

T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
KOORDİNASYON BİRİMİ

**ÜZÜM KABUĞUNDAN EKSTRAKTE EDİLEN ANTOSİYANİN BAZLI
RENK MADDELERİNİN BİYOLOJİK ÖZELLİKLERİNİN
BELİRLENMESİ VE BAZI GIDA MADDELERİNDE RENKLENDİRİCİ
OLARAK KULLANIMI**

Proje No: FBD- 08-766

Proje Türü: Doktora

SONUÇ RAPORU

Proje Yürütücüsü:
Prof. Dr. Hasan YETİM
Gıda Mühendisliği Bölümü

Araştırmacılar:
Doç. Dr. Osman SAĞDIÇ Gıda Mühendisliği Bölümü
Araş. Gör. Lutfiye EKİCİ Gıda Mühendisliği Bölümü

Temmuz 2011

KAYSERİ

İÇİNDEKİLER

TABLolar LİSTESİ	Vİİ
ŞEKİLLER LİSTESİ	İX
KISALTMALAR VE SİMGELER	X
ÖZET	Xİİ
ABSTRACT	XİV
1. BÖLÜM.....	1
GİRİŞ.....	1
2. BÖLÜM.....	8
GENEL BİLGİLER	8
2.1. Gıdalarda Renk ve Renklendiriciler	8
2.1.2. Doğala özdeş gıda boyaları.....	11
2.1.3. Doğal Renk Maddeleri.....	11
2.2.3.1. Karmin	12
2.2.3.2. Antosiyaninler	14
2.2.3.2.1. Antosiyanin-sağlık ilişkisi	17
2.2.3.2.2. Antosiyaninlerin antimikrobiyal özellikleri.....	17
2.3. Araştırma Kapsamında Renklendirici Olarak Kullanılan Antosiyanin Kaynağı Üzüm Kabuğu	18
2.4. Antosiyanin Ekstraksiyonunda Kullanılan Farklı Teknik Uygulamaları	20
2.4.1. Klasik ekstraksiyon.....	20
2.4.2. Ultrasonik ekstraksiyon	21
3. BÖLÜM.....	23
MATERYAL VE YÖNTEM.....	23
3.1. Materyal	23
3.1.1. Antosiyanin kaynakları	23
3.1.2. Renklendirilen ürünler	23
3.2. Yöntem	24
3.2.1. Üzüm posalarında yapılan analizler	24
3.2.1.1. Kuru Madde	24
3.2.1.2. Kül miktarı tayini.....	24
3.2.1.3. pH tayini.....	25
3.2.1.4. Titrasyon asitliği tayini.....	25
3.2.1.5. Toplam ve indirgen şeker tayini	25
3.2.2. Antosiyanin pigmentlerinin ekstraksiyonları.....	26
3.2.2.1. Klasik ekstraksiyon uygulamaları.....	26
3.2.2.2. Ultrasonik ekstraksiyon uygulaması	27
3.2.2. Farklı ekstraksiyon yöntemleri ile elde edilen üzüm kabuk ekstraktların bazı biyolojik özelliklerinin belirlenmesi	28
3.2.3.1. Toplam fenolik madde tayini	28
3.2.3.2. Toplam antosiyanin tayini.....	28
3.2.3.3. Antiradikal kapasite tayini.....	29
3.2.3.4. Antioksidan aktivite tayini	30
3.2.3.5. Mikrobiyolojik analizler.....	30
3.2.3.5.1. Agar difüzyon yöntemi ile üzüm kabuğu ekstraktının antimikrobiyal aktivitelerinin belirlenmesi	30
3.2.3.5.2. Üzüm kabuk ekstraktların elma suyunda <i>E. coli</i> O157:H7 ve <i>B.</i> <i>cereus</i> F2 üzerine antimikrobiyal etkisinin saptanması.....	31
3.2.4. Antosiyaninlerin ısıl stabilitelerinin belirlenmesi	32

3.2.4.1. Antosiyaninlerin tampon çözeltilerde ısıl stabilitelerinin belirlenmesi....	32
3.2.4.2. Antosiyaninlerin elma sularında ısıl stabilitelerinin belirlenmesi.....	32
3.2.4.2.1. Kinetik katsayıların hesaplanması.....	33
3.2.4.2.2. Reaksiyon hız sabitinin hesaplanması	33
3.2.4.2.3. Aktivasyon enerjisinin hesaplanması	34
3.2.4.2.4. Yarılanma süresinin ($t_{1/2}$) hesaplanması	34
3.2.5. Renklendirilen gıdalarda yapılan analizler	34
3.2.5.1. Elma Suyu	34
3.2.5.1.1. Titrasyon asitliği tayini	36
3.2.5.1.2. pH tayini	36
3.2.5.1.3. Suda çözünür kuru madde	36
3.2.5.1.4. Toplam fenolik madde tayini.....	36
3.2.5.1.5. Toplam antosiyanin tayini	37
3.2.5.1.6. Antiradikal kapasite tayini	37
3.2.5.1.7. Antioksidan aktivite tayini	37
3.2.5.1.8. Renk tayini	37
3.2.5.1.9. Duyusal analiz.....	38
3.2.5.2. Dondurma	38
3.2.5.2.1. pH tayini	40
3.2.5.2.2. Kuru madde tayini	40
3.2.5.2.3. Kül miktarı tayini	40
3.2.5.2.4. Toplam fenolik madde tayini.....	41
3.2.5.2.5. Antiradikal aktivite tayini	41
3.2.5.2.6. Renk Tayini.....	42
3.2.5.2.7. Duyusal Analiz.....	42
3.2.5.3. Şekerleme	42
3.2.5.3.1. pH analizi	44
3.2.5.3.2. Kuru madde analizi	44
3.2.5.3.3. Kül miktarı tayini	44
3.2.5.3.4. Renk tayini	45
3.2.5.3.5. Duyusal analiz.....	45
3.2.5.4. Çemen.....	45
3.2.5.4.1. pH analizi	46
3.2.5.4.2. Kuru madde analizi.....	46
3.2.5.4.3. Kül miktarı tayini.....	47
3.2.5.4.4. Renk Tayini.....	47
4. BÖLÜM.....	48
ARAŞTIRMA BULGULARI	48
4.1. Materyallerin Nitelikleri.....	48
4.2. Üzüm Kabuğunun Bazı Analitik Özellikleri.....	48
4.3. Farklı Ekstraksiyon Yöntemleri ile Elde Edilen Üzüm Kabuğu Ekstraktlarının Biyoaktif Özelliklerinin Belirlenmesi	49
4.3.1. Farklı ekstraksiyon yöntemleri ile elde edilen üzüm kabuğu ekstraktlarının verimleri.....	50
4.3.2. Farklı ekstraksiyon yöntemleri ile elde edilen üzüm kabuğu ekstraktlarının toplam fenolik madde içerikleri.....	50
4.3.3. Farklı ekstraksiyon yöntemleri ile elde edilen üzüm kabuğu ekstraktlarının antosiyanin miktarları.....	51

4.3.4. Farklı ekstraksiyon yöntemleri ile elde edilen üzüm kabuğu ekstraktlarının antioksidan kapasiteleri	51
4.3.5. Farklı ekstraksiyon yöntemleri ile elde edilen üzüm kabuğu ekstraktlarının antiradikal kapasiteleri	52
4.3.6. Üzüm kabuğu ekstraktlarının antimikrobiyal özellikleri	52
4.3.6.1. Farklı ekstraksiyon yöntemleri ile elde edilen üzüm kabuğu ekstraktlarının antimikrobiyal aktivitelerinin agar difüzyon yöntemi ile belirlenmesi	52
4.3.6.2. Üzüm kabuğu ekstraktlarının elma suyunda <i>E. coli</i> O157:H7 ve <i>B. cereus</i> F2 üzerine antimikrobiyal etkisinin saptanması	55
4.4. Antosiyaninlerin Isıl Stabilitelerinin Belirlenmesi	56
4.4.1. Üzüm kabuğu ekstraktlarının tampon çözeltilerde ısıl stabilitelerinin belirlenmesi.....	56
4.4.2. Üzüm kabuğu ekstraktlarının elma sularında ısıl stabilitelerinin belirlenmesi56	
4.5. Renklendirilen Gıdalar	57
4.5.1. Elma suları.....	58
4.5.1.1. Elma sularının toplam fenolik madde miktarlarında meydana gelen değişimler	58
4.5.1.2. Elma sularının antosiyanin miktarlarında meydana gelen değişimler	59
4.5.1.3. Elma sularının antiradikal aktivitelerinde meydana gelen değişimler	60
4.5.1.4. Elma sularının antioksidan aktivitelerinde meydana gelen değişimler ...	61
4.5.1.5. Elma sularının renginde meydana gelen değişimler	62
4.5.1.6. Elma sularının duyusal olarak değerlendirilmesi	67
4.5.2. Dondurma.....	69
4.5.2.1. Dondurmaların toplam fenolik madde miktarlarında meydana gelen değişimler	70
4.5.2.2. Dondurmaların antiradikal aktivitelerinde meydana gelen değişimler...	70
4.5.2.3. Dondurmaların renginde meydana gelen değişimler	71
4.5.2.4. Dondurmaların duyusal olarak değerlendirilmesi.....	72
4.5.3. Şekerleme.....	73
4.5.3.1. Şekerlemelerin renginde meydana gelen değişimler.....	73
4.5.3.2. Şekerlemelerin duyusal olarak değerlendirilmesi.....	74
4.5.4. Çemen	75
4.5.4.1. Çemenlerin renginde meydana gelen değişimler	76
5. BÖLÜM.....	77
TARTIŞMA VE SONUÇ.....	77
5.1. Üzüm Kabuklarının Bazı Analitik Özellikleri.....	77
5.2. Farklı ekstraksiyon yöntemleri ile elde edilen üzüm kabuğu ekstraktının biyoaktif özelliklerinin belirlenmesi.....	77
5.2.2. Farklı ekstraksiyon yöntemleri ile elde edilen üzüm kabuğu ekstraktının antosiyanin miktarları.....	79
5.2.3. Farklı ekstraksiyon yöntemleri ile elde edilen üzüm kabuğu ekstraktının antioksidan kapasiteleri	80
5.2.4. Farklı ekstraksiyon yöntemleri ile elde edilen üzüm kabuğu ekstraktının antiradikal kapasiteleri	81
5.2.5. Farklı ekstraksiyon yöntemleri ile elde edilen üzüm kabuğu ekstraktlarının antimikrobiyal özellikleri.....	81
5.2.5.1. Farklı ekstraksiyon yöntemleri ile elde edilen üzüm kabuğu ekstraktının agar difüzyon yöntemi ile antimikrobiyal aktivitelerinin belirlenmesi....	81

5.2.5.2. Üzüm kabuğu ekstraktının elma suyunda <i>E. coli</i> O157:H7 ve <i>B. cereus</i> F2 üzerine antimikrobiyal etkisinin saptanması	84
5.3. Antosiyaninlerin ısıl stabilitelerinin belirlenmesi.....	86
5.3.1. Üzüm kabuğu ekstraktının tampon çözeltilerde ısıl stabiliteleri.....	86
5.3.2. Üzüm kabuğu ekstraktının elma sularında ısıl stabiliteleri.....	87
5.4. Renklendirilen Gıdalar	88
5.4.1. Elma Suları.....	88
5.4.1.1. Elma sularının toplam fenolik madde miktarlarında meydana gelen değişim.....	88
5.4.1.2. Elma sularının antosiyanin miktarlarında meydana gelen değişim.....	90
5.4.1.3. Elma sularının antiradikal kapasitelerinde meydana gelen değişim	90
5.4.1.4. Elma sularının renginde meydana gelen değişimler	92
5.4.1.5. Elma sularında meydana gelen duyuşal değişimler	94
5.4.2. Dondurma.....	94
5.4.2.1.Dondurmaların fizikokimyasal özellikleri	94
5.4.2.2. Dondurmaların toplam fenolik madde miktarlarında meydana gelen değişimler	95
5.4.2.3. Dondurmaların antiradikal aktivitelerinde meydana gelen değişimler...	96
5.4.2.4. Dondurmaların renklerinde meydana gelen değişimler.....	97
5.4.2.5. Dondurmaların duyuşal özelliklerinin değeriendirilmesi	99
5.4.3. Şekerleme.....	100
5.4.3.1. Şekerlemelerin renklerinde meydana gelen değişimler	100
5.4.4. Çemen	102
5.4.4.1. Çemen örneklerinin renginde meydana gelen değişimler	102

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2.1. FDA ve Avrupa Birliği tarafından gıdalarda kullanılmasına izin verilen sentetik renk maddeleri [40].	10
Tablo 2.2. Bazı renk maddelerinin sağlık üzerine olan yan etkileri [41].	11
Tablo 2.3. Avrupa Birliği tarafından kullanımına izin verilen doğal kaynaklı boyalar [1]	12
Tablo 2.4. Gıdalarda kullanılan Renklendiriciler Tebliği' ne göre karmin kullanımına izin verilen ürünler ve maksimum kullanım miktarları	14
Tablo 4.1. Kırmızı üzüm kabuğunun bazı analitik özellikleri	48
Tablo 4.2. Farklı ekstraksiyon yöntemleri ile elde edilen ÜKE'lerinin % verimleri	50
Tablo 4.3. Farklı ekstraksiyon yöntemleri ile elde edilen ÜKE'lerinin fenolik madde miktarları (mg GAE/g kuru ekstrakt)	51
Tablo 4.4. Farklı ekstraksiyon yöntemleri ile elde edilen ÜKE'lerinin antosiyanin miktarları (mg siy-3-glikozit/g kuru ekstrakt)	51
Tablo 4.5. Farklı ekstraksiyon yöntemleri ile elde edilen ÜKE'lerinin antioksidan kapasiteleri (mg AAE/g kuru ekstrakt)	52
Tablo 4.6. Farklı ekstraksiyon yöntemleri ile elde edilen ÜKE'lerinin antiradikal kapasiteleri (IC ₅₀ , µg/mL)	52
Tablo 4.7. Farklı ekstraksiyon yöntemleri ile elde edilen ÜKE'lerinin bazı maya ve bakterilere karşı inhibitif etkileri (inhibisyon zonu, mm)	54
Tablo 4.8. 4 ve 20°C sıcaklıklarda inkübe edilen elma sularına ilave edilen ÜKE'lerinin <i>E. coli</i> O157:H7 ve <i>B. cereus</i> F2 üzerine inhibitif etkileri (log kob/mL)	55
Tablo 4.9. Elma sularında üzüm kabuğu antosiyaninlerinin ısıl stabilitelerine ait kinetik parametreler	57
Tablo 4.10. Elma suyunun bazı analitik özellikleri	58
Tablo 4.11. ÜKE ile renklendirilen elma sularının bazı analitik özellikleri	58
Tablo 4.12. ÜKE ile hazırlanmış ve farklı sıcaklıklarda depolanan elma suyu örneklerinin toplam fenolik madde miktarlarındaki değişimler (mg GAE/L)	59
Tablo 4.13. ÜKE ile renklendirilen ve farklı sıcaklıklarda depolanan elma sularının antiradikal aktiviteleri	61
Tablo 4.14. ÜKE'ları ile renklendirilen ve farklı sıcaklıklarda depolanan elma sularının antioksidan aktiviteleri (mg AAE/mL)	62
Tablo 4.15. ÜKE ile renklendirilen ve 4°C'de depolanan elma sularının renk değerleri	63
Tablo 4.16. ÜKE ile renklendirilen ve 20°C'de depolanan elma sularının renk değerleri	65
Tablo 4.17. ÜKE ile renklendirilen ve 30°C sıcaklıkta depolanan elma sularının renk değerleri	66
Tablo 4.18. ÜKE ile renklendirilen ve 4°C'de depolanan elma sularının duyu analiz bulguları	67
Tablo 4.19. ÜKE ile renklendirilen ve 20°C'de depolanan elma sularının duyu analiz bulguları	68
Tablo 4.20. ÜKE ile renklendirilen ve 30°C'de depolanan elma sularının duyu analiz bulguları	69
Tablo 4.21. Dondurma örneklerinin kuru madde, kül ve pH değerleri (0. gün)	69
Tablo 4.22. ÜKE ve karminle renklendirilen dondurmaların toplam fenolik madde miktarları ve antiradikal aktiviteleri	70
Tablo 4.23. ÜKE ile renklendirilen dondurma örneklerinin renk değerleri	71
Tablo 4.24. ÜKE ile renklendirilen dondurma örneklerinin duyu analiz bulguları	73
Tablo 4.25. Şekerleme örneklerinin kuru madde, kül ve pH değerleri (0. gün)	73
Tablo 4.26. ÜKE ve karminle renklendirilen şekerlemelerin renk değerleri	74

Tablo 4.27. ÜKE ve karmin ile renklendirilen şekerlemelerin duysal analiz bulguları.....	75
Tablo 4.28. ÜKE ve karmin ile renklendirilen çemenlerin pH, kül ve kuru madde değerleri (0. gün).....	76
Tablo 4.29. ÜKE ve karminle renklendirilen çemenlerin renk değerleri.....	76

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1. Dünya genelinde kullanılan gıda boyalarının dağılımı	10
Şekil 2.2. Koşinal böcekleri	13
Şekil 2.3. Flavilyum Katyonu [14]. R_1 ve R_2 : H, OH veya CH_3 ; R_3 : glikozil veya H; R_4 : OH veya glikozil	15
Şekil 3.1. Elma suyunun renklendirilme akış şeması.....	35
Şekil 3.2. Standart dondurma üretim akış şeması	39
Şekil 3.3. Standart şekerleme (lokum) üretim akış şeması	43
Şekil 3.4. Standart çemen üretim akış şeması	46
Şekil 4.1. Üzüm kabuğu örneklerinin ultrason ve klasik ekstraksiyon yöntemleri ve çözgen olarak AES karışımının kullanılması halinde arta kalan posalarının görünümü [a) Üzüm kabuğu ultrason, b) Üzüm kabuğunun klasik ekstraksiyon yöntemleri uygulandıktan sonraki görünümleri]	49
Şekil 4.2. Üzüm kabuğu örneklerinin ultrason ve klasik ekstraksiyon yöntemleri ve çözgen olarak suyun kullanılması halinde arta kalan posalarının görünümü [a)Üzüm kabuğu ultrason, b) Üzüm kabuğunun klasik ekstraksiyon yöntemleri uygulandıktan sonraki görünümleri]	50
Şekil 4.3. ÜKE ile renklendirilen tampon çözeltilerin antosiyanin miktarlarında meydana gelen değişimler (pH 3 ve pH 4)	56
Şekil 4.4. Üzüm kabuğu antosiyaninlerinin (ÜKE) elma suyunda farklı sıcaklıklarda ısıtılması sonucu ortaya çıkan degradasyonu	57
Şekil 4.5. ÜKE ile renklendirilen elma sularının 4, 20 ve 30°C sıcaklıkta depolanma sürecinde antosiyanin miktarındaki değişimler.....	60

KISALTMALAR ve SİMGELER

AAE	: Askorbik Asit Eşdeğeri
AB	: Avrupa Birliği
ABE	: Antosiyanin Bazlı Ekstrakt
ac	: Asillenmiş
ADI	: Kabul Edilebilir Günlük Alım (mg/kg vücut ağırlığı) (Acceptable Daily Intake)
AOAC	: Resmi Analitik Kimyagerler Kuruluşu (Association of Official Analytical Chemists)
CIE	: Uluslararası Aydınlatma Komisyonu (International Commission on Illumination)
Ea	: Aktivasyon Enerjisi
FAO	: Gıda ve Tarım Örgütü (Food and Agriculture Organization)
FD&C	: Federal Gıda-İlaç ve Kozmetik Numarası (Federal Food-Drug and Cosmetic Act)
FDA	: (Amerikan) Gıda ve İlaç İdaresi (Food and Drug Administration)
GAE	: Gallik Asit Eşdeğeri
Glc	: Glukoz
GMP	: Doğru/iyi Üretim Uygulamaları (Good Manufacturing Practises)
GRAS	: Genellikle Güvenilir Kabul Edilen (Generally Recognized As Safe)
GSE	: Grape Skin Extract
HCl	: Hidroklorik Asit
JECFA	: Gıda Katkıları Ortak Uzmanlar Komitesi (Joint Expert Committee on Food Additives)
k	: Reaksiyon Hız Sabiti
Kob	: Koloni Oluşturan Birim (Colony Forming Unit)
LDL	: Düşük Yoğunluklu Lipoproteinler (Low Density Lipoproteins)
ME	: Malvidin Eşdeğeri
MIC	: Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu (Minimum Inhibition Concentration)
OH	: Hidroksil
PEF	: Vurgulu/Darbeli Elektrik Alanı (Pulsed Electric Field)
ppm	: Milyonda Bir Kısım (Parts Per Million)
QS	: Yeteri Kadar (Quantum Satis)
SPE	: Katı Faz Ekstraksiyonu (Solid Phase Extraction)
TFM	: Toplam Fenolik Madde
THI	: 2-Asetil-4(5)-Tetrahidroksibütimidazol

UV : Mor Ötesi (Ultraviolet)

ÜKE : Üzüm kabuğu ekstraktı

WHO : Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organisation)

AEW : 1:1 ethanol:water mixture acidified with 0.1% HCl

AES : %0.1 oranında HCl ile asitlendirilmiş etanol:su (1:1) karışımı

t_{1/2} : Yarılanma Süresi

ÜZÜM KABUĞUNDAN EKSTRAKTE EDİLEN ANTOSİYANİN BAZLI RENK MADDELERİNİN BİYOLOJİK ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ VE BAZI GIDA MADDELERİNDE RENKLENDİRİCİ OLARAK KULLANIMI

ÖZET

Bu araştırmada üzüm kabuklarından farklı ekstraksiyon yöntemleriyle elde edilen üzüm kabuğu ekstraktlarının (ÜKE) bazı biyolojik özelliklerinin belirlenmesi ve bazı gıdalarda renklendirici olarak kullanılabilme imkanlarının araştırılması hedeflenmiştir. Bu amaçla, ultrason tekniği veya klasik ekstraksiyon yöntemleri ile ekstrakt elde edilmiştir. Ekstraksiyon uygulamalarında saf suyun yanı sıra %0.1 HCl ile asitlendirilmiş 1:1 AES (asitlendirilmiş etanolü su) karışımı da kullanılmıştır. Ekstraktların toplam fenolik madde ve antosiyanin miktarları, antiradikal ve antioksidan aktiviteleri üzerine uygulanan ekstraksiyon yönteminin ve kullanılan çözenlerin etkili olduğu saptanmıştır. Ekstraktların antimikrobiyal etkisi ise toplam 15 farklı mikroorganizma üzerinde denenmiştir. Neticede AES (%0.1 HCl ile asitlendirilmiş) ekstraktlarının su ekstraktlarından daha yüksek antimikrobiyal aktivite gösterdiği saptanmıştır.

Starking cinsi elmalardan laboratuvarında üretilip pastörize edilen elma suları 4 mg antosiyanin/100 mL konsantrasyonunda ÜKE'ler ile renklendirilmiş ve elma suyu içerisindeki ekstraktların *E. coli* O157:H7 veya *B. cereus* F2'ye karşı antimikrobiyal etkileri incelenmiştir. ÜKE'lerin *B. cereus* F2'ye kıyasla *E. coli* O157:H7 üzerine inhibitif etkisinin daha yüksek olduğu saptanmıştır.

Araştırmada, çözen olarak %0.1 HCl ile asitlendirilmiş AES (1:1) karışımının kullanıldığı, klasik ekstraksiyon yöntemi ile elde edilen ÜKE'ler elma suyu, dondurma, şekerleme ve çemenin renklendirilmesinde kullanılmıştır. Elma suyuna 4 mg antosiyanin/100 mL, dondurma miksine 3 mg antosiyanin/100 mL, şekerlemeye (lokum) 3 mg antosiyanin/100 g ve çemene 2 mg antosiyanin/100 g düzeyinde ÜKE'leri ilave edilerek renklendirilen örnekler, ürün gruplarına göre farklı sıcaklık ve sürelerde depolanarak, örneklerin bazı fizikokimyasal

ve duyuşal özellikleri belirlenmiştir. İlave edilen  KE'larının elma suları ile dondurmalara fonksiyonel özellik kattıkları saptanmıştır.  KE'ı ile renkleğirilen örneklerin duyuşal anlamda beğenildiği tespit edilmiştir. şekerlemelerde de  KE'larının başarı ile kullanılabileceği belirlenmiştir.

 KE'larının ısıl stabiliteleri hem pH değeri 3 ve 4 olan tampon  zeltelerde hem de elma sularında incelenmiştir. Gerek tampon  zeltelerde ve gerekse de elma sularında  KE'larının ısıl stabilitesinin düşük olduğu saptanmıştır.

Sonuç olarak, ekstraksiyon yöntemlerinin ve kullanılan  z zenin, elde edilen ekstraktların bazı biyoaktif özellikleri üzerine etkili olduğu saptanmıştır. Araştırmada elde edilen sonuçlar, ekstraktların ilave edildiği gıdalara çekici renkler vermesinin yanında fonksiyonel özellikler de kazandırdığını ortaya koymaktadır. Öküzgözü cinsi üzüm kabuğu ekstraktlarının antimikrobiyal aktivitelerinin son derece yüksek olduğu belirlenmiştir. Antosiyaninlerin saflaştırılması için pahalı kolonlar kullanılmaksızın, elde edilen ekstraktların, direkt olarak gıdaların renkleğirilmesinde kullanılması halinde dahi nispeten uzun depolama s releri sonunda da test edilen ürünlerin renklerini koruyabildikleri saptanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Antosiyanin; renk; ultrason; biyoaktivite.

DETERMINATION OF BIOLOGICAL PROPERTIES OF ANTHOCYANIN BASED PIGMENTS EXTRACTED FROM GRAPE SKIN THEIR USAGE IN SOME FOOD PRODUCTS AS COLORANTS

ABSTRACT

The objectives of this study were to determine some biological properties of grape skins extracts (GSEs) by using different extraction methods and to investigate their utilization possibility as colorants in some food products. For this purpose, the anthocyanin source was subjected to ultrasound technique or conventional extraction methods. In the extraction methods, AEW and pure water were used as solvents. It was determined that the applied extraction methods and solvents were effective on the total phenolic and anthocyanin contents as well as antiradical and antioxidant activities of the extracts. Antimicrobial effects of the extracts on 15 microorganism species were also tested. As a result, it was determined that ethanol: water mixture (acidified with 0.1% HCl) extracts exhibited higher antimicrobial activity than the water extracts.

The apple juices produced from Starking type apples and then pasteurized under the laboratory conditions, were colored with GSEs at the level of 4 mg anthocyanin/100 mL. Then the antimicrobial effects of the GSEs in the apple juices were tested against *E. coli* O157:H7 and *B. cereus* F2. In general, GSEs had more inhibitory effects on *E. coli* O157:H7 than on *B. cereus* F2.

In this study, GSEs obtained using conventional extraction method with 1:1 AEW were used to color the following foods; apple juice, ice cream, candy (Turkish delight) and cemen (fenugreek paste). Some physicochemical and sensory properties of the apple juice, ice cream mixture, candy and cemen colored with GSEs were determined and the effects of storage time and temperature were also tested. In the result, it was determined that GSEs could successfully be used in coloration of coloration of candies (Turkish delight).

Thermal stability of the GSEs was investigated both in the apple juices and in buffer solutions at the pH of 3 and 4.

As a result, the extraction methods and solvents used were effective on some bioactive properties of the extracts. The results obtained in this study revealed that the extracts gave some functional properties and attractive colors to the food products that were added. GSEs of Okuzgozu cultivar had significantly higher antimicrobial activities. In conclusion, it was revealed that the tested food products could protect their colors even in the prolonged storage periods even if they were obtained without using expensive columns in their production. These extracts were directly be used for the coloration of food products

Keywords: Anthocyanin; color; ultrasound; bioactivity.

1. BÖLÜM

GİRİŞ

Tüketiciler, renk, lezzet ve tekstürü gıdanın en önemli kalite özellikleri olarak değerlendirmektedirler. Bunlar içerisinde de satın alma hissi ile de direkt alakalı olduğu için renk son derece önemli bir kalite kriteri olarak kabul edilmektedir. Yine renk bir gıdanın güvenliği ile ilişkilendirilmekte ve gıdaya has olmayan bir renk gıdanın bozulduğunu veya uygun bir şekilde üretilmediğini düşündürmektedir. Özetle, gıdaların kalitesinin değerlendirilmesinde renk çok önemli bir yere sahiptir.

Günümüzde gıda ürünleri, üretim merkezlerinden çok uzaklarda bile tüketime sunulabilmektedir. Gelişmiş ülkelerde gıdaların %75'inin tüketiciye ulaşmadan önce bazı işlemlerden geçtiği tahmin edilmektedir. Bunun sonucunda da gıda işleme ve ulaşımı gibi gıdalarda renk değişimine sebep olabilecek faktörler ortaya çıkmaktadır. Gıdaya orijinal bir görünümün kazandırılması, renkte tekdüzeliğin sağlanması, gıdanın doğal renginin yoğunlaştırılması ve en iyi renge sahip gıda ürününün elde edilmesi gibi amaçlarla gıda endüstrisinde renklendirici olarak çeşitli katkı maddeleri kullanılmaktadır [1].

Özellikle 19. yüzyılın ikinci yarısından itibaren doğal boyaların yerini sentetik boyalar almaya başlamıştır. 19. yüzyılın sonundan 21. yüzyılın başına kadar yaklaşık 100 yıldır sentetik renklendiricilerin sayısı 90'dan 5000'lere çıkmıştır [2]. Birçok boya aromatik aminlerin sülfonik asit türevidir. Bu yapı, renk maddelerinin yüksek polariteye sahip olmalarına neden olmakta ve böylece gastrointestinal sistem tarafından çok az absorbe edilmelerini sağlamaktadır [3]. Gıda katkı maddeleri arasında önemli bir yeri olan sentetik renklendiriciler özellikle çok miktarda tüketilmeleri durumunda sağlık açısından bazı riskler de taşımaktadırlar. Bu nedenle Gıda ve Tarım Örgütü (FAO) ile Dünya Sağlık Örgütü (WHO), günlük kabul edilebilir doz (ADI) araştırmaları ve hayvanlar ile insanlar üzerinde yürütülen toksikolojik analizleri sık sık tekrar ederek yeni düzenlemelere gitmektedirler [4]. Örneğin, 1959 yılında sentetik bir anilin boyası olan tartrazin (FD&C Yellow No: 5) tüketimine bağlı olarak ürtiker, migren, görme bozukluğu, kaşıntı, rinit (burun iltihabı), aşırı duyarlılık ve astım gibi rahatsızlıklar nedeniyle bilim insanları gıda boyalarının insan sağlığına etkileri ile ilgili tartışmalara başlamışlardır. Amaranth'ın (FD & C Red No: 2) embriyo ölümlerine ve böbrekte taş oluşumuna, eritrosinin (FD & C Red No: 3) yağda çözünen formunun ise erkek farelerde tümör oluşumuna yol açtığı belirlendiğinden, bu boyaların gıdalarda kullanımları

yasaklanmıştır. Yine FD & C Red No: 4, Green No: 1, Green No: 2 ve Violet No: 1'de hayvanlarda kanserojen etki göstermeleri nedeni ile kullanımı yasaklanan gıda boyaları arasındadır [3]. Konuyla ilgili çalışmalar hala devam etmekte ve şüpheli bulunan sonuçlar takibe alınmaktadır. Örneğin, son yıllarda yapılan bir çalışmada sentetik renklendiricilerin çocuklarda hiperaktivite sendromunun görülme riskini arttırdığı da belirtilmektedir [5]. Bu konuda da daha ileri çalışmaların yapılmasına ihtiyaç duyulmaktadır.

Günümüzde dünyada 940 milyon dolar büyüklüğündeki gıda boyası pazarının yaklaşık 2/3'ünün doğal gıda boyalarına ait olduğu tahmin edilmektedir. ABD, Avrupa ve Asya'nın eşit paylardaki pazarları, doğal gıda boyaları pazarının yaklaşık %73'lük kısmını oluşturmaktadır. Sentetik renklendiricilerin toksikolojik ve ekolojik nedenlerle yasaklanması ve tüketici tercihinde yaşanan değişmelere bağlı olarak doğal renklendiricilerin pazardaki payı her yıl %4-6 oranında artmaktadır. Avrupa'da, Almanya, Fransa ve İngiltere, doğal renklendiricilerin en çok tüketildiği ülkeler olarak karşımıza çıkmaktadır [2].

Yaşanan sosyal değişimler ve tüketici istekleri doğrultusunda gıda sektöründe kullanılan boyaların doğal olmaları arzu edilmektedir. Genel olarak sağlık riski taşımaları nedeni ile sentetik gıda katkıları, özellikle bilinçli tüketiciler tarafından reddedilmektedir. Bazen kullanılan katkıların sadece doğal olmaları da tüketiciyi tatmin edememektedir. Örneğin koşinal böceklerinden elde edilen karmin boyası da doğal renklendiriciler arasında yer almaktadır. Genellikle güvenilir olmasına rağmen gerek kişisel tercih ve inançlar ve gerekse de sosyokültürel yapı nedeni ile karmin tüketimi toplumumuzda hoş karşılanmamaktadır. Bu nedenlerle böcekten elde edilen gıda boyası ile renklendirilen ürünlerin çekiciliğinin azalması söz konusu olup, tüketicilerin bilinçlenmesine paralel olarak bu ürünlerin pazar payı da nisbi bir azalma eğilimindedir. Karmin, sucuk, pastırma çemeni, sosis ve işlenmiş kümes hayvanı gibi et ürünleri ile bazı meyve preperatlarında, reçel ve marmelatlarında, jelatinli tatlılarda, pasta ve fırın ürünlerinde, dondurmalarda, şekerlemelerde ve hatta bazı süt ürünlerinde renklendirici olarak kullanılabilir [6]. Karminin pH ve sıcaklık gibi proses parametrelerindeki değişimlere karşı stabil olması ve ışık karşısında bozunmadan kalabilen bir doğal renklendirici olması nedeni ile özellikle et endüstrisinde geniş bir kullanım alanı bulmaktadır. Ancak bu katkı maddesinin sağlık açısından taşıyabileceği muhtemel riskler de daha fazla araştırmayı gerekli kılmaktadır [7]. Örneğin, karminin bazı duyarlı kişilerde nadir de olsa anafilaktik şok tepkisine sebep olabildiği aktarılmaktadır [6]. Ayrıca karminin kanserojen olduğu konusunda Hıfzıssıhha Enstitüsü raporları bulunduğu belirtilmektedir [8].

Bu bağlamda doğal fakat tüketicinin daha kolay kabul edebileceği katkılar önem kazanmaktadır. Neticede sağlık üzerine olan olumlu etkileri nedeniyle gıda endüstrisinde gerek proses gerekse de depolama sürecinde stabilitesi düşük olmasına rağmen antosiyanin bazlı renklendiricilerin kullanımı ön plana çıkmaktadır [5].

Flavonoidlerin alt gruplarından biri olan antosiyaninler, çiçek ve meyvelerin kırmızıdan maviye kadar değişen renklerini oluşturan doğal bitki bileşenleridir [9]. Doğal renklendiriciler arasında yer alan antosiyaninlerin gıda katkı maddesi olarak kullanımı çok eskilere dayanmaktadır. Örneğin, Romalıların şarabın rengini yoğunlaştırmak için yoğun renkli meyveleri kullandıkları belirtilmektedir [2]. Günümüzde de antosiyaninlerin gıdalarda renk maddesi olarak kullanımları hızla artmaktadır. Antosiyaninlerin renklendirici ajan olarak kullanımlarına olan bu ilgi, rengi çekici hale getirmeleri ve sudaki yüksek çözünürlüklerinin yanı sıra sağlık üzerine pozitif etkilerinden de kaynaklanmaktadır [9; 10; 11; 12]. Antosiyaninlerin damar koruyucu, iltihap giderici, trombosit kümeleşmesini önleyici, normal damar geçirgenliğini koruyucu, diyabet kontrolü, tümör gelişimini önleyici [13]., antiülser etkisi [14]. ve UV radyasyona karşı koruyucu etki gibi çok farklı olumlu anlamda etkileri rapor edilmiştir [15]. Yine antosiyaninlerin E ve C vitaminlerinden daha yüksek antioksidan aktivite gösterdikleri belirlenmiştir. Sonuç olarak bu bileşenler, yapılarındaki hidrojen atomunu vererek serbest radikalleri etkisiz hale getirebilmekte ve canlılarda antikarsinojen etki sergileyebilmektedirler [12].

Antosiyanin ve diğer fenolik bileşiklerin kolayca okside olabildikleri, bu nedenle de üretim ve depolama basamaklarındaki oksidatif bozulmalara karşı hassas oldukları bilinmektedir. Genel olarak, antosiyaninlerin stabilitesi, üretim esnasında ortaya çıkan farklı pH, sıcaklık, ışık, oksijen, metal iyonları, enzimler ve şekerler gibi bazı faktörlerden etkilenebilmektedir [16]. Ortamın fizikokimyasal özelliklerinden, renk tonu ve yoğunluğu üzerine en etkili faktör ise pH'dır. Nitekim, antosiyaninler ortam pH'sına göre indikatör gibi renk değiştirmektedirler. Ortam pH'sı 2'nin altına düşünce antosiyanin flavilyum katyonu halinde ortama hakim olur ve renk tonu kırmızıdır. pH 4-5 arasında, ortama renksiz karbinol psödobaz formu hakimdir. Ortam pH'sı 5'in üzerine çıkarsa da kuinidal anhidrobaz formu oluşur ve ortam rengi maviye dönüşür [12; 17]. Ancak bu reaksiyonlar geri dönüşümlü olup, antosiyaninlerin renksiz formu, renkli katyonik ve kuinidal formlara dönüşebilmektedir [2].

Son yıllarda bilim insanları, sağlıklı ve doğal gıda tüketiminin tüketicilerin öncelikleri arasında olması nedeni ile bu talepleri karşılamak adına sentetik gıda katkıları yerine doğal gıda katkıları üzerinde çalışmaya başlamışlardır. Bu kapsamda farklı gıdaların farklı hammaddelerden elde edilen antosiyaninlerle renklendirilmesini konu alan çok sayıda araştırma bulunmaktadır. Örneğin, üzüm ekstraktı ile alkolsüz içeceklerin 100 mL'sine 3 mg monomerik antosiyanin ilavesinin örneklerin rengini koyu kırmızıya dönüştürdüğü belirtilmektedir [18]. Bir diğer çalışmada ise benzer şekilde pH değeri 3-4 arasında değişen alkolsüz içeceklerin koyu kırmızı renkte olabilmeleri için 3-4 mg monomerik antosiyanin ilavesinin uygun olduğu aktarılmaktadır [19]. Benzer şekilde çilekli yoğurdun rengini temsilen 100 g yoğurda 0.5 mg antosiyaninin renklendirici olarak ilave edilebileceği belirtilmektedir [19].

Yine bazı şekerlemelere %0.4 (ağırlık/ağırlık) düzeyinde üzüm ekstraktı ilavesinin uygun olduğu aktarılmaktadır [18].

İşlenmiş gıdalarda antosiyaninler bazı problemlere de sebep olabilmektedirler. Örneğin, antosiyanin ekstraktları ile proteinler arasındaki interaksiyonlar nedeni ile gıdalarda bazı çökelme problemleri meydana gelebilmektedir. Bundan dolayı diğer fenolikleri ve oligomerik pigmentleri belli seviyenin üzerinde içeren ekstraktlar jelatin ile çökelmeye neden olabileceği için yumuşak şekerlemelerde renklendirici olarak kullanılamamaktadır [18].

Nötre yakın veya nötr ortamlarda antosiyaninlerin renklerini yitirmeleri nedeni ile pH değeri yüksek süt ürünlerinde antosiyanin kullanımının sadece dondurma gibi düşük sıcaklıkta muhafaza edilmesi gereken gıdalarda mümkün olabildiği belirtilmektedir [20]. Benzer şekilde, petanın gibi antosiyaninlerin buzdolabında muhafaza edilmesi gereken bazı pastane ürünleri ve süt gibi hafif alkali ürünlerde renklendirici olarak başarı ile kullanılabileceği belirtilmektedir [21]. Süt ürünlerine %0.3-0.5 (ağırlık/ağırlık) oranında üzümden elde edilen üzüm kabuğu ekstrakt ilavesinin çekici bir renk oluşturduğu belirtilmektedir [18]. Dondurmanın rengi üzerine yakın zamanda yapılan bir çalışmada kırmızı şarap tortusunun dondurmanın reolojik ve antioksidan özelliklerine olan etkileri incelenmiştir. Çalışmada ilave edilen tortunun dondurmaya antioksidan özellik kazandırdığı belirlenmiştir [22]. Özetle, antosiyaninler ve doğal pigmentler, sakızlar, sert şekerlemeler, toz içecekler, krem dolgular, pasta kremaları, alkolsüz içecekler, reçel ve jölelerin renklendirilmesinde halen kullanılmaktadır [19].

Hazırdaki çalışma kapsamında klasik ekstraksiyonun yanı sıra ultrason ekstraksiyon uygulamalarının, ekstraktların antosiyanin miktarı, toplam fenolik madde, antioksidan, antiradikal ve antimikrobiyal özellikleri gibi bazı biyoaktif özellikleri üzerine etkileri incelenmiştir. Ultrason gibi yeni teknolojiler, çevre dostu ve son derece etkin teknolojik uygulamalardır [23].

Ultrason saniyede 20.000 veya daha fazla titreşimde dalga boyu oluşturan bir enerji türü olarak tanımlanmaktadır [24]. Ultrason uygulamaları, ekstrakt eldesinde ısıl olmayan etkili ve alternatif bir metottur. Ultrasonik uygulamada hücre duvarları mekanik olarak parçalanarak materyal aktarımının kolaylaştırılması sağlanmaktadır. Ayrıca ultrasonun mekanik aktivitesi, solventin dokulara doğru olan dağılımını da hızlandırmaktadır. Hücre içi bileşenler, mekanik olarak parçalanan hücre duvarından çözücü solvente daha kolay geçerek etkili bir ekstraksiyon işlemi sağlanabilmektedir [25]. Son yıllarda protein, antosiyanin, tartarik asit, aroma bileşenleri ve polisakkaritler gibi çok farklı bileşenlerin ekstraksiyonunda ultrason tekniğinden yaygın olarak faydalanılmaktadır [26].

Cranberry, yabanmersini, kırmızı lahana, *Hibiscus sabdariffa*, *Viburnum dentatum* berryleri, *Vaccinium myrtillus*, duhat (*Sysium cumini* Linn. meyvesi), siyah zeytin, *Clitorea ternatia* ve *Ipomea tricolor* çiçeklerini içeren çok farklı materyaller antosiyanin bazlı doğal gıda boyaları üretiminde hammadde olarak düşünülmüş bitkilerdir. Bu materyallerin büyük bir kısmı hafif asidik veya nötral pH değerlerinde iyi stabilite göstermesine rağmen, verimlerinin düşük olması veya ticari ekstraksiyon için yeterli miktarlarda elde edilmelerinin zor olması gibi nedenlerle üretim için henüz faaliyete geçilememiştir [19]. Ekonomik açıdan yaklaşıldığında potansiyel antosiyanin kaynakları arasında üzüm kabuğu ekstraktları dikkat çekmektedir [10; 27; 28]. Antosiyanin bazlı renklendirici olarak üzüm sanayi artıkları İtalya’da 1879 yılından beri kullanılmaktadır [29]. Eski adıyla “enosiyenin” günümüzde “Enocolor” ticari ismiyle toz veya konsantre solüsyonlar formunda İtalya’da üretilmektedir[19]. FAO 2005 verilerine göre dünyada yaklaşık 1 yılda 65 milyon ton üretimi gerçekleştirilen üzümün [29] işlenmesi sonucunda ortaya çıkan atıklar son derece bol ve ucuz antosiyanin kaynağı olarak değerlendirilmeyi beklemektedir [30].

Şarap yapımında üzümün yaklaşık %17-20’si posa olarak ayrılmakta ve bu posa yeterince değerlendirilemediği için üretim maliyeti artmaktadır. Türkiye yıllık 3.6 milyon tonluk üzüm

üretimi ile dünya üretiminin yaklaşık %6'sını karşılamaktadır. Bunun %20'si posa olarak düşünüldüğü zaman ülkemizde de yılda yaklaşık 700 bin ton civarında bir üzüm posası rezervinin olduğu ortaya çıkmaktadır [29]. Oysa bu atıkların çok kolay bir şekilde ekonomiye kazandırılmaları mümkündür. Konunun ekonomik ve insan sağlığı boyutu yanında, Türkiye'de önemli bir potansiyeli bulunan bu atığın, geri kazandırılması çevre sağlığı açısından da çok önemlidir. Üzüm posasının tüm bu özellikleri; bu ürünün çok iyi değerlendirilmesi gerektiğini düşündürmektedir. Dolayısıyla bu araştırma kapsamında Öküzgözü üzümlerinin kabuklarından elde edilen Üzüm kabuğu ekstraktının (ÜKE) gıdaların renkleri üzerine olan etkilerinin incelenmesinin de faydalı olabileceği düşünülmüştür.

Hazırdaki çalışmada kırmızı üzüm kabuklarından klasik yöntem ve ultrasonla ekstrakte edilen antosiyanin bazlı renk maddeleri kullanılmıştır. Elde edilen ekstraktlar renklendirici ajan olarak çemen, dondurma, şekerleme ve elma suyunun renklendirilmesinde kullanılmıştır. Halen piyasada bulunan çemen, dondurma ve şekerlemeler, daha çekici bir renk elde edebilmek için genellikle karmin kullanılarak renklendirilmektedir. Çemen renginin stabil olmaması nedeni ile et endüstrisinde sorunlar yaşanmasına rağmen literatürde bu konuda yapılan bir çalışmaya rastlanamamıştır. Özen et al. [31]'nin yaptıkları çalışma dışında geleneksel şekerlememiz olan lokumun renk parametresi üzerinde yapılan herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Literatürde dondurmalarla ilgili çalışmaların özellikle reolojik özellikler üzerine yoğunlaştığı gözlenmiş, doğal gıda boyası ilavesinin sadece renkte meydana getirdiği değişimlere rastlanmıştır. Yine ilave edilen renk maddesinin biyoaktivitede meydana getirdiği değişime ise çok sınırlı sayıda kaynakta ulaşılabilmektedir [22]. Bu nedenle çalışma kapsamında meyve suyu haricinde adı geçen gıdalarda doğal ÜKE'lerin yanı sıra karmin ile de renklendirilerek, depolama süresince meydana gelen değişimler duyusal ve objektif yöntemlerle izlenmiştir.

Ayrıca çalışmada klasik yöntem ve ultrason teknikleri ile elde edilen ekstraktların, antosiyanin miktarları, toplam fenolik, antioksidan ve antiradikal aktivite tayinleri yapılmıştır. Antosiyaninlerin antimikrobiyal aktiviteleri üzerinde yapılan araştırmalar, bunların stimülatör veya inhibitör etkileri olabileceğini ortaya koymaktadır [32]. Bu nedenle elde edilen ekstraktların 13 adet bakteri ve 2 mayadan oluşan toplam 15 mikroorganizma üzerindeki antimikrobiyal etkileri de bu araştırmada incelenmiştir.

Isıl işlem uygulamalarında sıcaklık-süre kombinasyonunun antosiyanin stabilitesi üzerinde son derece güçlü bir etkiye sahip olduğu bildirilmektedir [16; 33-35]. Isı etkisiyle antosiyaninler, renksiz forma dönüşerek rengini kaybetmekte ve melanoidin pigmentleri adıyla bilinen esmer renkli polimerik bileşiklerin oluşumuna neden olmaktadır [18].

Gün geçtikçe sentetik gıda boyalarının yukarıda anlatılan olumsuz etkilerinin ortaya çıkması nedeni ile özellikle son yıllarda doğal gıda boyalarına olan ilgi giderek artmaktadır. Sürekli artan bu ilgi yeni veya alternatif doğal gıda boyaları üzerinde yapılan araştırmaları gerekli kılmaktadır [36]. Sonuç olarak bu araştırmada, ülkemizin önemli kırmızı üzüm çeşitlerinden Öküzgözü cinsinin kabuklarından elde edilen ÜKE'lerin biyoaktif özelliklerinin incelenmesi amaçlanmıştır. Ayrıca, ultrason ve klasik ekstraksiyon gibi farklı uygulamaların, elde edilen ekstraktların antosiyanin miktarları, toplam fenolik madde miktarları, antioksidan ve antiradikal aktiviteleri gibi biyoaktif özellikleri üzerine olan etkilerinin belirlenmesi de hedeflenmiştir. Farklı ekstraksiyon yöntemleri ile elde edilen ekstraktların (çözgen olarak saf su veya %0.1 HCl ile asitlendirilmiş 1:1 etanol: su karışımı) 13'ü bakteri 2'si maya olan toplam 15 farklı mikroorganizma üzerinde denenerek antimikrobiyal etkinlikleri de saptanmıştır. Ayrıca laboratuvar şartlarında üretilen elma suları pastörize edilerek, 4 mg antosiyanin/100 mL oranında ÜKE'lerden ilave edildikten sonra *E. coli* O157: H7 ve *Bacillus cereus* F2 suşlarından %1 oranında yaklaşık 10^7 - 10^8 kob/mL civarında eklenmiştir. Örnekler elma sularının depolandığı sıcaklıklar dikkate alınarak 4 ve 20°C'de 96 saat süreyle inkübe edilmiş ve çalışma kapsamında gıdaların renklendirilmesinde kullanılan klasik yöntemle elde edilmiş ÜKE'lerden elma sularında kullanılan miktarda (4 mg antosiyanin/100 mL) elma sularına ilave edilmiş ve mikroorganizmalar üzerindeki etkileri incelenmiştir.

Yine klasik ekstraksiyon yöntemi ile elde edilen ekstraktların elma suyu, dondurma, çemen ve şekerleme örneklerinin renklendirilmesinde kullanım olanakları araştırılmıştır. Renklendirilen bu gıdalardan meyve suyu ve dondurmanın depolama sürecinde ilave edilen ekstraktların biyoaktif özelliklerinde meydana getirdiği değişim depolama süreçlerinde izlenmiştir. Yine klasik ekstraksiyon yöntemi ile elde edilen ve araştırma kapsamındaki gıdaların renklendirilmesinde kullanılan klasik ekstraksiyon yöntemi ile elde edilen üzüm kabuğu ekstraktlarının pH değerleri 3 ve 4 olan tampon çözeltilerde 90°C sıcaklıkta ısıl stabiliteleri incelenmiştir. ÜKE'lerin, ayrıca elma sularında 70, 80 ve 90°C sıcaklıklarda ısıl stabiliteleri belirlenerek, gıda sistemlerindeki degradasyon eğilimleri de belirlenmeye çalışılmıştır.

2. BÖLÜM

GENEL BİLGİLER

2.1. Gıdalarda Renk ve Renklendiriciler

Renk, gıdaların fark edilen ilk duyuşal özelliği olması nedeniyle, kabul edilebilirliklerde de çok önemli bir rol oynamaktadır [1]. Tüketicinin gıda seçiminde etkili olan rengin daha da çekici hale getirilmesi amacıyla bazı sentetik veya doğal boyalar kullanılmaya başlanmıştır. Ayrıca sağlık açısından sağladığı bazı avantajlar nedeniyle de son yıllarda daha çok doğal boyalar tercih edilmektedir. Gıdalara bu boyaların eklenmelerinin çok sayıda nedeni vardır. Bunlardan bazıları aşağıda sıralanmıştır [2, 37]:

1. Isıl işlem uygulaması sırasında (örneğin meyvelerin konserveye işlenmesi) ya da daha sonraki depolama süreçlerinde, gıdaların doğal renginin tahrip olması nedeniyle orijinal görünümünün korunması,
2. Mevsimin değişik zamanlarında elde edilen meyvelerde olduğu gibi, renk yoğunluğundaki farklılıklar nedeniyle bunlardan elde edilen ürünlerin renklerindeki tekdüzeliği sağlamak,
3. İçecek, sos ya da meyveli yoğurt gibi rengin, tüketiciye; ürünün tat ve aromasını çağrıştırdığı gıdalarda, özellikle ürünün renginin beklenenden daha zayıf olduğu durumlarda rengin yoğunlaştırılması,
4. Ürünün depolanması sırasında tat, aroma ve ışığa duyarlı vitaminlerinin korunmasına yardımcı olmak,
5. Gıdalara daha çekici bir görünüş kazandırmak,
6. Gıdanın tanınabilirliğini sağlamak veya karakterini muhafaza etmek,
7. Renk, gıda kalitesinin önemli bir işareti olduğundan gıdanın kabul edilebilirliğini arttırmaya yardımcı olmak amacıyla dışarıdan boya ilavesi yapılmaktadır.

Gıdalara ilk gıda boyasının M.Ö. 1500’lü yıllarda Mısır’da katılmaya başlandığı düşünölmektedir. Şekerleme gibi bazı ürünlerin renginin düzeltilmesi için bu ürönlere bazı bitkisel ekstraktlar ve şarap ilavesi yapıldığı aktarılmaktadır. Zamanla endüstrideki ilerlemelere paralel olarak gıda sanayi de hızlı bir değişime uğramıştır [38].

Gıda boyaları; sentetik, doğala özdeş ve doğal boyalar olmak üzere 3 grupta toplanmaktadır [38].

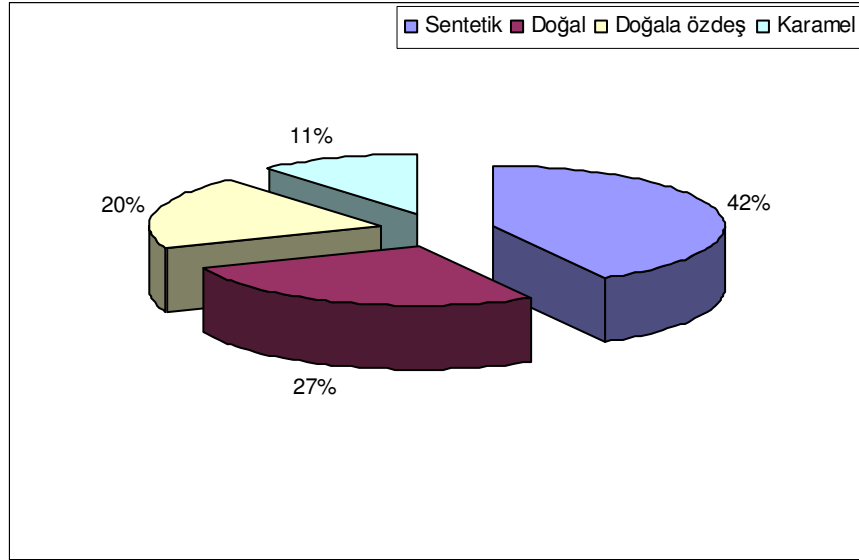
2.1.1. Sentetik gıda boyaları

İlk sentetik gıda boyası olan “muavine” 1856 yılında Sir William Henry Perkin tarafından geliştirilmiştir. Daha sonra geliştirilen sentetik diğer gıda boyaları da tüm dünyada geniş bir kullanım alanı bulmuştur. Sentetik boyalar, kolay üretilebilmeleri ve ucuz olmalarının yanında renklendirici özelliklerinin çok iyi olması gibi bazı avantajlara sahiptirler. Ayrıca gıdalara kolayca karıştırılabilmekte ve gıdalarda istenmeyen tat ve koku değişimlerine de sebep olmamaktadırlar [38].

Tüm ülkeler, gıda endüstrisinde kullanılan renklendirici katkılarla ilgili düzenlemelere gitmekte ve yapılan düzenlemeler neticesinde de kullanımına izin verilen renklendirici sayısı giderek azalmaktadır [39]. Nitekim son yıllarda yapılan yasal düzenlemelerle birlikte FDA tarafından kullanımına izin verilen sentetik boya sayısının 700’den 7’ye düştüğü bildirilmektedir [38].

Gıda katkı maddeleri arasında önemli bir yeri olan sentetik renklendiriciler özellikle çok miktarda tüketilmeleri durumunda sağlık açısından çok çeşitli riskler taşımaktadır. Bu nedenle Gıda ve Tarım Örgütü (FAO) ile Dünya Sağlık Örgütü (WHO) günlük kabul edilebilir doz (ADI) araştırmalarını, hayvanlar ve insanlar üzerinde yaptığı toksikolojik analizleri sık sık tekrar ederek, yeniden düzenlemekte ve belirlenen limitleri güncellemektedir [4]. Yaşanan sosyal ve kültürel değişimler, tüketici istekleri ve teknolojinin ilerlemesine bağlı olarak gıda sektöründe kullanılan boyaların doğal olmaları zarureti ortaya koymaktadır. Dünya genelinde kullanılan gıda boyalarının 2000 yılındaki dağılımı Şekil 2.1.’de verilmiştir [38].

Avrupa’da gıda endüstrisinde kullanılan sentetik boyalarla ilgili yasal düzenlemeler, Avrupa Birliği (AB)’nin ilgili kuruluşları tarafından sıkı bir şekilde kontrol edilmekte ve 94/36/EC sayılı yönerge ile düzenlenmektedir [4]. FDA ve Avrupa Birliği tarafından gıdalarda kullanılmasına izin verilen sertifikalı boyalar Tablo 2.1.’de verilmiş olup, bu boyalardan Türkiye ve ABD’de gıdalarda kullanımına izin verilenler de aynı tabloda belirtilmişlerdir [40].



Şekil 2.1. Dünya genelinde kullanılan gıda boyalarının dağılımı

Tablo 2.1. FDA ve Avrupa Birliği tarafından gıdalarda kullanılmasına izin verilen sentetik renk maddeleri [40].

Renk maddesi	Renk*	E-kodu	Yasal düzenlemeler			
			FDA numarası	AB	ABD	Türkiye
Erythrosine	Parlak pembe/kırmızı	E127	FD & C Red No.3	+	+	+
Brilliant blue FCF	Turkuaz mavisi	E133	FD & C Blue No.1	+	+	+
Indigotin	Deniz mavisi	E132	FD & C Blue No.2	+	+	+
Tartrazine	Limon sarısı	E102	FD & C Yellow No.5	+	+	+
Quinoline yellow	Limon sarısı	E104	FD & C Yellow No.6	+	-	+
Allura red	Turuncu-kırmızı	E129	FD & C Red No.40	+	+	+
Yellow 2G	Sarı	E107	-	+	-	+
Ponceau 4R	Çilek kırmızısı	E124	-	+	-	+
Carmoisine	Kırmızı	E122	-	+	-	+
Amaranth	Magenta kırmızısı	E123	FD & C Red No.2	+	-	+
Red 2G	Parlak pembe	E128	-	+	-	+
Patent blue	Turkuaz mavisi	E131	-	+	-	+
Green S	Yeşilimsi mavi	E142	-	+	-	+
Brown FK	Kırmızı kahverengi	E154	-	+	-	+
Chocolate Brown HT	Çikolata kahvesi	E155	-	+	-	+
Black PN	Violet siyahı	E151	-	+	-	+

*; sentetik boyaların renkleri 4 nolu kaynaktan alınmıştır, +; kullanımına izin verildiğini; -, kullanımına izin verilmediğini göstermektedir

Sentetik boyaların özellikle alerjik reaksiyonlara neden olduğu saptanmış olup, sağlık üzerine olan yan etkileri Tablo 2.2.'de verilmiştir [41].

Tablo 2.2. Bazı renk maddelerinin sağlık üzerine olan yan etkileri [41].

E-Kodu	Adı	Renk	Yan etkileri
E102	Tartrazin	Sarı-portakal rengi	Alerji
E104	Kinolin sarısı	Sarı-portakal rengi	Alerji, böbrek bozukluğu, kanser
E110	Sunset Yellow	Sarı-portakal rengi	Alerji, kanser
E122	Karmosin/ Azorubin	Kırmızı	Alerji, kanser, doğumsal kusurlar
E123	Amarat	Kırmızı	Alerji
E124	Ponceau 4R	Kırmızı	Alerji
E127	Eritrosin BS	Kırmızı	Alerji
E131	Patent Blue V	Mavi	Alerji
E132	İndigo Karmin/ İndigotin	Mavi	Alerji
E133	Brilliant Blue FCF	Mavi	Alerji, kanser
E153	Carbon Black/ Vegetable Carbon (Charcoal)	Kahverengi-siyah	Alerji

2.1.2. Doğala özdeş gıda boyaları

Doğala özdeş gıda boyaları, doğal kaynaklardan elde edilen maddelere uygulanan çeşitli proseslerle üretilirler. Örneğin, klorofilin bakır kompleksi veya karameller bu grupta değerlendirilmektedir [42].

2.1.3. Doğal Renk Maddeleri

Sentetik renklendiricilerin toksikolojik ve ekolojik nedenlerle yasaklanmasına bağlı olarak doğal renklendiricilerin pazardaki payı da her yıl yaklaşık %4-6 oranında artmaktadır [2]. Tüketici istekleri doğrultusunda doğal boyaların tercihinin artmasına rağmen, bunların gıdalarda kullanılmalarından önce bazı hususların dikkate alınması gerekmektedir. Bunlar aşağıda özetlenmiştir [1, 2]:

1. Gıda maddesinde arzu edilen renk tonu,
2. Gıda ürününün üretildiği ülkelerdeki yasal düzenlemeler,
3. Arzu edilen fiziksel form (örneğin, fiyat bakımından sıvı haldeki doğal boyalar genelde toz olanlardan daha pahalıdır),
4. Gıdanın kompozisyonu, özellikle sulu bir sistem olup olmadığı ya da önemli düzeyde sıvı veya katı yağ içerip içermediği (örneğin, tanen ve proteinlerin varlığı, antosiyanin gibi bazı renk maddelerinin kullanımını sınırlandırmaktadır),
5. Proses koşulları, özellikle uygulanan sıcaklık derecesi ve süresi,

6. Gıdanın pH değeri (doğal boyaların çoğunun renk stabilitesi ve tonu, ortamın pH'sından etkilenmektedir),
7. Gıdalarda kullanılacak ambalaj (ürüne ulaşacak oksijen ve ışık miktarını belirleyeceğinden, özellikle karotenoid gibi bazı renk maddelerini etkilemektedir),
8. Ürünün arzu edilen raf ömrü ve depolama koşulları.

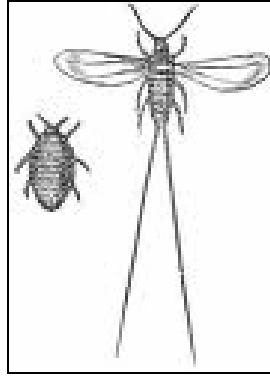
Avrupa Birliği tarafından kullanımına izin verilen doğal kaynaklı boyalar Tablo 2.3.'te verilmiştir [1].

Tablo 2.3. Avrupa Birliği tarafından kullanımına izin verilen doğal kaynaklı boyalar [1]

E Kodu	Ad
E100	Kurkumin
E101	Riboflavin
E120	Koşinal /karminik asit/karmin
E140	Klorofil
E141	Klorofilin bakır kompleksleri ve klorofilinler
E150	Karamel
E153	Bitkisel karbon
E160	(a) α -, β -, γ -karoten (b) Annatto ekstraktları, biksin, norbiksin (c) Paprika (kırmızı biber) ekstraktı, kapsantin, kapsorubin (d) Likopen (e) β -apo-8'-karotenal (C30)
E161	(a) Flavoksantin (b) Lutein (c) Kriptoksantin (d) Rubiksantin (e) Violaksantin (f) Rodoksantin (g) Kantaksantin
E162	Pancar kökü kırmızısı, betanin
E163	Antosiyaninler

2.2.3.1. Karmin

Karmin koşinal (*Dactylopius coccus*) böceklerinden elde edilen bir renk maddesidir. Dişi ve erkek koşinal böcekleri Şekil 2.2.'te görülmektedir [6].



Şekil 2.2. Koşinal böcekleri

Karmin, özellikle sosis, sucuk, pastırma, salam ve işlenmiş kümes hayvanı gibi et ürünleri ile çeşitli meyve preperatlarında, reçel ve marmelatlarda, jelatinli tatlılarda, pasta ve fırın ürünlerinde, dondurmalarda, şekerlemelerde ve çeşitli süt ürünlerinde bile renklendirici olarak kullanılabilmektedir [6].

Koşinal böcekleri Güney Amerika ve Meksika’da *Opuntia* cinsi kaktüslerin üzerinde parazit olarak yaşamaktadır. Diğer böceklerden korunmak amacı ile sentezledikleri karminik asit nedeniyle bu böcekler kırmızı renkli boya üretiminde kullanılmaktadırlar. Boya eldesi için yaklaşık doksan günlük dişi böcekler sıcak su içesine batırılıp, güneş ışığına maruz bırakılmakta veya fırın içerisinde kurutularak boya elde edilmektedir. Kalite açısından kurutulmuş böcekler ve elde edilen ekstraktların çok düşük mikrobiyal yüke sahip olması gerekmektedir. Böceklerin bozulmadan saklanabilmesi için vücut ağırlıklarının %30’una kadar kurutulmaları gerekmektedir. Ortalama 1 kg karmin elde edebilmek için yaklaşık 155.000 adet böcek kullanıldığı aktarılmaktadır [7; 43].

Türk Gıda Kodeksi Gıdalarda Kullanılan Renklendiriciler Tebliği’nde koşinal, karminik asit ve karminler, E120 Kodu ile izin verilen gıda renklendiricileri arasında yer almaktadır. Tablo 2.4.’te ilgili tebliğde karmin kullanımına izin verilen gıda ürünleri ve maksimum kullanım miktarları verilmiştir [44].

Daha önceden belirtildiği gibi tekstil, kozmetik ve gıda sanayinde kullanım alanı bulan karmin E120 kodu ile izin verilen gıda renklendiricileri arasında yer almaktadır. pH 4’te kırmızı renk veren karmin pH 10’da ilave edildiği gıdaya mavi-kırmızı renk kazandırmaktadır. Karmin, pH ve sıcaklık gibi proses parametrelerindeki değişimlere karşı stabil olması ve ışık karşısında bozulmadan kalabilen tek doğal renklendirici olması nedeni ile özellikle et endüstrisinde geniş bir kullanım alanı bulmaktadır [7].

Tablo 2.4. Gıdalarda kullanılan Renklendiriciler Tebliği' ne göre karmin kullanımına izin verilen ürünler ve maksimum kullanım miktarları

Gıda maddesi	Maksimum doz (mg/kg)
Meyve aromalı kahvaltılık hububat	200
Reçel jöle ve marmelat	100
Sosis, salam ve et ezmeleri	100
Pastırma (yenilebilir dış ambalajlarında)	QS*
Meyve ve sebze şekerlemeleri	200
Şekerlemeler	300
Süsleme ve kaplama maddeleri	500
Hafif fırıncılık ürünleri	200
Aromalandırılmış işlenmiş peynir	100
Aromalandırılmış süt ürünleri dahil tatlılar	150
Surumi	500
Füme balık	100
Kuru patates, hububat veya nişasta bazlı çerezler	
-Patlamış veya hacimlendirilmiş çerezler	200
-Diğer çerezler	100
Çorbalar	50
Alkolsüz aromalı içecekler	100 mg/l
Alkollü içecekler (bira, viski hariç)	200 mg/l
Meyve şarapları (durgun ve köpüren)	200 mg/l

* QS (Quantum Satis): Yeteri kadar

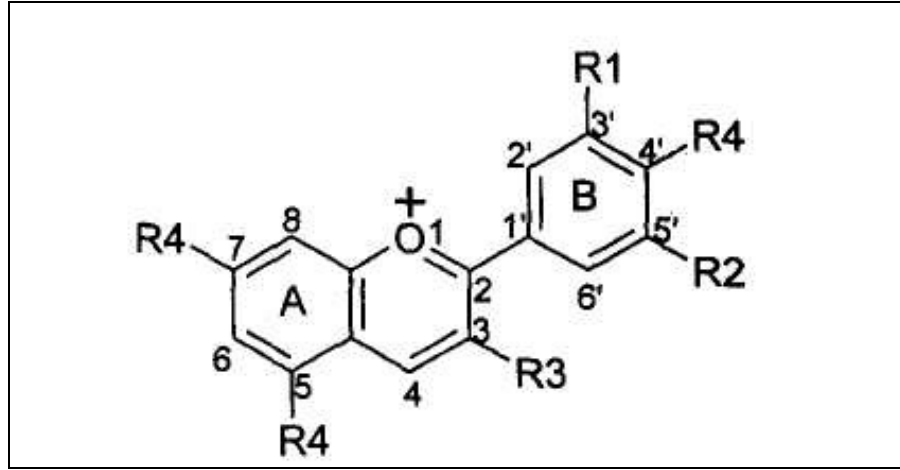
Karmin özellikle koşinal böceklerinden geçen bazı proteinlerinden dolayı alerjen olarak tanımlanmaktadır [45]. Ayrıca karminin bazı duyarlı kişilerde nadir de olsa anafilaktik şok tepkisine sebep olabildiği aktarılmaktadır [6]. Karminin kanserojen olduğu konusunda da Hıfzıssıhha Enstitüsü raporları bulunduğu belirtilmektedir [8]. Ancak sağlık açısından taşıyabileceği muhtemel riskler daha fazla araştırmayı gerekli kılmaktadır [7].

Koşinal (*Dactylopius coccus*) böceklerinden elde edilen karmin, gerek Müslümanların gerekse de Musevilerin dini inançları nedeni ile şüpheyle yaklaştıkları bir gıda katkı maddesidir. Özellikle Musevilerden 'Kosher Sertifikası' alamadığı için ticari olarak önemli bir engelle karşı karşıya bulunduğu bildirilmektedir [46].

2.2.3.2. Antosiyaninler

Antosiyaninler Yunanca'da çiçek anlamına gelen "anthos" ile mavi anlamındaki "kyanos" kelimelerinden türetilmiştir [14; 47]. Flavonoidlerin alt gruplarından biri olan antosiyaninler, çiçek ve meyvelerin kırmızıdan maviye kadar değişen renklerini oluşturmaktadır [9].

Antosiyaninler dokularda serbest vakuollerde bulunabilecekleri gibi antosiyanoplast adı verilen yapılar içerisinde de yer alabilmektedirler [48]. Antosiyanidinlerin glikozitleri olan antosiyaninlerin temel yapısını 2-fenilbenzopirillium (flavilyum katyonu) oluşturmaktadır [17]. Flavilyum katyonu açık formülü Şekil 2.3.'da verilmiştir [14].



Şekil 2.3. Flavilyum Katyonu [14]. R₁ ve R₂: H, OH veya CH₃; R₃: glikozil veya H; R₄: OH veya glikozil

Doğada bugüne kadar tespit edilen 500 adetten fazla antosiyanin ve 23 antosiyanidin bulunduğu bildirilmektedir. Antosiyaninlerin farklılıkları, moleküldeki hidroksil gruplarının sayısı, hidroksil gruplarının metilasyon derecesi, moleküle bağlanmış şekerlerin türü, sayısı ve bağlanma şeklinden kaynaklanmaktadır. Ayrıca yapıdaki şekerlere bağlanmış alifatik ve aromatik asitlerin yapı ve sayısı gibi faktörler de antosiyaninler arasındaki farklılığa neden olmaktadır [12].

Antosiyaninlerin gıda endüstrisinde renklendirici ajan olarak kullanımlarında karşılaşılan en önemli sorun bunların gösterdiği düşük stabilizasyondur. Antosiyanin pigmentlerinin renk stabilitesi pH, sıcaklık, antosiyaninin yapısı ve konsantrasyonu ile ortamdaki metal iyonları ve fenolik bileşiklere bağlı olarak değişmektedir [30]. Antosiyanidinlere bağlı olan şekerler birçok durumda *p*-kumarik, kafeik, ferulik, sinapik, gallik asit gibi aromatik asitler veya *p*-hidroksibenzoik asitler ya da malonik, okzalik, malik ya da asetik asit gibi alifatik asitler tarafından asillenmektedir. Asilasyon, antosiyaninlerin stabilitesi üzerine son derece etkilidir [2]. Bitkilerdeki renk stabilizasyonunun ana mekanizması, antosiyaninlerin diğer fenoliklerle kopigment olarak isimlendirilen kompleksler oluşturmalarıdır [30]. Kopigmentler genellikle renksizdirler, ancak antosiyaninlerle kompleks oluşturunca onların renklerini

güçlendirip stabilize etmektedirler. Kopigmentlerin başında flavonoidler gelmektedir [17].

Antosiyaninler ortam pH'sına göre indikatör gibi renk değiştirmektedirler. Ortam pH'sı 2'nin altına düşünce antosiyanin flavilyum katyonu halinde ortama hakim olur ve renk tonu kırmızıdır. pH 4-5 arasında, ortama renksiz karbinol psödobaz formu hakimdir. Ortam pH'ı 5'in üzerine çıkarsa kuinidal anhidrobaz formu oluşur ve ortamın rengi maviye döner [17; 12].

Antosiyaninler, bilinen en iyi doğal gıda boyaları olmalarına rağmen, saflaştırılmalarının zor olması ve kimyasal olarak stabil olmamaları nedeniyle bu amaçla yaygın olarak kullanılamamaktadırlar. Önemli antosiyanin kaynakları arasında siyah üzüm posası, kırmızı lahana, siyah havuç, konkord üzümü, tatlı patates, kırmızı turp ve patates, mor mısır, elderberry ve bluberry sayılabilir [2]. Ticari antosiyanin kaynakları hammadde ile sınırlı bulunmaktadır. Ekonomik açıdan yaklaşıldığında potansiyel antosiyanin kaynakları arasında üzüm kabuğu ekstraktları dikkat çekmektedir [10]. Üzüm sanayi artıkları İtalya'da 1879 yılından beri antosiyanin bazlı renklendirici olarak kullanılmakta ve "antosiyenin" ticari ismiyle üretilmektedir. FAO 2005 verilerine göre yaklaşık 65 milyon ton olarak üretimi gerçekleştirilen üzümün [29] işlenmesi sonucunda ortaya çıkan atıklar, son derece bol ve ucuz antosiyanin kaynağı olarak değerlendirilebilir potansiyeline sahiptir [30]. Kırmızı üzüm kabukları çeşit, mevsim ve çevresel faktörlere bağlı olarak değişen miktarlarda antosiyanin içermektedirler [49]. Malvidin, peonidin, petunidin, delphinidin ve syanidin başta 3-glikozit olmak üzere 3-asetilglikozit ve 3-*p*-kumarilglikozitlerini içermektedir [50]. Amerika'da FDA tarafından sadece üzüm ekstraktından elde edilen antosiyaninler gıda renklendiricisi olarak kabul edilmektedir. Ticari preparatları antosiyanin ve tortu (şarapların dibinde biriken tortu) olup, kodekste ticari üzüm ekstraktlarının şekerleme ürünlerinde, alkollü ve alkolsüz içeceklerde kullanımına izin verilmektedir [1].

Antosiyaninler E163 N (N; doğal orijini ifade etmektedir) kodu ile jöle, reçel ve meyve suları gibi ürünlerin renklendirilmesi amacı ile kullanılmaktadır. Antosiyaninlerin gıdalarda en fazla 200 ppm düzeyinde kullanılmasına izin verilmektedir [2].

2.2.3.2.1. Antosiyanin-sağlık ilişkisi

Antosiyaninlerin gıdalarda renk maddesi olarak kullanımı son yıllarda hızla artmaktadır. Antosiyaninlerin renklendirici ajan olarak kullanımlarına olan bu ilgi, rengi çekici hale getirmeleri ve suda yüksek çözünürlüklerinin yanı sıra sağlık üzerine pozitif etkilerinden de kaynaklanmaktadır [9; 10; 11; 12]

Antosiyaninlerin damar koruyucu, iltihap giderici, trombosit kümeleşmesini önleyici, normal damar geçirgenliğini koruyucu, diyabet kontrolü, tümör gelişimini önleyici [13], antiülser [14] ve UV radyasyona karşı koruyucu etkileri gibi çok farklı olumlu etkilerinin olduğu belirtilmektedir [15]. Antosiyaninlerin DNA kırılmalarını engellediği, östrojenik aktivite gösterdikleri (hormonlara bağlı olarak ortaya çıkan hastalıkların seyrini değiştirdikleri), siklooksigenaz gibi bazı enzimleri inhibe ettikleri, sitokin üretimini hızlandırarak bağışıklık sistemini destekledikleri aktarılmaktadır. Antosiyaninler idrak ve motor fonksiyonlarını modüle ederek, hafızayı geliştirmekte ve yaşa bağlı olarak ortaya çıkan nöral hastalıkların engellenmesinde önemli roller üstlenmektedirler [51].

2.2.3.2.2. Antosiyaninlerin antimikrobiyal özellikleri

Antosiyaninlerin antimikrobiyal aktiviteleri üzerinde yapılan araştırmalar stimülatör veya inhibitör etkilerinin olabileceğini ortaya koymaktadır. Yapılan bir çalışmada yıllanmış kırmızı şaraptaki malvidinin bakterisidal etkisinin olduğu sonucuna varılırken, diğer bir çalışmada %0.008-0.025 düzeyinde ilave edilen çilek ve üzüm antosiyaninlerinin *Lactobacillus acidophilus* üzerinde stimülant bir etki gösterdiği, ancak antosiyanin konsantrasyonundaki artışla (%2.5) bu etkinin tersine döndüğü bildirilmektedir. Aynı çalışmada çilek ve üzüm antosiyaninlerinin antimikrobiyal etkileri arasında fark olmadığı da belirlenmiştir. *Lactobacillus acidophilus* ve *Escherichia coli* üzerinde yapılan bir diğer çalışmada da çilek ve üzüm antosiyaninlerinin mikroorganizmaların gelişimi üzerine olan etkilerinin direkt olarak konsantrasyona bağlı olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Pelargonidin 3-monoglikozit ve delfinidin 3-monoglikozit'in *E. coli*'yi inhibe ettiği ancak delfinidin ve malvidinin gelişmeyi stimüle ettiği bildirilmektedir [32].

Fenolik bileşikler gibi ikincil metabolitlerin bitkileri, UV ışığından, parazitlerden ve serbest radikallerden koruduğu bilinmektedir. Genellikle bitkiler, hücrelerini tatsız ve zehirli forma çevirerek kendilerini çevre etkenlerinden özellikle de parazitlerden korumaktadırlar. Hücre strese girdiğinde bu kimyasalların miktarı artmaktadır. Bitkiler ile çevre arasındaki bu etkileşim bitkilerden ekstrakte edilen fenolik bileşikler ile antosiyaninlerin antioksidan ve antimikrobiyal etkilerinin olduğunu açıklamaktadır [52].

2.3. Araştırma Kapsamında Renklendirici Olarak Kullanılan Antosiyanin Kaynağı Üzüm Kabuğu

Çok sayıda antosiyanin kaynağı bulunmakla birlikte bunlar arasında en önemlileri üzüm ve özellikle de şarap endüstrisi artışı olan üzüm posasıdır [53; 54]. Ülkemiz, üzüm üretimi ve çeşit zenginliği açısından dünyanın sayılı ülkeleri arasında yer almaktadır. Üzüm; çeşitli değerlendirme yöntemlerinin olması, iklim ve toprak istekleri yönünden çok seçici olmaması, çok yıllık olması ve çoğaltılma yöntemlerinin kolay olması gibi avantajlara sahip olması nedeniyle dünyada en fazla üretilen meyvelerden biridir [53, 54]. Ülkemizde üretilen üzümlerin %3'ü şaraplık, %37'si kurutmalık, %23'ü sofralık ve %37'si de pekmez, pestil, pekmez sucuğu ve sıra gibi ürünlerin yapımında kullanılmaktadır [55].

Üzümler (*Vitis vinifera* L.) dünyada en çok üretimi yapılan meyvelerden biridir. Dünyada toplam 67 milyon ton üretimi gerçekleştirilen üzümün, 3.6 milyon tonunun Türkiye'de üretildiği belirtilmektedir [56]. Dünyada üretilen üzümün yaklaşık %80 kadarı şarap üretiminde kullanılmaktadır ve hasat mevsiminde birkaç hafta içerisinde 10'larca ton üzüm posası açığa çıkmaktadır [57].

Üzüm posası; şarap, sirke ve pekmez yapımı sırasında atık olarak ortaya çıkan ve üzüm çekirdeği, üzüm sapı ve üzüm kabuğundan oluşan bir atıktır. Şarap yapımında üzümün yaklaşık %17-20'si posa olarak ayrılmakta ve bu posa yeterince değerlendirilemediği için maliyet de artmaktadır. Türkiye yıllık 3.6 milyon tonluk üzüm üretimi ile dünya üretiminin yaklaşık %6'sını karşılamaktadır. Bunun %20'si posa olarak düşünüldüğü zaman ülkemizde de yaklaşık 700 bin ton civarında üzüm posası ortaya çıkmaktadır [29]. Oysa bu atıkların çeşitli şekillerde ekonomiye kazandırılmaları mümkündür.

Üzüm posasının GRAS statüsünde olması, antimikrobiyal ve antioksidan özelliğinin yüksek olması sebebiyle, insan sağlığı üzerine faydalı etkileri vardır. Bazı üzüm bileşenlerinin kötü kolesterol olarak bilinen düşük yoğunluklu lipoproteini (LDL) düşürdüğü, serbest radikalleri bağladığı, kalp-damar hastalıklarını önlemede etkili olduğu kanıtlanmıştır [58; 59]. Üzüm posasındaki antioksidanların yüksek radikal tutma kapasitesi sayesinde, hücrelerin yaşlanması gecikmekte, tümör oluşumu engellenmekte ve dolayısı ile üzüm posası antikanserojen bir aktivite göstermektedir [60].

Üzüm kabuğu, üzüm meyvesinin kuru ağırlık üzerinden %5-10 kadarlık kısmını oluşturmaktadır. Kabuk meyveyi mekanik ve iklimsel zararlanmalardan, dehidrasyondan, mantar enfeksiyonlarından ve ultraviyole (UV) ışıktan korumaktadır [61].

Genel olarak üzüm kabuğunun fenolik kompozisyonu çeşide bağlıdır [61]. Kabuk, meyvenin en yüksek düzeyde tanen içeren kısmını oluşturmaktadır. Üzüm kabuğunda bulunan tanenler diğer üzüm fraksiyonlarındaki tanenlerden çok daha fazla polimerize olmaları ve daha düşük miktarlarda gallat içermeleriyle ayrılmaktadırlar. Kateşin, epikateşin ve epikateşin gallat kabuktaki başlıca tanenler olup, az miktarda da gallokateşin ve epigallokateşin bulunmaktadır. Kabuğa rengini veren antosiyaninler ise delfinidin, siyanidin, petunidin, peonidin ve malvidin-3-glikozitleri, 3-(6-asetil)-glikozitleri ve 3-(6-*p*-kumaril) glikozitleri ile peonidin ve malvidinin 3-(6-caffeoil)-glikozitleri ile bazı pruvatlarıdır. Ayrıca kuersetin ve kampferol glikozitleri ve glukuronitleri, gallik asit ve glikozitleri, resveratrol, kaftarik ve kutarik asit üzüm kabuğunun fenolik bileşimini oluşturmaktadır. Kırmızı kabuklarının içerdiği antosiyaninler haricinde, beyaz ve kırmızı üzümün fenolik bileşimi çok farklı değildir [61].

Hazırdaki çalışma kapsamında da materyal olarak kullanılan üzüm çeşidi olan Öküzgözü üzümünde yapılan bir çalışmada, 5 adet monoglikozit, 5 adet asetil ve 4 adet kumaril yapısında olmak üzere, toplam 14 adet antosiyanin belirlendiği aktarılmaktadır. Bunlar arasında miktar olarak en fazla bulunanın malvidin-3-glikozit olduğu belirtilmektedir. Denizli ve Elazığ bölgelerindeki Öküzgözü üzümünde malvidin-3-glikozitin miktarının sırası ile 6.31-69.00 mg/100 g ile 3.78-61.10 mg/100 g arasında olduğu saptanmıştır. Malvidin-3-glikozit miktarının Öküzgözü üzümünde

toplam antosiyaninlerin yaklaşık %50'sini oluşturduğu belirlenmiştir. Malvidin-3-glikoziti miktar olarak petunidin, delfinidin, peonidin ve siyanidin-3-glikozitin izlediği belirtilmektedir. Öküzgözü üzümünün toplam antosiyanin miktarının 1992 yılında 1.2-93.5 mg/100 g ve 1993 yılı üzümünde ise 1.9-71.8 mg/100 g aralığında olduğu belirtilirken, 2005 yılında bu değerler 10.85-123.26 mg/100 g, 2006 yılında ise 13.45-136.20 mg/100 g aralığında saptanmıştır. Görüldüğü üzere örneklerin antosiyanin içerikleri gerek yetiştirildiği bölgeye ve gerekse de sezona bağlı olarak bazı değişiklikler gösterebilmektedir [62].

2.4. Antosiyanin Ekstraksiyonunda Kullanılan Farklı Teknik Uygulamaları

Antosiyaninlerin ekstraksiyonunda en çok kullanılan yöntem solvent ekstraksiyondur [12]. Bununla birlikte, son yıllarda ekstraksiyon uygulamalarında farklı tekniklerin etkileri üzerine çalışmalar yapılmaktadır. Bu kapsamda klasik ekstraksiyonun yanında ultrason teknikleri gibi materyallerin dokularında değişikliklere yol açarak, ekstrakte edilmesi istenen bileşiklerin dokudan daha kolay ayrılmasını sağlayan uygulamalar dikkat çekmektedir.

2.4.1. Klasik ekstraksiyon

Suda çözünen polar bileşikler olan antosiyaninlerin ticari izolasyonunda ilk işlem ekstraksiyondur. Bitki yüzeyine yakın hücrelerde lokalize olan antosiyaninler organik solventlerle ekstrakte edilmektedir. Geleneksel olarak, antosiyanin ekstraksiyonunda asitlendirilmiş metanol, etanol, aseton, su ve aseton/metanol/su karışımları kullanılmaktadır [63; 64]. Ekstraksiyonda kullanılan asit, hücre membranlarını denatüre ederek, ekstraksiyonu kolaylaştırdığı için tercih edilmektedir. Bununla birlikte, özellikle aşırı miktarda kullanılan asit, ekstraktın konsantre hale getirilmesi sırasında denatürasyona neden olabilmektedir [14]. Ekstraksiyon işleminde formik asit, asetik asit, sitrik asit ve tartarik asit gibi zayıf asitler %0.5-3 oranında kullanılabilirken, hidroklorik asit (HCl) ve trifloroasetik asit gibi güçlü asitler ise %1'den daha az bir oranda kullanılmalıdır [63].

Antosiyanin ekstraksiyonunda difüzyonu ve analitin solventte çözünürlüğünü arttırmak amacı ile yüksek ekstraksiyon sıcaklıkları üzerinde çalışmalar yapılmaktadır. Ancak

yüksek ekstraksiyon sıcaklıklarında antosiyaninlerin degrade olabileceği de bilinmektedir. Bu nedenle antosiyaninlerin ticari ekstraksiyon ve konsantrasyonu sırasında 70°C'nin altındaki sıcaklık dereceleri tercih edilmektedir [63].

2.4.2. Ultrasonik ekstraksiyon

Saniyede 20.000 veya daha fazla titreşimde dalga boyu oluşturan enerji ultrason olarak tanımlanmaktadır [24]. Ultrason kurutma, filtrasyon, mikrobiyal inaktivasyon ve enzimatik inhibisyon gibi farklı amaçlarla gıda sanayinde kullanılmıştır [65]. Son yıllarda ise ultrason uygulaması; protein, antosiyanin, tartarik asit, aroma bileşenleri ve polisakkaritler gibi çok farklı bileşenlerin ekstraksiyonunda uygulama alanı bulmuştur [26].

Ultrason uygulamaları ekstrakt eldesinde, ısıl olmayan etkili bir alternatif metottur. Ultrasonik uygulamada hücre duvarları mekanik olarak parçalanarak kütle aktarımının kolaylaştırılması sağlanmaktadır. Ultrasonun mekanik aktivitesi, solventin dokulara doğru olan dağılımını hızlandırmaktadır. Mekanik olarak parçalanan hücre duvarından hücre içi bileşen, çözücü solvante daha kolay geçerek etkili olmaktadır [25].

Ultrason etkisiyle hücre duvarları hasar görerek doku içindeki ekstrakte edilebilir bileşenlerin ortaya çıkması kolaylaşmaktadır. Çözücü fazına bu maddelerin kütle transferi ile aktarımı artmaktadır. Bu nedenle ultrason destekli ekstraksiyon gelecekteki uygulamalar için önemli potansiyele sahip olarak değerlendirilmektedir [66].

Bu çalışmada Öküzgözü üzüm çeşidinin kabuklarından farklı ekstraksiyon yöntemleri (klasik ekstraksiyon ve ultrason teknikleri) ile elde edilen ekstraktların, toplam fenolik madde miktarı, toplam antosiyanin miktarı, antioksidan aktivite ve antiradikal kapasiteleri gibi bazı biyoaktif özelliklerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Ayrıca farklı ekstraksiyon teknikleri ile elde edilen bu ekstraktların 2'si maya, 13'ü bakteri olmak üzere toplam 15 mikroorganizma üzerine olan antimikrobiyal aktivitelerinin de belirlenmesine çalışılmıştır. Koruyucu içermemesi için laboratuvar şartlarında hazırlanan pastörize elma sularına *Escherichia coli* O157:H7 ve *Bacillus cereus* F2 bakterileri inölüle edilerek, 4 ve 20°C sıcaklıklarda 96 saat süreyle inkübe edilmiş ve ekstraktların bu bakteriler üzerine olan inhibitif etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Klasik yöntemle elde edilen ekstraktların farklı gıda maddelerine ilave edilerek elma suları,

dondurma, çemen ve şekerleme (lokum) örneklerinin renklendirilmeleri sağlanmıştır. Dondurma, çemen ve şekerleme örnekleri ÜKE'nın yanı sıra stabil bir boya olan karminle de renklendirilerek, elde edilen renk maddesinin karminle kıyaslanması sağlanmıştır. Renklendirilen örneklerden elma suları ve dondurmaların depolama sürecindeki bazı biyoaktif özelliklerindeki değişimlerin de belirlenmesi hedeflenmiştir. Gerek meyve sularının pH değerlerinin genellikle 3-4 aralığında olması ve gerekse de antosiyaninlerin pH değerlerindeki değişimlere hassas olmaları nedeni ile pH değeri 3 ve 4 olan iki tampon çözelti ÜKE'ları ile renklendirilerek, 90°C'deki ısıl stabiliteleri belirlenmeye çalışılmıştır. Benzer şekilde bir grup elma suyu da ÜKE'ları ile renklendirilmiş ve bu örneklerin 70, 80 ve 90°C sıcaklıklardaki ısıl stabilitelerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

3. BÖLÜM

MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Antosiyanin kaynakları

Üzüm Kabuğu (*Vitis vinifera* L.) Elazığ yöresine has bir üzüm olan Öküzgözü cinsine ait posasından elde edilmiştir. Ülkemiz için önemli bir şaraplık çeşit olan Öküzgözü üzüm posaları, Tekirdağ'da bulunan Doluca Şarap Fabrikası'ndan temin edilmiştir. 50 kilogramlık çuvallarda laboratuara getirilen üzüm posaları, elle çekirdek ve saplarından ayrılmıştır. Çalışmada sadece kabuk kısmı ayrılarak kullanılmıştır. Çekirdek ve saplarından ayrılan üzüm kabukları, 65°C sıcaklıktaki bir etüvde (Nüve FN300, Türkiye) 24 saat süreyle kurutulmuştur. Laboratuar tipi bir değirmende (Faema MPN, İtalya) öğütülen kurutulmuş üzüm kabukları, renkli poşetlere doldurularak, analiz edilinceye kadar oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir.

3.1.2. Renklendirilen ürünler

Bu çalışmada elde edilen ekstraktlar elma suyu, dondurma, şekerleme ve çemenin renklendirilmesinde kullanılmıştır.

- Çalışmada kullanılan %100 elma suyu (Pınar, Yaşar Gıda San. ve Tic. A.Ş., İzmir) Kayseri piyasasından temin edilmiştir.
- Dondurma örneklerinin elde edilmesinde kullanılan UHT tipi süt (Pınar Süt, Yaşar Gıda San. ve Tic. A.Ş., Pınarbaşı/ İzmir) ve toz şeker yerel piyasadan satın alınmış, salep, emülgatör ve jelatin Özselamoğlu Gıda San. ve Tic. Ltd. Şti. (Kayseri)'den temin edilmiştir.
- Şekerleme örneklerinin üretiminde kullanılan şeker, nişasta, sitrik asit ve glikoz şurubu Kayseri piyasasından temin edilmiştir
- Çemen örneklerinin üretiminde gerekli olan çemen unu, kırmızı toz biber, sarımsak ve tuz Kayseri piyasasından temin edilmiştir.

- Dondurma, çemen ve şekerleme ürünlerinin renklendirilmesi amacıyla kullanılan karmin (Montecarmin WSS 52%, Lima, Peru) ise Şahin Sucukları (Şahin–Melek Et ve Et Mamülleri Gıda San.Tic. Ltd.Şti., Kayseri) tarafından hibe edilmiştir.

3.2. Yöntem

3.2.1. Üzüm posalarında yapılan analizler

Üzüm posaları laboratuara getirildiğinde örneklerin nem kaybetmesini önlemek amacı ile zaman kaybetmeden 3 adet 1'er kg ağırlığında posa tartılmış; kabuk, sap ve çekirdek kısımları özenle ayrılarak, posanın kabuk, çekirdek ve sap kısımlarının miktarları belirlenmiştir.

3.2.1.1. Kuru Madde

Projede kullanılan üzüm posalarında kuru madde analizi yapılmıştır. Bu amaçla sabit tartıma getirilen ve daraları alınmış kurutma kaplarına 3-5 g örnek tartılmış ve 105°C'deki etüvde (Nüve FN300, Türkiye) örnekler sabit tartıma gelene kadar kurutulmuştur. İşlem sonrasında örnekler desikatöre alınarak, oda sıcaklığına kadar soğutulmuş ve ağırlıkları belirlenerek, aşağıdaki formül yardımıyla % kuru madde miktarları belirlenmiştir [67].

$$\%KM = [(G_2 - G) / (G_1 - G)] \times 100$$

%KM : Örneğin kuru madde yüzdesi

G : Tartım kabının darası

G₁ : Örnek + tartım kabının darası

G₂ : Kurutma sonrası kuru örnek + tartım kabının darası

3.2.1.2. Kül miktarı tayini

Üzüm posalarının kül miktarı AOAC 940.26 No'lu metoda göre yapılmıştır [68]. Bu amaçla kullanılan porselen krozeler, 600°C sıcaklıkta sabit tartıma getirilerek, içlerine 1-2 g örnek tartılmış ve kül fırınında (Protherm PLF 12015 Electrical Furnaces, Türkiye) meydana gelebilecek sıçramaları önlemek maksadıyla 100°C'de 3 saat

tutularak, nemin uzaklaşması sağlanmıştır. Daha sonra kuruyan örneklerde 600°C’de siyah rezidü kalmayıncaya kadar yakma işlemine devam edilmiştir. İşlem sonunda krozeler desikatöre alınarak soğutulmuş ve aşağıdaki formül yardımı ile % kül miktarları belirlenmiştir.

$$\% \text{ Kül} = [(A_2 - A) / (A_1 - A)] \times 100$$

% Kül : Örneğin kül yüzdesi

A : Porselen krozenin darası

A₁ : Örnek + porselen krozenin darası

A₂ : Yakma sonrası kül + porselen krozenin darası

3.2.1.3. pH tayini

Örneklerin pH değerleri, analiz öncesinde uygun tampon çözeltilerle kalibre edilen WTV 720 model bir pH metre (WTV, Werkstätten, Almanya) kullanılarak belirlenmiştir. Bu amaçla üzüm kabuğu ekstraktı elde edilecek hammaddeler üzerine az miktarda damıtık su eklenmiş ve pH değerleri saptanmıştır[67].

3.2.1.4. Titrasyon asitliği tayini

Damıtık su ile seyreltilerek süzölmüş örnekler ayarlı 0.1 N NaOH (Merck, Darmstadt, Almanya) ile pH 8.1’e kadar titre edilmiş ve titrasyon asitliği üzüm kabuklarında tartarik asit cinsinden belirlenmiştir [67].

3.2.1.5. Toplam ve indirgen şeker tayini

Hammaddeler ile çalışmada kullanılan elma sularının toplam şeker ve indirgen şeker miktarlarının belirlenmesinde Luff–Schoorl yöntemi kullanılmıştır. Önce Carrez çözeltileriyle durultulan örnekler, daha sonra uygun bir şeker içeriğine kadar seyreltilmiştir. Buradan alınan seyreltik örnek çözeltisi, Luff çözeltisi ile kaynatılmıştır. Bu sırada ortamdaki şekerlerin okside olması sağlanmış ve kullanılmamış olan oksidasyon maddesinin miktarı ayarlı 0.1 N sodyumtiyosülfat (Merck, Darmstadt, Almanya) çözeltisi ile geri titre edilerek hesaplanmıştır. Bir şahit deney yapıldıktan sonra, ilgili tabloda yararlanmak suretiyle, harcanan sodyumtiyosülfat çözeltisi miktarına göre, örnekteki şeker miktarı hesaplanmıştır (Ek-1). İndirgen özelliği olmayan

sakarozun tayini için ise önce inversiyon uygulandıktan sonra ikinci bir titrasyonla doğal halde bulunan ve sakarozun inversiyonu ile oluşan toplam indirgen şeker miktarları aşağıda verilen formül ile belirlenmiştir [67].

$$\% \text{ Toplam Şeker (Sakaroz Cinsinden)} = \frac{A \times 100 \times F}{B}$$

A : Çizelgeden bulunan indirgen şeker miktarı, g

B : Alınan analiz çözeltisinin karşılığı olan numune miktarı, g

F : Sakaroz için çarpım faktörü (0.95)

3.2.2. Antosiyanin pigmentlerinin ekstraksiyonları

Çalışma kapsamında ÜKE'ı üretiminde ekstrakt verimi ve elde edilen ekstraktın toplam fenolik madde ve antosiyanin miktarları, antioksidan aktiviteleri ve antiradikal kapasiteleri üzerine olabilecek etkilerinin kıyaslanması amacı ile klasik ekstraksiyon yöntemi ile ultrasonik yöntem olmak üzere 2 farklı ekstraksiyon yöntemi kıyaslanmıştır. Ekstraksiyonda %0.1 oranında HCl ile asitlendirilmiş etanollü su (AES) ve sadece saf su ile ekstraksiyon yapılmıştır.

Siyah üzüm kabukları yaklaşık 2 x 2 mm olacak şekilde parçalanmıştır. Bu şekilde hazırlanan homojen örneklemelerden örnekler alınarak ekstraksiyon işlemi gerçekleştirilmiştir.

3.2.2.1. Klasik ekstraksiyon uygulamaları

Klasik ekstraksiyon uygulamaları Ersus ve Yurdagel [69]'in metodunda bazı modifikasyonlar yapılarak gerçekleştirilmiştir. Örneklerden antosiyanin pigmentlerinin ekstraksiyonu için çözgen olarak %0.1 oranında hidroklorik asit (HCl, Merck, Darmstadt, Almanya) ile asitlendirilmiş etanol (Merck, Darmstadt, Almanya): saf su (1:1) karışımı kullanılmıştır. Ekstraksiyon işleminde örnek:çözgen oranı 1:4 olacak şekilde ayarlanmıştır. 50 g örnek üzerine 50 mL çözgen ilave edilmiş ve karışımın ultraturaks (IKA T18 Basic, Almanya) yardımıyla 1 dakika süresince homojen bir şekilde öğütülmesi sağlanmıştır. Sonra kalan solvent eklenerek, örnekler çalkalamalı su

banyosuna (Memmert WB-22, Almanya) yerleştirilmiştir. Ekstraksiyon işlemi, 35°C’de 2 saat süreyle gerçekleştirilmiştir. Süre bitiminde örnekler önce dört katlı bir tülbentten geçirilmiştir. Sonrasında örnekler vakum altında (Millipore 230L, Fransa) önce kaba filtre kağıdından, ardından Whatman 1 No’lu filtre kağıdından süzölmüş ve bir rotary evaporatörde (BUCHI Multivapor P-6, İsviçre) 60°C sıcaklıkta çözen tamamen uzaklaştırılınca kadar kurutulmuştur.

Tüplere alınan kurutulmuş ekstraktların üzerine azot gazı basılarak, oksijenden ileri gelebilecek olumsuz etkilerin önlenmesi sağlanmış ve ekstraktlar kullanılınca kadar -18°C (Vestel FT 280, Türkiye) sıcaklıkta muhafaza edilmişlerdir. Elma suyu, dondurma ve tampon çözeltilerde kuru ekstraktlardan direkt ilave yapılırken, çemen ve şekerleme örneklerinin renklendirilmesi için kullanılmadan önce ekstraktlar saf su ile 60° brikse seyreltilip bu örneklerde antosiyanin tayini yapılmış ve örneklere ilave edilmesi gereken miktarlar tartılmış ve üzüm kabuk ekstraktlarının (ÜKE) örneklere homojen bir şekilde karışması sağlanmıştır.

Ancak, ultrason uygulamalarının ekstraksiyon etkinliklerinin kıyaslanması amacıyla parçacık büyüklüğü önem taşımaktadır. Bu nedenle ekstraktların biyoaktif özelliklerinin belirlenmesi amacı ile yapılan klasik ekstraksiyon uygulamalarında da siyah üzüm kabukları yaklaşık 2 x 2 mm olacak şekilde parçalanmıştır. Ekstraksiyon işlemi bu şekilde hazırlanan homojen örneklerde gerçekleştirilmiştir.

3.2.2.2. Ultrasonik ekstraksiyon uygulaması

Chen et al. [70]’ın metodunda bazı modifikasyon yapılarak ultrasonik ekstraksiyon uygulaması gerçekleştirilmiştir. Homojen hale getirilen örneklerden örnek:çözen oranı 1:2 olacak şekilde ekstraksiyonda kullanılan çözen ilave edilmiş ve örnekler ultrasonik su banyosuna (VWR Ultrasonic Cleaner, HF 45 kHz, 1800 Watt, Kanada) yerleştirilmiştir. Bir saat ekstraksiyon sonunda örnekler 4 katlı tülbentten süzölmüş ve katı kısım üzerine yine 1:2 oranında çözen ilavesi yapılmıştır. Örnekler 1 saat süreyle ikinci kez ekstraksiyona tabi tutulmuştur. Süre sonunda örnekler 4 katlı tülbentten geçirildikten sonra vakum altında önce adi filtre kağıdından ardından da Whatman No 1’den süzölmüştür. Her iki filtrat birleştirildikten sonra rotary evaporatörde 60°C’de çözen tamamen uzaklaştırılarak, kuru ekstrakt elde edilmiştir. Titreşimden

kaynaklanan sıcaklık artışını önlemek amacıyla ultrasonik su banyosu 15°C'deki saf su ile doldurulmuştur. Ekstraksiyon işlemi başladıktan 1 saat sonra ultrasonik su banyosundaki su, aynı sıcaklıktaki su ile devir daim yaptırılarak, sıcaklığın 35°C'yi geçmemesi sağlanmıştır. Böylece sıcaklığın ekstraksiyona olabilecek etkilerinden sakınılmaya çalışılmıştır.

3.2.2. Farklı ekstraksiyon yöntemleri ile elde edilen üzüm kabuk ekstraktların bazı biyolojik özelliklerinin belirlenmesi

Araştırma kapsamında antosiyanin kaynağı olarak kullanılan üzüm kabuklarından farklı ekstraksiyon uygulamaları ile elde edilen ekstraktların bazı biyolojik özellikleri belirlenmiş olup, kullanılan yöntemlere aşağıda kısaca değinilmiştir.

3.2.3.1. Toplam fenolik madde tayini

ÜKE'lerinin toplam fenolik madde içeriği Singleton ve Rossi [71] tarafından verilen metotta bazı modifikasyonlar yapılarak tespit edilmiştir. Bu amaçla ekstraktlar seyreltilirken ekstraksiyon aşamasında kullanılan çözümler dikkate alınarak, su ekstraktları su ile AES karışımı kullanılarak elde edilen ekstraktlar ise etanol:su (1:1) karışımı kullanılarak belli konsantrasyonlara seyreltilmişlerdir. Deney aşamasında 2400 µL saf suyun üzerine 40 µL örnek ilave edildikten sonra 200 µL Folin-Ciocalteu ayırıcı (Merck, Darmstadt, Almanya) ilave edilmiştir. Daha sonra 600 µL %20'lik doymuş Na₂CO₃ (Merck, Darmstadt, Almanya) ilavesini 760 µL saf su ilavesi izlemiştir. Karanlık bir ortamda 2 saat süreyle bekletilen örneklerin absorbans değerleri spektrofotometre (Varian Cary 100 Conc UV-Visible, Amerika) yardımı ile 765 nm'de belirlenmiştir. Hesaplamada gallik asitten (Acros Organics, New Jersey, Amerika) 0-1 mg/mL sınırları düzeyinde bir seri standart çözelti hazırlanmış ve örneklerin toplam fenolik madde miktarları bu şekilde hazırlanan bir standart kurve yardımı ile hesaplanmıştır (mg gallik asit eşdeğeri (GAE)/g kuru ekstrakt).

3.2.3.2. Toplam antosiyanin tayini

Örneklerin antosiyanin içeriği, pH diferansiyel metoduna göre yapılmıştır [72]. Antosiyanin miktarları tüm örneklerde, siyanidin 3-glikozit cinsinden belirlenmiştir

(MW=449.2, molar absorbans, ϵ =26.900). Örneklerin antosiyanin miktarları aşağıda verilen formüle göre hesaplanmıştır [73]:

$$\text{Antosiyanin mg/L} = (\Delta A / \epsilon \cdot L) 10^3 \times (\text{MW}) \times (\text{SF})$$

ΔA : Absorbans farkı (uygulanan yönteme göre pH 1.0 ve pH 4.5 değerlerinde ölçülen absorbans farkı)

ϵ : Molar absorbans

L : Absorbans ölçüm küvetinin tabaka kalınlığı, cm

MW : Molekül ağırlığı

SF : Seyreltme faktörü

3.2.3.3. Antiradikal kapasite tayini

Farklı yöntemlerle elde edilen üzüm kabuğu ekstraktlarının antiradikal aktivite tayinleri Brand-Williams [74], tarafından verilen yöntemde bazı modifikasyonlar uygulanarak yapılmıştır. Bu amaçla örnekler 1:1 oranında metanol (Merck, Darmstadt, Almanya): saf su (60:40) çözeltisi ile seyreltilmiştir. Daha sonra 200 μL örnek üzerine 4000 μL 0.1 mM/L DPPH, (Sigma St. Louis, MO, Amerika) ilave edilmiştir. Örnekler karanlıkta 30 dakika bekletildikten sonra 517 nm'de absorbans ölçümleri yapılmıştır. Kontrol örneğinde örnek yerine metanol kullanılmış ve spektrofotometre saf metanol ile sıfırlanmıştır.

Örneklerin antioksidan kapasiteleri aşağıda verilen eşitlikle hesaplanmıştır:

$$\% \text{ İ} = 100 \times (1 - A_{\text{ö}} / A_{\text{K}})$$

İ : Örnek tarafından inhibe edilen DPPH, %

$A_{\text{ö}}$: Örneğin absorbansı

A_{K} : Kontrolün absorbansı

%İ'den yararlanılarak DPPH'in %50'sinin inhibisyonu için gerekli ekstrakt miktarı grafiklerle belirlenmiştir ($\mu\text{g/mL}$).

3.2.3.4. Antioksidan aktivite tayini

ÜKE'lerin antioksidan aktivite tayini Prieto ve ark. [75]'na göre belirlenmiştir. Bu amaçla saf su ile seyreltilmiş meyve suyu örneğinden 0.4 mL alınarak üzerine 4 mL fosfomolibden çözeltisi (0.6 M sülfürik asit, 28 mM sodyum fosfat ve 4 mM amonyum molibdat) ilave edilmiştir. Örnekler 95°C sıcaklıktaki çalkalamalı su banyosunda (Memmert WB-22, Almanya) 90 dakika süreyle inkübe edilmiştir. Süre bitiminde örnekler hızla soğutulmuş ve 695 nm'deki absorbans değerleri belirlenmiştir. Hesaplama askorbik asitten 0-1 mg/mL sınırları düzeyinde bir seri standart çözelti hazırlanmış ve elde edilen kurve yardımıyla örneklerin antioksidan aktiviteleri mg askorbik asit eşdeğeri (AAE)/g kuru ekstrakt olarak verilmiştir.

3.2.3.5. Mikrobiyolojik analizler

3.2.3.5.1. Agar difüzyon yöntemi ile üzüm kabuğu ekstraktının antimikrobiyal aktivitelerinin belirlenmesi

Antimikrobiyal aktivite denemeleri agar difüzyon yöntemi ile yapılmıştır [76]. Bu çalışmada test organizması olarak 13 adet bakteri ve 2 adet mayayı içeren toplam 15 mikroorganizma kullanılmıştır. Çalışmada *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Escherichia coli* O157: H7, *Staphylococcus aureus* ATCC 1135, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus cereus* F2, *Bacillus cereus* FMC 19, *Bacillus subtilis* ATCC, *Bacillus brevis*, *Pseudomonas aurogenes*, *Aeromonas hydrophila*, *Yersinia enterocolitica* bakterileri ile *Saccharomyces cerevisiae* ve *Candida albicans* mayaları kullanılmıştır.

Stok kültürlerden, bakteriler nutrient sıvı besiyerine, mayalar ise malt ekstrakt sıvı besiyerine aşılanarak, mayalar ve *Y. enterocolitica* 27°C'de, diğer mikroorganizmalar ise 35°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Sıvı ortamlarda geliştirilen her mikroorganizma kültüründen, tekrar yukarıdaki sıvı ortamları içeren tüplere, %1 oranında bakteri kültürü aşılanarak 18 saat inkübe edilmiştir. Gelişen bu mikroorganizmaların gelişme eğrileri belirlenerek 10^6 - 10^7 kob/mL mikroorganizma içerecek şekilde gerektiğinde aynı steril sıvı besiyeri ile seyreltilmiştir.

Her mikroorganizma, içerisinde 25 mL steril besiyeri (bakteriler için nutrient agar ve mayalar için malt ekstrakt agar) içeren 43-45°C sıcaklıkta bulunan erlenmayerdeki besiyerine %1 oranında aşılanmıştır. Mikroorganizma kültürüyle aşılama yapılmış

agarlar, 9-10 cm çapındaki petri plaklarına dökülerek, donduktan sonra 4°C’de yaklaşık 1 saat bekletilmiştir.

Ekstrelerin eldelerinde kullanılan saf su veya 1:1 etanol: su (asit içermeyen) ile %1, 2.5, 5 ve 10 konsantrasyonlarında çözeltileri hazırlanmıştır. Agar Difüzyon Yöntemi için, bakteri aşılansak buzdolabında bir saat süreyle bekletilen petri kutularındaki taze besiyerine, korkborla (mantar delici) 4 mm çapında 4 adet kuyucuk açılarak bu kuyucuklara, yukarıda belirtilen yüzdelerde hazırlanmış ekstrelerden 50 µL pipetlendikten sonra *Y. enterocolitica* ve mayalar 27°C’de, diğer mikroorganizmalar ise 35°C sıcaklıkta 18-24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Meydana gelen inhibisyon zonlarının çapı mm cinsinden ölçülmüştür [77; 76].

3.2.3.5.2. Üzüm kabuk ekstraktların elma suyunda *E. coli* O157:H7 ve *B. cereus* F2 üzerine antimikrobiyal etkisinin saptanması

Elma sularında ÜKE’larının *E. coli* O157:H7 ve *B. cereus* F2’ye karşı antimikrobiyal etkilerini analiz etmek amacıyla, marketten alınan starking tipi elmalardan meyve suyu sıkma makinesinde (Tefal Type 8314, China) elma suyu elde edilmiştir. Elma suları önce dört katlı bir tülbentten daha sonra da vakum altında kaba filtre kağıdından süzölmüştür. Elma suları tüplere 15’er ml bölünmüş ve tüpler 85°C’de 20 dakika süreyle pastörize edilmiştir. Pastörize elma suları 2 kısma ayrılmış ve birinci gruba ÜKE’dan 4 mg antosiyanin/100 mL elma suyu konsantrasyonunda ekstrakt ilavesi yapılarak renklendirilmişlerdir. İkinci gruba hiçbir ekstrakt ilavesi yapılmamış ve bu örnekler kontrol grubu olarak değerlendirilmişlerdir.

Antimikrobiyal denemelerde materyal olarak *E. coli* O157:H7 ve *B. cereus* F2 suşları stok kültürlerden alınarak, nutrient buyyona (Merck) ekim yapılmış ve 35°C’de 24 saat süreyle inkübe edilerek aktifleştirilmişlerdir. Daha sonra bakteriler 35°C’de 18 saat inkübe edilerek taze kültür elde edilmiştir. Elma sularının renklendirildiği dozda (4 mg antosiyanin/100 mL elma suyu) pastörize elma sularına ilave edilen ekstraktlar oda sıcaklığındaki elma sularına steril ortamlarda ilave edilmiş, aynı zamanda elma sularına hazırlanan taze bakteri kültürlerinden %1 oranında, yaklaşık 10^7 - 10^8 kob/mL civarında eklenmiştir. Hiçbir ekstrakt içermeyen kontrol grubuna da aynı düzeyde bakteri aşılansak, bütün gruplar soğutmalı inkübatörde (Nuve ES 110) 20°C sıcaklıkta inkübe edilmişlerdir. Bu inkübasyonun 1., 24., 48., 72. ve 96. saatlerinde ekimler yapılarak bu

bakterilerin inhibisyon kurveleri izlenmiştir. Bakteri sayıları, seri dilüsyon yöntemi ile, cam tüplerde hazırlanmış %0.85 NaCl (serum fizyolojik) içeren steril tüpler kullanılarak dilüsyonlar hazırlanmış ve uygun dilüsyonlardan nutrient agara ekimler yapılmış ve 37°C’de 24-48 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda bakteri sayıları belirlenmiştir. Mikrobiyolojik analizlerin tamamı, 2 tekerrürlü olarak gerçekleştirilmiştir.

3.2.4. Antosiyaninlerin ısıl stabilitelerinin belirlenmesi

3.2.4.1. Antosiyaninlerin tampon çözeltilerde ısıl stabilitelerinin belirlenmesi

Isıl işlemin pH değerleri 3.0 ve 4.0 olan tampon çözeltilere ilave edilen renk pigmentleri üzerindeki etkilerinin belirlenmesi için analizin hemen öncesinde hazırlanan 100 mL tampon çözeltisine 4 mg antosiyanin içeren ÜKE’den 0.37 g kuru ekstrakt ilave edilmiştir. Bu amaçla 179 mL ayarlı 0.1 N HCl ile 821 mL 0.1 N glikokolün ($\text{NH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$, Merck, Darmstadt, Almanya) karıştırılmasıyla pH değeri 3 olan tampon çözelti elde edilmiştir. pH’sı 4 olan tampon çözelti ise 440 mL ayarlı 0.1 N HCl’in 0.1 M sodyum sitrat ($\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7$, Merck, Darmstadt, Almanya) ile karışımından elde edilmiştir [8]. Tampon çözeltilerin renklendirilmeden önce pH değerleri kontrol edilmiştir. Örnekler 90°C sıcaklıkta 0. dakikadan itibaren her 30 dakikada bir örnek almak suretiyle 180 dakika süresince ısıl işleme maruz bırakılmıştır. Bu amaçla renklendirilmiş tampon çözeltilerden 15 mL hacmindeki örnekler deney tüplerine koyulmuş ve 90°C’ye ayarlanmış su banyosuna yerleştirilmiştir. Tüp içerisindeki örnek sıcaklığı takip edilmiş ve istenilen sıcaklığa ulaştığı an sıfır süresi olarak kabul edilmiştir. Belirlenen sıcaklık süre normunda ısıl işleme tabi tutulan örnekler derhal oda sıcaklığına soğutulmuştur. Örneklerin toplam antosiyanin miktarları “3.2.3.2. Toplam antosiyanin tayini” başlığı altında verilen pH-diferansiyel yöntemiyle belirlenmiştir.

3.2.4.2. Antosiyaninlerin elma sularında ısıl stabilitelerinin belirlenmesi

Antosiyaninlerin ısıl stabilitelerinin belirlenmesi amacıyla 100 mL elma suyuna 4 mg antosiyanin içeren ÜKE’den 0.37 g kuru ekstrakt ilave edilmiştir. ÜKE ilave edilerek renklendirilen elma suları 70, 80 ve 90°C sıcaklıklarda farklı sürelerde ısıtılarak antosiyanin kaybı belirlenmiştir. Örnekler, “3.2.4.1. Antosiyaninlerin tampon çözeltilerde ısıl stabilitelerinin belirlenmesi” başlığı altında anlatıldığı şekilde ısıl işleme

maruz bırakıldıktan sonra antosiyanin miktarları pH- diferansiyel yöntemiyle belirlenmiştir.

ÜKE'ları ile renklendirilen elma sularına uygulanan sıcaklık süre normları aşağıda verilmiştir:

- 70°C'de depolamada; 0, 1, 2, 3, 5, 7 ve 9.
- 80°C'de depolamada; 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 ve 8.
- 90°C'de depolamada; 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 ve 7. saatlerde örnek alınmıştır.

3.2.4.2.1. Kinetik katsayıların hesaplanması

Elma sularına ilave edilen ÜKE'larının ısıtım işlem sırasındaki degradasyon reaksiyonlarının birinci derece kinetik modele uygun oldukları daha önce yapılan çalışmalarda belirlenmiştir [78; 79; 80]. Bu nedenle birinci derece kinetiğe uygun reaksiyonu tanımlayan 3.1. No'lu diferansiyel eşitliğin integrali alınarak elde edilen 3.2. No'lu eşitlik kullanılarak kinetik katsayılar hesaplanmıştır [81].

$$-(dC/dt) = k C \quad (3.1.)$$

$$\ln (C/C_0) = -k t \quad (3.2.)$$

C_0 : Antosiyaninin başlangıç konsantrasyonu

C : Antosiyaninin t süre sonundaki konsantrasyonu

k : Reaksiyon hız sabiti

t : Süre (saat)

3.2.4.2.2. Reaksiyon hız sabitinin hesaplanması

Uygulanan her bir sıcaklık için antosiyanin kayıpları “y” eksenine, süreler “x” eksenine yerleştirilerek, yarı logaritmik ölçekli bir grafikte doğrusal bir eğri elde edilmiştir. Bu eğriye linear regresyon analizi uygulanarak eğrinin denklemi hesaplanmıştır. Yine bu eğrinin eğimi kullanılarak ve 3.3 No'lu eşitlik dikkate alınarak reaksiyon hız sabiti hesaplanmıştır [81].

$$k = (\text{eğim}) \times 2.303 \quad (3.3.)$$

3.2.4.2.3. Aktivasyon enerjisinin hesaplanması

Reaksiyonun sıcaklığa olan bağımlılığı, 3.4. No'lu Arrhenius eşitliği kullanılarak aktivasyon enerjisinin (E_a) hesaplanmasıyla belirlenmiştir [80; 81].

$$k = k_0 \times \exp^{-E_a/RT} \quad (3.4.)$$

Hesaplamalarda 3.4. No'lu eşitliğin logaritması alınarak elde edilen 3.5. No'lu eşitlikte gösterilen formu kullanılmıştır:

$$\ln k = [(- E_a/R) \times (1/T)] + \ln k_0 \quad (3.5)$$

Eşitlikte;

- k : Hız sabiti
- k_0 : Frekans faktörü
- E_a : Aktivasyon enerjisi (j /mol)
- R : Gaz sabiti (8.314 J/mol/K)
- T : Sıcaklığı (Kelvin, K) ifade etmektedir.

Bu amaçla, reaksiyonun hız sabitlerinin (k) logaritmaları ($\ln k$) aritmetik ölçekli bir grafiğin “y” eksenine ve sıcaklık değerlerinin (Kelvin) resiprokali ($1/T$) aynı grafiğin “x” eksenine yerleştirilerek, doğrusal bir eğri elde edilmiştir. Arrhenius grafiği adı verilen bu eğriye regresyon analizi uygulanmış ve elde edilen denklemin eğimi ile gaz sabiti çarpılarak, aktivasyon enerjisi hesaplanmıştır [81].

3.2.4.2.4. Yarılanma süresinin ($t_{1/2}$) hesaplanması

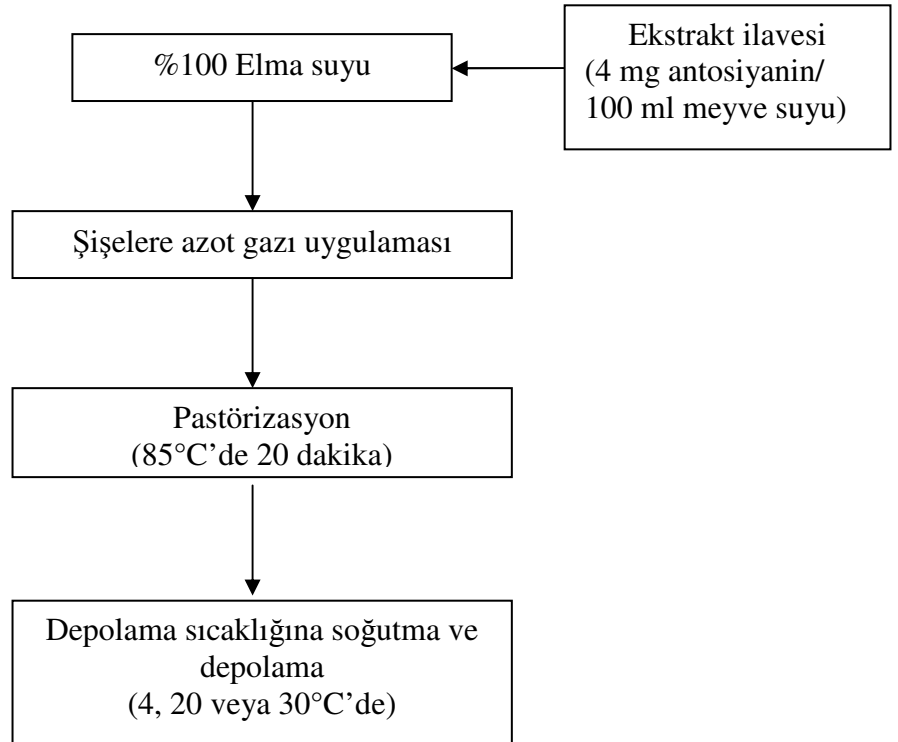
Yarılanma süresi, incelenen bileşiğin %50'sinin kaybolması için gereken süre olup, birinci derece kinetik modele göre gelişen reaksiyonlar için 3.6. No'lu eşitlik baz alınarak hesaplanmıştır [81].

$$t_{1/2} = -\ln (0.5) \times k^{-1} \quad (3.6.)$$

3.2.5. Renklendirilen gıdalarda yapılan analizler

3.2.5.1. Elma Suyu

Yapılan ön denemeler sonucunda duyuşal olarak en çok beğenilen örneklerin her üç antosiyanin kaynağı için de 100 mL elma suyuna 4 mg antosiyanin içeren ekstrakt ilavesiyle elde edildiğı belirlenmiştir. Bu nedenle çalışma kapsamında elma sularına ÜKE'den 0.37 g 4 mg antosiyanin/100 mL düzeyinde ilave edilmiştir. Cam şişelere 125 mL meyve suyu doldurulduktan sonra üzerine azot gazı uygulanmış ve oksijenden ileri gelebilecek bozulmalar elimine edilmeye çalışılmıştır. Sonrasında mikrobiyal gelişmenin önlenmesi için şişeler su banyosunda (Memmert WB-22, Almanya) 85°C'de 20 dakika süreyle pastörize edilerek, depolanacakları sıcaklıklara soğutulduktan sonra depolama işlemine geçilmiştir (Şekil 3.1.). Örnekler 4, 20 ve 30°C sıcaklıkta, depolama sıcaklıklarına göre değişen sürelerde depolanmışlardır. 4°C'deki depolama deneyleri buzdolabında (Vestel, Türkiye) yapılırken, 20 ve 30°C sıcaklıklarda yapılan deneyler için sırası ile Nuve ES 110 ve Nuve EN 055 (Nuve, Türkiye) model inkübatörler kullanılmıştır. Depolama süresi uygulanan sıcaklığa bağılı olarak 4°C'de 6 ay, 20°C'de 3 ay ve 30°C sıcaklıkta ise 2 ay olarak belirlenmiştir.



Şekil 3.1. Elma suyunun renklendirilme akış şeması

Elma suları da renklendirildikleri gün (0. gün), titrasyon asitliği, pH ve suda çözünür kuru madde analizleri yapılmıştır. Farklı sıcaklıklarda depolanan ÜKE'ler ile renklendirilmiş örneklerin depolama süresince antosiyanin miktarı, toplam fenolik

madde içeriği, antioksidan ve antiradikal kapasiteleri belirlenmiştir. Bu örneklerde ayrıca renk tayini ve duyu analizler gerçekleştirilmiştir. Elma sularında gerçekleştirilen analizler aşağıda kısaca açıklanmıştır.

3.2.5.1.1. Titrasyon asitliği tayini

Çalışma kapsamında kullanılan elma sularının ÜKE'ler ile hem renklendirilmeden önce hem de renklendirildikten sonra titrasyon asitliği belirlenmiştir. Örneklerin titrasyon asitliğinin belirlenmesinde elektrometrik titrasyon yöntemi uygulanmıştır. 25 mL elma suyu örneği ayarlı 0.1 N NaOH ile pH değeri 8.1 olana kadar titre edilmiştir. Aşağıdaki formül yardımı ile asitlik % malik asit cinsinden belirlenmiştir [67].

$$\% \text{ Asitlik} = [(A \times 0.006705)/B] \times 100$$

A : Harcanan 0.1 N ayarlı NaOH miktarı (mL)

B : Örnek miktarı (g)

3.2.5.1.2. pH tayini

Örneklerin pH değerleri, önceden kalibre edilmiş pH metrenin probu direkt meyve sularına daldırılarak saptanmıştır [67].

3.2.5.1.3. Suda çözünür kuru madde

Çalışma kapsamındaki elma sularının suda çözünür kuru madde miktarları 20°C sabit sıcaklıkta refraktometre (Reichert AR 700, Amerika) ile belirlenmiştir [67]. Bu amaçla kullanılan refraktometre saf su ile kalibre edildikten sonra örnek cihazın haznesine koyulmuş ve suda çözünür kuru madde miktarları saptanmıştır.

3.2.5.1.4. Toplam fenolik madde tayini

Elma suyu örneklerinin toplam fenolik madde içeriği “3.2.3.1. Toplam fenolik madde tayini” başlığı altında verildiği şekilde belirlenmiş olup, sonuçlar mg GAE/L elma suyu olarak hesaplanmıştır.

3.2.5.1.5. Toplam antosiyanin tayini

Örneklerin antosiyanin içeriği, “3.2.3.2. Toplam antosiyanin tayini” başlığı altında izah edilen pH diferansiyel metoduna göre yapılmış ve tüm örneklerin antosiyanin miktarları, siyanidin 3-glikozit cinsinden belirlenmiştir.

3.2.5.1.6. Antiradikal kapasite tayini

Elma sularının renklendirilmesi amacıyla ilave edilen ekstraktların depolama sürecinde antioksidan kapasiteye olan etkisinin belirlenmesi için meyve suyu örneklerinde antiradikal aktivite tayini “3.2.3.3. Antiradikal kapasite tayini” başlığında anlatıldığı şekilde yapılmıştır. Örneklerin antioksidan kapasiteleri aşağıda verilen eşitlikle hesaplanmıştır:

$$\% \dot{I} = 100 \times (1 - A_{\dot{O}}/A_K)$$

$\dot{I}$: Örnek tarafından inhibe edilen DPPH, %

$A_{\dot{O}}$: Örneğin absorbansı

A_K : Kontrolün absorbansı

3.2.5.1.7. Antioksidan aktivite tayini

Örneklerin antioksidan aktivite tayini “3.2.3.4. Antioksidan aktivite tayini” başlığı altında belirtildiği şekilde yapılmıştır. Elma sularının antioksidan aktiviteleri mg askorbik asit eşdeğeri (AAE)/mL meyve suyu olarak verilmiştir.

3.2.5.1.8. Renk tayini

Meyve suyu, dondurma, şekerleme ve çemen örneklerinin renk özelliklerini belirlemede otomatik renk tayin cihazı (Lovibond RT Series Reflectance Tintometer, İngiltere) kullanılmıştır. Cihaz, standart kalibrasyon skalası ile kalibre edildikten sonra örnekler aletin küvetine yerleştirilip L^* , a^* ve b^* değerleri belirlenmiş ve bu değerler kullanılarak hue açısı (h°) ile kroma değerleri (C^*) hesaplanmıştır. Hue açısı [$h^\circ = \arctan(b^*/a^*)$] örneğin renk tonunun belirlenmesinde, kroma değeri [$C^* = (a^{*2} + b^{*2})^{1/2}$] ise renksel parlaklığın değerlendirilmesinde kullanılmıştır [10]. Hue açısı $0^\circ = \text{kırmızı}$ -

mor, 90° = sarı, 180° = mavimsi-yeşil, 270° = mavi, 360° = 0° olup kırmızı-moru göstermektedir [11; 82].

3.2.5.1.9. Duyusal analiz

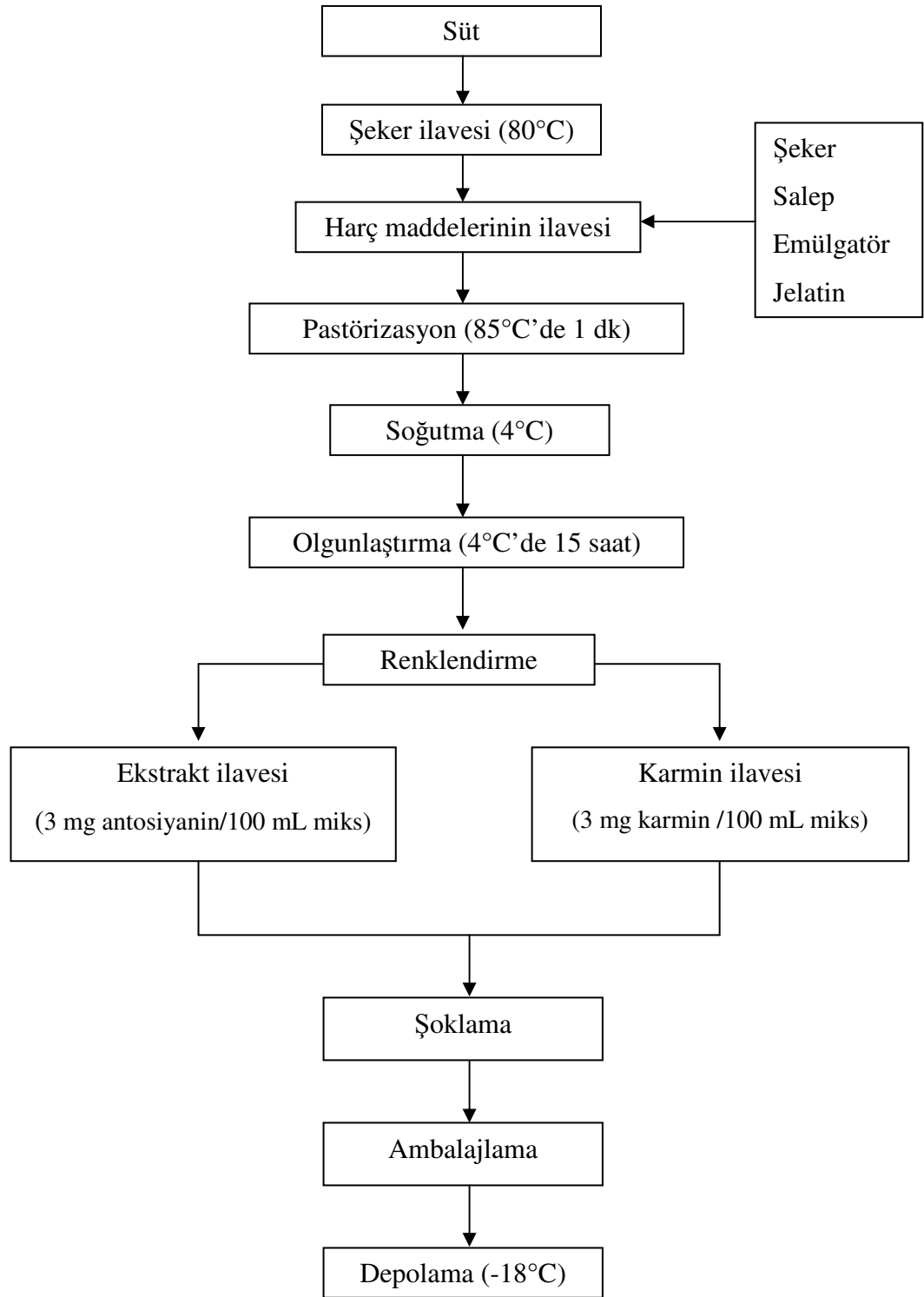
Çalışma kapsamında meyve suyu, dondurma ve şekerleme (lokum) örneklerine ilave edilen ÜKE'lerin duyusal kalite üzerine olan etkilerinin belirlenebilmesi için eğitilmiş 6 panelist ile hedonik skala yöntemine göre duyusal analizler yapılmıştır [83]. Çemen örneklerinde yapılan ön denemelerde katılan ekstraktların duyusal anlamda bir değişime neden olmadığı anlaşıldığından, bu örneklerde duyusal analizler yapılmamıştır.

3.2.5.2. Dondurma

Dondurma örnekleri Erciyes Üniversitesi, Safiye Çıkrıkçıoğlu Meslek Yüksek Okulu Araştırma ve Uygulama Merkezi'nde üretilmiştir (Şekil 3.2.). Dondurma üretimi, Dogan ve Kayacier [84]'in dondurma formülasyonunda bazı modifikasyonlar yapılarak gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla 1000 mL süte 80°C'de 100 g şeker ilave edildikten sonra, 85°C'de 90 g şeker, 5 g salep, 1 g jelatin ve 2.5 g emülgatör ilave edilmiştir. Karışım 85°C'de 1 dk pastörizasyon işlemine maruz bırakılıp, +4°C'ye soğutulmuş ve bu sıcaklıkta 15 saat süreyle olgunlaştırılmıştır. Dondurma miksleri 15 dk karıştırıldıktan sonra -25°C'de şoklanmıştır (Uğur L30, Türkiye).

Dondurma miksleri şoklanmadan önce 3 gruba ayrılmış olup, bunlardan birinci grup içerisine herhangi bir renklendirici madde ilavesi yapılmamış kontrol grubudur. İkinci grup karmin ile renklendirilmiştir. Üçüncü grup ise kırmızı üzüm kabuğundan (ÜKE) elde edilen ekstraktlar ile renklendirilmiştir.

Yapılan ön denemeler sonucunda duyusal olarak en çok beğenilen örneklerin 100 mL dondurma miksine 3 mg antosiyanin içeren ekstrakt ilavesiyle elde edildiği belirlenmiştir. Bu nedenle çalışma kapsamında dondurma mikslerinin 100 mL'si 3 mg antosiyanin içeren ekstrakt (ÜKE'den 0.2775 g) veya standart boya olarak 3 mg karmin ilavesi yapılarak renklendirilmiştir.



Şekil 3.2. Standart dondurma üretim akış şeması

Örnekler -18°C 'de 3 ay süreyle depolanmış ve ayda bir örnek alınmıştır. Dondurma örneklerinin üretildiği gün (0. gün), örneklerin pH değeri, kuru madde ve kül miktarları da belirlenmiştir. Depolama süresince dondurmaların toplam fenolik madde miktarı ile

antiradikal aktivitelerindeki değişimin yanı sıra renk değerleri ve duyuşsal beğenileri de incelenmiştir.

3.2.5.2.1. pH tayini

Örneklerin pH değerleri, analiz öncesinde uygun tampon çözeltilerle kalibre edilen pH metre kullanılarak belirlenmiştir. Bu amaçla dondurma miksinden 10 g tartılarak üzerine 90 mL saf su ilave edilmiş ve manyetik karıştırıcı yardımı ile homojen hale getirildikten sonra pH değeri saptanmıştır [22].

3.2.5.2.2. Kuru madde tayini

Dondurma örneklerinin kuru madde miktarlarının belirlenmesinde AOAC [85] standart prosedürü kullanılmıştır. Bu amaçla sabit tartıma getirilen ve daraları alınmış tartım kaplarına 1-2 g dondurma miksi tartılmış ve 105°C’deki etüvde (Nüve FN300, Türkiye) örnekler 4 saat süreyle kurutulmuşlardır. İşlem sonrasında desikatöre alınarak, oda sıcaklığına soğutulan örneklerin ağırlıkları belirlenerek, aşağıdaki formül yardımıyla % kuru madde miktarları hesaplanmıştır.

$$\%KM = [(G_2 - G) / (G_1 - G)] \times 100$$

% KM : Örneğin kuru madde yüzdesi

G : Tartım kabının darası

G₁ : Örnek+ tartım kabının darası

G₂ : Kurutma sonrası kuru örnek+ tartım kabının darası

3.2.5.2.3. Kül miktarı tayini

Örneklerin kül miktarlarının belirlenmesinde Kurt ve ark. [86]’nın prosedürü izlenmiştir. Bu amaçla porselen kroşeler 550°C sıcaklıkta sabit tartıma getirilerek, içlerine 1-2 g örnek tartılmış ve kül fırınında (Protherm PLF 12015 Electrical Furnaces, Türkiye) meydana gelebilecek sıçramaları önlemek amacıyla 105°C’de 3 saat tutularak, nemin uzaklaşması sağlanmıştır. Kuruyan örnekler daha sonra sıcaklık tedricen arttırılarak 550°C’de siyah rezidü kalmayıncaya kadar yakılmıştır. İşlem

sonunda krozeler desikatöre alınarak soğutulmuş ve aşağıdaki formül yardımı ile % kül miktarları belirlenmiştir.

$$\% \text{ Kül} = [(A_2 - A)/(A_1 - A)] \times 100$$

% Kül : Örneğin kül yüzdesi

A : Porselen krozenin darası

A₁ : Örnek + porselen krozenin darası

A₂ : Yakma sonrası kül + porselen krozenin darası

3.2.5.2.4. Toplam fenolik madde tayini

Dondurma örneklerinin toplam fenolik madde içeriği Hwang ve ark. [22], tarafından verilen metotta bazı modifikasyonlar yapılarak belirlenmiştir. Bu amaçla 10 g dondurma örneği üzerine 90 mL %50'lik metanol ilave edilerek 25°C sıcaklıktaki çalkalamalı su banyosunda 15 saat süreyle ekstraksiyona tabi tutulmuştur. Süre sonunda örnekler vakum altında önce kaba filtreden ardından da Whatman No:4'ten süzülmüştür. Ekstrakte edilen bu örnekler toplam fenolik madde tayininin yanı sıra antiradikal aktivite tayininde de kullanılmıştır. Filtrattan bir tüpe 0.2 mL aktarılmış ve üzerine 1.8 mL saf su, 1 mL Folin-Ciocalteu ayırıcı ve 2 mL %20'lik doymuş Na₂CO₃ ilave edilmiştir. Örnekler oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edildikten sonra spektrofotometrede (Varian Cary 100 Conc UV-Visible, Amerika) 735 nm dalga boyunda absorban değerleri belirlenmiştir.

Hesaplamada gallik asitten 0-250 mg/L sınırları düzeyinde bir seri standart çözelti hazırlanmış ve örneklerin toplam fenolik madde miktarları bu şekilde hazırlanan standart kurve yardımı ile hesaplanmıştır.

3.2.5.2.5. Antiradikal aktivite tayini

Dondurma örneklerinin antiradikal aktivitesi Hwang ve ark. [22], tarafından verilen metotta bazı modifikasyonlar yapılarak belirlenmiştir. “3.2.5.2.4. Toplam fenolik madde tayini” başlığı altında anlatıldığı üzere ekstrakte edilen örneklerden 0.5 mL alınarak üzerine önce 1.2 mL metanol sonrasında ise metanolde hazırlanan 0.1 mM DPPH radikalinden 1.5 mL ilave edilerek, oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edilmiştir.

Örneklerin 517 nm’de absorbans değerleri belirlenmiş olup, DPPH radikalini inhibisyon kapasitesi aşağıdaki formül yardımıyla hesaplanmıştır:

$$\% \text{ İ} = 100 \times [(K-A)/K] \times 100$$

İ : Örnek tarafından inhibe edilen DPPH, %

K : Örnek içermeyen DPPH’ in absorbansı

A : Örneğin absorbansı

3.2.5.2.6. Renk Tayini

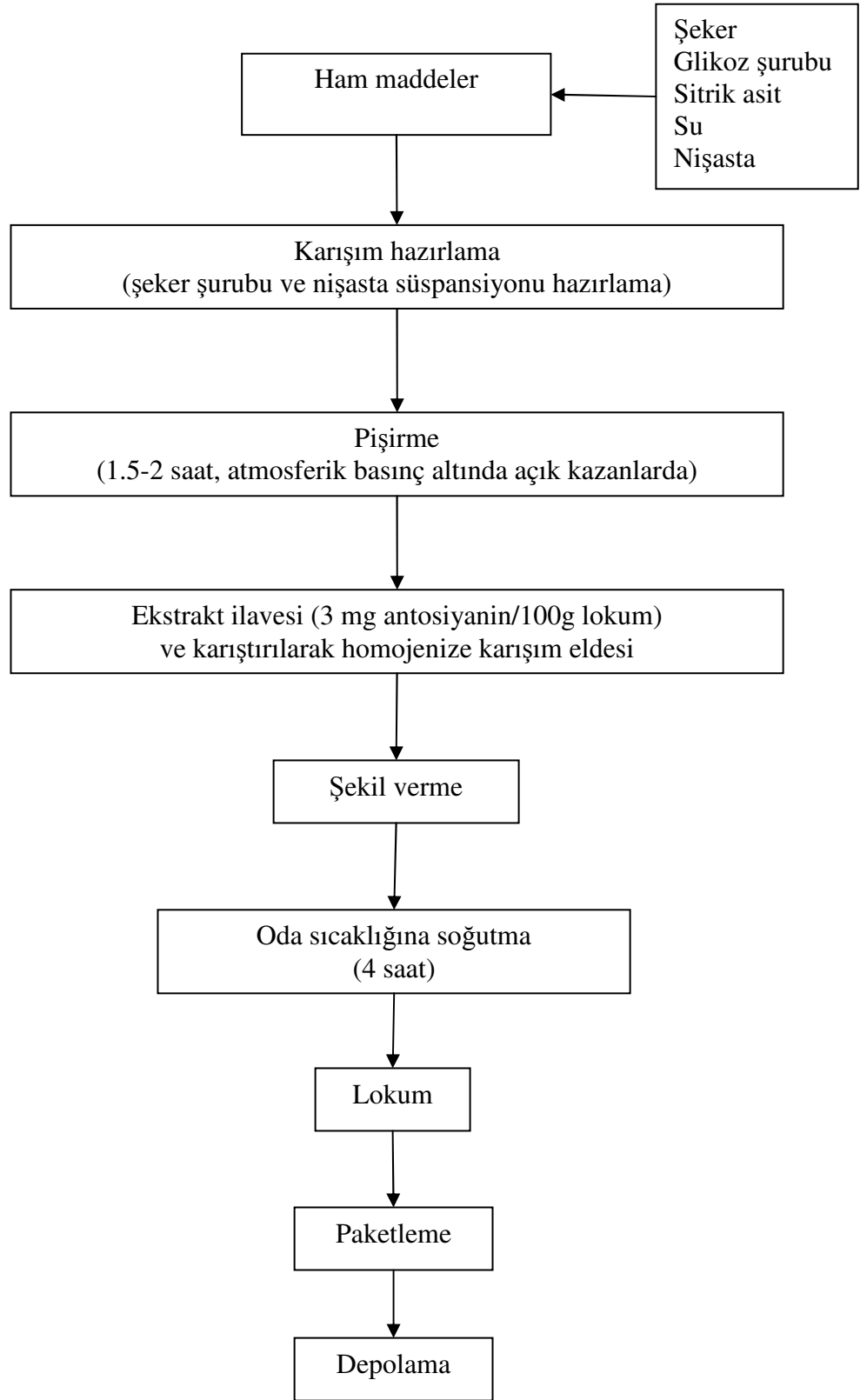
Dondurma örneklerinin renk analizi “3.2.5.1.8. Renk tayini” başlığı altında belirtildiği şekilde yapılmıştır.

3.2.5.2.7. Duyusal Analiz

Dondurma örneklerinde “3.2.5.1.9. Duyusal analiz” başlığı altında verildiği şekilde yapılmıştır.

3.2.5.3. Şekerleme

Şekerleme örnekleri, Çadırcı Gıda San. Tic. Ltd. Şti. (Kayseri) üretim tesislerinde, bu firma tarafından şekerleme imalatında kullanılan formülasyon kullanılarak üretilmişlerdir [43] Çalışma kapsamındaki şekerleme üretiminde %8.1 nişasta, %27.04 su, %54.09 glikoz şurubu, %10.82 şeker ve %0.04 sitrik asitten oluşan lokum formülasyonu kullanılmıştır (Şekil 3.3.).



Şekil 3.3. Standart şekerleme (lokum) üretim akış şeması

Bu amaçla öncelikle şeker bir miktar suda çözündürülerek, bakır kaynatma kazanına koyulmuş ve karıştırılarak ısıtılmıştır. Sitrik asit ayrı bir kapta bir miktar suda çözündürülmüş ve suyun geri kalan kısmında ise nişasta süspansiyeye hale getirilmiştir. Sonra nişasta süspansiyonu ve asit de şeker çözeltisine katılmış ve karışım karıştırılarak kaynatılmıştır. Kitle belirli bir kıvama erişince (kazandan alınıp soğutulan bir miktar örnek parmaklar arasında yuvarlanıp parmaklar açıldığında örnek iki parmağa birden yapışıp uzamadığı, şeklini koruyarak parmaklardan birinde kaldığı zaman), ön deneme ile belirlenen miktar olan 3 mg antosiyanin 100 g şekerleme örneğine ilave edilerek, örnekler homojen bir renk elde edilene kadar karıştırılmıştır. Bu amaçla 60° brikse ayarlanan ÜKE'den 0.4792 g ilave edilmiştir. Bir grup örnek (kontrol grubu) ise 8 ppm (8 mg karmin/1000 g lokum) karmin ile renklendirilmiştir. Sonrasında plastik kaplara 150'şer g örnek koyulmuş ve oda sıcaklığında soğutulduktan sonra bu örnekler 20°C'deki bir inkübatörde (Nuve ES 110) 6 ay süreyle depolanmış ve analizler için ayda bir örnek alınmıştır. Bu örneklerde renk analizi ile duyu analizi yapılmıştır.

3.2.5.3.1. pH analizi

5 g örnek üzerine 10 mL saf su ilave edilerek homojen hale getirilen örneklerin pH değerleri pH metre kullanılarak belirlenmiştir [87].

3.2.5.3.2. Kuru madde analizi

Örnekler sabit tartıma gelene kadar 70°C'deki vakumlu etüvde (Nüve EV 018, Türkiye) kurutulmuş ve % kuru madde miktarları belirlenmiştir [67].

3.2.5.3.3. Kül miktarı tayini

Şekerleme örnekleri öncelikle meydana gelebilecek sıçramaları önlemek amacıyla 105°C'de ön kurutma yapılarak örneklerden nemin uzaklaşması sağlanmıştır. Kuruyan örnekler daha sonra sıcaklık tedricen artırılarak 550°C sıcaklıkta örnekte siyah rezidü kalmayınca kadar yakılmış ve örneklerin % kül miktarları belirlenmiştir [67].

3.2.5.3.4. Renk tayini

Şekerleme örneklerinin renk analizi “3.2.5.1.8. Renk tayini” başlığı altında belirtildiği şekilde yapılmıştır.

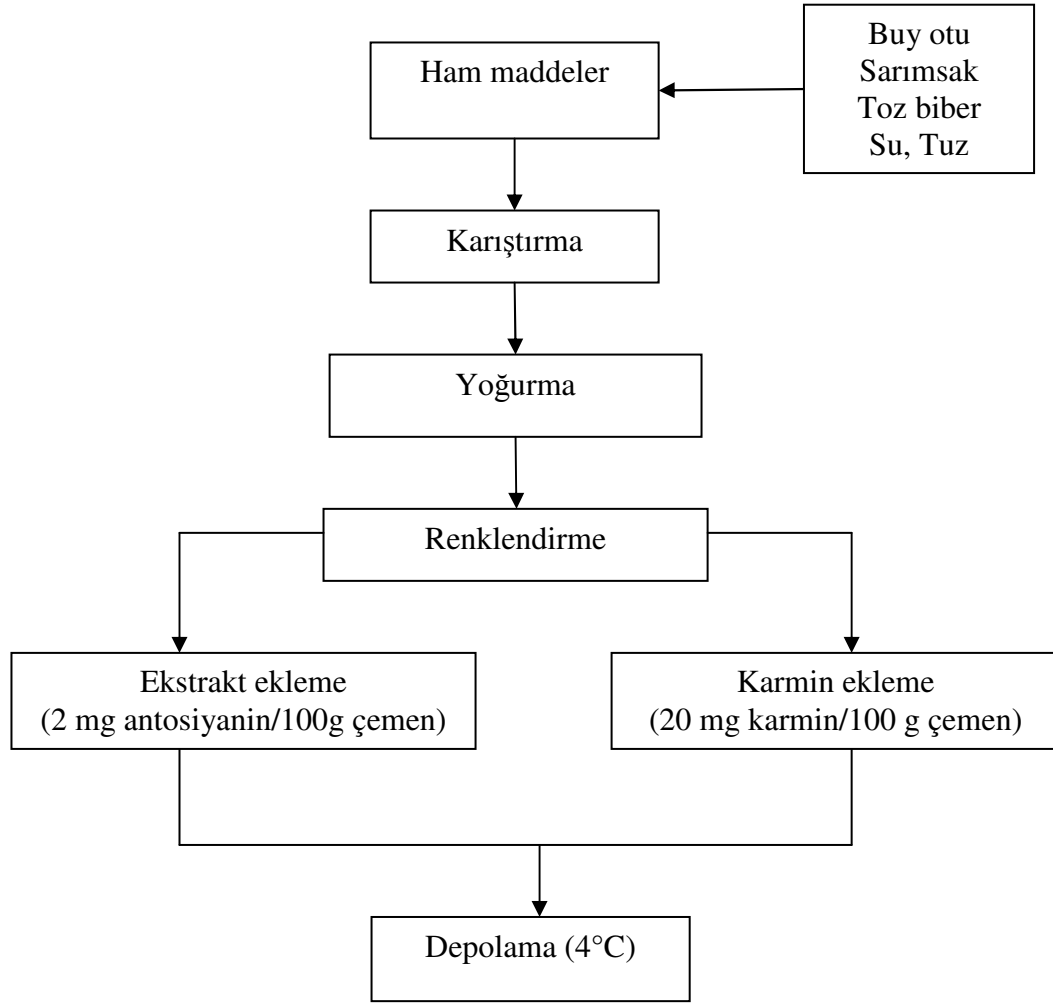
3.2.5.3.5. Duyusal analiz

Şekerleme örneklerinin duyusal analizleri “3.2.5.1.9. Duyusal analiz” başlığı altında aktarıldığı şekilde yapılmıştır.

3.2.5.4. Çemen

Araştırmada kullanılan ve Yetim et al. [88]’ın çemen formülasyonunda bazı modifikasyonlar yapılarak üretilen çemen örnekleri, %28.1 buyotu, %20.4 sarımsak, %8.7 acı toz biber, %1 tuz ve %41.8 oranında suyun karıştırılıp yoğrulması ile elde edilmiştir (Şekil 3.4.).

Yapılan ön denemeler sonucunda 2 mg antosiyanin içeren ÜKE ilave edilmiş çemen örneklerinin duyusal olarak en çok beğenilen örnekler olduğu saptanmış ve çalışmada çemenlerin renklendirilmesinde bu konsantrasyon kullanılmıştır. Bu amaçla saf su ile 60° brikse ayarlanan ÜKE’den 0.3195 g ilave edilmiştir. Bir grup örneğe renklendirici ilavesi yapılmazken, bir diğer gruba ise 0.020 g/100 g çemen hamuru düzeyinde karmin ilavesi yapılarak renklendirme işlemi gerçekleştirilmiştir. Karmin konsantrasyonu, halen piyasaya arz edilen çemenlerdeki miktar baz alınarak seçilmiştir. Çemen örneklerinden 50’şer g alınarak küçük plastik kaplara yerleştirilmiş ve ambalajların üzerleri streç filmle sıkı bir şekilde kapatılmıştır. Çemen örneklerinin 0. gün pH değerleri, kuru madde ve kül miktarları belirlenmiştir. Yine 4°C sıcaklıktaki buzdolabında (Vestel, Türkiye) 3 hafta süreyle depolanan örneklerde 0., 1., 3., 5., 7., 14. ve 21. günlerde renk analizleri yapılmıştır. Yapılan ön denemelerde çemen örneklerinin duyusal anlamda farklılık arz etmemesi nedeni ile çalışmada duyusal analiz yapılmamasına karar verilmiş ve bu analiz deneme planından çıkarılarak, depolama süresince sadece renk analizler yapılmıştır.



Şekil 3.4. Standart çemen üretim akış şeması

Antosiyaninlerin düşük pH değerlerinde daha stabil olmaları nedeni ile çemen örneklerinin hem doğal pH'larında hem de pH değerlerinin asit ilavesiyle 3'e ayarlanması halinde renk ölçümlerinin gerçekleştirilmesi amaçlanmıştır. Ancak, yapılan ön denemelerde çemen örneklerine sitrik asit ilave edilerek pH değerinin 3'e ayarlanması sonucu örneklerin çok ekşi bulunması nedeniyle duysal olarak kabul görmediği belirlenmiş ve bu çalışma da deneme planından çıkarılmıştır.

3.2.5.4.1. pH analizi

10 g örnek üzerine 10 mL saf su ilave edilerek homojen hale getirilen örneklerin pH değerleri pH metre kullanılarak belirlenmiştir [88].

3.2.5.4.2. Kuru madde analizi

Örnekler sabit tartıma gelene kadar 105°C'deki etüvde kurutulmuş ve % kuru madde miktarları belirlenmiştir [88].

3.2.5.4.3. Kül miktarı tayini

Çemen örnekleri öncelikle meydana gelebilecek sıçramaları önlemek amacıyla 105°C’de 3 saat tutularak, örneklerden nemin uzaklaşması sağlanmıştır. Kuruyan örnekler daha sonra sıcaklık tedricen artırılarak 650°C sıcaklıkta örnekte siyah rezidü kalmayıncaya kadar yakılmış ve örneklerin % kül miktarları belirlenmiştir [67].

3.2.5.4.4. Renk Tayini

Çemen örneklerinin renk analizi “3.2.5.1.8. Renk tayini” başlığı altında belirtildiği şekilde yapılmıştır.

4. BÖLÜM

ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Materyallerin Nitelikleri

Araştırmada kullanılan üzüm posaları laboratuara getirildiğinde nem kaybını engellemek amacı ile hiç zaman kaybetmeden 3 adet 1'er kg ağırlığında posa tartılarak; kabuk, sap ve çekirdek kısımları özenle ayrılmıştır. Bir kg'lık üzüm posasının kabuk miktarı, 545.0 ± 7.1 g olarak belirlenirken, çekirdek ve sap miktarlarının sırasıyla 280.0 ± 10.8 g ve 175.0 ± 8.2 g olduğu bulunmuştur. Sonuçlar üzüm posasının yaklaşık %54.5'inin kabuk, %28'inin çekirdek ve %17.5'inin ise sap olduğunu ortaya koymaktadır. Yapılan bir çalışmada preslenmiş üzümde elde edilen cibrenin %50'sinin kabuk %25'inin ise çekirdek olduğu bildirilmektedir [1]. Bir diğer çalışmada ise üzüm posasının kuru ağırlık üzerinden %38-52 kadarının çekirdek olduğu aktarılmaktadır [2]. Bu sonuçlar dikkate alındığında Öküzgözü cinsi üzümlerden elde edilen posanın kabuk oranının nispeten daha yüksek olduğu sonucuna ulaşılmaktadır. Bu sonuçlar, araştırmada kullanılan Öküzgözü cinsine ait posanın miktar olarak antosiyanin üretimine uygun bir kaynak olabileceğini göstermektedir.

4.2. Üzüm Kabuğunun Bazı Analitik Özellikleri

Bu araştırmada kullanılan antosiyanin kaynaklarında Tablo 4.1.'de belirtilen diğer bazı analizler yapılarak, materyallerin bazı kimyasal özellikleri ve genel bileşim unsurları belirlenmiştir.

Tablo 4.1. Kırmızı üzüm kabuğunun bazı analitik özellikleri

Analitik özellikler	Üzüm kabuğu
% Kuru Madde	47.80 ± 0.20
% Kül	3.80 ± 0.04
% Titrasyon asitliği*	1.06 ± 0.01
pH	3.51 ± 0.04
% Toplam şeker	3.70 ± 0.17
% İndirgen şeker	3.33 ± 0.01

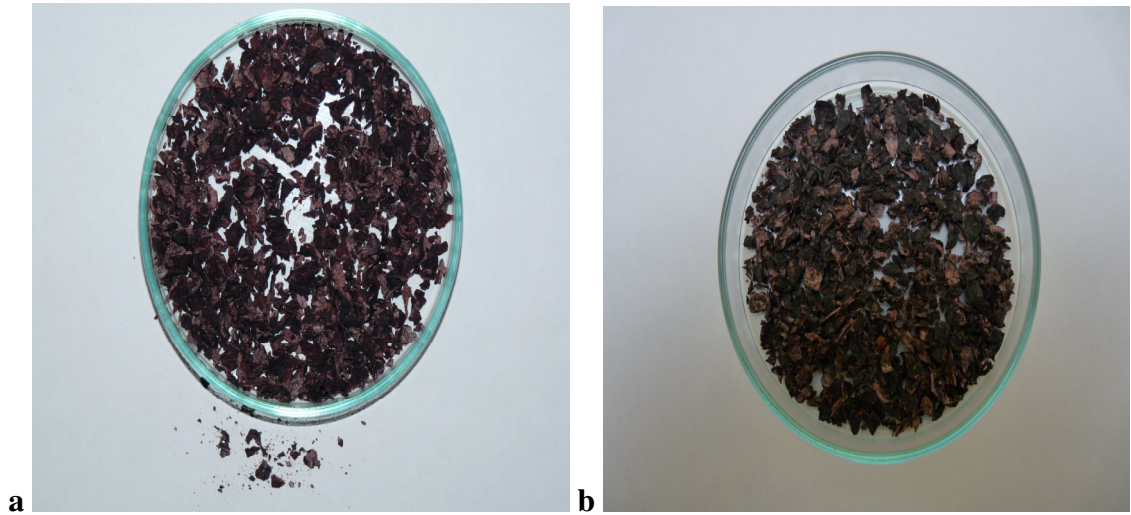
*Üzüm kabuğunda tartarik asit cinsinden hesaplanmıştır

Üzüm kabuklarının %47.80 değerinde kuru madde içeriğine, %3.80 kül içeriğine, %1.06 titrasyon asitliğine ve %3.70 toplam şeker miktarına sahip olduğu belirlenmiştir.

4.3. Farklı Ekstraksiyon Yöntemleri ile Elde Edilen Üzüm Kabuğu Ekstraktlarının Biyoaktif Özelliklerinin Belirlenmesi

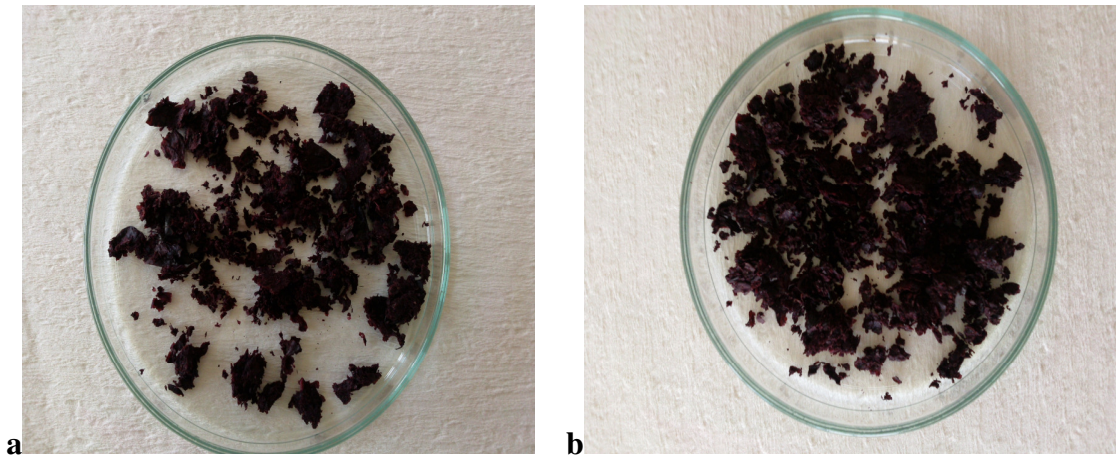
Çalışma kapsamında ÜKE üretiminde hammadde olarak kullanılan üzüm kabuğundan klasik ekstraksiyon yöntemi ve ultrason teknikleri ile ekstraktlar elde edilmiştir. Bu amaçla çözügen olarak saf su veya AES (%0.1 HCl ile asitlendirilmiş etanollü su (1:1 etanol:su)) karışımı kullanılmıştır. Ultrason ve klasik ekstraksiyon uygulamalarında da saf su kullanılarak ekstraktlarda çözügen farklılığından kaynaklanabilecek farklar elimine edilmeye çalışılmıştır.

Üzüm kabuklarına ultrason ve klasik ekstraksiyon uygulanması ve çözügen olarak AES veya sadece suyun kullanılması halinde örneklerin son halleri sırası ile Şekil 4.1.'de ve Şekil 4.2.'te verilmiştir.



Şekil 4.1. Üzüm kabuğu örneklerinin ultrason ve klasik ekstraksiyon yöntemleri ve çözügen olarak AES karışımının kullanılması halinde arta kalan posalarının görünümü [a) Üzüm kabuğu ultrason, b) Üzüm kabuğunun klasik ekstraksiyon yöntemleri uygulandıktan sonraki görünümleri]

Şekil 4.1.'den ve Şekil 4.2.'den de üzüm kabuğunun %0.1 HCl ile asitlendirilmiş AES (1:1) karışımı veya sadece suyun çözügen olarak kullanılması durumunda ekstraksiyonlar sonunda arta kalan posalar arasında pek bir farklılık göze çarpmamaktadır. Ultrason tekniği veya klasik ekstraksiyon yöntemleri uygulandıktan sonra arta kalan posaların görünümleri de birbirinden farklı görünmemektedir.



Şekil 4.2. Üzüm kabuğu örneklerinin ultrason ve klasik ekstraksiyon yöntemleri ve çözgen olarak suyun kullanılması halinde arta kalan posalarının görünümü [a)Üzüm kabuğu ultrason, b) Üzüm kabuğunun klasik ekstraksiyon yöntemleri uygulandıktan sonraki görünümü]

4.3.1. Farklı ekstraksiyon yöntemleri ile elde edilen üzüm kabuğu ekstraktlarının verimleri

Ultrason ve klasik ekstraksiyon yöntemleri ile çözgen olarak su veya AES karışımının kullanılması sonucu elde edilen ekstraktların verimleri Tablo 4.2.'de görülmektedir.

Tablo 4.2. Farklı ekstraksiyon yöntemleri ile elde edilen ÜKE'lerinin % verimleri

Solvent	Ekstraksiyon yöntemi	
	Ultrasonik ekstraksiyon	Klasik ekstraksiyon
Su	6.32±0.06	6.36±0.06
AES*	6.40±0.08	6.54±0.00

*AES: %0.1 HCl ile asitlendirilmiş etanol:su (1:1) karışımı

Üzüm kabuğunun ultrason ve klasik ekstraksiyon yöntemlerinde çözgen olarak su kullanılması durumunda ekstraktlarının veriminin sırası ile %6.32 ve %6.36 olduğu tespit edilmiştir. Üzüm kabuklarının AES verimlerinin su ekstraktlarından daha düşük olduğu saptanmıştır.

4.3.2. Farklı ekstraksiyon yöntemleri ile elde edilen üzüm kabuğu ekstraktlarının toplam fenolik madde içerikleri

Üzüm kabuklarına ultrason ve klasik ekstraksiyon uygulanması sonucu elde edilen ekstraktların toplam fenolik madde içerikleri (mg GAE/g kuru ekstrakt) Tablo 4.3.'de verilmiştir. Üzüm kabuğundan fenolik madde ekstraksiyonunda ultrason ve klasik ekstraksiyon uygulamaları arasında önemli bir fark olmadığı belirlenirken, kullanılan

çözgenin toplam fenolik madde miktarı üzerine olan etkisinin önemli olduğu saptanmıştır.

Tablo 4.3. Farklı ekstraksiyon yöntemleri ile elde edilen ÜKE'lerinin fenolik madde miktarları (mg GAE/g kuru ekstrakt)

Solvent	Ekstraksiyon yöntemi	
	Ultrasonik ekstraksiyon	Klasik ekstraksiyon
Su	77.56±0.38	78.83±1.19
AES*	100.20±1.45	101.90±1.42

*AES: %0.1 HCl ile asitlendirilmiş etanol:su (1:1) karışımı.

4.3.3. Farklı ekstraksiyon yöntemleri ile elde edilen üzüm kabuğu ekstraktlarının antosiyanin miktarları

Tablo 4.4.'de farklı ekstraksiyon yöntemleri ile elde edilen ÜKE'nin antosiyanin içerikleri verilmiştir (mg siy-3-glikozit/g kuru ekstrakt). Tüm örneklerde ekstraksiyonda kullanılan çözgen farklılığının ekstraktların antosiyanin miktarı üzerine etkisinin önemli olduğu, suya kıyasla AES karışımının antosiyaninleri daha iyi ekstrakte ettiği belirlenmiştir.

Üzüm kabuğunun su ekstraktlarının, yöntem olarak ultrason ve klasik ekstraksiyon yöntemleri uygulanması halinde antosiyanin miktarlarının sırası ile 6.96 ve 6.93 mg siy-3-glikozit/g kuru ekstrakt düzeyinde olduğu tespit edilmiştir.

Tablo 4.4. Farklı ekstraksiyon yöntemleri ile elde edilen ÜKE'lerinin antosiyanin miktarları (mg siy-3-glikozit/g kuru ekstrakt)

Solvent	Ekstraksiyon yöntemi	
	Ultrasonik ekstraksiyon	Klasik ekstraksiyon
Su	6.96±0.03	6.93±0.02
AES*	16.17±0.32	10.81±0.15

*AES: %0.1 HCl ile asitlendirilmiş etanol:su (1:1) karışımı.

4.3.4. Farklı ekstraksiyon yöntemleri ile elde edilen üzüm kabuğu ekstraktlarının antioksidan kapasiteleri

Farklı ekstraksiyon yöntemleri ve çözgenlerin kullanılması halinde ekstraktların antioksidan aktivitelerinde meydana gelen değişimler Tablo 4.5.'de verilmiştir. 1 g kuru ekstraktında 54.50 mg askorbik asit eşdeğeri (AAE) antioksidan kapasiteye sahip olan üzüm kabuğunun ultrason ekstraktlarının, en yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduğu

belirlenmiştir. Ultrason tekniği ile elde edilen ÜKE'nin hem su hem de AES ekstraktlarının antioksidan aktivitelerinin, klasik ekstraksiyon yöntemi ile elde edilen ekstraktlarından daha yüksek olduğu saptanmıştır (Tablo 4.5.).

Tablo 4.5. Farklı ekstraksiyon yöntemleri ile elde edilen ÜKE'lerinin antioksidan kapasiteleri (mg AAE/g kuru ekstrakt)

Solvent	Ekstraksiyon yöntemi	
	Ultrasonik ekstraksiyon	Klasik ekstraksiyon
Su	44.50±0.78	42.47±0.69
AES*	54.50±0.15	51.84±0.27

*AES %0.1 HCl ile asitlendirilmiş etanol:su (1:1) karışımı.

4.3.5. Farklı ekstraksiyon yöntemleri ile elde edilen üzüm kabuğu ekstraktlarının antiradikal kapasiteleri

ÜKE'nin DPPH radikalının %50'sini inaktive edebilmeleri için gerekli ekstrakt miktarları ($\mu\text{g/mL}$) IC₅₀ değeri olarak Tablo 4.6.'da yer almaktadır. Genel olarak AES ekstraktlarının su ekstraktlarından daha yüksek antiradikal aktiviteye sahip oldukları belirlenmiş olup, Üzüm kabuğunun klasik ekstraksiyon yöntemi ile elde edilen ekstraktlarının ultrason tekniğiyle elde edilen ekstraktlara kıyasla biraz daha yüksek antiradikal kapasitelere sahip oldukları belirlenmiştir (Tablo 4.6.).

Tablo 4.6. Farklı ekstraksiyon yöntemleri ile elde edilen ÜKE'lerinin antiradikal kapasiteleri (IC₅₀, $\mu\text{g/mL}$)

Solvent	Ekstraksiyon şekli	
	Ultrasonik ekstraksiyon	Klasik ekstraksiyon
Su	160.66±1.04	158.01±7.99
AES*	138.26±4.02	115.87±2.55

*AES: %0.1 HCl ile asitlendirilmiş etanol:su (1:1) karışımı.

4.3.6. Üzüm kabuğu ekstraktlarının antimikrobiyal özellikleri

4.3.6.1. Farklı ekstraksiyon yöntemleri ile elde edilen üzüm kabuğu ekstraktlarının antimikrobiyal aktivitelerinin agar difüzyon yöntemi ile belirlenmesi

Üzüm kabuğunun farklı ekstraksiyon yöntemleri uygulanarak (ultrason ve klasik ekstraksiyonlar) ve çözgen olarak su veya AES kullanılarak elde edilen ekstraktlarının agar difüzyon yöntemi ile belirlenen antimikrobiyal analiz bulguları sırası ile Tablo 4.9.'da, Tablo 4.10.'da ve Tablo 4.7.'de verilmiştir. ÜKE'nin *S. cerevisiae* ve *C. albicans* üzerine herhangi bir antimikrobiyal etkide bulunmadığı belirlenmiştir. Ekstraktların bu etkinliğinin, genel olarak konsantrasyonlarındaki artışa bağlı olarak

yükseldiği belirlenmiştir. Genel olarak AES ekstraktlarının, su ekstraktlarından daha yüksek bir antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu tespit edilmiştir. AES ekstraktları su ekstraktlarından daha aktif olmak üzere ÜKE'nin, *L. monocytogenes*, *B. cereus* FMC 19, *B. cereus* F2, *P. aeurogenes*a başta olmak üzere *E. coli* O157: H7, *B. subtilis* ATCC, *S. thymrium* ve *S. aureus* ATCC 1135 üzerine antimikrobiyal etkisinin olduğu saptanmıştır.

Tablo 4.7. Farklı ekstraksiyon yöntemleri ile elde edilen ÜKE'lerinin bazı maya ve bakterilere karşı inhibitif etkileri (inhibisyon zonu, mm)

Mikroorganizma	Ultrasonik Ekstraksiyon								Klasik Ekstraksiyon							
	Su ekstraktı				AES ekstraktı*				Su ekstraktı				AES ekstraktı*			
	Konsantrasyon (%)								Konsantrasyon (%)							
	1	2.5	5	10	1	2.5	5	10	1	2.5	5	10	1	2.5	5	10
<i>L. monocytogens</i>	-	-	6.5±0.7	11.5±0.7	-	8.5±0.7	15.5±0.7	19.0±1.4	-	-	9.0±1.4	17.5±0.7	-		9.0±1.4	15.5±2.1
<i>S. typhimurium</i>	-	-	-	7.0±0.0	-	6.0±0.0	7.5±0.7	11.5±0.7	-	-	-	-	-		6.0±0.0	10.5±0.7
<i>E. coli</i> 0157:H7	-	-	-	-	-	6.0±0.0	9.5±0.7	12.5±2.1	-	-	-	7.5±0.5	-	6.0±0.0	10.0±0.0	13.5±0.7
<i>E. coli</i> ATCC 25922	-	-	-	6.0±0.0	-	-	-	-	-	-	-	6.5±0.7	-	-	-	6.5±0.7
<i>S. aureus</i> ATCC 1135	-	-	-	3.0±4.2	-	-	6.5±0.7	14.0±1.4	-	-	-	6.0±0.0	-	-	9.5±0.7	13.5±0.7
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	-	-	-	13.0±1.4	-	-	9.5±0.7	13.0±1.4	-	-	-	-	-	6.0±0.0	8.5±2.1	14.0±2.8
<i>B. cereus</i> F2	-	8.0±2.8	10.5±2.1	13.0±4.2	-	-	11.5±0.7	15.5±0.7	-	10.0±2.8	12.5±2.1	16.5±2.1	-	7.5±0.7	9.5±0.7	13.5±2.1
<i>B. cereus</i> FMC 19	-	-	-	9.5±0.7	6.0±0.0	8.5±0.7	10.5±0.7	16.5±0.7	-	3.0±4.2	7.0±0.0	10.5±0.7	-	7.5±0.7	10.5±0.7	14.5±0.7
<i>B. subtilis</i> ATCC	-	-	-	-	-	-	-	13.5±0.7	-	-	10.5±0.7	7.5±0.7	-	8.5±0.7	12.0±2.8	18.5±2.1
<i>B. brevis</i>	-	-	-	9.0±1.4	-	-	8.5±0.7	11.5±0.7	-	-	-	8.5±0.7	-	-	-	11.5±0.7
<i>P. aurogenes</i>	-	7.5±2.1	9.0±1.4	12.5±0.7	-	-	-	13±1.4	-	-	10.5±2.1	7.0±1.4	-	8.5±0.7	13.0±1.4	16.0±2.8
<i>A. hydrophila</i>	-	-	-	6.5±0.7	-	-	-	7.5±0.7	-	-	-	-	-	-	7.5±0.7	10.5±0.7
<i>Y. enterocolitica</i>	-	-	-	6.5±0.7	-	-	9.0±0.0	6.5±0.7	-	-	-	6.0±0.0	-	-	-	-
<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. albicans</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

*:AES %0.1 HCl ile asitlendirilmiş etanol:su (1:1) karışımı, -: Etkisi gözlenmedi

4.3.6.2. Üzüm kabuğu ekstraktlarının elma suyunda *E. coli* O157:H7 ve *B. cereus* F2 üzerine antimikrobiyal etkisinin saptanması

Starking elma çeşidinden laboratuarda üretilen elma sularına çalışma kapsamında klasik ekstraksiyon yöntemi ile elde edilen ÜKE'den depolanan elma sularının renklendirildiği konsantrasyonda (4 mg antosiyanin/100 mL elma suyu) ilave edilmiş ve 2 farklı sıcaklıkta (4 ve 20°C) 96 saat süreyle inkübe edilerek, *E. coli* O157:H7 ve *B. cereus* F2 üzerine olan antimikrobiyal etkileri incelenmiştir. Elde edilen bulgular (log kob/mL) Tablo 4.8.'de görülmektedir. Elma sularının pH değerleri mikroorganizmaların gelişimi üzerine etkili faktörlerden biri olup, ÜKE ile renklendirilen örneklerde 3.98 olarak bulunmuştur.

Tablo 4.8. 4 ve 20°C sıcaklıklarda inkübe edilen elma sularına ilave edilen ÜKE'lerinin *E. coli* O157:H7 ve *B. cereus* F2 üzerine inhibitif etkileri (log kob/mL)

	Sıcaklık (°C)	Örnek	Mikroorganizma sayısı (log kob/mL)				
			1. saat	24. saat	48. saat	72. saat	96. saat
<i>E. coli</i> O157:H7	4	Kontrol	7.81±0.14	7.17±0.05	7.00±0.09	6.64±0.10	5.52±0.15
		ÜKE	7.92±0.09	7.16±0.51	6.73±0.09	6.68±0.03	4.39±0.10
	20	Kontrol	8.13±0.03	7.11±0.03	6.21±0.06	5.85±0.17	2.77±0.15
		ÜKE	7.79±0.14	6.90±0.06	5.92±0.15	5.83±0.06	<1
<i>B. cereus</i> F2	4	Kontrol	4.77±0.15	2.92±0.15	2.85±0.17	2.92±0.15	3.04±0.09
		ÜKE	4.89±0.24	3.07±0.30	3.04±0.09	3.24±0.07	2.97±0.20
	20	Kontrol	4.82±0.24	3.07±0.30	3.10±0.20	2.92±0.29	2.89±0.24
		ÜKE	4.92±0.15	4.70±0.15	2.97±0.20	2.77±0.15	2.77±0.15

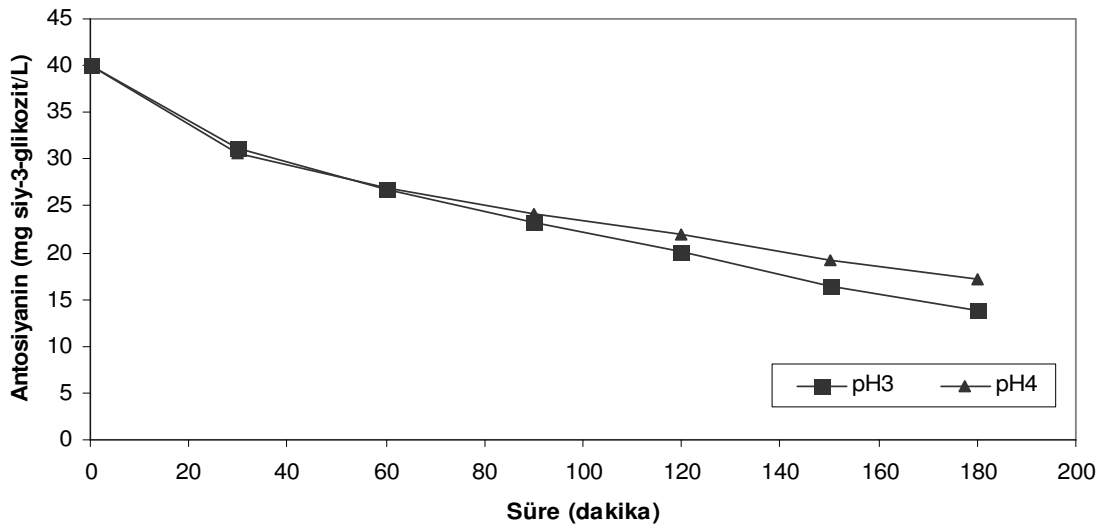
4 ve 20°C sıcaklıklarda inkübe edilen elma sularına inoküle edilen *E. coli* O157:H7 ve *B. cereus* F2 sayısının tüm örneklerde zamanla azaldığı belirlenmiştir. Ancak, özellikle *E. coli* O157:H7 için beklenenin aksine 4°C'de inkübe edilen örneklerde 20°C sıcaklıkta inkübe edilen örneklere kıyasla inhibisyonun daha az olduğu belirlenmiştir. Örneğin, 4°C'de inkübe edilen ÜKE ile renklendirilen örneklerde başlangıç *E. coli* O157:H7 sayısı 7.92 log kob/mL iken, inkübasyonun 96. saatinde sayının 4.39 log kob/mL seviyesine düştüğü tespit edilmiştir. Oysa ÜKE ile renklendirilen aynı örnekler 20°C sıcaklıkta inkübe edildiğinde 7.79 log kob/mL olan başlangıç mikroorganizma sayısının 96 saat inkübasyon sonunda <1 log kob/mL seviyesine düştüğü saptanmıştır. 20°C'de inkübe edilen ÜKE içeren elma sularında özellikle 72. saatten sonra *E. coli* O157:H7 inhibisyonunun hızlandığı belirlenmiştir.

E. coli O157:H7'ye kıyasla *B. cereus* F2 inhibisyonunda ÜKE'nin antimikrobiyal etkilerinin daha düşük olduğu saptanmıştır. Tüm örneklerde her iki inkübasyon sıcaklığında da 96 saat süren inkübasyon sonrasında *B. cereus* F2 sayısında yaklaşık 2 log azalma olduğu belirlenmiştir.

4.4. Antosiyaninlerin Isıl Stabilitelerinin Belirlenmesi

4.4.1. Üzüm kabuğu ekstraktlarının tampon çözeltilerde ısıl stabilitelerinin belirlenmesi

pH değeri 3 ve 4 olan iki farklı tampon çözeltinin 100 mL'si, 4 mg antosiyanin içerecek şekilde ÜKE'den 0.37 g/100 mL ilave edilip renklendirilerek, 90°C sıcaklıkta 3 saat süreyle ısıl işleme maruz bırakılmışlardır. pH değerleri 3 ve 4 olan tampon çözeltilerde ısıl işlem uygulaması sonucu antosiyanin miktarlarında meydana gelen değişimler Şekil 4.3.'de verilmiştir.



Şekil 4.3. ÜKE ile renklendirilen tampon çözeltilerin antosiyanin miktarlarında meydana gelen değişimler (pH 3 ve pH 4)

pH değerleri 3 ve 4 olan tampon çözeltilerde ısıl işlem süresinin uzamasına bağlı olarak antosiyanin miktarlarında azalmalar tespit edilmiştir. Her iki pH ortamında da ÜKE'nin ısıl işleme dayanıklılıkları dikkate pH değeri 4 olan tampon çözeltilerde ısıl işlem sırasında antosiyanin kaybı biraz daha fazla olduğu saptanmıştır.

4.4.2. Üzüm kabuğu ekstraktlarının elma sularında ısıl stabilitelerinin belirlenmesi

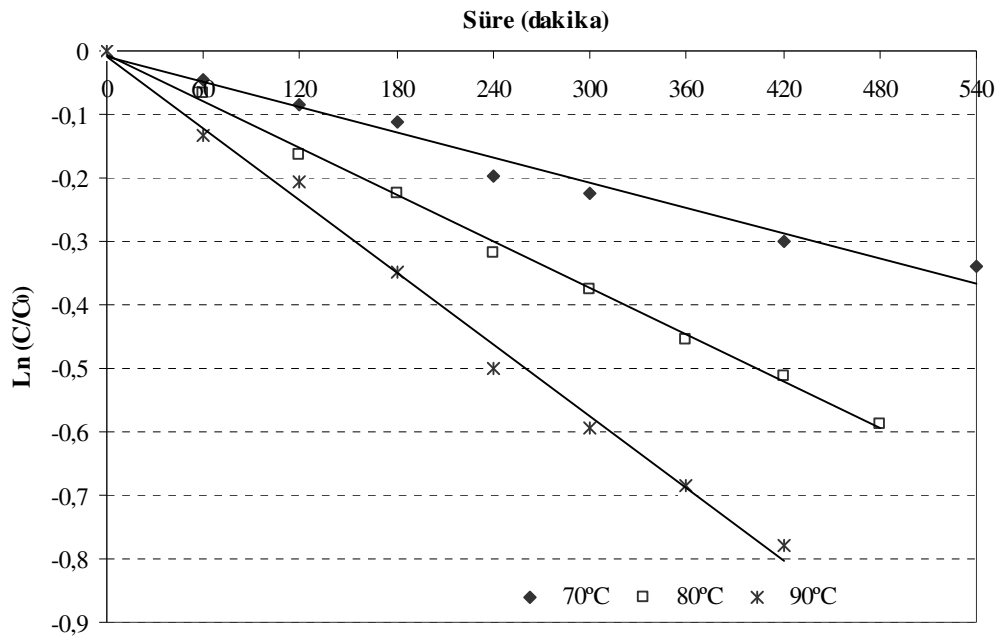
Depolanan elma sularına ilave edilen düzeyde (4 mg antosiyanin/100 mL elma suyu, ÜKE'den 0.37 g) ÜKE ile renklendirilen örnekler 70, 80 ve 90°C sıcaklıklarda ısıl işleme maruz bırakılmış ve ısıl degradasyonun birinci derece reaksiyon kinetiğine göre gerçekleştiği belirlenmiştir. Tablo 4.9.'da elma sularına ilave edilen ÜKE'nin ısıl stabilitelerine ilişkin kinetik parametreler yer almaktadır. Yarılanma sürelerinin beklendiği üzere sıcaklıktaki artışla birlikte azaldığı görülmektedir (Tablo 4.13).

Tablo 4.9. Elma sularında üzüm kabuğu antosiyaninlerinin ısıl stabilitelerine ait kinetik parametreler

Sıcaklık (°C)	- k x 10 ⁻³ (dak ⁻¹)	t _{1/2} (saat)	Ea (kJ mol ⁻¹)
70	1.61	7.2	51.87
80	2.76	4.2	
90	4.38	2.6	

k: Reaksiyon hız sabiti, t_{1/2}: Yarılanma süresi, Ea: Aktivasyon enerjisi

Elma sularında Üzüm kabuğu antosiyaninlerinin farklı sıcaklıklarda ısıtılmaları sonucu kayıp düzeyleri Şekil 4.4.'de verilmiştir.



Şekil 4.4. Üzüm kabuğu antosiyaninlerinin (ÜKE) elma suyunda farklı sıcaklıklarda ısıtılması sonucu ortaya çıkan degradasyonu

4.5. Renklendirilen Gıdalar

Klasik ekstraksiyon yöntemi ile elde edilen ÜKE elma suları, dondurma, şekerleme (lokum) ve çemen gibi farklı ürünlerin renklendirilmesi için kullanılmış olup, elde edilen bulgulara aşağıda değinilmiştir.

4.5.1. Elma suları

Araştırmada üretilen Üzüm kabuğu ekstraktları ile renklendirilen elma sularında Tablo 4.10.'da belirtilen analizler yapılarak, çalışılan elma suyunun bazı bileşim unsurları tespit edilmiştir.

Tablo 4.10. Elma suyunun bazı analitik özellikleri

Analitik özellikler	Elma suyu
Briks	12.20±0.02
% Titrasyon asitliği*	0.45±0.01
pH	3.42±0.01
% Toplam şeker	9.05±0.07
% İndirgen şeker	4.46±0.00

*: Malik asit cinsinden hesaplanmıştır

Çalışma kapsamında 100 mL elma suyunda 4 mg antosiyanin içerecek şekilde ekstrakt ilavesi yapılmıştır. Üzüm kabuğu ekstraktının (ÜKE) içerdikleri toplam antosiyanin miktarları farklı olduğundan elma sularının renklendirilmesi için ilave edilmesi gereken ekstrakt miktarları farklı olmuştur. Renklendirilen bu elma sularının belirlenen bazı analitik özellikleri Tablo 4.11.'de verilmiştir.

Tablo 4.11. ÜKE ile renklendirilen elma sularının bazı analitik özellikleri

Analitik özellikler	Kontrol	ÜKE
Briks	12.20±0.02	12.68±0.01
pH	3.42±0.01	3.40±0.01
% Titrasyon asitliği*	0.45±0.01	0.48±0.01

*: Tartarik asit cinsinden hesaplanmıştır

4.5.1.1. Elma sularının toplam fenolik madde miktarlarında meydana gelen değişimler

ÜKE ilavesi ile hazırlanmış elma sularının farklı sıcaklık ve sürelerde depolanmaları sonucunda toplam fenolik madde miktarlarında meydana gelen değişim Tablo 4.12.'de verilmiştir.

Tablo 4.12.'de de görüldüğü gibi elma sularını renklendirmek amacıyla ilave edilen ÜKE'nin elma sularının toplam fenolik madde miktarlarını önemli ölçüde arttırdığı belirlenmiştir. Örneğin, kontrol grubunun toplam fenolik madde miktarı 326.36 mg gallik asit eşdeğeri (GAE)/L iken, ÜKE ile renklendirilen elma sularının toplam fenolik madde miktarı 706.05 mg gallik asit eşdeğeri (GAE)/L düzeyindedir. Sıcaklık derecesindeki artışa paralel olarak

fenolik madde degradasyonunun da arttığı tespit edilmiştir. Altı ay süreyle 4°C’de depolanan kontrol örneğinin toplam fenolik madde kaybı %13.14 iken, ÜKE ile renklendirilen elma sularının toplam fenolik madde kaybı %28.08 olarak belirlenmiştir. Üç ay süreyle 20°C sıcaklıkta depolanan elma sularının toplam fenolik madde kayıpları ise kontrol ve ÜKE ile renklendirilen örnekler için sırası ile %3.56 ve %14.44 olarak saptanmıştır. 30°C’de 2 ay süreyle depolanan örneklerden kontrol grubunun toplam fenolik madde kaybı %5.33 olarak tespit edilmiştir. ÜKE ile renklendirilen örneklerin toplam fenolik madde miktarının %11.69 oranlarında kayba uğradığı saptanmıştır.

Tablo 4.12. ÜKE ile hazırlanmış ve farklı sıcaklıklarda depolanan elma suyu örneklerinin toplam fenolik madde miktarlarındaki değişimler (mg GAE/L)

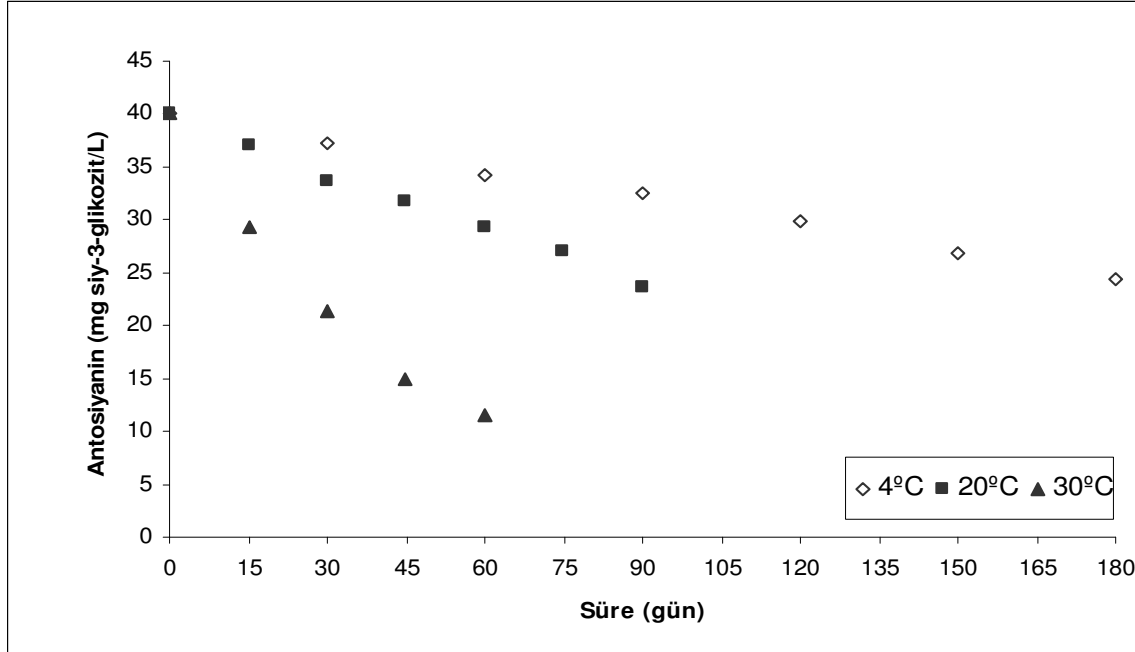
Sıcaklık (°C)	Depolama Süresi*	Kontrol	ÜKE
4	0	326.36±8.38	706.05±11.08
	30	325.79±7.98	699.29±12.52
	60	328.11±6.44	707.19±7.83
	90	326.50±3.13	641.05±34.21
	120	299.21±21.56	535.73±13.20
	150	288.63±8.52	531.64±2.72
	180	283.47±5.80	507.76±8.23
20	0	326.36±8.38	706.05±11.08
	15	321.82±8.62	686.46±13.76
	30	321.11±5.12	682.98±6.53
	45	316.74±8.25	642.11±9.34
	60	316.98±5.92	638.31±7.62
	75	312.75±3.28	616.57±11.36
	90	314.73±3.98	604.07±14.62
30	0	326.36±8.38	706.05±11.08
	15	320.89±12.16	683.64±7.17
	30	315.45±4.43	666.67±20.72
	45	311.80±3.62	642.81±3.14
	60	308.96±8.48	623.47±5.47

*: Gün

4.5.1.2. Elma sularının antosiyanin miktarlarında meydana gelen değişimler

Araştırmada ÜKE ile renklendirilen elma sularının 4, 20 ve 30°C sıcaklıklarda depolanması sonucunda antosiyanin miktarlarında meydana gelen değişimler Şekil 4.5.’de verilmiştir. Daha öncede belirtildiği üzere depolama süresi uygulanan sıcaklığa bağlı olarak 4°C’de 6 ay, 20°C’de 3 ay ve 30°C sıcaklıkta ise 2 ay olarak belirlenmiştir. Veriler incelendiğinde beklendiği gibi sıcaklığın yükselmesiyle antosiyanin kaybının arttığı görülmektedir. Kontrol

örneklerinde antosiyanin saptanamamış ÜKE ile renklendirilen örneklerde antosiyanin kayıpları, 4°C’de 6 ay depolama sonucu %38.85, 20°C’de 3 ay depolama sonucu %40.95 ve 30°C’de 2 ay depolama sonucunda ise %71.38 olarak gerçekleşmiştir. (Şekil 4.5.)



Şekil 4.5. ÜKE ile renklendirilen elma sularının 4, 20 ve 30°C sıcaklıkta depolanma sürecinde antosiyanin miktarındaki değişimler.

4.5.1.3. Elma sularının antiradikal aktivitelerinde meydana gelen değişimler

ÜKE ile renklendirilen ve farklı sıcaklık ve sürelerde depolanan elma sularının antiradikal aktivitelerinde meydana gelen değişimler Tablo 4.13.’te verilmiştir.

Farklı sıcaklıklarda depolanan elma sularının depolama süresinin uzamasına bağlı olarak antiradikal aktivitelerinin de kayba uğradığı belirlenmiştir. Depolama sıcaklığı yükseldikçe antiradikal aktivite kaybının arttığı saptanmıştır. Örneğin, 4°C’de 180 gün, 20°C’de 90 gün ve 30°C’de 60 gün süreyle depolanan kontrol örneklerinin antiradikal aktivite kayıpları sırası ile %36.88, %41.47 ve %42.93 olarak belirlenmiştir. 4, 20 ve 30°C sıcaklıklarda depolanan ÜKE ile renklendirilen elma sularının sırası ile %12.71, %13.65 ve %12.37 düzeyinde antiradikal aktivite kaybına uğradığı tespit edilmiştir.

Tablo 4.13. ÜKE ile renklendirilen ve farklı sıcaklıklarda depolanan elma sularının antiradikal aktiviteleri

Sıcaklık (°C)	Depolama Süresi*	Kontrol	ÜKE
4	0	47.89±1.35	78.81±1.07
	30	44.23±2.12	75.96±0.57
	60	40.80±1.79	74.07±0.65
	90	36.10±0.56	71.90±1.20
	120	34.51±1.16	69.43±0.91
	150	32.63±2.45	68.19±4.68
	180	30.23±2.10	68.79±1.81
20	0	47.89±1.35	78.81±1.07
	15	41.42±0.92	76.75±0.96
	30	38.76±2.23	74.62±0.88
	45	35.31±1.07	72.27±0.73
	60	34.03±0.47	70.68±1.59
	75	28.62±0.72	69.26±0.50
	90	27.55±1.03	68.05±0.86
30	0	47.89±1.35	78.81±1.07
	15	40.54±1.53	75.49±0.40
	30	36.45±0.91	73.54±1.47
	45	32.38±0.82	70.55±0.82
	60	27.33±1.43	69.06±2.03

*: Gün

4.5.1.4. Elma sularının antioksidan aktivitelerinde meydana gelen değişimler

Tablo 4.14.'de elma sularının 4, 20 ve 30°C sıcaklıklarda depolanması ile antioksidan aktivitelerinde meydana gelen değişimler görülmektedir. Elma sularının fosfomolibden metodu ile antioksidan aktivite tayini ile elde edilen sonuçlar irdelendiğinde, antiradikal aktiviteye benzer şekilde en yüksek antioksidan aktivitenin 37.52 mg askorbik asit eşdeğeri (AAE)/mL değeri ile ÜKE ile renklendirilen örneklerle ait olduğu görülmektedir. En düşük antioksidan aktivite ise 32.37 mg AAE/mL değeri ile kontrol grubunda saptanmıştır. Her üç depolama sıcaklığında da renklendirici materyal ve depolama süresinin antioksidan aktivite üzerine etkisinin olduğu belirlenmiştir. Depolama sıcaklığı arttıkça antioksidan aktivite kaybının hızlandığı tespit edilmiştir. Örneğin, 4°C'de 180 gün, 20°C'de 90 gün ve 30°C'de 60 gün süreyle depolanan kontrol örneklerinin antioksidan aktivite kayıpları sırası ile %7.94 %7.66 ve %8.74 olarak belirlenmiştir.

Tablo 4.14. ÜKE'ları ile renklendirilen ve farklı sıcaklıklarda depolanan elma sularının antioksidan aktiviteleri (mg AAE/mL)

Sıcaklık (°C)	Depolama Süresi*	Kontrol	ÜKE
4	0	32.37±1.01	37.52±1.23
	30	31.79±1.31	35.75±0.87
	60	32.62±0.44	35.45±0.81
	90	31.09±0.44	33.77±0.28
	120	30.83±0.36	33.22±1.25
	150	30.39±0.69	32.55±0.95
	180	29.80±0.16	32.01±0.16
20	0	32.37±1.01	37.52±1.23
	15	31.41±0.70	35.49±0.44
	30	31.08±1.01	34.53±0.91
	45	30.50±0.28	34.05±1.07
	60	30.01±0.29	32.85±0.63
	75	29.84±0.44	32.63±0.22
	90	29.89±0.16	32.52±0.25
30	0	32.37±1.01	37.52±1.23
	15	31.76±1.10	34.78±1.52
	30	31.09±0.26	34.08±0.87
	45	30.46±0.36	33.46±0.79
	60	29.54±0.52	32.78±0.39

*: Gün

4.5.1.5. Elma sularının renginde meydana gelen değişimler

The CIE L^* , a^* , b^* ölçüm sisteminde (International Commission on Illumination, Vienna, Uluslararası Aydınlatma Komisyonu, Viyana) L^* parlaklığı (L^* 100= beyaz, L^* 0= siyah), pozitif ve negatif a^* değerleri sırası ile kırmızı ve yeşil rengi göstermektedir. Diğer bir renk parametresi olan b^* değeri pozitif ise sarı, negatif ise mavi rengi temsil etmektedir. C^* değeri, renk doygunluğu veya renk yoğunluğu (kroma değeri) ile ilgili bir nitelik olup, 0 ile 60 aralığında değişmektedir. C^* değerleri, renk düzleminin merkezinde matken (0), merkezden uzaklaştıkça parlak (vivid) tonları temsil etmektedir. C^* değeri, a^* ve b^* değerleri kullanılarak $C^* = (a^{*2} + b^{*2})^{1/2}$ eşitliği ile hesaplanmaktadır. Hue açısı (h°) renk tonu veya renkle ilgili bir diğer niteliktir. Bu değer 0–360° arasında değişmekte olup 0° kırmızı, 90° sarı, 180° yeşil, 270° mavi; 360°=0° kırmızı rengi temsil etmektedir. h° değeri a^* ve b^* değerleri kullanılarak $h^\circ = \arctan(b^*/a^*)$ eşitliği ile de hesaplanabilmektedir. $L^*C^*h^\circ$ sistemi, $L^*a^*b^*$ sistemine göre rengin daha iyi tanımlanmasına olanak vermektedir. Çünkü bu sistemde rengi belirlemede C^* ve h° değerleri kullanılmakta ve bu değerlerin hesaplanmasında

a^* ve b^* renk koordinatlarından yararlanılmaktadır. C^* ve h° değerleri ile aynı a^* değerine sahip örnekler arasındaki farklılık daha açık bir şekilde ifade edilebilmektedir [89].

ÜKE ile renklendirilmiş elma sularının 4°C sıcaklıkta depolama süresince renk parametrelerinde meydana gelen değişim Tablo 4.15.'de verilmiştir.

Tablo 4.15. ÜKE ile renklendirilen ve 4°C'de depolanan elma sularının renk değerleri

	Depolama Süresi*	Kontrol	ÜKE
L^*	0	10.81±0.31	3.97±0.24
	30	10.49±2.18	3.77±0.08
	60	10.91±0.57	3.73±0.22
	90	7.42±0.36	3.88±0.13
	120	4.27±0.21	3.52±0.23
	150	4.75±0.78	2.79±0.44
	180	4.67±0.59	2.59±0.48
a^*	0	3.78±0.28	5.52±0.37
	30	2.22±0.38	5.56±0.25
	60	3.01±0.21	6.25±0.75
	90	1.21±0.14	4.59±0.32
	120	1.33±0.06	3.78±0.28
	150	1.28±0.23	3.49±1.23
	180	1.29±0.25	3.25±0.46
b^*	0	9.45±0.97	2.57±0.26
	30	9.36±2.02	2.38±0.27
	60	10.93±0.54	2.50±0.48
	90	11.36±0.07	1.89±0.21
	120	11.50±0.29	1.92±0.07
	150	11.56±0.20	2.47±0.10
	180	11.51±0.22	2.36±0.24
h°	0	68.05±2.67	25.02±2.56
	30	76.46±1.45	23.21±3.22
	60	74.66±0.32	21.67±1.66
	90	83.96±0.67	22.46±3.11
	120	83.44±0.25	26.98±1.90
	150	83.72±1.08	37.42±10.26
	180	83.63±1.31	36.34±4.54
C^*	0	10.18±0.89	6.10±0.35
	30	9.62±2.04	6.06±0.15
	60	11.34±0.58	6.73±0.87
	90	11.43±0.07	4.97±0.27
	120	11.58±0.29	4.24±0.26
	150	11.63±0.21	4.34±0.98
	180	11.59±0.41	4.03±0.42

: Gün, L^ : Parlaklık, a^* : Kırmızılık, b^* : Sarılık, C^* : Renk yoğunluğu, h° : Renk tonu

4°C sıcaklıkta depolanan örnekler arasında 10.81 değeri ile kontrol grubunun en yüksek L^* değerine sahip olduğu saptanırken, en düşük L^* değeri ise 3.97 değeri ile ÜKE ile

renklendirilen örneklerde tespit edilmiştir. Depolama süresinin uzamasıyla örneklerin L^* değerlerinin azaldığı belirlenmiştir. Elma sularının kırmızılık değerlerini ifade eden a^* değerlerinde depolama süresince dalgalanmalar olmakla birlikte, genel olarak a^* değerlerinin azalma eğiliminde olduğu belirlenmiştir. Örnekler en düşük a^* değeri beklediği üzere 3.78 değeri ile kontrol örneklerinde tespit edilmiştir. Örneklerin b^* değerlerinde de depolama süresince bazı dalgalanmalar olduğu saptanmıştır. En sarı örneklerin beklediği üzere 9.45 b^* değerine sahip olan kontrol örnekleri olduğu belirlenmiştir.

Elma sularının h° değerlerinde depolama süresince hafif dalgalanmalar olmakla birlikte, genellikle bir artış olduğu tespit edilmiştir. Kontrol örneği depolamanın 0. gününde 68.05 h° değerine sahipken, 180 gün depolandıktan sonra bu değer 83.63'e ulaşmıştır. Bu kontrolün depolama sonunda daha koyu sarı bir renge sahip olduğu anlamına gelmektedir. Tablo 4.15. incelendiğinde ÜKE ile renklendirilen örneklerin de depolama süresince h° değerlerinin arttığı görülmektedir. Elde edilen bulgular ÜKE ile renklendirilen elma sularının renk yoğunluğunun zamanla artmasıyla rengin sarıya yaklaştığını göstermektedir. ÜKE ile renklendirilen örneklerin C^* değerlerinde ise depolama süresinin uzamasına bağlı olarak azalma eğilimi gözlenmiştir.

20°C sıcaklıkta depolanan elma sularının renk parametrelerinde meydana gelen değişim Tablo 4.16.'da verilmiştir. 20°C'de depolanan elma sularının L^* değerlerinin 4°C sıcaklıkta depolanan örneklere yakın olduğu belirlenmiş parlaklık değerlerinin kontrol örneklerinde ÜKE ile renklendirilen örneklerden daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Örneklerin depolama sürecinde L^* değerlerinin düşme eğiliminde olduğu saptanmıştır. Elma sularının a^* değerleri depolama süresi uzadıkça azalma eğilimi göstermiştir. Kontrol örneklerinde a^* değerinin daha düşük olduğu tespit edilmiştir. Genel olarak 20°C'de depolanan elma sularının a^* değerlerinin 4°C sıcaklıkta depolanan örneklerden biraz daha düşük olduğu görülmektedir. Elma sularının b^* değerlerinde de depolama süresince dalgalanmalar olmakla birlikte, genel olarak bir artış olduğu saptanmıştır. (Tablo 4.16).

Elma sularının h° değerlerinde depolama süresince dalgalanmalar gözlenmekle birlikte, genel olarak artış eğiliminde oldukları belirlenmiştir. Bu sonuçlar, kontrol örneklerinin renginin sarıdan daha yoğun sarıya dönüştüğünü gösterirken, renklendirilen örneklerin renginin de benzer şekilde kırmızıdan hafif de olsa sarıya kaydığını ortaya koymaktadır.

Depolama süresince ÜKE ile renklendirilen örneklerin C^* değerlerinin azaldığı gözlenmiştir. Depolama süresinin uzamasıyla kontrol örneğinin C^* değerinde hafifte olsa bir artış (10.18-11.32) olduğu, dolayısı ile de örneklerin parlaklığının biraz arttığı tespit edilmiştir. (Tablo 4.16.).

Tablo 4.16. ÜKE ile renklendirilen ve 20°C’de depolanan elma sularının renk değerleri

	Depolama Süresi*	Kontrol	ÜKE
L^*	0	10.81±0.31	3.97±0.24
	15	10.01±0.91	3.58±0.18
	30	10.65±0.29	3.95±0.56
	45	10.11±0.46	3.86±0.43
	60	10.49±0.50	3.70±0.35
	75	9.75±0.24	3.31±0.46
	90	8.25±0.94	3.19±0.28
a^*	0	3.78±0.28	5.52±0.37
	15	2.41±0.19	5.42±1.42
	30	2.32±0.29	5.11±1.65
	45	3.17±0.47	4.70±0.39
	60	3.46±0.16	4.55±0.21
	75	3.37±0.13	3.43±0.30
	90	2.43±0.22	3.41±0.18
b^*	0	9.45±0.97	2.57±0.26
	15	9.63±0.59	2.35±0.18
	30	10.28±0.46	2.33±0.33
	45	12.50±1.77	2.39±0.29
	60	10.99±0.78	2.53±0.21
	75	10.84±0.40	2.50±0.36
	90	11.06±0.39	2.81±0.16
h°	0	68.05±2.67	25.02±2.56
	15	75.97±1.17	24.67±5.76
	30	77.36±1.18	25.89±5.93
	45	75.75±1.54	27.10±3.92
	60	72.51±0.78	29.12±2.60
	75	72.77±0.60	35.97±3.15
	90	77.66±1.03	39.52±2.11
C^*	0	10.18±0.89	6.10±0.35
	15	9.93±0.59	5.93±1.33
	30	10.54±0.50	5.64±1.56
	45	12.90±1.80	5.28±0.32
	60	11.52±0.78	5.21±0.19
	75	11.35±0.40	4.25±0.41
	90	11.32±0.40	4.42±0.18

: Gün, L^ : Parlaklık, a^* : Kırmızılık, b^* : Sarılık, C^* : Renk yoğunluğu, h° : Renk tonu

Tablo 4.17.’de ise 30°C sıcaklıkta depolanan elma suyu örneklerinin renklerinde meydana gelen değişimler görülmektedir. Kontrol örneklerinin 60 gün süreyle depolanması sonucunda

aydınlık değerlerinin 10.81-10.00 arasında değiştiği belirlenmiş olup, bu grubun ÜKE ile renklendirilen örneklerden daha yüksek L^* değerine sahip olduğu sonucuna ulaşılmıştır ve ÜKE ile renklendirilen örneklerin aydınlık değerleri ise 3.97-3.17 aralığında tespit edilmiştir. Görüldüğü gibi örneklerin L^* değerlerinde depolama süresince bir azalma gözlenmiştir.

Tablo 4.17. incelendiğinde ÜKE ile renklendirilen örneklerde depolama süresi uzadıkça örneklerin a^* değerlerinin azaldığı görülmektedir. Beklendiği üzere 30°C’de 60 gün süreyle depolanan elma suları arasında, sarı rengin hakim olduğu kontrol örneklerinde ÜKE ile renklendirilen örneklerden daha düşük a^* değerlerine (3.78-3.24) sahip olduğu belirlenmiştir. Örneklerin depolama süresince b^* değerlerinde bir miktar artış gözlenmiş olup, kontrol örneklerinin daha yüksek b^* değerine sahip olduğu ve değerlerin 9.45-10.51 aralığında olduğu saptanmıştır.

Tablo 4.17. ÜKE ile renklendirilen ve 30°C sıcaklıkta depolanan elma sularının renk değerleri

	Depolama Süresi*	Kontrol	ÜKE
L^*	0	10.81±0.31	3.97±0.24
	15	10.17±0.41	3.43±0.41
	30	10.06±0.44	3.63±0.27
	45	9.96±0.20	3.37±0.20
	60	10.00±0.34	3.17±0.28
a^*	0	3.78±0.28	5.52±0.37
	15	3.23±0.38	5.17±0.34
	30	3.01±0.16	4.44±0.54
	45	3.04±0.39	4.50±0.25
	60	3.24±0.38	4.15±0.64
b^*	0	9.45±0.97	2.57±0.26
	15	9.55±0.24	2.42±0.78
	30	10.19±0.34	2.15±0.65
	45	10.39±0.29	2.41±0.35
	60	10.51±0.25	2.68±0.25
h^o	0	68.05±2.67	25.02±2.56
	15	71.39±2.12	24.61±6.49
	30	73.59±1.11	25.75±7.82
	45	73.77±2.03	28.06±2.91
	60	72.94±1.80	33.18±3.02
C^*	0	10.18±0.89	6.10±0.35
	15	10.09±0.26	5.74±0.57
	30	10.63±0.32	4.97±0.51
	45	10.84±0.30	5.11±0.34
	60	11.00±0.30	4.95±0.64

: Gün, L^ : Parlaklık, a^* : Kırmızılık, b^* : Sarılık, C^* : Renk yoğunluğu, h^o : Renk tonu

Yine Tablo 4.17.'de görülebileceği gibi, kontrol örneklerinin h^o değerleri 68.05-72.94 aralığında tespit edilirken, ÜKE ilave edilen elma sularında ise 25.02-33.18 aralığında saptanmıştır. Depolama süresince ÜKE ilave edilmesiyle renklendirilen elma sularının C^* değerlerinde ise hafif dalgalanmalar tespit edilmiştir. ÜKE ile renklendirilen örneklerin C^* değerlerinin ise 6.10-4.95 aralıklarında olduğu belirlenmiş olup, bu örneklerin kontrolden daha mat bir görünüm sergilediği sonucuna ulaşılmıştır (Tablo 4.17.).

4.5.1.6. Elma sularının duyuşal olarak değerdendirilmesi

ÜKE ilave edilerek renklendirilen elma sularının depolama süresince renk, tat, koku ve genel beğeni özellikleri tecrübeli panelistler tarafından değerdendirilmiştir. 4°C'de depolanan örneklere ait duyuşal analiz bulguları Tablo 4.18.'de verilmiştir.

Tablo 4.18. ÜKE ile renklendirilen ve 4°C'de depolanan elma sularının duyuşal analiz bulguları

	Depolama Süresi*	Kontrol	ÜKE
Renk	0	6.78±0.81	8.39±0.61
	30	6.78±1.00	8.11±0.58
	60	6.78±0.73	8.11±0.76
	90	6.83±1.04	7.94±0.64
	120	7.44±0.78	7.94±0.87
	150	6.72±0.96	7.78±0.88
	180	6.89±1.02	7.50±0.92
Tat	0	8.00±0.77	7.67±1.33
	30	7.89±1.13	7.78±0.88
	60	7.39±1.09	7.61±0.92
	90	7.17±0.79	7.67±0.49
	120	7.17±1.62	7.89±0.76
	150	5.94±1.16	6.83±1.65
	180	6.67±0.84	6.56±1.46
Koku	0	7.61±0.85	8.06±0.87
	30	7.89±1.08	7.89±0.90
	60	7.28±1.13	7.83±0.79
	90	7.28±0.75	7.61±0.61
	120	7.28±1.67	7.89±0.83
	150	6.17±1.20	7.78±0.65
	180	7.17±1.10	7.11±1.23
Genel Beğeni	0	7.78±0.55	7.89±0.96
	30	7.72±0.89	8.00±0.77
	60	7.33±1.08	7.78±0.88
	90	7.17±0.79	7.72±0.46
	120	7.33±1.37	7.89±0.76
	150	6.33±0.91	7.39±1.20
	180	7.22±1.06	7.06±1.16

*: Gün, 1, kabul edilemez, 9, fazlasıyla beğendim.

Tablo 4.19.'da da görülebildiği gibi 20°C sıcaklıkta depolanan elma sularının renk skorlarının genel olarak 4°C'de depolanan örneklerden biraz daha düşük olduğu belirlenmiştir. Yine 4°C'de depolanan örneklerde olduğu gibi kontrol örneklerinin renk skorlarının daha düşük olduğu tespit edilmiştir. ÜKE ile renklendirilen grupların renk skorları ise 8.39-7.78 aralığındadır.

Tablo 4.19. ÜKE ile renklendirilen ve 20°C'de depolanan elma sularının duyusal analiz bulguları

	Depolama Süresi*	Kontrol	ÜKE
Renk	0	6.78±0.81	8.39±0.61
	15	7.22±0.94	8.22±0.43
	30	7.28±0.96	8.00±0.49
	45	7.22±0.55	8.00±0.77
	60	6.94±0.80	8.06±0.73
	75	6.72±0.67	7.72±0.57
	90	6.78±0.88	7.78±0.94
Tat	0	8.00±0.77	7.67±1.33
	15	7.50±0.99	7.83±0.71
	30	7.72±0.96	7.39±1.09
	45	7.44±0.70	7.94±0.87
	60	7.22±0.88	7.22±1.00
	75	7.33±0.69	7.28±1.18
	90	6.94±0.73	7.61±1.09
Koku	0	7.61±0.85	8.06±0.87
	15	7.17±0.92	7.56±0.78
	30	7.56±0.98	7.39±0.78
	45	7.33±0.77	7.94±0.87
	60	7.33±0.91	7.50±1.10
	75	7.33±0.59	7.11±1.28
	90	7.00±0.69	7.61±0.61
Genel Beğeni	0	7.78±0.55	7.89±0.96
	15	7.39±0.85	7.75±0.60
	30	7.61±0.98	7.56±0.92
	45	7.44±0.78	7.94±0.87
	60	7.19±0.86	7.39±0.92
	75	7.22±0.55	7.39±1.04
	90	6.89±0.76	7.61±0.85

*: Gün, 1, kabul edilemez- 9, fazlasıyla beğendim.

Araştırmada 30°C sıcaklıkta depolanan elma sularının duyusal analiz sonuçları ise Tablo 4.20.'de verilmiştir.

Tablo 4.20. ÜKE ile renklendirilen ve 30°C’de depolanan elma sularının duyuşal analiz bulguları

	Depolama Süresi*	Kontrol	ÜKE
Renk	0	6.78±0.81	8.39±0.61
	15	7.00±0.69	8.22±0.55
	30	7.11±0.58	8.06±0.80
	45	6.72±0.57	8.00±0.91
	60	6.78±0.65	7.72±0.83
Tat	0	8.00±0.77	7.67±1.33
	15	7.83±0.79	7.56±0.70
	30	7.56±0.92	8.00±0.77
	45	7.72±0.67	7.44±0.86
	60	7.56±0.86	7.44±0.92
Koku	0	7.61±0.85	8.06±0.87
	15	7.67±0.69	7.17±0.79
	30	7.83±0.86	8.00±0.59
	45	7.33±0.77	7.50±0.71
	60	7.61±0.85	7.50±0.99
Genel Beğeni	0	7.78±0.55	7.89±0.96
	15	7.83±0.62	7.33±0.84
	30	7.78±0.81	7.89±0.58
	45	7.33±0.77	7.50±0.71
	60	7.19±0.93	7.50±0.79

*: Gün,1, kabul edilemez - 9, fazlasıyla beğendim.

4.5.2. Dondurma

Yapılan ön denemelerde 100 mL dondurma miksinin 3 mg antosiyanin seviyesinde ÜKE ile renklendirilmeleri halinde duyuşal olarak en yüksek skorlara (renk ve genel beğeni skorları dikkate alınmıştır) sahip olduğu belirlenmiş ve denemelerde sadece bu konsantrasyon kullanılmıştır. ÜKE’de toplam antosiyanin tayini yapılarak 3 mg antosiyanin içeren miktarları hesaplanmış (ÜKE’den 0.2775g/100 mL miks) dondurmaların renklendirilmesinde kullanılmışlardır.

ÜKE ile renklendirilen dondurma örneklerinin 0. gün kuru madde, kül ve pH değeri Tablo 4.21.’de verilmiştir.

Tablo 4.21. Dondurma örneklerinin kuru madde, kül ve pH değeri (0. gün)

	Kontrol	Karmin	ÜKE
pH	6.67±0.01	6.71±0.02	6.52±0.01
% Kuru madde	26.30±0.24	26.36±0.29	26.36±0.30
% Kül	0.51±0.03	0.52±0.04	0.54±0.03

Dondurma örneklerinin pH ve kül değerleri üzerine renklendirici materyallerin etkisi olduğu belirlenmiştir (Tablo 4.21.). En yüksek ve en düşük pH değerleri sırası ile karmin (6.71) ve ÜKE (6.52) ile renklendirilen örneklerde belirlenmiştir. Örneklerin % kuru madde ve kül miktarlarının ise ilave edilen renklendirici materyal ile bir miktar arttığı saptanmıştır.

4.5.2.1. Dondurmaların toplam fenolik madde miktarlarında meydana gelen değişimler

-18°C sıcaklıkta 3 ay süreyle depolanan dondurma örneklerinin toplam fenolik madde miktarlarında ve antiradikal aktivitelerinde meydana gelen değişim Tablo 4.22.'de verilmiştir.

Tablo 4.22. ÜKE ve karminle renklendirilen dondurmaların toplam fenolik madde miktarları ve antiradikal aktiviteleri

	Depolama Süresi*	Kontrol	Karmin	ÜKE
Toplam fenolik madde (mg/kg)	0	0.39±0.16	0.42±0.34	128.71±2.06
	30	0.31±0.25	0.36±0.32	128.06±1.86
	60	0.29±0.14	0.31±0.24	127.52±2.15
	90	0.27±0.18	0.27±0.28	125.07±1.61
Antiradikal aktivite (%)	0	1.91±0.84	2.00±0.66	35.72±1.82
	30	1.43±0.63	2.04±0.78	32.40±1.34
	60	1.08±0.48	1.69±0.92	30.87±1.58
	90	1.18±0.92	1.06±0.81	30.66±2.74

*: Gün,

Tablo 4.22.'de görülebildiği gibi dondurma örneklerinin başlangıç toplam fenolik madde içerikleri 0.39'dir ve karminle renklendirilen dondurmaların toplam fenolik madde içerikleri kontrol grubuna son derece yakındır. Depolama süresinin uzamasına bağlı olarak toplam fenolik madde içeriğinde çok hafif bir azalma olduğu saptanmıştır (Tablo 4.22). Dondurmaların renklendirilmesi için ilave edilen ÜKE'nin toplam fenolik madde miktarları da dondurma örneklerinin fenolik madde tayininde kullanılan Hwang ve ark. [22], tarafından verilen metotta bazı modifikasyonlar yapılarak belirlenmiş olup, 102.237 mg GAE/g kuru ekstrakt olarak belirlenmiştir.

4.5.2.2. Dondurmaların antiradikal aktivitelerinde meydana gelen değişimler

Araştırmanın depolama sürecinde dondurma örneklerinin antiradikal aktivitelerindeki değişim Tablo 4.22.'de görülmektedir. ÜKE ile renklendirilen dondurmaların antiradikal kapasitesinin %35.72-30.66 aralığında olduğu belirlenmiştir. Karminle renklendirilen dondurmaların antiradikal kapasitelerinin %2.00-1.06 aralığında olduğu ve sonuçların renklendirilmemiş sade dondurmaların antiradikal kapasitelerine (1.91-1.18) son derece yakın olduğu

saptanmıştır. Depolama süresinin uzamasına bağlı olarak örneklerin antiradikal kapasitelerinde azalma olduğu tespit edilmiştir.

4.5.2.3. Dondurmaların renginde meydana gelen değişimler

ÜKE ile veya karminle renklendirilen dondurma örneklerinin renk parametrelerinde meydana gelen değişim Tablo 4.23.'de verilmiştir. L^* değeri kontrol grubunda 68.55 olarak saptanırken, ÜKE ile renklendirilen dondurmaların L^* değeri 56.79'dir. L^* değerinin artması örneklerin renginin daha parlak olduğunun bir göstergesi olup, dondurma örnekleri arasında sade dondurmaların en parlak grup olduğu saptanmıştır.

Tablo 4.23. ÜKE ile renklendirilen dondurma örneklerinin renk değerleri

	Depolama Süresi*	Kontrol (Sade)	Karmin	ÜKE
L^*	0	68.55±0.88	67.40±0.52	56.79±0.43
	30	68.52±0.38	65.91±1.06	56.53±0.98
	60	68.48±0.60	66.58±1.48	56.57±1.41
	90	68.38±1.81	63.69±1.33	52.42±1.10
a^*	0	0.07±0.07	7.58±0.24	3.90±0.43
	30	0.06±0.05	7.25±0.24	3.75±0.35
	60	0.02±0.02	7.22±0.21	3.53±0.31
	90	0.02±0.02	6.63±0.20	3.26±0.16
b^*	0	3.8±0.32	0.24±0.06	-4.10±0.57
	30	3.50±0.35	0.64±0.21	-4.45±0.38
	60	3.41±0.37	0.69±0.20	-4.68±0.29
	90	2.45±0.20	0.60±0.17	-5.68±0.21
h^o	0	89.07±0.90	1.85±0.48	314.26±6.47
	30	89.02±0.79	5.08±1.74	310.08±3.11
	60	89.69±0.38	5.45±1.61	307.03±3.29
	90	89.51±0.41	5.22±1.48	299.83±1.38
C^*	0	3.81±0.32	7.58±0.24	5.63±0.34
	30	3.50±0.35	7.29±0.22	5.83±0.42
	60	3.41±0.37	7.26±0.20	5.87±0.26
	90	2.45±0.20	6.66±0.19	6.55±0.22

: Gün, L^ : Parlaklık, a^* : Kırmızılık, b^* : Sarılık, C^* : Renk yoğunluğu, h^o : Renk tonu

Renklendirici içermeyen kontrol (sade dondurma) örneklerinin a^* değeri beklendiği gibi ÜKE ile renklendirilen örnekten daha düşük olup, 0.07 seviyelerindedir (Tablo 4.23.). Depolama süresinin uzamasıyla birlikte, genel olarak örneklerin hepsinin a^* değerlerinde hafif bir azalma olduğu tespit edilmiştir.

Kontrol örneklerinde b^* değerleri 3.80 olarak belirlenirken, ÜKE ile renklendirilen dondurmaların renginin morumsu olması nedeniyle b^* değerleri negatif olarak (-4.10) tespit

edilmiştir (Tablo 4.23.). Örneklerin b^* değerleri dikkate alındığında pozitif ve negatif b^* değerlerine sahip olan örneklerin sırasıyla sarımsı ve mavimsi-mor oldukları sonucuna ulaşılmaktadır. Depolama süresinin uzamasına bağlı olarak dondurmaların b^* değerlerinde dalgalanmalar gözlenmiştir.

Dondurma örneklerinin renk tonları hakkında fikir veren h^o incelendiğinde, kontrol grubunun sarı (89.07-89.51), karminle (1.85-5.22) renklendirilen örneklerin kırmızı, ÜKE (314.26-299.83) ile renklendirilen örneklerin ise morumsu kırmızı oldukları belirlenmiştir.

Karmin ile renklendirilen örneklerin C^* değerleri 7.58-6.66 aralığında en parlak örnekler iken 3.81-2.45 aralığındaki C^* değerlerine sahip olan kontrol grubunun en mat örnek grubunu oluşturduğu belirlenmiştir. Örneklerin C^* değerlerinde depolama süresince genel olarak dalgalanmalar tespit edilmiştir.

4.5.2.4. Dondurmaların duysal olarak değerlendirilmesi

Bu araştırmada 3 ay süreyle depolanan dondurma örneklerinin depolama sürecinde duysal olarak değerlendirilen renk, tat, koku ve genel beğeni kriterlerinde meydana gelen değişimler Tablo 4.24.'de görülmektedir. Dondurmaların renk skorları dikkate alındığında genel olarak tüm örneklerin panelistler tarafından beğenildikleri ve depolama süresinin uzamasına bağlı olarak da skarlarda çok az da olsa bir düşüş olduğu gözlenmektedir. Özellikle depolamanın 90. gününde dondurmaların panelistler tarafından biraz daha az beğenildiği saptanmıştır. Renk bakımından dondurma örneklerinin hepsinin depolama süresince panelistler tarafından iyi olarak nitelendirildiği saptanmıştır (Tablo 4.24.).

Dondurma grupları arasında genel özellikleri itibariyle en çok beğenilen örnek grupları kontrol grubu (8.28-7.89) ve ÜKE (7.94-7.44) ile renklendirilen dondurmalar olduğu bulunmuştur (Tablo 4.24.). Örneklerin depolama süreçlerinde genel beğeni skorlarının az da olsa düştüğü belirlenmiştir. Genel beğeni skorları dikkate alındığında panelistler tarafından, dondurmalara ÜKE ile dondurmaların başarılı bir şekilde renklendirilebileceği bulgusuna ulaşılmaktadır. Bununla birlikte ÜKE'lı ürünlerin tat ve koku parametrelerini olumsuz etkilemediği gibi bazı panelistler tarafından çok beğenildiği belirlenmiştir.

Tablo 4.24. ÜKE ile renklendirilen dondurma örneklerinin duyu analizi bulguları

	Depolama Süresi*	Kontrol	Karmin	ÜKE
Renk	0	8.39±0.85	8.11±0.83	8.22±0.65
	30	8.39±0.50	8.11±0.83	8.06±0.80
	60	7.89±1.23	8.11±0.96	8.17±1.19
	90	7.89±0.90	7.83±1.10	7.44±0.70
Tat	0	8.28±1.07	7.78±0.88	7.89±0.96
	30	8.22±0.55	7.78±1.26	7.61±0.98
	60	7.94±1.06	7.17±1.47	7.17±1.51
	90	7.89±0.90	6.44±1.82	7.22±1.22
Koku	0	7.89±1.53	8.00±0.77	7.78±0.73
	30	8.39±0.85	8.06±0.80	7.72±1.36
	60	7.83±1.04	7.22±1.56	7.48±1.56
	90	7.89±0.83	6.61±1.88	7.61±1.04
Genel Beğeni	0	8.28±1.07	8.00±0.77	7.94±0.80
	30	8.50±0.62	8.06±0.87	7.78±0.81
	60	7.89±1.13	7.28±1.36	7.41±1.59
	90	7.89±0.83	6.56±2.09	7.44±1.04

*: Gün, 1, kabul edilemez - 9, fazlasıyla beğendim.

4.5.3. Şekerleme

ÜKE ve karmin ile renklendirilen şekerleme örneklerinin 0. gün kuru madde, kül ve pH değerleri Tablo 4.25.'de verilmiştir.

Tablo 4.25. Şekerleme örneklerinin kuru madde, kül ve pH değerleri (0. gün)

	Karmin	ÜKE
pH	3.68±0.02	3.57±0.02
% Kuru madde	86.55±0.11	86.57±0.31
% Kül	0.02±0.02	0.02±0.01

Karminle renklendirilen örneklerin pH değerleri 3.68 iken, ÜKE ile renklendirilen lokumların pH değerleri ise 3.57 düzeyinde tespit edilmiştir. Şekerleme örneklerinin kuru madde değerleri %86.55-86.57 aralığında, kül miktarları ise tüm örneklerde %0.02 seviyesinde belirlenmiş olup ilave edilen renklendiricilerin örneklerin gerek kuru madde ve gerekse de kül miktarları üzerine önemli etkisinin olmadığı saptanmıştır.

4.5.3.1. Şekerlemelerin renginde meydana gelen değişimler

Tablo 4.26.'da şekerleme örneklerinin 6 ay süreyle 20°C sıcaklıkta depolanmaları sonucu L^* , a^* , b^* , h° ve C^* değerlerinde meydana gelen değişimler görülebilmektedir.

Tablo 4.26. ÜKE ve karminle renklendirilen şekerlemelerin renk değerleri

	Depolama Süresi*	Karmin	ÜKE
L^*	0	16.84±0.59	12.32±1.28
	30	15.46±1.28	11.45±1.34
	60	15.37±0.96	10.63±0.62
	90	16.10±0.69	10.01±0.74
	120	16.05±0.89	9.42±0.69
	150	15.56±1.29	10.36±1.34
	180	15.19±0.50	10.84±1.27
a^*	0	12.76±1.70	10.48±1.49
	30	13.58±0.93	10.42±0.69
	60	12.90±1.80	9.46±0.44
	90	11.81±1.74	9.51±1.01
	120	12.38±1.01	9.31±1.44
	150	10.33±1.23	9.26±0.85
	180	10.27±0.52	7.73±0.83
b^*	0	2.14±0.54	-0.48±0.22
	30	2.00±0.27	-0.52±0.26
	60	2.04±0.89	-0.53±0.28
	90	2.18±1.27	-0.78±0.29
	120	2.22±0.85	-0.74±0.43
	150	2.51±0.30	-0.77±0.28
	180	2.74±1.20	-0.88±0.21
h°	0	9.60±2.65	357.29±1.33
	30	8.40±1.03	357.06±1.58
	60	8.61±3.05	356.78±1.70
	90	9.85±5.37	355.18±2.04
	120	10.03±3.23	355.03±3.21
	150	13.79±2.10	355.20±1.97
	180	14.74±6.22	353.47±1.45
C^*	0	12.95±1.69	10.50±1.49
	30	13.73±0.94	10.44±0.69
	60	13.08±1.90	9.48±0.44
	90	12.06±1.87	9.55±1.00
	120	12.60±1.10	9.36±1.40
	150	10.64±1.20	9.30±0.84
	180	10.69±0.64	7.79±0.83

: Gün, L^ : Parlaklık, a^* : Kırmızılık, b^* : Sarılık, C^* : Renk yoğunluğu, h° : Renk tonu

4.5.3.2. Şekerlemelerin duysal olarak değerlendirilmesi

Şekerleme örneklerine ait renk, tat, koku ve genel beğeni skorları Tablo 4.27.'de verilmiştir. Genel olarak ÜKE ile renklendirilen şekerlemeler, karminle renklendirilen gruptan daha yüksek renk skorlarına sahiptir ve 180 gün depolama süresince tüm şekerleme örneklerinin renklerinin panelistler tarafından iyi olarak değerlendirildiği saptanmıştır.

Tablo 4.27. ÜKE ve karmin ile renklendirilen şekerlemelerin duyuusal analiz bulguları

	Depolama Süresi*	Karmin	ÜKE
Renk	0	8.17±0.79	8.50±0.62
	30	8.28±0.46	8.33±0.84
	60	8.17±0.92	8.39±0.50
	90	8.17±0.92	8.33±0.77
	120	8.17±0.92	8.17±0.71
	150	7.89±1.02	7.78±0.81
	180	7.61±1.09	7.78±0.73
Tat	0	8.00±0.91	8.44±0.51
	30	8.28±0.67	8.50±0.62
	60	8.17±0.86	8.39±0.50
	90	8.00±0.91	8.33±1.03
	120	7.67±0.97	8.17±0.71
	150	7.67±0.91	8.17±0.79
	180	7.39±0.98	7.83±0.92
Koku	0	8.50±0.51	8.83±0.38
	30	8.00±0.59	8.56±0.51
	60	8.00±0.59	8.28±0.46
	90	8.06±0.87	8.11±1.02
	120	7.67±0.97	8.11±0.68
	150	7.28±1.32	8.11±0.96
	180	7.39±0.61	7.67±0.69
Genel Beğeni	0	8.00±0.77	8.39±0.70
	30	8.25±0.65	8.39±0.61
	60	8.06±0.87	8.39±0.61
	90	8.17±0.92	8.28±1.02
	120	7.83±0.79	8.17±0.71
	150	7.56±1.10	8.06±0.87
	180	7.56±1.04	7.94±0.64

*: Gün, 1, kabul edilemez - 9, fazlasıyla beğendim.

4.5.4. Çemen

Çemen örneklerinin pH, kuru madde ve kül değerleri Tablo 4.28.'de görülmektedir. Beklendiği üzere en düşük kül miktarı %2.54 ve %43.21 kuru madde miktarı ile kontrol örneğine aittir. İlave edilen renklendirici materyaller örneklerin kuru madde ve kül miktarlarında çok az da olsa artışlara neden olduğu saptanmıştır. Örneklerin pH değerlerinin 5.85 olduğu ve dolayısı ile de çemenlerin pH değerleri üzerine renklendirici materyallerin önemli bir etkilerinin olmadığı belirlenmiştir.

Tablo 4.28. ÜKE ve karmin ile renklendirilen çemenlerin pH, kül ve kuru madde değerleri (0. gün)

	Kontrol	Karmin	ÜKE
% Kül	2.54±0.05	2.55±0.05	2.61±0.04
% Kuru madde	43.21±0.81	43.23±0.33	43.27±0.57
pH	5.85±0.01	5.85±0.01	5.85±0.03

4.5.4.1. Çemenlerin renginde meydana gelen değişimler

Çemenlerin renklerinde meydana gelen değişimler Tablo 4.29.'da verilmiştir.

Tablo 4.29. ÜKE ve karminle renklendirilen çemenlerin renk değerleri

	Depolama Süresi*	Kontrol	Karmin	ÜKE
L^*	0	40.08±0.88	38.14±0.75	32.63±0.90
	1	39.40±0.39	35.74±0.54	32.99±1.01
	3	39.39±0.22	37.30±0.40	31.48±0.41
	5	39.07±0.68	37.65±0.58	30.40±0.23
	7	34.19±0.21	31.12±0.68	27.03±1.17
	14	31.08±0.48	29.76±0.76	25.92±0.35
	21	30.74±0.72	30.59±0.57	27.92±1.09
a^*	0	16.85±0.55	18.80±0.42	11.83±0.52
	1	24.09±0.28	25.19±0.58	16.80±0.08
	3	21.26±0.57	25.56±0.54	18.86±0.33
	5	23.25±1.28	20.91±0.50	18.11±0.61
	7	21.15±0.46	22.23±0.49	15.75±0.55
	14	17.90±0.80	18.44±0.44	13.82±0.54
	21	15.66±0.81	16.61±0.63	12.68±0.51
b^*	0	41.34±0.37	39.68±0.41	30.34±0.37
	1	41.70±0.28	39.51±0.41	29.36±0.21
	3	39.33±0.38	38.67±0.68	31.12±0.31
	5	39.75±0.45	33.76±0.40	30.40±0.70
	7	32.98±0.83	31.96±0.43	22.13±0.52
	14	29.66±0.24	28.00±0.63	20.24±0.44
	21	24.41±0.33	22.46±0.77	19.52±0.21
h^o	0	67.86±0.72	64.68±0.63	68.73±0.95
	1	60.02±0.38	57.51±0.55	60.26±0.18
	3	61.64±0.73	56.56±0.79	58.81±0.54
	5	59.72±1.43	58.26±0.67	59.25±1.08
	7	57.35±0.39	55.20±0.85	54.59±1.18
	14	58.94±1.07	56.66±0.72	55.70±0.82
	21	57.36±1.32	53.55±0.66	57.02±1.06
C^*	0	44.65±0.36	43.92±0.33	32.57±0.34
	1	48.16±0.24	46.86±0.55	33.83±0.20
	3	44.71±0.37	46.36±0.59	36.39±0.28
	5	46.07±0.71	39.71±0.43	35.39±0.66
	7	39.18±0.91	38.93±0.31	27.17±0.51
	14	34.65±0.53	33.53±0.64	24.51±0.60
	21	29.01±0.57	27.94±0.94	23.28±0.35

: Gün, L^ : Parlaklık, a^* : Kırmızılık, b^* : Sarılık, C^* : Renk yoğunluğu, h^o : Renk tonu

5. BÖLÜM

TARTIŞMA ve SONUÇ

5.1. Üzüm Kabuklarının Bazı Analitik Özellikleri

Araştırma kapsamında antosiyanin kaynağı olarak kullanılan üzüm kabuklarının bazı genel bileşim unsurları belirlenmiştir (Tablo 4.1.). Öküzgözü üzüm posasının ayıklanması ile elde edilen üzüm kabuklarının kuru madde içeriği %47.80, kül miktarı ise %3.80 olarak saptanmıştır. Örneklerin titrasyon asitliği tartarik asit cinsinden %1.06, pH değeri ise 3.51 olarak belirlenmiştir. Üzüm kabuklarının indirgen şeker miktarı %3.33 düzeyinde iken, toplam şeker miktarının %3.70 seviyesinde olduğu saptanmıştır. Beş farklı üzüm çeşidinin posasının incelendiği bir çalışmada, posalar kurutulmuş olarak temin edilmiş ve genel bileşim analizleri gerçekleştirilmiştir. Öküzgözü üzüm posasının kuru madde ve kül miktarlarının sırası ile %91.38 ve %4.00 olarak belirlendiği aktarılmaktadır. Aynı çalışmada örneklerin titrasyon asitliği %1.80, pH değeri 4.02 düzeyinde saptanmıştır. Öküzgözü üzüm posasının toplam şeker ve indirgen şeker miktarlarının ise sırası ile %5.86 ve %2.9 olduğu belirlenmiştir [29].

5.2. Farklı ekstraksiyon yöntemleri ile elde edilen üzüm kabuğu ekstraktının biyoaktif özelliklerinin belirlenmesi

Daha önce de belirtildiği üzere araştırmada antosiyanin kaynağı olarak kullanılan üzüm kabuklarından klasik ekstraksiyon ve ultrason teknikleri kullanılarak ekstraktlar elde edilmiştir. Bu amaçla çözgen olarak su ve AES kullanılarak elde edilen ekstraktların toplam fenolik madde, toplam antosiyanin miktarı, antioksidan aktivite ve antiradikal kapasiteleri gibi bazı biyolojik özellikleri belirlenmiştir.

5.2.1. Farklı ekstraksiyon yöntemleri ile elde edilen üzüm kabuğu ekstraktının fenolik bileşimleri

Ekstraksiyon işleminde ekstraksiyonunda da çözgen olarak AES karışımının kullanılması halinde ekstraktların toplam fenolik madde miktarının su ekstraktlarından daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Örneğin klasik ekstraksiyon yöntemleri ile çözgen olarak su ve AES karışımının kullanılması durumunda toplam fenolik madde içeriklerinin sırası ile 78.83 ve 101.90 mg GAE/g kuru ekstrakt olduğu belirlenmiştir. Kullanılan solventin asitlendirilmiş

olması durumunda dokunun daha iyi parçalanması nedeni ile gerek ekstrakte edilen madde miktarı ve gerekse de ekstraktların kimyasal kompozisyonları etkilenmektedir (Novak ve ark., 2008). %50 civarında etanol içeren sulu sistemlerde fenolik bileşenlerin başarılı bir şekilde ekstrakte edilebildiği belirtilmektedir. Solvent kompozisyonunun yoğunluk ve dinamik vizkozite gibi parametreleri etkileyerek, difüzyonu ve ekstraksiyon oranlarını etkilediği bilinmektedir [90]. Örneğin kırmızı üzüm posasının ekstraksiyonunda farklı etanol konsantrasyonu ve asitlerin kullanıldığı bir çalışmada toplam fenolik madde miktarlarının 2546 ile 5402 mg GAE/100 g kuru ağırlık düzeylerinde geniş bir dağılım gösterdiği aktarılmaktadır. Aynı çalışmada kırmızı üzüm posasının ekstraksiyonunda %0.1 HCl ile asitlendirilen %57'lik etanol çözeltisinin kullanılması ile toplam fenolik madde miktarının 3424 mg GAE/100 g kuru ağırlık olduğu belirlenmiştir [90]. Üzüm posasından farklı solventlerle antosiyanin ekstraksiyonunun gerçekleştirildiği bir diğer çalışmada etanole su ilave edilmesiyle ekstrakt miktarının arttığını, ancak su oranının çok fazla artmasıyla ekstraktta istenmeyen diğer bileşenlerin miktarının arttığını, dolayısı ile ekstraktta fenolik bileşen miktarının azaldığı belirtilmektedir [91].

Çalışma kapsamında kullanılan üzüm kabukları 6 gün süreyle cibre fermantasyonuna tabi tutulan Öküzgözü posasından ayıklanarak elde edilmiştir. Kırmızı şarap yapımında uygulanan cibre fermantasyonu süresinin çeşide bağlı olarak değiştiği ve Öküzgözü çeşidi için 6 günlük sürenin yeterli olduğu bildirilmektedir [92].

Genel olarak ultrason uygulamasının üzüm kabuğu ekstraktlarında toplam fenolik madde miktarının artmasına neden olduğu belirlenmiştir. Örneğin, üzüm kabuklarından ultrason yöntemi ile elde edilen su ve AES ekstraktlarının sırası ile 77.56 ve 100.20 mg GAE/g kuru ekstrakt düzeyinde toplam fenolik madde içerdikleri saptanmıştır. Farklı materyallerde ultrasonik ekstraksiyonun klasik ekstraksiyon yöntemlerinden daha etkili olduğuna dair çok sayıda araştırmalar bulunmaktadır. Örneğin üzüm posasının ultrason tekniği ile ekstraksiyonu (24 kHz) ile kontrol örneğine kıyasla fenolik madde miktarının %11-35 oranında arttığı bildirilmektedir [26].

5.2.2. Farklı ekstraksiyon yöntemleri ile elde edilen üzüm kabuğu ekstraktının antosiyanin miktarları

Farklı ekstraksiyon yöntemleri ve çözügenlerin kullanılması durumunda üzüm kabuklarından elde edilen ekstraktların antosiyanin miktarları 16.17-6.93 mg siy-3-glikozit/g kuru ekstrakt aralığında belirlenmiştir. Üzüm kabuğundan ultrason uygulaması ile elde edilen su ekstraktlarının en yüksek antosiyanin içeriğine sahip ekstraktlar olduğu saptanmıştır (Tablo 4.2). Sicilya'ya özgü beş farklı üzüm posası üzerinde yapılan bir çalışmada örneklerin toplam antosiyanin içerikleri 3.75-45.27 mg/g MeOH ekstraktı düzeyinde belirlenmiştir [93]. Mevcut araştırma kapsamında kullanılan Öküzgözü cinsi üzüm kabuklarının antosiyanin miktarları 6.93-16.17 mg siy-3-glikozit/g kuru ekstrakt aralığında belirlenmiş olup, sonuçların Ruberto et al. [93]'nın bulgularından biraz daha düşük olduğu görülmektedir. Bu farkın çeşitten kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Nitekim hammaddelerin antosiyanin kompozisyonları ve biyoaktif içerikleri üzerine varyete, tür, olgunluk, yetiştirme şartları ve iklim etkili olmaktadır. Farklı çeşitlerle yapılan çalışmalarda, genetik kontrol altında sentezlenen ikincil metabolitler olan fenolikler ve dolayısı ile antosiyanin miktarlarının farklı bulunması doğal karşılanmaktadır. Ayrıca ekstraksiyon koşulları ve çözügen farklılıkları da antosiyanin miktarları üzerine etkili olabilmektedir [50; 94].

Çözügen olarak su yerine AES karışımının kullanılması durumunda elde edilen ekstraktlarda da antosiyanin miktarlarının arttığı belirlenmiştir. Literatürde kullanılan çözügenin elde edilen ekstraktların gerek verimleri gerekse de kimyasal kompozisyonları üzerine etkili olduğunu gösteren çok sayıda araştırma bulunmaktadır. Örneğin üzümde yapılan bir çalışmada antosiyanin ekstraksiyonunda metanolün etanolden %20, sudan ise %73 daha etkili olduğu belirlenmiştir [95]. Kırmızı üzüm posasından su/etanol karışımının hidroklorik, asetik veya tartarik asitler ile asitlendirilerek biyoaktif özelliklerin karşılaştırıldığı bir çalışmada kırmızı üzüm posasının toplam antosiyanin miktarının 114.2 ile 266.2 mg malvidin eşdeğeri/100 g kuru ağırlık aralığında bulunduğu belirtilmektedir. Aynı çalışmada maksimum antosiyanin seviyesine ekstraksiyonda %85.5'lik etanol kullanılması halinde ulaşıldığı aktarılmaktadır [90].

Ekstraksiyon yöntemleri arasında antosiyanin miktarı üzerine en etkili uygulamanın ultrason olduğu saptanmıştır. Benzer şekilde ahududularda ultrason uygulamasının antosiyanin miktarını arttırdığı ve uygulamanın antosiyaninlerin kimyasal yapısını olumsuz etkilemediği

belirlenmektedir [70]. Farklı üzüm çeşitlerine ait kabukların %1 oranında HCl ile asitlendirilmiş metanolla 1 saat süreyle ultrason tekniği ile ekstraksiyonunda örneklerin antosiyanin ve toplam fenolik madde içeriklerinin sırası ile 581.36-5226.93 µg/g ve 614.21-5452.44 µg/g olarak belirlendiği aktarılmaktadır [96]. Çalışmada ultrasonik ekstraksiyonda çözgen olarak AES kullanıldığında üzüm kabuğundan elde edilen ekstraktların antosiyanin miktarının diğer ekstraksiyon yöntemlerine kıyasla biraz daha yüksek olduğu saptanmıştır. Bu durumda asidik çözgenle birlikte ultrasonun sinerjik bir etki gösterebileceği düşünülmektedir.

5.2.3. Farklı ekstraksiyon yöntemleri ile elde edilen üzüm kabuğu ekstraktının antioksidan kapasiteleri

Ekstraktların antioksidan aktiviteleri fosfomolibden metoduyla belirlenmiş olup, genellikle AES'nin çözgen olarak kullanılması sonucu elde edilen ekstraktların antioksidan aktivitelerinin, su ekstraktlarından biraz daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Örneğin, üzüm kabuğunun su ekstraktlarının 42.47- 44.50 mg AAE/g kuru ekstrakt düzeyinde antioksidan kapasiteye sahip oldukları saptanmıştır. Üzüm kabuğunun AES ekstraktlarının ise 51.84-54.50 mg AAE/g kuru ekstrakt seviyelerinde antioksidan kapasiteye sahip oldukları tespit edilmiştir (Tablo 4.5.). Flavonol ve antosiyaninlerin organik solventlerde suya göre daha iyi çözüldüğü bilinmektedir. Ekstraksiyonda kullanılan çözgen fenolik bileşenlerin ekstraksiyonunda son derece önemli olmakla birlikte, ekstraktların antioksidan aktivitelerinde de önem taşımaktadır. Fenolik bileşiklerin farklı çözgenlerde çözünmeleri halinde antioksidan aktiviteleri değişmektedir. Bu sıralamanın en az polariteden en yüksek polariteye doğru etanol > metanol > su şeklinde olduğu bildirilmektedir [23].

Üzüm kabuklarının çözgen olarak AES karışımının kullanıldığı ultrason tekniği ile elde edilen ekstraktının 54.50 mg AAE/g kuru ekstrakt düzeyinde antioksidan aktivite düzeyi ile en yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir. Öküzgözü üzüm posasının antioksidan aktivitesinin fosfomolibden metodu ile belirlendiği bir diğer araştırmada, posanın 139 mg AAE/g kuru ekstrakt düzeyinde antioksidan aktiviteye sahip olduğu belirtilmektedir [97]. Ancak mevcut araştırma kapsamında elde edilen ekstrakt, posadan değil kabuktan elde edilmiş olduğundan antioksidan aktivitesi doğal olarak daha düşük bulunmuştur. Nitekim, üzüm çekirdeğinin yüksek düzeyde antioksidan aktiviteye sahip olduğu bilinmektedir [98].

5.2.4. Farklı ekstraksiyon yöntemleri ile elde edilen üzüm kabuğu ekstraktının antiradikal kapasiteleri

Örneklerin antiradikal kapasiteleri dikkate alındığında, genel olarak en yüksek antiradikal aktivitenin ultrason uygulamalarında çözgen olarak AES'in kullanılması halinde ortaya çıktığı belirlenmiştir. Öküzgözü üzüm kabuğunun IC₅₀ değerleri 115.87-160.66 µg/mL düzeylerinde belirlenmiş olup, aynı çeşidin posasının metanol ekstraktlarının antiradikal aktivitesinin 109.79 µg/mL seviyesinde olduğu belirtilmektedir [97]. Sicilya'ya özgü beş farklı üzüm posasının DPPH radikali üzerindeki inhibisyon etkileri (IC₅₀ değerleri) 38.93 ile 14.45 µg/mL düzeyinde bulunmuş olup, posaların kabuk fraksiyonundan daha yüksek antiradikal aktiviteye sahip olması doğal karşılanmaktadır [93]. Kırmızı üzüm posası ekstraktı gibi kompleks matrislerde antioksidan ve antiradikal etkilerin yalnızca toplam fenolik madde miktarı ile ilişkilendirilmesinin doğru olmadığı belirtilmektedir [90].

Sonuçlar ultrasonik yöntemle elde edilen ekstraktlarda antiradikal aktivitenin genel olarak daha yüksek olduğunu göstermektedir. Ahududuların ekstraksiyonunda ultrason yöntemi uygulandığında ekstraktın antosiyanin kompozisyonunda hafif bir değişiklik olduğu belirtilmektedir [70]. Ultrason uygulamalarından elde edilen ekstraktların diğer uygulamalardan az da olsa yüksek antiradikal aktiviteye sahip olmasının ekstraktların fenolik ve antosiyanin bileşimlerinden kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Nitekim yapısal farklılıkların antioksidan ve antiradikal aktivitede değişikliklere sebep olduğu çok sayıda araştırmacı tarafından bildirilmektedir [23; 93; 99].

5.2.5. Farklı ekstraksiyon yöntemleri ile elde edilen üzüm kabuğu ekstraktlarının antimikrobiyal özellikleri

5.2.5.1. Farklı ekstraksiyon yöntemleri ile elde edilen üzüm kabuğu ekstraktının agar difüzyon yöntemi ile antimikrobiyal aktivitelerinin belirlenmesi

Ultrason ve klasik yöntemler ile ekstrakte edilen ve çözgen olarak su veya ASE ile ekstrakte edilen ÜKE'nin ikisi maya olmak üzere toplam 15 farklı mikroorganizma üzerindeki inhibitif etkileri belirlenmeye çalışılmıştır. Genel olarak antimikrobiyal aktiviteleri değerlendirildiğinde ÜKE'lerinin *S. cerevisiae* ve *C. albicans* üzerine antimikrobiyal etkilerinin olmadığı saptanmıştır. Ekstraktların en etkili dozunun %10'luk konsantrasyonları olduğu belirlenmiştir. ÜKE'nin antimikrobiyal etkinliklerinin sınındığı çok sayıda

mikroorganizma üzerine %2.5 konsantrasyonda dahi etkili oldukları saptanmıştır. AES ekstraktlarının su ekstraktlarından daha aktif olduğu belirlenmiştir. Ultrason tekniği veya klasik ekstraksiyon yöntemleriyle elde edilen ÜKE'lerin inhibitif etkilerinin genel olarak birbirine yakın olduğu tespit edilmiştir. Ultrason tekniği ile elde edilen ÜKE'nin AES ekstraktlarının %10'luk konsantrasyonlarda *L. monocytogenes* (19.0 mm), *B. cereus* FMC 19 (16.5 mm), *B. cereus* F2 (15.5 mm), *P. aeurogenesa* (13.0 mm) başta olmak üzere *E. coli* O157: H7 (12.5 mm), *B. subtilis* ATCC (13.5 mm), *S. thymrium* (11.5 mm) ve *S. aureus* ATCC 1135 (13.0 mm) üzerine antimikrobiyal etkisinin olduğu saptanmıştır (Tablo 4.7.). Ancak istisnai bir durum olarak çözgen olarak su kullanılması halinde klasik ekstraksiyon yöntemi ile elde edilen ÜKE'nin *B. cereus* F2 üzerine olan inhibitif etkisinin (%10'luk konsantrasyonda; 16.5 mm) AES ekstraktından (%10'luk konsantrasyonda; 13.5 mm) daha yüksek olduğu bulunmuştur. Yapılan araştırmalar üzüm posası ekstraktının çeşitli patojen ve saprofit mikroorganizmalara karşı antibakteriyal etkiye sahip olduğunu ortaya koymuştur [100; 101; 102]. Ayrıca bu posa yüksek miktarda fenolik madde (kateşin, epikateşin, gallik asit gibi) içermektedir. Bu bileşiklerin de antimikrobiyal etkiye sahip olduğu bilinmektedir [59; 60; 103; 104; 105].

Genel olarak mikroorganizmalar üzerine AES ekstraktlarının su ekstraktlarından daha etkili oldukları ve özellikle konsantrasyon seviyesindeki artışın antimikrobiyal etkiyi olumlu yönde etkilediği saptanmıştır. Ekstraktların eldesi, mikrobiyal denemedeki farklılıklar antimikrobiyal aktivitenin farklı ifade edilmesine neden olduğundan elde edilen sonuçların direkt olarak kıyaslanabileceği literatür bulunmamaktadır. Bununla birlikte yapılan çalışmalarda antosiyaninlerin mikroorganizmalar üzerine inhibitif veya stimülatif etkilerinin olabileceği belirtilmektedir [32].

Fenolik bileşikler gibi ikincil metabolitlerin bitkileri UV ışığından, parazitlerden ve serbest radikallerden koruduğu bilinmektedir. Genellikle bitkiler, hücrelerini tatsız ve zehirli forma çevirerek kendilerini çevre etkenlerinden özellikle de parazitlerden korumaktadırlar. Hücre strese girdiğinde de bu kimyasalların miktarı artmaktadır. Bitkiler ile çevre arasındaki bu etkileşim bitkilerden ekstrakte edilen fenolik bileşenler ile antosiyaninlerin antioksidan ve antimikrobiyal etkilerini açıklamaktadır [52]. Tanenler, basit fenoller ve fenolik asitler antimikrobiyal aktiviteye sahip bileşiklerdir [106]. Ancak bireysel bazda ele alındıkları takdirde hepsinin farklı antimikrobiyal aktiviteye sahip oldukları gözlenmiştir. Örneğin, kateşinin birçok Gram-pozitif ve Gram-negatif bakteriye karşı kumarinler ve gallik asitten

daha zayıf bir aktivite gösterdiği bildirilmektedir [107]. Tanenlerin antimikrobiyal etkilerinin mikrobiyal enzimler ve hücre proteinleri ile oluşturduğu komplekslerden kaynaklandığı belirtilmektedir [106]. Tanenlerin antibakteriyel etkilerinin yanı sıra antifungal ve antiviral etkilerinin de olduğu aktarılmaktadır [108]. Çalışma kapsamındaki ÜKE'nin genel olarak Gram pozitif bakterilere karşı biraz daha etkili olduğu belirlenmiş olup, bu sonuç literatür verileri ile uyum içerisinde. Nitekim fenolik bileşiklerin genellikle Gram pozitif bakterilere karşı daha yüksek antimikrobiyal etkiye sahip oldukları belirtilmektedir [109]. Gram negatif bakterilerin lipopolisakkarit yapısındaki hücre membranlarının kimyasal strese direnç göstermesinde etken olan başlıca bileşen olduğu düşünülmektedir. *E. coli* gibi Gram negatif bakteriler nispeten düşük molekül ağırlıklı besin maddelerini porin adı verilen hidrofilik kanallar vasıtası ile sağlamaktadır. En dıştaki membran eksternal ajanlara karşı bariyer görevini üstlenmiş olmasına rağmen özellikle antimikrobiyal ajanlar tarafından kolayca etkisiz hale getirilebilmektedir. Örneğin bir şelatlama ajanı olan etilendiamintetraasetik asit (EDTA) membranın stabilizasyonunda görev alan divalent katyonları (Ca^{++} ve Mg^{++}) etkileyerek membranların parçalanmasına neden olmaktadır. Proantosiyanidinler metal iyonlarını şelatlayarak lipopolisakkarit yapısını etkilemektedir. Yapılan çalışmalarda ahududu polifenollerinin EDTA gibi lipopolisakkarit yapıyı parçalayarak, en dıştaki membranın geçirgenliğini arttırdığı belirlenmiştir. Antosiyaninlerin hidroksil, metoksil, şeker ve şeker substitue grupları antosiyanin stabilitesini etkileyen faktörler arasında yer almaktadır ve bu yapısal farklılıklar antosiyaninlerin iyon şelatör olarak görev üstlenmelerinde etkili olmaktadır [52].

Gerek üzüm posası [100; 101; 102] ve gerekse de çekirdeklerinden [103; 110; 111] elde edilen ekstraktların antimikrobiyal aktiviteleri belirlenmiş olsa da Öküzgözü üzüm cinsinin kabuklarında benzer bir çalışmaya rastlanmamıştır. Dolayısı ile on üçü bakteri ve iki adedi maya olan toplam on beş mikroorganizmaya karşı antimikrobiyal aktiviteleri ayrıntılı bir şekilde ilk kez bu çalışma ile tespit edilmiştir. Elde edilen bulgular, üzüm kabuğunun özellikle AES ekstraktlarının antibakteriyel etkiye sahip olduğunu, dolayısıyla gıdaları patojen ve saprofit bakterilere karşı koruyabileceğini ortaya koymaktadır.

5.2.5.2. Üzüm kabuğu ekstraktının elma suyunda *E. coli* O157:H7 ve *B. cereus* F2 üzerine antimikrobiyal etkisinin saptanması

1980’li yılların başında tanımlanan *E. coli* O157:H7, en önemli gıda patojenleri arasında yer almaktadır. Kanlı diare, hemolitik üremik sendrom gibi rahatsızlıklara neden olan *E. coli* O157:H7 süt, kıyma, içme suyu, elma suyu, marul gibi farklı gıdalarda bulunabilmektedir [112]. Elma sularının pH değerleri genellikle 3.3-4.1 aralığında olduğundan, gıda patojenleri için çok uygun bir gelişme ortamı değildir. Ancak elma suları özellikle asit toleransı yüksek olan *E. coli* O157:H7’nin gelişimi için son derece uygundur (Patil ve ark., 2010). *E. coli* O157:H7’nin asidik meyve sularında buzdolabı sıcaklığında 1-2 haftadan daha uzun süre canlılığını koruyabildiği bildirilmektedir [113]. Hem buzdolabı hem de oda sıcaklığında gelişebilen bir mikroorganizma olan *E. coli* O157:H7’nin asidik ananas suyunda da hem 20-25°C hem de 4°C’de gelişebildiği aktarılmaktadır [114]. Aside toleransı yüksek olduğundan 1980’lerde Kanada’da kontamine elma suyu tüketimine bağlı olarak gıda zehirlenmeleri olduğu bildirilmektedir [115]. 1970-2000 yılları arasında A.B.D.’de elma suyu tüketimiyle ortaya çıkan 78 *E. coli* O157:H7 enfeksiyon vakasından biri ölümle sonuçlanmış olup, bu vaka elma suyu kaynaklı *E. coli* O157:H7 enfeksiyonuna bağlı ilk ölüm olarak rapor edilmiştir [116]. 1995’ten 2005 yılına kadar Hastalık Kontrolü ve Koruma Merkezi’ne meyve suyu zehirlenmeleri ile ilgili olarak ise 21 vaka bildirildiği ve bunun 10 tanesinin elma suları ile ilgili olduğu belirtilmektedir [115].

Gerek kontrol gerekse de ÜKE ile renklendirilen örneklerde inkübasyon süresi uzadıkça *E. coli* O157:H7’nin inhibe olduğu belirlenmiştir. Özellikle 72. saat inkübasyondan sonra inhibisyonun hızlı bir şekilde gerçekleştiği belirlenmiştir. Örneğin kontrolde yaklaşık 2 log azalma belirlenirken, ÜKE ile renklendirilen örneklerde ise bu düşüş 5-6 log civarında saptanmıştır. Benzer şekilde Frenk üzümü ve mürver konsantrelerinin *E. coli* DSM 498 üzerine antimikrobiyal etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada, sadece Frenk üzümü konsantresinin *E. coli* gelişiminde 1. ve 3. günlerde 1 log’ uk azalmaya sebep olduğu belirlenmiştir [32].

Gerek 4 gerekse de 20°C sıcaklıklarda inkübe edilen örnekler incelendiğinde *B. cereus* F2 inhibisyonunun birbirine yakın olduğu belirlenmiştir. *B. cereus* F2’nin sporlu olması nedeni ile ortam şartları gelişmesine uygun olmadığında spor oluşturduğu, ancak şartların uygun olması durumunda (örneğin besiyerine ekim yapılması halinde) vejetatif hale geçtiği

bilinmektedir [117]. Elma suyu asidik olduğundan bakterinin spor oluşturmaya nedeni ile inhibisyonun *E. coli* O157:H7'den düşük olduğu düşünülmektedir. Nitekim *B. cereus* F2 sayısında her iki inkübasyon sıcaklığında da yaklaşık 2 log'luk bir azalış tespit edilirken, *E. coli* O157:H7'de bu azalış 4 ve 20°C sıcaklıklar için sırası ile yaklaşık 3.5-4.5 log ve 5.0-8.0 log olarak belirlenmiştir. 4°C'de inkübe edilen örnekler arasında sadece 72. saat, 20°C'de muhafaza edilen örneklerden ise 24. saat örneklerinde ilave edilen ekstraktların *B. cereus* F2 üzerine etkisi önemli bulunmuştur. Yapılan bir çalışmada 14 üzüm kabuğundan elde edilen ekstraktların *B. cereus*'un ve *E. coli* O157:H7'nin inhibisyonları için gerekli minimum konsantrasyonlarının (MIC) sırası ile 0.08-0.34 mg gallik asit eşdeğeri (GAE)/mL mikrobiyal besiyeri ve 0.15-0.44 mg GAE/mL mikrobiyal besiyeri aralığında bulunduğu ve bu etkinin ekstraktların fenolik bileşimine bağlı olduğu belirtilmektedir [109]. Nitekim hücre membranı zarar gördüğünde, oluşan küçük porlardan fenolik bileşikler hücreye girmekte ve metabolizmaya zarar vererek antimikrobiyal etkide bulunmaktadır [52].

Daha önce de belirtildiği gibi kontrol ve ÜKE ile renklendirilen örneklerin pH değerleri sırası ile 4.01 ve 3.98 olarak tespit edilmiştir. Elma sularının nispeten düşük pH değerine sahip olmalarının da ekstraktların etkinliğini arttırmış olabileceği düşünülmektedir. Nitekim özellikle düşük pH değerlerinin *E. coli* O157:H7'nin hücre mebranına zarar vererek antimikrobiyal maddelerin etkinliğini arttırdığı aktarılmaktadır [118]. Sıcaklığın *E. coli* O157:H7 üzerine olan etkisi önemlidir. Yapılan bir çalışmada 23°C'de depolanan elma suyuna ilave edilen %0.025 (hacim/hacim) oranındaki trans-sinimaldehit *E. coli* O157:H7'yi 5 gün içerisinde tamamen inaktive ederken, 8°C'de inkübe edilen örneklerde ise benzer inaktivasyonun ancak 2 haftanın sonunda ortaya çıktığı belirlenmiştir. Elma sularında nisin ve tarçın kombinasyonlarının antimikrobiyal aktivitelerinin araştırıldığı bir diğer çalışmada da *E. coli* O157:H7'nin 20°C'de 5°C'ye kıyasla daha fazla inaktive olduğu aktarılmaktadır [118]. Zhao ve ark. [119] tarafından yapılan çalışmada da benzer sonuçlara ulaşıldığı bildirilmektedir. Pastörize edilmemiş elma sularına *E. coli* O157:H7 inoküle edilerek %0.1 potasyum sorbat ve %0.1 sodyum benzoat veya kombinasyonlarının antibakteriyel etkisinin incelendiği bu çalışmada, örnekler 8°C ve 25°C sıcaklıklarda inkübe edilmişlerdir. *E. coli* O157:H7 8°C'de inkübe edilen elma sularında 10-31 gün canlı kalırken, 25°C'de inkübe edilen örneklerde 2-3 gün süreyle canlı kaldığı belirtilmektedir [119]. *E. coli* O157:H7'nin düşük sıcaklıklarda, oda sıcaklığına kıyasla daha az inaktive olması, mikroorganizmaların bu sıcaklıkta daha az metabolik aktivite göstererek gelişmeleri ve ölüm hızının düşük olmasına

bağlanmaktadır. Ayrıca düşük sıcaklıklarda çözünürlüğün azalmasına bağlı olarak, ilave edilen ekstraktların etkinliğinin de azalabileceği düşünülmektedir. Düşük sıcaklıkların bakteri hücre membranının akışkanlığında değişikliklere sebep olabileceği veya bakteri hücre membranının yapısındaki yağ asidi profilinden kaynaklanabileceği bildirilmektedir. Nitekim antimikrobiyal ajanlar için hücre membranı en önemli bariyer olup, yapılan çalışmalarda mikroorganizmaların soğukta inkübe edilmeleri halinde hücre lipid kompozisyonunda farklılıklar olduğu, yağ asitlerinde nispi değişimler gözlemlendiği, doymamışlık oranının arttığı ve tüm bunların sonucunda da hücrenin akışkanlığının değiştiği aktarılmaktadır [118].

5.3. Antosiyaninlerin ısıl stabilitelerinin belirlenmesi

5.3.1. Üzüm kabuğu ekstraktının tampon çözeltilerde ısıl stabiliteleri

Antosiyaninler özellikle düşük pH değerlerinde daha yüksek stabilizasyon sergilemelerinin [81] yanı sıra meyve sularının pH değerlerinin genellikle 3-4 aralığında bulunması [120] nedeni ile çalışma için bu pH değerleri seçilmiştir. pH değerleri düşük olan meyve sularının pastörize edilerek dayanıklı hale getirilmeleri sırasında sıcaklık süre normunun biraz yüksek tutulması halinde ortaya çıkabilecek durumun değerlendirilebilmesi için bu çalışma tasarlanmıştır. pH değerleri 3 ve 4 olan tampon çözeltilere depolanan elma sularının renklendirilmesinde kullanılan konsantrasyonda ÜKE ilavesi yapılarak, örnekler 90°C sıcaklıkta 3 saat süreyle ısıl işleme maruz bırakılmıştır. Isıl işlemin antosiyaninlerin degradasyonlarına neden olduğu ve bu degradasyonun özellikle ÜKE'de yoğunlaştığı belirlenmiştir. pH derecesi 3 olan tampon çözeltilerde 90°C'de 180 dakika süreyle ısıl işleme maruz bırakılması halinde ÜKE'nin kaybı %65.54 olarak belirlenmiştir. Üzüm antosiyaninlerinin asillenmemiş antosiyanin içeriğinin yüksek olması nedeni ile ısıl işlem stabilizasyonunun düşük olduğu düşünülmektedir. Benzer şekilde Sodilova, ve ark. [121], 95°C'de 3 dakika ısıl işlem gören mürver pigmentlerinin %50'sinin degrade olduğunu ve bunun antosiyanin kompozisyonuyla ilgili olduğunu belirlemişlerdir. pH değeri 4 olan tampon çözeltilerde renklendirici olarak kullanılan ÜKE'de antosiyanin kaybının pH 3'te saptanan kayıplara yakın olduğu ve antosiyanin kaybı üzerine pH farklılığının etkisinin çok önemli olmadığı saptanmıştır. Bu sonucun pH değerlerinin birbirine son derece yakın olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. [81]. Antosiyanin ve diğer fenolik bileşenlerin degradasyona meyilli oldukları bilinmektedir. Antosiyaninler asidik koşullarda stabil olmakla birlikte, diğer

şartlarda hızla renksiz türevlerine dönüşebilmektedirler. Antosiyanin degradasyonunda en önemli parametreler pH ve sıcaklık olarak bildirilmektedir [122].

5.3.2. Üzüm kabuğu ekstraktının elma sularında ısıl stabiliteleri

Elma suları 40 mg antosiyanin/L düzeyinde ÜKE ile renklendirildikten sonra degradasyon kinetikleri hesaplanmıştır. Depolama sürecindeki sıcaklığa bağlı olarak ortaya çıkan antosiyanin degradasyonunun birinci dereceden reaksiyon kinetiğine uyduğu birçok araştırmacı tarafından bildirilmektedir [78; 79; 80; 123; 124; 125]. Isıl işleme maruz bırakıldığında en çok degradasyona uğrayan grubun ÜKE antosiyaninleri olduğu ve hız sabitlerinin 70, 80 ve 90°C sıcaklıklar için sırası ile 1.61×10^{-3} , 2.76×10^{-3} ve $4.38 \times 10^{-3} \text{ dak}^{-1}$ olduğu tespit edilmiştir. Bir araştırmada ÜKE için 80°C’de elde edilen hız sabiti 2.76×10^{-3} olarak belirlenmiş olup, Dyrby ve ark. [79]’nın bulgularıyla kıyaslandığında, Öküzgözü cinsinden elde edilen ÜKE’nin daha yüksek stabiliteye sahip olduğu sonucuna ulaşılmaktadır. Wang and Xu [80], böğürtlen suyunun 70, 80 ve 90°C sıcaklıklar için hız sabiti değerlerini sırası ile 1.32×10^{-3} , 2.47×10^{-3} ve $3.94 \times 10^{-3} \text{ dak}^{-1}$ olarak belirlemişlerdir. Bu çalışmada üzüm kabuğu antosiyaninlerinin böğürtlen antosiyaninlerinden daha zayıf stabilite gösterdikleri sonucuna ulaşılmıştır.

Sıcaklıktaki artış, hız sabitini (k değeri) arttırırken, yarılanma süresini ($t_{1/2}$) kısaltmaktadır. Sıcaklık derecesindeki artışa bağlı olarak k değeri artarken, $t_{1/2}$ değerinin ise azaldığı çalışmalarda saptanmıştır [123; 126]. Böğürtlen suyunun 70, 80 ve 90°C sıcaklıklar için $t_{1/2}$ değerleri sırası ile 8.8, 4.7 ve 2.9 saat olarak belirlenirken, aktivasyon enerjisi $58.95 \text{ kJ mol}^{-1}$ olarak tespit edilmiştir [80]. Vişne sularında 60, 70 ve 80°C sıcaklıklarda $t_{1/2}$ değerinin sırası ile 54.3, 22.5 ve 8.1 saat olduğu belirtilmektedir [78]. Sıcaklığın antosiyanin stabilitesi üzerine etkisinin belirlenmesi için aktivasyon enerjileri hesaplanmış olup, bu değer ÜKE için $51.87 \text{ kJ mol}^{-1}$ olarak belirlenmiştir.

Beklendiği üzere sıcaklık derecesindeki artışa ve sürenin uzamasına bağlı olarak antosiyanin kaybının hızlandığı belirlenmiştir. Nitekim pigment degradasyonu depolama sıcaklığı, antosiyanin yapısı ve ekstraksiyon koşullarına bağlı olarak değişmekte olup [99], ısıl işlem sıcaklığındaki artışa bağlı olarak antosiyanin kaybının hızlandığı birçok araştırmacı tarafından saptanmıştır [123; 126].

5.4. Renklendirilen Gıdalar

5.4.1. Elma Suları

İlave edilen ÜKE'nin elma sularının pH değerleri ve % titrasyon asitliği üzerine olan etkisi son derece az olduğu tespit edilmiştir (Tablo 4.10.).

5.4.1.1. Elma sularının toplam fenolik madde miktarlarında meydana gelen değişim

Elma sularının renklendirilmesi amacıyla 100 mL örneğe ÜKE'den 4 mg antosiyanin içeren ekstrakt ilavesi yapılmıştır. ÜKE'ndan 0.37 g ilave edilerek, örnekler renklendirilmiştir.

Farklı kültürlerdeki toplumlarda, en çok tüketilen meyvelerden biri olan elmanın fenolik bileşimi çeşide bağlı olarak değişmekle birlikte, klorojenik asit, kafeik asit, *p*- kumarik asit, ferulik asit, kateşin, epikateşin, pyrosiyanidinler (B1, B2, trimer C1), rutin ve floridzin elma suyunun başlıca fenolik bileşimini oluşturmaktadır (Karaman et al., 2010). Elma sularında koku-lezzet karakteristikleri fenolik bileşim ile ilgilidir. Aynı zamanda fenolik bileşikler meyve ürünlerinin fizyolojik yapısının yanı sıra kalitesi hakkında da fikir vermesi nedeni ile önem taşımaktadırlar [127].

Kontrol grubunun depolamanın başlangıcında (0. gün) 326.36 mg GAE/L toplam fenolik madde miktarı içerdiği saptanmıştır. Elma sularının fenolik bileşimleri başta çeşit olmak üzere kültivasyon, ekstraksiyon metodu, proses koşulları ve enzim uygulamalarına bağlı olarak geniş bir varyasyon gösterebilmektedir. Örneğin, yapılan bir çalışmada taze elma suyunun toplam fenolik madde içeriği 6380 mg GAE/L olarak belirlenirken, bir başka çalışmada fenolik madde miktarının 154-970 mg/L düzeyinde tespit edildiği aktarılmaktadır [128].

ÜKE ile renklendirilen elma sularının 0. gün toplam fenolik madde miktarı 706.05 mg/L olarak belirlenmiştir. Elma sularına ÜKE ilave edilmesi durumunda ekstraktların fenolik maddelerinin hemen hiçbir bozunma reaksiyonuna uğramaması nedeni ile korunduğu saptanmıştır. Nitekim elma sularına ilave edilen ekstraktların fenolik madde miktarları dikkate alındığında ÜKE ile renklendirilen elma sularının ise 703.39 mg GAE/L elma suyu ((3.70 g x 101.90 mg GAE/g kuru ekstakt) + 326.36 mg GAE/L = 703.39 mg GAE/L elma suyu) düzeyinde toplam fenolik madde içeriğine sahip olması beklenmekteydi. Tespit edilen toplam fenolik madde miktarları olması muhtemel düzeye son derece yakın olduğundan ilave

edilen ÜKE'nin elma sularının renklendirilmesi aşamasında son derece stabil olduğu sonucuna ulaşılmıştır.

4°C'de 180 gün süreyle depolanan ÜKE ile renklendirilen örneklerin toplam fenolik madde içeriğinin 706-507.76 mg GAE/L düzeyinde olduğu belirlenmiştir. Örnekler arasında en düşük fenolik madde içeriğine ise beklendiği üzere 326.36-283.47 mg GAE/L toplam fenolik madde içeriğiyle kontrol grubunun sahip olduğu tespit edilmiştir (Tablo 4.12.). Depolama süresince ortaya çıkan fenolik madde kayıplarının ise 4°C'de 180 gün süreyle depolanan ÜKE ile renklendirilen örneklerde %28.08 seviyelerinde olduğu saptanmıştır. 20°C'de 90 gün süreyle depolanan ÜKE ile renklendirilen örneklerde ise kayıplar şu şekilde gerçekleşmiştir; %14.44. 60 gün 30°C'de depolanan ÜKE ile renklendirilen örneklerin toplam fenolik madde kayıplarının ise %11.69 düzeyinde olduğu belirlenmiştir.

Depolama süresince elma sularının fenolik bileşimlerinde genel olarak azalmalar olmakla birlikte, bazı dalgalanmalar olduğu saptanmıştır. Fenolik bileşiklerin degradasyon ürünlerinin veya enzimatik olmayan esmerleşme reaksiyonlarının Folin-ciocalteu uygulamalarında interferans bileşenler olabileceği belirtilmektedir. Örneğin yapısında bulunan şekerlerin de fenolik madde analizinde sonuçların olduğundan biraz daha yüksek çıkmasına neden olabildiği bildirilmektedir [5]. Ayrıca Folin-Ciocalteu ayırıcının karotenoidler ve aminoasitlerle de reaksiyona girebileceği aktarılmaktadır [128]. Depolama süresinin uzamasıyla elma sularının toplam fenolik madde miktarında genel bir düşüş olduğu belirlenmiştir. Literatürde gerek fenolik madde içeriği gerekse de antioksidan aktivitenin depolama süresince sabit kaldığı ya da azaldığına dair çok sayıda araştırmalar yer almaktadır. Örneğin, böğürtlenlerin buzdolabı sıcaklığında 9 gün süreyle depolandıkları bir çalışmada, fenolik bileşiklerin miktarlarında dalgalanmalar olmakla birlikte, depolama süresinin sonuna doğru fenolik madde miktarlarının azaldığı belirtilmektedir [122; 130], böğürtlendenden elde edilen ve başlangıç fenolik madde miktarı 1899 mg GAE/L olan antosiyanin bazlı ekstraktları 90 gün süreyle -80, 4 ve 25°C olmak üzere 3 ayrı sıcaklıkta depolandıkları çalışmalarında, depolamanın sonunda ekstraktların fenolik madde miktarlarının 1696-1537 mg GAE/L aralığında tespit etmişlerdir. Benzer şekilde elma sularının buzdolabı veya oda sıcaklıklarında bir ay süreyle depolanması sırasında fenolik madde miktarlarındaki değişimin önemli olmadığı belirtilmektedir [131]. Frenk üzümü, kıvılcık, yaban mersini, nar, çilek ve vişne sularının 4°C sıcaklıkta 29 gün süreyle depolanmaları sırasında fenolik madde miktarlarında ise dalgalanmalar olduğu belirtilmektedir [129].

5.4.1.2. Elma sularının antosiyanin miktarlarında meydana gelen değişim

Veriler incelendiğinde, beklendiği üzere depolama sıcaklığındaki artışa bağlı olarak örneklerin antosiyanin kaybının arttığı saptanmıştır. ÜKE ile renklendirilen örneklerde antosiyanin kayıpları 4°C’de 6 ay depolama sonunda %38.85, 20°C’de 3 ay depolama sonunda %40.95 ve 30°C’de 2 ay depolama sonunda ise %71.38 olarak saptanmıştır.

Pigment degradasyonu depolama sıcaklığı, antosiyanin yapısı ve ekstraksiyon koşullarına bağlı olarak değişmekle birlikte [99], antosiyanin degradasyonunda en önemli parametreler pH ve sıcaklıktır [34; 122]. Nar sularının 4, 20 ve 37°C sıcaklıkta 210 gün süreyle depolandığı bir çalışmada da antosiyanin miktarının depolama sıcaklığındaki artışa bağlı olarak düştüğü belirtilmektedir [132]. Benzer şekilde başlangıç antosiyanin miktarı 710 mg/L olan ve böğürtlenden elde edilen ekstraktların, -80, 4 ve 25°C sıcaklıklarda 90 gün süreyle depolanmaları sonucunda antosiyanin içeriklerinin sırasıyla 684, 621 ve 261 mg/L seviyelerine düştüğü belirtilmektedir [122]. Brownmiller ve ark. [133], yaban mersini püresinin 6 ay depolanmasıyla antosiyanin miktarının %50’den fazla kayba uğradığını belirlemişlerdir. Hager ve ark., [135] da durultulmamış siyah ahududu suyunun 6 ay süreyle depolanması halinde antosiyanin miktarındaki azalmanın %60’ın üzerinde olduğunu saptamışlardır. Diğer bir çalışmada ise 23°C sıcaklıkta 60 gün süreyle depolanan ahududu sularında antosiyanin kaybının %50 civarında olduğu bildirilmektedir [135]. Görüldüğü üzere yapılan çalışmalar antosiyaninlerin depolama süresince degradasyona uğradığını ortaya koymakta ve mevcut araştırma bulgularıyla paralellik sergilemektedir.

ÜKE ile renklendirilmemiş olan kontrol örneklerinde antosiyanin saptanamamıştır. Tüm depolama sıcaklıklarında antosiyanin kaynaklarının ve depolama süresinin antosiyanin miktarı üzerine etkisi önemli bulunmuştur. Gıdaların doğal antosiyanin ekstraktı ilavesi ile renklendirilmesinde stabilizasyon üzerine antosiyanin kompozisyonunu önemli parametrelerden biridir [136]. Siyah üzüm antosiyaninlerinde asillenmemiş antosiyanin formları ağırlıklı olarak bulunmaktadır [81]. Başat siyah üzüm antosiyaninleri arasında siyanidin, malvidin, delfinidin, peonidin, petunidin ve pelargonidin yer almaktadır [137].

5.4.1.3. Elma sularının antiradikal kapasitelerinde meydana gelen değişim

Farklı sıcaklıklarda depolanan elma sularının depolama sürecindeki antiradikal aktivite düzeylerinde meydana gelen değişimler incelendiğinde, depolama süresinin uzamasına bağlı

olarak antiradikal aktivitenin azaldığı belirlenmiştir (Tablo 4.13.). ÜKE ile renklendirilen elma sularının 0. gün antiradikal aktiviteleri %78.81 iken, kontrol örneklerinin %47.89 antiradikal aktiviteye sahip olduğu saptanmıştır. Elma sularının 0. gün örneklerinin antiradikal kapasiteleri dikkate alındığında toplam fenolik madde içerikleri yüksek olan ÜKE ile renklendirilen örneklerin antiradikal kapasitelerinin de yüksek olduğu görülmektedir. Depolama sıcaklığı arttıkça örneklerin antiradikal kapasitelerindeki kayıpların daha çok olduğu belirlenmiştir. Örneğin, kontrol örneklerinin antiradikal kapasitesinde 4°C’de 180 gün depolandığında %36.88, 20°C’de 90 gün depolandığında %42.47 ve 30°C’de 60 gün depolandığında ise %42.93 kayıp olduğu belirlenmiştir. ÜKE ile renklendirilen örneklerin 4, 20 ve 30°C’de depolanması halinde antiradikal kapasitelerindeki kayıplar ise sırası ile %12.71, %13.65 ve %12.37 olarak tespit edilmiştir.

Antosiyaninler zamanla degrade olarak, renksiz fenolik formlara dönüşmekte ve oluşan bu yeni formlar biyoaktivite kaybına neden olmaktadır [138]. Polifenollerin polimerizasyon derecesi belli bir değere ulaştığında molekül kompleksliği artarak, DPPH radikali ile reaksiyona girecek hidroksil grup sayısının azalmasına neden olmaktadır. Bu reaksiyonlar sonucunda da örneklerin antiradikal kapasiteleri düşmektedir [129]. Elma sularının depolanması sırasında gerek antosiyanin gerekse de fenolik madde miktarlarında azalmalar tespit edilmiştir. Örneklerin antioksidan ve antiradikal aktivitelerinin düşmesinin bununla ilgili olduğu düşünülmektedir. Antosiyanince zengin meyvelerle yapılan bir çalışmada da böğürtlen, ahududu ve çileklerin antioksidan özelliklerindeki azalmalar, örneklerin antosiyanin miktarlarındaki azalmayla ilişkilendirilmektedir [12].

Elma sularının antiradikal aktivitelerinin, depolama süresinin uzamasına bağlı olarak genel olarak azaldığı tespit edilmiştir. Yapılan çalışmalar da depolama süresince genellikle antiradikal aktivitede benzer şekilde azalma olduğunu ortaya koymaktadır. Örneğin, böğürtlenlerin buzdolabı sıcaklığında 9 gün süreyle depolanmaları sırasında örneklerin antiradikal aktivitelerinde dalgalanmalar olmakla birlikte, depolama süresinin sonuna doğru antiradikal aktivitenin azaldığı belirlenmiştir. Böğürtlenlerin depolama süresince antiradikal aktivitelerindeki bu azalmanın, örneklerin antosiyanin kayıplarından kaynaklandığı belirtilmektedir [130]. Yine böğürtlendenden elde edilen ekstraktların 90 gün süreyle -80, 4 ve 25°C olmak üzere 3 ayrı sıcaklıkta depolandığı bir çalışmada da depolama sıcaklığındaki artışa bağlı olarak, örneklerin antosiyanin, toplam fenolik madde içeriği ve antiradikal kapasitelerinde düşüş gözlemlendiği belirtilmektedir [122].

5.4.1.4. Elma sularının renginde meydana gelen değişimler

Elma sularının 4, 20 ve 30°C sıcaklıklarda depolandığı çalışmada her üç sıcaklıkta da en yüksek L^* değerinin kontrol grubuna ait olduğu tespit edilmiştir. Örneklerin L^* değerlerinde zamanla azalmalar olduğu belirlenmiştir. L^* değerlerindeki azalmanın depolama sıcaklığındaki artışa bağlı olarak hızlandığı saptanmıştır. Örneğin, başlangıç L^* değeri 10.81 olan kontrol elma sularının 4°C’de 180 gün, 20°C’de 90 gün ve 30°C sıcaklıkta 60 gün süreyle depolandıktan sonra L^* değerleri sırası ile 4.67, 8.25 ve 10.00 seviyelerine düşmüştür. Örnekler arasında parlaklık değeri en düşük olan ÜKE ile renklendirilen elma sularının L^* değerleri ise 4, 20 ve 30°C sıcaklıklarda sırası ile 3.97-2.59, 3.97-3.19 ve 3.97-3.17 aralığında tespit edilmiştir. Nispeten yüksek sıcaklıklarda gerek enzimatik olmayan esmerleşme reaksiyonları gerekse de pigment yıkımı hızlandığından renk değişimleri daha fazla dikkat çekmektedir. Örneğin, 4°C sıcaklıkta depolanan nar sularının renk değerlerindeki değişimin 20 ve 37°C sıcaklıklarda depolanan örneklerden daha az olduğu bildirilmektedir [132]. Gıdaların yapısındaki antosiyaninler üretim esnasında değişime uğramakta ve renk parametrelerinde değişimler meydana gelmektedir. Örneğin nar sularının konsantreye işlenmeleri sırasında uygulanan yöntemlere göre L^* değerlerinin %43.4-55.3 oranlarında azaldığı belirlenmiştir [139]. L^* değerinin aydınlık-karanlık eksenini olması nedeniyle, örneklerin L^* değerlerindeki düşüş örneklerin koyulaştığını göstermektedir. Daha önce de belirtildiği gibi genel olarak L^* değerindeki düşüşler gıdaların esmerleşmesi ve pigment yıkımı ile ilişkilendirilmektedir [139].

Tüm sıcaklıklarda depolama süresinin uzamasıyla genel olarak ÜKE ile renklendirilen örneklerin a^* değerlerinde az da olsa azalmalar tespit edilmiştir. Bu durumun ÜKE’nin antosiyanin kompozisyonu ile ilgili olduğu düşünülmektedir. [81]. Kontrol grubunda ise sadece 4°C’de depolananların a^* değerlerinde azalmalar tespit edilirken, 20 ve 30°C sıcaklıklarda depolanan kontrol örneklerinin a^* değerlerinde depolama süresince dalgalanmalar olmakla birlikte, depolama sonunda başlangıç değerlerine yakın a^* değerlerine sahip oldukları saptanmıştır. Antosiyanin içeren örneklerle yapılan araştırmalarda depolama süresinin uzamasına ve sıcaklık derecesindeki artışa bağlı olarak genellikle a^* değerlerinin düştüğü belirtilmektedir. Örneğin nar sularının 20 ve 37°C sıcaklıkta depolanması halinde antosiyaninlerin degradasyonu veya polimerizasyonu sonucu örneklerin L^* ve a^* değerlerinde azalma gözlemlendiği aktarılmaktadır. Bu durum, yüksek sıcaklıklarda depolanan meyve sularında rengin esmerleştiğinin de bir göstergesi olarak değerlendirilmektedir [132]. Mevcut

araştırmada renklendirilen elma sularında olduğu gibi nar sularının da a^* ve L^* değerlerindeki azalmalar özellikle yüksek sıcaklıklarda antosiyaninlerin parçalanma veya polimerizasyonları ile tipik kırmızı renginin solmasına bağlanmaktadır [132; 139].

Elma sularının b^* değerlerinde depolama süresince dalgalanmalar olduğu bulunmuştur. En yüksek b^* değerlerinin kontrol grubuna ait olduğu ve başlangıç b^* değeri 9.45 olan örneklerin b^* değerlerinin 4, 20 ve 30°C sıcaklıklarda depolandıktan sonra sırası ile 11.51, 11.06 ve 10.51 değerlerine ulaştığı saptanmıştır. Genel olarak ÜKE ile renklendirilen örneklerde depolama sıcaklığındaki artışın b^* değerlerinin yükselmesine neden olduğu belirlenmiştir.

Genel olarak depolama sıcaklığının artmasına bağlı olarak örneklerin h° değerlerinin arttığı tespit edilmiştir. Farklı sıcaklıklarda depolanan kontrol örneklerinin başlangıçta 68.05 olan h° değerlerinin 4, 20 ve 30°C sıcaklıklarda depolama sonrasında sırası ile 83.63, 77.66 ve 72.94 düzeylerine çıktığı, yani örneklerin daha da sarı bir renk kazandığı belirlenmiştir. Benzer şekilde ÜKE ile renklendirilen örneklerde de depolama süresince h° değerlerinde dalgalanmalar olmakla birlikte, örneklerin h° değerlerinin genel olarak artış eğilimi sergiledikleri saptanmıştır. Örneğin başlangıç h° değerlerinin 25.02 olan ÜKE ile renklendirilen 4, 20 ve 30°C sıcaklıklarda depolama sonrasında sırası ile 36.34, 39.52 ve 33.18 değerlerine ulaşmış ve örneklerin renklerinin kırmızıdan sarıya doğru kaydığı tespit edilmiştir.

C^* değeri rengin canlılığı hakkında fikir veren bir parametre olup, yükselmesi halinde rengin parlaklığında artış olduğu anlaşılmaktadır [5]. Kontrol örneklerinin C^* değerleri tüm depolama sıcaklıklarında artma eğiliminde olduğu saptanmıştır. Örneğin 4°C sıcaklıkta depolanan kontrol örneklerinin başlangıç C^* değerinin 10.18'den 11.59'a çıktığı tespit edilmiştir. ÜKE ile renklendirilen örneklerin C^* değerlerinde ise depolama sürecinde dalgalanmalar olmakla birlikte genel olarak C^* değerlerinin düşme eğiliminde oldukları belirlenmiştir. [140]. Benzer şekilde çilek ve mürver antosiyaninlerinin ısıtma işlemine maruz bırakılmaları halinde h° değerlerinin arttığı ve rengin hafifçe sarıya kaydığı belirtilmektedir [5].

ÜKE ile renklendirilen örneklerin depolama süresince renk değişimlerinin L^* ve b^* değerlerinde artış ve a^* değerlerinde düşüş ile karakterize olduğu saptanmıştır. Örneklerin h° değerlerinde artış gözlenirken, C^* değerlerinde ise düşüşler olduğu saptanmıştır. Genel olarak

depolama sıcaklığının artmasıyla örneklerin rengindeki değişmelerin hızlandığı belirlenmiştir. Benzer şekilde depolama süresince antosiyanin açısından son derece zengin olan nar sularının rengindeki koyulaşma da h° değerlerinde artış ve L^* değerlerindeki düşüşlerle karakterize edilmiştir. Örneklerin renk değerlerinde meydana gelen değişimin depolama sıcaklığının artışına paralel olarak arttığı belirtilmektedir [141].

5.4.1.5. Elma sularında meydana gelen duyuşal değişmeler

Elma sularının duyuşal analiz sonuçları ÜKE ile renklendirilen örneklerin renk skorlarının kontrol grubundan daha yüksek olduğunu ortaya koymaktadır. Örneğin, 4°C’de depolanan kontrol örneklerin renk skorları 6.78-6.89 aralığında değiştiği tespit edilmiştir. Depolama süresinin uzamasıyla örneklerin renk değerlerinde dalgalanmalar ve kısmen düşmeler gözlenmiştir. Panelistler tarafından ÜKE ile renklendirilen örneklerin duyuşal olarak daha çok beğenildiği belirlenmiştir. Depolama sıcaklığındaki artışın duyuşal renk skorları üzerine çok etkili olmadığı görülmektedir. Tat ve koku kriterleri dikkate alındığında ÜKE ile renklendirilen elma sularıyla birlikte kontrol örneklerinin de beğenildiği saptanmıştır. Örneklerin renklendirilmesinde kullanılan materyallerin elma sularının genel beğeni skorları üzerine etkisi önemlidir. Elde edilen bulgular elma sularının renklendirilmesinde ÜKE’nin başarılı bir şekilde kullanılabileceğini ortaya koymaktadır.

5.4.2. Dondurma

5.4.2.1.Dondurmaların fizikokimyasal özellikleri

100 g dondurma miksine ÜKE’den 3 mg antosiyanin içerecek şekilde 0.2775 g ÜKE’larından ilave edilerek, dondurmalar renklendirilmiştir. Dondurma miksi Bölüm “3.2.5.2. Dondurma” bölümünde belirtildiği şekilde hazırlanmış ve 0. gün örneklerinin pH, kuru madde ve kül analizleri yapılmıştır (Tablo 4.21). Dondurma örneklerinin kuru madde içeriklerinin %26.30-26.94 aralığında değiştiği saptanmıştır. Literatür çalışmaları dondurmaların kuru madde içeriklerinin genel olarak formülasyonlarına bağlı olarak değiştiğini ortaya koymaktadır. Örneğin, Kaçar ve Şahan [142], düşük kalorili dondurmaların kuru madde miktarlarının %22.22-27.39 aralığında bulunduğunu aktarmaktadır. Bazı pekmez çeşitlerinin dondurma üzerine etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada ise kuru madde değerlerinin %26.49-36.81 aralığında saptandığı bildirilmektedir [143].

Bu araştırmada, dondurma örneklerinin kül miktarları %0.51-0.60 aralığında belirlenmiş ve örneklerin renklendirilmesinde kullanılan renklendirici materyallerin kül miktarı üzerine etkili olduğu tespit edilmiştir. En düşük kül miktarı %0.51 değeri ile kontrol örneğinde saptanmıştır. Ankara piyasasında satılan dondurmaların incelendiği bir çalışma, sade dondurmalarda %0.216-2.857, meyveli dondurmalarda %0.103-0.625 ve çikolatalı dondurmalarda da %0.269-1.039 düzeyinde kül olduğunu ortaya koymaktadır. Çay aromalı dondurmaların kül miktarının %1.16-1.28 aralığında olduğu aktarılmaktadır [143].

Dondurmaların pH değerlerinin 6.52-6.71 aralığında olduğu saptanmıştır. Karminik asidin alkali tuzu olan karmin, kontrol ile kıyaslandığında dondurmaların pH değerlerinde hafif bir artışa neden olurken, ÜKE ilavesinin pH değerlerinde hafif bir azalmaya sebep olmuştur. Dondurmaların renklendirilmesi amacıyla ilave edilen renklendirici materyallerin dondurmanın pH değeri üzerine olan etkili olduğu belirlenmiştir. Yapılan çalışmalarda dondurmaların pH değerlerinin farklı aralıklarda olduğu belirtilmektedir. Örneğin, yağ ikame maddeleri kullanılarak üretilen düşük kalorili dondurmaların 6.35-6.45 [142], Maraş usulü dondurmaların 6.42-6.64 [145], sade dondurmaların ise ortalama 6.52 [146] pH değerlerine sahip olduğu aktarılmaktadır.

Literatür çalışmaları dikkate alındığında dondurma örneklerinin pH değerlerinin yanı sıra kuru madde ve kül miktarlarının da formülasyonlarla direkt olarak ilişkili olduğu sonucuna ulaşılmaktadır. Çalışma kapsamında üretilen dondurmaların pH, kuru madde ve kül değerlerinin literatür verileriyle uyumlu olduğu belirlenmiştir.

5.4.2.2. Dondurmaların toplam fenolik madde miktarlarında meydana gelen değişimler

Dondurmalara ilave edilen ekstraktlar, içerdiği antosiyaninlerle örneklerle çekici renkler kazandırırken, ekstraktların fenolik maddelerce de zengin olması nedeni ile örnekler fonksiyonel özellik de kazanmışlardır (Tablo 4.22.). Renklendirici madde ilavesi yapılmayan kontrol örneklerinin 0. gün fenolik madde miktarı 0.39 mg/kg iken, karminle renklendirilen örnekler için bu değer 0.42 mg/kg olarak belirlenmiştir. Hayvanların taze yemlerle beslenmesi başta olmak üzere bakterilerin protein katabolizması veya çevreden olabilecek kontaminasyonlar (sanitizer vs.) gibi nedenlerle süt ve ürünlerinde iz miktarda fenolik maddeler bulunabilmesi nedeniyle [20] kontrol örneklerinde iz miktarda da olsa fenolik madde saptandığı düşünülmektedir. ÜKE ile renklendirilen örneklerin 0. gün fenolik madde

içeriği 128.82 mg/kg düzeyinde belirlenmiştir. Hwang ve ark. [22]'nin dondurmanın toplam fenolik madde tayininde kullandıkları metot uygulandığında ÜKE'nin toplam fenolik madde miktarı 102.237 mg/g kuru ekstrakt olarak belirlenmiştir. 1 kg dondurma miksi ÜKE'den 2.775 g eklenerek renklendirilmiştir. ÜKE ile renklendirilen örneğin fenolik madde içeriğinin 284.10 mg GAE/kg dondurma ((2.775 g x 102.237 mg GAE/g kuru ekstrakt) + 0.39 mg GAE/kg = 284.10 mg GAE/kg dondurma) düzeyinde olması beklenirken, dondurmanın 128.82 mg GAE/kg dondurma düzeyinde fenolik içeriğine sahip olduğu tespit edilmiştir. ÜKE'nin dondurmaya ilave edildikten sonra %54.66'sının kayba uğradığı belirlenmiştir. Üzüm şaraplarının bulunduğu kaplarda dibe çöken tortu kısmını dondurmaya farklı oranlarda (50, 100 ve 150 g/kg) ilave ederek, dondurmaların biyoaktif özelliklerindeki değişimini incelemiştirlerdir. Hiç tortu ilave edilmemiş kontrol grubunun toplam fenolik madde miktarı 1.52 mg/mL olarak belirlenirken, 150 g/kg tortu ilave edilmiş örneklerde bu değer 3.58 mg/mL olarak tespit edilmiştir. Tortunun bileşimindeki toplam fenolik madde miktarı ise 7.51 mg/mL olarak saptanmıştır. Çalışmada dondurmalar ilave edilen şarap tortusunun dondurma üretim süresince stabil olduğu sonucuna ulaşıldığı belirtilmekte olup, bizim bulgularımızla örtüşmemektedir. Dondurma üretiminde kullanılacak sütün farklı bitkisel çaylarla aromalize edildiği bir çalışmada ise siyah çayla (10 g) 80°C'de demlenen örneklerin (415.20 ppm) en yüksek fenolik madde miktarına sahip olduğu belirlenirken, en düşük toplam fenolik madde konsantrasyonunun ise kontrol örneğinin ardından papatya çayı (5 g) ile 40°C sıcaklıkta demlenen örneklerde (123.37 ppm) saptandığı aktarılmaktadır [144].

3 ay süreyle depolanan örneklerin toplam fenolik madde miktarlarında sürenin uzamasına bağlı olarak bir miktar azalma saptanmıştır. Özellikle ÜKE'nin üretim sırasında kayba uğramasına rağmen, depolama sırasında ÜKE ile renklendirilen tüm dondurmaların fenolik bileşimlerinde çok az kayıplar olduğu saptanmıştır. Elde edilen sonuçlar ÜKE'li dondurmaların uzun süre depolanmaları halinde de yeterince stabil olabileceğini ortaya koymaktadır.

5.4.2.3. Dondurmaların antiradikal aktivitelerinde meydana gelen değişimler

ÜKE ilave edilen örneklerin %35.72 inhibisyon düzeyine sahip olduğu tespit edilmiştir. Kontrol örneklerinin ve karminle renklendirilen örneklerin antiradikal aktiviteleri son derece düşük olup, hemen hiç antiradikal aktivite sergilemedikleri sonucuna ulaşılmıştır. Yapılan bir çalışmada, üzüm şaraplarının bulunduğu kaplarda dibe çöken tortu kısmının dondurmaya

farklı oranlarda (50, 100 ve 150 g/kg) ilave edilmesi ile dondurmaların antiradikal aktivitelerinin arttığı saptanmıştır. Çalışmada 50 g dondurma 25 ml metanol ile ekstrakte edilmiş ve 90 dakika süreyle DPPH radikali ile muamele edilmiştir. Kontrol örneği ile kıyaslandığında 150 g/kg düzeyinde tortu ilave edilen örneklerin DPPH radikalini yaklaşık 4 kat daha çok inhibe ettiği belirlenmiştir [22].

Tablo 4.22. incelendiğinde dondurma örneklerinin antiradikal aktivitelerinde depolama sürecinde az da olsa düştüğü görülmektedir. ÜKE ile renklendirilen dondurmaların 3 aylık depolama süreçlerinde antiradikal aktivitelerinde meydana gelen değişim %35.72-30.66 aralıklarında belirlenmiştir. Kontrol ve karminle renklendirilen dondurmaların ise 1.91-1.18 ve 2.00-1.06 aralıklarında antiradikal kapasiteye sahip oldukları ve hemen hemen hiç antiradikal aktivite göstermedikleri saptanmıştır.

ÜKE ile renklendirilen örneklerin son derece stabil bir radikal olan DPPH'i gerek karminle renklendirilen dondurmalarından gerekse de kontrol örneklerinden çok daha iyi inhibe ettiği saptanmıştır. İlave edilen ekstraktların fenolik maddelerce zengin olması nedeniyle antiradikal aktiviteyi arttırdığı düşünülmektedir.

5.4.2.4. Dondurmaların renklerinde meydana gelen değişimler

Farklı antosiyanin kaynaklarından elde edilen ekstraktlar veya karminle renklendirilen dondurma örneklerinin renk parametrelerinde meydana gelen değişim Tablo 4.23.'de görülebilmektedir. L^* değeri en yüksek olan grubun kontrol (68.55-68.38) olduğu saptanırken, bunu sırasıyla karmin (67.40-63.69) ve ÜKE (56.79-52.42) ile renklendirilen örneklerin izlediği belirlenmiştir. Yapılan diğer araştırmalarda da genel olarak dondurmanın rengini değiştiren pigment ilavesinin L^* değerini azalttığı belirtilmektedir. Örneğin, çay veya bazı bitki çaylarıyla aromatize edilen dondurma örneklerine ait en yüksek ve düşük L^* değerlerinin sırasıyla kontrol (65.48) ve siyah çayla (48.91) aromatize edilmiş dondurma örneklerinde saptandığı belirtilmektedir. Aynı çalışmada dondurmaların L^* değerlerinin örnek formülasyonuna bağlı olarak değiştiği belirtilmektedir [144]. 1 kg dondurmaya 50, 100 veya 150 g düzeyinde ilave edilen kırmızı şarap tortusunun örneklerin L^* değerini düşürdüğü saptanmıştır. Benzer şekilde, bu araştırmada en yüksek L^* değeri 96.4 ile kontrol örneğinde saptanırken, en düşük aydınlık değeri ise 59.4 değeri ile 1 kg' ında 150 g tortu içeren

örneklerde tespit edilmiştir [22]. Örneklerin L^* değerlerinde depolama süresinin uzamasına bağlı olarak genel olarak bir düşüş olduğu belirlenmiştir.

Beklendiği üzere en düşük a^* değeri 0.07-0.02 değerleri ile kontrol grubu dondurmalarında saptanmıştır. Yapılan bir çalışmada dondurmaya ilave edilen kırmızı şarap tortusu miktarının artmasına bağlı olarak a^* değerinin -0.2 seviyesinden (kontrol örneği) 5.4'e (150 g tortu/kg dondurma) çıktığı saptanmıştır (Hwang et al., 2009). Farklı çaylarla aromatize edilen dondurmaların a^* değerleri 3.55 ile -2.62 arasında değişirken, kontrol örneklerinin a^* değerinin -2.79 olduğu belirlenmiştir. Siyah çayla aromatize edilen örneğin en yüksek a^* değerine sahip olduğu saptanırken, adaçaylı, ıhlamurlu ve papatyalı örneklerin renginde yeşil rengin daha baskın çıktığı belirlenmiştir [144]. Elde edilen bulgular, 3 aylık depolama süresince örneklerin a^* değerinde hafif bir düşüş olduğunu ortaya koymaktadır.

Morumsu kırmızı rengin hakim olması nedeni ile ÜKE ile renklendirilen örneklerin depolama başlangıcında b^* değeri -4.10 olarak tespit edilmiştir. [147]. Örnekler arasında krem beyaz renkteki kontrol grubunun en yüksek b^* değerlerine sahip olduğu ve 3 ay depolama süresince b^* değerlerinin 3.8-2.45 aralığında değiştiği saptanmıştır. Örneklerin b^* değerlerinde depolama süresinin uzamasına bağlı olarak dalgalanmalar olduğu saptanmıştır. Karaman [144], siyah çay veya bitkisel çaylarla aromatize edilen dondurmalarında, kontrol örneklerinin 4.63 değeri ile en düşük b^* değerine sahip olduğunu belirlerken, en yüksek b^* değerinin ise siyah çayla aromatize edilen örnek grubunda olduğunu saptamıştır. Soya proteini ile üretilmiş dondurmalarında ise b^* değerleri 10.46-14.63 aralığında tespit edilirken [148], pekmezli dondurmalarında bu değer 19.81-26.92 aralığında olduğu belirtilmektedir [143]. Dondurmaların b^* değerlerinin genel olarak literatür verilerinden daha düşük olduğu belirlenmiştir. Bu farklılığın dondurma formülasyonu ve ilave edilen renklendirici materyaller ile alakalı olabileceği düşünülmektedir.

Tüm dondurma örneklerinin h° değerlerinde depolama süresince dalgalanmalar olmakla birlikte, ÜKE ile renklendirilen örneklerin h° değerlerinin azalma eğiliminde olduğu belirlenmiştir. Kontrol örneklerinin h° değeri sarıyı temsil eden 90° 'ye son derece yakın bulunmuştur (89.07-89.69°). Depolama süresince ÜKE ile renklendirilen örneklerin renk değeri ise 314.26-299.83° aralığında tespit edilmiş olup, renklerinin morumsu kırmızı olduğu belirlenmiştir. Karmin ile renklendirilen örneklerin h° değerleri ise 5.54-10.75 aralığında belirlenmiş ve renklerinin kırmızısı olduğu tespit edilmiştir.

Sade (kontrol) dondurmaların C^* değerlerinin 3.81-2.45 aralığında değiştiği ve örnekler arasında renk yoğunluğu en düşük grubu oluşturduğu saptanmıştır. Genel olarak örneklerin renk yoğunluklarında depolama süresince dalgalanmalar tespit edilmiştir.

Dondurmaların genel görünümleri dikkate alındığında karminle renklendirilen dondurmalar uçuk pembe, ÜKE ilavesi ile örneklerin ise morumsu olduğu saptanmıştır. Süt ürünlerinin raf ömrünün yaklaşık birkaç hafta olduğu dikkate alındığında doğal antosiyanin kaynaklarının bu tip ürünlerde başarı ile kullanılabileceği bildirilmektedir [15].

5.4.2.5. Dondurmaların duyuşal özelliklerinin değerlendirilmesi

Panelistler tarafından dondurma örneklerinin renk, tat, koku ve genel beğeni kriterleri değerlendirilmiştir. Kontrol ve karmin veya ÜKE ile renklendirilen dondurmaların depolama sürecinin ilk 60 gününde renk skorlarında dalgalanmalar olmakla birlikte çok hafif bir düşüş belirlenmiştir. Örnekler farklı renklerde olmalarına rağmen, depolamanın özellikle ilk 60 gününde panelistler tarafından çok beğenildikleri saptanmıştır. Depolamanın 90. gününde ise özellikle ÜKE ile renklendirilen örneklerin renk skorlarında düşüş olduğu saptanmaktadır. Antosiyanin ve diğer fenolik bileşenlerin degradasyona meyilli oldukları bilinmektedir. Antosiyaninler asidik koşullarda stabil olmakla birlikte, diğer şartlarda hızla renksiz türevlerine dönüşebilmektedirler [122]. Dondurma örneklerinin pH değerlerinin yüksek olması nedeni ile depolamanın özellikle üçüncü ayında antosiyanin degradasyonuna maruz kaldığı ve panelistler tarafından başlangıç beğenilerini kısmen yitirdiği düşünülmektedir.

Duyuşal analiz sonuçları değerlendirildiğinde, dondurmaların 3 ay kadar uzun bir süre depolanmaları halinde dahi ÜKE'nın başarı ile kullanılabileceği sonucuna ulaşılmaktadır. ÜKE ile renklendirilen dondurmaların renk, tat, koku ve genel beğeni skorlarının karminle renklendirilen örneklerden daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Renk bakımından değerlendirildiğinde, dondurma örneklerinin hepsinin depolama süresince panelistler tarafından iyi olarak nitelendirildiği saptanmıştır.

Yapılan çalışmalar farklı amaçlarla dondurmaların formülasyonlarında yapılan çeşitli değişikliklerin panelistler tarafından farklı skorlar aldığını göstermektedir. Örneğin, dondurma miksine ilave edilen safranın panelistlerin genel beğeni kriterlerini olumlu yönde etkilediği belirtilirken, maltitollü örneklerin duyuşal anlamda kabul görmedikleri

bildirilmektedir [149]. Diğer bir çalışmada ise dört farklı oranda (%0, %15, %30 ve %45) yaban mersini pulpu ilave edilen dondurmalar arasında, duyuusal anlamda en çok beğenilen örneğin %30 oranında yaban mersini içeren grup olduğu belirtilmektedir [150].

5.4.3. Şekerleme

Çalışma kapsamında karmin ve ÜKE ile renklendirilen şekerlemelerin 3.57-3.68 aralığında pH değerlerine sahip oldukları saptanmıştır. Lokum örneklerinin 20°C’de depolandığı bir çalışmada, örneklerin 4.80 ile 4.92 aralığında değişen pH değerlerine sahip oldukları ve depolama süresince örneklerin pH’larında meydana gelen değişimlerin istatistiksel olarak önemli olmadığı ($p>0.05$) bildirilmektedir [151]. Farklı firmalardan alınan lokum örneklerinin incelendiği bir diğer çalışmada ise örneklerin pH değerlerinin 3.99-5.54 aralığında geniş bir dağılım gösterdiği belirlenmiştir [87]. Araştırmada incelenen örneklerin pH değerleri belirtilen çalışmalardan biraz daha düşük belirlenmiş olup, bunun formülasyonla ilgili olduğu düşünülmektedir. Lokumların kuru madde değerlerinin ise %86.55 ile %86.57 aralığında olduğu belirlenmiş ve ilave edilen renklendirici ajanların örneklerin kuru madde değerleri üzerine etkisinin önemsiz olduğu gözlemlenmiştir. Yapılan bir araştırmada piyasadan temin edilen lokumların kuru madde değerlerinin %78.40-93.00 aralığında tespit edildiği aktarılmaktadır [87]. Örneklerin kül miktarları ise %0.02 düzeyinde belirlenmiştir.

5.4.3.1. Şekerlemelerin renklerinde meydana gelen değişimler

Osmanlıca *rahat ul-hulküm*, yani boğaz rahatlatan kelimesinden türetilmiş olan lokum geleneksel bir Türk şekerlemesidir. Anadolu’da yaklaşık 15. yüzyıldan itibaren bilinen lokumun özellikle 17. yüzyılda Osmanlı İmparatorluğu sınırları içinde yaygınlaştığı belirtilmektedir. Avrupa ülkelerinde, bir İngiliz gezgin aracılığı ile “Turkish delight” adıyla 18. yüzyılda tanınmaya başlanan [87] lokum günümüzde de sevilerek tüketilen bir şekerlemedir. Çok farklı tatlarda üretilen lokumun renklendirilmesinde yaygın olarak karmin kullanılmaktadır.

20°C’de 180 gün süreyle depolanan şekerlemelerden karminle (13.09-11.10) renklendirilen şekerlemelerin ÜKE (12.32-10.84) ile renklendirilen örneklerden daha parlak olduğu belirlenmiştir. Örneklerin L^* değerlerinde depolama süresince genel olarak bir düşüş olduğu saptanmıştır. Karminle renklendirilen şekerlemelerin 12.76-10.27 değerleri ile en yüksek a^*

değerlerine sahip olduğu ve 6 aylık depolama süresince bu grubun en kırmızı örnek olma özelliğini koruduğu tespit edilmiştir. Bu durum karminin son derece stabil bir boya olması ile açıklanabilir. Örneklerin a^* değerlerinde genel olarak depolama süresinin uzamasına bağlı olarak hafif bir düşüş olduğu gözlenmiştir. Örneklerin L^* değerlerindeki düşüşün ürünün depolama sürecindeki esmerleşmesi ile ilgili olabileceği düşünülmektedir. Şekerlemeler arasında en yüksek b^* değerleri karminle renklendirilen örneklerde 2.14-2.74 aralığında tespit edilmiştir (Tablo 4.26.).

Karminle ile renklendirilen grupların h^o değeri 9.60-14.74 aralığında tespit edilmiştir. 180 gün depolanan ÜKE ile renklendirilen şekerlemelerin h^o değeri ise 357.29-353.47 aralıklarında belirlenmiştir. h^o değerleri dikkate alındığında karmin ile renklendirilen şekerlemelerin renkleri daha kırmızıyken, ÜKE ile renklendirilen örneklerin renginin morumsu-kırmızı olduğu sonucuna ulaşılmıştır. (Tablo 4.26.).

Depolama süresince örneklerin C^* değerlerinde dalgalanmalar olmakla birlikte, genel olarak depolama süresi uzadıkça C^* değerlerinin azaldığı, diğer bir anlatımla daha mat bir görüntüye sahip oldukları gözlenmiştir (Tablo 4.26.). Nitekim C^* değeri merkezde (0) matken, merkezden uzaklaştıkça (60) daha parlak bir görünüm sergilemektedir. Örnekler arasında en parlak örneğin karminle (12.95-10.69) renklendirilen grup olduğu belirlenirken, ÜKE (10.50-7.79) ile renklendirilen şekerlemelerin ise genel olarak diğerlerinden daha mat olduğu saptanmıştır.

5.4.3.2. Şekerlemelerin duyuşal özelliklerinde meydana gelen değişimler

Şekerlemeler arasında renk skoru en yüksek olan grup ÜKE (8.50-7.78) ile renklendirilen örnekler olduğu belirlenmiştir (Tablo 4.27.). Böylece panelistler tarafından ÜKE ile renklendirilen şekerlemelerin renklerinin karminle (8.17-7.61) renklendirilen örnekler kadar beğenildiği sonucuna ulaşılmıştır. Genel olarak depolama süresinin uzamasına bağlı olarak örneklerin renk değerlerinde bir azalma olduğu saptanmıştır. Yapılan duyuşal analiz sonucunda ÜKE (8.44-7.83) ile renklendirilen şekerlemelerin tat açısından en beğenilen örnekler olduğu belirlenmiştir. Depolama süresince örneklerin koku değerlerinde dalgalanmalar olmakla birlikte, genel olarak depolama süresinin uzamasıyla koku skorlarında bir düşüş gözlenmiştir. Tat parametresinde olduğu gibi koku açısından en beğenilen örnekler yine ÜKE (8.83-7.67) ile renklendirilen şekerlemeler olmuştur. Şekerleme grupları içerisinde

genel özellikleri itibariyle ÜKE (8.39-7.94) ile renklendirilen grubun karmin (8.00-7.56) ile renklendirilen gruptan daha çok beğenildiği saptanmıştır (Tablo 4.27.). Elde edilen duyusal analiz bulguları lokumun renklendirilmesinde ÜKE'nin başarılı bir biçimde kullanılabileceğini ortaya koymaktadır.

5.4.4. Çemen

Kontrol örneğinin kuru madde değeri %43.21 düzeyinde belirlenmiştir. Örneklerin rengini daha çekici kılmak için ilave edilen ÜKE'nin örneklerin kuru madde miktarlarını çok az da olsa arttırdığı belirlenmiştir (Tablo 4.28.). Çemenlerin kül miktarları %2.54-2.63 aralığında değiştiği ve ilave edilen renklendiricilerin çemenlerin kül miktarları üzerine çok etkili olmadığı belirlenmiştir. Kontrol örneğinin yanı sıra karmin ve ÜKE ile renklendirilen örneklerin pH değerleri 5.85'dir. Pastırma üzerine yapılan araştırmaların aksine çemen konusunda çok fazla literatüre ulaşılamamıştır. Yapılan bir çalışmada, olgunlaştırılmış pastırmanın çemen tabakasının %34.3-41.3 nem ve %3.7-6.4 kül içerdiği belirtilmektedir [152]. Bu farklılıklar çemen formülasyonlarındaki farklılıkların yanı sıra kullanılan malzemeler arasındaki farklardan da kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

5.4.4.1. Çemen örneklerinin renginde meydana gelen değişimler

Çemenleme pastırmanın kendine özgü tat, aroma, renk ve lezzet kazanmasını sağlamak amacıyla yapılan bir soslama işlemidir. Yapılan araştırmalar pastırma çemeninin pastırmayı dış etkenlerden koruma, pastırmanın fazla kurummasını engelleme, pastırmanın hava ile temasını önleyerek bozulma ve küflenmesinin önlenmesi, daha lezzetli ürün eldesi ve özellikle içeriğindeki sarımsağın antibakteriyal etkisinden faydalanma gibi çok farklı faydaları olduğunu göstermektedir [153]. Pastırmalarda ortaya çıkan en önemli kusurlar çoğunlukla çemen ve çemenleme işlemine bağlı olarak ortaya çıkmaktadır [152]. Üreticilerin ekonomik nedenlerle çemene buğday ve burçak unları karışırtmaları, ucuz ve kalitesiz kırmızı biber kullanımı ve boya ilave etmelerine bağlı olarak çemenlerde gerek renk gerekse de yapısal kusurlar ortaya çıkmaktadır [154]. Gıda Maddeleri Tüzüğü'nün (GMT) 170. maddesi pastırma çemeninde boya kullanımını yasaklamasına rağmen, piyasada bulunan pastırmaların çemenlerine renk vermek amacı ile çeşitli renklendirici maddelerin katıldığı belirtilmektedir. Piyasada bulunan pastırmaların çemenleri üzerinde yapılan bir çalışmada, çemenlerin %97-98'i gibi çok büyük bir kısmında sağlığa zararlı bir boya maddesi olan Orange II saptandığı

bildirilmektedir [155].

4°C sıcaklıkta depolanan çemen örneklerinin L^* , a^* , b^* , h° ve C^* değerleri üzerine depolama süresi ve renklendirici materyallerin etkisi önemlidir. L^* değeri en yüksek olan örnek kontrol grubu (40.08-30.74) iken, bunu sırası ile karmin (38.14-30.59) ve ÜKE (32.63-27.92) ile renklendirilen örneklerin izlediği belirlenmiştir (Tablo 4.29.). Renklendirici materyal ilavesinin gıda maddelerinin L^* değerlerinde düşmeye neden olduğu bilinmektedir [156]. En yüksek a^* değerinin karmin (18.80-16.61) ile renklendirilen örneklerde saptanırken, en düşük a^* değerinin ÜKE (11.83-12.68) ile renklendirilen gruba ait olduğu tespit edilmiştir. En yüksek b^* değerlerinin kontrol grubuna (41.34-24.41) aitken, en düşük b^* değerlerin ise ÜKE (30.34-19.52) ile renklendirilen gruba ait olduğu belirlenmiştir. Örneklerin a^* ve b^* değerlerinde depolama süresince dalgalanmalar saptanmış olup, genel olarak her iki değerin de depolama süresinin uzamasıyla birlikte azaldığı belirlenmiştir. Benzer şekilde çemenin hammaddelerinden biri olan kırmızı toz biberin bir ay depolandığı çalışmada örneklerin L^* , a^* ve b^* değerlerinin azaldığı tespit edilmiştir [157]. Kırmızı biberlerin farklı depolama koşullarında renk değişimlerinin incelendiği bir diğer çalışmada da kontrol örneklerinin geleneksel depolama yöntemine uygun olarak çuvallarda depolanması halinde benzer şekilde L^* , a^* ve b^* değerlerinin azaldığı saptanmıştır. Kırmızı biberlerin a^* değerlerindeki azalmanın, karotenoidlerin oksidasyonu ile ilgili olduğu belirtilmektedir [158].

Örneklerin a^* ve b^* değerlerinde meydana gelen değişimlerin h° ve C^* değerlerine yansımaları nedeni ile bu değerlerde de depolama süresince dalgalanmalar söz konusu olmakla birlikte, h° ve C^* parametrelerinde de zamanla azalmalar olduğu tespit edilmiştir. Örneğin, kontrol örneklerinde h° değerleri 67.86-57.36 aralığında değişmiştir. Çemenlerin C^* değerleri de zamanla azalmış ve dolayısı ile renklerinin zamanla matlaştığı saptanmıştır. En yüksek C^* değeri 44.65-29.01 aralığında kontrol grubunda saptanırken, en düşük C^* değerleri ise ÜKE ile renklendirilen örneklerde 32.57-23.28 aralığında belirlenmiştir. Genel olarak ÜKE ve karmin ilavesinin örneklerin az da olsa matlaşmasına sebep olduğu görülmektedir (Tablo 4.29.). Kırmızı biberlerde yapılan çalışmaların sonuçları da h° ve C^* değerlerinin zamanla azaldığını ve bu ürünlerdeki eğilimin çemen örneklerindeki eğilime paralel olduğunu ortaya koymaktadır [157; 158].

Çemenin depolama süresince renk değişiminin a^* ve b^* değerlerinde dalgalanmalar ve parlaklığın hafifçe düşmesiyle karakterize edilebileceği sonucuna ulaşılmıştır. Yapılan ön

denemelerde, çemenlerin formülasyonlarında yer alan sarımsak ve baharatların ÜKE'nin kokusunu baskıladığı ve hiçbir örnekte yabancı ya da rahatsız edici bir tadın veya kokunun algılanamadığının belirlenmesi üzerine örneklerde duyuşal analiz yapılmamasına karar verilmiştir. ÜKE ilave edilen örneklerin renklerinin hafif de olsa kahverengine dönmesi nedeni ile çemenlerin ÜKE ile renklendirilmesinin çok uygun olmadığı belirlenmiştir. Çemen rengi üzerine yapılan bir çalışmada GMT'nün yeniden düzenlenmesi şartıyla çemende %0.1 oranında 2/3 Pounceau 4R (E 124) ve 1/3 Sunset Yellow (E 110) karışımının renklendirici olarak kullanılabileceği aktarılmaktadır [154]. Oysa çemenlerin ÜKE ilavesi ile hem daha fonksiyonel hem de daha doğal ürünler elde etmenin mümkün olabileceği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

1. Delgado-Vargas, F., Paredes-Lopez, O., 2003. Natural Colorants for Food and Nutraceutical Uses, CRC Pres, USA, 327 pp.
2. Bechtold, T., Mussak, R., 2009. Handbook of Natural Colorants, Wiley Series in Renewable Resources, United Kingdom, 412 pp.
3. Rangan, C., Barceloux, D. G., 2009. Food additives and sensitivities. **Disease-a-Month**, **55** (5): 292-311.
4. Minioti, K.S., Sakellariou, C.F., Thomaidis, N.S., 2007. Determination of 13 synthetic food colorants in water-soluble foods by reversed-phase high-performance liquid chromatography coupled with diode-array detector. **Analytica Chimica Acta**, **583**:103-110.
5. Sodilova, E., Stintzing, F.C., Kammerer, D.R., Carle, R., 2009. Matrix dependent impact of Sugar and ascorbic acid addition on color and anthocyanin stability of black carrot, elderberry and strawberry single strength and from concentrate juices upon thermal treatment. **Food Research International**, **42**: 1023-1033.
6. Anonymous, 2010a. Carmine. (Web sayfası: <http://www.en.wikipedia.org>), (Erişim tarihi: Eylül 2010).
7. Velioğlu, H.M., İ. Yılmaz, S.D. Velioğlu, 2006. Gıdalarda kullanılan doğal renklendiricilerden karmin, ss. 347-350. *Türkiye 9. Gıda Kongresi, Mayıs 24-26, 2006, Bolu*.
8. Anonymous, 2008. Karmin (Web sayfası: www.sile75.k12.tr/forum/index.php?topic=18778.0-37k-), (Erişim tarihi: 09.09.2008).
9. Longo, L., Vasapollo, G., 2006. Extraction and identification of anthocyanins from *Smilax aspera* L. berries. **Food Chemistry**, **94**, 226-231.
10. Pazmino-Duran, E.A., Giusti, M.M., Wrosted, R.E., Gloria, B.A., 2001. Anthocyanins from banana bracts (*Musa x paradisiaca*) as potential food colorants. **Food Chemistry**, **73**: 327-332.
11. Duangmal, K., Saicheua, B., Sueeprasan, S., 2008. Colour evaluation of freeze-dried rosella extract as a natural food colorant in a model system of a drink. **LWT**, **41**: 1437-1445.

12. Castaneda-Ovando, A., Pacheco-Hernandez, Ma. De L., Paez-Hernandez, Ma. E., Rodriguez, J.A., Galan-Vidal, C.A., 2009. Chemical studies of anthocyanins: A review. **Food Chemistry**, **113**: 859-871.
13. Sass-Kiss, A., Kiss, J., Milotay, P., Kerek, M.M., Toth-Markus, M., 2005. Differences in anthocyanin and carotenoid content of fruits and vegetables. **Food Research International**, **38**: 1023-1029.
14. Kong, J-M., Chia, L-S., Goh, N-K., Chia, T-F., Brouillard, R., 2003. Analysis and biological activities of anthocyanins. **Phytochemistry**, **64**: 923-933.
15. Giusti, M.M., Wroslstad, R.E., 2003. Acylated anthocyanins from edible sources and their applications in food system. **Biochemical Engineering Journal**, **14**: 217-225.
16. Rhim, J.W., 2002. Kinetics of thermal degradation of anthocyanin pigment solutions driven from red flower cabbage. **Food Science and Biotechnology**, **11**: 361-364.
17. Cemeroğlu, B., 2004. Meyve ve Sebze İşleme Teknolojisi, Cilt 1, Başkent Klişe Matbaacılık, Ankara, 670 s.
18. Bridle, P., Timberlake, F., 1997. Anthocyanins as natural food colours-selected aspects. **Food Chemistry**, **58** (1-2): 103-109.
19. Hendry, G.A.F., Houghton, J.D., 1996. Natural Food Colorants, 2nd edition, Blackie Academic & Professional, London, United Kingdom, 348 p.
20. O' Connell, J.E., Fox, P. F., 2001. Significance and applications of phenolic compounds in the production and quality of milk and dairy products, a review. **International Dairy Journal**, **11** (3): 103-120.
21. Fossen, T., Cabrita, L., Andersen, O.M., 1998. Colour and stability of pure anthocyanins influenced by ph including the alkaline region. **Food Chemistry**, **63**: 435-440.
22. Hwang, J-Y., Shyu, Y-S., Hsu, C-K., 2009. Grape wine lees improves the rheological and adds antioxidant properties to ice cream. **LWT, Food Science and Technology**, **42**: 312-318.
23. 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 and Emerging Technologies**, **9**: 85-91.
24. Gunasekaran, S., Chiyung, A., 1994. Evaluating milk coagulation with ultrasonics. **Food Technology**, **48** (12): 74-78.

25. Bayraktaroğlu, G., Obuz, E., 2006. Ultrasound yönteminin ilkeleri ve gıda endüstrisinde kullanımı, s. 57-60. *Türkiye 9. Gıda Kongresi, Mayıs 24-26, Bolu.*
26. Vilku, K., Mawson, R., Simons, L., Bates, D., 2008. Applications and opportunities for ultrasound assisted extraction in the food industry: a review, **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, **9**: 161-169.
27. Bleve, M., Ciurlia, L., Erroi, E., Lionetto, G., Longo, L., Rescio, L., Schettino, T., Vasopolo, G., 2008. An Innovative method for the purification of anthocyanins from grape skin extracts by using liquid and sub-critical carbon dioxide. **Seperation and Purification Technology**, **64**: 192-197.
28. Vatai, T., Skerget, M., Knez, Z., 2009. Extraction of phenolic compounds from elderberry and different grape marc varieties using organic solvents and/or supercritical carbon dioxide. **Journal of Food Engineering**, **90**: 246-254.
29. Sağdıç, O., Özkan, G., Göktürk Baydar, N., 2005. Yeni bitkisel doğal bir antimikrobiyal ve antioksidan: Üzüm posası, **Gıda Teknolojisi**, **9** (4): 78-80.
30. Malien-Aubert, C., Dangles, O., Amiot, M.J., 2001. color stability of commercial anthocyanin-based extracts in relation to the phenolic composition: Protective effects by intra and intermolecular copigmentation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, **49**: 170-176.
31. Özen, G., Akbulut, M., Artık, N., Stability of black carrot anthocyanins in the Turkish delight (lokum) during storage, **Journal of Food Process Engineering**, DOI: 10.1111/j.1745-4530.2009.00412.x, 2009.
32. Werlein, H.D., Küttemeyer, C., Schatton, G., Hubbermann, E.M., Schwarz, K., 2005. Influence of elderberry and blaccurrant concentrates on the growth of microorganisms, **Food Control**, **16**: 729-733.
33. Drdak, M., Daucik, P., 1990. Changes of elderberry (*Sambucus nigra*) pigment concentrates, **Acta Aliment**, **19**, 3-7.
34. Garcia-Viguera, C., Zafrilla, P., Romero, P., Abellan, P., Artes, F., Tomas-Barberan, F.A., 1999. Color stability of strawberry jams as affected by cultivar and storage temperature. **Journal of Food Science**, **64** (2): 243-247.
35. Kırca, A., Özkan, M., Cemeroğlu, B., 2006. Stability of black carrot anthocyanins in various fruit juices and nectars. **Food Chemistry**, **97**: 598-605.

36. Sharif, A., Saim, N., Jasmani, H., Ahmad, W.Y.W., 2010. Effect of solvent and temperature on the extraction of colorant from onion (*Allium cepa*) skin using pressurized liquid extraction. **Asian Journal of Applied Science**, **3**(4): 262-268.
37. , A., 2004. Siyah Havuç Antosiyaninlerinin Bazı Meyve Ürünlerinde Isıl Stabilitesi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, , Ankara, 109 s.
38. Downham, A., Collins, P., 2000. Colouring our foods in the last and next millennium. **International Journal of Food Science and Technology**, **35**: 5-22.
39. Calvo, C., Salvador, A., 2000. Use of natural colorants in food gels, influence of composition of gels on their colour and study of their stability during storage. **Food Hydrocolloids**, **14**: 439-443.
40. Saldamlı, İ., 1998. Gıda Kimyası, Hacettepe Üniversitesi Yayınları, Ankara, 527 s.
41. Doğruyol H., 2006. Gıdalardaki katkı maddeleri ve zararları çocukluk hiperaktivitesi. **Güncel Pediatri**, **2**: 42-48.
42. Çakmakçı, S., Çelik, İ., 1995. Gıda Katkı Maddeleri, 2. Baskı, Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Ders Notu No: 164, Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Ofset Tesisi, 249 s.
43. Anonymous, 2010. Çadırcı Gıda San. Tic. Ltd. Şti.'nden Mustafa Kılçadır ile lokum üretim teknikleri üzerine söyleşi.
44. Anonymous, 2002. Türk Gıda Kodeksi Gıdalarda Kullanılan Renklendiriciler Tebliği, Tebliğ No: 2002/55.
45. Lucas, C.D., Hallagan, J.B., Taylor, S.L., 2001. The Role of Natural color additives in food allergy. **Advances in Food and Nutrition Research**, **43**: 195-215.
46. Anonymous, 2011. Karmin. (Web sayfası: [http://www.gidaraporu.com/cocuk-gidalarinda-
katki-maddeleri_p.htm](http://www.gidaraporu.com/cocuk-gidalarinda-katki-maddeleri_p.htm)), (Erişim tarihi, Aralık, 2010).
47. Jordheim, M., 2007. Isolation, Identification and Properties of Pyroanthocyanins and Anthocyanin Forms, Dissertation for the Degree of Philosophiae Doctor (PhD), Department of Chemistry University of Bergen, Bergen, Norway, 98 p.
48. Lopez, N., Puertolas, E., Condon, S., Raso, J., Alvarez, I., 2009. Enhancement of the extraction of betanine from red beetroot by pulsed electric field. **Journal of Food Engineering**, **90**: 60-66.
49. Gonzalez-Neves, G., Barreiro, L., Gil, G., Franco, J., Ferrer, M., Moutounet, M., Carbonneau, A., 2004. Anthocyanic composition of Tannat grapes from the south region of Uruguay. **Analytica Chimica Acta**, **513**: 197-202.

50. Luque-Rodriguez, J.M., Luque de Castro, M.D., Perez-Juan, P., 2007. Dynamic superheated liquid extraction of anthocyanins and other phenolics from red grape skins of winemaking residues. **Biosource Technology**, **98**: 2705-2713.
51. Lila, M.A., 2004. Anthocyanins and human health: an in vitro investigative approach. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, **5**: 306-313.
52. Lacombe, A., Vivian, C.H., Tyler, S., Edwards, K., 2010. Antimicrobial action of the American cranberry constituents; phenolics, anthocyanins, and organic acids, against *Escherichia coli* O157:H7. **International Journal of Food Microbiology**, **139**: 102–107.
53. Anonymous, 2004. Üzüm. (Web sayfası: http://www.tzob.org.tr/tzob/tzob_urun_rapor/rapor_2003-uzum.htm), (Erişim tarihi: 2004).
54. Ekici, L., 2005. Farklı Polimer Filmlerde Ambalajlanan Üzüm Suyu Konsantresinde HMF Oluşumu. Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 46 s.
55. Kaya, S., Maskan, A., 2003. Water permeability of pestil (a fruit leather) made from boiled grape juice with starch. **Journal of Food Engineering**, **57**: 295-299.
56. FAO, 2007, Agricultural data. (Web sayfası: <http://faostat.org>), (Erişim tarihi: Eylül 2009).
57. Maier, T., Schieber, A., Kammerer, D.R., Carle, R., 2009. Residues of grape (*Vitis vinifera* L.) seed oil production as a valuable source of phenolic antioxidants. **Food Chemistry**, **112**: 551-559.
58. Frankel, E.N., Kanner, J., German, J.B., Parks, E., Kinsella, J.E., 1993. Inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein by phenolic substances in red wine. **The Lancet**, **341** (20): 454–457.
59. Guandez, R., Kallithraka, S., Makris, D.P., Kefalas, P., 2005. Determination of low molecular weight polymeric constituents in grape (*Vitis vinifera* sp.) seed extracts: correlation with antiradical activity. **Food Chemistry**, **89**: 1-9.
60. Ahn, H.S., Jeon, T.I., Lee, J.Y., Hwang, S.G., Lim, Y., Park, D.K., 2002. Antioxidative activity of persimmon and grape seed extract: in vitro and in vivo. **Nutrition Research**, **22**: 1265-1273.

61. Pinelo, M., Arnous, A., Meyer, A.S., 2006. Upgrading of grape skins: significance of plant cell-wall structural components and extraction techniques for phenol release. **Trends in Food Science & Technology**, **17**: 579-590.
62. Kelebek, H., 2009. Değişik Bölgelerde Yetiştirilen Öküzgözü, Boğazkere ve Kalecik Karası Üzümlerinin ve Bu Üzümlerden Elde Edilen Şarapların Fenol Bileşikleri Profili Üzerinde Araştırmalar. Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Adana, 259 s.
63. Ju, Z. Y., Howard, L. R., 2003. Effects of solvent and temperature on pressurized liquid extraction of anthocyanins and total phenolics from dried red grape skin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, **51**: 5207-5213.
64. Gizir, M., Turker, N., Artuvan, E., 2008. Pressurized Acidified water extraction of black carrot [*Daucus carota* ssp. *sativus* var. *atrorubens* Alef.] anthocyanins. **European Food Research & Technology**, **226**: 363-370.
65. Floros, J.D., Liang, H., 1994. Acoustically assisted diffusion through membranes and biomaterials. **Food Technology**, **48**: 79 -84.
66. Tavman, Ş., Kumcuoğlu, S., Akkaya, Z., 2009. Bitkisel ürünlerin atıklarından antioksidan maddelerin ultrason destekli ekstraksiyonu. **Gıda**, **34** (3): 175-182.
67. Cemeroğlu, B., 2007. Gıda Analizleri Gıda Teknolojisi Derneği Yayınları, Yayın No: 34, Ankara, 535 s.
68. Anonymous, 1995. AOAC Official Methods of Analysis of the Association Agricultural Chemists. Ed. Board William Harwitz, Chairman and Ed. Committee on Editing Methods of Analysis. Chilhilo, P., Clifford P.A., Reynolds H., 10th ed..
69. Ersus, S., Yurdagel, U., 2007. Microencapsulism of anthocyanin pigments of black carrot (*Daucus carota* L.) by spray drier. **Journal of Food Engineering**, **80**: 805-812.
70. Chen, F., Sun, Y., Zhao, G., Liao, X., Hu, X., Wu, J., Wang, Z., 2007. Optimization of ultrasound-assisted extraction of anthocyanins in red raspberries and identification of anthocyanins in extract using high-performance liquid chromatography-mass spectrometry. **Ultrasonics Sonochemistry**, **14**: 767-778.
71. Singleton, V.L., Rossi, J.A. Jr., 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, **16**: 144-158.

72. Fuleki, T., Francis, F.J., 1968. Quantitative methods for anthocyanins 2. determination of total anthocyanins and degradation index for cranberry juice. **Journal of Food Science**, **50**: 754-756.
73. Wrosted, R.E., 1976. Color and pigment analyses in fruit products. Agric. Exp. Stn., Corvallis, Oregon State University, Station Bulletin 624, 17 p.
74. Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., Berset, C., 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensmittel Wissenschaft und Technologie**, **28**: 25–30.
75. Prieto, P., Pineda, M., Aguilar, M., 1999. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: Specific application to the determination of vitamin E. **Analytical Biochemistry**, **269**: 337-341.
76. Sagdic, O., Karahan, A.G., Ozcan, M., Ozkan, G., 2003. Effect of some spice extracts on bacterial inhibition. **Food Science and Technology International**, **9** (5): 353-356.
77. Sagdic, O., Kuşçu, A., Ozcan, M., Özçelik, S., 2002. Effect of Turkish spice extracts at various concentrations on the growth of *Escherichia coli* O157:H7. **Food Microbiology**, **19**: 473-480.
78. Cemeroglu, B., Velioğlu, S., Işık, S., 1994. Degradation kinetics of anthocyanins in sour cherry juice and concentrate. **Journal of Food Science**, **59** (6): 1216-1218.
79. Dyrby, M., Westergaard, N., Stapelfeldt, H., 2001. Light and heat sensitivity of red cabbage extract in soft drink model systems. **Food Chemistry**, **72**: 431-437.
80. Wang, W-D., Xu, S-Y., 2007. Degradation kinetics of anthocyanins in blackberry juice and concentrate, **Journal of Food Engineering**, **82**: 271-275.
81. Kırca, A., 2004. Siyah Havuç Antosiyaninlerinin Bazı Meyve Ürünlerinde Isıl Stabilitesi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, , Ankara, 109 s.
82. Zhang, Y., Wang, S.Y., Wang, C.Y., Zheng, W., 2007. Changes in strawberry phenolics, anthocyanins, and antioxidant capacity in response to high oxygen treatments, **LWT-Food Science and Technology**, **40** (1): 49-57.
83. Yetim, H., Kesmen, Z., 2008. Gıda Analizleri, Erciyes Üniversitesi Ders Yayınları No 163. Kayseri, 346 s.
84. Dogan, M., Kayacier, A., 2007. The effect of ageing at low temperature on the rheological characteristics of Kahramanmaraş-type ice-cream mix. **International Journal of Food Properties**, **10** (1): 19-24.
85. AOAC., 1990. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists (15th Edition), Washington.

86. Kurt, A., Çakmakçı, Çağlar, A., 1996. Süt ve Mamülleri Muayene ve Analiz Metotları Rehberi, 6. baskı, Atatürk Üniversitesi Yayınları 252/d Ziraat Fakültesi Yayınları, No:18, 238 s.
87. Doyuran, S.D., Gültekin, M., Güven, S., 2004. Geleneksel gıdalardan lokumun üretimi ve özellikleri, 334-338 s., *Geleneksel Gıdalar Sempozyumu, 23-24 Eylül, 2004, Van*.
88. Yetim, H., Sagdic, O., Dogan, M., Ockerman, H.W., 2006. Sensitivity of three pathogenic bacteria to turkish cemen paste and its ingredients. **Meat Science** **74**: 354–358.
89. Wrolstad, R.E., Durst, R.W., Lee, J., 2005. Tracking color and pigment changes in anthocyanin products. **Trends in Food Science & Technology** **16**: 423–428.
90. Makris, D.P., Boskou, G., Chiou, A., Andrikopoulos, N.K., 2008. An investigation on factors affecting recovery of antioxidant phenolics and anthocyanins from red grape (*Vitis vinifera* L.) pomace employing water/ethanol-based solutions. **American Journal of Food Technology**, **3** (3): 164-173.
91. Spigno, G., Tramelli, L., De Faveri, D.M., 2007. Effects of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics. **Journal of food Engineering**, **81**: 200-208.
92. Canbaş, A., Erten, H., Cabaroğlu, T., Nurgel, C., Selli, S., 2000. Önemli bazı üzüm çeşitlerinin şaraplık değerlerinin belirlenmesi ve elde edilen şarapların kalitesinin belirlenmesi üzerine bir araştırma, 1-17. *Türkiye Tarımsal Araştırma Projesi Sempozyumu, Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumu, Ankara*.
93. Ruberto, G., Renda, A., Daquino, C., Amico, V., Spatafora, C., Tringali, C., De Tommasi, N., 2007. Polyphenol constituents and antioxidant activity of grape pomace extracts from five scilian red grape cultivars. **Food Chemistry**, **100**: 203-210.
94. Yang, J., Martinson, T.E., Liu, R.H., 2009. Phytochemical profiles and antioxidant activities of wine grapes. **Food Chemistry**, **116**: 332–339.
95. Xu, Z., Wu, J., Zhang, Y., Hu, X., Liao, X., Wang, Z., 2010. Extraction of anthocyanins from red cabbage using high pressure CO₂. **Biosource Technology**, **101**: 7151-7157.
96. Novak, I., Janerio, P., Seruga, M., Oliveira-Brett, A.M., 2008. Ultrasound extracted flavonoids from four varieties of portuguese red grape skins determined by reverse-phase high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. **Analytica Chimica Acta**, **630**: 107-1115.
97. Sagdic, O., Ozturk, I., Ozkan, G., Yetim, H., Ekici, L., Yilmaz, M.T., 2011. RP-HPLC-DAD analysis of phenolic compounds in pomace extracts from five grape cultivars:

- evaluation of their antioxidant, antiradical and antifungal activities in orange and apple juices. **Food Chemistry**, **126**: 1749-1758.
98. Sağdıç, O., Ekici, L., 2005. Üzüm (*Vitis vinifera*) çekirdeğinin fenolik bileşikleri ve biyoaktif özellikleri. **Hasad Gıda**, **21** (244): 30-34.
 99. Pliszka, B., Huszcza-Ciolkowska, G., Mieleszko, E., Czaplicki, S., 2009. Stability and antioxidative properties of acylated anthocyanins in three cultivars of red cabbage (*Brassica oleracea* L. var *capitata* L. f. *rubra*). **Journal of the Science of Food and Agriculture**, **89**: 1154-1158.
 100. Göktürk Baydar, N., Özkan, G., Sağdıç, O., 2004. Total phenolic contents and antibacterial activities of grape (*Vitis vinifera* L.) extracts. **Food Control**, **15**: 335-339.
 101. Göktürk Baydar, N., Özkan, G., Sağdıç, O., 2004. In Vitro antioxidant and antibacterial activity of grape (*Vitis Vinifera* L.) seed extract, 78-81 s. 4th Environmental Micropaleontology, Microbiology and Meiobentholog, 13-18 September 2004, Isparta-Turkey.
 102. Özkan, G., Sağdıç, O., Göktürk Baydar, N., Kurumahmutoglu, Z., 2004. Antibacterial activities and total phenolic contents of grape pomace extracts. **Journal of Science of Food and Agriculture**, **84** (14): 1807-1811.
 103. Jayaprakasha, G.K., Selvi, T., Sakariah, K.K., 2003. Antibacterial and antioxidant activities of grape (*Vitis Vinifera*) seed extracts. **Food Research International**, **36**: 117-122.
 104. Negro, C., Tommasi, L., Miceli, A., 2003. Phenolic compounds and antioxidant activity from red grape marc extracts. **Bioresource Technology**, **87**: 41-44.
 105. Amico, V., Napoli, E.M., Renda, G., Spatafora, C., Tringali, C., 2004. Constituents of grape pomace from the Sicilian Cultivar 'Nerello Mascalese'. **Food Chemistry**, **88**: 599-607.
 106. Cowan, M.M., 1999. Plant products as antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews**, **12**, 564-582.
 107. Kayser, O., Kolodziej, H., 1997. Antibacterial activity of extracts and constituents of pelargonium sidoides and pelargonium reniforme. **Planta Medica**, **63**: 508-510.
 108. Shi, J., Yu, J., Pohorly, J.E., Kakuda, Y., 2003. Polyphenolics in grape seeds biochemistry and functionality. **Journal of Medicinal Food**, **6** (4): 291-299.
 109. Katalinic, V., Smole Mozina, S., Skroza, D., Generalic, I., Abramovic, H., Milos, M., Ljubenkovic, I., Piskernik, S., Pezo, I., Terpinic, P., Boban, M., 2010. Polyphenolic

- profile, antioxidant properties and antimicrobial activity of grape skin extracts of 14 *Vitis vinifera* varieties grown in Dalmatia (Croatia). **Food Chemistry**, **119**: 715-723.
110. Furiga, A., Lonvaud-Funel, A., Badet, C., 2009. In vitro study of antioxidant capacity and antibacterial activity on oral anaerobes of a grape seed extract. **Food Chemistry**, **113**, 1037-1040.
 111. Kao, T-T., Tu, H-C., Chang, W-N., Chen, B-H., Shi, Y-Y., Chang, T-C., Fu, T-F., 2010. Grape seed extract inhibits the growth and pathogenicity of *Staphylococcus aureus* by interfering with dihydrofolate reductase activity and folate-mediated one-carbon metabolism. **International Journal of Food Microbiology**, **141**: 17–27.
 112. Wu, V.C.H., Qiu, X., Hsie, Y. H.P., 2008. Evaluation of *Escherichia coli* O157:H7 in apple juice with cornus fruit (*Cornus officinalis* Sieb. et Zucc.) extract by conventional media and thin agar layer method. **Food Microbiology**, **25**: 190–195.
 113. Gabriel, A.A., Nakano, H., 2009. Inactivation of *Salmonella*, *E. coli* and *Listeria monocytogenes* in phosphate-buffered saline and apple juice by ultraviolet and heat treatments. **Food Control**, **20**: 443–446.
 114. Mutaku, I., Erku, W., Ashenafi, M., 2005. Growth and survival of *Escherichia coli* O157:H7 in fresh tropical fruit juices at ambient and cold temperatures. **International Journal of Food Sciences & Nutrition**, **56** (2): 133-139.
 115. Patil, S., Valdramidis, V.P., Cullen, P.J., Frias, J., Bourke, P., 2010. Inactivation of *Escherichia coli* by ozone treatment of apple juice at different pH levels. **Food Microbiology**, **27**: 835-840.
 116. Dingman, D.W., 2000. Growth of *Escherichia coli* O157:H7 in bruised apple (*Malus domestica*) tissue as influenced by cultivar, date of harvest, and source. **Applied and Environmental Microbiology**, **66** (3): 1077-1083.
 117. Erkmen, O., 2010. Gıda Mikrobiyolojisi. Efil Yayınevi, Gaziantep, 552 s.
 118. Baskaran, S.A., Amalaradjou, M.A.R., Hoagland, T., Venkitanarayanan, K., 2010. Inactivation of *E. coli* O157:H7 in apple juice and apple cider by trans-cinnamaldehyde, **International Journal of Food Microbiology**, **141**: 126-129.
 119. Zhao, T., Doyle, M.P., Beser, R.E., 1993. Fate of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in apple cider with and without preservatives. **Applied and Environmental Microbiology**, **59** (8): 2526-2530.
 120. Bahçeci, S., Acar, J., 2003. Meyve suyu sanayiinde yeni bir problem: *Alicyclobacillus*. **Gıda Mühendisliği Dergisi**, 26-31.

121. Sodilova, E., Stintzing, F. C., Carle, R., 2006. Thermal degradation of acylated and nonacylated anthocyanins. **Journal of Food Science**, **71**: 504-512.
122. Dai, J., Gupte, A., Gates, L., Mumper, R.J., A., 2009. Comprehensive study of anthocyanin-containing extrates from selected blackberry cultivars: extraction methods, stability, anticancer properties and mechanisms. **Food and Chemical Toxicology**, **47**: 837-847.
123. Kırca, A., Özkan, M., Cemeroğlu, B., 2007. Effects of temperature, solid content and pH on the stability of black carrot anthocyanins. **Food Chemistry**, **101**: 212-218.
124. Harbourne, N., Jacquier, J.C., Morgan, D.J., Lyng, J.G., 2008. Determination of the degradation kinetics of anthocyanins in a model juice system using isothermal and non-isothermal methods. **Food Chemistry**, **111**: 204-208.
125. Zhang, Y., Hu, X.S., Chen, F., Wu, J.H., Liao, X.J., Wang, Z.F., 2008. Stability and colour characteristics of PEF-treated cyanidin-3-glucoside during storage, **Food Chemistry**, **106**: 669-676.
126. Kirca, A., Özkan, M., Cemeroğlu, B., 2003. Thermal stability of black carrot anthocyanins in blood orange juice. **Journal of Food Quality**, **26** (5): 361-366.
127. Aguilar-Rosas, S.F., Ballinas-Casarrubias, M.L., Nevarez-Moorillon, G.V., Martin-Belloso, O., Ortega-Rivas, E., 2007. Thermal and pulsed electric field pasteurization of apple juice: Effects on physicochemical properties and flavour compounds. **Journal of Food Engineering**, **83**: 41-46.
128. Torres, B., Tiwari, B.K., Patras, A., Wijngaard, H.H., Brunton, N., Cullen, P.J., O'Donnell, C.P., 2011. Effect of ozone processing on the colour, rheological properties and phenolic content of apple juice. **Food Chemistry**, **124** (3): 721–726.
129. Piljac-Zegarac, J., Valek, L., Martinez, S., Belscak, A., 2009. Fluctuations in the phenolic content and antioxidant capacity of dark fruit juices in refrigerated storage. **Food Chemistry**, **113**: 394–400.
130. Wu, R., Frei, B., Kennedy, J.A., Zhao, Y., 2010. Effects of refrigerated storage and processing technologies on the bioactive compounds and antioxidant capacities of marion and evergreen blackberries. **Food Science and Technologie**, **43**: 1253-1264.
131. Van der Sluis, A.A., Dekker, M., Van Boekel, M.A.J.S., 2005. Activity and concentration of polyphenolic antioxidants in apple juice. 3. stability during storage. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, **53**: 1073–1080.

132. Alighourchi, H., Barzegar, M., 2009. Some Physicochemical characteristics and degradation kinetic of anthocyanin of reconstituted pomegranate juice during storage. **Journal of Food Engineering**, **90**: 179-185.
133. Brownmiller, C., Howard, L.R., Prior, R.L., 2008. Processing and storage effects on monomeric anthocyanins, percent polymeric color, and antioxidant capacity of processed blueberry products. **Journal of Food Science**, **5** (73): H72-H79.
- 134.. Hager, A., Prior, R.L., Brownmiller, C., 2008. Processing and storage effects on monomeric anthocyanins, percent polymeric color, and antioxidant capacity of processed black raspberry products. **Journal of Food Science**, **73**: H139-H143.
135. Srivastava, A., Akoh, C.C., Yi, W., Fischer, J., Krewer, G., 2007. Effect of storage conditions on the biological activity of phenolic compounds of blueberry extract packed in glass bottles. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, **55**: 2705-2713.
136. de Rosso, V.V., Mercadante, A.Z., 2007. Evaluation of colour and stability of anthocyanins from tropical fruits in an isotonic soft drink system. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, **8**: 347–352.
137. Corrales, M., Garcia, A. F., Butz, P., Tauscher, B., 2009. Extraction of anthocyanins from grape skins assisted by high hydrostatic pressure. **Journal of Food Engineering**, **90**: 415-421.
138. Sodilova, E., Carle, R., Stintzing, F.C., 2007. Thermal degradation of anthocyanins and its impact on color and in vitro antioxidant capacity. *Molecular Nutrition & Food Research*, **51**: 1461-1471.
139. Maskan, M., 2006. Production of pomegranate (*punica granatum* l.) juice concentrate by various heating methods: Colour degradation and kinetics. **Journal of Food Engineering**, **72** (3): 218-224.
140. Walkowiak-Tomczak, D., Czapski, J., 2007. Colour changes of a preparation from red cabbage during storage in a model system. **Food Chemistry**, **104**: 709–714.
141. Marti, N., Perez-Vicente, A., Garcia-Viguera, C., 2002. Influence of storage temperature and ascorbic acid addition on pomegranate juice. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, **82** (2): 217-221.
142. Kaçar, A., Şahan, N., 2004. Yağ ikame maddeleri kullanılarak üretilen enerjisi azaltılmış dondurmaların kimyasal özellikleri. **HR. Ü.Z.F.Dergisi**, **8** (1): 7-13.

143. Yeşilsu, A. F., 2006. Dondurmanın Fiziksel, Kimyasal ve Duyusal Özellikleri Üzerine Bazı Pekmez Çeşitlerinin Etkisi. Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Yüksek Lisans Tezi, Samsun, 88 s.
144. Karaman, S., 2009. Çay veya Bazı Bitki Çayları ile Aromatize Edilmiş Dondurma Üretim Olanaklarının Araştırılması. Erciyes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Kayseri, 86 s.
145. Or, F., 2009. Kahramanmaraş'ta üretilen Maraş Usulü Dondurmaların Mikrobiyolojik Kalitelerinin Değerlendirilmesi Üzerine Bir Araştırma. Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 46 s.
146. Evrensel, S., Güneş, E., 1998. Bursa'da tüketilen dondurmaların kimyasal ve mikrobiyolojik kalitesi. **Gıda**, **23** (4): 261-265.
147. Stintzing, F.C., Stintzing, A.S., Carle, R., Frei, B., Wrostedt, R.E., 2002. Color and antioxidant properties of cyanidin-based anthocyanin pigments. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, **50**: 6172-6181.
148. Dervişoğlu, M., Yazıcı, F., Aydemir, O., 2005. The Effect of soy protein concentration on the physical, chemical and sensory properties of strawberry flavored ice cream. **European Food Research and Technology**, **221**: 446-470.
149. Çelik, Ş., Cankurt, H., Doğan, C., 2010. Safran ilavesinin sade dondurmanın bazı özelliklerine etkisi. **Gıda**, **35** (1): 33-39.
150. Aliyev, C., 2006. Kefir ve Yaban Mersininin Dondurmanın Fizikokimyasal, Duyusal ve Mikrobiyolojik Özelliklerine Etkisi. On Dokuz Mayıs Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Samsun.
151. İpek, D., Zorba, N.N., 2008. Türk lokumuna uygulanan farklı ambalajlama tekniklerinin mikrobiyolojik kalitesine etkileri. **Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi**, **1**: 1-6.
152. Nizamlioğlu, M., Doğruer, Gürbüz, Ü., 1998. Çeşitli çemen karışımlarının pastırma kalitesine etkisi I, kimyasal ve duysal nitelikler. **Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences**, **22**: 299-308.
153. Doğruer, Y. , Nizamlioğlu, M., Gürbüz, Ü., Kayaardı, S., 1998. Çeşitli çemen karışımlarının pastırma kalitesine etkisi II: Mikrobiyolojik nitelikler. **Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences**, **22**: 221-229.
154. Kök, I. 1985. Pastırmanın imalatında kullanılan çemen (*Trigonella foenum graceum*) hamurunun geliştirilmesi, standardizasyonu üzerinde araştırmalar. **Doğa Bilim Dergisi**, **D1**, **9** (3): 241-248.

155. Demirer, M. A., 1972. Pastırma çemenlerinde boya araştırmaları. **Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi**, **19**: 106-116.
156. Kammerer, D.R., Schillmöller, S., Maier, O., Schieber, A., Carle, R., 2007. Colour stability of canned strawberries using black carrot and elderberry juice concentrates as natural colourants. **European Food Research and Technology**, **224**: 667–679.
157. Topuz, A., Feng, H., Kushad, M., 2009. The effect of drying method and storage on color characteristics of paprika. **LWT - Food Science and Technology**, **42** (10): 1667-1673.
158. Duman, A.D., 2010. Storage of red chili pepper under hermetically sealed or vacuum conditions for preservation of its quality and prevention of mycotoxin occurrence. **Journal of Stored Products Research**, **46**: 155-160.