T.C

SELÇUK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SİYAH HAVUÇ SUYU KONSANTRESİNİN TÜRK LOKUMUNDA RENKLENDİRİCİ OLARAK KULLANILMASI VE DEPOLAMA STABİLİTESİNİN BELİRLENMESİ

Gökhan ÖZEN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

Konya, 2008

T.C

SELÇUK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SİYAH HAVUÇ SUYU KONSANTRESİNİN TÜRK LOKUMUNDA RENKLENDİRİCİ OLARAK KULLANILMASI VE DEPOLAMA STABİLİTESİNİN BELİRLENMESİ

Gökhan ÖZEN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

Bu tez 25/09/2008 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oybirliği ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Adem ELGÜN

(ABD Başkanı)

(Üye)

Yrd. Doç. Dr. Mehmet AKBULUT — **(Danışman)**

Yrd. Doç. Dr. Cemalettin SARIÇOBAN — **(Üye)**

İÇİNDEKİLER

ÖZET……... i
ABSTRACT…… iii
ÇİZELGELER LİSTESİ……. v
ŞEKİLLER LİSTESİ…….. vi
TEŞEKKÜR…… vii
1. GİRİŞ…….. 1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI…… 3
3. MATERYAL-METOD…… 30
3.1. Materyal……... 30
3.1.1. Siyah havuç, siyah havuç suyu ve konsantresi…… 30
3.1.2. Lokum ……. 30
3.1.2.1. Lokumun üretimi …… 30
3.2. Metod…… 32
3.2.1. Fiziksel Analizler……. 32
3.2.1.1. pH değeri tayini…… 32
3.2.1.2. Reflektans renk tayini…….. 32
3.2.2. Kimyasal Analizler…….. 33
3.2.2.1. Toplam monomerik antosiyanin tayini…… 33
3.2.2.2. Antosiyanin parçalanma ölçüsü düzeyinin tayini …….. 34
3.2.2.3. Antosiyanin miktarının HPLC ile belirlenmesi…….. 35
3.2.2.3.1. HPLC cihazı …….. 37
3.3. Depolama Deneyleri…… 40
3.4. Kinetik Katsayıların Hesaplanması …… 40
3.5. İstatistik Değerlendirme ……. 41
4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA…… 42
4.1. Türk lokumunda siyah havuç antosiyaninlerinin depolanma stabilitesi 42
4.2. Lokum rengindeki değişiklikler……. 50
5.SONUÇ VE ÖNERİLER……. 54
6. KAYNAKLAR…… 56
EKLER …….. 63

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

SİYAH HAVUÇ SUYU KONSANTRESİNİN TÜRK LOKUMUNDA RENKLENDİRİCİ OLARAK KULLANILMASI VE DEPOLAMA STABİLİTESİNİN BELİRLENMESİ

Gökhan ÖZEN
Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı
Danışman: Yrd. Doç. Dr. Mehmet AKBULUT
2008, 81 Sayfa
Jüri: Yrd. Doç. Dr. Mehmet AKBULUT

Bu araştırmada siyah havuç suyu konsantresi ile Türk lokumu renklendirilmiş ve farklı depolama sıcaklıklarında (12, 20 ve 30°C) antosiyanin içerikleri 5 ay süre ile spektrofotometre ve HPLC yardımıyla izlenmiştir.

Kinetik veriler, Lokum içeriğindeki siyah havuç antosiyaninlerinin degradasyonunun, birinci derece reaksiyon kinetiğine göre gerçekleştiğini göstermektedir. Sıcaklık artıkça, siyah havuç antosiyaninlerinin degradasyon hızlarının arttığı saptanmıştır. 12, 20 ve 30°C' lerde k değerleri sırasıyla $6.91x10^{-3}$, $4.21x10^{-3}$ ve $9.21x10^{-3}$ $gün^{-1}$ olarak bulunmuştur. Depolama süresince 12°C'de siyah havuç antosiyaninlerinin degradasyon hızının diğer depolama sıcaklıklarına (20 ve 30°C) göre daha fazla arttığı saptanmıştır.

Siyah havuç antosiyaninlerin termal stabilitesi üzerine pH' nın da etkili olduğu belirlenmiştir. Siyah havuç antosiyaninlerin ısıl degradasyonu sırasında, pH

değeri yükseldikçe antosiyaninlerin stabilitesinin azaldığını gözlemlenmiştir. pH değerindeki artış depolama süresince örneklerin antosiyanin içeriğinin azalmasıyla ilişkilidir.

Depolama sıcaklığı ve süresi arttıkça, tüm örneklerin renklerindeki kırmızının renk değeri (a* değeri) azalmıştır. Diğer taraftan, depolama süresince parlaklık değerinde (L* değeri) yükselme görülmüştür.

Anahtar Kelimeler: Siyah havuç, Lokum, Antosiyanin, Depolama stabilitesi.

ABSTRACT

MS Thesis

THE USE OF BLACK CARROT JUICE CONCENTRATE IN THE TURKISH DELIGHT AS A COLORANT AND DETERMINATION OF THEIR STORAGE STABILITY

GökhanÖZEN

Selcuk University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Food Engineering

Supervisor : Ass.Prof.Dr. Mehmet AKBULUT

2008, 81 Pages

Jury : Ass.Prof.Dr.Mehmet AKBULUT

In this research, traditional Turkish delight was colored by using black carrot juice concentrate and the variations in the anthocyanin content at different storage temperatures (12, 20 and 30°C) during 5 months storage period were observed by spectrophotometer and HPLC.

Analysis of kinetic data suggested a first-order reaction for the degradation of black carrot anthocyanins in traditional Turkish delight. Degradation rates of anthocyanins of black carrot increased with increasing temperature. k values for 12, 20 and 30°C were found to be $6.91x10^{-3}$, 4.21x10-3 and $9.21x10^{-3}$ day^{-1}, respectively. It was determined that the degradation rate of black carrot anthocyanins the during

the storage period at the 12°C increased faster than that of the other temperatures (20 and 30°C).

Effects of pH on the thermal stability of black carrot anthocyanins were also determined. Results pointed the stability of anthocyanins decreased as the pH value increased. Increase in pH values correlated well with the decrease in anthocyanin content of the samples during storage.

Redness (a*) of all the samples increased with decreasing storage temperature and time. However, lightness (L*) increased during storage.

Keywords: Black carrot, Turkish delight, Anthocyanin, Storage stability

ÇİZELGELER LİSTESİ

Çizelge 2.1. FDA ve Avrupa Birliği tarafından gıdalarda kullanılmasına izin verilen bazı sertifikalı yapay boyalar…… 6

Çizelge 2.2. Avrupa Birliği tarafından kullanımına izin verilen doğal kaynaklı boyalar …… 7

Çizelge 2.3. FDA tarafından gıdalarda kullanılmasına izin verilen, sertifikaya tabi olmayan doğal renk maddeleri …… 8

Çizelge 2.4. Doğal Antosiyanidinlerin Yapıları …….. 11

Çizelge 3.1. Antosiyaninler için uygulanan elüsyon profili ……. 38

Çizelge 4.1. Farklı sıcaklıklarda depolanan lokum örneklerinde depolama süresine bağlı olarak antosiyanin miktarları (mg/kg)……... 42

Çizelge 4.2. Farklı sıcaklıklarda depolanan lokum örneklerinde depolama süresine bağlı olarak antosiyanin miktarlarına ait varyans analiz tablosu…….. 42

Çizelge 4.3. Farklı sıcaklıklarda depolanan lokum örneklerinde depolama süresine bağlı olarak antosiyanin miktarları ortalamalarının Duncan çoklu karşılaştırma test sonuçları…… 43

Çizelge 4.4. Farklı sıcaklıklarda depolanan lokum örneklerinde siyah havuç antosiyaninlerinin degradasyonuna ilişkin kinetik parametreler . 49

Çizelge 4.5. 12° C'de depolanan lokum örneklerindeki renk değişimi……. 50

Çizelge 4.6. 20° C'de depolanan lokum örneklerindeki renk değişimi……. 50

Çizelge 4.7. 30° C'de depolanan lokum örneklerindeki renk değişimi……. 51

Çizelge 4.8. Farklı sıcaklıklarda depolanan lokum örneklerinde depolama süresince meydana gelen pH değişimi ……. 51

Çizelge 4.9. Farklı sıcaklıklarda depolanan lokum örneklerinde depolama süresince meydana gelen ağırlık değişimi (g)……. 52

Çizelge 4.10. Farklı depolama sıcaklıklarında depolama süresince meydana gelen pH ve antosiyonin miktarı değişimleri arasındaki ilişki ……. ……. 53

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1. Gıda boyalarının dünya genelinde pazar payları ……. 5
Şekil 2.2. Flavilium katyonu……. 10
Şekil 2.3. Antosiyaninlerin doğadaki dağılımı……. 12
Şekil 2.4. Açillenmiş antosiyaninlerin stabilizasyon mekanizması…… 13
Şekil 2.5. Antosiyaninlerin pH değişikliklerine bağlı olarak uğradığı yapısal dönüşümler ……. 16
Şekil 2.6. Antosiyanidin 3-glikozitin degradasyon mekanizması……. 19
Şekil 3.1. Lokum üretim akış diyagramı…….. 31
Şekil 3.2. Kartuşların şartlandırılması ……. 39
Şekil 4.1. Depolama süresince antosiyanin miktarında meydana gelen değişim……. 43
Şekil 4.2. Siyah havuç antosiyaninleri renklendirilen lokumların farklı sıcaklıklarda depolanması sonucu meydana gelen antosiyanin değişimi …… 43
Şekil 4.3. Antosiyanin miktarındaki değişim (HPLC)…….. 45
Şekil 4.4. Lokum örneklerine ait HPLC kromatogramları (sırasıyla 0.gün, 150.gün (12-20-30° C)) ……... 47
Şekil 4.5. Siyah havuç antosiyaninleri renklendirilen lokumların farklı Sıcaklıklarda depolanması sonucu meydana gelen polimerik renk değişimi …….. 48

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans tez çalışması Selçuk Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü öğretim üyesi Yrd.Doç.Dr. Mehmet AKBULUT' un danışmanlığında tamamlanmıştır. Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsüne yüksek lisans tezi olarak sunulmuştur.

Tez çalışmam sırasında yardımlarını esirgemeyen danışmanım Yrd. Doç. Dr. Mehmet AKBULUT'a teşekkür ederim. Ayrıca çalışmalarım esnasında laboratuvarını kullanımımıza açan Ankara Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü öğretim üyesi Doç. Dr. Mehmet ÖZKAN'a, deneyimleriyle çalışmamı kolaylaştıran Araştırma görevlisi Dr. Oktay Yemiş'e ve yardımını esirgemeyen Özge TURFAN'a ve sevgili arkadaşım Berna ÖZALP'e sonsuz teşekkür ederim. Projemizi destekleyen Selçuk Üniversitesi BAP teşvik fonuna, yüksek lisans eğitimimi destekleyen TÜBİTAK'a ve lokum üretimi denemeleri aşamasında işletmesini araştırmamıza açan AZİM ŞEKERLEME'YE sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Konya, 2008 Gökhan ÖZEN

1. GİRİŞ

Uluslararası Gıda Kodeks Komisyonu (CAC) renklendiricileri "gıdaların rengini düzelten ve/veya gıdalara renk vermek amacıyla ilave edilen madde" olarak tanımlamaktadır.

Yapay renklendiricilerin, doğal renklendiricilere göre renk tonlarının ve renk şiddetlerinin kuvvetli olması, farklı pH seviyelerinde stabilitelerinin yüksek olması, uygulama kolaylığı ve ucuzluğu gibi özelliklerinden dolayı gıdalarda kullanımları hızla artmış ve doğal renklendiricilere olan ilgi azalmıştır.

Doğal renklendiriciler ise, teknolojik olumsuzluklarına rağmen sağlık üzerine olumlu etkilerinden dolayı günümüzde birçok üründe kullanılmaktadır.

Doğal renklendiriciler içinde yer alan en önemli grup, antosiyaninlerdir. Antosiyanin, Yunanca 'anthos' (çiçek), 'kyanos' (mavi) anlamına gelen iki kelimenin birleşmesiyle adlandırılmaktadır. Antosiyaninler, çilek, üzüm, erik, nar, kırmızı lahana vb. gibi birçok meyve ve sebzenin pembeden mora kadar değişen renklerini veren doğal pigmentlerdir. Meyve, sebze ve üzümsü bitkilerin birçoğu gösterişli renklerini, hücre özsuyunda bulunan ve suda çözünebilen bu bileşenlere borçludur.

Bu pigmentlerin stabiliteleri çevresel faktörler ile pH, sıcaklık, oksijen, enzimler ve kondenzasyon reaksiyonları gibi proses faktörleri tarafından etkilenir.

Renk, ışığın spektral dağılımından meydana gelen görsel bir özelliktir. Doğal gıdaların renkleri içerdikleri çok çeşitli kimyasal formlara sahip olan ve pigment olarak tanımlanan maddelerden kaynaklanmaktadır. Meyveler ve sebzeler gibi doğal kaynaklı birçok ürün çeşitli renklere sahip olup, çekicilikleri renkleri ile ilgilidir.

Renk, gıdaların besinsel özelliklerinin yanı sıra, tüketicinin duyusal tercihi açısından, gıdanın çekiciliğinde önemli rol oynamaktadır. Bir gıda ile ilgili ilk izlenim görseldir. Gıdanın tercih edilmesi onun renginin kabul veya red edilmesine bağlıdır.

Diğer taraftan renk, gıdanın üretildiği hammaddenin niteliklerini, uygulanan üretim teknolojisini, depolama koşulları ve süresi gibi değişik faktörler hakkında da tüketicilere ipuçları verebilmektedir.

Son yıllarda yapılan araştırmaların, yapay renk maddelerinin insan sağlığı üzerindeki olumsuz etkilerini ortaya koymasından sonra, doğal renk maddelerine olan ilgi günden güne artmaktadır. Ayrıca yapılan bazı araştırmalar, antosiyaninlerin insan sağlığı üzerine çok olumlu etkileri olduğunu ortaya koymuştur.

Günümüzde gelişen gıda üretim teknolojileri dikkate alındığında gıdalar proses sürecinde fiziksel ve kimyasal koşullara bağlı olarak renk solması ve/veya kaybına uğramaktadırlar. Ancak üreticiler, proses sırasında ortaya çıkan bu renk kayıplarını önleyerek gıdanın orjinal rengini koruma ve gıdalara renk kazandırma amacı ile koruyucu ve renklendirici katkı maddelerini ürünlerinde kullanma yoluna gitmektedirler.

Bu çalışmada renklendirici olarak seçilen siyah havuç, ekonomik olması, ülkemizde bol miktarda yetiştirilmesi, yüksek düzeyde ve stabilitesi yüksek antosiyanin içermesi ve kolaylıkla havuç suyu konsantresine işlenebilmesi gibi özellikleri nedeniyle antosiyanin kaynağı olarak kullanılmıştır.

Bu amaçla geleneksel olarak üretilen ve kökeni Osmanlı kültürüne dayanan geleneksel Türk lokumu hammadde kaynağı olarak seçilmiş ve renklendirici olarak doğal bir renk maddesi kaynağı olan siyah havuç suyu konsantresi kullanılmıştır. Siyah havuç suyu konsantresi ile renklendirilen lokum, farklı depolama sıcaklıklarında (12,20 ve 30°C) depolanarak antosiyaninlerin depolanma stabilitesi araştırılmıştır.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

Gıdaların rengi, tüketiciyi etkileyen en önemli kalite parametrelerinden birisidir. Renk, gıdaların fark edilen ilk özelliği olduğundan, tüketiciler bir gıda ürününün kalitesini rengine bakarak değerlendirmektedirler (Kırca 2004).

Bir gıdanın rengi aynı zamanda o gıdanın kokusu, tadı ve tekstürü gibi özelliklerinin algılanmasında da etkili olmaktadır (Christensen 1983, Newsome 1986, Henry 1992, Giusti ve Wrolstad 2003).

Rengin, gıdaların karakteristik çeşnilerinin algılanmasında etkili olduğu birçok araştırmacı tarafından ortaya konmuştur. Gıdalar, çeşnilerine uygun şekilde boyandığında, tat genellikle doğru olarak algılanabilmekte; buna karşın tadın renkle uyum sağlamadığı durumlarda tadın doğru olarak algılanması güçleşmektedir (Kırca 2004).

Stillman (1993) farklı renklerle (kırmızı, turuncu ve sarı) boyadığı ahududu ve portakal aromalı içeceklerde, rengin her iki meyve aromasının algılanmasında da çok önemli bir etkisinin olduğunu saptamıştır. Benzer şekilde, kırmızı, turuncu ve yeşil renge boyanan kiraz, portakal ve laym (lime, *Citrus aurantifolia*) aromalı içecek ve keklerde de, rengin, tadın doğru olarak algılanmasında etkili olduğunu belirlenmiştir (DuBose ve ark. 1980).

Yapılan benzer bir çalışmada ise, farklı gıda boyaları uygulanmış şeftali, kivi, portakal ve çeşitli üzümsü meyve aromalı içeceklerde rengin, tat ve tatlılık düzeyi üzerine etkisi incelenmiştir (Bayarri ve ark. 2001). Bu araştırmada meyve aromalı içecekleri renklendirmek amacıyla koşinal (kırmızı), tartarazin (sarı) ve klorofillin (yeşil), tatlandırıcı olarak ise sakkaroz kullanılmıştır. Rengin, incelenen tüm içeceklerde ürünlerin tipik tadın yoğunluğunun algılanmasını etkilediği, portakal aromalı içecekte ise tatlı tadın algılanma düzeyini arttırdığı saptanmıştır (Bayarri ve ark. 2001).

Renk, gıdaların tatlılık düzeyinin algılanmasında önemli bir etkendir. Johnson ve Clydesdale (1982) sakkaroz çözeltilerine değişen konsantrasyonlarda FD&C Red No:40 boyasının eklenmesiyle oluşan kırmızı rengin, tatlılığın algılanmasını önemli düzeyde arttırdığını belirlemişlerdir.

Benzer şekilde, farklı yoğunluklarda sarı renge boyanan laym ve limon aromalı içeceklerde, renk ve tatlılık düzeyi arasında farkedilir etkileşimler olduğu saptanmıştır (Roth ve ark. 1988).

Yukarıda anlatılan nedenlerle, günümüzde birçok gıda renklendirilerek çekici hale getirilmeye çalışılmaktadır. Gıda boyalarının, gıdalara eklenme nedenleri aşağıda sıralanmaktadır (Newsome 1986);

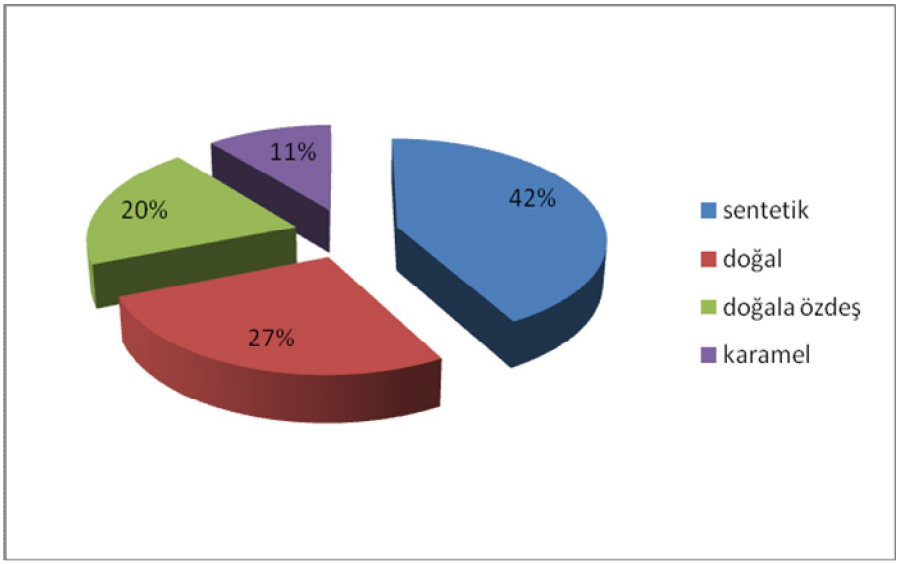
1. Isıl işlem uygulaması sırasında (örneğin, meyvelerin konserveye işlenmesi) veya daha sonraki depolama süreçlerinde, gıdaların doğal renginin kayıp olması nedeniyle orjinal görünüşünün korunması amacıyla eklenebilir.
2. Mevsimin değişik zamanlarında elde edilen meyvelerde olduğu gibi, renk yoğunluğundaki farklılıklar nedeniyle, bunlardan elde edilen ürünlerin renklerindeki yeknesaklığı sağlamak için eklenebilir
3. İçecek, sos veya meyveli yoğurt gibi rengin, tüketiciye; ürünün tadını çağrıştırdığı gıdalarda, ürünün rengi beklenilenden daha zayıf ise, rengin arttırılması amacıyla eklenebilir.
4. Ürünün depolanması sırasında tadı ve ışığa duyarlı vitaminlerin korunmasına yardımcı olmak amacıyla eklenebilir.
5. Gıdalara çekici bir görünüş kazandırmak amacıyla eklenebilir.
6. Gıdanın tanınabilirliğini sağlamak veya karakterinin muhafaza etmesini sağlamak amacıyla eklenebilir.
7. Renk, gıdanın kalitesinin görünür işareti olduğu için, gıdanın kabul edilirliğini arttırmaya yardımcı olmak amacıyla eklenebilir.

Gıdaların çekici hale getirilmesi için renklendirilmesi ihtiyacı yeni değildir. M.Ö. 400 yılında Mısırlıların şekerlemeleri renklendirmek ve şarabın rengini iyileştirmek amacıyla renk maddesi olarak doğal ekstraktlar kullandıkları tespit edilmiştir (Downham ve Collins 2000).

Sir William Perkin tarafından 1856 yılında ilk sentetik boyanın (mauvine) keşfedilmesinin ardından, boya maddeleri endüstrisi hızla gelişmiştir (Henry 1992, Downham ve Collins 2000). Doğal kaynaklı ürünlere kıyasla daha ucuz ve daha kolay elde edilebilmeleri nedeniyle, sentetik boyaların kullanımı hızla artmıştır.

Kuşkusuz rengin bu yolla sağlanması sağlık için çeşitli tehlikeleri de

beraberinde getirmiştir. Bu nedenle, sentetik boyaların güvenirliliği zaman içinde çok fazla sorgulanmış ve kullanımına izin verilen boyaların sayısında azalmaya neden olmuştur. Yasal düzenlemeler ve tüketicilerin gıdalarda sentetik boyaların kullanıldığının farkına varmaları sonucunda, doğal boyalara olan ilgi artmıştır (Giusti ve Wrolstad 2003). Sentetik boyalar, halen dünya gıda boya pazarının önemli bir kısmını oluştursa da Şekil 2.1'de tahmini % 5-10' luk yıllık büyüme hızı ile doğal kaynaklı gıda boyaları kullanımının, gittikçe artan bir büyüme göstereceği belirtilmektedir (Downham ve Collins 2000).



Şekil 2.1. Gıda boyalarının dünya genelindeki pazar payları (Downham ve Collins 2000)

Gıda boyaları; yapay boyalar, doğala özdeş boyalar ve doğal boyalar olmak üzere genel olarak 3 sınıfa ayrılmaktadır. Diğer yandan, sakaroz, glukoz ve fruktoz gibi karbonhidratların kontrollü bir şekilde ısıtılması sonucu üretilen karamel renklendiricileri de, dünya gıda boyaları pazarının önemli bir kısmını (%11) oluşturmaktadır (Downham ve Collins 2000).

Sentetik boyalar, doğada bulunmayan, kimyasal sentez yoluyla üretilen boyalardır. FDA ve Avrupa Birliği tarafından gıdalarda renk maddesi olarak kullanılmasına izin verilen, sertifikasyona tabi bazı yapay boyaların listesi Çizelge 2.1' de verilmiştir. Bunlardan FD&C Red No.40 (allura red), Amerika' da en fazla kullanılan sertifikalı boyadır (Giusti ve Wrolstad 2003).

Çizelge 2.1. FDA ve Avrupa Birliği tarafından gıdalarda kullanılmasına izin verilen bazı sertifikalı yapay boyalar (Downham ve Collins 2000)

Adı	Renk Tonu	FD&C #		E Kodu
Brilliant Blue	Türkuvaz mavi	74.101:	FD&C Blue No1	E 133
Indigotine	Deniz mavisi	74.102:	FD&C Blue No2	E 132
Fast Green	Deniz yeşili	74.203:	FD&CGreenNo3	izin verilmiyor
Erythrosine	Parlak pembe-kırmızı	74.303:	FD&C Red No3	E 127
Allura Red	Turuncu-kırmızı	74.340:	FD&C Red No40	E 129
Tatrazine	Limon sarısı	74.705:	FD&CYellowN5	E 102
Sunset Yellow	Turuncu	74.706:	FD&CYellowN6	E 110

Doğala özdeş boyalar ise kimyasal yolla üretilmektedir. Fakat bunların kimyasal yapısı doğada bulunan doğal boyalarla aynıdır, yani doğal kaynaklardan elde edilen pigment ve boyaların sentetik karşılıklarıdır (Newsome 1986). Yoğun olarak kullanılan doğala özdeş boyalar, β-karoten (sarı-turuncu), β-apo-8-karotenal (turuncu-kırmızı), kantaksantin (kırmızı) ve titanyumdioksittir (beyaz) (Askar 1993).

İlk olarak 1954 yılında satışa sunulan β-karoten, gıda boyaları pazarının büyük bir kısmını (Avrupa pazarının % 40' ı, dünya pazarının ise % 17' si) oluşturmakta ve başta katı yağlar, içecekler, şekerlemeler ve fırıncılık ürünleri olmak üzere birçok gıda ürününde yaygın olarak kullanılmaktadır (Downham ve Collins 2000). Avrupa Birliği tarafından gıdalarda kullanımına izin verilen doğal kaynaklı boyalar Çizelge 2.2' de verilmiştir.

Çizelge 2.2. Avrupa Birliği tarafından kullanımına izin verilen doğal kaynaklı Boyalar (Henry 1992).

No	Ad
E100	Kurkumin
E101	Riboflavin
E120	Koşinal/karminik asit/karmin
E140	Klorofil
E141	Klorofilin bakır kompleksleri ve klorofillinler
E150	Karamel
E153	Bitkisel karbon
E160	(a) α-, β-, γ-karoten
(b) Annatto ekstraktları, biksin, norbiksin	
(c) Paprika (kırmızı biber) ekstraktı, kapsantin, kapsorubin	
(d) Likopen	
(e) β-apo-8'-karotenal (C30)	
E161	(a) Flavoksantin
(b) Lutein	
(c) Kriptoksantin	
(d) Rubiksantin	
(e) Violaksantin	
(f) Rodoksantin	
(g) Kantaksantin	
E162	Pancar kökü kırmızısı, betanin
E163	Antosiyaninler

Doğal boyalar, gıdalarda kullanılmadan önce çeşitli araştırmalara maruz kalsalar da, sentetik boyalar gibi FDA tarafından sertifikasyon uygulamasına gerek görülmemektedir. Bu nedenle, bunların FD&C numaraları yoktur. Benzer şekilde, doğal boyaların sentetik karşılıkları da sertifikasyona tabi değildir (Newsome 1986). FDA tarafından gıdalarda renk maddesi olarak kullanılmasına izin verilen, sertifikasyona tabi olmayan doğal renk maddeleri ve bunların kullanılmalarına ilişkin sınırlamalar Çizelge 2.3' de verilmiştir.

Çizelge 2.3. FDA tarafından gıdalarda kullanılmasına izin verilen, sertifikaya tabi olmayan doğal renk maddeleri (Code of Federal Regulations 2003).

Renk maddesi	Uygulama sınırı
73.30: Annatto ekstraktı	—
73.35: Astaksantin	Sadece balık yeminde
73.40: Dehidre edilmiş pancar (pancar tozu)	—
73.50: Ultramarin mavi	Hayvan yemlerinde kullanılan tuzun renklendirilmesinde (max % 0.5)
73.75: Kantaksantin	30 mg/lb veya pt, 4.4 mg/kg (tavuk yemi)
73.85: Karamel	—
73.90: β -Apo-8'-karotenal	15 mg/lb veya pt
73.95: β -karoten	—
73.100: Koşinal ekstraktı (karmin)	—
73.140: Kızartılmış ve kısmen yağı uzaklaştırılmış, pişmiş çiğit unu	—
73.160: Ferrous glukonat	Sadece olgun zeytinlerin renklendirilmesinde
73.165: Ferrous laktat	Sadece olgun zeytinlerin renklendirilmesinde
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	—
73.575: Titanyum dioksit	max % 1
73.600: Turmerik	—
73.615: Turmerik oleoresin	—

Doğal gıda boyaları, çeşitli bileşiklerden oluşan oldukça geniş bir gruptur. Bu bileşiklerin her biri farklı çözünürlük ve stabilite özelliklerine sahip olduğundan, gıdalara uygulama şekilleri ve özellikleri farklılık göstermektedir. Gıda boyaları üzerinde durulan özellikler aşağıdaki gibi özetlenmektedir (Kırca 2004).

- ✓ Çözünürlük
- ✓ Fiziksel form
- ✓ pH
- ✓ Mikrobiyel kalite
- ✓ Diğer bileşenler

Gıda endüstrisinde kullanılan başlıca doğal gıda boyaları, antosiyaninler, betalainler, koşinal (karmin), annatto ve kurkumindir. Klorofiller, karotenoidler, kırmızıbiber ekstraktı (Oleoresin paprika), safran (krosetin) ve karamel de renklendirici olarak kullanılmaktadırlar (Henry 1992, Askar 1993).

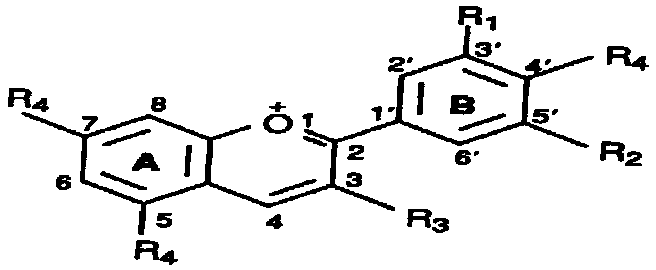
Ticari doğal pigmentlerin en önemlisi antosiyaninlerdir. Antosiyaninler, doğada bitkiler aleminde bulunan en yaygın pigment gruplarından birisidir. Meyve, sebze ve çiçeklerin kendilerine özgü pembe, kırmızı, viole, mavi ve mor tonlarındaki çeşitli renklerini veren, suda çözünebilir nitelikteki doğal renk maddeleridir (Cemeroğlu ve ark. 2001). Hemen hemen her meyvede az veya çok miktarda antosiyanin bulunmaktadır. Bazı tahıl ve baklagillerde, kök ve yumru sebzeler başta olmak üzere çeşitli sebzelerde de antosiyanin bulunmaktadır. Antosiyaninler bir grup bileşiğin adı olup, doğada 400'den fazla antosiyanin bulunduğu tahmin edilmektedir (Kong ve ark. 2003).

Antosiyaninler, gıdaların parlak kırmızı rengini sağlayan, bilinen en iyi doğal gıda boyalarıdır ve birçok gıdanın boyanmasında sentetik boyalara karşı önemli bir alternatif olarak kabul edilmektedirler (Bridle ve Timberlake 1997, Giusti ve Wrolstad 2003). Ayrıca suda çözünebilme özellikleri, antosiyaninlerin sulu gıda sistemlerine katılmalarını kolaylaştırmaktadır. Antosiyanin ekstraktlarının gıdalara yalnızca çekici renk özellikleri kazandırmadığı, aynı zamanda yüksek antiradikal kapasiteleri nedeniyle, eklendikleri gıdaların oksidatif stabilitelerini de arttırdığı belirlenmiştir (Espin ve ark. 2000). Antosiyaninler en iyi doğal gıda renklendirici olmalarına karşın, saflaştırılmalarının zor olmaları ve kimyasal stabilitelerinin düşük

olması nedeniyle renk maddesi olarak yaygın bir şekilde kullanılamamaktadırlar (Mazza ve Brouillard 1987).

Antosiyanin esaslı renk maddelerinin kaynağı meyve ve sebzelerdir. Bu amaçla kullanılan başlıca antosiyanin kaynakları arasında siyah üzüm posası (Palamidis ve Markakis 1975), konkord üzümü (Calvi ve Francis 1978), tatlı patates (Bassa ve Francis 1987), kırmızı turp (Giusti ve Wrolstad 1996, Rodriguez-Saona ve ark. 1999), kırmızı patates (Rodriguez-Saona ve ark. 1999), kırmızı lahana (Shi ve ark. 1992b, Dyrby ve ark. 2001), kırmızı tatlı patates, mor mısır (Cevallos-Casals ve Cisneros-Zevallos 2004), aronia (*Aronia melanocarpa*) (Plocharski ve Zbroszcyzk 1992), çilek (Garzon ve Wrolstad 2002), elderberry (Inami ve ark. 1996) ve blueberry (Francis 1985) sayılabilir.

Kimyasal açıdan antosiyaninler, 2-fenilbenzopirilium' un (flavilium katyonu) polihidroksi ve polimetoksi türevlerinin glikozitleridir (Jackman ve Smith 1992). Şekil 2.2'de flavilium katyonu gösterilmiştir.

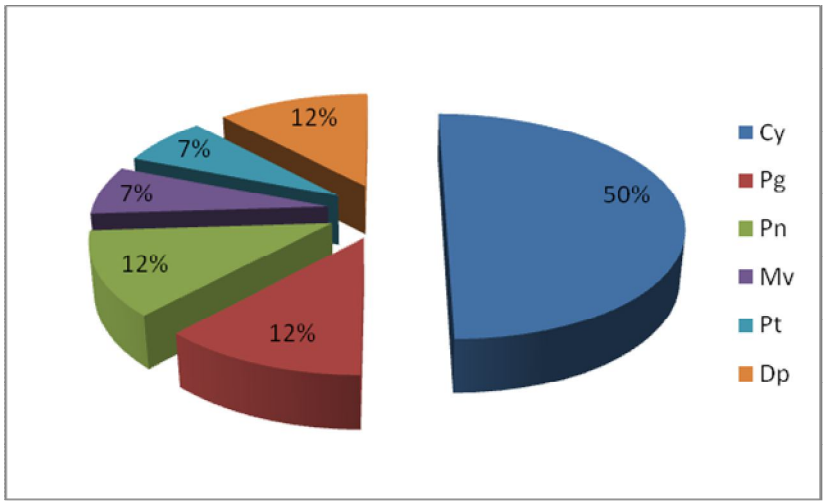


Şekil 2.2. Flavilium katyonu(Mazza ve Miniati 1993)

Antosiyaninler arasındaki farklılıklar; moleküldeki hidroksil gruplarının sayısı, bu hidroksil gruplarının metilasyon derecesi, moleküle bağlanmış şekerlerin türü, sayısı ve bağlanma şekli ile bu şekerlere bağlanmış alifatik ve aromatik asitlerin yapı ve sayısı gibi çeşitli faktörlerden kaynaklanmaktadır. Bilinen, doğal antosiyanidinler (aglikonlar) Çizelge 2.4'de verilmiştir. Bunlardan bitkilerde en çok bulunanları; pelargonidin, siyanidin, peonidin, delfinidin, petunidin ve malvinidin'dir (Mazza ve Brouillard 1987, Mazza ve Miniati 1993). Doğada yaygın olarak bulunan bu altı antosiyanidinin, bitkilerin yenilebilir kısımlarındaki dağılımı ise şu şekilde sıralanmaktadır; siyanidin (% 50), pelargonidin (% 12), peonidin (% 12), delfinidin (% 12), petunidin (% 7) ve malvidin (% 7) (Şekil 2.3) (Kong ve ark. 2003).

Çizelge 2.4. Doğal Antosiyanidinlerin Yapıları (Mazza ve Miniati 1993).

Antosiyanidin	Radikal Gruplar							Renk
	3	5	6	7	3'	4'	5'	
Delfinidin	OH	OH	H	OH	OH	OH	OH	Mavi-Kırmızı
Siyanidin	OH	OH	H	OH	OH	OH	H	Turuncu-Kırmızı
Petunidin	OH	OH	H	OH	OMe	OH	OH	Mavi-Kırmızı
Peonidin	OH	OH	H	OH	OMe	OH	H	Turuncu-Kırmızı
Pelargonidin	OH	OH	H	OH	H	OH	H	Turuncu
Malvinidin	OH	OH	H	OH	OMe	OMe	OMe	Mavi-Kırmızı



Şekil 2.3. Antosiyaninlerin doğadaki dağılımı

Antosiyanidinlere yaygın olarak bağlanan şekerler glukoz, galaktoz, ramnoz ve arabinozdur. Bu dört monosakkaritlerden oluşan di ve trisakkaritler de bazı antosiyanidinlerle glikozit yapmaktadırlar. Antosiyanidin glikozitlerinin en yaygınları, 3–monozidler, 3–biozidler, 3,5–diglikozidler ve 3,7–diglikozidlerdir. Bunlardan 3–glikozitler, doğada 3,5–diglikozidlerden yaklaşık 2,5 kat daha fazla bulunmaktadırlar. Dolayısıyla, doğada en yaygın olarak bulunan antosiyanin; siyanidin-3-glikozittir (Kong ve ark. 2003).

Antosiyaninlerinin rengi antosiyanidinin B halkasındaki değişimle ilgilidir. Hidroksilasyonun maviliği, metoksilasyonun ise kırmızılığı arttıran etkenler olduğu bildirilmektedir. Mavilik derecesi dikkate alındığında delfinidin glikozitleri en

yüksek maviliği vermekte, bunun ardından siyanidin glikozitleri gelmekte ve pelargonidin glikozitleri ise diğer ikisinden daha az mavilik göstermektedir. Çoğunlukla pelargonidin ve/veya siyanidin glikozitleri içeren sıvı ekstraktlar turuncu- kırmızı renkte olup peonidin glikozitleri daha koyu kırmızı renkte ve delfinidin, petunidin ve/veya malvinidin glikozitlerini içeren ekstraktlar ise mavimsi kırmızı renk göstermektedirler (Jackman ve Smith 1992).

Açilasyonun, antosiyaninlerin stabilitesi üzerine önemli bir etkiye sahip olduğu bilinmektedir. Nitekim, aromatik asitlerle di veya poliaçillenmiş flavilyum katyonlarının, pH:5.0'in üzerindeki ortamlarda bile renk kaybına uğramadığı ve dolayısıyla açillenmemiş olanlardan daha yüksek stabilite gösterdiği saptanmıştır (Giusti ve Wrolstad 2003). Flavilium katyonunun stabilizasyonunu sağlayan 3 farklı mekanizma olduğu ileri sürülmektedir (Gakh ve ark. 1998). Bunlar;

1. Antosiyanidin çekirdeği veya antosiyanidin çekirdeği ile aromatik açil grupları arasında moleküler içi bir interaksiyonla gerçekleşen kendiliğinden birleşme (self-association),

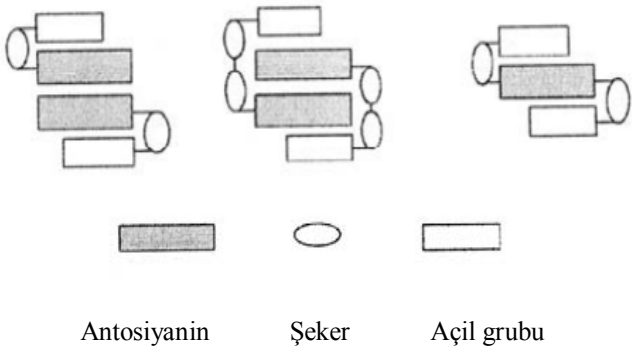
2. Antosiyanidin çekirdeği ve molekülün kromoforik olmayan kısımları (aromatik asit) arasında bir interaksiyonla gerçekleşen molekül içi kopigmentasyon,

3. İki veya daha fazla molekül arasında gerçekleşen moleküller arası kopigmentasyon' dur.

İki veya daha fazla açillenmiş grup içeren antosiyaninler için bir sandviç tipi istiflenme (sandwich-type stacking) kompleksi oluşumu söz konusudur (Giusti ve Wrolstad 2003).

Buna göre, esnek sakkarit zincirleri, bağlayıcı olarak hareket ederek açil gruplarının pirilium halkası üzerinde katlanmasını sağlamaktadırlar. Hidrofobik açil gruplarının, flavilium çekirdeğine paralel olarak istiflenmesi (stacking) sonucunda, antosiyaninin hidrolize uğramasına karşı güçlü bir koruyucu etki sağladığı düşünülmektedir (Giusti ve Wrolstad 2003, Stintzing ve Carle 2004). Şekil 2.4'de "sandwich-type stacking" kompleksi oluşumu gösterilmiştir.

Monoasillenmiş pigmentleri istiflenmesi Molekül içi istiflenme



Şekil 2.4. Açillenmiş antosiyaninlerin stabilizasyon mekanizması (sandwich-typestacking) (Giusti ve Wrolstad 2003)

Glikozilasyon ve açilasyon modellerinin, meyve ve sebzelerin rengi üzerine etkili olduğu pek çok araştırıcı tarafından ortaya konmuştur. Giusti ve ark. (1999) antosiyaninlerin glikozilasyon ve açilasyon modellerindeki farklılıkların, spektral nitelikler ve renk özellikleri üzerine etkisini belirlemek amacıyla çilek, kırmızı turp ve patatesten izole ettikleri pelargonidin esaslı antosiyaninlerin, asitlendirilmiş metanol çözeltisindeki (pH:1) spektral ve renk özelliklerini saptamışlar ve kimyasal yapıdaki küçük farklılıkların bile, antosiyaninlerin spektral ve renk özelliklerini önemli düzeyde etkilediğini belirlemişlerdir.

Antosiyaninlerle kompleks oluşturarak, stabil ve daha yoğun renkli bileşik oluşturan maddelere "kopigment" denir. Bir kopigment çoğunlukla kendi başına renksizdir, fakat antosiyanin çözeltisine eklendiğinde, çözeltinin renk yoğunluğunu büyük oranda arttırmaktadır. Kopigment olarak davranan moleküller, flavonoidler, polifenoller, alkaloidler, aminoasitler, organik asitler ve hatta antosiyaninlerin bizzat kendileri gibi çok geniş bir bileşik grubunu içermektedir. Kopigmentasyon etkisi, antosiyaninin renkli formları ile kopigment arasında oluşan bir moleküler interaksiyon olarak gösterilmiştir. Bir kopigmentin başlıca rolü, flavilium katyonu ile renksiz karbonil psödobaz arasındaki hidrasyon reaksiyonunun miktarını kontrol etmektir. Kopigmentasyon etkisi, antosiyanin çeşit ve konsantrasyonu, kopigment çeşit ve konsantrasyonu, ortamın pH değeri ve sıcaklığı gibi pek çok faktöre göre değişiklik göstermektedir (Mazza ve Miniati 1993).

Hidroksil grupları, metoksil grupları, şekerler ve açillenmiş şekerler antosiyaninlerin renk yoğunluğu ve stabilitesi üzerine belirgin bir etkiye sahiptirler. Moleküldeki hidroksil grubu sayısı arttıkça, antosiyanidinin maksimum absorbans verdiği dalga boyu büyümekte, ayrıca renk turuncudan maviye dönüşmektedir. Örneğin, % 0.01 HCl-MeOH çözeltisinde pelargonidinin λ_{max} değeri 520 nm (turuncu) düzeyindeyken, siyanidinin 535 nm (turuncu-kırmızı) ve delfinidinin 545 nm (mavi-kırmızı) düzeyindedir. Yani; moleküldeki hidroksil grubu sayısının artışı, rengi daha mavi, metoksil grubu sayısının artışı ise daha kırmızı yapmaktadır (Mazza ve Miniati 1993).

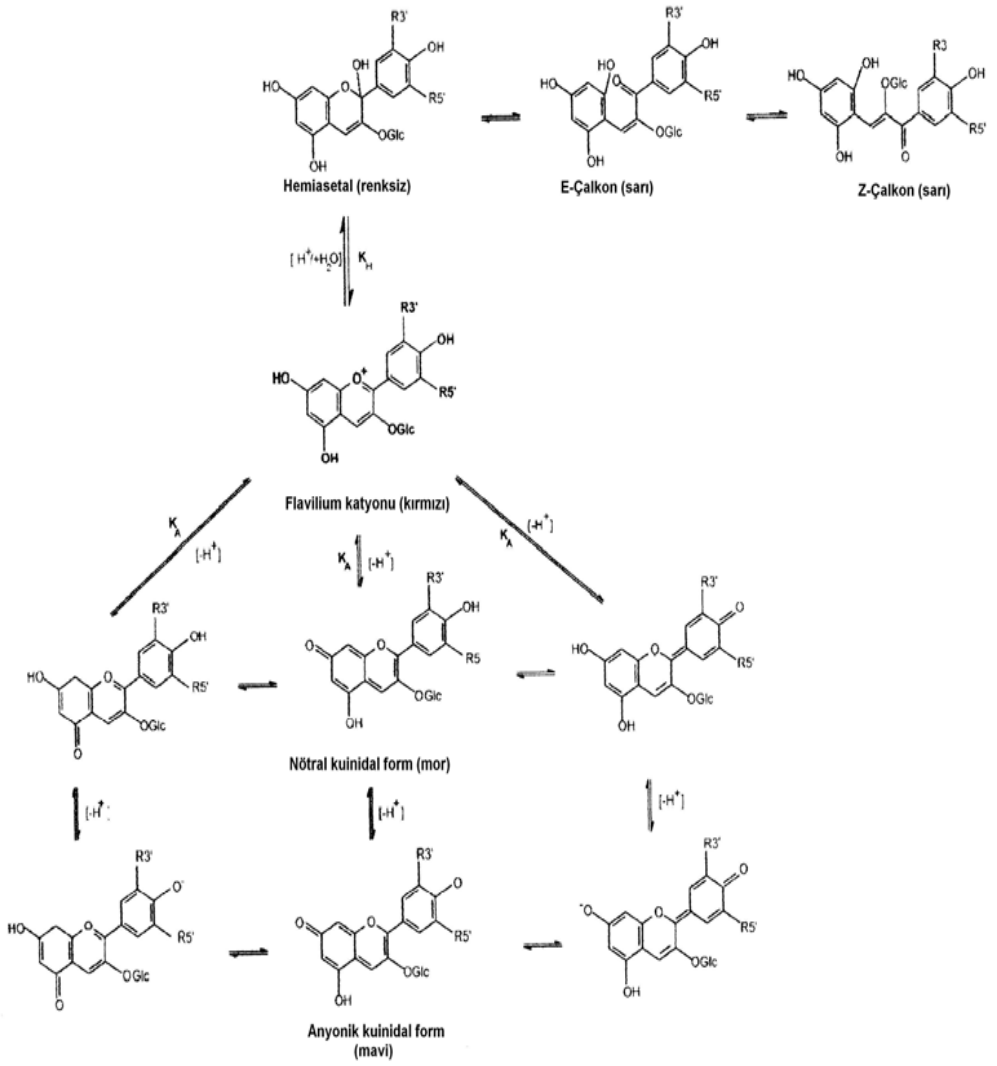
Antosiyaninler kimyasal yapılarında yer alan gruplardan dolayı pH'ya karşı oldukça duyarlı bileşikler olduğu ve buna bağlı olarak pH'nın antosiyaninlerin rengi, şiddeti, stabilitesi ve yapısı üzerinde etkili olduğu bildirilmektedir. Nitekim antosiyaninlerin çoğu, sulu ortamlarda pH indikatörü gibi davranmaktadırlar. Buna göre düşük pH derecesinde kırmızı, yüksek pH derecesinde mavi-mor tonda renk göstermekte, ikisi arasında ise renksiz formda bulunmaktadırlar.

Asidik çözeltilerde, antosiyanin 4 formda ve denge halinde bulunmaktadır. Bunlar kuinidal baz "A", flavilium katyonu "AH^+", psödobaz ya da karbinol "B" ve çalkon "C" formudur. Bu dört farklı yapı pH değiştikçe, aşağıda verilen (1), (2) ve (3) no' lu eşitliklere göre birbirlerine dönüşebilmektedirler (Mazza ve Miniati 1993);

$AH \rightarrow A + H^+$	Asit-baz dengesi	(1)
$AH^+ + H_2O \rightarrow B + H^+$	Hidrasyon dengesi	(2)
$B \rightarrow C$	Halka-zincir totomerik dengesi	(3)

Brouillard(1982), bir antosiyanin çözeltisinin ısıtılmasıyla, dengenin çalkon formuna (C) doğru kaydığını ve bu durumda da renkli formlarda (AH^+ ve A) azalma meydana geldiğini belirlemiştir. Soğutma ve asitlendirmeyle, kuinidal baz (A) ve karbinol (B) hızlı bir şekilde katyonik forma (AH^+) dönüşmektedir. Fakat çalkon formun (C) değişimi nispeten yavaş olmaktadır. Her şeye rağmen yukarıdaki eşitliklerde gösterilen reaksiyonlar geri dönüşümlüdür ve antosiyaninlerin renksiz formu, renkli katyonik ve kuinidal formlara dönüşebilmektedirler.

Ortam pH 2'nin altına düşünce, antosiyanin kırmızı renkli flavilium katyonu formunda bulunmaktadır. Buna karşın pH yükseldikçe, hızlı bir proton kaybı meydana gelerek kırmızı veya mavi renkli kuinidal formu oluşmaktadır. Flavilium katyonunun hidrasyonu da renksiz psödobaz (karbinol) formunu vermektedir (Mazza ve Brouillard 1987). Antosiyaninlerin pH değişikliklerine bağlı olarak uğradığı yapısal dönüşümler Şekil 2.5'de gösterilmiştir.



Şekil 2.5. Antosiyaninlerin pH değişikliklerine bağlı olarak uğradığı yapısal dönüşümler (Stintzing ve Carle 2004)

Antosiyaninler ve antosiyanidinler görünür ve ultraviyole bölgelerdeki spektrumlarının bu pigmentlerin yapılarının karakterizasyonunda yararlı olduğu bilinmektedir. Flavonoidlerin elektronik absorbsiyon spektrumları 2 ayrı bant ile karakterize edilmektedir. Bu bantlardan biri görünür bölgede olup (bant 1) B halkasındaki konjugasyon ile saptanmakta, diğeri ise ultraviyole bölgede (bant 2) A halkasındaki konjugasyonla saptanmaktadır.

Antosiyaninin çeşitli kaynaklardan ekstraksiyonunda kullanılacak olan yöntemler, çoğunlukla ekstraksiyonun amacına ve antosiyaninlerin yapısına bağlı

olmaktadır. Ekstraksiyon işlemleri için antosiyaninlerin yapısını ve stabilitesini etkileyen faktörlerin bilinmesi gerekmektedir. Ekstrakte edilen pigmentler kalitatif ve kantitatif olarak hemen analiz edilecekse yöntem, pigmentleri mümkün olduğunca doğal tutacak şekilde seçilmelidir. Ekstrakte edilen pigmentlerin renklendirici veya gıda bileşeni olarak kullanılması durumunda maksimum pigment verimi, boyama kuvveti ve stabilite gibi faktörler de önem kazanmaktadır. Ayrıca ekstraksiyon ve temizleme işlemlerinin çok kompleks olmaması, zaman alıcı ve pahalı olmaması gerekmektedir (Jackman ve Smith 1992).

Antosiyaninleri doğala yakın elde etmek için pek çok araştırmacı tarafından başlangıç pigment ekstraksiyonunda nötral çözgenlerin kullanımı önerilmiştir. Ayrıca zayıf organik asitlerinde ekstraksiyon çözgenlerinde kullanıldığı bildirilmektedir (Jackman ve Smith 1992).

Antosiyaninlerin çeşitli bitkisel materyallerden ekstraksiyonu üzerine günümüze kadar pek çok çalışma yapılmıştır.

Kızılcığa benzer bir meyveden (*Vaccinium oxycoccus*) antosiyaninleri ekstrakte etmek amacıyla yapılan bir çalışmada metanol, su, aseton, etilen, glikol, metil etil keton ve izopropanol kullanılmış ve maksimum renk maddesi ekstraksiyonunun % 0.03 oranında HCl içeren metanol ile sağlandığı ve HCl'nin asetik asitten daha iyi sonuç verdiği bildirilmiştir. Elde edilen ekstraktı saflaştırmak amacıyla da iyon değiştirici reçine kullanılmıştır (Timberlake ve Bridle 1980).

Bir çeşit erik meyvesinin (*Prunus cerasifera*) kabuğu ve yapraklarının antosiyanin kaynağı olarak kullanılabilme durumunun araştırıldığı bir çalışmada, siyanidin ve peonidin-3-glikozit ve peonidin-3-rutinozitleri içeren erik antosiyaninleri, asitlendirilmiş etanol kullanılarak ekstrakte edilmiş ve elde edilen ekstraktın organoleptik açıdan kabul edilebilir özelliklere sahip olduğu ifade edilmiştir (Jackman ve ark. 1987).

Metiever ve ark. (1980) antosiyaninlerin üzüm posasından ekstraksiyonunda kullanılan çözgen ve asidin ekstraksiyon derecesi ve oranı üzerine etkisini incelemiş, çözgen olarak etanol, metanol ve su karışımı; asit olarak HCl, sitrik asit, tartarik asit, fumarik asit ve propiyonik asit kullanmış ve kullanılan ekstraksiyon çözgenleri arasında en iyi ekstraktın metanol olduğu bildirmiştir. % 10 HCl içeren metanolün etanolden % 20 ve sudan % 73 oranında daha etkili olduğu saptanmıştır. Metanol

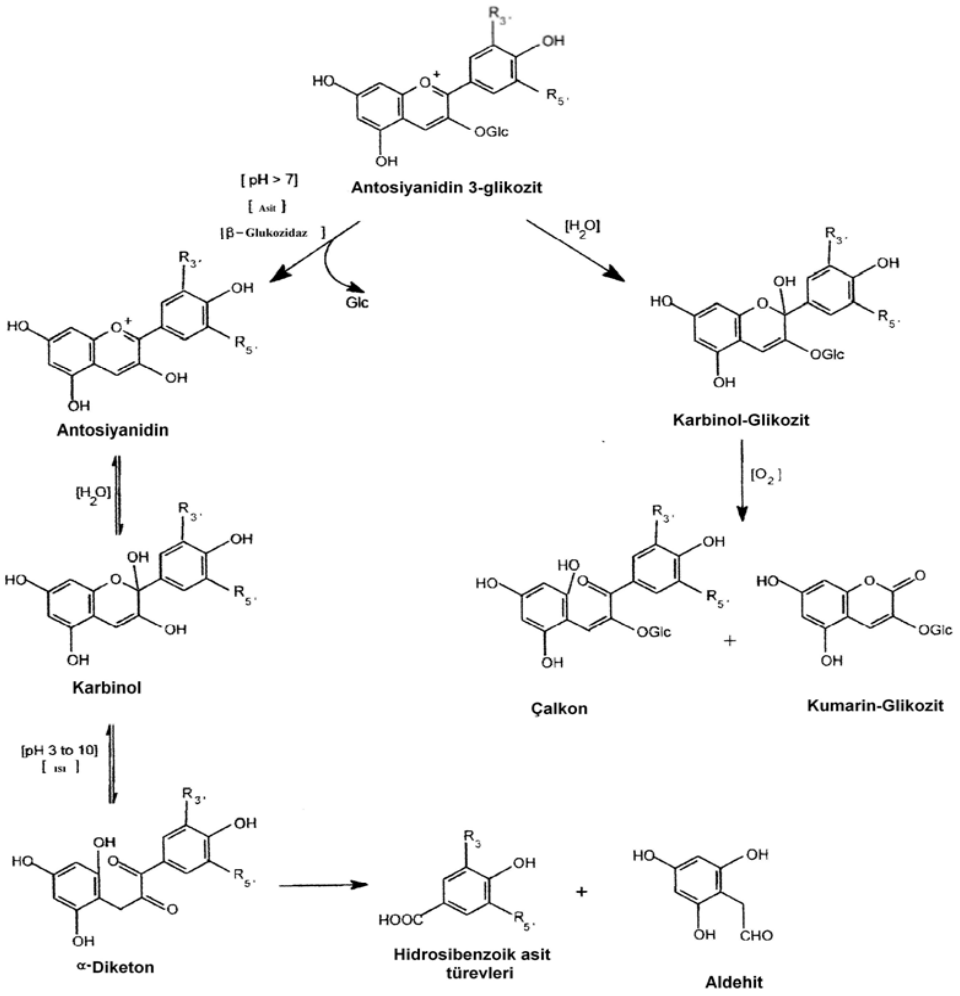
ekstraktındaki en yüksek pigment konsantrasyonuna 48 saat sonunda ulaşıldığı bildirilmiştir. HCl'in oldukça korozif bir etkiye sahip olmasından dolayı çalışmada ekstraksiyon çözgeninde asit olarak organik asitlerde denenmiştir. Organik asitle yapılan denemelerden elde edilen bulgulara göre sitrik asidin metanol ile ve asetik asidin su ile birlikte kullanıldığında daha etkili olduğu rapor edilmiştir. Pigment analizi Fuleki ve Francis (1968)'in uyguladığı yönteme göre pH:1 ve pH:4.5'de pH diferansiyel yöntem kullanılarak yapılmış ve bu çalışmada 100 g üzüm posasında 85 mg antosiyanin içeriği saptanmıştır (Uysal 2000 alıntıdır).

Antosiyaninlerin özelliklerinin araştırılması üzerine yapılan bir çalışma da Takeoka ve ark. (1997) tarafından siyah fasulye (*Phaseolus vulgaris L.*) ile yapılmıştır. Antosiyaninler % 0.5 HCl içeren metanol ile ekstrakte edilmiş, toplam antosiyanin içeriği 537 nm'deki maksimum absorbans değerleri ile hesaplanmıştır. Siyah fasulyenin pigment içeriği delfinidin-3-glikozit cinsinden 213 mg/100g olarak saptanmıştır. Antosiyaninlerin özelliklerinin belirlenmesi amacıyla yüksek basınç sıvı kromatografisi, kütle spektrofotometrisi ve spektrofotometrik analizler kullanılmış ve siyah fasulyede başlıca antosiyaninler; delfinidin-3-glikozit (%56), petunidin-3-glikozit (%26) ve malvidin-3-glikozit (%18) olarak tanımlanmıştır.

Birçok gıda bileşeninde gözlendiği gibi antosiyaninler çeşitli faktörlerin etkisiyle parçalanarak Şekil 2.6' da kendilerine özgü renklerini kaybetmekte ve hatta bazen istenmeyen renkler oluşturmaktadırlar. Gıda maddesi çekiciliğini dolayısı ile ticari değerini önemli ölçüde kaybetmektedir. Antosiyaninlerin parçalanmasına neden olan en önemli faktör sıcaklık-süre ilişkilisidir. Bu nedenle hangi süre ile olursa olsun uygulanan her ısıtma, antosiyaninlerde mutlaka parçalanmaya neden olmaktadır. Bu tahribat depolamada da sıcaklık-süre etkisiyle devam etmektedir (Kırca 2004).

Bir gıda bileşeninin degradasyonuna ilişkin, reaksiyon derecesi ve buna ait kinetik değerler, degradasyonun gerçekleştiği ortama ve bu ortamda bulunan çeşitli bileşiklere bağlıdır. Aynı durum antosiyaninler için de geçerlidir. Antosiyaninlerin degradasyonu birçok araştırmacı tarafından birinci derece bir reaksiyon kinetiği ile açıklanırken, Mishkin ve Saguy (1982) nar antosiyaninlerin degradasyonunu sıfırıncı derece reaksiyon kinetiği ile tanımlamışlardır. Sondheimer ve Kertesz (1952) ise, hidrojen peroksit bulunan ortamlarda bu maddenin miktarına bağlı olarak

antosiyaninlerin degradasyonunun birinci ya da ikinci derece kinetiğe uyduğunu ileri sürmektedirler.



Şekil 2.6. Antosiyanidin degradasyon mekanizması(Stintzing ve Carle 2004)

Vişne suyu ve konsantresinde antosiyaninlerin degradasyonunu inceleyen Cemeroğlu ve ark. (1994), 50°–80° C'lerde 8–48 saat ısıtma işlemi uyguladıkları örneklerde, antosiyanin degradasyonunun birinci derece reaksiyon kinetiğine göre gerçekleştiğini belirlemişlerdir.

Tanchev (1972), ahududu antosiyaninlerinin ısıl degradasyonunu incelemiş ve olayın birinci derece reaksiyon kinetiğine göre gerçekleştiğini belirlemiştir. Model

sistemlerde ise, ahududu antosiyaninlerinin ısıl degradasyonunun aynı şekilde birinci derece kinetiğe uyduğu saptanmıştır (Daravingas ve Cain 1968).

Frenk üzümü ile yapılan bir çalışmada ise, antosiyaninler 4°-140° C'ler arasında değişen sıcaklıklara maruz bırakılmış ve antosiyaninlerin ısıl degradasyonunun birinci derece reaksiyon kinetiğini olduğu bulunmuştur. Çalışmada 4°-140°C reaksiyon hız sabiti(*k*)'nin sırasıyla; 0.16 (±0.01) × 10^{-3}'ten 9.954 (±0.004)' kadar h^{-1} arttığı gözlemlenmiştir (Harbourne ve ark. 2008).

5°-30°C ve 60°-90°C'ler arasındaki farklı sıcaklıklara ısıtılan böğürtlen suyu ve konsantresi üzerine yapılan bir çalışmada; böğürtlen suyu antosiyaninleri birinci derece reaksiyon kinetiği izlemiş 8.90 brix° böğürtlen suyu örneklerinde aktivasyon enerjisi (E_a) değeri 58.95 kJ/mol iken depolama süresince 8.90 brix°'deki böğürtlen suyu örneklerinde aktivasyon enerjisi (E_a) değerinin hızla 65.06 kJ/mol yükseldiği gözlemlenmiştir. 65 brix°'deki böğürtlen suyu konsantresindeki aktivasyon enerjisi (E_a) ise 75.5 kJ/mol bulunmuştur (Wang ve ark. 2007).

Gıda sisteminin yanı sıra gıdanın depolama sıcaklığı da, antosiyaninlerin degradasyonu üzerine son derece etkili diğer bir faktördür. Iversen (1999), 20°C'de, karanlık veya ışıklı ortamlarda depolanan frenk üzümü sularında antosiyanin degradasyonunu birinci derece reaksiyon kinetiğiyle açıklamış ve hız sabitlerini ışıkta ve karanlıkta sırasıyla 4.2 ve 3.2 x 10^{-3} $gün^{-1}$ olarak saptamıştır.

Çilek suyu ve konsantresinin 25°C' de depolanması boyunca çilek antosiyaninlerinin degradasyonunu inceleyen Garzon ve Wrolstad (2002)'da, olayın birinci dereceden kinetiğe uyduğunu saptamışlardır. Araştırmada, çilek konsantresinde antosiyaninlerin meyve suyuna kıyasla çok daha hızlı parçalandığı belirlenmiştir. Nitekim antosiyaninlerin degradasyonuna ilişkin $t_{1/2}$ değeri çilek suyunda 8 gün, konsantrede ise 3.5 gün olarak belirlenmiştir. Buna karşın, briks derecesi arttıkça vişne (Asafi ve Cemeroğlu 2000) ve kan portakalı antosiyaninlerinin (Kırca ve Cemeroğlu 2003) depolanma stabilitesinin arttığı saptanmıştır.

Yüksek sıcaklıklarda depolanan örneklerde, kısa sürede çok hızlı bir antosiyanin kaybı meydana gelirken, depolama sıcaklığı düştükçe antosiyaninlerin stabilitesi artmaktadır. Nitekim kan portakalı sularının 15°, 25° ve 35°C'de

depolanması boyunca, 10°C'lik sıcaklık artışının, antosiyaninin degradasyon hızını 2 kat arttırdığı saptanmıştır (Maccarone ve ark. 1985).

Withy ve ark. (1993) da, kırmızı ahududu suyu konsantrelerin de antosiyanin kaybının depolama sıcaklığına bağlı olduğunu göstermişlerdir. 20°C'de 3 ay süreyle depolanan konsantrelerin antosiyanin içeriğinde % 80.4 kayıp olduğu saptanırken, –20°C'de depolamada kayıp oranı yalnızca % 3.1 düzeyinde kalmıştır.

Farklı sıcaklıklarda depolanan nar suyunda antosiyaninlerin degradasyonunu inceleyen Marti ve ark. (2001) ise, 25°C' de 2 aylık depolama sonunda nar suyundaki antosiyaninlerin % 99' unun parçalandığını, buna karşın 5°C'de 5 aylık depolama sonunda antosiyanin içeriğinde % 80' lik bir kayıp olduğunu saptamışlardır.

Genel olarak sıcaklık düştükçe antosiyaninlerin stabilitesi artmasına rağmen, yapılan bazı araştırmalar sonucunda dondurma veya dondurarak depolama sırasında da antosiyanin kaybının olduğu belirlenmiştir.

Bing kirazlarının -23°C' de 3 aylık depolanması sonunda toplam antosiyanin içeriğinin % 66' sının, 6 ay sonunda ise % 87' sinin parçalandığı saptanmıştır (Chaovanalikit ve Wrolstad 2004). Diğer yandan, aynı araştırmada –70° C'de depolanan örneklerde, 6 ay sonunda antosiyaninlerin sadece % 12'sinin parçalandığı belirlenmiştir. Dondurarak depolanan örneklerde gerçekleşen antosiyanin kaybının, meyvenin hem et hem de kabuk kısmında aktif halde bulunan enzimlerle, özellikle polifenol oksidazlarla ilişkili olduğu açıklanmıştır.

Diğer taraftan ortamın pH derecesinin, antosiyaninlerin degradasyonu üzerinde önemli bir etkiye sahip olduğu ileri sürülmektedir. Antosiyaninler, pH'dan kaynaklanan renk dönüşümlerine uğramaları nedeniyle, genel olarak asitli gıdalara (pH<3.0) uygulanmaktadırlar. Ortam pH derecesinin antosiyaninlerin rengi üzerine etkisini araştıran Fossen ve ark. (1998), mor patatesten (petanin) ve pirinçten (siyanidin 3-$_{O\text{-}\beta\text{-}D}$-glikopiranozit) izole ettikleri antosiyaninlerin 13 farklı pH aralığındaki (pH:1-9) renk stabilitesini incelemişler ve pH değerindeki değişimin her iki antosiyaninin de renk yoğunluğunu etkilediğini belirlemişlerdir. pH'nın 1'den 5'e yükselmesi her iki antosiyaninin renk yoğunluğunda azalmaya neden olurken, 5'den 8.1' e yükselmesi ise renk yoğunluğunun tekrar artmasıyla sonuçlanmış ve şaşırtıcı şekilde, pH:8.1 değerinde petanin için maksimum renk yoğunluğuna ulaşıldığı

saptanmıştır. Pirinçten ekstrakte edilen antosiyaninler ise, beklenildiği gibi pH:1'de maksimum renk yoğunluğuna ulaşmıştır.

Diğer taraftan, pH'nın pelargonidin esaslı, açillenmiş farklı antosiyanin moleküllerinin renk özellikleri üzerine etkisini belirlemek amacıyla, pH:1-7 arasında değişen tampon çözeltilerine kırmızı turp ve kırmızı patates ekstraktları eklenmiş ve ekstraktların bu pH aralıklarında sergiledikleri renk tonu (hue angle) ve Chroma değerleri belirlenmiştir (Giusti ve Wrolstad 2003). Buna göre pH:1-2 arasında incelenen tüm ekstraktların benzer renk tonu ve Chroma değerleri sergilediği, buna karşın pH:3' e yükseldiğinde renk tonu değerinin 40'dan 20'ye düştüğü saptanmıştır. pH derecesinin daha fazla artması ise, antosiyaninlerin kimyasal yapısına bağlı olarak renk tonu ve Chroma değerlerinin değişmesine neden olmuştur. Diğer yandan, kırmızı patates antosiyaninleri pH değişikliklerinden daha fazla etkilenmiş ve pH değerindeki artışla beraber Chroma değerinde daha büyük bir azalma meydana gelmiştir. Sinamik asitlerle asillenmiş kırmızı turp antosiyaninlerinin ise pH'dan kaynaklanan renk değişikliklerine karşı daha dayanıklı olduğu saptanmıştır.

Giusti ve Wrolstad (2003), pH değeri 4,2-4,5 olan yoğurt ve ekşi krema gibi süt ürünlerinde, kırmızı turp, kırmızı lahana, siyah havuç ve siyah üzüm gibi açillenmiş antosiyanin içeren ekstraktların, boya maddesi olarak kullanılabilme olasılığını incelemişler ve kırmızı turp ve siyah havuç ekstraktlarının tek başına veya kombine halde uygulandığında (5 mg monomerik antosiyanin / 100 g örnek) süt ürünlerinde arzu edilen kırmızı renk tonunu sağladığını belirlemişlerdir. Siyah havuç ekstraktı ile boyanan örneklerin renk yoğunluğunun kırmızı turp ekstraktı ile boyananlardan daha yüksek olduğu; kırmızı lahana ekstraktının ise örneklere çekici bir mor renk kazandırdığı saptanmıştır. Bu ürünlerin raf ömürlerinin soğukta depolama koşullarında yalnızca birkaç hafta ile sınırlı olduğu düşünülürse, bu koşullarda pigmentlerin stabilite açısından da sorun yaratmayacağı anlaşılmaktadır.

Başka bir çalışmada ise siyah havuç antosiyaninlerinin ısıl degradasyonu üzerine pH ve askorbik asidin etkisi incelenmiş ve araştırma sonuçları, askorbik asidin siyah havuç antosiyaninlerinin parçalanması üzerine önemli bir etkisinin bulunmadığını, buna karşın pH değeri yükseldikçe antosiyaninlerin stabilitesinin azaldığını göstermektedir (Kırca, 2004).

Gerek siyah ahududu suyunda ve gerekse siyanidin-3-diglikozit içeren model sistemlerde pH: 4.15'den 2.15'e düşürülmesi sonucunda, antosiyanin pigmentinin stabilitesinin arttığı belirlenmiştir (Daravingas ve Cain 1968).

Tanchev ve Joncheva (1973), kiraz ve eriklerden izole edilerek saflaştırılan siyanidin-3-rutinozit ve peonidin-3-rutinozitin, pH 2.5, 3.5 ve 4.5 olan tampon çözeltilerde ısıl stabilitesini incelemişler ve pH derecesi arttıkça antosiyaninlerin degradasyonuna ilişkin hız sabitlerinin (k) arttığını saptamışlardır.

Fossen ve ark. (1998), 10 ve 23°C' de depolama boyunca, mor patatesten (petanin) ve pirinçten (siyanidin-3-$_{O\text{-}\beta\text{-}D}$-glikopiranozit) ekstrakte ettikleri antosiyaninlerin 13 farklı pH aralığındaki (pH:1–9) renk stabilitesini incelemişler ve ortam pH değerinin, antosiyaninlerin degradasyon hızı üzerine oldukça etkili olduğunu saptamışlardır. pH:1.0-1.3 arasında, 10°C' de 60 günlük depolama sonunda her iki antosiyaninin de yaklaşık % 90' ı bozunmadan kalırken; petanin'in pH:6'da 8 gün, siyanidin-3-$_{O\text{-}\beta\text{-}D}$-glikopiranozit'in ise pH:7'de 2 günlük depolanma sonunda tamamen parçalandığı belirlenmiştir. Diğer taraftan, 23°C' de depolama boyunca benzer şekilde; en yüksek renk stabilitesi, düşük pH derecelerinde saptanmış, pH:4–9 arasında ise antosiyaninlerin stabiliteleri hızlı bir şekilde azalmıştır.

Tanchev ve Joncheva (1973), tampon çözeltilerde (pH:2.5) siyanidin-3-rutinozid ve peonidin-3-rutinozidin ısıl degradasyonu incelenmişler ve olayın birinci dereceden reaksiyon kinetiğine uyduğunu saptamışlardır. 78°C' de hız sabitlerini; siyanidin-3-rutinozit için 1.4×10^{-5} s^{-1} ve peonidin-3-rutinozit için ise 2.5×10^{-5} s^{-1} olarak saptamışlardır.

Farklı pH değerlerindeki model sistemlerde pelargonidin-3-soporozit'in ısıl degradasyonunun incelendiği başka bir çalışmada ise; pH 3.5'de; 78, 88, 98 ve 108°C' lerde birinci derece hız sabitleri sırasıyla; 3.0-6.7-15.5 ve 37.5×10^{-5} s^{-1} olarak belirlenmiştir (Jonscheva ve Tanchev 1972).

pH 4.0'de ve 70°, 80° ve 90°C' lerde mor mısır koçanı antosiyaninlerini inceleyen Yang ve ark. (2007) Hunter renk parametre değerlerini (C*, a* ve ΔE) birinci derece reaksiyon kinetiğini takip ettiğini bulmuşlarsa da h° ve b* değerlerinin sıfırıncı derece reaksiyon kinetiğini takip ettiğini bildirmişlerdir.

Shi ve ark. (1992a), telgraf çiçeği (*Tradescantia pallida*) yapraklarından ekstrakte ettikleri antosiyaninlerin, farklı pH derecelerinde (3.5, 4.5 ve 5.5)

hazırlanan model içecek sistemlerde stabilitesini incelemişler ve aynı koşullarda enosiyanin ve "blackberry" antosiyaninleri ile kıyaslamışlardır. İncelenen ortamlarda telgraf çiçeği antosiyaninlerinin, özellikle yüksek pH derecelerinde enosiyanin ve "blackberry" antosiyaninlerinden çok daha stabil olduğu saptanmıştır.

Diğer taraftan, kırmızı tatlı patates ve mor mısır ekstraktlarının farklı pH, sıcaklık ve ışık yoğunluklarındaki stabiliteleri incelenerek, sentetik renk maddeleri FD&C Red No.40 ve FD&C Red No.3 ile ticari siyah havuç ve siyah üzüm ekstraktları ile kıyaslanmıştır (Cevallos-Casals ve Cisneros-Zevallos 2004). Araştırmada, açillenmiş antosiyaninler açısından zengin olan kırmızı patates ve siyah havuç antosiyaninlerinin, açillenmemiş antosiyanin içeriğine sahip olan mor mısır ve siyah üzümlerden daha yüksek stabilite gösterdiği saptanmıştır. Nitekim, 98°C' de antosiyaninlerin degradasyonuna ilişkin $t_{1/2}$ değerleri siyah havuç, tatlı kırmızı patates, siyah üzüm ve mor mısır için sırasıyla 4.6, 4.6, 2.4 ve 2.0 saat olarak belirlenmiştir.

Diğer taraftan ortamda bulunan bazı şekerlerin ve bunların parçalanma ürünlerinin de antosiyaninlerin degradasyonunu hızlandırdığı belirlenmiştir. Furfural ve HMF gibi şekerlerin parçalanma ürünleri, antosiyaninlerin degradasyonunda önemli etkiye sahiptirler (Debicki-Pospisil ve ark. 1983). Nitekim model sistemlerde (pH 3.25), farklı şekerlerin (glukoz, fruktoz, ksiloz, sakaroz) ve bunların parçalanma ürünlerinin siyanidin-3-diglikozitin bozunması üzerine etkisini inceleyen Daravingas ve Cain (1968), şekerlerin hepsinin, antosiyaninlerin degradasyonunu yaklaşık aynı oranda hızlandırdığını saptamışlardır. Aynı çalışmada şekerlerin parçalanma ürünleri olan furfural ve HMF' nin antosiyaninlerin degradasyonunu şekerlerden çok daha fazla hızlandırdığı sonucuna varılmıştır. Benzer şekilde, Markakis ve ark (1957), model sistemlerde pelargonidin-3-glikozitin degradasyonunun HMF tarafından hızlandırıldığını saptamışlardır.

Model sistemlerde (pH:3.2) konkord üzümü antosiyaninlerinin degradasyonu üzerine farklı şekerlerin etkisini inceleyen Calvi ve Francis (1978), glukoz içeren sistemin degradasyon hızını etkilemediğini, buna karşın sakaroz içeren sistemde degradasyon hızının arttığını saptamışlardır. Kan portakalı ve çilek suyu gibi şeker ve askorbik asitce zengin, asitli ortamlarda antosiyaninler ile askorbik asit ve şekerlerin parçalanma ürünleri (furfural ve HMF) arasında gerçekleşen

reaksiyonlar sonucunda çeşitli polikondensasyon bileşikleri oluşmakta ve meyve sularının rengi kiremit kırmızı-kahverengiye dönüşmekte olduğu ileri sürülmektedir (Krifi ve ark. 2000).

Shi ve ark. (1992b) tarafından yapılan bir çalışmada da, farklı model sistemlerde 55°C' de ve floresan ışık altında telgraf çiçeği ve kırmızı lahana antosiyaninlerinin stabilitesi incelenmiştir. Şeker içermeyen içecek model sistemlerinde, kırmızı lahana antosiyaninlerinin telgraf çiçeği antosiyaninlerinden yaklaşık 29 kat daha hızlı parçalandığı saptanmıştır. Protein içeren model sistemlerde ise, 24 saat içinde kırmızı lahana antosiyaninlerinin nerdeyse tamamı parçalanmıştır.

Bazı Avrupa ülkelerinde reçel, jel ve şarapların renklendirilmesi amacıyla, yüksek antosiyanin içeriğiyle potansiyel bir renk maddesi olan "elderberry" ekstraktı kullanılmaktadır (Inami ve ark. 1996). "Elderberry" ekstraktı, özellikle çilek reçellerinin renginin zenginleştirilmesi ve çilek antosiyaninlerinin esmerleşmesinden kaynaklanan rengin maskelenmesi amacıyla İspanya'da yaygın olarak kullanılmaktadır. Zafrilla ve ark. (1998) ise, çilek reçeli rengini stabilize etmek amacıyla "elderberry" ekstraktına alternatif olarak nar suyu kullanılabileceğini göstermişlerdir.

Kırca (2004) yaptığı çalışmada ise 70°-90 °C ve 4°–37°C aralığında, siyah havuç suyu ve konsantrelerinde antosiyaninlerin ısıl stabilitesini araştırmış ve ayrıca, siyah havuç antosiyaninlerinin çeşitli meyve suları ve nektarları ile çilek marmelatlarında ısıl stabilitesini de incelenmiştir. Kinetik veriler, siyah havuç antosiyaninlerinin degradasyonunun incelenen tüm ortamlarda birinci derece reaksiyon kinetiğine göre gerçekleştiğini göstermektedir. Sıcaklık ve brix derecesi artıkça, siyah havuç suyu ve konsantrelerin de antosiyaninlerin ısıl degradasyon hızlarının arttığı saptanmıştır. 70°–90°C aralığında, $t_{1/2}$ değerleri, 10.8 °briks için 16.7 ile 5 saat, 30 °briks için, 16.9 ile 4.5 saat, 45 °briks için, 14.8 ile 3.2 saat ve 64 °briks için 14.4 ile 2.3 saat arasında değişim göstermiştir. Diğer yandan, depolama süresince briks derecesi azaldıkça, antosiyaninlerin degradasyon hızlarının arttığı saptanmıştır. 30, 45 ve 64 °briks derecesindeki örnekler için $t_{1/2}$ değerleri sırasıyla, 4°C' de 71.7–4.1 hafta, 20°C' de 85.9–4.5 hafta ve 37°C' de 214.8–3.9 hafta arasında değişiklik göstermiştir.

Antosiyanin içermeyen fakat siyah havuç konsantresi eklenerek

renklendirilmiş meyve suyu ve nektarlarında, antosiyaninlerin ısıl degradasyonuna ilişkin $t_{1/2}$ değerlerinin 70°C' de 12.6 ile 16.7 saat, 80°C' de 7.2 ile 10.1 saat ve 90°C' de ise 3.9 ile 5.6 saat arasında değiştiği saptanmıştır (Kırca 2004).

Siyah havuç antosiyaninlerinin ısıl degradasyonunun portakal suyunda en yüksek düzeyde gerçekleştiği gözlenmiştir. Siyah havuç antosiyaninlerinin 20°C' deki degradasyon hızları ise en düşükten başlayarak yükseğe doğru "üzüm suyu, mandarin suyu, elma suyu, şeftali nektarı, limon suyu, kayısı nektarı, ananas nektarı, greyfrut suyu, portakal suyu" şeklinde sıralanmıştır. Meyve suyunun doğal rengini geliştirmek ve bu rengin stabilitesini arttırmak amacıyla, doğal olarak antosiyanin içeren bazı meyve suyu (nar ve kan portakalı) ve nektarlarına (vişne) da siyah havuç konsantresi eklenmiştir. Kinetik veriler, antosiyanin içeren meyve suyu ve nektarlarına siyah havuç suyu konsantresi eklenmesinin, antosiyaninlerin stabilitesini arttırdığını göstermiştir (Kırca 2004).

Rodriguez-Saona ve ark. (1999) tarafından, kırmızı turp ve kırmızı patates antosiyaninlerinin meyve suyu model sistemlerindeki stabilitesi incelenmiştir. Araştırmada, model sistemlerin boyanması amacıyla kimyasal olarak saflaştırılmış antosiyanin ekstraktları ile bizzat kırmızı turp ve patates suyu konsantreleri kullanılmıştır. 2°C ve 25°C' lerde 65 haftalık depolama boyunca, kırmızı turp antosiyaninlerin patates antosiyaninlerinden daha yüksek stabilite gösterdiği saptanmıştır. Nitekim 25°C' de depolama boyunca $t_{1/2}$ değerleri kırmızı turp antosiyaninleri için 16–24 hafta, patates antosiyaninleri için ise 10-11 hafta olarak belirlenmiştir. Ayrıca, antosiyanin ekstraktları ile boyanan sistemlerin renk stabilitesinin, konsantre ile boyanan sistemlerden daha yüksek olduğu saptanmıştır.

Kırmızı lahana ekstraktındaki antosiyaninlerin tampon çözeltilerde ve gazsız içecek model sistemlerinde, 25°, 40°, 60° ve 80°C' lerdeki ısıl stabilitesini inceleyen Dyrby ve ark. (2001), ulaştığı sonuçları frenk üzümü, siyah üzüm ve "elderberry" ekstraktlarındaki antosiyaninlerin stabiliteleri ile kıyaslamışlardır. İncelenen ortamlarda antosiyaninlerin degradasyonu birinci derece reaksiyon kinetiğine uygun olarak gerçekleşmiş ve antosiyaninlerin stabiliteleri içecek model sistemlerde kırmızı lahana > frenküzümü > siyah üzüm > "elderberry" şeklinde sıralanmıştır. 80°C' deki hız sabitleri, tampon çözeltilerde sırasıyla: $9x10^{-3}$, $4.3x10^{-2}$, $1.5x10^{-2}$ ve $9.0x10^{-2}$ h^{-1},

içecek model sistemlerde ise; $3.6x10^{-3}$, $8.7x10^{-2}$, $3.2x10^{-1}$, $1.8x10^{-1}$ h^{-1} olarak belirlenmiştir. Hız sabitlerin, içecek model sistemlerde yaklaşık iki kat fazla olması ortamda bulunan şeker ve askorbik asidin antosiyaninler üzerindeki yıkıcı etkisiyle açıklanmıştır.

Antosiyaninlerin gıdalara çekicilik kazandırma özellikleri yanında, sağlık açısından da yararlı bileşikler olduğu ve farmakolojik özellikleri nedeniyle çeşitli hastalıklarda tedavi etme amacıyla kullanıldığı bilinmektedir.

Antosiyaninler, günlük diyetle ve yüksek düzeydeki alımı beslenme açısından da büyük ilgi çekmektedirler. Nitekim 1971 yılında, Amerika Birleşik Devletlerinde gıdalarla alınan günlük ortalama antosiyanin miktarı 180 mg/gün (kışın) ve 215 mg/gün (yazın) olarak belirlenmiş olduğu bildirilmektedir (Bridle ve Timberlake 1997).

Son yıllardaki çalışmalarla, antosiyaninlerin çeşitli kan dolaşımı bozukluklarında, bazı göz hastalıklarında tedavi edici niteliği bulunduğu ortaya konmuştur (Kong ve ark. 2003). Özellikle siyanidin glikozitlerinin, antimutajenik, antikanserojenik aktivite ve gastrite karşı koruyucu etki ve oksidatif stresin azaltılması gibi çeşitli biyolojik özellikleri olduğu bildirilmiştir (Galvano ve ark. 2004). Bu yüzden, antosiyanin içeren birçok farmasotik ürünün piyasaya sunulmaya başlandığı bilinmektedir.

Yapılan birçok araştırmada da, antosiyaninlerin antioksidatif etkilerinin bulunduğu saptanmıştır (Tsuda ve ark. 1994, Wang ve ark. 1997, Kalt ve ark. 2000). Siyanidin ve siyanidin-3-glikozitin çeşitli sistemlerde antioksidatif aktivite gösterdiği, hatta bazı sistemlerde α-tokoferolden daha fazla antioksidatif etkiye sahip olduğu belirlenmiştir (Tsuda ve ark. 1994).

Proteggente ve ark. (2002) çilek, kırmızı erik ve ahududu ekstraktlarının antioksidant kapasitelerini incelemişler ve ekstraktların yüksek antioksidant aktivitelerini, ekstraktın içerdiği yüksek düzeydeki antosiyanin miktarı ile açıklamışlardır.

Yine siyanidin, delfinidin, pelargonidin, malvidin ve peonidinin çeşitli türevlerinden oluşan 14 farklı antosiyaninin antioksidant kapasitesinin incelendiği bir araştırmada, siyanidin-3-glikozitin en yüksek antioksidatif aktive gösterdiği ve bu aktivitenin bir E vitamini analoğu olan Troloksa göre 3,5 kat yüksek olduğu

saptanmıştır (Wang ve ark. 1997). Diğer yandan, incelenen bileşikler arasında en düşük antioksidatif aktivite gösteren pelargonidin-3,5-diglikozitin bile, Troloksla eşit düzeyde bir aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir.

Çalışmanın materyalini oluşturan siyah havuç, bilimsel adı *Daucus carota* olan, *Umbelliferae* (şemsiyegiller) familyasına ait, kökleri yenen iki yıllık bir kültür sebzesidir. Yenilebilen etli kökler birinci yıl, çiçek ve tohumları ise ikinci yılda yetişmektedir (Bayraktar 1970).

Antosiyanince zengin bir besin olan siyah havuç, az ışık, yüksek rutubet ve nispeten düşük sıcaklık şartlarında iyi bir gelişme göstermektedir. Optimum gelişim özellikleri açısından 15-21°C' lik sıcaklığın iyi olduğu bilinmektedir. Yine gelişme şartlarının, havucun rengi üzerine etkisinin incelendiği çalışmalara göre, ilkbaharda yetiştirilen havuçların renklerinin sonbahar ve kışın yetiştirilenlere göre daha iyi ve gösterişli olduğu belirtilmektedir (Bayraktar 1970).

Çalışmanın diğer bir materyali olan lokum, özde şeker ve nişasta hammaddesinden oluşan, boğaz rahatlatan anlamına gelen ''rahat-ul hüküm'' olarak adlandırılan ve 15.y.y.'dan beri Anadolu'da ve Osmanlı topraklarında bilinen ve daha ziyade şeker, nişasta, un ve gerektiğinde değişik çeşni maddeleri katılarak tekniğine uygun bir şekilde hazırlanan bir gıdadır (Altan 2001). Diğer tatlı yiyeceklerde olduğu gibi lokum üretiminde de rafine şeker kullanılmaya başlanması ve unun yerini nişastanın almasıyla ortaya çıkan 'Türk lokumu' tüm dünyada bilinir hale gelmiştir. Şeker, mısır nişastası ve suyun uygun oranlarda karıştırılıp, içine meyve veya kuruyemiş eklenerek elde edilen karışım, belirli sıcaklıkta ve sürede pişirilmektedir. Elde edilen sıcak ve akıcı durumdaki lokum, alçak kenarlı tablalar üzerine dökülüp, üzerine nişasta serpilerek 24 veya 48 saat beklemeye bırakılır. Soğuyan ve esnek bir katılığa ulaşan şekerleme, üzerine pudra şekeri serpilip küçük parçalar halinde kesildikten sonra tekrar pudra şekerine bulunmasıyla Türk lokumu elde edilmektedir.

Lokum 18. yüzyılda bir İngiliz turist tarafından Avrupa'ya götürülmesiyle "Türk tatlısı'' veya "Türk zevki'' anlamına gelen "Turkish Delight'' olarak tanınmaya başlanmıştır (Anonymous 2004). Lokum, şeker şurubunun sitrik asit, tartarik asit veya krem tartarla kestirilerek nişasta ile pişirilmesinden elde edilmektedir. Esas madde olan nişasta ve şekere, yapılacak lokum cinsine göre fıstık,

fındık, badem içi gibi kuruyemişler, meyve usareleri, çiçek yaprakları veya sakız da konulabilmektedir. Ayrıca hindistan cevizi talaşı ve kaymak ilave edilerek yapılan çeşitleri de vardır. Bazen içine gıda maddelerine özgü boya veya esanslar da katılabilmektedir (Anonymous A. Arı Lokum).

Lokum üretiminde kullanılan nişasta; granüler yapıda beyaz, tatsız, kokusuz, gözenekli bir kalitede olup granüllerin şekli ve büyüklüğü nişastanın elde edildiği hammaddeye göre değişmektedir. Nişastalar kimyasal olarak amiloz ve amilopektin moleküllerini içermektedir. Amiloz molekülleri lineerdir ve yapı içinde birbirleri ile paralel bir şekilde ve yakın olarak yerleştikleri için bir polimerin diğeri ile hidrojen bağları aracılığıyla birleşebilme yeteneği vardır. Ayrıca amiloz; iyot, yağ asitleri ve diğer organik maddelerle fiziksel olarak reaksiyona girebilmektedir. Amilozun bu özellikleri retrogradasyona uğramasına yol açmakta, bunun sonucunda da süngerimsi veya kauçuk tipi yapılar oluşturmasına sebep olabilmektedir. Nişastanın yapısında yer alan amilopektin molekülü ise dallanmış bir yapıya sahiptir ve genelde yapı içinde amilozdan daha yüksek miktarlarda bulunmaktadır (Lees ve Jackson 1973).

Nişasta-su karışımlarına şeker ilave edildiğinde nişastanın jelleşme özelliklerinde değişme meydana gelmektedir. Ortamda bulunan şekerler, nişasta granülünün şişmesine engel olmakta ve jelatinizasyon süresini uzatarak geciktirici etki yapmaktadırlar. Ayrıca şekerler, pişirme aşamasında su ile etkileşime girerek nişastanın tamamen ve düzgün bir şekilde suyu almasına engel olmakta, viskoziteyi ve jel kuvvetini etkilemektedirler. Ancak, bütün bunların yanı sıra şekerlerin, nişasta moleküllerinin birbirleri ile birleşmelerini engelleyerek jel yapısını stabilize ettiği ve retrogradasyon oluşumunu azalttığı düşünülmektedir (Özbey 2002).

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Materyal

3.1.1. Siyah havuç suyu konsantresi

Araştırmada, pigment kaynağı olarak siyah havuç ve bundan elde edilen siyah havuç suyu konsantresi kullanılmıştır. Siyah havuç suyu konsantresi örnekleri araştırmada kullanılmak üzere üzere TARGID Meyve Suyu Firmasından (Mersin) temin edilmiştir. Siyah havuç suyu konsantresi (62.8 Bx°) örnekleri, analiz ve lokum üretiminde renklendirme amacıyla kullanılana kadar -30^{o} C'de muhafaza edilmiştir.

3.1.2. Lokum

Araştırmada kullanılan lokum, Azim Şekerleme (Konya) firmasının üretim tesislerinde üretilmiş, 30kg lokum karışımına 198.15g siyah havuç suyu konsantresi ilave edilerek renklendirilmiştir. Bu miktar lokumların sentetik boyalar kullanılarak yapılan renklendirmede elde edilen renge yakın bir renk tonu elde etmek için deneme yapılarak belirlenmiştir.

3.1.2.1. Lokum Üretimi

Toz şeker çözülebileceği kadar su ile birlikte kaynatma kazanına konulup, karıştırılarak ısıtılmış bu sırada sitrik asit bir başka kapta bir miktar suda çözündürülmüştür. Lokum üretimi esnasında kullanılacak olan nişasta suyun geri kalan kısmı içinde süspanse hale getirilmiştir. Daha sonra nişasta süspansiyonu ve asit, şeker çözeltisine ilave edilmiştir. Elde edilen karışım karıştırılarak pişirilirken, 120°C de siyah havuç suyu konsantresi ilave edilmiştir.

Renklendirilmiş lokum kitlesi belirli bir kıvama erişince (kazandan alınıp soğutulan bir miktar örnek, parmaklar arasında yuvarlanıp parmaklar açıldığında, lokum iki parmağa birden yapışıp uzamadığı, şeklini koruyarak parmaklardan birinde

kaldığı zaman) ateşten indirilip nişastalı tahta tablalara dökülmüştür. 12-24 saat tablalarda bekletilip dinlendirildikten sonra üzerine pudra şekeri/nişasta serpilerek, mermer tezgahlar üzerinde, istenen büyüklük ve şekilde kesilerek ambalajlanmıştır.

LOKUM ÜRETİMİ

Hammaddelerin Temini (Şeker, nisasta, sitrik asit ve su)

↓

Karışım Eldesi (Şeker şurubu ve nişasta sütünün hazırlanması)

↓

Pişirme (1.5-2.0 saat, açık kazanda) + Asit ilavesi

↓

Siyah havuç suyu konsantresinin ilavesi

↓

Aroma ilavesi

↓

Döküm ve Kalıplama (Pudra şekeri+Nişasta)

↓

Bekletme (Soğutma 12-24 saat)

↓

Kesim (bıçakla)

↓

LOKUM

↓

Paketleme

↓

Depolama

Şekil 3.1. Lokum üretim akış diyagramı

3.2. Metod

3.2.1. Fiziksel analizler

3.2.1.1. pH değeri tayini

pH değeri, potansiyometrik olarak pH-metre (WTW Inolab Level 1, Weilheim, Almanya) ile saptanmıştır. Bu amaçla, 10 g lokum örneği alınmış ve üzerine 90 mL saf su eklenerek homojen bir karışım hazırlanmıştır. Elde edilen homojen karışımda, 20º C'de pH değeri belirlenmiştir (Cemeroğlu 2007).

3.2.1.2. Reflektans renk tayini

Bu amaçla, reflektans spektrofotometresi (Minolta CM-3600d, Osaka, Japonya) kullanılmıştır. Lokumlarım renklerinin ölçümünde CIE L*a*b* sistemi kullanılarak L*, a* ve b* değerleri belirlenmiştir. Daha sonra a* ve b* değerleri kullanılarak, C* (chroma, renk yoğunluğu) ve h° (hue, renk tonu) aşağıda verilen 3.1. ve 3.2. No'lu eşitlikler yardımıyla hesaplanmıştır:

$$C^* = (a^{*2} + b^{*2})^{1/2} \quad (3.1.)$$

$$h^\circ = \arctan (b^*/a^*) \quad (3.2.)$$

Reflektans spektrofotometresi, her kullanımdan önce standardize edilmiştir. Renk ölçümlerinde "Minolta CM-S100w SpectraMagic NX" 1.22 versiyonu bilgisayar programı kullanılmıştır.

CIE L*a*b* sisteminde L* değeri parlaklık derecesi (lightness) olarak tanımlanmakta ve bu değer 0 (siyah) ile 100 (beyaz) arasında değişmektedir. CIE a* değeri, 0 ile 60 arasında değişmekte olup, pozitif a* değerleri kırmızı, negatif a* değerleri ise, yeşil rengi göstermektedir. CIE b* değerleri de, 0 ile 60 arasında değişmekte; pozitif b* değerleri sarı, negatif b* değerleri ise, mavi rengi göstermektedir. a* ve b* değerlerinin 0 olması, cismin renksiz (akromatik) olduğunu göstermektedir. CIE C* değeri, renk doygunluğu veya renk yoğunluğu (kroma değeri) ile ilgili bir nitelik olup 0 ile 60 arasında değişmekte ve renk düzleminin

merkezinde 0 (mat) ve merkezden uzaklaştıkça parlak (vivid) tonlar artmaktadır. h° değeri (hue değeri) ise, renk tonu veya renkle ilgili bir nitelik olup 0°–360° arasında değişmekte; 0° ve 360° kırmızı, 90° sarı, 180° yeşil ve 270° mavi olarak değerlendirilmektedir. L* değeri gıdalarda esmerleşme indeksi olarak kullanılmaktadır (Aguilera ve ark. 1987).

Renk analizi yapılacak lokum örneği bir eldiven ile alınmış ve üzerinde bulunan nişasta ve/veya pudra şekeri bir fırça yardımı ile uzaklaştırılmıştır. Lokum bir falçata yardımıyla ortadan ikiye bölünüp, okuma yapılcak yüzey makasla traşlanıp temizlendikten sonra, renk analizi için uygun hale getirilmiş ve okuma bu yüzeyde yapılmıştır.

3.2.2. Kimyasal analizler

3.2.2.1. Toplam monomerik antosiyanin tayini

Antosiyanin içeriği, Fuleki ve Francis (1968) tarafından geliştirilmiş bulunan pH-diferansiyel tayin metoduna göre saptanmıştır. Absorbans okumaları siyah havuç antosiyaninlerinin maksimum absorbans verdiği dalga boyunda (526 nm), düşük düzeyde bulunan bulanıklığın belirlenmesi için ise; 700 nm' de yapılmıştır (Wrolstad 1976). Siyah havuç suyu konsantresi antosiyaninlerinin 526 nm' de maksimum absorbans verdiği saptanmıştır. Tüm depolama süresince, konsantre örnekleri aynı seyreltme oranlarına uyularak seyreltilmiş ve böylece analizler birçok spektrofotometrenin linear sınırı olan 1.2 absorbans değerinin (Cemeroğlu, 2007) altında yürütülmüştür. Potasyum klorür çözeltisi (pH:1) ile belirlenen bu seyreltme oranı, hem potasyum klorür ve hem de sodyum asetat tampon çözeltisi (pH:4.5) ile uygulanmış ve elde edilen seyreltikler, 15 dakika süre ile denge oluşması için kendi halinde bırakılmışlardır. Bekleme süresi sonunda, seyreltikler 0.45 μm gözenek çapındaki PVDF (polyvinylidene fluoride) filtreden (Millipore, Bedford, MA, A.B.D.) filtre edildikten sonra örnek ve şahidin (% 0.01'lik HCl) aynı anda koyulabildiği çift huzmeli (double-beam) spektrofotometre (ThermoSpectronic Helios-α, Cambridge, İngiltere) kullanılarak belirlenmiştir. Antosiyanin miktarı bütün örneklerde, siyanidin 3-glikozit cinsinden (Alasalvar ve ark. 2004)

(MW=445,2 molar absorbans, ε=29 600) 3.3. no' lu eşitliğe göre hesaplanmıştır (Wrolstad 1976).

$$\text{Monomerikantosiyanin, mg/L} = \frac{A \times MW \times S_f \times 1000}{\varepsilon \times \ell} \qquad (3.3.)$$

Burada;

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

ε: Molar absorbans, L Absorbans ölçüm küvetinin tabaka kalınlığı, cm,

MW: Molekül ağırlığı, SF: Seyreltme faktörü.

3.2.2.2. Antosiyaninlerin parçalanma ölçüsü düzeyinin tayini:

Giusti ve Wrolstad (2001) tarafından önerilen yöntem kullanılarak; antosiyaninlerin parçalanma ölçütleri olarak kabul edilen "renk yoğunluğu," "polimerik renk" ve "polimerik renk oranı" gibi üç nitelik belirlenmiştir. Bu yöntem de potasyum *meta*-bisülfit çözeltisi eklenen doğal haldeki monomerik antosiyaninler bisülfitle reaksiyona girerek renksiz bileşikler oluşturmaktadır. Buna karşın polimerik antosiyanin-tanen kompleksleri ve melanoidin pigmentleri bisülfitlerin ağartma etkisine direnerek renklerini korurlar. Bu esmer renkli bileşiklerin miktarı arttıkça 400–440 nm aralığında okunan absorbans değerleri artmaktadır. Bu nedenle 420 nm'de yapılacak okuma, bu değerleri bulmamızda yardımcı olacaktır. Bu amaçla daha önce ekstrakte edilip saflaştırılan örnekten, belirlenen seyreltme oranlarına göre saf su ile seyreltilen örnekler hazırlanımıştır. Seyreltiğin üzerine aynı oranda potasyum *meta*-bisülfit çözeltisi ve saf su ilave edilerek, seyreltiğin dengeye gelmesi için 15 dakika süre ile beklenilmiştir. Bekleme süresi sonunda, seyreltikler 0.45 µm gözenek çapındaki PVDF (polyvinylidene fluoride) filtreden (Millipore, Bedford, MA, A.B.D.) filtre edildikten sonra örnek ve şahidin (%0.01'lik HCl) aynı anda koyulabildiği çift huzmeli (double-beam) spektrofotometre (ThermoSpectronic Helios-α, Cambridge, İngiltere) kullanılarak belirlenmiştir.

Renk yoğunluğu: Bu değer bisülfit uygulanmamış küvette bulunan örneğin okunan absorbans değeri yardımıyla hesaplanır.

$$\textbf{Renk Yoğunluğu} = [(A\lambda vis\text{-}max\text{-}A_{700}) + (A_{420}\text{-}A_{700})] * (S_f) \qquad (3.4.)$$

***Polimerik renk*:** Bisülfit uygulanmış küvette bulunan örneğin okunan absorbans değeri yardımıyla bulunur.

$$\textbf{Polimerik Renk} = [(A\lambda vis\text{-}max\text{-}A_{700}) + (A_{420}\text{-}A_{700})] * (S_f) \qquad (3.5.)$$

***Polimerik renk yüzdesi*:** Polimerik renk ve polimerik renk yoğunluğunun yükselmesi üründe antosiyanin parçalanmasının arttığını esmer renkli bileşiklerin yoğunluğunun arttığının göstergesidir. Taze ürünlerde polimerik renk yüzdesinin % 10 altında olması istenir. İşlem görmüş ürünlerde ise bu değer % 30'lara kadar yükselebilmektedir.

$$\textbf{Polimerik renk yüzdesi} = \frac{\textbf{Polimerik Renk}}{\textbf{Renk Yoğunluğu}} * 100 \qquad (3.6.)$$

3.2.2.3. Antosiyanin miktarının HPLC yöntemiyle belirlenmesi

Lokum örneklerindeki antosiyanin kompozisyonu, HPLC yöntemiyle üç aşamadan (ekstraksiyon, saflaştırma, tanımlama ve hesaplama) sonunda belirlenmiş olup, bu aşamalar aşağıda açıklanmıştır.

Antosiyaninlerin ekstraksiyonu: Bu amaçla lokumdan, ekstraksiyon için 100 g alınmış ve üzerine 100 mL saf su ilave edilerek blenderda (Warning Commercial Laboratory Blender-Warning Products Division U.S.A) yarım saat süre homojenize edilmiştir. Homojen karışımdan 50 g tartılmış ve üzerine 100 mL (% 85 etanol-% 15 1,5 N HCL) solvent ile yüksek devirli bir homojenizatörde (Heidolph SilentCrusher

M, Schwabach, Almanya) 15500 rpm'de 20 dakika süre ile homojenize edilmiştir. Homojenizata aşağıdaki işlemler uygulanmıştır.

Homojen karışım, Buchner hunisinden Whatman 1 no'lu filtre kağıdı yardımıyla vakum altında filtre edilmiştir. Filtrat içerisinde 200 mL kloroform bulunan bir ayırma hunisi üzerine aktarılmıştır. Emzikli erlenmayerdeki ekstraktın tümünün kayıpsız olarak alınması için erlenmayer 5 mL (% 85 etanol-% 15 1,5 N HCL) solvent ile yıkanmış ve kloroformun üzerine ilave edilmiştir. Ayırma hunisi karıştırılmış, 4º C'de buzdolabında bir gece bekletilerek faz ayrımı sağlanmıştır.

Bu ayrım sağlandıktan sonra, altta bulunan kloroform fazı uzaklaştırılmış ve antosiyaninleri içeren üstteki renkli faz, ayırma hunisinden kayıpsız bir şekilde bir rotary evaporatör balonuna alınmıştır. Az miktardaki (% 85 etanol-% 15 1,5 N HCL) solvent ve kloroform, 40º C'de rotary evaporatörde vakum altında 30 dakikada uzaklaştırılmıştır. Kalan sulu ekstrakt, %0.01 HCl içerecek şekilde asitlendirilmiş su ile 50 mL'lik ölçü balonuna yıkanarak hacmine tamamlanmıştır. Balondaki çözelti 0.45 μm gözenek çaplı PVDF filtreden (Millipore, Bedford, MA, A.B.D.) filtre edilmiştir (Cemeroğlu, 2007).

Antosiyaninleri saflaştırma: Elde edilen ekstrakttan; şeker ve organik asit gibi unsurların uzaklaştırılması amacıyla saflaştırma işlemi uygulanmıştır. Saflaştırma işleminin ilk aşamasında C-18 Oasis kartuşların şartlandırma işlemi yapılmıştır. Bu işlemde kartuşdan sırasıyla; 5 mL metanol (MeOH, %0.01 HCl içerecek şekilde asitlendirilmiş) ve son olarak da 2 mL %0.01 HCl içerecek şekilde asitlendirilmiş su geçirilmiştir. Ekstraksiyona hazır hale getirilen kartuşa, 50 mL'lik ekstrakt yüklenmiş ve daha sonra 15 mL saf suyla yıkanmıştır. Bu sırada organik asitler, şekerler ve suda çözünür nitelikteki diğer bileşikler uzaklaştırılırken, antosiyaninler ve diğer polifenolik bileşikler kartuşun dolgu maddesine bağlanmıştır. Homojen bir saflaştırma işlemi için manifold'dan (Waters, Milford, MA, A.B.D.) yararlanılmıştır.

C-18 Oasis kartuş, 5 dakika süresince N_2 gazı altında tutularak kartuşun kuruması sağlanmış ve kurutulmuş kartuş, 12 mL asitlendirilmiş MeOH ile yıkanarak antosiyaninleri içeren ekstrakt elde edilmiş, elde edilen antosiyanin ekstraktı bir santrifüj tüpüne alınmış ve 40ºC'deki su banyosuna (Memmert WB 14, Schwabach, Almanya) yerleştirilerek, asitlendirilmiş MeOH, N_2 gazı altında kurutulmuştur. Daha

sonra santrifüj tüpündeki kurutulmuş antosiyanin ekstraktı üzerine 5 mL asitlendirilmiş su eklenerek yeniden çözündürülmüştür. Antosiyaninleri içeren bu çözelti 0.45 µm gözenek çaplı PVDF filtreden (Millipore, Bedford, MA, A.B.D.) filtre edilerek, HPLC'nin oto-örnekleme (auto-sampler) ünitesinde kullanılan amber renkli 2 mL'lik cam şişelere (vial) alınmış ve bekletilmeden HPLC'ye enjekte edilmiştir.

3.2.2.3.1. HPLC cihazı

Antosiyaninlerin miktarlarının hesaplanmasında "yüksek performanslı sıvı kromatografi" cihazından (HPLC, Agilent 1200 serisi, Waldbronn, Almanya) yararlanılmıştır. Kullanılan HPLC sistemi; ikili (binary) pompa, foto diyoderey dedektörü (PDA, photo dioderay dedector), 4°C 'ye inebilen soğutma sistemine sahip oto-örnekleyici (auto-sampler), gaz giderici (degasser) ve kolon fırınından (thermostatted column compartment) oluşmaktadır. Elde edilen kromatogramlar "ChemStation rev. B.02.01" yazılım programı ile değerlendirilmiştir.

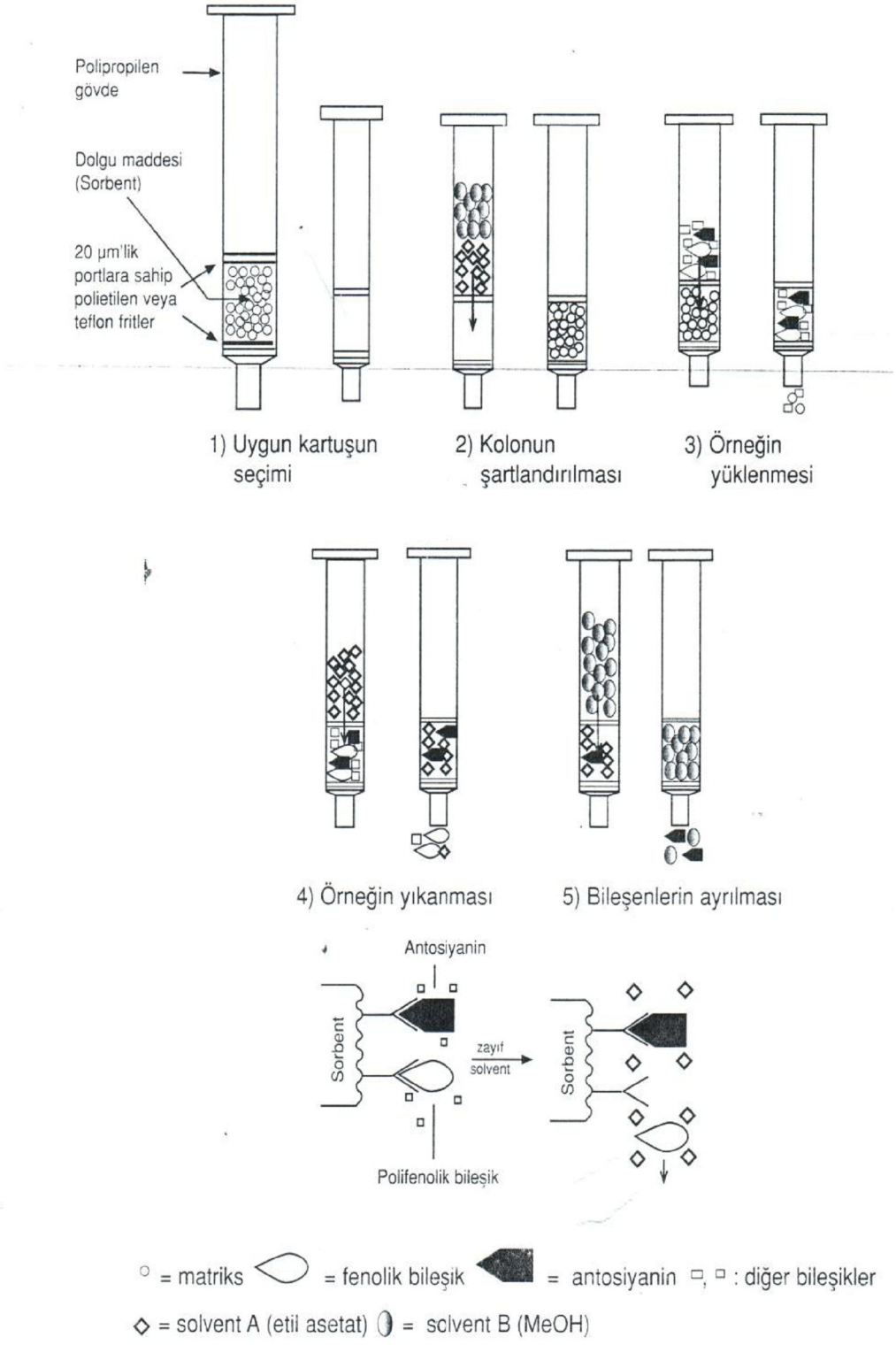
Kromatografi koşulları:

- **Kolon**: Ters faz (reverse phase) C_{18} kolonu (250 x 4.6 mm, 5 µm) (Phenomenex, Los Angeles, CA, A.B.D.)
- **Koruyucu kolon**: C_{18} koruyucu kolonu (4 x 3 mm, 5 µm) (Phenomenex, Los Angeles, CA, A.B.D.)
- **Akış hızı**: 1 mL/dak.
- **Elüsyon süresi**: 30 dak.
- **Enjeksiyon hacmi**: 50 µL
- **Dalga boyu**: 520 nm
- **Hareketli faz (mobile phase)**: Asetonitril (%100, v/v) (A) ile *o*-fosforik asit-asetik asit-asetonitril-su (1:10:5:84; v/v/v/v) (B) karışımı. Gradiyent akış söz konusu olup, Çizelge 3.1'deki elüsyon profili uygulanmıştır.

Çizelge 3.1. Antosiyaninler için uygulanan elüsyon profili

Süre(dak.)	%A	%B
0	1	99
10	12	88
20	22	78
25	22	78
30	1	99

Kromatogramlarda elde edilen antosiyanin pikleri, standart maddelerin alıkonma süresi (retention time) ve PDA dedektöründe elde edilen UV spektrumlarının karşılaştırılmasıyla tanımlanmıştır.



Şekil 3.2. Kartuşların şartlandırılması (Cemeroğlu 2007)

3.3. Depolama Deneyleri

Siyah havuç suyu konsantresinin geleneksel Türk lokumunda stabilitesinin belirlenmesi amacıyla depolama sıcaklıkları olarak 12°, 20° ve 30° C seçilmiştir. Bu amaçla, Sanyo MIR 153 Model soğutmalı inkübatör (Sanyo, Gunma, Japan) kullanılmıştır. Depolama süresince, uygulanan sıcaklığa bağlı olarak farklı aralıklarla alınan örneklerde antosiyanin kaybı belirlenmiştir. Depolama süresi, uygulanan sıcaklığa bağlı olarak maksimum 5 ay olarak saptanmıştır.

3.4. Kinetik Katsayıların Hesaplanması

Reaksiyon hız sabitinin (k) hesaplanması:

Uygulanan herbir sıcaklık için antosiyanin kaybına ilişkin değerlerin "y" eksenine, sürelerin "x" eksenine yerleştirilmesiyle, yarı logaritmik ölçekli bir grafikte doğrusal bir eğri elde edilmiştir. Bu eğriye linear regresyon analizi uygulanarak eğrinin denklemi hesaplanmış ve elde edilen denklemin eğim değeri kullanılarak, aşağıdaki eşitliğe göre reaksiyon hız sabiti (k) hesaplanmıştır (Labuza 1984):

$$k = (\text{eğim}) \times 2.303$$

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

Bu değer, incelenen bileşiğin ya da kalite kriterinin % 50' sinin kaybolması için gerekli süre olup birinci derece kinetiğe uygun reaksiyonlar için aşağıdaki eşitliğe göre hesaplanmıştır (Labuza 1984):

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

Q_{10} değerinin hesaplanması:

Reaksiyonun sıcaklığa bağımlılığını gösteren diğer bir boyut olan Q_{10} değeri, sıcaklığın 10°C yükseltilmesinin reaksiyon hızına etkisini gösteren bir kriter olup, aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplanmıştır:

$$Q_{10} = (k_2 / k_1)^{10/(T2 - T1)}$$

3.5. İstatistik değerlendirme

Lokumların farklı sıcaklıklarda (12°C, 20°C ve 30°C) depolanması durumunda depolama süresi ile toplam monomerik antosiyanin miktarı arasındaki değişim iki tekerrürlü faktöriyel düzende varyans analiz tekniği kullanılarak değerlendirilmiştir.

Varyans analizi sonucuna göre, gerekli olduğu durumda Duncan çoklu karşılaştırma testi kullanılarak faktörlerin hangi seviyeleri arasındaki farklılığın önemli olduğu araştırılmıştır. İstatistik analizler için "Minitab for Windows (ver. 14)" ve "MSTAT" paket programları kullanılmıştır.

4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA

4.1. Türk Lokumunda Siyah Havuç Antosiyaninlerinin Depolanma Stabilitesi

Ülkemiz şekerleme sanayinin en önemli üretim ve ihracat ürünü olan lokum Türk halkınca çok sevilen ve çok tüketilen bir üründür. Bu ürünün, özellikle de güllü lokumun bileşimine bakıldığında; karbonhidratca zengin olduğu ve yapısına giren tek yapay maddenin ise renk maddesi olduğu gözden kaçmamaktadır.

Bu çalışmada, lokum üretiminde doğal renk maddesi kullanımı ve doğal renk maddesi kaynağı olarak da siyah havuç antosiyaninlerinin gelenkesel Türk lokumundaki depolama stabilitesi araştırılmıştır. Depolama süresince antosiyanin miktarındaki değişim Çizelge 4.1' de ve Şekil 4.1' de gösterilmiştir. Başlangıçta 12.62 mg/kg düzeyindeki antosiyanin miktarı depolama süresince sıcaklığa bağlı olarak zamanla azalmıştır. Aralarında doğrusal bir ilişki olduğu anlaşılmaktadır.

Çizelge 4.1. Farklı Sıcaklıklarda Depolanan Lokum Örneklerinde Depolama Süresine Bağlı Olarak Antosiyanin Miktarları (birimi mg/kg).

Depolama Sıcaklığı (°C)	**Depolama Süresi**				
	0. Gün	**60. Gün**	**90. Gün**	**120. Gün**	**150. Gün**
12	12.62	8.37	7.35	5.46	3.69
20	12.62	8.77	8.32	6.34	5.27
30	12.62	8.05	6.65	4.55	3.05

Çizelge 4.2. Farklı Sıcaklıklarda Depolanan Lokum Örneklerinde Depolama Süresine Bağlı Olarak Antosiyanin Miktarlarına Ait Varyans Analizi Sonuçları.

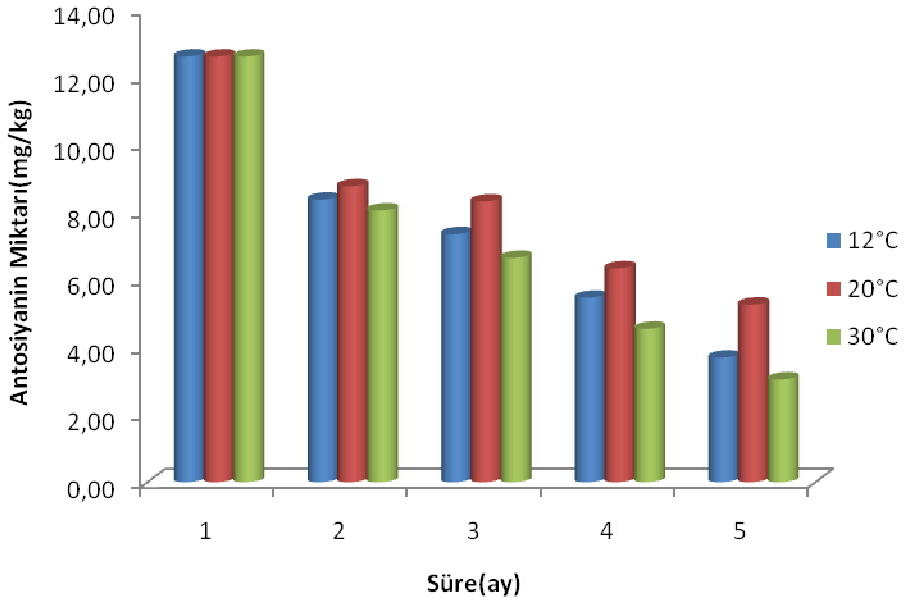
Varyasyon Kaynağı	**SD**	**Depolama Süresi**							
		60. Gün		**90. Gün**		**120. Gün**		**150. Gün**	
		KO	**F**	**KO**	**F**	**KO**	**F**	**KO**	**F**
Depo. Sıc.	2	0.5205	28.57**	2.8132	476.81**	3.2046	337.72**	5.2167	60.96**
Hata	9	0.0182	-	0.0059	-	0.0095	-	0.0856	-
Genel	11	-	-	-	-	-	-	-	-

**$p<0.01$ seviyesinde önemli

Çizelge 4.3. Farklı Sıcaklıklarda Depolanan Lokum Örneklerinde Depolama Süresine Bağlı Olarak Antosiyanin Miktarları Ortalamalarının Duncan Çoklu Karşılaştırma Test Sonuçları*.

Depolama Sıcaklığı (°C)	n	Depolama Süresi				
		0. Gün	60. Gün	90. Gün	120. Gün	150. Gün
12	4	12.62 ± 0.55ns	8.37 ± 0.04^{b}	7.35 ± 0.02^{b}	5.46 ± 0.01^{b}	3.69 ± 0.29^{b}
20	4	12.62 ± 0.55ns	8.77 ± 0.01^{a}	8.32 ± 0.05^{a}	6.34 ± 0.02^{a}	5.27 ± 0.40^{a}
30	4	12.62 ± 0.55ns	8.05 ± 0.23^{c}	6.65 ± 0.12^{c}	4.55 ± 0.17^{c}	3.05 ± 0.12^{b}

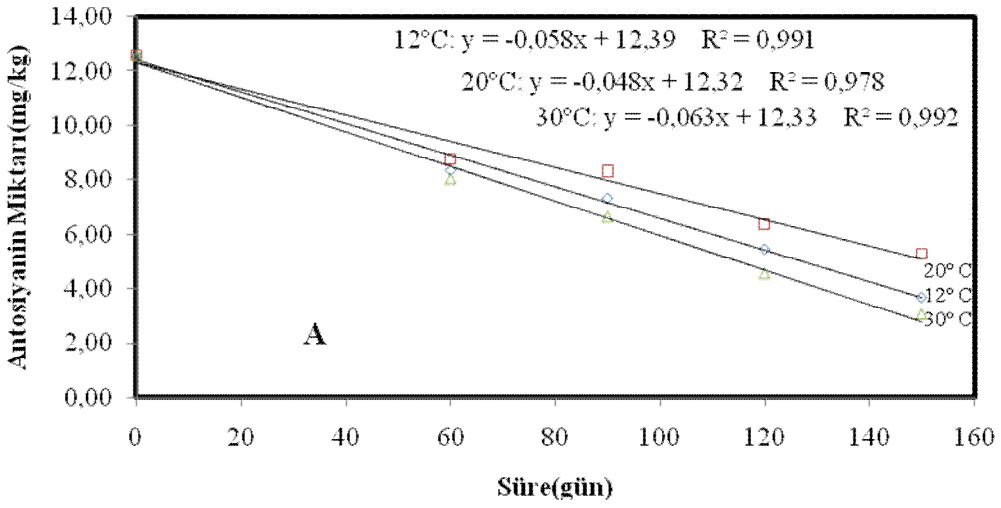
*:Aynı sütunda farklı harfle işaretlenmiş ortalamalar istatistiki olarak ($p<0.01$) birbirinden farklıdır.
ns: Önemsiz.

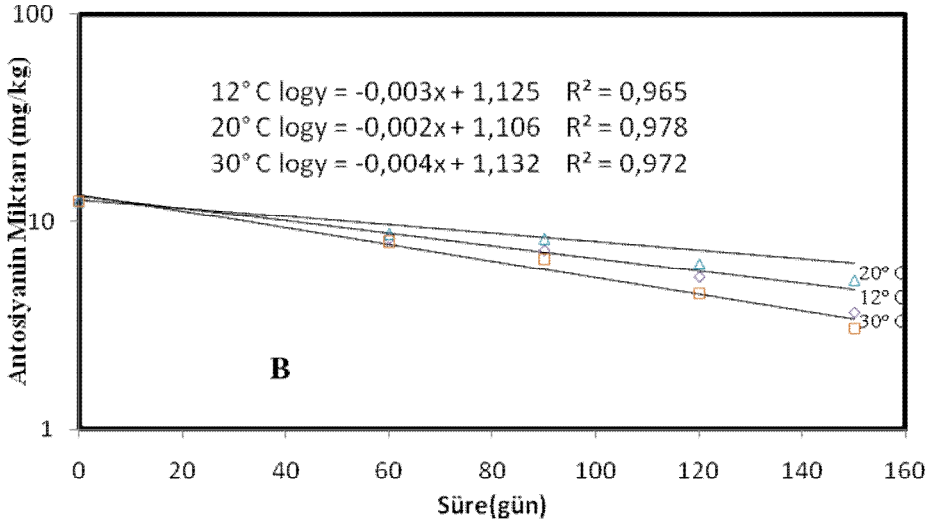


Şekil 4.1. Depolama süresince antosiyanin miktarında meydana gelen değişim(mg/kg)

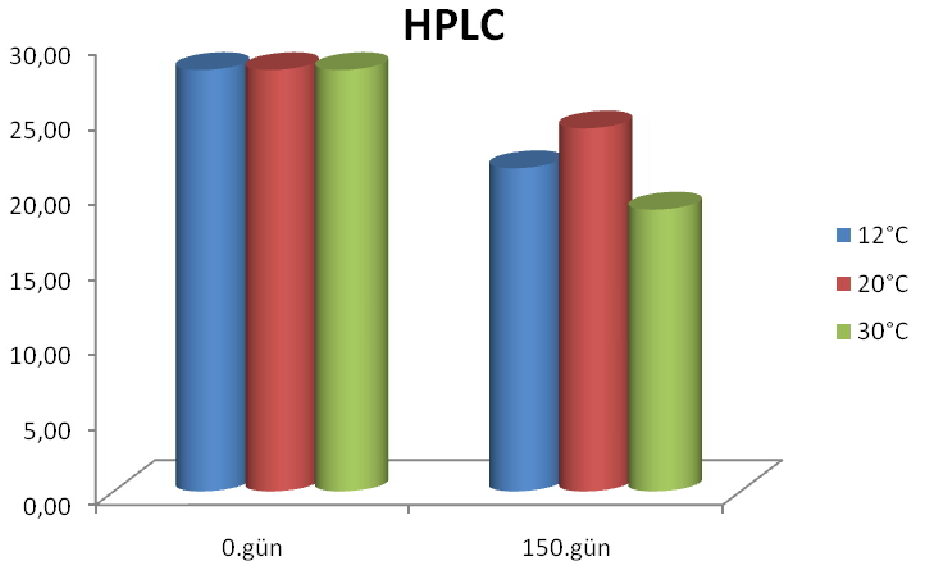
Şekil 4.2 ve Şekil 4.3 incelendiğinde lokumdan ekstrakte edilen siyah havuç antosiyaninlerinin 12, 20 ve 30°C' lerde depolama koşullarındaki degradasyonunun birinci derece reaksiyon kinetiğine uygun olarak gerçekleştiği görülmektedir. Lokumda siyah havuç antosiyaninleri degradasyonuna ait veriler Çizelge 4.1'de verilmiştir. Bu değerlerden de görüldüğü gibi depolama sıcaklığı antosiyanin degradasyonu üzerine etkili faktörlerin başında gelir. Veriler incelendiğinde çok düşük ve çok yüksek sıcaklıklarda antosiyanin degradasyonu hızla ilerlerken, 20°C' de depolanan lokumlarda antosiyanin degradasyonun minimum düzeyde olduğu

saptanmıştır. Örneğin, depolama sıcaklığı 20°C' de olan lokumlarda siyah havuç antosiyaninlerinin degradasyonuna ilişkin hız sabiti $4.61x10^{-3}$ $gün^{-1}$ iken depolama sıcaklığı 30°C' ye çıktığında hız sabiti $9.21x10^{-3}$ $gün^{-1}$ düzeyine çıkmıştır. Bu iki depolama sıcaklığı arsındaki Q_{10} değerinin yaklaşık 2 olduğu saptanmıştır. Düşük sıcaklıkta meydana gelen hızlı parçalanmanın nedeninin ise, nişastalı ürünlerde meydana gelen nişastanın retrogradasyonu olduğu düşünülmektedir. Retrogradasyon, sıcak çözünür nişastanın soğutulduğunda jel haline dönüşmesi, zamanla jel yapısındaki nişastanın çözünürlüğünün azalması ve kısmen kristalizasyonu olayıdır. Nişasta bileşenlerinden amilozun retrogradasyonu amilopektine göre daha hızlıdır ve pişirmeden sonra ürün soğutulduğunda tamamlanmıştır. Ancak amilopektin daha yavaş hızla retrograde olduğu için ürün soğutulduktan sonra da retrogradasyona devam eder (BeMiller ve Whistler 1996). Bu olay sırasında yapıda bulunan su açığa çıkarak ve ürünün su miktarı ve su aktivitesi artmaktadır. Bilindiği gibi antosiyaninler suda çok iyi çözünen bileşiklerdir. Bu olay sonucunda 12°C' de depolanan lokum örneklerindeki siyah havuç antosiyaninlerinin hızlı parçalanmasının sebebi artan su aktivitesi olabilir.





Şekil 4.2. Siyah havuç antosiyaninleri renklendirilen lokumların farklı sıcaklıklarda depolanması sonucu meydana gelen antosiyanin değişimi A: lineer B: logaritmik

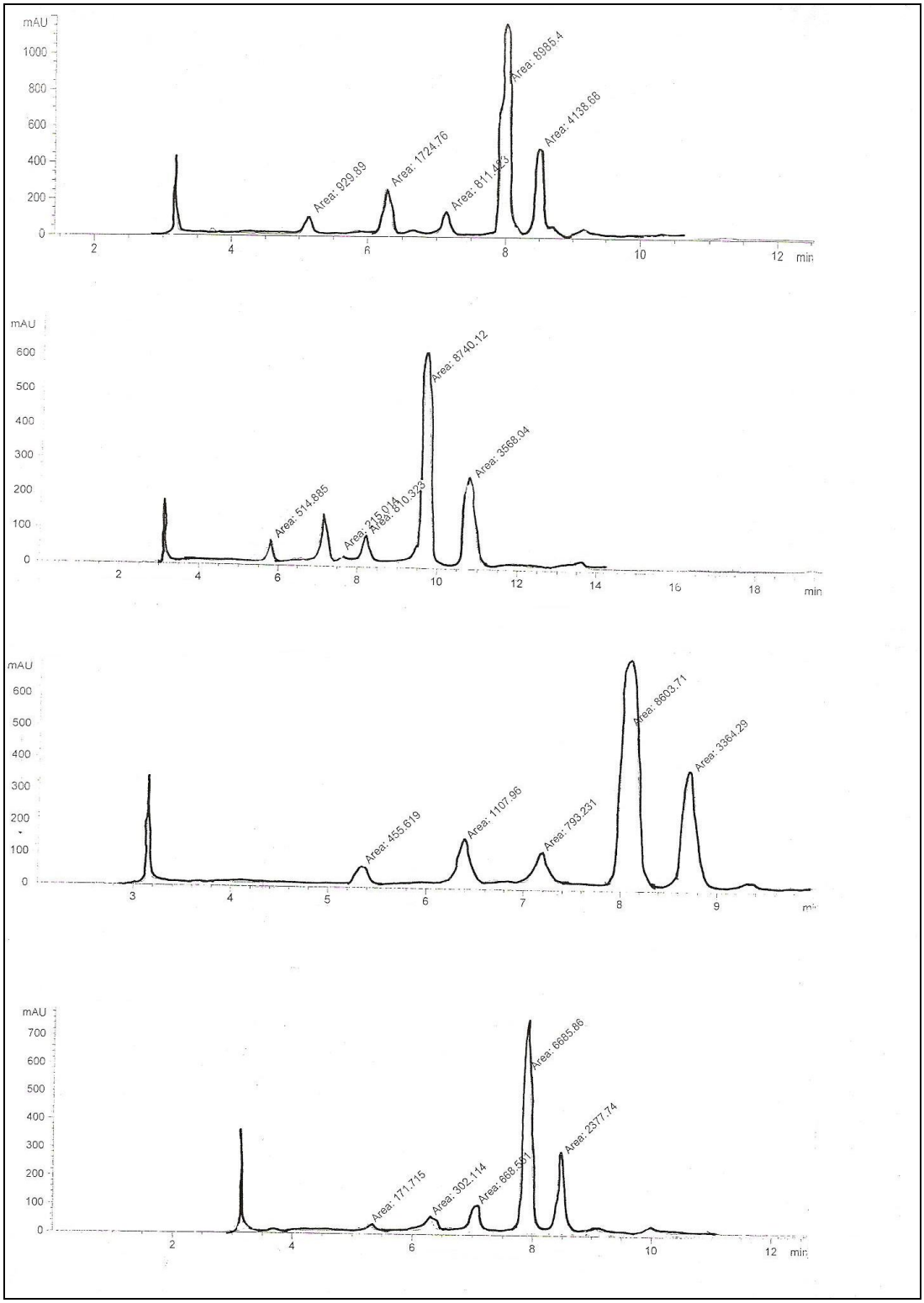


Şekil 4.3. Antosiyanin miktarındaki değişim (HPLC)

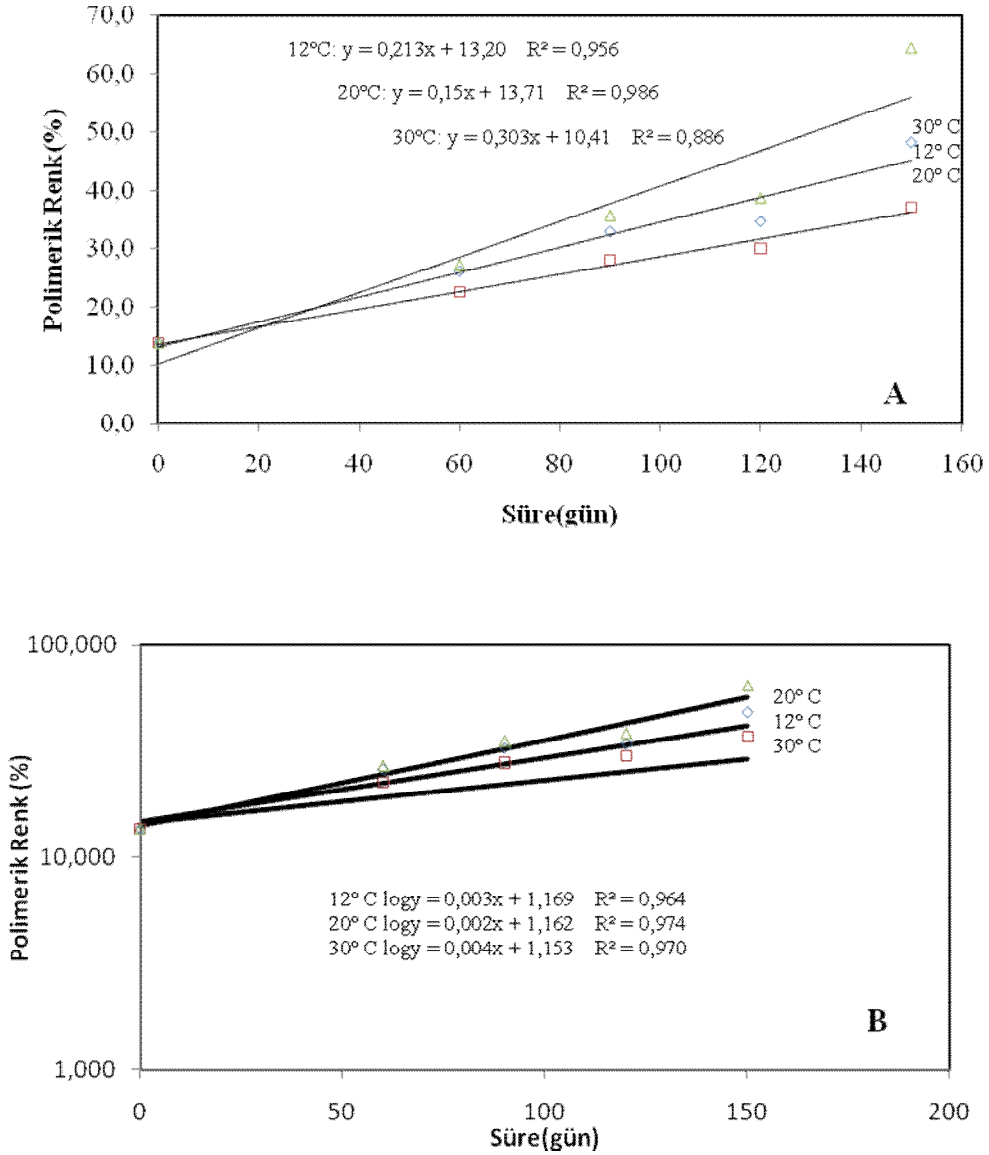
Farklı sıcaklıklarda depolanan lokum örneklerinde, antosiyanin değişimi spektrofotometrik olarak izlendiği gibi buna ek olarak yüksek basınçlı/performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) yöntemi ile de takip edilmiş, bu analizler sonucunda farklı sıcaklıklarda depolanan lokum örneklerindeki antosiyanin değişimi Şekil 4.3'te

verilmiştir. Başlangıçta 28.10 mg/kg olan antosiyanin miktarı zamana bağlı olarak azalmıştır. HPLC ile antosiyanin miktarının hesaplanması siyanidin-3-glikozit temel alınarak yapılmıştır. Hem spektrofotometrik hem de HPLC yöntemiyle alınan verilere bakıldığında benzer bir değişim olduğu görülmektedir.

Sonuç olarak yüksek sıcaklıkta (30°C) depolama muhtemel ısıl degradasyona bağlı olarak, düşük sıcaklıkta depolama (12°C) ise nişasta retrogrdasyonuna bağlı olarak antosiyanin parçalanmasını ve kaybını hızlandırmaktadır. 20°C'lik sıcaklığın ise optimal olduğu anlaşılmaktadır.



Şekil 4.4. Lokum örneklerine ait HPLC kromatogramları(sırasıyla 0.gün, 150.gün (12-20-30° C)



Şekil 4.5. Siyah havuç antosiyaninleri renklendirilen lokumların farklı sıcaklıklarda depolanması sonucu meydana gelen polimerik renk değişim A: lineer B: logaritmik

Şekil 4.5 süreye bağlı polimerik parçalanmanın 30°C'de diğer 2 depolama sıcaklığından çok fazla olduğunu, 12°C'deki depolamanın su aktivitesine bağlı olarak parçalanmayı teşvik edici rol oynadığını göstermektedir.

Polimerik renk oranı, hiçbir işlem görmemiş taze meyve sularında genellikle % 10'un altındadır. Meyve sularının, yüksek sıcaklıklarda uzun süre ısıtılması ve uygun olmayan sıcaklıklarda uzun süre depolanması sonucunda polimerik renk oranında artış görülmekte ve bu oran % 30 veya daha üzerinde de olabilmektedir. Ayrıca uzun süre depolanmış meyvelerden elde edilen meyve sularında, polimerik

renk oranının artabileceği de bildirilmektedir (Cemeroğlu 2007). Polimerik renk oranının artması, bir yandan antosiyaninlerin parçalandığını gösterirken diğer yandan da esmerleşme reaksiyonları sonucunda kahverengi melanoidin pigmentlerinin oluştuğunu göstermektedir (Giusti ve Wrolstad 2001).

Çizelge 4.4.' de farklı sıcaklıklarda depolanan lokum örneklerinde siyah havuç antosiyaninlerinin degradasyonuna ilişkin kinetik parametreler yer almaktadır. 20°C'deki depolama 150 günlük $t_{1/2}$ değeri ile en uygun depolama sınıfını oluşturmaktadır. Bu durum lokum ortamı için geçerlidir.

Çizelge 4.4. Farklı sıcaklıklarda depolanan lokum örneklerinde siyah havuç antosiyaninlerinin degradasyonuna ilişkin kinetik parametreler

Sıcaklık (°C)	**– k* x 10^{-3} ($gün^{-1}$)**	**$t^{**}_{1/2}$ (gün)**
12	6.91	100
20	4.61	150
30	9.21	75

* k: Reaksiyon hız sabiti

**$t_{1/2}$: Yarılanma süresi

Sıvı ortamlarda yapılan çalışmalar, buradaki bulguların aksine sıcaklık düştükçe stabilitenin arttığını ortaya koymaktadır.

Yüksek sıcaklıklarda depolanan örneklerde kısa sürede çok hızlı bir antosiyanin kaybı meydana gelirken, depolama sıcaklığı düştükçe antosiyaninlerin stabilitesi artmaktadır. Kan portakalı sularının 15°, 25° ve 35°C' de depolanması boyunca, 10°C' lik sıcaklık artışının, antosiyaninin degradasyon hızını 2 kat arttırdığı saptanmıştır (Maccarone ve ark. 1985). Çizelge 4.1 incelendiğinde sıcaklık 20°C' den 30°C' ye çıktığında hız sabiti değeri değeri 4.61 x 10^{-3}'den 9.21 x 10^{-3}' e yükselmiş Q_{10} değeri 2 kat artmıştır.

Withy ve ark. (1993)' da, kırmızı ahududu suyu konsantrelerin de antosiyanin kaybının depolama sıcaklığına bağlı olduğunu göstermişlerdir. 20°C' de 3 ay süreyle depolanan konsantrelerin antosiyanin içeriğinde % 80.4 kayıp olduğu saptanırken, –20°C'de depolamada kayıp oranı yalnızca % 3.1 düzeyinde kalmıştır.

Genel olarak sıcaklık düştükçe antosiyaninlerin stabilitesi artmasına rağmen, yapılan bazı araştırmalar, dondurma veya dondurarak depolama sırasında da antosiyanin kaybının olduğunu göstermektedir (Chaovanalikit ve Wrolstad 2004) 12°C' de yapılan depolama sonucunda meydana gelen antosiyanin kaybının nedeninin ise nişastanın retrogradasyonu olduğu düşünülmektedir.

4.2. Lokum Rengindeki Değişiklikler

Siyah havuç antosiyaninlerinin Türk lokumundaki stabilitesi, depolama süresince antosiyanin kaybının izlendiği gibi, düzenli olarak lokum örneklerinde renk ölçümleriyle de takip edilmiştir. Bu renk ölçüm değerleri, insan gözünün algıladığı renk kavramıyla paralellik gösteren değerlerdir. Renk ölçümlerine ilişkin sonuçlar Çizelge 4.5, 4.6, 4.7' de verilmiştir. Bu değerlere göre farklı sıcaklıklarda depolanan lokumların renklerine genel olarak bakıldığında kırmızının payı azalmıştır (a* değeri düşmüştür). L* değerinde ise artış görülmüştür. Bilindiği gibi, L* değeri gıdalarda esmerleşme indeksi olarak kullanılmaktadır (Aguilera ve ark. 1987).

Çizelge 4.5. 12° C'de depolanan lokum örneklerindeki renk değişimi

Süre(gün)	L*	a*	b*	C*	h
0	26,02	6,4	-0,28	6,4	357,46
150	26,19	5,3	-0,94	5,4	349,96

Çizelge 4.6. 20°C'de depolanan lokum örneklerindeki renk değişimi

Süre(gün)	L*	a*	b*	C*	h
0	26,02	6,4	-0,28	6,4	357,46
150	26,53	5,8	-1,20	5,9	348,39

Çizelge 4.7. 30° C'de depolanan lokum örneklerindeki renk değişimi

Süre(gün)	L*	a*	b*	C*	h
0	26,02	6,4	-0,28	6,4	357,46
150	27,13	4,8	-0,72	4,8	350,15

Tristimulus reflektans kolorimetreleri ile yapılan renk ölçüm değerleri ile gıdalardaki başta renk bozulmaları olmak üzere birçok kalite kriteri arasında ilişki olduğu bilinen bir gerçektir (Little 1976). Çizelge 4.8'de farklı sıcaklıklarda depolanan lokumların pH değişimleri yer almaktadır. Çizelge 4.8 incelendiğinde, pH değerleri artarken antosiyanin miktarının azaldığı görülmektedir. pH ve antosiyanin arasındaki ilişkiyi inceleyen diğer çalışmalarda da bunu desteklemektedir (Kırca, 2004). Bu sonuçlar antosiyanin parçalanma ürünlerinin, muhtemelen buffer özellikli ürünler ile pH'yı yükselttiği sonucunu ortaya çıkarmaktadır (Çizelge 4.6). Bu olay, paralel olarak parlaklığı (L*) artırırken, kırmızı renk (a*) yoğunluğunu düşürmektedir.

Çizelge 4.8. Farklı sıcaklıklarda depolanan lokum örneklerinde depolama süresince meydana gelen pH değişimi

Depolama Süresi	Sıcaklık (^{o}C)		
	12°	**20°**	**30°**
0.gün	3,99 $_{22,4° C}$	3,99 $_{22,4° C}$	3,99 $_{22,4° C}$
60.gün	4,08 $_{20,7° C}$	4,02 $_{21,6° C}$	4,12 $_{22,6° C}$
90.gün	4,15 $_{20,5° C}$	4,08 $_{21,7° C}$	4,28 $_{22,7° C}$
120.gün	4,27 $_{20,1° C}$	4,12 $_{21,3° C}$	4,35 $_{22,9° C}$
150.gün	4,39 $_{20,9° C}$	4,14 $_{21,9° C}$	4,58 $_{23,0° C}$

Fossen ve ark. (1998), mor patatesten (petanin) ve pirinçten (siyanidin 3-$_{O\text{-}\beta\text{-}D}$-glikopiranozit) izole ettikleri antosiyaninlerin 13 farklı pH aralığındaki (pH:1-9) renk stabilitesini inceledikleri bir çalışmada; pH değerindeki değişimin her iki

antosiyaninin de renk yoğunluğunu etkilediğini belirlemişlerdir. pH'nın 1'den 5'e yükselmesinin her iki antosiyaninin renk yoğunluğunda azalmaya neden olduğunu bildirmektedir.

Kırca (2004) yaptığı çalışmada ise siyah havuç antosiyaninlerinin ısıl degradasyonu üzerine pH ve askorbik asidin etkisi incelenmiş ve araştırma sonucunda; askorbik asidin siyah havuç antosiyaninlerinin parçalanması üzerine önemli bir etkisinin bulunmadığını, buna karşın pH değeri yükseldikçe antosiyaninlerin miktarının azaldığını tespit etmiştir.

Çizelde 4.9'de farklı sıcaklıklarda depolanan lokum örneklerinde depolama süresince meydana gelen ağırlık değişimi yer almaktadır. Çizelge 4.9 incelendiğinde farklı sıcaklıklarda depolanan lokumlardan alınan ve nem miktarı tayini için ayrılan örneklerde 20° ve 30°C' lerde depolanan lokum örneklerinde depolama süresinin artışına bağlı olarak ağırlık kaybı görülmüştür. 12°C' de ise, 60. gün sonunda yapılan ölçümde kuru madde miktarının arttığı saptanmıştır. Bunun bir hata olduğu düşünülmüş ve yeni bir örnek (43,45g) konulmuş fakat devam eden ölçümlerde ağırlık artışı sürekli olarak gözlenmiştir. Bunun nedeninin ise nişastalı ürünlerin düşük sıcaklıklarda depolanması sonucu meydana gelen nişastanın retrogradasyona uğraması olduğu düşünülmektedir. Nişasta jeli soğukta bekletildiğinde retrograde olarak su molekülü serbest kalır. 12°C' de depolanan nem örneklerinde ağırlık artışının sebebini nişastanın retrogradasyona uğraması sonucu serbest kalan suyun kolayca evaporasyonu sonucu olduğu düşünülmektedir.

Çizelge 4.9. Farklı sıcaklıklarda depolanan lokum örneklerinde depolama süresnce meydana gelen ağırlık değişimi (g)

Depolama Süresi	**Sıcaklık (^{o}C)**		
	12°	**20°**	**30°**
0.gün	61,89	68,64	62,13
60.gün	62,08 - (43,45)	67,62	58,54
90.gün	43,78	66,76	57,78
120.gün	44,34	65,99	57,11
150.gün	44,62	65,59	56,66

Çizelge 4. 10. Farklı depolama sıcaklıklarında depolama süresince meydana gelen pH ve antosiyonin miktarı değişimleri arasındaki korelasyon

Sıcaklık					
12 °C		***20 °C***		***30 °C***	
R^2	-0,959*	R^2	-0,939*	R^2	-0,949*

** P<0.05 önem seviyesi*

Çizelge 4.10'de pH ve antosiyanin miktarında meydana gelen değişim incelendiğinde her bir sıcaklıkta pH ile antosiyanin miktarındaki azalma ters orantılı ve yüksek korelasyonda gerçekleşmiştir. Birçok çalışmada da gözlendiği gibi, burada da pH'da meydana gelen artışa paralel olarak antosiyanin miktarı zamana bağlı olarak azalmıştır. Bu sonuç, antosiyaninlerin polimerik parçalanma ürünlerinin, ortamda buffer (tampon) etkisi sağlayarak pH'yı yükselttiği görüşümüzü desteklemektedir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Siyah havuç antosiyaninlerinin, geleneksel Türk lokumundaki degradasyonu literatürdeki verilere uygun olarak birinci dereceden reaksiyon kinetiğine göre gerçekleştiği saptanmıştır. Beklenildiği gibi, depolamada oda sıcaklığına (20°C) göre uygulanan sıcaklık yükseldikçe antosiyaninlerin degradasyon hızlarının arttığı tespit edilmiştir. Ancak 12°C' de meydana gelen hızlı parçalanmanın nedeni ise, bol miktarda nişasta içeren bir ürün olan lokumda meydana gelen retrogradasyon sonucu ürünün nem miktarının ve su aktivitesinin artması ve bu sulu ortamda antosiyaninlerin kolayca parçalanmasından ileri geldiği düşünülmektedir. Siyah havuç suyu ve konsantrelerinde, antosiyaninlerin ısıl degradasyonuna ilişkin parametrelerin sıcaklık artışına bağlı olarak değiştiği ve sıcaklık artışının reaksiyon hızını artırdığı belirlenmiştir.

Farklı sıcaklıklarda depolanan lokum örneklerinde, siyah havuç antosiyaninlerin ısıl degradasyon hızını arttığı, bununda hızla pH'nın yükselmesine sebep olduğu düşünülmektedir. pH derecesi yükseldikçe antosiyaninlerin stabilitesinin azaldığı görülmüştür.

Lokumların farklı sıcaklıklarda (12°, 20° ve 30°C) depolanmaları süresince, renklerindeki kırmızının (a* değeri düşmüş) ve sarılığın payı azalmıştır.(b* değeri düşmüş). L* (aydınlatma değeri) değerlerinde ise depolanma süresince belirgin bir değişim saptanmamıştır. Sıvı ortamlarda düşük depolama sıcaklığının antosiyaninlerin raf ömrünü uzattığı bulgularına karşılık, vizkoz lokum ortamında, tamamen ters bulgulara ulaşılmıştır.

Araştırma esnasında 12°C' de meydana gelen antosiyanin parçalanmasının nedeni olduğu düşünülen retrogradasyon, nişastalı ürünlerin soğukta depolanması sonucunda oluşmaktadır. Bu nedenle, renklendirici olarak kullanılacak antosiyanin preparatlarının kullanılması esnasında renklendirilecek ürünün özellikleri dikkate alınarak depolama sıcaklığınınoda sıcaklığı (20°C) civarında tespit edilmesi önemlidir. Ürün özelliklerinde ve üründe meydana gelecek değişimlerin kullanılan renklendirici üzerine etkisi araştırılmalıdır.

Sonuç olarak, sıcaklık ve pH değişikliklerine karşı oldukça duyarlı olan siyah havuç suyu ve özellikle konsantresinin, yoğun bir boya preparatı niteliğinde

bulunduğu ve çeşitli ürünlerde doğrudan boya olarak kullanılmak üzere yüksek bir potansiyele sahip olduğu kanısına varılmıştır.

12°C' de nişastanın retrogardasyonu sonucunda olauşan sulu yaıdan dolayı antosiyaninleri parçalanmasının arttığı düşünülecek olursa, nişastaca zengin olan bu ürünü depolamalarında bu ve bundan daha düşük sıcaklıkların kullanılmaması önerilir.

6. KAYNAKLAR

Aguilera, J.M., Oppermann, K. ve Sanchez, F. 1987. Kinetic of browning of Sultana grapes. J. Food Sci. 52; 990-993, 1025.

Alasalvar, C., Al-Farsi, M., Quantick, P.C., Shahidi, F. ve Wiktorowicz, R. 2004. Effect of chill storage and modified atmosphere packaging (MAP) on antioxidant capacity, anthocyanins, carotenoids, phenolics and sensory quality of ready-to-eat shredded orange and purple carrots. Food Chem.

Altan, A. 2001. Özel Gıdalar Teknolojisi. 3. Baskı. Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Genel Yayın No: 178, Adana

Anon, 2004. Türk Gıda Kodeksi: Lokum Tebliği. Resmi Gazete. 22.05.2004-25469

Anon, A. Arı Lokum. http://www.arilokum.com.tr/lokum_imalat.asp

Asafi, N. ve Cemeroğlu, B. 2000. Vişne ve nar suyu, ve konsantratlarında antosiyaninlerin degradayonu. Gıda 25; 407-411.

Askar, A. 1993. Natural colors for the food industry-an overview. Fruit Processing. 3; 400-403.

Bassa, I.A. ve Francis, F.J. 1987. Stability of anthocyanins from sweet potatoes in a model beverage. J. Food Sci. 52; 1753-1754.

Bayarri, S., Calvo, C., Costell, E. ve Duran, L. 2001. Influence of color on perception of sweetness and fruit flavor of fruit drinks. Food Sci. Technol. Int. 7; 399-404.

Bayraktar, K. 1970. Sebze yetiştiriciliği E.Ü. Z.F. Yayınları İzmir.

BeMiller, J. N.,Whistler, R. L. 1996. Starch. In: R. L. Whistler & J. N. BeMiller (Eds.), Carbohydrate chemistry for food scientists(p. 117–151). St. Paul, MN: Eagan Press.

Bridle, P. ve Timberlake, C.F. 1997. Anthocyanins as natural food colours–selected a spects. Food Chem. 58; 103-109.

Brouillard, R. 1982. Chemical structure of anthocyanins. In *Anthocyanins as Food Colors*, P. Markakis (Ed.) p.1, Academic Press, New York.

Calvi, J.P. ve Francis, F.J. 1978. Stability of Concord grape (*V. Labrusca*) anthocyanins in model systems. J. Food Sci. 43; 1448-1456.

Cemeroğlu, B., Velioğlu, S. ve Işık, S. 1994. Degradation kinetics of anthocyanins in sour cherry juice and concentrate. J. Food Sci. 59; 1216-1217.

Cemeroğlu, B., Yemenicioğlu, A. ve Özkan, M. 2001. *Meyve ve Sebzelerin Bileşimi Soğukta Depolanmaları*, Gıda Teknolojisi Derneği Yayınları No: 24, Ankara. 328 s.

Cemeroğlu, B. 2007. Gıda Analizleri, Gıda Teknolojisi Derneği Yayınları Ankara.

Cevallos-Casals, B.A. ve Cisneros-Zevallos, L. 2004. Stability of anthocyanin-based aqueous extracts of andean purple corn and red-fleshed sweet potato compared to synthetic and natural colorants. Food Chem. 86; 69-77.

Chaovanalikit, A. ve Wrolstad, R.E. 2004. Total anthocyanins and total phenolics of resh and processed cherries and their antioxidant properties. J. Food Sci. 69; 67-72.

Christensen, C.M. 1983. Effects of color on flavor and texture judgements of foods. J. Food Sci. 48; 787-790.

Code of Federal Regulations. 2003. Listing of color additives exempt from certification. 21 CFR 73. Office of the Federal Register, U.S. Government Printing Office, Washington, DC.

Daravingas, G. ve Cain, R.F. 1968. Thermal degradation of black raspberry anthocyanin pigments in model systems. J. Food Sci. 33; 138-142.

Debicki-Pospisil, J., Lovric, T. ve Trinajstic, N. 1983. Anthocyanin degradation in the presence of furfural and 5-hydroxymethylfurfural. J. Food Sci. 48; 411-416.

Downham, A. ve Collins, P. 2000. Colouring our foods in the last and next millennium. Int. J. Food Sci. Technol. 35; 5-22.

DuBose, C.N., Cardello, A.V., ve Maller, O. 1980. Effects of colorants and flavorants on identification, perceived flavor intensity and hedonic quality of fruit flavored beverages and cake. J. Food Sci. 45; 1393-1399.

Dyrby, M., Westergaard, N. ve Stapelfeldt, H. 2001. Light and heat sensitivity of red cabbage extract in soft drink model systems. Food Chem. 72; 431-437.

Espin, J.C., Soler-Rivas, C., Wichers, H.J. ve Garcia-Viguera, C. 2000. Anthocyanin-based natural colorants: a new source of antiradical activity for foodstuff. J. Agric. Food Chem. 48; 1588-1592.

Fossen, T., Cabrita, L. ve Veersen, O.M. 1998. Colour and stability of pure a anthocyanins influenced by pH including the alkaline region. Food Chem. 63; 435-440.

Francis, F.J. 1985. Blueberries as a colorant ingredient in food products. J. Food Sci. 50; 754-756.

Fuleki, T. ve Francis, F.J. 1968. Quantative methods for anthocyanins 2. Determination of total anthocyanin and degradation index for cranberry juice. J. Food Sci. 33; 72-77.

Gakh, E.G., Dougall, D.K. ve Baker, D.C. 1998. Proton nuclear magnetic resonance studies of monoacylated anthocyanins from the wild carrot: Part 1. Inter- and intra-molecular interactions in solution. Phytochem. Analysis. 9; 28-34.

Galvano, F., Fauci, L.L., Lazzarino, G., Fogliano, V., Ritieni, A., Ciappellano, S., Battistini, N.C., Tavazzi, B. ve Galvano, G. 2004. Cyanidins: metabolism and biological properties. J. Nutr. Biochem. 15; 2-11.

Garzon, G.A. ve Wrolstad, R.E. 2002. Comparision of the stability of pelargonidin-based anthocyanins in strawberry juice and concentrate. J. Food Sci. 67; 1288- 1299.

Giusti, M.M. ve Wrolstad, R.E. 1996. Radish anthocyanin extract as a natural red colorant for Maraschino cherries. J. Food Sci. 61; 688-694.

Giusti, M.M., Rodriguez-Saona, L.E. ve Wrolstad, R.E. 1999. Molar absorptivity and color characteristics of acylated and non-acylated pelargonidin-based a anthocyanins. J. Agric. Food Chem. 47; 4631-4637.

Giusti, M. M. and Wrolstad, R. E. 2001. Unit F1.2.1-13. Anthocyanins. Characterization and Measurement with UV-Visible Spectroscopy. In, Current Protocols in Food Analytical Chemistry

Giusti, M.M. ve Wrolstad, R.E. 2003. Acylated anthocyanins from edible sources and their applications in food systems. Biochem. Eng. J. 14; 217-225.

Harbourne, N., Jacquier, J. C., Morgan, D. J. ve Lyng, J. G. 2008 Determination of the degradation kinetics of anthocyanins in a model juice system using isothermal and non-isothermal methods. J. Food Chem. 2008.3.023

Henry, B.S. 1992. Natural food colours. In *Natural Food Colorants,* G.A.F. Hendry and J.D. Houghton (Eds.), Blackie and Son Ltd., pp: 39-78, New York.

IFJU. Nr: 3 1968. Analysen. Internationale Fruchtsaft Union Juris Verlag, Zurich.

Inami, O., Tamura, I., Kikuzaki, H. ve Nakatani, N. 1996. Stability of anthocyanins of *Sambucus canadensis* and *Sambucus nigra*. J. Agric. Food Chem. 44; 3090- 3096.

Iversen, C.K. 1999. Black currant nectar: Effect of processing and storage on anthocyanin and ascorbic acid content. J. Food Sci. 64; 37-41.

Jackman, R. L., ve Smith, J. L. (1992). Anthocyanins and betalains. In G.A. F. Hendry & J. D. Houghton (Eds.), Natural food colorants(pp. 183–241). London: Blackie and Son Ltd.

Jackman, R. L., Yada, R. Y., ve Tung, M. A. (1987). A review: separation and chemical properties of anthocyanins used for their qualitative and quantitative analysis. Journal of Food Biochemistry, 11, 279–308.

Johnson, J. ve Clydesdale, F.M. 1982. Perceived sweetness and redness in colored sucrose solutions. J. Food Sci. 47; 747-752.

Joncheva, N. ve Tanchev, ST. 1972. Kinetik des thermischen Abbaues von Pelargonidin 3-sophorozid. Z. Lebensm. Unters.-Forsch. 150(1); 31-34.

Kalt, W., Mcdonald, J.E. ve Donner, H. 2000. Anthocyanins, phenolics antioxidant capacity of processed lowbush blueberry products. J Food Sci. 65; 390-393.

Kırca, A. ve Cemeroğlu, B. 2003. Thermal degradation of blood orange anthocyanins. Food Chem. 81; 583-587.

Kırca, A. 2004. Siyah havuç antosiyaninlerinin bazı meyve ürünlerinde ısıl stabilitesi. A.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü. Doktora Tezi.

Kong, J-M., Chia, L-S., Goh, N-K., Chia, T-F. ve Brouillard, R. 2003. Analysis and biological activities of anthocyanins. Phytochem. 64; 923-933.

Krifi, B., Chouteau, F., Boudrant, J. ve Metche, M. 2000. Degradation of anthocyanins from blood orange juices. Int. J. Food Sci. Technol. 35; 275-283.

Labuza, T.P. 1984. Application of chemical kinetics to deterioration of foods. J. Chem. Educ. 61; 348-358.

Lees, R. ve Jackson, B. 1973. Confectionery and Chocolate, Manufacture. Leonard Hill Books. Plymouth. S: 379.

Little, A.C. 1976. Physical measurements as predictors of visual appearance. Food Technol. 30; 74-82.

Maccarone, E., Maccarone, A. ve Rapisarda, P. 1985. Stabilization of anthocyanins of blood orange fruit juice. J. Food Sci. 50; 901-904.

Markakis, P., Livingstone, G.E. ve Fellers, C.R. 1957. Quantative aspects of strawberry pigment degradation. Food Res. 22; 117-130.

Marti, N., Perez-Vicente, A. ve Garcia-Viguera, C. 2001. Influence of storage temperature and ascorbic acid addition on pomegranate juice. J. Sci. Food Agric. 82; 217-221.

Mazza, G. ve Brouillard, R. 1987. Recent developments in the stabilization of anthocyanins in food products. Food Chem. 25; 207-225.

Mazza, G. ve Miniati, E. 1993. Anthocyanins in fruits, vegetables and grains. CRC Press Inc. p: 362, Boca Raton, Florida.

Mishkin, M. ve Saguy, I. 1982. Thermal stability of pomegranate juice. Z. Lebensm. Unters. Forsch. 175; 410-412.

Newsome, R.L. 1986. Food Colors. Food Technology. 40; 49-56.

Özbey, R.K. 2002. Şekerim kristalizasyonu ve Şekerin Puanını Etkileyen Faktörler. S:82-95. Şeker Üretiminde Verimliliğin Artırılması ve KaliteninYükseltilmesi. Üçüncü Şeker Üretim Teknolojisi Sempozyumu 17-18 Eylül 2002. Türkiye Şeker Fabrikaları A.Ş. Etimesgut, Ankara

Özkan, M., Yemenicioğlu, A., Çıtak, B. ve Cemeroğlu, B. 2000. Effect of hydrogen peroxide on sour cherry anthocyanins. J. Food Quality. 23; 421-428.

Palamidis, N. ve Markakis, P. 1975. Stability of grape anthocyanin in a carbonated beverage. J. Food Sci. 40; 1047-1049.

Plocharski, W. ve Zbroszcyzk, J. 1992. Aronia fruit (*Aronia melanocarpa, elliot*) as a natural source for anthocyanin colorants. Fruit Processing. 2; 85-89.

Proteggente, A.R., Pannala, A.S., Paganga, G., Buren, L.V., Wagner, E., Wiseman, S. Van de Put, F., Dacombe, C. ve Rice-Evans, C. 2002. The antioxidant activity of regularly consumed fruit and vegetables reflects their phenolic and vitamin C composition. Free Radicals Res. 36; 217-233.

Rodriguez-Saona, L.E., Giusti, M.M. ve Wrolstad, R.E. 1999. Color and pigment stability of red radish and red-fleshed potato anthocyanins in juice model systems. J. Food Sci. 64; 451-456.

Roth, H.A., Radle, L.J., Gifford, S.R. ve Clydesdale, F.M. 1988. Psychophysical relationships between perceived sweetness and color in lemon and lime flavored drinks. J. Food Sci. 53; 1116-1119, 1162.

Shi, Z., Lin, M. ve Francis, F.J. 1992a. Stability of anthocyanins from *Tradescania pallida*. J. Food Sci. 57; 758-760, 770.

Shi, Z., Francis, F.J. ve Daun, H. 1992b. Quantitative comparison of the stability of anthocyanins from *Brassica oleracea* and *Tradescantia pallida* in non-sugar drink model and protein model systems. J. Food Sci. 57; 768-770.

Sondheimer, E. ve Kertesz, Z.I. 1952. The kinetics of the oxidation of strawberry anthocyanin by hydrogen peroxide. Food Res. 17; 288-298.

Stillman, J.A. 1993. Color influences flavor identification in fruit-flavored beverages. J. Food Sci. 58; 810-812.

Stintzing, F.C ve Carle, R. 2004. Functional properties of anthocyanins and betalains in plants, food, and in human nutrition. Trends Food Sci. Technol. 15; 19-38.

Takeoka, G.R., Dao, L.T., Full, G.H., Wong, R.Y., ve Harden, L.A,. 2007. Characterization of black bean (*Phaseolus vulgaris* L.) anthocyanins. *J Agric Food Chem* 45, 3395–3400, 1997.

Tanchev, S.S. 1972. Kinetics of the thermal degradation of anthocyanins of the raspberry. Z. Lebensm. Unters.-Forsch.150(1); 28-30.

Tanchev, S.S. ve Joncheva, N. 1973. Kinetics of the thermal degradation of cyanidin-3-rutinoside and peonidin-3-rutinoside. Z. Lebensm. Unters.-Forsch. 153; 37-41.

Timberlake, C.F. ve Bridle, F. 1980. Developments of Food Colours. Applied Science Publishers London UK.

Tsuda, T., Ohshima, K., Kawakishi, S. ve Osawa, T. 1994. Antioxidative pigments isolated from the seeds of phaseolus vulgaris L. J. Agric. Food Chem. 42; 248-251.

Uysal, V. 2000. Kara havuçtaki renk maddelerinin (Antosiyanin) ekstraksiyonu ve özelliklerinin incelenmesi. Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez 71 s

Wang, H., Cao, G. ve Prior, R.L. 1997. Oxygen radical absorbing capacity of anthocyanins. J. Agric. Food Chem. 45; 304-309.

Wang, W. D. ve Xu. S. Y. 2007. Degradation kinetics of anthocyanins in blackberry juice and concentrate J. Food Eng. 82 (2007) 271–275

Withy, L.M., Nguyen, T.T., Wrolstad, R.E. ve Heatherbell, D.A. 1993. Storage changes in anthocyanin content of red raspberry juice concentrate. J. Food Sci. 58; 190-192.

Wrolstad, R.E. 1976. Color and pigment analyses in fruit products. Station Bulletin 624, Agric. Exp. Stn., Oregon State University, Corvallis.

Yang, Z., Han, Y., Gu, Z., Fan, G. ve Chen, Z., 2007. Thermal degradation kinetics of aqueous anthocyanins and visual color of purple corn (*Zea mays* L.) cob, *Innovative Food Science and Emerging Technologies.*2007.09.001

Zafrilla, P., Valero, A. ve Garcia-Viguera, C. 1998. Stabilization of strawberry jam colour with natural colourants. Food Sci. Technol. Int. 4; 99-105.

EKLER

Çalışmada kullanılan lokum örneğinin yapım aşamaları;



Şekil 6.1. Şeker, su ve nişastanın kazana ilavesi



Şekil 6.2. Karışımın(nişasta sütü) kaynatılması



Şekil 6.3. Karışımın karıştırılması



Şekil 6.4. Renk maddesinin ilavesi



Şekil 6.5. Renk maddesinin karıştırılması



Şekil 6.6. Kazanın kenarlarını sıyırma



Şekil 6.7. Renk maddesinin karıştırılması



Şekil 6.8. Olgunluk ölçme (kulak memesi düzeyi)



Şekil 6.9. .Ateşten alma



Şekil 6.10. Tablaların hazırlanması



Şekil 6.11. Tablalara dökme



Şekil 6.12. Tablalara dökme



Şekil 6.13. Tablaya yayma



Şekil 6.14. Nişasta ile kaplama



Şekil 6.15. Tablalarda dinlendirme



Şekil 6.16. Siyah havuç konsantresi ile boyanan lokum örnekleri