet Sauvignon hardaliyelerinde sırasıyla; 1,28±0,06, 3,31±0,16 ve 1,56±0,07 mg/L) *in vitro* sindirim sonrası Shiraz hardaliyesinde tespit edilmezken, Merlot ve Cabernet Sauvignon hardaliyelerinde sırasıyla; %121,14 ve %160,89 olmak üzere önemli ölçüde artmıştır. Hardaliyelerin sindirim öncesi ve sonrası ferulik asit konsantrasyonları birbirine oldukça yakın bulunmuş ve üç hardaliye çeşiti içinde *in vitro* sindirim sonrası artışın tespit edildiği tek fenolik bileşik ferulik asit olmuştur.

Van Leeuw vd. (2014) Shiraz, Merlot ve Cabernet Sauvignon üzümlerinden üretilmiş kırmızı şarap örneklerinde gallik asit miktarını sırasıyla 49,54-78,07 mg/L, 26,13 - 94,26 mg/L ve 40,58-90,37 mg/L; vanilik asit miktarını sırasıyla 2,68-6,25 mg/L, 2,24-4,71 mg/L ve 2,24-6,41 mg/L; epikateşin miktarını sırasıyla 19,62-39,39 mg/L, 11,14-49,80 mg/L ve 13,06-35,80 mg/L ve Merlot ve Cabernet Sauvignon üzümlerinden üretilmiş kırmızı şarap örneklerinde p-kumarik asit miktarını sırasıyla 1,41-4,97 mg/L ve 1,73-3,51 mg/L değer aralıklarında belirlemişlerdir. Zorraquín-Peña vd. (2021) çalışmalarında Cabernet Sauvignon ve Cabernet Franc üzümleriyle üretilen şarapta gallik asit, vanilik asit, ferulik asit, kumarik asit ve epikateşin değerlerinin sindirim öncesi sırasıyla 115 ± 2, 3,56 ± 0,21, 0,281 ± 0,050, 4,92 ± 2,05 ve 9,68 ± 1,31 mg/L; sindirim sonrası ise vanilik asit ve ferulik asitin iz miktarda gallik asit, kumarik asit ve epikateşin in ise 0,183 ± 0,003, 2,59 ± 0,078 ve 0,115 ± 0,048 mg/L olarak tespit edildiğini bildirmişlerdir. Da Silva Haas vd. (2018) gallik asit, vanilik asit ve epikateşin miktarlarını *in vitro* sindirim öncesi Bordo ve Isabel üzümlerinden üretilmiş farklı üzüm suyu örneklerinde sırasıyla 3,1±0,2 ve 1,7±0,2, 4,5±0,1 ve 2,8±0,2, 185 ±1 ve 33 ±2 mg/kg olarak belirlerken; *in*

vitro sindirimin bağırsak fazı sonrası gallik asiti yalnızca Bordo üzüm suyu örneklerinde 2,30 ± 0,03 mg/kg olarak, vanilik asiti sırasıyla 3,40 ± 0,02 ve 2,0±0, 1 mg/kg ve epikateşini sırasıyla 89 ±0, 4 ve 18 ±1 mg/kg olarak tespit etmişlerdir. Sun vd. (2020) Cabernet Sauvignon üzümlerinden üretilmiş şaraplarda yaptıkları çalışmalarında gallik asit, vanilik asit ve epikateşin miktarını *in vitro* sindirim öncesi sırasıyla 90,79 ± 0,57, 16,62 ± 0,87, 6,26 ± 0,23; mide sindiriminden sonra sırasıyla 87,12 ± 0,99, 17,83 ± 0,37, 13,87 ± 0,44 ve kolonda sırasıyla 19,28 ± 0,98, 4,09 ± 0,33 ve 4,87 ± 0,33 olarak tespit etmişlerdir. Lingua vd. (2018) Shiraz üzümlerinden üretilmiş şarapta gallik asit ve epikateşin miktarlarını sırasıyla 8,80 ± 0,51 ve 15,98 ± 0,82 mg/L olarak belirlerken *in vitro* sindirim sonrası diyalize edilebilir fraksiyonda şaraba göre geri kazanım yüzdelerini gallik asit için algılama sınırının altında, epikateşin için 2,25 ± 0,50 olarak tespit etmişlerdir. Osrečak vd. (2016) Merlot üzümlerinden üretilmiş şarapta gallik asit, p-kumarik asit ve epikateşin değerlerini sırasıyla 42,5, 5,2 ve 16,4 mg/L olarak tespit etmişlerdir.

Üzümve üzümden üretilen içecekler, fenolik bileşiklerin sayısı ve türü açısından büyük farklılıklar gösterir ve bunların bireysel fenolik profilleri ve ilgili sağlık yararları hakkındaki veriler büyük ilgi görmektedir (Zang vd., 2021). Üzümlerin fenolik bileşimini üzüm türü, çeşidi, iklim ve üzümün yetiştirildiği coğrafya ve olgunluk derecesini gibi birçok faktör etkileyebilir. Üzümün kendine özgü bileşimine ek olarak, pH, sıcaklık, enzim muamelesini ve fermantasyon koşullarıda fenolik bileşimi etkiler (Hernández-Jiménez vd., 2009; Revilla vd., 2001; Sacchi vd., 2005; Sims ve Morris, 1984).

Bütün hardaliye örneklerinde *in vitro* sindirim öncesi ve sonrasında başat antosiyanin malvidin-3-O-glikozit olmuştur. Sindirim öncesi Cabernet Sauvignon hardaliyesi 1404,79±77,81 mg/L ile en yüksek malvidin-3-O-glikozit içeriğine sahipken *in vitro* sindirim sonrası 629,09±28,24 mg/L ile Merlot hardaliyesi en yüksek malvidin-3-O-glikozit içeriğine sahip örnek olarak belirlenmiştir. Shiraz hardaliyesinde sindirim sonrası malvidin-3-O-glikozit içeriğinde %29,94 azalma tespit edimiştir. Bütün hardaliye örneklerinde *in vitro* sindirim öncesi malvidin-3-O-glikozitten sonra en yüksek miktarda belirlenen antosiyanin siyanidin-3-O-rutinozittir. *In vitro* sindirim sonrası Shiraz hardaliyesinde malvidin-3-O-

glikozitten sonra yine en yüksek Siyanidin-3-O-rutinozit (21,83±0,87 mg/L) belirlenirken, Merlot ve Cabernet Sauvignon hardaliyelerinde ise sindirim sonrası en yüksek değer malvidin-3-O-glikozitten sonra peonidin-3-O-glikozite ait bulunmuştur (sırasıyla; 41,98±2,01 ve 13,89±0,62 mg/L). Sindirim sonrası peonidin-3-O-glikozit konsantrasyonunda en küçük azalma Shiraz hardaliyesinde belirlenmiştir. Siyanidin-3-O-glikozit Merlot ve Cabernet Sauvignon hardaliyelerinde 1,00±0,04 ve 1,21±0,05 mg/L ile en düşük değere sahip antosiyanin iken sindirim sonrası artışın tespit edildiği tek antosiyanin molekülü olmuştur. Cabernet Sauvignon hardaliyesi başlangıçta 63,45±2,85 mg/L ile en yüksek delfidin-3-O-β-D-glikozit içeriğine sahip örnek olarak belirlenmiş ancak *in vitro* sindirim sonrası 1,15±0,05 mg/L ile en düşük değer yine Cabernet Sauvignon hardaliyesinde belirlenmiştir. Başlangıçta üç hardaliyede de oldukça düşük konsantrasyonlarda belirlenen siyanidin-3,5-di-O-glikozit molekülü sindirim sonrası %3,72 ve %7,02 azalma ile sırasıyla Shiraz ve Cabernet Sauvignon hardaliyelerinde en düşük azalmanın tespit edildiği antosiyanin olmuştur. Sindirim sonrası siyanidin-3,5-di-O-glikozitte en önemli azalma %84,05 ile Merlot hardaliyesinde belirlenmiştir. Shiraz, Merlot ve Cabernet Sauvignon hardaliyelerinde sindirim öncesi sırasıyla 5,02±0,25, 5,23±0,26 ve 11,82±0,59 mg/L olarak belirlenen pelargonidin *in vitro* sindirim sonrası hardaliye örneklerinde tespit edilmeyen tek antosiyanindir.

Zorraquín-Peña vd. (2021) çalışmalarında Cabernet Sauvignon ve Cabernet Franc üzümleriyle üretilen şaraplarda delfidin-3-O-glikozit, peonidin-3-O-glikozit ve malvidin-3-O-glikozit değerlerinin 0,121 ± 0,001, 0,262 ± 0,004 ve 2,85 ± 0,01 mg/L, bağırsak sindirimine uğramış örneklerde ise delfidin-3-O-glikozit ve peonidin-3-O-glikozitin iz miktarda olduğunu malvidin-3-O-glikozitin ise 0,029 ± 0,001 mg/L olduğunu bildirmişlerdir. Pešić vd. (2019) malvidin-3-O-glikozit miktarını üzüm kabuğu ekstraktında 100,80 ± 15,01 μg/L, sindirim uygulanmış üzüm kabuğu ekstraktında ise 22,68 ± 0,27 μg/L olarak belirlemişlerdir. Yang vd. (2018) Cabernet Sauvignon üzümlerinden üretilmiş şaraplarda *in vitro* sindirim sürecinden sonra delfidin-3-O-glikozit, malvidin-3-O-glikozit, peonidin-3-O-glikozit ve siyanidin-3-O-glikozit konsantrasyonlarının sırasıyla %92,9, %51.1, %49,7 ve %46,7 olmak üzere önemli ölçüde azaldığını bildirmişlerdir.

Carmona-Jiménez vd. (2018) taze Shiraz ve Cabernet Sauvignon üzüm posasında peonidin-3-O-glikozit miktarını 22,21 ± 0,81 ve 15,66 ± 0,46 mg/kg olarak ve malvidin-3-O-glikozit miktarını 209,66 ± 20,02 ve 152,21 ± 0,99 mg/kg olarak bulmuşlardır. Da Silva Haas vd. (2018) siyanidin-3-O-glikozit, peonidin-3-O-glikozit, malvidin-3-O-glikozit miktarlarını *in vitro* sindirim öncesi Bordo ve Isabel üzümlerinden üretilmiş farklı üzüm suyu örneklerinde sırasıyla 0,9 ±0, 1 ve 1,2 ±0, 2, 1,90±0,04 ve 19 ±1, 15±1 ve 47±2 mg/kg olarak belirlerken; *in vitro* sindirimin bağırsak fazı sonrası siyanidin-3-O-glikoziti yalnızca Bordo üzüm suyu örneklerinde 0,30 ± 0,01 mg/kg olarak, peonidin-3-O-glikoziti sırasıyla 1,4±0, 1 ve 1,7±0, 2 mg/kg ve malvidin-3-O-glikoziti sırasıyla 11±1 ve 3,2±0, 4 mg/kg olarak tespit etmişlerdir. Alencar vd. (2017) Shiraz üzümlerinden üretilmiş şarapta delfidin-3-O-glikozit, peonidin-3-O-glikozit ve malvidin-3-O-glikozit miktarlarını sırasıyla 3,2 ± 0,06, 4,4 ± 0,06 ve 68,3 ± 1,44 mg/L olarak tespit etmişlerdir. Lingua vd. (2018) Shiraz üzümlerinden üretilmiş şarapta peonidin-3-O-glikozit ve malvidin-3-O-glikozit miktarlarını sırasıyla 4,44 ± 0,35 ve 126,27 ± 14,73 mg/L olarak belirlerken *in vitro* sindirim sonrası diyalize edilebilir fraksiyonda şaraba göre geri kazanım yüzdelerini sırasıyla 0,69 ± 0,13 ve 6,04 ± 0,26 olarak tespit etmişlerdir.

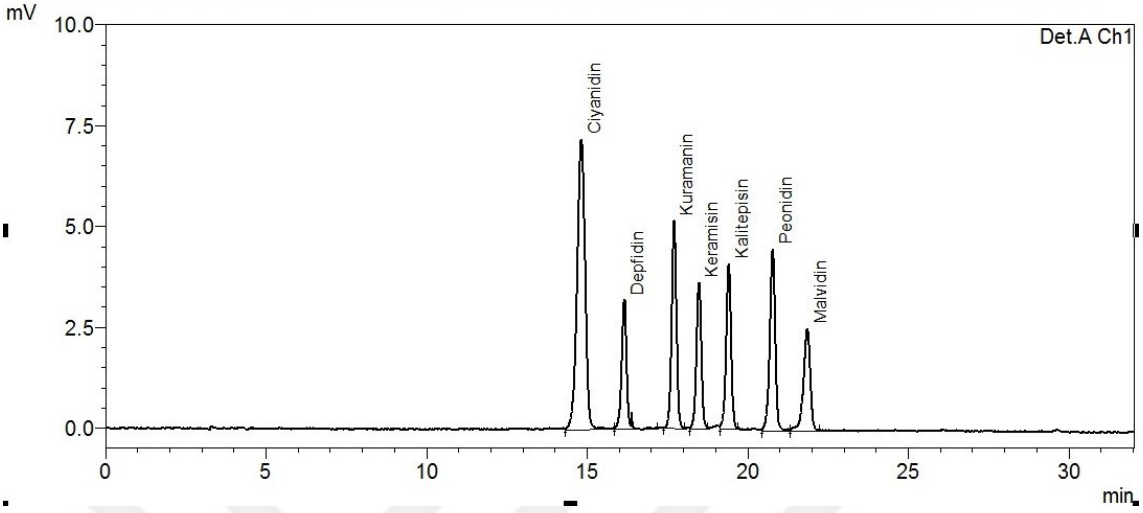
Antosiyaninler asidik koşullar altında kararlıdırlar, mide sindirimine maruz kaldığında, sindirim süreci bitki materyallerinin hücre duvarını tahrip ederek antosiyaninlerin salınmasına neden olabilir (Liu vd., 2020). Ancak alkali ortamlarda stabil değildir ve büyük ölçüde bağırsak sindiriminin alkali koşullarından etkilenir (Wang vd., 2016). Antosiyanin moleküllerinin farklı pH koşulları altında farklı bir dengeye sahip olduğu, daha düşük pH ortamının çoğu antosiyaninlerin flavilyum katyon konformasyonuna neden olabileceği bilinmektedir (Março ve Scarminio, 2007). Böyle bir konformasyon kayması, simüle edilmiş gastrik koşul altında toplam antosiyanin konsantrasyonunda belirgin bir artışa yol açabilmektedir (Yang vd., 2018). Bağırsak sindirimine tabi tutulduklarında da salınmasına rağmen, salınan antosiyaninler yüksek kararsızlığa sahiptir ve alkali ortam nedeniyle büyük miktarlarda ayrışır (Liu vd., 2020; Pérez-Vicente vd., 2002). Böylece, antosiyanin içeriği önemli ölçüde azalır. Yapılan çalışmalar, antosiyaninlerin alkali koşullar altında bozunma

hızının yapıları ile yakın bir ilişkisi olduğuna işaret etmiştir (Liu vd., 2020). Simüle edilmiş bağırsak yolunda, toplam antosiyanin konsantrasyonundaki azalma, daha önceki çalışmalarda bildirildiği gibi, esas olarak antosiyaninlerin aromatik halkalarının parçalanarak bozunmasından kaynaklanır (Kay vd., 2009; Forester ve Waterhouse, 2008). Antosiyaninlerin yapısındaki hidroksil grubunun fazlalığının sindirim sisteminde antosiyaninlerin parçalanmasını hızlandırdığı bilinmektedir (Woodward vd., 2009; Kamonpatana vd., 2014). Ek olarak, simüle edilmiş bağırsak yolundaki bazik durumun, antosiyanin molekülleri ile diğer bileşikler arasındaki etkileşimleri tetikleyerek polimerik bileşikler oluşturduğu rapor edilmiştir (Hanske vd., 2013; Keppler ve Humpf, 2005).

Analizi yapılan bireysel fenolikler % biyoerişilebilirlikleri açısından da değerlendirilmiştir. Sindirim sonrası Shiraz hardaliyesinde tespit edilemeyen p-kumarik asit Merlot ve Cabernet Sauvignon hardaliyelerinde sırasıyla 220,81±11,04 ve 260,54±13,02 ile en yüksek biyoerişilebilirliğe sahip fenolik bileşik olmuştur. Shiraz hardaliyesi için ise en yüksek biyoerişilebilirlik ferulik asitte belirlenmiştir. Merlot ve Cabernet Sauvignon hardaliyelerinde 154,00±7,69 ve 169,74±0,99 ile en yüksek biyoerişilebilirlik gösteren antosiyanin molekülü olan siyanidin-3-O-glikozit, Shiraz hardaliyesinde 26,31±0,17 ile en düşük biyoerişilebilirliğe sahip antosiyanin molekülü olmuştur. Shiraz hardaliyesinde en yüksek biyoerişilebilirlik gösteren antosiyanin ise 96,29±0,01 ile en yüksek biyoerişilebilirliğe sahip olan siyanidin-3,5-di-O-glikozittir. Merlot ve Cabernet Sauvignon hardaliyelerinde en düşük biyoerişilebilirlik sırasıyla 9,63±0,76 ve 1,81±0,17 ile delfidin-3-O-β-D-glikozitte tespit edilirken, Shiraz hardaliyesinde 17,45±0,87 ile vanilik asitte tespit edilmiştir. Antosiyanin olmayan fenoliklerin biyoerişilebilirliği açısından en etkili hardaliye Merlot olurken, antosiyanin sınıfındaki fenolikler için (siyanidin-3-O-glikozit hariç) en yüksek biyoerişilebilirlik değerleri Shiraz hardaliyesinde belirlenmiştir.

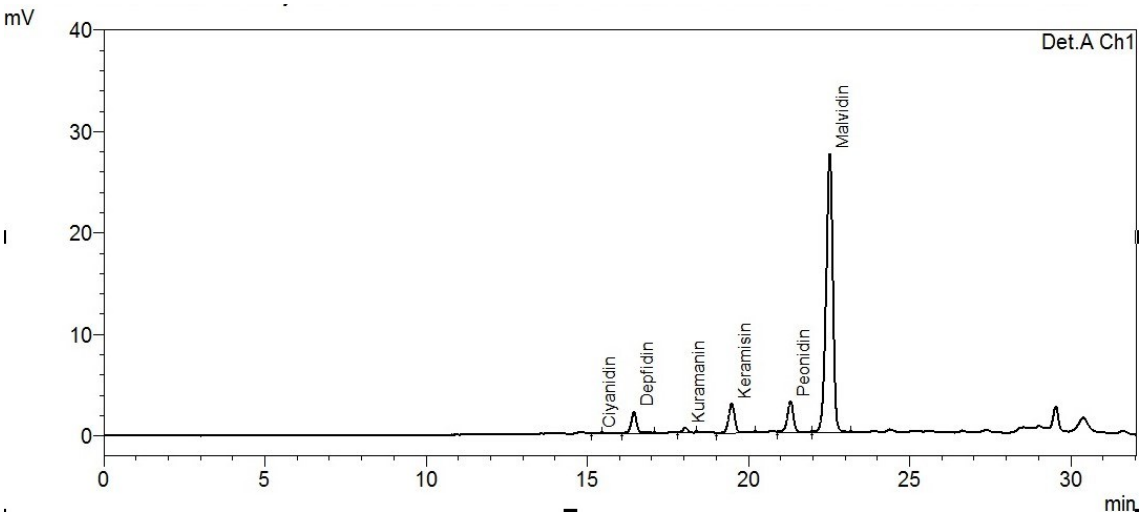
Bireysel fenolik grupları, yapıları, moleküler ağırlıkları ve polariteleri ile ilişkili olan biyoyararlanım açısından önemli ölçüde farklılık gösterir (Tarko vd., 2020). pH değişiklikleri ve sindirim enzimlerinin özel etkisi ile gastrointestinal

sindirimin fizikokimyasal ortamı, sıvı ve katı gıda matrisinden fenolik stabiliteyi ve biyoerişilebilirliği etkilemekten ve sonuç olarak fenolik profillerinde değişiklikler üretmekten sorumludur (Benzie ve Strain, 1996).



Şekil 3.6 Antosiyanin standartlarına ait HPLC kromatogramı

1. Siyanidin-3,5-di-O-glikozit (ciyanidin); 2. Delfidin-3-O-β-D-glikozit (depfidin); 3. Siyanidin-3-O-glikozit (Kuramanin); 4. Siyanidin-3-O-rutinozit (keramisin); 5. Pelargonidin-3-O-glikozit (kalitepsin); 6. Peonidin-3-O-glikozit (peonidin); 7. Malvidin-3-O-glikozit (malvidin)



Şekil 3.7 Merlot hardaliye örneğine ait HPLC kromatogramı

Tablo 3.11 Hardaliye örneklerinde sindirim öncesi ve sonrası fenolik bileşiklerin profili ve % biyoerişilebilirllik değerleri

Fenolik Bileşik	*In vitro* Sindirim Öncesi (mg/L)		
	Shiraz	**Merlot**	**Cabernet Sauvignon**
Epikateşin	47,52±2,37^{b}	70,08±3,50^{a}	30,16±1,50^{c}
Vanilik asit	13,56±0,67^{b}	20,30±1,01^{a}	15,28±0,76^{b}
Gallik asit	12,32±0,61^{c}	28,01±1,40^{a}	23,70±1,18^{b}
3-Hidroksibenzoik asit	17,85±0,89^{b}	66,03±3,30^{a}	7,75±0,38^{c}
p-Kumarik asit	1,28±0,06^{b}	3,31±0,16^{a}	1,56±0,07^{b}
Ferulik asit	7,34±0,36^{a}	7,02±0,35^{b}	6,96±0,34^{b}
Fenolik Bileşik	***In vitro* Sindirim Sonrası (mg/L)**		
	Shiraz	**Merlot**	**Cabernet Sauvignon**
Epikateşin	24,97±1,24^{a}	24,70±1,23^{a}	4,51±0,22^{b}
Vanilik asit	2,36±0,11^{b}	7,03±0,35^{a}	1,89±0,09^{c}
Gallik asit	5,91±0,29^{b}	14,93±0,74^{a}	T.E.
3-Hidroksibenzoik asit	T.E.	16,87±0,84	T.E.
p-Kumarik asit	T.E.	7,32±0,36^{a}	4,07±0,20^{b}
Ferulik asit	7,71±0,38^{a}	7,65±0,38^{a}	7,07±0,35^{b}
Fenolik Bileşik	**Biyoerişilebilirllik (%)**		
	Shiraz	**Merlot**	**Cabernet Sauvignon**
Epikateşin	52,55±2,62^{a}	35,24±1,76^{b}	14,96±0,74^{c}
Vanilik asit	17,45±0,87^{b}	34,67±1,73^{a}	12,37±0,61^{b}
Gallik asit	48,00±2,40^{b}	53,31±2,66^{a}	–
3-Hidroksibenzoik asit	–	25,55±1,27	–
p-Kumarik asit	–	220,81±11,04^{b}	260,54±13,02^{a}
Ferulik asit	105,03±5,25^{a}	109,04±5,45^{a}	101,54±5,07^{a}

*Aynı satırda farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$). T.E.: Tespit edilemedi

Tablo 3.11 Hardaliye örneklerinde sindirim öncesi ve sonrası fenolik bileşiklerin profili ve % biyoerişilebilirllik değerleri (devamı)

Fenolik Bileşik (*Antosiyaninler*)	*In vitro* Sindirim Öncesi (mg/L)		
	Shiraz	**Merlot**	**Cabernet Sauvignon**
Siyanidin-3,5-di-O-glikozit	1,61±0,03^{b}	3,51±0,14^{a}	1,42±0,06^{b}
Siyanidin-3-O-glikozit	2,90±0,63^{a}	1,00±0,04^{b}	1,21±0,05^{b}
Malvidin-3-O-glikozit	827,23±7,01^{b}	864,97±46,52^{b}	1404,79±77,81^{a}
Pelargonidin	5,02±0,25^{b}	5,22±0,26^{b}	11,82±0,59^{a}
Siyanidin-3-O-rutinozit	39,38±0,66^{c}	89,31±4,46^{b}	117,69±5,29^{a}
Peonidin-3-O-glikozit	23,09±0,66^{b}	67,55±3,03^{a}	27,99±1,25^{b}
Delfidin-3-O-β-D-glikozit	6,30±0,87^{c}	39,11±1,56^{b}	63,45±2,85^{a}
Fenolik Bileşik (*Antosiyaninler*)	***In vitro* Sindirim Sonrası (mg/L)**		
	Shiraz	**Merlot**	**Cabernet Sauvignon**
Siyanidin-3,5-di-O-glikozit	1,55±0,06^{a}	0,56±0,02^{b}	1,32±0,06^{a}
Siyanidin-3-O-glikozit	0,76±0,03^{c}	1,54±0,07^{b}	2,04±0,09^{a}
Malvidin-3-O-glikozit	579,48±23,17^{b}	629,09±28,24^{a}	456,58±20,52^{c}
Pelargonidin	T.E.	T.E.	T.E.
Siyanidin-3-O-rutinozit	21,83±0,87^{a}	15,77±0,70^{b}	7,51±0,33^{c}
Peonidin-3-O-glikozit	16,79±0,67^{b}	41,98±2,01^{a}	13,89±0,62^{b}
Delfidin-3-O-β-D-glikozit	3,64±0,14^{a}	3,76±0,17^{a}	1,15±0,05^{b}
Fenolik Bileşik (*Antosiyaninler*)	**Biyoerişilebilirllik (%)**		
	Shiraz	**Merlot**	**Cabernet Sauvignon**
Siyanidin-3,5-di-O-glikozit	96,29±0,01^{a}	15,95±0,00^{b}	93,59±0,55^{a}
Siyanidin-3-O-glikozit	26,31±26,31^{b}	154±7,69^{a}	169,74±0,99^{a}
Malvidin-3-O-glikozit	70,29±0,42^{a}	73,23±0,88^{a}	32,72±0,39^{b}
Pelargonidin	–	–	–
Siyanidin-3-O-rutinozit	55,80± 0,32^{a}	17,89±0,2^{b}	6,41±0,07^{c}
Peonidin-3-O-glikozit	73,43±0,69^{a}	62,52±0,33^{b}	48,92±1,2^{c}
Delfidin-3-O-β-D-glikozit	57,97±0,34^{a}	9,63±0,76^{b}	1,81±0,17^{c}

*Aynı satırda farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$). T.E.: Tespit edilemedi

3.9 Hardaliye Örneklerinde *in vitro* Sindirim Öncesi ve Sonrası LC-MS Tabanlı Metabolomik Yaklaşım İle Metabolitlerin Tanımlanması

Hardaliye örneklerinde hedeflenmemiş LC-QTOF-MS tabanlı metabolomik analiz, *in vitro* gastrointestinal sindirim öncesi ve sonrası yapılmıştır. *In vitro* sindirim öncesi metabolit profilleri Tablo 3.12'de ve *in vitro* sindirim sonrası metabolit profilleri Tablo 3.13'de gösterilmiştir. Analiz sonrası belirlenen kütleler, LC-QTOF-MS cihazının sahip olduğu kütüphane ve benzer literatür çalışmalarının karşılaştırılması ile tanımlanarak kimlikler oluşturulmuştur.

In vitro sindirim öncesi Shiraz hardaliyesinde (S1) 63 adet kütle belirlenmiş 18'i tanımlanmış, Merlot hardaliyesinde (M1) 96 adet kütle belirlenmiş 20'si tanımlanmış ve Cabernet Sauvignon hardaliyesinde (C1) 87 adet kütle belirlenmiş 23'ü tanımlanmıştır. *In vitro* sindirim sonrası Shiraz hardaliyesinde (S2) 132 adet kütle belirlenmiş 19'u tanımlanmış, Merlot hardaliyesinde (M2) 122 adet kütle belirlenmiş 21'si tanımlanmış ve Cabernet Sauvignon hardaliyesinde (C2) 100 adet kütle belirlenmiş 23'ü tanımlanmıştır. Toplamda 59 farklı metabolit tanımlanmıştır.

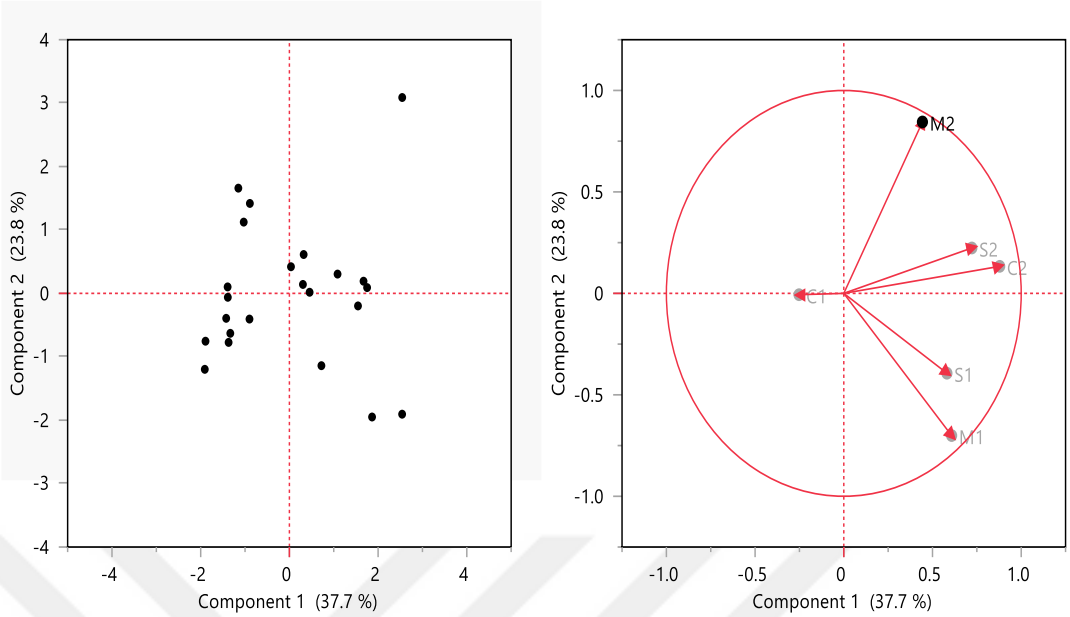
Bütün hardaliye örneklerinde *in vitro* sindirim öncesi tanımlanan 7 ortak metabolit; Kolin, Prolin, Fenobucarb, Kaftarik asit, trans-Resveratrol, Piceatannol ve Malvidin-3-O-monoglukosittir. *In vitro* sindirim sonrası ise bütün örneklerde tanımlanan 9 ortak metabolit; Malvidin-kumaroil-glukozit-pirüvikasit, Piloretin, p-Kumarik asit, Kaempferol-3-O-pentosit, trans-Resveratrol, Kuersetin-3-O-glukuronid, Piran-malvidin-3-glukozit (vitisin B), Malvidin-3-O-asetilglukosit ve Malvidin-3-O-monoglukosittir. S1 ve S2 örneklerindeki 3 adet ortak metabolit; trans-Resveratrol, Kaempferol-3-O-pentosit ve Malvidin-3-O-monoglukosittir. M1 ve M2 örneklerinde belirlenen 8 adet ortak metabolit; Epikateşin, Piloretin, trans-Sinnamaldehit, Fenobucarb, trans-Resveratrol, Piceatannol, Malvidin-3-O-monoglukosit ve Malvidin-3-O-asetilglukosittir. C1 ve C2 örneklerinde belirlenen 8 adet ortak metabolit ise şunlardır; Pirogallik asit, L-Prolin, trans-Sinnamaldehit, Malvidin-3-O-monoglukosit, trans-Resveratrol, Piceatannol, Malvidin-3-O-asetilglukosit, Piceid (Resveratrol-3-O-beta-D-glukopiranozit).

Bütün örneklerde yalnız Malvidin-3-O-monoglucoside ve trans-Resveratrol hem sindirim öncesi hem de simdirim sonrası tespit edilmiş olan iki metabolittir.

Hardaliye örneklerinin metabolit profillerinin farklılaşmasında, üzüm çeşiti önemli bir etkendir ayrıca *in vitro* sindirim uygulamasıda, başta S2 olmak üzere örneklerin metabolit profilleride başlangıca kıyasla önemli farklılıklara neden olmuştur. Metabolit profillerinde S1 ile S2 arasında yaklaşık %89, M1 ile M2 arasında yaklaşık %70 ve C1 ile C2 arasında yaklaşık %65 değişim belirlenmiştir. Temel bileşen analizi (PCA) ile Şekil 3.6 'da gösterildiği gibi örneklerin metabolit profillerinin X ekseninde %37,7 Y ekseninde %23,8 varyasyon göstererek birbirinden farklılaştığı ortaya koyulmuştur. İncelenen örnekler için, birinci ve ikinci temel bileşenler toplam varyansın %61,5' ini açıklamıştır. Temel bileşen 1 (PC1) varyansın %37,7'ini ve temel bileşen 2 (PC2) %23,8'ini açıklamaktadır (Şekil 3.6). PC1; M2, S2, C2, S1 ve M1 örneklerini C1 den ve PC2; S1, M1, C1 örneklerini S2, M2, C2 örneklerinden ayırmıştır.

Örneklerde *in vitro* sindirim öncesi ve sonrasında tespit edilmiş metabolitler genel olarak, aminoasit ve peptitler gibi protein yapısına sahip olanlar, organik yapıdaki pestisitler ve fenolik yapıya sahip olan bileşenler şeklinde sınıflandırılabilir. Her üç hardaliyede de sindirim sonrası tespit edilmiş metabolitler arasında fanolik yapıya sahip olanlar, sindirim öncesi duruma kıyasla daha fazladır. Başlangıç ve sindirim sonrası örneklerde analiz öncesi, fenolik yapıdaki bileşenleri ayırmaya yönelik herhangi bir ekstraksiyon işlemi uygulanmamıştır. Ancak *in vitro* sindirime tabi tutulmuş örneklerde enzimler, sindirim sıvıları ve değişen ortam pH'ı gibi etkilerle gıda matriksi sindirim öncesi hardaliye örneklerine kıyasla değişmiştir. Başlangıça kıyasla farklı fenolik yapıların belirlenmesinin nedeni; sindirim koşullarının etkisiyle gıda matriksinden salınmaları veya sindirim öncesi analiz sırasında bu bileşenleri perdeleyen metabolitlerin yapısal değişikliğe uğraması olabilir.

Yapılan hedeflenmemiş analiz sonucunda elde edilmiş sonuçlar ile hardaliyede bulunabilecek metabolit sınıflarını aydınlatan ve *in vitro* sindirim metabolit profilinde meydana getirebileceği değişimlere ışık tutan bilimsel veriler sağlanmıştır.



Şekil 3.8 Üç hardaliye çeşitinin sindirim öncesi ve sonrası metabolitlerinin nispi değişimine dayanan temel bileşen analizi (PCA biplot)

Tablo 3.12 Hardaliye örneklerinin *in vitro* sindirim öncesi metabolit profili

Shiraz (S1)						
Rt (min)	**[M+H]+ (m/z)**	**Bileşen**	**Kapalı formül**	**Sınıf**	**Molekül ağırlığı**	**Referans(lar)**
2,297	104,11	Kolin	$C_5H_{14}NO$	B-kompleks vitamini	104,11	LC-MS kütüphane
2,381	148,06	L-Glutamik asit	$C_5H_9NO_4$	Aminoasit	147,06	LC-MS kütüphane
2,394	175,12	Şikimik asit	$C_7\ H_{10}\ O_5$	Organik asit	174,15	Arbulu vd. (2015)
2,832	116,07	L-Prolin	$C_5H_9NO_2$	Aminoasit	115,07	LC-MS kütüphane
2,897	280,14	Metalaksil	$C_{15}H_{21}NO_4$	Fungisid	279,33	Pérez-Ortega vd. (2012)
3,633	130,05	Piroglutamik asit	$C_5H_7NO_3$	Aminoasit türevi	129,04	LC-MS kütüphane
4,568	182,08	L-Tirozin	$C_9H_{11}NO_3$	Amininoasit	181,08	LC-MS kütüphane
4,701	132,10	L-İzolösin	$C_6H_{13}NO_2$	Amininoasit	131,10	LC-MS kütüphane
5,302	132,10	L-Lösin	$C_6H_{13}NO_2$	Amininoasit	131,10	LC-MS kütüphane
8,202	208,13	Fenobucarb	$C_{12}H_{17}NO_2$	İnsektisid	207,27	Pérez-Ortega vd. (2012)
8,218	312,22	Kaftarik asit	$C_{13}H_{12}O_9$	Fenolik asit	312,22	Tkacza vd. (2019)
8,22	229,2	trans-Resveratrol	$C_{14}H_{12}O_3$	Polifenol	228,24	Da Silva vd. (2017)
8,226	419,31	Kaempferol-3-O- pentosit	$C_{20}H_{18}O_{10}$	Fenolik madde	418,3	Radenkovs vd. (2020), Kiselova-Kaneva vd. (2022)
9,628	245,18	Piceatannol	$C_{14}\ H_{12}\ O_4$	Fenol	244,24	Arbulu vd. (2015) López-Gutiérrez vd. (2016)
9,651	493,13	Malvidin-3-O-monoglukosit	$C_{23}H_{25}O_{12}^{+}$	Antosiyanin	493,13	Flamini vd. (2015), Drosou vd. (2015
9,982	453,21	Kateşin glikozit	$C_{21}H_{24}O_{11}$	Flavan-3-ol glikosid	452,41	Wang vd. (2017), Pešić vd. (2019)
9,988	459,22	(-)-Gallokateşin gallat	$C_{22}H_{18}O_{11}$	Kateşin	458,37	López-Gutiérrez vd. (2016), Fracassetti vd. (2016)
17,196	301,14	Krizoeriol	$C_{16}H_{12}O_6$	Flavon	300,26	Melo vd. (2016)

Tablo 3.12 Hardaliye örneklerinin *in vitro* sindirim öncesi metabolit profili (devamı)

Merlot (M1)						
Rt (min)	**[M+H]+ (m/z)**	**Bileşen**	**Kapalı formül**	**Sınıf**	**Molekül ağırlığı**	**Referans(lar)**
2,268	175,12	Şikimik asit	$C_7H_{10}O_5$	Organik asit	174,15	Arbulu vd. (2015)
2,299	104,113	Kolin	$C_5H_{14}NO$	Aminoasit	104,113	LC-MS kütüphane
2,584	116,077	L-Prolin	$C_5H_9NO_2$	Aminoasit	115,07	LC-MS kütüphane
2,795	291,05	Epikateşin	$C_{15}H_{14}O_6$	Flavonoid	290,27	Zhang vd. (2018), López-Gutiérrez vd. (2016)
2,854	275,075	Piloretin	$C_{15}H_{14}O_5$	Fenol (Dihidrokalkon)	274,27	Wang vd. (2017), Ehrhardt vd. (2014)
2,884	280,14	Metalaxyl	$C_{15}H_{21}NO_4$	Fungisid	279,33	Pérez-Ortega vd. (2012)
4,881	133,11	trans-Sinnamaldehit	C_9H_8O	Fenilpropanoid	132,16	Zhang vd. (2018)
4,924	294,16	Paclobutrazol (PBZ)	$C_{15}H_{20}ClN_3O$		293,80	Pu vd. (2018)
6,359	215,14	Metribuzin	$C_8H_{14}N_4OS$	Herbisid	214,9	Pérez-Ortega vd. (2012)
6,381	326,18	Benalaksil	$C_{20}H_{23}NO_3$	Fungisid	325,4	Pérez-Ortega vd. (2012)
7,284	535,32	Malvidin-3-O- asetilglukosit	$C_{25}H_{27}O_{13}^+$	Antosiyanin	535,5	Granato vd. (2018), Dipalmo vd. (2016)
8,205	208,13	Fenobucarb	$C_{12}H_{17}NO_2$	İnsektisid	207,27	Pérez-Ortega vd. (2012)
8,22	312,22	Kaftarik asit	$C_{13}H_{12}O_9$	Fenolik asit	312,22	Tkacza vd. (2019)
8,233	229,15	trans-Resveratrol	$C_{14}H_{12}O_3$	Polifenol	228,24	Da Silva vd. (2017), Ivanova-Petropulos vd. (2015)
8,281	579,15	Prosiyanidin B	$C_{30}H_{26}O_{12}$	B tipi proantosiyanidin	578,52	Zhang vd. (2018), Ivanova-Petropulos vd. (2015)
9,664	245,19	Piceatannol	$C_{14}H_{12}O_4$	Fenol	244,24	Arbulu vd. (2015), López-Gutiérrez vd. (2016)
9,694	493,13	Malvidin-3-O-monoglukosit	$C_{23}H_{25}O_{12}^+$	Antosiyanin	493,13	Flamini vd. (2015), Drosou vd. (2015)
12,819	609,16	Peonidin-3-O-p-kumarilmonoglukozit	$C_{31}H_{29}O_{13}$	Antosiyanin	609,16	Wang vd. (2017)
15,549	338,34	Bitertanol	$C_{20}H_{23}N_3O_2$	Fungisid	337,4	Pérez-Ortega vd. (2012)
15,566	369,35	Feruloil kinik asit	$C_{17}H_{20}O_9$	Kinik asit türevi	368,3	Larbat vd. (2014)

Tablo 3.12 Hardaliye örneklerinin *in vitro* sindirim öncesi metabolit profili (devamı)

Cabernet Sauvignon (C1)						
Rt (min)	**[M+H]+ (m/z)**	**Bileşen**	**Kapalı formül**	**Sınıf**	**Molekül ağırlığı**	**Referans(lar)**
2,289	104,11	Kolin	$C_5H_{14}NO$	B-kompleks vitamini	104,11	LC-MS kütüphane
2,388	127,04	Pirogallol / Pirogallik asit	$C_6H_6O_3$	Benzentriol izomeri	126,11	Arbulu vd. (2015)
2,506	116,070	L-Prolin	$C_5H_9NO_2$	Aminoasit	115,07	LC-MS kütüphane
3,758	130,05	Piroglutamik asit	$C_5H_7NO_3$	Aminoasit türevi	129,05	LC-MS kütüphane
4,826	187,06	a-L-Ramnoz	$C_6H_{12}O_5$	Deoksi şeker	164,07	LC-MS kütüphane
4,861	133,11	trans-Sinnamaldehit	C_9H_8O	Fenilpropanoid	132,16	Zhang vd. (2018)
5,135	132,10	L-Lösin	$C_6H_{13}NO_2$	Aminoasit	131,10	LC-MS kütüphane
6,162	231,09	Pro Asp	$C_9H_{14}N_2O_5$		230,09	LC-MS kütüphane
6,696	407,17	Arg Cys Glu	$C_{14}H_{26}N_6O_6S$	Tripeptid	406,17	LC-MS kütüphane
7,241	535,19	Malvidin-3-O-asetilglukosit	$C_{25}H_{27}O_{13}^+$	Antosiyanin	535,50	Granato vd. (2018), Dipalmo vd. (2016)
8,223	199,06	Sirinjik asit	$C_9H_{10}O_5$	Fenolik yapı (Dimetoksibenzen)	198,17	Longo vd. (2019),Barnaba vd. (2016)
8,229	208,13	Fenobucarb	$C_{12}H_{17}NO_2$	İnsektisid	207,27	Pérez-Ortega vd. (2012)
8,236	229,15	trans-Resveratrol	$C_{14}H_{12}O_3$	Polifenol	228,24	Da Silva vd. (2017) Ivanova-Petropulos vd. (2015)
8,63	312,22	Kaftarik asit	$C_{13}H_{12}O_9$	Fenolik asit	312,22	Tkacza vd. (2019)
8,697	579,15	Prosiyanidin B	$C_{30}H_{26}O_{12}$	B tipi proantosiyanidin	578,52	Zhang vd. (2018), Ivanova-Petropulos vd. (2015)
9,682	245,19	Piceatannol	$C_{14}H_{12}O_4$	Fenol	244,24	Arbulu vd. (2015), López-Gutiérrez vd. (2016)
9,695	493,13	Malvidin-3-O-monoglukosit	$C_{23}H_{25}O_{12}^+$	Antosiyanin	493,13	Flamini vd. (2015),Drosou vd. (2015)
9,767	496,26	Tyr Trp Lys	$C_{26}H_{33}N_5O_5$	Tripeptid	495,26	LC-MS kütüphane
10,446	757,24	Kaempferol 3-O-rutinosit-7-O-glukozit	$C_{33}H_{40}O_{20}$	Flavonoid glikozit	756,70	Larbat vd. (2014)
10,46	391,12	Piceid (Resveratrol-3-O-beta-D-glukopiranozit)	$C_{20}H_{22}O_8$	Fitoaleksin (Resveratrol türevi)	390,39	Serrano-Lourido vd. (2012), López-Gutiérrez vd. (2016)
15,55	338,34	Bitertanol	$C_{20}H_{23}N_3O_2$	Fungisid	337,40	Pérez-Ortega vd. (2012)
15,589	369,35	Feruloil kinik asit	$C_{17}H_{20}O_9$	Kinik asit türevi	368,30	Larbat vd. (2014)
16,793	301,14	Krizoeriol	$C_{16}H_{12}O_6$	Flavon (luteolin'in 3'-metoksi türevi)	300,26	Melo vd. (2016)

Tablo 3.13 Hardaliye örneklerinin *in vitro* sindirim sonrası metabolit profili

Shiraz (S2)						
Rt (min)	**[M+H]+ (m/z)**	**Bileşen**	**Kapalı formül**	**Sınıf**	**Molekül ağırlığı**	**Referans(lar)**
2,56	707,22	Malvidin-kumaroil-glukozit-pirüvik asit	$C_{35}H_{31}O_{16}^+$	Piranoflavonoid	707,00	De Villiers vd. (2011), Laitila vd. (2019)
2,765	291,05	Epikateşin	$C_{15}H_{14}O_6$	Flavonoid	290,27	Zhang vd. (2018), López-Gutiérrez vd. (2016)
2,811	275,07	Piloretin	$C_{15}H_{14}O_5$	Fenol (Dihidrokalkon)	274,27	Wang vd. (2017), Ehrhardt vd. (2014)
3,042	276,07	Ametoktradin	$C_{15}H_{25}N_5$	Fungisid	275,39	Pèrez-Mayán vd. (2018), López-Gutiérrez vd. (2016)
4,426	165,05	p-Kumarik asit	$C_9H_8O_3$	Hidroksisinnamik asit izomeri	164,16	Da Silva vd. (2017) López-Gutiérrez vd. (2016)
4,533	455,13	Viniferin	$C_{28}H_{22}O_6$	Stilbenoid (trans-Resveratrol dimeri)	454,47	Donato vd. (2016), Da Silva vd. (2017)
7,103	318,19	Ser Leu Val	$C_{14}H_{27}N_3O_5$	Tripeptid	317,19	LC-MS kütüphane
7,236	478,30	Arg Phe Arg	$C_{21}H_{35}N_9O_4$	Tripeptid	477,30	LC-MS kütüphane
8,241	419,31	Kaempferol-3-O-pentosit	$C_{20}H_{18}O_{10}$	Flavonol	418,30	Radenkovs vd. (2020) Kiselova-Kaneva vd. (2022)
8,344	229,15	trans-Resveratrol	$C_{14}H_{12}O_3$	Polifenol	228,24	Da Silva vd. (2017) Ivanova-Petropulos vd. (2015)
8,384	480,22	Mirisetin -3-O-galaktozit	$C_{21}H_{20}O_{13}$	Flavonoid	480,40	Tkacza vd. (2019)
8,699	479,27	Kuersetin-3-O-glukuronid	$C_{21}H_{18}O_{13}$	Flavonol glukuronid	478,00	Hilbert vd. (2015), Figueiredo-González vd. (2012)
9,239	344,25	Ile Val Ile	$C_{17}H_{33}N_3O_4$	Tripeptid	343,25	LC-MS kütüphane
9,629	493,13	Malvidin-3-O-monoglukosit	$C_{23}H_{25}O_{12}^+$	Antosiyanin	493,13	Flamini vd. (2015), Drosou vd. (2015)
9,701	433,22	Viteksin	$C_{21}H_{20}O_{10}$	Flavon glukozit	432,38	Zhang vd. (2018), López-Gutiérrez vd. (2016)
11,099	521,83	Petunidin-3-O-(6-O-asetil)glukosit	$C_{24}H_{25}O_{13}^+$	Antosiyanin	521,40	Samoticha vd. (2017), Figueiredo-González vd. (2012)
11,453	618,12	S- glutatyon -kaftarik asit	$C_{23}H_{27}N_3O_{15}S$	Fenolik bileşik	617,50	Longo vd. (2019), Pérez-Navarro vd. (2021)
15,673	517,31	Piran-malvidin-3-glukozit (vitisin B)	$C_{25}H_{25}O_{12}^+$	Piranoantosiyanin	517,45	Avizcuri vd. (2016), Ivanova-Petropulos vd. (2015)
15,701	535,32	Malvidin-3-O-asetilglukosit	$C_{25}H_{27}O_{13}^+$	Antosiyanin	535,50	Granato vd. (2018), Dipalmo vd. (2016)

Tablo 3.13 Hardaliye örneklerinin *in vitro* sindirim sonrası metabolit profili (devamı)

Merlot (M2)						
Rt (min)	**[M+H]+ (m/z)**	**Bileşen**	**Kapalı formül**	**Sınıf**	**Molekül ağırlığı**	**Referans(lar)**
2,339	707,22	Malvidin-kumaroil-glukozit-pirüvik asit	$C_{35}H_{31}O_{16}^+$	Piranoflavonoid	707,00	De Villiers vd. (2011), Laitila vd. (2019)
2,643	255,15	Chrysin	$C_{15}H_{10}O_4$	Dihidroksiflavon	254,24	López-Gutiérrez vd. (2016)
2,828	291,05	Epikateşin	$C_{15}H_{14}O_6$	Flavonoid	290,27	Zhang vd. (2018), López-Gutiérrez vd. (2016)
2,84	275,07	Piloretin	$C_{15}H_{14}O_5$	Fenol (Dihidrokalkon)	274,27	Wang vd. (2017), Ehrhardt vd. (2014)
3,026	343,23	Kafeik asit-O-glukosit	$C_{15}H_{18}O_9$	Fenolik glikozit	342,3	Radenkovs vd. (2020)
4,353	455,36	Viniferin	$C_{28}H_{22}O_6$	Stilbenoid (trans-Resveratrol dimeri)	454,47	Donato vd. (2016), Da Silva vd. (2017)
4,372	123,05	4-Etilfenol	$C_8H_{10}O$	İzomerik etilfenol	122,16	Barnaba vd. (2016)
4,401	165,05	p-Kumarik asit	$C_9H_8O_3$	Hidroksisinnamik asit izomeri	164,16	Da Silva vd. (2017), López-Gutiérrez vd. (2016)
4,893	133,11	trans-Sinnamaldehit	C_9H_8O	Fenilpropanoid	132,16	Zhang vd. (2018)
7,273	121,08	4-Vinilfenol	C_8H_8O	İzomerik vinilfenol	120,15	Barnaba vd. (2016)
8,185	208,13	Fenobucarb	$C_{12}H_{17}NO_2$	İnsektisid	207,27	Pérez-Ortega vd. (2012)
8,205	229,16	trans-Resveratrol	$C_{14}H_{12}O_3$	Polifenol	228,24	Da Silva vd. (2017), Ivanova-Petropulos vd. (2015)
8,223	419,22	Kaempferol-3-O-pentosit	$C_{20}H_{18}O_{10}$	Flavonol	418,3	Radenkovs vd. (2020), Kiselova-Kaneva vd. (2022)
8,682	479,27	Kuersetin 3-O-glukuronit	$C_{21}H_{18}O_{13}$	Flavonol glukuronid	478,00	Hilbert vd. (2015), Figueiredo-González vd. (2012)
9,557	245,18	Piceatannol	$C_{14}H_{12}O_4$	Fenol	244,24	Arbulu vd. (2015), López-Gutiérrez vd. (2016)
9,598	463,12	Peonidin-3-O-glukosit	$C_{22}H_{23}O_{11}^+$	Antosiyanin	463,41	Samoticha vd. (2017), Capanoglu vd. (2013)
9,643	493,13	Malvidin-3-O-monoglukosit	$C_{23}H_{25}O_{12}^+$	Antosiyanin	493,13	Flamini vd. (2015), Drosou vd. (2015)
10,451	391,23	Piceid (Resveratrol-3-O-beta-D-glukopiranozit)	$C_{20}H_{22}O_8$	Fitoaleksin (Resveratrol türevi)	390,39	Serrano-Lourido vd. (2012), López-Gutiérrez vd. (2016)
11,773	435,26	Kuersetin 3-O-arabinosit	$C_{20}H_{18}O_{11}$	Flavonoid	434,30	Blázovics vd. (2016), Kiselova-Kaneva vd. (2022)
15,728	517,31	Piran-malvidin-3-glukozit (vitisin B)	$C_{25}H_{25}O_{12}^+$	Piranoantosiyanin	517,45	Avizcuri vd. (2016), Ivanova-Petropulos vd. (2015)
15,797	535,32	Malvidin-3-O-asetilglukosit	$C_{25}H_{27}O_{13}^+$	Antosiyanin	535,50	Granato vd. (2018), Dipalmo vd. (2016)

Tablo 3.13 Hardaliye örneklerinin *in vitro* sindirim sonrası metabolit profili (devamı)

Cabernet Sauvignon (C2)						
Rt (min)	**[M+H]+ (m/z)**	**Bileşen**	**Kapalı formül**	**Sınıf**	**Molekül ağırlığı**	**Referans(lar)**
2,03	146,17	Spermidin	$C_7H_{19}N_3$	Poliamin bileşiği	145,17	LC-MS kütüphane
2,304	127,04	Pirogallol Pirogallik asit	$C_6H_6O_3$	Benzentriol izomeri	126,11	Arbulu vd. (2015)
2,534	707,22	Malvidin-kumaroil-glukozit-pirüvik asit	$C_{35}H_{31}O_{16}^+$	Pyranoflavonoid	707,00	De Villiers vd. (2011), Laitila vd. (2019)
2,633	255,15	Chrysin	$C_{15}H_{10}O_4$	Dihidroksiflavon	254,24	López-Gutiérrez vd. (2016)
2,698	116,07	L-Prolin	$C_5H_9NO_2$	Aminoasit	115,07	LC-MS kütüphane
2,863	275,07	Piloretin	$C_{15}H_{14}O_5$	Fenol(Dihidrokalkon)	274,27	Wang vd. (2017), Ehrhardt vd. (2014)
3,012	343,23	Kafeik asit-O-glukosit	$C_{15}H_{18}O_9$	Fenolik glikozit	342,3	Radenkovs vd. (2020)
3,049	118,09	L-Valin	$C_5H_{11}NO_2$	Aminoasit	117,09	LC-MS kütüphane
4,355	123,05	4-Etilfenol	$C_8H_{10}O$	İzomerik etilfenol	122,16	Barnaba vd. (2016)
4,378	165,05	p-Kumarik asit	$C_9H_8O_3$	Hidroksisinnamik asit izomeri	164,16	Da Silva vd. (2017), López-Gutiérrez vd. (2016)
4,892	133,11	trans-Sinnamaldehit	C_9H_8O	Fenilpropanoid	132,16	Zhang vd. (2018)
5,119	132,1	L-İzolösin	$C_6H_{13}NO_2$	Aminoasit	131,10	LC-MS kütüphane
7,257	121,08	4-Vinilfenol	C_8H_8O	İzomerik vinilfenol	120,15	Barnaba vd. (2016)
8,218	229,15	trans-Resveratrol	$C_{14}H_{12}O_3$	Polifenol	228,24	Da Silva vd. (2017), Ivanova-Petropulos vd. (2015)
8,237	419,31	Kaempferol-3-O-pentosit	$C_{20}H_{18}O_{10}$	Flavonol	418,30	Radenkovs vd. (2020), Kiselova-Kaneva vd. (2022)
8,283	391,12	Piceid (Resveratrol-3-O-beta-D-glukopiranozit)	$C_{20}H_{22}O_8$	Fitoaleksin (Resveratrol türevi)	390,39	Serrano-Lourido vd. (2012), López-Gutiérrez vd. (2016)
8,675	479,27	Kuersetin 3-O-glukuronit	$C_{21}H_{18}O_{13}$	Flavonol glukuronid	478,00	Hilbert vd. (2015), Figueiredo-González vd. (2012)
9,628	493,13	Malvidin-3-O-monoglukosit	$C_{23}H_{25}O_{12}^+$	Antosiyanin	493,13	Flamini vd. (2015), Drosou vd. (2015)
9,241	344,24	Ile Val Ile	$C_{17}H_{33}N_3O_4$	Tripeptid	343,24	LC-MS kütüphane
9,544	245,1862	Piceatannol	$C_{14}H_{12}O_4$	Fenol	244.24	Arbulu vd. (2015), López-Gutiérrez vd. (2016)
9,685	495,14	Mirisetin 3-O-glukuronit	$C_{21}H_{18}O_{14}$	Flavonoid	494,40	Hilbert vd. (2015), Pérez-Navarro vd. (2021)
15,724	517,31	Piran-malvidin-3-glukozit (vitisin B)	$C_{25}H_{25}O_{12}^+$	Piranoantosiyanin	517,45	Avizcuri vd. (2016), Ivanova-Petropulos vd. (2015)
15,747	535,32	Malvidin-3-O-asetilglukosit	$C_{25}H_{27}O_{13}^+$	Antosiyanin	535,50	Granato vd. (2018), Dipalmo vd. (2016)

3.10 Hardaliye Muamelesinin Et Ürünlerinde Malondialdehit (MDA) Değerine Etkisi

Sade ve içeceklerle (Shiraz, Merlot, Cabernet Sauvignon hardaliyeleri ve ayran, kola, şalgam suyu) muamele edilmiş et ürünlerinde (döner, köfte ve hamburger köftesi); *in vitro* sindirimden önce ve sonra lipid oksidasyon ürünü olan MDA miktarı belirlenmiş; hardaliyelerle muamelenin etkisi diğer içeceklerin etkisi ile karşılaştırılmıştır. Sonuçlar Tablo 3.14'de verilmiştir ($p<0,05$).

Tabloda görüldüğü gibi; döner örnekleri için başlangıçta en düşük değerler sade örneklerde belirlenmiş, içeceklerle muamele (5 g et örneği /15 mL içecek) edilmeleri ile MDA değeri yükselmiştir. Muamele edilmiş örnekler arasında başlangıçta en düşük değer 7,54±0,32 μg/100g ile D1+Şalgam suyu ve en yüksek değer 86,89±1,42 μg/100g ile D2+Shiraz örneğine aittir ($p<0,05$). Sade örneklerde sindirim sonrası MDA değeri artarken içeceklerle muamele edilmiş örneklerde bu değer azalmıştır (D3+Şalgam suyu hariç). Döner örneklerinin doymamış yağ asiti içeiği farklıdır. Doymamış yağ asiti içeiği en fazla olan D2 örneğinde başlangıç ve sindirim sonrası MDA değeri diğer örneklere göre daha yüksek bulunmuştur. Çalışmamız *in vitro* sindirim koşullarının MDA değerlerini başlangıça kıyasla, özellikle polifenolik bileşiklerin varlığında önemli ölçüde etkilediğini ortaya koymuştur. Hardaliye muamelesi yapılmış örneklerde sindirim sonrası en düşük MDA değeri 4,46±0,20 μg/100g ile D3+Merlot'da belirlensede en çarpıcı düşüş Shiraz hardaliyesiyle muamele edilmiş örneklerde görülmüştür (D1+Shiraz, D2+Shiraz ve D3+Shiraz için sırasıyla %89,72, %67,91 ve %88,26 azalma). Diğer içeceklerle muamele edilmiş örneklerin çoğunda, hardaliye muamelesi yapılmış örneklere kıyasla, sindirim sonrası MDA değerindeki azalmanın oranı daha küçük olmuştur (en endüşük 1,27±0,06 μg/100g ile D3+Ayran, en yüksek 23,03±1,04 μg/100g ile D1+Kola) ($p<0,05$).

MDA biyoerişilebilirlikleri incelendiğinde 10,27±0,05 ile D1+Shiraz en düşük ve 111,82±4,79 μg/100g ile D3+Şalgam suyu en yüksek değere sahip örnekler olmuştur. Diğer içcekler ile muamelenin de bu değeri düşürdüğü belirlenmiştir (D3+ Şalgam suyu hariç) ancak hardaliyelerin genel itibariyle daha etkili olduğu görülmüştür. Bütün döner örneklerinde en düşük MDA biyoerişilebilirliği hardaliye muameleli örneklerde belirlenmiştir.

Fenolik bileşiklerin stabilitesi ve antioksidan aktivitesi; pH, sıcaklık, gıda matrisi, çözücü-katı oranı ve sindirim enzimlerine bağlı olarak mide-bağırsak koşulları sırasında değişebilir (Tagliazucchi vd., 2010). Bir lipid oksidasyon ürünü olan MDA değerinin de belirlendiği ortamın antioksidan aktivite gösteren bileşiklerinin miktarından etkilenmesi olasıdır. Shiraz, Merlot ve Cabernet Sauvignon hardaliyelerinde *in vitro* sindirim sonrası antioksidan kapasite sindirim öncesi belirlenen değerden oldukça yüksektir. Dolayısıyla hardaliye örnekleri *in vitro* sindirim sonrası yüksek antioksidan kapasite biyoerişilebilirliği sergilemişlerdir. Bu durum hardaliye içecekleriyle muamele edilmiş örneklerde MDA biyoerişilebilirliğinin başlangıç değerine kıyasla düşük bulunmasını açıklar. Özellikle Shiraz hardaliyesinde *in vitro* sindirim sonrası antioksidan kapasite ve biyoaktif bileşenlerin biyoerişilebilirliği Merlot ve Cabernet Sauvignon hardaliyelerine kıyasla daha yüksektir. Bu durum ise Shiraz hardaliyesiyle muamelenin MDA biyoerişilebilirliğini azaltmada diğer hardaliyelerden daha etkili oluşunu açıklamaktadır.

Önceki çalışmalar, *in vitro* sindirim sırasında etlerde lipid peroksidasyonunu geciktirme etkinliğinin meyve, sebze, otlar ve baharatlardaki toplam fenolik miktarla güçlü bir şekilde ilişkili olduğunu; çeşitli *in vitro* ve *in vivo* raporlar polifenoller lifler, mineraller ve vitaminler gibi koruyucu bileşiklerin eklenmesiyle ve meyve, sebze, kırmızı şarap ve kahve gibi antioksidan bakımından zengin gıdaların, et ile aynı anda tüketildiğinde lipid peroksidasyonunun önlenebileceğini bildirmiştir (Kanner vd., 2017; Van Hecke vd., 2017; Gorelik vd., 2008; Hur vd., 2009; Pierre vd., 2013; Li vd., 2010; Martini vd., 2018). Bununla birlikte, yakın tarihli bir çalışmada, farklı moleküler yapılarından dolayı fenolik bileşiklerin lipid peroksidasyonunu inhibe edici aktivitelerinde farklılıkların olduğu kaydedilmiştir (Martini vd., 2019). Van Hecke vd. (2017) MDA seviyesini, pişirmeden önce otlarla muamelesi yapılan sığır etinde 2 kat; *in vitro* sindirim sırasında otlar eklenen örneklerde 2 ila 3 kat daha düşük tespit etmişlerdir. Martini vd. (2019) ise Akdeniz Diyeti salatası ile *in vitro* sindirime uğratılan hindi göğüs etinde lipid hidroperoksit üretiminin, eklenen salata miktarının artmasıyla büyük ölçüde azaldığını belirtmişlerdir. Martínez vd. (2014) hindi etlerine üzüm çekirdeği ekstraktı eklenmesinin,

başlangıçta ve *in vitro* sindirim sonrasında, sade örneklere kıyasla MDA seviyelerini azalttığını belirlemişledir. Sindirim sonrası görülen düşüşler sonuçlarımızla uyumludur.

Et ürünlerinin gastrointestinal sindirimi sırasında meydana gelebilen lipit oksidasyon ürünleri kolona geçebilir veya kan dolaşımına emilebilir ve bir dizi mekanizma yoluyla sağlığı olumsuz yönde etkileyebilir (Gorelik vd., 2008; Van Hecke vd., 2017). Bu nedenle et sindirimi sırasında lipit oksidasyonun oluşumunun önlenmesi, çeşitli kronik hastalıkların gelişme riskinin azaltılmasına katkıda bulunabilir (Chan vd., 2011; Micha vd., 2010).

Diğer bir et ürünü olan hamburger köftelerinin başlangıçta en düşük MDA değerleri sade örneklere ve en yüksek değerler ise Shiraz hardaliyesiyle muamele edilmiş örneklere aittir. *In vitro* sindirim sonrası sade ve diğer içeceklerle muamele edilmiş örneklerin bu değerinde artışlar veya küçük azalmalar tespit edilirken; hardaliyeler ile muamele edilmiş örneklerin MDA değerleri önemli derecede azalmıştır ($p<0,05$). Sindirim sonrası en düşük MDA değeri; diğer içeceklerle muamele edilmiş örnekler arasında 8,66±0,39 μg/100g ile H2+Ayran örneğine, hardaliyeler ile muamele edilmiş örnekler arasında 10,14±0,46 μg/100g ile H3+Merlot örneğine ait olsa da, bu aşamada en önemli azalmayı sağlayan yine Shiraz hardaliyesiyle muamele olmuştur. Shiraz hardaliyesi hamburger köftelerinin MDA seviyesini başlangıca kıyasla %56,32-77,59 arasında azaltmıştır.

Bu durumla uyumlu olarak en düşük MDA biyoerişilebilirliği H2+Shiraz ve H3+Shiraz örneklerinde belirlenmiştir (sırasıyla; 22,40±0,11 ve 22,59±0,12 μg/100g). Hardaliye ile muamele edilmiş örnekler arasında en yüksek biyoerişilebilirlik 71,03±0,97 μg/100g iken (H1+Merlot örneği); diğer içeceklerle muamele edilmiş örneklerin bu değerleri 92,03±2,12-134,74±5,73 μg/100g arasında değişen ve hardaliye muamelesi yapılmış örneklere göre oldukça yüksek değerlerde bulunmuştur ($p<0,05$).

Gıdaların gastrointestinal sindirimi sırasında çoklu doymamış yağ asitlerinin peroksidasyonu, lipid hidroperoksitler ve lipid oksidasyonu son ürünleri gibi insan sağlığını olumsuz yönde etkileyebilecek toksik bileşiklerin oluşumuna

neden olabilir, et lipidlerinin de pişirme ve gastrointestinal sindirim sırasında peroksidasyona karşı çok hassas olduğu belgelenmiştir (Sies vd., 2005; Perše, 2013; Nogueira vd., 2016; Vieira vd., 2017). Etlerin lipid oksidasyonuna duyarlılığı; etin kökenine, kas tipine, türüne, saklama koşullarına, hem-demir içeriği ve etin doğal antioksidan mekanizmaları gibi endojen faktörlere ve taşıma ve depolama sırasında sıcaklık, oksijen mevcudiyeti ve pH gibi dış faktörlere dayanır (Estevez, 2015).

Gorelik vd. (2008), on sağlıklı gönüllü ile gerçekleştirdikleri randomize, çapraz bir çalışmada, kırmızı şarap polifenollerinin tokluk plazma ve idrar MDA seviyeleri üzerindeki etkisini araştırmışlardır. Açlık plazma MDA seviyeleri ortalama 50 ± 20 nM olan gönüllülerin; farklı günlerde ısıtıldıktan sonra kırmızı şaraba batırılmış 250 gr ızgara hindi pirzolası ve 200 mL kırmızı şarap tükettikten sonra MDA emiliminde %75'lik bir azalma olduğunu ve ısıtmadan önce kırmızı şaraba batırılmış 250 gr ızgara hindi pirzolası ve 200 mL kırmızı şarap tükettikten sonra ise plazma MDA'sının yükselmesinin tamamen önlendiğini bildirmişlerdir. Gorelik vd. (2008)'nin gastrointestinal sistemdeki proteolitik enzimler ile kırmızı şarap polifenolleri arasında olası gördüğü etkileşim gibi bir etkileşim hardaliye polifenolleri ile de olabilir. Etin sindiriminde oksidatif reaksiyonları sınırlandırmak, tüketicilerin sağlığına büyük olasılıkla fayda sağlayacaktır. Garrido vd. (2011) üzüm posası ekstraktı eklenen burgerlerin TBARS değerlerinin kontrol burgerlerine kıyasla iki kat daha düşük olduğunu belirtmiştir. Sobral vd. (2020) sade, kekik ve bira eklenmiş çiğ tavuk eti burgerlerinin MDA değerlerini 2,3 ila 7,9 nmol/g et arasında tespit etmişler; fırında pişirme ve *in vitro* sindirim uygulandıktan sonra kekik eklenen örnekler hariç MDA değerinin arttığını, en düşük MDA değerinin kekik eklenen örneklere ait olduğunu belirlemişlerdir. Martini vd. (2021) hindi göğüs etine pişirmeden önce eklenen siyah, yeşil ve pembe biberlerin, *in vitro* sindirim sonunda lipid hidroperoksit oluşumunu sırasıyla %52, %22 ve %83.4 oranında inihbe ettiğini belirlemişlerdir.

Köfte örneklerinde, hamburger köftelerine benzer bir durum söz konusudur; başlangıçta en düşük MDA değeri 4,55±0,21 μg/100g ile K2/ KTL örneğine en yüksek değer ise 96,84±1,87 μg/100g ile K3+Shiraz örneğine aittir ($p<0,05$).

Doymamış yağ asiti içeriği en yüksek olan K3/KTL örneğinde diğer kontrol örneklerine kıyasla başlangıçta ve sindirim sonrası en yüksek MDA değeri belirlenmiştir. Gıdalarda yağ bileşimi de en önemli belirleyicilerden biridir, özellikle çoklu doymamış yağlar doymuş yağlardan daha fazla lipid peroksidasyonu riski taşır (Gumus ve Decker, 2021). Diğer içeceklerle muamele edilen örneklerin başlangıç değerleri, hardaliye muamelesi yapılmış örneklere kıyasla daha düşüktür ancak sindirim sonrası hardaliyelerin genel itibariyle MDA değerini düşürmede daha etkili olduğu görülmüştür. Sindirim sonrası; sade ve diğer içeceklerle muamele edilmiş örneklerin bu değerinde artış veya küçük azalmalar belirlenmiş, en düşük değer ise 2,24±0,10 μg/100g ile K2+Cabernet Sauvignon örneğinde tespit edilmiştir.

En düşük biyoerişilebilirlik, sindirim sonrası durumla uyumlu olarak 7,12±0,05 μg/100g ile K2+Cabernet Sauvignon örneğine aittir. Aynı hardaliye ile muamele edilmiş bir diğer köfte örneğinde ise biyoerişilebilirlik oldukça yüksektir (91,05±2,50 μg/100g ile K3+Cabernet Sauvignon) ve benzer bir durum Shiraz hardaliyesiyle muamele edilmiş köfte örneklerinde de belirlenmiştir (K2+Shiraz için 12,83±0,04 μg/100g ve K3+Shiraz için 60,38±1,16 μg/100g) ($p<0,05$). Bu, MDA biyoerişilebilirliği üzerinde et örneğine uygulanan muamelenin yanı sıra başlangıç MDA seviyesininde etkili bir faktör olduğunu göstermektedir. Araştırmalar, gıda lipidlerinin başlangıçtaki oksidatif durumunun, sindirim sırasında devam eden oksidatif reaksiyonları büyük ölçüde etkilediğini göstermiştir (Nieva-Echevarría vd., 2020). Köfte örneklerinde biyoerişilebilirliği azaltmada diğer içeceklere kıyasla hardaliye içecekleri daha etkili olmuştur.

Önceki çalışmalarda çok sayıda yazar üzüm polifenollerinin, kas yapısındaki gıdalara güçlü antioksidan etkisinden bahsetmiştir (domuz eti: Carpenter vd. (2007), O'Grady vd. (2008); sığır eti: Rojas vd. (2007), Rojas vd. (2008); kümes hayvanları: Brannan vd. (2009), Mielnik vd. (2006), Sayago-Ayerdi vd. (2009)). Alnoumani vd. (2017); kurutulmuş Agaricus bisporus tozunun eklendiği pişmiş kıyma örneklerinin tuzlanmış kontrol örneklerine kıyasla %66-96 daha düşük MDA'ya sahip olduğunu belirlemişlerdir. Kanner vd. (2017) salata ile etin (274 gr salata/200 gr et) *in vitro* gastrik sindiriminden sonra MDA oluşumunda yaklaşık %90'lık bir inhibisyon bildirmiştir. Kim ve Hur (2018) 100 °C'de

kurutulan domates tozu eklenerek hazırlanmış domuz köftelerinde TBARS değerlerinin *in vitro* sindirim sırasında azaldığını belirlemişlerdir. Antonini vd. (2019) burgerlere goji püresi ve chia tohumu eklenmesiyle MDA değerlerinde önemli azalmalar belirlemişlerdir. Arslan (2019) çiğ ve pişmiş dana etinden yapılan köftelere eklenen üzüm çekirdeği tozunun, lipit oksidasyonuna etkisini belirlemiştir. çiğ dana etinden yapılan köftelere depolama uygulamasının 1. ve 3. gününde TBARS değerini en yüksek üzüm çekirdeği tozu eklenmemiş ve en düşük %8 oranında üzüm çekirdeği tozu içeren köftelerde tespit etmiştir. Pişmiş dana etinden yapılan köftelere depolamanın ilk günü en yüksek TBARS değerini üzüm çekirdeği tozu eklenmemiş (1,88±0,06 mg MDA/kg kuru ağırlık) ve en düşü TBARS değerini %8 oranında üzüm çekirdeği tozu eklenmiş (1,23±0,32 mg MDA/kg kuru ağırlık) köftelerde; depolamanın 30. gününde en yüksek TBARS değerini üzüm çekirdeği tozu eklenmemiş (5,76±0,24 mg MDA/kg kuru ağırlık) ve en düşü TBARS değerini %8 oranında üzüm çekirdeği tozu eklenmiş (1,27±0,11 mg MDA/kg kuru ağırlık) köftelerde belirlemiştir.

Literatürde sindirim sırasında meydana gelen oksidatif süreçler nedeniyle lipid peroksidasyonun arttığı belirtilmektedir ki bu durum çalışmamızda sindirim uygulanmış sade (kontrol) et ürünlerinin çoğunda gerçekleşen artış ile uyumludur. Midede meydana gelen kimyasal reaksiyonlar ve mide sıvısının asidik pH'ı ile ilişkili lipid oksidasyon amplifikasyonu, lipid oksidasyonunun artmasından sorumlu olabilir. Kan dolaşımına ulaşan besinlerin kalitesi ve sağlığa etkileri tüketilen etin sindirimi sırasında maruz olduğu fizyolojik sürece ve bu sürecin kimyasal koşullarına bağlıdır (Sobral vd., 2020). Bu nedenle lipid oksidasyonu sürecinin gelişme ihtimali olan gıdaların hazırlanmasında veya tüketilmesi sırsında polifenolce zengin, antioksidan aktivite gösteren bileşikleri içeren meyve, sebze ve bunlardan türetilen içecekler gibi gıdaların veya tamamlayıcı gıda bileşenlerinin kullanılması etkin bir yol olarak görünmektedir.

Tablo 3,14 Hardaliye ve diğer içeceklerle muamele edilmiş et ürünlerinde MDA (μg/100g) değerleri

Döner+Muamele	Başlangıç (μg/100g)	Sindirim (μg/100g)	Biyoerişilebilirlik (%)
D1/KTL	7,00±0,32^{f}	9,97±0,45^{a}	142,71±6,50^{a}
Hardaliye Örnekleri			
D1+Shiraz	62,50±0,31^{a}	6,42±0,29^{d}	10,27±0,05^{g}
D1+Merlot	24,91±0,30^{c}	9,56±0,43^{a}	38,37±0,49^{e}
D1+Cabernet S.	33,97±0,32^{b}	7,85±0,36^{b}	23,12±0,22^{f}
Diğer İçecekler			
D1+Ayran	8,35±0,32^{e}	6,94±0,31^{cd}	83,21±3,17^{c}
D1+Şalgam	7,54±0,33^{f}	7,25±0,33^{bc}	96,19±4,06^{b}
D1+Kola	14,81±0,32^{d}	7,11±0,32^{c}	48,05±1,03^{d}
D2/KTL	31,39±1,42^{e}	31,85±0,99^{c}	101,46±3,17^{b}
Hardaliye Örnekleri			
D2+Shiraz	86,89±1,42^{a}	27,88±1,26^{b}	32,08±0,52^{e}
D2+Merlot	49,31±1,41^{c}	14,64±0,66^{d}	29,72±0,86^{e}
D2+Cabernet S.	58,36±1,42^{b}	48,31±2,19^{a}	82,81±2,02^{a}
Diğer İçecekler			
D2+Ayran	32,75±1,42^{e}	10,10±0,46^{e}	30,88±1,35^{e}
D2+Şalgam	31,94±1,40^{e}	16,03±0,73^{d}	50,24±2,25^{d}
D2+Kola	39,20±1,42^{d}	23,03±1,04^{c}	58,80±2,14^{c}
D3/KTL	8,86±0,40^{f}	11,74±0,53^{b}	132,67±6,04^{a}
Hardaliye Örnekleri			
D3+Shiraz	64,36±0,42^{a}	7,55±0,34^{d}	11,73±0,07^{e}
D3+Merlot	26,78±0,40^{c}	4,46±0,20^{e}	16,66±0,25^{e}
D3+Cabernet S.	35,83±0,41^{b}	15,37±0,70^{a}	42,90±0,48^{d}
Diğer İçecekler			
D3+Ayran	10,21±0,40^{e}	10,27±0,06^{f}	100,58±0,49^{e}
D3+Şalgam	9,41±0,43^{f}	10,51±0,48^{c}	111,82±4,79^{b}
D3+Kola	16,67±0,40^{d}	11,37±0,51^{b}	68,20±1,65^{c}

Aynı et örneğine uygulanan muamelelerin farklı harflerle gösterilen ortalamaları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (ANOVA, Tukey's test, $p < 0,05$). D1, D2, D3: farklı marka et dönerler; KTL: kontrol; +Shiraz: Shiraz hardaliye muamelesi; +Merlot: Merlot hardaliye muamelesi; +Cabernet S.: Cabernet Sauvignon hardaliye muamelesi; +Ayran: Ayran muamelesi; +Şalgam: Şalgam muamelesi; +Kola: Kola muamelesi

Tablo 3.14 Hardaliye ve diğer içeceklerle muamele edilmiş et ürünlerinde MDA (μg/100g) değerleri (devamı)

Hamburger köftesi + Muamele	Başlangıç (μg/100g)	Sindirim (μg/100g)	Biyoerişilebilirlik (%)
H1/KTL	7,74±0,35^{e}	8,46±0,38^{e}	109,47±4,98^{bc}
Hardaliye Örnekleri			
H1+Shiraz	63,24±0,35^{a}	27,62±1,25^{a}	43,67±0,24^{f}
H1+Merlot	25,65±0,36^{b}	18,22±0,82^{b}	71,03±0,97^{d}
H1+Cabernet S.	34,71±0,35^{b}	18,98±0,86^{b}	54,67±0,55^{e}
Diğer İçecekler			
H1+Ayran	9,09±0,35^{d}	10,53±0,48^{d}	115,92±4,49^{b}
H1+Şalgam	8,29±0,34^{d}	11,15±0,50^{d}	134,74±5,73^{a}
H1+Kola	15,55±0,35^{c}	16,29±0,74^{c}	104,79±2,37^{c}
H2/KTL	7,13±0,32^{f}	7,23±0,28^{e}	101,40±3,98^{c}
Hardaliye Örnekleri			
H2+Shiraz	62,63±0,32^{a}	14,03±0,63^{b}	22,40±0,11^{f}
H2+Merlot	25,04±0,33^{c}	15,13±0,68^{a}	60,44±0,78^{d}
H2+Cabernet S.	34,10±0,32^{b}	12,32±0,56^{c}	36,13±0,34^{e}
Diğer İçecekler			
H2+Ayran	8,48±0,32^{e}	8,66±0,39^{d}	102,18±3,91^{b}
H2+Şalgam	7,68±0,34^{f}	9,54±0,43^{d}	124,45±5,26^{a}
H2+Kola	14,94±0,32^{d}	14,61±0,66^{ab}	97,82±2,12^{b}
H3/KTL	8,08±0,37^{f}	10,59±0,48^{d}	131,29±5,98^{a}
Hardaliye Örnekleri			
H3+Shiraz	63,58±0,36^{a}	14,36±0,65^{b}	22,59±0,12^{e}
H3+Merlot	25,99±0,37^{c}	10,14±0,46^{d}	39,00±0,55^{d}
H3+Cabernet S.	35,05±0,37^{b}	18,30±0,83^{a}	52,20±0,55^{c}
Diğer İçecekler			
H3+Ayran	9,43±0,37^{e}	11,74±0,53^{c}	124,66±4,86^{a}
H3+Şalgam	8,63±0,34^{f}	10,73±0,49^{cd}	124,50±5,31^{a}
H3+Kola	15,89±0,36^{d}	14,62±0,66^{b}	92,03±2,12^{b}

Aynı et örneğine uygulanan muamelelerin farklı harflerle gösterilen ortalamaları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (ANOVA, Tukey's test, $p < 0,05$). H1, H2, H3: farklı marka hamburger köfteleri; KTL: kontrol; +Shiraz: Shiraz hardaliye muamelesi; +Merlot: Merlot hardaliye muamelesi; +Cabernet S.: Cabernet Sauvignon hardaliye muamelesi; +Ayran: Ayran muamelesi; +Şalgam: Şalgam muamelesi; +Kola: Kola muamelesi

Tablo 3.14 Hardaliye ve diğer içeceklerle muamele edilmiş et ürünlerinde MDA (μg/100g) değerleri (devamı)

Köfte+Muamele	Başlangıç (μg/100g)	Sindirim (μg/100g)	Biyoerişilebilirlik (%)
K1/KTL	9,12±0,45^{f}	9,84±0,41^{e}	107,89±4,22^{a}
Hardaliye Örnekleri			
K1+Shiraz	65,34±0,44^{a}	16,97±0,77^{a}	25,96±0,17^{f}
K1+Merlot	27,76±0,45^{c}	16,00±0,72^{ab}	57,64±0,93^{d}
K1+Cabernet S.	36,81±0,43^{b}	15,06±0,68^{b}	40,92±0,50^{e}
Diğer İçecekler			
K1+Ayran	11,19±0,45^{e}	10,24±0,46^{de}	91,62±3,66^{b}
K1+Şalgam	10,39±0,44^{ef}	10,50±0,48^{d}	101,20±4,36^{b}
K1+Kola	17,65±0,45^{d}	13,41±0,61^{c}	76,00±1,92^{c}
K2/KTL	4,55±0,21^{g}	6,61±0,30^{c}	145,35±6,62^{a}
Hardaliye Örnekleri			
K2+Shiraz	60,05±0,20^{a}	7,71±0,35^{b}	12,83±0,04^{f}
K2+Merlot	22,47±0,21^{c}	6,15±0,28^{cd}	27,37±0,25^{e}
K2+Cabernet S.	31,52±0,21^{b}	2,24±0,10^{e}	7,12±0,05^{f}
Diğer İçecekler			
K2+Ayran	5,90±0,20^{e}	6,15±0,28^{cd}	104,26±3,65^{c}
K2+Şalgam	5,10±0,21^{f}	5,89±0,27^{d}	115,61±4,70^{b}
K2+Kola	12,36±0,23^{d}	9,02±0,41^{a}	72,99±1,22^{d}
K3/KTL	41,34±1,87^{e}	59,86±2,71^{b}	145,01±6,60^{a}
Hardaliye Örnekleri			
K3+Shiraz	96,84±1,87^{a}	58,46±2,64^{b}	60,38±1,16^{e}
K3+Merlot	59,25±1,87^{c}	31,82±1,44^{d}	53,74±1,70^{e}
K3+Cabernet S.	68,30±1,87^{b}	62,16±2,81^{ab}	91,05±2,50^{d}
Diğer İçecekler			
K3+Ayran	42,69±1,86^{e}	35,92±1,63^{d}	84,26±3,71^{d}
K3+Şalgam	41,88±1,87^{e}	43,01±1,95^{c}	102,82±4,62^{c}
K3+Kola	49,15±1,86^{d}	66,09±2,99^{a}	134,61±5,15^{b}

Aynı et örneğine uygulanan muamelelerin farklı harflerle gösterilen ortalamaları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (ANOVA, Tukey's test, $p < 0,05$). M1, M2, M3: farklı marka köfteler; KTL: kontrol; +Shiraz: Shiraz hardaliye muamelesi; +Merlot: Merlot hardaliye muamelesi; +Cabernet S.: Cabernet Sauvignon hardaliye muamelesi; +Ayran: Ayran muamelesi; +Şalgam: Şalgam muamelesi; +Kola: Kola muamelesi

4
SONUÇ VE ÖNERİLER

Tez kapsamında Shiraz, Merlot ve Cabernet Sauvignon üzüm çeşitileriyle üç farklı hardaliye tekerrürlü olarak, spontan fermentasyon ile, geleneksel üretim tekniği uygulanarak üretilmiştir. Altı hafta süren üretim periyodunun ardından çalışma kapsamında belirlenen analizlere başlanmıştır. Örneklerin pH, toplam asitlik, kuru madde, renk, alkol, toplam şeker ve invert şeker analizleri yapılmıştır. Ayrıca mikrobiyolojik içeriklerinin tespiti için laktik asit bakterisi, maya ve küf sayımı yapılmıştır. Hardaliye örneklerinin uçucu bileşen profileri belirlenerek farklılıklar ortaya koyulmuştur. Çalışmada hardaliye örneklerini biyoaktif bileşenler açısından incelemek ve *in vitro* sindirimin biyoaktif bileşenlerin miktarı ve biyoerişilebilirliği üzerine etkisini tespit etmek amacıyla, sindirim öncesi ve sonrası toplam fenolik madde, toplam flavonoid madde, toplam monomerik antosiyanin miktarı ve toplam antioksidan aktivite (CUPRAC ve DPPH yöntemleriyle) analizleri yapılmış ve sonuçlar yorumlanmıştır. Hardaliyelerin *in vitro* sindirim öncesi ve sonrası, başta fenolik yapıya sahip bileşenler olmak üzere, metabolit profillerini metabolomik bir bakış açısıyla değerlendirmek için HPLC sistemiyle hedefli fenolik bileşiklerin profili analizi ve LC-QTOF-MS sistemiyle hedefsiz metabolit profili analizi yapılmıştır. Hardaliye biyoaktif bileşenlerinin sahip oldukları antioksidan kapasiteyle lipit peroksidasyonunu engelleyebilme kabiliyetlerini tespit etmek amacıyla, hardaliye muamelesi yapılmış et ürünlerinde *in vitro* sindirimden önce ve sonra lipid oksidasyon ürünü olan MDA miktarı belirlenmiş; hardaliyelerle muamelenin etkisi diğer bazı içeceklerin etkisi ile karşılaştırılmıştır. Çalışma kapsamında ulaşılan bazı sonuçlar şöyledir:

- Hardaliye örnekleri arasında toplam fenolik madde, tolam flavonoid madde ve toplam monomerik antosiyanin miktarları en düşük Shiraz hardaliye ekstraktlarında belirlenmiş, benzer durum antioksidan kapasite analizi sonuçlarında da tespit edilmiştir ($p<0.05$). Aynı analizler için (toplam

monomerik antosiyanin miktarları hariç) en yüksek değerler ise Merlot hardaliye ekstraklarına ait bulunmuştur.

- Hardaliye örneklerine uygulanan *in vitro* sindirim sonrası, sindirim ekstraktlarında toplam fenolik madde, tolam flavonoid madde ve toplam monomerik antosiyanin miktarlarının sindirim öncesine kıyasla önemli ölçüde azaldığı belirlenmiştir. Bu durum sindirimin her aşaması (ağız, mide, bağırsak) ve üç hardaliye çeşiti içinde geçerlidir. CUPRAC antioksidan kapasite değeri için *in vitro* sindirim sonrası değişim yine azalma yönünde olurken, DPPH antioksidan kapasite değeri için bu değişim artış yönünde olmuştur.

- Sindirim sürecini yorumlamada önemli bir parameter olan % Biyoerişilebilirlik, yukarıda sıralanan her analiz için hesaplanmıştır. Merlot ve Cabernet Sauvignon hardaliyeleri biyoerişilebilirlik açısından benzer sonuçlar vererek önemli derecede farklılaşmazken ($p>0,05$); Shiraz hardaliyesi diğer hardaliyelerden önemli drecede farklılaşarak ($p<0,05$) en yüksek biyoerişilebilirlik derğerlerine sahip hardaliye olmuştur.

- Örneklerin *in vitro* glisemik indeks değeri kontrol beyaz ekmeğe kıyasla önemli derecede daha yüksek ($p<0,05$) bulunurken, hardaliye örneklerinin bu değerleri önemli derecede farklılaşmayarak ($p>0,05$) biribirine oldukça yakın bulunmuştur. *In vitro* çalışmalar canlı organizmada gelişen süreçler hakkında fikir sahibi olmayı sağlasa da ileriki araştırmalarda sonuçların *in vivo* çalışmalar ile desteklenmesi önerilmektedir.

- Çalışmada *in vitro* sindirim öncesi ve sonrasında hardaliyelerin hedefli fenolik bileşiklerinin profilleri kalitatif açıdan benzerlik göstermiştir. Sindirim öncesi hardaliyelerin hepsinde aynı çeşit, 7'si antosiyanin sınıfına ait 13 fenolik yapı belirlenmiş ancak sindirim sonrası; Merlot hardaliyesinde 12, Shiraz ve Cabernet Sauvignon hardaliyelerinde 10 fenolik bileşen tespit edilmiştir. Antosiyanin sınıfına ait bir bileşik olan Malvidin-3-O-glikozit klorit sindirim öncesi ve sonrası üç hardaliye örneğinde de en yüksek miktarda tespit edilmiş fenolik bileşendir. *In vitro* sindirim koşulları sonrası bireysel fenoliklerin miktarlarında, farklı bileşenlerin bu durumdan farklı oranlarda etkilenmiş olmasıyla birlikte, genel itibariyle azalma görülmüştür. Ancak Shiraz

hardaliyesinin 1, Merlot ve Cabernet Sauvignon hardaliyelerinin 3 fenolik bileşeninde sindirim sonrası artış belirlenmiştir. Bireysel fenoliklerin toplam biyoerişilebilirlikleri, önceki biyoerişilebilirlik sonuçlarıyla uyumlu olarak, en yüksek Shiraz hardaliyesinde tespit edilmiştir. Genel itibariyle bireysel fenoliklerin, *in vitro* sindirim öncesi ve sonrası miktarları ile biyoerişilebilirlikleri, üzüm çeşitine bağlı olatak farklılık göstermiştir. Bununla birlikte başta antosiyaninler olmak üzere, hardaliye fenolik bileşenlerinin, mikrobiyal metabolizmasınında araştırılması önemlidir, çünkü bu bileşiklerin bağırsak mikroflorasındaki değişimi, tüketimleri ile ilişkili biyoaktivitelerinin anlaşılmasına yardımcı olacaktır. Ayrıca fenolik bileşenlerin biyoerişilebilirliklerini ve biyoyararlanımlarını belirleyen sindirim sistemindeki kaderlerini ileride yapılacak *in vivo* çalışmlarla desteklemek önemli görülmektedir.

- Hardaliye ve sindirim örneklerinin metabolit profilleri hedeflenmemiş yaklaşım ile kalitatif olarak belirlenmiştir. Analiz sonrası belirlenen kütleler arasından toplamda 59 farklı metabolit tanımlanmıştır. Hem *in vitro* sindirim öncesi hemde sonrasında belirlenen metabolitlerin büyük çoğunluğu fenolik yapıda bileşenlerdir. Analizi yapılan örneklerin tamamında, antasiyanin olan Malvidin-3-O-monoglucoside ve stilbenoid olan trans-Resveratrol belirlenmiştir. *In vitro* sindirim etkisiyle metabolit profilinde en yüksek oranda değişim Shiraz hardaliyesinde en az değişim ise Cabernet Sauvignon hardaliyesinde tespit edilmiştir. Sindirim öncesi ve sonrası metabolit profil bakımından birbirine en benzer örnekler M1 / C1 ve M2 / C2 örnekleridir. Yapılan çalışmada elde edilmiş sonuçlar ile hardaliyede bulunabilecek metabolit sınıflarını aydınlatan bilimsel veriler sağlanmıştır. Ileriki çalışmalar belirlenen metabolit sınıflarına dair, daha ayrıntılı ve kapsamlı veriler elde etmeye yönelik yürütülebilir. Ayrıca analiz genel bir profil çıkarmaya yönelik yapıldığından, organik moleküllerin genel itibariyle daha çok iyonlaştığı pozitif iyon modunda yürütülmüştür. Daha sonraki çalışmalarda, araştırılmak istenen metabolit sınıfı göz önüne alınarak, örneklere ekstraksiyon gibi ön işlemler uygulanabilir, çalışma farklı iyon modlarında tekrarlanarak daha geniş bir metabolit profili elde edilebilir. Ayrıca, tercihen kantitatif ve hedefli analizlere başvurulabilir.

• Gıdaların hazırlanması ve tüketilmesi sırasında gelişebilen lipit oksidasyonu üzerine hardaliyenin etkisini göstermek amacıyla üç farklı et ürünüyle hardaliyeler muamele edilerek *in vitro* sindirime tabi tutulmuştur. Hardaliyenin bu etkinliğini mukayeseli bir şekilde yorumlayabilmek adına, aynı muameleler üç farklı içecek ilede tekrarlanmıştır. Sindirim sonrası en düşük MDA değerleri; +Shiraz, +Ayran, +Merlot ve +Cabernet S. muamelesi yapılmış örneklerde belirlenmiştir. En düşük MDA biyoerişilebilirlikleri ise döner ve hamburger ürünlerinin tamamında ve köfte ürünlerinin ikisi için, Shiraz muamelesi yapılmış örneklerde tespit edilmiştir. Shiraz hardaliyenin Merlot ve Cabernet Sauvignon hardaliyelerine kıyasla daha yüksek fenolik, flavonoid, antosiyanin ve antioksidan kapasite biyoerişilebilirliğine sahip olması bu durumu açıklar. Buna ek olarak örneklerin tamamında hardaliye muamelesinin MDA biyoerişilebilirliğini düşürmede diğer içeceklere kıyasla önemli derecede ($p<0,05$) daha etkili olduğu görülmüştür.

Hardaliyelerin; biyoaktif bileşenleri, metabolit profili ve lipid oksidasyonundaki etkinliği gibi antioksidan özellikleri, *in vitro* sindirim koşulları çerçevesinde değerlendirilerek, literatüre hardaliyenin potansiyel sağlık yararlarına ışık tutan bilimsel bilgi sağlanmıştır.

KAYNAKÇA

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

Acosta-Estrada, B. A., Gutiérrez-Uribe, J. A., & Serna-Saldívar, S. O. (2014). Bound phenolics in foods, a review. *Food Chemistry*, 152, 46–55.

Adamski, J. (2020). Introduction to metabolomics. *Metabolomics for Biomedical Research*, 1–15.

Ahad, T., & Nissar, J. (2017). Metabolomic and its approach in food science. *The Pharma Innovation Journal*, 6, 745-756.

Alencar, N. M. M., Cazarin, C. B. B., Corrêa, L. C., Maróstica Junior, M. R., Biasoto, A. C. T., & Behrens, J. H. (2017). Influence of maceration time on phenolic compounds and antioxidant activity of the Syrah must and wine. *Journal of Food Biochemistry*, 42(2), e12471.

Alnoumani, H., Ataman, Z. A., & Were, L. (2017). Lipid and protein antioxidant capacity of dried Agaricus bisporus in salted cooked ground beef. *Meat Science*, 129, 9–19.

Alongi, M., Melchior, S., & Anese, M. (2018). Reducing the glycemic index of short dough biscuits by using apple pomace as a functional ingredient. *LWT*, 100, 300–305.

Altay, F. (2013). Physicochemical properties of hardaliye. In Proceedings of the 2nd International Symposium on Traditional Foods from Adriatic to Caucasus, Struga (Ohrid Lake), Macedonia, 24–26 October.

Amoutzopoulos, B. (2013). *Sağlıklı bireylerde geleneksel üzüm içeceği hardaliyenin serum antioksidan ve biyokimyasal parametreler üzerine etkisi*. Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Ankara.

Amoutzopoulos, B., Löker, G. B., Samur, G., Çevikkalp, S. A., Yaman, M., Köse, T., & Pelvan, E. (2013). Effects of a traditional fermented grape-based drink "hardaliye" on antioxidant status of healthy adults: a randomized controlled clinical trial. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93(14), 3604–3610.

Anderson, J. W., Weiter, K. M., Christian, A. L., Ritchey, M. B., & Bays, H. E. (2014). Raisins compared with other snack effects on glycemia and blood pressure: a randomized, controlled trial. *Postgraduate medicine*, 126(1), 37–43.

Anonymous, (2001). Yeasts, molds and mycotoxins. FDA Bacteriological Analytical Manual, Chapter 18.

Antonini, E., Torri, L., Piochi, M., Cabrino, G., Meli, M. A., & De Bellis, R. (2019). Nutritional, antioxidant and sensory properties of functional beef

burgers formulated with chia seeds and goji puree, before and after *in vitro* digestion. *Meat Science*, 108021.

Apak, R., Guçlu, K., Ozyurek, M., & Kardemir, S.E. (2004). Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamin C and E using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuprione: CUPRAC method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52, 7970-7981.

Arbulu, M., Sampedro, M. C., Gómez-Caballero, A., Goicolea, M. A., & Barrio, R. J. (2015). Untargeted metabolomic analysis using Liquid Chromatography Quadrupole Time-Of-Flight Mass Spectrometry for non-volatile profiling of wines. *Analytica Chimica Acta*, 858, 32–41.

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

Arslan, M. (2019). *Üzüm çekirdeği tozunun çiğ ve pişmiş dana eti köftelerde antioksidan kapasite ve lipit oksidasyonuna etkisi*. Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Ankara.

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

Avizcuri, J.-M., Sáenz-Navajas, M.-P., Echávarri, J.-F., Ferreira, V., & Fernández-Zurbano, P. (2016). Evaluation of the impact of initial red wine composition on changes in color and anthocyanin content during bottle storage. *Food Chemistry*, 213, 123–134.

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

Banini, A. E., Boyd, L. C., Allen, J. C., Allen, H. G., & Sauls, D. L. (2019). Muscadine grape products intake, diet and blood constituents of non-diabetic and type 2 diabetic subjects. *Nutrition*, 22(11-12):1137-45.

Bantle, A. E., Thomas, W., & Bantle, J. P. (2008). Metabolic effects of alcohol in the form of wine in persons with type 2 diabetes mellitus. *Metabolism*, 57(2), 241–245.

Barak, T. H., Celep, E., İnan, Y., & Yesilada, E. (2019). Influence of in vitro human digestion on the bioavailability of phenolic content and antioxidant activity of *Viburnum opulus L*. (European cranberry) fruit extracts. *Industrial Crops and Products*, 131, 62–69.

Barba, F. J., Esteve, M. J., & Frigola, A. (2014). Bioactive components from leaf vegetable products. *Studies in Natural Products Chemistry*, 41, 321–346.

Barba, F. J., Mariutti, L. R. B., Bragagnolo, N., Mercadante, A. Z., Barbosa-Cánovas, G. V., & Orlien, V. (2017). Bioaccessibility of bioactive compounds from fruits and vegetables after thermal and nonthermal processing. *Trends in Food Science and Technology*, 67, 195–206.

Barnaba, C., Dellacassa, E., Nicolini, G., Nardin, T., Malacarne, M., & Larcher, R. (2016). Free and glycosylated simple phenol profiling in Apulian Italian wines. *Food Chemistry*, 206, 260–266.

Başyiğit Kılıç, G., Ağdaş, K. , Karahan, A. G. & Çakmakçı, M. L. (2016). Effect of lactobacillus plantarum ak4-11 and different grape varieties on the properties of hardaliye . *Journal of Agricultural Sciences* , 22 (4) , 512-521.

Bayram, B., González-Sarrías, A., Istas, G., Garcia-Aloy, M., Morand, C., Tuohy, K., García-Villalba, R., & Mena, P. (2018). Breakthroughs in the Health Effects of Plant Food Bioactives: A Perspective on Microbiomics, Nutri(epi)genomics, and Metabolomics. *Journal of agricultural and food chemistry*, 66(41), 10686–10692.

Bays, H. E., Schmitz, K., Christian, A., Ritchey, M., & Anderson, J. (2012). Raisins and blood pressure: A randomized, controlled trial. *Journal of the American College of Cardiology*, 59(13), E1721.

Begou, O., Gika, H. G., Wilson, I. D., & Theodoridis, G. (2017). Hyphenated MS-based targeted approaches in metabolomics. *The Analyst*, 142, 3079–3100.

Benzie, I. F. F., & Strain, J. J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "Antioxidant Power": The FRAP Assay. *Analytical Biochemistry*, 239(1), 70–76.

Beres, C., Freitas, S. P., Godoy, R. L. de O., de Oliveira, D. C. R., Deliza, R., Iacomini, M., …& Cabral, L. M. C. (2019). Antioxidant dietary fibre from grape pomace flour or extract: Does it make any difference on the nutritional and functional value? *Journal of Functional Foods*, 56, 276–285.

Bermudez-Soto, M.J., Tomás-Barberán, F.A., & García-Conesa, M.T. (2007). Stability of polyphenols in chokeberry (Aronia melanocarpa) subjected to *in vitro* gastric and pancreatic digestion. *Food Chemistry*, 102, 865–874.

Bertolín, J.R., Joy, M., & Blanco M. (2019). Malondialdehyde determination in raw and processed meat products by UPLC-DAD and UPLC-FLD. *Food Chemistry*, 298, 125009.

Bino, R. J., Hall, R. D., Fiehn, O., Kopka, J., Saito, K., Draper, J., Nikolau, B. J., Mendes, P., Roessner-Tunali, U., Beale, M. H., Trethewey, R. N., Lange, B. M., Wurtele, E. S., & Sumner, L. W. (2004). Potential of metabolomics as a functional genomics tool. *Trends in plant science*, 9(9), 418–425.

Blázovics, A., Kursinszki, L., Papp, N., Kleiner, D., Szőke, E., Hegyi, G., & Szilvás, A. (2016). Is professional prescription of a commercially derived dietary supplement in colectomysed patients necessary? *European Journal of Integrative Medicine*, 8(3), 219–226.

Boss, P., Davies, C., & Robinson, S.P. (1996). Analysis of the expression of anthocyanin pathway genes in developing *Vitis vinifera L.* cv. Shiraz grape berries and the implications for pathway regulation. *Plant Physiol*, 1(11):1059–1066.

Botsoglou, N.A., Fletouris, D.J., Papageorgiou, G.E., Vassilopoulos, V.N., Mantis, A.J., et al., (1994). Rapid, sensitive, and specific thiobarbituric acid method for measuring lipid peroxidation in animal tissue, food, and feedstuff samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42, 1931–1937.

Bouayed, J., Deußer, H., Hoffmann, L., & Bohn, T. (2012). Bioaccessible and dialysable polyphenols in selected apple varieties following *in vitro* digestion vs. their native patterns. *Food Chemistry*, 131, 1466–1472.

Boyer, J., & Liu, R. H. (2004). Apple phytochemicals and their health benefits. *Nutrition Journal*, 3(1), 5.

Böhme, K., Calo-Mata, P., Barros-Velazquez,´J., & Ortea, I. (2019). Recent applications of omics-based technologies to main topics in food authentication. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 110, 221–232.

Brannan, R. G. (2009). Effect of grape seed extract on descriptive sensory analysis of ground chicken during refrigerated storage. *Meat Science*, 81, 589-595.

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

Brennan, L., Gibbons, H., & O'Gorman, A. (2015). An overview of the role of metabolomics in the identification of dietary biomarkers. *Current Nutrition Reports*, 4(4), 304–312.

Buescher, J. M., Moco, S., Sauer, U., & Zamboni, N. (2010). Ultrahigh performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for fast and robust quantification of anionic and aromatic metabolites. *Analytical Chemistry*, 82(11), 4403–4412.

Bulut, D., Jelich, U., Dacanay-Schwarz, R., & Mügge, A. (2013). Red wine ıngestion prevents microparticle formation after a single high-fat meal—A crossover study in healthy humans. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 61(6), 489–494.

Büyükbaş, S., Gürel, A., Uz, E. & Bodur, S. (2000). Sağlıklı kişilerde malondialdehit ve konjuge dien ile yaş ilişkisi. *Turgut Özal Tıp Merkezi Dergisi*, 7 (3), 254-258.

Cadenas, E. & Packer, L. (2001). *Handbook of Antioxidants*, 2nd edition Revised and Expanded. New York: Marcel Dekker Inc.

Camara, M. A., Martínez, G., Cermeño, S., Zafrilla, P., & Oliva, J. (2019). Influence of fungicide residues and in vitro gastrointestinal digestion on total antioxidant capacity and phenolic fraction of Graciano and Tempranillo red wines. *Journal of Environmental Science and Health*, Part B, 1–6.

Capanoglu, E., de Vos, R. C. H., Hall, R. D., Boyacioglu, D., & Beekwilder, J. (2013). Changes in polyphenol content during production of grape juice concentrate. *Food Chemistry*, 139(1-4), 521–526.

Carbonell-Capella, J. M., Buniowska, M., Barba, F. J., Esteve, M. J., & Frígola, A. (2014). Analytical methods for determining bioavailability and

bioaccessibility of bioactive compounds from fruits and vegetables: a review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13(2), 155–171.

Cardoso, C., Afonso, C., Lourenço, H., Costa, S., & Nunes, M. L. (2015). Bioaccessibility assessment methodologies and their consequences for the risk-benefit evaluation of food. *Trends in Food Science and Technology*, 41(1), 5–23.

Carmona-Jiménez, Y., García-Moreno, M. V., & García-Barroso, C. (2018). Effect of drying on the phenolic content and antioxidant activity of red grape pomace. *Plant Foods for Human Nutrition*, 73(1), 74–81.

Carpenter, R., O'Grady, M. N., O'Callaghan, Y. C., O'Brien, N. M., & Kerry, J. P. (2007). Evaluation of the antioxidant potential of grape seed and bearberry extracts in raw and cooked pork. *Meat Science*, 76, 604-610.

Castro-Puyana, M., P´erez-Míguez, R., Montero, L., & Herrero, M. (2017). Application of mass spectrometry-based metabolomics approaches for food safety, quality and traceability. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 93, 102–118.

Cemeroğlu B (2007). Gıda Analizleri. Gıda Teknolojisi Derneği Yayınları. No: 34, Bizim Büro Basımevi, 535s, Ankara.

Cerezo, A.B.; Tesfaye, W.; Soria-Diáz, M.E.; Torija, M.J.; Mateo, E.; Garcia-Parrilla, M.C.; & Troncoso, A.M. (2010). Effect of wood on the phenolic profile and sensory properties of wine vinegars during ageing. *Journal of Food Composition and Analysis*, 23, 175–184.

Ceriello, A., Bortolotti, N., Motz, E., Lizzio, S., Catone, B., Assaloni, R., …& Taboga, C. (2001). Red wine protects diabetic patients from meal-induced oxidative stress and thrombosis activation: a pleasant approach to the prevention of cardiovascular disease in diabetes. *European Journal of Clinical Investigation*, 31(4), 322–328.

Cevallos-Cevallos, J. M., & Reyes-De-Corcuera, J. I. (2012). Metabolomics in food science. *Advances in food and nutrition research*, 67, 1–24.

Chace, D. H., Kalas, T. A., & Naylor, E. W. (2002). The application of tandem mass spectrometry to neonatal screening for inherited disorders of intermediary metabolism. *Annual review of genomics and human genetics*, 3, 17–45.

Chalker-Scott, L. (1999). Environmental significance of anthocyanins in plant stress responses. *Photochem Photobiol*, 70:1–9.

Chan, D. S., Lau, R., Aune, D., Vieira, R., Greenwood, D. C., Kampman, E., & Norat, T. (2011). Red and processed meat and colorectal cancer incidence: meta-analysis of prospective studies. *Plos One*, 6, e20456.

Chandrasekara, A., & Shahidi, F. (2012). Bioaccessibility and antioxidant potential of millet grain phenolics as affected by simulated *in vitro* digestion and microbial fermentation. *Journal of Functional Foods*, 4(1), 226–237.

Chen, G.-L., Chen, S.-G., Chen, F., Xie, Y.-Q., Han, M.-D., Luo, C.-X., …& Gao, Y.-Q. (2016). Nutraceutical potential and antioxidant benefits of selected

fruit seeds subjected to an *in vitro* digestion. *Journal of Functional Foods*, 20, 317–331.

Chervin, C., Aked, J., & Crisosto, C. H. (2012). Grapes. *Crop Post-Harvest: Science and Technology*, First Edition, 187–211.

Cheynier, V., Prieur, C., Guyot, S., Rigaud, J. & Moutounet, M. (1997). The structures of tannins in grapes and wines and their interactions with proteins. in 'Wine; nutritional & therapeutic benefits', T. Watkins, ed. A.C.S. Symp. Series, ISBN 08-412-34973, 661, 81–93.

Clayton, T. A., Lindon, J. C., Cloarec, O., Antti, H., Charuel, C., Hanton, G., Provost, J. P., Le Net, J. L., Baker, D., Walley, R. J., Everett, J. R., & Nicholson, J. K. (2006). Pharmaco-metabonomic phenotyping and personalized drug treatment. *Nature*, 440(7087), 1073–1077.

Coe, S. A., Clegg, M., Armengol, M., & Ryan, L. (2013). The polyphenol-rich baobab fruit (*Adansonia digitata L.*) reduces starch digestion and glycemic response in humans. *Nutrition research* (New York, N.Y.), 33(11), 888–896.

Coles, L. T., Moughan, P. J., & Darragh, A. J. (2005). *In vitro* digestion and fermentation methods, including gas production techniques, as applied to nutritive evaluation of foods in the hindgut of humans and other simple-stomached animals. *Animal Feed Science and Technology*, 123–124(Part 1), 421–444.

Collins, C., McNamara, A. E., & Brennan, L. (2019). Role of metabolomics in identification of biomarkers related to food intake. *Proceedings of the Nutrition Society*, 1–8.

Constantinou, S., Gómez-Caravaca, A. M., Goulas, V., Segura-Carretero, A., & Manganaris, G. A. (2017). Metabolic fingerprinting of must obtained from sun-dried grapes of two indigenous Cypriot cultivars destined for the production of "Commandaria": A protected destignation of origin product. *Food Research International*, 100, 469–476.

Corona-Leo, L. S., Meza-Márquez, O. G., & Hernández-Martínez, D. M. (2021). Effect of *in vitro* digestion on phenolic compounds and antioxidant capacity of different apple (Malus domestica) varieties harvested in Mexico. *Food Bioscience*, 43, 101311.

Costa, J. R., , Amorim, M., , Vilas-Boas, A., , Tonon, R. V., , Cabral, L., , Pastrana, L., , & Pintado, M., (2019). Impact of *in vitro* gastrointestinal digestion on the chemical composition, bioactive properties, and cytotoxicity of *Vitis vinifera L.* cv. Syrah grape pomace extract. *Food & function*, 10(4), 1856–1869.

Coşkun F, Arici M, Gülcü M & Çelikyurt G (2009). Some physicochemical, microbiological and sensory properties of Hardaliye produced using different methods In: II. Traditional Foods Symposium, 27-29 May, Van, Turkey, pp. 665-669

Coşkun, F. (2001). *Hardaliye üretim teknolojisi üzerinde bir araştırma*. Doktora tezi, Trakya Üniversitesi, Tekirdağ.

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., Arıcı, M., Gulcu, M., Çelikyurt, G. & Mırık, M. (2018). Physicochemical, functional and microbiological properties of hardaliye beverages produced from different grapes and collected from different households . *Journal of Agricultural Sciences* , 24 (2) , 278-285.

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

Crozier, A., Jaganath, I. B., & Clifford, M. N. (2009). Dietary phenolics: Chemistry, bioavailability and effects on health. *Natural Product Reports*, 26(8), 1001–1043.

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

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

Çelik, H., Çelik, S., Marasalı Kunter, B., Söylemezoglu, G., Boz, Y., Özer, C., & Atak, A. (1998). *Bağcılıkta gelişme ve üretim hedefleri*. Türkiye Ziraat Mühendisliği IV. Teknik Kongresi. Cilt II, 565-588.

Da Silva Haas, I. C., Toaldo, I. M., Gomes, T. M., Luna, A. S., de Gois, J. S., & Bordignon-Luiz, M. T. (2018). Polyphenolic profile, macro- and microelements in bioaccessible fractions of grape juice sediment using in vitro gastrointestinal simulation. *Food Bioscience*, 27, 66-74,

Da Silva, L. F., Guerra, C. C., Klein, D., & Bergold, A. M. (2017). Solid cation exchange phase to remove interfering anthocyanins in the analysis of other bioactive phenols in red wine. *Food Chemistry*, 227, 158–165.

David, L., Danciu, V., Moldovan, B., & Filip, A. (2019). Effects of *ın vitro* gastrointestinal digestion on the antioxidant capacity and anthocyanin content of Cornelian cherry fruit extract. *Antioxidants*, 8(5), 114.

Davidson, P.M., Sofos, J.N., & Branen, A.L. (Eds.). (2005). *Antimicrobials in Food*. (3rd ed.). CRC Press.

De Ferrars, R. M., Czank, C., Zhang, Q., Botting, N. P., Kroon, P. A., Cassidy, A., & Kay, C. D. (2014). The pharmacokinetics of anthocyanins and their metabolites in humans. *British Journal of Pharmacology*, 171(13), 3268–3282.

De Freitas Queiroz Barros, H. D., & Maróstica Junior, M. R. (2019). Phenolic compound bioavailability using *in vitro* and *in vivo* models. bioactive compounds, 113–126.

De Man, J. C., Rogosa, M., & Sharpe, M. E. (1960). A medıum for the cultıvatıon of lactobacıllı. *Journal of Applied Bacteriology*, 23(1), 130–135.

De Villiers, A., Cabooter, D., Lynen, F., Desmet, G., & Sandra, P. (2011). High-efficiency High Performance Liquid Chromatographic analysis of red wine anthocyanins. *Journal of Chromatography A*, 1218(29), 4660–4670.

Del Rio, D., Stewart, A. J., & Pellegrini, N. (2005). A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutrition, metabolism, and cardiovascular diseases* : NMCD, 15(4), 316–328.

Demiray, M. (2019). *Geleneksel hardaliye içeceğinin yenilikçi proses teknolojileri ile pastörizasyonu*. Yüksek lisans tezi, Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi, Bolu.

Dhekney, S.A. (2016). *Grapes*. Encyclopedia of Food and Health, University of Wyoming, Sheridan, WY, USA, 261–265.

Diamantidou, D., Zotou, A., & Theodoridis, G. (2018). Wine and grape marc spirits metabolomics. *Metabolomics*, 14(12).

Dipalmo, T., Crupi, P., Pati, S., Clodoveo, M. L., & Di Luccia, A. (2016). Studying the evolution of anthocyanin-derived pigments in a typical red wine of Southern Italy to assess its resistance to aging. *LWT - Food Science and Technology*, 71, 1–9.

Dolara, P., Luceri, C., de Filippo, C., Femia, A.P., Giovannelli, L., Caderni, G., Cecchini, C., Silvi, S., Orpianesi, C., & Cresci, A. (2005). Red wine polyphenols influence carcinogenesis, intestinal microflora, oxidative damage and gene expression profiles of colonic mucosa in F344 rats. Mutation research, 591 1-2, 237-46 .

Donato, P., Rigano, F., Cacciola, F., Schure, M., Farnetti, S., Russo, M., … & Mondello, L. (2016). Comprehensive two-dimensional liquid chromatography–tandem mass spectrometry for the simultaneous determination of wine polyphenols and target contaminants. *Journal of Chromatography A*, 1458, 54–62.

Drosou, C., Kyriakopoulou, K., Bimpilas, A., Tsimogiannis, D., & Krokida, M. (2015). A comparative study on different extraction techniques to recover red grape pomace polyphenols from vinification byproducts. *Industrial Crops and Products*, 75, 141–149.

Ehrhardt, C., Arapitsas, P., Stefanini, M., Flick, G., & Mattivi, F. (2014). Analysis of the phenolic composition of fungus-resistant grape varieties cultivated in Italy and Germany using UHPLC-MS/MS. *Journal of Mass Spectrometry*, 49(9), 860–869.

Emwas, A. H., Roy, R., McKay, R. T., Tenori, L., Saccenti, E., Gowda, G., Raftery, D., Alahmari, F., Jaremko, L., Jaremko, M., & Wishart, D. S. (2019). NMR Spectroscopy for Metabolomics Research. *Metabolites*, 9(7), 123.

Englyst, K. N., Englyst, H. N., Hudson, G. J., Cole, T. J., & Cummings, J. H. (1999). Rapidly available glucose in foods: an in vitro measurement that reflects the glycemic response. *The American journal of clinical nutrition*, 69(3), 448- 454.

Estevez, M. (2015). Oxidative damage to poultry: from farm to fork. *Poultry Science*. 94 (6), 1368–1378.

Fan, T. W., & Lane, A. N. (2016). Applications of NMR spectroscopy to systems biochemistry. *Progress in nuclear magnetic resonance spectroscopy*, 92-93, 18–53.

Fang, J. (2014). Bioavailability of anthocyanins. *Drug metabolism reviews*, 46(4), 508–520.

Faydaoğlu, E., & Sürücüoğlu, M. S. (2013). Tıbbi ve aromatik bitkilerin antimikrobiyal, antioksidan aktiviteleri ve kullanım olanakları. *Erzincan University Journal of Science and Technology*, 6(2), 233-265.

Feizi, N., Hashemi-Nasab, F. S., Golpelichi, F., Saburouh, N., & Parastar, H. (2021). Recent trends in application of chemometric methods for GC-MS and GC×GC-MSbased metabolomic studies. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 138, 116239.

Felgines, C., Krisa, S., Mauray, A., Besson, C., Lamaison, J. L., Scalbert, A., Mérillon, J. M., & Texier, O. (2010). Radiolabelled cyanidin 3-O-glucoside is poorly absorbed in the mouse. *The British journal of nutrition*, 103(12), 1738–1745.

Fernandes, I., Nave, F., Gonçalves, R., de Freitas, V., & Mateus, N. (2012). On the bioavailability of flavanols and anthocyanins: Flavanol–anthocyanin dimers. *Food Chemistry*, 135(2), 812–818.

Fiehn, O., Kopka, J., Dormann, P., Altmann, T., Trethewey, R. N., & Willmitzer, L. (2000). Metabolite profiling for plant functional genomics. *Nature Biotechnology*, 18 (11), 1157–1161.

Figueiredo-González, M., Martínez-Carballo, E., Cancho-Grande, B., Santiago, J. L., Martínez, M. C., & Simal-Gándara, J. (2012). Pattern recognition of three *Vitis vinifera L.* red grapes varieties based on anthocyanin and flavonol profiles, with correlations between their biosynthesis pathways. *Food Chemistry*, 130(1), 9–19.

Flamini, R., De Rosso, M., & Bavaresco, L. (2015). Study of grape polyphenols by Liquid Chromatography-High-Resolution Mass Spectrometry (UHPLC/QTOF) and suspect screening analysis. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, 2015, 1–10.

Flamini, R., De Rosso, M., De Marchi, F., Dalla Vedova, A., Panighel, A., Gardiman, M., …& Bavaresco, L. (2013). An innovative approach to grape metabolomics: stilbene profiling by suspect screening analysis. *Metabolomics*, 9(6), 1243–1253.

Flanzy, C. (1998). Oenologie. Tech & Doc, ed. Lavoisier, Paris, 1311 p.

Forester, S. C., & Waterhouse, A. L. (2008). Identification of Cabernet Sauvignon anthocyanin gut microflora metabolites. *Journal of agricultural and food chemistry*, 56(19), 9299–9304.

Fracassetti, D., Gabrielli, M., Costa, C., Tomás-Barberán, F. A., & Tirelli, A. (2016). Characterization and suitability of polyphenols-based formulas to replace sulfur dioxide for storage of sparkling white wine. *Food Control*, 60, 606–614.

Fraga-Corral, M., Carpena, M., Garcia-Oliveira, P., Pereira, A. G., Prieto, M. A., & Simal-Gandara, J. (2020). Analytical metabolomics and applications in health, environmental and food science. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 1–23.

Frankel, E. N., & Meyer, A. S. (2000). The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(13), 1925–1941.

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

Garcia-Alonso, M., Minihane, A. M., Rimbach, G., Rivas-Gonzalo, J. C., & de Pascual-Teresa, S. (2009). Red wine anthocyanins are rapidly absorbed in humans and affect monocyte chemoattractant protein 1 levels and antioxidant capacity of plasma. *The Journal of nutritional biochemistry*, 20(7), 521–529.

Gardeli, C., Varela, K., Krokida, E., & Mallouchos, A. (2019). Investigation of anthocyanins stability from pomegranate juice (Punica Granatum L. Cv Ermioni) under a simulated digestion process. *Medicines*, 6(3), 90.

Garrido, M. D., Auqui, M., Martí, N., & Linares, M. B. (2011). Effect of two different red grape pomace extracts obtained under different extraction systems on meat quality of pork burgers. *LWT - Food Science and Technology*, 44(10), 2238–2243.

Gawlik-Dziki, U. (2012). Changes in the antioxidant activities of vegetables as a consequence of interactions between active compounds. *Journal of Functional Foods*, 4(4), 872–882.

George, W., & Mansell, V., (1968). Nuclear magnetic resonance spectra of acetylacetaldehyde and malondialdehyde. *Journal of the Chemical Society. B, Physical Organic*. 132–134.

Gibbons, H., & Brennan, L. (2017). Metabolomics as a tool in the identification of dietary biomarkers. *The Proceedings of the Nutrition Society*, 76(1), 42–53.

Gika, H. G., Theodoridis, G. A., Plumb, R. S., & Wilson, I. D. (2014). Current practice of liquid chromatography–mass spectrometry inmetabolomics and metabonomics. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 87, 12–25.

Gika, H. G., Wilson, I. D., & Theodoridis, G. A. (2014). LC–MSbased holistic metabolic profiling. Problems, limitations, advantages, and future perspectives. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 966, 1–6.

Gil-Izquierdo, A., Gil, M.I., Ferreres, F., & Tomás-Barberán, F.A. (2001). *In vitro* availability of flavonoids and other phenolics in orange juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry,* 49, 1035-1041.

Giusti, M. M., & Wrolstad, R. E. (2001). Characterization and measurement of anthocyanins by UV-Visible spectroscopy. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, 00(1), F1.2.1–F1.2.13.

Gomes, T. M., Toaldo, I. M., Haas, I. C. da S., Burin, V. M., Caliari, V., Luna, A. S., …& Bordignon-Luiz, M. T. (2019). Differential contribution of grape peel, pulp, and seed to bioaccessibility of micronutrients and major polyphenolic compounds of red and white grapes through simulated human digestion. *Journal of Functional Foods*, 52, 699–708.

Gong, Y., Parker, R. S., & Richards, M. P. (2010). Factors affecting lipid oxidation in breast and thigh muscle from chicken, turkey and duck. *Journal of Food Biochemistry*, 34(4), 869–885.

Goñi, I., Garcia-Alonso, A., & Saura-Calixto, F. (1997). A starch hydrolysis procedure to estimate glycemic index. *Nutrition Research*, 17(3), 427–437.

González-Peña, D., & Brennan, L. (2019). Recent advances in the application of metabolomics for nutrition and health. *Annual Review of Food Science and Technology*, 10(1), 479–519.

González-Riano, C., Dudzik, D., Garcia, A., Gil-de-la-Fuente, A., Gradillas, A., Godzien, J., López-Gonzálvez, Á., Rey-Stolle, F., Rojo, D., Ruperez, F. J., Saiz, J., & Barbas, C. (2020). Recent developments along the analytical process for metabolomics workflows. *Analytical chemistry*, 92(1), 203–226.

Gorelik, S., Ligumsky, M., Kohen, R., & Kanner, J. (2008). A novel function of red wine polyphenols in humans: prevention of absorption of cytotoxic lipid peroxidation products. *The FASEB Journal*, 22, 41–46.

Gotcheva, V., Pandiella, S. S., Angelov, A., Roshkova, Z. G., & Webb, C. (2000). Microflora identification of the Bulgarian cereal-based fermented beverage boza. *Process Biochemistry*, 36(1-2), 127–130.

Gökmen, V. (2016). Acrylamide in food: Analysis, content and potential health effects. Elsevier. ISBN 978-0-12-802832-2, 1st Edition.

Granato, T. M., Ferranti, P., Iametti, S., & Bonomi, F. (2018). Affinity and selectivity of plant proteins for red wine components relevant to color and aroma traits. *Food Chemistry*, 256, 235–243.

Grotto, D., Maria, L.S., Valentini, J., Paniz, C., … & Schmitt, G. (2009). Importance of the lipid peroxidation biomarkers and methodological aspects for malondialdehyde quantification. *Quimica Nova* 32, 169–174.

Guadalupe, Z., Ayestarán, B. (2008). Changes in the color components and phenolic content of red wines from *Vitis vinifera* L. Cv. “Tempranillo” during vinification and aging. *Eur Food Res Technol* 228, 29–38.

Gucer, Y., Aydogdu, H. & Durgun, T. (2009). A traditional Thracian beverage: 'hardaliye'. *Trakia Journal of Sciences*, 7 (2), 208-210.

Guerra, A., Etienne-Mesmin, L., Livrelli, V., Denis, S., Blanquet-Diot, S., & Alric, M. (2012). Relevance and challenges in modeling human gastric and small intestinal digestion. *Trends in Biotechnology*, 30(11), 591–600.

Gumus, C. E., & Decker, E. A. (2021). Oxidation in low moisture foods as a function of surface lipids and fat content. *Foods*, 10(4), 860.

Gunathilake, K., Ranaweera, K., & Rupasinghe, H. (2018). *In vitro* anti-ınflammatory properties of selected green leafy vegetables. *Biomedicines*, 6(4), 107.

Gündüz, G. T., Vurmaz, A. K., Solak, E. & Sözbir, H. D. (2019). Antimicrobial, Antioxidant Activities and Total Phenolic Contents of the Traditional Turkish Beverages Produced by Using Grapes#. *Turkish Journal of Agriculture - Food Science and Technology,* 7(sp1), 119-125.

Gürbüz, Ö. (2013). *Hardaliye üretiminde kullanılan antimikrobiyal maddelerin fermantasyon üzerine etkileri*. Yüksek Lisans Tezi, Trakya Üniversitesi, Edirne.

Halket, J. M., Waterman, D., Przyborowska, A. M., Patel, R. K., Fraser, P. D., & Bramley, P. M. (2005). Chemical derivatization and mass spectral libraries in metabolic profiling by GC/MS and LC/MS/MS. *Journal of experimental botany*, 56(410), 219–243.

Han, F., Yang, P., Wang, H., Fernandes, I., Mateus, N., & Liu, Y. (2018). Digestion and absorption of red grape and wine anthocyanins through the gastrointestinal tract. *Trends in Food Science & Technology*, 83, 211–224.

Hanske, L., Engst, W., Loh, G., Sczesny, S., Blaut, M., & Braune, A. (2013). Contribution of gut bacteria to the metabolism of cyanidin 3-glucoside in human microbiota-associated rats. *British Journal of Nutrition*, 109, 1433–1441.

Hassimotto, N. M. A., Genovese, M. I., & Lajolo, F. M. (2009). Antioxidant capacity of Brazilian fruit, vegetables and commercially-frozen fruit pulps. *Journal of Food Composition and Analysis*, 22(5), 394–396.

Hernández-Jiménez, A., Gómez-Plaza, E., Martínez-Cutillas, A., & Kennedy, J. A. (2009). Grape skin and seed proanthocyanidins from Monastrell × Syrah Grapes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(22), 10798–10803.

Hidalgo, M., Oruna-Concha, M. J., Kolida, S., Walton, G. E., Kallithraka, S., Spencer, J. P. E., …& de Pascual-Teresa, S. (2012). Metabolism of anthocyanins by human gut microflora and their ınfluence on gut bacterial growth. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60(15), 3882–3890.

Hilbert, G., Temsamani, H., Bordenave, L., Pedrot, E., Chaher, N., Cluzet, S., Delaunay, J-C., Ollat, N., Delrot, S., Mérillon, J.-M., Gomès, E., & Richard, T. (2015). Flavonol profiles in berries of wild Vitis accessions using liquid chromatography coupled to mass spectrometry and nuclear magnetic resonance spectrometry. *Food Chemistry*, 169, 49–58.

Hithamani, G., & Srinivasan, K., (2014). Effect of domestic processing on the polyphenol content and bioaccessibility in finger millet (Eleusine coracana) and pearl millet (Pennisetum glaucum). *Food Chemistry* 164, 55–62.

Holzapfel, W., (2015). *Advances in fermented foods and beverages*. Woodhead Publishing, ISBN 978-1-78242-015-6, Cambridge, MA.

Hrazdina, G., Parsons, G.F., & Mattick, L.R. (1984). Physiological and biochemical events during development and maturation of grape berries. *American Journal of Enology and Viticulture*, 35, 220-227.

Hribar, U., & Ulrih, N. P. (2014). The metabolism of anthocyanins. *Current Drug Metabolism*, 15, 3–13.

Huang, S. Q., Ma, Y. L., Zhang, C. T., Cai, S. B., & Pang, M. J. (2017). Bioaccessibility and antioxidant activity of phenolics in native and fermented Prinsepia utilis Royle seed during a simulated gastrointestinal digestion *in vitro*. *Journal of Functional Foods*, 37, 354-362.

Hur, S. J., Lee, S. Y., Kim, Y. C., Choi, I., & Kim, G. B. (2014). Effect of fermentation on the antioxidant activity in plant-based foods. *Food chemistry*, 160, 346–356.

Hur, S., Lim, B. O., Park, G. B., & Joo, S.-T. (2009). Effects of various fiber additions on lipid digestion during *in vitro* digestion of beef patties. *Journal of Food Science*, 74(9), C653–C657.

Ib´anez, ˜C., García-Canas, ˜V., Vald´es, A., & Simo, ´C. (2013). Novel MS-based approaches and applications in food metabolomics. *Trends in Analytical Chemistr*y, 52, 100–111.

Ivanova-Petropulos, V., Hermosín-Gutiérrez, I., Boros, B., Stefova, M., Stafilov, T., Vojnoski, B., … & Kilár, F. (2015). Phenolic compounds and antioxidant activity of Macedonian red wines. *Journal of Food Composition and Analysis*, 41, 1–14.

Ivić, I., Kopjar, M., Jakobek, L., Jukić, V., Korbar, S., Marić, B., …& Pichler, A. (2021). Influence of processing parameters on phenolic compounds and color of Cabernet Sauvignon red wine concentrates obtained by reverse osmosis and nanofiltration. *Processes*, 9(1), 89.

Jale, A., & Cemeroğlu, B. (1986). *Meyve ve sebze işleme teknolojisi*. Gıda Teknolojisi Derneği Yayınları, Ankara.

Janero, D. R. (1990). Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free Radical Biology and Medicine*, 9(6), 515–540.

Jenkins, D. J., Wolever, T. M., Jenkins, A. L., Thorne, M. J., Lee, R., Kalmusky, J., Reichert, R., & Wong, G. S. (1983). The glycaemic index of foods tested in diabetic patients: a new basis for carbohydrate exchange favouring the use of legumes. *Diabetologia*, 24(4), 257–264.

Jenkins, D. J., Wolever, T. M., Taylor, R. H., Barker, H., Fielden, H., Baldwin, J. M., Bowling, A. C., Newman, H. C., Jenkins, A. L., & Goff, D. V. (1981). Glycemic index of foods: a physiological basis for carbohydrate exchange. *The American journal of clinical nutrition*, 34(3), 362–366.

Johnson, R.A. & Wichern, D.W. (2002). Applied Multivariate Statistical Analysis. Prentice Hall, New Jersey.

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

Kamiloglu, S., Capanoglu, E., Bilen, F. D., Gonzales, G. B., Grootaert, C., Van de Wiele, T., & Van Camp, J. (2016). Bioaccessibility of polyphenols from plant-processing byproducts of black carrot (*Daucus carota L.*). *Journal of agricultural and food chemistry*, 64(12), 2450–2458.

Kamonpatana, K., Failla, M. L., Kumar, P. S., & Giusti, M. M. (2014). Anthocyanin structure determines susceptibility to microbial degradation and bioavailability to the buccal mucosa. *Journal of agricultural and food chemistry*, 62(29), 6903–6910.

Kanner, J. (1994). Oxidative processes in meat and meat products: Quality implications. *Meat Science*, 36(1–2), 169–189.

Kanner, J., Selhub, J., Shpaizer, A., Rabkin, B., Shacham, I., & Tirosh, O. (2017). Redox homeostasis in stomach medium by foods: The Postprandial Oxidative Stress Index (POSI) for balancing nutrition and human health. *Redox Biology*, 12, 929–936.

Karabudak, E. (2002). Etlerdeki lipid peroksidasyonunun bir ürünü olarak malonaldehid ve ölçüm yöntemleri. *Beslenme ve Diyet Dergisi*, 31(1), 43-48.

Karataş, F., Karatepe, M. & Baysar A. (2002). Determination of free malondialdehyde in human serum by high-performance liquid chromatography. *Analytical Biochemistry*, 311 (1), 76-79.

Kashyap, P., Riar, C. S., Jindal, N. (2021). Effect of extraction methods and simulated *in vitro* gastrointestinal digestion on phenolic compound profile, bio-accessibility, and antioxidant activity of Meghalayan cherry (Prunus nepalensis) pomace extracts. *LWT*, 153, 112570.

Kay, C. D., Kroon, P. A., & Cassidy, A. (2009). The bioactivity of dietary anthocyanins is likely to be mediated by their degradation products. *Molecular nutrition & food research*, 53 Suppl 1, S92–S101.

Keppler, K., & Humpf, H. U. (2005). Metabolism of anthocyanins and their phenolic degradation products by the intestinal microflora. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 13(17), 5195–5205.

Ketnawa, S., Hamanaka, D., Wongpoomchai, R., Ogawa, Y., & Setha, S. (2021). Low intensity of high pressure processing increases extractable recovery of polyphenols and antioxidant activities of non-astringent persimmon fruit. *LWT*, 151, 112162.

Kim, H. K., Choi, Y. H., & Verpoorte, R. (2010). NMR-based metabolomic analysis of plants. *Nature protocols*, 5(3), 536–549.

Kim, H. S., & Hur, S. J. (2018). Effects of *in vitro* human digestion on the antioxidant activity and stability of lycopene and phenolic compounds in

pork patties containing dried tomato prepared at different temperatures. *Journal of Food Science*, 83(7), 1816–1822.

Kim, S., Kim, J., Yun, E. J., & Kim, K. H. (2016). Food metabolomics: from farm to human. *Current Opinion in Biotechnology*, 37, 16–23.

Kim, Y., Hertzler, S. R., Byrne, H. K., & Mattern, C. O. (2008). Raisins are a low to moderate glycemic index food with a correspondingly low insulin index. *Nutrition Research*, 28(5), 304–308.

Kiselova-Kaneva, Y., Galunska, B., Nikolova, M., Dincheva, I., & Badjakov, I. (2022). High resolution LC-MS/MS characterization of polyphenolic composition and evaluation of antioxidant activity of Sambucus ebulus fruit tea traditionally used in Bulgaria as a functional food. *Food Chemistry*, 367, 130759.

Kroll, J., Rawel, H.M., & Rohn, S. (2003). Reactions of plant phenolics with food proteins and enzymes under special consideration of covalent bonds, *Food Science and Technology Research*, 9, 205-218

Kumar, Y., Yadav, D. N., Ahmad, T., & Narsaiah, K. (2015). Recent trends in the use of natural antioxidants for meat and meat products. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 14(6), 796–812.

Kumaran, A., & Karunakaran, R.J. (2006). Antioxidant and free radical scavenging activity of an aqueous extract of Coleus aromaticus. *Food Chemistry*, 97, 109-114

Lacalle-Bergeron, L., Izquierdo-Sandoval, D., Sancho, J. V., Lopez, ´ F. J., Hern´ andez, F., & Portol´es, T. (2021). Chromatography hyphenated to high resolution mass spectrometry in untargeted metabolomics for investigation of food (bio)markers. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 135, 116161.

Laitila, J., Suvanto, J., & Salminen, J.-P. (2019). Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry reveals detailed chromatographic fingerprints of anthocyanins and anthocyanin adducts in red wine. *Food Chemistry*, 294, 138–151

Lane, A. N.; Fan, T. W. M.; & Higashi, R. M. (2008). Isotopomer-based metabolomic analysis by NMR and mass spectrometry. *Methods Cell Biol*., 84, 541–588.

Larbat, R., Paris, C., Le Bot, J., & Adamowicz, S. (2014). Phenolic characterization and variability in leaves, stems and roots of Micro-Tom and patio tomatoes, in response to nitrogen limitation. *Plant Science*, 224, 62–73.

Lay, J. O., Liyanage, R., Borgmann, S., & Wilkins, C. L. (2006). Problems with the “omics”. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 25(11), 1046–1056.

Lee, S. J., Lee, S. Y., Chung, M. S., & Hur, S. J. (2016). Development of novel in vitro human digestion systems for screening the bioavailability and digestibility of foods. *Journal of Functional Foods*, 22, 113–121.

León, C., Cifuentes, A., & Valdés, A. (2018). Foodomics applications. *In Comprehensive Analytical Chemistry*, 82, 643–685.

Leonard, W., Zhang, P., Ying, D., Adhikari, B., & Fang, Z. (2021). Fermentation transforms the phenolic profiles and bioactivities of plant-based foods. *Biotechnology advances*, 49, 107763.

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

Li, S., Li, X., Shpigelman, A., Lorenzo, J. M., Montesano, D., & Barba, F. J. (2017). Direct and indirect measurements of enhanced phenolic bioavailability from litchi pericarp procyanidins by: Lactobacillus casei-01. *Food & Function*, 8(8), 2760–2770.

Li, S., Tian, Y., Jiang, P., Lin, Y., Liu, X., & Yang, H. (2021). Recent advances in the application of metabolomics for food safety control and food quality analyses. *Critical reviews in food science and nutrition*, 61(9), 1448–1469.

Li, Z., Henning, S. M., Zhang, Y., Zerlin, A., Li, L., . . . & Gao, K. (2010). Antioxidant-rich spice added to hamburger meat during cooking results in reduced meat, plasma, and urine malondialdehyde concentrations. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 91 (5), 1180–1184.

Lingua, M. S., Wunderlin, D. A., & Baroni, M. V. (2018). Effect of simulated digestion on the phenolic components of red grapes and their corresponding wines. *Journal of Functional Foods*, 44, 86–94.

Liu, Q., Lanari, M. C., & Schaefer, D. M. (1995). A review of dietary vitamin E supplementation for improvement of beef quality. *Journal of Animal Science*, 73, 3131-3140.

Liu, X., & Locasale, J. W. (2017). Metabolomics: A primer. *Trends in Biochemical Sciences*, 42(4), 274–284.

Liu, X., Shi, J., Yi, J., Zhang, X., Ma, Q., & Cai, S. (2020). The effect of in vitro simulated gastrointestinal digestion on phenolic bioaccessibility and bioactivities of Prinsepia utilis Royle fruits. *LWT*, 110782.

Lobo, V., Patil, A., Phatak, A., & Chandra, N. (2010). Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacognosy Reviews*, 4(8), 118-126.

Longo, E., Rossetti, F., Jouin, A., Teissedre, P.-L., Jourdes, M., & Boselli, E. (2019). Distribution of crown hexameric procyanidin and its tetrameric and pentameric congeners in red and white wines. *Food Chemistry*, 125125.

López-Gutiérrez, N., Romero-González, R., Martínez Vidal, J. L., & Frenich, A. G. (2016). Determination of polyphenols in grape-based nutraceutical products using high resolution mass spectrometry. *LWT - Food Science and Technology*, 71, 249–259.

Lopez-Ruiz, ´ R., Romero-Gonz´ alez, R., & Garrido Frenich, A. (2019). Metabolomics approaches for the determination of multiple contaminants in food. *Current Opinion in Food Science*, 28, 49–57.

Lorenzo, J. M., Domínguez, R., & Carballo, J. (2017). Control of lipid oxidation in muscle food by active packaging technology. In R. Banerjee, A. K. Verma,

& M. W. Siddiqui (Eds.), Natural antioxidants. Applications in foods of animal origin (pp. 343–382). Waretown: CRC Press.

Lucas-González, R., Viuda-Martos, M., Pérez Álvarez, J. A., & Fernández-López, J. (2018). Changes in bioaccessibility, polyphenol profile and antioxidant potential of flours obtained from persimmon fruit (Diospyros kaki) co-products during in vitro gastrointestinal digestion. *Food Chemistry*, 256, 252–258.

Lück, E., & Jager, M. (1997). *Antimicrobial food additives: characteristics, uses, effects*. (2nd ed.). Springer.

Maduwanthi, S. D. T., & Marapana, R. A. U. J. (2020). Total phenolics, flavonoids and antioxidant activity following simulated gastro-intestinal digestion and dialysis of banana (Musa acuminata, AAB) as affected by induce ripening agents. *Food Chemistry*, 127909.

Maier, T., Schieber, A., Kammerer, D.R., & Carle, R. (2009). Residues of grape (*Vitis vinifera*) seed oil production as a valuable source of phenolic antioxidants. *Food Chemistry*, 112:551–559.

Mak, T. D., Goudarzi, M., Laiakis, E. C., & Stein, S. E. (2020). Disparate Metabolomics Data Reassembler: A novel algorithm for agglomerating incongruent LC-MS metabolomics datasets. *Analytical Chemistry*, 92, 5231–5239.

Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., & Jiménez, L. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American Journal of Clinical Nutrition* 79, 727–747.

Março, P.H., Scarminio, I.S., (2007).Q-mode curve resolution of UV-vis spectra for structural transformation studies of anthocyanins in acidic solutions. *Analytica Chimica Acta*, 583, 138–146.

Markley, J. L., Brüschweiler, R., Edison, A. S., Eghbalnia, H. R., Powers, R., Raftery, D., & Wishart, D. S. (2017). The future of NMR-based metabolomics. *Current opinion in biotechnology*, 43, 34–40.

Martínez, J., Nieto, G., Castillo, J., & Ros, G. (2014). Influence of *in vitro* gastrointestinal digestion and/or grape seed extract addition on antioxidant capacity of meat emulsions. *LWT - Food Science and Technology*, 59(2), 834–840.

Martini, S., Cattivelli, A., Conte, A., & Tagliazucchi, D. (2021). Black, green, and pink pepper affect differently lipid oxidation during cooking and *in vitro* digestion of meat. *Food Chemistry*, 350, 129246.

Martini, S., Cavalchi, M., Conte, A., & Tagliazucchi, D. (2018). The paradoxical effect of extra-virgin olive oil on oxidative phenomena during *in vitro* co-digestion with meat. *Food Research International*, 109, 82–90.

Martini, S., Conte, A., & Tagliazucchi, D. (2018). Bioactivity and cell metabolism of *in vitro* digested sweet cherry (Prunus avium) phenolic compounds. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 1–14.

Martini, S., Conte, A., Bottazzi, S., & Tagliazucchi, D. (2019). Mediterranean diet vegetable foods protect meat lipids from oxidation during *in vitro* gastrointestinal digestion. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 71(4), 424–439.

Matus, J. T., Loyola, R., Vega, A., Peña-Neira, A., Bordeu, E., Arce-Johnson, P., & Alcalde, J. A. (2009). Post-veraison sunlight exposure induces MYB-mediated transcriptional regulation of anthocyanin and flavonol synthesis in berry skins of Vitis vinifera. *Journal of experimental botany*, 60(3), 853–867.

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

McGhie, T.K., & Walton, M.C. (2007). The bioavailability and absorption of anthocyanins: towards a better understanding. *Molecular Nutrition and Food Research* 51, 702–713.

Melo, P. S., Arrivetti, L. de O. R., Alencar, S. M. de, & Skibsted, L. H. (2016). Antioxidative and prooxidative effects in food lipids and synergism with α-tocopherol of açaí seed extracts and grape rachis extracts. *Food Chemistry*, 213, 440–449.

Mendes, R., Cardoso, C., & Pestana, C., (2009). Measurement of malondialdehyde in fish: a comparison study between HPLC methods and the traditional spectrophotometric test. *Food Chemistry*, 112, 1038–1045.

MevzuatBilgiSistemi,https://www.mevzuat.gov.tr/mevzuat?MevzuatNo=11376&MevzuatTur=9&MevzuatTertip=5, 31.10.2021.

Meyer, A.S., Yi, O.S., Pearson, D.A., Waterhouse, A.L., & Frankel, E.N. (1997). Inhibition of human low density lipoprotein oxidation in relation to composition of phenolic antioxidants in grapes (*Vitis vinifera*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45:1638–1643.

Micha, R., Wallace, S. K., & Mozaffarian, D. (2010). Red and processed meat consumption and risk of ıncident coronary heart disease, stroke, and diabetes mellitus: A systematic review and meta-analysis. *Circulation*, 121(21), 2271–2283.

Michopoulos, F., Whalley, N., Theodoridis, G., Wilson, I. D., Dunkley, T. P. J., & Critchlow, S. E. (2014). Targeted profiling of polar intracellular metabolites using ion-pair-high performance liquid chromatography and -ultra high performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry: Applications to serum, urine and tissue extracts. *Journal of Chromatography A*, 1349, 60–68.

Mielko, K. A., Pudełko-Malik, N., Tarczewska, A., & Młynarz, P. (2021). NMR spectroscopy as a “green analytical method” in metabolomics and proteomics studies. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, 22, 100474.

Mielnik, M. B., Olsen, E., Vogt, G., Adeline, D., & Skrede, G. (2006). Grape seed extract as antioxidant in cooked, cold stored turkey meat. *LWT - Food Science and Technology*, 39, 191-198.

Mihaylova, D., Desseva, I., Stoyanova, M., Petkova, N., Terzyiska, M., & Lante, A. (2021). Impact of *ın vitro* gastrointestinal digestion on the bioaccessibility of phytochemical compounds from eight fruit juices. *Molecules*, 26(4), 1187.

Milinčić, D. D., Stanisavljević, N. S., Kostić, A. Ž., Soković Bajić, S., Kojić, M. O., Gašić, U. M., Barać, M. B., Stanojević, S. P., Tešić, Ž. Lj, & Pešić, M. B. (2021). Phenolic compounds and biopotential of grape pomace extracts from Prokupac red grape variety. *LWT*, 138, 110739.

Millán, L., Sampedro, M. C., Sánchez, A., Delporte, C., Van Antwerpen, P., Goicolea, M. A., & Barrio, R. J. (2016). Liquid chromatography–quadrupole time of flight tandem mass spectrometrybased targeted metabolomic study for varietal discrimination of grapes according to plant sterols content. *Journal of Chromatography* A, 1454, 67–77.

Min, B., & Ahn, D. U. (2005). Mechanism of lipid peroxidation in meat and meat products-a review. *Food Science and Biotechnology*, 14(1), 152–163.

Min, B., Nam, K. C., Cordray, J., & Ahn, D. U. (2008). Endogenous factors affecting oxidative stability of beef loin, pork loin, and chicken breast and thigh meats. *Journal of Food Science*, 73(6), C439–C446.

Mithen, R.F., Dekker, M., Verkerk, R., Rabot, S. & Johnson, I.T. (2000). The nutritional significance, biosynthesis and bioavailability of glucosinolates in human foods. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80 (7), 967-984.

Mohamedshah, Z., Chadwick-Corbin, S., Wightman, J. D., & Ferruzzi, M. G. (2020). Comparative assessment of phenolic bioaccessibility from 100% grape juice and whole grapes. *Food & Function*, 11, 6433-6445.

Moreno-Montoro, M., Olalla-Herrera, M., Gimenez-Martinez, R., Navarro-Alarcon, M., & Rufián-Henares, J. A. (2015). Phenolic compounds and antioxidant activity of Spanish commercial grape juices. *Journal of Food Composition and Analysis*, 38, 19–26. Moreno-Montoro, M., Olalla-Herrera, M., Gimenez-Martinez, R., Navarro-Alarcon, M., & Rufián-Henares, J. A. (2015). Phenolic compounds and antioxidant activity of Spanish commercial grape juices. *Journal of Food Composition and Analysis*, 38, 19–26.

Mori, K., Goto-Yamamoto, N., Kitayama, M., & Hashizume, K. (2007). Loss of anthocyanins in red-wine grape under high temperature. *Journal of Experimental Botany*, 58(8):1935–1945.

Mozaffarian, D., & Ludwig, D. S. (2010). Dietary guidelines in the 21st century--a time for food. *JAMA*, 304(6), 681–682.

Mulero, J., Pardo, F., & Zafrilla, P. (2010). Antioxidant activity and phenolic compounds in conventional and organic red grapes (var. Monastrell). *CyTA - Journal of Food*, 8(3), 185–191.

Nagana Gowda, G. A., & Raftery, D. (2013). Biomarker Discovery and Translation in Metabolomics. *Current Metabolomics*, 1(3), 227–240.

Nagana Gowda, G. A., & Raftery, D. (2015). Can NMR solve some significant challenges in metabolomics?. *Journal of magnetic resonance* (San Diego, Calif. : 1997), 260, 144–160.

Nagana Gowda, G. A., Alvarado, L. Z., & Raftery, D. (2017). Metabolomics. *Nutrition in the Prevention and Treatment of Disease*, 103–122.

Nagana Gowda, G. A., & Djukovic, D. (2014). Overview of mass spectrometry-based metabolomics: opportunities and challenges. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.),* 1198, 3–12.

Naissides, M., Mamo, J. C. L., James, A. P., & Pal, S. (2004). The effect of acute red wine polyphenol consumption on postprandial lipaemia in postmenopausal women. *Atherosclerosis*, 177(2), 401–408.

Namal Senanayake, S. P. J. (2013). Green tea extract: Chemistry, antioxidant properties and food applications – A review. *Journal of Functional Foods*, 5(4), 1529–1541.

Nasi, A., Ferranti, P., Amato, S., & Chianese, L. (2008). Identification of free and bound volatile compounds as typicalness and authenticity markers of non-aromatic grapes and wines through a combined use of mass spectrometric techniques. *Food Chemistry*, 110(3), 762–768.

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

Nieva-Echevarría, B., Goicoechea, E., & Guill´en, M. D. (2020). Food lipid oxidation under gastrointestinal digestion conditions: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 60(3), 461–478.

Niki, E. (2010). Assessment of antioxidant capacity *in vitro* and *in vivo*. *Free Radical Biology & Medicine*, 49 (4), 503-515.

Nogueira, M. S., Kessuane, M. C., Lobo Ladd, A. A. B., Lobo Ladd, F. V., Cogliati, B., & Castro, I. A. (2016). Effect of long-term ingestion of weakly oxidised flaxseed oil on biomarkers of oxidative stress in LDL-receptor knockout mice. *British Journal of Nutrition*, 116(02), 258–269.

O'Grady, M. N., Carpenter, R., Lynch, P. B., O'Brien, N. M., & Kerry, J. P. (2008). Addition of grape seed extract and bearberry to porcine diets: Influence on quality attributes of raw and cooked pork. *Meat Science*, 78, 438-446

Oomen, A. G., Hack, A., Minekus, M., Zeijdner, E., Cornelis, C., Schoeters, G., …& Van Wijnen, J. H. (2002). comparison of five *in vitro* digestion models to study the bioaccessibility of soil contaminants. *Environmental Science & Technology*, 36(15), 3326–3334.

Ortega, N., Macià, A., Romero, M.-P., Reguant, J., & Motilva, M.-J. (2011). Matrix composition effect on the digestibility of carob flour phenols by an *in-vitro* digestion model. *Food Chemistry*, 124(1), 65–71.

Osrečak, M., Karoglan, M., & Kozina, B. (2016). Influence of leaf removal and reflective mulch on phenolic composition and antioxidant activity of Merlot,

Teran and Plavac mali wines (*Vitis vinifera L.*). *Scientia Horticulturae*, 209, 261–269.

Othman, N. B., Roblain, D., Chammen, N., Thonart, P., & Hamdi, M. (2009). Antioxidant phenolic compounds loss during the fermentation of Chétoui olives. *Food Chemistry*, 116(3), 662–669.

Oussalah, M., Caillet, S., Saucier, L., & Lacroix, M. (2007). Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: E. coli O157: H7, Salmonella typhimurium, Staphylococcus aureus and Listeria monocytogenes. *Food control*, 18(5), 414-420.

Ovando-Martínez, M., Gámez-Meza, N., Molina-Domínguez, C. C., Hayano-Kanashiro, C., & Medina-Juárez, L. A. (2018). Simulated gastrointestinal digestion, bioaccessibility and antioxidant capacity of polyphenols from Red Chiltepin (Capsicum annuum L. Var. glabriusculum) grown in Northwest Mexico. *Plant Foods for Human Nutrition*, 73(2), 116–121.

Öztürkcan, A., & Sıla, A. (2017). Yaygın olarak kullanılan antimikrobiyal gıda katkı maddeleri ile ilgili genel bir değerlendirme. *Igusabder*, 1, 1-17.

Panceri, C. P., De Gois, J. S., Borges, D. L. G., & Bordignon-Luiz, M. T. (2015). Effect of grape dehydration under controlled conditions on chemical composition and sensory characteristics of Cabernet Sauvignon and Merlot wines. *LWT - Food Science and Technology*, 63(1), 228–235.

Papastergiadis, A., Mubiru, E., Van Langenhove, H., & De Meulenaer, B., (2012). Malondialdehyde measurement in oxidized foods: evaluation of the spectrophotometric thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) test in various foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 9589–9594.

Papuc, C., Goran, G. V., Predescu, C. N., & Nicorescu, V. (2016). Mechanisms of oxidative processes in meat and toxicity ınduced by postprandial degradation products: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 16(1), 96–123.

Parada, J., & Aguilera, J. M. (2007). Food microstructure affects the bioavailability of several nutrients. *Journal of Food Science*, 72(2), R21–R32.

Pastrana-Bonilla, E., Akoh, C.C., Sellappan, S., & Krewer, G. (2003). Phenolic content and antioxidant capacity of muscadine grapes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51:4497–4503.

Patil, B.S., Jayaprakasha, G.K., Chidambara Murthy, K.N., & Vikram, A., (2009). Bioactive compounds: historical perspectives, opportunities, and challenges. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 8142–8160.

Peña-Neira, A. (2017). *Grapes*. Fruit & Vegetable Phytochemicals: Chemistry and Human Health, Volume II, Second Edition, 1041–1054.

Peña-Neira, A., Caceres, A., & Pastenes, C. (2007). Low molecular weight phenolic and anthocyanin composition of grape skins from cv. Syrah (*Vitis vinifera L.*) in the Maipo Valley (Chile): effect of clusters thinning and vineyard yield. *Food Science and Technology International*, 13(2):153–158.

Pérez-Magariño, S., & González-San José, M. L. (2004). Evolution of flavanols, anthocyanins, and their derivatives during the aging of red wines elaborated from grapes harvested at different stages of ripening. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(5), 1181–1189.

Pérez-Mayán, L., Rodríguez, I., Ramil, M., Kabir, A., Furton, K. G., & Cela, R. (2018). Fabric phase sorptive extraction followed by Ultra-Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry for the determination of fungicides and ınsecticides in wine. *Journal of Chromatography A*. 584, 13–23.

Pérez-Navarro, J., Izquierdo-Cañas, P. M., Mena-Morales, A., Martínez-Gascueña, J., Chacón-Vozmediano, J. L., García-Romero, E., … & Gómez-Alonso, S. (2021). Genotypic variation in phenolic composition of novel white grape genotypes (*Vitis vinifera L.*). *Journal of Food Composition and Analysis*, 102, 103987.

Pérez-Ortega, P., Gilbert-López, B., García-Reyes, J. F., Ramos-Martos, N., & Molina-Díaz, A. (2012). Generic sample treatment method for simultaneous determination of multiclass pesticides and mycotoxins in wines by Liquid Chromatography–Mass Spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1249, 32–40.

Pérez-Vicente, A., Gil-Izquierdo, A., & García-Viguera, C. (2002). *In vitro* gastrointestinal digestion study of pomegranate juice phenolic compounds, anthocyanins, and vitamin C. *Journal of agricultural and food chemistry*, 50(8), 2308–2312.

Perše, M. (2013). Oxidative Stress in the Pathogenesis of Colorectal Cancer: Cause or Consequence? *BioMed Research International*, 2013, 1–9.

Pešić, M. B., Milinčić, D. D., Kostić, A. Ž., Stanisavljević, N. S., Vukotić, G. N., Kojić, M. O., Gašić, U. M., Barać, M. B., Stanojević, S. P., Popović, D. A., Banjac, N. R., & Tešić, Ž. L. (2019). *In vitro* digestion of meat- and cereal-based food matrix enriched with grape extracts: How are polyphenol composition, bioaccessibility and antioxidant activity affected? *Food Chemistry*, 284, 28–44.

Pezzatti, J., Boccard, J., Codesido, S., Gagnebin, Y., Joshi, A., Picard, D., Gonz´ alezRuiz, V., & Rudaz, S. (2020). Implementation of liquid chromatography–high resolution mass spectrometry methods for untargeted metabolomic analyses of biological samples: A tutorial. *Analytica Chimica Acta,* 1105, 28–44.

Phan, M. A. T., Bucknall, M., & Arcot, J. (2019). Co-ingestion of red cabbage with carrot or cherry tomato enhances digestive bioaccessibility of anthocyanins but decreases carotenoid bioaccessibility after simulated in vitro gastro-intestinal digestion. *Food Chemistry*, 125040.

Pierre, F. H. F., Martin, O. C. B., Santarelli, R. L., Taché, S., Naud, N., Guéraud, F., . . . & Corpet, D. E. (2013). Calcium and α-tocopherol suppress cured-meat promotion of chemically induced colon carcinogenesis in rats and

reduce associated biomarkers in human volunteers. *The American journal of clinical nutrition*, 98(5), 1255-1262.

Pimentel, G., Burton, K. J., Vergères, G., & Dupont, D. (2018). The role of foodomics to understand the digestion/bioactivity relationship of food. *Current Opinion in Food Science*, 22, 67–73.

Pintać, D., Majkić, T., Torović, L., Orčić, D., Beara, I., Simin, N., Mimica–Dukić, N., & Lesjak, M. (2018). Solvent selection for efficient extraction of bioactive compounds from grape pomace. *Industrial Crops and Products*, 111, 379–390.

Podio, N. S., López-Froilán, R., Ramirez-Moreno, E., Bertrand, L., Baroni, M. V., Pérez-Rodríguez, M. L., …& Wunderlin, D. A. (2015). Matching *in vitro* bioaccessibility of polyphenols and antioxidant capacity of soluble coffee by boosted regression trees. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(43), 9572–9582.

Podsędek, A., Redzynia, M., Klewicka, E., & Koziołkiewicz, M. (2014). Matrix effects on the stability and antioxidant activity of red cabbage anthocyanins under simulated gastrointestinal digestion. *BioMed Research International,* 2014, 1–11.

Pojer, E., Mattivi, F., Johnson, D., & Stockley, C. S. (2013). The Case for Anthocyanin Consumption to Promote Human Health: A Review. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 12(5), 483–508.

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

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

Pu, C.-H., Lin, S.-K., Chuang, W.-C., & Shyu, T.-H. (2018). Modified QuEChERS method for 24 plant growth regulators in grapes using LC-MS/MS. *Journal of Food and Drug Analysis*, 26(2), 637–648.

Radenkovs, V., Püssa, T., Juhnevica-Radenkova, K., Kviesis, J., Salar, F. J., Moreno, D. A., & Drudze, I. (2020). Wild apple (Malus spp.) by-products as a source of phenolic compounds and vitamin C for food applications. *Food Bioscience*, 100744.

Rainville, P. D., Theodoridis, G., Plumb, R. S., & Wilson, I. D. (2014). Advances in liquid chromatography coupled to mass spectrometry for metabolic phenotyping. TrAC—Trends in Analytical Chemistry, 61, 181–191.

Ramautar, R., Somsen, G. W., & de Jong, G. J. (2013). CE-MS for metabolomics: developments and applications in the period 2010-2012. *Electrophoresis*, 34(1), 86–98.

Ramos, M. C., Jones, G. V., & Yuste, J. (2015). Phenology and grape ripening characteristics of cv tempranillo within the ribera del duero designation of

origin (Spain): Influence of soil and plot characteristics. *European Journal of Agronomy*, 70, 57–70.

Rangel-Huerta, O. D., & Gil, A. (2016). Nutrimetabolomics: An Update on Analytical Approaches to Investigate the Role of Plant-Based Foods and Their Bioactive Compounds in Non-Communicable Chronic Diseases. *International journal of molecular sciences*, 17(12), 2072.

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

Revilla, E., García-Beneytez, E., Cabello, F., Martín-Ortega, G., & Ryan, J.-M. (2001). Value of high-performance liquid chromatographic analysis of anthocyanins in the differentiation of red grape cultivars and red wines made from them. *Journal of Chromatography A*, 915(1-2), 53–60.

Rezzi, S., Ramadan, Z., Fay, L. B., & Kochhar, S. (2007). Nutritional metabonomics: applications and perspectives. *Journal of proteome research*, 6(2), 513–525.

Rizo, J., Guill´en, D., Farr´es, A., Díaz-Ruiz, G., Sanchez, ´S., Wacher, C., & RodríguezSanoja, R. (2020). Omics in traditional vegetable fermented foods and beverages. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 60(5), 791–809.

Robertson D. G. (2005). Metabonomics in toxicology: a review. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology*, 85(2), 809–822.

Rojas, M. C., & Brewer, S. (2007). Effect of natural antioxidants on oxidative stability of cooked, refrigerated beef and pork. *Journal of Food Science*, 72, S282eS288.

Rojas, M. C., & Brewer, S. (2008). Effect of natural antioxidants on oxidative stability of frozen, vacuum-packaged beef and pork. *Journal of Food Quality*, 31, 173e188.

Romero-Díez, R., Rodríguez-Rojo, S., Cocero, M. J., Duarte, C. M. M., Matias, A. A., & Bronze, M. R. (2018). Phenolic characterization of aging wine lees: Correlation with antioxidant activities. *Food Chemistry*, 259, 188–195.

Roriz, C. L., Barros, L., Prieto, M. A., Morales, P., & Ferreira, I. C. (2017). Floral parts of Gomphrena globosa L. as a novel alternative source of betacyanins: Optimization of the extraction using response surface methodology. *Food chemistry*, 229, 223–234.

Rubió, L., Macià, A., Castell-Auví, A., Pinent, M., Blay, M.T., Ardévol, A., Romero, M.P., & Motilva, M.J. (2014). Effect of the co-occurring olive oil and thyme extracts on the phenolic bioaccesability and bioavailability assessed by *in vitro* digestion and cell models. *Food Chemistry* 149, 277–284.

Rueda, A., Cantarero, S., Seiquer, I., Cabrera-Vique, C., & Olalla, M. (2017). Bioaccessibility of individual phenolic compounds in extra virgin argan oil after simulated gastrointestinal process. *Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie- Food Science and Technology* 75, 466–472.

Ryu, D., & Koh, E. (2018). Stability of anthocyanins in bokbunja (Rubus occidentalis L.) under *in vitro* gastrointestinal digestion. *Food Chemistry*, 267, 157–162.

Sacchi, K. L., Bisson, L. F., & Adams, D. O. (2005). A review of the effect of winemaking techniques on phenolic extraction in red wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 56(3), 197e206.

Salminen, S., & von Wright, A. (Eds.). (2004). Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects, Third Edition (3rd ed.). CRC Press.

Samoticha, J., Wojdyło, A., & Golis, T. (2017). Phenolic composition, physicochemical properties and antioxidant activity of interspecific hybrids of grapes growing in Poland. *Food Chemistry*, 215, 263–273.

Saura-Calixto, F., Serrano, J., & Goñi, I. (2007). Intake and bioaccessibility of total polyphenols in a whole diet. *Food Chemistry*, 101(2), 492–501.

Sayago-Ayerdi, S. G., Brenes, A., & Goñi, I. (2009). Effect of grape antioxidant dietary fiber on the lipid oxidation of raw and cooked chicken hamburgers. *LWT - Food Science and Technology*, 42, 971-976.

Scalbert, A., Brennan, L., Manach, C., Andres-Lacueva, C., Dragsted, L. O., Draper, J., Rappaport, S. M., van der Hooft, J. J., & Wishart, D. S. (2014). The food metabolome: a window over dietary exposure. *The American journal of clinical nutrition*, 99(6), 1286–1308.

Schaefer, H.M., Schaefer, V., & Levey, D.J. (2004). How plant-animal interactions signal new insights in communication. *Trends in Ecology & Evolution*, 19:577–584.

Schwingshackl, L., & Hoffmann, G. (2013). Long-term effects of low glycemic index/load vs. high glycemic index/load diets on parameters of obesity and obesity-associated risks: a systematic review and meta-analysis. Nutrition, metabolism, and cardiovascular diseases: *NMCD*, 23(8), 699–706.

Septembre-Malaterre, A., Remize, F., & Poucheret, P. (2018). Fruits and vegetables, as a source of nutritional compounds and phytochemicals: Changes in bioactive compounds during lactic fermentation. *Food Research International,* 104, 86–99.

Serrano-Lourido, D., Saurina, J., Hernández-Cassou, S., & Checa, A. (2012). Classification and characterisation of Spanish red wines according to their appellation of origin based on chromatographic profiles and chemometric data analysis. *Food Chemistry*, 135(3), 1425–1431.

Shi, X., Wang, S., Jasbi, P., Turner, C., Hrovat, J., Wei, Y., Liu, J., & Gu, H. (2019). Database-Assisted Globally Optimized Targeted Mass Spectrometry (dGOT-MS): Broad and Reliable Metabolomics Analysis with Enhanced Identification. *Analytical chemistry*, 91(21), 13737–13745.

Sies, H., Stahl, W., & Sevanian, A. (2005). Nutritional, dietary and postprandial oxidative stress. *The Journal of Nutrition*, 135(5), 969–972.

Simões, C., Bizarri, C. H., da Silva Cordeiro, L., de Castro, T. C., Coutada, L. C., da Silva, A. J., . . . & Mansur, E. (2009). Anthocyanin production in callus

cultures of Cleome rosea: Modulation by culture conditions and characterization of pigments by means of HPLC-DAD/ESIMS. *Plant Physiology and Biochemistry*, 47(10), 895-903.

Sims, C., & Morris, J. (1984). Effects of pH, sulfur dioxide, storage time, and temperature on the color and stability of red muscadine grape wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, 35(1), 35e39.

Singleton VL, & Rossi JR. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16(3): 144158.

Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventós, R. M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, 152–178.

Siriwardhana, N., Kalupahana, N. S., Cekanova, M., LeMieux, M., Greer, B., & MoustaidMoussa, N. (2013). Modulation of adipose tissue inflammation by bioactive food compounds. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 24(4), 613–623.

Sivilotti, P., Herrera, J. C., Lisjak, K., Baša Česnik, H., Sabbatini, P., Peterlunger, E., & Castellarin, S. D. (2016). Impact of leaf removal, applied before and after flowering, on anthocyanin, tannin, and methoxypyrazine concentrations in "Merlot" (*Vitis vinifera L.*) grapes and wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64(22), 4487–4496.

Sobral, M. M. C., Casal, S., Faria, M. A., Cunha, S. C., & Ferreira, I. M. P. L. V. O. (2020). Influence of culinary practices on protein and lipid oxidation of chicken meat burgers during cooking and *in vitro* gastrointestinal digestion. *Food and Chemical Toxicology*, 111401.

Souquet, J.M., Cheynier, V., Brossaud, F. & Moutounet M. (1996). Polymeric proanthocyanidins from grape skins. *Phytochemistry*, 43, 509–512.

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

Sparkman OD, Penton ZE & Kitson FG. (2011). Gas Chromatography and Mass Spectrometry, A Practical Guide [Internet]. Gas Chromatography and Mass Spectrometry 2nd ed., p. 285–292. Oxford: Academic Press.

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

Sternad Lemut, M., Sivilotti, P., Franceschi, P., Wehrens, R., & Vrhovsek, U. (2013). Use of metabolic profiling to study grape skin polyphenol behavior as a result of canopy microclimate manipulation in a "Pinot noir" vineyard. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(37), 8976–8986.

Stinco, C. M., Sentandreu, E., Mapelli-Brahm, P., Navarro, J. L., Vicario, I. M., & Meléndez-Martínez, A. J. (2020). Influence of high pressure homogenization and pasteurization on the *in vitro* bioaccessibility of carotenoids and flavonoids in orange juice. *Food Chemistry*, 127259.

Su, D. X., Luo, M. K., Liu, H. S., Qi, X. Y., Zeng, Q. Z., He, S., Fen S., & Zhang, J. (2019). The effect of simulated digestion on the composition of phenolic compounds and antioxidant activities in lychee pulp of different cultivars. *International Journal of Food Science & Technology*, 54(11), 3042-3050.

Sun, X., Cheng, X., Zhang, J., Ju, Y., Que, Z., Liao, X., …& Ma, T. (2020). Letting wine polyphenols functional: Estimation of wine polyphenols bioaccessibility under different drinking amount and drinking patterns. *Food Research International*, 127, 108704.

Sundekilde, U. K., Larsen, L. B., & Bertram, H. C. (2013). NMR-Based Milk Metabolomics. *Metabolites*, 3(2), 204–222.

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

Tagliazucchi, D., Verzelloni, E., & Conte, A. (2012). The first tract of alimentary canal as an extractor. Release of phytochemicals from solid food matrices during simulated digestion. *Journal of Food Biochemistry*, 36(5), 555–568.

Tagliazucchi, D., Verzelloni, E., Bertolini, D., & Conte, A. (2010). *In vitro* bio-accessibility and antioxidant activity of grape polyphenols. *Food Chemistry*, 120(2), 599–606.

Takahama, U. (2004). Oxidation of vacuolar and apoplastic phenolic substrates by peroxidases: physiological significance of the oxidation reactions. *Phytochemistry Reviews*, 3:207–219.

Tarko, T., Duda-Chodak, A., & Soszka, A. (2020). Changes in phenolic compounds and antioxidant activity of fruit musts and fruit wines during simulated digestion. *Molecules*, 25(23), 5574.

Taub, I. A., (1984). Free radical reactions in food. *Journal of Chemical Education*, 61, 313-24.

TGK. (2007). Alkolsüz İçecekler Tebliği. Tarım Bakanlığı Koruma ve Kontrol Genel Müdürlüğü, Ankara.

Theodoridis, G., Gika, H. G., & Wilson, I. D. (2011). Mass spectrometry-based holistic analytical approaches for metabolite profiling in system biology studies. *Mass Spectrometry Reviews*, 30(5), 884–906.

Tkacz, K., Wojdyło, A., Nowicka, P., Turkiewicz, I., & Golis, T. (2019). Characterization in vitro potency of biological active fractions of seeds, skins and flesh from selected *Vitis vinifera L*. cultivars and interspecific hybrids. *Journal of Functional Foods*, 56, 353–363.

Tolve, R., Pasini, G., Vignale, F., Favati, F., & Simonato, B. (2020). Effect of grape pomace addition on the technological, sensory, and nutritional properties of durum wheat pasta. *Foods*, 9(3), 354.

Tressera-Rimbau, A., Arranz, S., Eder, M., & Vallverdú-Queralt, A. (2017). Dietary Polyphenols in the Prevention of Stroke. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 7467962.

Trygg, J., Holmes, E., & Lundstedt, T. (2007). Chemometrics in metabonomics. *Journal of proteome research*, 6(2), 469–479.

Tsao, R. (2010). Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients*, 2(12), 1231–1246.

Tsikas, D. (2017). Assessment of lipid peroxidation by measuring malondialdehyde (MDA) and relatives in biological samples: Analytical and biological challenges. *Analytical Biochemistry*, 524, 13–30.

Tzanova, M., Atanasov, V., Ivanov, M., Iliev, A., Atanassova, S. & Peeva, P., Grozeva, N., Gerdzhikova, M. & Dinev, T. (2019). Antioxidant constituents and antioxidant activity of some red wine and red table grape varieties, cultivated in diff erent regions of Bulgaria. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 25, 3-12.

Ucar, T.M., & Karadag A. (2019). The effects of vacuum and freeze-drying on the physicochemical properties and *in vitro* digestibility of phenolics in oyster mushroom (Pleurotus ostreatus). *Journal of Food Measurement and Characterization*, 13 (3), 2298-2309.

Utpott, M., Rodrigues, E., Rios, A. de O., Mercali, G. D., & Flôres, S. H. (2022). Metabolomics: An analytical technique for food processing evaluation. *Food Chemistry*, 366, 130685.

Van Boekel, M., Fogliano, V., Pellegrini, N., Stanton, C., Scholz, G., Lalljie, S., …& Eisenbrand, G. (2010). A review on the beneficial aspects of food processing. *Molecular Nutrition & Food Research*, 54(9), 1215–1247.

Van Hecke, T., Goethals, S., Vossen, E., & De Smet, S. (2019). Long chain n -3 PUFA content and n -6/ n -3 PUFA ratio in mammal, poultry and fish muscles largely explain differential protein and lipid oxidation profiles following in vitro gastrointestinal digestion. *Molecular Nutrition & Food Research*, 1900404.

Van Hecke, T., Ho, P. L., Goethals, S., & De Smet, S. (2017). The potential of herbs and spices to reduce lipid oxidation during heating and gastrointestinal digestion of a beef product. *Food Research International*, 102, 785–792.

Van Hecke, T., Van Camp, J., & De Smet, S. (2017). Oxidation during digestion of meat: Interactions with the diet and Helicobacter pylori gastritis, and implications on human health. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 16(2), 214–233.

Van Leeuw, R., Kevers, C., Pincemail, J., Defraigne, J. O., & Dommes, J. (2014). Antioxidant capacity and phenolic composition of red wines from various grape varieties: Specificity of Pinot Noir. *Journal of Food Composition and Analysis*, 36(1-2), 40–50.

Vandamme, J., Nikiforov, A., Dujardin, K., Leys, C., De Cooman, L., & Van Durme, J. (2015). Critical evaluation of non-thermal plasma as an innovative accelerated lipid oxidation technique in fish oil. *Food Research International*, 72, 115–125.

Vandemoortele, A., & De Meulenaer, B. (2018). Reactivity of lipid oxidation products in foods – Is malondialdehyde a reliable marker? *Reference Module in Food Science*.

Vardar, U.S., Tekin, Z.H. & Ozcelik, G. (2015). Physicochemical and bioactive properties of hardaliye. In Proceedings of the 3rd International Symposium on Traditional Foods from Adriatic to Caucasus, Sarajevo, Bosnia and Herzegovina, 1–4 October.

Vauzour, D., Houseman, E. J., George, T. W., Corona, G., Garnotel, R., Jackson, K. G., …& Spencer, J. P. E. (2009). Moderate Champagne consumption promotes an acute improvement in acute endothelial-independent vascular function in healthy human volunteers. *British Journal of Nutrition*, 1.

Vieira, S. A., Zhang, G., & Decker, E. A. (2017). Biological Implications of lipid oxidation products. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 94(3), 339–351.

Virgiliou, C., Sampsonidis, I., Gika, H. G., Raikos, N., & Theodoridis, G. A. (2015). Development and validation of a HILIC–MS/MS multitargeted method for metabolomics applications. *Electrophoresis*, 36(18), 2215–2225.

Vrhovsek, U., Masuero, D., Gasperotti, M., Franceschi, P., Caputi, L., Viola, R., & Mattivi, F. (2012). A versatile targeted metabolomics method for the rapid quantification of multiple classes of phenolics in fruits and beverages. *Journal of agricultural and food chemistry*, 60(36), 8831–8840.

Wang, L., Sun, X., Weiszmann, J., & Weckwerth, W. (2017). System-level and granger network analysis of ıntegrated proteomic and metabolomic dynamics ıdentifies key points of grape berry development at the ınterface of primary and secondary metabolism. *Frontiers in Plant Science*, 8.

Wang, S., Amigo-Benavent, M., Mateos, R., Bravo, L., & Sarriá, B. (2016). Effects of *in vitro* digestion and storage on the phenolic content and antioxidant capacity of a red grape pomace. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 68(2), 188–200.

Wang, T., Liu, L., Rakhmanova, A., Wang, X., Shan, Y., Yi, Y., …& Lü, X. (2020). Stability of bioactive compounds and in vitro gastrointestinal digestion of red beetroot jam: Effect of processing and storage. *Food Bioscience*, 100788.

Want, E. J., Wilson, I. D., Gika, H., Theodoridis, G., Plumb, R. S., Shockcor, J., Holmes, E., & Nicholson, J. K. (2010). Global metabolic profiling procedures for urine using UPLC-MS. *Nature protocols*, 5(6), 1005–1018.

Williams, M. J. ., Sutherland, W. H. ., Whelan, A. P., McCormick, M. P., & de Jong, S. A. (2004). Acute effect of drinking red and white wines on circulating levels of inflammation-sensitive molecules in men with coronary artery disease. *Metabolism*, 53(3), 318–323.

Woodward, G., Kroon, P., Cassidy, A., & Kay, C. (2009). Anthocyanin stability and recovery: implications for the analysis of clinical and experimental samples. *Journal of agricultural and food chemistry*, 57(12), 5271–5278.

Xanthopoulou, M. N., Kalathara, K., Melachroinou, S., Arampatzi-Menenakou, K., Antonopoulou, S., Yannakoulia, M., & Fragopoulou, E. (2016). Wine consumption reduced postprandial platelet sensitivity against platelet activating factor in healthy men. *European Journal of Nutrition*, 56(4), 1485–1492.

Xie, X., Chen, C., & Fu, X. (2020). Study on the bioaccessibility of phenolic compounds and bioactivities of passion fruit juices from different regions in vitro digestion. *Journal of Food Processing and Preservation*.

Xu, X., Zheng, J., & Truhlar, D. G. (2015). Ultraviolet Absorption Spectrum of Malonaldehyde in Water Is Dominated by Solvent-Stabilized Conformations. *Journal of the American Chemical Society*, 137(25), 8026–8029.

Yang, J., Martinson, T. E., & Liu, R. H. (2009). Phytochemical profiles and antioxidant activities of wine grapes. *Food Chemistry*, 116(1), 332–339.

Yang, P., Yuan, C., Wang, H., Han, F., Liu, Y., Wang, L., & Liu, Y. (2018). Stability of anthocyanins and their degradation products from Cabernet Sauvignon red wine under gastrointestinal pH and temperature conditions. *Molecules*, 23(2), 354.

Yeo, S. K., & Ewe, J. A. (2015). Effect of fermentation on the phytochemical contents and antioxidant properties of plant foods. *Advances in Fermented Foods and Beverages*, 107–122.

Yeung, A. W. K., Tzvetkov, N. T., Gupta, V. K., Gupta, S. C., Orive, G., Bonn, G. K., …& Atanasov, A. G. (2019). Current research in biotechnology: Exploring the biotech forefront. *Current Research in Biotechnology*.

Yu, J., & Ahmedna, M. (2013). Functional components of grape pomace: their composition, biological properties and potential applications. *International Journal of Food Science & Technology*, 48(2), 221-237.

Yuliana, N. D., Hunaefi, D., Goto, M., Ishikawa, Y. T., & Verpoorte, R. (2021). Measuring the health effects of food by metabolomics. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1–15.

Zang, Z., Chou, S., Geng, L., Si, X., Ding, Y., Lang, Y., …& Tian, J. (2021). Interactions of blueberry anthocyanins with whey protein isolate and bovine serum protein: Color stability, antioxidant activity, in vitro simulation, and protein functionality. *LWT*, 152, 112269.

Zhang, A. H., Sun, H., Han, Y., Yan, G. L., Yuan, Y., Song, G. C., Yuan, X. X., Xie, N., & Wang, X. J. (2013). Ultraperformance liquid chromatography-mass spectrometry based comprehensive metabolomics combined with pattern recognition and network analysis methods for characterization of metabolites and metabolic pathways from biological data sets. *Analytical chemistry*, 85(15), 7606–7612.

Zhang, A., Sun, H., Wang, P., Han, Y., & Wang, X. (2012). Modern analytical techniques in metabolomics analysis. *The Analyst*, 137(2), 293–300.

Zhang, J., Hu, Q., Yu, Q., Chen, Y., Zhao, Y., & Qie, M. (2020). Metabolomics analysis in food authentication. *Reference Module in Food Science*.

Zhang, J., Yu, Q., Cheng, H., Ge, Y., Liu, H., Ye, X., & Chen, Y. (2018). Metabolomic approach for the authentication of berry fruit juice by Liquid Chromatography Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry coupled to chemometrics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(30), 8199–8208.

Zhang, Y., Chang, S. K. C., Stringer, S. J., & Zhang, Y. (2017). Characterization of titratable acids, phenolic compounds, and antioxidant activities of wines made from eight mississippi-grown muscadine varieties during fermentation. *LWT*, 86, 302–311.

Zhang, Y., Henning, S. M., Lee, R. P., Huang, J., Zerlin, A., Li, Z., & Heber, D. (2015). Turmeric and black pepper spices decrease lipid peroxidation in meat patties during cooking. *International journal of food sciences and nutrition*, 66(3), 260–265.

Zhang, Z., Lv, G., Pan, H., Fan, L., Soccol, C. R., & Pandey, A. (2012). Production of powerful antioxidant supplements via solid-state fermentatin of wheat (Triticum aestivum Linn.) by cordyceps militaris. *Food Technology and Biotechnology*, 50(1), 32–39.

Zhishen, J., Tang, M., & Wu, J. (1999). The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry*, 64: 555–559.

Zhu, J., Wang, L., Xiao, Z., & Niu, Y. (2018). Characterization of the key aroma compounds in mulberry fruits by application of gas chromatography–olfactometry (GC-O), odor activity value (OAV), gas chromatography-mass spectrometry (GC–MS) and flame photometric detection (FPD). *Food Chemistry*, 245, 775–785.

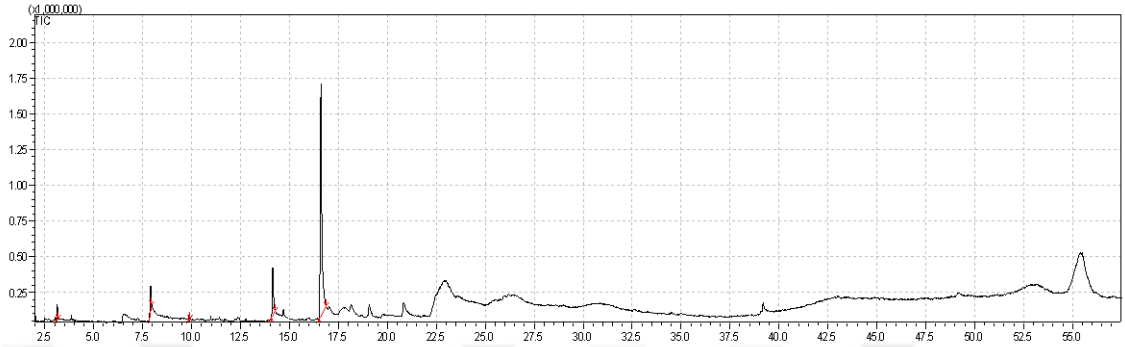
Zorraquín-Peña, I., Taladrid, D., Tamargo, A., Silva, M., Molinero, N., de Llano, D. G., …& Moreno-Arribas, M. V. (2021). Effects of wine and ıts microbial-derived metabolites on ıntestinal permeability using simulated gastrointestinal digestion/colonic fermentation and Caco-2 ıntestinal cell models. *Microorganisms*, 9(7), 1378.

Zoubiri, L., Bakir, S., Barkat, M., Carrillo, C., & Capanoglu, E. (2019). Changes in the phenolic profile, antioxidant capacity and *in vitro* bioaccessibility of two Algerian grape varieties, Cardinal and Dabouki (Sabel), during the production of traditional sun-dried raisins and homemade jam. *Journal of Berry Research*, 1–16.

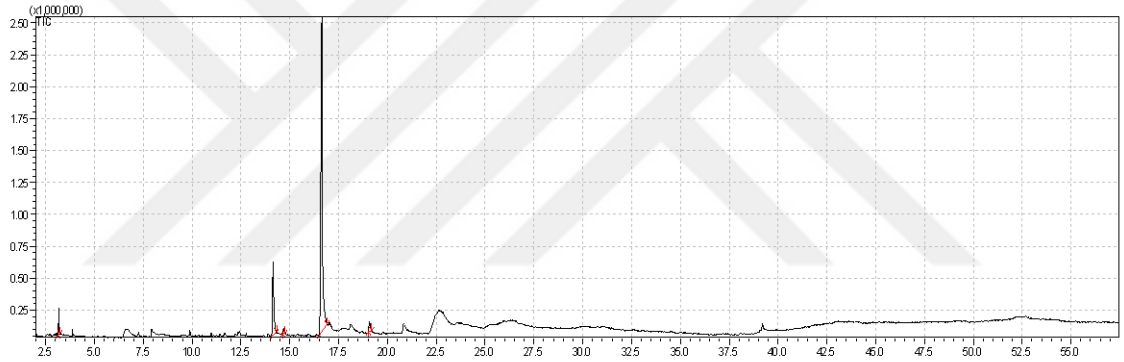
Zunino, S. J. (2009). Type 2 diabetes and glycemic response to grapes or grape products. *The Journal of Nutrition*, 139(9), 1794S–1800S.

A

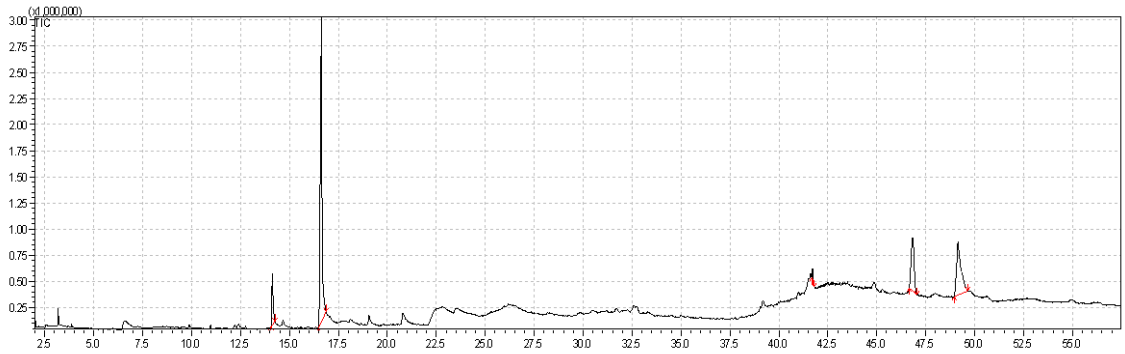
HPLC Kromatogram ve Pikleri



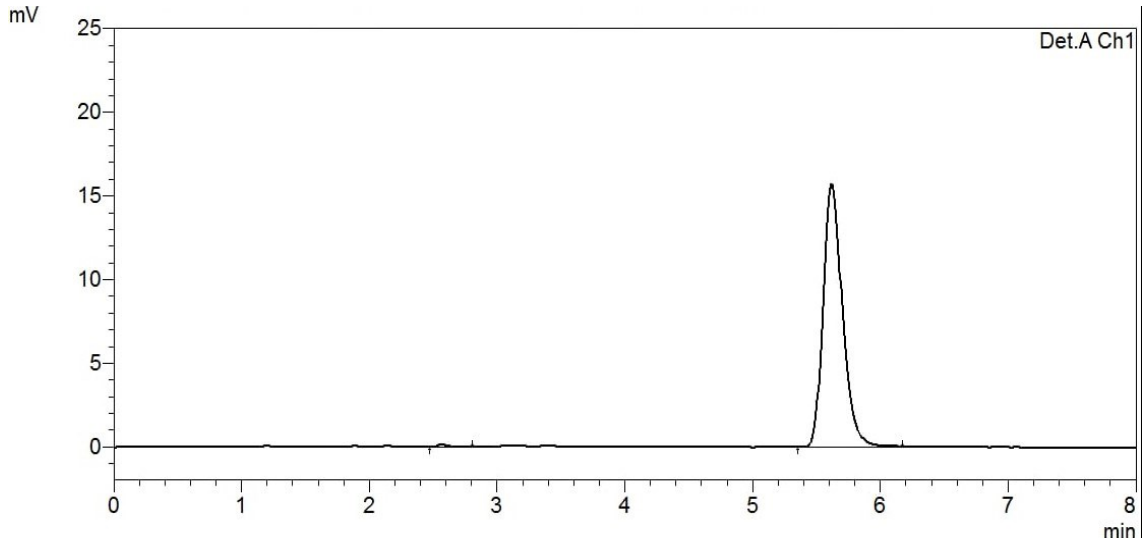
Şekil A-1 Shiraz hardaliye örneğine ait uçucu bileşen kromatogramı



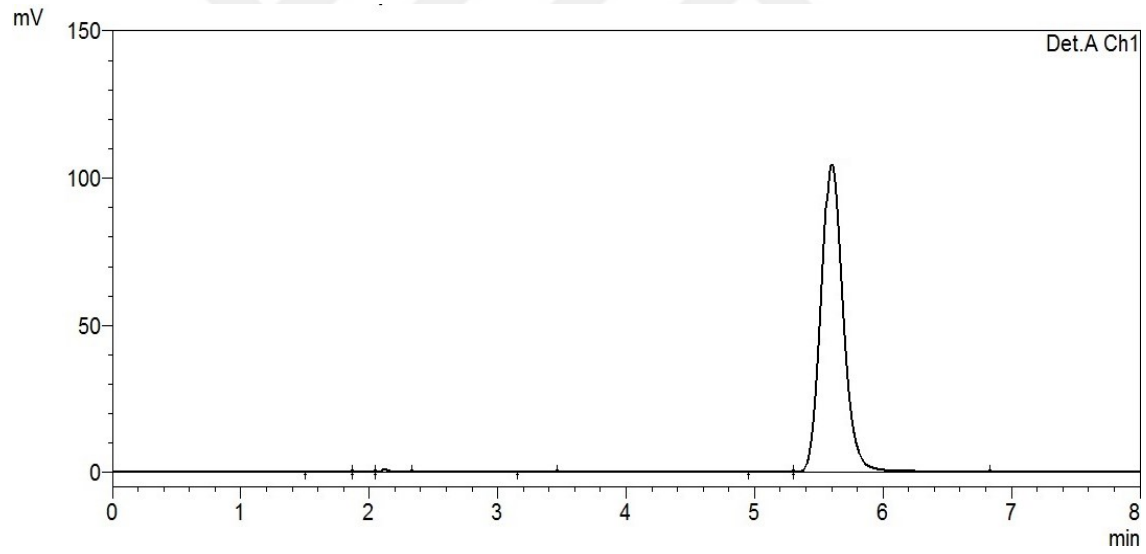
Şekil A-2 Merlot hardaliye örneğine ait uçucu bileşen kromatogramı



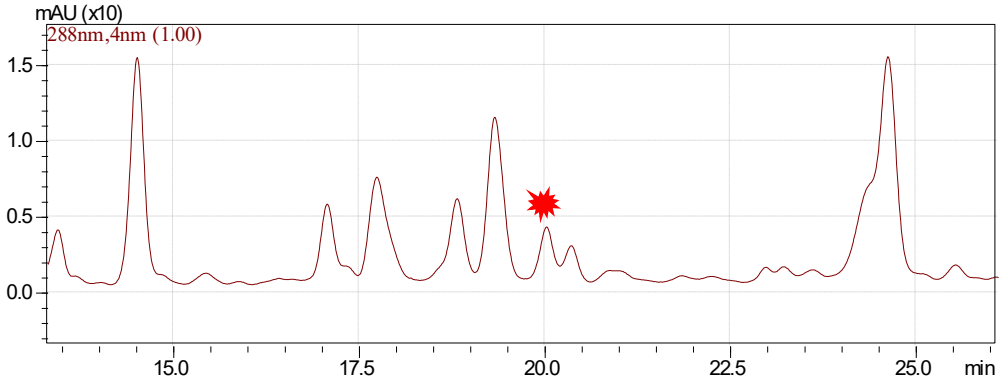
Şekil A-3 Cabernet Sauvignon hardaliye örneğine ait uçucu bileşen kromatogramı



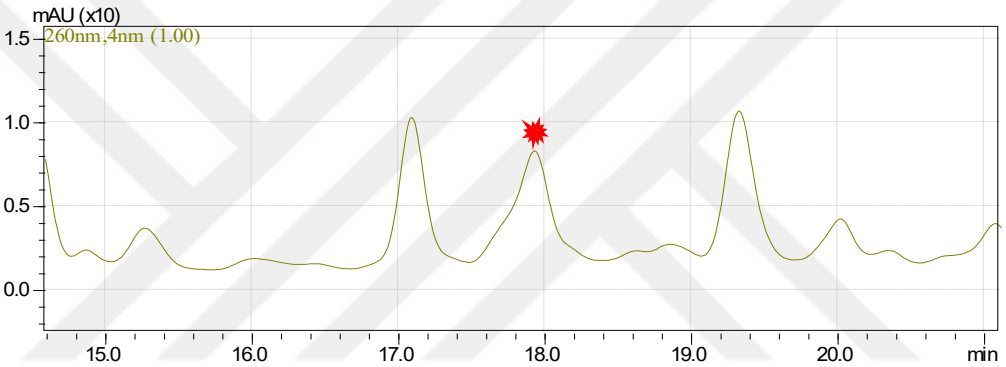
Şekil A-4 MDA standardına ait kromatogram (2ppm)



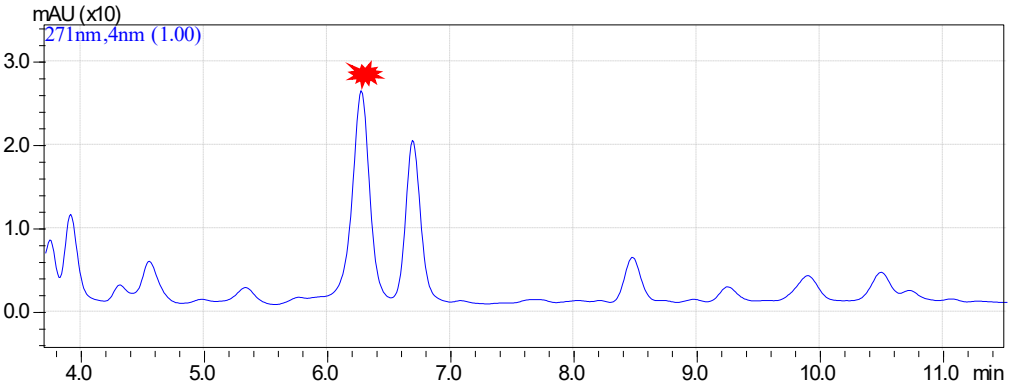
Şekil A-5 Döner örneğine ait MDA kromatogramı



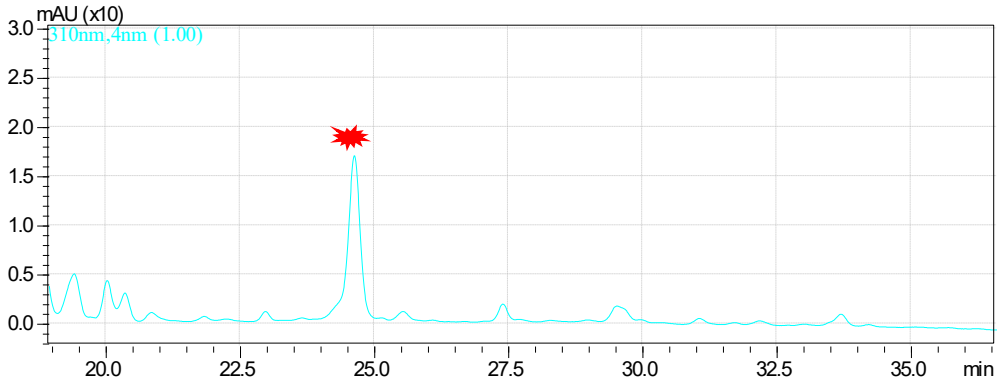
Şekil A-6 Epikateşin piki



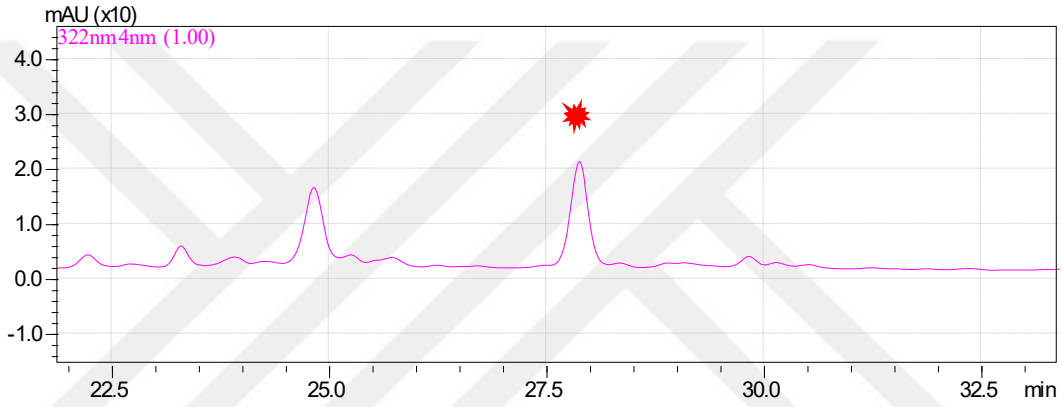
Şekil A-7 Vanilik asit piki



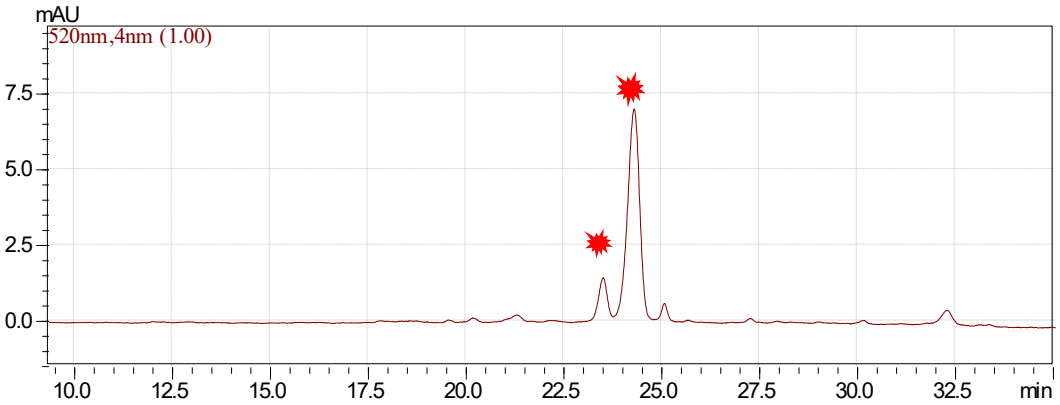
Şekil A-8 Gallik asit piki



Şekil A-9 p-Kumarik asit piki



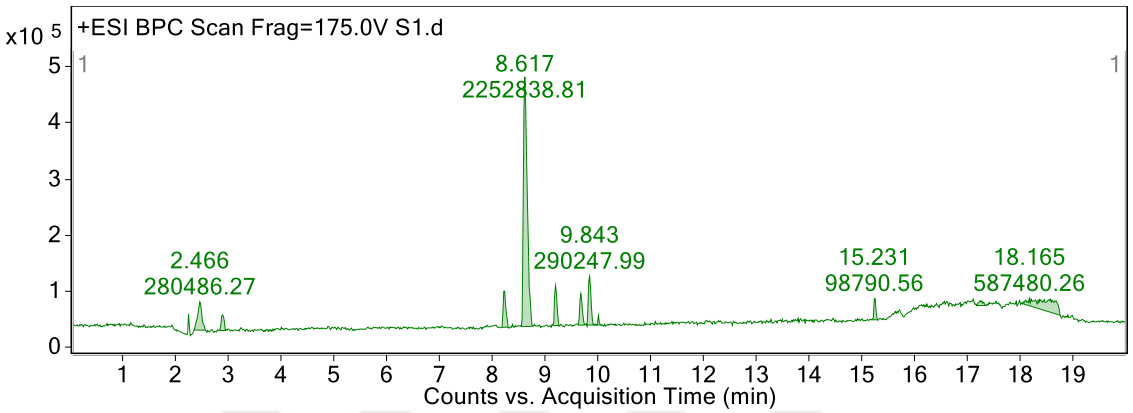
Şekil A-9 Ferulik asit piki



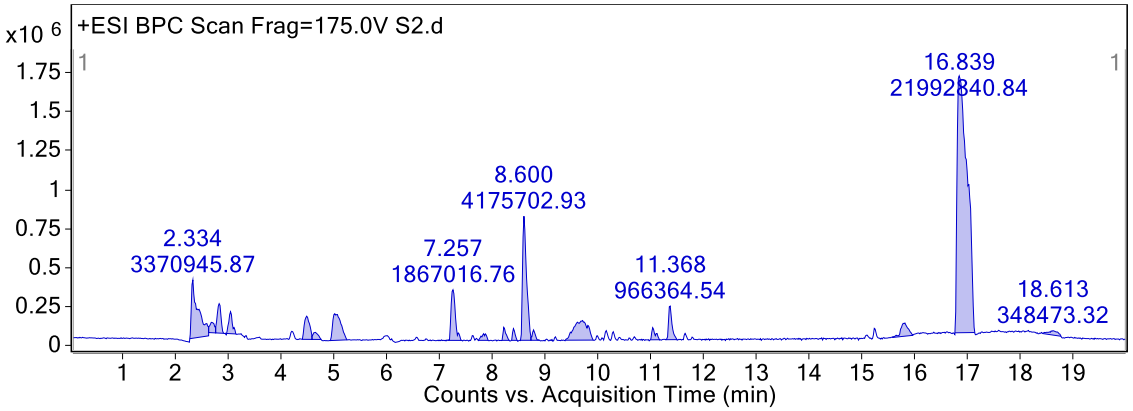
Şekil A-10 Peonidin ve Malvidin pikleri

B

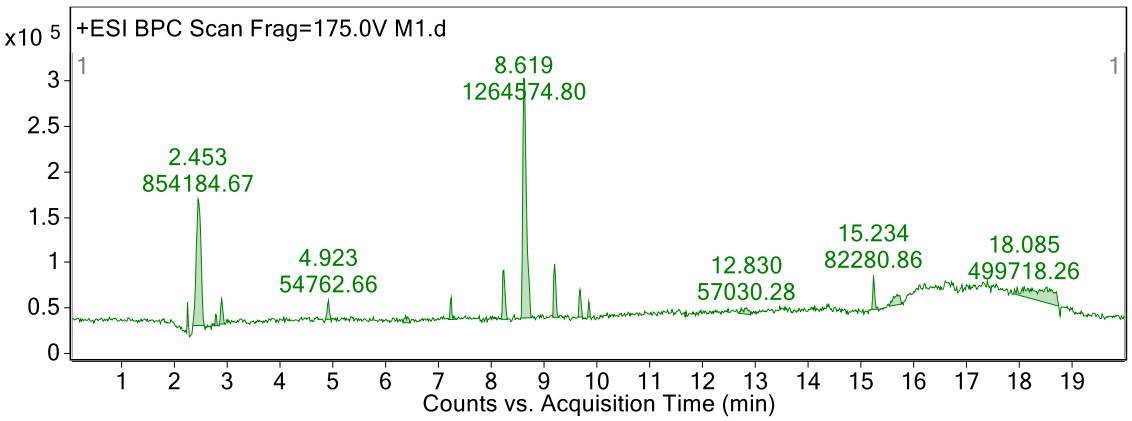
LC-MS Kromatogramları



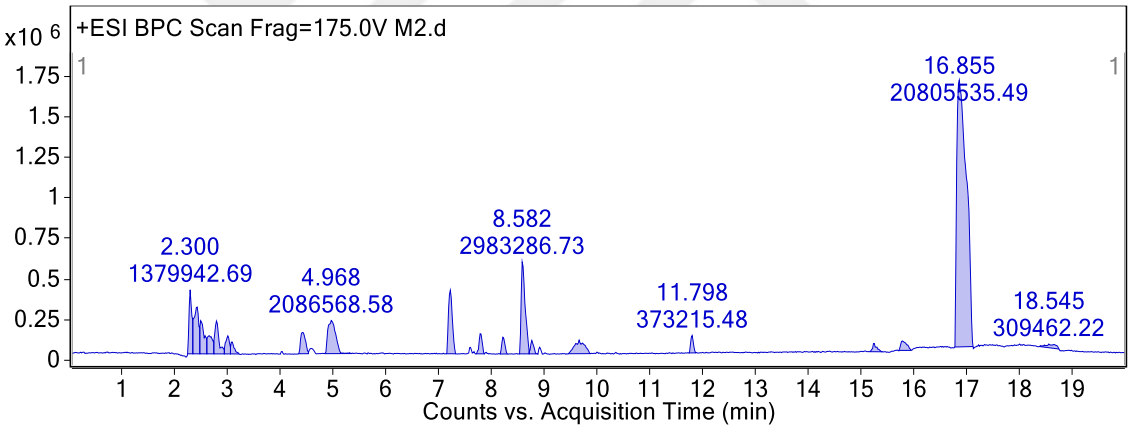
Şekil B-1 S1 örneğine ait metabolit kromatogramı



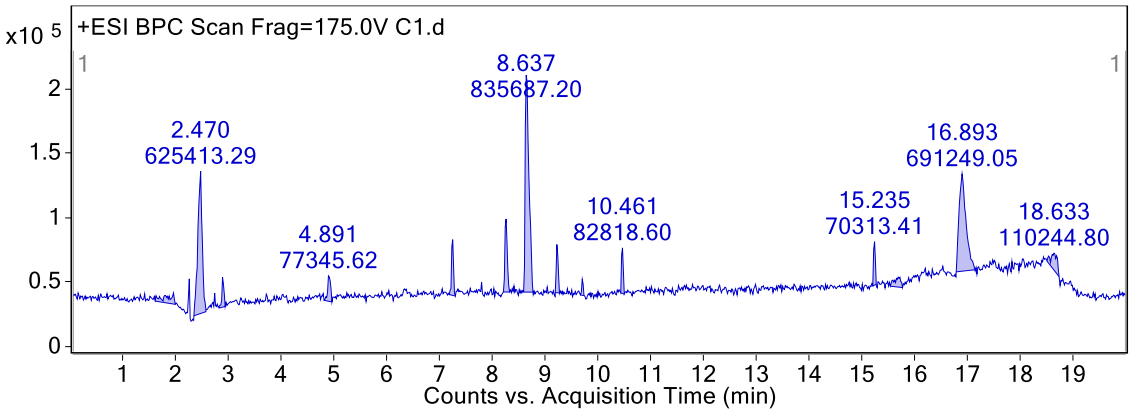
Şekil B-1 S2 örneğine ait metabolit kromatogramı



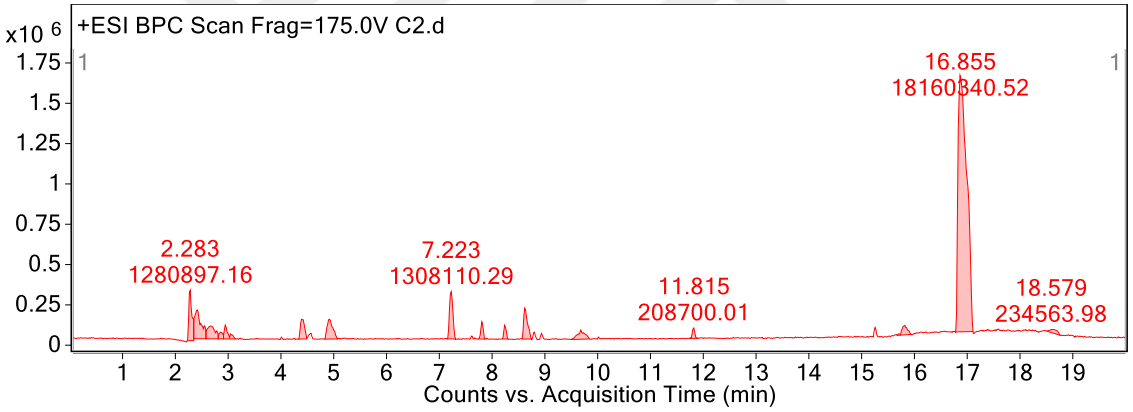
Şekil B-1 M1 örneğine ait metabolit kromatogramı



Şekil B-1 M2 örneğine ait metabolit kromatogramı



Şekil B-1 C1 örneğine ait metabolit kromatogramı



Şekil B-1 C2 örneğine ait metabolit kromatogramı

TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR

Konferans Bildirileri

1. Aksoy, A. S., & Arıcı, M. (2019). Determination of Some Bioactive Components in Hardaliye, Tam metin bildiri, International Marmara Sciences Congress, 01-03 Kasım 2019, 819.

Makaleler

1. Aksoy, A. S., Arici, M., & Yaman, M. (2022). The effect of hardaliye on reducing the formation of malondialdehyde during *in vitro* gastrointestinal digestion of meat products. *Food Bioscience*, 101747.

Projeler

1. Yıldız Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi Koordinasyon Merkezi (BAP) FDK- 2019-3604 numaralı proje.

Proje adı: Hardaliye Biyoaktik Bileşiklerinin Potansiyel Biyolojik Etkilerine *invitro* Metabolomik Yaklaşımlar

Yürütücü: Prof.Dr. Muhammet ARICI

Arştırmacılar: Ayşe Semra AKSOY