

T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
KOORDİNASYON BİRİMİ

**SİYAH HAVUÇ VE KIRMIZI LAHANADAN EKSTRAKTE EDİLEN
ANTOSİYANİN BAZLI RENK MADDELERİNİN BİYOLOJİK
ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ VE BAZI GIDA MADDELERİNDE
RENKLENDİRİCİ OLARAK KULLANIMI**

Proje No: FBA- 08 768

Proje Türü: Araştırma

SONUÇ RAPORU

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

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

Temmuz 2011

KAYSERİ

Temmuz 2011

KAYSERİ

İÇİNDEKİLER

TABLolar LİSTESİ	Vİİ
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	İX
KISALTMALAR VE SİMGELER	X
ÖZET	Xİİ
ABSTRACT	XİV
1. BÖLÜM.....	16
GİRİŞ.....	16
2. BÖLÜM.....	25
GENEL BİLGİLER	25
2.1. Gıdalarda Renk ve Renklendiriciler	25
2.1.1. Sentetik gıda boyaları	26
2.1.2. Doğala özdeş gıda boyaları.....	28
2.1.3. Doğal Renk Maddeleri.....	28
2.1.3.1. Karmin	30
2.1.3.2. Antosiyaninler	32
2.1.3.2.1. Antosiyanin-sağlık ilişkisi	34
2.1.3.2.2. Antosiyaninlerin antimikrobiyal özellikleri.....	35
2.3. Araştırma Kapsamında Renklendirici Olarak Kullanılan Antosiyanin Kaynakları .	36
2.3.1. Siyah havuç.....	36
2.3.2. Kırmızı lahana.....	37
2.4. Antosiyanin Ekstraksiyonunda Kullanılan Farklı Teknik Uygulamaları	39
2.4.1. Klasik ekstraksiyon.....	39
2.4.2. Vurgulu elektrik alan (Pulsed Electric Field, PEF).....	40
2.4.3. Ultrasonik ekstraksiyon	42
3. BÖLÜM.....	44
MATERYAL VE YÖNTEM.....	44
3.1. Materyal	44
3.1.1. Antosiyanin kaynakları	44
3.1.2. Renklendirilen ürünler	44
3.2. Yöntem	45
3.2.1. Antosiyanin kaynaklarında yapılan analizler	45
3.2.1.1. Antosiyanin bazlı ekstrakt elde edilen materyallerin niteliklerinin belirlenmesi	45
3.2.1.2. Kuru Madde	45
3.2.1.3. Kül miktarı tayini.....	46
3.2.1.4. pH tayini.....	46
3.2.1.5. Titrasyon asitliği tayini.....	46
3.2.1.6. Toplam ve indirgen şeker tayini	47
3.2.2. Antosiyanin pigmentlerinin ekstraksiyonları.....	47
3.2.2.1. Klasik ekstraksiyon uygulamaları.....	48
3.2.2.2. Vurgulu elektrik alan uygulamaları (PEF)	49
3.2.2.3. Ultrasonik ekstraksiyon uygulaması	49
3.2.3. Farklı ekstraksiyon yöntemleri ile elde edilen ekstraktların bazı biyolojik özelliklerinin belirlenmesi.....	50
3.2.3.1. Toplam fenolik madde tayini	50
3.2.3.2. Toplam antosiyanin tayini.....	51
3.2.3.3. Antiradikal kapasite tayini.....	51
3.2.3.4. Antioksidan aktivite tayini	52

3.2.3.5. Mikrobiyolojik analizler	52
3.2.3.5.1. Agar difüzyon yöntemi ile antosiyanin bazı ekstraktların antimikrobiyal aktivitelerinin belirlenmesi	52
3.2.3.5.2. Antosiyanin bazı ekstraktların elma suyunda <i>E. coli</i> O157:H7 ve <i>B. cereus</i> F2 üzerine antimikrobiyal etkisinin saptanması	53
3.2.4. Antosiyaninlerin ısıl stabilitelerinin belirlenmesi	54
3.2.4.1. Antosiyaninlerin tampon çözeltilerde ısıl stabilitelerinin belirlenmesi....	54
3.2.4.2. Antosiyaninlerin elma sularında ısıl stabilitelerinin belirlenmesi	55
3.2.4.2.1. Kinetik katsayıların hesaplanması.....	55
3.2.4.2.2. Reaksiyon hız sabitinin hesaplanması	56
3.2.4.2.3. Aktivasyon enerjisinin hesaplanması	56
3.2.4.2.4. Yarılanma süresinin ($t_{1/2}$) hesaplanması	57
3.2.5. Renklendirilen gıdalarda yapılan analizler	57
3.2.5.1. Elma Suyu	57
3.2.5.1.1. Titrasyon asitliği tayini	58
3.2.5.1.2. pH tayini.....	59
3.2.5.1.3. Suda çözünür kuru madde	59
3.2.5.1.4. Toplam fenolik madde tayini.....	59
3.2.5.1.5. Toplam antosiyanin tayini	59
3.2.5.1.6. Antiradikal kapasite tayini	59
3.2.5.1.7. Antioksidan aktivite tayini	60
3.2.5.1.8. Renk tayini	60
3.2.5.1.9. Duyusal analiz.....	60
3.2.5.2. Dondurma	60
3.2.5.2.1. pH tayini.....	62
3.2.5.2.2. Kuru madde tayini	62
3.2.5.2.3. Kül miktarı tayini.....	63
3.2.5.2.4. Toplam fenolik madde tayini.....	63
3.2.5.2.5. Antiradikal aktivite tayini	64
3.2.5.2.6. Renk Tayini.....	64
3.2.5.2.7. Duyusal Analiz.....	64
3.2.5.3. Şekerleme	65
3.2.5.3.1. pH analizi	67
3.2.5.3.2. Kuru madde analizi.....	67
3.2.5.3.3. Kül miktarı tayini.....	67
3.2.5.3.4. Renk tayini	67
3.2.5.3.5. Duyusal analiz.....	67
3.2.5.4. Çemen.....	67
3.2.5.4.1. pH analizi	69
3.2.5.4.2. Kuru madde analizi.....	69
3.2.5.4.3. Kül miktarı tayini.....	69
3.2.5.4.4. Renk Tayini.....	69
4. BÖLÜM.....	70
ARAŞTIRMA BULGULARI	70
4.1. Materyallerin Nitelikleri.....	70
4.2. Antosiyanin Kaynaklarının Bazı Analitik Özellikleri.....	71
4.3. Farklı Ekstraksiyon Yöntemleri ile Elde Edilen Antosiyanin Bazı Ekstraktların Biyoaktif Özelliklerinin Belirlenmesi.....	72
4.3.1. Farklı ekstraksiyon yöntemleri ile elde edilen antosiyanin bazı ekstraktların	74

verimleri	74
4.3.2. Farklı ekstraksiyon yöntemleri ile elde edilen antosiyanin bazlı ekstraktların toplam fenolik madde içerikleri	75
4.3.3. Farklı ekstraksiyon yöntemleri ile elde edilen antosiyanin bazlı ekstraktların antosiyanin miktarları	75
4.3.4. Farklı ekstraksiyon yöntemleri ile elde edilen antosiyanin bazlı ekstraktların antioksidan kapasiteleri	75
4.3.5. Farklı ekstraksiyon yöntemleri ile elde edilen antosiyanin bazlı ekstraktların antiradikal kapasiteleri	76
4.3.6. Antosiyanin bazlı ekstraktların antimikrobiyal özellikleri	76
4.3.6.1. Farklı ekstraksiyon yöntemleri ile elde edilen antosiyanin bazlı ekstraktların antimikrobiyal aktivitelerinin agar difüzyon yöntemi ile belirlenmesi	76
4.3.6.2. Antosiyanin bazlı ekstraktların elma suyunda <i>E. coli</i> O157:H7 ve <i>B. cereus</i>	80
F2 üzerine antimikrobiyal etkisinin saptanması	80
4.4. Antosiyaninlerin Isıl Stabilitelerinin Belirlenmesi	81
4.4.1. Antosiyanin bazlı ekstraktların tampon çözeltilerde ısıl stabilitelerinin belirlenmesi	81
4.4.2. Antosiyanin bazlı ekstraktların elma sularında ısıl stabilitelerinin belirlenmesi	82
4.5. Renklendirilen Gıdalar	84
4.5.1. Elma suları	84
4.5.1.1. Elma sularının toplam fenolik madde miktarlarında meydana gelen değişimler	85
4.5.1.2. Elma sularının antosiyanin miktarlarında meydana gelen değişimler ...	86
4.5.1.3. Elma sularının antiradikal aktivitelerinde meydana gelen değişimler ...	88
4.5.1.4. Elma sularının antioksidan aktivitelerinde meydana gelen değişimler ...	89
4.5.1.5. Elma sularının renginde meydana gelen değişimler	90
4.5.1.6. Elma sularının duyusal olarak değerlendirilmesi	93
4.5.2. Dondurma	96
4.5.2.1. Dondurmaların toplam fenolik madde miktarlarında meydana gelen değişimler	97
4.5.2.2. Dondurmaların antiradikal aktivitelerinde meydana gelen değişimler ..	97
4.5.2.3. Dondurmaların renginde meydana gelen değişimler	97
4.5.2.4. Dondurmaların duyusal olarak değerlendirilmesi	98
4.5.3. Şekerleme	99
4.5.3.1. Şekerlemelerin renginde meydana gelen değişimler	99
4.5.3.2. Şekerlemelerin duyusal olarak değerlendirilmesi	100
4.5.4. Çemen	101
4.5.4.1. Çemenlerin renginde meydana gelen değişimler	102
5. BÖLÜM	102
TARTIŞMA-SONUÇ VE ÖNERİLER	102
5.1. Antosiyanin Kaynaklarının Bazı Analitik Özellikleri	102
5.4. Farklı ekstraksiyon yöntemleri ile elde edilen antosiyanin bazlı ekstraktların biyoaktif özelliklerinin belirlenmesi	102
5.4.1. Farklı ekstraksiyon yöntemleri ile elde edilen antosiyanin bazlı ekstraktların fenolik bileşimleri	102

5.4.2. Farklı ekstraksiyon yöntemleri ile elde edilen antosiyanin bazı ekstraktların antosiyanin miktarları	104
5.4.3. Farklı ekstraksiyon yöntemleri ile elde edilen antosiyanin bazı ekstraktların antioksidan kapasiteleri	105
5.4.4. Farklı ekstraksiyon yöntemleri ile elde edilen antosiyanin bazı ekstraktların antiradikal kapasiteleri	106
5.4.5. Farklı ekstraksiyon yöntemleri ile elde edilen antosiyanin bazı ekstraktların agar difüzyon yöntemi ile antimikrobiyal aktivitelerinin belirlenmesi	106
5.3. Antosiyaninlerin ısıl stabilitelerinin belirlenmesi.....	108
5.3.1. Antosiyanin bazı ekstraktların tampon çözeltilerde ısıl stabiliteleri	108
5.3.2. Antosiyanin bazı ekstraktların elma sularında ısıl stabiliteleri	109
5.4. Renklendirilen Gıdalar	109
5.4.1. Elma Suları	109
5.4.1.1. Elma sularının toplam fenolik madde miktarlarında meydana gelen değişim.....	109
5.4.1.2. Elma Sularının antosiyanin miktarlarında meydana gelen değişim.....	110
5.4.1.3. Elma sularının antiradikal kapasitelerinde meydana gelen değişim	111
5.4.1.4. Elma sularının renginde meydana gelen değişimler	112
5.4.1.5. Elma sularında meydana gelen duyuşal değişimler	113
5.4.2. Dondurma	114
5.4.2.1.Dondurmaların fizikokimyasal özellikleri	114
5.4.2.2. Dondurmaların toplam fenolik madde miktarlarında meydana gelen değişimler	115
5.4.2.3. Dondurmaların antiradikal aktivitelerinde meydana gelen değişimler.	117
5.4.2.4. Dondurmaların renklerinde meydana gelen değişimler.....	118
5.4.2.5. Dondurmaların duyuşal özelliklerinin değeriendirilmesi	120
5.4.3. Şekerleme.....	121
5.4.3.1. Şekerlemelerin renklerinde meydana gelen değişimler	121
5.4.4. Çemen	122
5.4.4.1. Çemen örneklerinin renginde meydana gelen değişimler	122

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2.1. FDA ve Avrupa Birliği tarafından gıdalarda kullanılmasına izin verilen sentetik renk maddeleri [53].	27
Tablo 2.2. Bazı renk maddelerinin sağlık üzerine olan yan etkileri [54].	28
Tablo 2.3. Avrupa Birliği tarafından kullanımına izin verilen doğal kaynaklı boyalar [1].	29
Tablo 2.4. FDA tarafından gıdalarda kullanılmasına izin verilen, sertifikaya tabi olmayan doğal renk maddeleri [57].	30
Tablo 2.5. Gıdalarda kullanılan Renklendiriciler Tebliği' ne göre karmin kullanımına izin verilen ürünler ve maksimum kullanım miktarları.	32
Tablo 4.1. Siyah havuçların ağırlık, boy ve çapları	70
Tablo 4.2. Kırmızı lahanaların ağırlık, boy ve çapları	71
Tablo 4.3. Siyah havuç ve kırmızı lahanaların bazı analitik özellikleri	71
Tablo 4.4. Farklı ekstraksiyon yöntemleri ile elde edilen antosiyanin bazlı ekstraktların % verimleri	74
Tablo 4.5. Farklı ekstraksiyon yöntemleri ile elde edilen antosiyanin bazlı ekstraktların fenolik bileşimleri (mg GAE/g kuru ekstrakt)	75
Tablo 4.6. Farklı ekstraksiyon yöntemleri ile elde edilen antosiyanin bazlı ekstraktların antosiyanin miktarları (mg siy-3-glikozit/g kuru ekstrakt)	75
Tablo 4.7. Farklı ekstraksiyon yöntemleri ile elde edilen antosiyanin bazlı ekstraktların antioksidan kapasiteleri (mg AAE/g kuru ekstrakt)	76
Tablo 4.8. Farklı ekstraksiyon yöntemleri ile elde edilen antosiyanin bazlı ekstraktların antiradikal kapasiteleri (IC ₅₀ , µg/mL)	76
Tablo 4.9. Farklı ekstraksiyon yöntemleri ile elde edilen SHE'lerinin bazı maya ve bakterilere karşı inhibitif etkileri (inhibisyon zonu, mm)	78
Tablo 4.10. Farklı ekstraksiyon yöntemleri ile elde edilen KLE'ların bazı maya ve bakterilere karşı inhibitif etkileri (inhibisyon zonu, mm)	79
Tablo 4.11. 4 ve 20°C sıcaklıklarda inkübe edilen elma sularına ilave edilen antosiyanin bazlı ekstraktların (4 mg antosiyanin/100 mL) <i>E. coli</i> O157:H7 ve <i>B. cereus</i> F2 üzerine inhibitif etkileri (log kob/mL)	80
Tablo 4.12. Elma sularında farklı antosiyanin bazlı ekstrakt antosiyaninlerinin ısıl stabilitelere ait kinetik parametreler	83
Tablo 4.13. Elma suyunun bazı analitik özellikleri	85
Tablo 4.14. Farklı ABE'lar ile renklendirilen elma sularının analitik özellikleri	85
Tablo 4.15. Farklı ABE'lar ile hazırlanmış ve farklı sıcaklık ve sürelerde depolanan elma suyu örneklerinin toplam fenolik madde miktarlarındaki değişimler (mg GAE/L)	86
Tablo 4.16. Farklı ABE'lar ile renklendirilen ve farklı sıcaklık ve sürelerde depolanan elma suyu örneklerinin antiradikal aktivitelerindeki değişimler (% inhibisyon)	89
Tablo 4.17. Farklı ABE'lar ile renklendirilen ve farklı sıcaklık ve sürelerde depolanan elma suyu örneklerinin antioksidan aktivitelerindeki değişimler (mg AAE/mL)	90
Tablo 4.18. Farklı ABE'lar ile renklendirilen ve 4°C sıcaklıkta depolanan elma sularının <i>L</i> *, <i>a</i> *, <i>b</i> *, <i>h</i> ^o ve <i>C</i> * değerleri	91
Tablo 4.19. Farklı ABE'lar ile renklendirilen ve 20°C sıcaklıkta depolanan elma sularının <i>L</i> *, <i>a</i> *, <i>b</i> *, <i>h</i> ^o ve <i>C</i> * değerleri	92

Tablo 4.20. Farklı ABE'lar ile renklendirilen ve 30°C sıcaklıkta depolanan elma sularının L^* , a^* , b^* , h^o ve C^* değerleri	93
Tablo 4.21. Farklı ABE'lar ile renklendirilen ve 4°C sıcaklıkta depolanan elma sularının duyuşsal analiz bulguları	94
Tablo 4.22. Farklı ABE'lar ile renklendirilen ve 20°C sıcaklıkta depolanan elma sularının duyuşsal analiz bulguları	95
Tablo 4.23. Farklı ABE'lar ile renklendirilen ve 30°C sıcaklıkta depolanan elma sularının duyuşsal analiz bulguları	96
Tablo 4.24. Dondurma örneklerinin kuru madde, kül ve pH değerleri (0. gün)	96
Tablo 4.25. Farklı ABE'lar ve karminle renklendirilen dondurma örneklerinin toplam fenolik madde miktarlarındaki (TFM) ve antiradikal aktivitelerindeki değişim.....	97
Tablo 4.26. Farklı ABE'lar ile renklendirilen dondurma örneklerinin L^* , a^* , b^* , h^o ve C^* değerleri.....	98
Tablo 4.27. Farklı ABE'lar ile renklendirilen dondurma örneklerinin duyuşsal analiz bulguları	98
Tablo 4.28. Şekerleme örneklerinin kuru madde, kül ve pH değerleri (0. gün)	99
Tablo 4.29. Farklı ABE'lar ve karminle renklendirilen şekerlemelerin L^* , a^* , b^* , h^o ve C^* değerleri.....	100
Tablo 4.30. Farklı ABE'lar ve karmin ile renklendirilen şekerlemelerin duyuşsal analiz bulguları	101
Tablo 4.31. Farklı ABE'lar ve karmin ile renklendirilen çemen örneklerinin pH, kül ve kuru madde değerleri (0. gün)	101
Tablo 4.32. Farklı ABE'lar ve karminle renklendirilen çemenlerin depolanma sürecinde L^* , a^* , b^* , h^o ve C^* değerlerindeki değişimler	102

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1. Koşinal böcekleri	31
Şekil 3.1. Elma suyunun renklendirilme akış şeması.....	58
Şekil 3.2. Standart dondurma üretim akış şeması	61
Şekil 3.3. Standart şekerleme (lokum) üretim akış şeması	66
Şekil 3.4. Standart çemen üretim akış şeması	68
Şekil 4.1. Siyah havuç ve kırmızı lahana örneklerine PEF uygulaması [a) Siyah havucun PEF işleminden önceki hali, b) Siyah havucun PEF uygulanmış hali, c) Sağdaki mezürde PEF uygulaması sonrası elde edilen ekstrakt, soldaki mezürde ise aynı hacimde su ile muamele edilen örnek d) Kırmızı lahananın PEF işleminden önceki hali, b) Kırmızı lahananın PEF uygulanmış hali, c) Soldaki mezürde PEF uygulaması sonrası elde edilen ekstrakt, sağdaki mezürde ise aynı hacimde su ile muamele edilen örnek görülmektedir]	72
Şekil 4.2. Siyah havuç ve kırmızı lahana örneklerinin ultrason ve klasik ekstraksiyon yöntemleri ve çözgen olarak AES'nin kullanılması halinde arta kalan posalarının görünümü [a) Siyah havuç ultrason, b) Siyah havuç klasik, c) Kırmızı lahana ultrason, d) Kırmızı lahana klasik ekstraksiyon yöntemleri uygulandıktan sonraki görünümleri].....	73
Şekil 4.3. Siyah havuç, kırmızı lahana örneklerinin ultrason ve klasik ekstraksiyon yöntemleri ve çözgen olarak suyun kullanılması halinde arta kalan posalarının görünümü [a) Siyah havuç ultrason, b) Siyah havuç klasik, c) Kırmızı lahana ultrason, d) Kırmızı lahana klasik ekstraksiyon yöntemleri uygulandıktan sonraki görünümleri].....	74
Şekil 4.4. 90°C sıcaklıkta ısıtılma işlemi gören ABE içeren tampon çözeltilerin antosiyanin miktarlarında meydana gelen değişimler (pH 3), SHE: Siyah havuç ekstraktı, KLE: Kırmızı lahana ekstraktı.	81
Şekil 4.5. 90°C sıcaklıkta ısıtılma işlemi gören ABE içeren tampon çözeltilerin antosiyanin miktarlarında meydana gelen değişimler (pH 4), SHE: Siyah havuç ekstraktı, KLE: Kırmızı lahana ekstraktı.	82
Şekil 4.6. Siyah havuç antosiyaninlerinin (SHE) elma suyunda farklı sıcaklıklarda ısıtılması sonucu ortaya çıkan degradasyonu.....	83
Şekil 4.7. Kırmızı lahana antosiyaninlerinin (KLE) elma suyunda farklı sıcaklıklarda ısıtılması sonucu ortaya çıkan degradasyonu	84
Şekil 4.8. ABE'lar ile renklendirilen elma sularının 4°C sıcaklıkta depolanma sürecinde antosiyanin miktarındaki değişimler, SHE: Siyah havuç ekstraktı, KLE: Kırmızı lahana ekstraktı.....	87
Şekil 4.9. ABE'lar ile renklendirilen elma sularının 20°C sıcaklıkta depolanma sürecinde antosiyanin miktarındaki değişimler, SHE: Siyah havuç ekstraktı, KLE: Kırmızı lahana ekstraktı.....	87
Şekil 4.10. ABE'lar ile renklendirilen elma sularının 30°C sıcaklıkta depolanma sürecinde antosiyanin miktarındaki değişimler, SHE: Siyah havuç ekstraktı, KLE: Kırmızı lahana ekstraktı.....	88

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)
BCE	: Black carrot extract
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)
HCl	: Hidroklorik Asit
JECFA	: Gıda Katkıları Ortak Uzmanlar Komitesi (Joint Expert Committee on Food Additives)
k	: Reaksiyon Hız Sabiti
KLE	: Kırmızı Lahana Ekstraktı
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)
RCE	: Red cabbage extract
SHE	: Siyah Havuç Ekstraktı

TFM : Toplam Fenolik Madde

THI : 2-Asetil-4(5)-Tetrahidroksibütilimidazol

UV : Mor Ötesi (Ultraviolet)

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

**SİYAH HAVUÇ VE KIRMIZI LAHANADAN EKSTRAKTE EDİLEN
ANTOSİYANİN BAZLI RENK MADDELERİNİN BİYOLOJİK ÖZELLİKLERİNİN
BELİRLENMESİ VE BAZI GIDA MADDELERİNDE RENKLENDİRİCİ OLARAK
KULLANIMI**

ÖZET

Bu araştırmada, siyah havuç ve kırmızı lahana farklı ekstraksiyon yöntemleriyle elde edilen antosiyanin bazlı ekstraktların (ABE) bazı biyolojik özelliklerinin belirlenmesi ve bazı gıdalarda renklendirici olarak kullanılabilme imkanlarının araştırılması hedeflenmiştir. Bu amaçla, belirtilen antosiyanin kaynakları, vurgulu elektrik alan (PEF), ultrason tekniği veya klasik ekstraksiyon yöntemleri ile ekstrakte edilmişlerdir. PEF uygulamalarında çözen olarak sadece saf su kullanılırken, diğer uygulamalarda saf suyun yanı sıra %0.1 HCl ile asitlendirilmiş 1:1 etanol:su (AES) 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 etanol:su (%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 ABE'lar ile renklendirilmiş ve elma suyu içerisindeki ekstraktların *E. coli* O157:H7 veya *B. cereus* F2'ye karşı antimikrobiyal etkileri incelenmiştir. Genel olarak ABE'ların *B. cereus* F2'ye kıyasla *E. coli* O157:H7 üzerine inhibitif etkisinin daha yüksek olduğu saptanmıştır.

Araştırmada, çözen olarak AES karışımının kullanıldığı, klasik ekstraksiyon yöntemi ile elde edilen ABE'lar 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 ABE'lar ilave edilerek renklendirilen örnekler, ürün gruplarına göre farklı sıcaklık ve sürelerde depolanarak, bazı fizikokimyasal ve duyuşal özellikleri belirlenmiştir. İlave edilen ABE'ların elma suları ile dondurmalara fonksiyonel özellik kattıkları saptanmıştır. Sonuçta bu örneklerde özellikle siyah havuç ekstraktlarının (SHE) duyuşal anlamda beğenildiği tespit edilmiştir. Çemen örneklerinin renklendirilmesinde SHE

ve kırmızı lahana ekstraktlarının (KLE), şekerlemelerde ise SHE'larının başarı ile kullanılabileceği belirlenmiştir.

ABE'ların ısıl stabiliteleri hem pH değeri 3 ve 4 olan tampon çözeltilerde hem de elma sularında incelenmiştir. Gerek tampon çözeltilerde ve gerekse de elma sularında KLE'larının SHE'larından daha yüksek ısıl stabiliteye sahip oldukları saptanmıştır.

Sonuç olarak, ekstraksiyon yöntemlerinin ve kullanılan çözgenin, 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.

Anahtar Kelimeler: Antosiyanin; renk; PEF; ultrason; biyoaktivite.

DETERMINATION OF BIOLOGICAL PROPERTIES OF ANTHOCYANIN BASED PIGMENTS EXTRACTED FROM BLACK CARROT AND RED CABBAGE AND THEIR USAGE IN SOME FOOD PRODUCTS AS COLORANTS

ABSTRACT

The objectives of this study were to determine some biological properties of anthocyanin based extracts (ABEs) obtained from black carrot and red cabbage by using different extraction methods and to investigate their utilization possibility as colorants in some food products. For this purpose, these anthocyanin sources were subjected to pulsed electric field (PEF), ultrasound technique or conventional extraction methods. In the PEF extraction method, only pure water was used as a solvent, while 1:1 ethanol: water mixture acidified with 0.1% HCl and pure water were used as solvents in the other extraction methods. 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, AEW) 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 ABEs at the level of 4 mg anthocyanin/100 mL. Then the antimicrobial effects of the ABEs in the apple juices were tested against *E. coli* O157:H7 and *B. cereus* F2. In general, ABEs had more inhibitory effects on *E. coli* O157:H7 than on *B. cereus* F2.

In this study, ABEs obtained using conventional extraction method with AEW was 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 ABEs were determined and the effects of storage time and temperature were also tested. The ABEs added some functional properties to apple juices and ice cream samples, and higher sensory score were given to these samples that have black carrot extracts (BCEs). In the result, it was determined that BCEs and red cabbage extracts (RCEs) could successfully be used in coloration of cemen paste, while BCEs in the coloration of candies (Turkish delight).

Thermal stability of the ABEs was investigated both in the apple juices and in buffer solutions at the pH of 3 and 4. The extracts having the highest thermal stabilities both in the apple juices and buffer solutions were RCEs.

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.

Keywords: Anthocyanin; color; PEF; 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 katkıları 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

antosiyenin 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].

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 antosiyeninlerle renklendirilmesini konu alan çok sayıda araştırma bulunmaktadır. Örneğin, üzüm ekstraktı ile alkolsüz içeceklerin 100 mL'sine 3 mg monomerik antosiyenin 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 antosiyenin ilavesinin uygun olduğu aktarılmaktadır [19]. Soda ve mineralli (gazlı) içeceklerin 100 mL'sine ilave edilen 0.5 mg siyah havuç antosiyanininin pembe renk oluşturduğu, konsantrasyonun artmasıyla birlikte rengin daha da koyulaştığı belirlenmiştir [20].

Yoğurtların renklendirilmesinde mikrokapsüle edilmiş siyah havuç antosiyanininin kullanıldığı bir çalışmada, 100 g yoğurda ilave edilen 3.5 mg monomerik antosiyaninin pembemsi mor bir renk oluşturmak için yeterli olduğu rapor edilmiştir [20]. Benzer şekilde çilekli yoğurdun rengini temsilen 100 g yoğurda 0.5 mg antosiyaninin renklendirici olarak ilave edilebileceği belirtilmektedir [19].

Siyah havuç konsantresinin farklı meyve suları ve nektarlarının yanı sıra çilek reçelinin renklendirilmesinde de başarı ile kullanıldığı belirtilmektedir [21]. Bir başka çalışmada gül reçelini temsilen 100 g reçele 2 mg mikrokapsüle edilmiş siyah havuç antosiyanini ilavesinin uygun olduğu saptanmıştır [20]. Yine bazı şekerlemelere %0.4 (ağırlık/ağırlık) düzeyinde üzüm ekstraktı ilavesinin uygun olduğu aktarılmaktadır [18]. Ülkemizde yapılan bir başka çalışmada da 1 kg geleneksel Türk lokumunun renklendirilmesinde 6.6 g siyah havuç konsantresinin yeterli olduğu bildirilmektedir [22].

İşlenmiş gıdalarda antosiyaninler bazı problemlere de sebep olabilmektedirler. Örneğin, antosiyenin ekstraktları ile proteinler arasındaki interaksiyonlar nedeni ile gıdalarda bazı

çökeltme 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 [23]. Benzer şekilde, petanin gibi antosiyaninlerin buzdolabında muhafaza edilmesi gereken bazı pastane ürünleri ve süt gibi hafif alkali ürünlerde renklendirici olarak başarı ile kullanılabileceği belirtilmektedir [24]. Süt ürünlerine %0.3-0.5 (ağırlık/ağırlık) oranında üzümünden elde edilen antosiyanin bazlı 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 [25]. Yapılan başka bir çalışmada, pH değerleri yaklaşık 4.2-4.5 olan yoğurt ve ekşi kremaya renklendirici özelliklerini değerlendirmek amacı ile 5 mg antosiyanin/100 g ürün dozunda kırmızı turp, kırmızı lahana ve siyah havuç gibi farklı antosiyanin kaynaklarından elde edilen ekstraktlar ilave edilmiştir. Çalışmada kırmızı turp ve siyah havuç ilavesinin ürünlere hoş bir kırmızılık verirken, kırmızı lahananın ürünlerde çekici bir mor renk oluşturduğu belirtilmiştir. Süt ürünlerinin raf ömrünün yaklaşık birkaç hafta olduğu dikkate alındığında doğal antosiyanin kaynaklarının bu tip ürünlerde başarı ile kullanılabileceği belirtilmektedir [15]. 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 vurgulu elektrik alan (PEF) ve ultrason gibi farklı ekstraksiyon uygulamalarının, ekstraktların antosiyanin miktarı, toplam fenolik madde, antioksidan, antiradikal ve antimikrobiyal özellikleri gibi bazı biyoaktif özellikleri üzerine etkileri incelenmiştir. PEF ve ultrason gibi yeni teknolojiler, çevre dostu ve son derece etkin teknolojik uygulamalardır [26]. PEF uygulamaları ısı artışının az olması, hücre zarlarının mikro düzeyde etkin şekilde parçalanması ve işlem maliyetinin düşük olması gibi avantajlara sahip olduğu için son

yıllarda dikkatleri üzerine çekmektedir [27; 28]. PEF işleminin 15-80 kV/cm elektrik alan şiddetinde, vurgu sıklığı 1-100 arasında değişmek sureti ile 1-100 µs süreyle uygulanması halinde bakteriler ve enzimlerin inaktivasyonu için yeterli olduğu bildirilmektedir [39]. Yine PEF tekniği mikroorganizmaların etkisiz hale getirilmesi başta olmak üzere, gıdaların kurutulması ve meyve suyu veriminin artırılması gibi farklı amaçlarla kullanılmaktadır [30; 31]. PEF uygulamalarının gıdaların renk, lezzet ve antosiyanin gibi biyoaktif özelliklerini olumsuz yönde etkilemeksizin, gıdalarda istenmeyen bazı mikroorganizma ve enzimler üzerinde etkili olduğu belirtilmektedir [32].

Ultrason ise saniyede 20.000 veya daha fazla titreşimde dalga boyu oluşturan bir enerji türü olarak tanımlanmaktadır [33]. Ultrason uygulamaları, ekstrakt eldesinde ısı 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 solvante daha kolay geçerek etkili bir ekstraksiyon işlemi sağlanabilmektedir [34]. Son yıllarda protein, antosiyanin, tartarik asit, aroma bileşenleri ve polisakkaritler gibi çok farklı bileşenlerin ekstraksiyonunda ultrason tekniğinden yaygın olarak faydalanılmaktadır [35].

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; 36; 37].

Mevcut araştırma kapsamında antosiyanin kaynağı olarak kullanılan materyallerden biri de siyah havuçtur. Kökleri yenen iki yıllık bir kültür sebzesi olan siyah havuç (*Daucus carota* ssp. *sativus* var. *atrorubens* Alef.) ülkemizde özellikle Adana ve Hatay

yörelere mahalli bir çeşit olarak üretilmektedir [38]. FAO [39] verilerine göre dünyada havuç ve şalgam üretimi 27225451 ton olup, bu üretimin 6419532 tonu Türkiye’de gerçekleştirilmektedir. Bu üretimin büyük bir kısmının turuncu havuç olduğu ve siyah havuçların özellikle batı toplumları tarafından çok iyi bilinmediği belirtilmektedir. Siyah veya mor havuçların turuncu havuçlardan daha eski bir tarihi olmasına rağmen, bu havuçlar geleneksel olarak sadece Türkiye, Afganistan, Mısır, Pakistan, Hindistan ve Uzak Doğu’da üretilmektedir [40]. Siyah havuç, yüksek düzeyde antosiyanin içermesi nedeniyle gıda boyası olarak kullanıma son derece uygun bir kaynaktır. Siyah havuç üzerinde yapılan çalışmalar toplam antosiyanin içeriğinin çok geniş bir aralıkta yer aldığını ortaya koymaktadır [40]. Siyah havuçlardan izole edilen antosiyaninler yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduklarından, renklendirme amacıyla gıdaya ilave edildiklerinde gıdanın besleme kalitesini de artırmaktadır [40; 41; 42].

Bir diğer araştırma mayeryali olan kırmızı lahanada (*Brassica oleracea* L. var. *capitata* f. *rubra*), tüm dünyada 3.1 milyon hektar alanda 68 milyon ton üretimi gerçekleştirilen bir sebzedir [43]. FAO [39] verileri Türkiye’de *Brassica* familyasına dahil olan sebzelerin yaklaşık olarak 650 bin ton üretildiğini ortaya koymaktadır. Yüksek düzeyde antioksidan aktivite sergileyen kırmızı lahanalarda bu etkinin, polifenolik bileşiminden ve bu grupta geniş bir yer tutan antosiyaninlerinden kaynaklandığı belirtilmektedir [43]. Hafif asidik ortamlarda kırmızı lahanada bulunan çift asillenmiş antosiyaninler sıcaklık ve ışığa karşı son derece stabil olup, ürünün renk kalitesini korumaktadır [18; 44]. Kırmızı lahanada içecekler, şekerlemeler, toz gıdalar, sakızlar, yoğurt ve sosların renklendirilmesi amacıyla kullanılmaktadır. Diğer materyallerden elde edilen antosiyaninlerin çoğunun aksine kırmızı lahanada ekstraktları asidik gıdaların yanı sıra nötr gıdalarda da başarı ile kullanılabilir. Kırmızı lahanada ekstraktlarının mavi renkli sentetik boyalara da iyi bir alternatif olabileceği bildirilmektedir [45].

Hazırdaki çalışmada siyah havuç ve kırmızı lahanalardan klasik yöntemle 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 ve ark. [22]'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 [25]. Bu nedenle çalışma kapsamında meyve suyu haricinde adı geçen gıdalarda doğal ABE'lerin yanı sıra karmin ile de renklendirilerek, depolama süresince meydana gelen değişimler duyuşal ve objektif yöntemlerle izlenmiştir.

Ayrıca çalışmada klasik yöntem, PEF 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 [46]. 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; 47; 48; 49]. 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 [52]. Sonuç olarak bu araştırmada, siyah havuç ve kırmızı lahana olmak üzere iki farklı antosiyanin kaynağından elde edilen ABE'lerin biyoaktif özelliklerinin incelenmesi amaçlanmıştır . Ayrıca, PEF, 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 AES) 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 ABE'lardan 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 ABE'lardan elma sularında kullanılan miktarda (4 mg antosiyanin/100 mL) elma sularına ilave edilmiş ve mikroorganizmalar üzerindeki etkileri incelenmiştir.

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. Klasik ekstraksiyon yöntemi ile elde edilen ve araştırma kapsamındaki gıdaların renklendirilmesinde kullanılan klasik ekstraksiyon yöntemi ile elde edilen siyah havuç ve kırmızı lahana ekstraktlarının pH değerleri 3 ve 4 olan tampon çözeltilerde 90°C sıcaklıkta ısıl stabiliteleri incelenmiştir. ABE'ların, 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; 21]:

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 düşünülmektedir. Şekerleme gibi bazı ürünlerin renginin düzeltilmesi için bu ürünlere bazı bitkisel ekstraktlar ve şarap ilavesi yapıldığı aktarılmaktadır. Zamanla endüstrideki ilerlemelere paralel olarak gıda sanayi de hızlı bir değişime uğramıştır. Gıdaların renklendirilmesi amacıyla da kırmızı kurşun (Pb_3O_4), HgS veya bakır arsenat gibi mineral ve metal bazlı bileşiklerin kullanımı yoluna gidilmiştir. Zararları sonradan tespit edilen bu tip toksik kimyasallar, şekerleme ve salamura gibi çok farklı gıda gruplarında kullanılmıştır. Tarihi belgeler, kullanılan bu toksik bileşiklerin zehirlenmelere hatta ölümlere neden olduğunu ortaya koymaktadır [51].

Gıda boyaları; sentetik, doğala özdeş ve doğal boyalar olmak üzere 3 grupta toplanmaktadır [51].

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 üretilibilmeleri 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 [51].

Tüm ülkeler, gıda endüstrisinde kullanılan renklendirici katkılarla ilgili düzenlemelere gitmekte ve yapılan düzenlemeler neticesinde de kullanımına izin verilen renklendirici sayısı giderek azalmaktadır [52]. Nitekim son yıllarda yapılan yasal düzenlemelerle birlikte FDA tarafından kullanımına izin verilen sentetik boya sayısının 700’den 7’ye düştüğü bildirilmektedir [51].

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].

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 [53].

Tablo 2.1. FDA ve Avrupa Birliği tarafından gıdalarda kullanılmasına izin verilen sentetik renk maddeleri [53].

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 etkileri Tablo 2.2.’de verilmiştir [54]. Sıçanlara Sunset Yellow gıda boyasının 0-20 mg/kg gün düzeyinde verilmesiyle meme tümörü oluşumu, 20-30 mg/kg gün seviyesinde tüketimiyle diare, sekum (kör bağırsak) genişlemesine yol açtığı belirlenmiştir. 4-16 mg/kg gün seviyesinde 80 hafta süreyle tüketiminin ise lenfoma, reticulum-cell tümörleri ve akciğer adenomları (iyi huylu tümör), yüksek dozda yumurtalık tümörleri, düşük dozlarda ise göğüs tümörlerine sebep olduğu belirtilmektedir. Aynı araştırmada, Poncea 4R boyasının 50, 500, 1250 mg/kg gün dozunda tüketen sıçanlarda ise vücutta yaralar, küçük benekli timüs, böbrek taşı

oluşumu, sekum genişlemesi, benekli karaciğer, beyin ağırlıklarında artış ve hatta ölümlerin gözlemlendiği bildirilmektedir [55].

Tablo 2.2. Bazı renk maddelerinin sağlık üzerine olan yan etkileri [54].

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 [56].

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) Flavoksaantin (b) Lutein (c) Kriptoksaantin (d) Rubiksaantin (e) Violaksaantin (f) Rodoksaantin (g) Kantaksaantin
E162	Pancar kökü kırmızısı, betanin
E163	Antosiyaninler

FDA tarafından gıdalarda kullanımına izin verilen ve sertifikaya tabi olmayan doğal renk maddeleri ise Tablo 2.4.'de verilmiştir [57].

Tablo 2.4. FDA tarafından gıdalarda kullanılmasına izin verilen, sertifikaya tabi olmayan doğal renk maddeleri [57].

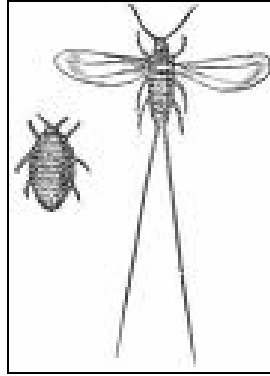
Renk Maddesi	Uygulama Alanı
73.30: Annatto ekstraktı	-*
73.35: Astaksantin	Sadece balık yeminde
73.40: Dehidre edilmiş pancar (pancar tozu)	-
73.50: Ultramarin mavi	Hayvan yemlerindeki tuzun renklendirilmesi (maksimum %0.5)
73.75: Kantaksantin	Tavuk yemi (4.4 mg/kg)
73.85: Karamel	-
73.90: β -Apo-8'-karotenol	33.05 mg/kg
73.95: β -karoten	-
73.100: Koşinal ekstraktı (karmin)	-
73.140: Kızartılmış ve kısmen yağı uzaklaştırılmış, pişmiş çığit unu	-
73.160: Ferrous glukonat	Sadece olgun zeytinlerin renklendirilmesi
73.165: Ferrous laktat	Sadece olgun zeytinlerin renklendirilmesi
73.169: Üzüm ekstraktı	Sadece içecek dışındaki gıdalarda
73.170: Üzüm kabuğu ekstraktı (enocianina)	Gazlı ve gazsız içecekler, bira ve alkollü içeceklerde
73.185: Haematococcus algae	Sadece balık yeminde
73.200: Sentetik demir oksit	Sadece kedi ve köpek mamalarında
73.250: Meyve suyu	-
73.260: Sebze suyu	-
73.275: Kurutulmuş algae	Sadece tavuk yeminde
73.295: Tagetes (Aztec marigold) ekstraktı	Sadece tavuk yeminde
73.300: Havuç yağı	-
73.315: Mısır endospermi yağı	Sadece tavuk yeminde
73.340: Paprika	-
73.345: Paprika oleoresin	-
73.355: Phaffia mayası	Sadece balık yeminde
73.450: Riboflavin	-
73.500: Safran	-
73.600: Turmerik	-
73.615: Turmerik oleoresini	-

*: GMP; Doğru/iyi Üretim Uygulamaları (Good Manufacture Practises)

2.1.3.1. Karmin

Karmin koşinal (*Dactylopius coccus*) böceklerinden elde edilen bir renk maddesidir.

Dişi ve erkek koşinal böcekleri Şekil 2.1.'de görülmektedir [6].



Şekil 2.1. Koşinal böcekleri

Karmin, özellikle sosis, sucuk, pastırma, salam ve işlenmiş kümes hayvanı gibi et ürünleri ile çeşitli meyve preperatlarında, reçel ve marmelatlarında, 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 [6; 7].

Türk Gıda Kodeksi Gıdalarda Kullanılan Renklendiriciler Tebliği’nde koşinal, karminik asit ve karminler, E120 Kodu ile izin verilen gıda renklendiricileri arasında yer almaktadır. Tablo 2.5.’de ilgili tebliğde karmin kullanımına izin verilen gıda ürünleri ve maksimum kullanım miktarları verilmiştir [58].

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 2.5. 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 [59]. 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 [60].

2.1.3.2. Antosiyaninler

Antosiyaninler Yunanca'da çiçek anlamına gelen "anthos" ile mavi anlamındaki "kyanos" kelimelerinden türetilmiştir [14; 61]. Flavonoidlerin alt gruplarından biri olan antosiyaninler, çiçek ve meyvelerin kırmızından maviye kadar değişen renklerini oluşturmaktadır [9]. Antosiyaninler, çarpıcı renkleriyle polen ve çekirdeklerin

yayılmasına önemli katkılarda bulunmaktadırlar [14]. Ayrıca, bunların bitki dokularını ışığın inhibitif etkisinden ve fotosentez sonucu ortaya çıkan oksidasyondan da koruduğu bildirilmektedir [62]. Antosiyaninler bitki dokusunda antibakteriyel ajan olarak da etkili olmaktadır. Örneğin, siyanidin-3-glukozitin pamuk yapraklarında tütün tomurcuk kurtlarına karşı koruyucu etkisinin olduğu belirlenmiştir [14].

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]. Bu antosiyanidinlerden bitkilerde en fazla bulunanları pelargonidin, peonidin, siyanidin, malvidin, petunidin ve delfinidindir. Bu antosiyanidinler arasında siyanidin, delfinidin ve pelargonidin bitkilerde en yaygın olarak bulunanlar olup, pigmentli yaprakların %80' i, meyvelerin %69'u ve çiçeklerin %50'sinde yer almaktadır. Doğada en yaygın olarak bulunan antosiyanin ise siyanidin 3-glikozittir [14].

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 [63]. 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 [63]. Kopigmentler genellikle renksizdirler, ancak antosiyaninlerle kompleks oluşturunca onların renklerini güçlendirip stabilize etmektedirler. Kopigmentlerin başında flavonoidler gelmektedir [17]. Flavonoidlerin yanı sıra organik asitler, alkaloidler, amino asitler, nükleotitler, polisakkaritler, metaller ve diğer antosiyaninler de kopigment olarak sınıflandırılabilir [12].

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' s 5'in üzerine çıkarsa kuinidal anhidrobaz formu oluşur ve ortamın rengi maviye dönüşür [12; 17].

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].

Siyah üzüm ve yan ürünleri, yabanmersini, *Hibiscus calyces* ve Frenk üzümü gibi meyvelerin antosiyanin içeriği yüksek olmasına rağmen, genel olarak hidrasyon ve pH değişikliklerine karşı düşük stabilite gösterdikleri belirtilmektedir. Arzu edilen renk ve stabilite özelliklerine sahip asillenmiş, tüketilebilir antosiyanin kaynaklarının başlıcaları ise kırmızı turp, kırmızı patates, kırmızı lahana ve siyah havuçtur [15].

Antosiyaninler E163 N (N; doğal orjini 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].

2.1.3.2.1. 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]. Antosiyanin pigmentleri içeren materyallerin halk arasında kullanımı çok eskilere dayanmaktadır. Örneğin *Hibiscus* sp antosiyaninleri karaciğer rahatsızlıkları ve hipertansiyon, bilberry (*Vaccinium*) antosiyaninleri ise görme bozuklukları, infeksiyonlar, diare ve çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır. Bununla birlikte antosiyaninlerin sağlık üzerine olan

etkilerinin in vivo, in vitro veya klinik denemelerle belirlenmesi son yıllarda yapılan çalışmalarla gerçekleştirilmiştir [64].

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 [64]. Yapılan bir çalışmada, antosiyaninlerin kronik iltihaplı hastalıklarla ilişkilendirilen nitrik oksidi inhibe etmede son derece etkili olduğu saptanmıştır [65]. Bireysel olarak saflaştırılmamış antosiyanin ekstraktlarının sinerjik etkiyle daha yüksek antiradikal aktivite sergiledikleri belirtilmektedir [66].

2.1.3.2.2. 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 [46].

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 [67].

2.3. Araştırma Kapsamında Renklendirici Olarak Kullanılan Antosiyanin Kaynakları

2.3.1. Siyah havuç

Bilimsel adı *Daucus carota* olan siyah havuç, *Umbelliferae* (şemsiyegiller) familyasına dahildir ve kökleri yenen iki yıllık bir kültür sebzesidir. Ülkemizde özellikle Adana ve Hatay yörelerinde mahalli bir çeşit olarak siyah havuç üretimi yapılmaktadır [38]. Havuçlar antosiyanin grubu (*Daucus carota* ssp. *sativus* var. *atrorubens* Alef.) ve karoten grubu (*Daucus carota* ssp. *sativus* var. *sativus*) olmak üzere iki alt grupta toplanmaktadır [40]. FAO [39] verilerine göre dünyada havuç ve şalgam üretimi 27 225 451 ton olup, bu üretimin 641 95 32 tonu Türkiye’de gerçekleştirilmektedir. Bu üretimin çok büyük bir kısmının turuncu havuç olduğu ve siyah havuçların özellikle batı toplumları tarafından çok iyi bilinmediği belirtilmektedir. Siyah veya mor havuçların turuncu havuçlardan daha eski bir tarihi olmasına rağmen, bu havuçlar geleneksel olarak sadece Türkiye, Afganistan, Mısır, Pakistan, Hindistan ve Uzak Doğu’da üretilmektedir [40].

Siyah havuç, yüksek düzeyde antosiyanin içermesi nedeniyle gıda boyası elde etmek için son derece uygun bir kaynaktır. Siyah havuç üzerinde yapılan çalışmalar toplam antosiyanin içeriğinin çok geniş bir aralıkta yer aldığını ortaya koymaktadır. Nitekim yapılan bir çalışmada antosiyanin miktarı 1 mg ile 98 mg/100 g taze ağırlık [40]. olarak belirtilirken, bir diğer çalışmada ise siyah havucun 175 mg/100 g taze ağırlığa kadar antosiyanin içerebileceği belirtilmektedir [2]. Gizir ve ark. [40], 1 g kuru siyah havucun 7.63 mg monomerik antosiyanin içerdiğini belirlemişlerdir. 15 siyah havuç çeşidinin antosiyanin kompozisyonunun belirlendiği bir çalışmada ise farklı havuç çeşitlerinin antosiyanin içeriklerinin 45.4 mg/kg ile 17.4 g/kg kuru ağırlık arasında değiştiği rapor edilmiştir [40].

Siyah havuç antosiyaninleri mono asillenmiş yapıda olup, gıdaların doğal pH derecelerinde rengini korumakta ve antioksidan aktivitesini arttırmaktadır [42; 43]. Yine siyah havuçlardan izole edilen antosiyaninler antioksidan aktiviteye sahip olduklarından, renklendirme amacıyla gıdaya ilave edildiklerinde gıdanın besleme kalitesini de arttırmaktadır [40].

Siyah havuçların en önemli antosiyaninleri arasında siyanidin-3-galaktozit-ksilozid-ferulik asit, siyanidin-3-galaktozit-ksilozid, siyanidin-3-galaktozit-ksilozid-glikozit-kumarik asit, siyanidin-3-galaktozit-ksilozid-glikozit-sinapik asit ve siyanidin-3-galaktozit-ksilozid-glikozit yer almaktadır [5]. Yapılan bir çalışmada siyah havuçta siyanidin-3-ksilosil-galaktozit %44.1, siyanidin-3-ksilosil-glikozil-galaktozit %14.9, siyanidin-3-ksilosil-glikozil-galaktozitin sinapik asitle asillenmiş formu %27.5, ferulik asitle asillenmiş formu ise %13.5 olarak belirlenmiştir [68]. Özellikle asidik pH değerlerinde parlak çilek kırmızısı rengi veren siyah havuç ekstraktları meyve suları ve nektarlarının, alkolsüz içeceklerin, reçellerin, jölelerin, pasta ve şekerlemelerin renklendirilmesinde kullanılmaktadır [69].

2.3.2. Kırmızı lahanana

Brassicaceae familyasına dahil bir sebze olan kırmızı lahananın (*Brassica oleracea* L. var. *capitata* f. *rubra*) tüm dünyada 3.1 milyon hektar alanda 68 milyon ton üretimi gerçekleştirilmektedir [43]. FAO [39] verileri, Türkiye’de *Brassica* familyasına dahil olan sebzelerin yaklaşık olarak 650 bin ton üretildiğini ortaya koymaktadır.

Lahananın gıda olarak tüketiminden önce gut, diare, peptik ülser ve baş ağrılarının tedavisinde kullanıldığı aktarılmaktadır. Sonrasında yapılan epidemiyolojik çalışmalar lahananın kalp damar hastalıkları ile bazı kanser çeşitleri üzerine de etkili olduğunu ortaya koymaktadır. Bu etki, kırmızı lahananın polifenolik bileşiminden ve bu grupta çok geniş bir yer tutan antosiyanin içeriğinden kaynaklanmaktadır [43].

Kırmızı lahanana antosiyaninlerinin iki farklı şeker grubuyla glukozilasyonu ve farklı aromatik ve alifatik asitlerle asilasyonu nedeni ile antosiyanin profilleri son derece kompleksir. Lahanaların antosiyanin profillerinde, siyanidin-3,5-diglikozit ve siyanidin-3-sofhorosit-5-glikozitin sinapik asit, ferulik asit, kafeik asit, *p*-kumarik asit

ve malonik asit ile asillenmiş yapıları yaygın olarak bulunmaktadır [70]. Tüm meyve ve sebzeler arasında antosiyanin profili en zor belirlenen bitki grubunun kırmızı lahana olduğu bildirilmektedir [43]. Bunun başlıca nedeni de referans bileşiklerinin ticari olarak temin edilememesidir [43; 44].

Kırmızı lahananın taze ağırlık üzerinden toplam fenolik madde içeriğinin 101.30 mg/100 g [71], antosiyanin içeriğinin ise 69-94 mg/100g düzeyinde olduğu belirtilmektedir [18]. Kırmızı lahanaların biyoaktif bileşiminin çeşit, iklim, yetiştirme koşulları gibi farklı etkenlere bağlı olması nedeni ile antosiyanin bileşiminde de farklılıklar görülebilmektedir. Nitekim bir diğer çalışmada antosiyanin içeriğinin 25 mg/100 g düzeyinde belirlendiği aktarılmaktadır [72]. Kırmızı lahananın antosiyanin içeriğinin 756 mg/kg taze ağırlık olarak belirlenmiş olduğu bir diğer çalışmada, başlıca antosiyaninlerin siyanidin 3-(6-sinapyl)-sofhorozit-5-glikozit ve 3-(6-sinapyl)-sofhorozit-5-(6-sinapyl)-glikozit olduğu saptanmıştır [73]. Bir diğer çalışmada ise kırmızı lahanalarda 9'u yeni olmak üzere toplam 24 farklı antosiyanin tespit edildiği bildirilmektedir. Antosiyaninlerin hepsinin aglikon olarak siyanidin içerdiği belirlenmiş olup, siyanidin mono ve/veya di-glikozitleri, aromatik ve alifatik asitlerle asillenmiş veya asillenmemiş olarak bulunduğu saptanmıştır [43]. Giusti ve Wrolstad [15], yaptıkları çalışmalarında siyanidin-3-glikozit-5-glikozitin mono ve diasillenmiş formlarından oluşan 9 farklı antosiyanin belirlemişlerdir. Bir diğer çalışmada ise kırmızı lahanada 18 farklı antosiyanin belirlenmiş olup, bunların da benzer şekilde siyanidin-3-glikozit-5-glikozitin *p*-kumarik, kafeik, ferulik ve sinapik asit ile monoasillenmiş ve diasillenmiş formlarının başat antosiyaninler olduğu saptanmıştır [74].

Hafif asidik ortamlarda kırmızı lahanada bulunan çift asillenmiş antosiyaninler sıcaklık ve ışığa karşı son derece stabil olup, ürünün renk kalitesini korumaktadır. Antioksidatif özellikleri aynı tür içerisinde kültivasyona bağlı olarak değişebilmektedir [44]. Kırmızı lahananın C vitamini ve α -tokoferol içerikleri sırası ile 24.38 mg/100 g ve 0.261 mg/100 g iken, β -karoten ve lutein içerikleri ise sırası ile 0.044 mg/100 g ve 0.046 mg/100 g olarak belirlenmiş ve elde edilen bulgular, kırmızı lahananın son derece güçlü bir antioksidan olduğunu ortaya koymaktadır [71].

Gıda boyası olarak kullanılan kırmızı lahananın istenmeyen kokusunu gidermek için ekstraktlar polimerik reçinelerden geçirilmekte veya anyon değiştirmeye tabi

tutulmaktadır [18]. Yine elde edilen antosiyaninlerin stabilizasyonunlarını arttırmak amacıyla da flavonol, suda çözünür antioksidanlar, fosfatlar, anyonik pigmentler, şeker ilavesi ve suda çözünür flavonoid glikozitleri ile kopigmentasyon uygulamaları gerçekleştirilmiştir [18]. Kırmızı lahanadan elde edilen renk maddeleri içecekler, şekerlemeler, toz gıdalar, sakızlar, yoğurt ve sosların renklendirilmesi amacıyla kullanılmaktadır. Berrylerden elde edilen renk pigmentlerinin çoğunun aksine kırmızı lahana ekstraktları, asidik gıdaların yanı sıra nötral gıdalarda da başarı ile kullanılabilir. Nitekim kırmızı lahana ekstraktlarının mavi renkli sentetik boyalara iyi bir alternatif olduğu aktarılmaktadır [45].

Dyrby ve ark. [70] yaptıkları bir çalışmada, kırmızı lahana ekstraktlarındaki antosiyaninlerin tampon çözelti ve gazsız içecek model sistemlerinde 25, 40, 60 ve 80°C sıcaklıklardaki ısıl stabilitesi Frenk üzümü, siyah üzüm ve elderberry ekstraktlarındaki antosiyaninlerin stabilitesi ile kıyaslamışlardır. İncelenen ortamlarda antosiyaninlerin degradasyonunun birinci derece reaksiyon kinetiğine uyduğu ve antosiyanin stabilitesinin içecek model sistemlerde kırmızı lahana > Frenk üzümü > siyah üzüm > elderberry şeklinde sıralandığı belirtilmektedir. Kırmızı lahananın renk pigmentlerinin renk karakteristikleri ve yüksek stabilitesi geniş ölçekli asilasyonları ile açıklanmaktadır [18].

2.4. Antosiyanin Ekstraksiyonunda Kullanılan Farklı Teknik Uygulamaları

Antosiyaninlerin ekstraksiyonunda en çok kullanılan yöntem solvent ekstraksiyonudur [12]. Bununla birlikte, son yıllarda ekstraksiyon uygulamalarında farklı tekniklerin etkileri üzerine çalışmalar yapılmaktadır. Bu kapsamda klasik ekstraksiyonun yanında vurgulu elektrik alan (pulsed electric field, PEF) ve 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 [41; 75]. 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 [75].

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 [75].

2.4.2. Vurgulu elektrik alan (Pulsed Electric Field, PEF)

PEF uygulaması, 2 elektrot arasına yerleştirilen gıda maddelerine kısa sürelerde (1-100 μ s) yüksek voltajlı elektrik uygulaması (10-50 kV/cm) ile gerçekleştirilen bir işlemdir [76]. Ekstraksiyon işleminde hücre zarlarının fiziksel, kimyasal veya biyolojik işlemlerle parçalanması son derece önemlidir. Taze gıda maddeleri üzerinde gerçekleştirilen elektrik uygulamalarına “elektroplasmoliz” veya “elektropermeabilizasyon” adı verilmektedir. Bu metot, elektrik alan uygulamasına bağlı olarak hücre zarlarında oluşan porların (elektroporasyon) büyümesi temeline dayanmaktadır [77]. PEF uygulamalarının gıdaların renk, flavor ve antosiyanin gibi biyoaktif özelliklerini olumsuz bir şekilde etkilemeksizin, mikroorganizmalar ve enzimler üzerinde etkili olduğu belirtilmektedir [32].

PEF uygulamalarında elektrotlar arasına yerleştirilen materyalin üniform yapıda olması ve sıkıca yerleştirilmesi önem taşımaktadır. Aşırı miktardaki yüksek iletken sıvılar (kesme sırasında hücre zararlanması sonucu açığa çıkan) ve ekstra partiküller elektrik enerjisi kaybını arttırmaktadır. Ayrıca, dışsal nem miktarının az olması halinde de katı partiküllerle temas olmaması nedeniyle PEF uygulamalarının etkinliği azalmaktadır [77].

PEF uygulamaları, ısı artışının az olması, hücre zarlarının mikro düzeyde ve etkin bir şekilde parçalanması ve işlem maliyetinin düşük olması gibi avantajlara sahiptir. Bu özellikleri nedeni ile de PEF son yıllarda dikkatleri üzerine çekmektedir [27; 28]. PEF işleminin 15-80 kV/cm elektrik alan şiddetinde, 1-100 arasındaki vurgu sıklığı ve 1-100 μ s süreyle uygulanması halinde bakteriler ve enzimlerin inaktivasyonu için yeterli bir işlem olduğu bildirilmektedir [29]. Son yıllarda PEF uygulamalarının gıdaların vitamin [78; 79; 80; 81;], protein [82] ve enzim [83; 84; 85; 86]. içerikleri üzerine olan etkileri üzerinde yapılan araştırmaların sayısı da giderek artmaktadır.

Farklı hücrelerin farklı elektrofiziksel ve morfolojik yapıları sahip olmalarına rağmen, elektrik uygulamaları karşısında benzer zararlanmalara maruz kaldıkları belirtilmektedir [87]. PEF uygulamasının, kompleks fenolik moleküllerin gıda içeriği ve gıda matriksinde bulunan diğer bileşiklerle etkileşimi konularında çok az bilgi bulunmaktadır. Fenolik bileşiklerin bazıları meyvelerin renklerinden sorumlu olduklarından, renk tayini özellikle yüksek miktarda antosiyanin içeren gıdalar için PEF uygulaması etkinliğinin belirlenmesinde iyi bir ayıraç olarak kullanılabilir. Örneğin, Cranberry sularına 150 μ s süreyle 40 kV/cm düzeyinde PEF uygulamanın örneklerin rengine önemli bir değişim yapmadığı belirtilmektedir [88]. PEF uygulamalarının, ahududuların başat antosiyanini olan siyanidin-3-glikozitin depolama stabilitesi üzerine etkili olmadığı belirlenmiştir [89]. PEF, antosiyaninlerin depolama stabilitesini etkilemezken, üzüm suyu üretiminde ön işlem olarak uygulanması halinde antosiyanin konsantrasyonunu arttırdığı belirtilmektedir [32].

Sanchez-Moreno ve ark. [90], 750 μ s 35 kV/cm'de 4 μ s bipolar vurgusundaki PEF uygulamasının portakal suyunun flavon içeriğinde önemli bir değişiklik oluşturmadığını belirlemişlerdir. Corrales ve ark. [26], yaptıkları çalışmada üzüm posasında PEF, ultrasonik ve yüksek hidrostatik basınç uygulamalarını ticari ekstraksiyonla (kontrol grubu) karşılaştırmışlardır. PEF ve ultrasonik ekstraksiyon ile ekstrakte edilen örneklerin antioksidan aktivitelerinin kontrol grubuna kıyasla sırasıyla 4 ve 2 kat daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Antosiyanin monoglikozitlerinin ekstraksiyonunda PEF uygulamasının daha iyi sonuçlar verdiği belirlenmiştir. Yüksek ekstraksiyon oranlarının uygulama sırasında meydana gelen elektroporasyona bağlı olabileceği aktarılmaktadır [91].

Gavhovska et al., [92], tarafından kırmızı lahanaya PEF (elektrik alan şiddeti 2.5 kV/cm, vurgu aralığı 15 μ s, vurgu sayısı 50, spesifik enerji 15.63 J/g) uygulanarak antosiyanin ekstraksiyonunun gerçekleştirildiği bir çalışmada solvent olarak su kullanılmıştır. Sonuçta PEF uygulanan örneklerin toplam antosiyanin miktarlarının, kontrol örneklerinden 2.12 kat daha fazla olduğu tespit edilmiştir (16-889 μ g/mL). PEF uygulanmış örneklerin ısı ve ışık stabilitelerinin ise kontrol örneklerinden farklı olmadığı belirtilmektedir.

2.4.3. Ultrasonik ekstraksiyon

Saniyede 20.000 veya daha fazla titreşimde dalga boyu oluşturan enerji ultrason olarak tanımlanmaktadır [33]. Yüksek frekanslı bir ses dalgasının mekanik titreşimleri yoğunlaştırıldığında, sıkışma ve genişleme hatları arasında yüksek bir basınç farkı olmaktadır. Sıkışmaya dayanıklı olan sıvı, basıncın hızla düşmesi ile meydana gelen genişleme sırasında milyonlarca mikroskobik boşluk üretmekte ve bu boşluklar gaz ve buhar ile dolarak kabarcık haline gelmektedir. Bu haliyle de etkili olabilen kabarcıklar patladığında ise büyük bir enerji açığa çıkmaktadır. İşte ultrasonun hava kabarcıkları oluşturma özelliğine ‘kavitasyon’ adı verilmektedir [93]. Ultrason kurutma, filtrasyon, mikrobiyal inaktivasyon ve enzimatik inhibisyon gibi farklı amaçlarla gıda sanayinde kullanılmıştır [94]. Son yıllarda ise ultrason uygulaması; protein, antosiyanin, tartarik asit, aroma bileşenleri ve polisakkaritler gibi çok farklı bileşenlerin ekstraksiyonunda uygulama alanı bulmuştur [35].

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 solvente daha kolay geçerek etkili olmaktadır [34].

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 [93].

Bu çalışmada siyah havuç ve kırmızı lahana farklı ekstraksiyon yöntemleri (klasik ekstraksiyon, PEF 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 inoküle 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 ABE'ların yanı sıra stabil bir boya olan karminle de renklendirilerek, elde edilen renk maddelerinin 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 ABE'lar ile renklendirilerek, 90°C'deki ısıl stabiliteleri belirlenmeye çalışılmıştır. Benzer şekilde bir grup elma suyu da ABE'lar 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

Bu çalışmada antosiyanin kaynağı olarak kullanılan siyah havuç ve kırmızı lahananın temin edilmesi ve çalışma süresince muhafaza şartları aşağıda verilmiştir:

Siyah Havuç (*Daucus carota* ssp. *Sativus* var. *atrorubens* Alef) Konya Ereğli piyasasından temin edilmiş ve laboratuara üzerinde havalandırma delikleri bulunan 25'er kilogramlık poşetler halinde getirilmiştir. Yıkayıp kurulan havuçlar laboratuvar tipi bir mutfak robotu (BEKO Robokit 2154, Türkiye) ile öğütülerek, analiz edilinceye kadar 500 gramlık buzdolabı poşetleri içerisinde -40°C sıcaklıktaki derin dondurucuda (Hettich Freezer, Almanya) muhafaza edilmiştir.

Kırmızı Lahana (*Brassica oleracea* L. var. *capitata* f. *rubra*) Kayseri'nin Yemliha Beldesi'nden temin edilmiştir. Ticari kasalarla laboratuara getirilen lahanaların en dış yaprakları uzaklaştırılmış ve musluk suyu ile yıkayıp kurulandıktan sonra yine aynı mutfak robotu yardımı ile öğütülmüştür. Örnekler analiz edilinceye kadar 500 gramlık ambalajlar içerisinde -40°C sıcaklıktaki aynı derin dondurucuda 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. Antosiyanin kaynaklarında yapılan analizler

3.2.1.1. Antosiyanin bazlı ekstrakt elde edilen materyallerin niteliklerinin belirlenmesi

Siyah Havuç: Çalışma kapsamında temin edilen siyah havuçlardan rastgele 15 adet örnek seçilerek, havuçların ağırlıkları ve boyları belirlenmiştir. Ayrıca örneklerin iki farklı yerinden bir kumpas (SR44 digital, Çin) yardımı ile çap ölçümleri yapılmıştır.

Kırmızı Lahana: Kırmızı lahanalardan rastgele 10 adet örnek seçilerek, lahanaların ağırlıkları ve boyları belirlenmiştir. Ayrıca uç ve orta kısımlarından kumpas ile çap ölçümleri yapılmıştır.

3.2.1.2. Kuru Madde

Projede kullanılan antosiyanin kaynaklarının herbirinde 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 [95].

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

%KM : Örneğin kuru madde yüzdesi

G : Tartım kabının darası

G₁ : Örnek + tartım kabının darası

G₂ : Kurutma sonrası kuru örnek + tartım kabının darası

3.2.1.3. Kül miktarı tayini

Hammaddelerin kül miktarı AOAC 940.26 No'lu metoda göre yapılmıştır [96]. 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

3.2.1.4. 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 antosiyanin bazlı renk maddesi elde edilecek hammaddeler üzerine az miktarda damıtık su eklenmiş ve pH değerleri saptanmıştır [95].

3.2.1.5. 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 hesaplanırken, siyah havuç ve kırmızı lahanada susuz sitrik asit cinsinden belirlenmiştir [95].

3.2.1.6. 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 tablodan 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 [95].

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

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 ABE 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 ve vurgulu elektrik alan (pulse electric field= PEF) teknikleri olmak üzere 3 farklı ekstraksiyon yöntemi kıyaslanmıştır. PEF uygulamasında dokunun sağlam olması gerektiğinden, üzüm kabuklarında PEF uygulaması gerçekleştirilememiştir. PEF işleminde asitlendirilmiş etanol:su uygulamasının elektrik

geçirgenliği üzerindeki etkisini tahmin edemememiz nedeni ile sadece saf su ile ekstraksiyon yapılırken, ultrasonik ve klasik ekstraksiyonlarda saf suyun yanı sıra %0.1 oranında HCl ile asitlendirilmiş etanol: su (1:1) karışımı da çözügen olarak kullanılmıştır.

Siyah havuç ve kırmızı lahana örnekleri yaklaşık olarak 2 x 1 x 1 mm büyüklüğünde özenle doğranmışlardır. Bu şekilde hazırlanan homojen örneklemelerden örnekler alınarak ekstraksiyon işlemi gerçekleştirilmiştir.

3.2.2.1. Klasik ekstraksiyon uygulamaları

Klasik ekstraksiyon uygulamaları Ersus ve Yurdagel [97]'in metodunda bazı modifikasyonlar yapılarak gerçekleştirilmiştir. Donmuş haldeki havuç ve lahana örnekleri buzdolabı (Vestel, Türkiye) sıcaklığında 12 saat süreyle çözündürüldükten sonra ekstraksiyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Örneklerden antosiyanin pigmentlerinin ekstraksiyonu için çözügen 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:çözügen oranı 1:4 olacak şekilde ayarlanmıştır. 50 g örnek üzerine 50 mL çözügen 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 çözügen tamamen uzaklaştırılncaya kadar kurutulmuştur.

Tüplere alınan kurutulmuş ekstraktların üzerine azot gazı basılarak, oksijenden ileri gelebilecek olumsuz etkilerin önlenmesi sağlanmış ve ekstraktlar kullanılıncaya 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 örneklerle ilave edilmesi gereken

miktarlar tartılmış ve antosiyanin bazlı ekstraktların (ABE) örneklere homojen bir şekilde karışması sağlanmıştır.

Ancak, özellikle PEF ve ultrason uygulamalarının ekstraksiyon etkinliklerinin kıyaslanması amacıyla parçacık büyüklüğü önem taşımaktadır. Bu nedenle ekstraktların biyoaktif özelliklerinin belirlenmesi amacı ile yapılan klasik ekstraksiyon uygulamalarında da siyah havuç ve kırmızı lahana örnekleri yaklaşık olarak 2 x 1 x 1 mm büyüklüğünde doğranmışlardır. Ekstraksiyon işlemi bu şekilde hazırlanan homojen örneklerde gerçekleştirilmiştir.

3.2.2.2. Vurgulu elektrik alan uygulamaları (PEF)

Vurgulu elektrik alan uygulamasında taze haldeki siyah havuç ve lahana örnekleri “paralel plate tipi” olarak adlandırılan elektrotlara (BTX Caliper electrode) yerleştirilerek işlem gerçekleştirilmiştir. Uygulamada PEF jeneratörü (BTX 830, ABD) kullanılmıştır. Örneklere 3 kV/cm elektrik alan şiddetinde, genişliği 10 µs olan 99 adet vurgu uygulanmış olup, vurgular arası mesafe 100 µs tutulmuştur. Uygulamada yukarıda bahsedildiği gibi hazırlanan örneklerin kesme sırasında dokularından dışarı sızan maddeler, elektrik geçirgenliğini etkilememesi için saf su ile yıkanarak uzaklaştırılmıştır. Yıkama suyu tamamen uzaklaştırıldıktan sonra 2 g örnek küvete (0.5 cm aralık, boy 2 cm ve yükseklik 1 cm) yerleştirilerek, üzeri tamamen suyla kaplanmıştır. İşlem yeterli ekstrakt çıkarılınca kadar tekrarlanmıştır. Uygulamanın sonunda örnekler süzülerek, filtrat ayrılmıştır. Katı parçacıkların üzerine örnek:çözgen oranı 1:4 olacak şekilde saf su ilavesi yapıp, 35°C sıcaklığa ayarlanmış olan çalkalamalı su banyosunda 2 saat süreyle ekstraksiyon işlemine devam edilmiştir. Süre bitiminde örnekler 4 katlı tülbentten geçirildikten sonra vakum altında önce adi filtre kağıdından ardından da Whatman No 1’den süzülmüştür. Her iki filtrat birleştirildikten sonra rotary evaporatörde 60°C’de çözgen tamamen uzaklaştırılarak, kuru ekstrakt elde edilmiştir.

3.2.2.3. Ultrasonik ekstraksiyon uygulaması

Chen et al. [98]’nin metodunda bazı modifikasyon yapılarak ultrasonik ekstraksiyon uygulaması gerçekleştirilmiştir. Homojen hale getirilen örneklerden örnek:çözgen oranı

1:2 olacak şekilde ekstraksiyonda kullanılan çözügen 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 çözügen 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 çözügen 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.

3.2.3. Farklı ekstraksiyon yöntemleri ile elde edilen ekstraktların bazı biyolojik özelliklerinin belirlenmesi

Araştırma kapsamında antosiyanin kaynağı olarak kullanılan siyah havuç ve kırmızı lahanalardan 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

ABE'ların toplam fenolik madde içeriği Singleton ve Rossi [99], tarafından verilen metotta bazı modifikasyonlar yapılarak tespit edilmiştir. Bu amaçla ekstraktlar seyreltilirken ekstraksiyon aşamasında kullanılan çözügenler dikkate alınarak, su ekstraktları su ile AES kullanılarak elde edilen ABE'lar 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 ayracı (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. Hesaplama 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 [100]. Antosiyanin miktarları tüm örneklerde, siyanidin 3-glikozit cinsinden belirlenmiştir (MW=449.2, molar absorpsiyon, $\epsilon=26.900$). Örneklerin antosiyanin miktarları aşağıda verilen formüle göre hesaplanmıştır [101].

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

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

ϵ : Molar absorpsiyon

L : Absorbans ölçüm küvetinin tabaka kalınlığı, cm

MW : Molekül ağırlığı

SF : Seyreltme faktörü

3.2.3.3. Antiradikal kapasite tayini

Farklı yöntemlerle elde edilen ABE'lerin antiradikal aktivite tayinleri Brand-Williams [102], tarafından verilen yöntemde bazı modifikasyonlar uygulanarak yapılmıştır. Stabil bir serbest radikal olan DPPH (2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) radikali antiradikal ajanlarla reaksiyona girdiğinde serbest elektronu eşlenmekte ve örneğin mor rengi sarıya dönmektedir. Bu reaksiyon absorbans değerlerinde azalma olarak belirlenmektedir. 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:

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

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

$A_{\dot{O}}$: Örneğin absorbansı

A_K : Kontrolün absorbansı

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

3.2.3.4. Antioksidan aktivite tayini

ABE'ların antioksidan aktivite tayini Prieto ve ark. [103]'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 antosiyanin bazlı ekstraktların antimikrobiyal aktivitelerinin belirlenmesi

Antimikrobiyal aktivite denemeleri agar difüzyon yöntemi ile yapılmıştır [104]. 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 aşılanarak 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 [104; 105].

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

Elma sularında ABE’ların *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 3 kısma ayrılmış ve birinci gruba SHE, ikinci gruba KLE’ndan 4 mg antosiyanin/100 mL elma suyu konsantrasyonunda ekstrakt ilavesi yapılarak renklendirilmişlerdir. Üçüncü 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 ABE (SHE’ndan 1.20 g ve KLE’ndan 0.50 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 [106]. 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 ısıtma işlemi 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 ABE (SHE’ndan 1.20 g ve KLE’ndan 0.50 g kuru ekstrakt) ilaveleri yapılmıştır. SHE ve KLE 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 ısıtma işlemi maruz bırakıldıktan sonra antosiyanin miktarları pH- diferansiyel yöntemiyle belirlenmiştir.

ABE’larla 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 ABE’ların ısıtma sırasındaki degradasyon reaksiyonlarının birinci derece kinetik modele uygun oldukları daha önce yapılan çalışmalarda belirlenmiştir [70; 106; 107]. 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 [21].

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

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

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 [21].

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

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 [21; 107].

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

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 [21].

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

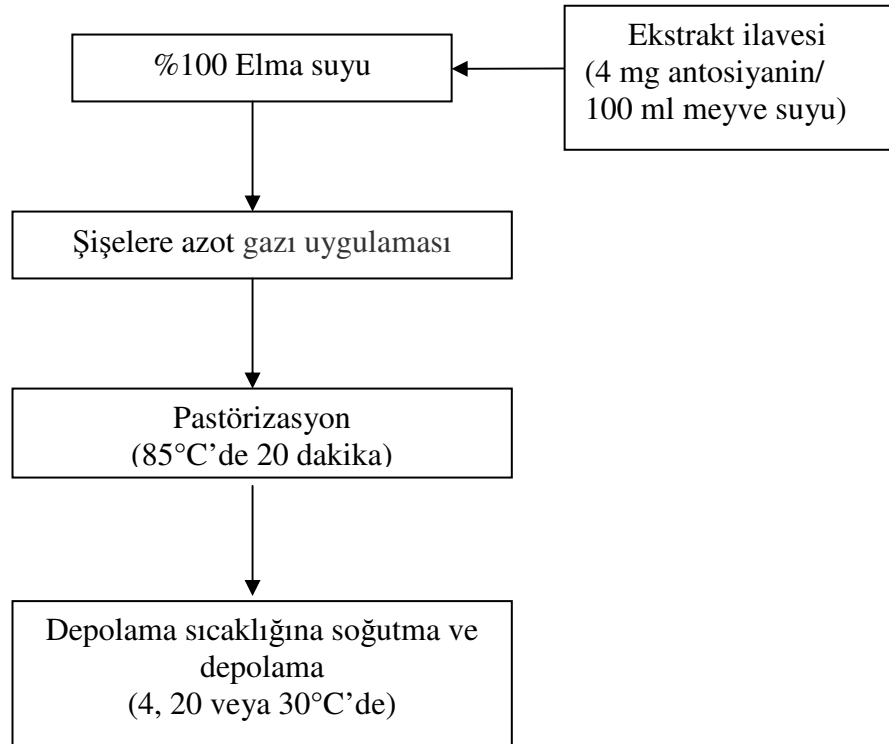
Yarılanma süresi, incelenen bileşiğin %50'sinin kaybolması için gereken süre olup, birinci derece kinetik modele göre gelişen reaksiyonlar için 3.6. No'lu eşitlik baz alınarak hesaplanmıştır [21].

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

3.2.5. Renklendirilen gıdalarda yapılan analizler

3.2.5.1. Elma Suyu

Yapılan ön denemeler sonucunda duysal olarak en çok beğenilen örneklerin her üç antosiyanin kaynağı için de 100 mL elma suyuna 4 mg antosiyanin içeren ekstrakt ilavesiyle elde edildiği belirlenmiştir. Bu nedenle çalışma kapsamında elma sularına ABE'lardan 4 mg antosiyanin/100 mL düzeyinde ilave edilmiştir (SHE'den 1.20 g ve KLE'ndan 0.50 g 0.37 g). 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 bağlı 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 ABE'lar ile renklendirilmiş örneklerin depolama süresince antosiyanin miktarı, toplam fenolik madde içeriği, antioksidan ve antiradikal kapasiteleri belirlenmiştir. Bu örneklerde ayrıca renk tayini ve duyusal analizler gerçekleştirilmiştir. Elma sularında gerçekleştirilen analizler aşağıda kısaca açıklanmıştır.

3.2.5.1.1. Titrasyon asitliği tayini

Çalışma kapsamında kullanılan elma sularının ABE'lar 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 [95].

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

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 [95].

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 [95]. 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, %

$A_{\text{ö}}$: 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

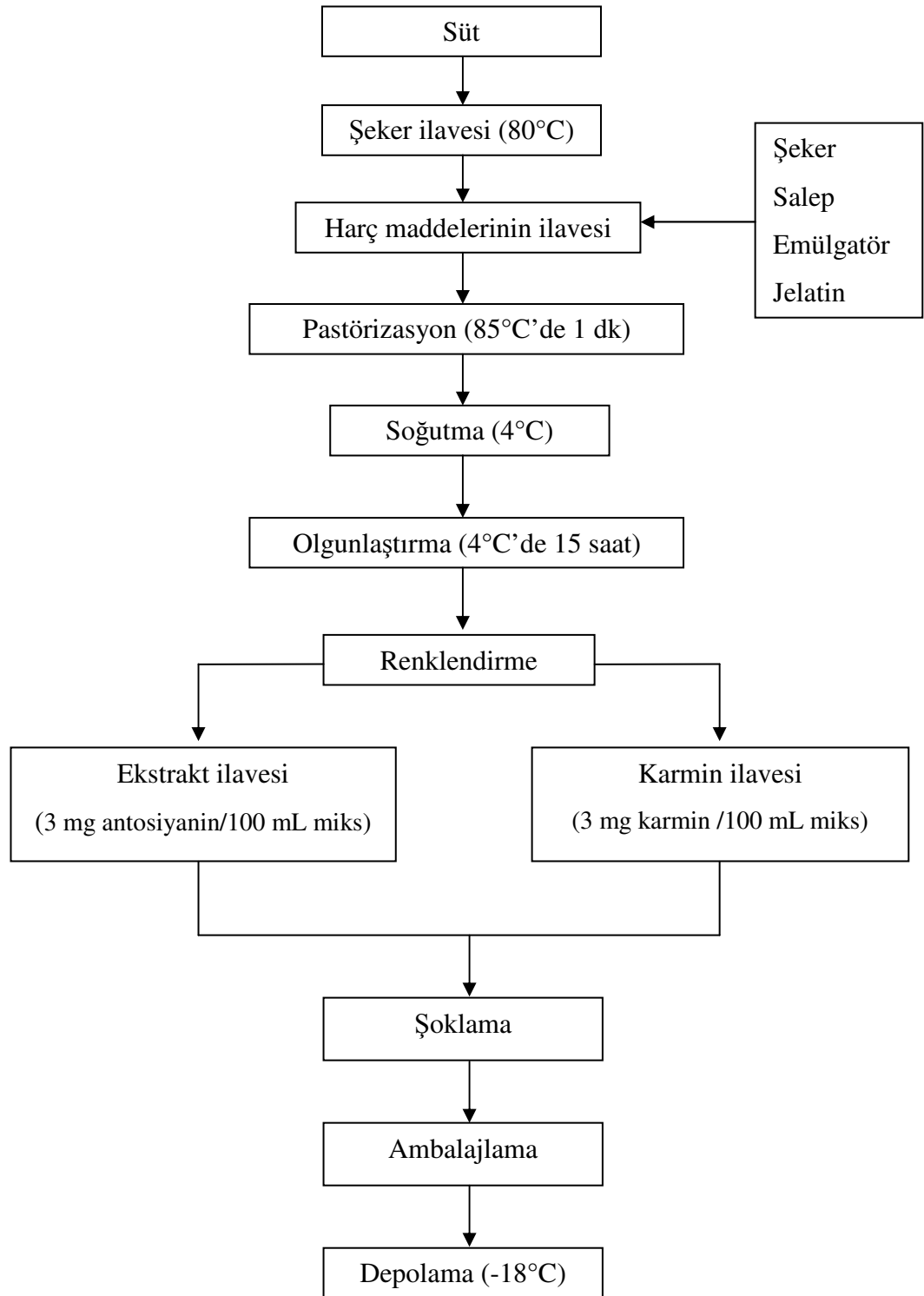
Meyve suyu, dondurma, şekerleme ve çemen örneklerinin renk özelliklerini belirlemede otomatik renk tayin cihazı (Lovibond RT Series Reflectance Tintometer, İngiltere) kullanılmıştır. Cihaz, standart kalibrasyon skalası ile kalibre edildikten sonra örnekler aletin küvetine yerleştirilip L^* , a^* ve b^* 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° = kırmızı-mor, 90° = sarı, 180° = mavimsi-yeşil, 270° = mavi, $360^\circ = 0^\circ$ olup kırmızı-moru göstermektedir [11; 108].

3.2.5.1.9. Duyusal analiz

Çalışma kapsamında meyve suyu, dondurma ve şekerleme (lokum) örneklerine ilave edilen ABE’lerin duyusal kalite üzerine olan etkilerinin belirlenebilmesi için eğitilmiş 6 panelist ile hedonik skala yöntemine göre duyusal analizler yapılmıştır [109]. Çemen örneklerinde yapılan ön denemelerde katılan ekstraktların duyusal anlamda bir değişime neden olmadığı anlaşıldığından, bu örneklerde duyusal analizler yapılmamıştır. Çalışmada örneklerin duyusal farklılıklarının tespit edilmesinde kullanılan form Ek-2’de verilmiştir.

3.2.5.2. Dondurma

Dondurma örnekleri Erciyes Üniversitesi, Safiye Çıkrıkçıoğlu Meslek Yüksek Okulu Araştırma ve Uygulama Merkezi’nde üretilmiştir (Şekil 3.2.).



Şekil 3.2. Standart dondurma üretim akış şeması

Dondurma üretimi, Dogan ve Kayacier [110]'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 4 gruba ayrılmış olup, bunlardan birinci grup içerisine herhangi bir renklendirici madde ilavesi yapılmamış kontrol grubudur. İkinci grup karmin ile renklendirilmiştir. Üçüncü ve dördüncü gruplara ise sırası ile siyah havuç ekstraktı (SHE) ve kırmızı lahana ekstraktı (KLE) ile renklendirilmiştir.

Yapılan ön denemeler sonucunda duyuşal olarak en çok beğenilen örneklerin her üç antosiyanin kaynağı için de 100 mL dondurma miksine 3 mg antosiyanin içeren ekstrakt ilavesiyle elde edildiği belirlenmiştir. Bu nedenle çalışma kapsamında dondurma mikslерinin 100 mL’si 3 mg antosiyanin içeren ekstrakt (SHE’ndan 0.9009 g ve KLE’ndan 0.3778 g) veya standart boya olarak 3 mg karmin ilavesi yapılarak renklendirilmiştir.

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 değeri ve duyuşal beğenileri de incelenmiştir.

3.2.5.2.1. pH tayini

Örneklerin pH değeri, 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 [25].

3.2.5.2.2. Kuru madde tayini

Dondurma örneklerinin kuru madde miktarlarının belirlenmesinde AOAC [111] 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. [112]'nin prosedürü izlenmiştir. Bu amaçla porselen krozeler 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 kalmayınca 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. [25], 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 Na_2CO_3 ilave edilmiştir. Örnekler oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edildikten sonra spektrofotometrede (Varian Cary 100 Conc UV-Visible, Amerika) 735 nm dalga boyunda absorbans değerleri belirlenmiştir.

Hesaplama da 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. [25], 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

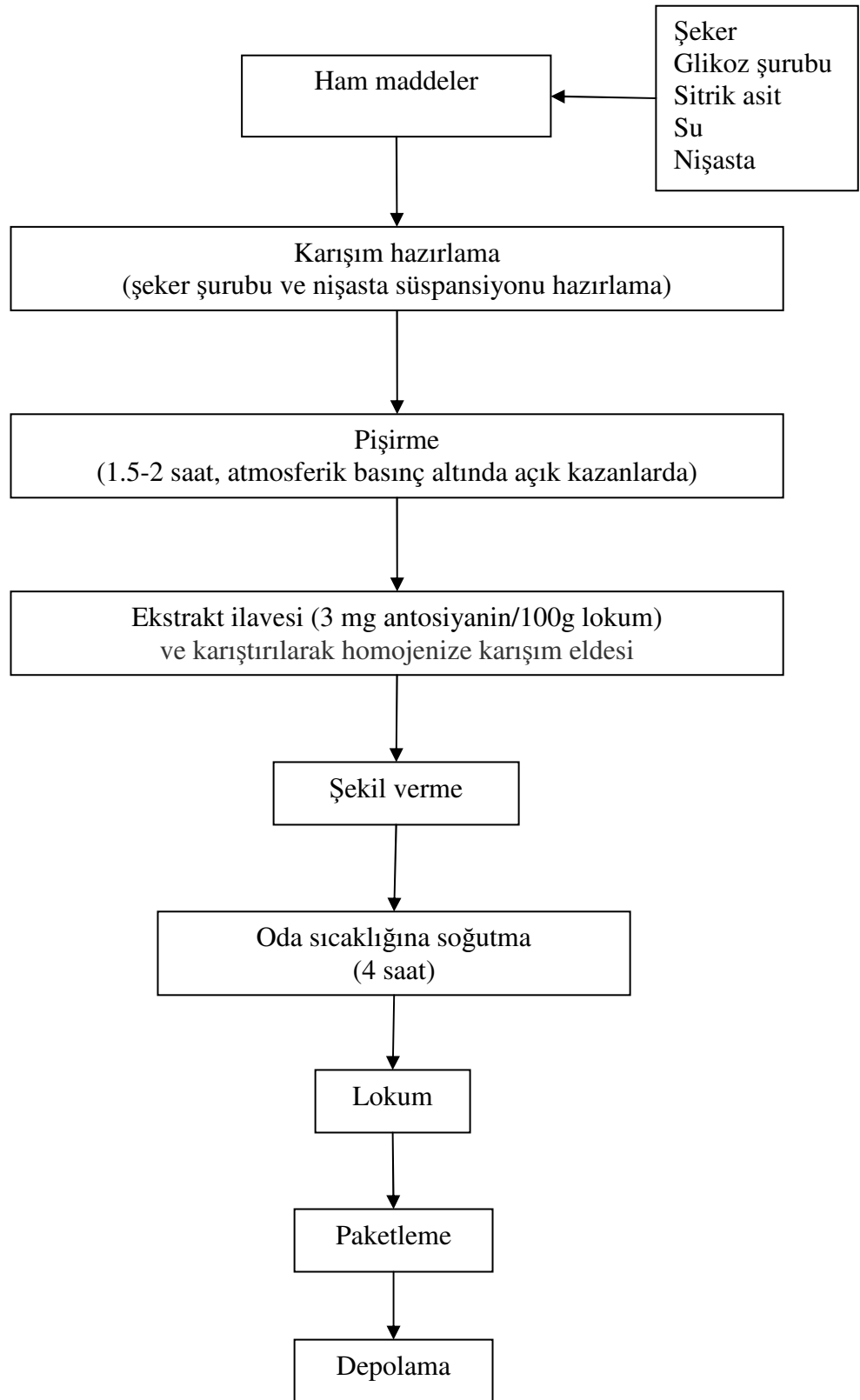
Dondurma örneklerinin renk analizi “3.2.5.1.8. Renk tayini” başlığı altında belirtildiği şekilde yapılmıştır.

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 [113]. (Şekil 3.3.) 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. 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 süspansiyonuna 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 ekstraktlardan SHE'ndan 1.5102 g ve KLE'ndan 0.6351 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 duyusal analizler yapılmıştır.



Şekil 3.3. Standart şekerleme (lokum) üretim akış şeması

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 [114].

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 [95].

3.2.5.3.3. Kül miktarı tayini

Lokum 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 [95].

3.2.5.3.4. Renk tayini

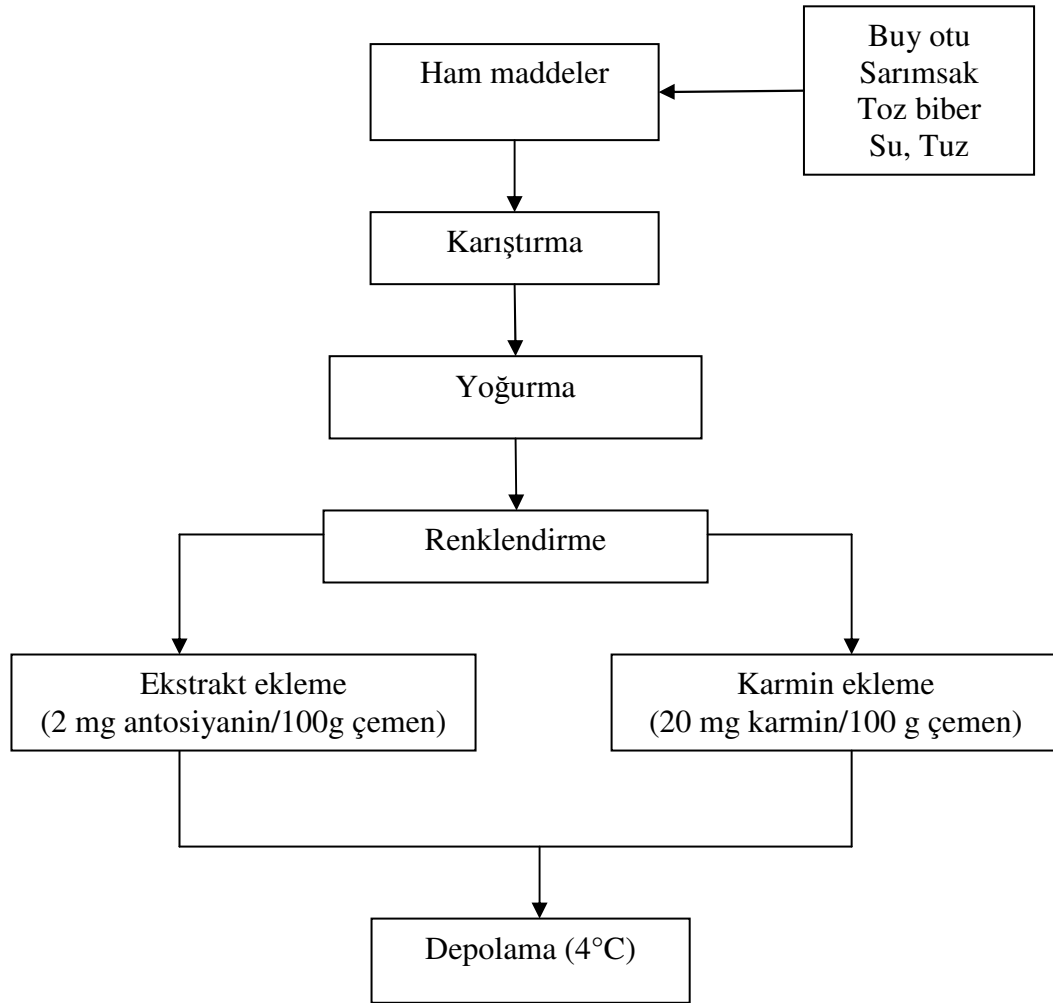
Şekerleme örneklerinin renk analizi “3.2.5.1.8. Renk tayini” başlığı altında belirtildiği şekilde yapılmıştır.

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.* [115]'in 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.).



Şekil 3.4. Standart çemen üretim akış şeması

Yapılan ön denemeler sonucunda 2 mg antosiyanin içeren ABE ilave edilmiş çemen örneklerinin duyuşal olarak en çok beğenilen örnekler olduğu saptanmış ve çalışmada çemenlerin renklendirilmesinde bu konsantrasyon kullanılmıştır. Bu amaçla saf su ile 60° brikse ayarlanan ekstraktlardan SHE'ndan 1.0068 g ve KLE'ndan 0.4234 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 duyuşal anlamda farklılık arz etmemesi nedeni ile

çalışmada duyuşal analiz yapılmamasına karar verilmiş ve bu analiz deneme planından çıkarılarak, depolama süresince sadece renk analizler yapılmıştır.

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 amaçlanmıştı. Ancak, yapılan ön denemelerde çemen örneklerine sitrik asit ilave edilerek pH değerinin 3'e ayarlanması sonucu örneklerin çok ekşi bulunması nedeniyle duyuşal olarak kabul görmediğı 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 [115].

3.2.5.4.2. Kuru madde analizi

Örnekler sabit tartıma gelene kadar 105°C'deki etüvde kurutulmuş ve % kuru madde miktarları belirlenmiştir [115].

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 kalmayınca kadar yakılmış ve örneklerin % kül miktarları belirlenmiştir [95].

3.2.5.4.4. Renk Tayini

Çemen örneklerinin renk analizi "3.2.5.1.8. Renk tayini" başlığı altında belirtildiğı şekilde yapılmıştır.

4. BÖLÜM

ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Materyallerin Nitelikleri

Araştırmada kullanılan antosiyanin kaynaklarının incelemeye alınan bazı özellikleri aşağıda verilmiştir.

Siyah Havuç: Araştırma için alınan siyah havuçlardan rastgele 15 adet örnek seçilerek, bu havuçların ağırlıkları, boy ve iki farklı yerinden çap ölçümleri yapılmıştır (Tablo 4.1.).

Tablo 4.1. Siyah havuçların ağırlık, boy ve çapları

Örnek No	Ağırlık (g)	Boy (mm)	Çap (mm)	
			Alt kısım	Orta kısım
1	155	235	43.51	21.40
2	95	230	33.87	23.32
3	75	205	29.95	19.17
4	140	180	40.81	27.47
5	215	260	46.34	29.37
6	125	200	40.12	25.77
7	135	245	39.77	23.16
8	300	260	55.32	30.96
9	75	180	33.18	18.92
10	175	185	43.25	33.82
11	65	165	30.58	20.89
12	110	170	40.90	23.26
13	110	295	33.33	18.43
14	140	300	40.70	18.32
15	75	248	29.60	18.98
Maksimum	300	300	55.32	33.82
Minimum	65	165	29.60	18.32
Ortalama	132.67	223.9	38.75	23.55

Kırmızı Lahana: Araştırma için laboratuara getirilen kırmızı lahanalardan rastgele 10 adet örnek seçilerek, lahanaların ağırlıkları, boy ve iki farklı yerinden çap ölçümleri yapılmıştır (Tablo 4.2.).

Tablo 4.2. Kırmızı lahanaların ağırlık, boy ve çapları

Örnek No	Ağırlık (g)	Boy (mm)	Çap (mm)	
			Orta kısım	Uç kısım
1	1295	185	146.25	50.13
2	1260	205	126.94	41.98
3	1350	210	152.42	42.59
4	1240	180	136.88	53.62
5	1120	180	130.55	38.42
6	1470	195	138.98	46.57
7	1515	200	139.82	49.31
8	1040	180	125.40	45.75
9	955	155	114.23	50.75
10	1250	195	120.45	42.30
Maksimum	1515.00	210.00	152.42	53.62
Minimum	955.00	155.00	114.23	38.42
Ortalama	1249.50	187.50	133.19	46.14

4.2. Antosiyanin Kaynaklarının Bazı Analitik Özellikleri

Bu araştırmada kullanılan antosiyanin kaynaklarında Tablo 4.3.'te belirtilen diğer bazı analizler yapılarak, materyallerin bazı kimyasal özellikleri ve genel bileşim unsurları belirlenmiştir.

Tablo 4.3. Siyah havuç ve kırmızı lahanaların bazı analitik özellikleri

Analitik özellikler	Siyah havuç	Kırmızı lahana
% Kuru Madde	14.05±0.02	8.15±0.07
% Kül	0.96±0.01	0.77±0.01
% Titrasyon asitliği*	0.16±0.02	0.13±0.00
pH	5.79±0.00	6.26±0.01
% Toplam şeker	7.28±0.03	5.26±0.03
% İndirgen şeker	2.33±0.03	5.00±0.09

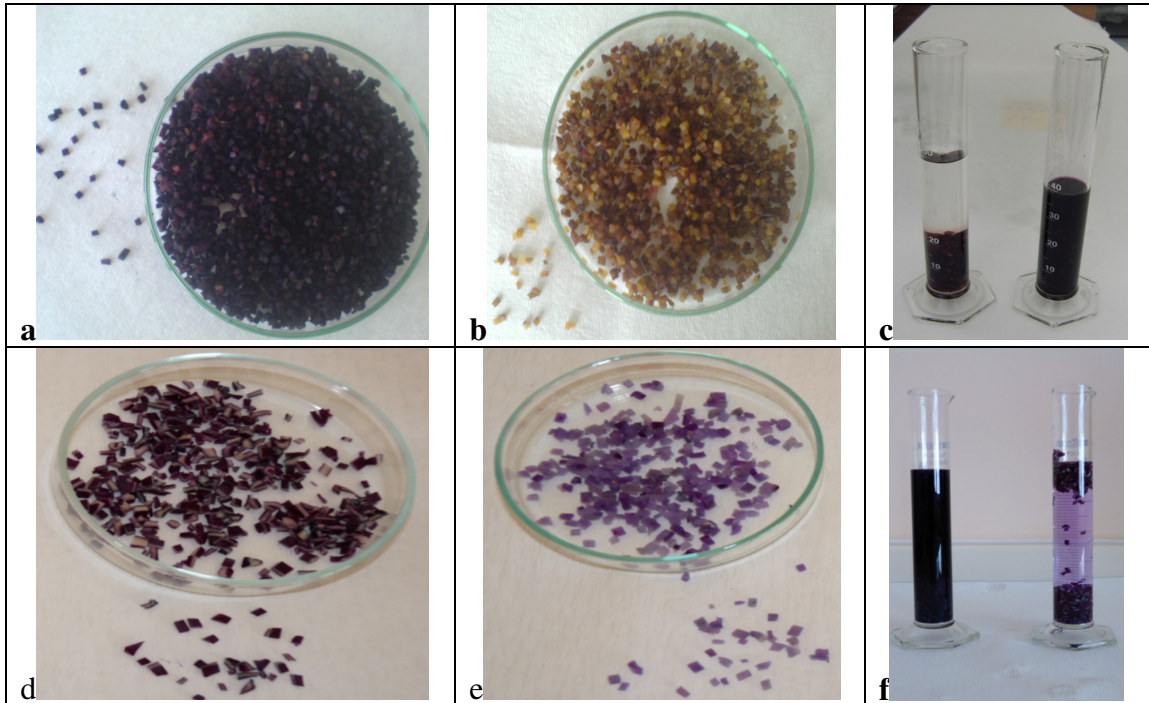
* susuz sitrik asit cinsinden hesaplanmıştır

Örneklerin % kuru madde, % kül, % titrasyon asitliği, pH, % toplam şeker ve % indirgen şeker miktarları arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli ($p<0.05$) olduğu saptanmıştır. Siyah havuç ve kırmızı lahana örneklerinin % kuru madde değerleri sırası ile %14.05 ve %8.15 olarak tespit edilmiştir. Siyah havuçların %7.28 seviyesinde toplam şeker içerdiği belirlenirken, kırmızı lahana örneklerinin %5.26 düzeyinde toplam şeker içerdiği tespit edilmiştir.

4.3. Farklı Ekstraksiyon Yöntemleri ile Elde Edilen Antosiyanin Bazlı Ekstraktların Biyoaktif Özelliklerinin Belirlenmesi

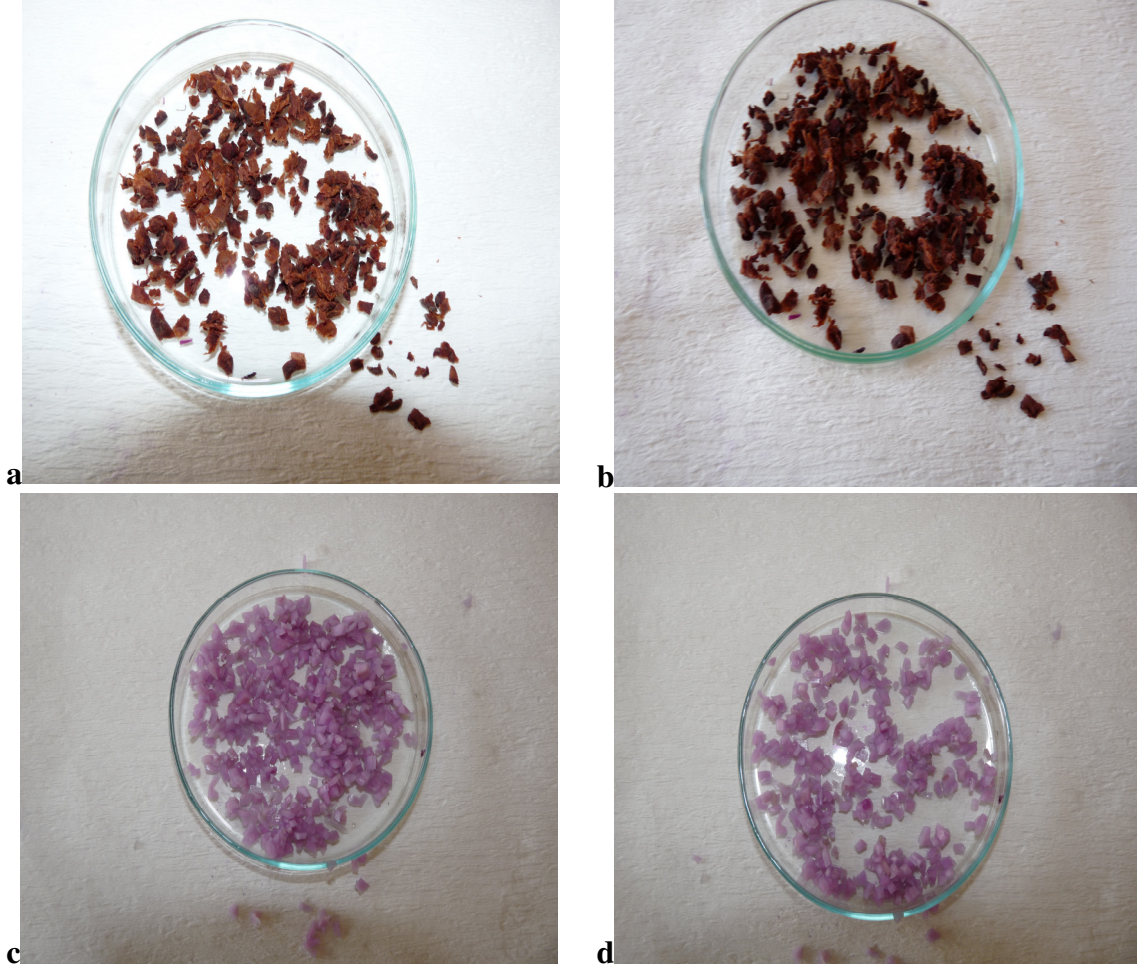
Çalışma kapsamında ABE üretiminde hammadde olarak kullanılan siyah havuç, kırmızı lahana ve üzüm kabuğundan klasik ekstraksiyon yöntemi, PEF ve ultrason teknikleri ile ekstraktlar elde edilmiştir. Bu amaçla çözügen olarak saf su veya AES karışımı kullanılmıştır. PEF uygulamalarında su haricindeki çözügenlerin elektrik iletkenliğini olumsuz etkileyebileceği düşünüldüğünden çözügen olarak sadece saf su kullanılmış ancak ultrason ve klasik ekstraksiyon uygulamalarında da saf su kullanılarak ekstraktlarda çözügen farklılığından kaynaklanabilecek farklar elimine edilmeye çalışılmıştır.

Siyah havuç ve kırmızı lahana örneklerine PEF yöntemi uygulandığında dokularda meydana gelen değişimler Şekil 4.1.'de verilmiştir. Görüldüğü üzere PEF uygulaması ile özellikle siyah havuç örneklerinin ekstraksiyondan sonra kalan posalarının antosiyanin içermediği tahmin edilmektedir. Nitekim rengi kahve-sarı olup, başlangıçtaki renginden son derece farklı olduğu görülmektedir.

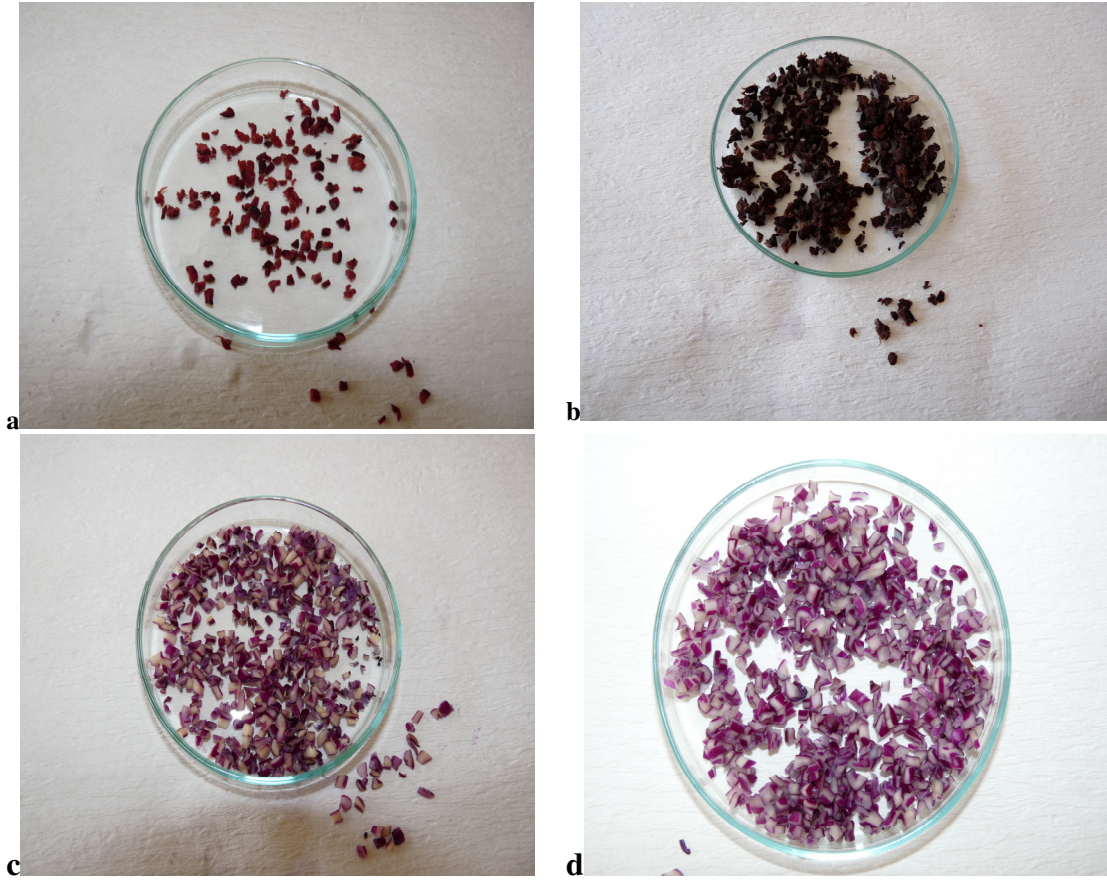


Şekil 4.1. Siyah havuç ve kırmızı lahana örneklerine PEF uygulaması [a) Siyah havucun PEF işleminden önceki hali, b) Siyah havucun PEF uygulanmış hali, c) Sağdaki mezürde PEF uygulaması sonrası elde edilen ekstrakt, soldaki mezürde ise aynı hacimde su ile muamele edilen örnek d) Kırmızı lahananın PEF işleminden önceki hali, b) Kırmızı lahananın PEF uygulanmış hali, c) Soldaki mezürde PEF uygulaması sonrası elde edilen ekstrakt, sağdaki mezürde ise aynı hacimde su ile muamele edilen örnek görülmektedir]

Siyah havuç ve kırmızı lahanalara ultrason ve klasik ekstraksiyon uygulanması ve çözen olarak AES veya sadece suyun kullanılması halinde örneklerin son halleri sırası ile Şekil 4.2.'de ve Şekil 4.3.'te verilmiştir.



Şekil 4.2. Siyah havuç ve kırmızı lahanaların ultrason ve klasik ekstraksiyon yöntemleri ve çözen olarak AES'nin kullanılması halinde arta kalan posalarının görünümü [a) Siyah havuç ultrason, b) Siyah havuç klasik, c) Kırmızı lahanalar ultrason, d) Kırmızı lahanalar klasik ekstraksiyon yöntemleri uygulandıktan sonraki görünimleri]



Şekil 4.3. Siyah havuç, kırmızı lahana örneklerinin ultrason ve klasik ekstraksiyon yöntemleri ve çözgen olarak suyun kullanılması halinde arta kalan posalarının görünümü [a) Siyah havuç ultrason, b) Siyah havuç klasik, c) Kırmızı lahana ultrason, d) Kırmızı lahana klasik ekstraksiyon yöntemleri uygulandıktan sonraki görünümleri]

4.3.1. Farklı ekstraksiyon yöntemleri ile elde edilen antosiyanin bazlı ekstraktların verimleri

PEF, ultrason ve klasik ekstraksiyon yöntemleri ile çözgen olarak su veya AES'nin kullanılması sonucu elde edilen ekstraktların verimleri Tablo 4.4.'te görülmektedir.

Tablo 4.4. Farklı ekstraksiyon yöntemleri ile elde edilen antosiyanin bazlı ekstraktların % verimleri

	Solvent	Ekstraksiyon şekli		
		PEF	Ultrason	Klasik
Siyah Havuç	Su	8.38±0.02	8.67±0.17	8.02±0.10
	AES*	-**	9.25±0.03	7.86±0.08
Kırmızı Lahana	Su	5.64±0.01	1.21±0.08	1.82±0.36
	AES	-	6.45±0.24	5.26±0.05

PEF: Vurgulu elektrik alan, *AES: %0.1 HCl ile asitlendirilmiş etanol:su (1:1) karışımı. -**: Ekstraksiyon gerçekleştirilememiştir.

4.3.2. Farklı ekstraksiyon yöntemleri ile elde edilen antosiyanin bazlı ekstraktların toplam fenolik madde içerikleri

Siyah havuç ve kırmızı lahanalara PEF, ultrason ve klasik ekstraksiyon uygulanması sonucu elde edilen ekstraktların toplam fenolik madde içerikleri (mg GAE/g kuru ekstrakt) Tablo 4.5.'te verilmiştir. Siyah havuç örneklerine PEF ve klasik ekstraksiyon yöntemleri uygulandığında toplam fenolik madde miktarlarının sırası ile 23.84 mg GAE/g kuru ekstrakt ve 21.89 mg GAE/g kuru ekstrakt düzeylerinde olduğu belirlenmiştir.

Tablo 4.5. Farklı ekstraksiyon yöntemleri ile elde edilen antosiyanin bazlı ekstraktların fenolik bileşimleri (mg GAE/g kuru ekstrakt)

	Solvent	Ekstraksiyon şekli		
		PEF	Ultrason	Klasik
Siyah Havuç	Su	23.84±0.48	25.99±0.63	21.89±0.86
	AES*	-**	35.44±0.62	31.55±0.70
Kırmızı Lahana	Su	25.18±1.51	21.71±0.39	20.68±0.70
	AES	-	39.88±0.61	38.72±0.51

* AES: %0.1 HCl ile asitlendirilmiş etanol:su (1:1) karışımı. -**: Ekstraksiyon gerçekleştirilememiştir. PEF: Vurgulu elektrik alan.

4.3.3. Farklı ekstraksiyon yöntemleri ile elde edilen antosiyanin bazlı ekstraktların antosiyanin miktarları

Tablo 4.6.'da farklı ekstraksiyon yöntemleri ile elde edilen ABE'ların antosiyanin içerikleri verilmiştir (mg siy-3-glikozit/g kuru ekstrakt).

Tablo 4.6. Farklı ekstraksiyon yöntemleri ile elde edilen antosiyanin bazlı ekstraktların antosiyanin miktarları (mg siy-3-glikozit/g kuru ekstrakt)

	Solvent	Ekstraksiyon şekli		
		PEF	Ultrason	Klasik
Siyah Havuç	Su	1.95±0.04	1.68±0.01	1.37±0.04
	AES *	-**	4.62±0.12	3.33±0.05
Kırmızı Lahana	Su	6.85±0.09	5.88±0.20	3.83±0.08
	AES	-	9.15±0.50	7.94±0.18

* AES: %0.1 HCl ile asitlendirilmiş etanol:su (1:1) karışımı. -**: Ekstraksiyon gerçekleştirilememiştir. PEF: Vurgulu elektrik alan.

4.3.4. Farklı ekstraksiyon yöntemleri ile elde edilen antosiyanin bazlı ekstraktların antioksidan kapasiteleri

Farklı ekstraksiyon yöntemleri ve çözügenlerin kullanılması halinde ekstraktların antioksidan aktivitelerinde meydana gelen değişimler Tablo 4.7.'de verilmiştir.

Tablo 4.7. Farklı ekstraksiyon yöntemleri ile elde edilen antosiyanin bazlı ekstraktların antioksidan kapasiteleri (mg AAE/g kuru ekstrakt)

	Solvent	Ekstraksiyon şekli		
		PEF	Ultrason	Klasik
Siyah Havuç	Su	27.92±0.32	28.95±0.69	32.89±0.46
	AES *	-**	32.98±1.10	29.56±1.78
Kırmızı Lahana	Su	41.74±0.53	35.13±0.27	30.46±0.66
	AES	-	34.20±0.42	30.60±0.76

PEF: Vurgulu elektrik alan, * AES: %0.1 HCl ile asitlendirilmiş etanol:su (1:1) karışımı. **: Ekstraksiyon gerçekleştirilememiştir.

4.3.5. Farklı ekstraksiyon yöntemleri ile elde edilen antosiyanin bazlı ekstraktların antiradikal kapasiteleri

ABE'ların DPPH radikalının %50'sini inaktive edebilmeleri için gerekli ekstrakt miktarları ($\mu\text{g/mL}$) IC₅₀ değeri olarak Tablo 4.8.'de yer almaktadır.

Tablo 4.8. Farklı ekstraksiyon yöntemleri ile elde edilen antosiyanin bazlı ekstraktların antiradikal kapasiteleri (IC₅₀, $\mu\text{g/mL}$)

	Solvent	Ekstraksiyon şekli		
		PEF	Ultrason	Klasik
Siyah Havuç	Su	173.81±4.85	150.35±0.49	177.40±0.26
	AES*	-**	142.13±3.64	145.32±1.04
Kırmızı Lahana	Su	125.28±2.67	122.42±0.08	129.80±1.32
	AES	-	110.76±2.30	102.62±8.45

PEF: Vurgulu elektrik alan, * AES: %0.1 HCl ile asitlendirilmiş etanol:su (1:1) karışımı. **: Ekstraksiyon gerçekleştirilememiştir.

4.3.6. Antosiyanin bazlı ekstraktların antimikrobiyal özellikleri

4.3.6.1. Farklı ekstraksiyon yöntemleri ile elde edilen antosiyanin bazlı ekstraktların antimikrobiyal aktivitelerinin agar difüzyon yöntemi ile belirlenmesi

Siyah havuç ve kırmızı lahana farklı ekstraksiyon yöntemleri uygulanarak (PEF, ultrason ve klasik ekstraksiyonlar) ve çözügen olarak su veya etanol: su (%0.1 HCl ile asitlendirilmiş) kullanılarak elde edilen ekstraktlarının agar difüzyon yöntemi ile belirlenen antimikrobiyal analiz bulguları sırası ile Tablo 4.9.'da ve Tablo 4.10.'da verilmiştir. Ekstraktların genel olarak antimikrobiyal aktiviteleri değerlendirildiğinde KLE ve SHE'lerinin *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 etanol:su (%0.1 HCl ile asitlendirilmiş) ekstraktlarının, su ekstraktlarından daha yüksek bir antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu tespit edilmiştir. Kırmızı lahananın PEF ile

elde edilen ekstraktlarının *B. cereus* F2, *B. cereus* FMC 19 ve *S. aureus* ATCC 1135 üzerine antimikrobiyal etkisinin olduğu gözlenirken (Tablo 4.10.), siyah havucun PEF ekstraktlarının hiçbir mikroorganizma üzerine etkili olmadığı belirlenmiştir (Tablo 4.9). Kırmızı lahanaların ultrasonik ve klasik ekstraksiyonlarında çözgen olarak su kullanıldığında elde edilen ekstraktların antimikrobiyal etkiye sahip olmadıkları saptanmıştır. Kırmızı lahana ekstraksiyonunda da etanol:suyun çözgen olarak kullanılması halinde antimikrobiyal etkilerinin daha yüksek olduğu belirlenmiş olup, genel olarak klasik yöntemle elde edilen ekstraktlara kıyasla ultrasonik ekstraksiyonla elde edilen ekstraktlarının daha yüksek antimikrobiyal etkiye sahip olduğu tespit edilmiştir. Siyah havuçlarda da kırmızı lahana ekstraktlarına benzer sonuçlar elde edilmiş olup, SHE'lerinin en çok *B. cereus* F2 ve *P. aurogenosa* üzerine etkili olduğu saptanmıştır.

Tablo 4.9. Farklı ekstraksiyon yöntemleri ile elde edilen SHE'lerinin bazı maya ve bakterilere karşı inhibitif etkileri (inhibisyon zonu, mm)

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

PEF: Vurgulu elektrik alan, *AES: %0.1 HCl ile asitlendirilmiş etanol:su (1:1) karışımı, -: Etkisi gözlenmedi.

Tablo 4.10. Farklı ekstraksiyon yöntemleri ile elde edilen KLE'ların bazı maya ve bakterilere karşı inhibitif etkileri (inhibisyon zonu, mm)

Mikroorganizma	PEF				Ultrasonik Ekstraksiyon								Klasik Ekstraksiyon							
	Su ekstraktı				Su ekstraktı				AES*				Su ekstraktı				AES*			
	Konsantrasyon (%)				Konsantrasyon (%)								Konsantrasyon (%)							
	1	2.5	5	10	1	2.5	5	10	1	2.5	5	10	1	2.5	5	10	1	2.5	5	10
<i>L. monocytogens</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	9±1.4	14±1.4	-	-	-	-	-	-	7.5±0.7	12.5±2.1
<i>S. typhimurium</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7.0±1.4	-	-	-	-	-	-	-	6.0±0.0
<i>E. coli</i> 0157:H7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6.0±0.0	-	-	-	-	-	-	-	6.0±0.0
<i>E. coli</i> ATCC 25922	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8.5±0.7	-	-	-	-	-	-	-	5.5±0.7
<i>S. aureus</i> ATCC 1135	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7.0±1.4	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	-	-	6.0±0.0	8.5±0.7	-	-	-	-	-	-	-	7.5±0.7	-	-	-	-	-	-	-	6.5±0.7
<i>B. cereus</i> F2	-	-	7.5±0.7	11.0±1.4	-	-	-	-	-	-	7.5±0.7	9.5±0.7	-	-	-	-	-	-	9.0±1.4	11.5±0.7
<i>B. cereus</i> FMC 19	-	-	9.0±1.4	12.5±0.7	-	-	-	-	-	-	-	7.5±0.7	-	-	-	-	-	-	-	10±0.0
<i>B. subtilis</i> ATCC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	9.0±1.4	-	-	-	-	-	-	-	7.5±0.7
<i>B. brevis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6.0±0.0	8.5±0.7	-	-	-	-	-	-	-	8.5±0.7
<i>P. aurogenes</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	9.0±0.0	-	-	-	-	-	-	5.5±0.7	7.5±0.7
<i>A. hydrophila</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7.5±0.7	-	-	-	-	-	-	-	5.5±0.7
<i>Y. enterocolitica</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7.5±2.1	-	-	-	-	-	-	-	6.5±0.7
<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. albicans</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

PEF: Vurgulu elektrik alan, *AES: %0.1 HCl ile asitlendirilmiş etanol:su (1:1) karışımı, -: Etkisi gözlenmedi.

4.3.6.2. Antosiyanin bazlı ekstraktların 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 ABE'lerden 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 4.11.'de görülmektedir. Elma sularının pH değerleri mikroorganizmaların gelişimi üzerine etkili faktörlerden biri olup, kontrol ve SHE ile renklendirilen örneklerde 4.01 ve KLE ile renklendirilen örneklerde ise bu değer 4.02 olarak bulunmuştur.

Tablo 4.11. 4 ve 20°C sıcaklıklarda inkübe edilen elma sularına ilave edilen antosiyanin bazlı ekstraktların (4 mg antosiyanin/100 mL) *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
		SHE	7.95±0.05	7.09±0.05	6.82±0.04	6.24±0.07	3.77±0.08
		KLE	8.07±0.10	7.07±0.03	6.60±0.07	6.34±0.13	3.34±0.11
	20	Kontrol	8.13±0.03	7.11±0.03	6.21±0.06	5.85±0.17	2.77±0.15
		SHE	7.93±0.07	6.59±0.05	5.77±0.15	5.75±0.07	<1
		KLE	7.54±0.13	7.00±0.33	5.77±0.15	5.74±0.05	<1
<i>B. cereus</i> F2	4	Kontrol	4.77±0.15	2.92±0.15	2.85±0.17	2.92 ^b ±0.15	3.04±0.09
		SHE	5.12±0.15	2.89±0.24	2.94±0.28	3.16±0.12	2.85±0.17
		KLE	5.17±0.32	2.97±0.32	3.04±0.09	2.89±0.24	2.77±0.15
	20	Kontrol	4.82±0.24	3.07±0.30	3.10±0.20	2.92±0.29	2.89±0.24
		SHE	4.97±0.20	2.89±0.24	2.89±0.24	2.89±0.24	2.85±0.17
		KLE	5.14±0.31	4.70±0.24	2.85±0.30	3.01±0.23	2.77±0.15

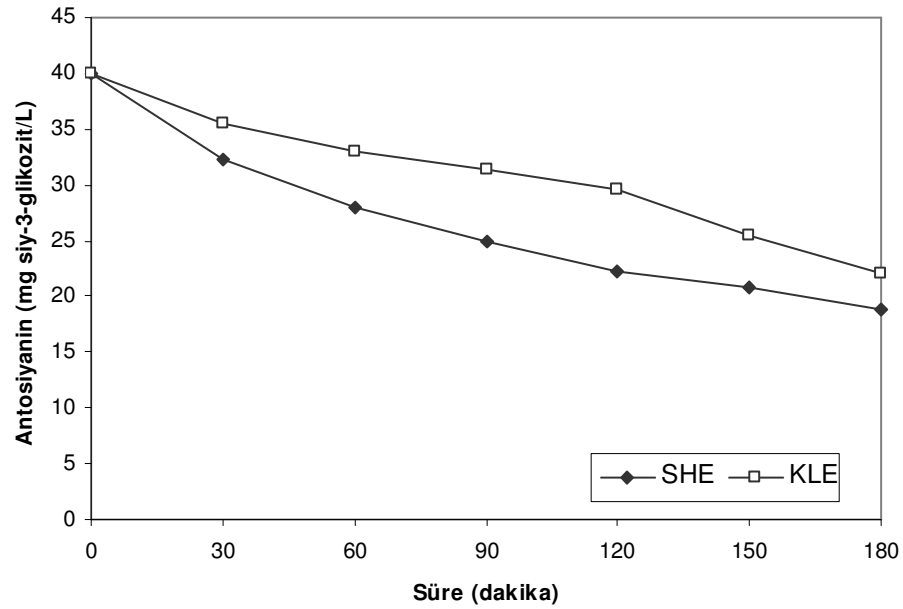
SHE: Siyah havuç ekstraktı, KLE: Kırmızı lahana ekstraktı.

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. *E. coli* O157:H7'ye kıyasla *B. cereus* F2 inhibisyonunda ABE'lerin 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

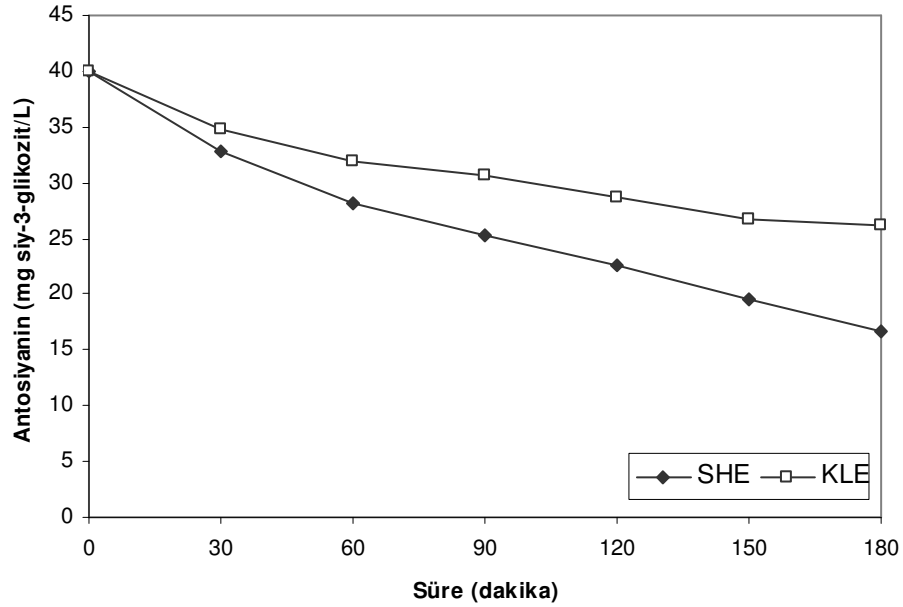
4.4.1. Antosiyanin bazlı ekstraktların tampon çözeltilerde ısıl stabilitelerinin belirlenmesi

pH değeri 3 ve 4 olan iki farklı tampon çözeltinin 100 mL'si, 4 mg antosiyanin içerecek şekilde ABE'lar (SHE'den 1.20 g/100 mL ve KLE'ndan 0.50 g/100 mL) ile 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 4.4. ve Şekil 4.5.'te verilmiştir.



Şekil 4.4. 90°C sıcaklıkta ısıl işlem gören ABE içeren tampon çözeltilerin antosiyanin miktarlarında meydana gelen değişimler (pH 3), SHE: Siyah havuç ekstraktı, KLE: Kırmızı lahana ekstraktı.

pH değerleri 3 ve 4 olan tampon çözeltilerde ısıl işlem süresinin uzamasına bağlı olarak antosiyanin miktarlarında azalmalar tespit edilmiştir. Her iki pH ortamında da ısıl işleme dayanıklılıkları dikkate alındığında KLE'nın SHE'den daha stabil olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.5. 90°C sıcaklıkta ısıtıl işlem gören ABE içeren tampon çözeltilerin antosiyanin miktarlarında meydana gelen değişimler (pH 4), SHE: Siyah havuç ekstraktı, KLE: Kırmızı lahana ekstraktı.

4.4.2. Antosiyanin bazı ekstraktların elma sularında ısıl stabilitelerinin belirlenmesi

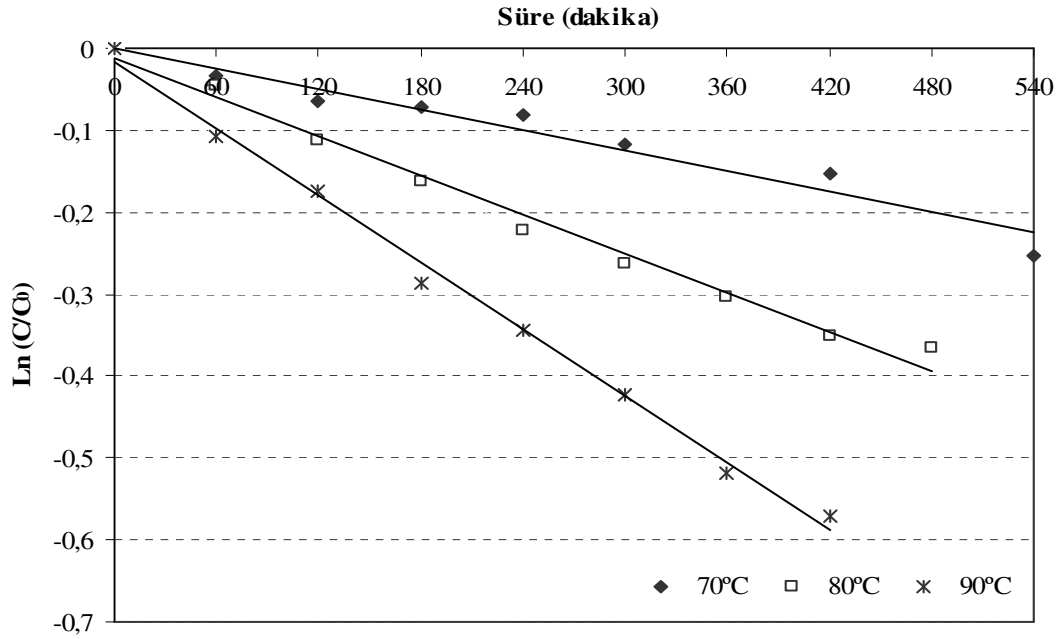
Depolanan elma sularına ilave edilen düzeyde (4 mg antosiyanin/100 mL elma suyu, SHE'den 1.20 g ve KLE'ndan 0.50 g) farklı ABE'lar ile renklendirilen örnekler 70, 80 ve 90°C sıcaklıklarda ısıtıl işlem maruz bırakılmış ve ısıl degradasyonun birinci derece reaksiyon kinetiğine göre gerçekleştiği belirlenmiştir. Tablo 4.12.'de elma sularına ilave edilen SHE ve KLE'larının ısıl stabilitelerine ilişkin kinetik parametreler yer almaktadır. Reaksiyon hız sabitleri dikkate alındığında KLE'nın ısıtıl işlem en dayanıklı antosiyaninleri içerdiği ve bunu SHE'larının izlediği sonucuna ulaşılmaktadır. Yarılma sürelerinin beklendiği üzere sıcaklıktaki artışla birlikte azaldığı görülmektedir (Tablo 4.12).

Tablo 4.12. Elma sularında farklı antosiyanin bazlı ekstrakt antosiyaninlerinin ısıl stabilitelerine ait kinetik parametreler

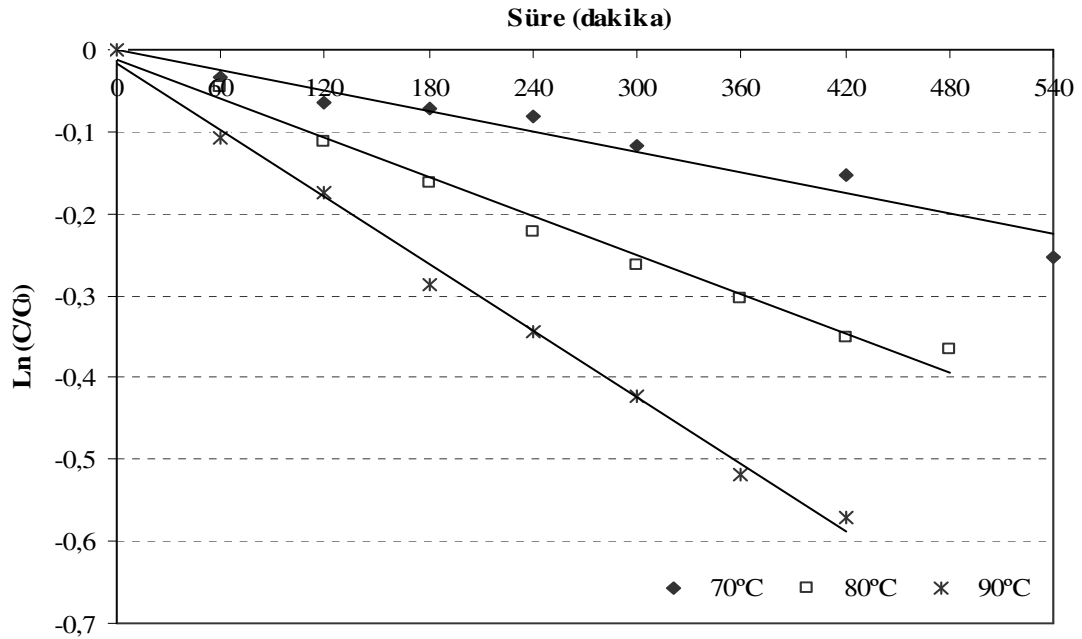
	Sıcaklık (°C)	- k x 10 ⁻³ (dak ⁻¹)	t _{1/2} (saat)	Ea (kJ mol ⁻¹)
SHE	70	0.92	12.5	64.94
	80	1.84	6.3	
	90	3.22	3.6	
KLE	70	0.46	25.1	83.24
	80	0.92	12.5	
	90	2.30	5.0	
	80	2.76	4.2	
	90	4.38	2.6	

SHE: Siyah havuç ekstraktı, KLE: Kırmızı lahana ekstraktı k: Reaksiyon hız sabiti, t_{1/2}: Yarılanma süresi, Ea: Aktivasyon enerjisi.

Elma sularında siyah havuç ve kırmızı lahana antosiyaninlerinin farklı sıcaklıklarda ısıtılmaları sonucu kayıp düzeyleri sırası ile Şekil 4.6. ve Şekil 4.7.'de verilmiştir.



Şekil 4.6. Siyah havuç antosiyaninlerinin (SHE) elma suyunda farklı sıcaklıklarda ısıtılması sonucu ortaya çıkan degradasyonu



Şekil 4.7. Kırmızı lahanada antosiyaninlerinin (KLE) elma suyunda farklı sıcaklıklarda ısıtılması sonucu ortaya çıkan degradasyonu

Antosiyanin degradasyonu reaksiyon hız sabitinin (k) sıcaklığa olan bağımlılığını belirlemek için Arrhenius eşitliği kullanılmıştır. Bu amaçla, daha önce de belirtildiği üzere reaksiyonun hız sabitlerinin (k) logaritmaları ($\ln k$) aritmetik ölçekli bir grafiğin “y” eksenine ve sıcaklık değerlerinin (Kelvin) resiprokalı ($1/T$) 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 [21].

4.5. Renklendirilen Gıdalar

Klasik ekstraksiyon yöntemi ile elde edilen ABE’lar 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 antosiyanin bazlı ekstraktlar ile renklendirilen elma sularında Tablo 4.13.’te belirtilen analizler yapılarak, çalışılan elma suyunun bazı bileşim unsurları tespit edilmiştir.

Tablo 4.13. 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. Antosiyanin bazıli ekstraktların (ABE) içerdikleri toplam antosiyanin miktarları farklı olduğundan elma sularının renklendirilmesi için ilave edilmesi gereken ekstrakt miktarları farklı olmuştur. Buna göre siyah havuç ekstraktından (SHE) 1.20 g, ve kırmızı lahana ekstraktından (KLE) 0.50 g ilave edilerek renklendirilen elma suları Şekil 4.10.'da görülmektedir. Renklendirilen bu elma sularının belirlenen bazı analitik özellikleri Tablo 4.14.'te verilmiştir. İlave edilen renklendirici materyallerin elma sularının briks, pH ve % titrasyon asitliği değerleri üzerine olan etkileri istatistiksel olarak önemli ($p<0.05$) bulunmuştur.

Tablo 4.14. Farklı ABE'lar ile renklendirilen elma sularının analitik özellikleri

Analitik özellikler	Kontrol	SHE	KLE
Briks	12.20±0.02	13.35±0.02	12.52±0.01
pH	3.42±0.01	3.43±0.00	3.42±0.01
% Titrasyon asitliği*	0.45±0.01	0.45±0.00	0.45±0.00

*: Malik asit cinsinden hesaplanmıştır. SHE: Siyah havuç ekstraktı, KLE: Kırmızı lahana ekstraktı.

4.5.1.1. Elma sularının toplam fenolik madde miktarlarında meydana gelen değişimler

ABE ilavesi ile hazırlanmış elma sularının farklı sıcaklık ve sürelerde depolanmaları sonucunda toplam fenolik madde miktarlarında meydana gelen değişim Tablo 4.15.'te verilmiştir.

Tablo 4.15.'te da görüldüğü gibi elma sularını renklendirmek amacıyla ilave edilen ABE'ların 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, SHE ve KLE ile renklendirilen elma sularının toplam fenolik madde miktarları sırası ile 695.96 ve 521.92 mg gallik asit eşdeğeri (GAE)/L düzeyindedir. Sıcaklık derecesindeki artışa paralel olarak fenolik madde

degradasyonunun da arttığı tespit edilmiştir.

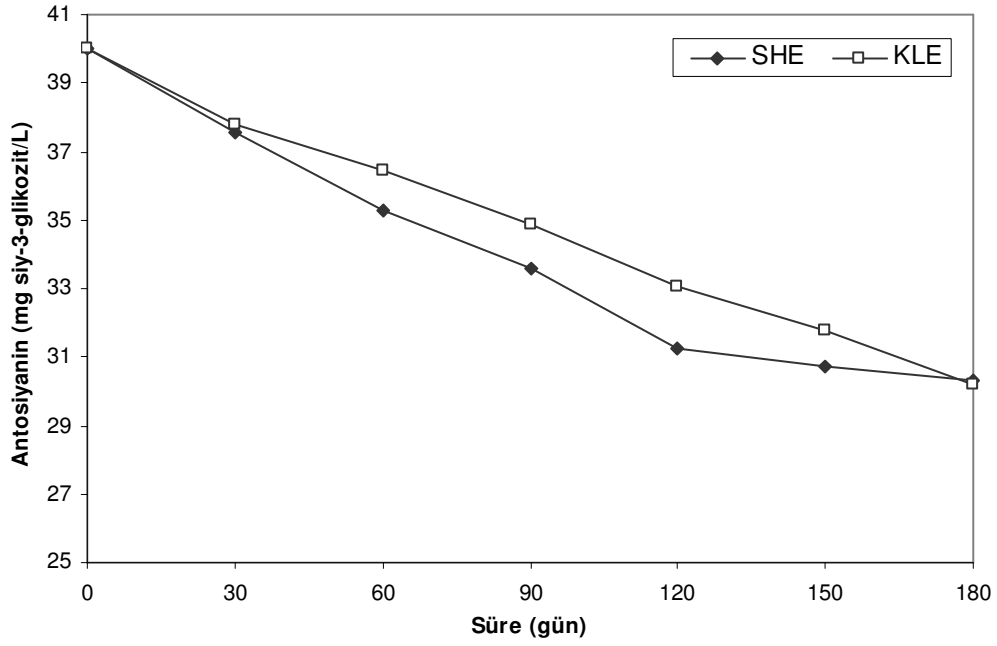
Tablo 4.15. Farklı ABE'lar ile hazırlanmış ve farklı sıcaklık ve sürelerde depolanan elma suyu örneklerinin toplam fenolik madde miktarlarındaki değişimler (mg GAE/L)

Sıcaklık (°C)	Depolama Süresi*	Kontrol	SHE	KLE
4	0	326.36±8.38	695.96±7.38	521.92±6.97
	30	325.79±7.98	702.46±12.61	519.81±9.36
	60	328.11±6.44	692.80±11.72	521.77±19.35
	90	326.50±3.13	690.92±8.95	502.40±12.11
	120	299.21±21.56	643.83±7.53	451.57±3.69
	150	288.63 ^c ±8.52	531.17±21.66	427.39±23.02
	180	283.47±5.80	523.33±4.01	428.18±5.94
20	0	326.36±8.38	695.96±7.38	521.92±6.97
	15	321.82±8.62	682.86±4.10	509.01±10.10
	30	321.11±5.12	644.99±4.84	515.50±7.23
	45	316.74±8.25	644.59±5.06	513.36±16.23
	60	316.98±5.92	645.48±9.42	511.01±8.13
	75	312.75±3.28	643.82±7.24	512.02±9.35
	90	314.73±3.98	640.64±16.01	491.44±6.10
30	0	326.36±8.38	695.96±7.38	521.92±6.97
	15	320.89±12.16	684.81±7.38	509.03±6.46
	30	315.45±4.43	645.98±9.11	507.28±4.93
	45	311.80±3.62	644.89 ±11.70	500.14±6.84
	60	308.96±8.48	637.99±6.08	484.68±4.69

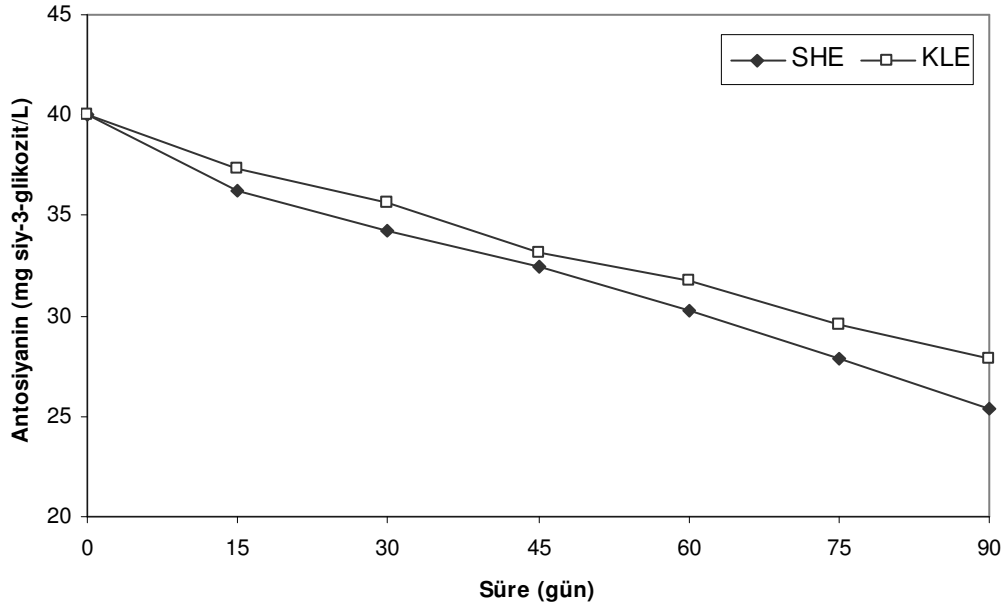
*: Gün, SHE: Siyah havuç ekstraktı, KLE: Kırmızı lahana ekstraktı.

4.5.1.2. Elma sularının antosiyanin miktarlarında meydana gelen değişimler

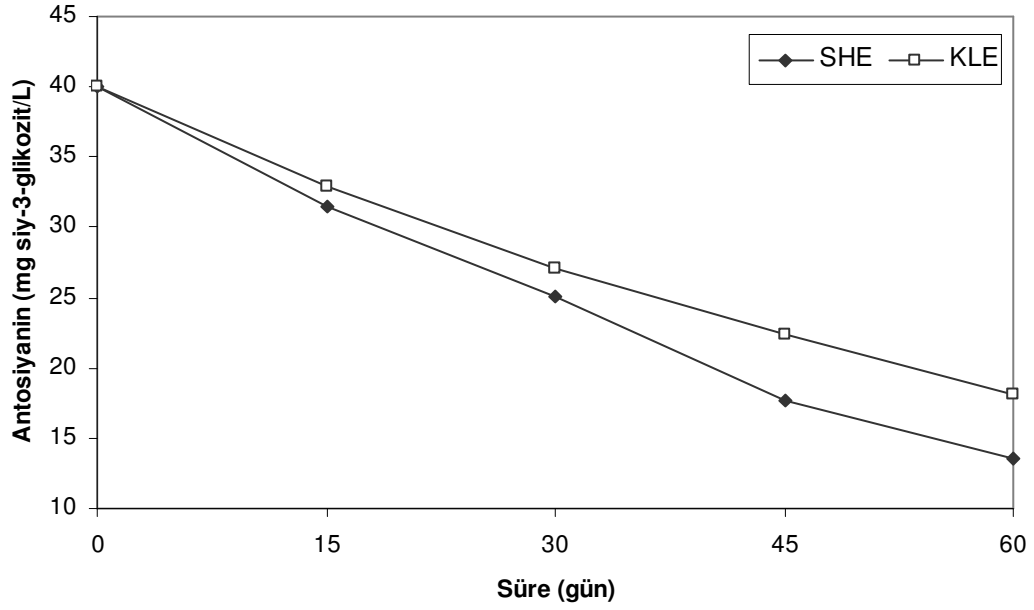
Araştırmada ABE'lar ile renklendirilen elma sularının 4, 20 ve 30°C sıcaklıklarda depolanması sonucunda antosiyanin miktarlarında meydana gelen değişimler sırasıyla Şekil 4.8.'de, Şekil 4.9.'da ve Şekil 4.10.'da verilmiştir. Veriler incelendiğinde beklendiği gibi sıcaklığın yükselmesiyle antosiyanin kaybının arttığı görülmektedir. Kontrol örneklerinde antosiyanin saptanamamış ve tüm depolama sıcaklıklarında en stabil antosiyanin kaynağının kırmızı lahana olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.8. ABE'lar ile renklendirilen elma sularının 4°C sıcaklıkta depolanma sürecinde antosiyanin miktarındaki değişimler, SHE: Siyah havuç ekstraktı, KLE: Kırmızı lahana ekstraktı.



Şekil 4.9. ABE'lar ile renklendirilen elma sularının 20°C sıcaklıkta depolanma sürecinde antosiyanin miktarındaki değişimler, SHE: Siyah havuç ekstraktı, KLE: Kırmızı lahana ekstraktı.



Şekil 4.10. ABE'lar ile renklendirilen elma sularının 30°C sıcaklıkta depolanma sürecinde antosiyanin miktarındaki değişimler, SHE: Siyah havuç ekstraktı, KLE: Kırmızı lahana ekstraktı.

4.5.1.3. Elma sularının antiradikal aktivitelerinde meydana gelen değişimler

Farklı ABE'lar ile renklendirilen ve farklı sıcaklık ve sürelerde depolanan elma sularının antiradikal aktivitelerinde meydana gelen değişimler Tablo 4.16.'da 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.

Tablo 4.16. Farklı ABE'lar ile renklendirilen ve farklı sıcaklık ve sürelerde depolanan elma suyu örneklerinin antiradikal aktivitelerindeki değişimler (% inhibisyon)

Sıcaklık (°C)	Depolama Süresi*	Kontrol	SHE	KLE
4	0	47.89±1.35	77.10±0.59	65.80±1.32
	30	44.23±2.12	72.27±1.15	62.17±1.29
	60	40.80±1.79	69.44±1.76	58.96±2.57
	90	36.10±0.56	67.27±1.14	56.08±0.72
	120	34.51±1.16	64.91±2.09	53.92±1.46
	150	32.63±2.45	64.25 ^a ±0.84	53.91±2.57
	180	30.23±2.10	63.17±1.64	52.40±2.32
20	0	47.89±1.35	77.10±0.59	65.80±1.32
	15	41.42±0.92	71.63±0.77	61.69±1.51
	30	38.76±2.23	68.79±2.40	59.97±0.93
	45	35.31±1.07	68.53±1.54	54.86±0.86
	60	34.03±0.47	67.73±0.32	53.14±1.96
	75	28.62±0.72	64.21±0.40	48.50±3.25
	90	27.55±1.03	60.35±1.71	46.22±2.58
30	0	47.89±1.35	77.10±0.59	65.80±1.32
	15	40.54±1.53	67.76±0.92	60.63±0.78
	30	36.45±0.91	63.95±1.36	58.04±0.92
	45	32.38±0.82	62.42±0.99	54.23±0.51
	60	27.33±1.43	60.48±0.40	53.47±2.26

*: Gün, SHE: Siyah havuç ekstraktı, KLE: Kırmızı lahana ekstraktı ile renklendirilmiş.

4.5.1.4. Elma sularının antioksidan aktivitelerinde meydana gelen değişimler

Tablo 4.17.'de elma sularının 4, 20 ve 30°C sıcaklıklarda depolanması ile antioksidan aktivitelerinde meydana gelen değişimler görülmektedir.

Tablo 4.17. Farklı ABE'lar ile renklendirilen ve farklı sıcaklık ve sürelerde depolanan elma suyu örneklerinin antioksidan aktivitelerindeki değişimler (mg AAE/mL)

Sıcaklık (°C)	Depolama Süresi*	Kontrol	SHE	KLE
4	0	32.37±1.01	37.24±0.60	33.99±0.70
	30	31.79±1.31	36.81±0.39	33.78±0.49
	60	32.62±0.44	35.55±1.53	33.67±0.26
	90	31.09±0.44	33.58±0.26	33.57±0.50
	120	30.83±0.36	32.71±0.65	31.58±0.50
	150	30.39±0.69	32.19±0.38	31.45±0.69
	180	29.80±0.16	31.63±0.19	30.11±0.20
20	0	32.37±1.01	37.24±0.60	33.99±0.70
	15	31.41±0.70	35.84±1.93	33.96±0.68
	30	31.08±1.01	35.50±1.19	34.79±0.75
	45	30.50±0.28	35.40±0.60	32.69±0.89
	60	30.01±0.29	33.25±0.83	31.91±0.91
	75	29.84±0.44	32.61±1.00	31.49±0.31
	90	29.89±0.16	32.59±0.67	31.10±0.49
30	0	32.37±1.01	37.24±0.60	33.99±0.70
	15	31.76±1.10	33.88±0.48	33.89±2.25
	30	31.09±0.26	33.89±0.81	34.22±1.09
	45	30.46±0.36	33.45±0.64	33.67±3.05
	60	29.54±0.52	33.07±0.77	31.45±0.43

*: Gün, SHE: Siyah havuç ekstraktı, KLE: Kırmızı lahana ekstraktı

4.5.1.5. Elma sularının rengine meydana gelen değişimler

ABE'lar ile renklendirilmiş elma sularının 4°C sıcaklıkta depolama süresince renk parametrelerinde meydana gelen değişim Tablo 4.18.'de verilmiştir. 4°C sıcaklıkta depolanan örnekler arasında 10.81 değeri ile kontrol grubunun en yüksek L^* değerine sahip olduğu saptanmıştır. Depolama süresinin uzamasıyla örneklerin L^* değerlerinin azaldığı belirlenmiştir. Örnekler arasında en yüksek a^* değeri 9.85 ile KLE ile renklendirilen örneklerde saptanırken, en düşük a^* değeri beklendiği üzere 3.78 değeri ile kontrol örneklerinde tespit edilmiştir. Örneklerin b^* değerlerinde de depolama süresince bazı dalgalanmalar belirlenmiş olsa da genel olarak b^* değerlerinin çok az da olsa artma eğiliminde oldukları saptanmıştır. En sarı örneklerin beklendiği üzere 9.45 b^* değerine sahip olan kontrol örnekleri olduğu belirlenmiştir. En düşük b^* değerinin ise 1.59 değeri ile SHE ilave edilmiş elma sularına ait olduğu tespit edilmiştir.

Elma sularının h^o değerlerinde depolama süresince hafif dalgalanmalar olmakla birlikte, genellikle bir artış olduğu tespit edilmiştir. Kontrol örneği depolamanın 0. gününde 68.05 h^o 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 4.19. incelendiğinde ABE'lar ile renklendirilen örneklerin de depolama süresince h^o değerlerinin arttığı görülmektedir. Elde edilen bulgular ABE'lar ile renklendirilen elma sularının renk yoğunluğunun zamanla artmasıyla rengin sarıya yaklaştığını göstermektedir.

Tablo 4.18. Farklı ABE'lar ile renklendirilen ve 4°C sıcaklıkta depolanan elma sularının L^* , a^* , b^* , h^o ve C^* değerleri

	Depolama Süresi*	Kontrol	SHE	KLE
L^*	0	10.81±0.31	4.40±0.27	5.19±0.56
	30	10.49±2.18	4.53±0.22	4.65±0.33
	60	10.91±0.57	4.28±0.28	4.13±0.20
	90	7.42±0.36	4.22±0.18	4.04±0.14
	120	4.27±0.21	3.4±0.74	3.59±0.32
	150	4.75±0.78	3.94±0.31	3.63±0.60
	180	4.67±0.59	3.44±0.24	3.66±0.55
a^*	0	3.78±0.28	5.28±0.55	9.85±0.42
	30	2.22±0.38	5.20±0.44	8.34±0.27
	60	3.01±0.21	4.21±0.90	8.36±0.28
	90	1.21±0.14	3.91±0.74	8.38±0.28
	120	1.33±0.06	3.47±0.27	6.14±0.47
	150	1.28±0.23	2.03±0.19	5.22±0.63
	180	1.29±0.25	3.32±0.37	5.33±0.36
b^*	0	9.45±0.97	1.59±0.28	2.51±0.99
	30	9.36±2.02	1.65±0.24	3.03±0.29
	60	10.93±0.54	1.46±0.32	3.08±0.13
	90	11.36±0.07	1.05±0.15	3.23±0.18
	120	11.50±0.29	1.20±0.09	3.31±0.08
	150	11.56±0.20	1.28±0.04	3.06±0.63
	180	11.51±0.22	1.66±0.15	3.37±0.24
h^o	0	68.05±2.67	16.87±3.39	14.13±5.31
	30	76.46±1.45	17.56±1.78	19.96±2.10
	60	74.66±0.32	19.12±0.95	20.22±0.44
	90	83.96 ±0.67	15.56±3.92	21.11±0.96
	120	83.44±0.25	19.15±2.21	28.43±1.74
	150	83.72±1.08	32.37±2.37	30.61±7.68
	180	83.63±1.31	26.80±3.06	32.28±3.23
C^*	0	10.18±0.89	5.52±0.52	10.20±0.53
	30	9.62±2.04	5.46±0.48	8.88±0.23
	60	11.34±0.58	4.45±0.95	8.91±0.30
	90	11.43±0.07	4.05±0.70	8.98±0.29
	120	11.58±0.29	3.67±0.24	6.98±0.43
	150	11.63±0.21	2.40±0.16	6.10±0.40
	180	11.59±0.41	3.71±0.35	6.31±0.26

: Gün, L^ : Parlaklık, a^* : Kırmızılık, b^* : Sarılık, C^* : Renk yoğunluğu, h^o : Renk tonunu ifade etmektedir. SHE: Siyah havuç ekstraktı, KLE: Kırmızı lahana ekstraktı

Farklı ekstraktlar 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 4.19.'da verilmiştir. 20°C'de depolanan elma sularının L^* değerlerinin 4°C sıcaklıkta depolanan örneklerle yakın olduğu belirlenmiş ve en yüksek parlaklık değerlerinin kontrol örneklerine ait olduğu saptanmıştır. 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 4.19. Farklı ABE'lar ile renklendirilen ve 20°C sıcaklıkta depolanan elma sularının L^* , a^* , b^* , h° ve C^* değerleri

	Depolama Süresi*	Kontrol	SHE	KLE
L^*	0	10.81±0.31	4.40±0.27	5.19±0.56
	15	10.01±0.91	4.12±0.40	4.91±0.96
	30	10.65±0.29	3.98±0.54	4.30±0.17
	45	10.11±0.46	3.99±1.25	4.72±0.47
	60	10.49±0.50	3.72±0.18	3.95±0.31
	75	9.75±0.24	3.68±0.29	3.97±0.43
	90	8.25±0.94	3.69±0.25	3.61±0.31
a^*	0	3.78±0.28	5.28±0.55	9.85±0.42
	15	2.41±0.19	5.02±0.68	10.38±2.26
	30	2.32±0.29	5.17±1.21	8.74±1.58
	45	3.17±0.47	5.13±0.59	10.24±0.45
	60	3.46±0.16	5.14±0.98	9.83±0.53
	75	3.37±0.13	4.74±0.19	8.82±0.40
	90	2.43±0.22	3.91±0.62	7.94±0.20
b^*	0	9.45±0.97	1.59±0.28	2.51±0.99
	15	9.63±0.59	1.66±0.24	4.18±1.23
	30	10.28±0.46	1.69±0.52	2.93±0.63
	45	12.50±1.77	1.75±0.30	4.02±0.45
	60	10.99±0.78	1.81±0.14	3.77±0.31
	75	10.84±0.40	1.70±0.21	3.30±0.31
	90	11.06±0.39	1.91±0.25	2.74±0.28
h°	0	68.05±2.67	16.87±3.39	14.13±5.31
	15	75.97±1.17	18.33±1.89	21.66±1.55
	30	77.36±1.18	17.96±2.19	18.39±0.90
	45	75.75±1.54	19.15±4.49	21.39±1.73
	60	72.51±0.78	19.98±4.14	20.97±0.77
	75	72.77±0.60	19.82±2.68	20.57±2.12
	90	77.66±1.03	26.51±5.53	19.05±2.05
C^*	0	10.18±0.89	5.52±0.52	10.20±0.53
	15	9.93±0.59	5.29±0.70	11.20±2.55
	30	10.54±0.50	5.45±1.30	9.22±1.69
	45	12.90±1.80	5.43±0.51	11.00±0.54
	60	11.52±0.78	5.46±0.92	10.53±0.59
	75	11.35±0.40	5.04±0.16	9.42±0.36
	90	11.32±0.40	4.37±0.52	8.40±0.17

: Gün, L^ : Parlaklık, a^* : Kırmızılık, b^* : Sarılık, C^* : Renk yoğunluğu, h° : Renk tonunu ifade etmektedir. SHE: Siyah havuç ekstraktı, KLE: Kırmızı lahana ekstraktı

Elma sularının h^o değerlerinde depolama süresince dalgalanmalar gözlenmekle birlikte, genel olarak artış eğilimde 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 kontrol grubu haricindeki örneklerin C^* değerlerinin azaldığı gözlenmiştir.

Tablo 4.20.'de ise 30°C sıcaklıkta depolanan elma suyu örneklerinin renklerinde meydana gelen değişimler görülmektedir

Tablo 4.20. Farklı ABE'lar ile renklendirilen ve 30°C sıcaklıkta depolanan elma sularının L^* , a^* , b^* , h^o ve C^* değerleri

	Depolama Süresi*	Kontrol	SHE	KLE
L^*	0	10.81±0.31	4.40±0.27	5.19±0.56
	15	10.17±0.41	4.26±0.23	5.00±0.43
	30	10.06±0.44	3.90±0.29	4.49±0.49
	45	9.96±0.20	3.91±0.74	4.35±0.22
	60	10.00±0.34	3.74±0.21	3.94±0.42
a^*	0	3.78±0.28	5.28±0.55	9.85±0.42
	15	3.23±0.38	5.22±0.15	10.32±0.59
	30	3.01±0.16	4.57±0.40	9.18 ^a ±0.22
	45	3.04±0.39	4.86±0.58	9.60±0.15
	60	3.24±0.38	4.49±0.84	8.74±0.66
b^*	0	9.45±0.97	1.59±0.28	2.51±0.99
	15	9.55±0.24	2.01±0.30	4.27±0.78
	30	10.19±0.34	1.80±0.26	3.41±0.23
	45	10.39±0.29	1.87±0.14	4.13±1.00
	60	10.51±0.25	2.14±0.26	4.32±0.22
h^o	0	68.05±2.67	16.87±3.39	14.13±5.31
	15	71.39±2.12	20.97±2.82	22.37±3.12
	30	73.59±1.11	21.66±3.78	20.37±1.28
	45	73.77±2.03	21.25±2.98	23.15±5.51
	60	72.94±1.80	26.17±5.83	26.54±2.53
C^*	0	10.18±0.89	5.52±0.52	10.20±0.53
	15	10.09±0.26	5.60±0.19	11.18±0.77
	30	10.63±0.32	4.92±0.36	9.79±0.23
	45	10.84±0.30	5.21±0.53	10.50±0.28
	60	11.00±0.30	5.00±0.73	9.76±0.56

* :Gün, L^* : Parlaklık, a^* : Kırmızılık, b^* : Sarılık, C^* : Renk yoğunluğu, h^o : Renk tonunu ifade etmektedir. SHE: Siyah havuç ekstraktı, KLE: Kırmızı lahana ekstraktı

4.5.1.6. Elma sularının duyuşsal olarak değerlendirilmesi

Farklı ABE'lar ilave edilerek renklendirilen elma sularının depolama süresince renk, tat, koku ve genel beğeni özellikleri tecrübeli panelistler tarafından değerlendirilmiştir.

4°C’de depolanan örneklerle ait duyu analizi bulguları Tablo 4.21.’de verilmiştir.

Tablo 4.21. Farklı ABE’lar ile renklendirilen ve 4°C sıcaklıkta depolanan elma sularının duyu analizi bulguları

	Depolama Süresi*	Kontrol	SHE	KLE
Renk	0	6.78±0.81	8.50±0.62	7.83±0.51
	30	6.78±1.00	8.39±0.70	7.89±1.02
	60	6.78±0.73	8.11±0.68	7.72±1.18
	90	6.83±1.04	7.89±0.58	7.72±1.07
	120	7.44±0.78	7.83±0.79	7.83±0.99
	150	6.72±0.96	7.89±0.47	7.89±0.83
	180	6.89±1.02	8.00±0.97	7.78±0.88
Tat	0	8.00±0.77	7.72±0.75	6.94±1.51
	30	7.89±1.13	7.72±1.18	6.83±0.79
	60	7.39±1.09	7.78±0.81	6.72±1.13
	90	7.17±0.79	7.56±0.78	6.44±1.69
	120	7.17±1.62	7.72±0.67	7.61±1.38
	150	5.94±1.16	7.94±0.80	5.83±2.01
	180	6.67±0.84	7.39±1.24	5.94±0.94
Koku	0	7.61±0.85	7.39±0.85	6.28±1.81
	30	7.89±1.08	7.78±0.81	6.28±1.41
	60	7.28±1.13	7.67±0.69	6.06±1.16
	90	7.28±0.75	7.67±0.77	5.61±1.46
	120	7.28±1.67	7.83±0.79	6.44±1.98
	150	6.17±1.20	7.78±0.65	5.83±1.69
	180	7.17±1.10	7.50±1.34	6.00±1.41
Genel Beğeni	0	7.78±0.55	7.78±0.65	6.94±1.47
	30	7.72±0.89	7.89±0.68	6.83±0.86
	60	7.33±1.08	7.83±0.79	6.67±1.07
	90	7.17±0.79	7.78±0.55	6.44±1.58
	120	7.33±1.37	7.78±0.73	7.00±1.46
	150	6.33±0.91	7.83±0.79	6.06±1.51
	180	7.22±1.06	7.56±1.25	6.67±1.41

*: Gün, SHE: Siyah havuç ekstraktı, KLE: Kırmızı lahana ekstraktı, 1, kabul edilemez, 9, fazlasıyla beğendim

Tablo 4.22.’de de görülebildiği gibi 20°C sıcaklıkta depolanan elma sularının renk skorlarının genel olarak 4°C’de depolanan örneklerden biraz daha düşük olduğu belirlenmiştir.

Tablo 4.22. Farklı ABE'lar ile renklendirilen ve 20°C sıcaklıkta depolanan elma sularının duyusal analiz bulguları

	Depolama Süresi*	Kontrol	SHE	KLE
Renk	0	6.78±0.81	8.50±0.62	7.83±0.51
	15	7.22±0.94	8.44±0.51	7.72±0.75
	30	7.28±0.96	8.50±0.62	7.83±1.20
	45	7.22±0.55	8.06±0.73	7.89±0.96
	60	6.94±0.80	8.00±0.69	7.83±1.15
	75	6.72 ±0.67	7.94±0.54	7.61±0.85
	90	6.78±0.88	7.83±0.86	7.28±0.67
Tat	0	8.00±0.77	7.72±0.75	6.94±1.51
	15	7.50±0.99	8.22±0.73	6.56±1.04
	30	7.72±0.96	8.11±0.76	6.00±1.57
	45	7.44±0.70	8.11±0.76	6.50±0.99
	60	7.22±0.88	7.83±0.71	6.78±0.88
	75	7.33±0.69	7.44±0.86	6.56±1.25
	90	6.94±0.73	6.56±1.34	6.17±1.42
Koku	0	7.61±0.85	7.39±0.85	6.28±1.81
	15	7.17±0.92	7.56±0.62	5.39±0.98
	30	7.56±0.98	8.00±1.19	5.39±1.65
	45	7.33±0.77	7.94±0.80	6.72±1.56
	60	7.33±0.91	7.56±0.70	6.50±1.10
	75	7.33±0.59	6.72±1.67	5.89±1.94
	90	7.00±0.69	6.67±1.57	6.17±1.95
Genel Beğeni	0	7.78±0.55	7.78±0.65	6.94±1.47
	15	7.39±0.85	8.22±0.73	6.33±0.77
	30	7.61±0.98	8.06±0.73	6.17±1.69
	45	7.44±0.78	7.94±0.73	6.56±1.15
	60	7.19±0.86	7.92±0.60	6.72±0.96
	75	7.22±0.55	7.28±0.96	6.50±1.20
	90	6.89±0.76	6.61±1.54	5.89±1.91

*: Gün, SHE: Siyah havuç ekstraktı, KLE: Kırmızı lahana ekstraktı, .1, kabul edilemez- 9, fazlasıyla beğendim.

Araştırmada 30°C sıcaklıkta depolanan elma sularının duyusal analiz sonuçları Tablo 4.23.'te verilmiştir.

Tablo 4.23. Farklı ABE'lar ile renklendirilen ve 30°C sıcaklıkta depolanan elma sularının duyuşsal analiz bulguları

	Depolama Süresi*	Kontrol	SHE	KLE
Renk	0	6.78±0.81	8.50±0.62	7.83±0.51
	15	7.00±0.69	8.17±0.51	7.72±0.96
	30	7.11±0.58	8.22±0.73	7.83±0.62
	45	6.72±0.57	7.78±1.17	7.94±1.00
	60	6.78±0.65	7.72±0.67	7.44±0.92
Tat	0	8.00±0.77	7.72±0.75	6.94±1.51
	15	7.83±0.79	7.61±0.70	6.78±0.81
	30	7.56±0.92	8.33±0.77	6.56±1.42
	45	7.72±0.67	7.89±0.96	6.39±1.54
	60	7.56±0.86	7.94±0.64	6.56±1.10
Koku	0	7.61±0.85	7.39±0.85	6.28±1.81
	15	7.67±0.69	7.61±0.50	5.39±1.20
	30	7.83±0.86	8.22±0.73	5.28±0.89
	45	7.33±0.77	7.61±0.92	6.00±1.64
	60	7.61±0.85	7.89±0.76	5.61±1.29
Genel Beğeni	0	7.78±0.55	7.78±0.65	6.94±1.47
	15	7.83±0.62	7.67±0.59	6.36±1.11
	30	7.78±0.81	8.22±0.73	6.39±1.38
	45	7.33±0.77	7.83±0.99	6.50±1.50
	60	7.19±0.93	7.94±0.64	6.33±1.24

*: Gün, SHE: Siyah havuç ekstraktı, KLE: Kırmızı lahana ekstraktı, 1, kabul edilemez - 9, fazlasıyla beğendim.

4.5.2. Dondurma

Yapılan ön denemelerde 100 mL dondurma miksinin 3 mg antosiyanin seviyesinde ABE'lar ile renklendirilmeleri halinde duyuşsal olarak en yüksek skorlara (renk ve genel beğeni skorları dikkate alınmıştır) sahip olduğu belirlenmiş ve denemelerde sadece bu konsantrasyon kullanılmıştır. ABE'larda toplam antosiyanin tayini yapılarak 3 mg antosiyanin içeren miktarları hesaplanmış (SHE'ndan 0.9009g/100 mL miks ve KLE'ndan 0.3778g/100 mL miks) dondurmaların renklendirilmesinde kullanılmışlardır.

Farklı ABE'lar ile renklendirilen dondurma örneklerinin 0. gün kuru madde, kül ve pH değerleri Tablo 4.24.'te verilmiştir.

Tablo 4.24. Dondurma örneklerinin kuru madde, kül ve pH değerleri (0. gün)

	Kontrol	Karmin	SHE	KLE
pH	6.67±0.01	6.71±0.02	6.53±0.04	6.57±0.01
% Kuru madde	26.30±0.24	26.36±0.29	26.94±0.70	26.37±0.54
% Kül	0.51±0.03	0.52±0.04	0.60±0.03	0.55±0.04

SHE: Siyah havuç ekstraktı, KLE: Kırmızı lahana ekstraktı.

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 4.25.'de verilmiştir.

Tablo 4.25. Farklı ABE'lar ve karminle renklendirilen dondurma örneklerinin toplam fenolik madde miktarlarındaki (TFM) ve antiradikal aktivitelerindeki değişim

	Depolama Süresi*	Kontrol	Karmin	SHE	KLE
TFM** (mg/kg)	0	0.39±0.16	0.42±0.34	138.20±2.43	67.28±2.56
	30	0.31±0.25	0.36±0.32	133.93±1.83	66.73±4.36
	60	0.29±0.14	0.31±0.24	130.15±1.22	65.40±0.98
	90	0.27±0.18	0.27±0.28	131.67±2.06	64.70±5.51
Antiradikal aktivite (%)	0	1.91±0.84	2.00±0.66	43.82±1.97	36.19±1.25
	30	1.43±0.63	2.04±0.78	41.51±1.60	35.63±1.65
	60	1.08±0.48	1.69±0.92	40.49±2.62	33.74±2.45
	90	1.18±0.92	1.06±0.81	40.11±1.90	33.58±2.80

*: Gün, **TFM: Toplam fenolik madde, SHE: Siyah havuç ekstraktı, KLE: Kırmızı lahana ekstraktı.

4.5.2.2. Dondurmaların antiradikal aktivitelerinde meydana gelen değişimler

Araştırmanın depolama sürecinde dondurma örneklerinin antiradikal aktivitelerindeki değişim Tablo 4.25.'de görülmektedir. En yüksek antiradikal aktiviteye sahip olan örneklerin %43.82-40.11 inhibisyon kapasiteleri ile SHE ile renklendirilen örnekler olduğu bulunmuştur.

4.5.2.3. Dondurmaların renginde meydana gelen değişimler

Farklı antosiyanin kaynaklarından elde edilen ekstraktlar veya karminle renklendirilen dondurma örneklerinin renk parametrelerinde meydana gelen değişim Tablo 4.26.'da verilmiştir.

Tablo 4.26. Farklı ABE'lar ile renklendirilen dondurma örneklerinin L^* , a^* , b^* , h^o ve C^* değerleri

	Depolama Süresi*	Kontrol (Sade)	Karmin	SHE	KLE
L^*	0	68.55±0.88	67.40±0.52	57.70±0.85	58.55±2.94
	30	68.52±0.38	65.91±1.06	57.20±0.65	58.15±0.45
	60	68.48±0.60	66.58±1.48	55.21±2.32	58.33±1.19
	90	68.38±1.81	63.69±1.33	52.72±1.08	56.82±1.33
a^*	0	0.07±0.07	7.58±0.24	8.03±0.77	5.29±0.32
	30	0.06±0.05	7.25±0.24	7.62±0.28	5.30±0.40
	60	0.02±0.02	7.22±0.21	7.66±0.27	5.09 ^c ±0.26
	90	0.02±0.02	6.63±0.20	7.59±0.12	4.92±0.15
b^*	0	3.8±0.32	0.24±0.06	0.77±0.17	-3.69±0.29
	30	3.50±0.35	0.64±0.21	1.01±0.26	-3.45±0.37
	60	3.41±0.37	0.69±0.20	1.22±0.27	-3.96±0.59
	90	2.45±0.20	0.60±0.17	1.44±0.08	-4.36±0.57
h^o	0	89.07±0.90	1.85±0.48	5.54±1.33	325.48±3.32
	30	89.02±0.79	5.08±1.74	7.58±2.10	326.95±3.12
	60	89.69±0.38	5.45±1.61	9.04±2.04	322.34±4.96
	90	89.51±0.41	5.22±1.48	10.75±0.45	318.62±3.39
C^*	0	3.81±0.32	7.58±0.24	8.00±0.77	6.45±0.22
	30	3.50±0.35	7.29±0.22	7.69±0.26	6.33±0.43
	60	3.41±0.37	7.26±0.20	7.76±0.24	6.46±0.42
	90	2.45±0.20	6.66±0.19	7.73±0.13	6.59±0.45

: Gün, L^ : Parlaklık, a^* : Kırmızılık, b^* : Sarılık, C^* : Renk yoğunluğu, h^o : Renk tonunu ifade etmektedir. SHE: Siyah havuç ekstraktı, KLE: Kırmızı lahana ekstraktı

4.5.2.4. Dondurmaların duyuşsal olarak değerlendirilmesi

Dondurmaların depolama sürecinde duyuşsal olarak değerlendirilen renk, tat, koku ve genel beğeni kriterlerinde meydana gelen değişimler Tablo 4.27.'de görülmektedir.

Tablo 4.27. Farklı ABE'lar ile renklendirilen dondurma örneklerinin duyuşsal analiz bulguları

	Depolama Süresi*	Kontrol	Karmin	SHE	KLE
Renk	0	8.39±0.85	8.11±0.83	8.39±0.50	8.00±0.97
	30	8.39±0.50	8.11±0.83	8.28±0.67	8.11±0.90
	60	7.89±1.23	8.11±0.96	8.06±0.87	8.00±0.84
	90	7.89±0.90	7.83±1.10	7.11±0.83	7.44±0.62
Tat	0	8.28±1.07	7.78±0.88	8.44±1.04	5.50±2.15
	30	8.22±0.55	7.78±1.26	8.50±0.71	5.67±2.14
	60	7.94±1.06	7.17±1.47	7.67±1.14	5.83±1.58
	90	7.89±0.90	6.44±1.82	7.56±1.25	5.39±1.33
Koku	0	7.89±1.53	8.00±0.77	8.17±0.62	5.56±2.06
	30	8.39±0.85	8.06±0.80	8.17±0.99	6.28±1.69
	60	7.83±1.04	7.22±1.56	7.67±1.14	5.78±1.73
	90	7.89±0.83	6.61±1.88	7.50±0.99	5.78±1.22
Genel Beğeni	0	8.28±1.07	8.00±0.77	8.33±0.69	5.56±1.82
	30	8.50±0.62	8.06±0.87	8.33±0.69	6.17±1.69
	60	7.89±1.13	7.28±1.36	7.83±1.04	5.94±1.59
	90	7.89±0.83	6.56±2.09	7.56±0.78	5.94±1.16

*: Gün, SHE: Siyah havuç ekstraktı, KLE: Kırmızı lahana ekstraktı. 1, kabul edilemez - 9, fazlasıyla beğendim.

4.5.3. Şekerleme

Farklı ABE'lar ve karmin ile renklendirilen şekerleme örneklerinin 0. gün kuru madde, kül ve pH değerleri Tablo 4.28.'de verilmiştir.

Tablo 4.28. Şekerleme örneklerinin kuru madde, kül ve pH değerleri (0. gün)

	Karmin	SHE	KLE
pH	3.68±0.02	3.66±0.01	3.66±0.02
% Kuru madde	86.55±0.11	86.57±0.22	86.56±0.11
% Kül	0.02±0.02	0.02±0.01	0.02±0.01

SHE: Siyah havuç ekstraktı, KLE: Kırmızı lahana ekstraktı.

4.5.3.1. Şekerlemelerin renginde meydana gelen değişimler

Tablo 4.29.'da şekerleme örneklerinin 6 ay süreyle 20°C sıcaklıkta depolanmaları sonucu L^* , a^* , b^* , h° ve C^* değerlerinde meydana gelen değişimler görülebilmektedir.

Tablo 4.29. Farklı ABE'lar ve karminle renklendirilen şekerlemelerin L^* , a^* , b^* , h^o ve C^* değerleri

	Depolama Süresi*	Karmin	SHE	KLE
L^*	0	16.84±0.59	13.09±1.43	14.55±0.46
	30	15.46±1.28	11.89±0.78	13.74±1.72
	60	15.37±0.96	11.89±1.21	14.06±0.98
	90	16.10±0.69	11.82±1.13	13.47±1.41
	120	16.05±0.89	10.45±2.13	14.73±1.13
	150	15.56±1.29	10.28±2.60	13.30±1.20
	180	15.19±0.50	11.10±0.33	15.35±1.01
a^*	0	12.76±1.70	11.40±1.21	11.37±1.10
	30	13.58±0.93	11.18±1.49	10.70±1.19
	60	12.90±1.80	10.36±1.51	9.92±0.97
	90	11.81±1.74	10.10±1.67	9.64±1.28
	120	12.38±1.01	11.34±2.03	10.06±1.86
	150	10.33±1.23	9.96±1.30	9.49±2.19
	180	10.27±0.52	8.66±0.95	9.86±0.65
b^*	0	2.14±0.54	1.89±0.85	-0.62±0.12
	30	2.00±0.27	2.17±0.39	-0.51±0.46
	60	2.04±0.89	2.17±0.41	-0.57±0.37
	90	2.18±1.27	2.51±0.95	-0.40±0.28
	120	2.22±0.85	2.38±0.68	-0.64±0.27
	150	2.51±0.30	2.62±0.57	-0.63±0.24
	180	2.74±1.20	2.56±0.32	-0.83±0.37
h^o	0	9.60±2.65	9.51±4.21	356.82±0.71
	30	8.40±1.03	11.03±1.66	357.06±2.82
	60	8.61±3.05	12.09±2.98	356.57±2.44
	90	9.85±5.37	13.44±3.49	357.64±1.63
	120	10.03±3.23	11.84±2.84	356.13±1.94
	150	13.79±2.10	14.71±1.99	356.19±1.36
	180	14.74±6.22	16.64±3.00	355.25±1.92
C^*	0	12.95±1.69	11.59±1.20	11.39±1.09
	30	13.73±0.94	11.39±1.51	10.72±1.17
	60	13.08±1.90	10.60±1.48	9.95±0.95
	90	12.06±1.87	10.42±1.83	9.65±1.28
	120	12.60±1.10	11.60±2.07	10.08±1.85
	150	10.64±1.20	10.30±1.37	9.52±2.19
	180	10.69±0.64	9.04±0.90	9.90±0.67

: Gün, L^ : Parlaklık, a^* : Kırmızılık, b^* : Sarılık, C^* : Renk yoğunluğu, h^o : Renk tonunu ifade etmektedir. SHE: Siyah havuç ekstraktı, KLE: Kırmızı lahana ekstraktı.

4.5.3.2. Şekerlemelerin duysal olarak değerlendirilmesi

Şekerleme örneklerine ait renk, tat, koku ve genel beğeni skorları Tablo 4.30.'da verilmiştir.

Tablo 4.30. Farklı ABE'lar ve karmin ile renklendirilen şekerlemelerin duyu analizi bulguları

	Depolama Süresi*	Karmin	SHE	KLE
Renk	0	8.17±0.79	8.61±0.50	8.44±0.62
	30	8.28±0.46	8.33±0.59	8.28±1.13
	60	8.17 ±0.92	8.33 ±0.69	8.22±1.00
	90	8.17 ±0.92	8.17 ±0.92	8.28±0.96
	120	8.17 ±0.92	8.17 ±0.71	8.28 ^a ±0.83
	150	7.89±1.02	8.06 ±0.73	7.94±0.94
	180	7.61±1.09	7.78±1.06	7.39±1.65
Tat	0	8.00±0.91	8.33±0.69	6.78±0.73
	30	8.28±0.67	8.33±0.49	6.81±0.82
	60	8.17±0.86	8.33±0.59	6.89±1.45
	90	8.00±0.91	8.00±1.03	6.78±1.73
	120	7.67±0.97	8.00±0.00	6.28 ^c ±0.89
	150	7.67±0.91	7.89±0.58	6.17±1.58
	180	7.39±0.98	7.67±0.84	6.17±1.72
Koku	0	8.50±0.51	8.83±0.38	7.00±1.37
	30	8.00±0.59	8.33±0.59	7.00±1.19
	60	8.00±0.59	8.33±0.49	6.89±1.13
	90	8.06±0.87	7.94±0.94	6.61±1.50
	120	7.67±0.97	7.89±0.83	6.56±1.50
	150	7.28±1.32	8.11±0.68	6.67±1.53
	180	7.39±0.61	7.67±0.69	6.61±1.09
Genel Beğeni	0	8.00±0.77	8.56±0.70	6.67±1.57
	30	8.25±0.65	8.33±0.59	6.78±0.81
	60	8.06±0.87	8.44±0.51	6.94±1.16
	90	8.17±0.92	7.94±1.00	6.69±1.38
	120	7.83±0.79	7.94±0.54	6.67±1.08
	150	7.56±1.10	8.06±0.64	6.50±1.42
	180	7.56±1.04	7.61±0.61	6.28±1.64

*: Gün, SHE: Siyah havuç ekstraktı, KLE: Kırmızı lahana ekstraktı. 1, kabul edilemez - 9, fazlasıyla beğendim.

4.5.4. Çemen

Çemen örneklerinin pH, kuru madde ve kül değerleri Tablo 4.31.'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.

Tablo 4.31. Farklı ABE'lar ve karmin ile renklendirilen çemen örneklerinin pH, kül ve kuru madde değerleri (0. gün)

	Kontrol	Karmin	SHE	KLE
% Kül	2.54±0.05	2.55±0.05	2.63±0.01	2.60±0.08
% Kuru madde	43.21±0.81	43.23±0.33	43.73±0.36	43.48±0.84
pH	5.85±0.01	5.85±0.01	5.84±0.02	5.85±0.01

SHE: Siyah havuç ekstraktı, KLE: Kırmızı lahana ekstraktı.

4.5.4.1. Çemenlerin renginde meydana gelen değişimler

Araştırmada kullanılan çemen örneklerinin L^* , a^* , b^* , h° ve C^* değerlerinde meydana gelen değişim Tablo 4.32.'de verilmiştir.

Tablo 4.32. Farklı ABE'lar ve karminle renklendirilen çemenlerin depolanma sürecinde L^* , a^* , b^* , h° ve C^* değerlerindeki değişimler

	Depolama Süresi*	Kontrol	Karmin	SHE	KLE
L^*	0	40.08±0.88	38.14±0.75	35.29±1.84	35.60±1.17
	1	39.40±0.39	35.74±0.54	35.16±0.65	35.33±0.37
	3	39.39±0.22	37.30±0.40	35.03±1.36	35.71±0.50
	5	39.07±0.68	37.65±0.58	34.54 ^c ±0.42	35.16±0.47
	7	34.19±0.21	31.12±0.68	32.55±2.69	34.01±0.62
	14	31.08±0.48	29.76±0.76	30.29±1.06	30.48±0.46
	21	30.74±0.72	30.59±0.57	29.20±0.70	30.85±0.34
a^*	0	16.85±0.55	18.80±0.42	14.00±1.02	15.21±0.41
	1	24.09±0.28	25.19±0.58	21.90±0.57	23.32±0.82
	3	21.26±0.57	25.56±0.54	19.16±0.80	18.68±0.39
	5	23.25±1.28	20.91±0.50	18.84±0.18	18.37±0.19
	7	21.15±0.46	22.23±0.49	16.56±0.55	15.00±0.34
	14	17.90±0.80	18.44±0.44	15.15±0.34	14.35±0.24
	21	15.66±0.81	16.61±0.63	14.26±0.39	13.77±0.49
b^*	0	41.34±0.37	39.68±0.41	34.62±1.21	37.49±0.34
	1	41.70±0.28	39.51±0.41	38.36±0.28	38.30±0.64
	3	39.33±0.38	38.67±0.68	32.88±0.30	33.45±0.51
	5	39.75±0.45	33.76±0.40	30.93±0.18	32.67±0.36
	7	32.98±0.83	31.96±0.43	24.29±1.16	21.93±0.39
	14	29.66±0.24	28.00±0.63	29.46±0.27	21.52±0.65
	21	24.41±0.33	22.46±0.77	24.81±0.70	22.09±0.75
h°	0	67.86±0.72	64.68±0.63	68.02±1.27	67.95±0.55
	1	60.02±0.38	57.51±0.55	60.31±0.67	58.70±0.92
	3	61.64±0.73	56.56±0.79	59.81±0.98	60.85±0.23
	5	59.72±1.43	58.26±0.67	58.68±0.27	60.67±0.38
	7	57.35±0.39	55.20±0.85	55.72±1.23	55.65±0.73
	14	58.94±1.07	56.66±0.72	62.82±0.46	56.33±1.04
	21	57.36±1.32	53.55±0.66	60.14±0.98	58.07±1.14
C^*	0	44.65±0.36	43.92±0.33	37.35±1.34	40.46±0.37
	1	48.16±0.24	46.86±0.55	44.17±0.37	44.85±0.75
	3	44.71±0.37	46.36±0.59	38.06±0.56	38.31±0.62
	5	46.07±0.71	39.71±0.43	36.22±0.18	37.48±0.32
	7	39.18±0.91	38.93±0.31	29.40±1.11	26.57±0.39
	14	34.65±0.53	33.53±0.64	33.12±0.34	25.87±0.51
	21	29.01±0.57	27.94±0.94	28.62±0.63	26.04±0.73

: Gün, L^ : Parlaklık, a^* : Kırmızılık, b^* : Sarılık, C^* : Renk yoğunluğu, h° : Renk tonunu ifade etmektedir. SHE: Siyah havuç ekstraktı, KLE: Kırmızı lahana ekstraktı.

5. BÖLÜM

TARTIŞMA-SONUÇ VE ÖNERİLER

5.1. Antosiyanin Kaynaklarının Bazı Analitik Özellikleri

Araştırma kapsamında antosiyanin kaynağı olarak kullanılan siyah havuç ve kırmızı lahanaların bazı genel bileşim unsurları belirlenmiştir (Tablo 4.3.). Siyah havucun kuru madde, kül, toplam şeker ve indirgen şeker miktarları sırası ile %14.05, %0.96, %7.28 ve %2.33 olarak tespit edilmiştir. Kırmızı lahana örneklerinin kuru madde, kül, toplam şeker ve indirgen şeker miktarları sırası ile %8.15, %0.77, %5.26 ve %5.00 olarak belirlenmiştir. Örneklerin pH değeri 6.26, titrasyon asitliği ise susuz sitrik asit cinsinden %0.13 olarak tespit edilmiştir.

5.4. Farklı ekstraksiyon yöntemleri ile elde edilen antosiyanin bazlı ekstraktların biyoaktif özelliklerinin belirlenmesi

5.4.1. Farklı ekstraksiyon yöntemleri ile elde edilen antosiyanin bazlı ekstraktların fenolik bileşimleri

Antosiyanin kaynaklarının ekstraksiyonunda da çözen olarak AES'nin kullanılması halinde ekstraktların toplam fenolik madde miktarının su ekstraktlarından daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Örneğin kırmızı lahananın klasik ekstraksiyon yöntemiyle elde edilen su ve etanol:su ekstraktlarının sırası ile 20.68 ve 38.72 mg GAE/g kuru ekstrakt düzeylerinde toplam fenolik madde içerdiği saptanmıştır. Diğer bir antosiyanin kaynağı olan siyah havucun klasik ekstraksiyonla elde edilen su ve etanol:su ekstraktlarının toplam fenolik madde miktarlarının ise 21.89 ve 31.55 mg GAE/g kuru ekstrakt seviyelerinde olduğu tespit edilmiştir (Tablo 4.5). Solvent kompozisyonunun yoğunluk ve dinamik vizkozite gibi parametreleri etkileyerek, difüzyonu ve ekstraksiyon oranlarını etkilediği bilinmektedir [116].

Genel olarak ultrason uygulamasının siyah havuç ve kırmızı lahana ekstraktlarında toplam fenolik madde miktarının artmasına neden olduğu belirlenmiştir.

Siyah havuca PEF uygulanması sonucunda 1 g kuru ekstraktın 23.84 mg GAE düzeyinde fenolik madde içerdiği saptanmıştır. Siyah havuçta çözgen olarak suyun kullanıldığı klasik ve ultrason ekstraksiyon uygulamalarında bu değer sırası ile 21.89 ve 25.99 mg GAE/g kuru ekstrakt olarak belirlenmiştir. En yüksek toplam fenolik madde içeriğine sahip olan siyah havuç ekstraktının %0.1 HCl ile asitlendirilmiş 1:1 etanol:su karışımının çözgen olarak kullanıldığı ultrason uygulamasında elde edilen örnek olduğu saptanmıştır (35.44 mg GAE/g kuru ekstrakt).

Kırmızı lahana örneklerinin ekstraksiyonunda çözgen olarak suyun kullanıldığı uygulamalarda fenolik madde miktarları dikkate alındığında, yöntemlerin etkinliği PEF (25.18 mg GAE/g kuru ekstrakt) > ultrason (21.71 mg GAE/g kuru ekstrakt) > klasik (20.68 mg GAE/g kuru ekstrakt) ekstraksiyon olarak belirlenmiştir. AES'nin kırmızı lahanalarda da fenolik madde ekstraksiyonunu olumlu yönde etkilediği belirlenmiş olup, ultrason ve klasik ekstraksiyonlarında fenolik madde miktarları sırası ile 39.88 ve 38.72 mg GAE/g kuru ekstrakt düzeyinde belirlenmiştir. PEF uygulaması ile elde edilen ekstraktların toplam fenolik madde miktarları beklenenin aksine düşük bulunmuştur. Bunun 3 kV/cm şiddetindeki elektrik alan uygulamasının örneklerdeki polifenoloksidaz enzimini inaktive edememesi nedeni ile olabileceği düşünülmektedir. PEF uygulanmış örneklerde hücre klasik ekstraksiyona göre daha çok parçalanmakta ve fenoliklerle polifenoloksidaz enzimi daha çok bir araya gelebilmektedir. Enzimin inaktive edilmemesi nedeni ile de PEF işlemini izleyen 2 saatlik ekstraksiyon sırasında fenoliklerin parçalandığı düşünülmektedir. Nitekim PEF uygulamasının polifenoloksidaz enzimi üzerine olan etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada, 24 kV/cm düzeyinde bipolar tarzda 20 µs süreyle uygulanan 300 adet vurgunun elmanın polifenoloksidaz miktarını %97 düzeyinde azalttığı belirlenmiştir. Artan vurgu şiddetinin veya vurgu sayısının inaktivasyon seviyesini arttırdığı saptanmıştır. Benzer şekilde şeftali polifenoloksidaz seviyesinin bipolar tarzda 24 kV/cm düzeyinde PEF uygulaması ile %70 azaldığı belirtilmektedir [117]. Bir diğer çalışmada PEF işleminin 15-80 kV/cm elektrik alan şiddetinde, vurgu sıklığı 1-100 arasında değişmek sureti ile 1-100 µs süreyle uygulanması halinde bakteriler ve enzimlerin inaktivasyonu için yeterli olduğu bildirilmektedir [29]. Oysa bu çalışmada uygulanan elektrik alan şiddeti 3 kV/cm düzeyinde olup, bu uygulamanın polifenoloksidaz enzimini inaktive etmediği ve bu nedenle PEF uygulaması ile elde edilmiş

siyah havuç ve kırmızı lahana ekstraktlarının toplam fenolik madde miktarlarının özellikle çözgen olarak AES'nin kullanıldığı ultrason tekniği ve klasik ekstraksiyon yöntemleri ile elde edilen ekstraktlardan daha düşük olduğu düşünülmektedir.

PEF uygulamalarının fenolik madde üzerine olan etkilerinin araştırıldığı çok az sayıda araştırma bulunmaktadır. Örneğin bir çalışmada 35 kV/cm şiddetinde, 750 µs süreyle 4 µs bipolar vurgu uygulanan portakal sularında toplam flavonon, flavanon glikozitleri veya bunların aglikonları olan hesperidin ve naringenin miktarlarının pek değişmediği belirtilmektedir [90]. Elde edilen bulgular bu literatüre benzerlik arz etmektedir.

5.4.2. Farklı ekstraksiyon yöntemleri ile elde edilen antosiyanin bazlı ekstraktların antosiyanin miktarları

Çözgen olarak su yerine AES'nin kullanılması durumunda her iki antosiyanin kaynağından elde edilen ekstraktlarda da antosiyanin miktarlarının arttığı belirlenmiştir.

Kırmızı lahanaların ekstraksiyonunda çözgen olarak suyun kullanıldığı PEF, ultrason ve klasik ekstraksiyon uygulamalarıyla elde edilen ekstraktların antosiyanin miktarları sırası ile 6.85, 5.88 ve 3.83 mg siy-3-glikozit/g kuru ekstrakt düzeylerinde tespit edilmiştir. Saf suyun çözgen olarak kullanıldığı bir çalışmada PEF (2.5 kV/cm elektrik alan şiddeti; 15 µs vurgu genişliği; 50 vurgu sayısı) uygulanmış kırmızı lahana ekstraktlarının antosiyanin miktarı 3.46 mg/mL iken, kontrol örneğinin (4 saat 22°C'de karanlık bir ortamda saf su ile çalkalanması ile elde edilen ekstrakt) 1.65 mg/mL düzeyinde toplam antosiyanin içerdiği belirlenmiştir [92].

Araştırmada antosiyanin içeriği siyah havuç ekstraktlarında 4.62-1.37 mg/g kuru ekstrakt düzeyinde saptanmıştır. Siyah havucun su ekstraktlarını kendi aralarında kıyasladığımızda, en düşük antosiyanin miktarının klasik yöntemle elde edilen ekstraktlarda 1.37 mg siy-3-glikozit/g kuru ekstrakt düzeyinde saptandığı görülmektedir. Bunu sırası ile ultrason (1.68 mg siy-3-glikozit/g kuru ekstrakt) ve PEF (1.95 mg siy-3-glikozit/g kuru ekstrakt) teknikleri ile elde edilen ekstraktların izlediği belirlenmiştir.

Çalışmada ultrasonik ekstraksiyonda çözgen olarak AES kullanıldığında tüm antosiyanin kaynaklarından 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.

5.4.3. Farklı ekstraksiyon yöntemleri ile elde edilen antosiyanin bazlı ekstraktların 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, siyah havucun su ekstraktlarının antioksidan kapasiteleri 27.92-32.89 mg AAE/g kuru ekstrakt iken, AES ekstraktlarının 29.86-32.98 mg AAE/g kuru ekstrakt düzeylerinde antioksidan kapasiteye sahip olduğu belirlenmiştir (Tablo 4.7.). 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 [26].

Örnekler arasında en düşük antioksidan aktiviteye siyah havucun su ekstraktlarının sahip olduğu saptanmıştır. Bunun su fraksiyonuna geçen fenolik ve antosiyaninlerin yapısından kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Nitekim siyah havucun su ekstraktlarının antosiyanin (1.37-1.95 mg siy-3-glikozit/g kuru ekstrakt) ve fenolik madde miktarları da (21.89-23.84 mg GAE/g kuru ekstrakt) genel olarak düşüktür. Fenolik bileşiklerin antioksidan kapasiteleri reaksiyona girebilecek hidroksil grubu sayısıyla orantılıdır. Nitekim farklı model sistemler içerisinde B halkasında 3', 4' ve 5' pozisyonlarında hidroksil içeren flavonoidler üzerinde yapılan çalışmalar, aynı halkada sadece bir hidroksil içeren flavonoidlerden çok daha yüksek antioksidan aktivite sergilediklerini ortaya koymaktadır [118].

Kırmızı lahana ekstraktları arasında PEF yöntemi ile elde edilen ekstraktının 41.74 mg AAE/g kuru ekstrakt düzeyi ile en yüksek antioksidan aktiviteye sahip oldukları saptanmıştır. Burada da kırmızı lahananın PEF ekstraktının bileşiminde özellikle asillenmiş yapıdaki antosiyanin miktarındaki artışa bağlı olabileceği düşünülmektedir. Nitekim farklı kırmızı lahana çeşitlerinde antioksidan aktivitenin 24.2-30.3 μ mol TE/g olarak belirlendiği bir çalışmada antioksidan kapasitesi en yüksek olan çeşidin asillenmiş antosiyaninlerce en zengin olan çeşit olduğu vurgulanmaktadır [44].

5.4.4. Farklı ekstraksiyon yöntemleri ile elde edilen antosiyanin bazı ekstraktların antiradikal kapasiteleri

Genel olarak en yüksek antiradikal aktivitenin ultrason uygulamalarında çözgen olarak AES kullanılması halinde ortaya çıktığı belirlenmiştir. ABE'lar arasında en yüksek antiradikal aktivitenin AES'nin çözgen olarak kullanıldığı kırmızı lahana örneklerinin klasik yöntemle elde edilen ekstraktlarına ait olduğu görülmektedir (102.62 µg/mL).

Siyah havucun ultrason uygulaması ile elde edilen su ekstraktının antiradikal aktivitesi 150.35 µg/mL iken, PEF ve klasik ekstraksiyon yöntemleri ile elde edilen örnekler için bu değer sırası ile 173.81 µg/mL ve 177.40 µg/mL olarak belirlenmiştir.

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 [98]. 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 [26; 44; 118].

5.4.5. Farklı ekstraksiyon yöntemleri ile elde edilen antosiyanin bazı ekstraktların agar difüzyon yöntemi ile antimikrobiyal aktivitelerinin belirlenmesi

Ultrason ve PEF teknikleri veya klasik yöntemler ile ekstrakte edilen ve çözgen olarak su veya AES ile ekstrakte edilen ABE'ların ikisi maya olmak üzere toplam 15 farklı mikroorganizma üzerindeki inhibitif etkileri belirlenmeye çalışılmıştır. Genel olarak antimikrobiyal aktiviteleri değerlendirildiğinde KLE ve SHE'larının *S. cerevisiae* ve *C. albicans* üzerine antimikrobiyal etkilerinin olmadığı saptanmıştır. Ekstraktların en etkili dozunun %10'luk konsantrasyonları olduğu belirlenmiştir. Etanol:su ekstraktlarının su ekstraktlarından daha aktif olduğu belirlenmiştir.

PEF uygulaması ile elde edilen kırmızı lahana ekstraktlarının %5 ve %10 konsantrasyonlarda etkili olduğu belirlenmiştir. Bu ekstraktların *B. cereus* F2 (7.5-11.0 mm), *B. cereus* FMC 19 (9.0-12.5 mm) ve *S. aureus* ATCC 1135 (6.0-8.5 mm) üzerine antimikrobiyal etkisinin olduğu belirlenmiştir. Kırmızı lahanaların ultrasonik ve klasik ekstraksiyonlarında çözgen olarak su

kullanıldığında elde edilen ekstraktların antimikrobiyal etkiye sahip olmadıkları saptanmıştır. Kırmızı lahana ekstraksiyonunda da etanol:suyun çözen olarak kullanılması halinde antimikrobiyal etkilerinin daha yüksek olduğu belirlenmiş olup, genel olarak ultrasonik ekstraksiyonla elde edilen ekstraktların daha yüksek antimikrobiyal etkiye sahip olduğu tespit edilmiştir. Örneğin, %10 konsantrasyonda hazırlanan ultrason tekniği veya klasik ekstraksiyon yöntemleri ile elde edilen etanol:su ekstraktlarının *L. monocytogenes*'e karşı oluşturdukları inhibisyon zonları sırası ile 14.0 mm ve 12.5 mm olarak belirlenmiştir. Kırmızı lahanaların ultrasonik ve klasik ekstraksiyon uygulamalarında çözen olarak suyun kullanılması halinde elde edilen ekstraktların hiçbir antimikrobiyal özellik taşımadığı saptanmıştır.

Siyah havuçlarda da kırmızı lahana ekstraktlarına benzer sonuçlar elde edilmiş olup, SHE'nin en çok *L. monocytogenes*, *B. cereus* F2 ve *P. aurogenosa* üzerine etkili olduğu saptanmıştır. Çözen olarak sadece saf suyun kullanıldığı PEF uygulamasında SHE'lerinin hiçbir mikroorganizma üzerine etkili olmadığı belirlenmiştir. Siyah havuç örneklerinin klasik ekstraksiyonla elde edilen su ekstraktlarının tüm konsantrasyonlarda etkisiz olduğu belirlenirken, ultrasonik ekstraksiyonla elde edilen su ekstraktlarının ise *B. cereus* F2 (9.5 mm), *P. aeurogenesa* (6.5 mm) ve *B. subtilis* ATCC (7.0 mm) üzerine etkili olduğu saptanmıştır. Literatürde siyah havuç ve kırmızı lahana ekstraktlarının antimikrobiyal aktivitelerinin belirlenmediği saptanmıştır.

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 [67]. Tanenler, basit fenoller ve fenolik asitler antimikrobiyal aktiviteye sahip bileşiklerdir [119]. 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 [120]. Tanenlerin antimikrobiyal etkilerinin mikrobiyal enzimler ve hücre proteinleri ile oluşturduğu komplekslerden kaynaklandığı belirtilmektedir [119]. Tanenlerin antibakteriyel etkilerinin yanı sıra antifungal ve antiviral etkilerinin de olduğu aktarılmaktadır [121]. Çalışma kapsamındaki ABE'lerin genel olarak

Gram pozitif bakterilere karşı biraz daha etkili olduğu belirlenmiş olup, bu sonuç literatür verileri ile uyum içerisindedir. Nitekim fenolik bileşiklerin genellikle Gram pozitif bakterilere karşı daha yüksek antimikrobiyal etkiye sahip oldukları belirtilmektedir [122]. 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. Proantosiyantinler metal iyonlarını şelatlayarak lipopolisakkarit yapısını etkilemektedir. Yapılan çalışmalarda ahududu polifenollerinin EDTA gibi lipopolisakkarit yapıyı parçalayarak, en dıştaki membranın geçirgenliğini arttırdığı belirlenmiştir. Antosiyantinlerin hidroksil, metoksil, şeker ve şeker substitue grupları antosiyantin stabilitesini etkileyen faktörler arasında yer almaktadır ve bu yapısal farklılıklar antosiyantinlerin iyon şelatör olarak görev üstlenmelerinde etkili olmaktadır [67].

5.3. Antosiyantinlerin ısıl stabilitelerinin belirlenmesi

5.3.1. Antosiyantin bazı ekstraktların tampon çözeltilerde ısıl stabiliteleri

Antosiyantinler özellikle düşük pH değerlerinde daha yüksek stabilizasyon sergilemelerinin [21] yanı sıra meyve sularının pH değerlerinin genellikle 3-4 aralığında bulunması [123] nedeni ile çalışma için bu pH değerleri seçilmiştir. pH değerleri 3 ve 4 olan tampon çözeltilere depolanan elma sularının renklendirilmesinde kullanılan konsantrasyonda ABE ilavesi yapılarak, örnekler 90°C sıcaklıkta 3 saat süreyle ısıl işleme maruz bırakılmıştır. pH derecesi 3 olan tampon çözeltilerde 90°C’de 180 dakika süreyle ısıl işleme maruz bırakılmaları halinde SHE ve KLE için kayıplar sırası ile %53.04 ve %45.07 olarak belirlenmiştir. Kırmızı lahana antosiyantinlerinin ısıl stabilitesinin özellikle diasillenmiş yapılarından kaynaklandığı belirtilmektedir [124; 125]. pH değeri 4 olan tampon çözeltilerde renklendirici olarak kullanılan iki ekstraktta da antosiyantin kaybının pH 3’te saptanan kayıplara yakın olduğu saptanmıştır. Bu sonucun pH değerlerinin birbirine son derece yakın olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Nitekim pH değerleri 3 ve 4 olan tampon çözeltilerde siyah

havuç antosiyaninlerinin ısıl stabilitesinin incelendiği bir çalışmada da 90°C sıcaklıkta antosiyaninlerin her iki tampon içerisinde de yarılanma surelerinin 6.3 saat olduğu aktarılmaktadır [21].

5.3.2. Antosiyanin bazı ekstraktların elma sularında ısıl stabiliteleri

Elma suları 40 mg antosiyanin/L düzeyinde farklı ABE'lar ile renklendirildikten sonra degradasyon kinetikleri hesaplanmıştır. Depolama surecindeki sıcaklığa bağlı olarak ortaya çıkan antosiyanin degradasyonunun birinci dereceden reaksiyon kinetiğine uyduğu birçok araştırımcı tarafından bildirilmektedir [70; 89; 106; 107; 126; 127]. KLE antosiyaninlerinin hız sabitleri 70, 80 ve 90°C için sırası ile 0.46×10^{-3} , 0.92×10^{-3} ve $2.30 \times 10^{-3} \text{ dak}^{-1}$ olarak belirlenmiş olup, antosiyanin kaynakları arasında ısıl işleme en dayanıklı antosiyanin kaynağının bu grup olduğu sonucuna ulaşılmıştır (Tablo 4.12.). Siyah havuç antosiyaninleri için hız sabitleri 70°C'de 0.92×10^{-3} , 80°C'de 1.84×10^{-3} , 90°C'de ise $3.22 \times 10^{-3} \text{ dak}^{-1}$ olarak belirlenmiştir. 100 mL elma suyunun 1.5 g siyah havuç konsantresi ile renklendirildiği bir çalışmada 70, 80 ve 90°C sıcaklıklarda hız sabitleri sırası ile 0.69×10^{-3} , 1.15×10^{-3} ve $2.30 \times 10^{-3} \text{ dak}^{-1}$ olarak saptanmış [126] olup, çalışma kapsamında elde edilen sonuçlarla kıyaslandığında havuç suyu konsantresinin stabilitesinin SHE'ndan biraz daha yuksek olduğu sonucuna ulaşılmaktadır.

Ekstraktların ısıl işlem stabiliteleri KLE > SHE olarak belirlenmiş ve elde edilen veriler sonucunda asillenmiş yapıdaki antosiyanin içeriği yuksek olan ekstraktların ısıl stabilitelerinin daha yuksek olduğu sonucuna ulaşılmıştır.

5.4. Renklendirilen Gıdalar

5.4.1. Elma Suları

Farklı ABE'lar ile renklendirilen elma sularının briksleri dikkate alındığında kontrol grubunun 12.20° briks ile en düşk, SHE ile renklendirilen örneklerin ise 13.35° briks ile en yuksek briks değerine sahip olduğu belirlenmiştir (Tablo 4.14.).

5.4.1.1. Elma sularının toplam fenolik madde miktarlarında meydana gelen değişim

Elma sularının renklendirilmesi amacıyla 100 mL örneğe ABE'lardan 4 mg antosiyanin içeren ekstrakt ilavesi yapılmıştır. Bu amaçla, 100 mL elma suyuna SHE'ndan 1.20 g ve

KLE'ndan 0.50 g ilave edilerek, örnekler renklendirilmiştir. Daha önce de belirtildiği gibi ABE'ların içerdikleri toplam antosiyanin miktarları farklı olduğundan elma sularının renklendirilmesi için ilave edilmesi gereken ekstrakt miktarları farklı olmuştur.

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].

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]. 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 [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. Daha önce de belirtildiği gibi 4, 20 ve 30°C'de depolanan KLE ile renklendirilmiş örneklerin depolama sürecinde antosiyanin kayıpları sırasıyla %24.51, %30.44 ve %54.78 iken, SHE ile renklendirilen örneklerde meydana gelen değişimler ise sırasıyla %24.24, %36.52 ve %65.98 düzeylerinde belirlenmiştir.

Pigment degradasyonu depolama sıcaklığı, antosiyanin yapısı ve ekstraksiyon koşullarına bağlı olarak değişmekle birlikte [44], antosiyanin degradasyonunda en önemli parametreler pH ve sıcaklıktır [48, 130]. Çalışmalarda sıcaklığın aritmetik olarak artması ile antosiyanin kaybının logaritmik olarak arttığı bildirilmektedir [16; 130]. Siyah havuç konsantrelerinin 4, 20 ve 37°C sıcaklıklarda depolanarak stabilitelerinin incelendiği bir çalışmada sıcaklıktaki artışa bağlı olarak degradasyon hızının arttığı belirlenmiştir [126].

ABE'lar ile renklendirilmemiş olan kontrol örneklerinde antosiyanin saptanamamıştır. Her üç depolama sıcaklığında da en stabil antosiyanin kaynağının kırmızı lahana olduğu belirlenmiştir. Gıdaların doğal antosiyanin ekstraktı ilavesi ile renklendirilmesinde stabilizasyon üzerine antosiyanin kompozisyonunu önemli parametrelerden biridir [131]. Nitekim asillenmiş antosiyaninlerin asillenmemiş formdaki antosiyaninlerden daha stabil olduğu bilinmektedir [1; 41; 63; 126]

Asillenmiş olan antosiyaninlerin asillenmemiş formlarından daha yüksek termal stabiliteye sahip olduğu bilinmektedir. Siyah havuç [126] ve kırmızı lahana [70; 124; 125] antosiyaninlerinin yüksek stabilizasyonları asillenmiş formları ile ilişkilendirilmektedir.

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 4.16). Elma sularının 0. gün örneklerinin antiradikal kapasiteleri dikkate alındığında toplam fenolik madde içerikleri yüksek olan SHE ile renklendirilen örneklerin antiradikal kapasitelerinin de yüksek olduğu görülmektedir. Depolama sıcaklığı arttıkça örneklerin antiradikal kapasitelerindeki kayıpların daha çok olduğu belirlenmiştir.

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 [129].

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. 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 [132]. 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 [132].

Tüm sıcaklıklarda depolama süresinin uzamasıyla genel olarak ABE ile renklendirilen örneklerin a^* değerlerinde az da olsa azalmalar tespit edilmiştir. KLE ile renklendirilen örneklerin 4°C’de 180 gün depolama sonunda 9.85-5.33, 20°C’de 90 gün depolandığında 9.85-7.94 ve 30°C’de 60 gün depolandığında ise 9.85-8.74 aralığında a^* değerlerine sahip olduğu 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 [133].

Elma sularının b^* değerlerinde depolama süresince dalgalanmalar olmakla birlikte, 4°C sıcaklıkta depolanan örnekler arasında SHE ile renklendirilenlerde, 20°C’de depolanan örneklerden ise kontrol grubunun b^* değerlerinde meydana gelen değişimler istatistiksel

olarak önemli ($p<0.05$) 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 ABE ile renklendirilen örneklerde depolama sıcaklığındaki artışın b^* değerlerinin yükselmesine neden olduğu belirlenmiştir. Örneğin, başlangıç b^* değeri 1.59 olan SHE ile renklendirilen örneklerin en düşük b^* değerlerine sahip olduğu ve 4, 20 ve 30°C sıcaklıklarda depolama sonrasında sarılık göstergesi olan b^* değerlerinin sırası ile 1.66, 1.91 ve 2.14 değerlerine çıktığı belirlenmiştir. Benzer şekilde farklı ambalaj materyalleri ile depolanan nar sularının depolama süresince b^* değerlerinde artış gözlemlendiği bildirilmektedir [134]

Genel olarak depolama sıcaklığının artmasına bağlı olarak örneklerin h^o değerlerinin arttığı 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.

ABE ile renklendirilen örneklerin depolama süresince renk değişimlerinin L^* ve b^* değerlerinde artış ve a^* değerlerinde düşüş ile karakterize olduğu saptanmıştır. Örneklerin h^o değerlerinde artış gözlenirken, C^* değerlerinde ise düşüşler olduğu saptanmıştır. Genel olarak depolama sıcaklığının artmasıyla örneklerin rengindeki değişimlerin hızlandığı belirlenmiştir. Benzer şekilde depolama süresince antosiyanin açısından son derece zengin olan nar sularının rengindeki koyulaşma da h^o değerlerinde artış ve L^* değerlerindeki düşüşlerle karakterize edilmiştir. Örneklerin renk değerlerinde meydana gelen değişimin depolama sıcaklığının artışına paralel olarak arttığı belirtilmektedir [135].

5.4.1.5. Elma sularında meydana gelen duyuşal değişimler

Elma sularının duyuşal analiz sonuçları ABE ile renklendirilen örneklerin renk skorlarının kontrol grubundan daha yüksek olduğunu ortaya koymaktadır. Panelistler tarafından özellikle SHE ile renklendirilen örneklerin duyuşal olarak daha çok beğenildiği belirlenmiştir. Depolama sıcaklığındaki artışın duyuşal renk skorları üzerine çok etkili olmadığı görülmektedir. Örneğin, başlangıç skoru 8.50 olan SHE ile renklendirilen örneklerin 4, 20 ve 30°C sıcaklıklarda 60 gün süreyle depolanmaları sonrasında renk skorlarının sırası ile 8.11, 8.00 ve 7.72'ye düştüğünü ortaya koymaktadır. KLE ile renklendirilen örneklerin tat ve koku kriterleri açısından en kusurlu bulunan grup olduğu saptanmıştır. Tat ve koku kriterleri

dikkate alındığında SHE ile renklendirilen elma sularıyla birlikte kontrol örneklerinin de beğenildiği saptanmıştır.

Üç depolama sıcaklığında da depolama süresinin elma sularının genel beğeni skorları üzerine etkisinin, 4°C’de depolanan kontrol ile renklendirilen örneklerin haricinde istatistiksel olarak önemli olmadığı ($p>0.05$) belirlenmiştir. Örneklerin renklendirilmesinde kullanılan materyallerin elma sularının genel beğeni skorları üzerine etkisinin ise önemli ($p<0.05$) olduğu tespit edilmiştir. Elde edilen bulgular elma sularının renklendirilmesinde SHE’lerinin başarılı bir şekilde kullanılabileceğini ortaya koymaktadır.

5.4.2. Dondurma

5.4.2.1.Dondurmaların fizikokimyasal özellikleri

100 g dondurma miksine ABE’lerden 3 mg antosiyanin içerecek şekilde 0.9009 g SHE ve 0.3778 g KLE’lerinden 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 4.24). Dondurma örneklerinin kuru madde içeriklerinin %26.30-26.94 aralığında değiştiği saptanmıştır. En düşük kuru madde içeriği %26.30 değeri ile sade dondurmalarda saptanırken, en yüksek kuru madde içeriğine sahip grubun %26.94 değeri ile SHE ile renklendirilen örnekler olduğu belirlenmiştir. Bu sonucun ilave edilen SHE miktarının diğerlerinden biraz daha fazla olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Literatür çalışmaları dondurmaların kuru madde içeriklerinin genel olarak formülasyonlarına bağlı olarak değiştiğini ortaya koymaktadır. Örneğin, Kaçar ve Şahan [136], düşük kalorili dondurmaların kuru madde miktarlarının %22.22-27.39 aralığında bulunduğunu aktarırken, Çelik ve ark. [137], safranlı dondurma örneklerinin %33.14-33.88 düzeyinde kuru madde içerdiğini bildirmektedir. Yapılan bir diğer çalışmada, piyasadan toplanan sade ve meyveli dondurmaların kuru madde değerleri sırası ile %29.69-37.81 ile %26.46-32.67 aralıklarında belirlenmiştir [138]. Bazı pekmez çeşitlerinin dondurma üzerine etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada ise kuru madde değerlerinin %26.49-36.81 aralığında saptandığı bildirilmektedir [139]. Çay aromalı dondurma üretimi olanaklarının araştırıldığı bir çalışmanın bulguları ise dondurmaların %37.90-41.34 aralığında kuru madde içerdiğini ortaya koymaktadır [140].

Bu araştırmada, dondurma örneklerinin kül miktarları %0.51-0.60 aralığında belirlenmiştir. İlave edilen ekstrakt miktarının artmasına bağlı olarak örneklerin kül miktarlarının kontrole kıyasla arttığı saptanmış olup, en yüksek kül miktarı SHE ile renklendirilen örneklerde %0.60 düzeyinde saptanmıştır. Bu artışın ilave edilen ekstrakt miktarının fazla olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Örnekler arasında 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 [140], pekmez ilave edilen dondurmalarda ise bu değerin %0.76-1.02 düzeyinde olduğu aktarılmaktadır [139].

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, ABE ilavesinin pH değerlerinde hafif bir azalmaya sebep olmuştur. Dondurmaların renklendirilmesi amacıyla ilave edilen renklendirici materyallerin dondurmanın pH değeri üzerine olan etkisi istatistiksel olarak önemli ($p < 0.05$) bulunmuştur. Yapılan çalışmalarda dondurmaların pH değerlerinin farklı aralıklarda olduğu belirtilmektedir. Örneğin, yağ ikame maddeleri kullanılarak üretilen düşük kalorili dondurmaların 6.35-6.45 [136], Maraş usulü dondurmaların 6.42-6.64 [141], sade dondurmaların ise ortalama 6.52 [142] pH değerlerine sahip olduğu aktarılmaktadır. Yapılan bir diğer çalışmada, dondurmaların pH değerlerinin 6.56-6.65 aralığında olduğu belirtilmektedir [143]. Kola ilave edilerek üretilen dondurmaların pH değerlerinin kontrol grubunda 6.41, %1.5 oranında kola içeren örneklerde ise 5.13'e düştüğü bildirilmektedir [144].

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 4.25.). 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 [23] kontrol örneklerinde iz miktarda da olsa fenolik madde saptandığı düşünülmektedir. SHE ve KLE ile renklendirilen örneklerin 0. gün fenolik madde içerikleri sırası ile 138.20 ve 67.28 mg/kg düzeylerinde belirlenmiştir. Hwang ve ark. [25]'nın dondurmanın toplam fenolik madde tayininde kullandıkları metot uygulandığında SHE ve KLE'lerinin toplam fenolik madde miktarları sırası ile 15.171 ve 23.084 mg/g kuru ekstrakt olarak belirlenmiştir. 1 kg dondurma miksi SHE ve KLE'lerinden sırası ile 9.009 g, ve 3.778 g eklenerek renklendirilmiştir. Ekstraktların fenolik madde miktarları dikkate alındığında SHE ile renklendirilen örneğin 137.06 mg GAE/kg dondurma ((9.009 g x 15.171 mg GAE/g kuru ekstakt) + 0.39 mg GAE/kg = 137.06 mg GAE/kg dondurma), KLE ile renklendirilen örneğin ise 87.60 mg GAE/kg dondurma ((3.778 g x 23.084 mg GAE/g kuru ekstakt) + 0.39 mg GAE/kg = 87.60 mg GAE/kg dondurma) düzeyinde fenolik madde içermesi beklenmekteydi. SHE'nin dondurmanın işlenmesi sırasında kayba uğramadığı, ancak KLE'nin dondurmanın üretimi sırasında %23.2'sinin kayba uğradığı belirlenmiştir. Dondurmalara ilave edilen antosiyanin bazlı renklendirici materyallerin toplam fenolik madde miktarı üzerine olan etkisinin istatistiksel olarak önemli ($p<0.05$) olduğu saptanmıştır. Hwang ve ark. [25], üzüm şaraplarının bulunduğu kaplarda dibe çöken tortu kısmını dondurmaya farklı oranlarda (50, 100 ve 150 g/kg) ilave ederek, dondurmaların biyoaktif özelliklerindeki değişimini incelemişlerdir. 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 dondurmalara ilave edilen şarap tortusunun dondurma üretim süresince stabil olduğu sonucuna ulaşıldığı belirtilmekte olup, bizim bulgularımızla örtüşmemektedir. Dondurma üretiminde kullanılacak sütün farklı bitkisel çaylarla aromatzize 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 [140].

Dondurmaların fenolik bileşimleri dikkate alındığında SHE ve KLE'lerinin dondurma üretimi sırasında oldukça stabildir. 3 ay süreyle depolanan örneklerin toplam fenolik madde miktarlarında sürenin uzamasına bağlı olarak bir miktar azalma saptanmakla birlikte, depolama süresinin etkisi sadece SHE ile renklendirilen örneklerde önemli ($p<0.05$) bulunmuştur.

5.4.2.3. Dondurmaların antiradikal aktivitelerinde meydana gelen değişimler

Fenolik madde içeriği en yüksek grup olan SHE ile renklendirilen örneklerin %43.82 inhibisyon derecesi ile en yüksek antiradikal aktiviteye sahip oldukları belirlenmiştir. Bu örneği %36.19 KLE ilavesiyle renklendirilen örneklerin izlediği 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 [25].

KLE ile renklendirilen örneklerin, antiradikal aktivitelerinin biraz daha yüksek olduğu saptanmıştır. Bu durumun örneklerin antosiyanin ve fenolik madde kompozisyonlarındaki farklılıklardan kaynaklandığı düşünülmektedir. Nitekim, kırmızı lahananın antosiyanin profillerinde siyanidin-3,5-diglikozit ve siyanidin-3-sophorosit-5-glikozitin sinapik asit, ferulik asit, kafeik asit, p-kumarik asit ve malonik asit ile asillenmiş yapıları yaygın olarak bulunmaktadır [21]. Fenolik bileşikler bireysel bazda ele alınmaları halinde farklı antiradikal veya antioksidan aktivite gösterebilmektedirler [62].

Tablo 4.25. incelendiğinde dondurma örneklerinin antiradikal aktivitelerinde depolama sürecinde az da olsa düştüğü görülmektedir. Örneğin, SHE ve KLE ile renklendirilen dondurmaların 3 aylık depolama süreçlerinde antiradikal aktivitelerinde meydana gelen değişimler sırası ile %43.82-40.11 ve %36.19-33.58 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.

ABE'larla 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. Ulaşılan literatürler arasında Hwang ve ark. [25]'nin yaptıkları çalışma haricinde dondurmalarda benzer bir çalışmaya rastlanamamıştır. Özellikle dondurmaların depolama sürecindeki toplam fenolik madde ve antiradikal aktivite değişiminin incelendiği literatüre ulaşamamış olmamız nedeni ile verilerimizi karşılaştırma olanağımız olmamıştır.

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 4.26.'da görülebilmektedir. Dondurmaların renklendirilmesi amacı ile kullanılan ABE'lar örneklerin L^* değerlerinin düşmesine neden olmuştur. L^* değeri en yüksek olan grubun kontrol (68.55-68.38) olduğu saptanırken, bunu sırasıyla karmin (67.40-63.69), KLE (58.55-56.82) ve SHE (57.70-52.72) 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 [140]. 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 [25]. 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 dondurmalarda saptanmıştır. Başlangıç a^* değeri 8.03 olan ve 3 ay depolama sonucunda bu değer 7.59'a düştüğü SHE ile renklendirilen örneklerin, en yüksek a^* değerlerine sahip olduğu

belirlenmiştir. 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 [25]. 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 [140]. Elde edilen bulgular, 3 aylık depolama süresince örneklerin a^* değerinde hafif bir düşüş olduğunu ortaya koymaktadır.

Morumsu kırmızı rengin hakim olması nedeni ile KLE ile renklendirilen örneklerin depolama başlangıcında b^* değeri -3.69 olarak tespit edilmiştir. Kırmızı lahanada olduğu gibi sinamik asitle asillenmiş antosiyaninlerin ilave edildiği gıdaların rengini kırmızıdan morumsu kırmızıya kaydıracağı belirtilmektedir [68]. 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 [140], siyah çay veya bitkisel çaylarla aromatize edilen dondurmalarda, 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. Pekmezli dondurmalarda b^* değerlerinin 19.81-26.92 aralığında olduğu belirtilmektedir [139]. Bir diğer çalışmada ise dondurmaya ilave edilen kırmızı şarap tortusu miktarına bağlı olarak b^* değerinin 2.3-10.7 aralığında değiştiği aktarılmaktadır [25]. 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, KLE 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°).

C^* değeri 8.00-7.73 aralığında değişen SHE ile renklendirilen örneklerin en yoğun renge sahip olduğu belirlenirken, bunu karminle renklendirilen grubun izlediği saptanmıştır. 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 görünimleri dikkate alındığında karminle renklendirilen dondurmalar uçuk pembe, SHE ve KLE ilavesi ile örneklerin ise sırası ile kırmızımsı mor ve eflatun olduğu saptanmıştır. ABE'lar ile renklendirilen örneklerin depolama süresince renklerini özellikle ilk 2 ay son derece iyi korudukları belirlenmiştir. Benzer şekilde pH değerleri yaklaşık 4.2-4.5 olan yoğurt ve ekşi kremaya renklendirici özelliklerini değerlendirmek amacı ile 5 mg antosiyanin/100 g ürün dozunda kırmızı turp, kırmızı lahana ve siyah havuç gibi farklı antosiyanin kaynaklarından elde edilen ekstraktların ilave edildiği bir çalışmada, kırmızı turp ve siyah havuç ekstraktları ilavesinin ürünlere hoş bir kırmızılık verirken, kırmızı lahananın ürünlere çekici bir mor renk oluşturduğu aktarılmaktadır. Yapılan bir diğer çalışmada ise asillenmiş petunidin türevlerinin nötral ve hafif alkali ortamlarda dahi oldukça yoğun bir şekilde renk verdiği aktarılmaktadır. Süt ürünlerinin raf ömrünün yaklaşık birkaç hafta olduğu dikkate alındığında doğal antosiyanin kaynaklarının bu tip ürünlere 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 ABE 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.

Duyuşal analiz sonuçları değerlendirildiğinde, pH değeri 6.52-6.71 arasında değişen dondurmaların 3 ay kadar uzun bir süre depolanmaları halinde dahi ABE'ların başarı ile kullanılabileceği sonucuna ulaşılmaktadır. Özellikle SHE ile renklendirilen dondurmaların renk, tat, koku ve genel beğeni skorlarının karminle renklendirilen örneklerden daha yüksek olduğu belirlenmiştir. KLE ile renklendirilen örneklerin ise özellikle dondurma örneklerine geçen lahana kokusu nedeni ile beğenilmediği açıktır. Ancak bu örneklerin dahi renk skorları dikkate alındığında, beğenildiği görülmektedir.

Her yaşa ve her kesime hitap eden bir süt ürünü olan dondurmanın renklendirilmesinde özellikle SHE kullanılması durumunda dondurmaların duyusal anlamda beğenildiği saptanmıştır. ABE'ların bu örneklerde rengin çekici hale getirilmesinin yanı sıra örneklerle fonksiyonel özellikler de kazandırdıkları sonucuna ulaşılmıştır.

5.4.3. Şekerleme

5.4.3.1. Şekerlemelerin renklerinde meydana gelen değişimler

20°C'de 180 gün süreyle depolanan şekerlemelerden karminle (13.09-11.10) renklendirilen şekerlemelerin en parlak örnekler olduğu belirlenirken, bu grubu sırasıyla KLE (14.55-15.35) ve SHE (13.09-11.10) ile renklendirilen örneklerin izlediği saptanmıştır. 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 saptanmıştır. Örneklerin a^* değerlerinde genel olarak depolama süresinin uzamasına bağlı olarak hafif bir düşüş olduğu gözlenmiştir

Karminle ve SHE ile renklendirilen grupların h° değerleri sırası ile 9.60-14.74 ve 9.51-16.64 aralıklarında tespit edilmiştir. 180 gün depolanan KLE ile renklendirilen şekerlemelerin h° değerleri ise 356.82-355.25 aralıklarında belirlenmiştir.

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 4.29.). 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 saptanmıştır. Lokumların renklendirilmesi üzerine yapılan ender çalışmalardan birinde, 1 kg lokum hamuruna renklendirici olarak 6.6 g siyah havuç konsantresi ilave edilmiştir. Renklendirilen örnekler 12, 20 ve 30°C sıcaklıklarda 5 ay süreyle depolanmıştır. Depolama süresinin uzamasına bağlı olarak lokumların a^* ve b^* değerlerinin azaldığı, C^* ve h° değerlerinin ise arttığı belirtilmektedir. Aynı çalışmada lokum gibi nişasta içeren gıdalarda düşük sıcaklıkta muhafazada retrogradasyon nedeni ile ürünlerdeki serbest su miktarının artarak, antosiyanin degradasyonunu hızlandırdığı belirlenmiştir. Nitekim antosiyaninlerin en düşük çalışma

sıcaklığı olan 12°C'ye kıyasla 20°C'de daha iyi korunduğu saptanmıştır. Elde edilen bulgular lokumların sentetik gıda boyaları yerine siyah havuç antosiyaninleri ile renklendirilebileceğini ortaya koymaktadır [22].

5.4.3.2. Şekerlemelerin duysal özelliklerinde meydana gelen değişimler

Şekerlemeler arasında renk skoru en yüksek olan gruplar SHE (8.61-7.78) (8.50-7.78) ile renklendirilen örnekler olduğu belirlenmiştir (Tablo 4.30.). Böylece panelistler tarafından ABE 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 duysal analiz sonucunda SHE (8.33-7.67) ile renklendirilen şekerlemelerin tat açısından en beğenilen örnekler olduğu saptanmıştır. Depolama süresince örneklerin koku değerlerinde dalgalanmalar olmakla birlikte, genel olarak depolama süresinin uzamasıyla koku skorlarında bir düşüş gözlenmiştir. Şekerleme grupları içerisinde genel özellikleri itibariyle en fazla beğenilen örnekler SHE (8.56-7.61) ve karmin (8.00-7.56) ile renklendirilen gruplardır. KLE (6.67-6.28) ile renklendirilen örneklerin ise panelistler tarafından pek beğenilmediği saptanmıştır (Tablo 4.30).

5.4.4. Çemen

Kontrol örneğinin kuru madde değeri %43.21 iken SHE ile renklendirilen örneklerde bu değer %43.73 düzeyinde belirlenmiştir. Kontrol örneğinin yanı sıra karmin ve KLE ile renklendirilen örneklerin pH değerleri 5.85 iken, SHE ile renklendirilen çemenlerde bu değer 5.84 olduğu saptanmıştır. 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 [145]. 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 [146]. Pastırmalarda ortaya çıkan en önemli kusurlar çoğunlukla çemen ve çemenleme işlemine bağlı olarak ortaya çıkmaktadır [145]. Üreticilerin ekonomik nedenlerle çemene buğday ve burçak unları karıştırmaları, ucuz ve kalitesiz kırmızı biber kullanımı ve boya ilave etmelerine bağlı olarak çemenlerde gerek renk gerekse de yapısal kusurlar ortaya çıkmaktadır [147].

L^* değeri en yüksek olan örnek kontrol grubu (40.08-30.74) iken, bunu sırası ile karmin (38.14-30.59), KLE (35.60-30.85) ve SHE (35.29-29.20) ile renklendirilen örneklerin izlediği belirlenmiştir (Tablo 4.32.). Renklendirici materyal ilavesinin gıda maddelerinin L^* değerlerinde düşmeye neden olduğu bilinmektedir [148]. En yüksek a^* değeri karmin (18.80-16.61) ile renklendirilen örneklerde tespit edilmiştir. En yüksek b^* değerleri ise kontrol grubuna (41.34-24.41) aittir. Örneklerin a^* ve b^* değerlerinde depolama süresince dalgalanmalar saptanmış olup, genel olarak her iki değer 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 [149]. 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 [150].

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. Kırmızı biberlerde yapılan çalışmaların sonuçları da h° ve C^* değerlerinin zamanla azaldığını ve bu ürünlerdeki eğilimin çemen örneklerindeki eğilime paralel olduğunu ortaya koymaktadır [149; 150].

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 ABE'lerden özellikle KLE'lerinin lahana kokusunu baskıladığı ve hiçbir örnekte yabancı ya da rahatsız edici bir tadın veya kokunun algılanmadığının belirlenmesi üzerine örneklerde duyusal

analiz yapılmamasına karar verilmiştir. 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 [147]. Oysa çemenlerin ABE 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 Klîşe 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. Uyan Ersus, S., 2004. Kara Havuç (*Daucus carota* L.) Antosiyanin Ekstraktının Püskürtmeli Kurutucu Kullanılarak Mikroenkapsülasyonu. Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, İzmir, 167 s.
21. Kırca, A., 2004. Siyah Havuç Antosiyaninlerinin Bazı Meyve Ürünlerinde Isıl Stabilitesi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, , Ankara, 109 s.
22. 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.
23. 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.
24. 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.
25. 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.
26. 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.
27. Angersbach, A., Knorr, D., 1997. High intensity electric field pulses as pretreatment for affecting dehydration characteristics and rehydration properties potato cubes. **Nahrung**, **41**: 194-200.
 28. Puertolas, E., Lopez, N., Condon, S., Alvarez, I., Raso, J., 2010. Potential applications of PEF to improve red wine quality. **Trends in Food Science & Technology**, **21**: 247-255.
 29. Wesierska, E., Trziszka, T., 2007. Evaluation of the use of pulsed electrical field as a factor with antimicrobial activity, **Journal of Food Engineering**, **78**: 1320-1325.
 30. Lebovka, N.I., Praporscic, I., Ghnimi, S., Vorobiev, E., 2005. Temperature enhanced electroporation under the pulsed electric field treatment of food tissue. **Journal of Food Engineering**, **69**: 177-184.
 31. Gachovska, T.K., Adediji, A.A., Ngadi, M.O., 2009. Influence of pulsed electric field energy on the damage degree in alfalfa tissue. **Journal of Food Engineering**, **95** (4): 558-563.
 32. Tiwari, B.K., O'Donnell, C.P., Cullen, P.J., 2009a. Effect of non thermal processing technologies on the anthocyanin content of fruit juices. **Trends in Food Science & Technonology**, **20**: 137-145.
 33. Gunasekaran, S., Chiyung, A., 1994. Evaluating milk coagulation with ultrasonics. **Food Technology**, **48** (12): 74-78.
 34. Bayraktaroğlu, G., Obuz, E., 2006. Ultrasound yönteminin ilkeleri ve gıda endüstrisinde kullanımı, s. 57-60. *Türkiye 9. Gıda Kongresi, Mayıs 24-26, Bolu*.
 35. 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.
 36. Bleve, M., Ciurlia, L., Erroi, E., Lionetto, G., Longo, L., Rescio, L., Schettino, T., Vasopollo, 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.
 37. 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.

38. Uysal, V., 2000. Kara Havuçtaki Renk Maddelerinin (Antosiyaninlerin) Ekstraksiyonu ve Özelliklerinin İncelenmesi. Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, İzmir, 71 s.
39. FAO, 2007, Agricultural data. (Web sayfası: <http://faostat.org>), (Erişim tarihi: Eylül 2009).
40. Kammerer, D., Carle, R., Schieber, A., 2004. Quantification of anthocyanins in black carrot extracts (*Daucus carota* ssp. *sativus* var. *atrorubens* Alef.) and evaluation of their color properties. *European Food Research and Technology*, 219: 479-486.
41. 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.
42. Patras, A., Brunton, N. P., O'Donnell, C., Tiwari, B. K., 2010. Effect of thermal processing on anthocyanin stability in foods; mechanisms and kinetics of degradation. **Trends in Food Science & Technology**, 21: 3-11.
43. Arapitsas, P., Sjöberg, P.J.R., Turner, C., 2008. Characterisation of anthocyanins in red cabbage using high resolution liquid chromatography coupled with photodiode array detection and electrospray ionization-linear ion trap mass spectrometry. **Food Chemistry**, 109: 219-226.
44. 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.
45. 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.
46. Werlein, H.D., Küttemeyer, C., Schatton, G., Hubbermann, E.M., Schwarz, K., 2005. Influence of elderberry and blackcurrant concentrates on the growth of microorganisms, **Food Control**, 16: 729-733.
47. Drdak, M., Daucik, P., 1990. Changes of elderberry (*Sambucus nigra*) pigment concentrates, **Acta Aliment**, 19, 3-7.
48. 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.

49. Kırca, A., Özkan, M., Cemeroğlu, B., 2006. Stability of black carrot anthocyanins in various fruit juices and nectars. **Food Chemistry**, **97**: 598-605.
50. 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.
51. Downham, A., Collins, P., 2000. Colouring our foods in the last and next millennium. **International Journal of Food Science and Technology**, **35**: 5-22.
52. 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.
53. Saldamlı, İ., 1998. Gıda Kimyası, Hacettepe Üniversitesi Yayınları, Ankara, 527 s.
54. Doğruyol H., 2006. Gıdalardaki katkı maddeleri ve zararları çocukluk hiperaktivitesi. **Güncel Pediatri**, **2**: 42-48.
55. Erdoğan, Ş., 2007. Ankara Piyasasında Satışa Sunulan Bazı Gıdalarda Sentetik Boya Miktarlarının Araştırılması. Gazi Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 120 s.
56. 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.
57. Code of Federal Regulations, Listing of Color Additives Exempt from Certification. 21 CFR 73, Office of the Federal Register, U.S. Government Printing Office, Washington, DC, 2003.
58. Anonymous, 2002. Türk Gıda Kodeksi Gıdalarda Kullanılan Renklendiriciler Tebliği, Tebliğ No: 2002/55.
59. 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.
60. Anonymous, 2011. Karmin. (Web sayfası: http://www.gidaraporu.com/cocuk-gidalarinda-katki-maddeleri_p.htm), (Erişim tarihi, Aralık, 2010).
61. 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.
62. Einbond, L.S., Reynertson, K.A., Luo, X-D., Basile, M.J., Kennelly, E.J., 2004. Anthocyanin antioxidants from edible fruits, **Food Chemistry**, **84**, 23-28.

63. 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.
64. Lila, M.A., 2004. Anthocyanins and human health: An in vitro investigative approach. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, **5**: 306-313.
65. Wang, J., Mazza, G., 2002. Inhibitory effects of anthocyanins and other phenolic compounds on nitric oxide production in LPS/IFN- γ -activated RAW 2647 macrophages, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, **50**: 850-857.
66. Stintzing, F.C., Carle, R., 2004. Functional properties of anthocyanins and betalains in plants, food, and in human nutrition. **Trends in Food Science & Technology**, **15**: 19-38.
67. 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.
68. Stintzing, F.C., Stintzing, A.S., Carle, R., Frei, B., Wrosta, R.E., 2002. Color and antioxidant properties of cyanidin-based anthocyanin pigments. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, **50**: 6172-6181.
69. Khandare, V., Walia, S., Singh, M., Kaur, C., 2010. Black carrot (*Daucus carota* ssp. *sativus*) juice: processing effects on antioxidant composition and color. **Food and Bioproducts Processing**, in press.
70. 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.
71. Singh, J., Upadhyay, A.K., Bahadur, A., Singh, B., Singh, K.P., Rai, M., 2006. Antioxidant phytochemicals in cabbage (*Brassica oleracea* L. var *capitata*). **Scientia Horticulturae**, **108**: 233-237.
72. Podsedek, A., Sosnowska, D., Redzynia, M., Koziolkiewicz, M., 2008. Effect of domestic cooking on the red cabbage hydrophilic antioxidants. **International Journal of Food Science and Technology**, **43**: 1770–1777.
73. Lo Scalzo, R., Genna, A., Branca, F., Chedin, M., Chassaingne, H., 2008. Anthocyanin composition of cauliflower (*Brassica oleracea* L. var *botrytis*) and cabbage (*Brassica*

- oleracea* L. var *capitata*) and its stability in relation to thermal treatments. **Food Chemistry**, **107**: 136-144.
74. McDougall, G.J., Fyffe, S., Dobson, P., Stewart, D., 2007. Anthocyanins from red cabbage stability to simulated gastrointestinal digestion, **Phytochemistry**, **68**, 1285-1294, 2007.
 75. Ju, Z.Y., Howard, L.R., 2003. Effects of solvent and temperature on pressurized liquid extraction and anthocyanins and total phenolics from dried grape skin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, **51**: 5207-5213.
 76. A'lvarez, I., Raso, J., Palop, A., Sala, FJ., 2000. Influence of different factors on the inactivation of *Salmonella senftenberg* by pulsed electric fields. **International Journal of Food Microbiology**, **55**: 143-146.
 77. Bazhal, M., Lebovka, N., Vorobiev, E., 2003. Optimisation of pulsed electric field strength for electroporation of vegetable tissues. **Biosystems Engineering**, **86** (3): 339-345.
 78. Sharma, S.K., Zhang, Q.H., Chism, G.W., 1998. Development of a protein fortified fruit beverage and its quality when processed with pulsed electric field treatment. **Journal of Food Quality**, **21** (6): 459-473.
 79. Sánchez-Moreno, C., Cano, M.P., Ancos, B., Plaza, L., Olmedilla, B., Granado, F., Elez-Martínez, P., Martín-Belloso, O., Martín, A., 2004. Pulsed electric field-processed orange juice consumption increases plasma vitamin C and decreases F2-Isoprostanes in healthy humans. **Journal of Nutritional Biochemistry**, **15**: 601-607.
 80. Wu, Y., Mittal, G.S., Griffiths, M.W., 2005. Effect of pulsed electric field on the inactivation of microorganisms in grape juices with and without antimicrobials, **Biosystems Engineering**, **90** (1): 1-7.
 81. Elez-Martinez, P., Martin-Bellosa, O., 2007. Effect of high intensity pulsed electric field processing conditions on vitamin c and antioxidant capacity of orange juice and gazpacho, a cold vegetable soup. **Food Chemistry**, **102**: 201-209.
 82. Li, Y., Chen, Z., 2006. Effect of high intensity pulsed electric field on the functional properties of protein isolated from soybean. **Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering**, **22** (8): 194-198.
 83. Yeom, H.W., Zhang, Q.H., Dunne, C.P., 1999. Inactivation of papain by pulsed electric fields in a continuous system, **Food Chemistry**, **67**: 53-59.

84. Zhong, K., Hu, X., Zhao, G., Chen, F., Liao, X., 2005. Inactivation and conformational change of horseradish peroxidase induced by pulsed electric field, **Food Chemistry**, **92**: 473-479.
85. Aguayo, I.A., Serrano, I.O., Teixeira, L.J.Q., Belloso, O.M., 2008. Inactivation of tomato juice peroxidase by high-intensity pulsed electric fields as affected by process conditions. **Food Chemistry**, **107**: 949-955.
86. Riener, J., Noci, F., Cronin, D.A., Morgan, D.J., Lyng, J.G., 2008. Combined effect of temperature and pulsed electrical fields on apple juice peroxidase and polyphenoloxidase inactivation. **Food Chemistry**, **109**: 402-407.
87. Ade-Omowaye, B.I.O., Angersbach, A., Taiwo, K.A., Knorr, D., 2001. Use of pulsed electric field pre-treatment to improve dehydration characteristics of plant based foods. **Trends in Food Science and Technology**, **12**: 285-295.
88. Soliva-Fortuny, R., Balasa, A., Knorr, D., Martin-Belloso, O., 2009. Effects of pulsed electric fields on bioactive compounds in foods: A review. **Trends in Food Science & Technology**, **20** (11-12): 544-556.
89. 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.
90. Sanchez-Moreno, C., Plaza, L., Elez-Martinez, P., De Ancos, B., Martin-Belloso, O., Cano, M.P., 2005. Impact of high pressure and pulsed electric fields on bioactive compounds and antioxidant activity of orange juice in comparison with traditional thermal processing. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, **53**: 4403-4409.
91. Tiwari, B.K., Patras, A., Brunton, N., Cullen, P.J., O'Donnell, C.P., 2010. Effect of ultrasound processing on anthocyanins and color of red grape juice. **Ultrasonics Sonochemistry**, **17**: 598-604.
92. Gavhovska, T., Cassada, D., Subbiah, J., Hana, M., Thippareddi, H., Snow, D., 2010. Enhanced anthocyanin extraction from red cabbage using pulsed electric field processing. **Journal of Food Science**, **75** (6): E323-E329.
93. Tavman, Ş., Kumcuoğlu, S., Akkaya, Z., 2009. Bitkisel ürünlerin atıklarından antioksidan maddelerin ultrason destekli ekstraksiyonu. **Gıda**, **34** (3): 175-182.
94. Floros, J.D., Liang, H., 1994. Acoustically assisted diffusion through membranes and biomaterials. **Food Technology**, **48**: 79 -84.

95. Cemeroğlu, B., 2007. Gıda Analizleri Gıda Teknolojisi Derneği Yayınları, Yayın No: 34, Ankara, **SAYFFAAAA**.
96. 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..
97. 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.
98. 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.
99. 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.
100. 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.
101. Wrosted, R.E., 1976. Color and pigment analyses in fruit products. Agric. Exp. Stn., Corvallis, Oregon State University, Station Bulletin 624, 17 p.
102. 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.
103. 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.
104. 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.
105. 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.
106. Cemeroğlu, B., Velioğlu, S., Işık, S., 1994. Degradation kinetics of anthocyanins in sour cherry juice and concentrate. **Journal of Food Science**, **59** (6): 1216-1218.
107. Wang, W-D., Xu, S-Y., 2007. Degradation kinetics of anthocyanins in blackberry juice and concentrate, **Journal of Food Engineering**, **82**: 271-275.

108. 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 Sciene and Technology**, **40** (1): 49-57.
109. Yetim, H., Kesmen, Z., 2008. Gıda Analizleri, Erciyes Üniversitesi Ders Yayınları No 163. Kayseri, 346 s.
110. Dogan, M., Kayacier, A., 2007. The effect of ageing at low temperature on the rheological characteristics of Kahramanmaras-type ice-cream mix. **International Journal of Food Properties**, **10** (1): 19-24.
111. AOAC., 1990. Official Methods of Analysis of the Asociation of Official Analytical Chemists (15th Edition), Washington.
112. 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.
113. Anonymous, 2010. Çadırcı Gıda San. Tic. Ltd. Şti.'nden Mustafa Kılçadır ile lokum üretim teknikleri üzerine söyleşi.
114. 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*.
115. 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.
116. 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.
117. Van Loey, A., Verachtert, B., Hendrickx, M., 2002. Effect of high electric field pulses on enzymes. **Trends in Food Science & Technology**, **12**, 94-102.
118. 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.
119. Cowan, M.M., 1999. Plant products as antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews**, **12**, 564-582.
120. Kayser, O., Kolodziej, H., 1997. Antibacterial activity of extracts and constituents of pelargonium sidoides and pelargonium reniforme. **Planta Medica**, **63**: 508-510.

121. 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.
122. Katalinic, V., Smole Mozina, S., Skroza, D., Generalic, I., Abramovic, H., Milos, M., Ljubenkovic, I., Piskernik, S., Pezo, I., Terpin, 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.
123. Bahçeci, S., Acar, J., 2003. Meyve suyu sanayiinde yeni bir problem: *Alicyclobacillus*. **Gıda Mühendisliği Dergisi**, 26-31.
124. Shimizu, T., Muroi, T., Ichi, T., Nakamura, M., Yoshihira, K., 1997. Analysis of red cabbage colors in commercial foods using high performance liquid chromatography with photodiode array detection-mass spectrophotometry. **Journal of the Food Hygienic Society of Japan**, **38**: 34-38.
125. Degenhardt, A., Knapp, H., Winterhalter, P., 2000. Separation and purification of anthocyanins by high-speed countercurrent chromatography and screening for antioxidant activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, **48**: 338-343.
126. 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.
127. 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.
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. 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 Technology**, **43**: 1253-1264.
130. Dai, J., Gupte, A., Gates, L., Mumper, R.J., A., 2009. Comprehensive study of anthocyanin-containing extracts from selected blackberry cultivars: extraction methods, stability, anticancer properties and mechanisms. **Food and Chemical Toxicology**, **47**: 837-847.
131. 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.

132. 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.
133. 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.
134. . Perez-Vicente, A., Serrano, P., Abellan, P., Garcia-Viguera, C., 2004. Influence of packaging material on pomegranate juice color and bioactive compounds, during storage. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, **84**: 639–644.
135. 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.
136. Kaçar, A., Şahan, N., 2004. Yağ ikame maddeleri kullanılarak üretilen enerjisi azaltılmış dondurmaların kimyasal özellikleri. **HR. Ü.Z.F.Dergisi**, **8** (1): 7-13.
137. Çelik, Ş., Cankurt, H., Doğan, C., 2010. Safran ilavesinin sade dondurmanın bazı özelliklerine etkisi. **Gıda**, **35** (1): 33-39.
138. Akyüz, N., Andiç, S., 1992. Van ilinde üretilen dondurmaların duyuşal, kimyasal ve mikrobiyolojik özelliklerinin belirlenmesi üzerine bir araştırma. **Yüzüncü Yıl Üniversitesi Ziraat Fak. Dergisi**, **2** (2): 13-28.
139. Yeşilsu, A. F., 2006. Dondurmanın Fiziksel, Kimyasal ve Duyusal Özellikleri Üzerine Bazı Pekmez Çeşitlerinin Etkisi. Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Yüksek Lisans Tezi, Samsun, 88 s.
140. . 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.
141. 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.
142. Evrensel, S., Güneş, E., 1998. Bursa'da tüketilen dondurmaların kimyasal ve mikrobiyolojik kalitesi. **Gıda**, **23** (4): 261-265.
143. Mayadalı, Y., 2004. Farklı Oranda Emülgatör ve Stabilizatör Kullanımının Enerjisi Azaltılmış Dondurma Niteliklerine Etkisi. Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Adana, 52 s.

144. Dervişoğlu, M., Yazıcı, F., 2001. Kolalı dondurma üretimi. **The Turkish Journal of Agriculture and Forestry**, **25**: 283-289.
145. Nizamlioğlu, M., Doğruer, Gürbüz, Ü., 1998. Çeşitli çemen karışımlarının pastırma kalitesine etkisi 1, kimyasal ve duyusal nitelikler. **Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences**, **22**: 299-308.
146. 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.
147. Kök, I. 1985. Pastırmanın imalatında kullanılan çemen (*Trigonella foenum graceum*) hamurunun geliştirilmesi, standardizasyonu üzerinde araştırmalar. **Doğa Bilim Dergisi**, **D1, 9** (3): 241-248.
148. 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.
149. 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.
150. 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.