

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KARAMUK BİTKİSİNDEN EKSTRAKTE EDİLEN DOĞAL RENK
MADDELERİNİN STABİLİTESİNİN ARTIRILMASI VE ÇEŞİTLİ
GIDA ÜRÜNLERİNDE RENKLENDİRİCİ OLARAK
KULLANILABİLİRLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI

Mehmet DEMİRCİ

DOKTORA TEZİ

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Gıda Mühendisliği Programı

Danışman

Doç. Dr. Salih KARASU

Ağustos, 2021

T.C.

YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KARAMUK BİTKİSİNDEN EKSTRAKTE EDİLEN DOĞAL RENK
MADDELERİNİN STABİLİTESİNİN ARTIRILMASI VE ÇEŞİTLİ
GIDA ÜRÜNLERİNDE RENKLENDİRİCİ OLARAK
KULLANILABİLİRLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI**

Mehmet DEMİRCİ tarafından hazırlanan tez çalışması 12.07.2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Gıda Mühendisliği Programı **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Salih KARASU
Yıldız Teknik Üniversitesi
Danışman

Jüri Üyeleri

Doç. Dr. Salih KARASU, Danışman

Yıldız Teknik Üniversitesi

Prof. Dr. Osman SAĞDIÇ, Üye

Yıldız Teknik Üniversitesi

Dr. Öğr. Üyesi Halime PEHLİVANOĞLU, Üye

Namık Kemal Üniversitesi

Doç. Dr. Enes DERTLİ, Üye

Yıldız Teknik Üniversitesi

Doç. Dr. Mustafa YAMAN, Üye

İstanbul Sabahattin Zaim Üniversitesi

Danışmanım Doç. Dr. Salih KARASU sorumluluğunda tarafımca hazırlanan Karamuk Bitkisinden Ekstrakte Edilen Doğal Renk Maddelerinin Stabılitesinin Artırılması ve Çeşitli Gıda Ürünlerinde Renklendirici Olarak Kullanılabilirliğinin Araştırılması 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.

Mehmet DEMİRCİ

İmza

Bu alışma, TÜBİTAK 1512-Teknogirişim Sermayesi Desteği Programı (BiGG) 2180700 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

Canım Aileme...

TEŞEKKÜR

Doktora çalışmam boyunca bilgi ve birikimleriyle beni yönlendiren, her konuda ve her zaman yardımını hiç esirgemeyen çok değerli danışman hocam Doç. Dr. Salih KARASU' ya en içten duygularla saygı ve şükranlarımı sunarım. Lisans eğitimimden doktora eğitimime kadar öğrencisi olmaktan gurur duyduğum saygıdeğer hocam Prof. Dr. Osman SAĞDIÇ' a ve iş hayatım boyunca her zaman hiçbir yardımını esirgemeyen çok değerli hocam Dr. Öğr. Üyesi Halime PEHLİVANOĞLU' na teşekkürü bir borç bilirim.

Çalışmam süresince desteklerini esirgemeyen can arkadaşlarım Adil ÇAVUŞ' un babası Mustafa ÇAVUŞ, Ahsen Vera ŞAHİNER' in babası Abdulkadir ŞAHİNER ve iş ve ev arkadaşım M. Yusuf ÇAĞLAR' a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

En önemlisi bugünlere gelmemde en büyük paya sahip olan canlarım annem Vesile DEMİRCİ ve babam Kamuran DEMİRCİ' ye; her daim yanımda olan kardeşlerim biricik Kıymet DEMİRCİ, Demet DEMİR, Buket YILDIZ ve Sena DEMİRCİ' ye; minicik tebessümleri bile her olumsuzluğu unutturan yeğenlerim Burak GÖKALP, Alper DEMİR ve Aysima DEMİR' e ve hayatıma girdiği günden bu yana her günümü ayrı güzelleştirilen Cd. Şeyma Nur BİLGİN' e sonsuz teşekkür ederim. İyi ki varsınız...

Mehmet DEMİRCİ

İÇİNDEKİLER

SİMGE LİSTESİ	viii
KISALTMA LİSTESİ	ix
ŞEKİL LİSTESİ	x
TABLO LİSTESİ	xii
ÖZET	xiii
ABSTRACT	xv
1 GİRİŞ	1
1.1 Literatür Özeti.....	1
1.1.1 Gıdalarda Rengin Önemi	1
1.1.2 Sentetik Gıda Boyaları	2
1.1.3 Doğal Gıda Boyaları.....	10
1.1.4 Antosiyaninler	25
1.1.5 Antosiyanin Ekstraksiyon Metotları	29
1.1.6 Antosiyanin Stabilitesini Etkileyen Faktörler	34
1.1.7 Antosiyanin Stabilite Artırma Metotları	36
1.1.8 Karamuk (<i>Berberis crataegina</i> DC.)	46
1.2 Tezin Amacı	47
1.3 Hipotez	49
2 MATERYAL VE YÖNTEM	50
2.1 Materyal.....	50
2.2 Metot	50
2.2.1 Ekstraksiyon	50
2.2.2 Seperasyon Kolonunun Hazırlanması ve Antosiyanin Saflaştırma	51
2.2.3 Kopigmentasyon	55
2.2.4 Toplam Antosiyanin Miktarının Belirlenmesi (pH değişim metodu)	55
2.2.5 Toplam Fenolik Madde Miktarı.....	56
2.2.6 Toplam Flavonoid İçeriği	56
2.2.7 Antioksidan Aktivite Tayini (DPPH)	57
2.2.8 Antosiyanin Profilinin HPLC ile Belirlenmesi	57
2.2.9 Kinetik Parametrelerin Belirlenmesi	58

2.2.10 Enkapsülasyon.....	58
3 BULGULAR VE TARTIŞMA	61
3.1 Karamuk Bitkisinin Ultrasonik Ekstraksiyonu	61
3.1.1 Kopigmentasyon için Antosiyanin Ekstraksiyonu	66
3.2 Antosiyanin Profilinin HPLC ile Belirlenmesi.....	67
3.3 Toplam Flavonoid İçeriği	70
3.4 DPPH- Radikal Süpürme Aktivitesi.....	72
3.5 Termal Degradasyon Çalışmaları.....	73
3.5.1 Fenolik Bileşiklerin İlavesi	73
3.5.2 Metal İyonlarının Eklenmesi	88
3.5.3 Siklodekstrinlerin İlavesi	99
3.5.4 Örnek Ürün Denemeleri	107
4 SONUÇ VE ÖNERİLER	110
KAYNAKÇA	112
TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR	130

SİMGE LİSTESİ

α	Alfa
β	Beta
rpm	Dakikadaki devir sayısı (round per minute)
kg	Kilogram
kJ	Kilojul
kV	Kilovolt
Mpa	Mega paskal
μL	Mikrolitre
μm	Mikrometre
mg	Miligram
mm	Milimetre
mM	Milimolar
M	Molar
nm	Nanometre
C_o	Örneğin başlangıç antosiyanin miktarı
C_t	Örneğin t zaman sonundaki antosiyanin miktarı
k	Reaksiyon hız sabiti
$^{\circ}\text{C}$	Santigrat derece
$t_{1/2}$	Yarılanma süresi

KISALTMA LİSTESİ

ADI	Günlük Kabul Edilebilir Alım Miktarı (Acceptable daily intake)
Co	Kobalt
DEHB	Dikkat eksikliği hiperaktivite bozukluğu
EFSA	Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi (European Food Safety Authority)
FAO	Gıda ve Tarım Örgütü (Food and Agriculture Organization)
FDA	Gıda ve İlaç İdaresi (ABD)
JECFA	Gıda Katkı Maddeleri Uzman Komitesi (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives)
Mg	Magnezyum
Ni	Nikel
PPO	Polifenol Oksidaz Enzimi
TA	Toplam Antosiyanin
TFM	Toplam Fenolik Madde
TGK	Türk Gıda Kodeksi
TRH	Tirotropin salgılayıcı hormon
RSM	Yanıt Yüzey Yöntemi
UE	Ultrasonik Ekstraksiyon
v.a.	Vücut ağırlığı
WHO	Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organization)

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1.1	Bazı sentetik boyaların kimyasal yapıları.....	7
Şekil 1.2	Bazı izoprenoidlerin kimyasal yapısı.	13
Şekil 1.3	Likopen ve izomerlerinin kimyasal yapısı.	16
Şekil 1.4	Doğal olarak oluşan bazı tetrapirollerin kimyasal yapısı.....	19
Şekil 1.5	Betalainlerin kimyasal yapısı.....	21
Şekil 1.6	Karminin kimyasal yapısı	22
Şekil 1.7	Benzopiranların kimyasal yapısı.....	24
Şekil 1.8	Flavilyum Katyonu	27
Şekil 2.1	Seperasyon kolonunun hazırlanması.....	52
Şekil 2.2	Örneğin kolondan geçirilmesi	53
Şekil 2.3	Kolonun yıkanması ve resinin alınması	54
Şekil 2.4	Sprey kurutucu ile ürünün toz formunun eldesi.....	60
Şekil 3.1	Gallik asit kalibrasyon eğrisi.....	62
Şekil 3.2	TFM üzerine ultasonik işlem parametrelerinin 3-boyutlu yanıt yüzey verileri	63
Şekil 3.3	TA miktarı üzerine ultrasonik işlem parametrelerinin 3-boyutlu yanıt yüzey verileri	63
Şekil 3.4	Antosiyanin standartlarına ait HPLC kromatogramı	69
Şekil 3.5	Karamuk örneğine ait HPLC kromatogramı.....	69
Şekil 3.6	Farklı konsantrasyonlarda kuersetinin kalibrasyon eğrisi	71
Şekil 3.7	Kontrol örneğine ait antosiyanin kayıpları.....	73
Şekil 3.8	Fraklı oranlarda rutin içeren örneklerle ait antosiyanin kayıpları	76
Şekil 3.9	Farklı oranlarda kuersetin içeren örneklerle ait antosiyanin kayıpları.....	80
Şekil 3.10	Farklı oranlarda klorojenik asit içeren örneklerle ait antosiyanin kayıpları.....	84
Şekil 3.11	Alüminyum klorür içeren örneklerin antosiyanin kayıpları.....	90
Şekil 3.12	Farklı oranlarda ferrik sodyum tuzu içeren örneklerin antosiyanin kayıpları.....	93
Şekil 3.13	Magnezyum oksit içeren örneklerin antosiyanin kayıpları	96
Şekil 3.14	Farklı konsantrasyonlarda α -siklodekstrin içeren örneklerin antosiyanin kayıpları.....	101

Şekil 3.15	Farklı konsantrasyonlarda β -siklodekstrin içeren örneklerin antosiyanin kayıpları.....	102
Şekil 3.16	Stabilitesi en yüksek konsantrasyonu içeren renklendiriciler ile üretilmiş	107
Şekil 3.17	Stabilitesi en yüksek konsantrasyonu içeren renklendiriciler ile üretilmiş kurabiye ve hamuru	107
Şekil 3.18	Stabilitesi en yüksek konsantrasyonu içeren renklendiriciler ile üretilmiş kek ve hamuru	108
Şekil 3.19	Stabilitesi en yüksek konsantrasyonu içeren renklendiriciler ile üretilmiş yogurt	108
Şekil 3.20	Stabilitesi en yüksek konsantrasyonu içeren renklendiriciler ile üretilmiş pasta kreması	109

TABLO LİSTESİ

Tablo 1.1	Gıda endüstrisinde sıklıkla kullanılan yapay renklendiriciler	4
Tablo 1.2	Gıdalarda bulunan karotenoidler ve miktarları ($\mu\text{g}/100\text{g}$)	12
Tablo 1.3	Antosiyanidinler, molekül yapısı ve verdiği renkler.....	27
Tablo 2.1	Box-Behnken dizaynı için bağımsız değişkenler ve değişkenlerin seviyeleri.....	51
Tablo 3.1	17 farklı ekstraksiyon modeli uygulanarak elde edilen TFM ve TA ait veriler	61
Tablo 3.2	ANOVA yanıt yüzey quadratic model	65
Tablo 3.3	Farklı oranlarda etanol ile aktifleştirilen kolonun verimi.....	66
Tablo 3.4	Karamuk örneğine ait antosiyanin miktarları ($\text{mg}/100\text{g}$)	68
Tablo 3.5	Toplam flavonoid içeriği	71
Tablo 3.6	Kontrol örneğinin termal degradasyon parametreleri.....	73
Tablo 3.7	Farklı konsantrasyonlarda rutin içeren örneklerin termal degradasyon parametreleri ve kayıp miktarları	75
Tablo 3.8	Farklı konsantrasyonlarda kuersetin içeren örneklerin termal degradasyon parametreleri	79
Tablo 3.9	Farklı oranlarda klorojenik asit içeren örneklerin termal degradasyon parametreleri	83
Tablo 3.10	Fenolik bileşiklerin kendi aralarında kıyaslanması	87
Tablo 3.11	Farklı oranlarda alüminyum klorür içeren örnekler için termal degradasyon verileri	89
Tablo 3.12	Farklı oranlarda ferrik sodyum tuzu içeren örneklerin termal degradasyon verileri	92
Tablo 3.13	Farklı konsantrasyonlarda magnezyum oksit içeren örneklerin termal degradasyon verileri	95
Tablo 3.14	Metal iyonlarının kendi arasında kıyaslanması	98
Tablo 3.15	Farklı konsantrasyonlarda alfa siklodekstrin içeren örnekler için termal degradasyon verileri	100
Tablo 3.16	Farklı konsantrasyonlarda β –siklodekstrin içeren örneklerin termal degradasyon parametreleri	103
Tablo 3.17	Siklodekstrinlerin kendi arasında kıyaslanması.....	106

Karamuk Bitkisinden Ekstrakte Edilen Doğal Renk Maddelerinin Stabilesinin Artırılması ve Çeşitli Gıda Ürünlerinde Renklendirici Olarak Kullanılabilirliğinin Araştırılması

Mehmet DEMİRCİ

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Doktora Tezi

Danışman: Doç. Dr. Salih KARASU

Bu tez çalışmasında ülkemizde farklı yörelerde yetişen endemik bir bitki olan karamuk (*Berberis crataegina* DC.) bitkisinden izole edilen antosiyaninlerin farklı bileşikler kullanılarak kopigmentasyonu ile ısıl stabilesinin artırılması amaçlanmıştır. İlk olarak, antosiyanin ekstraksiyonu için uygulanacak yüksek ses parametreleri yüzey yanıt yöntemi ile belirlenmiştir. Optimum koşulların belirlenmesinde toplam antosiyanin miktarı ve toplam fenolik madde içeriği kullanılmıştır. Yüksek ses uygulamasında şiddet ve sürenin artışı doğrudan ekstraksiyon verimini artırmıştır. Elde edilen antosiyaninlerin HPLC ile Karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir. HPLC ile belirlenen antosiyaninler içerisinde malvidin-3-glikozit en baskın olanı olmuştur. Antosiyaninler, Amberlite XAD-7HP makro resini yardımı ile şekerler ve diğer organik asitlerden ayrılarak %89,67 oranında saflaştırılmıştır. Saflaştırılan antosiyaninlere farklı oranlarda (1:5, 1:10 ve 1:20) fenolik bileşikler, metal iyonları ve siklodekstrinler ilave

edilerek 70°C, 80°C ve 90°C' de 210 dakika su banyosunda tutulup termal degradasyon parametreleri birinci derece kinetik model ile ifade edilmiştir. Rutin, klorojenik asit ve kuersetin katılan fenolik bileşikler iken alüminyum klorür, ferrik sodyum tuzu ve magnezyum oksit ilave edilen metal iyonları olmuştur. Fenolik bileşik ilaveli örneklerle uygulanan tüm sıcaklık değerlerinde etkinlik sırası klorojenik asit>rutin>kersetin şeklinde olmuştur. Metal iyonlarında ise 1:5 ve 1:10 konsantrasyonlarında en etkili ajan ferrik sodyum tuzu olurken 1:20 konsantrasyonda en etkili ajan alüminyum klorür olmuştur. Uygulanan tüm sıcaklık değerlerinde magnezyum oksit çok fazla etki göstermemiştir. Katılan siklodekstrinlerde ise 1:5 konsantrasyonda alfa ve beta siklodekstrin benzer etki gösterirken 1:10 ve 1:20 konsantrasyonda alfa siklodekstrin daha etkili bir ajan olmuştur. Çalışma sonucunda, karamuk bitkisinden antosiyaninler yüksek saflıkta izole edilebilmiştir. Uygulanan moleküler kopigmentasyon ile de sıcaklık dayanımı artırılmış ve potansiyel bir gıda renklendiricisi olabileceği ortaya konmuştur.

Anahtar Kelimeler: karamuk, antosiyanin, termal stabilite, kopigmentasyon

Increasing the Stability of Natural Colorants Extracted from Karamuk Plant and Investigation of Usability as Colorant in Different Food Products

Mehmet DEMİRCİ

Department of Food Engineering

Doctor of Philosophy Thesis

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Salih KARASU

In the present thesis, it was aimed to increase the thermal stability of anthocyanins isolated from karamuk (*Berberis crataegina* DC.), an endemic plant grown in different regions of our country, by copigmentation by using different compounds. First, the ultrasound parameters for optimum anthocyanin extraction were determined by the surface response methodology. Total phenolic compounds and total anthocyanin content were used to determine the optimum conditions. The increase in amplitude and duration in ultrasound process directly increased the extraction yield. Among the anthocyanins determined by HPLC, malvidin-3-glycoside was found to be the most dominant. Anthocyanins were separated from sugars and other organic acids using Amberlite XAD-7HP resin and purified by 89.67%. After adding phenolic compounds, metal ions and cyclodextrins in different ratios (1:5, 1:10 and 1:20), samples were put in water-bath at 70°C, 80°C and 90°C for 210 minutes, and thermal degradation parameters were expressed by first order kinetic model. While the rutin, chlorogenic acid, and quercetin were added phenolic compounds, while aluminum chloride, ferric sodium salt, and magnesium oxide were the metal ions. The order of increasing thermal stability

was chlorogenic acid>rutin>quercetin at all temperature values. In metal ions, the most effective agent was found to be as ferric sodium salt at 1:5 and 1:10 concentrations, while aluminum chloride was the most effective agent at 1:20 concentration. Magnesium oxide did not show much effect at all applied temperature values. In the added cyclodextrins, alpha and beta cyclodextrin at 1:5 concentrations showed similar effects, while alpha cyclodextrin at 1:10 and 1:20 concentrations was more effective. As a result of the study, anthocyanins could be isolated from barberry plant with high purity. With the applied molecular copigmentation, its temperature resistance could be increased and, thus it could be a potential food colorant.

Keywords: karamuk, anthocyanin, thermal stability, copigmentation.

1.1 Literatür Özeti

1.1.1 Gıdalarda Rengin Önemi

Gıda seçiminde, gıdanın duysal özelliklerinin yanında tüketici beklentileri ve bağlamsal faktörler önemli bir rol oynamaktadır (Piqueras-Fiszman, Alcaide, Roura, & Spence, 2012). Gıdaların tüketici tarafından fark edilen ilk özelliklerinden olan renk, gıdalardaki en önemli duysal kalite parametrelerinden biridir. Renk, doğrudan gıdanın besleyici, aroma ya da fonksiyonel özelliklerini yansıtmaya da ürünün tüketici tarafından kabul edilebilirliğinin başlıca belirleyicisidir (Sahin & Sumnu, 2006). Gıda ve içeceklerin renkleri, aroma özellikleri (Cynthia N., Armand V., & Maller, 1980), kalite özellikleri (Dominique, Wendy V., Dominique, Claire, & Jordi, 2016), daha yoğun bir tat (Carlos, Ana, & Fiszman, 2001), besleyici değer (Francesco, Giulio, & Raffaella Ida, 2016), tüketim miktarı (Kahn & Brian, 2004) gibi tüketim öncesi farklı algıları uyarmaktadır. Özet olarak renk, gıdaların estetik, güvenlik, tat, koku ve tekstürel özellikleri başta olmak üzere kabul edilebilirliklerinde hayati rol oynamaktadır (Charles, Carmel, Maya U., & Zampini, 2010). Eğer bir gıdanın rengi çekici değilse, insanda tadı ve aromasının da kötü olabileceği kanaati oluşmaktadır. Gıdanın rengi duysal algıyı doğrudan etkilemesinin yanı sıra fiziksel ve fizyolojik de reaksiyonlara neden olmaktadır (Nayane Aparecida Araújo, Suzana Borges, Lucilene Soares, & Ivy Scorzi Cazelli, 2012).

Gıdalar, işleme ve depolama gibi süreçlerde birçok farklı dış etkiye maruz kaldıklarından ürünün son rengi olumsuz etkilenmekte ve tüketici kabulünde sorun yaşanmaktadır. Bu nedenle gıdaların renklerinde oluşabilecek istenmeyen özelliklerin maskelenmesi için renklendiriciler kullanılmaktadır (Natália, Custódio Lobo, Patricia, Lillian, & Isabel C.F.R., 2016). Renklendiriciler gıdalara farklı amaçlar ile katılmaktadır. Bazıları şu şekilde sıralanabilir.

- Işık, yüksek sıcaklık, nem ve depolama koşulları gibi gıdaların maruz kaldığı süreçlerde meydana gelen renk kaybını en aza indirmek,

- Gıdanın kimliğini oluşturmak,
- Gıdalara daha çekici görünüm kazandırmak,
- Gıdaların renk yoğunluğunu artırmak,
- Aroma ve vitaminlerin ışıktan zarar görmesini engellemek,
- Fırıncılık ürünü gibi ürünlerde süsleme yapmak (Michalina & Christopher T., 2017; Manish, M P, & T M Pramod, 2017).

Gıdalara, farklı amaçlar için katılan renklendiricileri elde ediliş yöntemlerine göre doğal renklendiriciler ve yapay (sentetik) renklendiriciler olarak iki ana grupta toplayabiliriz.

1.1.2 Sentetik Gıda Boyaları

Sentetik gıda boyaları, su ve yağ çözünürlükleri iyi, ilave bir işlem gerektirmeden gıdalarda kolayca kullanabilen gıda katkı maddeleridir. Çoğunluğu asidik tabanlı olan sentetik gıda boyalarının büyük çoğunluğu kömür katranından üretilir ve kömür katranı boyaları şeklinde de adlandırılır (Rajapaksha, Wansapala, & Silva, 2015). Sentetik boyaların uygulandığı gıda grupları oldukça fazladır. Çoğunlukla, kek, bisküvi ve pasta gibi fırıncılık ürünleri, süt ürünleri, içecekler, dolgular, şekerlemeler, atıştırmalık ürünler ve sakızlar örnek verilebilir.

Renklendiricilerin boyama kapasitesi ve stabilitesi, kimyasal yapılarına ve içerdikleri kromofor gruplarına bağlıdır. Sentetik boyalar, kalsiyum tuzu olan patent mavisi hariç çoğunlukla asidik sodyum tuzlarıdır. Suda iyi çözünürlükleri en az bir molekül asidik grubun (sülfon grubu – SO₃ H, karboksilik grup – COOH) olmasından ileri gelmektedir. Sentetik boyalar ayrıca, sorbitol, propilen glisöl ve gliserinde de çözünebilir (Carocho, Barreiro, Morales, & Ferreira, 2014). Gıdalarda sıklıkla kullanılan sentetik boyalardan bazılarının kimyasal yapısı şekil 1.1’ de verilmiştir.

Sentetik boyaların gıda endüstrisinde çokça tercih edilmesinin başlıca sebepleri şu şekildedir.

- Renklendirici özellikleri çok iyidir,
- Üretimi kolay ve yüksek miktarda olabilmektedir,
- Ucuzdur,
- Isı, ışık, O₂ ve basınç gibi proses şartlarına oldukça dayanıklıdır,

- Katıldığı üründe herhangi olumsuz bir değişikliğe neden olmamaktadır (Downham & Collins, 2000; Rajapaksha, Wansapala, & Silva, 2015).

İçerisinde tartrazin, gün batımı sarısı, azorubin, amarant, koşinal kırmızısı, 2G kırmızı, Allura kırmızısı AC, brilliant black BN, HT bronz' un yer aldığı azo boyaları, en yaygın olarak kullanılan sentetik boyalardandır. Gıdaların yapısında doğal halde bulunan polisakkaritler, aldehitler, ketonlar ve askorbik asit gibi indirgeyici ajanların neden olabileceği renk kayıplarına karşı oldukça dayanıksızdırlar. Azo boyaları, hidrazin bileşiklerine hatta karsinogenik aktivitesi kanıtlanmış aromatik aminlere indirgenebilir (Rollas, 2010). Bu fenomen fırıncılık ürünleri mayalama ve fermantasyonda da meydana gelebilmektedir. Azo bileşikleri, kandaki eritrositlere bağlanarak anemi gibi hastalıkların oluşumunu da tetiklemektedir (Vojdani & Vojdani, 2015).

S yeşil, FCF parlak mavi ve patent mavi V gibi triarilometan boyaları, birçok farklı rengin eldesinde kullanılırken, ksantan boyası yalnızca çeri kırmızısı olup ışığa duyarsızdır. Indigoin, indigo karmin boyasının benzeri olup ışığa maruz kaldığında rengini kaybetmektedir. Kinolin boyası (kinolin sarısı) sarı-yeşil renkte olup selefi olduğu azo gruplarından tartrazine nazaran daha dayanıksızdır.

Kabul edilebilir günlük alım (ADI: Acceptable Daily intake), boyalar da dahil olmak üzere bütün gıda katkı maddelerinin toksisite açısından bir kalite ölçütüdür. ADI, Gıda Katkılarında Uzman FAO/WHO komitesi ve Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi (EFSA) tarafından belirlenmektedir. sentetik boyaların E kodları, genel kullanım alanları ve ADI değerleri tablo 1.1' de verilmiştir (Martins, Roriz, Morales, Barros, & Ferreira, 2016; Feketea & Tsabouri, 2017).

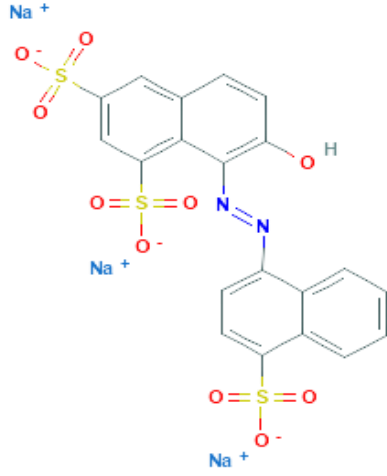
Tablo 1.1 Gıda endüstrisinde sıklıkla kullanılan yapay renklendiriciler

	Sentetik Renklendirici	E Kodu	ADI	Kullanım Alanları
Kırmızı-Turuncu Renk Veren	Allura kırmızısı AC	E129	7 mg/kg v.a.	Yumuşak içecekler ve işlenmiş et ürünleri
	Amarant	E123	0,8 mg/kg v.a.	İçecekler, alkollü içkiler ve havyar
	β-Karoten	E160a	5 mg/kg v.a.	Soslar, süt, baharat karışımları, soslar, içecekler, kaplamalar, meyve suları ve margarin
	Karminik asit	E120	5 mg/kg v.a.	Fırıncılık ürünleri, Şekerlemeler, soslar, dondurma, yoğurt, jeli bon, domates ürünleri, sakız, haplar, içecekler
	Azorubin	E122	4 mg/kg v.a.	Reçel, şekerlemeler, yoğurt
	Eritrosin	E127	0,1 mg/kg v.a.	Kokteyl ve şekerlemeler
	Lithol rubin BK	E180	1,5 mg/kg v.a.	Peynir dış kabuğu
	Ponso 4R	E124	4 mg/kg v.a.	Alkolsüz içecekler, tatlılar ve şekerlemeler
	Kırmızı 2G	E128	0,1 mg/kg v.a.	Dolgu malzemeleri ve et ürünleri
Mavi Renk Veren	Parlak mavi FCF	E133	10 mg/kg v.a.	Süt ürünleri, renkli içecekler, şekerlemeler, kaplamalar, şuruplar

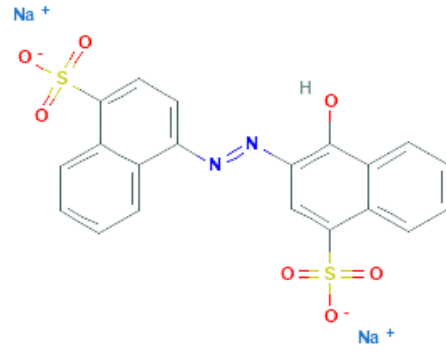
Tablo 1.1 Gıda endüstrisinde sıklıkla kullanılan yapay renklendiriciler (devamı)

	Sentetik Renklendirici	E Kodu	ADI	Kullanım Alanları
	İndigo karmin	E132	5 mg/kg v.a.	Dondurma, tatlılar, fırıncılık ürünleri, dolgu malzemeleri ve bisküviler
	Patent mavi V	E131	15 mg/kg v.a.	Şekerlemeler
	Kinolin sarısı	E104	10 mg/kg v.a.	Meyve ve sebze suları
Sarı Renk Veren	Gün batımı sarısı FCF	E110	2,5 mg/kg v.a.	Alkolsüz içecekler, tatlılar
	Tartrazine	E102	7,5 mg/kg v.a.	Alkolsüz içecekler, tatlılar, şekerlemeler
	Bakır klorofilin kompleksleri	E141ii	7,5 mg/kg v.a.	Yeşil zeytin ve ürünleri
Yeşil Renk Veren	Yeşil S	E142	5 mg/kg v.a.	Kavanoz bezelye, kek miksleri, naneli şekerler
Beyaz Renk Veren	Titanyum dioksit	E171	Belirli değil	Dolgu ve süs malzemeleri, fırıncılık ürünleri

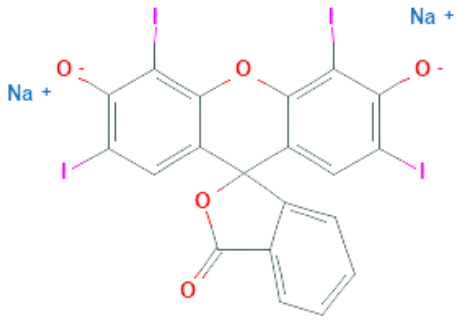
Kaynak: (Martins, Roriz, Morales, Barros, & Ferreira, 2016)



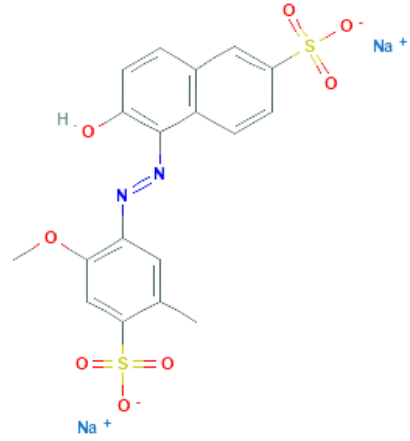
Ponso 4r



Karmozin

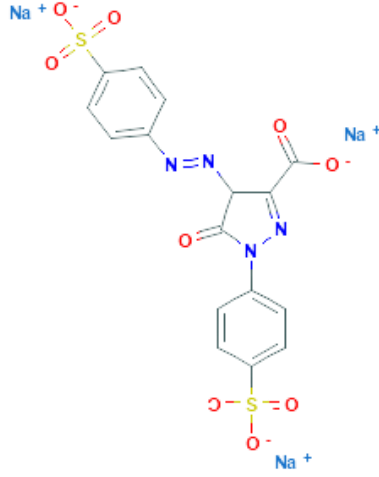


Eritrosin

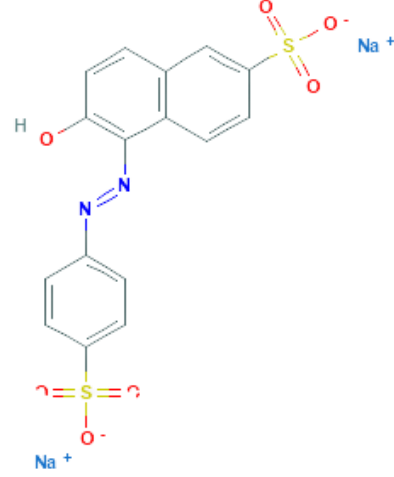


Allura Kırmızısı

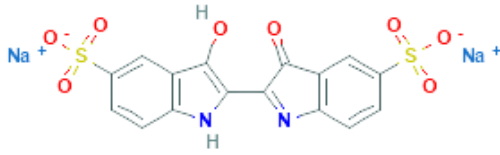
Şekil 1.1 Bazı sentetik boyaların kimyasal yapıları (Okafor, ve diğerleri, 2016)



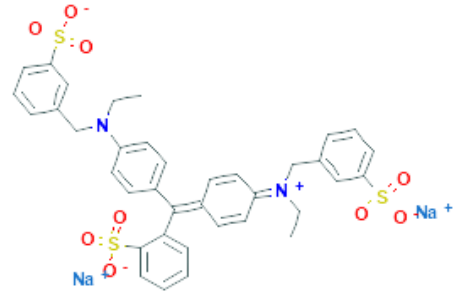
Tartrazin



Gün batımı sarısı



İndigo Karmin



Parlak Mavi

Şekil 1.2 Bazı sentetik boyaların kimyasal yapıları (Okafor, ve diğerleri, 2016) (devamı)

1.1.2.1 Yapay Renklendiriciler ve Sağlık Üzerine Etkileri

Tartrazine boyasının toksisitesi üzerine ilk çalışmalar Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) tarafından 1966, 1975 ve 1984 yıllarında yapıldı ve günlük 7,5 mg/kg v.a. miktarında herhangi bir toksisiteye rastlanmadı. 2009 yılında EFSA tarafından yapılan çalışmada boyanın nükleer DNA ya hasar verdiği ortaya kondu (EFSA P. o., 2009a). Yüksek miktarda Tartrazine tüketildiğinde bu boya bir östrojen reseptörü aktivatörü olarak davranmakta ve menopoz sonrası kadınlarda birincil biliyer sirozu tetiklemektedir (Axon, ve

diğerleri, 2012). Fare ve sıçanlara 125-500 mg/kg aralığında verilen tartrazinin 30 gün sonunda nörotoksik etki gösterdiği ve öğrenme hafıza kayıplarına neden olduğu bildirilmiştir (Gao, ve diğerleri, 2011). Ayrıca tartrazine insan ve sığır serum albüminlerini bağlayarak bu proteinlerin fizyolojik fonksiyonlarını kısıtlamaktadır (Basu & Kumar, 2015).

2009 yılında EFSA kinolin sarısının iki adet *in vitro* hücre modelinde, insan lenfositlerinde ve baklada orta-genotoksik etki gösterdiğini ispatlamışlardır (Macioszek & Kononowicz, 2004; EFSA P. o., 2009b). Ayrıca bu boya eritrositlerdeki kolinesteraz ve plazma psödokolinesterazları inhibe ederek beslenme dışı intoksikasyonlara neden olmaktadır (Osman, Sharaf, El-Rehim, & ElSharkawi, 2016).

Gün batımı sarısı boyasının toksik etkilerinin olduğu ilk defa 2009 yılında EFSA tarafından ortaya kondu (EFSA P. o., Scientific opinion on the re-evaluation of Sunset Yellow FCF (E 110) as a food additive on request from the European Commission, 2009c). Gün batımı sarısı, insan ve hayvan serum albüminlerini bağlayarak bir kompleks oluşuma neden olmaktadır. Düşük miktarları bile bu etkiyi gösterebilmektedir (Masone & Chanforan, 2015). Bağırsaklardaki düşük miktarda emilimi ile azo-indirgeyici moleküller yıkımlanıp sülfonatlı aromatik aminlere dönüşmekte ve genotoksik aktivite göstermektedir. 2000 mg/kg üzerindeki dozlarda insan kan lenfositlerinde ve Brassica campestris L.' Nin kök hücrelerinde DNA hasarına neden olabilmektedir (Dwivedi & Kumar, 2015). 36 adet çocuğa gizli kapsüllerde Gün batımı sarısı boyası verildi ve bu çocuklardan 10 unda kurdeşen veya anjiyoödem, rinit ve hırıltı semptomları geliştiği görüldü Hastalara daha sonra opak kapsüllerde "gizlenmiş" ayrı ayrı gıda boyları uygulandı. 36 çocuğun 10'u Gün batımı sarısı FCF'ye tepki gösterdi, ürtiker veya anjiyoödem, rinit ve hırıltı geliştirdi (Supramaniam & Warner, 1986).

Günlük 205 mg/kg Poso 4R kullanımının erkek farelerde nörodavranışsal ve bilişsel bozukluklara neden olduğu bildirilmektedir (Tanaka, 2006; EFSA P. o., 2009d). DNA hasarının ölçüldüğü bir diğer çalışmada farklı dozlarda Ponso 4R

verilen farelerde farklı organlarda nükleer DNA'nın hareket ettiği gözlemlenmiştir (Tsuda ve diğerleri, 2001).

Eritrosin 4 adet iyot atomu içermesinden dolayı tiroit bezi üzerinde potansiyel bir risk teşkil etmektedir. Sıçanlarda üreme toksisitesini değerlendiren bir deneyde, Eritrosinin T4'ün T3'e dönüşümünü etkilediği ve böylece hipofizden TRH salınımını arttırdığı bulundu. Bu mekanizma ile eritrosin kaynaklı kemirgen tiroit tümörlerinin ortaya çıkabileceği sonucuna varıldı (Jennings, Schwartz, Balter, Gardner, & Witorsch, 1990). 0.02–8 mM dozlarda eritrosinin, genotoksisite kanıtı olmaksızın *in vitro* olarak insan lenfositleri için toksik bir potansiyele (sitotoksik etki) sahip olduğu sonucuna varılmıştır (Mpountoukas ve diğerleri, 2010). Eritrosinin, prostaglandin H2'nin prostaglandin D2'ye izomerizasyonunu katalize eden bir glutatyon transferaz olan hematopoietik prostaglandin D2 sentazı inhibe ettiği gösterilmiştir. Bu, alerji ve iltihap tepkilerinin bir aracıdır ve alerji ve astım hastalığını tetiklediği kanısına varılabilir (Mazaria, Hegazy, & Mannervik, 2015).

Farelerde farklı Allura kırmızısı dozlarının neden olduğu DNA hasarı ve çeşitli organdaki nükleer DNA göçünde önemli bir artış bulmuştur (Tsuda, ve diğerleri, 2001).

Son *in vitro* çalışmalar, Parlak Mavi FCF boyasının insan kanı lenfosit hücre kültürleri üzerinde belirli sitotoksik ve genotoksik etki gösterdiğini bildirmektedir. Bu çalışmalarda, mitotik indeks frekans değerlerinde doza bağlı bir azalma görülürken, mikronükleus frekansı da aynı şekilde artırılmıştır (Kus & Eroğlu, 2015).

Parlak Mavi ile ilgili olarak başka bir olası toksik reaksiyon, iç sınırlayıcı membranı boyamak için kullanıldığı oftalmolojide bildirilmiştir. Birkaç hastada fovea incelmesi ve perifoveal hiperpigmentasyon gözlemlendi (Jindal, ve diğerleri, 2014).

Parlak Siyah, iki hücre modelinde hafif genotoksik özellikler göstermiştir: *in vitro* insan lenfositleri ve *in vivo* *Vicia faba* kök ucu meristemleri ve mikronükleuslarında toksisite gözlemlenmiştir (Macioszek & Kononowicz, 2004).

İndigo, ilaçlar için bir yardımcı madde olarak tanımlanmıştır ve özellikle yetişkinlerde alerjik reaksiyonlarla ilişkilendirilmiştir (Swerlick & Campbell, 2013).

Patent Blue ile ilgili olarak çocuklarda yapılan çalışma sayısı az olmakla birlikte yetişkinlerde alerjik reaksiyon gösterdiği bildirilmiştir (Low, McEwan, Karanam, North, & Kong, 2016).

Son zamanlarda, gıda boyalarının çocuklarda dikkat eksikliği hiperaktivite bozukluğunun (DEHB) gelişmesine katkıda bulunabileceği ifade edilmektedir (Vojdani & Vojdani, 2015). Benzer bir çalışmada ise renklendiricilerin alımı ile DEHB gelişimi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulundu (McCann, ve diğerleri, 2007). Renklendiricilerin ayrıca alerji ve astım insidansındaki artışla ilişkili olduğu bildirilmiştir (Vojdani & Vojdani, 2015). Kronik sürekli ürtikerli çocuklarda azo ve azo olmayan renklendiriciler dahil olmak üzere belirli gıda katkı maddelerine alerjik olmayan aşırı bir duyarlılığın olduğu bildirilmiştir.

1.1.3 Doğal Gıda Boyaları

Doğal gıda boyası, bitki, tohum, algler, mineraller gibi farklı kaynaklardan farklı metotlar kullanılarak ekstrakte edilen, katıldığı gıda ve ilaçları renklendirebilen maddelerdir (Sigurdson, Tang, & Giusti, 2017). Doğal boyalar kimyasal yapılarına göre, izoprenoidler (karotenoidler: beta-karoten, biksin, astaksantin, kurkumin ve diğerleri), benzopiranlar (flavonoidler ve antosiyaninler), tetraپیroller (klorofiller), N-heterosiklik bileşikler (betalainler), karamel ve kinonlar (karmin) olarak sınıflandırılabilir (Delgado-Vargas, Jiménez, & Paredes-López, 2000).

1.1.3.1 İzoprenoidler (karotenoidler)

Aynı zamanda terpenoidler olarak da bilinen izoprenoidler, renkleri sarıdan, turuncu ve kırmızıya kadar değişen, yağda çözünen pigmentlerin önemli bir grubudur. Hala devam etmekle birlikte günümüze kadar 23000 izoprenoid bileşiği keşfedilmiştir. Çoğunlukla bitkiler, mantarlar, maya, bakteriler ve kuşlar da dahil olmak üzere doğada yoğun bir biçimde bulunur (Tanaka, Sasaki, & Ohmiya, 2008). Tablo 1.2' de bazı gıdalarda bulunan karotenoidler ve miktarları

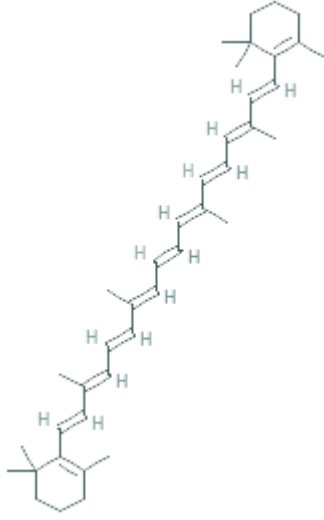
verilmiştir. Baştan sona bir düzende birleştirilmiş izoprenoid birimlerden oluşan 40 karbonlu tetra-terpenoidlerdir. Sadece çoklu doymamış hidrokarbonlar içeren karotenler ve bazı oksijen fonksiyonel grupları ile çoklu doymamış hidrokarbonlar içeren ksantofiller olmak üzere iki ana kategoriye ayrılırlar. Polien zinciri boyunca, görünür spektrumdaki emiciliğinden sorumlu olan dağınık π -elektronlarına sahip olan karotenoidler, sarıdan turuncuya ve kırmızı tonlara değişen renklere sahiptirler (Rivera & Canela-Garayoa, 2012). Elektron açısından zengin, yüksek oranda doymamış kimyasal bileşimleri nedeniyle karotenoidler gıda işleme ve depolama sırasında oksidasyon ve izomerizasyona karşı dayanıksızdırlar. Oksidasyon, karotenoid kaybının başlıca nedenidir ve ışık, nem, sıcaklık, peroksitler, metaller, enzimler, lipitler ve antioksidanlar dahil birçok faktörden etkilenir (Riggi, 2010). En yaygın kullanılan karotenoidler α -, β -, γ -karoten, likopen, biksin ve kapsaksantindir. Gıdalarda bulunan karotenoidler ve miktarları tablo 1.2' de verilmiştir. Doğada yoğun miktarda olmasına rağmen karotenoidler çoğunlukla sentetik yollarla elde edilir (Sigurdson, Tang, & Giusti, 2017). İnsan beslenmesinde yer alan önemli izoprenoidlerden bazılarının kimyasal yapısı şekil 1.2' de verilmiştir

Safran, kırmızı palm yağı, kırmızı biber gıda renklendirmede sıklıkla kullanılan karotenoid kaynaklarıdır. Yağda çözünebilir olmalarından yağ miktarı düşük gıdalarda koloidal biçimde ya da proteinler ile kompleks oluşturmuş halde kullanılırlar (Delgado-Vargas, Jiménez, & Paredes-López, 2000).

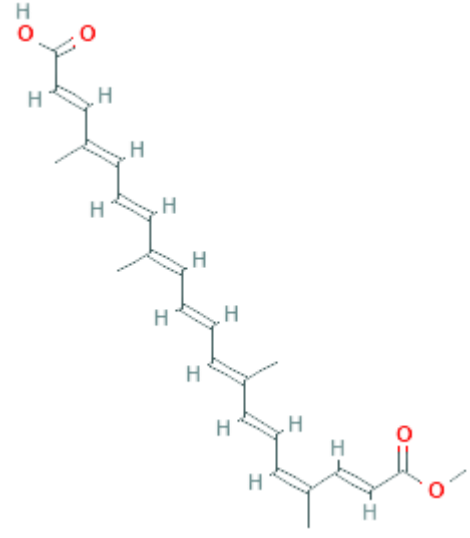
Tablo 1.2 Gıdalarda bulunan karotenoidler ve miktarları ($\mu\text{g}/100\text{g}$)

<i>Gıda</i>	<i>β-karoten</i>	<i>Lutein</i>	<i>β-kriptoksantin</i>	<i>Likopen</i>	<i>α-karoten</i>	<i>Zeaksantin</i>
Havuç	7975	271			2186	
Ispanak	4469	6265				
Domates	608	77		4375		
Portakal	250	120	700		200	
Kayısı	3500	70	120	iz	iz	
Marul	890	1250				
Kırmızı biber	1700	270	250		30	600
Mango	3100		800			
Brokoli	1580	2560				
Karpuz	180	20	300	4750	iz	

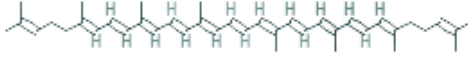
(Delgado-Vargas, Jiménez, & Paredes-López, 2000)



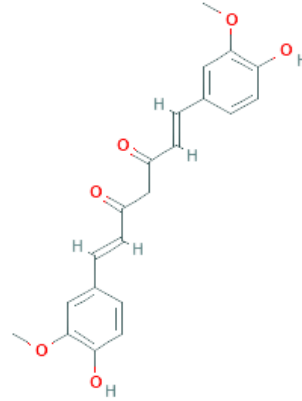
Beta karoten



Biksin



Likopen



Kurkumin

Şekil 1.3 Bazı izoprenoidlerin kimyasal yapısı (Ellison, 2016).

- **Beta Karoten**

β -karoten, bitkilerin ikincil metabolitlerinden olup okside olmamış karotenoidler grubundandır. Asıklık yapıdan türemiş bir polien bileşiği olan beta karoten uzun bir konjuge çift bağlar zinciridir. Yüksek sıcaklık çift bağların izomerleşmesine ve böylelikle de renkte açılmalara neden olur (Fратиanni, Cinquanta, & Panfili, 2010). Beta karotenin insan vücudundaki fonksiyonel özelliklerinin arasında provitamin A kaynağı olması, embriyonik gelişime ve görmeye katkı sağlaması sayılabilir. Bu

özelliklerinin yanında anti-kanser ve antioksidan özellikleri de bulunmaktadır (Berman, ve diğerleri, 2015).

β -karoten, turuncu renk pigmenti olarak yenilebilir yağlarda, peynir, fırıncılık ürünleri, alkolsüz içecekler ve dondurma gibi birçok gıda uygulamasının yanı sıra eczacılık ve kozmetik sanayinde de kullanılmaktadır (Bogacz-Radowska & Harasym, 2018).

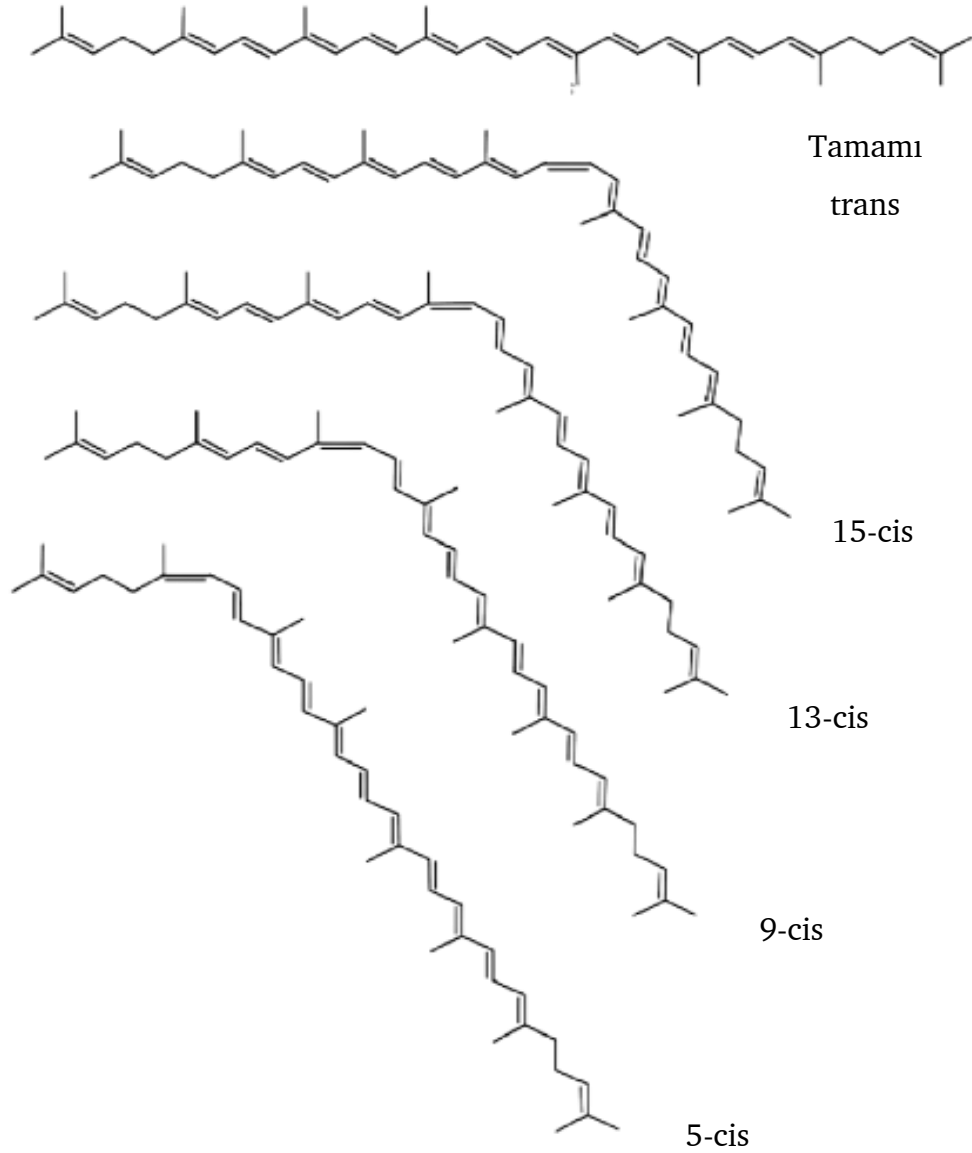
Havuç β -karoten eldesinde en çok kullanılan bitkidir. Kısaca aşamalar özetlenecek olursa; meyve sıkımı, protein koagülasyonu, sedimentasyon, santrifüjleme ve organik çözücü ile ekstraksiyon, filtreleme, deodorizasyon, Evaporasyon ve kristalizasyon şeklindedir. Bazı durumlarda karotenoid ekstraksiyon verimini artırmak için hammadde fermentasyon, kurutma ya da yeniden parçalama işlemlerine tabi tutulmaktadır. Yüksek maliyet, coğrafik faktörler ve sezonsal değişimler bitkisel beta karoten üretiminin dezavantajlarındandır. Birkaç gram karotenoid için onlarca kilogram hammaddenin işlenmesi gerekmektedir (Beyer, ve diğerleri, 2002).

Beta karotenin kimyasal sentezinde 2 temel yöntem kullanılmaktadır. Bunlar Wittig reaksiyonları veya Grignard bileşikleridir. Bu yöntemler ile β -karoten, likopen, santaksantin ve sittranaksantin üretilmektedir. Wittig reaksiyonlarında, 15 karbon atomu içeren iki adet fosfonyum tuzu ile 10 karbon içeren dialdehit molekülü birleştirilir. Daha sonra izomerizasyon tepkimeleri ile 40 karbonlu karotenoid bileşikler oluşur. Grignard bileşikler yönteminde 1 adet diketon molekülü ile 2 metanol molekülü birleşir ve 40 karbonlu bileşikler elde edilir (Álvarez, Vaz, Gronemeyer, & de Lera, 2014). Bitkisel, kimyasal sentezinin yanı sıra beta karoten mikrobiyal olarak da sentezlenmektedir. Bu yöntemde en yüksek verimli üretimi *Dunaliella* spp. ve *Eustigmatos* cf. *Polyphem* algleri gerçekleştirmektedir (Marchal, Mojaat-Guemir, Foucault, & Pruvost, 2013; Fazelia, Tofighia, Samadia, & Jamalifar, 2006; Zhen, Xiaoqin, Aifen, & Chengwu, 2012). Ayrıca *Rhodococcus maris* ve *Rhodobacter sphaeroides* türleri ile bakteriyel karotenoid üretimi de gerçekleştirilebilmektedir (Venil, Zakaria, & Ahmad, 2013).

- **Likopen**

Likopen, 11 doğrusal konjuge ve 2 konjuge olmayan toplam 13 çift bağ içeren doymamış bir asiklik karotenoiddir. Domates, kırmızı üzüm, karpuz, kırmızı greyfurt gibi bitkilerin kırmızı renginden sorumlu pigmenttir. Likopen, yapısında yer alan konjuge çift bağlar nedeni ile karotenoidler arasında en etkili oksijen bağlayıcıdır. Ayrıca bu yapıdan dolayı Likopen oksidatif bozulmaya karşı da çokça duyarlıdır. Likopen, doğal olarak trans formlarında meydana gelir ve yüksek sıcaklık, asitler, ışık ya da metal iyonları gibi dış etmenlere maruz kaldığında mono-cis ya da poli-cis izomerlerine dönüşür (Shi & Le Maguer, 2010). Likopen ve bazı izomerlerine ait kimyasal yapılar şekil 1.3' te verilmiştir. Likopen asiklik yapısı ve 11 adet doğrusal konjuge çift bağlarından dolayı hidrofobik özelliktedir ve lipofilik bir bileşik olarak kabul edilir. Bu nedenle hegzan, aseton, kloroform ve petrol eteri gibi organik çözücülerde çözünür (Roldán-Gutiérrez & Dolores Luque de Castro, 2007).

Likopen eldesi için kullanılan metotların büyük çoğunluğu benzerdir. Elde edilecek meyvenin varsa kabuğu ve çekirdeği ayrıldıktan (örnek domates ise kabuk da kullanılır) sonra kaba ezme işlemine tabi tutulur. Elde edilen püre yapıdaki örnek ister doğrudan isterse de ön bir kurutma işlemine (ısı, basınç ya da nitrojen buharı ile) tabi tutularak organik çözücü ile ekstraksiyon gerçekleştirilir. Oksijen, ışık ve sıcaklığı çok duyarlı olduğu için prosesin her aşamasında dikkatli olunmalıdır. Elde edilen ekstrakt süzülür ve evapore edilerek Likopen izole edilmiş olur (Duringa & Harrison, 2005). Likopen başta içecekler olmak üzere bisküvi, kek, gofret, sütlü tatlılar, buzlu dondurmalar, soslar ve çorba mikslerinde kullanılmaktadır.



Şekil 1.4 Likopen ve izomerlerinin kimyasal yapısı (Kong, ve diğerleri, 2010)

- **Lutein ve zeaksantin**

Lutein, meyvelerden, kaba yonca ve kadife çiçeğinden elde edilen; reçel ve şekerlemeler, marmelatlar, işlenmiş peynir ve meyve ve sebze soslarında kullanılan bir renk pigmentidir (Berman, ve diğerleri, 2015).

- **Biksinler: Annatto ve Safran**

Anatto, çoğunlukla süt ürünleri ve fırıncılık ürünlerinde kullanılan ve sarıdan turuncuya renk veren doğal bir boyadır. Anatto, güney ve merkez Amerika’ da yetişen tropik bir bitki olan *Bixa orellana*’nın tohumlarından elde edilir. Kristal

halde Bixinler, organik çözücüler yardımı ile anattodan %87-90 saflıkta izole edilir. Anattodan elde edilen karotenoidlerin %80' i biksin formundadır (Levy & Rivadeneira, 2000). Biksin, karakteristik izoprenoid yapasında olmasına rağmen 26 karbon içeriği ile daha kısa zincir uzunluğundadır. Molekölün bir ucunda yağda çözünür karboksilik asit grubu bulunurken diğer ucunda metil ester grubu bulunmaktadır (Wrolstad & A Culver, 2012). Tüm karotenoidlerde olduğu gibi anatto biksinlerinde de oksidasyona duyarlı polien zincirinden dolayı stabiliteeleri düşüktür. Oksijen, asit, ışık gibi dış etmenlerden etkilenirler (Scotter, 2009). Anatto ekstraktları çoğunlukla tereyağı ve peynir gibi ürünlerde renklendirici olarak kullanılmaktadır (Oka, Ozeki, Hayashi, & Itakura, 2007).

Aroma verici ve renklendirici olarak kullanılan safran, *Crocus sativus* bitkisinden elde edilen bir baharattır. Safranın fonksiyonel özellikleri, 3 adet majör apokarotenoid olan krosin, krosetin ve pikrocrosinden ileri gelmektedir (Bouvier, Suire, Mutterer, & Camara, 2003). Safran pigmentlerinin degradasyonuna neden olan etmenler, sıcaklık, ışık ve asitliktir. Safran ekstraktında kurutma sıcaklığının 30°C altında ve 60°C üstünde olması degradasyona neden olmaktadır. Kurutma sıcaklığına bağlı olarak en ideal sıcaklık $40 \pm 5^{\circ}\text{C}$ olarak ifade edilmektedir. Krosin, safrandaki majör karotenoiddir ve suda çözünebilir bir moleküldür. Nu nedenle çözgen ekstraktında su miktarının artması çözünen bileşiklerin hareketliliğini artıracığından daha fazla degradasyona neden olabilir. Ayrıca, safran karotenoidlerinin stabilitesi, moleküllerin sabit pozisyonda kaldığı ve degradasyon reaksiyonlarının zor olduğu kristal geçiş sıcaklığının altında daha yüksek olmaktadır (Delgado-Vargas, Jiménez, & Paredes-López, 2000).

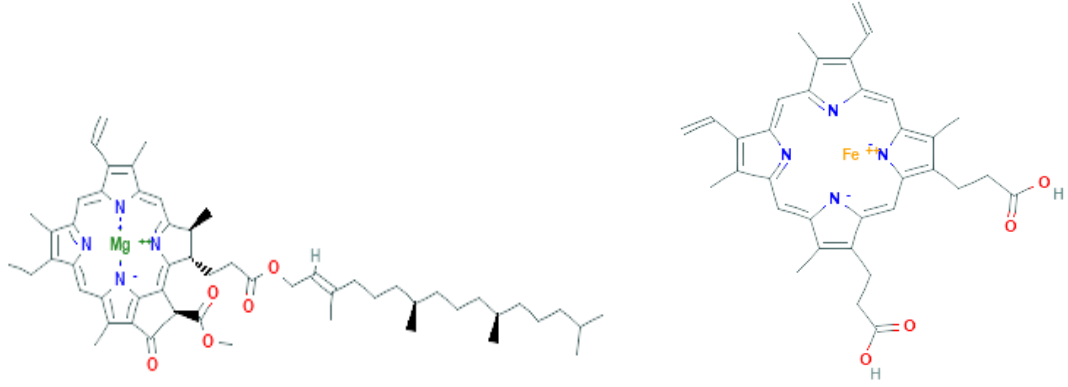
- **Kurkumin**

Kurkumin, zerdeçalda bulunan baskın sarı renkli pigmenttir. Kurkumin ile birlikte zerdeçalda bir metoksil grubunun proton ile yer değiştirdiği demetoksikurkumin ve her iki metoksil grubunun protonlar ile yer değiştirdiği bisdemethoxycurcumin molekülleri de bulunmaktadır. Kurkumin pigmenti hidrofobik olup yağda çözülebilir. Kurkuminin elde edildiği kökler *Curcuma longa* bitkisi tarafından üretilmektedir. Turmerik oleoresin tozu, solvent ekstraktı ile elde edilen onaylı bir

boyadır. Pigmentin rengi parlak sarı ya da yeşilimsi sarıdır. Tüm karotenoidler gibi Kurkumin pigmenti de oksidasyon ve ışığa karşı duyarlıdır. Fakat ısıl stabilitesi kısmen iyidir ve bu nedenle ekstrüde gıdaların üretimin kullanılabilir. Kurkumin, süt ürünleri, sürülebilir yağlar, fırıncılık ürünleri ve kahvaltılık gevreklerde ve dondurmalarda kullanılmaktadır (Wrolstad & A Culver, 2012). Kurkuminin renk yoğunluğu çok yüksek ve bulanıklık değerleri de düşüktür (Luzardo-Ocampo, Ramírez-Jiménez, Yañez, & Mojica, 2021).

1.1.3.2 Tetrapiroller (Klorofiller)

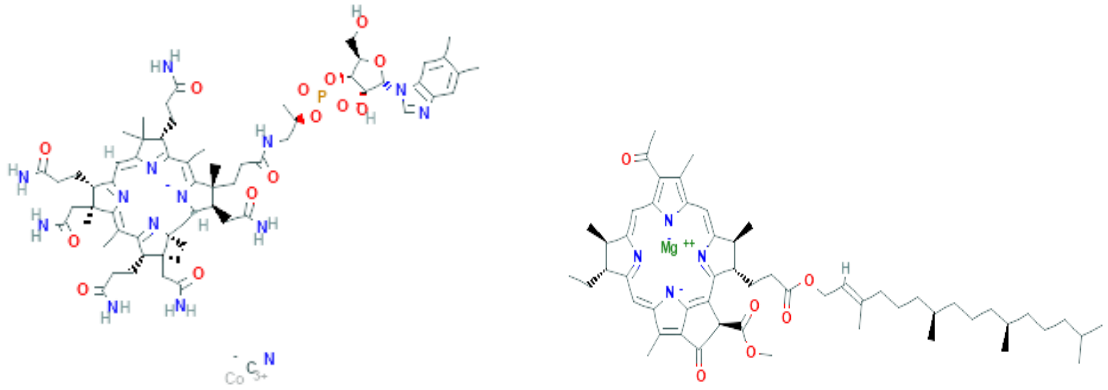
Dünya üzerinde en yüksek miktarda bulunan ve canlı organizmalar için esansiyel özellikte olan pigmentlerdir. En bilinenleri kana kırmızı rengini veren hemeler ve bitki, alg ve bakterilere yeşil rengi veren klorofillerdir (Delgado-Vargas, Jiménez, & Paredes-López, 2000). Doğal olarak oluşan diğer tetrapiröl molekülleri bilinler, kobalamin (vit. B12), siroheme ve koenzim F430'dur. Tetrapiroller, metin köprüleri aracılığı ile doğrusal ya da halkasal bağlanmış 4 adet pirol türevi bileşikten oluşurlar. Yalnızca kobalamin, birinci ve dördüncü pirol halkası arasında 1 köprü karbonu eksik bulundurması ile farklılık gösterir (Larkin, 2016). Bütün doğrusal tetrapiroller, halkasal tetrapirollerin parçalanmasından oluşur ve bu nedenle yalnızca 3 adet metin köprüsü içerir. Genel olarak, tüm halkasal tetrapirollerin pirol halkaları saat yönünde A – D olarak gösterilir. Siklik tetrapirollerin önemli bir özelliği, Fe, Mg, Co veya Ni gibi çeşitli metal iyonlarını şelatlayabilmeleridir. Doğal olarak oluşan tetrapiroller, halka düzeninin oksidasyon durumu, şelatladığı metal iyonunun doğası ve halkalarında bulunan diğer moleküller gibi özellikleri ile birbirinden ayrılırlar (Layer, Jahn, Deery, Lawrence, & Warren, Biosynthesis of Heme and Vitamin B12, 2010). Doğal olarak oluşan bazı tetrapirollerin kimyasal yapısı şekil 1.4' te verilmiştir.



Klorofil a

Heme b

Şekil 1.5 Doğal olarak oluşan bazı tetrapirollerin kimyasal yapısı (Layer, Jahn, Deery, Lawrence, & Warren, Biosynthesis of Heme and Vitamin B12, 2010)



Kobalamin

Bakterioklorofil a

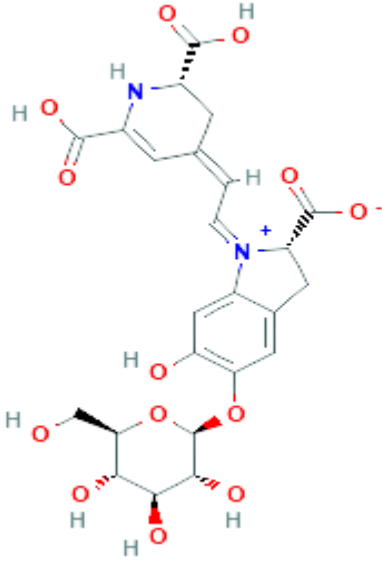
Şekil 1.6 Doğal olarak oluşan bazı tetrapirollerin kimyasal yapısı (Layer, Jahn, Deery, Lawrence, & Warren, Biosynthesis of Heme and Vitamin B12, 2010)
(devamı)

Klorofiller, porfirin halkasının magnezyum atomuyla şelatlanması sonucu meydana gelen, yeşil bitkilerde bulunan, fotosentezden sorumlu bir tetrapiröl molekülüdür. Klorofil ayrıca 4 pirol-benzeri halkanın ötesinde bir de fitol ile esterleşmiş propiyonik asit zinciri bulundurur (Kang, Park, Jung, & Chang, 2018). Doğada a, b, c1, c2, c3 ve d olmak üzere toplam 6 adet klorofil bulunmaktadır. Bitkilerde bulunan klorofillerin a ve türlerinin kloroplasttaki oranı 1:3' tür. Gıda sanayinde klorofiller, E140i kodu bakır-klorofilleri E141i kodu le

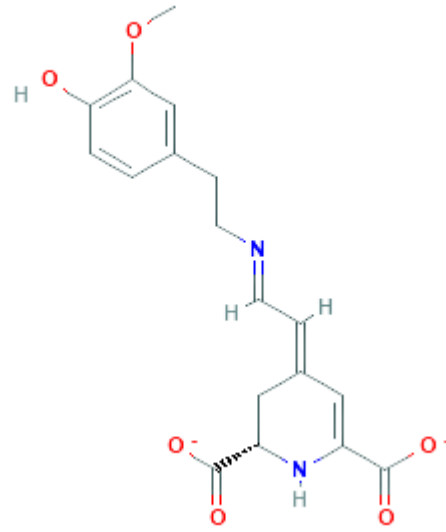
kullanılmaktadır. Klorofil eldesinde en yaygın olarak kullanılan bitki spirulina (*Arthrospira platensis*)' dir. Kaba yonca bitkisi, endüstriyel olarak kullanılan bir diğer klorofil kaynağıdır. Klorofil eldesi için ekstraksiyon sonrası, ham ekstrakt bakır tuzları varlığında asidifiye edilerek suda çözünür olması için sabunlaştırılmaktadır. Klorofiller, başta içecekler ve şekerlemeler olmak üzere dondurma, buzlu şekerlemeler, yoğurt, puding, toz ürünler ve muhallebi gibi birçok farklı gıdada kullanılmaktadır (Viera, Pérez-Gálvez, & Roca, 2019).

1.1.3.3 N-heterosiklik bileşikler (Betalainler)

Betalainler, kimyasal olarak azotlu-fonksiyonel gruplara dayalı, kırmızı mor betasiyaninler ve sarı turuncu betaksantin olarak sınıflandırılan suda çözünür pigmentlerdir (şekil 1.5). Betalainler, betalamik asidin siklo-Dopa (cyclo-3,4-dihydroxyphenylalanine) ve amino bileşikleri ile imonyum konjugatlarıdır. En önemlileri, kırmızı pancardan elde edilen betanin (betanidin-5-O- β -glükozit) ve kaktüs meyvesinden elde edilen indikaksantin' dir (de Mejia, Zhang, Penta, Eroglu, & Lila, 2020; Rodriguez-Amaya, 2019). Betaninler, süt ürünleri, fırıncılık ürünleri, içecekler gibi birçok alanda yaygın bir biçimde kullanılmaktadır (Khan, 2016). Betanidin, betasiyaninlerin çoğunluğunun temel yapısını oluşturur. Ardın betanidinlerin C15 epimeri olan izobetanidinin gelir. Betanidinlerin herhangi bir hidroksil grubunun glikozidasyonu ile yüksek sayıda betasiyanin elde edilebilir. Betaksantinler, farklı proteinojenik ve proteinojenik olmayan amino asitlerden meydana gelir ve betalamik asidin biyojenik amin-konjuge kısmıdır. Betaksantinlerin en bilineni olan indikaksantin kaktüs meyvelerinden elde edilir (Delgado-Vargas, Jiménez, & Paredes-López, 2000). Betalainler, yüksek su çözünürlüğü ve iyi bir pH stabilitesi sunmasına rağmen sıcaklık ve ışıktan etkilenirler (de Mejia, Zhang, Penta, Eroglu, & Lila, 2020).



Betasiyanin



Betaksantin

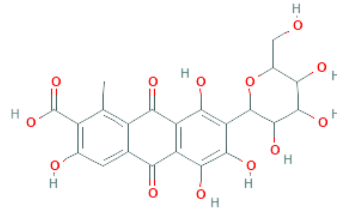
Şekil 1.7 Betalainlerin kimyasal yapısı (Napoleon, Swetha, & Angajala, 2013)

1.1.3.4 Karamel ve Kinonlar (karmin)

Karamel, şekerlerin gıda kullanımı uygun asitler, alkaliler, amonyum ve sülfid bileşikleri ile kontrollü olarak ısıtılmasından elde edilir. Karamel boyası, indirgeyici şekerler ve amino bileşiklerinin neden olduğu Maillard reaksiyonlarının son ürünüdür. Sarıdan, kırmızı kahverengi ve koyu kahverengiye kadar değişen toplamda 4 adet karamel mevcuttur. Karamelin tüm türleri koloidal yükleri bakımından ayrılrsa da tamamı suda çözünür formdadır (Pintea, 2008). I. sınıf karamel (Class I) amonyum ya da sülfid kullanılmadan farklı karbonhidrat oranlarına sahip şekerlerden elde edilir ve kısmen negatif koloidal yükse sahiptir. %70'e kadar alkol içeren çözücülerde stabildir ve alkollü içecek ve kahve yapımında kullanılır. II. Sınıf (Class II) karamel üretiminde birincisinden farklı olarak sülfid bileşikleri kullanılır. Tamamen negatif koloidal yapıya sahiptirler ve %70'e kadar olan alkolde stabildir. Tanin içeren konyak gibi alkollü içkilerin yapımında kullanılırlar. III. sınıf (Class III) karamel üretiminde sülfidler kullanılmazken amonyum bileşikleri kullanılır. Pozitif koloidal yüke sahip olup bira gibi pozitif yüklü protein oranı yüksek ürünlerde çökelmeleri engeller. Son grup olan IV. Sınıf karamelde hem amonyum hem de sülfid bileşikleri kullanılır.

Negatif kolloidal yüklüdür ve asit, tuz ve alkol stabilitesi yüksektir. Dünya geneli karamel üretiminin %70' i dördüncü sınıf karameldir (Cunha, Barrado, Faria, & Fernandes, 2011). Karamel, şekerin 100°C'ye ısıtılması, türüne göre reaktan ajanların eklenmesi, tekrar ısıtma, asitlik ve yoğunlukların ayarlanması, 80°C'ye getirme ve ardından filtreleme aşamaları kullanılarak üretilmektedir. Karamel, alkollü ve alkolsüz içeceklerde, şekerlemelerde, fırıncılık ürünlerinde, makarna ve erişte gibi ürünler, bebek gıdaları ve şuruplar gibi birçok alanda yaygın bir biçimde kullanılmaktadır (Delgado-Vargas, Jiménez, & Paredes-López, 2000).

Kinonlar, bazı yüksek canlılarda ve mikroorganizmalarda renk vermeden sorumludurlar. Kinonlar, bu canlılarda omurga, kabuk ve yumurtaların pigmetasyonuna katkı sağlar (Aly & Hassan, 2014). Karminik asit, *Opuntia* türü kaktüslerde yaşayan koşineal (*Dactylopius coccus* Costa) gibi böceklerde bulunan kırmızı kinon yapıda bir renk pigmentidir. Karmin, 7-D-glukopiranozil- 3,5, 6, 8-tetrahidroksi 1- etil-9-10- dioksoantrasen-2-karboksilik asit molekül yapısındadır (şekil 1.6).



Şekil 1.8 Karminin kimyasal yapısı (Wrolstad & A Culver, 2012)

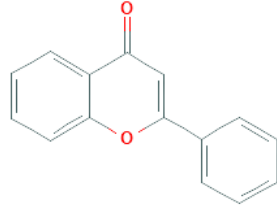
Gıda boyası olarak kullanılan koşineal ekstraktı, böceklerin dişilerinin vücudunun hidroalkolik olarak ekstraksiyonu ile elde edilir. Ekstraksiyon sonrası karminik asit amonyum ve sodyum karbonat tuzları ile kaynatılır. Filtreden geçirildikten sonra karminik asit, alüminyum sülfat ile muamele edilerek karminik asidin kalsiyum ya da kalsiyum-alüminyum gölü elde edilir ki bu da karmindir (Wrolstad & A Culver, 2012). Karminik asidin sıvı çözeltisi pH:4' te sarı turuncu renklerinde iken alüminyum ya da kalsiyum ile kompleks oluşturduğu zaman bu renk kırmızı-mor olmaktadır. Karmin alkolde çözünmez ve suda çözünürlüğü de çok azdır. Karmin de en az %50 oranında karminik asit içeren bir boyadır. Karmin, içecekler, süt

ürünleri, şekerlemeler, et ürünleri, reçel ve işlenmiş gıdalar gibi birçok gıdada kullanılmaktadır (Villaño, García-Viguera, & Mena, 2016).

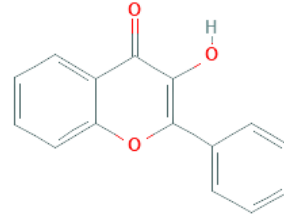
1.1.3.5 Benzopiranlar (antosiyantinler ve diğer flavonoidler)

Aynı zamanda kromenler olarak da adlandırılan benzopiranlar, benzen ve piranın doyma ve oksidasyon reaksiyonları sonucu bir araya gelmesi ile oluşan bisiklik heterosiklik bir sistem olup meyve ve sebzelerde çokça bulunur. Benzopiranlar, flavonoidler, antosiyantinler, kumarinler ve alkoloidler gibi birçok farklı polifenolün omurgasını oluşturur (AHMED, 2015; PIYUSH, KULDEEP, AZIZUR, MISBAHUL, & PRANAY, 2018). Bazı benzopiranların kimyasal yapısı şekil 1.7’ de verilmiştir.

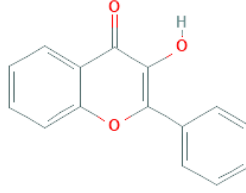
Flavonoidler, $C_6-C_3-C_6$ yapısına sahip, bitkilerin kök, yaprak, tohum, çiçek ve meyvelerinde bulunup onlara farklı renkler veren ikincil bir metabolittir (Havsteen, 2002). B halkasının C halkasına bağlandığı bölgeye, oksidasyon ve C halkası bulundurup bulundurmama durumlarına göre antosiyanidin, flavon, auronlar, sarı flavonoller, renksiz flavonoller, flavon-3-ol, flavonon, izoflavon ve chalcone gibi alt gruplara ayrılmaktadırlar (González-Paramás, Ayuda-Durán, Martínez, González-Manzano, & Santos-Buelga, 2019).



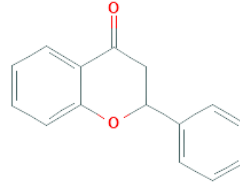
Flavon



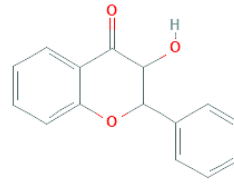
Flavonol



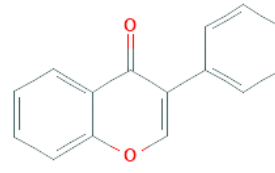
Flavon-3-ol



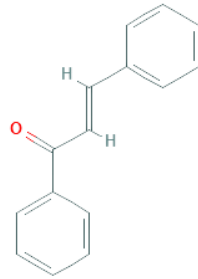
Flavonon



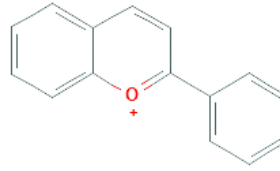
Flavononol



İzoflavon



Kalkon



Antosiyanin

Şekil 1.9 Benzopiranların kimyasal yapısı (Corradini, ve diğerleri, 2011)

1.1.4 Antosiyaninler

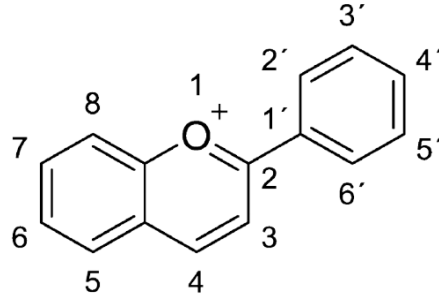
Antosiyanin ifadesi, yunanca çiçek anlamında gelen *anthos* ve koyu mavi anlamına gelen *kyaneos* kelimelerin birleşiminden gelmektedir. Antosiyaninler, flavonoid grubu suda çözünür vakuolar polifenolik pigmentlerdir ve bitkilerin yapraklarına, çiçeklerine ve meyvelerine kırmızı-turuncudan mavi mora kadar olan renkleri verir (Wallace & Giusti, 2015).

Kimyasal olarak antosiyaninler, glikozitlere bağlı bir aglikon biriminin (antosiyanidinler) heterozitleri olarak tanımlanabilir. Doğada, flavilyum iyonu (şekli 1.8)ya da 2-fenil benzopirilyumdan türetilmiş glikozitleşmiş polihidroksi ve/veya polimetoksi türevleri olarak bulunurlar.

Antosiyaninler, oksitlenmiş hetero halkada 3 karbon ile bağlanmış iki adet aromatik halkadan oluşur (Prior & Wu, 2006). Antosiyanidinler farklı organik asitler ile açillenebilen 1 ya da daha fazla şekerle bağlı halde bulunurlar. Halkalarda şeker ya da hidroksil grubunun bulunması bileşiğin su, etil alkol ya da metil alkol gibi çözücülerde çözünürlüğü ile doğrudan ilişkilidir (Escribano-Bailón, Santos-Buelga, & Rivas-Gonzalo, 2004).

Doğada yaklaşık glikozitlenebilecek 30 farklı antosiyanidin tespit edilmiştir ve bu bileşikler halkalarındaki hidroksilasyon ve metoksilasyon derece ve yoluna göre birbirinden ayrılmaktadırlar. Tablo 1.3' te antosiyanidinler, kimyasal yapıları ve verdikleri renkler yer almaktadır. Her geçen gün artmakla birlikte doğada 700'den fazla antosiyaninin yapısı tamamen aydınlatıldı ve 200' den fazlasının da yapıları kısmen belirlendi (Santos-Buelga & González-Paramás, 2019). Antosiyaninler, bağlanan şekerlerin sayısı, yeri ve pozisyonu, hidroksil gruplarının sayısı ve şekerlere bağlanmış aromatik ve alifatik asitlerin doğası gibi faktörler ile farklılık göstermektedir (Kong, ve diğerleri, 2003). Antosiyanidinlerin sayıları çok fazla olmasına rağmen doğada yalnızca en yaygın olanları yalnızca 6 tanedir ve toplam antosiyaninlerin %90' ını oluşturur. Bunlar, siyanidin, pelargonidin, delfidin, malvidin, peonidin ve petunidindir (Castañeda-Ovando, Pacheco-Hernández, Páez-Hernández, Rodríguez, & Galán-Vidal, 2009). Bu antosiyanidinlerin meyve ve sebzelerdeki dağılımına bakıldığı zaman %50' sinin siyanidin en az olmaları ise

%7 oranında malvidin ve petunidin olup diğ erlerinin oranı ise her biri yaklaşık %12' dir (Casta eda-Ovando, Pacheco-Hern andez, P  ez-Hern andez, Rodr  guez, & Gal  n-Vidal, 2009). Antosiyaninlerin bu formları şekerler ve organik asitler ile konjuge olarak farklı renklerdeki antosiyaninlere d n ş r. Renkleri, B halkası  ok fazla hidroksil grubu i erirse maviye,  ok fazla metoksil grubu i erirse de kırmızıya d nmektedir (He & Giusti, 2010). Antosiyanidinlerin kimyasal yapısı ve verdikleri renkler tablo 3' te verilmiştir.



Şekil 1.10 Flavilyum Katyonu (Mattioli, Francioso, Mosca, & Silva, 2020)

Tablo 1.3 Antosiyanidinler, molekül yapısı ve verdiği renkler

Adı	Kısaltması	Molekül Modeli							Renk
		<i>R1</i>	<i>R2</i>	<i>R3</i>	<i>R4</i>	<i>R5</i>	<i>R6</i>	<i>R7</i>	
Apigeninidin	Ap	H	OH	H	OH	H	OH	H	Turuncu
Arrabidin	Ab	H	H	OH	OH	H	OH	OCH ₃	
Aurantininidin	Au	OH	OH	OH	OH	H	OH	H	Turuncu
Capensinidin	Cp	OH	OCH ₃	H	OH	OCH ₃	OH	OCH ₃	Mavi-Kırmızı
Carajurin	Cj	H	H	OH	OH	H	OCH ₃	OCH ₃	
Siyanidin	Cy	OH	OH	H	OH	OH	OH	H	Turuncu-Kırmızı
Delfinidin	Dp	OH	OH	H	OH	OH	OH	OH	Mavi-Kırmızı

Tablo 1.4 Antosiyanidinler, molekül yapısı ve verdiği renkler (devamı)

Adı	Kısaltması	Molekül Modeli							Renk
		<i>R1</i>	<i>R2</i>	<i>R3</i>	<i>R4</i>	<i>R5</i>	<i>R6</i>	<i>R7</i>	
Europinidin	Eu	OH	OCH ₃	H	OH	OCH ₃	OH	OH	Mavi-Kırmızı
Hirsutidin	Hs	OH	OH	H	OCH ₃	OCH ₃	OH	OCH ₃	Mavi-Kırmızı
Luteolin	Lt	H	OH	H	OH	OH	OH	H	Turuncu
Malvidin	Mv	OH	OH	H	OH	OCH ₃	OH	OCH ₃	Mavi-Kırmızı
5-MethylCy	5-MCy	OH	OCH ₃	H	OH	OH	OH	H	Turuncu-Kırmızı
Pelargonidin	Pg	OH	OH	H	OH	H	OH	H	Turuncu
Peonidin	Pn	OH	OH	H	OH	OCH ₃	OH	H	Turuncu-Kırmızı
Petunidin	Pt	OH	OH	H	OH	OCH ₃	OH	OH	Mavi-Kırmızı
Pulchellidin	Pl	OH	OCH ₃	H	OH	OH	OH	OH	Mavi-Kırmızı
Riccionidin A	RiA	OH	H	OH	OH	H	OH	H	-
Rosinidin	Rs	OH	OH	H	OCH ₃	OCH ₃	OH	H	Kırmızı
Tricetinidin	Tr	H	OH	H	OH	OH	OH	OH	Kırmızı

(Santos-Buelga & González-Paramás, 2019)

Antosiyaninler, içecekler, süt ürünleri, fırıncılık ürünleri, şekerlemeler gibi farklı birçok gıda grubunda kullanılan pH ya bağlı olarak değişen renklerde popüler bir doğal gıda boyasıdır (Cortez, Luna- Vital, Margulis, & Gonzalez de Mejia, 2017). Antosiyaninler E163 kodu ile sunulmaktadır. Siyanidin: E163a, delfidin: E163b, malvidin: E163c, pelargonidin: E163d, peonidin: E163e ve petunidin: E163f (Khoo, Azlan, Tang, & Lim, 2017).

Antosiyaninlerin temel fonksiyonu olan pembeden, kırmızı, meneke ve koyu maviye varan renkler sağlamasının yanında diğer hayvanları cezbetmesiyle de tozlaşma ve tohum dağılımına da yardımcı olmaktadır. Ayrıca bitkiler için UV ışık koruyucusu, antioksidan, antimikrobiyal ve bazı böceklerden de koruyucudurlar (Kong, ve diğerleri, 2003). Antosiyaninler, insan sağlığı üzerine de antioksidan kapasite, antiinflamatuvar etki, diyabet önleyici, kardiyovasküler hastalıklara karşı koruma gibi olumlu etkileri de vardır. Antosiyaninlerin gıda endüstrisinde doğal renklendirici olarak kullanımı, bu bileşiklerin sıcaklık, ışık, oksijen, enzim ve pH durumları gibi etmenlere duyarlı olduğu için zordur ve kullanım miktarları kısıtlıdır. Bu nedenle üreticiler antosiyaninlerin stabilitesinin artırılması üzerine çalışmalara ağırlık vermektedir (Eiro & Heinonen, 2002).

2018 yılında antosiyaninlerin toplam piyasa değeri 205 milyon dolar olarak açıklanmış olup bu değerin 2023 yılına kadar yaklaşık %4,7 artacağı tahminlenmiştir (Belwal, ve diğerleri, 2020).

1.1.5 Antosiyanin Ekstraksiyon Metotları

Antosiyaninler birçok dış etmenden etkilendiği ve kolayca değrede olabildiği için kullanılacak metotlar önem arz etmektedir. Örneğin yüksek sıcaklık ve pH'da antosiyanin konsantrasyonu azalmaktadır (Cacace & Mazza, 2006).

Antosiyaninlerin ekstraksiyon ile ilgili olarak metotlar literatürde 2 ana başlık altında toplanmıştır. Birincisi antosiyaninlerin tanımlanması ve karakterize edilmesi için kullanılan ekstraksiyon metotları, ikincisi ise gıda endüstrisine uyarlanabilecek ekstraksiyon metotlarıdır. Antosiyanin molekülleri polar özellikte olduğu için etanol, metanol, aseton ve su gibi polar çözücülerde rahatça znebilir. Antosiyaninler oldukça reaktif moleküller oldukları için uygun

Çözgenin seçilmesi önem arz etmektedir. En verimli ekstraksiyon solüsyonları, formik asit, fosforik asit ya da sitrik asit ile asidifiye edilmiş etanol, metanol ve asetonitril gibi organik çözücülerdir (Ongkowijoyo, Luna-Vital, & Gonzalez de Mejia, 2018).

Antosiyanin ekstraksiyonu öncesinde uygulanan ön-işlemler hücre organellerinden antosiyaninlerin salınmasına yardımcı olup erişebilirliği artırmaktadır. Yüzey alanını artırarak katı partiküllerin kolayca sıvı ortama geçmesini kolaylaştıran partikül boyutunun küçültülmesi bu metotlardan bir tanesidir. Diğer metotlara da kurutma ve liyofilizasyon örnek olarak verilebilir (Lorenzo, ve diğerleri, 2018).

Antosiyaninler için, maserasyon ve soxhlet ekstraksiyonu geleneksel ekstraksiyon metotlarıdır. Bu metotların, uzun ekstraksiyon süresi, düşük saflıkta ekstraksiyon, düşük ekstraksiyon seçiciliği, yüksek miktarda solvent ve termal degradasyonu hızlandırması gibi olumsuz özellikleri; araştırmacıları ve üreticileri yeni metotlara yöneltmektedir (Selvamuthukumaran & Shi, 2017). Daha yüksek verim, daha kısa süre, daha selektif ekstraksiyon ve daha az solvent gibi avantajları olan yeni tekniklere yüksek ses, vurgulu elektrik alan, mikrodalga, süper-kritik akışkan ekstraksiyon metotları örnek verilebilir (Mane, Bremner, Tziboula-Clarke, & Lemos, 2015).

- **Ultrasonik Ekstraksiyon (UE)**

Ultrasonik ekstraksiyon, 20 kHz ile 2000 kHz arasında bir şiddette ses uygulamasıdır. Yüksek ses ile meydana gelen akustik kavitasyonun mekanik etkisi hücre duvarı gözeneklerinin genişlemesine neden olan bitkinin hidrasyonunu tetikler ve hücre duvarının yıkılmasına yardımcı olur. Bu kütle transferine yardımcı olur ve ekstraksiyon verimini artırır (Galván D'Alessandro, Dimitrov, Vauchel, & Nikov, 2014). Ultrases uygulamasının düşük enerji kullanımı, daha az çözücü kullanımı, yüksek ekstraksiyon verimi, düşük degradasyon gibi birçok avantajı vardır. Ayrıca yeşil bir teknoloji olup kolayca endüstriye de uygulanabilir (Vieira, Cavalcanti, Meireles, & Hubinger, 2013). Sıvının mikrojeterleri ile oluşan akustik kavitasyon hücre duvarının yüzeyinde hava kabarcıklarının asimetrik

olarak patlaması ile sıcaklık anlık olarak 70°C' ye kadar çıkabilmektedir (Golmohamadi, Möller, Powers, & Nindo, 2013). Bu da antosiyanin stabilitesini olumsuz etkilemektedir (Tiwari, O' Donnell, Patras, & Cullen, 2008). Başta şeker pancarı (Chen, Zhao, & Yu, 2015), ahududu (Teng, Lee, & Choi, 2014), böğürtlen (Oancea, Grosu, Otto, & Stoia, 2013), portakal kabuğu (Khan, Abert-Vian, Fabiano-Tixier, Dangles, & Chemat, 2010) ve soğan (Katsampa, Valsamedou, Grigorakis, & Makris, 2015) gibi farklı birçok meyve ve sebzededen ultrason uygulaması ile dan antosiyaninlerin elde edildiği literatürler mevcuttur.

Antosiyaninlerin en yüksek verimde ekstraksiyonu için sonikasyon şiddeti ve süresi, sıcaklık, solvent miktarı ve konsantrasyonu gibi parametrelerin optimize edilmesi gerekmektedir. Ekstraksiyon parametrelerinin optimizasyonu deneysel ya da istatistiki metotlar ile gerçekleştirilmektedir. Deneysel ortalamalar ile kıyaslandığı zaman istatistiki metotlar daha az test sayısı ile parametrelerin etkileşimlerini doğrulayabilir ve aynı anda birkaç yanıt için en uygun koşulları belirleyebilir. Yanıt yüzey yöntemi (Response surface methodology: RSM), süreçleri optimize etmek ve iyileştirmek için kullanılan en popüler dizayn metotlarından biridir (Myers, Montgomery, & Anderson-Cook, 2016).

- **Vurgulu Elektrik Alan ile Ekstraksiyon**

Vurgulu elektrik alan ile ekstraksiyonda örnek, 1 ile 10 kV/cm ve 10 kJ/kg ve 5 ile 50 arası vurgu ile oluşturulan elektrik alana maruz bırakılmaktadır. Uygulanan bu elektriksel yük hücre membranlarının elektroporasyonuna ve böylece daha geçirgen olmasını sağlamaktadır. Normal ekstraksiyona oranla 2,5 kat daha fazla antosiyanin verimi sağlamaktadır (Corrales, Toepfl, Butz, Knorr, & Tauscher, 2008). Vurgulu elektrik alan meyve suyu üretiminde, değerli bileşenlerin ekstraksiyon verimini artırdığı için ideal bir metot olarak kabul edilmektedir (Eshtiaghi & Knorr, 2000).

Kırmızı pancardan betanin (Chalermchat, Fincan, & Dejmeek, 2004; Fincan, DeVito, & Dejmeek, 2004; López, Puértolas, Condón, Raso, & Alvarez, 2015) ve üzüm ve kara lahanadan antosiyanin (Gachovska, ve diğerleri, 2010) eldesinde ekstraksiyon verimini artırdığı ile ilgili çalışmalar mevcuttur.

- Mikrodalga ile Ekstraksiyon

Hedef örneğin eşit olarak hızlıca ısıtılmasını sağlayan mikrodalgalar yardımı ile ekstraksiyon işlemi gerçekleşmektedir. Mikrodalga enerjisi moleküllerin hareketini değiştirir ve örneğin ve solventin çok hızlı ısınmasına neden olan kalıcı dipole neden olur (Buldini, Ricci, & Sharma, 2002). Sıvı içeren dokularda su enerjiyi absorbe eder ve ısınarak hücrenin yapısının bozulmasına neden olur (Garofulić, Dragović-Uzelac, Režek Jambrak, & Jukić, 2013). Mikrodalga ile ekstraksiyon, daha kısa süren, daha çözücü gerektiren ve iyi bir tekrarlanabilirliği olan bir yöntemdir (Armenta, Garrigues, Esteve-Turrillas, & de la Guardia, 2019). Kullanılabilecek solventlerin yelpazesinin az olması tekniğin dezavantajlarından (Eskilsson & Björklund, 2000). Matriksten solvante bileşiklerin difüzyonu hızlanırken bazen istenmeyen bileşiklerin de geçmesi söz konusu olmaktadır (Garofulić, Dragović-Uzelac, Režek Jambrak, & Jukić, 2013). Belirli bir değere kadar sıcaklık artışı ve irradyasyon artışı antosiyanin verimini artırmaktadır. Sonrasında ise belirgin bir biçimde düşürmektedir (Garofulić, Dragović-Uzelac, Režek Jambrak, & Jukić, 2013). Siyak kuşburnu (Odabaş & Koca, 2021), yaban mersini (Routray & Orsat, 2014), hibiskus (Cassol, Rodrigues, & Zapata Noreña, 2019), üzüm kabuğu (Liazid, Guerrero, Cantos, Palma, & Barroso, 2011) ve frenk üzümü (Li, ve diğerleri, 2016) farklı bitkilerden mikrodalga ekstraksiyon ile antosiyanin eldesi gerçekleştirilmiştir.

- Yüksek Hidrostatik Basınç ile Ekstraksiyon

Yüksek hidrostatik basınç 100 ile 800 Mpa arasındaki soğuk izostatik hidrolik basınç uygulaması ile gerçekleştirilen bir prosestir (Shouqin & Changzheng, 2005). Bu yüksek basınç uygulaması sıvının bitkideki hava boşluklarına nüfuz etmesini sağlar ve böylelikle hücre membranına zarar verir ve bileşenlerin membrandan çıkmasını kolaylaştırır (Garcia, Butz, & Tauscher, 2001). Aynı anda yüksek basınç yüklü grupların deprotonasyonuna, hidrofobik bağların ve tuz köprülerinin kırılmasına neden olarak protein denatürasyonuna yol açar. Ekstraksiyon işlemi esnasında bitkideki moleküllerin deprotonasyonu ile ortam pH' sını düşürebilir. Böylece yüksek basınç uygulaması, kütle transferini ve

antosiyeninlerin stabilitelerini artırır (Jun, 2013). Yüksek hidrostatik basınç uygulaması ile antosiyenin ekstraksiyonu ile literatürde çilek ve yabani çilek musları, nar suyu (Ferrari, Maresca, & Ciccarone, 2011), ahududu (Suthanthangjai, Kajda, & Zabetakis, 2005), *Vitis amurensis* Rupr. (He, ve diğerleri, 2018) gibi farklı bitkilerden antosiyenin eldesinde YHB kullanıldığı mevcuttur.

- Süperkritik Akışkan ile Ekstraksiyon

Süper kritik akışkan tekniği, bir gazın (çoğunlukla CO₂) kritik sıcaklık ve basıncının üzerinde kullanıldığı ve gazın geçişsel olarak sıvı ve gaz arasında davranarak ekstraksiyon çözücüsü olarak kullanıldığı bir metottur (Galanakis, 2012). Bu metot, ışık ve hava olmadan biyokomponentlerin ekstraksiyonuna imkân tanıdığı için degradasyon reaksiyonları çok azdır. Karbonik asit, etraksiyon matriksinde su ile CO₂ den üretilir ve dışarıdan asit kullanımına gerek kalmaz (Paes, Dotta, Barbero, & Martínez, 2014). Fakat, CO₂' in polar olmayan karakteri nedeni ile bazen düşük konsantrasyonlarda da olsa etanol, metanol gibi yardımcı çözümler kullanılabilir (Barba, Zhu, Koubaa, Sant'Ana, & Orlie, 2016). Süperkritik akışkan ekstraksiyonunun mürver posası (Seabra, Braga, Batista, & de Sousa, 2010), yaban mersini (Paes, Dotta, Barbero, & Martínez, 2014), ve üzüm kabuğu (Ghafoor, Park, & Choi, 2010) antosiyeninlerinin eldesinde kullanılmıştır.

- Enzimatik Ekstraksiyon

Hücre duvarının pektinaz, selüloz, proteaz ve α -amilaz gibi enzimler ile degrade edilmesi hücre yapısını bozarak antosiyeninler gibi hücre içi bileşiklerin ekstraksiyonunu kolaylaştırır (Puri, Sharma, & Barrow, 2012). Enzimler yardımı ile ekstraksiyon, düşük enerji kullanımı, daha az solvent gereksinimi ve daha yüksek geri kazanım gibi avantajlar sunmaktadır. Ham ya da saf olarak pektinaz, viskozim ve celucast gibi enzimler yardımı ile meyve ve sebzelerden antosiyenin ekstraksiyon verimini artırmaktadır. Enzimler tek başına kullanılabileceği gibi birlikte kullanılarak sinerjistik bir etki görmek de mümkün olmaktadır (Kumar, ve diğerleri, 2019). Başta antosiyeninler (Buchert, ve diğerleri, 2005) ve flavonlar olmak üzere enzimatik ekstraksiyonun fenolik bileşiklerin izolasyonunda verimli

bir metot olduğu bildirilmektedir. Literatürde siyah frenk üzümü (Landbo & Meyer, 2001), yaban mersini (Lee & Wrolstad, 2004) ve üzümden (Kammerer, Claus, Schieber, Carle, & Carle, 2005) antosiyanin eldesinde başarılı bir biçimde kullanıldığı çalışmalar mevcuttur.

1.1.6 Antosiyanin Stabilitesini Etkileyen Faktörler

Doğal gıda renklendiricileri içerisinde önemli bir yeri olan antosiyaninlerin stabilitelerinin sıcaklık, ışık, pH, enzimler, oksijen nem, askorbik asit, şeker, sülfid tuzları ve veya sülfür dioksit gibi faktörlerden kolayca etkilenmesi nedeniyle endüstriyel boyutta kullanımı kısıtlanmaktadır (Vinha, Rodrigues, Nunes, & Oliveira, 2018).

- Askorbik asit

Askorbik asidin oksidasyonu, antosiyaninlerin pirilyum halkasını parçalayabilen serbest radikallerin oluşumuna neden olur. Ayrıca askorbik asit antosiyaninler ile kondanse olarak flavilyum pigmenti kaybını tetikler. Askorbik asidin bu etkinliği hem aerobik hem de anaerobik ortamda gerçekleşebilmektedir (Howard, Brownmiller, & Prior, Improved color and anthocyanin retention in strawberry puree by oxygen exclusion, 2014).

- Enzimler

Polifenol oksidaz, fenolikleri kinonlara oksitleyerek dolaylı olarak antosiyanin bozulmasına neden olur. Bu tepkime ile antosiyaninler kahverengi bileşiklere dönüşür. Antosiyanin zengin bitki ekstraktlarında enzim inhibitörü kullanmak renk kaybına neden olacak oksidatif enzimleri durdurur (Terefe, Yang, Knoerzer, Buckow, & Versteeg, 2010)

- Işık

Işık, antosiyaninin benzopirilyum ve C-2 bağlı penil halkasından ve benzoik asitten 2,4,6 trihidroksibenzaldehit oluşmasına neden olarak, antosiyaninlerin degradasyonuna ve rengin açılmasında neden olur (Carlsen & Stapelfeldt, 1997). Işık, antosiyanin stabilitesine etki eden dış faktörlerden biridir. Işık, Antosiyaninlerin yarılanma süreleri ($t_{1/2}$) ışık olan ortamda karanlıkta bekletilene

göre kayda değer biçimde azdır (Bordignon-Luiz, Gauche, Gris, & Falcão, 2007). Işığa maruz kalma ile antosiyanin degradasyonu arasında lineer bir orantı vardır (Amr & Al- Tamimi, 2007).

- Sıcaklık

Gıdalar, tüketime hazır hale gelmeden önce birçok aşamadan geçmektedir. En temel gıda işleme aşamalarından biri de gıdaların istenilen özelliklere ulaşması için pH' sına bağlı olarak uygulanan 50 ile 150°C arasındaki ısı işlemidir. Sıcaklık, antosiyanin stabilitesini etkileyen en önemli faktörlerden biridir. Genel olarak sıcaklık 60°C' nin üzerine çıktığı zaman antosiyaninler çalkon yapısına dönüşmekte, stailite düşmekte ve renksiz bir hal almaktadırlar (Liu, ve diğerleri, 2018). Çözeltinin pH değeri düşük olmasına rağmen 40°C' nin üzerinde sıcaklık antosiyanin rengini kırmızıdan turuncuya dönüştürmektedir (West & Mauer, 2013). Bazı durumlarda, orta dereceli (50°C' ye kadar) ısıtma antosiyaninlerin oksidasyonunu engellemektedir. Fenolik bileşiklerce zengin ekstraktlarda, orta dereceli ısıtma polifenol oksidazın aktivitesini durdurmakta ve bu da antosiyaninlerin enzimatik olarak degrade olmasını engellemektedir (Patras, Brunton, O'Donnell, & Tiwari, 2010). Sıcaklıkla antosiyanin miktarındaki değişim birinci derece kinetik model ile ifade edilmektedir. Aritmetik sıcaklık artışı ile logaritmik bir antosiyanin azalması görülmektedir (Kırca, Özkan, & Cemeroglu, 2007).

- pH

Antosiyaninler, ortamın pH değerine bağlı olarak farklı kimyasal formlarda olurlar. Flavilyum katyonu pH 1 değerinde baskındır ve rengin mor-kırmızı olmasına neden olur. pH 2 ve 4 aralığında ise hızlı proton kaybına bağlı kuinoidal kırmızı-mavi bileşikleri oluşmaktadır. pH değeri 5 ile 6 arasında sırasıyla renksiz karbinol psödobaz ve çalkon türevleri oluşmaktadır. 7 ve üzeri pH değerlerinde ise antosiyaninler ikame gruplarına bağlı olarak degrade olmaya başlarlar (Fleschhut, Kratzer, Rechkemmer, & Kulling, 2006). pH 4-6 noktasında susuz kuinoidal bazı, Flavilyum katyonu, renksiz karbinol bazı ve soluk sarı renkli çalkon

oluşur. pH yükseldiğinde susuz baz miktarı da artar ve daha asidik koşullar altında baskın tür kırmızı flavilyum iyonu olur (Cooper-Driver, 2001). Antosiyanidin stabilitesi, B halkasındaki molekül ve nötr ortamda aglikon stabilitesini düşüren hidroksil ve metoksil gibi grupların varlığından etkilenir. Bu nedenle en stabil aglikon pelargonidindir (Fleschhut, Kratzer, Rechkemmer, & Kulling, 2006). Aglikonların aksine monoglikozitler ve çoğunlukla diglikozitler nötr pH değerinde daha stabildir. Çünkü şeker molekülleri karasız moleküllerin fenolik asit ve aldehit bileşiklerine dönüşmesini engeller (Fleschhut, Kratzer, Rechkemmer, & Kulling, 2006). pH' nın antosiyaninlerin stabilitesine ve renk varyasyonlarına etkisi alkalın bölgede daha belirgindir. Çünkü bu bölgede moleküllerin stabilitesi çok düşüktür (Cabrita, Fossen, & Andersen, 2000). Flavilyumun tahmini pKa değerleri 1-3, kuinoidalın 4-5 ve çalkon monoanyonların ise 7,5-8' dir. Flavilyum ve kuinoidal baz kırmızı iken, kuinoidal monoanyon ve dianyon mor ve mavi şeklinde gözlemlenebilir (Asenstorfer, Giland, Tate, & Jones, 2003).

Antosiyanin pigmentlerinin çoğu asidik koşullarda daha yüksek stabiliteye sahiptir. Siyanidin ve delfinidin en iyi örneklerdir. Daha yüksek pH değerlerinde petanin gibi bazı antosiyanidinler pH 8' de bile degradasyona dayanıklıdır. Bu nedenle petanin bitki kökenli içecekler için iyi bir renklendiricidir (Fossen, Cabrita, & Andersen, 1998).

1.1.7 Antosiyanin Stabilite Artırma Metotları

Gıda sanayinde önemli bir yeri olan antosiyaninlerin, sıcaklık, pH, ışık, oksijen, enzimler ve askorbik asit gibi dış etmenlerden kolayca etkilenmesi kullanımını kısıtlamaktadır. Bu nedenle endüstriyel ve akademik çalışmalar, molekülün daha stabil hale gelmesi üzerine yoğunlaşmıştır (Castañeda-Ovando, Pacheco-Hernández, Páez-Hernández, Rodríguez, & Galán-Vidal, 2009). Kopigmentasyon, antosiyaninlerin başka bileşikler ile kompleks oluşturması prensibine dayanan bir stabilizasyon metodudur. Bu amaçla, metaller, fenolik bileşikler, amino asitler, polisakkaritler ve organik asitler gibi birçok molekül antosiyanin kopigmentasyonunda kullanılmıştır (Cortez, Luna- Vital, Margulis, & Gonzalez de Mejia, 2017).

1.1.7.1 Moleküler Kopigmentasyon ve Kompleks Oluşturma

- Metal-Antosiyanin Kompleksleri

Farklı konsantrasyonlarda demir, alüminyum, bakır gibi farklı metal katyonları ile antosiyanin kompleksleri oluşturularak, antosiyaninlerin stabilitesi artırılmaktadır. Metal katyonları, antosiyanin B halkasında orto-dihidroksil düzeni oluşturması ile stabilizeye katkı sağlamaktadır. Bu metalloantosiyaninler, bir sitokiyometrik oran ile kendiliğinden oluşan ve sulu çözeltide hemen ayrılan bir yapıya sahiptirler. Bu nedenle oluşan kompleksin daha da stabil olması için pektin gibi polisakkaritleri de metal-antosiyanin kopigmentasyonuna dahil edildiğı çalışmalar mevcuttur. Bu kompleks, siyanidin, delfidin ve petunidin antosiyanidinleri ile oluşurken, pelargonidin, malvidin ve peonidinde oluşmamaktadır (Cortez, Luna-Vital, Margulis, & Gonzalez de Mejia, 2017; Tachibana, Kimura, & Ohno, 2014).

Patlıcan, ahududu, kırmızı lahana, aronya, siyah kuş üzümü ve kara havuç bitkilerinden izole edilen siyanidin ve delfidin türevleri üzerine alüminyum tuzlarının (0.057, 0.2288, ve 0.4576 M) etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, alüminyum-antosiyanin komplekslerinin pH 3-6 aralığında bütün bitki ve antosiyanin türlerinde gerçekleştiğı bildirilmiştir. Her bir antosiyanin alüminyum katyonları ile muamele edildiğinde batokromik ve hiperkromik etkileşim göstermiştir. Düşük antosiyanin konsantrasyonlarında, artan alüminyum tuzu miktarı belirgin bir fark oluşturmamıştır. Örnek antosiyanin miktarlarının 25, 50 ve 100 μ M olarak alındığı çalışmada optimum tuz konsantrasyonu 100-500X antosiyanin olduğu bildirilmiştir. pH değeri yükseldikçe antosiyanin degradasyonu artmış ve metalloantosiyanin kompleksleri zayıflamıştır (Sigurdson & Giusti, 2014).

Metal iyonlarının Tachibana ve ar. (2014), demir, alüminyum ve kalsiyum anyonlarının (FeCl_3 , FeCl_2 , AlCl_3 ve CaCl_2) siyanidin-3-glukozit, pelargonidin-3-glukozit ve delfidin-3-glucosit antosiyaninlerinin stabiliteyi üzerine etkisini incelediğı benzer bir çalışmada 30 μ L antosiyanin solüsyonu, 6 μ L of 100 mM metal tampon çözeltisi ve 10 μ L 10 g/l polisakkarit tampon çözeltisi ile

karıştırılarak metal-antosiyenin kompleksi oluşturulmuştur. Fe^{+3} anyonu siyanidin ve delfidin moleküllerinin termal stabilitesini belirgin bir biçimde artırmıştır. Pelargonidinde B halkasındaki hidroksil grubunu az olması nedeni ile etkin olamamıştır. Siyanidin-metal komplekslerinden yalnızca kalsiyum tuzu termal stabilitede fazla etkinlik göstermemiştir. Termal stabiliteyi artırma sıralaması $\text{Fe}^{2+} > \text{Al}^{3+} > \text{Fe}^{3+}$ şeklinde oluşmuştur. Her bir metal iyonu yanında katılan pektin, aljinat ve karregenana stabiliteye olumlu katkı sağlamıştır (Tachibana, Kimura, & Ohno, 2014).

Mikroenkapsülasyon öncesi, metal kopigmentasyonun kırmızı lahana antosiyenin termal stabilitesi üzerine etkisinin incelendiği başka bir çalışmada, 1:1 oranında metal anyonu (Al^{+3} , Ca^{+2} , Fe^{+3} ve Sn^{+2}) antosiyenin kompleksleri oluşturulup sprey kurutucu ile enkapsüle edilerek termal degradasyon parametreleri incelenmiştir. Alüminyum katyonu hariç, diğer bütün metaller antosiyenin yarılanma sürelerini kontrole göre azaltmıştır. K değerleri kıyaslandığında Sn^{+2} anyonu içeren örnek en yüksek olarak saptanmıştır (Ratanapoompinyo, Nguyen, Devkota, & Shrestha, 2017).

- Fenolik Bileşikler ile Kopigmentasyon

Antosiyenin fenolik bileşikler ile moleküler bazda kompleks oluşturması, bitkilerde doğal olarak var olan renk-stabilizasyon mekanizmasıdır. Flavonollar, konsantrasyon artışı ile paralel olmak ile en etkili kopigmentlerdedir (Rustioni, Bedgood Jr., Failla, Prenzler, & Robards, 2012). Kopigmentler, antosiyenin iskeletine kovalent bağlanmaktadır. Fenolik bileşiklerin sandviç-tipi-toplanma gibi antosiyenin ile oluşturduğu sterik konformasyon nükelik atakların engellenmesine ve antosiyenin molekülünün daha stabil olmasına katkı sağlamaktadır (Stintzing, Stintzing, Carle, Frei, & Wrolstad, 2002). Antosiyenin ile stabilize edici ajanlar arasında oluşan kompleksler ya $\pi-\pi$ etkileşimlerini içeren dikey kümelenmiş moleküler agregatlar ya da $\text{CH}-\pi$ etkileşimleri temelli daha dik hizalanmalar şeklinde olmaktadır. Su ile etkileşimleri en aza indirmek için fenoliklerin birbirleriyle birleştiği hidrofobik etkileşimler dahil olmak üzere zayıf moleküler kuvvetler söz konusudur.

İyonlaşabilen kofaktörlerin dahil olduğu bitartrat gibi karşı iyonların da muhtemel katkıları vardır. Fenolik kofaktörler yardımı ile renkteki iyileşme sinnamik asit için %60-70 civarında iken bu oran rutin ile %1000' e ulaşmaktadır (Rustioni, BedgoodJr., Failla, Prenzler, & Robards, 2012). Fenolik açıl kısımlarının $\pi-\pi$ etkileşimleri ile antosiyanidinler ile moleküller arası kompleksler oluşturduğu bilinmektedir. Molekül içi ko-pigmentasyon olarak da adlandırılan bu fenomen, pirilyum halkasının C2 pozisyonundaki suyun nükleofilik saldırısını bloklayarak pH artışı ile renksiz hemiketallerin oluşumunu kısmen önler veya geciktirir (Gras, Nemetz, Carle, & Schweiggert, 2017). Genel olarak, kopigmentler ya $\pi-\pi$ etkileşimlerinin oluşumuna zemin hazırlayan yeterince genişletilmiş π -konjuge sistemlere ya da hidrojen bağı vericisi/alıcısı olabilecek OH ve C-O gibi gruplara sahip olmalıdır. Hidrolize edilebilir taninler, flavonoidler ve fenolik asitler iyi birer kopigment olarak bilinirler. Flavonoid kopigmentler içerisinde flavonoller flavonlar, flavonoller ve hatta dihidroflavonoller yer alır. π -konjugasyonlarının tüm trisiklik çekirdek yapıları (A, B ve C halkaları) üzerine yayılması nedeniyle, flavonlar ve flavonoller (örn., kuersetin, kaempferol, izokuercitrin ve rutin) en verimli kopigmentler olarak karşımıza çıkmaktadır (Trouillas, ve diğerleri, 2016).

Gras ve ark. (2017) mor tatlı patates antosiyaninlerinin stabilitesi üzerine farklı konsantrasyonlarda klorojenik asit, rozmarinik asit ile elma ve biberiye fenoliklerinin etkisini incelemiştir. Klorojenik asit ve rozmarinik asit çözeltileri 1, 2.5 ve 10 g/L konsantrasyonunda; elma ve biberiye ekstratları ise 1.3, 2.6 ve 12.7 g/L konsantrasyonunda hazırlanmış ve antosiyanin:fenolik oranı 1:013 olarak ayarlanmıştır. Düşük pH değerlerinde tatlı mor patates antosiyaninleri ile fenolik asitler ve ekstraktlar hiperkromik değişim göstererek kopigmente olmuşlardır. Kopigmentasyon oranı katılan ajana bağlı olarak %50' ye kadar gelebilmiştir. Antosiyaninlerin pKH değerleri kopigment ilavesi ile 3.28' den 4.71' e kadar çıkmıştır (Gras, Nemetz, Carle, & Schweiggert, 2017).

Üzüm kabuğu antosiyaninlerinin ısı ve ışık stabilitesini üzerine kuersetagetin ilavesinin etkisinin incelendiği bir çalışmada, antosiyaninler 1'e 10, 20 ve 40 oranında kuersetagetin ile kopigmente edilip 70°C, 80° ve 90°C' de ısı işlem uygulanmıştır. Sonuçlar birinci derece kinetik model ile açıklanmıştır.

Kuersetagetin konsantrasyonunun artması ile antosiyaninlerin yarılanma süreleri uzamıştır. Ayrıca ışık ile renk azalması kopigmente edilmiş örneklerde kontrole nazaran daha az olmuştur. Ayrıca rutin, mirisitrin ve çay polifenollerini ile kıyaslandığı zaman kuersetagetin en etkili kopigmentasyon ajanı olmuştur. 90°C’ de 1:40 oranında kopigment içeren örneklerin k değerleri 0.003 ile 0.0021 arasında değişmiştir. Kontrolde bu değerler 0.0019 ve 0.0027 arasında değişmiştir. pH’ nın artması ile de beklenildiği üzere hem kontrol grubunda hem de kopigmente edilmiş örneklerde degradasyon daha da artmıştır (Xu, Liu, Yan, Yuan, & Gao, 2015).

Benzer bir çalışmada Gras ve ark. (2016) siyah havuç antosiyaninlerine klorojenik asit, fenolikçe zengin kahve ekstraktı ve siyah havuç fenoliklerini 1:0-1:162 oranında katarak kopigmente etmişlerdir. 90°C’ de 5 saat ısı işlem uygulayıp degradasyonu birinci derece kinetik model ile değerlendirmişlerdir. Kontrol grubunun 5 saat sonunda toplam antosiyanin kaybı %37.6 olarak ölçülmüştür. 1:0.4-1:0.36 arasında kopigmentasyon ajanı katılmış örneklerde bu değer 38.1–39.2% arasında bulunmuş ve çok bir fark gözlemlenmemiştir. Fakat daha yüksek konsantrasyonlarda ilave edildiğinde ise daha dayanıklı antosiyaninler (5.6% ve 8.7% oranında daha az kayıp) elde edilmiştir. En yüksek konsantrasyonda kopigment içeren örneğin yarılanma süresi 4.72 saat ile kontrolden (3.63) çok daha yüksek olmuştur (Gras, Bogner, Carle, & Schweiggert, 2016).

Güvercin bezelye yapraklarından izole edilen flavonoid-C-glukozitleri olan viteksin ve orientin’ in yanında rutin yabanmersini antosiyaninleri ve rengi üzerine etkisi Pan ve ark. (2014) tarafından incelenmiştir. 30 mL yaban mersini suyuna 1:0.1, 1:0.5 ve 1:1 oranında fenolik bileşikler katılmıştır. Kopigmentlerin ilavesi, görünür dalga boyunda (450-600 nm) absorbanası artırmıştır bu da hiperkromik etkinin olduğunu göstergesidir. 7. Günün sonunda viteksin, orientin ve rutin içeren kopigmente meyve suyu örnekleri renklerini koruyabilmişlerdir. Rutin ilaveli örnek, diğer örneklerle nazaran biraz daha zayıf kalmıştır. 1:1 oranında rutin ve fenolik ekstraktı içeren örnekler ve 1:05 oranında fenolik ekstrakt içeren örnekler daha uzun yarılanma süresine ($t_{1/2}$) ve daha küçük degradasyon sabitine (k) sahip olduğu gözlemlenmiştir. Yarılanma süreleri 10.7

ile 12.7 d arasında değişmiştir. K değerleri ise 0.0603 ile 0.0709 d-1 arasında değişmiştir (Pan, ve diğerleri, 2014).

Benzer bir çalışmada 4 farklı tür zmden (Tempranillo, Syrah, Cabernet Sauvignon ve Graciano) izole edilen fenoliklerin kırmızı üzüm antosiyaninleri ile kopigmente edilmesi ile elde edilen meyve sularının stabiliteleri incelenmiştir. Graciano türü üzümden elde edilen fenolikler ile kopigmente edilen üzüm suları en yüksek k (0.0094) değerine sahipken en düşük de yarılanma süresine (73.2) sahip oldukları bildirilmiştir. Diğer taraftan, *syrah* türü üzüm fenoliklerinin olduğu örnek termal olarak en dayanıklı olarak gözlemlenmiştir. Dolayısı ile en düşük k (0.0042 d-1) değerine sahip iken; yarılanma süresi (165.0 d)de en yüksek örnek olmuştur. zm türlerinden *Temperanillo* ve *Syrah*ın fenoliklerinin yüksek konsantrasyonda içeren örnekler en yüksek yarılanma sürelerine sahip örnekler olurken; en düşük oranda Graciano türü fenolik içeren örnekler en düşük yarılanma sürelerine sahip olmuştur (Gordillo, ve diğerleri, 2018).

Bimpilas ve ark. (2015) şarapların stabilitesi üzerine rozmarinik asit ve hidroksisinamik asidin etkisini inceledikleri benzer bir çalışmada, kopigmente şarapların renk yoğunluğu ve antosiyanin stabilitesini incelemişlerdir. Rozmarinik asit dışarıdan temin edilirken hidroksinamik asit kekik, *O. vulgare* ssp. *hirtum* ve *S. Thymbr*' dan izole edilmiştir. Kofaktörler, çözeltideki toplam konsantrasyonları 650mg/L olacak şekilde 20 mL şarap örneklerine katılmıştır. Kopigmentasyon, olgunlaşmamış şaraplarda maksimum absorbe edilen dalga boyunu 5-20 nm artırıarak batokromik etki göstermiştir. İlerleyen safhalarda daha yoğun renk oluşmasına neden olmuştur (hiperkromik etki). Depolama süresi boyunca kopigmente edilmiş ürünler daha stabil sonuçlar verirken; şarap örneklerinin rengine %15-50 arasında katkı sağlamışlar (Bimpilas, Panagopoulou, Tsimogiannis, & Oreopoulou, 2016).

Tatlı patates antosiyaninlerinin stabilitesi üzerine gallik, ferulik ve kafeik asidin etkisinin incelendiği benzer bir çalışmada Qian ve ark. (2017) 1:100 antosiyanin:fenolik örnekleri hazırlamışlardır. Son çözeltideki toplam antosiyanin miktarı 22,5 mg iken gallik, ferulik ve kafeik asit miktarları sırası ile 851, 971 ve

901 mg olarak ayarlanmıştır. 95°C’ de sıcaklık uygulanan örneklerin termal parametreleri birinci derece kinetik model ile hesaplanmıştır. Mor patates örneklerinin renk yoğunlukları ferulik asit ile %26,5 oranında artarken, kafeik asit ile %20,1, gallik asit ile de %19,1 oranında artmıştır. Örneğin yarılanma süresi 2.72 s olurken; gallik asit ve ferulik asidin yarılanma süreleri 3.4 h civarında iken kafeik asitte bu değer 2.29 s olmuştur (Qian, Liu, Zhao, Cai, & Jing, 2017).

Sun ve ark. (2010) ahududu antosiyaninlerinden siyanidin 3-glukozit ve siyanidin 3-soforozit’ i izole ederek sinapik asit, ferulik asit, kafeik asit, kumarik asit ve gallik asit olmak üzere 5 farklı fenolik asit ile kopigmente etmiş. Kopigmentasyonda antosiyanin:fenolik asit oranı 1:20, 1:40, 1:60, 1:80 ve 1:100 olarak ayarlanmıştır. Tüm antosiyanin:fenolik kompleksleri batokromik ve hiperkromik kayma göstermiştir. Konsantrasyon değişimi ile kopigmentasyon oranları da değişmiştir. En kuvvetli kopigmentasyon, 1:100 olan maksimum konsantrasyonda gerçekleşmiştir (Sun, Cao, Bai, Liao, & Hu, 2010).

Erik antosiyaninlerinin rutin ile kopigmentasyonu ile elde edilen model içeceklerin raf ömrü süresi boyunca renk ve stabilite durumları incelenmiştir. 20 mL ham erik ekstraktı ile 15 mL rutin çözeltisi karıştırılarak içecekler elde edilmiştir. 7 haftalık depolama süresin sonunda sade ekstraktın H* değeri rutin ile zenginleştirilmişten çok daha yüksek bulunmuştur. Ham antosiyanin ekstraktı 5. Haftanın sonunda toplam antosiyaninin %60’ ını kaybetmiştir. Rutin içeren örneklerde bu kayıp %50 civarında gözlemlenmiştir (Hernández-Herrero & Frutos, 2015).

Weber ve ark. (2017) böğürtlen antosiyaninlerini sprey kurutma öncesi rutin ve ferulik asit ile kopigmente etmiş ve stabilitelerini incelemişlerdir. Antosiyanin:fenolik oranı ferulik asitte 1:0.43 (w/w) iken rutinde 1:1.48 (w/w) şeklinde ayarlandı. Sprey kurutulmuş bütün örnekler %1-40 arası bir kayıp göstermişlerdir. Saf antosiyanin örneğinde kayıp %37-38 civarında iken ferulik içeren örnekte bu değer %35; rutin içeren örnekte ise %25-28 civarlarında gözlemlenmiştir. Yarılanma süreleri kıyaslandığında ise saf örneğin yarılanma süresi 151 gün iken, ferulik asit içeren örneğin 158 ve rutin içeren örneğin ise 193 gün olarak hesaplanmıştır (Weber, Boch, & Schieber, 2017).

- Siklodekstrinlerin İlavesi ile Stabilite Artırma Metotları

Siklodekstrinler α -(1 $\rightarrow$ 4) bağları ile bağlanmış β -d-glikopiranozil ünitelerinden oluşan siklik oligosakkaritlerdir. En yaygın olanları sırası ile 6, 7 ve 8 glikoz ünitesi barındıran α -, β - and γ -siklodekstrindir. Siklodekstrin molekülleri, hidrofobik bir boşluk oluşturmak için siklik düzende dizilirler ve böylelikle antosiyaninler ile kompleks oluşturarak, antosiyanin moleküllerini hidrasyon ve polimerizasyon reaksiyonlarından koruyarak stabilitelerine katkıda bulunurlar. Bu etkileşim, antosiyanin yapısı, ortam pH değeri ve siklodekstrinlerin konsantrasyonu ile ilişkilidir (Fernandes ve diğerleri, 2018).

Idaho ve Otomi türü iki adet siyah fasulye kabuklarından elde edilen antosiyaninlerin, sporcu içeceği olarak kullanımı için β -siklodekstrin ile kopigmentasyonu gerçekleştirilmiştir. β -siklodekstrin örnekler % 2 oranında katılmıştır. Örnekler, Idaho türünden elde edilen 25 mg saf antosiyanin ve Otomi türünden elde edilen 65 mg saf antosiyanin ve Otomi türünün kabuğundan elde edilen 1.5 g sıvı solüsyon ile hazırlanmıştır. Örneklerin ışık muamelesi ve raf ömrü süresince termal stabilitesi 1. Derece kinetik düzen ile ifade edilmiştir. Karanlık ortamda tüm örneklerdeki antosiyanin kayıpları az olup, β -siklodekstrin içeren örneklerde daha da az olmuştur. K değerleri en düşüğü 0.0455 gün⁻¹ olmakla birlikte kayda değer biçimde düşmüştür. Yarılanma süreleri β -siklodekstrin ilavesi ile Otomi örneklerinde 9.8 günden 15.2 güne, Idaho örneklerinde ise 7.5 günden 9.4 güne çıkmıştır. Raf ömrü süresi boyunca, β -siklodekstrin içeren tüm örneklerin yarılanma süreleri artmıştır. Idaho örneğinde 31.8 haftadan 77.8 haftaya çıkarken; Otomi örneğinde ise bu değer 36.10 haftadan 96.42 haftaya çıkmıştır (Aguilera ve diğerleri, 2016).

Benzer bir çalışmada Quan ve ark. (2020) mor tatlı patates antosiyaninlerini farklı konsantrasyonlarda β -siklodekstrin ile zenginleştirerek termal degradasyon parametrelerini incelemiştir. 500 mg/L ve 2500 mg/L' lik β -siklodekstrin çözeltileri ile patates antosiyaninleri kopigmente edilmiştir. 100°C' de 30 dakikalık ısıtıl işlemin ardından 500 mg/L β -siklodekstrin içeren örnekte termal degradasyon kontrolden daha fazla olmuştur. Fakat 2500 mg/L β -siklodekstrin içeren örnekte

bu deęer dūřmūřtur. Kontrolde toplam kayıp %42.5 iken 500 mg/L β-siklodekstrin içeren örnekte %50.2 ve 2500 mg/L β-siklodekstrin içeren örnekte ise %34.7 olarak gözlemlenmiřtir. Kontrol örneklerinde k deęeri 1103 min⁻¹ ve t ¹/₂ deęeri de 36,3 dakika olarak bulunmuřtur. Dūřuk konsantrasyonda β-siklodekstrin içeren örnekte k deęeri 1413 iken yūksek konsantrasyonda 0.988 min⁻¹ olarak lūlmūřtur. K ve t ¹/₂ deęerlerinden de konsantrasyon artıřı ile daha stabil bir ūrūn elde edildięi anlařılmaktadır (Quan, ve dięerleri, 2020).

Howard ve ark. (2013) β-siklodekstrin ile aronya antosiyaninlerinin kopigmentasyonunu gerçekleřtirmiř ve stabilite deęiřimini incelemiřlerdir. %0,5, 1 ve 3 oranında β-siklodekstrin ilavesi gerçekleřmiřtir. Pastörizasyon iřlemi esnasında β-siklodekstrin ilavesi antosiyanin kayıplarını azaltmıřtır. En yūksek konsantrasyondaki (%3) β-siklodekstrin ilavesi dūřuk pH deęerinde çok fazla kayda deęer koruma saęlamazken; daha yūksek pH deęerlerinde kayıpları azaltmıřtır. 8 aylık depolama sonrasında %3 β-siklodekstrin içeren örneklerdeki antosiyanin miktarının kontrole göre %49 daha fazla olduęu bildirilmiřtir. 2-8 aylık periyotta %3 β-siklodekstrin içeren örnekler toplam antosiyaninlerinin %95' i gibi būyūk bir kısmını muhafaza etmiřlerdir.

- Diğer Stabilizasyon Metotları

Antosiyaninlerin stabiliteleri ūzerine gam arabik ilavesinin etkileri Guan ve Zhong (2015) tarafından incelenmiřtir. Kopigmentasyon için 0,51 mg/mL antosiyanin rneęi ile 10 mg/mL gam arabik pH 5' te karıřtırılmıř ve 80 ve 126°C' de 80 dakika ısıt iřlem uygulanmıřtır. Kontrol grubu örneklerinde b* deęeri önemli lūde artarken a* deęeri ise azalmıřtır. Gam arabik ekli örnekte a* ve b* deęerlerindeki deęiřim çok fazla olmamıř ve renk deęerleri sabit kalmıřtır. Gam arabik ilavesi ile 80 ve 126°C' deki k deęerleri sırasıyla %61 ve %45,3 oranında dūřmūřtur. 80°C' de kontrol örneęinin k deęeri 0.41*10² dakika⁻¹ iken yarılanma sūresi de 221,47 dakika olarak bulunmuřtur. Bu deęerler gam arabik ilavesi yapıldıęında sırasıyla 0.16 *10² dakika⁻¹ ve 445,13 dakika olarak lūlmūřtur. Aynı řekilde 126°C'de kontrol örneęinin k ve t ¹/₂ deęerleri 4.28 10² dakika⁻¹ ve 16,58 dakika olarak

ölçülürken; gam arabik ilavesi sonrası bu değerler sırası ile $2.34 \cdot 10^2$ dakika⁻¹ ve 30.14 dakika olmuştur (Guan & Zhong, 2015).

Kopigment olarak narenciye, elma ve şeker pancarı pektinlerinin kullanıldığı bir çalışmada Buchweitz ve ark. (2013) çilek antosiyaninlerinin stabilitesini incelemişlerdir. Koruyucu olarak potasyum sorbatın eklendiği örnek gruplarında oranlar 500 mg/kg antosiyanin, 1% (w/w) pektin ve 0.2% (w/w) sorbat olmuştur. Raf ömrü süresi boyunca elma ve şeker pancarı pektini antosiyanin kaybını azaltırken narenciye pektinleri çok fazla etkin olmamıştır. Kontrol grubu için 18 haftanı sonunda yarılanma süresi 38 gün ve %90 oranında pigment kaybı gözlemlenmiştir. Elma pektini eklenen örneklerde bu değer 48.2 ve 52.9 arası olurken; şeker pancarı pektinlerinde bu süre 47.2 ile 48,5 gün arası olmuştur. Narenciye pektini içeren örneklerde yalnızca 4-5 günlük bir iyileşme olmuştur (Buchweitz, Speth, Kammerer, & Carle, 2013).

Süt α ve β - kazeinlerinin malvidin-3-O-glikozit antosiyanini üzerine etkisinin incelendiği bir çalışmada üzüm kabuğu antosiyaninlerine 0.05, 0.1 ve 0,15 mg/mL konsantrasyonlarında kazeinler 1:1 oranında ilave edilmiştir. Daha sonra bu örnekler ısıtma, oksitleme ve ışığa maruz bırakma olmak üzere 3 farklı işleme tabi tutulmuşlardır. Isıl işlem esnasında antosiyanin degradasyon oranlarına bakıldığı zaman en az (%46) degradasyon 0.1 kazein içeren örnekte gözlemlenirken kontrolde bu oran %74,19 olarak gözlemlenmiştir. Oksidasyon işleminde kontrol grubundaki antosiyanin kaybı %96,18 iken 0.1 mg/mL kazein örneğinde bu oran % 78.49' a düşmüştür. Son olarak ışığın antosiyanin degradasyonu oranlarına bakıldığında kontrolde kayıp %92,21 olarak, 0.1 mg/mL kazein örneğinde % 65.13 olarak ölçülmüştür. 0.15 mg/mL kazein içeren örneklerin etkinlikleri 0.1 oranında içerenlerden daha az olmuştur (He, Xu, Zeng, Qin, & Chen, 2016).

Fernandes ve ark. (2016) oenin antosiyaninin stabilitesi üzerine pektik polisakkaritlerin etkisini inceledikleri bir çalışmada narenciyelerden elde edilmiş düşük moleküllü pektik polisakkaritler ile 1:0, 1:5, 1:10, 1:20, 1:30 ve 1:40 oranlarında kopigmente edilmiştir. Pektik polisakkaritlerin oenin molekülüne bağlanması rengi kuvvetlendirmektedir.

1.1.7.2 Mikroenkapsülasyon

Antosiyaninlerin stabilitelerini artırmada kullanılan bir diğer yöntem de enkapsülasyondur. Bu amaçla mikro ve nano boyutta uygulanan farklı teknikler bildirilmiştir. Bunlardan birincisi sprey kurutma, liyofilizasyon ve elektrospin gibi özel bir ekipman yardımı ile gerçekleştirilen yöntemlerdir. Bunlara ilave olarak da su-yağ emülsiyonları ve lipozomlardan bahsedilebilir. Son olarak da atomizasyon ya da ekstrüzyon temelli enkapsülasyon yöntemi olan iyonik jelleşme ile hazırlanan nano ve mikro taşıyıcılar gelmektedir. Teknikten bağımsız olarak birçok biyopolimer bazlı taşıyıcılar da antosiyanin enkapsülasyonunda kullanılmaktadır. Bunlara da karbonhidrat temelli gamlar, nişasta ve maltodekstrin ve protein temelli jelatin, whey proteinleri ve soya proteinleri örnek olarak verilebilir (Sharif, Khoshnoudi-Nia, & Jafari, 2020). Sprey kurutmaya siyah havuç (Ersus & Yurdagel, 2007), yaban mersini posası (Flores, Singh, & Kong, 2014), lipozoma siyah havuç (Guldiken, Gibis, Boyacioglu, Capanoglu, & Weiss, 2017) ve keçi yemişi (Zhao, Temelli, & Chen, 2017), liyofilizasyona böğürtlen (Yamashita, ve diğerleri, 2017), emülsiyona hibiskus (de Moura, Berling, Germer, Alvim, & Hubinger, 2018) gibi farklı gıda örneklerinin antosiyaninleri örnek olarak verilebilir.

1.1.8 Karamuk (*Berberis crataegina* DC.)

Karamuk (*Berberis crataegina* DC.) *Berberidaceae* ailesine ait, genellikle Anadolu bölgesinde yabani koşullarda yetişen endemik bir bitkidir. Yöre halkı tarafından doğrudan tüketildiği gibi içeceği, reçeli ya da marmelatı da yapılmaktadır. Meyvelerinin rengi koyu mordan siyaha değişmekte olup kuvvetli bir ekşiliği vardır. Yapraklı bir çalı gibi olan bitki 2metre uzunluğa ulaşabilmektedir. Yaprakları küçük oval olup, çiçekleri sarıdır. Meyveleri, yaz sonları ya da sonbahar başlarında tam olgunlaşmaya erişir. Demir içeriği zengin topraklarda yetişir (Develi Işıklı & Yılmaz, 2014). Biyoaktivitesi yüksek olan bitki, antosiyanince, c vitaminince, taninlerce ve organik asitlerce zengindir. Bu özelliklerinden dolayı iltihap önleyici, diüretik, antioksidan özellik gibi birçok fonksiyonu bulunmaktadır (Yeşilada & Küpeli, 2002). Yetiştigi bölgeler arasında farklılık göstermekle birlikte

448-148 µg fenolik madde ve yaklaşık 4684 mg/L antosiyanin içermektedir (Sarraf, Beig-babaei, & Naji-Tabasi, 2019). Karamuk bitkisi içermiş olduğu alkaloidler ile güçlü bir antifungal etki göstermektedir. Soğuk algınlığı, bronşit ve şeker hastalığı gibi hastalıkların tedavisinde ekstraktlarının kullanıldığı bildirilmektedir. Ayrıca köklerinin yakılmasıyla elde edilen küllerin tereyağına katılması ile elde edilen merhemın yaraları iyileştirdiğı bildirilmektedir (Toroğlu & Çenet, 2006; Savran, Bağcı, & Kargioğlu, 2009)

1.2 Tezin Amacı

Renk, gıdaların fark edilen ilk duyuşal özelliğı olmasının yanında tüketici tercihlerinin ve dolayısı ile gıdada kalite algısının da ilk belirleyicisidir. Bitkisel kaynaklı boyalar, ilk çağlardan bu yana gıdaların görünüşünün iyileştirilmesinde kullanılmaktadır. 1800lerden sonra artan boya ihtiyacını karşılamak için gıda boyaalarının kimyasal olarak sentezlenmesi popülarite kazanmış ve günümüzde de çok büyük oranda kullanılan sentetik boyalar üreilmeye başlanmıştır. FDA tarafından onaylı olan sentetik boyalar, proses şartlarından en az şekilde etkilenererek katıldıkları ürünün rengini iyileştirmektedirler. Son yıllarda artan tüketici bilinci, sentetik boyaaların insan sağlığı üzerindeki sorgulatmaya başlamıştır. Bu kapsamda yürütölen birçok akademik çalışma bu boyaaların başta kanser, kardiyovasküler hastalıklar, diyabet, obezite, alerjik reaksiyonlar ve Hiperaktivite gibi hastalıkları tetiklediklerini ortaya koymuştur. Yapay boyaaların zararlı etkileri tüketiciyi doğal olan alternatiflerine yöneltmiştir. Bitkilerden farklı yollarla elde edilen antosiyaninler, klorofiller, karotenler, betaninler ve likopen gibi doğal bileşenler gıdalarda kullanılmaya başlanmıştır. Antosiyaninler, pembeden, kırmızıya; mordan, maviye değışen renklere sahip, gıda endüstrisinde sıklıkla kullanılan doğal boyaaların en önemlilerindendir. Fakat antosiyaninlerin gıda işleme esnasında maruz kaldıkları sıcaklık, ışık ve oksijen gibi etmenlere dayanıksız olmaları, akademik ve endüstriyel araştırmaları bu boyaaların stabiliteilerini artırmaya yöneltmiştir. Moleküler kopigmentasyon ve mikroenkapsölasyon yöntemleri en çok kullanılan yöntemlerdir. Kopigmentasyon, antosiyaninlerin fenolik bileşikler, metal iyonları, siklodekstrinler ve proteinler

gibi farklı moleküller ile kompleks oluşturarak ortam şartlarına dayanıklı hale getirilmesini sağlayan bir metottur. Moleküler kopigmentasyon, üzüm, siyah lahana, siyah havuç, ahududu, yaban mersini, çile ve berberin türleri gibi birçok farklı gıdadan elde edilen antosiyaninlerin stabilizasyonunda denenmiş ve olumlu sonuçlar alınmıştır. Karamuk (*Berberis crataegina* DC.) bitkisi, Anadolu'nun farklı yörelerinde kendi başına yetişen, dikenli çalılarda mor-siyah meyveler veren endemik bir bitkidir. Yüksek antosiyanin içeriği, kırmızı ve tonlarında doğal boya olabilme potansiyeline sahip olduğunu göstermektedir. Fakat bütün doğal pigmentlerde olduğu gibi karamuk antosiyaninleri de proses şartlarına dayanıklı değildir.

Bu çalışma ile;

- Karamuk bitkisinin antosiyaninlerinin ekstraksiyonu için optimum şartların belirlenmesi,
- Optimum şartlarda ekstrakte edilen antosiyaninlerin saflaştırılması,
- Saflaştırılan antosiyaninlerin farklı moleküller ile kopigmente edilerek ısıl stabilitesinin artırılması hedeflenmektedir.

Elde edilen stabil boya ile,

- Başta gıda sektörü olmak üzere ilaç ve tekstil sanayinde kullanılacak farklı özellikte doğal boyaların üretilmesi,
- Katıldığı gıda ürününün rengini korumasının yanında fonksiyonel özelliklerinin de artıracak bir ürün eldesi,
- Yapay boyalar ve karmin gibi helallik durumu şüpheli ürünlere alternatif bir ürün eldesi,
- Ülkemizin boya ithalatının azaltılıp, potansiyel bir ihracat kalemi olabilecek bir ürün sunulması,
- Yetişen yörelerimiz için yeni bir tarım bitkisi haline getirilerek, yöre halkımıza istihdam sağlanması hedeflenmektedir.

1.3 Hipotez

Berberis crataegina DC., antosiyanince zengin bir bitki olmasının yanı sıra içermiş olduğu bileşenler ile de fonksiyonel bir bitkidir. Bitki yetiştirme koşulları itibari ile sulu ve susuz yerlerde rahatça yetişebilmekte ve ıslahı da kolay olmaktadır. Bu gibi özellikleri, bitkinin endüstriyel hammadde olarak kullanım potansiyelini artırmaktadır. İçermiş olduğu yüksek miktarda antosiyanin ile verimli bir doğal renk maddesi bitkisidir.

- Antosiyaninler, polar çözücülerde daha iyi çözüldüğü için ekstraksiyonun metanol ile gerçekleştirilmesi verimi artıracaktır. Ayrıca, antosiyaninler aglikonların şeker tuzları olduğu için çözücü de bir miktar suyun olması da çözünürlüğü artıracaktır. Antosiyaninler düşük pH değerinde renklerini daha iyi koruduklarından ekstraksiyon çözeltisinin asidifiye edilmesi rengi daha iyi muhafaza etmeye katkı sağlayacaktır.
- Yüksek ses ile ekstraksiyon işlemi, düşük sıcaklıkta daha iyi bir verim sağlayacağı için tercih edilecektir. En uygun ultrases uygulaması parametreleri yanıt yüzey yöntemi ile belirlenecek ve çalışmanın sonraki süreçlerinde ekstraksiyon o parametreler ile gerçekleştirilecektir.
- Ekstrakte edilen antosiyaninlerin, fizikokimyasal özellikleri belirlenecektir.
- Optimum ekstraksiyon şartlarında ekstrakte edilen antosiyaninler, stabilite çalışmalarına geçilmeden önce saflaştırılacaktır. Antosiyanin dışındaki, şeker ve diğer organik asitler gibi bileşikler, antosiyaninlerin moleküler kopigmentasyonunu olumsuz etkileyeceğinden uzaklaştırılacaktır. Bu amaçla antosiyanin adsorbe edici resinler kullanılacaktır.
- Elde edilen yüksek saflıktaki antosiyanin farklı ajanlar ile kopigmente edilerek ısıl stabilitesi birinci derece kinetik ile ifade edilerek, her bir ajanın en verimli konsantrasyonu belirlenecektir.
- Çalışma sonucunda bitkinin fizikokimyasal özelliklerinin aydınlatılmasına katkı sağlanacak.
- Alternatif bir doğal boya kaynağı daha stabil bir hale getirilecektir.

2.1 Materyal

Karamuk (*Berberis crataegina* DC.) meyveleri, Kayseri yöresinden ağustos sonu eylül başı gibi toplanmıştır. Meyvelerin, uzunluğu 5,5-7 mm ve çapı da 2,5-3 mm şeklindedir. Meyveler, toplandıktan sonra ekstraksiyon yapılana kadar dondurucuda muhafaza edilmiştir. Bütün kimyasallar Sigma-Aldrich' ten temin edilmiştir.

2.2 Metot

2.2.1 Ekstraksiyon

2.2.1.1 Ultrasonik Ekstraksiyon Dizaynı

Antosiyaninlerin ekstraksiyon optimizasyonu için yanıt yüzey yöntemi ile 3-seviyeli Box Behnken deneme dizaynı kullanılmıştır (Fernández-Barbero, ve diğerleri, 2019). Deneme dizaynında (-1) düşük, (0) orta ve (+1) yüksek olmak üzere 3 farklı seviyede 3 bağımsız değişken çalışılmıştır (tablo 2.1). Bağımsız değişkenler ve seviyeleri tabloda verilmiştir. Değerlerin spesifik aralıklarını belirlemede Karasu ve ark. (2019) yılında antosiyanin ve fenolik bileşenlerin ekstraksiyonu çalışmasından yararlanılmıştır (Karasu, Bayram, Ozkan, & Sagdic, 2019). Yanıt değişkenleri toplam antosiyanin ve toplam fenolik madde içeriği olmuştur. 17 farklı deneme noktası her biri 3 tekrarlı olmak üzere 3 merkezi nokta ile çalışıldı. Örnekler ultrasonik su banyosu (WiseClean, DH.WUC.D10H, Almanya; 40 kHz, 258 W) yardımı ile ekstrakte edildi. 5 mg örnek 50 ml %80:20 metanol (v/v) ile karıştırılarak deneme dizaynında verilen şartlara göre ekstraksiyon işlemi gerçekleştirildi. Daha sonra 10000 rpm' de 3 dakika Ultra-Turrax (Daihan, HG-15D, Güney Kore) yardımı ile homojenize edildikten sonra

4500 rpm’ de santrifüj edildi. Son olarak 0.25 µm filtrelerden geçirildikten sonra analizler için 4°C’ de saklandı (Gazeran, Tajalli, & Sani, 2016).

Tablo 2.1 Box-Behnken dizaynı için bağımsız değişkenler ve değişkenlerin seviyeleri

Semboller	Bağımsız Değişkenler	Seviyeler		
		1	0	1
X1	Güç, A	20	60	100
X2	Sıcaklık, °C	20	40	60
X3	Süre, dakika	10	15	20

2.2.1.2 Kopigmentasyon için Antosiyanin Ekstraksiyonu

Antosiyaninlerin ekstraksiyonu, degassing fonksiyonu olan bir ultrasonik (ISOLAB, 10L; 320W, 40 kHz) su banyosu ile gerçekleştirilmiştir. Ekstraksiyon sıcaklığı antosiyaninlerin termal degradasyonunu önlemek için 30±5°C’ de gerçekleştirilmiştir. Ekstraksiyon için %0.1 formik asit ile asidifiye edilmiş %75 metanol/su (v/v) solüsyonu kullanılmıştır. 50 g örnek 100 mL çözügen ile karıştırılmış ve su banyosunda 20 dakika süre ile %100 şiddette ekstraksiyona tabi tutulmuştur. Daha sonra whatman no.1 filtre kağıdından geçirilerek ilerleyen aşamalarda kullanılmak üzere 4°C’ de muhafaza edilmiştir (Chaturvedi & Yadav, 2019).

2.2.2 Seperasyon Kolonunun Hazırlanması ve Antosiyanin Saflaştırma

Antosiyanin seperasyonunda Amberlite XAD-7Hp resini kullanılmıştır. İnaktif olarak gelen resin, %95 etanol:su (v/v) solventinde 1 gece boyunca oda sıcaklığında karıştırılmıştır. Son olarak 40°C’ de kurutulduktan sonra ayırma kolonuna doldurularak (şekil 2.1) ekstraktların kolondan geçirilme işlemine geçilmiştir (şekil 2.2). Örnekteki antosiyaninler resine tutundurulduktan sonra resin, şeker, organik asitler ve diğer suda çözünen bileşiklerin uzaklaştırılması için asidifiye saf su ile yıkanmıştır. Daha sonra resine adsorbe edilen antosiyaninler metanol ile yıkanarak alınmıştır (şekil 2.3). Son aşamada 30°C’ de vakumlu

evaporatör yardımı ile çözgünden antosiyaninler alınarak kopigmentasyon çalışmalarına geçilmiştir (Zhao, ve diğerleri, 2017; Müller-Maatsch, Gurtner, Carle, & Steingass, 2019).

Resin özellikleri

Matriks: Makroretiküler alifatik

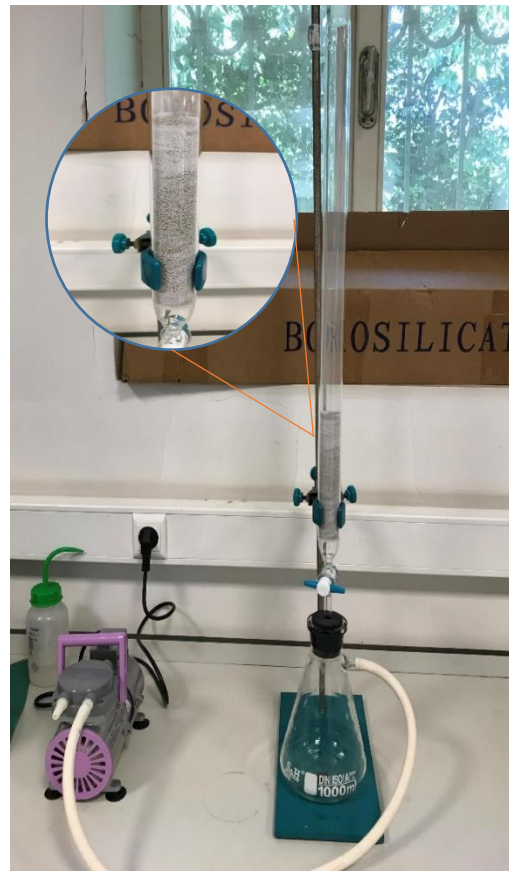
Parçacık boyutu: 0,56 ile 0,71

Fiziksel form: Yarı saydam beyaz boncuk şeklinde

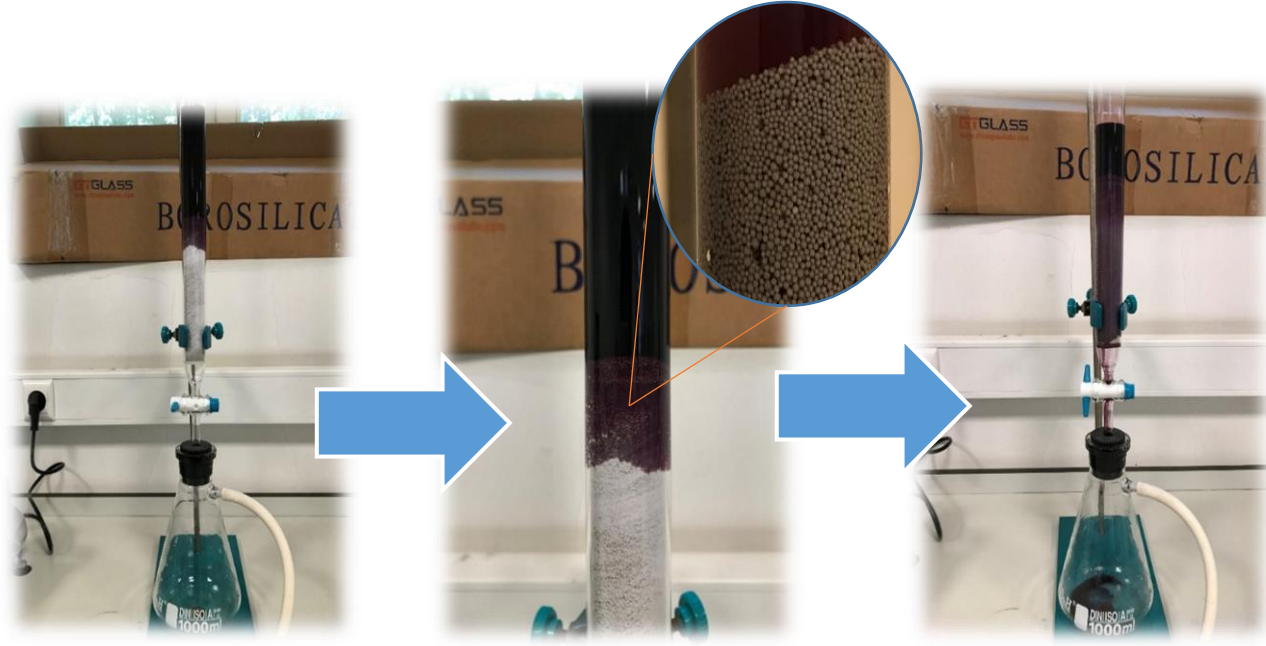
Yüzey alanı: 380 m²/g

Özgül ağırlık: 1,06 ile 1,08

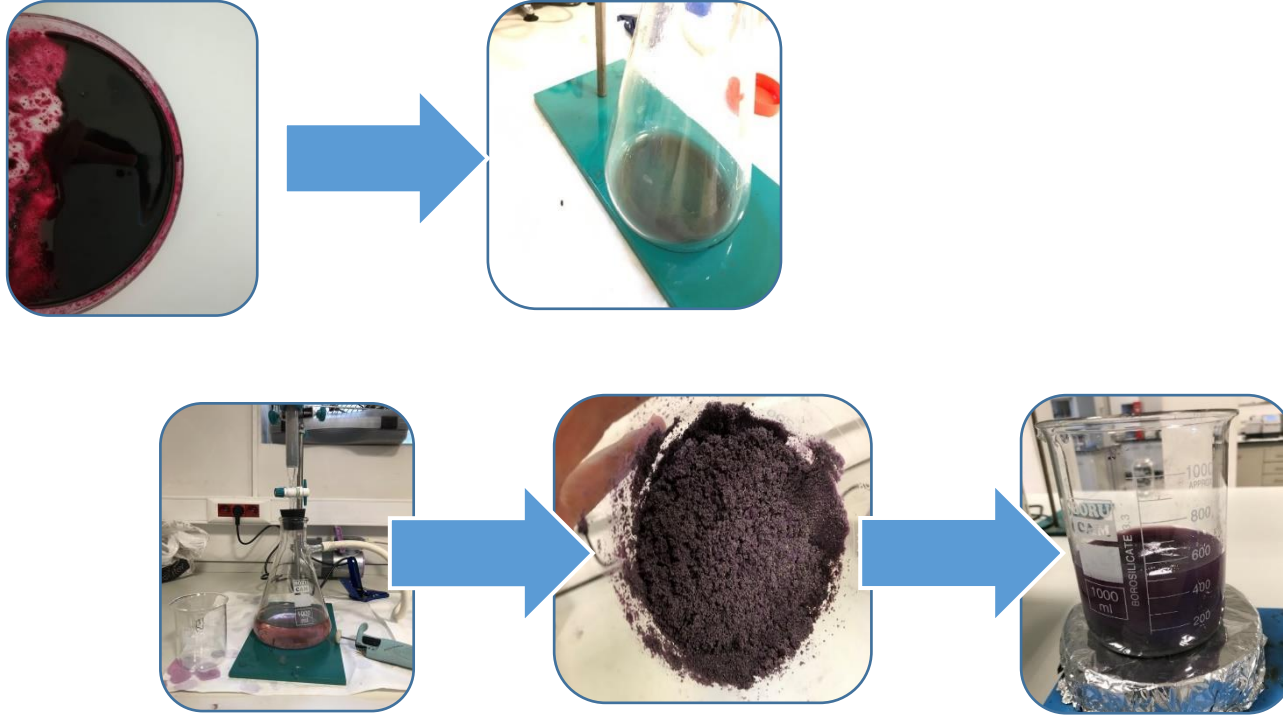
Dışlama sınırı gözenekliliği >0,5 ml/ml



Şekil 2.1 Seperasyon kolonunun hazırlanması



Şekil 2.2 Örneğin kolondan geçirilmesi



Şekil 2.3 Kolonun yıkanması ve resinin alınması

2.2.3 Kopigmentasyon

Kopigmentasyon işleminde, metal iyonları (ferrik sodyum tuzu, alüminyum klorür ve magnezyum oksit, fenolik bileşikler (rutin, klorojenik asit, kuersetin), α - ve β -siklodekstrin kullanılmıştır. Hazırlanan örneklerde antosiyanin:kopigment oranı 1:5, 1:10 ve 1:20 olacak şekilde ayarlanmıştır. Örneklerin renk yoğunluğunu daha iyi korumak amacı ile son pH değeri 3.5-4 olarak ayarlanmış ve 3 saat karanlıkta oda sıcaklığında karışmaya bırakılmıştır. Daha sonra oksidatif bozulmayı önlemek ve daha iyi bir Homojenizasyon için 25°C’ de 15 dakika yüksek uygulanmıştır. Son olarak örnekler 20°C’ de 10000 rpm’ de 15 dakika santrifüj edilerek analizlere geçilmiştir (Pan, ve diğerleri, 2014; Quan, ve diğerleri, 2020).

2.2.4 Toplam Antosiyanin Miktarının Belirlenmesi (pH değişim metodu)

Örneklerin monomerik antosiyanin içerikleri pH değişim metodu ile belirlenmiştir. pH: 1 ve pH: 4.5 olmak üzere 2 adet tampon çözelti hazırlanmıştır.

A: pH 1.0 tampon çözeltisi (potasyum klorit, 0.025M): 1.86 g KCl alınıp üzeri 980 mL saf su ile tamamlanmıştır. Daha sonra tamponun pH değeri derişik HCl ile 1’ e ayarlanmıştır.

B: pH 4.5 tampon çözeltisi (sodyum asetat, 0.4M): 54.43 g $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{Na}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ tartılarak üzeri 960 mL saf su ile tamamlanmıştır. Daha sonra çözeltinin pH değeri derişik HCl ile 4.5’ e ayarlanmıştır.

1 ml örnek alınarak 4 ml hazırlanmış tampon çözeltileri ilave edilerek kontrollü şartlar altında bekletilip absorbansları UV-Spektrofotmetre (Shimadzu UV-1280 model, BK) ile 520 ve 700 nm’ de ölçülmüştür. İlk ölçümlerde, yüksek antosiyanin konsantrasyonu nedeni ile ölçümler alınamadığı için örnekler seyreltilerek çalışmaya devam edilmiştir. Her bir tampon çözeltisi için elde edilen absorbans değerleri not edilip aşağıdaki eşitlik (1) yardımı ile antosiyanin miktarları siyanidin-3-glikozit eküvelanı (mg/L) cinsinden belirlenmiştir.

$$\text{Monomerik Antosiyanin mikatrı} = \frac{A_{xM} \times S \times F \times 10^3}{\epsilon \times l} \quad (2.1)$$

A (Absorbans): $(A_{520\text{nm}})_{\text{pH1}} - (A_{720\text{nm}})_{\text{pH1}} - (A_{520\text{nm}})_{\text{pH4.5}} + (A_{720\text{nm}})_{\text{pH4.5}}$

MA: siyanidin-3-glikozitin molekül ağırlığı=449.2g/mol

SF: Seyreltme Faktörü

L= küvetin ışık yolu

ϵ : 26 900 cm⁻¹

10³: gramdan miligrama çevirme katsayısı (Lee, W Durst, & Wrolstad, 2005)

2.2.5 Toplam Fenolik Madde Miktarı

Örneklerin toplam fenolik madde içerikleri Singleton & Rossi (1965) tarafından bildirilen Folin-Ciocalteu metodunun küçük modifikasyonu ile gerçekleştirilmiştir. Örneklerin toplam fenolik madde miktarlarının ölçümüne geçilmeden önce konsantrasyonu belli (0, 25, 50, 75 ve 100 mg/L) gallik asit çözeltisi ile kalibrasyon eğrisi çizilmiştir (şekil 3.1). Her bir konsantrasyondan 1 ml gallik asit alınıp üzerine %10' luk Folin-Ciocalteu çözeltisi konularak 2 dakika vortekslenmiştir. Daha sonra 4 ml Na₂CO₃ (75g/L) çözeltisi konularak toplam karışım 10 mL' ye tamamlanıp tekrar 2 dakika vortekslenmiştir. Karışım 35°C' de 30 dakika çalkalamalı karıştırıcı yardımı ile karıştırılıp 765 nm dalga boyunda UV-Spektrometre (Shimadzu UV-1280 model, UK) ile köre karşı ölçüm yapılmıştır. Benzer prosedür ekstraktlar için de uygulanarak toplam fenolik madde miktarı $\mu\text{g}/100\text{g}$ gallik asit eküvelanı olarak ifade edilmiştir (Singleton & Rossi, 1965).

2.2.6 Toplam Flavonoid İçeriği

Toplam flavonoid içeriğinin belirlenmesi için alüminyum klorit kalorimetrik metodu kullanılmıştır. Kuersetin, referans flavonoid olarak kullanılmıştır. Fenolik madde içeriğine benzer şekilde öncelikli olarak konsantrasyonu belli (0-100 mg/L) kuersetin ile standart eğrisi oluşturulmuştur. Her bir konsantrasyondan 1 ml alınarak 3 ml %95 etanol, 0.2 mL AlCl₃ çözeltisi (%10 w/v), 0.2 ml 1M potasyum asetat tampon çözeltisi ve son olarak da 5.6 ml saf su ile toplam hacim 10 ml olacak şekilde ayarlanmış ve her bir ilaveden sonra 1 dakika vortekslenmiştir. Karışım oda sıcaklığında 30 dakika bekletilip UV-VIS Spektrofotometrede (Shimadzu UV-1280 model, UK) 415 nm' de köre karşı

okunmuştur. Flavonoid içeriği $\mu\text{g}/100\text{g}$ kuersetin eküvelanı olarak ifade edilmiştir (Chang, Yang, Wen, & Chern, 2002).

2.2.7 Antioksidan Aktivite Tayini (DPPH)

Örneklerin DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) radikal temizleme aktivitesi Kim ve ark. (2002)' ye göre yapılmıştır. %80 sulu metanolde 100 μM DPPH reaktifi hazırlanmıştır. 0.1 mL örnek ekstraktları 2.9 mL DPPH çözgeni ile karıştırılmış ve oda sıcaklığında 30 dakika boyunca karanlıkta bekletilmiştir. Daha sonra absorbanslar 517 nm' de UV-VIS Spektrofotometre yardımı ile ölçülmüştür. 0.1 mL %80 sulu metanol ve 2.9 mL DPPH çözeltisi kontrol olarak kullanılmıştır. DPPH radikal temizleme aktivitesi TE mg/100g olarak ifade edilmiştir (Kim, Lee, Lee, & Lee, 2002).

2.2.8 Antosiyanin Profilinin HPLC ile Belirlenmesi

Antosiyanin profili Simões ve ark. (2009) bildirdikleri çalışmadaki metodun modifiye edilmesi ile belirlenmiştir. Analiz parametreleri aşağıdaki gibi ayarlanmıştır.

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)

7 dakika: 30% A + 70% B (toplam 35 dakika)

10 dakika: %3 A + 97% B (toplam 45 dakika) (Simões, ve diğerleri, 2009).

2.2.9 Kinetik Parametrelerin Belirlenmesi

Kopigmente edilmiş örnekler ve kontrol grubu örnekleri 70, 80 ve 90°C' de 210 ve 90 dakika süreyle su banyosuna konulup; kontrol için her 10 dakikada, kopigmente örnekler için ise her 30 dakikada numune alınmış ve ileri bir degradasyonu önlemek için soğuk suya daldırılmıştır. Soğutulan örneklerin antosiyanin miktarları ile aşağıdaki eşitlikler (2;3) yardımı ile termal degradasyon parametreleri hesaplanmıştır (Kırca, Özkan, & Cemeroğlu, 2006).

$$-kt = \frac{-\ln C_t}{\ln C_0} \quad (2.2)$$

$$t_{1/2} = \frac{\ln 0.5}{k} \quad (2.3)$$

k: tepkime hız sabiti

t: süre

C₀: başlangıç antosiyanin miktarı

C_t: t süredeki antosiyanin miktarı

2.2.10 Enkapsülasyon

Enkapsülasyon işlemi, sprey kurutucu yardımı ile gerçekleştirildi (şekil 2.4). Duvar malzemesi olarak maltodekstrin (DE17-20) ve gam arabik kullanıldı. Oran 60:40 (w/w) şeklinde ayarlandı. Ekstraksiyon ve kopigmentasyon sonrası örneğin brix° değeri 9.7 olarak ölçüldü. Brix° değeri 4.8 olan duvar materyalleri ile 2 saat karıştırıldıktan sonra cihaza verildi. Unopex B15 model (Türkiye) mini sprey kurutucu ile gerçekleştirilen enkapsülasyonda işlem parametreleri aşağıdaki gibi ayarlandı.

Giriş sıcaklığı: 140°C

Çıkış sıcaklığı: 65-70°C

Besleme: 7ml/dak.

Nozul: 5-8 saniye

Kurutma sonrası nem: 2,92 (Tolun, Artik, & Altintas, 2020).



Duvar materyali ve ekstraktın
Karıştırılması



Sprey kurutucu şartlarının ayarlanması



Kurutma işlemi



Ürünün son hali

Şekil 2.4 Sprey kurutucu ile ürünün toz formunun eldesi

3

BULGULAR VE TARTIŞMA

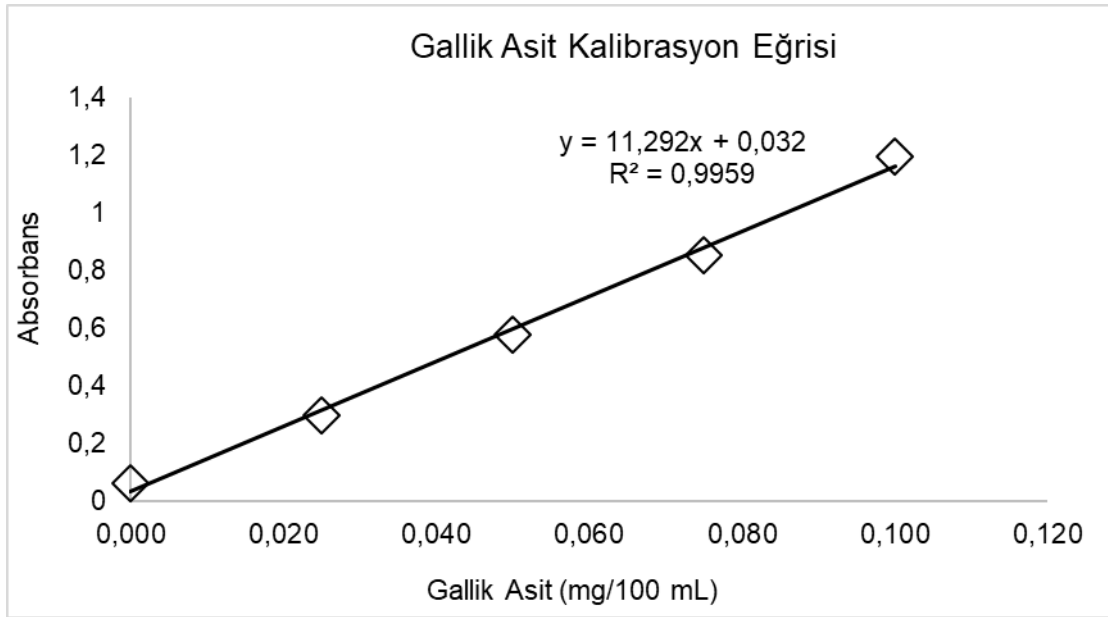
3.1 Karamuk Bitkisinin Ultrasonik Ekstraksiyonu

Toplam fenolik madde (TFM) ve toplam antosiyanin (TA) ekstraksiyonu Ultrases uygulaması ile gerçekleştirilmiştir. Uygulanan sıcaklık değerleri 20, 40 ve 60°C; şiddet değerleri 20, 60 ve 100 iken süre de 10, 15 ve 20 dakika olmuştur. Çalışmada 17 adet farklı ekstraksiyon modeli uygulanarak elde edilen TFM ve TA ait veriler tablo 3.1’ de verilmiştir.

Tablo 3.1 17 farklı ekstraksiyon modeli uygulanarak elde edilen TFM ve TA ait veriler

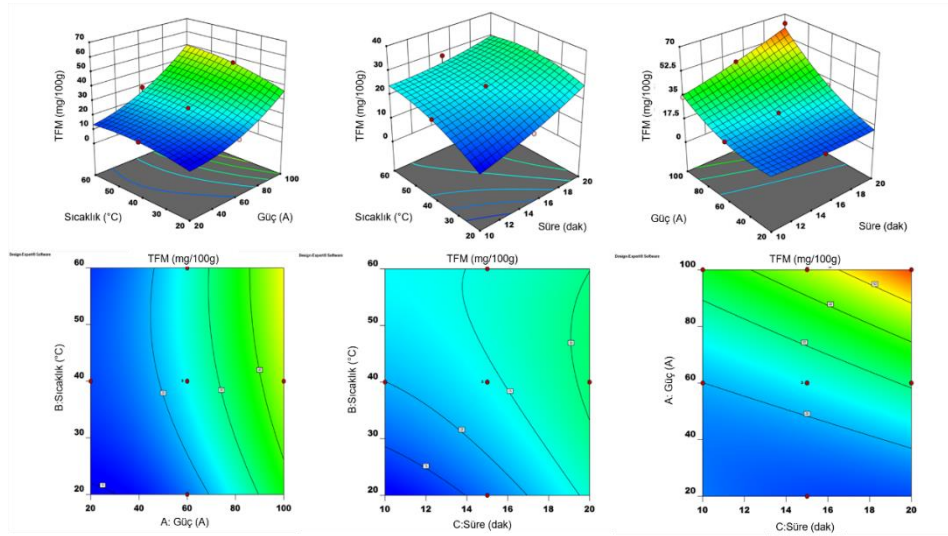
Run	X1	X2	X3	TFM (mg GA/100g)	TA (mg/L)
1	20	20	10	10,76	785,23
2	60	20	15	45,64	1.593,91
3	100	20	10	42,89	2.076,51
4	20	60	10	16,77	1.087,93
5	20	40	15	14,33	1.524,48
6	100	40	15	46,31	2.247,67
7	20	20	20	11,44	1.004,44
8	60	40	15	23,2	1.967,38
9	100	60	10	34,04	2.020,50
10	60	40	15	24,83	1.658,20
11	100	20	10	62,95	2.463,98
12	60	60	15	28,6	1.999,69
13	60	40	15	22,21	1.654,86
14	100	60	20	57,87	2.659,30
15	20	60	20	11,68	1.190,63
16	60	40	10	20,24	1.291,99
17	60	40	20	30,82	1.670,14

TFM: toplam fenolik madde, TA: toplam antosiyanin, GA: Gallik asit



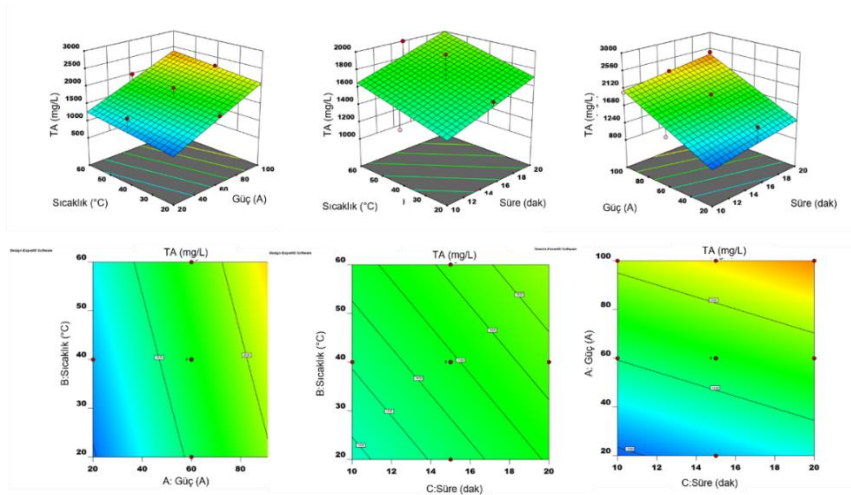
Şekil 3.1 Gallik asit kalibrasyon eğrisi

Elde edilen sonuçlara göre TFM içeriği 70,76 ile 62,95 mg/100g, toplam antosiyanin içeriği de 785,234 mg/L ile 2659,297 mg/L arasında değişmiştir. En yüksek fenolik madde en yüksek fenolik madde ve antosiyanin miktarı 100A ultrasonik güçte elde edilmiştir. Fenolik madde ve antosiyanin ekstraksiyonu için uygulanan parametrelerin etkisi kuadratik modele uygun olmuştur (tablo 3.2). Modelin uyumluluğunu doğrulamak için kullanılan uyum eksikliği (Lack of fit) değeri önemsiz çıkmış ($p > 0,05$) ve deney verilerine uymuştur. Bütün parametreler TFM ve TA miktarını etkilemiştir. Tablo 3.2' ye göre R^2 ve düzeltilmiş R^2 değerleri TFM için 0,9892 ve 0,9654 iken TA için 0,9638 ve 0,9171 olarak ölçülmüş ve uyum eksikliği de önemsiz olmuştur ($p > 0,1$). Sonuçlar quadratic model TFM ve TA ekstraksiyonu için başarılı bir biçimde uygulanmıştır. 3 boyutlu ekstraksiyon parametrelerinin ve bu parametrelerinin birbiri ile interaksiyonunun TFM miktarı üzerine etkisi şekil 3.2' de verilmiştir.



Şekil 2.2 TFM üzerine ultrasonik işlem parametrelerinin 3-boyutlu yanıt yüzey verileri

TFM içeriğinin sabit şiddet ve sıcaklıkta arta süre ile doğrusal olarak bir eğilimi gözlenmektedir. Ramić ve ark. (2015) aronya meyvelerinin fenolik bileşiklerinin ultrasonik ekstraksiyonunda ultrasonik gücün artmasıyla TFM miktarının arttığını belirtmişlerdir. 3 boyutlu ekstraksiyon parametrelerinin ve bu parametrelerinin birbiri ile interaksiyonunun TA miktarı üzerine etkisi şekil 3.3’ de verilmiştir.



Şekil 3.3 TA miktarı üzerine ultrasonik işlem parametrelerinin 3-boyutlu yanıt yüzey verileri

Şekil 3.3’ ten de görüldüğü gibi ultrasonik güç artışı doğrudan TA miktarını artırmıştır. Benzer şekilde sabit sıcaklık ve şiddette süre artışı da TA miktarını

doğrudan artırmıştır. En yüksek şiddet en ideal ekstraksiyon değeri olmuştur. Ghafoor ve ark. (2010) üzüm antosiyaninleri üzerine yaptıkları bir çalışmada sabit süre ve şiddette sıcaklık artışının antosiyanin miktarını artırdığını belirtmişlerdir (Ghafoor, Park, & Choi, 2010).

Tablo 3.2 ANOVA yanıt yüzey quadratic model

Regresyon Katsayıları	df	TFM			TA		
		Ortalama Kare	F	P	Ortalama Kare	F	P
Model	9	455,64	72,54	<0,0001	4,68x10 ³	20,68	0,0003
X ₁ -Şiddet	1	1482,74	232,81	<0,0001	1,57x10 ⁶	69,66	<0,0001
X ₂ -Sıcaklık	1	91,22	14,32	0,0069	1,84x10 ⁵	8,14	0,0246
X ₃ -Süre	1	281,55	44,21	0,0003	2,83x10 ⁵	12,5	0,0095
Çaprazlama							
X ₁ X ₂	1	18,52	2,91	0,1319	1,96x10 ⁴	0,87	0,383
X ₁ X ₃	1	324,01	50,87	0,0002	5,99x10 ⁴	2,65	0,1478
X ₂ X ₃	1	32,56	5,11	0,0582	594,71	0,026	0,08759
Quadratic							
X ₁ ²	1	108,67	17,06	0,0044	4,36x10 ⁵	1,93	0,2076
X ₂ ²	1	22,84	3,59	0,1001	8791,76	0,39	0,5532
X ₃ ²	1	5,24	0,82	0,3944	2,29x10 ⁵	10,13	0,0154
Uyum eksikliği (Lack of fit)	5	8,22	4,69	0,185	1,8x10 ⁴	0,59	0,7281
R ²		0,9892			0,9638		
Adj-R ²		0,9654			0,9171		

3.1.1 Kopigmentasyon için Antosiyanin Ekstraksiyonu

Seperasyon prosesi, hazırlanışı ve uygulanışı ve antosiyanin saflaştırması işlemi dahil olmak üzere aşağıdaki şekillerde özetlenmiştir. Etanolle aktifleştirilmiş resinler ayırma kolonuna doldurulmuş ve üzerine ekstrakt yavaş yavaş ilave edilmiştir. Ekstrakt miktarı kolon yüksekliğine gelince yükleme tamamlanmış ve bir süre beklenmiştir. Toplam ekstraktın resine oranı 20 ml:2 g şeklinde ayarlanmıştır. Daha sonra vakum yardımı ile ekstrakt alınmıştır. Kolona adsorbe olan antosiyaninleri almak için kolondaki resin boşaltılmış ve yeni resin ile değiştirilmiştir. Bu işlem altta kalan kısım rengini kaybedene kadar devam etmiştir. Yıkama işleminde kullanılan asidifiye etanol miktarının resine oranı ise 40 ml:2 g şeklinde olmuştur. Kolondan geçirme işlemi tamamlandıktan sonra antosiyaninlerin adsorbe olduğu resin saf su ile yıkanarak şeker ve organik asitler gibi bileşenler uzaklaştırılmıştır. Daha sonra resinler etanol yardımı ile yıkanarak antosiyaninler alınmış ve sonraki çalışmalar için +4°C’de muhafaza edilmiştir.

Tablo 3.3 Farklı oranlarda etanol ile aktifleştirilen kolonun verimi

Toplam Antosiyanin Miktarı (mg/L)			
Kolon Türü	ES	KK	% verim
%100 Etanol	2083,819	1868,480	%89,67
%50 Etanol/su (v/v)	2154,8855	1720,758	%79,85

ES: Ekstraksiyon sonrası, KK: Kolonda kalan

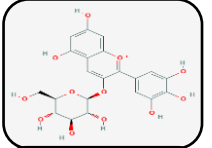
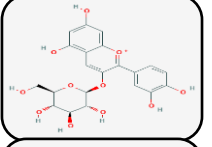
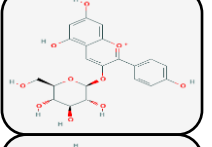
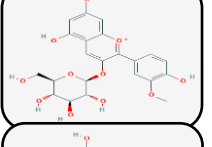
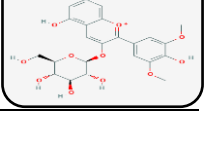
Karamuk (*Berberis crataegina* DC.) ekstraktlarının seperasyon öncesi ve seperasyon sonrası toplam antosiyanin miktarları tablo 3.3’ teki gibidir. %100 etanol ile aktifleştirilen Amberlite XAD-7Hp kolonunun %100 etanol ile aktifleştirmesi toplam antosiyanin verimi 89,67 iken %50 etanol ile hazırlanan resinin verimi 79,85 olarak hesaplanmıştır. Hua ve ark. (2013) *Bridelia retusa* (L.) bitkisinin antosiyaninlerini saflaştırdığında aynı kolon ve aynı aktifleştirmeye

yöntemi ile %92,34' lük bir verim almıştır (Hua, ve diğerleri, 2013). Mor patates antosiyaninlerinin Amberlite XAD-7HP resini ile saflaştırıldığı bir diğer çalışmada vakum evaporasyonu sonrası toplam antosiyanin miktarı 1750 mg/L olarak ifade edilmiştir. Amberlite XAD-7HP Glikoz moleküllerini hiç tutmadığı için iyi bir şeker uzaklaştırma adsorbentidir. %98,8' e kadar glikoz başarı ile uzaklaştırılmıştır. Seperasyon verimi kolondan yıkama işleminde etanol miktarının artmasına bağlı olarak artmıştır (Heinonen, ve diğerleri, 2016). Kang ve ark. (2014) siyah pirinç antosiyaninlerini Amberlite XAD-7HP ile saflaştırdıkları benzer bir çalışmada %10' luk bir kayıp ile antosiyaninleri alabilmişlerdir (Kang, Jung, & Lee, 2014).

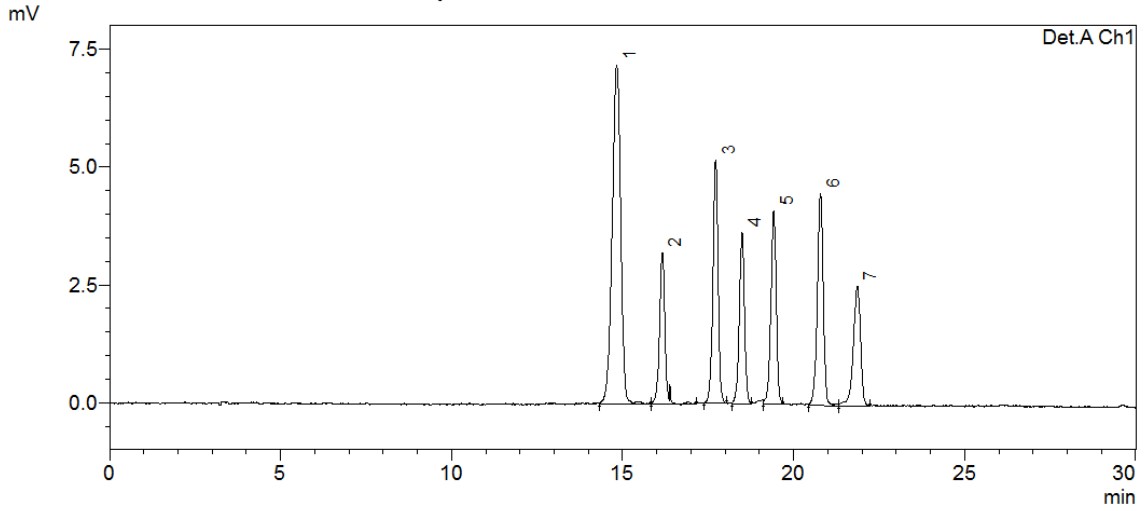
3.2 Antosiyanin Profilinin HPLC ile Belirlenmesi

Karamuk örneklerine ait HPLC sonuçları tablo 3.4' de verilmiştir. Grafiğe göre malvidin 3-o-glikozit klorit en baskın olarak bulunan antosiyanin olmuştur. Diğer moleküllerin miktarları birbirine yakın çıkmıştır. Malvidin-3-oglikozit miktarı 421,7 mg/100g iken siyanidin 3-o-glikozit ve delfidin-3-o-glikozit miktarları sırasıyla 85,4 ve 82,0 mg/100g şeklinde ölçülmüştür. Petunidin-3-o-glikozit 1,48 mg/100g ile en düşük miktardaki antosiyanin olmuştur. Siyanidin 3-o-glikozit ve peonidin-3-o-rutinozid miktarları yaklaşık olarak 49 mg/100g olarak hesaplanmıştır.

Tablo 3.4 Karamuk örneğine ait antosiyanin miktarları (mg/100g)

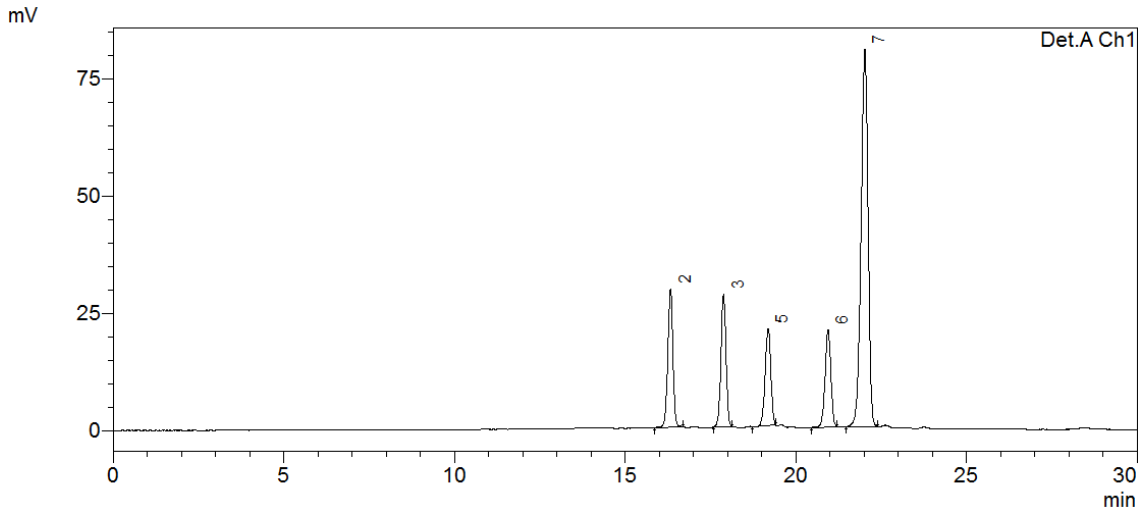
#	Antosiyanin	Sinonim	Molekül Formülü	Molekül Ağırlığı	Alınma Zamanı (dak.)	Miktar (mg/100g)	Molekül Yapısı
2	Delfidin 3-o- glikozit	Delfidin Klorit	C ₂₁ H ₂₁ ClO ₁₂	500.84	15.7	82,0	
3	Siyanidin 3-o-glikozit	Kuromanin Klorit	C ₂₁ H ₂₁ ClO ₁₁	484.84	17.5 (4)	85,4	
5	Pelargonidin 3-o-glikozit	Kallistefin Klorit	C ₂₁ H ₂₁ ClO ₁₀	468.84	19	19,7	
6	Peonidin 3-o-glikozit	Glukopeonidin Klorit	C ₂₂ H ₂₃ O ₁₁ Cl	498.86	20.5	49,9	
7	Malvidin-3-o-glikozit	Oenin Klorit	C ₂₃ H ₂₅ O ₁₂ Cl	528.89	21.5	421,7	

Antosiyanin standartlarına ait HPLC kromatogramı şekil 13, örneğe ait HPLC kromatogramı ise şekil 14' te verilmiştir.



1.Siyanidin-3,5-di-O-glikozit (siyanin klorit); 2. Delfidin 3-o- β -D- glikozit klorit (delfidin klorit); 3. Siyanidin 3-o-glikozit klorit (Kuromanin klorit); 4. Siyanidin 3-o-rutinozit klorit (kerasiyanin klorit); 5. Pelargonidin 3-o-glikozit klorit (kallistefin klorit); 6. Peonidin 3-o-glikozit klorit (Glukopeonidin klorit); 7. Malvidin-3-o-glikozit klorit (oenin klorit)

Şekil 3.4 Antosiyanin standartlarına ait HPLC kromatogramı



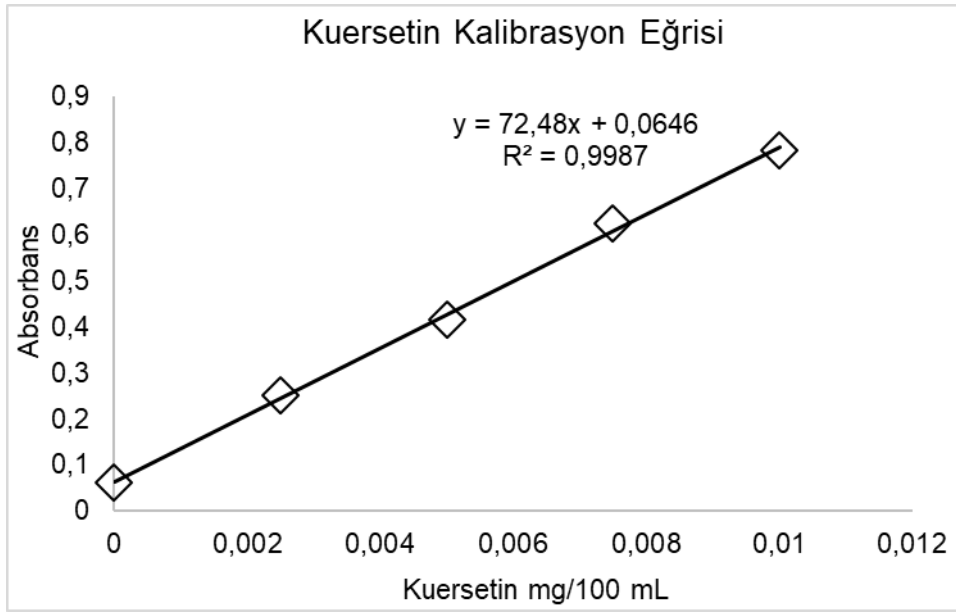
2. Delfidin 3-o- β -D- glikozit klorit (delfidin klorit); 3. Siyanidin 3-o-glikozit klorit (Kuromanin klorit); 5. Pelargonidin 3-o-glikozit klorit (kallistefin klorit); 6. Peonidin 3-o-glikozit klorit (Glukopeonidin klorit); 7. Malvidin-3-o-glikozit klorit (oenin klorit)

Şekil 3.5 Karamuk örneğine ait HPLC kromatogramı

4 farklı mürver çeşidinin antosiyanin profili HPLC ile belirlenmiştir. Siyanidin-3-o-glikozit miktarı 31-91 ile 181,76 mg/100 g aralığında değişmiştir (Mikulic-Petkovsek, ve diğerleri, 2014). Bae ve ark. (2015) Kore’ de yetişen beriler üzerine yapmış oldukları çalışmada ürünlerin antosiyanin profilini çıkarmışlardır. Yaban mersini örneklerinde peonidin-3-glikozit (1,10 mg/g) ve malvidin-3-arabinozid (0,91mg/g) en yüksek miktarda çıkmıştır. Defidin-3-arabinozid ve delfidin-3-galaktozid miktarları ise sırasıyla 0,67 ve 0,85 mg/g olmuştur. Ahududu örneklerinde ise siyanidin-3-rutinosid 16,12 mg/g ile en yüksek miktarda olan antosiyanin olmuştur. Dut örneklerinde siyanidin-3-glikozit 10,12 mg/g ile en baskın antosiyanin olmuştur (Bae, ve diğerleri, 2016). Zhao ve ark. (2010) normal ve beriler ile hibrit edilmiş üzüm türleri antosiyaninleri üzerine yapmış oldukları bir çalışmada hasat zamanı alınan örneklerde en baskın olarak Malvidin-3,5-diglikozit antosiyanini bulmuşlardır (Zhao, Duan, & Wang, 2010). Costa ve ark. (2014) yılında 24 farklı üzüm örneğinin antosiyanin profilini incelemişlerdir. Üzümlerde en baskın olarak bulunan antosiyanin malvidin-3-glikozit olmuştur. Malvidin miktarı 0,62 ile 6,09 mg/g aralığında değişmiştir. Ayrıca peonidin-3-glikozit 1,34-0,01 mg/g aralığında petunidin-3-glikozit de 0,01 ile 1,03 mg/g aralığında değişmiştir (Costa, Cosme, Jordão, & Mendes-Faia, 2014). Malvidin türevi antosiyaninler oksidatif strese dayanıklı oldukları için bulundukları gıdaların stabilitelerini olumlu olarak etkilerler (Ribéreau-Gayon, Dubourdieu, Donèche, & Lonvaud, 2006).

3.3 Toplam Flavonoid İçeriği

Örneklerin toplam flavonoid içeriği kuersetin cinsinden belirlenmiştir. Bu amaçla farklı konsantrasyonlarda kuersetin içeren çözeltiler kullanılarak kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur.



Şekil 1.6 Farklı konsantrasyonlarda kuersetinin kalibrasyon eğrisi

Farklı ekstraksiyon parametrelerinde ekstrakte edilen örneklerin toplam flavonoid madde içeriği tablo 3.5' te verilmiştir.

Tablo 3.5 Toplam flavonoid içeriği

Örnekler	X1	X2	X3	Flavonoid (mg QE/100g)
1	20	20	10	28,366
2	60	20	15	39,404
3	100	20	10	57,064
4	20	60	10	45,475
5	20	40	15	31,678
6	100	40	15	53,753
7	20	20	20	35,541
8	60	40	15	48,786
9	100	60	10	62,583
10	60	40	15	49,890
11	100	20	10	55,408
12	60	60	15	63,135
13	60	40	15	51,545
14	100	60	20	70,861
15	20	60	20	47,130
16	60	40	10	43,267
17	60	40	20	52,097

Farklı ekstraksiyon parametrelerinde elde edilen ekstraktların toplam flavonoid içeriği tablo 8' de verilmiştir. Tabloya göre örneklerin toplam flavonoid içeriği 28,366 mg QE/100g ile 70,861 mg QE/100g arasında değişmiştir. En yüksek miktarda flavonoidin ekstrakte edildiği ultrases uygulaması 100A şiddet 60°C ve 20 dakika olarak gözlemlenmiştir. En düşük değerlerin olduğu ekstraksiyonda elde edilen flavonoid içeriği de en düşük seviyede olmuştur. Cosmulescu ve ark. (2017) farklı türlerde antosiyanince zengin yenilebilir ve vahşi meyveler üzerine yaptıkları araştırmada örneklerin toplam flavonoid içeriğini 17,27 mg QE/100g ile 165.55 mg QE/100g arasında bulmuşlardır. Yabani böğürtlenlerde bu değeri 55.82 mg QE/100g olarak bulmuşlardır (Cosmulescu, Trandafir, & Nour, 2017). Sariburun ve ark. Ahududu ve böğürtlenler ile yaptıkları benzer bir çalışmada Bursa 1 türü böğürtlen örneklerinin metanol ile ekstraktlarının toplam flavonoid miktarını 51,9 mg CTE/100 g olarak; Chester türü böğürtlenlerin ise 56,1 mg CTE/100 g olarak bulmuşlardır. Ahududu örneklerinde ise aksu kırmızısı türünün metanol ekstraktına ait flavonoid değeri 38,2 iken heritage türü örneklerin 25,3 mg CTE/100 g olmuştur (Sariburun, Sahin, Demir, Türkben, & Uylaşer, 2010). Benzer şekilde Huang ve ark. (2012) antosiyanince zengin berri türlerinin flavonoid içeriklerini inceledikleri bir çalışmada yabanmersininde 36,08 mg rutin/g, böğürtlende 11,83 mg rutin/g ve çilekte de 7,04 mg rutin/g toplam flavonoid bildirmişlerdir (Huang, Zhang, Liu, & Li, 2012).

3.4 DPPH- Radikal Süpürme Aktivitesi

Seperasyon öncesi ve Seperasyon sonrası karamuk (*Berberis crataegina* DC.) örneklerinin DPPH radikal süpürme aktivitesi sırasıyla %79,5 ve %84,3 olmuştur. Çilek, yaban mersini ve böğürtlen ekstraktlarının radikal süpürme aktivitesinin incelendiği benzer bir çalışmada örneklerin aktivitesi sırasıyla %58,32, %96,96 ve %95,37 olmuştur (Huang, Zhang, Liu, & Li, 2012). Bae ve ark. (2016) Kore' de yetişen farklı türdeki berry meyvelerinin radikal süpürme aktivitelerini incelemiştir. Bütün örnekler %65 ve üzeri oranda etkinlik göstermiştir. Crowberry %65, siyah ahududu ise %58,4 etkinlik göstermiştir (Bae, ve diğerleri, 2016). Guerrero ve ark. (2010) vahşi ve ıslah edilmiş berry meyveleri üzerine yaptıkları

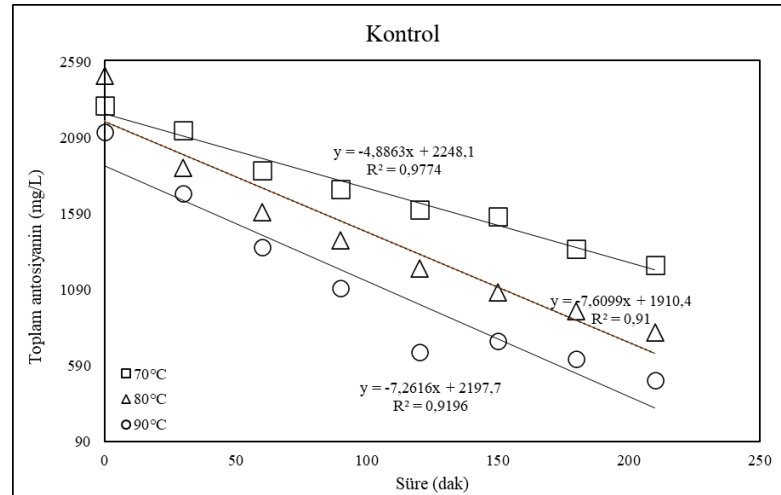
bir çalışmada ıslah edilmiş meyvelerin DPPH radikal süpürme aktivitesini %76,0 ile %92,3 arasında bulmuştur. Vahşi meyvelerde ise %67,8 ile %95,3 arasında ölçülmüştür (Guerrero, ve diğerleri, 2010).

3.5 Termal Degradasyon Çalışmaları

Kontrol grubuna ait termal degradasyon verileri ve antosiyanin kayıplarına ait veriler tablo 3.6 ve şekil 3.5’ te verilmiştir. Tablo 7 ye göre kontrol örneğinde 70°C’de k değeri $0,00288 \text{ k} \cdot 10^2(\text{dak}^{-1})$ 80°C’ de $0,006468 \text{ k} \cdot 10^2(\text{dak}^{-1})$ ve 90°C’de de $0,00740 \text{ k} \cdot 10^2(\text{dak}^{-1})$ olmuştur. Yarılanma süreleri kıyaslandığında ise sıcaklık artışı ile yarılanma süreleri azalmıştır. 70°C’ de 239, 970 dakika olan bu değer 90°C’ de 93, 580 dakikaya düşmüştür.

Tablo 3.6 Kontrol örneğinin termal degradasyon parametreleri

Sıcaklık (°C)	$k \cdot 10^2(\text{dak}^{-1})$	$t_{1/2}$ (dakika)	R^2	Kayıp (%)
70	0,002888	239,970	0,980	45,67
80	0,006468	107,159	0,91	67,55
90	0,007407	93,580	0,92	76,72



Şekil 3.7 Kontrol örneğine ait antosiyanin kayıpları

3.5.1 Fenolik Bileşiklerin İlavesi

3.5.1.1 Rutin İlavesi

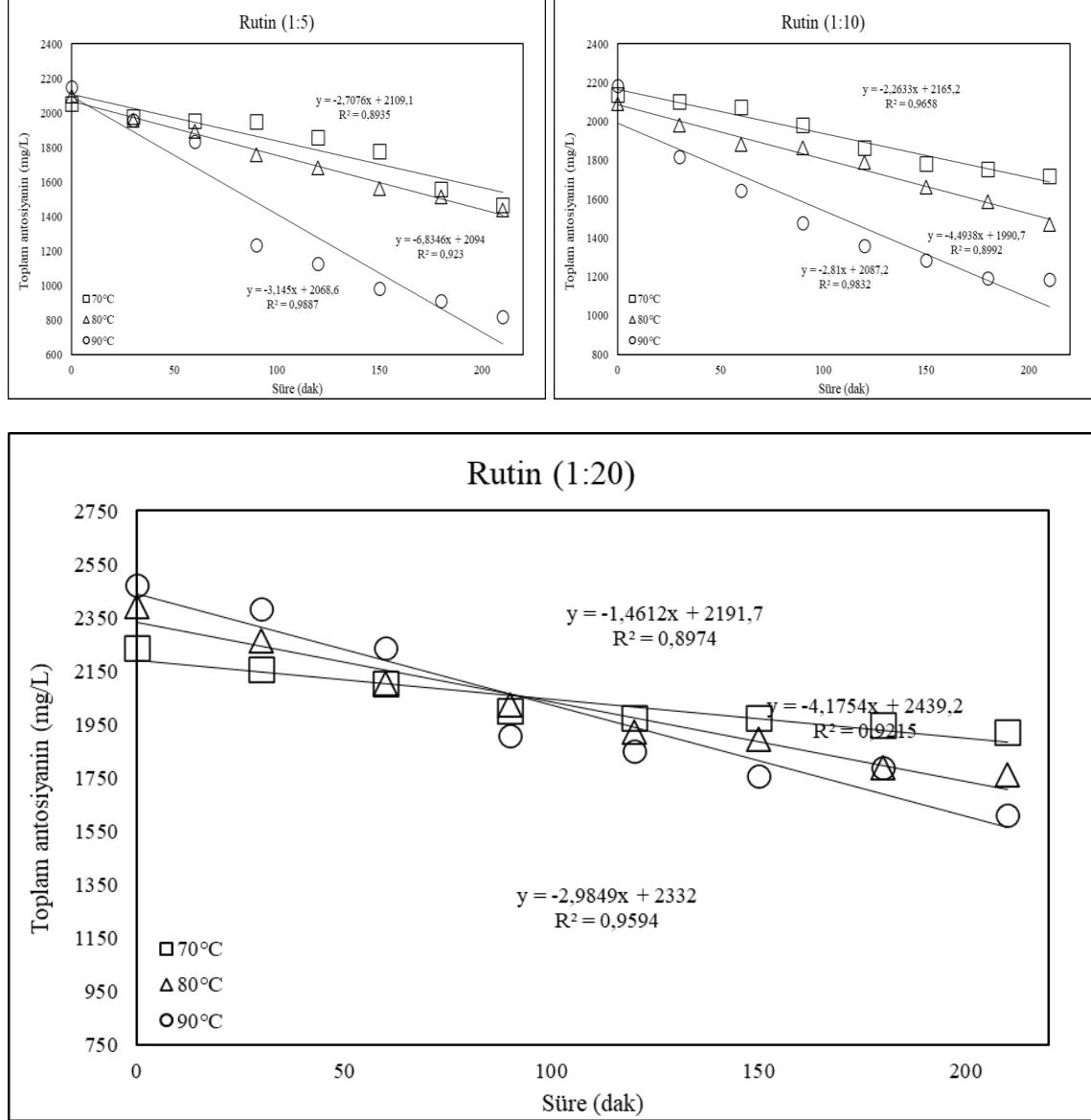
Farklı konsantrasyonlarda rutin içeren örneklere ait termal degradasyon parametreleri tablo 3.7’de ve şekil 3.6’ da verilmiştir. Her bir sıcaklıkta kontrole

ait k değerleri en yüksek olarak gözlemlenmiştir. 70°C’ de kontrol örneğinin k değeri 0,00288 (dak⁻¹) ile en yüksek iken; 0,000975 (dak⁻¹) ile 1:20 konsantrasyonunda rutin içeren örneğin k değeri en küçük olarak gözlemlenmiştir. 70°C hariç diğer tüm sıcaklık değerlerinde konsantrasyon artışına bağlı olarak k değerleri azalmıştır. En yüksek oranda rutin içeren örneklerin k değerleri tüm sıcaklık değerlerinde en küçük olarak gözlemlenmiştir. 80°C’ de kontrole ait k değeri 0,00640 (dak⁻¹) iken rutin ilave edilen örneklerde bu değer sırasıyla 0,001917, 0,001561 ve 0,1766 (dak⁻¹) olarak hesaplanmıştır. 90°C’ de en yüksek konsantrasyonda rutin içeren örneğin k değeri kontrolden yaklaşık 3,5 kat daha az (0,002052) olarak kaydedilmiştir. Yarılanma süreleri kıyaslandığında beklenildiği üzere kontrol örneği tüm sıcaklık değerlerinde 70, 80 ve 90°C’ de sırasıyla 239,970, 107,159, 93,5800 dakika şeklinde en düşük olarak gözlenmiştir. Rutin içeren örneklerin yarılanma süreleri konsantrasyon artışı ile artmakla birlikte 1:20 konsantrasyonda azalmıştır. Bunun sebebi ise rutin konsantrasyonu arttıkça, rutin çözelti içinde çözünmesi azalmış ve daha bulanık bir yapı oluşmuştur. Bu da aglikonlar ile rutin arasında gerçekleşecek bağlanmaların daha zayıf olmasına neden olmuştur. 70°C’ de kontrol örneğine ait t değeri 239,970 dak olarak ölçülürken 1:5 konsantrasyonda 639,385 dak, 1:10 konsantrasyonda 752,401 dak ve 1:20 konsantrasyonda 711,048 dak olarak ölçülmüştür. 80°C’ de kontrol örneğine ait t değeri 107,159 dak iken rutin içeren örneklerin t değerleri konsantrasyon artışına göre 361,666 dak, 444,041 dak ve 392,507 dak olarak değişmiştir. 90°C’ de kontrolde t değeri 93,580 dak iken 1:20 oranından rutin içeren örnekte 337,869 dak ile en yüksek olarak ölçülmüştür. Farklı sıcaklık değerlerinde tutulan örneklerin % kayıpları incelendiğinde, beklenildiği üzere kopigmente edilmemiş kontrol gurubunda bu değer en yüksek olarak kaydedilmiştir. 70°C’ de kontrolde olan % 45,67’ lik kayıp %14,12 değerine kadar düşürülmüştür. 80°C’ de %67,55 olan kayıp miktarı %26,37’ ye 90°C’ de ise %76,72 olan kayıp %34,94 e kadar düşürülmüştür.

Tablo 3.6 Farklı konsantrasyonlarda rutin içeren örneklerin termal degradasyon parametreleri ve kayıp miktarları

Sıcaklık (°C)	Konsantrasyon (v/v)	$k \cdot 10^2$ (dak ⁻¹)	$t_{1/2}$ (dak)	R ²	% Kayıp
70°C	Kontrol	0,002888 A	239,970 D	0,98	45,67
	1;5	0,001080 B	639,385 C	0,89	28,54
	1;10	0,000921 BC	752,401 A	0,96	19,74
	1;20	0,000975 C	711,048 B	0,89	14,12
80°C	Kontrol	0,006401 A	107,159 D	0,91	67,55
	1;5	0,001917 B	361,666 C	0,92	31,50
	1;10	0,001561 C	444,041 A	0,9	29,82
	1;20	0,001766 D	392,507 B	0,92	26,37
90°C	Kontrol	0,007407 A	93,5800 D	0,92	76,72
	1;5	0,004558 B	152,150 C	0,98	62,00
	1;10	0,004147 C	167,329 B	0,98	45,80
	1;20	0,002052 D	337,869 A	0,93	34,94

Farklı konsantrasyonlarda rutin ile kopigmente edilmiş karamuk antosiyaninlerine ait grafik şekil 16’ da verilmiştir.



Şekil 3.8 Farklı oranlarda rutin içeren örneklere ait antosiyanin kayıpları

Üzüm kabuğu antosiyaninleri üzerine farklı fenoliklerin etkisinin incelendiği benzer bir çalışmada Xu ve ark. (2015) rutin ilavesi ile 70°C’ de k değerini 0,0007; 80°C’ de 0,0009 ve 90°C’ de de 0,0016 dak⁻¹ olarak bulmuştur. Yarılanma sürelerini ise 70, 80 ve 90°C’ de sırası ile 1366.0, 770.0 ve 503.1 dak. olarak bulmuştur. Elde ettiği sonuçların çalışmamız ile küçük farklılıklar göstermesinin

nedeni bekleme süresinin bizim çalışmamızdan daha kısa olmasıdır (Xu, Liu, Yan, Yuan, & Gao, 2015). Benzer bir çalışmada Pan ve ark. (2014) yabanmersini suyu antosiyaninlerini rutin ve başka fenolikler ile kopigmente ederek raf ömrü boyunca termal degradasyonlarını takip etmişlerdir. Rutin içeren örneklerin k değeri 0.0603 ile 0.0709 arasında değişirken yarılanma süreleri de 11.3 gün olarak bulunmuştur. Fakat renk konusunda rutin içeren örneklerin diğerlerine nazaran daha düşük seviyede kaldığını bildirmişlerdir (Pan, ve diğerleri, 2014). Böğürtlen antosiyaninleri üzerine rutin ve ferulik asidin stabilite artırıcı etkisinin incelendiği bir diğer çalışmada Weber ve ark. (2017) kontrolde raf ömrü süresince meydana gelen toplam kaybın %40 seviyelerinden rutin ilavesi ile %25-28 seviyelerine çekmişlerdir. Ayrıca yarılanma süreleri de 151 günden 193 güne çıkmıştır (Weber, Boch, & Schieber, 2017). Benzer bir çalışmada rutin ilavesinin 50, 70 ve 90°C' de böğürtlen antosiyaninlerinin stabilitesine etkisi incelenmiştir. Çalışma sonucunda kontrol ile kıyaslandığında daha stabil bir ürün elde edilmiştir. 16, 29,6 ve 88,3 10⁻³ sa⁻¹ Olan kontrol k değerleri rutin ilavesi ile 11,9, 25,1 ve 64,4 sa⁻¹ e düşmüştür. Yarılanma süreleri de 70°C' de 43,4 80°C' de 23,4 ve 90°C' de 7,8 saatten sırasıyla 58,4, 27,6 ve 11,8 saate çıkmıştır. Rutin, 5 aromatik halkası ve iyi bir H verici (11 adet) olmasından dolayı yeterli elektrona sahip olmayan filavilyum içeren antosiyaninler gibi moleküller ile çok iyi bir kopigmentasyon gerçekleştirir (Fan, Xie, Zhang, Li, & Zhou, 2019).

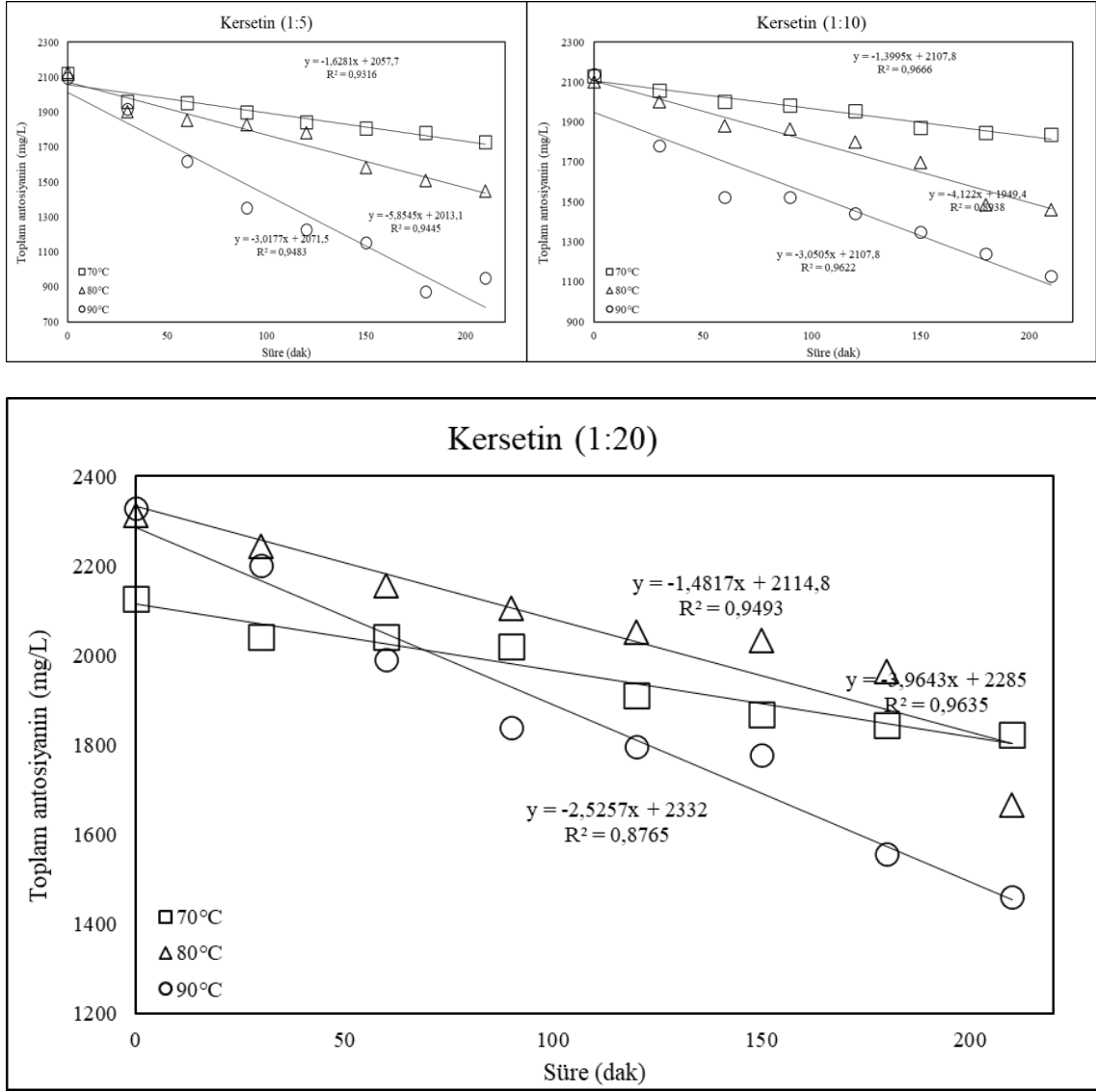
3.5.1.2 Kuersetin İlavesi

Farklı oranlarda kuersetin içeren örneklerle ait termal degradasyon parametreleri tablo 3.8 ve şekil 3.7' de verilmiştir. Kontrol örneğine ait k değerleri 70°C, 80°C ve 90°C' de sırasıyla 0,00288 dak⁻¹, 0,00640 ve 0,00740 dak⁻¹ olarak ölçülmüştür. 70°C' de kopigmentasyonda konsantrasyon artışı ile k değerleri azalmış olup; 1:10 ve 1:20 konsantrasyonlarda birbirine istatistiki olarak yakın olduğu görülmüştür. En düşük k değeri 0,000851 dak⁻¹ değeri ile 1:20 konsantrasyonda kuersetin içeren örnekte gözlemlenmiştir. 70°C' deki yarılanma süreleri de benzer şekilde konsantrasyon artışı ile artmıştır. Kontrol örneğinde 239,970 dak. olarak ölçülen t değeri en yüksek derişimde kuersetin içeren örnekte 814,389 dak. olarak ölçülmüştür. Aynı şekilde 70°C' deki % antosiyanin kaybı %45,67' den %14,29' a

kadar düşmüştür. 80°C’ deki termal degradasyon verileri 70°C’ deki değerlerden daha belirgin şekilde farklı olarak gözlemlenmiştir. Kontrol örneğinden sonra en yüksek k değeri 0,002134 dak-1 ile 1:5 konsantrasyonda kersetin içeren örnekte gözlemlenmiştir. En düşük k değerine sahip örnek en yüksek konsantrasyonda kersetin içeren örnek (0,001088 dak-1) olarak karşımıza çıkmıştır. Yarılanma sürelerinde 80°C’ de kersetin konsantrasyonunun artışı doğrudan etkili olmuştur. Konsantrasyon artışı ile yarılanma süreleri uzamıştır. 107,159 dak. Olan kontrol örneğinin yarılanma süresi, 1:20 kersetin ilavesi ile 637,801 dakikaya çıkmıştır. % toplam antosiyanin kaybı kersetin ilavesi ile 3’ te 1 oranına kadar düşürülmüştür. En yüksek sıcaklık değerinde % kayıp kontrolde %76,72 iken bu değer kersetin ilavesi ile %37,29’ a çekilmiştir. K değerleri konsantrasyon artışı ile azalmış ve t değerleri de artmıştır. 0,00740 dak-1 olan kontrol k değeri 0,002117’ ye kadar düşmüştür. 90°C’ de kontrol örneğinin 93,580 dak. Olan yarılanma süresi 1:20 kersetin ilavesi ile 312,689 dakikaya çıkmıştır.

Tablo 3.7 Farklı konsantrasyonlarda kuersetin içeren örneklerin termal degradasyon parametreleri

Sıcaklık (°C)	Konsantrasyon (v/v)	$k \cdot 10^2$ (dak ⁻¹)	$t_{1/2}$ (dak)	R ²	% Kayıp
70°C	Kontrol	0,002888 A	239,970 D	0,98	45,67
	1;5	0,001335 B	519,361 C	0,93	18,44
	1;10	0,000868 C	798,797 B	0,96	15,79
	1;20	0,000851 C	814,389 A	0,96	14,29
80°C	Kontrol	0,006401 A	107,159 D	0,91	67,55
	1;5	0,002134 B	324,846 C	0,95	32,00
	1;10	0,001601 C	433,044 B	0,89	30,57
	1;20	0,001088 D	637,801 A	0,94	28,03
90°C	Kontrol	0,007407 A	93,580 D	0,92	76,72
	1;5	0,004075 B	170,116 C	0,95	54,55
	1;10	0,003994 B	173,541 B	0,96	47,21
	1;20	0,002217 C	312,689 A	0,88	37,29



Şekil 3.9 Farklı oranlarda kersetin içeren örneklerle ait antosiyanin kayıpları

Kersetin malvidion-3-oglikozit ile kompleks oluşturma yeteneğine sahip olduğu için malvidince zengin antosiyanin örneklerinin stabilitesini artırmaktadır (Lambert, Asenstorfer, Williamson, Iland, & Jones, 2011). Benzer bir çalışmada kersetin ilavesinin 50, 70 ve 90°C’ de böğürtlen antosiyaninlerinin stabilitesine etkisi incelenmiştir. Çalışma sonucunda kontrol k değerleri 16, 29,6 ve 88,3 10⁻³ sa⁻¹ iken kersetin içeren örneklerin k değerleri sırasıyla 12,1, 26,3 ve 85,3 10⁻³ sa⁻¹ olarak hesaplanmıştır. Kersetinin 90°C’ deki etkinliği çok fazla olmamıştır. Çalışmada 50, 70 ve 90°C’ de kontrol örneklerinin yarılanma süreleri sırasıyla 43,4, 23,4 ve 7,8 saat olarak ölçülmüştür. Kersetin ilavesi ile bu değerler 50°C’ de 57,1, 70°C’ de 26,4 ve 90°C’ de ise 8,1 saat olarak ölçülmüştür (Fan, Xie, Zhang,

Li, & Zhou, 2019). Lambert ve ark. (2011) yapmış oldukları bir çalışmada 1 ile 100 arasında değişen farklı oranlarda kafeik asit, kateşinler, taninler ve kuersetin ile malvidin 3-o-glikozit antosiyanini kopigmente etmişlerdir. Uygulanan tüm fenolikler içerisinde kuersetin en yüksek stabilite sabiti ile en stabil örnek olmuştur. Fakat kuersetinin düşük çözünürlüğü yüksek derişimlerde net olmayan sonuçlar vermiştir (Lambert, Asenstorfer, Williamson, Iland, & Jones, 2011). Kuersetin ve siyanidin türevleri sulu bir ortamda bulunurlarsa aralarında kovalent olmayan dimerlerin oluşumu ile kendiliğinden oluşan bir bağlanma meydana gelir. Kopigmente olmuş pigmentler 3-O-metilsiyanidin:kuersetin (C:Q), ve her bir molekülün kendi dimerleri oluşur. Bunlar [3-O-metilsiyanidin]₂ (C:C) ve [kuersetin]₂ (Q:Q) (Di Meo, Sancho Garcia, Dangles, & Trouillas, 2012)

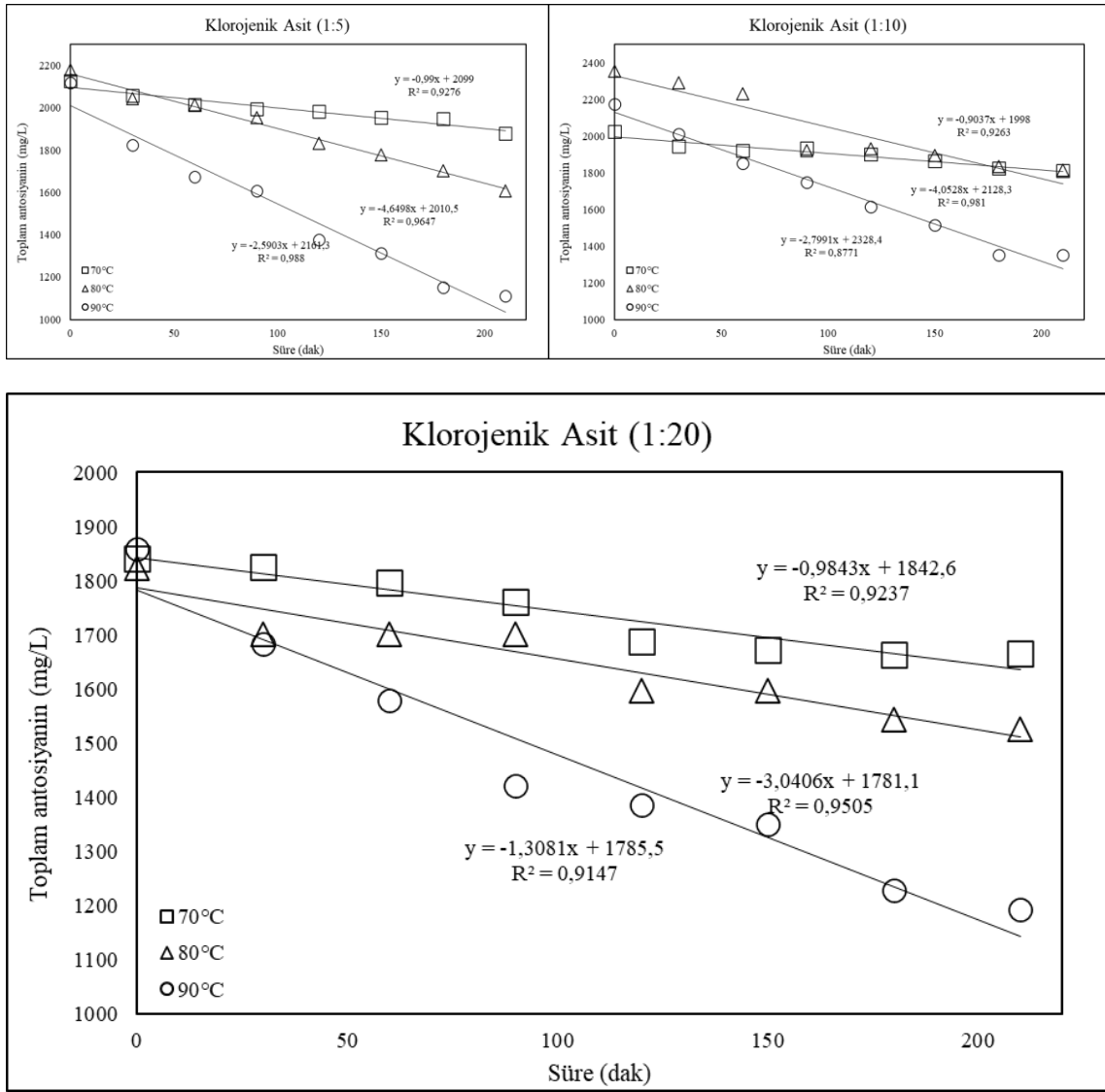
3.5.1.3 Klorojenik Asit İlavesi

Farklı oranlarda Klorojenik asit içeren örneklerle ait k, t ve % kayıp değerleri tablo 3.9' ve şekil 3.8'de verilmiştir. Bütün sıcaklık değerlerinde kontrol örneğinin k değerleri en yüksek iken t değerleri en düşük olarak hesaplanmıştır. 70°C' de kontrol örneğinde t değeri 0,00288 dak⁻¹ olarak hesaplanırken bu değer 1:20 klorojenik asit içeren örnekte 0,00615 dak⁻¹ olarak hesaplanmıştır. 70°C' de Klorojenik asit konsantrasyonundaki artış k değerlerini belirgin bir biçimde düşürmemiştir. 1:5 ilavesinden sonraki her bir konsantrasyonda k değerleri birbirine yakın olacak şekilde düşmüştür. 1:5 konsantrasyonda klorojenik asit içeren örneğin k değeri 0,000717 dak⁻¹ iken bu değer 1:20 konsantrasyonda içeren örnekte 0,000615 dak⁻¹ olarak gözlemlenmiştir. 80°C' de benzer şekilde ilk konsantrasyonlarda alınan değerler konsantrasyon artışı ile belirgin şekilde düşmüştür. Fakat konsantrasyondaki değişim k değerlerini belirgin bir biçimde etkilememiştir. 90°C' de 1:5 rutin ilavesi ile k değerinde yaklaşık 2 katlık bir düşüş gözlemlenmiştir. Kontrol örneğinde 0,00740 dak⁻¹ olan değer klorojenik asit ilavesi ile 0,00249 dak⁻¹ a kadar düşmüştür. Yarılanma süreleri değerlendirildiğinde 70°C' de 239,970 dak. olan kontrol t değeri 5 kata yakın artarak 1083,719 dak. Olmuştur. Konsantrasyon artışına bağlı olarak yarılanma süreleri de artmıştır. 80°C' de 1:5 ve 1:10 konsantrasyonunda klorojenik asit içeren örneklerin t değerleri birbirine oldukça yakın çıkmıştır. 1:20 klorojenik asit içeren örneğin t

değeri 616,881 dak. olarak hesaplanmıştır. 90°C' de ise 1:10 ve 1:20 konsantrasyonlarında klorojenik asit ilavesi yakın etki göstermiştir. Bu konsantrasyonların t değerleri sırasıyla 269,273 ve 277,668 dak. Olarak ölçülmüştür. % antosiyanin kayıpları her bir sıcaklık değerinde konsantrasyon artışına bağlı olarak artmıştır. 70°C' de %45,67 olan kayıp %9,52' ye; 80°C' de %67,55 olan kayıp %16,35' e ve 90°C' de %76,72 olan kayıp %35,85' e düşürülmüştür.

Tablo 3.8 Farklı oranlarda klorojenik asit içeren örneklerin termal degradasyon parametreleri

Sıcaklık (°C)	Konsantrasyon (v/v)	$k \cdot 10^2$ (dak ⁻¹)	$t_{1/2}$ (dak)	R ²	% Kayıp
70°C	Kontrol	0,002888 A	239,970 D	0,98	45,67
	1;5	0,000717 B	966,088 C	0,96	11,76
	1;10	0,000639 BC	996,173 B	0,92	10,46
	1;20	0,000615 C	1083,719 A	0,92	9,52
	Kontrol	0,006401 A	107,159 C	0,91	67,55
	1;5	0,001467 B	472,246 B	0,96	26,21
	1;10	0,001393 BC	497,442 B	0,98	22,85
	1;20	0,001148 C	616,881 A	0,95	16,35
	Kontrol	0,007407 A	93,580 D	0,92	76,72
	1;5	0,003606 B	192,181 C	0,98	47,52
	1;10	0,002574 C	269,273 B	0,87	37,84
	1;20	0,002496 C	277,668 D	0,91	35,85



Şekil 1.10 Farklı oranlarda klorojenik asit içeren örneklere ait antosiyanin kayıpları

Gras ve ark. (2016) benzer bir çalışmada farklı konsantrasyonlarda klorojenik asidin siyah havuç antosiyaninleri üzerine stabilite edici özelliklerini incelemiştir. Çalışma sonucunda $0,191 \text{ h}^{-1}$ olan k değeri 1:9,4 oranında klorojenik asit ilavesi ile $0,17 \text{ h}^{-1}$ ye; 1:85 klorojenik asit ilavesi ile $0,16 \text{ h}^{-1}$ e ve 1: 162 klorojenik asit ilavesi ile de $0,147 \text{ h}^{-1}$ e düşürmüştür. Benzer şekilde yarılanma süresi de kontrol grubunda 3.63 saat iken, en yüksek konsantrasyonda klorojenik asit içeren örnekte 4,72 saate çıkmıştır. Yarılanma süreleri değerlendirildiğinde ise kontrol grubunun 5 saat sonunda toplam antosiyanin kaybı %37.6 iken; 1:0.4-1:0.36 arasında kopigmentasyon ajanı katılmış

örneklerde bu değer 38.1–39.2% arasında bulunmuştur. Yüksek konsantrasyonlarda klorojenik asit ilave edildiğinde ise daha dayanıklı antosiyaninler (5.6% ve 8.7% oranında daha az kayıp) elde edilmiştir (Gras, Bogner, Carle, & Schweiggert, 2016).

S. peruviana, *S. Nigra* ve siyah havuç ekstraktlarına klorojenik asit katarak raf ömrü süresi boyunca stabilitelerini incelemişlerdir. 23 haftalık raf ömrü sonunda kontrol grubu ile klorojenik asit içeren örneklerin yarılanma süreleri benzer çıkmıştır. Klorojenik asit örneğin rengini zenginleştirse de raf ömrüne katkıda bulunmamıştır (Pangestu, Miyagusuku-Cruzado, & Giusti, 2020). Benzer bir çalışmada Su ve ark. (2017) kırmızı elma antosiyaninlerini farklı fenolikler ile kopigmente etmişlerdir. Çalışma sonunda 0,1080 gün⁻¹ olan kontrol k değeri klorojenik asit ilavesi ile 0,0399 gün⁻¹ olmuştur. Ayrıca yarılanma süresi de 6,42 günden 17,39 güne çıkmıştır. Uygulanan diğer fenolikler gallik asit, ferulik asit ve kafeik asit ile kıyaslandığında klorojenik asit en etkili ajan olmuştur (Su, ve diğerleri, 2017). Kopjar ve ark. (2009) kuş üzümü suyuna farklı konsantrasyonlarda klorojenik asit katarak 30, 50, 70 ve 90°C’ de 1 saat bekleterek termal degradasyonunu incelemiştir. Kontrol örneğine ait k değerleri sırasıyla 0,0583, 0,1092, 0,2569 ve 0,3932 h⁻¹ olarak bulunurken; 1:50 oranında klorojenik asit içeren örnekte bu değerler sırası ile 0,0249, 0,0875, 0,216 ve 0,3058 h⁻¹ olarak bulunmuştur. Konsantrasyon 1:100 olduğunda ise bu değerler 0,0249, 0,0768, 0,1716 ve 0,3059 h⁻¹ olarak bulunmuştur. Yarılanma süreleri sıcaklık artışı ile kontrol grubunda 11,89, 6,35, 2,70 ve 1,76 saat olarak değişirken bu değerler 1:50 oranında klorojenik asit içeren örneklerde 27,85, 7,92, 3,2 ve 2,27 saat olarak değişmiştir. En yüksek konsantrasyonda klorojenik asit içeren örnekte bu değerler 27,85, 9,02, 4,04 ve 2,27 saat olacak şekilde artmıştır (Kopjar, Piližota, Šubarić, & Babić, 2009).

3.5.1.4 Fenolik Bileşiklerin Kendi Aralarında Kıyaslanması

Benzer konsantrasyonlarda fenolik bileşiklerin kendi aralarında göstermiş olduğu etkinliğe ait termal degradasyon verileri tablo 3.10’da verilmiştir. Tabloya göre 70°C’ de tüm uygulanan tüm konsantrasyonlarda k değerini en etkin biçimde

düşüren ajan klorojenik asit olmuştur. 70°C’ de 1:10 ve 1:20 konsantrasyonlarında kersetin ve rutin benzer etki göstermiş olup t ve k değerleri birbirine yakın çıkmıştır. 80°C’ de 1:5 konsantrasyonda klorojenik asit k değerini en etki düşüren kopigment olmuştur. 0,00640 dak⁻¹ olan kontrol k değerini 0,001467 dak⁻¹ e kadar düşürmüştür. T değerlerinde ise etkinlik sırası klorojenik asit>rutin>kersetin şeklinde olmuştur. Aynı sıcaklıkta 1:10 konsantrasyonda k değerlerinde fenolikler arasında istatistiki fark gözlemlenmezken t değerlerinde klorojenik asit yine etkili ajan olmuştur. 1:20 konsantrasyonda ise k ve t değerlerinde kersetin ve klorojenik asit birbirine yakın olarak hesaplanmıştır. En yüksek sıcaklık değeri olan 90°C’ de 1:5 ve 1:10 konsantrasyonlarda en etkili kopigmentasyon ajanı benzer şekilde klorojenik asit olurken; 1:20 konsantrasyonda rutin en etkili ajan olmuştur.

Tablo 3.9 Fenolik bileşiklerin kendi aralarında kıyaslanması

		1:5		1:10		1:20	
<i>Örnek</i>		$k \cdot 10^2$ (dak ⁻¹)	$t_{1/2}$ (dak)	$k \cdot 10^2$ (dak ⁻¹)	$t_{1/2}$ (dak)	$k \cdot 10^2$ (dak ⁻¹)	$t_{1/2}$ (dak)
70°C	Kontrol	0,002888 A	239,970 D	0,002888 A	239,970 D	0,002888 A	239,970 D
	Rutin	0,001084 Ca	639,385 Bc	0,000921 Bab	752,401 Ca	0,000975 Bb	711,048 Cb
	Kersetin	0,001335 Ba	519,361 Cc	0,000868 Bb	798,797 Bb	0,000851 Bb	814,389 Ba
	Klorojenik Asit	0,000717 Da	966,088 Ac	0,000615 Cab	996,173 Ab	0,000639 Cb	1083,970Aa
80°C	Kontrol	0,006401 A	107,159 D	0,006401 A	107,159 D	0,006401 A	107,159 C
	Rutin	0,001917 Ca	361,666 Bc	0,001561 Bb	444,041 Ba	0,001466 Bc	392,507 Bb
	Kersetin	0,002134 Ba	324,846 Cc	0,001601 Bb	433,044 Cb	0,001148 Cc	637,801 Aa
	Klorojenik Asit	0,001467 Da	472,246 Ab	0,001393 Bab	497,442 Ab	0,001088 Cb	616,881 Aa
90°C	Kontrol	0,007407 A	93,580 D	0,007407 A	93,580 D	0,007407 D	93,580 D
	Rutin	0,004558 Ba	152,150 Cc	0,004142 Bb	167,329 Cb	0,002052 Cc	337,869 Aa
	Kersetin	0,004075 Ca	170,116 Bc	0,003994 Ba	173,541 Bb	0,002217 Bcb	312,689 Ba
	Klorojenik Asit	0,003606 Da	192,181 Ac	0,002496 Cb	277, 668 Ab	0,002574 Bb	269,273 Ca

Farklı büyük harfler benzer konsantrasyonda farklı ajanlar arasındaki istatistiki farkı gösterirken farklı küçük harfler aynı ajanın farklı konsantrasyonları arasındaki istatistiki farkı ifade etmektedir ($p < 0,05$).

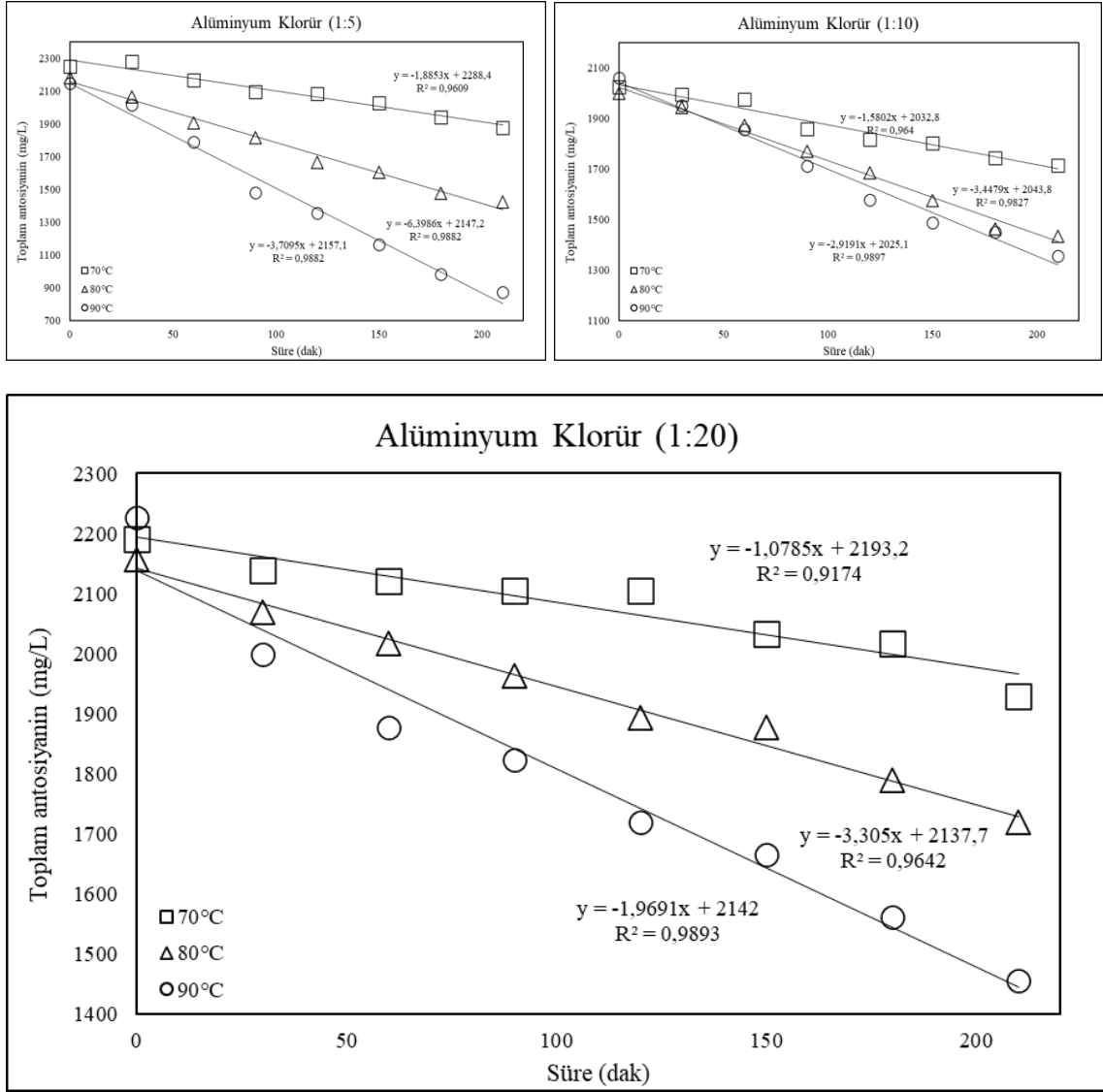
3.5.2 Metal İyonlarının Eklenmesi

3.5.2.1 Alüminyum Klorür İlavesi

Alüminyum klorür ile farklı oranlarda kopigmente edilmiş örneklerle ait termal degradasyon verileri tablo 3.11’de ve şekil 3.10’ da verilmiştir. Tabloya göre her bir sıcaklık değerinde konsantrasyon artışı ile k değerleri azalırken t değerleri artmaktadır. 70°C’ de 0,00288 dak⁻¹ olan kontrol k değeri 1:5 konsantrasyonda 0,000741 dak⁻¹, 1:10 konsantrasyonda 0,000727 dak⁻¹ ve 1:20 konsantrasyonda da 0,000531 dak⁻¹ olarak ölçülmüştür. 1:10 ve 1:20 konsantrasyonda alüminyum klorür içeren örneklerin k değerleri arasında istatistiki olarak fark gözlemlenmemiştir. 70°C’ deki yarılanma süreleri de konsantrasyon artışı ile artmıştır. Kontrole ait 239,970 dakika olan t değeri 1:5 oranda alüminyum iyonu ilavesi ile 904,662 dakikaya çıkarken bu değer 1:20 alüminyum klorür ilavesi ile 1305,822 dakikaya çıkmıştır. 80°C’ de benzer şekilde k değerleri azalma gösterirken t değerleri ise artmıştır. 0,00640 dak⁻¹ olan kontrolün k değeri 1:20 oranında alüminyum ilavesi ile 0,00109 dak⁻¹ e kadar düşmüştür. Yarılanma süreleri de bu sıcaklık değerinde konsantrasyon artışına bağlı olarak artmıştır. 90°C’ deki k değerlerindeki değişim 70°C ile benzerlik göstermiştir. Konsantrasyon artışı ile k değerleri düşse de 1:10 ve 1:20 konsantrasyonun k değerleri arasında istatistiki olarak bir fark gözlemlenmemiştir. Yarılanma süreleri ise logaritmik olarak artmıştır. % toplam antosiyanin kayıpları 70°C’ de 45,67’ den %12,00’ ye kadar; 80°C’ de %67,55’ ten %20,33’e kadar ve 90°C’ de de %76,72’ den %34,65’ e kadar düşmüştür.

Tablo 3.10 Farklı oranlarda alüminyum klorür içeren örneklerle ait termal degradasyon verileri

Sıcaklık (°C)	Konsantrasyon (v/v)	$k \cdot 10^2$ (dak ⁻¹)	$t_{1/2}$ (dak)	R ²	% Kayıp
70°C	Kontrol	0,00288 A	239,970 D	0,98	45,67
	1;5	0,000741 B	904,662 C	0,96	16,69
	1;10	0,000727 B	953,439 B	0,96	15,3
	1;20	0,000531 B	1305,822 A	0,92	12,00
80°C	Kontrol	0,00640 A	107,159 D	0,91	67,55
	1;5	0,00210 B	329,867 C	0,99	34,86
	1;10	0,00140 C	494,775 B	0,99	28,3
	1;20	0,00109 D	631,774 A	0,99	20,33
90°C	Kontrol	0,0074 A	93,580 D	0,92	76,72
	1;5	0,00370 B	187,034 C	0,98	59,44
	1;10	0,00236 C	346,497 A	0,98	34,2
	1;20	0,00200 C	289,296 B	0,96	34,65



Şekil 3.11 Alüminyum klorür içeren örneklerin antosiyanin kayıpları

Ratanapoompinyo ve ark. (2017) kara lahana antosiyaninleri üzerine farklı metallerin etkisini inceledikleri bir çalışmada 1:1,7 oranında antosiyanin:alüminyum klorür kompleksi hazırlayıp 90°C’ de 120 dakika tutarak birinci derece termal degradasyon parametrelerini incelemişlerdir. Kontrol grubuna it k değerini 0,00106 dak⁻¹ olarak bulurken bu değer alüminyum içeren örnekte aynı kalmıştır. Benzer şekilde 10,9 saat olan yarılanma süresinde herhangi bir değişiklik olmamıştır (Ratanapoompinyo, Nguyen, Devkota, & Shrestha, 2017). Sigurdson & Giusti (2014) yılında farklı bitki antosiyaninlerine alüminyum klorür tuzu ekleyerek termal stabilitelerini incelemişlerdir. Patlıcan, ahududu, kırmızı lahana, aronya, siyah kuş üzümü ve kara havuç

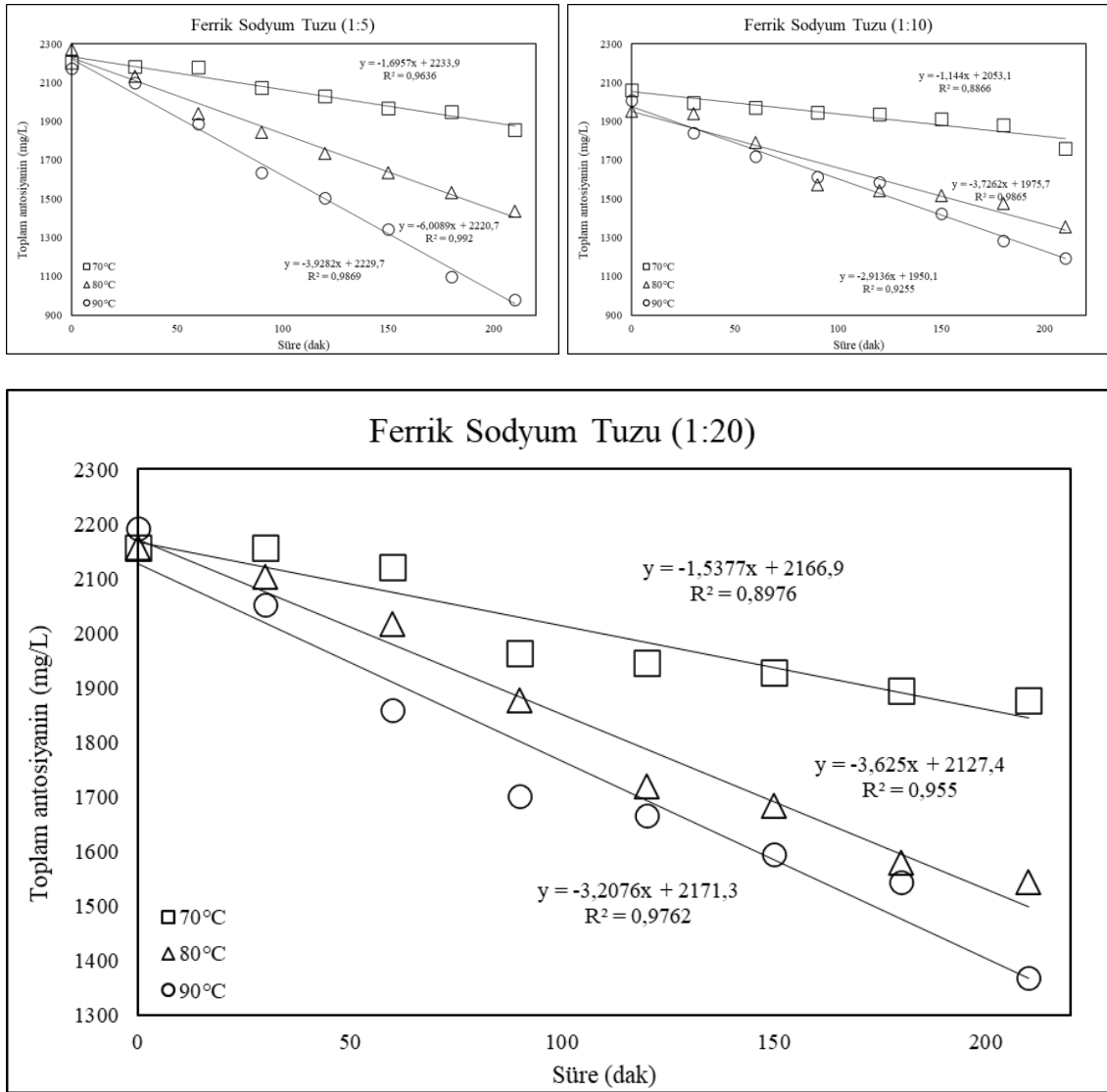
antosiyeninlerine 0.057, 0.2288, ve 0.4576 M konsantrasyonlarında katılan alüminyum klorür tuzlarının konsantrasyon artışı ile daha iyi kompleks oluşturduklarını bildirmişlerdir (Sigurdson & Giusti, 2014). Maylinda ve ark. (2018) kırmızı pirinç antosiyeninlerini $AlCl_3$ ile kopigmente ederek stabilitelerini UV-spektrofotometre ile gözlemlemişlerdir. Katılan alüminyum tuzu oranları 1:1, 1:2, 1:3, 1:4 ve 1:5 şeklinde olmuştur. Farklı asitlik değerlerinde metal iyonu ile kopigmente edilmiş antosiyeninlerin daha stabil olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca konsantrasyon artışı doğrudan stabilizeyi olumlu etkilemiştir (Maylinda, Rinadi, Putri, Fadillah, & Wayuningsih, 2019).

3.5.2.2 Ferrik Sodyum Tuzu İlavesi

Farklı konsantrasyonlarda ferrik sodyum tuzu içeren örnekler için termal bozunma değerleri tablo 3.12 ve şekil 3.11’de verilmiştir. Tabloya göre 70°C’de k değerleri kontrolden çok daha küçük olarak ölçülmüştür. Konsantrasyon artışı ile k değerleri değişse de istatistiki olarak konsantrasyon artışının k değerlerine etkisi çok fazla olmamıştır. 70°C’de 1:5 konsantrasyonda k değeri 0,00059 dak^{-1} iken bu değer 1:10 konsantrasyonda 0,00068 dak^{-1} ve 1:20 konsantrasyonda ise 0,00061 dak^{-1} olarak ölçülmüştür. 80°C’de k değerleri kontrole göre düşse de 1:10 ve 1:20 konsantrasyondaki örneklerde istatistiki olarak fark olmamıştır. 0,00640 olan kontrol örneğinin k değeri 1:5 ferrik sodyum tuzu ilavesi ile 0,002272’ye 1:10 ilavesi ile 0,001575’e ve 1:20 ilavesi ile de 0,001481 dakikaya çıkmıştır. Uygulanan en yüksek sıcaklık değerinde 80°C’ye benzer şekilde k değerleri metal ilavesi ile azalırken 1:10 ve 1:20 konsantrasyonda ilave edilen kopigmentlerin etkinliği benzer olmuştur. Yarılma sürelerine bakıldığında 80°C’de 107, 159 dakika olan değer 1:20 kopigment ilavesi ile 468,231’e kadar çıkarılmıştır. 90°C’de bu değer kontrolde 93,58 dakikadan 287,410 dakikaya 1:20 kopigment ilavesi ile gerçekleştirilmiştir. % toplam antosiyenin kayıplarına bakıldığında 70°C’de 45,67’den 13,01’e 80°C’de %67,55’ten %28,46’ya ve 90°C’de de %76,72’den %37,60’a düşürülmüştür.

Tablo 3.11 Farklı oranlarda ferrik sodyum tuzu içeren örneklerin termal degradasyon verileri

Sıcaklık (°C)	Konsantrasyon (v/v)	$k \cdot 10^2$ (dak ⁻¹)	$t_{1/2}$ (dak)	R ²	% Kayıp
70°C	Kontrol	0,00288 A	239,970 D	0,98	45,67
	1;5	0,00059 B	1175,33 A	0,96	15,76
	1;10	0,00068 B	1012,323 C	0,89	14,7
	1;20	0,00061 B	1128,264 B	0,90	13,01
80°C	Kontrol	0,00640 A	107,159 D	0,91	67,55
	1;5	0,002272 B	305,136 C	0,99	36,86
	1;10	0,001575 C	440,148 B	0,93	30,5
	1;20	0,001481 C	468,231 A	0,98	28,46
90°C	Kontrol	0,00740 A	93,58 C	0,92	76,72
	1;5	0,00294 B	236,04 B	0,96	54,99
	1;10	0,00233 C	284,022 A	0,99	40,5
	1;20	0,00214 C	287,410 A	0,96	37,60



Şekil 3.12 Farklı oranlarda ferrik sodyum tuzu içeren örneklerin antosiyanin kayıpları

Ratanapoompinyo ve ark. (2017) siyah lahana antosiyaninlerine ferrik iyonu ilave ederek örneklerin 90°C’ de termal degradasyonunu birinci derece kinetik denklem ile ifade etmişlerdir. Ferrik tuzu içeren örneğin k değerini 0,00153 (0,963) dak^{-1} olarak ve yarılanma süresini de 7,6 saat olarak bulmuşlardır. İlginç bir biçimde kontrol ile kıyaslandığında k değeri artarken t değeri azalmış ve stabilite üzerinde olumsuz etki göstermiştir (Ratanapoompinyo, Nguyen, Devkota, & Shrestha, 2017). Antosiyaninlerin metal iyonları ile yaptığı şelatların etki mekanizması metallerin kinonoidal bazı stabil hale getirerek nükleofilik ataklardan koruması ile açıklanmaktadır (Yoshida, Kitahara, Ito, & Kondo, 2006). Genellikle metal

iyon:antosiyenin kompleksi ısıtılma işlemde termal bozunmaya karşı koruyucu etki göstermektedir (Figueiredo, ve diğerleri, 1999) ve düşük pH değerinde bu koruma daha da etki onmaktadır (Cevallos-Casals & Cisneros-Zevallos, 2004). Demir moleküllerinin antosiyeninler ile yaptığı şelatlar 80 dakika boyunca 60°C’ de tutulan antosiyeninlerin bozulmasını önlemektedir (Patras, Brunton, O'Donnell, & Tiwari, 2010). İlave olarak kopigment metal iyonunun kimyasal yapısı ve antosiyenin molekülünün bağ oluşturma potansiyeli kompleks oluşumunda son derece etkilidir (Maccarone, Maccarrone, & Rapisarda, 1985). Mavi renkli antosiyeninlerin termal stabilitesi üzerine demir iyonu ilavesinin incelendiği benzer bir çalışmada Buchweitz ve ark. (2013) 1:1 ve 1:2 konsantrasyonlarında ferrik tuzu ilave ederek raf ömrü boyunca yarılanma süreleri incelemiştir. Ferrik tuzu konsantrasyonunun artması stabiliteyi azaltmıştır. En etkin stabilite sonuçları pH 4.5 ve antosiyenin:ferrik 1:1 oranında elde edilmiştir (Buchweitz, Brauch, Carle, & Kammerer, 2013).

3.5.2.3 Magnezyum Oksit İlavesi

Farklı konsantrasyonlarda magnezyum oksit içeren örnekler için termal degradasyon parametreleri tablo 3.13 ve şekil 3.12’ de verilmiştir. Tabloya göre 70°C’ de kontrol örneğine ait k değeri 0,00288 dak⁻¹ iken MgO ilavesi ile bu değer düşmüştür. Aynı sıcaklık değerinde konsantrasyon artışı ile k değerleri düşse de istatistiki olarak herhangi bir farklılık gözlemlenmemiştir. 0,001393 dak⁻¹ ile 1:20 konsantrasyonda MgO içeren örnek en düşük k değerine sahip örnek olarak karşımıza çıkmaktadır. 80°C’ de magnezyum oksit ilavesi ile k değerleri düşmüştür. 0,00640 olan kontrolün k değeri kopigment konsantrasyonuna bağlı olarak azalmıştır.70°C’ ye nazaran daha belirgin bir düşüş gözlemlenmiştir. En yüksek sıcaklık değerindeki k değerlerine bakıldığı zaman 1:5 konsantrasyonda metal iyonu içeren örnek kontrole yakın bir değere sahip olmuştur. 1:10 ve 1:20 konsantrasyonda metal iyonu içeren örneklerin k değerleri arasında istatistiki olarak bir fark gözlemlenmemiştir. Kopigmente edilmiş örneklerin yarılanma

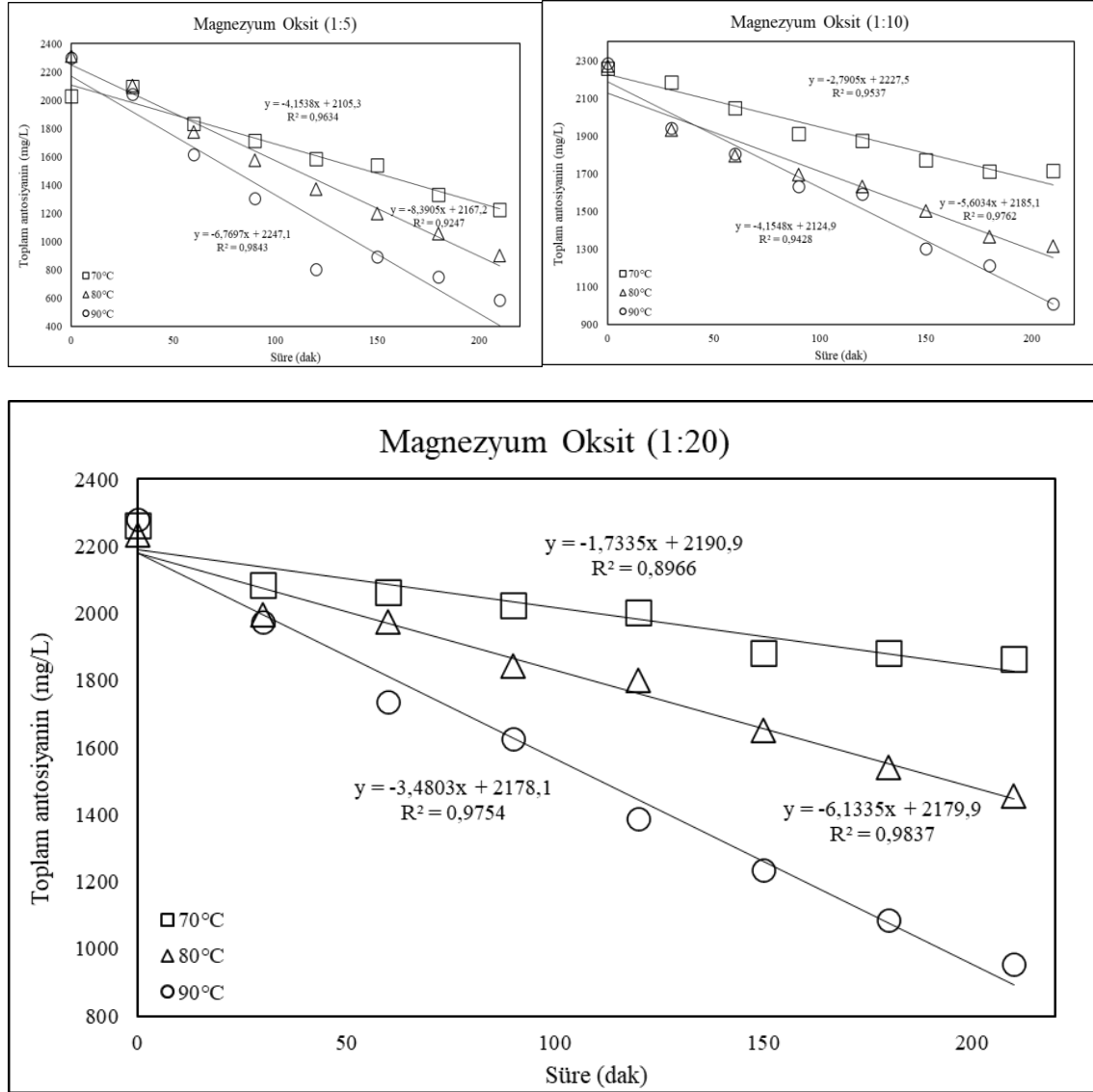
süreleri kontrol ile kıyaslandığında artmıştır. 70°C’ de 239,970 dak. Olan kontrol örneğinin yarılanma süresi 497,422 dakikaya kadar çıkmıştır.

Tablo 3.12 Farklı konsantrasyonlarda magnezyum oksit içeren örneklerin termal degradasyon verileri

Sıcaklık (°C)	Konsantrasyo n (v/v)	$k \cdot 10^2$ (dak ⁻¹)	$t_{1/2}$ (dak)	R ²	% Kayıp
70°C	Kontrol	0,002880 A	239,970 D	0,98	45,67
	1;5	0,001580 B	436,603 C	0,96	39,63
	1;10	0,001518 B	456,760 B	0,95	24,0
	1;20	0,001393 B	497,422 A	0,90	17,70
80°C	Kontrol	0,00640 A	107,159 D	0,91	67,55
	1;5	0,00419 B	165,291 C	0,98	60,98
	1;10	0,00335 C	206,660 B	0,94	42,1
	1;20	0,00227 D	305,086 A	0,98	34,95
90°C	Kontrol	0,00740 A	93,580 D	0,92	76,72
	1;5	0,00629 B	110,253 C	0,92	74,53
	1;10	0,00421 C	178,074 A	0,98	55,9
	1;20	0,00389 C	164,460 B	0,98	58,10

Fakat konsantrasyon artışı ile yarılanma sürelerinde büyük farklılıklar gözlemlenmemiştir. 80°C’ de kontrol örneğinin t değeri 107,159 dakika iken 1:5’ te 165,291 dakikaya 1:10’ da 206,660 dakikaya ve 1:20 konsantrasyonda da 305,086 dakikaya çıkmıştır. 90°C’ de 1:5 oranında MgO içeren örneğin yarılanma süresi kontrol örneğine yakın olarak ölçülmüştür. 90°C’ de 1:10 konsantrasyondaki örnek 1:20 konsantrasyondaki örnekten daha dayanıklı olarak gözlemlenmiştir. Kontrol örneğinin 70, 80 ve 90°C’deki % kayıpları sırası ile 45,67, 67,55 ve 76,22 olarak hesaplanmıştır. 70°C’ de bu değer %17,70’ e 80°C’ de %34,95’ e ve 90°C’de de %55,9’a kadar düşürülmüştür. 90°C’ de 1:20

konsantrasyonda metal içeren örneğin toplam antosiyanin kaybı 1:10 oranında kopigment içeren örnekten daha az olmuştur.



Şekil 1.13 Magnezyum oksit içeren örneklerin antosiyanin kayıpları

Magnezyum tuzunun konsantrasyon artışı ile bağlanma kabiliyeti artmaktadır. Metal iyonları antosiyaninlerin B halkasındaki serbest hidroksil grupları ile kolayca birleşebilmesi renk yoğunluğu ve stabilite artırmaya katkı sağlamaktadır. B halkasında bir kateşol yapısına sahip olan tüm antosiyaninlerin, yani tüm siyanidin, delphinidin ve petunidin türevlerinin, birkaç küçük iki değerlikli ve üç

değerlikli metal katyonları ile kompleks oluşturma kapasitesine sahip olduğu bilinmektedir (Li, Li, Wang, & Jiang, 2016).

3.5.2.4 Metal İyonlarının Kendi Arasında Kıyaslanması

Benzer konsantrasyonlarda farklı metallerin etkinlikleri tablo 3.14' te verilmiştir. Tabloya göre 70°C' de k değerleri kıyaslandığında 1:5 konsantrasyonda en etkili ajanlar alüminyum klorür ve ferrik sodyum tuzu olmuştur. Fakat yarılanma sürelerinde ferrik sodyum tuzu en etkili ajan olarak gözlemlenmiştir. Aynı sıcaklık değerinde 1:10 konsantrasyonda benzer şekilde bir eğilim gözlenmiş olup en etkin ajan ferrik sodyum tuzu olmuştur. Fakat 1:20 konsantrasyona bakıldığında yarılanma sürelerinin iyileştirilmesinde en etkili ajan alüminyum klorür olmuştur. 80°C' de k değerleri kıyaslandığında tüm konsantrasyonlarda en etkisiz metal iyonu magnezyum oksit olmuştur. Ferrik sodyum tuzu ve alüminyum klorür yakın etkiyi gösterse de daha yüksek sıcaklıklarda alüminyum klorür daha ön plana çıkan ajan olmuştur. 90°C' de k değerlerinde ferrik sodyum tuzu en düşük değere sahip ajan olmuştur. Yarılanma sürelerinde ise alüminyum klorürün daha etkin olduğu görülmüştür.

Tablo 3.13 Metal İyonlarının kendi arasında kıyaslanması

		1;5		1;10		1;20	
		k*10 ² (dak ⁻¹)	t _{1/2} (dak)	k*10 ² (dak ⁻¹)	t _{1/2} (dak)	k*10 ² (dak ⁻¹)	t _{1/2} (dak)
70°C	Kontrol	0,00288 A	239,970 D	0,00288 A	239,970 D	0,00288 D	239,970 D
	Alüminyum	0,000741 Ca	904,662 Bc	0,000727 Ca	953,439 Bb	0,000531 Ca	1305,822 Aa
	Ferrik	0,000590 Ca	1175,330 Aa	0,000685 Ca	1012,323 Ac	0,000614 Ca	1128,264 Bb
	Magnezyum	0,001588 Ba	436,603 Cc	0,001518 Bb	456,760 Cb	0,00139 Bb	497,422 Ca
80°C	Kontrol	0,00640 A	107,159 D	0,00640 A	107,159 D	0,00640 A	107,159 D
	Alüminyum	0,00210 Ca	329,867 Ac	0,00140 Cb	494,775 Ab	0,00109 Dc	631,774 Aa
	Ferrik	0,00227 Ca	305,136 Bc	0,00157 Cb	440,148 Bb	0,00148 Cb	468,231 Ba
	Magnezyum	0,00419 Ba	165,291 Cc	0,00335 Bb	206,660 Cb	0,00227 Bc	305,086 Ca
90°C	Kontrol	0,0074 A	93,580 D	0,00740 A	93,580 D	0,00740 A	93,850 C
	Alüminyum	0,00370 Ca	187,034 Bc	0,00200 Cb	346,497 Aa	0,002396 Cb	289,296 Ab
	Ferrik	0,0029 Da	236,187 Ab	0,00214 Cb	284,022 Ba	0,00233 Cb	287,410 Aa
	Magnezyum	0,00629 Ba	110,2533 Cc	0,00389 Bb	178,074 Cb	0,00421 Bb	164,460 Ba

Farklı büyük harfler benzer konsantrasyonda farklı ajanlar arasındaki istatistiki farkı gösterirken farklı küçük harfler aynı ajanın farklı konsantrasyonları arasındaki istatistiki farkı ifade etmektedir (p<0,05).

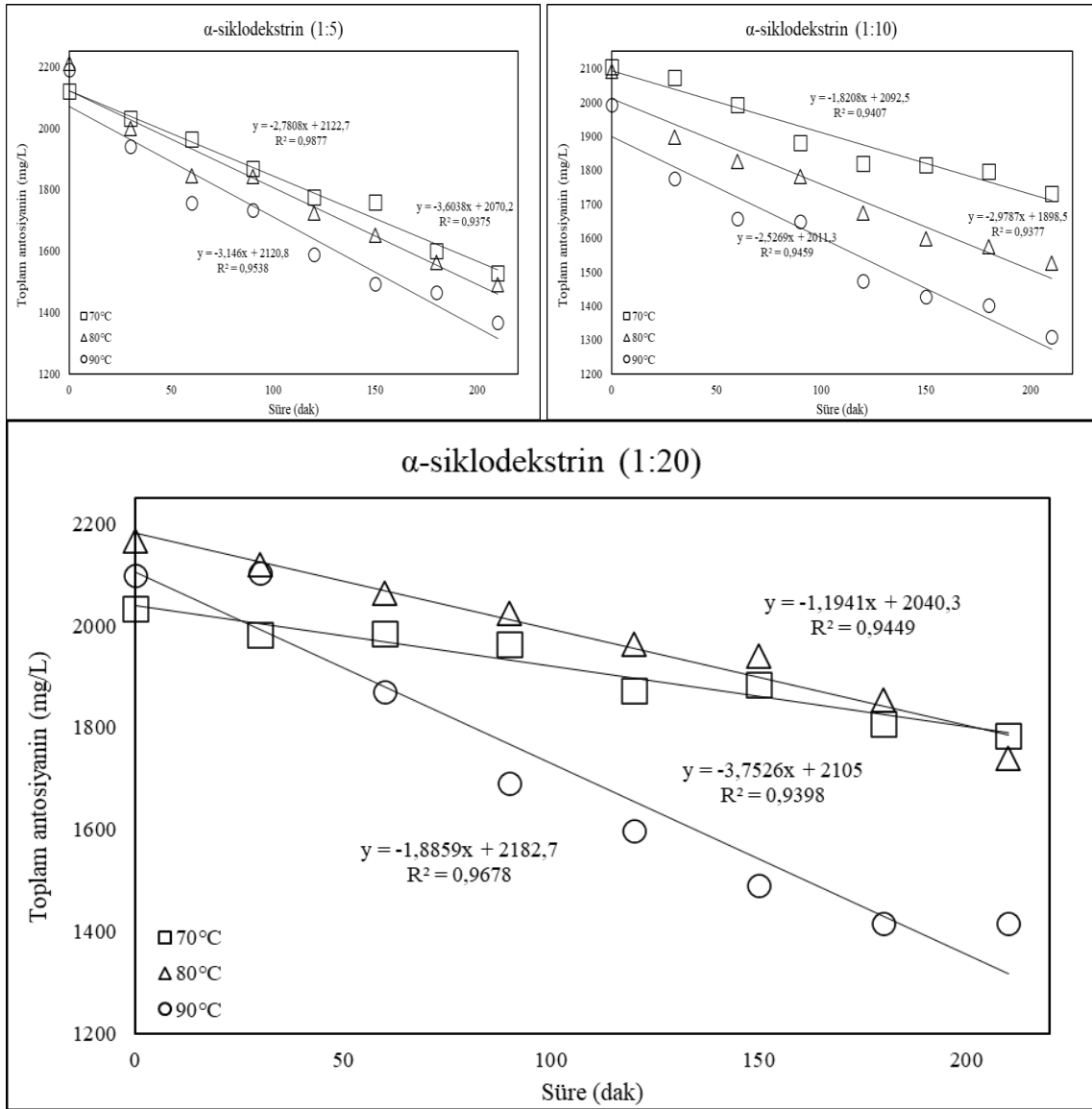
3.5.3 Siklodekstrinlerin İlavesi

3.5.3.1 α -siklodekstrin İlavesi

Farklı konsantrasyonlarda α -siklodekstrin içeren örneklerle ait termal degradasyon verileri tablo 3.15 ve şekil 3.13' te verilmiştir. Tabloya göre tüm sıcaklık değerlerinde α -siklodekstrin ilavesi k değerlerini düşürmüştür. Fakat 1:10 ve 1:20 konsantrasyonda kopigment içeren örneklerin k değerleri arasında 90°C hariç istatistiki olarak fark gözlemlenmemiştir. 70°C' de kontrole ait k değeri 0,00288' den 1:5 α -siklodekstrin ilavesi ile 0,001422' ye 1:10 α -siklodekstrin ilavesi ile 0,000693'e 1:20 α -siklodekstrin ilavesi ile de 0,000584' e düşürülmüştür. 70°C' deki yarılanma süreleri konsantrasyon artışına bağlı olarak yükselmiş olup 239,970 olan kontrolün t değeri 1:20 α -siklodekstrin ilavesi ile 1178,236 dakikaya çıkmıştır. 80°C ve 90°C' de benzer şekilde yarılanma süreleri konsantrasyon artışına bağlı olarak artmıştır. 80°C' de 107,159 dakika olan kontrole ait yarılanma süresi 841,493' e 90°C'de 93,580 dakika olan kontrol yarılanma süresi de 377,898 dakikaya çıkmıştır. % toplam antosiyanin kayıpları 70°C' de %45,67' den %12,23' e; 80°C'de %67,55' ten %19,72' ye ve 90°C' de de % 76,72' den %32,54' e düşmüştür.

Tablo 3.14 Farklı konsantrasyonlarda alfa siklodekstrin içeren örneklere ait termal degradasyon verileri

Sıcaklık (°C)	Konsantrasyon (v/v)	$k \cdot 10^2$ (dak ⁻¹)	$t_{1/2}$ (dak)	R^2	% Kayıp
70°C	Kontrol	0,00288 A	239,970 D	0,98	45,67
	1;5	0,00142 B	488,249 C	0,98	27,90
	1;10	0,000693 C	998,942 B	0,89	17,74
	1;20	0,000584 C	1187,236 A	0,94	12,23
80°C	Kontrol	0,00640 A	107,159 D	0,91	67,55
	1;5	0,00232 B	298,195 C	0,94	32,64
	1;10	0,000870 C	796,164 B	0,94	27,07
	1;20	0,000824 C	841,493 A	0,95	19,72
90°C	Kontrol	0,00740 A	93,580 D	0,92	76,72
	1;5	0,00285 B	242,850 C	0,95	37,58
	1;10	0,00140 D	494,941 A	0,98	34,24
	1;20	0,00183 C	377,898 B	0,97	32,54

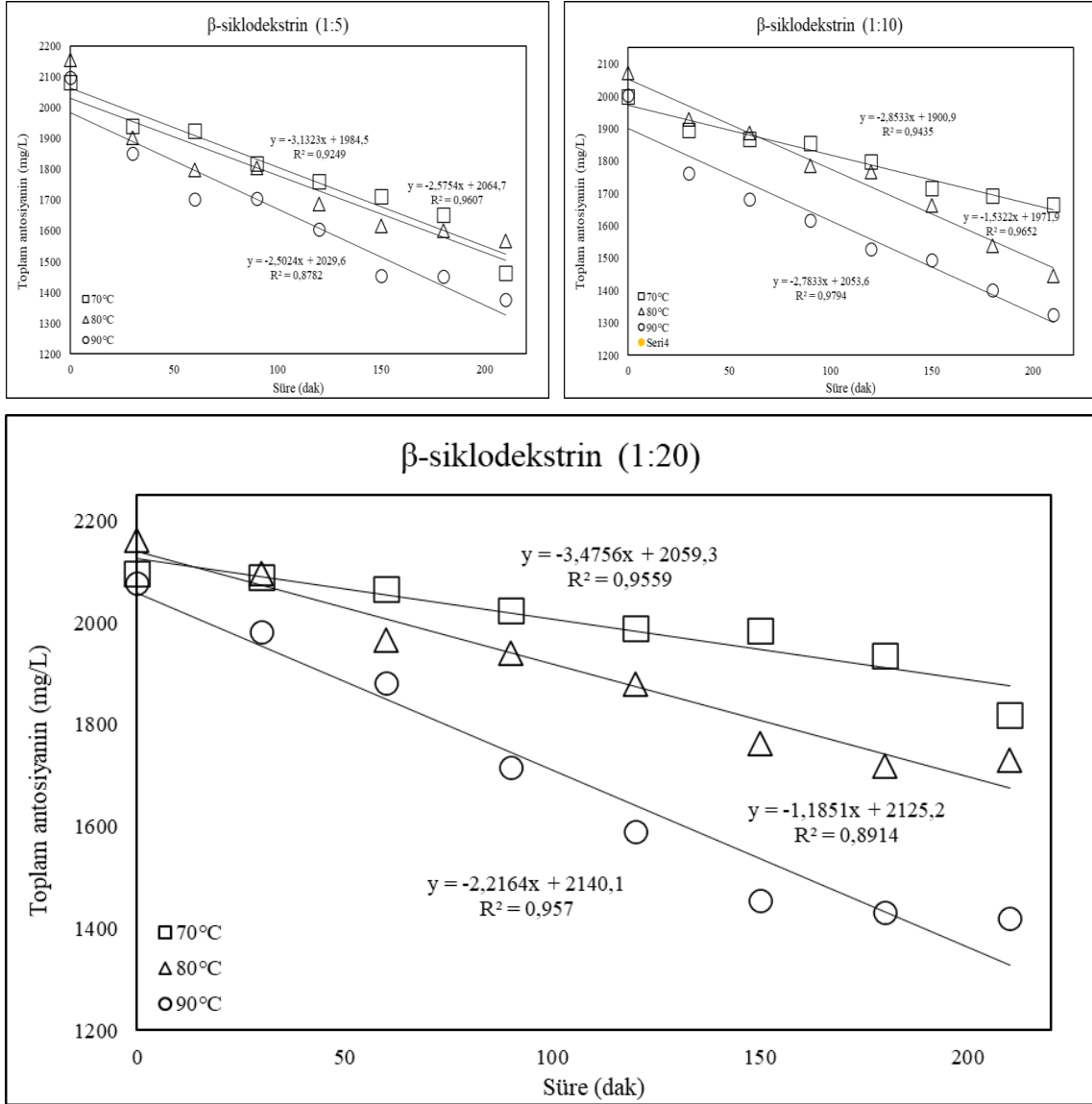


Şekil 3.14 Farklı konsantrasyonlarda α -siklodekstrin içeren örneklerin antosiyanin kayıpları

3.5.3.2 β -siklodekstrin ilavesi

Farklı konsantrasyonlarda β -siklodekstrin içeren örneklere ait termal degradasyon parametreleri Tablo 3.16 ve Şekil 3.14’te verilmiştir. Tabloya göre tüm sıcaklık değerlerinde konsantrasyon artışına bağlı olarak k değerleri azalmış ve t değerleri artmıştır. 90°C’de 1:5 konsantrasyon ve 1:10 konsantrasyondaki örneklerin k değerleri arasında istatistiki olarak bir fark gözlemlenmemiştir. Yarılma süreleri tüm konsantrasyonlarda artarak devam etmiştir. 70°C’de en düşük k değeri

0,000375 ve en yüksek t değeri de 1847,161 dakika olarak 1:20 konsantrasyondaki örnekte gözlemlenmiştir. 80°C’ de kontrol k değeri 0,00640 iken bu değer 1:20 β –siklodekstrin ilavesi ile 0,00124’ e düşmüştür. % antosiyanin kayıplarına bakıldığı zaman 70°C’ de toplam kayıp %13,22’ ye kadar



düşürülmüştür. 80°C’ de %67,55 olan kontrole ait % kayıp %19,99’ a 1:20 β –siklodekstrin ilavesi ile düşürülmüştür. 90°C’ de %76,72 olan kayıp %31,56’ ya kadar düşürülmüştür.

Şekil 3.15 Farklı konsantrasyonlarda β-siklodekstrin içeren örneklerin antosiyanin kayıpları

Tablo 3.15 Farklı konsantrasyonlarda β –siklodekstrin içeren örneklerin termal degradasyon parametreleri

Sıcaklık (°C)	Konsantrasyon (v/v)	$k \cdot 10^2$ (dak ⁻¹)	$t_{1/2}$ (dak)	R^2	% Kayıp
70°C	Kontrol	0,00288 A	239,970 D	0,98	45,67
	1;5	0,00155 B	447,044 C	0,96	29,77
	1;10	0,00106 C	653,198 B	0,94	16,74
	1;20	0,000375 D	1847,161 A	0,96	13,22
80°C	Kontrol	0,00640 A	107,159 D	0,91	67,55
	1;5	0,00232 B	297,479 C	0,88	27,34
	1;10	0,00168 C	412,094 B	0,97	30,20
	1;20	0,00124 D	550,356 A	0,89	19,99
90°C	Kontrol	0,00740 A	93,580 D	0,92	76,72
	1;5	0,00268 B	258,168 C	0,92	34,41
	1;10	0,00252 B	274,032 B	0,98	33,79
	1;20	0,00197 C	351,275 A	0,96	31,59

Mourtzinis ve ark. (2008) β -siklodekstrin varlığında hibiskus ekstraktlarının termal stabilitesini incelemişlerdir. Hibiskus örneklerine 1:1 oranda β -siklodekstrin katılarak 60, 70, 80 ve 90°C’ de bekleterek antosiyanin miktarındaki değişimi incelemişlerdir. 60°C’ de kontrol grubu örneğinin k değeri $0,7 \cdot 10^3 \text{ dak}^{-1}$ iken, yarılanma süresi de 16,5 saat olarak bulunmuştur. Bu değerler β -siklodekstrin ilavesi ile sırasıyla $0,3 \cdot 10^3 \text{ dak}^{-1}$ ve 36,51 saat olmuştur. 70°C’ de benzer şekilde k değeri düşerken t değeri artmıştır. $1,9 \cdot 10^3 \text{ dak}^{-1}$ olan kontrol k değeri 1,4; 6,08 saat olan yarılanma süresi de 8,25 saat olmuştur. 90°C’de kontrol k değeri $3,6 \cdot 10^3 \text{ dak}^{-1}$ olarak ölçülürken kopigmente edilmiş örnekte bu değer $3,21 \cdot 10^3 \text{ dak}^{-1}$ olarak hesaplanmıştır. Ayrıca 90°C’ deki yarılanma süresi 3,21 saatten 6,08 saate çıkmıştır (Mourtzinis, ve diğerleri, 2008). Fernandes ve ark. (2018) yaban mersini antosiyaninlerine 1:10 oranında β -siklodekstrin ilave ederek 60 ve 90°C’ de 120 dakika bekletip termal degradasyonunu incelemiştir. 60°C’de $0,8 \cdot 10^3 \text{ dak}^{-1}$ olan kontrole ait k değeri β -siklodekstrin ilavesi ile $0,29 \cdot 10^3 \text{ dak}^{-1}$ olmuştur. Ayrıca yarılanma süreleri bu sıcaklık değerinde kontrolde 14 saat iken bu değer kopigmente edilmiş örnekte 41 olarak ölçülmüştür. 90°C’ de ise $3,2 \cdot 10^3 \text{ dak}^{-1}$ olan kontrol k değeri β -siklodekstrin ilavesi ile $2,6 \cdot 10^3 \text{ dak}^{-1}$ e düşmüş ve yarılanma süresi de 2,6 saatten 4,1 saate çıkmıştır (Fernandes, ve diğerleri, 2018). Pastörizasyon işleminin antosiyaninler üzerine etkisinin incelendiği bir diğer çalışmada aronya ekstraktları β -siklodekstrin ile zenginleştirilmiştir. Pastörizasyon işlemi öncesi toplam antosiyanin miktarı 95-100 mg/ml olarak ölçülürken pastörizasyon sonrası bu değer 76-82 mg/ml aralığına düşmüştür. %0,5, 1 ve 3 oranında β -siklodekstrin ilave edilen ürünlerde pastörizasyon sonrası antosiyanin miktarı incelendiğinde %3’ten daha düşük konsantrasyonlarda ilave edilen β -siklodekstrin etkinlik göstermezken %3 ve üzeri konsantrasyonlarda antosiyanin kaybı azalmıştır (Howard, Brownmiller, Prior, & Mauromoustakos, Improved Stability of Chokeberry Juice Anthocyanins by β -Cyclodextrin Addition and Refrigeration, 2013). Dut antosiyaninlerinin β -siklodekstrin ilavesi ile stabilitesinin artırılmaya çalışıldığı bir diğer araştırmada 70,80 ve 90°C’ de tutulan örneklerin termal degradasyon parametreleri incelenmiştir. Kontrol örneğinde k değerleri 70, 80 ve 90°C’ de sırasıyla 1,26, 3,36

ve $4,33 \cdot 10^3$ dak⁻¹ olarak ölçülürken $t_{1/2}$ değerleri de sırasıyla 8,95, 3,44 ve 2,67 saat olarak ölçülmüştür. β -siklodekstrin ilavesi ile k değerleri aynı sıcaklıklarda sırasıyla 0,44, 1,22 ve $1,94 \cdot 10^3$ dak⁻¹ olarak ölçülürken t değerleri de sırası ile 26,25, 9,47 ve 5,95 saat olarak ölçülmüştür (Xie, Xu, Shishir, Zheng, & Chen, 2019). Benzer şekilde siyah fasulye kabuklarından elde edilen antosiyaninler üzerine β -siklodekstrin ilavesi $+4^\circ\text{C}$ ' de raf ömrü boyunca antosiyaninlerin termal yarılanma sürelerini uzatmıştır. Kontrolde $0,0218$ hafta⁻¹ olan k değeri β -siklodekstrin ilavesi ile $0,0089$ hafta⁻¹ e kadar düşerken yarılanma süresi de 31,8 haftadan 77,8 haftaya çıkmıştır (Aguilera, ve diğerleri, 2016).

3.5.3.3 Siklodekstrinlerin Kendi Arasında Kıyaslanması

Siklodekstrinlerin kendi aralarında olan termal degradasyon kıyaslama parametreleri tablo 3.17'de verilmiştir. Tabloya göre 1:5 konsantrasyonda k değerleri kıyaslandığında tüm sıcaklık değerlerinde iki ajan arasında istatistiki olarak bir fark gözlemlenmemiştir. Fakat yarılanma sürelerinde 70 ve 80°C ' de 1:5 konsantrasyonda α -siklodekstrin öne çıkmıştır. 90°C ' de ise beta siklodekstrin daha etkili olmuştur. 1:10 ve 1:20 konsantrasyonda tüm sıcaklık değerlerinde α -siklodekstrin daha etkili ajan olarak gözlemlenmiştir.

Tablo 3.16 Siklodekstrinlerin kendi arasında kıyaslanması

		1;5		1;10		1;20	
		$k \cdot 10^2$ (dak ⁻¹)	$t_{1/2}$	$k \cdot 10^2$ (dak ⁻¹)	$t_{1/2}$ (dak)	$k \cdot 10^2$ (dak ⁻¹)	$t_{1/2}$ (dak)
106	Kontrol	0,00288 A	239,970 C	0,00288 A	239,970 C	0,00288 A	239,970 C
	70°C						
	Alfa	0,00142 Bb	488,249 Ac	0,000693 Ca	998,942 Ab	0,000584 Ba	1187,236 Ba
	Beta	0,00155 Ba	447,044 Bc	0,00106 Bb	653,198 Bb	0,000375 Cc	1847,161 Aa
	Kontrol	0,00640 A	107,159 C	0,00640 A	107,159 C	0,00640 A	107,159 C
	80°C						
	Alfa	0,00233 Bb	298,195 Ac	0,000870 Ca	796,164 Ab	0,000824 Ca	841,493 Aa
	Beta	0,00232 Ba	297,479 Bc	0,00168 Bb	412,094 Cb	0,00124 Bc	559,356 Ba
	Kontrol	0,00740 A	93,580 C	0,00740 A	93,580 C	0,00740 A	93,580 C
90°C	Alfa	0,00285 Ba	242,850 Bc	0,00140 Cc	494,941 Aa	0,001834 Bb	377,898 Ab
	Beta	0,00268 Ba	258,168 Ac	0,00252 Bb	274,032 Bb	0,00197 Bc	351,275 Ba

Farklı büyük harfler benzer konsantrasyonda farklı ajanlar arasındaki istatistiki farkı gösterirken farklı küçük harfler aynı ajanın farklı konsantrasyonları arasındaki istatistiki farkı ifade etmektedir ($p < 0,05$).

3.5.4 Örnek Ürün Denemeleri

Örnek ürün denemelerine ilişkin sonuçlar aşağıda görseller şeklinde verilmiştir.



Şekil 3.16 Stabilitesi en yüksek konsantrasyonu içeren renklendiriciler ile üretilmiş



Şekil 3.17 Stabilitesi en yüksek konsantrasyonu içeren renklendiriciler ile üretilmiş kurabiye ve hamuru



Şekil 1.18 Stabilitesi en yüksek konsantrasyonu içeren renklendiriciler ile üretilmiş kek ve hamuru



Şekil 3.19 Stabilitesi en yüksek konsantrasyonu içeren renklendiriciler ile üretilmiş yogurt



Şekil 3.20 Stabilitesi en yüksek konsantrasyonu içeren renklendiriciler ile üretilmiş pasta kreması

Renk, gıda tercihlerinde tüketici tarafından ilk fark edilen özellik olması nedeni ile en önemli kalite parametrelerinden biridir ve tüketici tercihlerini doğrudan etkiler. Gıdaların renklendirilmesi ilk çağlardan itibaren bitkisel kaynaklı ürünler ile yapılırken artan nüfus ve zorlaşan tüketici taleplerine cevap vermek adına sanayi devrimi ile birlikte doğal renk maddelerine alternatif yapay olanları üretilmeye başlanmıştır. Stabilité, ucuz olma ve gıda yapısını bozmama gibi avantajlarından dolayı gıda endüstrisinde farklı amaçlar için uzun yıllar kullanılan yapay boyaların sağlığa olumsuz etkilerinin ortaya konması ile yapay boya tüketimine olan ilgi doğrudan bitkisel alternatiflerine kaymıştır. Bu amaçla farklı bitkilerden farklı renk maddelerinin eldesi için akademik ve endüstriyel birçok çalışma yürütülmüştür. Bitkisel renk pigmentleri klorofil, karotenler, likopen ve antosiyaninler gibi geniş bir yelpazeye sahip olup farklı gıda matrikslerinde başarılı bir biçimde kullanılmaktadır. Antosiyaninler, doğada kırmızıdan pembeye; maviden mora renk verebilme özelliğine sahip hücre içinde ve dışında bulunabilen aglikon glikozitleridir. Antosiyaninler, fırıncılık ürünleri, süt ürünleri, alkollü ve alkolsüz içecekler gibi birçok farklı gıda ürününde kullanılmaktadır. Gıda proseslerinde ısı, sıcaklık, pH değişimi gibi etmenlerden kolayca etkilenmesi nedeni ile antosiyaninlerin stabilitesini artırmaya yönelik çalışmalar gün geçtikçe artmaktadır. Bu amaçla bu çalışmada zengin bir antosiyanin kaynağı olan endemik karamuk (*Berberis crataegina* DC.) bitkisinden antosiyaninler yüksek saflıkta izole edilip ısıl stabilitesi artırılmaya çalışılmıştır. Bu amaçla yüksek ses uygulaması yardımı ile ekstrakte edilen antosiyaninler Amberlite XAD-7HP makro resini yardımı ile %86 oranında şeker ve organik bileşiklerden ayrılmıştır. HPLC ile tanımlanan antosiyanin profilinde en yüksek miktarda elde edilen antosiyanin malvidin-3-glikozit olmuştur. Daha sonra 3 farklı fenolik madde, 3 farklı metal iyonu ve 2 farklı siklodekstrin ile kopigmente edilerek farklı sıcaklık değerlerinde

tutulup antosiyaninlerin degradasyonu incelenmiştir. Çalışma kapsamında kullanılan fenolik bileşikler rutin, kuersetin ve klorojenik asittir. Klorojenik asit, en etkili kopigmentasyon aracı olmuştur. Yüksek konsantrasyonlarda rutin daha etkili bir ajan olmuş fakat örnekte renk değişimine sebep olmaktadır. Çalışmada kullanılan metal iyonları, Alüminyum klorür, magnezyum oksit ve ferrik sodyum tuzudur. En verimli metal iyonu ferrik sodyum tuzu olmuştur. Metal iyonları için TKG'nde pastacılık malzemelerinde kullanılan renklendiricilerde kullanılabilir ibaresi bulunmaktadır. Magnezyum oksit gıda takviyeleri hazırlamada da kullanılmaktadır. Demir oksitler için turuncgillerden elde edilen ürünlerde kontrastı artırmak için ve tütsülenmiş deniz ürünleri üretiminde kullanılır ibaresi bulunmaktadır. Çalışmada siklodekstrinlerden α -siklodekstrin ve β -siklodekstrin kullanılmıştır. Çalışılan bütün kopigmentler içinde en verimli ikisi olmuştur. α -siklodekstrin en verimli olan ajan olmuştur. Gıda endüstrisinde uzun yıllardır pek çok farklı amaçlarla kullanılmıştır. Işık, oksijen ve sıcaklıktan etkilenen bileşenler için iyi birer koruyucudurlar. Beta-siklodekstrin için TKG limit sınırlaması olmadan gıda takviyesi üretiminde kullanılabileceği ibaresi yer almaktadır. Katılan kopigmentasyon ajanlarının konsantrasyonlarının artması stabiliteyi artırmıştır fakat artan konsantrasyon son üründe renk ve kıvam değişikliğine neden olmuştur. 1:20 konsantrasyon sonrası rutin, kuersetin ve ferrik sodyum tuzu içeren örneklerin renkleri değişirken siklodekstrin miktarının artması ile ürün daha yapışkan ve kıvamlı bir hal almıştır. Çalışma sonucunda ısıl işleme dayanıklı farklı amaçlar için kullanılabilecek yüksek antosiyanin içerikli doğal kırmızı ve tonlarında renk maddesi eldesi gerçekleşmiştir. Ticarileşmesi ile ülke ekonomisine katkı sağlayabilecek hammadde olurken; üretiminde kullanılacak bitkinin ıslahı ile de yöre halkına yeni bir gelir imkanı tanınmış olacaktır.

- Aguilera, Y., Mojica, L., Rebollo-Hernanz, M., Berhow, M., de Mejía, E. G., & Martín-Cabrejas, M. A. (2016). Black bean coats: New source of anthocyanins stabilized by β -cyclodextrin copigmentation in a sport beverage. *Food Chemistry*, 212, 561-570.
- Ahmed, H. A. (2015). Synthesis Of Some Novel Benzopyranes Derivatives And Evaluation Their Biological Activity. *Asian J Pharm Clin Res.*, 8(4), 7-12.
- Álvarez, R., Vaz, B., Gronemeyer, H., & de Lera, Á. R. (2014). Functions, Therapeutic Applications, and Synthesis of Retinoids and Carotenoids. *Chem. Rev.*, 114(1), 1-25.
- Aly, A. A., & Hassan, A. A. (2014). Heterocycles from Donor–Acceptor Interactions. A. R. Katritzky içinde, *Advances in Heterocyclic Chemistry* (Cilt 112, s. 145-181). NY: Elsevier.
- Amr, A., & Al- Tamimi, E. (2007). Stability of the crude extracts of Ranunculus asiaticus anthocyanins and their use as food colourants. *International Journal of Food Science and Technology* 2007, 42, 985–991.
- Armenta, S., Garrigues, S., Esteve-Turrillas, F. A., & de la Guardia, M. (2019). Green extraction techniques in green analytical chemistry. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 116, 248-253.
- Asenstorfer, R. E., Glland, P., Tate, M. E., & Jones, G. P. (2003). Charge equilibria and pKa of malvidin-3-glucoside by electrophoresis. *Analytical Biochemistry*, 318(2), 291-299.
- Axon, A., May, F. E., Gaughan, L. E., Williams, F. M., Blain, P. G., & Wright, M. C. (2012). Tartrazine and sunset yellow are xenoestrogens in a new screening assay to identify modulators of human oestrogen receptor transcriptional activity. *Toxicology*, 298(1-3), 40-51.
- Bae, H.-S., Kim, H. J., Kang, J. H., Kudo, R., Hosoya, T., Kumazawa, S., . . . Ahn, M.-R. (2016). Anthocyanin Profile and Antioxidant Activity of Various Berries Cultivated in Korea. *Nat. Prod. Commun.*, 10(6), 963-8.
- Barba, F. J., Zhu, Z., Koubaa, M., Sant'Ana, A. S., & Orlén, V. (2016). Green alternative methods for the extraction of antioxidant bioactive compounds from winery wastes and by-products: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 49, 96-109.
- Basu, A., & Kumar, G. S. (2015). Thermodynamics of the interaction of the food additive tartrazine with serum albumins: A microcalorimetric investigation. *Food Chemistry*(175), 137-142.
- Belwal, T., Singh, G., Jeandet, P., Pandey, A., Giri, L., Ramola, S., . . . Luo, Z. (2020). Anthocyanins, multi-functional natural products of industrial relevance: Recent biotechnological advances. *Biotechnology Advances*, 43, 107600.

- Berman, J., Zorrilla-López, U., Farré, G., Zhu, C., Sandmann, G., Twyman, R. M., . . . Christou, P. (2015). Nutritionally important carotenoids as consumer products. *Phytochemistry Reviews*(14), 727-743.
- Beyer, P., Al-Babili, S., Ye, X., Lucca, P., Schaub, P., Welsch, R., & Potrykus, I. (2002). Golden Rice: Introducing the β -Carotene Biosynthesis Pathway into Rice Endosperm by Genetic Engineering to Defeat Vitamin A Deficiency. *The Journal of Nutrition*(132), 506-510.
- Bimpilas, A., Panagopoulou, M., Tsimogiannis, D., & Oreopoulou, V. (2016). Anthocyanin copigmentation and color of wine: The effect of naturally obtained hydroxycinnamic acids as cofactors. *Food Chemistry*, 197 (Part A), 39-46.
- Bogacz-Radomska, L., & Harasym, J. (2018). β -Carotene—properties and production methods. *Food Quality and Safety*(2), 69-74.
- Bordignon-Luiz, M., Gauche, C., Gris, E., & Falcão, L. (2007). Colour stability of anthocyanins from Isabel grapes (*Vitis labrusca* L.) in model systems. *LWT - Food Science and Technology*, 40(4), 594-599.
- Bouvier, F., Suire, C., Mutterer, J., & Camara, B. (2003). Oxidative remodeling of chromoplast carotenoids: identification of the carotenoid dioxygenase CsCCD and CsZCD genes involved in crocus secondary metabolite biogenesis. *The Plant Cell*, 15(1), 47-62.
- Buchert, J., Koponen, J. M., Suutarinen, M., Mustranta, A., Lille, M., Törrönen, R., & Poutanen, K. (2005). Effect of enzyme- aided pressing on anthocyanin yield and profiles in bilberry and blackcurrant juices. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85(15), 2548-2556.
- Buchweitz, M., Brauch, J., Carle, R., & Kammerer, D. R. (2013). Colour and stability assessment of blue ferric anthocyanin chelates in liquid pectin-stabilised model systems. *Food Chemistry*, 128(2-3), 2026-2035.
- Buchweitz, M., Speth, M., Kammerer, D., & Carle, R. (2013). Stabilisation of strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) anthocyanins. *Food Chemistry*, 141, 2998–3006.
- Buldini, P. L., Ricci, L., & Sharma, J. L. (2002). Recent applications of sample preparation techniques in food analysis. *Journal of Chromatography A*, 975(1), 47-70.
- Cabrita, L., Fossen, T., & Andersen, Ø. M. (2000). Colour and stability of the six common anthocyanidin 3-glucosides in aqueous solutions. *Food Chemistry*, 68(1), 101-107.
- Cacace, J., & Mazza, G. (2006). Optimization of Extraction of Anthocyanins from Black Currants with Aqueous Ethanol. *Journal of Food Science*, 68(1), 240-248.

- Carlos, C., Ana, S., & Fiszman, S. M. (2001). Influence of colour intensity on the perception of colour and sweetness in various fruit-flavoured yoghurts. *European Food Research and Technology*, 213, 99–103.
- Carlsen, C., & Stapelfeldt, H. (1997). Light sensitivity of elderberry extract. quantum yields for photodegradation in aqueous solution. *Food Chemistry*, 60(3), 383-387.
- Carocho, M., Barreiro, M. F., Morales, P., & Ferreira, I. C. (2014). Adding Molecules to Food, Pros and Cons: A Review on Synthetic and Natural Food Additives. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13(4), 377-399.
- Cassol, L., Rodrigues, E., & Zapata Noreña, C. P. (2019). Extracting phenolic compounds from Hibiscus sabdariffa L. calyx using microwave assisted extraction. *Ind. Crops Prod.*, 133, 168-177.
- Castañeda-Ovando, A., Pacheco-Hernández, M. d., Páez-Hernández, M. E., Rodríguez, J. A., & Galán-Vidal, C. A. (2009). Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food Chemistry*, 113(4), 859-871.
- Cevallos-Casals, B. A., & Cisneros-Zevallos, L. (2004). Stability of anthocyanin-based aqueous extracts of Andean purple corn and red-fleshed sweet potato compared to synthetic and natural colorants. *Food Chemistry*, 86(1), 69-77.
- Chalermchat, Y., Fincan, M., & Dejmek, P. (2004). Pulsed electric field treatment for solid–liquid extraction of red beetroot pigment: mathematical modelling of mass transfer. *Journal of Food Engineering*, 64(2), 229-236.
- Chang, C.-C., Yang, M.-H., Wen, H.-M., & Chern, J.-C. (2002). Estimation of Total Flavonoid Content in Propolis by Two Complementary Colorimetric Methods. *Journal of Food and Drug Analysis*, 10(3), 178-182.
- Charles, S., C. A., Maya U., S., & Zampini, M. (2010). Does Food Color Influence Taste and Flavor Perception in Humans? *Chemosensory Perception*, 3(1), 68–84.
- Chaturvedi, K., & Yadav, S. K. (2019). Ultrasonication assisted salt-spices impregnation in black carrots to attain anthocyanins stability, quality retention and antimicrobial efficacy on hot-air convective drying. *Ultrasonics Sonochemistry*, 58, 104661.
- Chen, M., Zhao, Y., & Yu, S. (2015). Optimisation of ultrasonic-assisted extraction of phenolic compounds, antioxidants, and anthocyanins from sugar beet molasses. *Food Chemistry*, 172(1), 543-550.
- Cooper-Driver, G. A. (2001). Contributions of Jeffrey Harborne and co-workers to the study of anthocyanins. *Phytochemistry*, 56(3), 229-236.
- Corradini, E., Foglia, P., Giansanti, P., Gubbiotti, R., Samperi, R., & Lagana, A. (2011). Flavonoids: Chemical properties and analytical methodologies of identification and quantitation in foods and plants. *Natural Product Research*, 25(5), 469-95.

- Corrales, M., Toepfl, S., Butz, P., Knorr, D., & Tauscher, B. (2008). Extraction of anthocyanins from grape by-products assisted by ultrasonics, high hydrostatic pressure or pulsed electric fields: A comparison. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 9(1), 85-91.
- Cortez, R., Luna- Vital, D. A., Margulis, D., & Gonzalez de Mejia, E. (2017). Natural Pigments: Stabilization Methods of Anthocyanins for Food Applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 16, 180-198.
- Cosmulescu, S., Trandafir, I., & Nour, V. (2017). Phenolic acids and flavonoids profiles of extracts from edible wild fruits and their antioxidant properties. *International Journal of Food Properties*, 20(12), 3124-3134.
- Costa, E., Cosme, F., Jordão, A. M., & Mendes-Faia, A. (2014). Anthocyanin profile and antioxidant activity from 24 grape varieties cultivated in two Portuguese wine regions. *Journal international des sciences de la vigne et du vin*, 48(1), 51-62.
- Cunha, S., Barrado, A., Faria, M., & Fernandes, J. (2011). Assessment of 4-(5-)methylimidazole in soft drinks and dark beer. *Journal of Food Composition and Analysis*, 24(4-5), 609-614.
- Cynthia N., D., Armand V., C., & Maller, O. (1980). Effects Of Colorants And Flavorants On Identification, Perceived Flavor Intensity, And Hedonic Quality Of Fruit- Flavored Beverages And Cake. *Journal of Food Science*, 1393-1399.
- de Mejia, E. G., Zhang, Q., Penta, K., Eroglu, A., & Lila, M. A. (2020). The Colors of Health: Chemistry, Bioactivity, and Market Demand for Colorful Foods and Natural Food Sources of Colorants. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.*, 11, 145-182.
- de Moura, S. C., Berling, C. L., Germer, S. P., Alvim, I. D., & Hubinger, M. D. (2018). Encapsulating anthocyanins from Hibiscus sabdariffa L. calyces by ionic gelation: Pigment stability during storage of microparticles. *Food Chemistry*, 241, 317-327.
- Delgado-Vargas, F., Jiménez, A. R., & Paredes-López, O. (2000). Natural pigments: carotenoids, anthocyanins, and betalains—characteristics, biosynthesis, processing, and stability. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 40(3), 173-289.
- Develi Işıklı, N., & Yılmaz, İ. (2014). Some physical properties of sun-dried Berberis fruit (Berberis crataegina). *Journal of Food Science and Technology*, 51, 104–110.
- Di Meo, F., Sancho Garcia, J. C., Dangles, O., & Trouillas, P. (2012). Highlights on Anthocyanin Pigmentation and Copigmentation: A Matter of Flavonoid π -Stacking Complexation To Be Described by DFT-D. *J. Chem. Theory Comput.*, 8(6), 2034–2043.

- Dominique, V., Wendy V., P., Dominique, P., Claire, G., & Jordi, B. (2016). Colour as a driver of Pinot noir wine quality judgments: An investigation involving French and New Zealand wine professionals. *Food Quality and Preference*, 48, Part A, 251-261.
- Downham, A., & Collins, P. (2000). Colouring our foods in the last and next millennium. *International Journal of Food Science and Technology*(35), 5-22.
- Duringa, A., & Harrison, E. H. (2005). An in vitro model to study the intestinal absorption of carotenoids. *Food Research International*, 38(8-9), 1001-1008.
- Dwivedi, K., & Kumar, G. (2015). Genetic Damage Induced by a Food Coloring Dye (Sunset Yellow) on Meristematic Cells of *Brassica campestris* L. *J. Environ. Public Health*, 319727.
- EFSA, P. o. (2009a). Scientific opinion on the re-evaluation Tartrazine (E 102). *EFSA Journal*(7), 52.
- EFSA, P. o. (2009b). Scientific Opinion on the re- evaluation of Quinoline Yellow (E 104) as a food additive. *EFSA Journal*, 7(11), 1329.
- EFSA, P. o. (2009c). Scientific opinion on the re-evaluation of Sunset Yellow FCF (E 110) as a food additive on request from the European Commission. *EFSA Journal*(7), 44.
- EFSA, P. o. (2009d). Scientific opinion on the reevaluation of Ponceau 4R (E 124) as a food additive on request from the European Commission. *EFSA Journal*(7), 39.
- Eiro, M. J., & Heinonen, M. (2002). Anthocyanin Color Behavior and Stability during Storage: Effect of Intermolecular Copigmentation. *J. Agric. Food Chem.*, 50(25), 7461–7466.
- Ellison, S. (2016). Carotenoids: Physiology. B. Caballero, P. M. Finglas, & F. Toldrá içinde, *Encyclopedia of Food and Health* (s. 670-675). NY: Elsevier.
- Ersus, S., & Yurdagel, U. (2007). Microencapsulation of anthocyanin pigments of black carrot (*Daucus carota* L.) by spray drier. *Journal of Food Engineering*, 80(3), 805-812.
- Escribano-Bailón, M. T., Santos-Buelga, C., & Rivas-Gonzalo, J. C. (2004). Anthocyanins in cereals. *Journal of Chromatography A*, 1054(1-2), 129-141.
- Eshtiaghi, M. N., & Knorr, D. (2000). Anwendung elektrischer Hochspannungsimpulse zum Zellaufschluss bei der Saftgewinnung am Beispiel von Weintrauben. *LVT*, 45(1), 23-27.
- Eskilsson, C. S., & Björklund, E. (2000). Analytical-scale microwave-assisted extraction. *Journal of Chromatography A*, 902(1), 227-250.
- Fan, L. W., Xie, P., Zhang, L., Li, Y., & Zhou, J. (2019). Copigmentation effects of phenolics on color enhancement and stability of blackberry wine residue anthocyanins: Chromaticity, kinetics and structural simulation. *Food Chemistry*, 275, 299-308.

- Fazelia, M., Tofighia, H., Samadia, N., & Jamalifar, H. (2006). Effects of salinity on β -carotene production by *Dunaliella tertiolecta* DCCBC26 isolated from the Urmia salt lake, north of Iran. *Bioresource Technology*, 97(18), 2453-2456.
- Feketea, G., & Tsabouri, S. (2017). Common food colorants and allergic reactions in children: Myth or reality? *Food Chemistry*(230), 578-588.
- Fernandes, A., Rocha, M. A., Santos, L. M., Brás, J., Oliveira, J., Mateus, N., & de Freitas, V. (2018). Blackberry anthocyanins: β -Cyclodextrin fortification for thermal and gastrointestinal stabilization. *Food Chemistry*, 245, 426-431.
- Fernández-López, J. A., Angosto, J. M., Giménez, P. J., & León, G. (2013). Thermal stability of selected natural red extracts used as food colorants. *Plant Foods Hum Nutr*, 68(1), 11-17.
- Ferrari, G., Maresca, P., & Ciccarone, R. (2011). The Effects of High Hydrostatic Pressure on the Polyphenols and Anthocyanins in Red Fruit Products. *Procedia Food Science*, 1, 847-853.
- Figueiredo, P., George, F., Tatsuzawa, F., Toki, K., Saito, N., & Brouillard, R. (1999). New features of intramolecular copigmentation byacylated anthocyanins. *Phytochemistry*, 51(1), 125-132.
- Fincan, M., DeVito, F., & Dejmek, P. (2004). Pulsed electric field treatment for solid–liquid extraction of red beetroot pigment. *Journal of Food Engineering*, 64(3), 381-388.
- Fleschhut, J., Kratzer, F., Rechkemmer, G., & Kulling, S. E. (2006). Stability and biotransformation of various dietary anthocyanins in vitro. *Eur J Nutr.*, 45(1), 7-18.
- Flores, F. P., Singh, R. K., & Kong, F. (2014). Physical and storage properties of spray-dried blueberry pomace extract with whey protein isolate as wall material. *Journal of Food Engineering*, 137, 1-6.
- Fossen, T., Cabrita, L., & Andersen, O. M. (1998). Colour and stability of pure anthocyanins influenced by pH including the alkaline region. *Food Chemistry*, 63(4), 435-440.
- Francesco, F., Giulio, P., & Raffaella Ida, R. (2016). Food color is in the eye of the beholder: the role of human trichromatic vision in food evaluation. *Scientific Reports*, 6, 1-6.
- Fратиanni, A., Cinquanta, L., & Panfili, G. (2010). Degradation of carotenoids in orange juice during microwave heating. *LWT - Food Science and Technology*(43), 867-871.
- Gachovska, T., Cassada, D., Subbiah, J., Hanna, M., Thippareddi, H., & Snow, D. (2010). Enhanced anthocyanin extraction from red cabbage using pulsed electric field processing. *J Food Sci*, 75(6), E323-326.
- Galanakis, C. M. (2012). Recovery of high added-value components from food wastes: Conventional, emerging technologies and commercialized applications. *Trends in Food Science & Technology*, 26(2), 68-87.

- Galván D'Alessandro, L., Dimitrov, K., Vauchel, P., & Nikov, I. (2014). Kinetics of ultrasound assisted extraction of anthocyanins from *Aronia melanocarpa* (black chokeberry) wastes. *Chemical Engineering Research and Design*, 92(10), 1818-1826.
- Gao, Y., Li, C., Shen, J., Yin, H., An, X., & Jin, H. (2011). Effect of food azo dye tartrazine on learning and memory functions in mice and rats, and the possible mechanisms involved. *Journal of Food Science*, 76(6), 125-129.
- Garcia, A. F., Butz, P., & Tauscher, B. (2001). Effects of High- pressure Processing on Carotenoid Extractability, Antioxidant Activity, Glucose Diffusion, and Water Binding of Tomato Puree (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Journal of Food Science*, 66(7), 1033-8.
- Garofulić, I. E., Dragović-Uzelac, V., Režek Jambrak, A., & Jukić, M. (2013). The effect of microwave assisted extraction on the isolation of anthocyanins and phenolic acids from sour cherry Marasca (*Prunus cerasus* var. Marasca). *Journal of Food Engineering*, 117(4), 437-442.
- Ghafoor, K., Park, J., & Choi, Y.-H. (2010). Optimization of supercritical fluid extraction of bioactive compounds from grape (*Vitis labrusca* B.) peel by using response surface methodology. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 11(3), 485-490.
- Golmohamadi, A., Möller, G., Powers, J., & Nindo, C. (2013). Effect of ultrasound frequency on antioxidant activity, total phenolic and anthocyanin content of red raspberry puree. *Ultrasonics Sonochemistry*, 20(5), 1316-1323.
- González-Paramás, A. M., Ayuda-Durán, B., Martínez, S., González-Manzano, S., & Santos-Buelga, C. (2019). The Mechanisms Behind the Biological Activity of Flavonoids. *Current Medicinal Chemistry*, 26(39), 6976-6990.
- Gordillo, B., Sigurdson, G. T., Lao, F., González-Miret, M. L., Heredia, F. J., & Giusti, M. M. (2018). Assessment of the color modulation and stability of naturally copigmented anthocyanin-grape colorants with different levels of purification. *Food Research International*, 106, 791-799.
- Gras, C. C., Bogner, H., Carle, R., & Schweiggert, R. M. (2016). Effect of genuine non-anthocyanin phenolics and chlorogenic acid on color and stability of black carrot (*Daucus carota* ssp. *sativus* var. *atrorubens* Alef.) anthocyanins. *Food Research International*, 85, 291-300.
- Gras, C. C., Nemetz, N., Carle, R., & Schweiggert, R. M. (2017). Anthocyanins from purple sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) and their color modulation by the addition of phenolic acids and food-grade phenolic plant extracts. *Food Chemistry*, 235, 265-274.
- Guan, Y., & Zhong, Q. (2015). The improved thermal stability of anthocyanins at pH 5.0 by gum. *LWT - Food Science and Technology*, 64, 706-712.
- Guerrero, J., Ciampi, L., Castilla, A., Medel, F., Schalchli, H., & Hormazabal, E. .. (2010). Antioxidant capacity, anthocyanins, and total phenols of wild and

- cultivated berries in Chile. *Chilean Journal of Agricultural Research*, 70(4), 537-544.
- Guldiken, B., Gibis, M., Boyacioglu, D., Capanoglu, E., & Weiss, J. (2017). Impact of liposomal encapsulation on degradation of anthocyanins of black carrot extract by adding ascorbic acid. *Food & Function*, 8(3), 1085-1093.
- Havsteen, B. H. (2002). The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology & Therapeutics*, 96(2-3), 67-202.
- He, J., & Giusti, M. M. (2010). Anthocyanins: Natural Colorants with Health-Promoting Properties. *Annual Review of Food Science and Technology*, 1, 163-187.
- He, Y., Wen, L., Yua, H., Zheng, F., Wang, Z., Xu, X., . . . Hao, J. (2018). Effects of high hydrostatic pressure-assisted organic acids on the copigmentation of *Vitis amurensis* Rupr anthocyanins. *Food Chemistry*, 268, 15-26.
- He, Z., Xu, M., Zeng, M., Qin, F., & Chen, J. (2016). Interactions of milk α - and β -casein with malvidin-3-O-glucoside and their effects on the stability of grape skin anthocyanin extracts. *Food Chemistry*, 199, 314–322.
- Heinonen, J., Farahmandazad, H., Vuorinen, A., Kallio, H., Yang, B., & Sainio, T. (2016). Extraction and purification of anthocyanins from purple-fleshed potato. *Food and Bioprocess Processing*, 99, 136-146.
- Hernández-Herrero, J., & Frutos, M. (2015). Influence of rutin and ascorbic acid in colour, plum anthocyanins and antioxidant capacity stability in model juices. *Food Chemistry*, 173, 495-500.
- Howard, L. R., Brownmiller, C., & Prior, R. L. (2014). Improved color and anthocyanin retention in strawberry puree by oxygen exclusion. *Journal of Berry Research*, 4(2), 107-11.
- Howard, L. R., Brownmiller, C., Prior, R. L., & Mauromoustakos, A. (2013). Improved Stability of Chokeberry Juice Anthocyanins by β -Cyclodextrin Addition and Refrigeration. *J. Agric. Food Chem.*, 63(1), 693–699.
- Hua, Z., Yuesheng, D., Ge, X., Menglu, L., Liya, D., LiJia, A., & Zhilong, X. (2013). Extraction and purification of anthocyanins from the fruit residues of *Vaccinium uliginosum* Linn. *J Chromatogr Sep Tech*, 4(2), 167-71.
- Huang, W.-y., Zhang, H.-c., Liu, W.-x., & Li, C.-y. (2012). Survey of antioxidant capacity and phenolic composition of blueberry, blackberry, and strawberry in Nanjing. *J. Zhejiang Univ. Sci. B.*, 13(2), 94–102.
- Jennings, A. S., Schwartz, S. L., Balter, N. J., Gardner, D., & Witorsch, R. J. (1990). Effects of oral erythrosine (2' ,4' ,5' ,7' -tetraiodofluorescein) on the pituitary-thyroid axis in rats. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 103(3), 549-556.
- Jindal, A., Pathengay, A., Mithal, K., Chhablani, J., Pappuru, R. R., & Flynn Jr, H. W. (2014). Macular toxicity following Brilliant Blue G-assisted macular hole surgery – a report of three cases. *Nepal J. Ophthalmol.*(6), 98-101.

- Jun, X. (2013). High-Pressure Processing as Emergent Technology for the Extraction of Bioactive Ingredients From Plant Materials. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 53, 837-852.
- Kahn, B. E., & Brian, W. (2004). The Influence of Assortment Structure on Perceived Variety and Consumption Quantities. *Journal of Consumer Research*, Volume 30, 519–533.
- Kammerer, D. R., Claus, A., Schieber, A., Carle, R., & Carle, R. (2005). A novel process for the recovery of polyphenols from grape (*Vitis vinifera* L.) pomace. *Journal of Food Science*, 70, C157-C163.
- Kang, Y. J., Jung, S. W., & Lee, S. J. (2014). An optimal extraction solvent and purification adsorbent to produce anthocyanins from black rice (*Oryza sativa* cv. Heugjinjubyeo). *Food Science and Biotechnology*, 23, 97–106.
- Kang, Y.-R., Park, J., Jung, S. K., & Chang, Y. H. (2018). Synthesis, characterization, and functional properties of chlorophylls, pheophytins, and Zn-pheophytins. *Food Chemistry*, 245, 943-950.
- Katsampa, P., Valsamedou, E., Grigorakis, S., & Makris, D. P. (2015). A green ultrasound-assisted extraction process for the recovery of antioxidant polyphenols and pigments from onion solid wastes using Box–Behnken experimental design and kinetics. *Industrial Crops and Products*, 77, 535-543.
- Khan, M. I. (2016). Plant Betalains: Safety, Antioxidant Activity, Clinical Efficacy, and Bioavailability. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.*, 15(2), 316-330.
- Khan, M. K., Abert-Vian, M., Fabiano-Tixier, A.-S., Dangles, O., & Chemat, F. (2010). Ultrasound-assisted extraction of polyphenols (flavanone glycosides) from orange (*Citrus sinensis* L.) peel. *Food Chem.*, 119(2), 851–858.
- Khoo, H. E., Azlan, A., Tang, S. T., & Lim, S. M. (2017). Anthocyanidins and anthocyanins: colored pigments as food, pharmaceutical ingredients, and the potential health benefits. *Food Nutr Res*, 61(1), 1361779.
- Kim, D.-O., Lee, K. W., Lee, H. J., & Lee, C. Y. (2002). Vitamin C Equivalent Antioxidant Capacity (VCEAC) of Phenolic Phytochemicals. *J. Agric. Food Chem.*, 50(13), 3713–3717.
- Kirca, A., Özkan, M., & Cemeroglu, B. (2007). Thermal Stability Of Black Carrot Anthocyanins In Blond Orange Juice. *Journal of Food Quality*, 26(5), 361-366.
- Kirca, A., Özkan, M., & Cemeroglu, B. (2006). Stability of black carrot anthocyanins in various fruit juices and nectars. *Food Chemistry*, 97(4), 598-605.
- Kong, J.-M., Chia, Lian-Sai, Goh, N.-K., Chia, T.-F., & Brouillard, R. (2003). Analysis and biological activities of anthocyanins. *Phytochemistry*, 64(5), 923-933.
- Kong, K. W., Khoo, H. E., Eng, K. H., Nagendra PrasadK. Prasad, N., Ismail, A., Tan, C.-P., & Rajab, N. F. (2010). Revealing the Power of the Natural Red Pigment Lycopene. *Molecules*, 15(2), 959-987.

- Kopjar, M., Piližota, V., Šubarić, D., & Babić, J. (2009). Prevention of thermal degradation of red currant juice anthocyanins by phenolic compounds addition. *Croat. J. Food Sci. Technol.*, 1(1), 24-30.
- Kumar, M., Dahuja, A., Sachdev, A., Kaur, C., Varghese, E., Saha, S., & Sairam, K. (2019). Evaluation of enzyme and microwave-assisted conditions on extraction of anthocyanins and total phenolics from black soybean (*Glycine max* L.) seed coat. *International Journal of Biological Macromolecules*, 135, 1070-1081.
- Kus, E., & Eroğlu, H. E. (2015). Genotoxic and cytotoxic effects of Sunset Yellow and Brilliant Blue, colorant food additives, on human blood lymphocytes. *Pakistan journal of pharmaceutical sciences*, 28, 227-230.
- Lambert, S. G., Asenstorfer, R. E., Williamson, N. M., Iland, P. G., & Jones, G. P. (2011). Copigmentation between malvidin-3-glucoside and some wine constituents and its importance to colour expression in red wine. *Food Chemistry*, 125(1), 106-115.
- Landbo, A., & Meyer, A. S. (2001). Enzyme-assisted extraction of antioxidative phenols from black currant juice press residues (*Ribes nigrum*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(2001), 3169-3177.
- Larkin, R. M. (2016). Tetrapyrrole Signaling in Plants. *Front. Plant Sci.*, 7, 1586.
- Layer, G., Jahn, D., Deery, E., Lawrence, A. D., & Warren, M. J. (2010). Biosynthesis of Heme and Vitamin B12. H.-W. (. Liu, & L. Mander içinde, *Comprehensive Natural Products II* (s. 445-499). NY: Elsevier.
- Layer, G., Jahn, D., Deery, E., Lawrence, A. D., & Warren, M. J. (2010). Biosynthesis of Heme and Vitamin B12. H.-W. Liu, & L. Mander içinde, *Comprehensive Natural Products II* (s. 445-499). NY: Elsevier.
- Lee, J., & Wrolstad, R. E. (2004). Extraction of anthocyanins and polyphenolics from blueberry processing waste. *Journal of Food Science*, 69, C564-C573.
- Lee, J., W Durst, R., & Wrolstad, R. E. (2005). Determination of Total Monomeric Anthocyanin Pigment Content of Fruit Juices, Beverages, Natural Colorants, and Wines by the pH Differential Method: Collaborative Study. *Journal of AOAC International*, 88(5), 1269–1278.
- Levy, L. W., & Rivadeneira, D. M. (2000). Anatto. G. Lauro, & F. Francis içinde, *Natural food colorants: science and technology* (s. 115-152). NY: Marcel Dekker.
- Li, X., Chen, F., Li, S., Ji, J., Gu, H., & Yang, L. (2016). An efficient homogenate-microwave-assisted extraction of flavonols and anthocyanins from blackcurrant marc: Optimization using combination of Plackett-Burman design and Box-Behnken design. *Industrial Crops and Products*, 94, 834-847.
- Li, X.-d., Li, J., Wang, M., & Jiang, H. (2016). Copigmentation effects and thermal degradation kinetics of purple sweet potato anthocyanins with metal ions and sugars. *Applied Biological Chemistry*, 59(1), 15-24.

- Liaqid, A., Guerrero, R. F., Cantos, E., Palma, M., & Barroso, C. G. (2011). Microwave assisted extraction of anthocyanins from grape skins. *Food Chem.*, *124*, 1238-1243.
- Liu, Y., Liu, Y., Tao, C., Liu, M., Pan, Y., & Lv, Z. (2018). Effect of temperature and pH on stability of anthocyanin obtained from blueberry. *Journal of Food Measurement and Characterization*, *12*, 1744–1753.
- López, N., Puértolas, E., Condón, S., Raso, J., & Alvarez, I. (2015). Enhancement of the extraction of betanine from red beetroot by pulsed electric fields. *Journal of Food Engineering*, *90*(1), 60-66.
- Lorenzo, J. M., Pateiro, M., Domínguez, R., Barba, F. J., Putnik, P., Kovačević, D. B., . . . Franco, D. (2018). Berries extracts as natural antioxidants in meat products: A review. *Food Research International*, *106*, 1095-1104.
- Low, A., McEwan, J., Karanam, S., North, J., & Kong, K. (2016). Anaesthesia-associated hypersensitivity reactions: Seven years' data from a British bi-specialty clinic. *Anaesthesia*, *70*(1), 76-84.
- Luzardo-Ocampo, I., Ramírez-Jiménez, A. K., Yañez, J., & Mojica, L. (2021). Technological Applications of Natural Colorants in Food Systems: A Review. *Foods*, *10*, 634.
- Maccarone, E., Maccarrone, A., & Rapisarda, P. (1985). Stabilization of anthocyanins of blood orange fruit juice. *Journal of Food Science*, *50*(4), 901-904.
- Macioszek, V. K., & Kononowicz, A. K. (2004). The evaluation of the genotoxicity of two commonly used food colors: Quinoline Yellow (E 104) and Brilliant Black BN (E 151). *Cell Mol. Biol. Lett.*(9), 107-122.
- Mane, S., Bremner, D. H., Tziboula-Clarke, A., & Lemos, M. A. (2015). Effect of ultrasound on the extraction of total anthocyanins from Purple Majesty potato. *Ultrasonics Sonochemistry*, *27*, 509-514.
- Manish, K., M P, V., & T M Pramod, K. (2017). Colourants and Additives: Existing and Emerging Safety Concerns. *International Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, *9*(7), 525-533.
- Marchal, L., Mojaat-Guemir, M., Foucault, A., & Pruvost, J. (2013). Centrifugal partition extraction of β -carotene from *Dunaliella salina* for efficient and biocompatible recovery of metabolites. *Bioresource Technology*, *134*, 396-400.
- Martins, N., Roriz, C. L., Morales, P., Barros, L., & Ferreira, I. C. (2016). Food colorants: Challenges, opportunities and current desires of agro-industries to ensure consumer expectations and regulatory practices. *Trends in Food Science & Technology*(52), 1-15.
- Masone, D., & Chanforan, C. (2015). Study on the interaction of artificial and natural food colorants with human serum albumin: A computational point of view. *Computational Biology and Chemistry*(56), 152-158.

- Mattioli, R., Francioso, A., Mosca, L., & Silva, P. (2020). Anthocyanins: A Comprehensive Review of Their Chemical Properties and Health Effects on Cardiovascular and Neurodegenerative Diseases. *Molecules*, 25(17), 3809.
- Maylinda, E. V., Rinadi, A., Putri, E. A., Fadillah, G., & Wayuningsih, S. (2019). Color Stability of Anthocyanins Copigmentation from Red Rice (*Oryza sativa* L.) Bran by Spectrophotometry UV-Vis. *In IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 578, s. 012001.
- Mazaria, A. M., Hegazy, U. M., & Mannervik, B. (2015). Identification of new inhibitors for human hematopoietic prostaglandin D2 synthase among FDA-approved drugs and other compounds. *Chemico-Biological Interactions*, 229, 91-99.
- McCann, D., Barrett, A., Cooper, A., Crumpler, D., Dalen, L., Grimshaw, K., . . . Stevenson, J. (2007). Food additives and hyperactive behaviour in 3-year-old and 8/9-year-old children in the community: a randomised, double-blinded, placebo-controlled trial. *The Lancet*, 370(9598), 1560-1567.
- Michalina, O.-S., & Christopher T., E. (2017). Food colors: Existing and emerging food safety concerns. *Crit Rev Food Sci Nutr.*, 57(3), 524-548.
- Mikulic-Petkovsek, M., Schmitzer, V., Slatnar, A., Todorovic, B., Veberic, R., Stampar, F., & Ivancic, A. (2014). Investigation of Anthocyanin Profile of Four Elderberry Species and Interspecific Hybrids. *J. Agric. Food Chem.* 2014, 62(24), 5573–5580.
- Mourtzinou, I., Makris, D. P., Yannakopoulou, K., Kalogeropoulos, N., Michali, I., & Karathanos, V. T. (2008). Thermal Stability of Anthocyanin Extract of *Hibiscus sabdariffa* L. in the Presence of β -Cyclodextrin. *J. Agric. Food Chem.*, 56(21), 10303–10310.
- Mpountoukas, P., Pantazaki, A., Kostareli, E., Christodoulou, P., Kareli, D., Poliliou, S., . . . Lialiaris, T. (2010). Cytogenetic evaluation and DNA interaction studies of the food colorants amaranth, erythrosine and tartrazine. *Food and Chemical Toxicology*, 48(10), 2934-2944.
- Müller-Maatsch, J., Gurtner, K., Carle, R., & Steingass, C. B. (2019). Investigation into the removal of glucosinolates and volatiles from anthocyanin-rich extracts of red cabbage. *Food Chemistry*, 278, 406-414.
- Myers, R. H., Montgomery, D. C., & Anderson-Cook, C. M. (2016). *Response Surface Methodology: Process and Product Optimization Using Designed Experiments*. NY: John Wiley & Sons.
- Napoleon, A. A., Swetha, S., & Angajala, G. (2013). In-vitro anti oxidant and anti bacterial studies of betacyanin isolated from the bracts of *Bougainvillea glabra*. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 5(4), 85-87.
- Natália, M., Custódio Lobo, R., Patricia, M., Lillian, B., & Isabel C.F.R., F. (2016). Food colorants: Challenges, opportunities and current desires of agro-industries to ensure consumer expectations and regulatory practices. *Trends in Food Science & Technology*(52), 1-15.

- Nayane Aparecida Araújo, D., Suzana Borges, L., Lucilene Soares, M., & Ivy Scorzi Cazelli, P. (2012). Influence of color on acceptance and identification of flavor of foods by adults. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 32(2), 296-301.
- Oancea, S., Grosu, C., Otto, K., & Stoia, M. (2013). Conventional and ultrasound-assisted extraction of anthocyanins from blackberry and sweet cherry cultivars. *Acta Chim. Slov.*, 60(2), 383–389.
- Odabaş, H. İ., & Koca, I. (2021). Simultaneous separation and preliminary purification of anthocyanins from *Rosa pimpinellifolia* L. fruits by microwave assisted aqueous two-phase extraction. *Food and Bioprocesses Processing*, 125, 170-180.
- Oka, H., Ozeki, N., Hayashi, T., & Itakura, Y. (2007). Analysis of Natural Colorings in Foods by Thin Layer Chromatography. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 30(14), 2021-2036.
- Okafor, S. N., Obonga, W., Ezeokonkwo, M. A., Nurudeen, J., Orovwigho, U., & Ahiabuike, J. (2016). Assessment of the Health implications of Synthetic and Natural Food Colourants –A Critical Review. *UK Journal of Pharmaceutical and Biosciences*, 4(4), 1-11.
- Ongkowijoyo, P., Luna-Vital, D. A., & Gonzalez de Mejia, E. (2018). Extraction techniques and analysis of anthocyanins from food sources by mass spectrometry: An update. *Food Chemistry*, 250, 113-126.
- Osman, M. Y., Sharaf, I. A., El-Rehim, W. M., & ElSharkawi, A. M. (2016). Synthetic organic hard capsule colouring agents: in vitro effect on human true and pseudo-cholinesterases. *British Journal of Biomedical Science*(59), 212-217.
- Paes, J., Dotta, R., Barbero, G. F., & Martínez, J. (2014). Extraction of phenolic compounds and anthocyanins from blueberry (*Vaccinium myrtillus* L.) residues using supercritical CO₂ and pressurized liquids. *The Journal of Supercritical Fluids*, 95, 8-16.
- Pan, Y.-Z., Guan, Y., Wei, Z.-F., Peng, X., Li, T.-T., Qi, X.-L., . . . Fu, Y.-J. (2014). Flavonoid C-glycosides from pigeon pea leaves as color and anthocyanin stabilizing agent in blueberry juice. *Industrial Crops and Products*, 58, 142-147.
- Pangestu, N. P., Miyagusuku-Cruzado, G., & Giusti, M. M. (2020). Copigmentation with Chlorogenic and Ferulic Acid Affected Color and Anthocyanin Stability in Model Beverages Colored with *Sambucus peruviana*, *Sambucus nigra*, and *Daucus carota* during Storage. *Foods* 2020, 9(10), 1476.
- Patras, A., Brunton, N. P., O'Donnell, C., & Tiwari, B. (2010). Effect of thermal processing on anthocyanin stability in foods; mechanisms and kinetics of degradation. *Trends in Food Science & Technology*, 21(1), 3-11.
- Pintea, A. (2008). Food colorants derived from natural sources by processing. C. Socaciu içinde, *Food Colorants Chemical and Functional Properties* (s. 329-343). New York: Taylor & Francis Group.

- Piqueras-Fiszman, B., Alcaide, J., Roura, E., & Spence, C. (2012). Is it the plate or is it the food? Assessing the influence of the color (black or white) and shape of the plate on the perception of food placed on it. *Food Quality and Preference*, 205-208.
- Piyush, K., Kuldeep, S., Azizur, R. M., Misbahul, H. S., & Pranay, W. (2018). A Review Of Benzopyran Derivatives In Pharmacotherapy Of Breast Cancer. *Asian J Pharm Clin Res.*, 11(7), 43-46.
- Prior, R. L., & Wu, X. (2006). Anthocyanins: Structural characteristics that result in unique metabolic patterns and biological activities. *Free Radical Research*, 40(10), 1014-1028.
- Puri, M., Sharma, D., & Barrow, C. J. (2012). Enzyme-assisted extraction of bioactives from plants. *Trends in Biotechnology*, 30(1), 37-44.
- Qian, B.-J., Liu, J.-H., Zhao, S.-J., Cai, J.-X., & Jing, P. (2017). The effects of gallic/ferulic/caffeic acids on colour intensification and anthocyanin stability. *Food Chemistry*, 228, 526-532.
- Quan, W., He, W., Qie, X., Chen, Y., Zeng, M., Qin, F., . . . He, Z. (2020). Effects of β -cyclodextrin, whey protein, and soy protein on the thermal and storage stability of anthocyanins obtained from purple-fleshed sweet potatoes. *Food Chemistry*, 320, 126655.
- Rajapaksha, G. K., Wansapala, J. M., & Silva, A. B. (2015). Detection of Synthetic Colours in Selected Foods & Beverages Available in Colombo District, Sri Lanka. *International Journal of Science and Research*, 6(5), 801-808.
- Ratanapoompinyo, J., Nguyen, L. T., Devkota, L., & Shrestha, P. (2017). The effects of selected metal ions on the stability of red cabbage anthocyanins and total phenolic compounds subjected to encapsulation process. *J Food Process Preserv.*, 41(6), e13234.
- Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Donèche, B., & Lonvaud, A. (2006). The microbiology of wine and vinifications. *Handbook of enology*, içinde John Wiley & Sons.
- Riggi, E. (2010). Recent Patents on the Extraction of Carotenoids. *Bentham Science Publishers*, 2(1), 75-82.
- Rivera, S., & Canela-Garayoa, R. (2012). Analytical tools for the analysis of carotenoids in diverse materials. *Journal of Chromatography A*(1224), 1-10.
- Rodriguez-Amaya, D. B. (2019). Betalains. L. Melton, F. Shahidi, & P. Varelis içinde, *Encyclopedia of Food Chemistry* (s. 35-39). NY: Elsevier.
- Roldán-Gutiérrez, J. M., & Dolores Luque de Castro, M. (2007). Lycopene: The need for better methods for characterization and determination. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 26(2), 163-170.
- Rollas, S. (2010). Reduction of aromatic and heteroaromatic azo compounds with hydrazine hydrate. *Marmara Pharmaceutical Journal*(14), 41-46.

- Routray, W., & Orsat, V. (2014). MAE of phenolic compounds from blueberry leaves and comparison with other extraction methods. *Industrial Crops and Products*, 58, 36-45.
- Rustioni, L., Bedgood Jr., D. R., Failla, O., Prenzler, P. D., & Robards, K. (2012). Copigmentation and anti-copigmentation in grape extracts studied by spectrophotometry and post-column-reaction HPLC. *Food Chemistry*, 132(4), 2194-2201.
- Sahin, S., & Sumnu, S. G. (2006). *Physical Properties of Foods*. California: Springer.
- Santos-Buelga, C., & González-Paramás, A. M. (2019). Anthocyanins. L. Melton, F. Shahidi, & P. Varelis içinde, *Encyclopedia of Food Chemistry* (s. 10-21). NY: Elsevier.
- Sariburun, E., Sahin, S., Demir, C., Türkben, C., & Uylaşer, V. (2010). Phenolic content and antioxidant activity of raspberry and blackberry cultivars. *J. Food Sci.*, 75(4), 328-35.
- Sarraf, M., Beig-babaei, A., & Naji-Tabasi, S. (2019). Investigating Functional Properties of Barberry Species: An Overview. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90(12), 5255-5269.
- Savran, A., Bağcı, Y., & Kargıoğlu, M. (2009). Gemerek (Sivas) Ve Çevresindeki Bazı Bitkilerin Yerel Adları Ve Etnobotanik Özellikleri. *Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Ve Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 8(1), 313-321.
- Scotter, M. (2009). The chemistry and analysis of annatto food colouring: a review. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 26(8), 1123-1145.
- Seabra, I. J., Braga, M. E., Batista, M. T., & de Sousa, H. C. (2010). Effect of solvent (CO₂/ethanol/H₂O) on the fractionated enhanced solvent extraction of anthocyanins from elderberry pomace. *The Journal of Supercritical Fluids*, 54(2), 145-152.
- Selvamuthukumar, M., & Shi, J. (2017). Recent advances in extraction of antioxidants from plant by-products processing industries. *Food Quality and Safety*, 1(1), 61-81.
- Sharif, N., Khoshnoudi-Nia, S., & Jafari, S. M. (2020). Nano/microencapsulation of anthocyanins; a systematic review and meta-analysis. *Food Research International*, 132, 109077.
- Shi, J., & Le Maguer, M. (2010). Lycopene in Tomatoes: Chemical and Physical. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 40(1), 1-42.
- Shouqin, Z., & Changzheng, X. J. (2005). High hydrostatic pressure extraction of flavonoids from propolis. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 80(1), 50-54.
- Sigurdson, G. T., & Giusti, M. M. (2014). Bathochromic and Hyperchromic Effects of Aluminum Salt Complexation by Anthocyanins from Edible Sources for Blue Color Development. *J. Agric. Food Chem.*, 62(29), 6955-6965.

- Sigurdson, G. T., Tang, P., & Giusti, M. M. (2017). Natural colorants: Food colorants from natural sources. *Annual Review of Food Science and Technology*(8), 261-280.
- 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.
- Singleton, V. L., & Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *Am J Enol Vitic.*, 16, 144-158.
- Stintzing, F. C., Stintzing, A. S., Carle, R., Frei, B., & Wrolstad, R. E. (2002). Color and Antioxidant Properties of Cyanidin-Based Anthocyanin Pigments. *J. Agric. Food Chem.*, 50(21), 6172–6181.
- Su, F., Xue, J., Yang, X., Deng, H., Meng, Y., & Guo, Y. (2017). Effects of phenolic acids on copigmentation and stability of anthocyanins in red-fleshed apple. *Scientia Agricultura Sinica*, 50(4), 732-742.
- Sun, J., Cao, X., Bai, w., Liao, X., & Hu, X. (2010). Comparative analyses of copigmentation of cyanidin 3-glucoside and cyanidin 3-sophoroside from red raspberry fruits. *Food Chemistry*, 120(4), 1131-1137.
- Supramaniam, G., & Warner, J. (1986). Artificial food additive intolerance in patients with angio-oedema and urticaria. *Lancet*, 2(8512), 907-909.
- Suthanthangjai, W., Kajda, P., & Zabetakis, I. (2005). The effect of high hydrostatic pressure on the anthocyanins of raspberry (*Rubus idaeus*). *Food Chemistry*, 90(1-2), 193-197.
- Swerlick, R. A., & Campbell, C. F. (2013). Medication Dyes as a Source of Drug Allergy. *Journal of Drugs in Dermatology*, 12(1), 99-102.
- Tachibana, N., Kimura, Y., & Ohno, T. (2014). Examination of molecular mechanism for the enhanced thermal stability of anthocyanins by metal cations and polysaccharides. *Food Chemistry*, 143, 452–458.
- Tanaka, T. (2006). Reproductive and neurobehavioural toxicity study of Ponceau 4R administered to mice in the diet. *Food and Chemical Toxicology*, 44(10), 1651-1658.
- Tanaka, Y., Sasaki, N., & Ohmiya, A. (2008). Biosynthesis of plant pigments: anthocyanins, betalains and carotenoids. *Plant Journal*, 54(4), 733-749.
- Teng, H., Lee, W. Y., & Choi, Y. H. (2014). Optimization of ultrasonic-assisted extraction of polyphenols, anthocyanins, and antioxidants from raspberry (*Rubus coreanus* Miq.) using response surface methodology. *Food Anal. Methods*, 7(7), 1536–1545.
- Terefe, N. S., Yang, Y. H., Knoerzer, K., Buckow, R., & Versteeg, C. (2010). High pressure and thermal inactivation kinetics of polyphenol oxidase and

- peroxidase in strawberry puree. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 11(1), 52-60.
- Tiwari, B. K., O' Donnell, C. P., Patras, A., & Cullen, P. J. (2008). Anthocyanin and Ascorbic Acid Degradation in Sonicated Strawberry Juice. *J. Agric. Food Chem.*, 56(21), 10071–10077.
- Tolun, A., Artik, N., & Altintas, Z. (2020). Effect of different microencapsulating materials and relative humidities on storage stability of microencapsulated grape pomace extract. *Food Chemistry*, 302, 125347.
- Toroğlu, S., & Çenet, M. (2006). Tedavi amaçlı kullanılan bazı bitkilerin kullanım alanları ve antimikrobiyal aktivitelerinin belirlenmesi için kullanılan metodlar. *KSÜ. Fen ve Mühendislik Dergisi*, 9(2), 12-19.
- Trouillas, P., Sancho-García, J. C., De Freitas, V., Gierschner, J., Otyepka, M., & Dangles, O. (2016). Stabilizing and Modulating Color by Copigmentation: Insights from Theory and Experiment. *Chem. Rev.*, 116(9), 4937–4982.
- Tsuda, S., Murakami, M., Matsusaka, N., Kano, K., Taniguchi, K., & Sasaki, Y. F. (2001). DNA Damage Induced by Red Food Dyes Orally Administered to Pregnant and Male Mice. *Toxicological Sciences*, 61(1), 92–99.
- Venil, C. K., Zakaria, Z. A., & Ahmad, W. A. (2013). Bacterial pigments and their applications. *Process Biochemistry*, 48(7), 1065-1079.
- Vieira, G. S., Cavalcanti, R. N., Meireles, M. A., & Hubinger, M. D. (2013). Chemical and economic evaluation of natural antioxidant extracts obtained by ultrasound-assisted and agitated bed extraction from jussara pulp (*Euterpe edulis*). *Journal of Food Engineering*, 119(2), 196-204.
- Viera, I., Pérez-Gálvez, A., & Roca, M. (2019). Green Natural Colorants. *Molecules*, 24(1), 154.
- Villaño, D., García-Viguera, C., & Mena, P. (2016). Colors: Health Effects. B. Caballero, P. M. Finglas, & F. Toldrá içinde, *Encyclopedia of Food and Health* (s. 265-272). NY: Elsevier.
- Vinha, A. F., Rodrigues, F., Nunes, M. A., & Oliveira, M. B. (2018). Natural pigments and colorants in foods and beverages. C. M. Galanakis içinde, *Polyphenols: Properties, Recovery, and Applications* (s. 363-391). NY: Elsevier.
- Vojdani, A., & Vojdani, C. (2015). Immune Reactivity to Food Coloring. *ALTERNATIVE THERAPIES*, 21(SUPPL. 1), 1-100.
- Wallace, T. C., & Giusti, M. M. (2015). Anthocyanins. *Advances in Nutrition*, 6(5), 620-622.
- Weber, F., Boch, K., & Schieber, A. (2017). Influence of copigmentation on the stability of spray dried anthocyanins from blackberry. *LWT*, 75, 72-77.
- West, M. E., & Mauer, L. J. (2013). Color and chemical stability of a variety of anthocyanins and ascorbic acid in solution and powder forms. *J Agric Food Chem*, 61(17), 4169-79.

- Wrolstad, R. E., & A Culver, C. (2012). Alternatives to Those Artificial FD&C Food Colorants. *Annual Review of Food Science and Technology*, 3, 59-77.
- Xie, J., Xu, Y., Shishir, M. R., Zheng, X., & Chen, W. (2019). Green extraction of mulberry anthocyanin with improved stability using β -cyclodextrin. *J. Sci. Food Agric.*, 99(5), 2494-2503.
- Xu, H., Liu, X., Yan, Q., Yuan, F., & Gao, Y. (2015). A novel copigment of quercetagenin for stabilization of grape skin anthocyanins. *Food Chemistry*, 166, 50-55.
- Yamashita, C., Chung, M. M., dos Santos, C., Mayer, C. R., Moraes, I. C., & Branco, I. G. (2017). Microencapsulation of an anthocyanin-rich blackberry (*Rubus* spp.) by-product extract by freeze-drying. *LWT - Food Science and Technology*, 84, 256-262.
- Yeşilada, E., & Küpeli, E. (2002). *Berberis crataegina* DC. root exhibits potent anti-inflammatory, analgesic and febrifuge effects in mice and rats. *J Ethnopharmacol.*, 79(2), 237-48.
- Yoshida, K., Kitahara, S., Ito, D., & Kondo, T. (2006). Ferric ions involved in the flower color development of the Himalayan blue poppy, *Meconopsis grandis*. *Phytochemistry*, 67(10), 992-8.
- Zhao, L., Temelli, F., & Chen, L. (2017). Encapsulation of anthocyanin in liposomes using supercritical carbon dioxide: Effects of anthocyanin and sterol concentrations. *Journal of Functional Foods*, 34, 159-167.
- Zhao, Q., Duan, C.-Q., & Wang, J. (2010). Anthocyanins profile of grape berries of *Vitis amurensis*, its hybrids and their wines. *Int. J. Mol. Sci.*, 11(5), 2212-28.
- Zhao, Z., Wu, M., Zhan, Y., Zhan, K., Chang, X. Y., & Li, Z. (2017). Characterization and purification of anthocyanins from black peanut (*Arachis hypogaea* L.) skin by combined column chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1519, 74-82.
- Zhen, L., Xiaoqin, M., Aifen, L., & Chengwu, Z. (2012). A novel potential source of β -carotene: *Eustigmatos* cf. *polyphem* (Eustigmatophyceae) and pilot β -carotene production in bubble column and flat panel photobioreactors. *Bioresource Technology*, 117, 257-263.

TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR

Makaleler

1. Demirci, M., Tomaş, M., Tekin-Çakma, Z. H., Karasu, S. (2021) *Berberis crataegina* DC. as a novel natural food colorant source: ultrasound-assisted extraction optimization using response surface methodology and thermal stability studies. *Food Science and Technology*.

Projeler

1. Stabilitesi Artırılmış Doğal Renk Maddesi, TÜBİTAK 1512-Teknogirişim Sermayesi Desteği (BİGG), 2019, Proje no: 2180700