

**KARA HAVUÇ ANTOSİYANİNLERİNİN
KOPİGMENTASYON İLE KARARLILIKLARININ
DEĞİŞİMİ**

BETÜL BAY

**MERSİN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**GIDA MÜHENDİSLİĞİ
ANA BİLİM DALI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**MERSİN
TEMMUZ – 2015**

**KARA HAVUÇ ANTOSİYANİNLERİNİN
KOPİGMENTASYON İLE
KARARLILIKLARININ DEĞİŞİMİ**

BETÜL BAY

**MERSİN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**GIDA MÜHENDİSLİĞİ
ANA BİLİM DALI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Danışman
Prof. Dr. Nüzhet İ. TÜRKER**

**MERSİN
TEMMUZ – 2015**

Betül BAY tarafından Prof. Dr. Nüzhet İ. TÜRKER danışmanlığında hazırlanan “Kara Havuç Antosiyaninlerinin Kopigmentasyon ile Kararlılıklarının Değişimi” başlıklı bu çalışma aşağıda imzaları bulunan jüri üyeleri tarafından oy birliği ile Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

İmza

Prof. Dr. Nüzhet İ. TÜRKER

Prof. Dr. H. İbrahim EKİZ

Prof. Dr. M. Ümit ÜNAL



Yukarıdaki Jüri kararı Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun .14./09./2015 tarih ve ..2015.23.../..855..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.


Prof. Dr. Ayla ÇELİK
Enstitü Müdürü


Bu tezde kullanılan özgün bilgiler, şekil, çizelge ve fotoğraflardan kaynak göstermeden alıntı yapmak 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunu hükümlerine tabidir.

ANTOSİYANİN ESASLI GIDA BOYALARININ KARARLILIKLARININ KOPİGMENTASYON İLE İYİLEŞTİRİLMESİ

BETÜL BAY

ÖZ

Bu çalışmanın temel amacı, kara havuçtan elde edilen antosiyanin özütlerinin, farklı kopigment içeren nar ve mandalina kabukları ile polifenolik bileşenlerce zengin gül petalleriyle kopigmentasyonu sağlanarak, kopigmentasyonun antosiyanin pigmentinin ısıl ve pH kararlılığı üzerindeki etkisinin araştırılmasıdır. Bu amaçla, kara havuçta bulunan beş adet antosiyaninin farklı pH'lardaki ısıl bozunumları (90°C) incelenmiştir.

Çalışmanın ilk aşamasında kara havuçta bulunan antosiyaninler özütlenerek saflaştırılmıştır. Saflaştırılan antosiyanin pigmentlerine toz haline getirilmiş nar kabuğu, mandalina kabuğu ve gül petalleri eklenmesi ile kopigmentasyon tepkimeleri gerçekleştirilmiştir. Kopigmentasyonu gerçekleştirilen örneklerin pH 1-5.4 aralığında pH kararlılığı ve ısıl kararlılığı incelenmiştir.

Referans antosiyanin çözeltisinin ve kopigment eklenmiş antosiyanin çözeltilerinin spektrofotometrik analizleri ve HPLC analizleri yapılmıştır. Spektrofotometrede dalga boyu taraması yapılarak batokromik kayma ve kuinoidal baz oluşumu incelenmiştir. HPLC'de 280 nm'de fenolik bileşikler, 330 nm'de açillenme, 440 nm'de kahverengileşme, 525 nm'de antosiyanin ölçümleri yapılmıştır. Elde edilen kromatogramlarda yeni bir bileşik oluşumunun göstergesi olan yeni pikler saptanmamıştır. Ancak, antosiyaninlerin bozunumu sonucu degradasyon pikleri olduğu tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Kopigmentasyon, ısıl degradasyon, antosiyanin, kara havuç

Danışman: Prof. Dr. Nüzhet İ. TÜRKER, Mersin Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Ana Bilim Dalı.

IMPROVEMENT OF THE STABILITY OF ANTHOCYANIN BASED FOOD COLORANTS VIA COPIGMENTATION

BETÜL BAY

ABSTRACT

The main objective of this study was to investigate the effects of copigmentation on black carrot anthocyanin extracts in terms of pH and thermal stability. Defined stability of black carrot anthocyanin extracts' was evaluated after copigmentation with pomegranate peel, mandarin peel and rose petals, rich in polyphenolic compounds. For this purpose, thermal degradations (90 ° C) of five anthocyanins found in black carrot at different pH values were examined.

In the first part of the study, black carrot anthocyanins were purified after extraction. Copigmentation reactions were carried out by the addition of pomegranate peel, mandarin peel, and rose petals powders to the purified anthocyanins pigments. Thermal and pH stability of the samples which were subjected to the copigmentation were investigated at pH 1-5.4 interval.

Spectrophotometric analysis and HPLC analysis of all reference and copigmented anthocyanin solutions were carried out. Bathochromic shift and quinoidal base formation were followed via spectrophotometric scan. Formation of new and different peaks from the reference chromatograms at the wavelengths 280 nm (phenolic compounds), 330 nm (acylation), 440 nm (browning) and 525 nm (anthocyanin) were investigated. New peaks which indicate the formation of new compound were not detected. However, as a result of the anthocyanins' degradation, it has been found that degradation peaks occurred.

Key Words: Copigmentation, thermal degradation, anthocyanin, black carrot

Advisor: Prof. Dr. Nüzhet İ. TÜRKER, University of Mersin, Department of Food Engineering.

TEŞEKKÜR

Bu tezin her aşamasında bana her konuda, her zaman yardımcı olan ve yol gösteren değerli danışman hocam Prof. Dr. Nüzhet İ. TÜRKER'e tüm içtenliğimle teşekkür ederim.

Çalışmalarım sırasında her türlü olanağı sağlayan ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen Mersin Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölüm Başkanı Prof. Dr. H. İbrahim EKİZ'e ve Gıda Mühendisliği Bölümü değerli öğretim üyelerine,

Yüksek lisans eğitimim boyunca bana sağladıkları motivasyon ve destekleri nedeniyle tüm bölüm arkadaşlarıma,

Tez çalışmam sırasında deneylerime yardımcı olan bölümümüz öğrencilerinden Musa KAYAR ve Felat GÜLSERİN'e, HPLC ve spektrofotometrik analizlerim sırasında yardımlarını esirgemeyen Mersin Üniversitesi İleri Teknoloji Eğitim, Araştırma ve Uygulama Merkezi (MEİTAM) uzmanlarına,

Projemize destek sağlayan Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi Başkanlığına (BAP-FBE GMB (BB) 2014-2 YL),

Hayatımın her aşamasında yanımda olan, sevgileri ve destekleri ile her daim bana güç veren, teşekkürlerin en büyüğünü hak eden sevgili annem, babam, kardeşim ve nişanlıma sonsuz sevgilerimi ve teşekkürlerimi sunuyorum.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZ	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ÇİZELGELER DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
EKLER DİZİNİ	x
SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI	3
2.1. ANTOSİYANİNLER.....	3
2.1.1. Antosiyaninlerin Yapısı	4
2.1.1.1. Glikozillenme	5
2.1.1.2. Açillenme	5
2.1.2. Antosiyaninlerin Kararlılığına Etki Eden Faktörler	6
2.1.2.1. pH.....	6
2.1.2.2. Sıcaklık.....	8
2.1.2.2.1. Antosiyaninlerin Bozunma Kinetiği	9
2.1.2.3. Oksijen	10
2.1.2.4. Işık.....	10
2.1.2.5. Konsantrasyon.....	11
2.2. ANTOSİYANİNLERİN KOPİGMENTASYONU	11
2.2.1. Molekül-içi Kopigmentasyon.....	13
2.2.2. Moleküller-arası Kopigmentasyon.....	14
2.2.3. Moleküllerin Kendi Aralarında Birleşmesi	16
2.3. KARA HAVUÇ ANTOSİYANİNLERİ.....	16
2.4. POLİFENOLİK BİLEŞENLER.....	17
2.4.1. Nar (<i>Punica granatum L.</i>) Kabuğu Fenolik Bileşenleri.....	17
2.4.2. Mandalina (<i>Citrus reticulata</i>)Kabuğu Fenolik Bileşenleri	18
2.4.3. Gül (<i>Rosa damascena</i>) Petalleri Fenolik Bileşenleri	20

3. MATERYAL ve METOT	21
3.1.KARA HAVUÇ ANTOSİYANİNLERİNİN ÖZÜTLENMESİ.....	21
3.2. ANTOSİYANİN ÖZÜTLERİNİN SAFLAŞTIRILMASI	21
3.3. ANTOSİYANİN PİGMENTLERİNİN KOPİGMENTASYONU	22
3.4. HPLC ANALİZLERİ.....	23
3.5. ISIL KARARLILIK DENEYİ	24
3.6. ANTOSİYANİN SPEKTRAL FOTOMETRE ANALİZLERİ	24
3.6.1. Monomerik Antosiyanin Tayini	24
3.6.2. Renk Yoğunluğu, Polimerik Renk ve Kahverengileşme	25
3.6.2.1. Renk Yoğunluğu	26
3.6.2.2. Polimerik Renk	27
4. BULGULAR ve TARTIŞMA.....	28
4.1. KARA HAVUÇ ANTOSİYANİLERİ.....	28
4.1.1. Kara Havuç Suyunun Spektral Özellikleri	28
4.2. SAFLAŞTIRILMIŞ KARA HAVUÇ ANTOSİYANİNLERİNİN KOPİGMENTASYONU	29
4.3. KOPİGMENTASYONUN pH KARARLILIĞI ÜZERİNE ETKİSİ	30
4.3.1. pH Etki Mekanizmasının Matematiksel Yaklaşımı	30
4.4. ISIL İŞLEMİN ANTOSİYANİN BOZUNUMU ÜZERİNE ETKİSİ.....	39
4.4.1.Toplam Alan Üzerinden Antosiyanin Bozunumunun İncelenmesi	47
4.5. KARA HAVUÇ ANTOSİYANİNLERİ TEPKİME HIZ SABİTİ.....	55
4.6. % POLİMERİK RENK ve KAHVERENGİLEŞME.....	60
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	66
KAYNAKLAR	67
EKLER.....	72
ÖZGEÇMİŞ.....	82

ÇİZELGELER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Çizelge 2.1. Temel antosiyanidinler, radikal grupları, maksimum absorbands gösterdikleri dalga boyu değerleri ve moleköl ağırlıkları.....	4
Çizelge 4.1. Referans ve kopigmente kara havuç antosiyanin çözeltileri λ_{max} ve ABS değerleri	30
Çizelge 4.2. Kara havuçta bulunan antosiyaninlerin ve bozunum ürünlerinin HPLC alıkonma süreleri	41



ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2.1. Antosiyanidin molekül yapısı	3
Şekil 2.2. Antosiyanidin-3-Glikozit'in Yapısı	5
Şekil 2.3. Aromatik organik asitler	6
Şekil 2.4. Alifatik organik asitler	6
Şekil 2.5. Antosiyanin molekülünün denge formları	7
Şekil 2.6. Antosiyanin monoglikozitin ısı bozunumu (pH 3.7)	9
Şekil 2.7. Molekül-içi kopigmentasyon	13
Şekil 2.8. Moleküller-arası kopigmentasyon	14
Şekil 2.9. Moleküllerin kendi aralarında birleşmesi	16
Şekil 2.10. Kara havuçta bulunan açilli antosiyaninlere bağlanan aromatik asitlerin yapıları	17
Şekil 2.11. Kara havuçta bulunan açilli antosiyaninlerin kimyasal yapıları	17
Şekil 2.12. Nar kabuğu fenolik maddelerinden punikalajin ve ellajik asit	18
Şekil 2.13. Mandalina kabuğu fenolik maddelerinden naringin ve hesperidin	19
Şekil 2.14. Gül petalleri fenolik maddelerinden kuersetin ve kamferol	20
Şekil 3.1. Saflaştırılmış kara havuç antosiyaninlerine ait HPLC kromatogramı ..	22
Şekil 4.1. Referans kara havuç suyu spektrumu	28
Şekil 4.2. Referans antosiyanin çözeltisi termodinamik ölçüm spektrumları	31
Şekil 4.3. Nar kabukları ile kopigmente antosiyanin çözeltisi termodinamik ölçüm spektrumları	32
Şekil 4.4. Mandalina kabukları ile kopigmente antosiyanin çözeltisi termodinamik ölçüm spektrumları	32
Şekil 4.5. Gül petalleri ile kopigmente antosiyanin çözeltisi termodinamik ölçüm spektrumları	33
Şekil 4.6. pH 2,2 referans kara havuç antosiyanin spektrumu çıkarılarak elde edilmiş farklı pH değerlerindeki kuinonoidal baz spektrumları	34
Şekil 4.7. pH 2,2 nar kabukları ile kopigmente kara havuç antosiyanin spektrumu çıkarılarak elde edilmiş farklı pH değerlerindeki kuinonoidal baz spektrumları	34
Şekil 4.8. pH 2,2 mandalina kabukları ile kopigmente kara havuç antosiyanin spektrumu çıkarılarak elde edilmiş farklı pH değerlerindeki kuinonoidal baz spektrumları	35
Şekil 4.9. pH 2,2 gül petalleri ile kopigmente kara havuç antosiyanin spektrumu çıkarılarak elde edilmiş farklı pH değerlerindeki kuinonoidal baz spektrumları	35
Şekil 4.10. Referans kara havuç antosiyanin çözeltisinin $\frac{ABS_o}{ABS}$ 'a karşılık $\left[\frac{1}{H^+} \right]$ denklem (7)'ye göre eğrisi	37
Şekil 4.11. Nar kabukları ile kopigmente edilmiş kara havuç antosiyanin çözeltisinin $\frac{ABS_o}{ABS}$ 'a karşılık $\left[\frac{1}{H^+} \right]$ denklem (7)'ye göre eğrisi	37

Şekil 4.12. Mandalina kabukları ile kopigmente edilmiş kara havuç antosiyanin çözeltisinin $\frac{ABS_o}{ABS}$ 'a karşılık $\left[H^+ \right]$ denklem (7)'ye göre eğrisi eğrisi .	38
Şekil 4.13. Gül petalleri ile kopigmente edilmiş kara havuç antosiyanin çözeltisinin $\frac{ABS_o}{ABS}$ 'a karşılık $\left[H^+ \right]$ denklem (7)'ye göre eğrisi eğrisi .	38
Şekil 4.14. Siyanidin türevli açilli ve açısız kara havuç antosiyaninlerinin ısıl bozunum akım şeması	40
Şekil 4.15. Evaporasyon öncesi saflaştırılmış referans kara havuç antosiyaninlerine ait HPLC kromatogramı.....	42
Şekil 4.16. Gül petalleri ile kopigmente edilmiş kara havuç antosiyaninleri ısı deneyler sonrasına ait HPLC kromatogramı (pH 2,8, 30. dk).....	43
Şekil 4.17. Gül petalleri ile kopigmente edilmiş kara havuç antosiyaninleri ısı deneyler sonrasına ait HPLC kromatogramı (pH 4,2, 30. dk).....	43
Şekil 4.18. Mandalina kabukları ile kopigmente edilmiş kara havuç antosiyaninleri ısı deneyler sonrasına ait HPLC kromatogramı.....	44
Şekil 4.19. Referans kara havuç antosiyanin çözeltisi ısı deneyler sonrasına ait HPLC kromatogramı	45
Şekil 4.20. ısı deneyler öncesi referans kara havuç antosiyaninlerine ait HPLC kromatogramı (pH 2,2, 0. dk).....	46
Şekil 4.21. Referans kara havuç antosiyanin çözeltisi toplam alan-zaman grafiği.	47
Şekil 4.22. Nar kabukları ile kopigmente edilmiş antosiyanin çözeltisi toplam alan-zaman grafiği	48
Şekil 4.23. Mandalina kabukları ile kopigmente edilmiş antosiyanin çözeltisi toplam alan-zaman grafiği	48
Şekil 4.24. Gül petalleri ile kopigmente edilmiş antosiyanin çözeltisi toplam alan-zaman grafiği	49
Şekil 4.25. Referans antosiyanin çözeltisi monomerik antosiyanin bozunumu....	49
Şekil 4.26. Nar kabuğu ile kopigmente antosiyanin çözeltisi monomerik antosiyanin bozunumu	50
Şekil 4.27. Mandalina kabuğu ile kopigmente antosiyanin çözeltisi monomerik antosiyanin bozunumu	50
Şekil 4.28. Gül petalleri ile kopigmente antosiyanin çözeltisi monomerik antosiyanin bozunumu	51
Şekil 4.29. Gül petalleri ile kopigmente edilmiş kara havuç antosiyaninlerinin ısı işlemler sonrası bozunum grafiği (pH 2,2).....	52
Şekil 4.30. Referans kara havuç antosiyanin çözeltisi P8+P9+10 konsantrasyon-zaman grafiği	53
Şekil 4.31. Nar kabukları ile kopigmente edilmiş antosiyanin çözeltisi P8+P9+10 konsantrasyon-zaman grafiği.....	53
Şekil 4.32. Mandalina kabukları ile kopigmente edilmiş antosiyanin çözeltisi P8+P9+10 konsantrasyon-zaman grafiği.....	54
Şekil 4.33. Gül petalleri ile kopigmente edilmiş antosiyanin çözeltisi P8+P9+10 konsantrasyon-zaman grafiği.....	54
Şekil 4.34. P1+2'nin referans antosiyanin çözeltisi, nar kabukları, mandalina kabukları ve gül petalleri ile kopigmente edilmiş antosiyanin çözeltilerinde k değerleri	55

Şekil 4.35. P3+4'ün referans antosiyanin çözeltisi, nar kabukları, mandalina kabukları ve gül petalleri ile kopigmente edilmiş antosiyanin çözeltilerinde k değerleri	56
Şekil 4.36. P5'in referans antosiyanin çözeltisi, nar kabukları, mandalina kabukları ve gül petalleri ile kopigmente edilmiş antosiyanin çözeltilerinde k değerleri	57
Şekil 4.37. P6'nın referans antosiyanin çözeltisi, nar kabukları, mandalina kabukları ve gül petalleri ile kopigmente edilmiş antosiyanin çözeltilerinde k değerleri	58
Şekil 4.38. P7'nin referans antosiyanin çözeltisi, nar kabukları, mandalina kabukları ve gül petalleri ile kopigmente edilmiş antosiyanin çözeltilerinde k değerleri	59
Şekil 4.39. Referans antosiyanin çözeltisi %polimerik renk.....	61
Şekil 4.40. Nar kabukları ile kopigmente antosiyanin çözeltisi %polimerik renk	61
Şekil 4.41. Mandalina kabukları ile kopigmente antosiyanin çözeltisi %polimerik renk	63
Şekil 4.42. Gül petalleri ile kopigmente antosiyanin çözeltisi % polimerik renk.	63
Şekil 4.43. Referans antosiyanin çözeltisi kahverengileşme değerleri	64
Şekil 4.44. Nar kabukları ile kopigmente antosiyanin çözeltisi kahverengileşme değerleri	64
Şekil 4.45. Mandalina kabukları ile kopigmente antosiyanin çözeltisi kahverengileşme değerleri	65
Şekil 4.46. Gül petalleri ile kopigmente antosiyanin çözeltisi kahverengileşme değerleri	65

EKLER DİZİNİ

Sayfa

Ek 1. Referans antosiyanin çözeltisi toplam alan verileri.....	72
Ek 2. Nar kabukları ile kopigmente edilmiş antosiyanin çözeltisi toplam alan verileri.....	72
Ek 3. Mandalina kabukları ile kopigmente edilmiş antosiyanin çözeltisi toplam alan verileri.....	73
Ek 4. Gül petalleri ile kopigmente edilmiş antosiyanin çözeltisi toplam alan verileri	73
Ek 5. Referans antosiyanin çözeltisi monomerik antosiyanin (mg/L) verileri.....	74
Ek 6. Nar kabukları ile kopigmente edilmiş antosiyanin çözeltisi monomerik antosiyanin (mg/L) verileri.....	74
Ek 7. Mandalina kabukları ile kopigmente edilmiş antosiyanin çözeltisi monomerik antosiyanin (mg/L) verileri.....	75
Ek 8. Gül petalleri ile kopigmente edilmiş antosiyanin çözeltisi monomerik antosiyanin (mg/L) verileri.....	75
Ek 9. P1+2 antosiyanini k (1/dakika) değerleri.....	76
Ek 10. P3+4 antosiyanini k (1/dakika)değerleri.....	76
Ek-11. P5 antosiyanini k (1/dakika)değerleri.....	76
Ek 12. P6 antosiyanini k (1/dakika)değerleri.....	77
Ek 13. P7 antosiyanini k (1/dakika) değerleri.....	77
Ek 14. Referans antosiyanin çözeltisi % polimerik renk verileri	77
Ek 15. Nar kabukları ile kopigmente edilmiş antosiyanin çözeltisi % polimerik renk verileri	78
Ek 16. Mandalina kabukları ile kopigmente edilmiş antosiyanin çözeltisi % polimerik renk verileri.....	78
Ek 17. Gül petalleri ile kopigmente edilmiş antosiyanin çözeltisi % polimerik renk verileri.....	79
Ek 18. Referans antosiyanin çözeltisi kahverengileşme verileri.....	79
Ek 19. Nar kabukları ile kopigmente edilmiş antosiyanin çözeltisi kahverengileşme verileri.....	80
Ek 20. Mandalina kabukları ile kopigmente edilmiş antosiyanin çözeltisi kahverengileşme verileri.....	80
Ek 21. Gül petalleri ile kopigmente edilmiş antosiyanin çözeltisi kahverengileşme verileri.....	81

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

ABS	: Absorbans
λ_{\max}	: Maksimum dalga boyu
Δ ABS	: Absorbans farkı
P	: Siyanidin
P1	: Siyanidin-3-ksilozil-glikozil-galaktozit
P2	: Siyanidin-3-glikozil-galaktozit
P3	: Siyanidin-3-ksilozil-galaktozit
P4	: Siyanidin-3-galaktozit
P5	: Sinapik asitle açillenmiş siyanidin-3-ksilozil-glikozil-galaktozit
P6	: Ferulik asitle açillenmiş siyanidin-3-ksilozil-glikozil-galaktozit
P7	: Kumarik asitle açillenmiş siyanidin-3-ksilozil-glikozil-galaktozit
P8	: Siyanidin-3- glikozil-galaktozit-sinapik
P9	: Siyanidin-3- glikozil-galaktozit-ferulik
P10	: Siyanidin-3- glikozil-galaktozit-kumarik
P11	: Sinapik-galaktozit-glikozit
P12	: Ferulik-galaktozit-glikozit
P13	: Kumarik-galaktozit-glikozit
k	: Tepkime hız sabiti



1.GİRİŞ

Renk, tüketicilerin duyuları ile algılayabildiği ilk özelliklerden biridir ve tüketicilerin gıdayı satın alıp almama noktasında nihai kararlarını etkileyen önemli bir bileşendir [Giusti ve Wrolstad, 2003]. Bu yönüyle renk, gıdaların yapısal estetik parametreleri ve ürün kalitesinin değerlendirilmesini sağlayan en önemli faktörlerden biri olarak değerlendirilmektedir [Gris vd., 2007].

Gıdaların renklendirilmesi amacıyla genellikle sentetik gıda boyaları tercih edilmektedir. Sentetik gıda boyalarının ucuz olmasının yanı sıra, ışık, oksijen, sıcaklık ve pH kararlılıklarının yüksek oluğu sentetik gıda boyalarının tercih edilme sebepleri arasında gösterilebilir. Ancak, son yıllarda, sentetik boyaların kullanımına getirilen yasal kısıtlamalar (örn. Sudan boyası) ve sentetik boyaların kullanımı sonucu ortaya çıkan ciddi sağlık problemleri gıda üreticilerini sentetik ürünler yerine doğal alternatifler kullanmaya yöneltmiştir [Gris vd., 2007; Shikov vd., 2008].

Antosiyaninler birçok meyve ve sebzeye kırmızı, mavi ve mor rengini veren, doğada yaygın olarak bulunan fenolik renk pigmentleridir. Antosiyaninler, renklendirici özelliklerine ek olarak, güçlü bir antioksidan kaynağıdır. Bu nedenle, kardiyovasküler rahatsızlıkların ve diyabetin önlenmesinde, kanser riskinin azaltılmasında önemli bir rol üstlenmektedir. Ancak, antosiyaninlerin işlenmesi ve depolanması sırasında kolay bozunması antosiyaninlerin kullanımında kısıtlamalar yaratmaktadır. Antosiyaninler, çevresel faktörlerden etkilenerek kolaylıkla renksiz türevlerine ve çözünmeyen kahverengi pigmentlere dönüşebilmektedir [Kırca vd., 2006; Patras vd., 2010; Wang ve Xu, 2007].

Önemli bir antosiyanin kaynağı olan kara havuçta iki tanesi açısız, üç tanesi tek açilli olmak üzere siyanidin türevli beş antosiyanin bulunmaktadır. Açısız antosiyaninler siyanidin-3-ksilozil-glikozil-galaktozit ve siyanidin-3-ksilozil-galaktozit iken; açilli antosiyaninler ise; sinapik, ferulik ve kumarik asitlerle açillenmiş siyanidin-3-ksilozil-glikozil-galaktozit'lerdir [Turker vd., 2004].

Gıdaların korunması ve raf ömürlerinin uzatılması amacıyla ısıl işlem uygulanması gıda sanayiinde en çok kullanılan yöntemlerden biridir [Wang ve Xu, 2007]. Isıl ve pH kararlılıklarının düşük oluşu nedeniyle antosiyaninlerin genellikle ısıl işlem görmemiş ve asitliği yüksek olan gıdalarda kullanıldığı bildirilmiştir [Giusti ve Wrolstad, 2003]. Bu nedenle antosiyanin pigmentlerinin kararlılıklarının arttırılmasına yönelik kopigmentasyon çalışmaları yapılmaktadır. Kopigmentasyon olgusu, *in vivo* ve *in vitro* koşullarda antosiyanin kararlılığını arttırmak için yaygın olarak kullanılan yöntemlerden biridir [Awika, 2008].

Kopigmentasyon çeşitli etkileşim mekanizmaları ile gerekleēebilir. En önemli kopigmentasyon mekanizmaları molekül-içi ve moleküller-arası etkileşimler ile gerekleēen mekanizmalardır. Molekül içi kopigmentasyon, kopigmentlerin antosiyanin molekülünün kromoforuna şeker molekülü aracılığıyla kovalent bağlarla bağlanması sonucu oluşmaktadır. Moleküller arası kopigmentasyon ise; renkli antosiyanin molekülü ile renksiz kopigment moleküllerinin kovalent olmayan etkileşimi olarak ifade edilir [Cavalcanti vd., 2011].

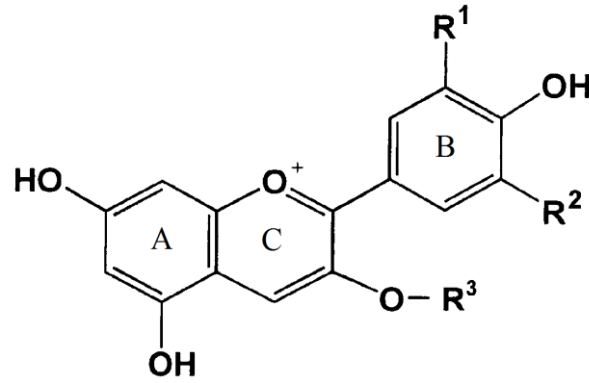
Bu çalışmada, antosiyanin özütlerinin, farklı kopigment içeren meyve endüstrisi atığı kabuklarla (nar kabuğu, mandalina kabuğu gibi) ve polifenolik bileşenlerce zengin gl petalleri ile kopigmentasyonu sağlanarak, kopigmentasyonun antosiyanin pigmentinin ısıl ve pH kararlılığı üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Bu amaçla kara havuçta bulunan beş adet antosiyaninin farklı pH'lardaki ısıl bozunumları incelenmiştir.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. ANTOSİYANİNLER

Antosiyaninler, doğada yaygın olarak bulunan, pek çok meyve ve sebzenin kendine özgü, maviden kırmızıya, rengini veren, suda çözünebilir nitelikte renk pigmentleridir [Pacheco-Palencia ve Stephen, 2010; Patras vd. 2010; Wang ve Xu, 2007].

Doğada, siyanidin, delphinidin, pelargonidin, peonidin, petunidin ve malvidin olmak üzere altı farklı antosiyanin aglikonu bulunmaktadır. Bu antosiyaninler, **B** halkalarında bulunan hidroksil ve metoksil gruplarının sayısı ve yerine göre çeşitlilik göstermektedir [Sadilova vd., 2006]. Antosiyaninler, 2-fenilbenzopirilyum (flavylyum katyonu) ve flavylyum tuzlarının polihidroksi ve polimetoksi türevlerinin glikozitleri olan fenolik maddelerdir [Wang ve Xu, 2007].



Şekil 2.1. Antosiyanidin molekül yapısı

Çizelge 2.1. Temel antosiyanidinler, radikal grupları, maksimum absorbands gösterdikleri dalga boyu değerleri ve molekül ağırlıkları

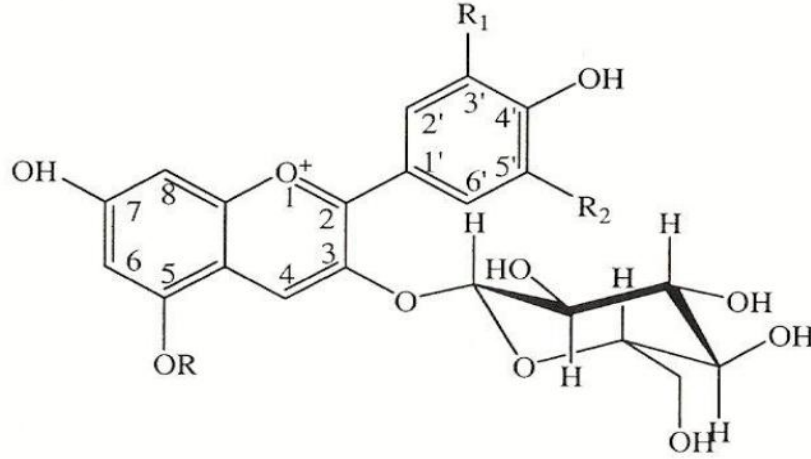
Antosiyanidin	R ₁	R ₂	λ_{max}	Molekül Ağırlığı (g)
Pelargonidin	H	H	494	271
Siyanidin	OH	H	506	287
Peonidin	OCH ₃	H	506	301
Delfinidin	OH	OH	508	303
Petunidin	OCH ₃	OH	508	317
Malvidin	OCH ₃	OCH ₃	510	331

Antosiyaninlerde hidrosillenme derecesi arttıkça renk maviye dönmektedir. Moleküldeki –OH bağı sayısına göre sırasıyla pelargonidin, siyanidin ve delfinidin antosiyanidinlerinde mavimsi rengin artışı söz konusudur. Buna karşılık glikosillenme ve metillenme ise rengin kırmızıya dönmesine neden olmaktadır. Buna örnek olarak kırmızı rengin siyanidinden peonidine doğru artması verilebilir [Saldamlı, 2014].

2.1.1. Antosiyaninlerin Yapısı

Antosiyaninler, flavonoid grubuna ait suda çözünebilen glikozit yapıda polifenolik maddelerdir. Tüm fenolik maddeler gibi ana iskeletinde C-6 (A halkası), C-3 (C halkası), C-6 (B halkası) konfigürasyonuna sahip 15 karbon atomu bulunmaktadır. İlk altı karbondan oluşan fenolik yapı **A** halkası olarak tanımlanırken, son altı karbondan oluşan fenolik yapı **B** halkası olarak tanımlanmaktadır. Antosiyanin pigmentlerinin bu formu antosiyanidin (flavilyum katyonu) olarak adlandırılmaktadır [Barry, 2013; Jettanapornsumran, 2009].

2.1.1.1. .Glikozillenme



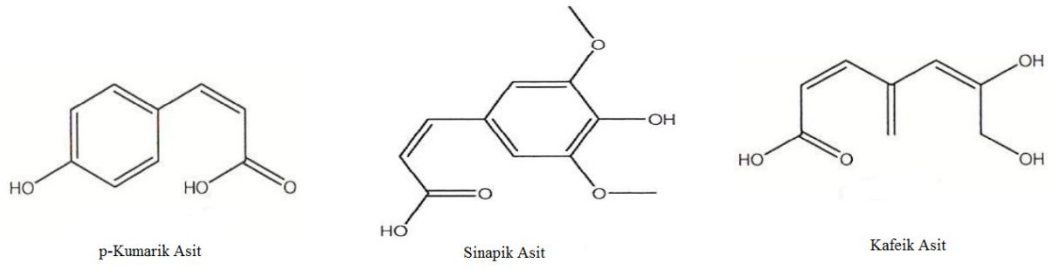
Şekil 2.2. Antosiyanidin-3-Glikozit'in Yapısı

Antosiyanidinler çok kararsız olmaları nedeniyle doğada nadir olarak bulunan pigmentlerdir. Antosiyanidinlerin glikozitleri olan antosiyaninler ise suda çözünen ve bileşimlerinde bir veya birden fazla şeker molekülü bulunan bileşiklerdir. Antosiyaninler, glikoz (glu), ramnoz (rha), ksiloz (xyl), galaktoz (gal), arabinoz (ara) rutinoz (rut) ile glikozillenmiş olmalarından dolayı antosiyanidinlere nazaran suda daha fazla çözünürler ve kararlılıkları daha yüksektir. Antosiyaninler genellikle C halkası üzerinde C-3 pozisyonunda bulunan hidroksil grubu ile bağ yaparak glikozillenmektedirler. Bunun yanı sıra, başka şekerler C-3, C-5, C-7 pozisyonlarında bulunan hidroksil gruplarına glikozidik bağlar aracılığıyla bağlanarak da glikozillenme yapabilmektedir [Barry, 2013; Jettanapornsumran, 2009].

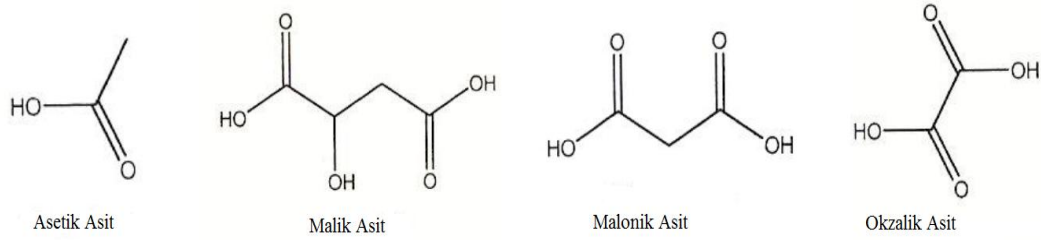
2.1.1.2 Açillenme

Antosiyaninlerde aromatik ve/veya alifatik asitler gibi üçüncü bir bileşen de moleküle bağlanabilir. Buna açillenme denir.

Antosiyaninlerin genel olarak açillenme yaptığı organik asitler sinamik asit, kumarik asit, sinapik asit ve kafeik asit gibi aromatik asitler ile asetik asit, malik asit, malonik asit, oksalik asit ve süksinik asit gibi alifatik asitlerdir [Jettanapornsumran, 2009].



Şekil 2.3. Aromatik organik asitler



Şekil 2.4. Alifatik organik asitler

2.1.2. Antosiyaninlerin Kararlılığına Etki Eden Faktörler

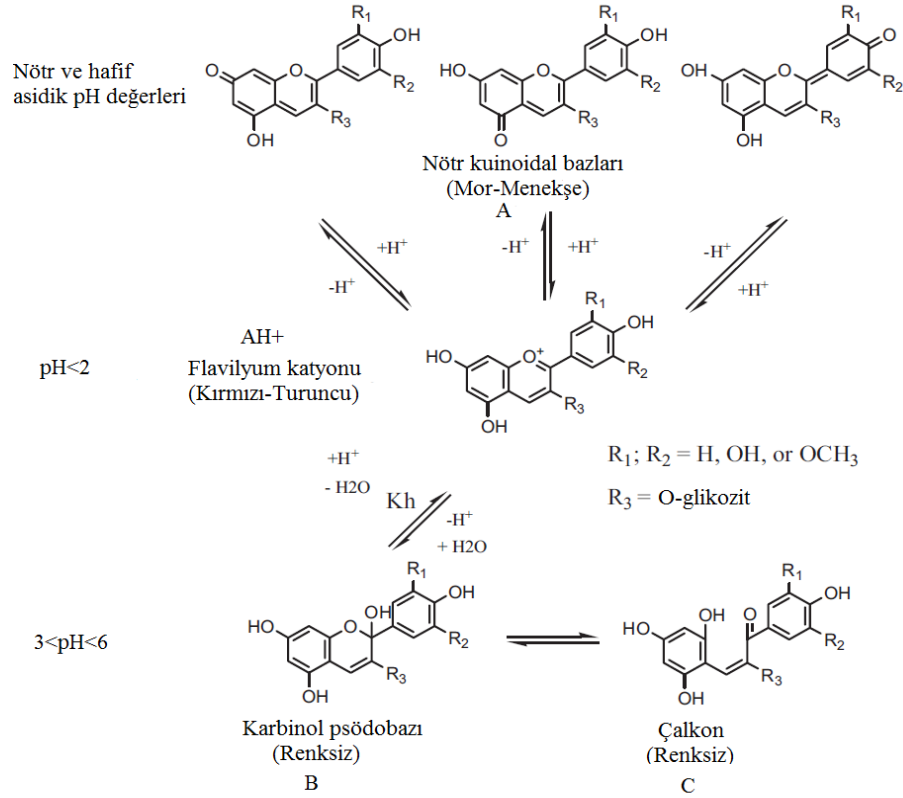
Antosiyanin pigmentlerinin flavilyum çekirdeğinde bir elektron eksik olduğundan oldukça reaktif bileşiklerdir. Reaksiyonlar genellikle pigment renginin açılması şeklinde gerçekleşmektedir.

Gıdaların işlenmesi ve depolanması sırasında kolay bozunmaları, kararlılıklarının düşük olması antosiyaninlerin kullanımında kısıtlamalar yaratmaktadır. Antosiyanin kararlılığına etki eden başlıca faktörler pH ve sıcaklıktır. Bunun yanı sıra, ışık, oksijen, metalik iyonların ve enzimlerin varlığı, proteinler, şeker, fenolik kofaktörler, askorbik asit, sülfid gibi faktörler de antosiyanin kararlılığı üzerinde etkili olan diğer faktörlerdir [Cavalcanti vd., 2011; Pacheco-Palencia ve Stephen, 2010; Sadilova vd., 2006].

2.1.2.1. pH

Antosiyaninler, pH değişimlerine karşı oldukça duyarlı pigmentlerdir. Düşük pH değerine sahip asidik ortamlarda, alkali ortamlara nazaran kararlılıkları daha

yüksektir. Düşük pH değerlerinde mor-kırmızı, daha yüksek pH değerlerinde ise yeşil-mavi renk alırlar.



Şekil 2.5. Antosiyanin molekülünün denge formları kuinoidal baz (QB), flavilyum katyonu (FC) karbinol veya psödobaz (PB) ve çalkon (CH)

Çok düşük pH değerlerinde (pH < 2) antosiyanin pigmentinin flavilyum katyonu (AH⁺) ortama hakim olmaktadır. pH 2 - 4 aralığında ise; ortamda mavi renkli kuinoidal baz formu (A) baskın durumdadır. pH 3 - 6 aralığında değişim gösterirken antosiyanin pigmentinin flavilyum katyonunun C2 konumuna suyun nükleofilik atağı sonucunda renksiz karbinol psödobaz formu oluşmaktadır. pH değerleri 4 - 6 aralığından değişim gösterirken antosiyanin pigmentinin dört formunun da (flavilyum katyonu, susuz kuinoidal bazı, renksiz karbinol ve soluk sarı renkli çalkon formu) ortamda bulunduğu görülmektedir. pH 5 ve 6 değerleri arasında sadece iki formun hakim olduğu görülmektedir. Bunlar sırasıyla; karbinol psödobaz (B) ve çalkon (C) formudur. Denge halindeyken hangi formun hakim olduğu, ortamın pH değerine bağlıdır. pH değerlerinde meydana gelen artış ile birlikte karbinol veya psödobaz formunun (B) miktarı artarken, buna paralel olarak flavilyum

katyonu formu (AH^+) aynı düzeyde azalır. pH değeri değiştikçe bu dört farklı yapı birbirine dönüşebilir [Castañeda-Ovando vd., 2009; Cavalcanti vd., 2011; Limón vd., 2013].

Alkali bir antosiyanin çözeltisinin renginin, pH değerinin asidik değerlere getirilmesi ile değiştirilmesi mümkündür. Bu durumda, antosiyanin molekülünün denge formları flavilyum formunun baskın olduğu tarafa kayar ve ortam yine kırmızı renk alır. Bununla birlikte, pH değeri çok yüksek olduğu koşullarda kararsız iyonik çalkonlar oluşmuş durumdadır ve ortam pH değerinin değiştirilmesi ile tekrar antosiyanin pigmentinin canlı renk formlarının elde edilmesi, antosiyanin molekülü degrede olduğundan mümkün değildir [Rein, 2005]. Şekil 2.5. antosiyanin kararlılığı üzerinde pH etkisinin önemini özetlemektedir.

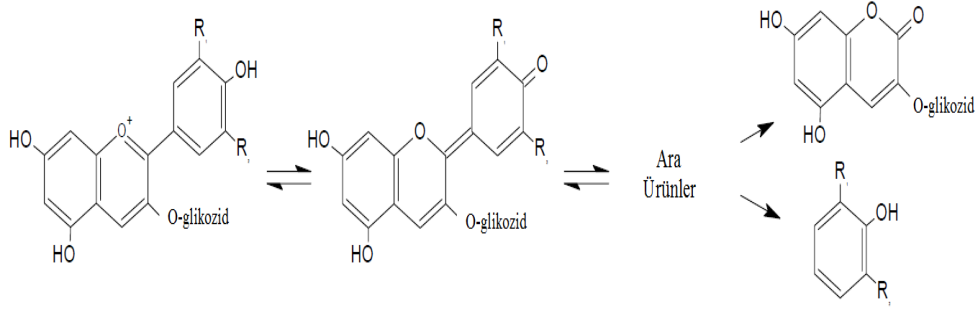
2.1.2.2. Sıcaklık

Antosiyanin bozunumu üzerinde önemli bir etkiye sahip olan bir diğer faktör de sıcaklıktır. Ürünün renk kalitesi ve beslenme özellikleri üzerinde belirgin bir etkisi olan antosiyanin pigmentleri ısıtma işlemi sırasında kolayca parçalanabilmektedir. Isıtmanın şiddeti ve süresi antosiyanin kararlılığı üzerinde güçlü bir etkiye sahiptir [Patras vd., 2010]. Isıtma işlemi gerçekleştirilen ortamın sıcaklığına bağlı olarak, ısıtma bozunumu, özellikle oksijen varlığında kahverengi pigmentlerin oluşumuna neden olmaktadır [Cavalcanti vd., 2011].

Isıtma işlemi sırasında, ısıtma sıcaklığı ve süresinin artışı antosiyanin ve kopigment miktarını, dolayısıyla kopigmentasyon kompleksini etkilemektedir. Bunun sonucunda, ana absorpsiyon pikinde hiperkromik etki ve batokromik kayma meydana gelmektedir [Bakowska vd., 2003].

pH 2-4 değerlerinde sıcaklık artışı glikozidik bağların hidrolizi ile antosiyanin pigmentinin glikozil kısımlarının bozunmasına neden olmaktadır. Bu durum glikozidik formlara nazaran antosiyanin aglikonunun kararlılığının düşük oluşu

sonucunda daha çok renk kaybına yol açmaktadır. Çalkon oluşumunun antosiyanin pigmentinin ısıl bozunumunun ilk basamağı olduğu kabul edilmektedir [Rein, 2005].



Şekil 2.6. Antosiyanin monoglikozitin ısıl bozunumu (pH 3,7) (Rein, 2005)

2.1.2.2.1. Antosiyaninlerin Bozunma Kinetiği

Yapılan araştırmalar, antosiyaninlerin, meyve suları ve konsantrelerinde bozunma reaksiyonunun birinci mertebeye reaksiyon kinetiğine göre gerçekleştiğini göstermektedir. Çalışmalar, antosiyanin konsantrasyonuna karşı zaman grafiği çizildiğinde üstel bir eğri, antosiyanin konsantrasyonunun doğal logaritmasına karşı zaman grafiği çizildiğinde ise lineer bir doğru elde edildiğini ortaya koymuştur.

Sadilova ve arkadaşlarının (2006) oluşturduğu ısıl bozunum şemasına göre (Şekil 4.14.) antosiyaninler bozunurken ilk önce deglikozillenme ile ksilozil molekülünün antosiyanin molekülünden ayrıldığı tespit edilmiştir. Ksilozil moleküllerinin parçalanmasının ardından ortaya çıkan ara ürünün de antosiyanin türevli olduğu bildirilmiştir. Şekil 4.14. incelendiğinde açilli ve açilsiz antosiyaninlerin bozunma mekanizmalarının birbirinden farklı olduğu görülmektedir.

Açilsiz antosiyaninlerde deglikozillenme sonucu üç şekerli antosiyaninlerin iki şekerli antosiyaninlere, iki şekerli antosiyaninlerin tek şekerli antosiyaninlere dönüştüğü tespit edilmiştir. Deglikozillenme tepkimelerinin ardından antosiyanin aglikonu açığa çıktığı görülmüştür. Aglikonun parçalanması ile de fenolik asit ya da fenolik aldehit oluştuğu saptanmıştır [Sadilova vd., 2006].

Açilli antosiyaninlerde de deglikozillenme ile şekerlerin antosiyanin molekülünden ayrılması sonucu açilsiz antosiyaninlerde olduğu gibi antosiyanin ağırlıkunu ve fenolik asit açığa çıktığı belirlenmiştir [Sadilova vd., 2006].

Wang ve Xu (2007) yaptıkları çalışmada 60 - 90°C aralığında böğürtlen antosiyaninlerinin birinci merteye reaksiyon kinetiğine göre bozunduğunu bildirmişlerdir. 8,90 °Brix böğürtlen suyunda 60 - 90°C aralığında antosiyaninlerin yarılanma ömürlerinin sıcaklık artışına paralel olarak azaldığı ve değerlerinin sırasıyla 16,7; 8,8; 4,7 ve 2,9 sa olarak bulunduğu rapor edilmiştir.

Kırca ve arkadaşları (2007a) tarafından yapılan çalışmada, kara havuç antosiyaninlerinin bozunma kinetiğinin de birinci merteye reaksiyon kinetiğine göre gerçekleştiği bildirilmiştir. pH 4,3 değerinde 45 °Brix kara havuç antosiyanin konsantrisinde 70, 80 ve 90°C için reaksiyon hız sabitleri sırasıyla, $0,78 \times 10^{-3}$, $1,68 \times 10^{-3}$, $3,57 \times 10^{-3} \text{ dk}^{-1}$ olarak bulunmuştur.

2.1.2.3 Oksijen

Oksijen molekülünün, antosiyaninlerin bozunma süreçlerini hızlandırdığı bilinmektedir. Ortamda bulunan oksijenin elimine edilmesi ısıl bozunuma karşı koruma sağlamaktadır. Yüksek ortam sıcaklığına ek olarak, ortamda oksijenin varlığı üzümü meyvelerden elde edilen meyve sularının ve ayrıştırılmış antosiyaninlerin bozunumu üzerinde ciddi bir etkiye sahiptir. Oksijen kaynaklı antosiyanin instabilitesi özellikle pH değişimlerinden etkilenmektedir. Oksijen varlığında pH ne kadar yüksekse antosiyanin bozunumunun da o ölçüde kuvvetli olduğu bilinmektedir [Cavalcanti vd., 2011; Rein, 2005].

2.1.2.4 Işık

Işık, antosiyaninlerin biyosentezi için gerekli bir unsur iken; aynı zamanda antosiyanin bozunumunu da hızlandırdığı bilinmektedir. Karanlıkta muhafaza edildiklerinde antosiyaninlerin renklerinin daha stabil olduğu görülmektedir.

Kearsley ve Rodriguez'in yaptıkları çalışma sonucunda aynı koşullarda, oda sıcaklığında, biri ışık altında, biri karanlıkta muhafaza edilen antosiyaninler arasındaki farkın 24 saatlik sürenin sonunda açıkça görülebildiği bildirilmiştir [Cavalcanti vd., 2011].

2.1.2.5 Konsantrasyon

Antosiyanin konsantrasyonunda meydana gelen artışın renk kararlılığının artışına katkıda bulunduğu bildirilmektedir. Skrede ve arkadaşları yaptıkları çalışma ile antosiyanin konsantrasyonunun artırılması sonucu renk kararlılığı daha yüksek çilek şurubu elde edilebileceğini tespit etmişlerdir [Cavalcanti vd., 2011].

Sadilova ve arkadaşları yaptıkları çalışmada açıl grubunda metoksillenmenin antosiyanin pigmentinin ısı kararlılığını arttırdığını bildirmişlerdir. Bunun yanı sıra ısı işlem esnasında artan katı madde miktarlarına paralel olarak antosiyanin yıkımının da arttığı gözlenmiştir. Bunun da, daha yüksek katı madde içeren çözeltilerde moleküllerin birbirlerine olan yakınlıklarının artışı ile reaksiyona girme isteklerinin artması sonucu ortaya çıktığı düşünülmektedir. Sonuç olarak molekül-içi ve moleküller-arası kopigmentasyon, glikozillenme ve açillenme derecesinin artışı antosiyanin pigmentinin pH, ısı ve ışık kararlılığını arttırmaktadır [Patras vd. 2010].

2.2. ANTOSİYANİNLERİN KOPİGMENTASYONU

Kopigment molekülünün antosiyanin pigmentine bağlanması sonucu arada oluşan bağlar, flavilyum iyonunda bulunan suyun nükleofilik atağının önlenmesine yardımcı olmaktadır. Nükleofilik su atağının önlenememesi durumunda renkli flavilyum iyonu renksiz psödobaz formuna dönüşecektir. Bunun sonucunda da renk kayıpları meydana gelecektir. Antosiyanin ve kopigment molekülü arasında meydana gelen moleküler etkileşimler hiperkromik etki ve batokromik kayma meydana gelmesine neden olur. Verilen bir pH değerinde, antosiyanin çözeltilerinin renk yoğunluğunun artışı hiperkromik etki olarak ifade edilirken; antosiyanin-kopigment kompleksinin görünür bölgedeki maksimum absorbansının dalga boyunda meydana

gelen değişim batokromik kayma olarak ifade edilmektedir [Bakowska vd., 2003; İstanbullu, 2007].

Yapılan araştırmalar, bitkilerde renk kararlılığını sağlayan ana mekanizmanın antosiyaninler ile diğer fenolik maddeler, daha genel bir tanımlamayla kopigmentler (sinapik asit, rozmarinik asit, kafeik asit, gallik asit, tanik asit v.b.) arasındaki moleküler etkileşimler olduğunu göstermektedir [Bakowska vd., 2003]. Kopigmentasyon olgusu ilk olarak Willstätter ve Zollinger tarafından 1916 yılında ortaya atılmıştır. Ortama tannik asit ya da gallik asit ilavesi yapıldığında üzüm antosiyanininin, oenin (malvidin 3-glikozit), renk yoğunluğunun maviden kırmızıya değiştiğini bildirmişlerdir [Awika, 2008]. Doğal halde kararsız olarak bulunan antosiyaninlerin kararlılığı kopigmentasyon ile doğrudan veya zayıf bağ etkileşimleriyle arttırılabilmektedir [Rein, 2005].

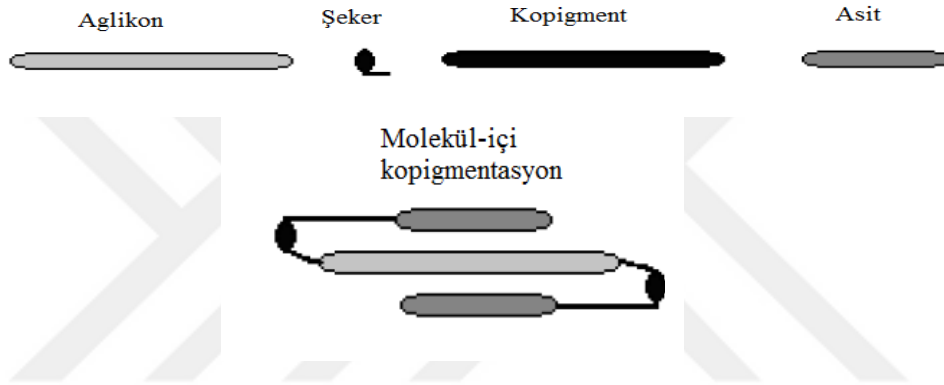
Son yıllarda yapılan çalışmalar, kopigmentasyon sonucunda elde edilen gıda boyalarının daha parlak ve renk açısından daha kararlı olduğunu göstermektedir. Kararlılığın arttırılmasına yönelik bir çalışma olan kopigmentasyon, renkli antosiyaninin düzlemsel polarize çekirdek formuna (flavilyum iyonu, kuinoidal formları) kopigment molekülünün tutunmasıyla oluşmaktadır [Dangles vd., 1992].

Antosiyanin molekülünün aglikon yapısı kopigmentasyon hızını ve derecesini önemli ölçüde etkilemektedir. Kopigmentasyon derecesini etkileyen faktörlerden bazıları arasında pH, çözeltinin iyonik gücü, sıcaklık ve pigment-kopigment oranı sayılabilmektedir [Awika, 2008].

Kopigmentasyon tepkimeleri bir kaç farklı mekanizma ile gerçekleşebilmektedir. Bu tepkimelerden en önemlileri ise; moleküller-arası ve molekül-içi etkileşimler aracılığıyla gerçekleşen tepkimelerdir. Antosiyanin pigmentlerinin kendi aralarında birleşmesi ya da metaller ile kompleks oluşturması sonucunda da kopigmentasyon tepkimeleri gerçekleşebilmektedir [Cavalcanti vd., 2011].

2.2.1. Molekül-içi Kopigmentasyon

Kopigmentasyonun en etkili şekillerinden biri aromatik ve/veya alifatik asitlerin antosiyanidin çekirdeğine şeker molekülü aracılığı ile açillenmesidir (molekül-içi kopigmentasyon) [İstanbullu, 2007]. Bu kopigmentasyon prosesinde kopigment, antosiyanin molekülünün bir parçasıdır ve kopigmentasyon, antosiyaninlerin kromofor grupları ile antosiyanin yapısında bulunan kopigmentin, kovalent bağ yaparak aynı şeker molekülüne bağlanması sonucu oluşmaktadır [Cavalcanti vd., 2011].



Şekil 2.7. Molekül-içi kopigmentasyon

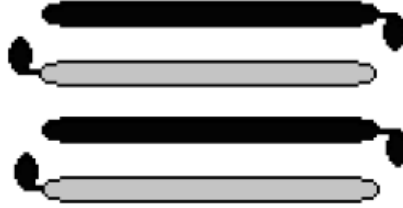
Açıl gruplarının sayısı, yapısı, antosiyanin pigmentinin şeker molekülüne bağlanma pozisyonu moleküller-içi kopigmentasyon üzerinde etkili parametrelerdir. Kovalent bağ oluşumu nedeniyle moleküller içi kopigmentasyonun moleküller arası kopigmentasyona göre daha etkili olduğu düşünülmektedir [Jettanapornsumran, 2009].

Şarapların olgunlaşması ve yıllanması ile birlikte zaman içerisinde antosiyanin konsantrasyonunda azalma meydana geldiği, bununla birlikte A ve B tipi vitisinler ve diğer piranoantosiyaninler gibi antosiyanin türevli ürünlerin oluştuğu tespit edilmiştir. Oluşan bu bileşiklerin antosiyaninlerden daha fazla renk kararlılığına sahip oldukları bildirilmiştir [Oliveira vd., 2014].

Meyve suyu üretiminde antosiyanin kaybı önemli bir faktör olarak görülmektedir. Brenes ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada, kırmızı üzüm antosiyaninlerinden yapılan model meyve suyunda ortamda askorbik asit varlığında, 25 ve 35 °C’ de depolamanın antosiyanin kararlılığına etkisi incelenmiştir. Kofaktör olarak biberiye polifenolleri (0, 0,2 ve % 0,4) kullanılmıştır. Kofaktör eklenmesinin meyve sularında daha yoğun kırmızı renk gözlenmesine, hiperkromik etkiye (%178) ve batokromik kaymaya (23 nm) sebep olduğu bildirilmiştir. Depolama sırasında antosiyanin ve askorbik asit bozunumunun birinci merteye reaksiyon kinetiğine göre gerçekleştiği tespit edilmiştir [Brenes vd., 2005].

2.2.2. Moleküller-arası Kopigmentasyon

Moleküller-arası kopigmentasyon, renkli antosiyanin molekülü ile renksiz kopigment molekülünün moleküller-arası kovalent olmayan etkileşimi olarak tanımlanmaktadır. Moleküller-arası kopigmentasyonun hem flavilyum katyonu hem de antosiyaninin kuinoidal baz formu arasında hidrojen bağlarının oluşması ya da hidrofobik etkileşim yolu ile gerçekleştiği öne sürülmektedir [İstanbulu, 2007].



Şekil 2.8. Moleküller-arası kopigmentasyon

Kopigmentasyon süreci, kırmızı şaraplarda üzüm kompozisyonu ve renk arasındaki ilişki üzerinde önemli bir etkiye sahiptir. Ayrıca yıllanmış şarapların rengini belirleyen yeni pigmentlerin oluşumunun gerçekleştiği birinci aşama olarak görülmektedir. Şarap yapımında kullanılacak üzümün karakteristik yapısı ve şarap prosesine bağlı olarak değişim göstermekle birlikte, flavonoidler ve hidroksisinasimil türevlerinin kırmızı şaraplarda etkin olan kopigmentler arasında bulunduğu belirtilmiştir [González-Manzano vd., 2009].

Kopigmentasyon sırasında renkli antosiyanin ile renksiz kopigment molekülü arasında meydana gelen zayıf etkileşimler sonucunda sandviç tipi bir yapı oluşmaktadır. Kompleks oluşumu sırasında kromenol (renksiz bileşik) ve koyu kırmızı flavilyum iyonu arasındaki denge flavilyum iyonunun olduğu tarafa doğru kaymaktadır. Bunun sonunda şarapların renk yoğunluğunun arttığı bildirilmiştir [Kunsági-Máté vd., 2006].

Jettanapornsumran [2009] tarafından yapılan çalışmada Asen ve arkadaşları ile Brouillard ve arkadaşlarına göre moleküller arası kopigmentasyonun arkasındaki mekanik itici güçlerin hidrojen bağı ve hidrofobik etkileşimler olduğu bildirilmiştir. Antosiyanin pigmentinin molekül yapısının da kopigmentasyon derecesi üzerinde etkili olduğu saptanmıştır. Örneğin, 3-monoglikozit antosiyanininin en yoğun renk değerlerine pH 3,5-4,2 aralığında ulaştığı tespit edilirken, 3,5-diglikozitlerin, 3-açilglükozit-5-glikozitin en yoğun renk değerlerine pH 3,1 değerinde ulaştığı ortaya konulmuştur [Jettanapornsumran, 2009].

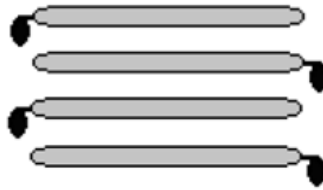
Euterpe oleracea meyvesinde doğal olarak bulunan ve dışarıdan eklenmiş polifenolik kofaktörlerin, meyvenin renk kararlılığı üzerindeki etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada kofaktör olarak Afrika kızıl çayı ve biberiye ilave edilmiştir. Afrika kızıl çayı ilave edilmiş örneklerde antosiyanin renginin %45,5 daha yoğun, antosiyanin kararlılığının ise kopigmente olmamış örneklere göre %40,7 arttığı, biberiye polifenollerinin de aynı kopigmentasyon etkisini göstererek renk yoğunluğuna katkıda bulunduğu gözlemlenmiştir [Pacheco-Palencia ve Stephen, 2010].

Çilek antosiyaninlerinin ısı kararlılıklarının incelendiği bir çalışmada, kopigment kaynağı olarak fenolik bileşenlerce zengin gül yaprağı eklenmesi sonucunda ürünün tadında herhangi bir değişiklik oluşmazken, çilek antosiyaninlerinin ısı bozunumunun yavaşladığı gözlemlenmiştir. Isıtma süresinin artması ile birlikte pigment konsantrasyonunda azalma gözlemlenmiştir. İki saat sonunda kopigmente olmamış örnekte bulunan pigment konsantrasyonu %63 iken kopigmente olmuş örnekte bulunan pigment miktarı %70'tir [Shikov vd., 2008].

Kırca ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmaya göre, çilek reçeli gibi çilek türevli ürünlerin rengi proses ve depolama sırasında bozunmaya karşı duyarlı ve kararsız bir yapıdadır. Bu nedenle, bu ürünlerin renk kararlılıklarının doğal gıda boyaları veya antosiyanin kaynaklı ürünler yardımıyla arttırılması gerekmektedir. Çilek suyuna, kopigment olarak ferulik asit, sinapik asit ve rozmarinik asit gibi fenolik asitler eklenmesi sonucu çilek suyunun renk kararlılığının arttığı gözlenmiştir [Kırca vd., 2007b].

2.2.3. Moleküllerin Kendi Aralarında Birleşmesi

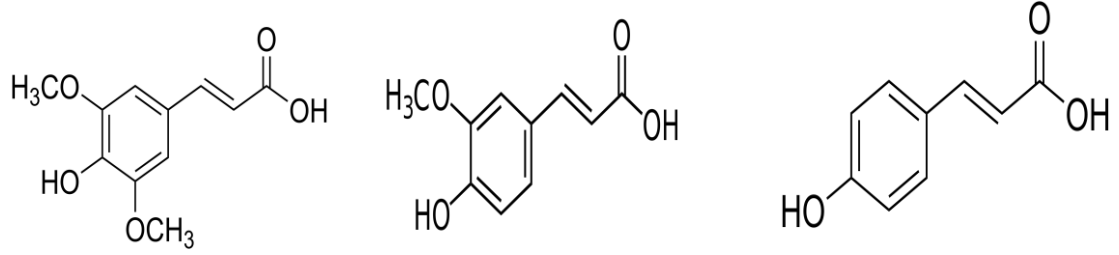
Cavalcanti ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada (2011), antosiyanin moleküllerinin kendi aralarında birleşmesi sonucu kararlılıklarının artışının ilk olarak Asen ve arkadaşları tarafından fark edildiği bildirilmiştir. Antosiyanin konsantrasyonunun (siyanidin 3,5-diglikozit) 10^{-4} M'dan 10^{-2} M'a artırılması sonucu Beer's Yasasından pozitif bir sapma meydana gelmektedir. Bunun sonucunda görünür bölgede antosiyanin pigmentinin maksimum dalga boyunun değiştiği ve verilen bir pH değerinde daha yoğun bir renge sahip olduğu tespit edilmiştir [Cavalcanti vd., 2011].



Şekil 2.9. Moleküllerin kendi aralarında birleşmesi

2.3. KARA HAVUÇ ANTOSİYANİNLERİ

Kara havuçta temel olarak tümü siyanidin türevleri olan iki tanesi açılız, üç tanesi açılı beş farklı antosiyanin bulunmaktadır. Açılız antosiyaninler siyanidin-3-ksilozil-glikozil-galaktozid ve siyanidin-3-ksilozil-galaktozid; diğer üçü ise sinapik, ferulik ve kumarik asitlerle açılmış siyanidin-3-ksilozil-glikozil-galaktozid'lerdir [Montilla vd., 2011].

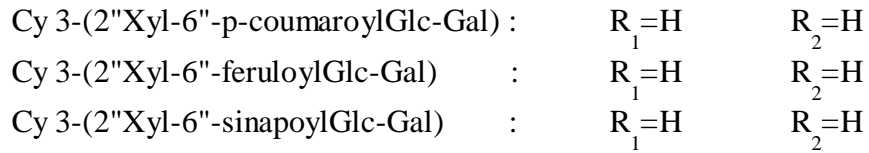
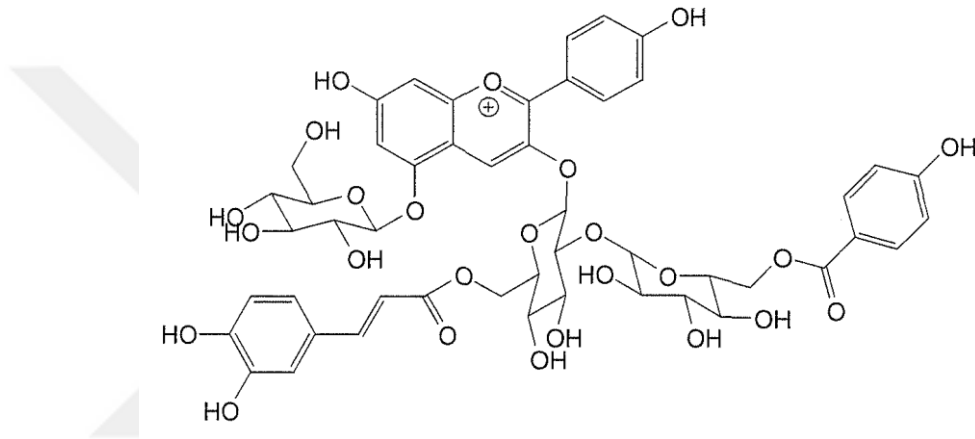


Sinapik asit

Ferulik asit

Kumarik asit

Şekil 2.10. Kara havuçta bulunan açilli antosiyaninlere bağlanan aromatik asitlerin yapıları



Şekil 2.11. Kara havuçta bulunan açilli antosiyaninlerin kimyasal yapıları

2.4. POLİFENOLİK BİLEŞENLER

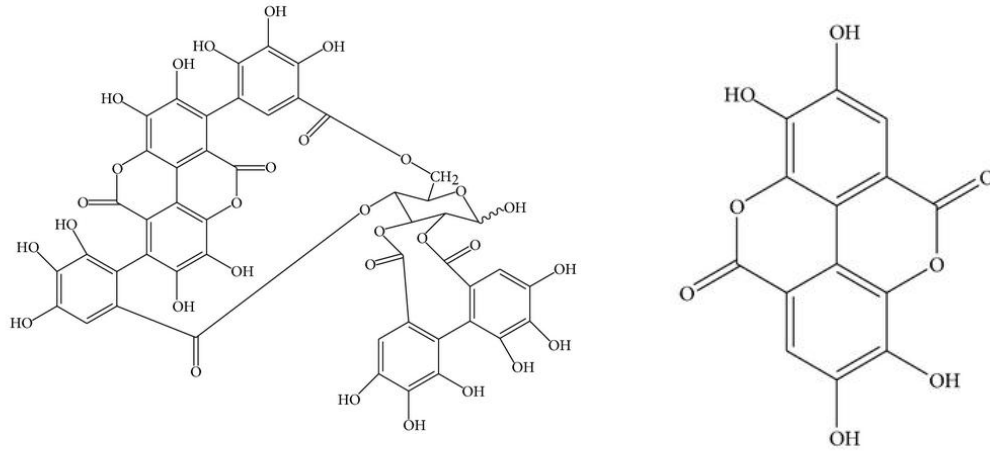
2.4.1. Nar (*Punica granatum L.*) Kabuğu Fenolik Bileşenleri

Nar, İran, ABD (Kaliforniya), Türkiye, Mısır, İtalya, Hindistan, Şili ve İspanya gibi tropikal ve subtropikal bölgelerde, farklı iklim bölgelerinde, yetiştirilebilen bir meyvedir [Fischer vd., 2011].

Nar, meyve kabuğu ve mezokarpında bulunan polifenoller, özellikle hidroliz olabilen tanenler, açısından zengin bir meyvedir. Tanen fraksiyonu, temel polioller

moleküllerinin gallik asit ve ellajik asit esterlerinden oluşmaktadır [Fischer vd., 2011].

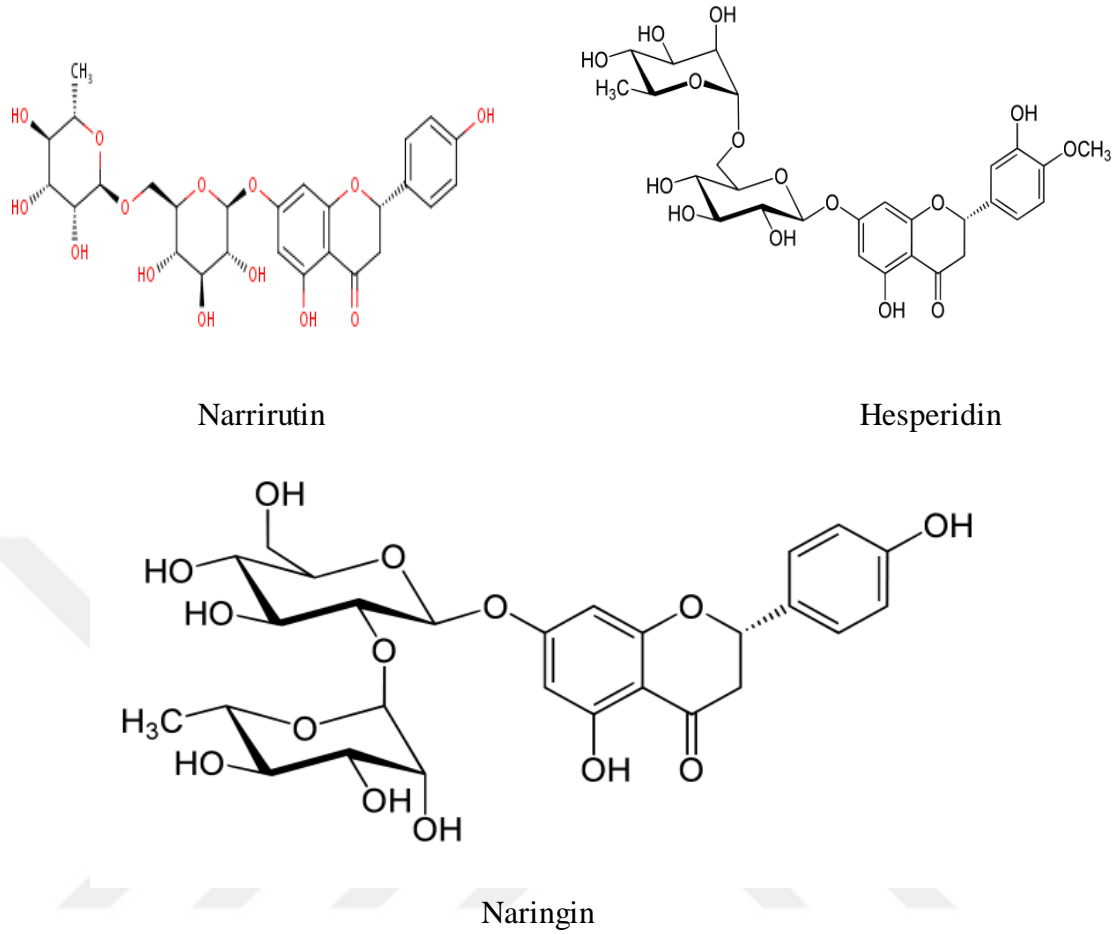
Nar kabuğu, meyve özütüne kıyasla polifenolik bileşenler yönünden oldukça zengindir [Li vd., 2006]. Nar kabuğunda baskın olan polifenolik bileşen hidrolize edilebilir tanenlerden olan ellajitanenler iken, punikalajin, galloyl-HHDP-hekzosit, granatin B, digalloyl-HHDP-glukonik asit ve bis-HHDP-hekzosit yönünden oldukça zengindir. Bunun yanı sıra, nar meyve özütünde de ellajik asit ve türevleri ile gallik asite rastlanılmaktadır [Fischer vd., 2011; Kelebek ve Canbaş, 2010].



Şekil 2.12. Nar kabuğu fenolik maddelerinden punikalajin ve ellajik asit

2.4.2. Mandalina (*Citrus reticulata*) Kabuğu Fenolik Bileşenleri

Fenolik bileşenlerce zengin meyve özünde en çok bulunan flavon glikoziti hesperidin iken, buna ek olarak, kabukta narirutin, hesperidin ve naringin bulunmaktadır. Ekşi mandalina türlerinde ise naringin yanı sıra, neohesperidin ve neoeriositrin baskın olarak bulunmaktadır [Levaj vd., 2009]. Ayrıca, Hayat ve arkadaşlarının (2011) yaptıkları çalışmaya göre, mandalina türlerinde gallik asit, p-hidroksibenzoik asit, vanilik asit, p-kumarik asit ve ferulik asit varlığı tespit edilmiştir.



Şekil 2.13. Mandalina kabuğu fenolik maddelerinden naringin, hesperidin ve naringin

Levaj ve arkadaşları yaptıkları çalışmada (2009), Peterson ve arkadaşlarının mandalina ve tatlı portakal türlerinde (*Citrus sinensis*) en fazla bulunan flavanon glikozitinin hesperidin olduğunu ortaya koyduklarına değinmişlerdir. Bunun yanı sıra, ekşi portakal türlerinde (*Citrus aurantium*) naringin, neohesperidin ve neoesiositrin flavanon glikozitlerinin baskın olan fenolik maddelerden olduğunu bildirmişlerdir [Levaj vd., 2009].

Turunçgillerde acı, keskin tadın kaynağının naringin olduğu tespit edilmiştir. Naringinin turunçgillerin meyve özünde bulunup bulunmamasına göre ekşi veya tatlı lezzete sahip olduğu bilinmektedir. Bu özelliklerine ek olarak flavanoidler sağlığa yararlı biyoaktif bileşenlerdir. Bazıları güçlü antioksidan özellik gösterirken, bu

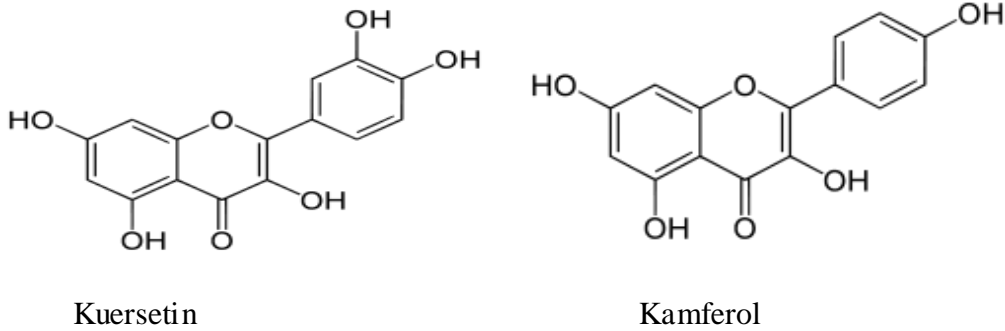
özellikleri sayesinde kanser ve kardiyovasküler hastalıkların oluşum riskini azalttıkları bilinmektedir [Levaj vd., 2009].

On dört farklı yabancı mandalina genotipinde yapılan analizler sonucunda mandalinaların hidroksibenzoik asit, hidroksisinnamik asit ve klorojenik asit içerdiği belirlenmiştir. Çalışılan mandalina kabuklarında en fazla bulunan fenolik asitin ferulik asit olduğu, bununla birlikte kafeik asit, p-kumarik asit, sinapik asit ve klorojenik asit içerdiği tespit edilmiştir [Zhang vd., 2014].

2.4.3. Gül (*Rosa damascena*) Petalleri Fenolik Bileşenleri

Fenolik bileşikler, antioksidan potansiyellerinin önemli bir belirleyicisi olmakla birlikte, doğal antioksidan kaynaklardır. Gül petalleri fenolik bileşenler yönünden oldukça zengindir. Özellikle gallik asit açısından çok zengin olduğu tespit edilmiştir. Petalden elde edilen ekstraktlar, diğer ekstraktlar ile karşılaştırıldığında, kafeik asit, klorojenik asit, p-kumarik asit, ferulik asit ve gallik asitlere ek olarak, kateşin ve epikateşin gibi fenolik asitler bakımından da zengin olduğu belirlenmiştir. [Baydar ve Baydar, 2013].

Gül petallerinde, kamferol ve kuersetin glikozitleri tespit edilmiştir. Schieber ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmaya göre, bol miktarda kamferol 3-O-glikozit ve az miktarda kuersetin 3-O-ramnozid bulunduğu saptanmıştır [Schieber vd., 2005]. Ham ve saflaştırılmış ekstrakta, kamferol glikozitleri toplam bileşenlerin %65'i oranında bulunuyor iken, bu oranın %30'u kamferol 3-O-glikozittir [Shikov vd., 2008].



Şekil 2.14. Gül petalleri fenolik maddelerinden kuersetin ve kamferol

3. MATERYAL VE METOT

3.1. KARA HAVUÇ ANTOSİYANİNLERİNİN ÖZÜTLENMESİ

Bu çalışmada Mersin’de bulunan yerel marketlerden temin edilen kara havuç, sitrik asit (Merck, 1.00242.1000, Germany), kaba filtre kağıdı, cam hazneli parçalayıcı (8011ES, HGB2WTS3, USA) ve santrifüj (MEDIFRIGER BL-S, SELECTA, Spain) kullanılmıştır.

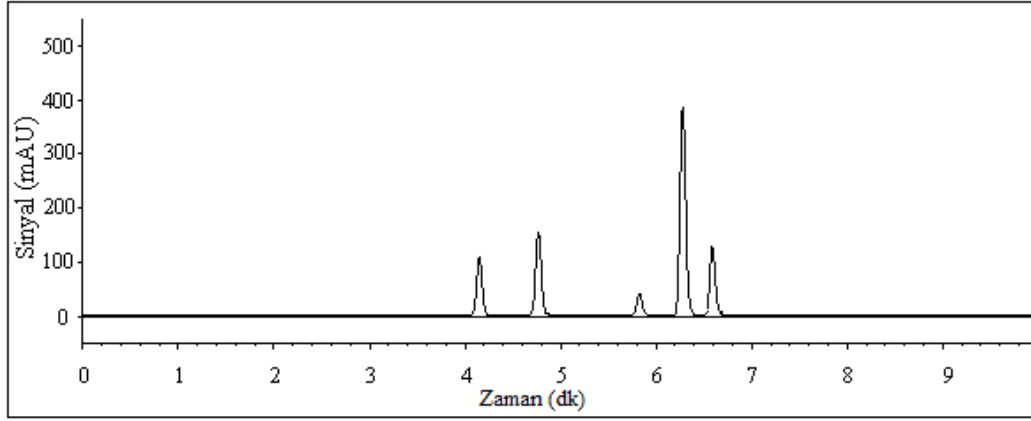
Kara havuç, 0,1 M sitrik asit çözeltisi içerisinde konularak parçalayıcıda parçalanmış ve kaba filtreden geçirilmiştir. Askıda kalan partikülleri uzaklaştırmak için santrifüjleme işlemi yapılmıştır.

3.2 ANTOSİYANİN ÖZÜTLERİNİN SAFLAŞTIRILMASI

Özütün saflaştırılması için Amberlite XAD7 (Sigma, 37380-43-1, Germany) reçine, cam kolon (İldam, Teflon musluklu, 325 mL), vakumlu evaporatör (BUCHI Rotavapor R-3000, Switzerland), metanol (Merck, 1.06008.2500, Germany), hidroklorik asit (%37’lik, Merck, 1.00314.2500, Germany), dondurarak kurutucu (TELSTAR, Cryodos-50, Spain) ve saf su kullanılmıştır.

Kaba filtreden geçirilerek santrifüjlenen özüt, Amberlite XAD7 reçinesi ile doldurulmuş cam kolonlarda saflaştırılmıştır. Reçine doldurulmuş cam kolondan metanol geçirilerek reçinenin aktifleştirme işlemi yapılmıştır. Ardından metanolü uzaklaştırmak için %0,01 HCl (h/h) içeren saf su geçirilmiştir. Özüt kolona yüklenmiş ve asitli su geçirilerek antosiyanin ve fenolik maddeler dışındaki tüm bileşenlerin uzaklaşması sağlanmıştır. Kolonda tutulan antosiyaninler %0,01 HCl (h/h) içeren metanol ile kolondan alınmıştır [Rodríguez-Saona ve Wrolstad, 2001].

Elde edilen saf antosiyanin özütü vakumlu evaporatörde 35-40°C’de deriştirilmiş, ardından dondurarak kurutulmuş ve buzdolabında (+4°C) muhafaza edilmiştir.



Şekil 3.1. Saflaştırılmış kara havuç antosiyaninlerine ait HPLC kromatogramı

3.3. ANTOSİYANİN PİGMENTLERİNİN KOPİGMENTASYONU

Kopigmentasyon deneyleri sırasında etüv (SELECTA, DIGITHEAT 2001245, Spain), öğütücü değirmen (IKA WERKE M20, Germany), terazi (Sartorius, BP221 S, Germany), ultrasonik su banyosu (elma, Transsonic 460/H, Germany), santrifüj ((MEDIFRIGER BL-S, SELECTA, Spain), filtre (0,45 μ m HV, Millipore Durapore Membrane Filters, Ireland) ve UV/VIS spektrofotometre (ANALYTK JENA AG, SPECORD 210 PLUS, Germany) kullanılmıştır. Kopigmentasyonu gerçekleştirilmiş örneklerin pH kararlılığının belirlenebilmesi amacıyla disodyum hidrojen fosfat (Merck, 1.06586.0500, Germany), sitrik asit (Merck, 1.00242.1000, Germany) ve pH metre (Hanna Instruments), kullanılmıştır.

Kopigmentasyon deneyleri nar kabuğu ve mandalina kabuğu gibi meyve kabukları ile gül petalleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Kabuklar ve petaller etüvde 40°C'de kurutulduktan sonra öğütücü değirmende öğütülerek toz haline getirilmiştir. Kopigment kaynağı olarak nar ve mandalina kabukları ile gül petalleri eklenmiş antosiyanin çözeltilerinin ve referans örneklerin UV/VIS spektrofotometrede spektrumları alınarak batokromik kayma ($\Delta\lambda_{max}$) ve hiperkromik etki (ΔABS) belirlenmiştir. En fazla batokromik kayma gösteren antosiyanin kopigment kompleksi için optimum derişim oranı %2 olarak belirlenmiştir. Kurutulan antosiyanin özütleri bilinen hacimdeki %0,01'lik HCl ile yaklaşık $1,00 \pm 0,05$ ABS olacak şekilde çözündürülmüştür.

Antosiyanin pigmentlerinin kopigmentasyonu için toz kopigment kaynakları $1,00 \pm 0,05$ ABS olacak şekilde çözündürülen örnek içerisine %2 oranında eklenerek iki saat kopigmentasyonun gerçekleşmesi için ultrasonik su banyosunda bekletilmiştir. Kopigmentasyon deneylerinin ardından, toz kopigmentleri uzaklaştırmak amacıyla santrifüjleme işlemi ($+4^{\circ}\text{C}$, 18000 rpm, 15 dakika) yapılmıştır. Örneklerin pH kararlılıklarının belirlenebilmesi için McIlvain tampon çözelti protokolüne göre disodyum hidrojen fosfat – sitrik asit tampon çözeltileri hazırlanmıştır. Hazırlanan tampon çözeltiler dengeye gelebilmeleri için bir saat karanlıkta bekletilmiştir. Ardından referans ve kopigmentasyonu gerçekleştirilen antosiyanin örnekleri tampon çözeltiler ile seyreltilerek pH'sı istenilen değere (pH 1, 2,2, 2,8, 3,2, 3,6, 4,2, 4,8 ve 5,4) ayarlanmıştır. Hazırlanan çözeltilerin dengeye gelmesi için iki saat karanlıkta bekletilmiş ve $0,45 \mu\text{m}$ 'lik filtreden süzöldükten sonra spektrofotometrede 450-700 nm dalga boyları aralığında spektrumları alınmıştır.

Oda sıcaklığında referans ve kopigment eklenmiş antosiyanin özütlerinde pH 1-5,4 aralığında kopigmentasyon tepkimeleri gerçekleştirilmiştir. Ancak, pH 1 çözeltisi tampon çözeltisi olmadığından, %0,01 HCl (h/h) içeren saf su olduğundan dolayı, elde edilen sonuçlarda sapmalar görölmüştür. Bu nedenle, pH 1 ölçüm sonuçları değerlendirilmeye alınmamıştır.

3.4 HPLC ANALİZLERİ

Antosiyanin pigmentlerinin analizlerinde Chemstation (Chem32) yazılım sistmine sahip, pompa (Agilent 1200, G1311A), gaz giderici (Agilent 1200, G1322A), diod array dedektör (Agilent 1200, G1315D) ve enjektörden (autosampler, Agilent 1200, G1229A) oluşan Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) kullanılmıştır.

Hareketli faz olarak %100 asetonitril (Merck, 1.00030.2500, Germany) (A) ve %4'lük o-fosforik asit (%85'lik, Merck, 1.00563.2500, Germany) (B) ile oluşturulan gradient program kullanılmıştır. Lineer gradient program %6 A (0 dak.), %25 A (18,33 dak.) ve hareketli fazın akış hızı 1 mL/dak. olarak ayarlanmıştır [Durst

ve Wrolstad, 2001]. Ters faz C18 kolon (Zorbax SB-C18, 4,6 x 50 mm, 1,8µm) kullanılmıştır.

Referans ve kopigment eklenen antosiyanin çözeltilerinin UV/VIS spektrofotometrede spektrumları alındıktan sonra 50 µL örnek alınarak doğrudan HPLC'ye enjekte edilmiştir. 280 nm, 330 nm, 440 nm ve 525 nm dalga boylarında kromatogramları elde edilmiştir.

3.5. ISIL KARARLILIK DENEYİ

Isıl kararlılık deneyleri, pH 1-5,4 aralığında referans antosiyanin çözeltilerinde ve kopigment eklenmiş antosiyanin çözeltilerinde 90°C'de su banyosunda (MEMMERT WB 14, Germany) gerçekleştirilmiştir. Başlangıç absorbans değerleri yaklaşık $1.00 \pm 0,05$ olarak ayarlanan referans ve kopigmentasyon yapılmış antosiyanin çözeltileri cam deney tüplerine üçer paralel olacak şekilde dağıtılmıştır. Su banyosunda bekletilen tüplerden merkezde bulunan tüpe digital termokupl yerleştirilmiş ve sıcaklık $90 \pm 0,01$ gösterdiği an deneyin 0. dakikası olarak deney başlatılmıştır. 0, 30, 60, 120, 240 ve 360. dakikalarda su banyosundan çıkartılan örnekler buzlu su içerisinde hemen oda sıcaklığına soğutulularak 525 nm'deki absorbansları kaydedilerek hesaplamalar yapılmıştır.

3.6. ANTOSİYANİN SPEKTRAL FOTOMETRE ANALİZLERİ

3.6.1. Monomerik Antosiyanin Tayini

Monomerik antosiyanin tayini için 0,025 M potasyum klorür (KCl) (Merck, 1.04935, Germany) tamponu (pH 1), 0,4 M sodyum asetat ($\text{CH}_3\text{CO}_2\text{Na} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) (Merck, 1.06267.1000, Germany) tamponu (pH 4,5), saf su, UV/VIS spektrofotometre (ANALYTK JENA AG, SPECORD 210 PLUS, Germany) ve quartz absorbans ölçüm küveti kullanılmıştır. Spektrofotometrik ölçümler, örneklerin maksimum absorbans verdiği dalga boyunda ($\lambda_{\text{max}}=525\text{nm}$), saf suya karşı yapılmıştır.

Referans ve kopigmentasyona bırakılmış örneklerin monomerik antosiyanin içeriği, Fuleki ve Francis (1968) tarafından geliştirilmiş pH-diferansiyel metoduna göre yapılmıştır. pH-diferansiyel metodunun ilkesi, monomerik antosiyaninlerin pH 1,0'da renkli flavilyum formunun egemen olmasına dayanmaktadır. Buna göre ortam pH 1,0 ve pH 4,5 olduğu zaman ölçülen absorbans değerlerinin farkı, doğrudan antosiyanin konsantrasyonu ile orantılıdır.

Absorbans okumaları kara havuç antosiyaninlerinin maksimum absorbans verdiği 525 nm dalga boyunda, düşük düzeyde bulunan bulanıklığın belirlenmesi için ise; 700 nm'de yapılmıştır [Giusti ve Wrolstad 2001].

Antosiyanin miktarı bütün örneklerde, siyanidin 3-glikozit cinsinden (MA= 445,2; $\epsilon = 29.600$) eşitlik 3.2'ye göre hesaplanmıştır [Giusti ve Wrolstad 2001].

$$A = (A_{525 \text{ nm}} - A_{700 \text{ nm}})_{pH 1.0} - (A_{525 \text{ nm}} - A_{700 \text{ nm}})_{pH 4.5} \quad (3.1)$$

$$\text{Monomerik Antosiyanin Miktarı} \left(\frac{\text{mg}}{\text{L}} \right) = (A * MA * SF * 1000) / (\epsilon * l) \quad (3.2)$$

A= Absorbans değeri

MA= Antosiyanin pigmentinin molekül ağırlığı

SF= Seyreltme faktörü

ϵ = Molar absorpsiyon katsayısı

l= Absorbans ölçüm küvetinin hücre kalınlığı (1cm)

3.6.2 Renk Yoğunluğu, Polimerik Renk ve Kahverengileşme

Renk yoğunluğu, polimerik renk ve kahverengileşme tayini için potasyum metabisülfid ($K_2S_2O_5$) (Merck, 1.05057.1000, Germany) çözeltisi, 0,025 M potasyum klorür (KCl) (Merck, 1.04935, Germany) tamponu (pH 1), saf su, UV/VIS spektrofotometre (ANALYTK JENA AG, SPECORD 210 PLUS, Germany) ve quartz spektrofotometre küveti kullanılmıştır.

Ölçümler Giusti ve Wrolstad (2001)'ın bisülfite ağartma metoduna göre yapılmıştır. Bu yöntemde $K_2S_2O_5$ çözeltisi ilavesi ile birlikte doğal haldeki monomerik antosiyaninler bisülfitle reaksiyona girerek renksiz bileşikler oluşturmaktadır. Kahverengi pigmentlerin tayini amacıyla 420 nm'de okuma yapılmıştır.

Giusti and Wrolstad (2001) protokolü kullanılarak; antosiyaninlerin parçalanma ölçütleri olarak değerlendirilen renk yoğunluğu, polimerik renk, polimerik renk oranı ve kahverengileşme değerleri belirlenmiştir. Bu amaçla, örnekler için, monomerik antosiyanin miktarı tayininde olduğu gibi, 0,025 M KCl tampon çözeltisi (pH 1,0) kullanılarak uygun bir seyreltme oranı saptanmıştır. Bu seyreltme oranına göre örnekler saf suyla seyreltilmiştir. İki ayrı, 1 cm hücre kalınlığındaki, quartz küvetin her birine seyreltilmiş örneklerden 2,8 mL alınıp, birinin üzerine 0,2 mL $K_2S_2O_5$ (%20, w/v, $K_2S_2O_5$) çözeltisi eklenmiş, örnekteki monomerik antosiyaninlerin renksiz kompleks oluşturması sağlanmıştır. Buna karşın, "polimerik antosiyanin-tanen" kompleksleri ve "melanoidin" pigmentleri ise, bisülfite karşı direnç göstererek renklerini korumuşlardır.

Diğer küvete ise, bisülfite çözeltisi yerine 0,2 mL saf su eklenerek her iki küvet 15 dk süreyle denge oluşumu için karanlıkta beklemeye bırakılmışlardır. Bu süre sonunda, her iki küvetteki çözeltilerin absorbans değerleri 420 nm, 525 nm ve 700 nm dalga boylarında ölçülmüştür. Ölçümler saf suya karşı yapılmıştır. Ölçüm sonuçları aşağıda belirtildiği gibi renk yoğunluğu, polimerik renk, polimerik renk oranı ve kahverengileşme olarak değerlendirilmiştir.

3.6.2.1. Renk yoğunluğu

Renk yoğunluğu, $K_2S_2O_5$ eklenmemiş küvette bulunan örneklerin, 525 nm ve 420 nm dalga boylarındaki absorbansları toplamı olarak tanımlanmaktadır. Renk yoğunluğu eşitlik 3.3 kullanılarak hesaplanmıştır [Giusti ve Wrolstad 2001].

$$A = (A_{420 \text{ nm}} - A_{700 \text{ nm}}) + (A_{525 \text{ nm}} - A_{700 \text{ nm}}) * SF \quad (3.3)$$

SF= Seyreltme Faktörü

3.6.2.2. Polimerik Renk

Polimerik renk; K₂S₂O₅ uygulanmış küvette bulunan örneklerin 525 nm ve 420 nm dalga boylarındaki absorbansları toplamı olarak tanımlanmaktadır. Eşitlik 3.4 kullanılarak hesaplanmıştır [Giusti ve Wrolstad 2001]..

$$A = (A_{420 \text{ nm}} - A_{700 \text{ nm}}) + (A_{525 \text{ nm}} - A_{700 \text{ nm}}) * SF \quad (3.4)$$

SF= Seyreltme Faktörü



4. BULGULAR VE TARTIŞMA

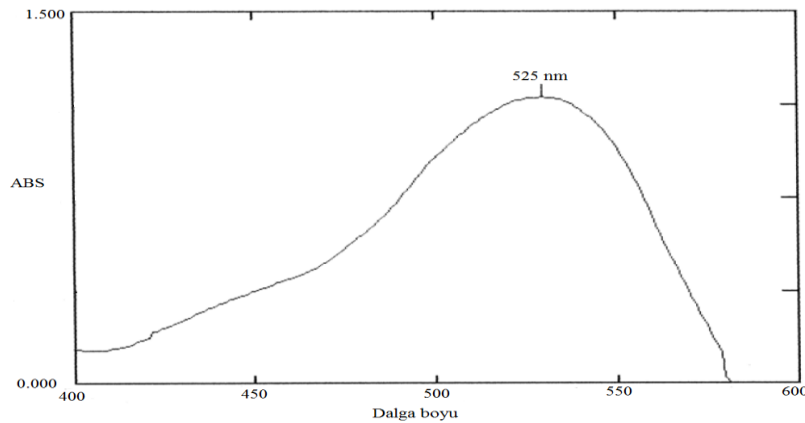
4.1. KARA HAVUÇ ANTOSİYANİNLERİ

Kara havuçta hepsi siyanidin türevli olan iki tanesi açısız, üç tanesi tek-açilli beş farklı antosiyanin bulunmaktadır. Açısız antosiyaninler siyanidin-3-ksilozil-glikozil-galaktozit ve siyanidin-3-ksilozil-galaktozit; açilli antosiyaninler ise sinapik, ferulik ve kumarik asitlerle açillenmiş siyanidin-3-ksilozil-glikozil-galaktozit'lerdir [Montilla vd., 2011]. Bu antosiyaninler arasında ferulik asit ile açillenmiş siyanidin-3-ksilozil-glikozil-galaktozit'in en yüksek miktarda bulunduğu bilinmektedir [Sadilova vd., 2006].

Antosiyaninlerin yüksek sıcaklık ve pH değerlerinde kolay bozunma eğiliminde olduğu bilinmektedir. Bu nedenle, son yıllarda antosiyaninlerin ısı kararlılığını ve pH kararlılığını arttırmak için yapılan kopigmentasyon çalışmaları hız kazanmıştır. Bu çalışmada saflaştırılmış referans antosiyanin özütü ve nar kabukları, mandalina kabukları, gül petalleri ile kopigmentasyonu gerçekleştirilmiş antosiyanin özütünün pH kararlılığı ve 90°C'de ısı kararlılığı incelenmiştir. Ayrıca, termodinamik ölçümler yapılarak önerilen matematiksel modele uygunluğu tartışılmıştır. Elde edilen sonuçlar ekler dizininde verilmiştir.

4.1.1. Kara Havuç Suyunun Spektral Özellikleri

Referans kara havuç spektrumu Şekil 4.1' de verilmiştir.



Şekil 4.1.Referans kara havuç suyu spektrumu (λ_{max} : 525 nm, Abs: 1,144)

Kara havuç suyunun spektral özelliğini yansıtan Şekil 4.1.'de görüldüğü gibi kara havuç suyunun maksimum absorbands gösterdiği dalga boyu 525 nm olarak belirlenmiştir.

4.2. SAFLAŞTIRILMIŞ KARA HAVUÇ ANTOSİYANİNLERİNİN KOPİGMENTASYONU

Nar kabuğunun punikalajin, galloyl-HHDP-hekzosit, granatin B, di galloyl-HHDP-glukonik asit ve bis-HHDP-hekzosit gibi fenolik bileşenler yönünden zengin olduğu bilinmektedir. Bunun yanı sıra nar kabuğunda, ellajik asit ve türevleri ile gallik asite de rastlanılmaktadır [Fischer vd., 2011]. Mandalina kabuklarında da bol miktarda narirutin, hesperidin, naringin, p-kumarik ve ferulik asit gibi fenolik bileşenler bulunduğu bilinmektedir [Hayat vd., 2011; Levaj vd., 2009]. Gül petallerinde bulunan olası fenolik maddelerin ise gallik asit, kamferol, kuersetin, kafeik asit, klorojenik asit, p-kumarik asit, ferulik asit, kateşin ve epikateşin olduğu tespit edilmiştir [Baydar ve Baydar, 2013; Schieber vd., 2005]. Nar kabuğu, mandalina kabuğu ve gül petallerinde bulunan özellikle halka yapıdaki fenolik maddelerin kara havuçta bulunan antosiyaninler ile zayıf etkileşimler oluşturarak kopigmentasyona neden olabileceği düşünülmüştür.

Nar kabukları, mandalina kabukları ve gül petalleriyle kopigmentasyon yapılmış örneklerde maksimum dalga boyunda (λ_{max}) absorbands (ABS) artışı (hiperkromik etki) ve maksimum dalga boyundaki kayma (batokromik kayma) kopigmentasyonun gerçekleştiğini göstermektedir. Kara havuç antosiyaninlerinin spektral özelliklerindeki batokromik kayma kopigmentasyonu işaret etmektedir. Çizelge 4.1.'de görüldüğü gibi absorbansta çok fazla değişiklik olmamakla birlikte, kopigmentasyon öncesi referans kara havuç antosiyanin çözeltisinin maksimum dalga boyu 525 nm iken, nar kabuğu, mandalina kabuğu ve gül petalleri ile kopigmentasyon sonrası 531-532 nm'ye yükseldiği gözlemlenmiştir.

Çizelge 4.1. Referans ve kopigmente kara havuç antosiyanin çözeltileri λ_{\max} ve ABS değerleri

Örnek ¹	λ_{\max}	ABS
Referans kara havuç antosiyanin çözeltisi	525 nm	1,129
Kopigment 1* + Kara havuç özütü	531 nm	1,044
Kopigment 2** + Kara havuç özütü	531 nm	0,951
Kopigment 3*** + Kara havuç özütü	532 nm	1,096

* nar kabuğu, ** mandalina kabuğu, *** gül petalleri

1: Tablodaki değerler örneklerin pH kararlılık deneyleri pH 2,8 verilerinden alınmıştır.

4.3 KOPİGMENTASYONUN pH KARARLILIĞI ÜZERİNE ETKİSİ

4.3.1. pH Etki Mekanizmasının Matematiksel Yaklaşımı

Kopigmentasyon deneyleri öncesinde ve sonrasında referans kara havuç antosiyanin çözeltisi ile nar kabuğu, mandalina kabuğu ve gül petalleri ile kopigmentasyonu yapılmış antosiyanin çözeltilerinin termodinamik davranışının incelenmesinde, Figueiredo ve arkadaşlarının (1996) geliştirdikleri matematiksel yaklaşım kullanılmıştır. Buna göre;



Burada, AH^+ : Flavilyum katyonu; CP : Molekül-arası kompleks; B : Hemiasetal ve kalkon; A : Kuinodal formlarını, K_h^{CP} : Hidratlanma denge sabitini; K_a^{CP} : Deprotonlanma denge sabitini ve K_1 : Flavilyum:Kompleks denge sabitini ifade etmektedir. Bu durumda bir antosiyanin çözeltisinin toplam derişimi (C_T);

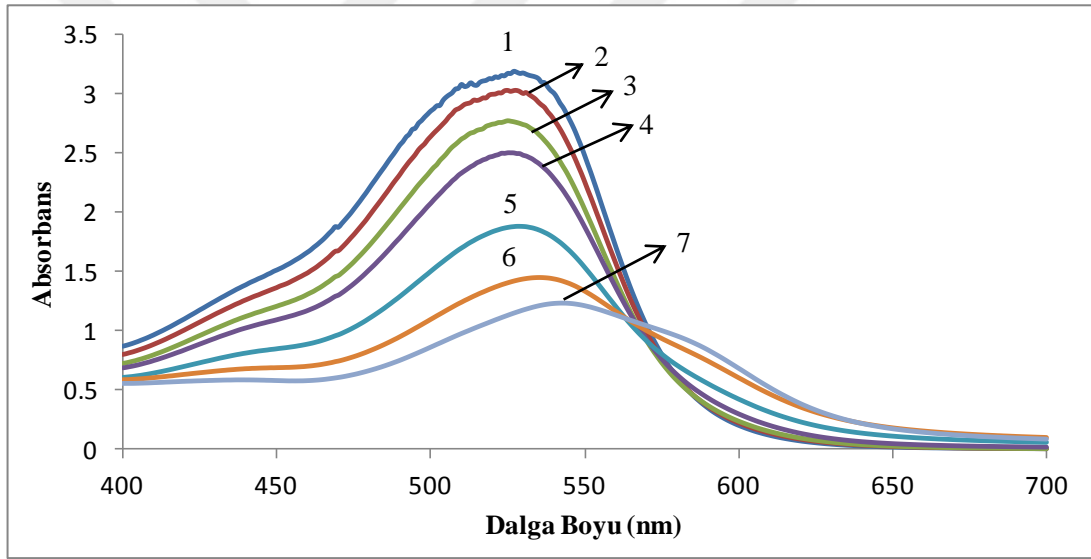
$$C_T = [AH^+] + [CP] + [A] + [B] \quad (4)$$

$$ABS = \varepsilon_{AH^+} [AH^+] + \varepsilon_{CP} [CP] + \varepsilon_A [A] \quad (5)$$

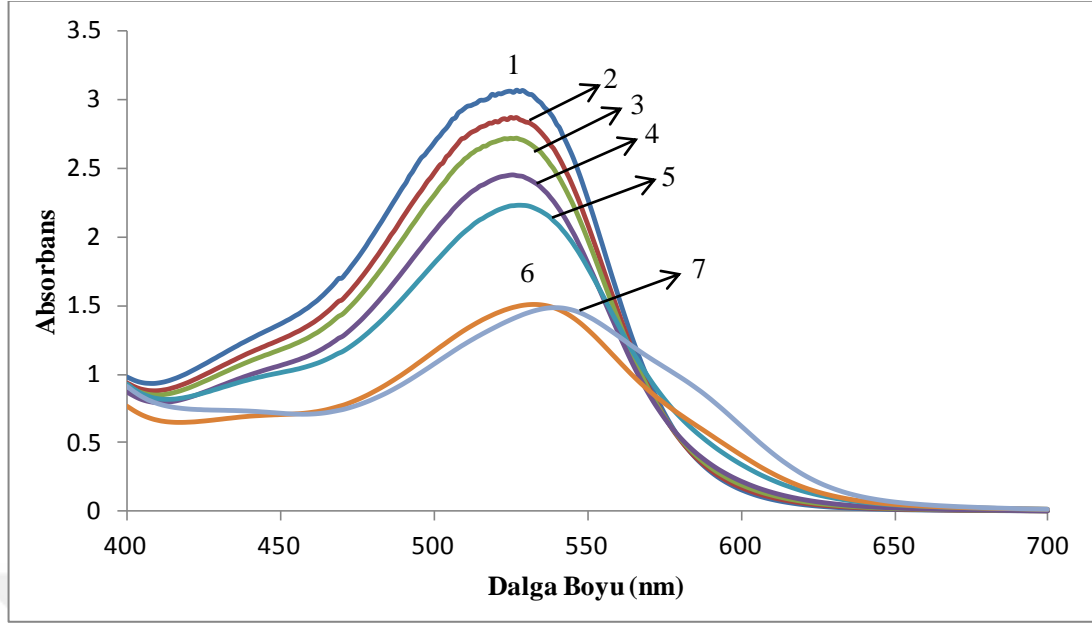
$$ABS_0 = \varepsilon_{AH^+} C_T \quad (6)$$

Burada, ABS : Çözeltinin herhangi bir pH değerindeki görünür bölge maksimum absorbansını; ABS_o : Çözeltinin $pH < 2,2$ değerindeki görünür bölge maksimum absorbansını; ε : Değişik formların molar absorpsiyon katsayılarını ifade etmektedir.

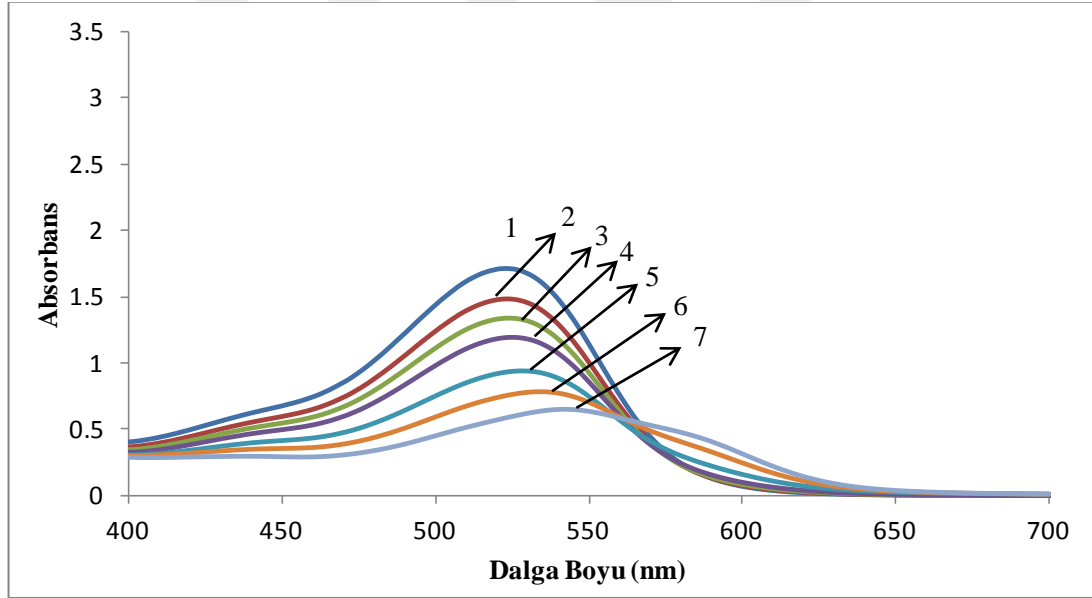
Şekil 4.2.'de referans kara havuç antosiyanin çözeltisinin, Şekil 4.3.'te ise nar kabukları ile kopigmentasyon yapılmış kara havuç antosiyanin çözeltisinin, Şekil 4.4.'te mandalina kabukları ile kopigmentasyon yapılmış kara havuç antosiyanin çözeltisinin, Şekil 4.5'te gül petalleri ile kopigmentasyon yapılmış kara havuç antosiyanin çözeltisinin farklı pH değerlerinde, oda sıcaklığında, gerçekleştirilen termodinamik ölçümlerinden elde edilen spektrumları görülmektedir.



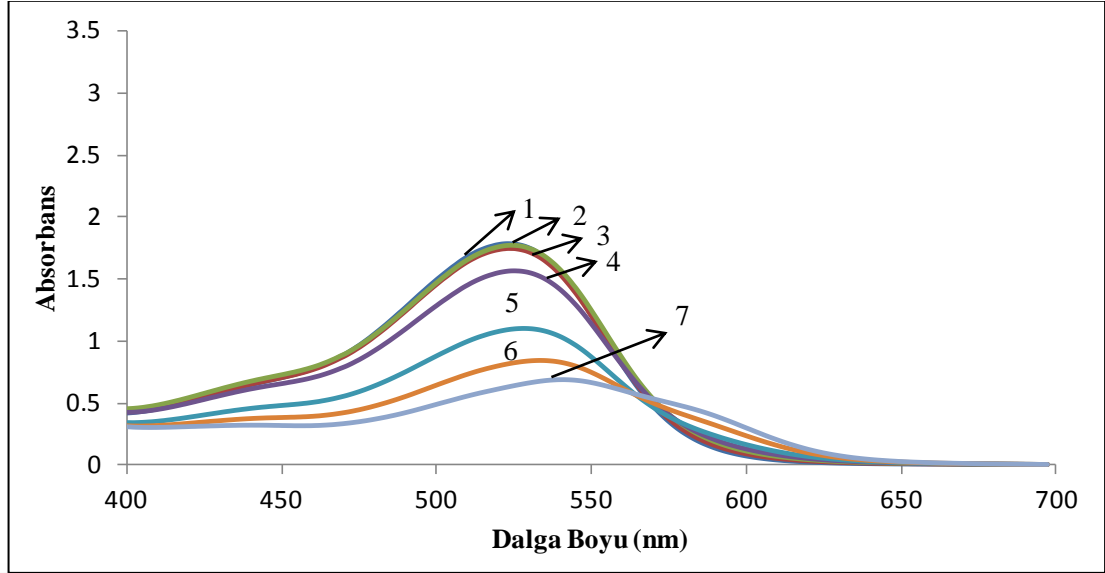
Şekil 4.2. Referans antosiyanin çözeltisi termodinamik ölçüm spektrumları: (1) pH 2,2; (2) pH 2,8; (3) pH 3,2; (4) pH 3,6; (5) pH 4,2; (6) pH 4,8; (7) pH 5,4



Şekil 4.3. Nar kabukları ile kopigmente antosiyanin çözeltisi termodinamik ölçüm spektrumları: (1) pH 2,2; (2) pH 2,8; (3) pH 3,2; (4) pH 3,6; (5) pH 4,2; (6) pH 4,8; (7) pH 5,4



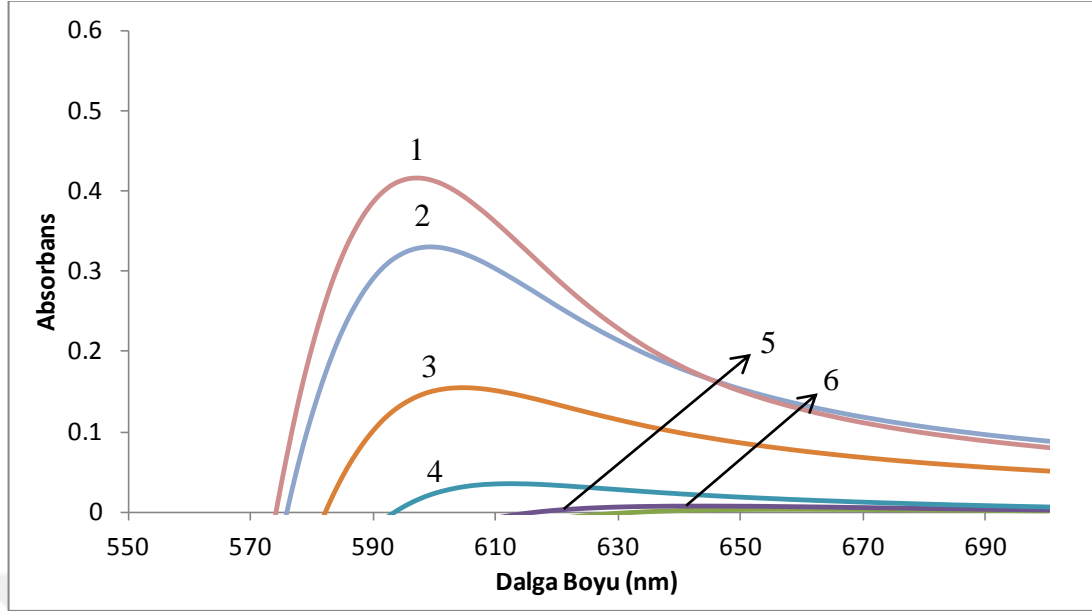
Şekil 4.4. Mandalina kabukları ile kopigmente antosiyanin çözeltisi termodinamik ölçüm spektrumları: (1) pH 2,2; (2) pH 2,8; (3) pH 3,2; (4) pH 3,6; (5) pH 4,2; (6) pH 4,8; (7) pH 5,4



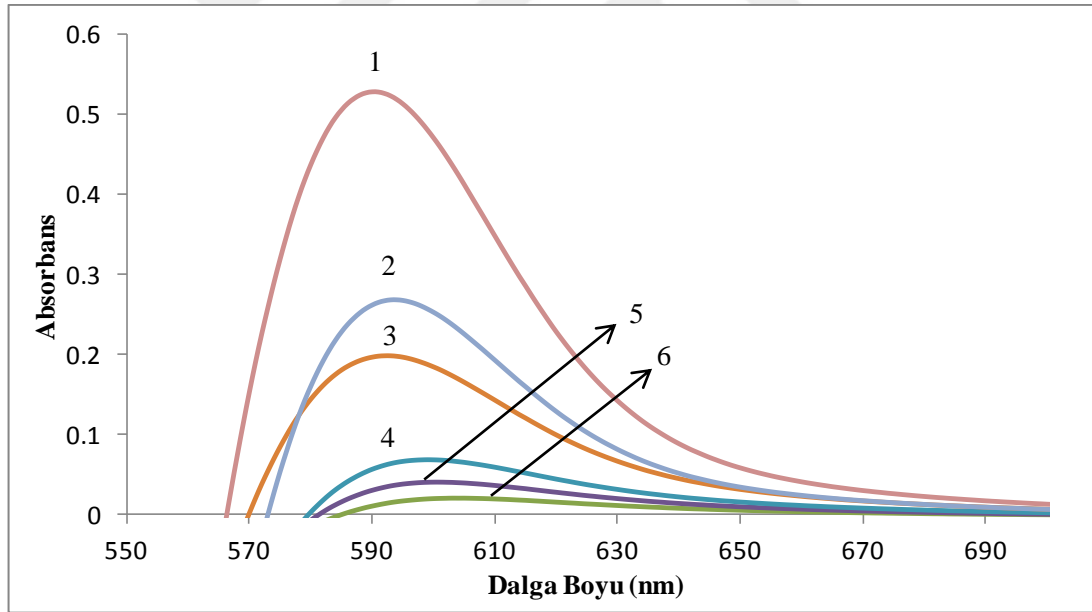
Şekil 4.5. Gül petalleri ile kopigmente antosiyanin çözeltisi termodinamik ölçüm spektrumları: (1) pH 2,2; (2) pH 2,8; (3) pH 3,2; (4) pH 3,6; (5) pH 4,2; (6) pH 4,8; (7) pH 5,4

Görünür bölgede, çok asidik ortamda ($\text{pH} < 2,2$) antosiyanin çözeltisinde baskın olan form flavilyum katyonu (AH^+) formudur. Bu nedenle, ölçülen absorbans doğrudan AH^+ katyonunun derişimini ifade etmektedir. Ortam pH'sının artışı ile birlikte ($\text{pH} 2,2-3,6$) kuinoidal form oluşmaya başlamaktadır. Görünür bölgede spektrumun sağ kolunda, pH artışı ile yükselen bir tepe oluşmaya başlamaktadır (Şekil 4.2., 4.3., 4.4. ve 4.5.). Oluşan bu yeni absorbans bandı kuinoidal bazlara özgüdür [Figueiredo vd., 1996].

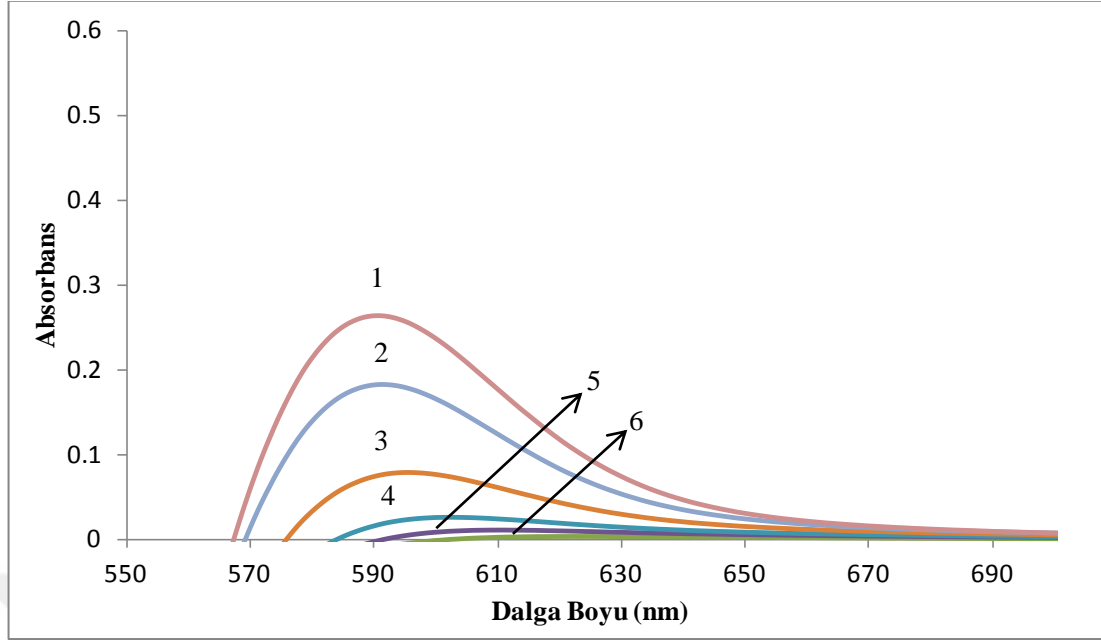
Yüksek pH'daki görünür bölge spektrum bandından, sadece flavilyum katyonunun baskın olduğu $\text{pH} < 2,2$ 'deki spektrum bandı çıkarıldığında geriye kalan spektrum kuinoidal bazına aittir. Şekil 4.6., 4.7., 4.8. ve 4.9'da pH'ya bağlı olarak kuinoidal form oluşumundaki artış gözlenmektedir.



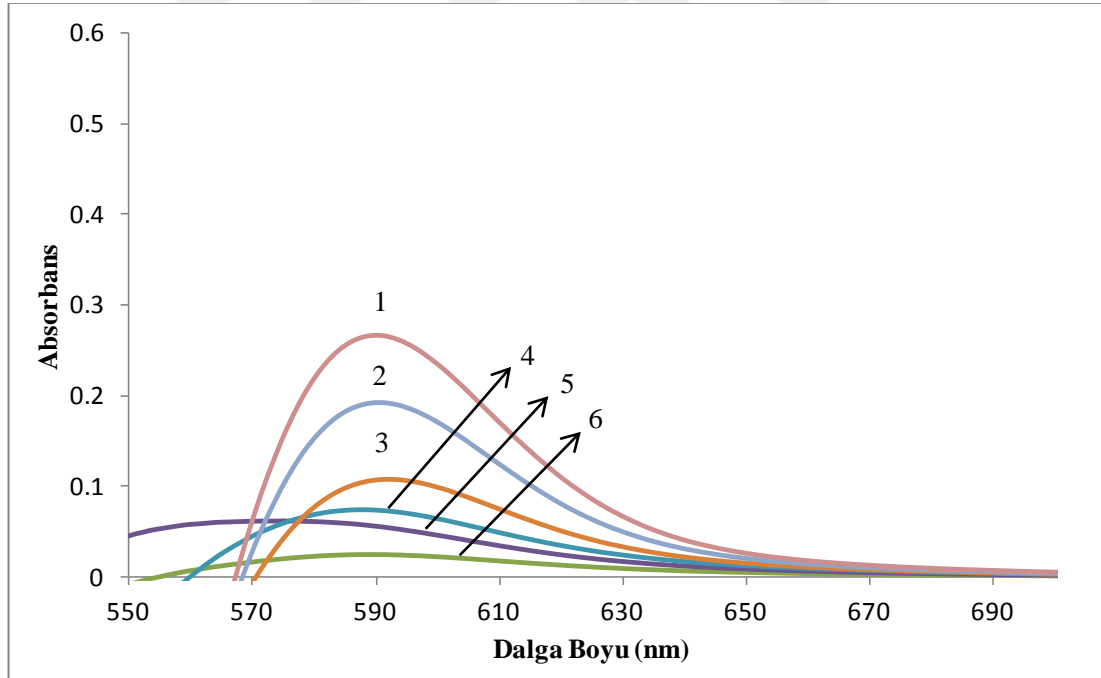
Şekil 4.6. pH 2,2 referans kara havuç antosiyanin spektrumu çıkarılarak elde edilmiş farklı pH değerlerindeki kuinoidal baz spektrumları: (1) pH 5,4; (2) pH 4,8; (3) pH 4,2; (4) pH 3,6; (5) pH 3,2; (6) pH 2,8



Şekil 4.7. pH 2,2 nar kabukları ile kopigmentasyon tepkimelerine bırakılmış kara havuç antosiyanin spektrumu çıkarılarak elde edilmiş farklı pH değerlerindeki kuinoidal baz spektrumları: (1) pH 5,4; (2) pH 4,8; (3) pH 4,2; (4) pH 3,6; (5) pH 3,2; (6) pH 2,8



Şekil 4.8. pH 2,2 mandalina kabukları ile kopigmentasyon tepkimelerine bırakılmış kara havuç antosiyanin spektrumu çıkarılarak elde edilmiş farklı pH değerlerindeki kuinoidal baz spektrumları: (1) pH 5,4; (2) pH 4,8; (3) pH 4,2; (4) pH 3,6; (5) pH 3,2; (6) pH 2,8



Şekil 4.9. pH 2,2 gül petalleri ile kopigmentasyon tepkimelerine bırakılmış kara havuç antosiyanin spektrumu çıkarılarak elde edilmiş farklı pH değerlerindeki kuinoidal baz spektrumları: (1) pH 5,4; (2) pH 4,8; (3) pH 4,2; (4) pH 3,6; (5) pH 3,2; (6) pH 2,8

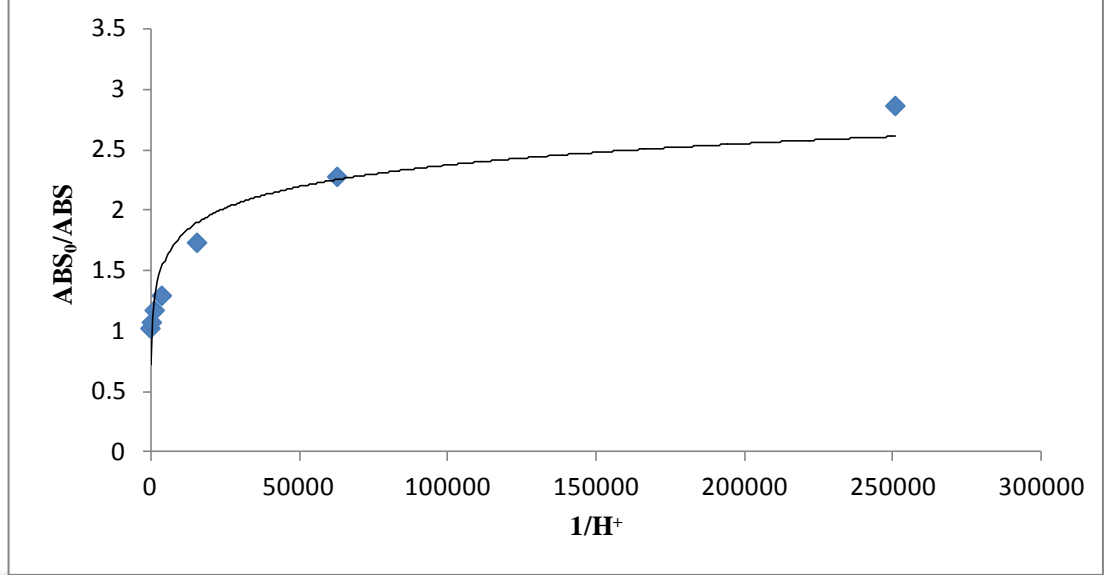
Şekil 4.6., 4.7., 4.8. ve 4.9. incelendiğinde mandalina kabukları ve gül petalleri ile gerçekleştirilen kopigmentasyon tepkimeleri sonucunda antosiyanin molekülünün kararlılığının artması ile birlikte flavilyum iyonunun baskın olduğu, dolayısıyla kuinoidal baz oluşumun daha az olduğu görülmektedir. Referans antosiyanin çözeltisi ile kopigment eklenen antosiyanin çözeltilerinin kuinoidal baz görünür bölge spektrumları karşılaştırıldığında, mandalina kabukları ve gül petalleri ile kopigmentasyon yapılmış antosiyanin çözeltisinde pH-bağımlı kararlılığın daha yüksek olduğu görülmüştür. Nar kabukları ile kopigmentasyon yapılmış antosiyanin çözeltisinde ise kuinoidal baz oluşumunun referans antosiyanin çözeltisi ile benzer bir davranış sergilediği görülmüştür. Literatürde [Figueiredo vd., 1996] genellikle, kuinoidal tabanının nötr pH değerlerine yakın olduğu kabul edilmektedir. Ancak, Şekil 4.6., 4.7., 4.8. ve 4.9.'daki spektrumlardan kuinoidal bazın asidik pH değerlerinde oluşmaya başladığı ve yüksek pH değerlerinde baskın form olduğu görülmektedir. Bu bulgular Figueiredo ve arkadaşlarının (1996) önerdikleri matematiksel yaklaşım ile uyumludur.

Denklem (5) ve (6) birbiriyle oranlandığında;

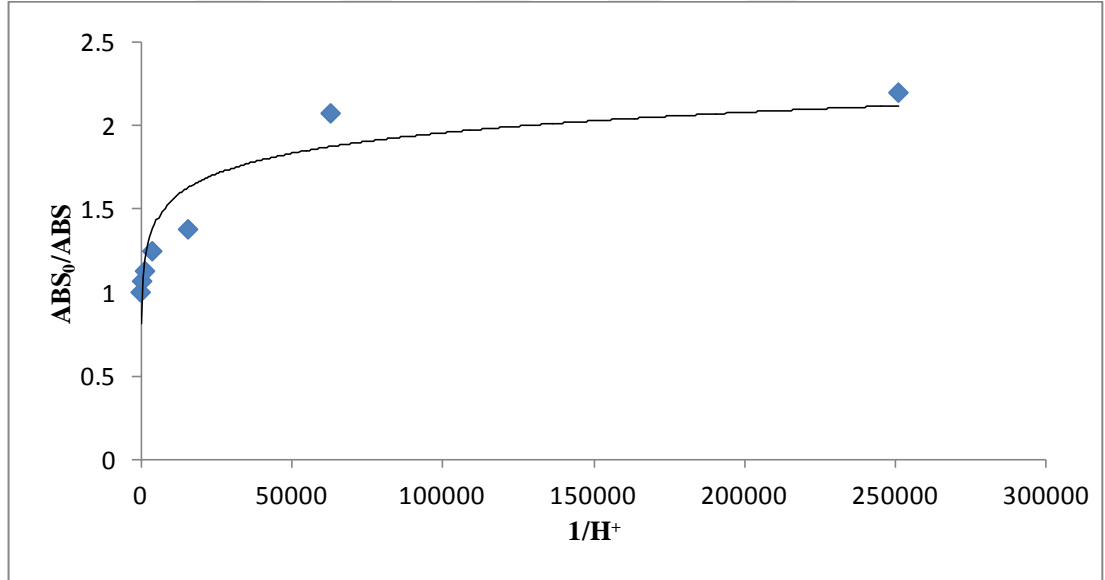
$$\frac{ABS_o}{ABS} = \frac{\frac{1}{K_1} + 1 + \frac{1}{[H^+]}(K_h^{CP} + K_a^{CP})}{\frac{1}{K_1} + \frac{\epsilon_{CP}}{\epsilon_{AH^+}} + \frac{1}{[H^+]} \frac{\epsilon_A}{\epsilon_{AH^+}} K_a^{CP}} \quad (7)$$

denklemini elde edilmektedir.

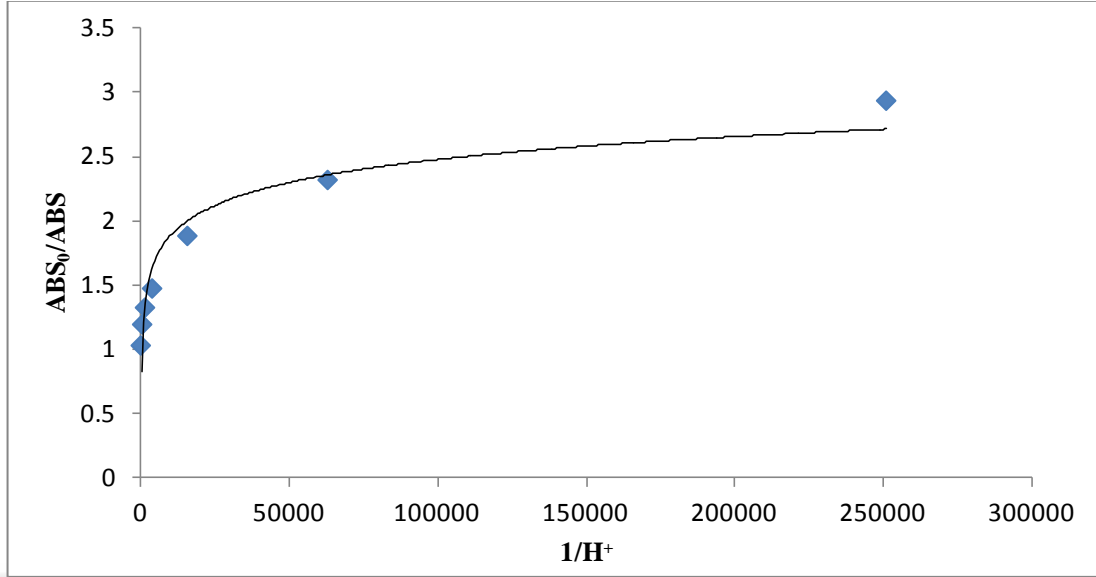
$\frac{ABS_o}{ABS}$ 'a karşılık $\frac{1}{[H^+]}$ çizildiğinde (Şekil 4.10., 4.11., 4.12. ve 4.13) deneysel verilerle modelin uyumlu olduğu gözlenmiştir.



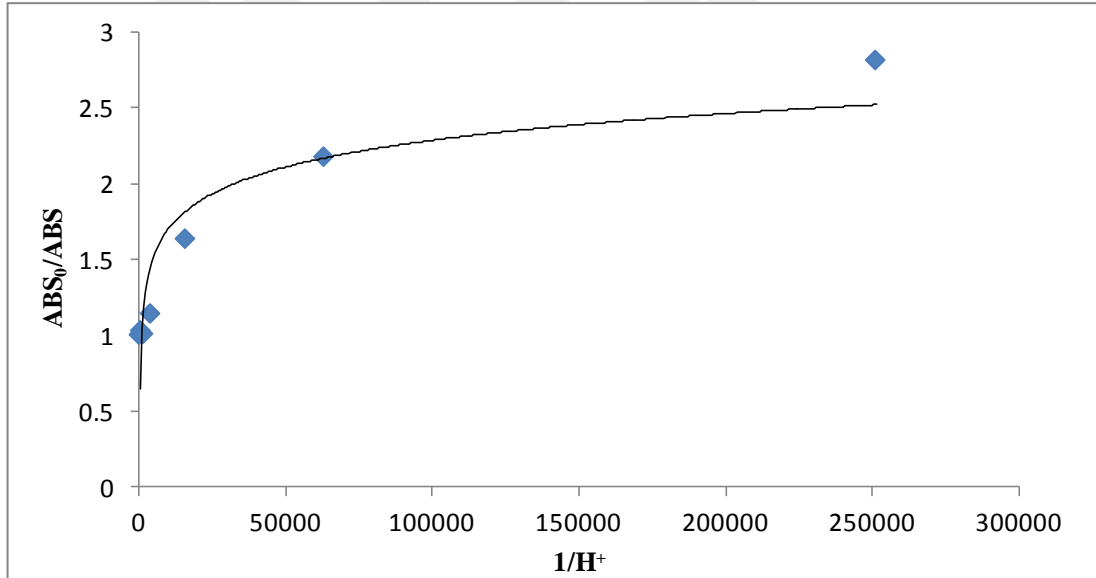
Şekil 4.10. Referans kara havuç antosiyaninin $\frac{ABS_0}{ABS}$ 'a karşılık $\frac{1}{[H^+]}$ denklem (7)'ye göre eğrisi



Şekil 4.11. Nar kabukları ile kopigmente edilmiş kara havuç antosiyanin çözeltisinin $\frac{ABS_0}{ABS}$ 'a karşılık $\frac{1}{[H^+]}$ denklem (7)'ye göre eğrisi



Şekil 4.12. Mandalina kabukları ile kopigmente edilmiş kara havuç antosiyanin çözeltisinin $\frac{ABS_0}{ABS}$ 'a karşılık $\frac{1}{[H^+]}$ denklem (7)'ye göre eğrisi



Şekil 4.13. Gül petalleri ile kopigmente edilmiş kara havuç antosiyanin çözeltisinin $\frac{ABS_0}{ABS}$ 'a karşılık $\frac{1}{[H^+]}$ denklem (7)'ye göre eğrisi

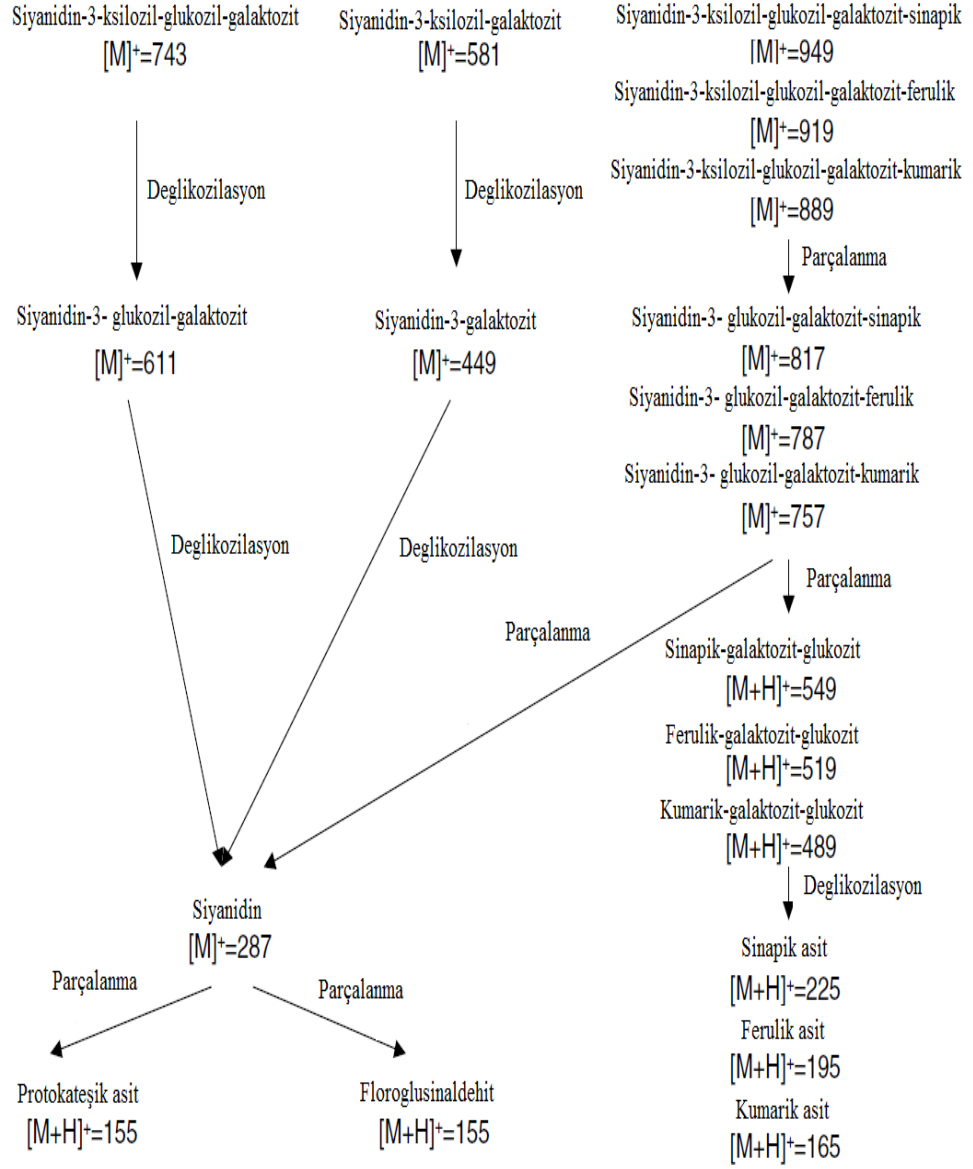
Sonuç olarak, görünür bölge maksimum dalga boyunda kayma meydana gelmesi kopigmentasyonun gerçekleştiğinin bir göstergesidir. HPLC analizleri sonucu referans antosiyanin çözeltilerinde görülen bileşikler dışında kopigmentasyon yapılmış antosiyanin çözeltilerinde yeni bir bileşik görülmemesi yapılan kopigmentasyonun kovalent bağlanma ile oluşan moleküller içi kopigmentasyon

olmadığını, zayıf etkileşimlerin etkili olduğu moleküller arası kopigmentasyon olduğunu, antosiyanin ve kopigment molekülünün zayıf hidrojen bağları veya van der Waals bağları ile bağlandığını ortaya koymaktadır. Elde edilen verilerin Turker ve arkadaşlarının (2009) yaptıkları çalışmadan elde edilen veriler ile uyumlu olduğu görülmüştür. Termodinamik ölçümler [Figueiredo vd., 1996], nar kabukları eklenmiş kara havuç antosiyanininin pH kararlılığında herhangi bir değişim olmadığını göstermiştir. Mandalina kabukları ve gül petalleri ile gerçekleştirilen kopigmentasyon tepkimeleri sonucunda alınan termodinamik ölçümler artan pH değerlerinde kuinoidal baz oluşumunun daha az olduğunu, dolayısıyla antosiyanin moleküllerinin daha kararlı hale geldiğini göstermiştir. Literatürde, kopigmentin, flavilyum katyonu ve kuinonoidal form ile etkileşime girerek, katyonun hidratlanmasını engellediği ve daha yüksek pH değerinde de daha fazla flavilyum katyonu bulunmasına neden olduğu öne sürülmektedir [Figueiredo vd., 1996; Figueiredo vd., 1999].

4.4. ISIL İŞLEMİN ANTOSİYANİN BOZUNUMU ÜZERİNE ETKİSİ

Referans ve kopigment eklenmiş kara havuç örneklerinin ısıl kararlılığı farklı pH değerlerinde 90°C sıcaklıkta hem spektrofotometrik yöntemlerle hem de HPLC kromatogramları izlenerek değerlendirilmiştir. Genel olarak, antosiyaninlerin birinci mertebe veya yalancı-birinci mertebe kinetik ile bozdukları kabul edilmektedir. Saflaştırılmış referans ve kopigmente edilmiş kara havuç örneklerinin hem monomerik antosiyanin miktarları hem de toplam pik alanları incelendiğinde, özellikle ısıl işlemin başlarında birinci mertebe kinetik davranışı göstermedikleri gözlenmiştir. Aynı davranış tüm pH değerlerinde görülmekle birlikte, pH değeri düşükçe belirginleştiği gözlenmiştir.

Kara havuç antosiyaninlerinin ısıl bozunumunu inceleyen bir çalışmada Şekil 4.14'te verilen mekanizma önerilmiştir [Sadilova vd., 2006].



Şekil 4.14. Siyanidin türevli açilli ve açısız kara havuç antosiyaninlerinin ısıl bozunum akım şeması [Sadilova vd., 2006]

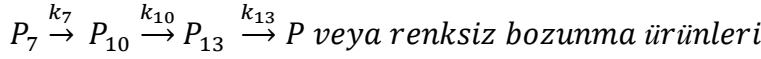
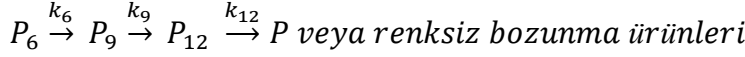
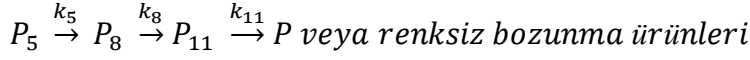
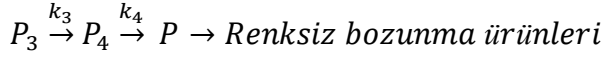
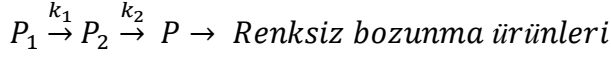
Çizelge 4.2. Kara havuçta bulunan antosiyaninlerin ve bozunum ürünlerinin HPLC alıkonma süreleri [Sadilova vd., 2006]

		R _t (Alıkonma Süresi)(dk)
P	Siyanidin	44,2
P1	Siyanidin-3-ksilozil-glikozil-galaktozit	24,9
P2	Siyanidin-3-glikozil-galaktozit	24,9
P3	Siyanidin-3-ksilozil-galaktozit	25,5
P4	Siyanidin-3-galaktozit	25,6
P5	Siyanidin-3-ksilozil-glikozil-galaktozit-sinapik	28,7
P6	Siyanidin-3-ksilozil-glikozil-galaktozit-ferulik	30,6
P7	Siyanidin-3-ksilozil-glikozil-galaktozit-kumarik	32,1
P8	Siyanidin-3-glikozil-galaktozit-sinapik	34,1
P9	Siyanidin-3-glikozil-galaktozit-ferulik	36,1
P10	Siyanidin-3-glikozil-galaktozit-kumarik	36,7
P11	Sinapik-galaktozit-glikozit	32,1
P12	Ferulik-galaktozit-glikozit	30,1
P13	Kumarik-galaktozit-glikozit	26,1

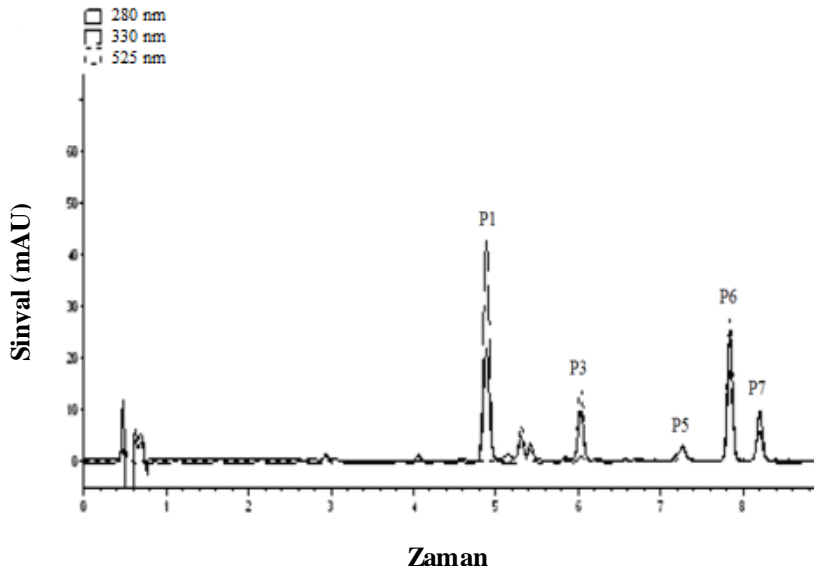
Çizelge 4.2’de kara havuç antosiyaninleri ile bu antosiyaninlerin bozunum ürünleri ve alıkonma süreleri verilmiştir. Bu mekanizmaya göre açılız olan antosiyaninlerden siyanidin-3-ksilozil-glikozil-galaktozit (P1) ksiloz şekerinin kopmasıyla yine bir antosiyanin olan siyanidin-3-glikozil-galaktozite (P2) dönüşmekte; siyanidin-3-ksilozil-galaktozit (P3) ise siyanidin-3-galaktozite (P4) dönüşmektedir. Her iki bozunum ürünü de ardından siyanidine parçalanmaktadır. P1 ve P2 ile P3 ve P4 antosiyaninlerinin HPLC kromatogramları incelendiğinde birbirlerine oldukça yakın alıkonma sürelerine sahip oldukları görülmektedir.

Kara havuçta bulunan açilli antosiyaninler sinapik (P5), ferulik (P6) ve kumarik (P7) asitle açillenmiş siyanidin-3-ksilozil-glikozil-galaktozit’lerdir. Açilli antosiyaninler ise önce ksilozil şekerini kaybetmekte ardından glukoz şekerini kaybederek yeni açilli antosiyanin bozunma ürünlerine dönüşmektedir. Ardından siyanidin ve aromatik asitlerine parçalanmaktadır.

Bu durumda, unimoleküler birinci mertebe kinetik yerine bozunum ürünlerinin de kırmızı renk veren antosiyaninlerin olduğu bir dizi seri birinci mertebe kinetik mekanizması önermek daha doğru olacaktır.

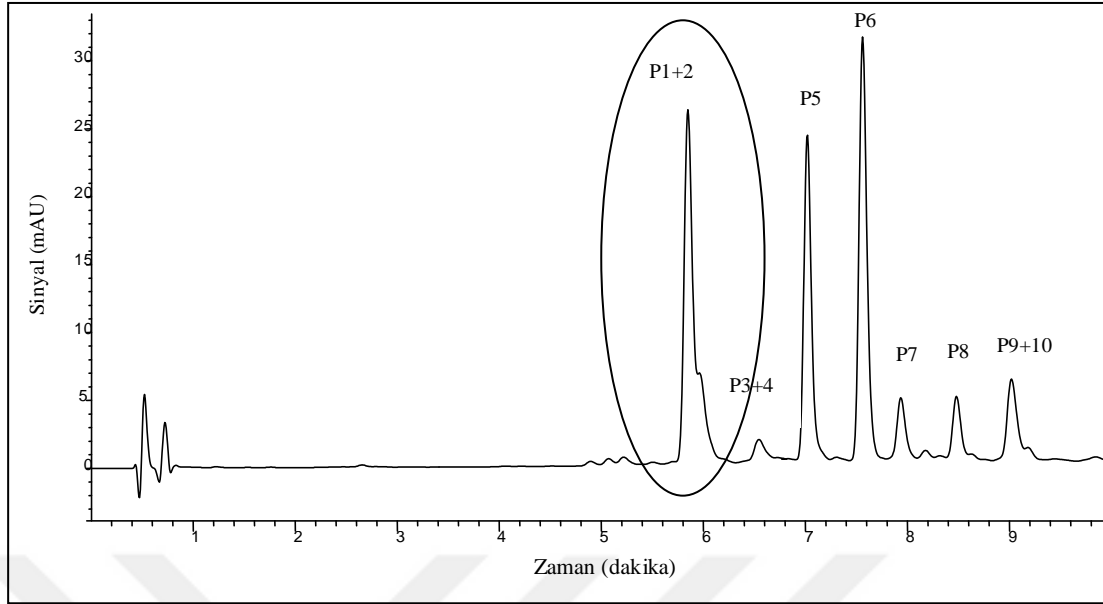


Bu yeni mekanizma önerisine göre elde edilen kromatogramlar yeniden değerlendirilmiştir. Isıl işlem öncesinde referans saf kara havuç antosiyanin özütüne ait HPLC kromatogramı Şekil 4.15'te verilmiştir. Isıl işlem öncesinde, kara havuçta bulunan P1, P3, P5, P6 ve P7 pikleri haricinde 525 nm dalga boyunda absorbanst gösteren antosiyanin bulunmamaktadır.



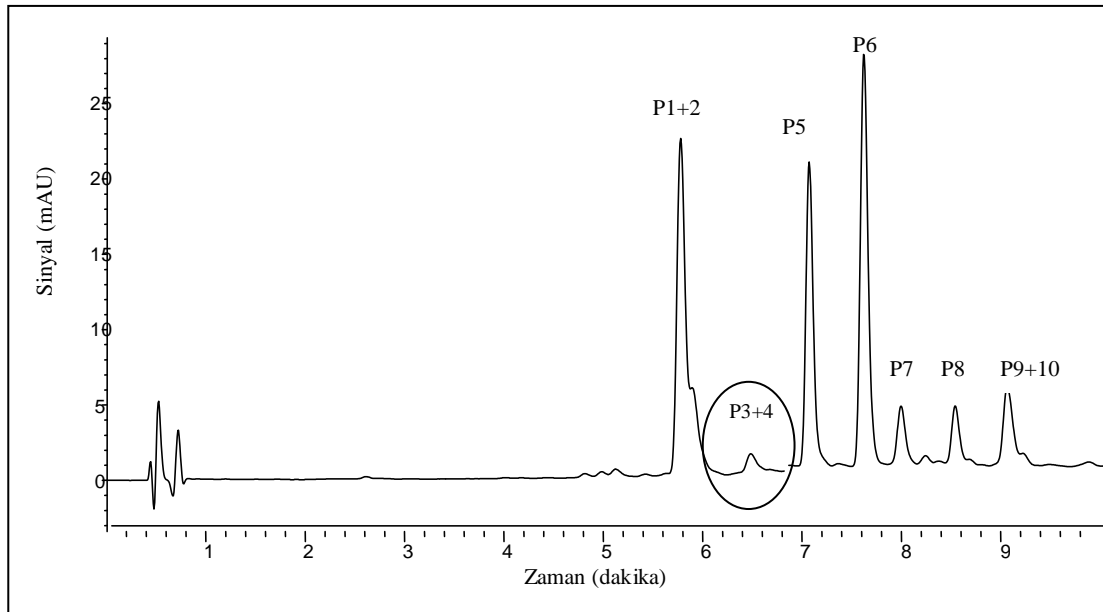
Şekil 4.15. Evaporasyon öncesi saflaştırılmış referans kara havuç antosiyaninlerine ait HPLC kromatogramı

(P1)'in bozunumu sonucu (P2) oluşmaktadır. Her iki pikin alıkonma süresi birbirine çok yakın olduğundan, tam ayrışma sağlanamamış ve P2, P1 üzerinde omuz şeklinde görülmüştür. Yeni oluşan pik ise P1+2 olarak adlandırılmıştır (Şekil 4.16).



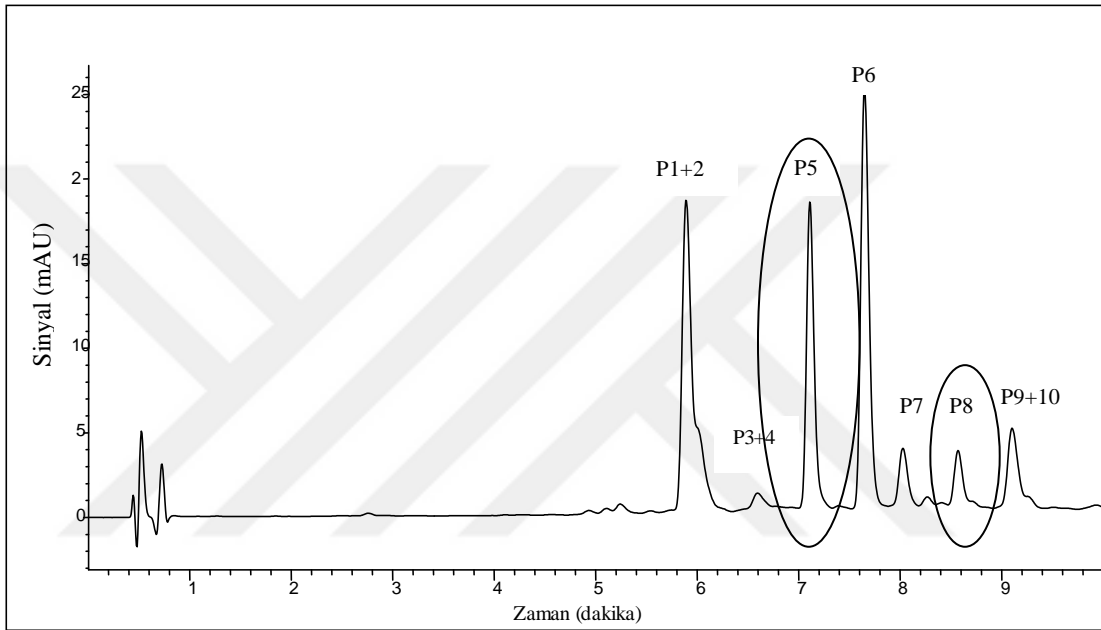
Şekil 4.16. Gül petalleri ile kopigmente edilmiş kara havuç antosiyaninleri ısıtılma deneyleri sonrasında ait HPLC kromatogramı (pH 2,8, 30. dk)

Kara havuçta bulunan açısız antosiyaninlerden olan (P3)'ün bozunumu sonucu (P4) oluşmaktadır. Bu iki pikin de alıkonma süreleri birbirine çok yakın olduğu için tam ayırışma sağlanamamış, az miktarda olan P3 piki ısıtılma işlem sonrasında P3+4 olarak adlandırılmıştır (Şekil 4.17).

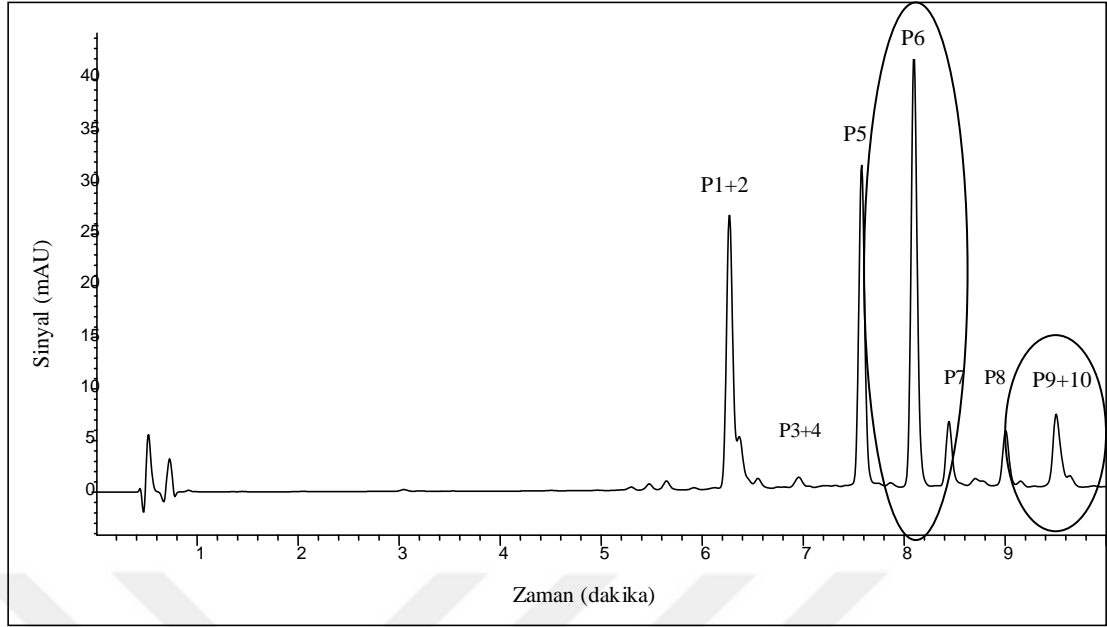


Şekil 4.17. Gül petalleri ile kopigmente edilmiş kara havuç antosiyaninleri ısıtılma deneyleri sonrasında ait HPLC kromatogramı (pH 4,2, 30. dk)

Sinapik (P5), ferulik (P6) ve kumarik (P7) asitlerle açılmış siyanidin-3-kilozil-glikozil-galaktozitlerin bozunumu sonucu sırasıyla siyanidin-3-glikozil-galaktozit-sinapik (P8), siyanidin-3-glikozil-galaktozit-ferulik (P9) ve siyanidin-3-glikozil-galaktozit-kumarik (P10) oluştuğu saptanmıştır. Ancak, P9 ve P10'un alıkonma süresi birbirine çok yakın olduğundan, tam ayrışma sağlanamamış ve P10, P9 üzerinde omuz şeklinde görülmüştür. Yeni oluşan pik P9+10 olarak adlandırılmıştır (Şekil 4.18 ve 4.19).

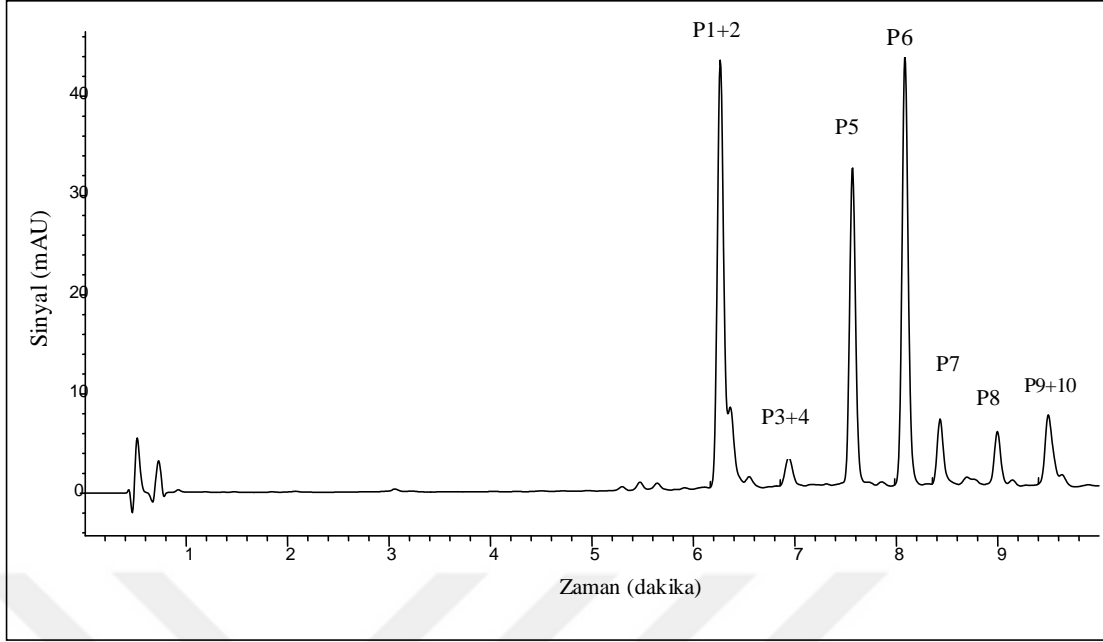


Şekil 4.18. Mandalina kabukları ile kopigmente edilmiş kara havuç antosiyaninleri ısıl deneyler sonrasında ait HPLC kromatogramı (pH 4,2; 60. dk)



Şekil 4.19. Referans kara havuç antosiyanin çözeltisi ısıl deneyler sonrasında ait HPLC kromatogramı (pH 2.8; 120. dk)

Kopigmentasyon çeşidinden ve pH değerlerinden bağımsız olarak tüm ısıl işlem gören tüm antosiyanin özütlerinde aynı davranış gözlenmiştir. Saflaştırılmış kara havuç antosiyanin örneklerinde bulunmayan P8-10 piklerinin evapore edilerek deriştirilmiş örneklerde de bulunması, aynı zamanda açilli antosiyaninlerin de toplam antosiyanin içerisinde oranlarının düşmesi vakum evaporasyon işleminin de pigment kararlılığını olumsuz etkilediğini göstermektedir.



Şekil 4.20. Isıl deneyler öncesi referans kara havuç antosiyaninlerine ait HPLC kromatogramı (pH 2,2, 0. dk)

Önerilen bu mekanizmaya göre önce toplam pik alanı/monomerik antosiyanin üzerinden birinci merteye bozunum kinetiği yaklaşımının yanlış olduğu gösterilmiş, ardından her pikin ısıl işlem davranışı ayrı ayrı birinci merteye tepkime kinetiğine göre incelenmiştir.

$$r_A = -\frac{dC_A}{dt} = kC_A$$

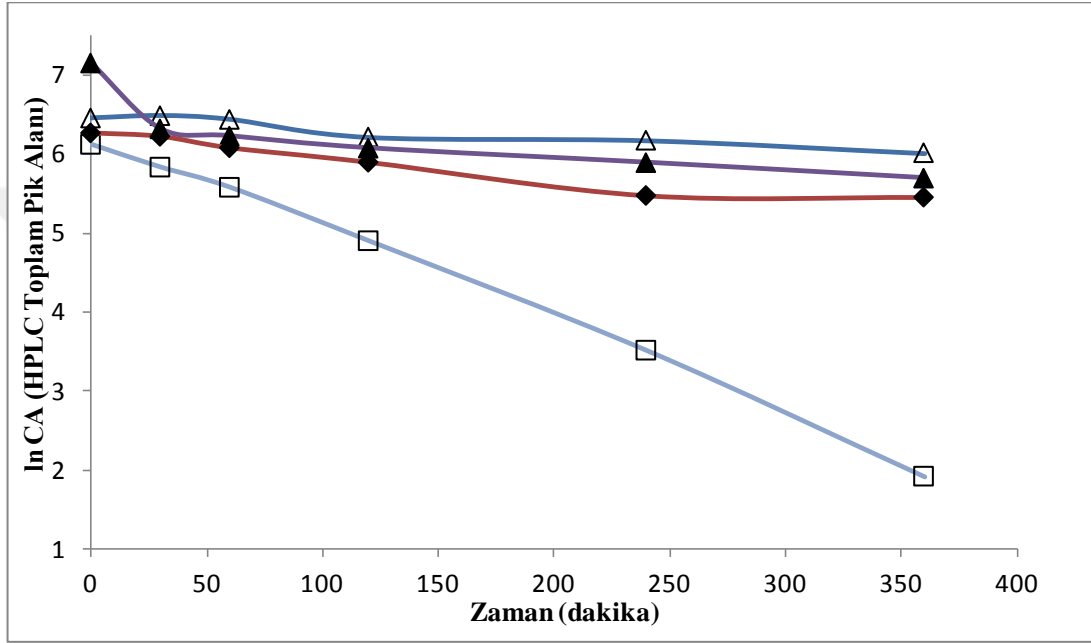
$$\ln \frac{C_{A_0}}{C_A} = kt$$

Bu eşitlikte C_{A_0} antosiyanin çözeltisinin başlangıç konsantrasyonunu (525 nm'deki absorbans değerini), C_A ise herhangi bir zaman dilimindeki konsantrasyonunu, k birinci merteye tepkime sabitini ve t ise ısıl işlem süresini (dakika) göstermektedir.

$\ln C_A$ veya $\ln \frac{C_{A_0}}{C_A}$ 'ya karşı t grafiği çizildiğinde orijinden geçen doğrusal eğrinin eğimi tepkime hız sabitini vermektedir.

4.4.1. Toplam Alan Üzerinden Antosiyanin Bozunumunun İncelenmesi

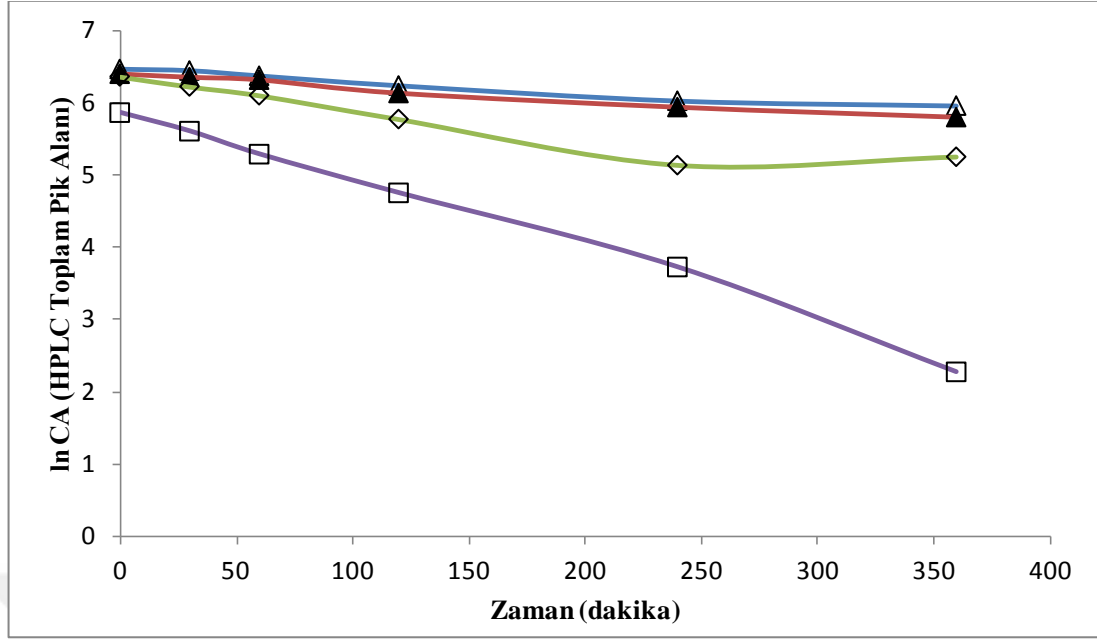
Şekil 4.21., 4.22., 4.23. ve 4.24.'te görüldüğü gibi kopigmentasyondan bağımsız olarak toplam alan üzerinden $\ln C_A$ -zaman grafiği doğrusal eğri vermemektedir. Bu nedenle literatürde yalancı birinci mertebe yaklaşımına rastlanmaktadır [Harbourne vd., 2008].



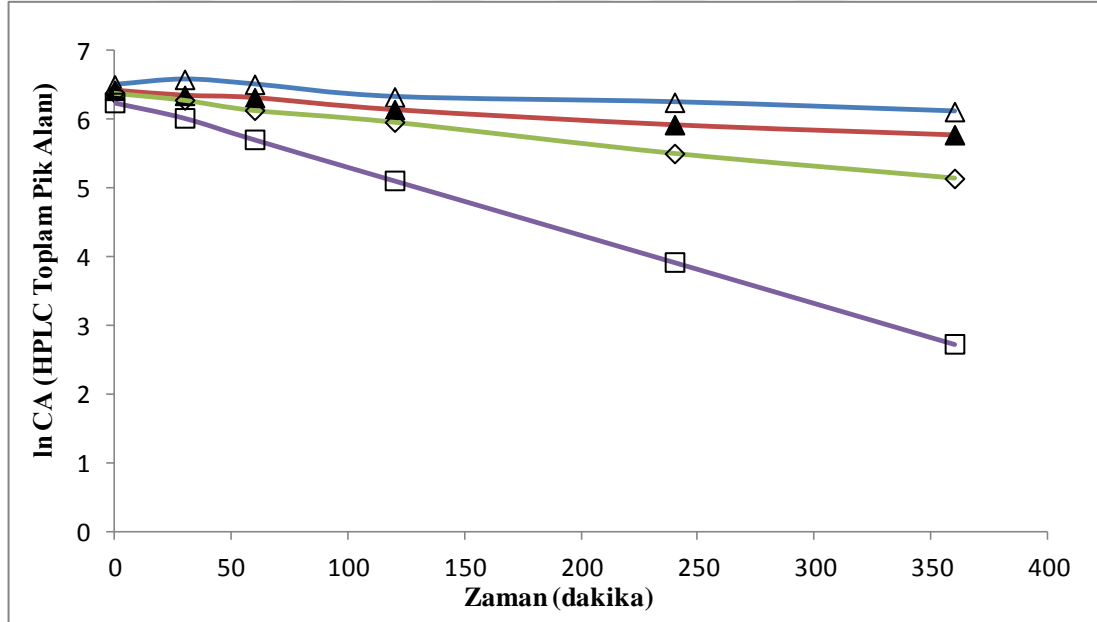
Şekil 4.21. Referans kara havuç antosiyaninin çözeltisi toplam alan-zaman grafiği:

Δ – pH 2,2; ▲ - pH 3,6; ◇ – pH 4,2; □ – pH 5,4*

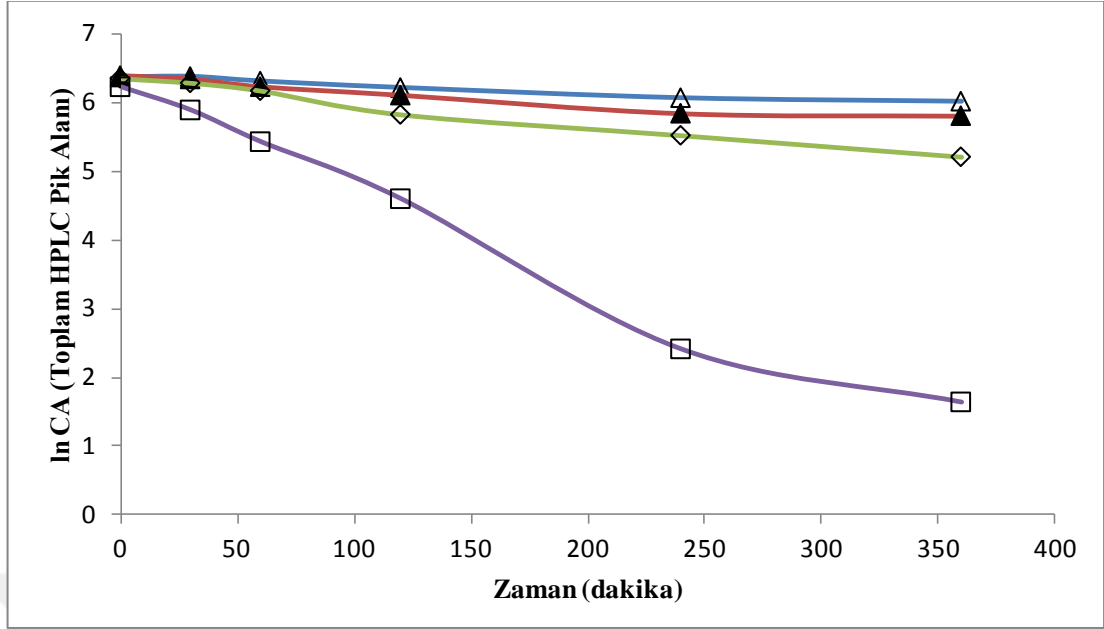
*Diğer pH değerlerine ait toplam alan verileri Ek 1 'de verilmiştir.



Şekil 4.22. Nar kabukları ile kopigmente edilmiş antosiyanin çözeltisi toplam alan-zaman grafiği: Δ – pH 2,2; ▲ - pH 3,6; ◇ – pH 4,2; □ – pH 5,4*
*Diğer pH değerlerine ait toplam alan verileri Ek 2’de verilmiştir.



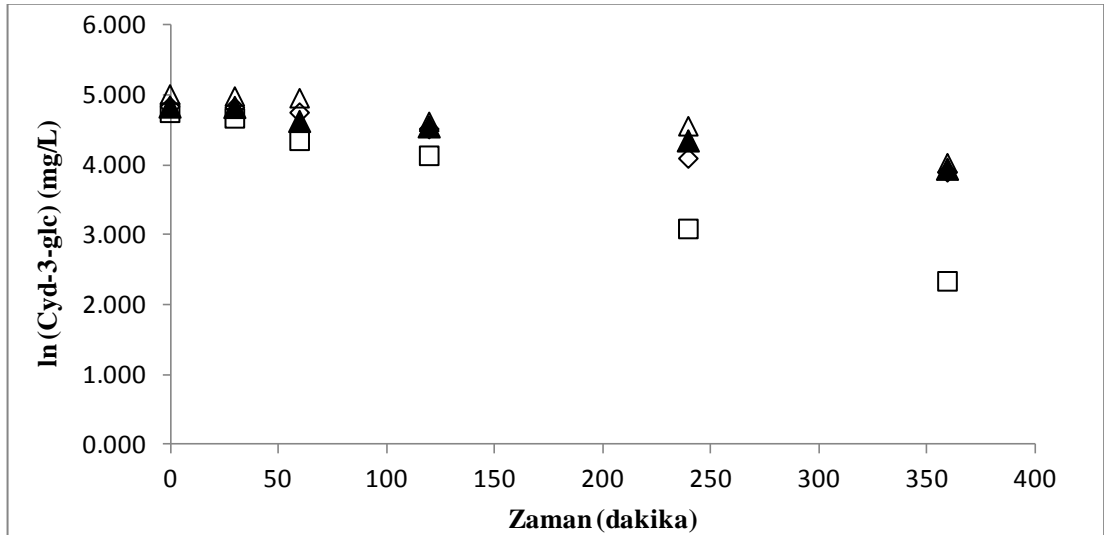
Şekil 4.23. Mandalina kabukları ile kopigmente edilmiş antosiyanin çözeltisi toplam alan-zaman grafiği: Δ – pH 2,2; ▲ - pH 3,6; ◇ – pH 4,2; □ – pH 5,4*
*Diğer pH değerlerine ait toplam alan verileri Ek 3’te verilmiştir.



Şekil 4.24. Gül petalleri ile kopigmente edilmiş antosiyanin çözeltisi toplam alan-zaman grafiği: Δ – pH 2,2; ▲ - pH 3,6; ◇ – pH 4,2; □ – pH 5,4*

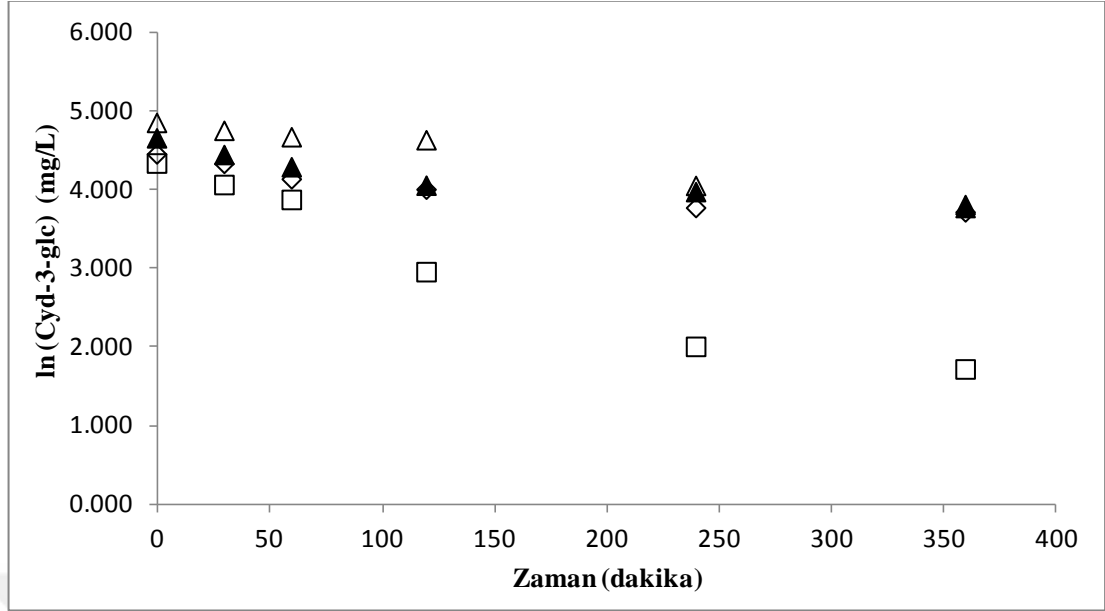
*Diğer pH değerlerine ait toplam alan verileri Ek 4’te verilmiştir.

Örneklerde bulunan toplam antosiyanin miktarını siyanidin-3-glikozit (cyd-3-glu) cinsinden veren spektral ölçümlerde HPLC kromatogramlarını doğrular niteliktedir.



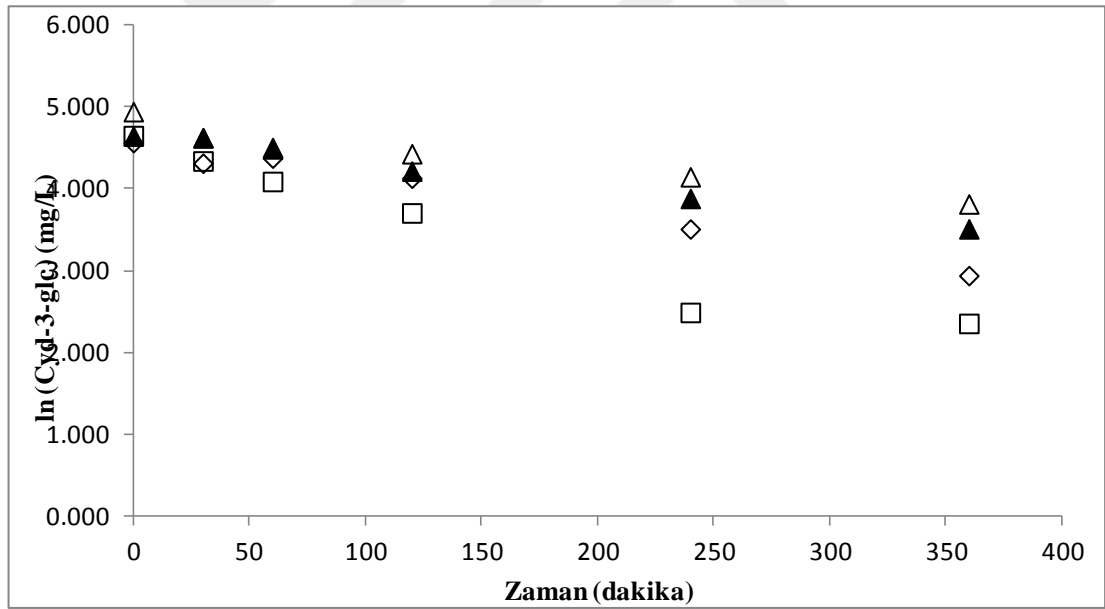
Şekil 4.25. Referans antosiyanin çözeltisi monomerik antosiyanin bozunumu: Δ – pH 2,2; ▲ - pH 3,6; ◇ – pH 4,2; □ – pH 5,4*

* Diğer pH değerlerine ait monomerik antosiyanin (mg/L) verileri Ek 5’te verilmiştir.



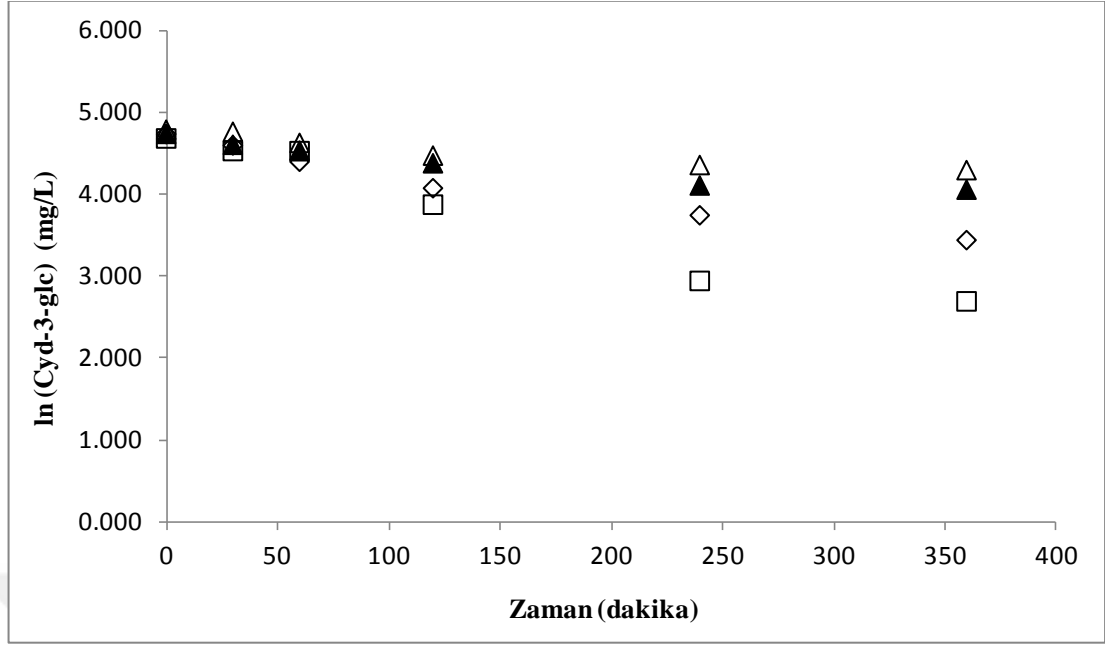
Şekil 4.26. Nar kabuğu ile kopigmente antosiyanin çözeltisi monomerik antosiyanin bozunumu: Δ – pH 2,2; ▲ - pH 3,6; ◇ – pH 4,2; □ – pH 5,4*

* Diğer pH değerlerine ait monomerik antosiyanin (mg/L) verileri Ek 6'da verilmiştir.



Şekil 4.27. Mandalina kabuğu ile kopigmente antosiyanin çözeltisi monomerik antosiyanin bozunumu: Δ – pH 2,2; ▲ - pH 3,6; ◇ – pH 4,2; □ – pH 5,4*

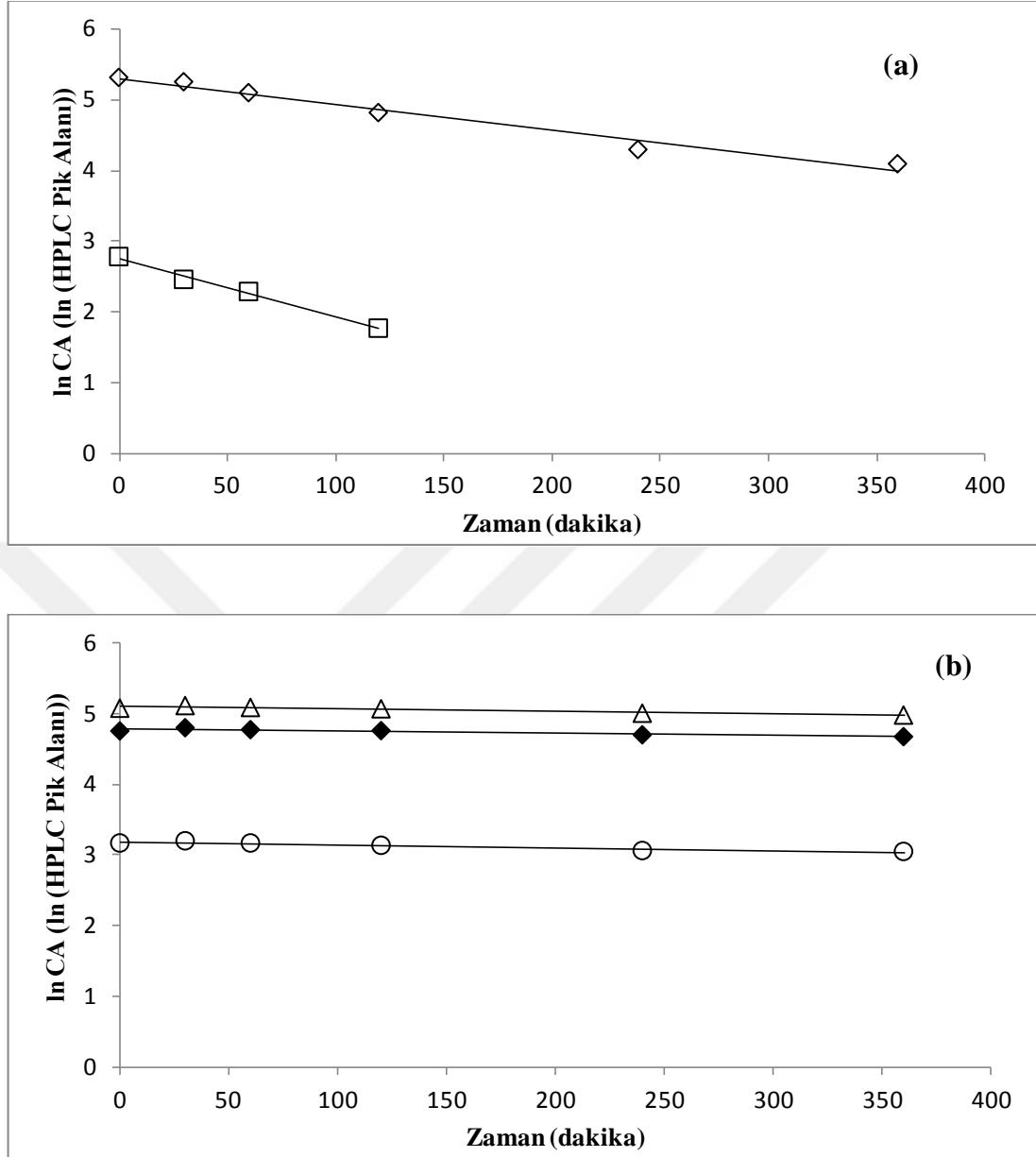
* Diğer pH değerlerine ait monomerik antosiyanin (mg/L) verileri Ek 7'de verilmiştir.



Şekil 4.28. Gül petalleri ile kopigmente antosiyanin çözeltisi monomerik antosiyanin bozunumu: Δ – pH 2,2; ▲ - pH 3,6; ◇ – pH 4,2; □ – pH 5,4*

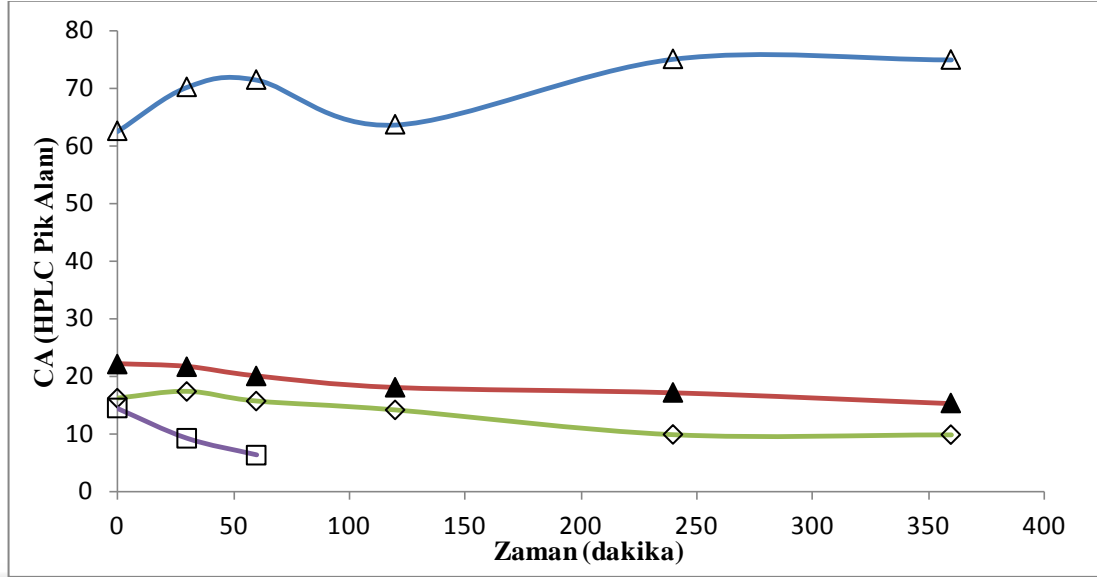
* Diğer pH değerlerine ait monomerik antosiyanin (mg/L) verileri Ek 8’de verilmiştir.

Her pik ayrı ayrı incelendiğinde ısı bozunmanın pH’den bağımsız olarak birinci mertebe reaksiyon kinetiği gösterdiği görülmektedir (Şekil 4.29 a ve b). Bu da birinci mertebe kinetik yaklaşımını desteklemektedir. Şekil 4.29 a ve b’de gül petalleri ile kopigmente edilmiş antosiyanin çözeltisinin P1-P7 bozunumları gösterilmektedir. Referans antosiyanin çözeltisi, nar kabukları ve mandalina kabukları ile kopigmente örneklerde de benzer davranış gözlemlenmiştir.

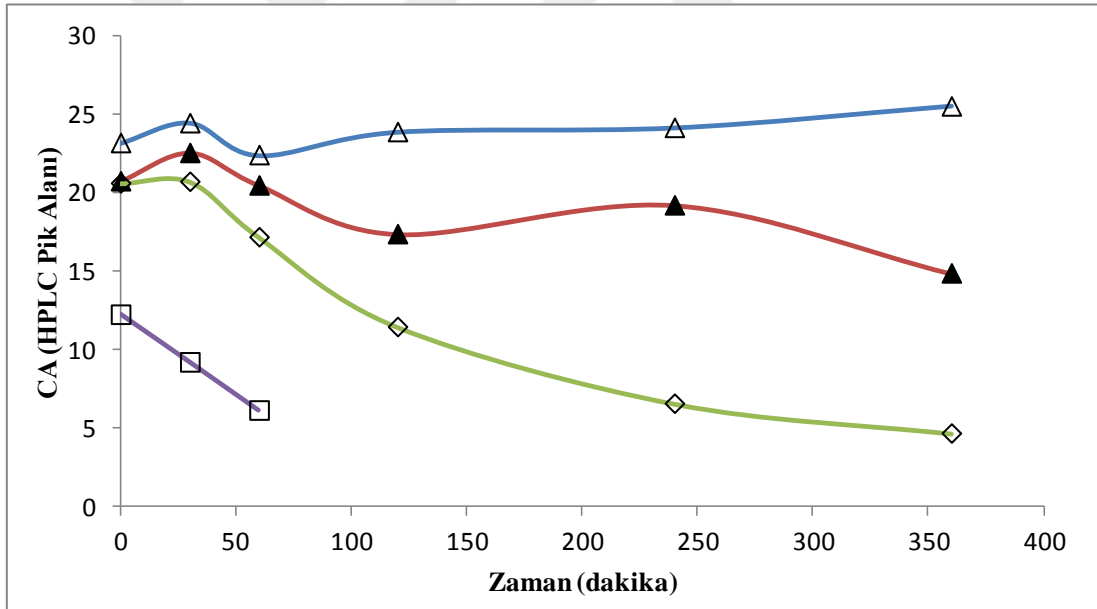


Şekil 4.29. Gül petalleri ile kopigmente edilmiş kara havuç antosiyaninlerinin ısı işlemler sonrası bozunum grafiği (pH 2,2): (a) ◇-P1+2; □-P3+4; (b) ◆-P5; △-P6; ○-P7

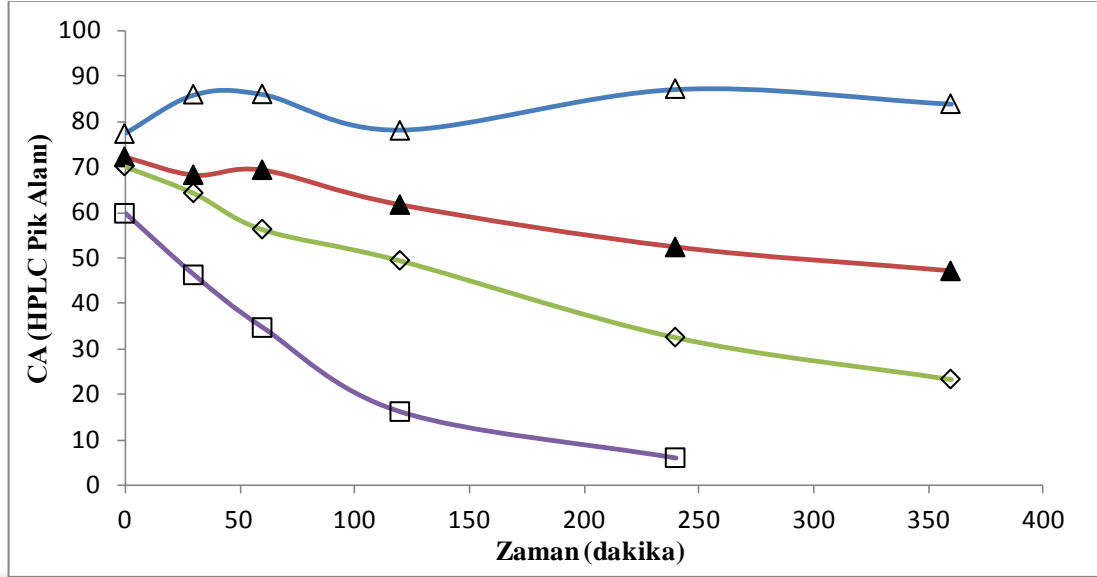
P8 ve P9+10 piklerinin ısı işlem süresince başlangıçta arttığı, ısı işlem süresinin sonlarına doğru azaldığı tespit edilmiştir (Şekil 4.30, 4.31, 4.32 ve 4.33). Bu davranış seri birinci mertebe kinetik tepkimeye özgüdür.



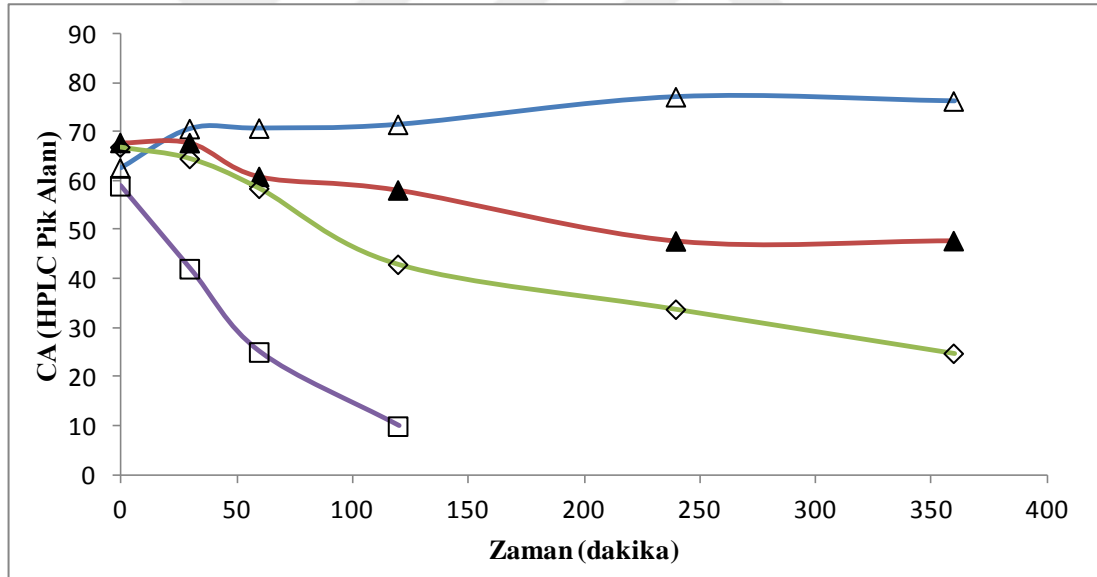
Şekil 4.30. Referans kara havuç antosiyanin çözeltisi P8+P9+10 konsantrasyon – zaman grafiği: Δ – pH 2,2; ▲ - pH 3,6; ◇ – pH 4,2; □ – pH 5,4



Şekil 4.31. Nar kabukları ile kopigmente edilmiş antosiyanin çözeltisi P8+P9+10 konsantrasyon – zaman grafiği: Δ – pH 2,2; ▲ - pH 3,6; ◇ – pH 4,2; □ – pH 5,4



Şekil 4.32. Mandalina kabukları ile kopigmente edilmiş antosiyanin çözeltisi P8+P9+10 konsantrasyon – zaman grafiği: Δ – pH 2,2; ▲ - pH 3,6; ◇ – pH 4,2; □ – pH 5,4

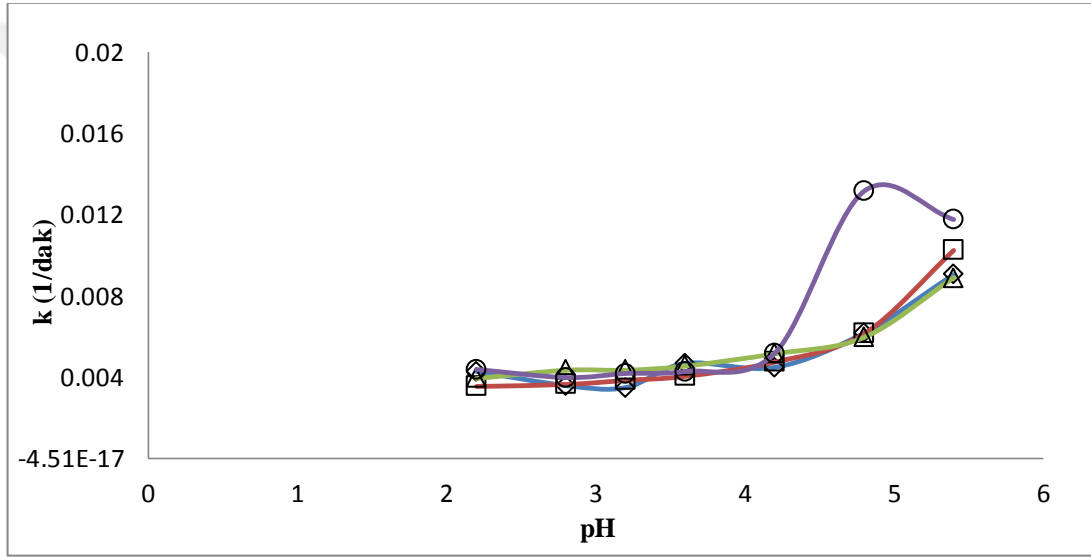


Şekil 4.33. Gül petalleri ile kopigmente edilmiş antosiyanin çözeltisi P8+P9+10 konsantrasyon – zaman grafiği: Δ – pH 2,2; ▲ - pH 3,6; ◇ – pH 4,2; □ – pH 5,4

Bu sonuçlar önerilen mekanizmanın hem kopigmente olmuş antosiyaninler için geçerli olduğunu, hem de pH değişimlerinden etkilenmediğini göstermiştir. Kopigmente olmuş kara havuç antosiyaninlerinin tepkime hız sabitleri her pH değeri için hesaplanarak referansa göre değişimler değerlendirilmiştir.

4.5. KARA HAVUÇ ANTOSİYANİNLERİ TEPKİME HIZ SABİTİ

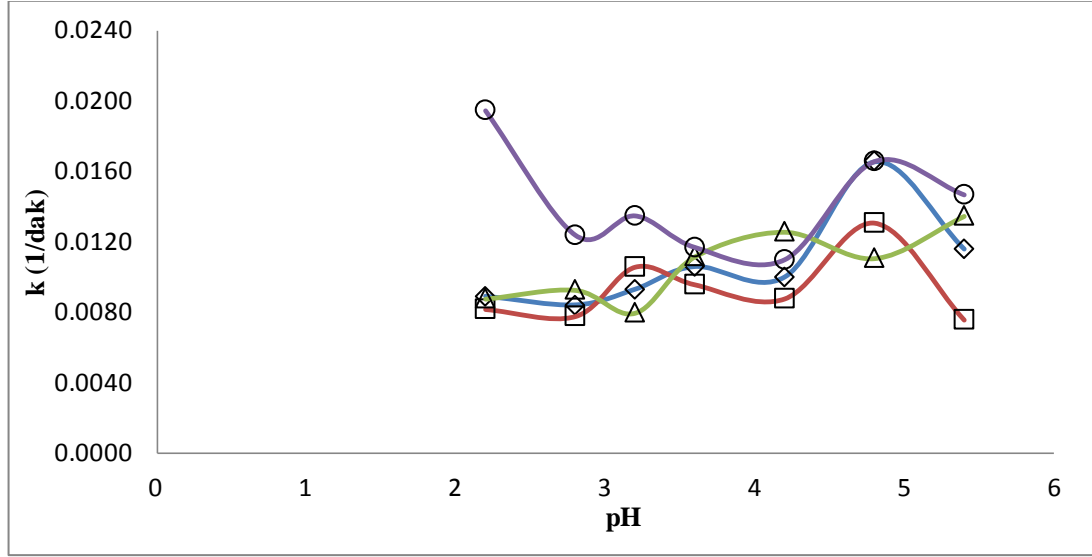
Düşük pH değerlerinde referans ve kopigment eklenmiş antosiyanin çözeltilerinde P1+2'nin tepkime hız sabitlerinin fazla değişim göstermediği görülmektedir. pH 5,4 değerinde gül petalleri ile kopigmente olan örneklerde tepkime hızı sabitinde bir miktar artış gözlenmiştir. Nar kabuğu ile kopigmente edilen örneklerde ise pH 4,8 değerinde bir artış gözlenmiş, pH 5,4 değerinde ise azalmakla birlikte diğer örneklerden daha yüksek değerde kaldığı gözlenmiştir (Şekil 4.34).



Şekil 4.34. P1+2'nin ◇ – Referans antosiyanin çözeltisi; O- Nar kabukları ile kopigmente edilmiş; Δ - Mandalina kabukları ile kopigmente edilmiş; □ – Gül petalleri ile kopigmente edilmiş antosiyanin çözeltilerinde k değerleri*

*P1+2 antosiyanini k (1/dk) değerleri Ek 9'da verilmiştir.

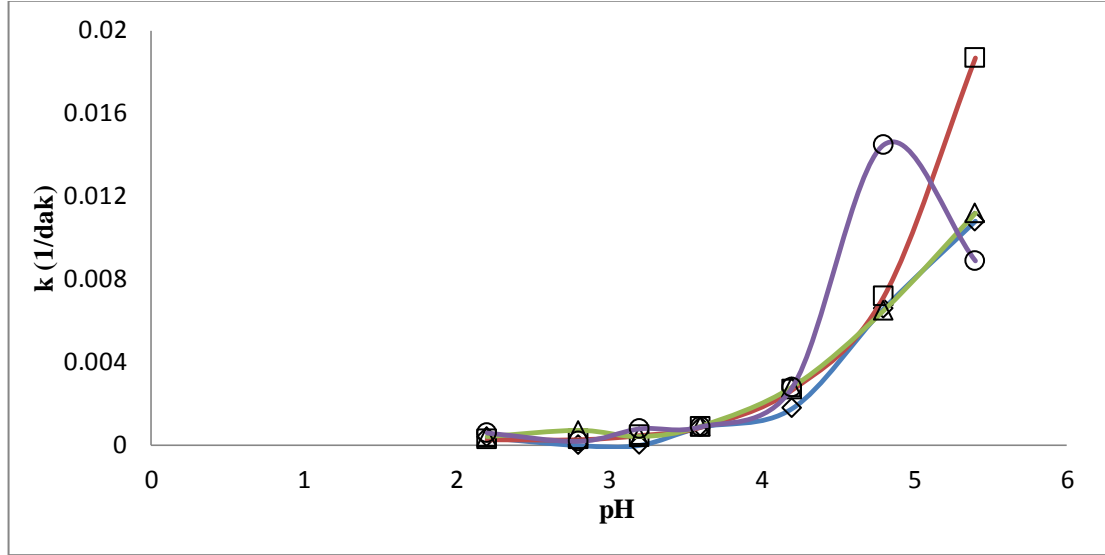
Referans ve kopigmente antosiyanin çözeltileri içerisinde P3+4'ün k değerleri incelendiğinde tüm pH değerlerinde kendi içerisinde dalgalanmalar olduğu görülmektedir. Isıl kararlılığı düşük olan bu açilsiz antosiyaninin kara havuç özütü içerisinde miktarının çok düşük olmasının (%2-3) ve ısıl işlemin hemen başlarında (60-90 dakika) tamamen bozunmasının sonuçların doğru değerlendirilmesini önlediği düşünülmektedir.



Şekil 4.35. P3+4'ün ◇ – Referans antosiyanin çözeltisi; O- Nar kabukları ile kopigmente edilmiş; Δ - Mandalina kabukları ile kopigmente edilmiş; □ – Gül petalleri ile kopigmente edilmiş antosiyanin çözeltilerinde k değerleri*

*P3+4 antosiyanini k (1/dk) değerleri Ek 10'da verilmiştir.

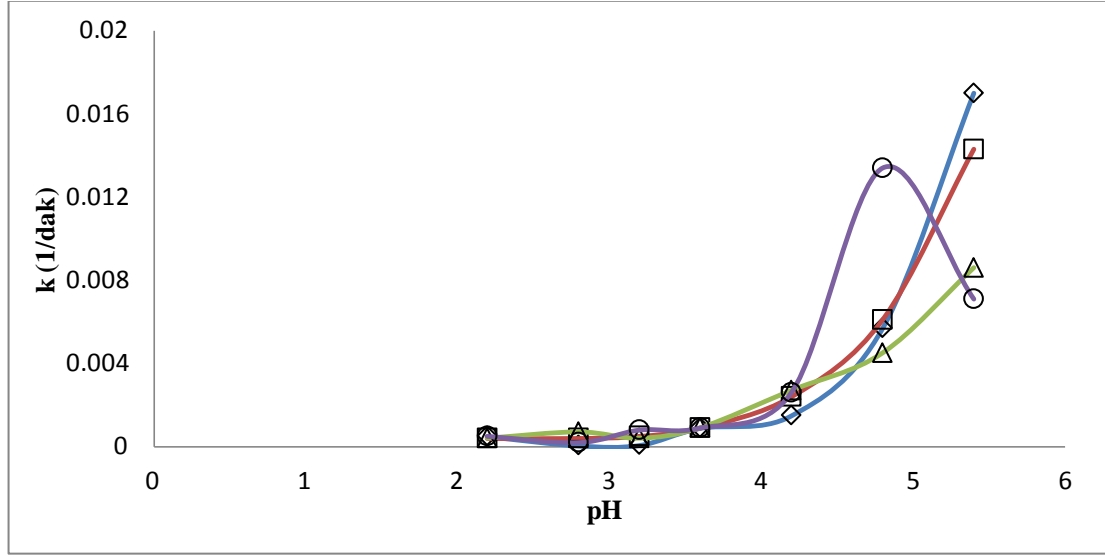
P5 antosiyaninlerine ait tepkime hız sabiti verileri incelendiğinde düşük pH değerlerinde pH 4,2 değerine kadar bir farklılık olmadığı görülmektedir. Nar kabuğu ile kopigmente edilmiş örneklerde yine pH 4,8 değerinde ani bir artış olduğu görülmektedir. Tüm pH değerlerinde referans ile mandalina kabuğuyla kopigmente edilmiş P5 tepkime hız sabitlerinin benzer davranış gösterdiği, gül petalleri ile kopigmente edilmiş P5 tepkime hızının ise pH 5,4 değerinde yükseldiği gözlenmiştir. Bu durum gül petalleri ile kopigmentasyonun P5 antosiyaninini, yüksek pH değerlerinde, olumsuz etkilediğini göstermektedir (Şekil 4.36).



Şekil 4.36. P5'in ◇ – Referans antosiyanin çözeltisi; O- Nar kabukları ile kopigmente edilmiş; Δ - Mandalina kabukları ile kopigmente edilmiş; □ – Gül petalleri ile kopigmente edilmiş antosiyanin çözeltilerinde k değerleri*

*P5 antosiyanini k (1/dk) değerleri Ek 11'de verilmiştir.

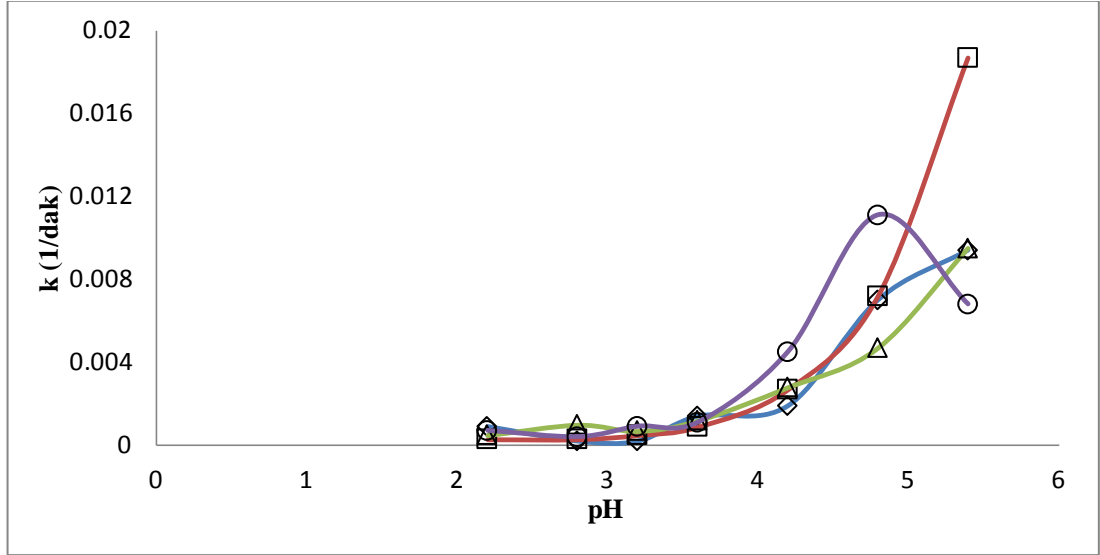
P6 antosiyaninin k değerleri tüm örnekler için pH 2,2-4,2 değerleri arasında farklılık göstermemektedir. Artan pH değerleri ile mandalina kabuğuyla kopigmente edilmiş P6'nın düşük k değerine sahip olduğu yani ısı kararlılığının belirgin derecede arttığı gözlenmiştir. Gül petalleri ile kopigmentasyonun da yüksek pH değerinde ısı kararlılık üzerinde az da olsa olumlu etki gösterdiği görülmektedir. Nar kabuğu ile kopigmente edilmiş örneklerde diğer antosiyaninler ile benzer davranış gözlenmiş, pH 4,8 değerinde tepkime hız sabitinde ani bir artış gözlenmiştir (Şekil 4.37).



Şekil 4.37. P6'nın ◇ – Referans antosiyanin çözeltisi; O- Nar kabukları ile kopigmente edilmiş; Δ - Mandalina kabukları ile kopigmente edilmiş; □ – Gül petalleri ile kopigmente edilmiş antosiyanin çözeltilerinde k değerleri*

*P6 antosiyanini k (1/dk) değerleri Ek 12'de verilmiştir.

P7 için de düşük pH değerlerinde kopigmentasyonun ısıl kararlılık üzerinde olumlu ve olumsuz belirgin bir etkisinin olmadığı, yüksek pH değerinde ise gül petalleri ile kopigmentasyonun belirgin olumsuz etkisinin olduğu gözlenmiştir. Nar kabuğu ile kopigmentasyon, diğer antosiyaninlerde de olduğu gibi, pH 4,8 değerinde k değerinde belirgin bir artış gözlenmiştir (Şekil 4.38).



Şekil 4.38. P7'nin ◇ – Referans antosiyanin çözeltisi; O- Nar kabukları ile kopigmente edilmiş; Δ - Mandalina kabukları ile kopigmente edilmiş; □ – Gül petalleri ile kopigmente edilmiş antosiyanin çözeltilerinde k değerleri*

*P7 antosiyanini k (1/dk) değerleri Ek 13'de verilmiştir.

Tepkime hız sabiti değerleri genel olarak düşük pH değerlerinde aynı kalmakta, pH değerlerinin artması ile birlikte kuinoidal baz oluşumu artmakta (yani denge flavilyum iyonundan kararsız kuinoidal baz formuna doğru kaymakta), bu da antosiyanin bozunumunu hızlandırmaktadır. Kopigmentasyon esnasında kopigmentler ile antosiyaninler arasında oluşan zayıf bağ etkileşimlerinin (hidrojen bağı, van der Waals etkileşimi gibi) pH değerlerinin artışı ile çözüldüğü düşünülmektedir. Dolayısıyla, pH>4 değerinden sonra açilli antosiyaninlerde kopigmentasyonun ısıl kararlılık üzerinde pozitif veya negatif etkisinin olduğu görülmektedir. P5 ve P7 üzerinde pH>5 değerlerinde gül petalleri ile kopigmentasyonun olumsuz etkisi olduğu, mandalina kabukları ile kopigmentasyonun P6 antosiyanini üzerinde belirgin pozitif etkisi olduğu belirlenmiştir. Kopigmentasyonun etkisinin tam olarak anlaşılabilmesi için kabuklarda ve petalde bulunan fenolik maddelerin ayrı ayrı incelenmesi gerekmektedir.

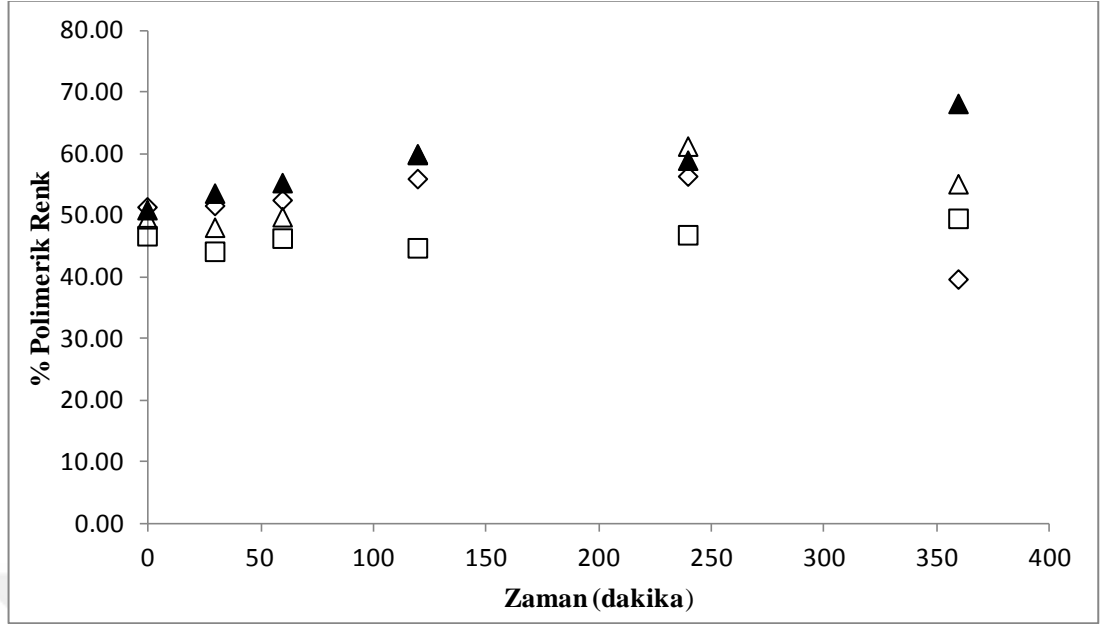
4.6. % POLİMERİK RENK ve KAHVERENGİLEŞME

Referans ve kopigmente antosiyanin örneklerinde pH'ya bağımlı polimerik renk verilerini karşılaştırabilmek için sonuçlar % polimerik renk üzerinden değerlendirilmiştir (Şekil 4.39, 4.40, 4.41 ve 4.42).

Polimerik renk yüzdesi polimerik rengin renk yoğunluğuna oranı olarak tanımlanmaktadır ve örneğin renginin % kaçının polimerize olmuş bileşiklerden kaynaklandığının bir ölçütüdür. Örnekteki monomerik antosiyaninler bisülfite etkisi ile renksiz kompleksler oluştururken, polimerik antosiyanin-tanen komplekslerinin, bisülfite karşı direnç göstererek renklerini korudukları bilinmektedir [Giusti ve Wrolstad, 2001]. Polimerik renk ve polimerik renk oranı değerlerinin artışı, polimerik bileşiklerden kaynaklanan renk yoğunluğunun fazla olduğunu göstermektedir.

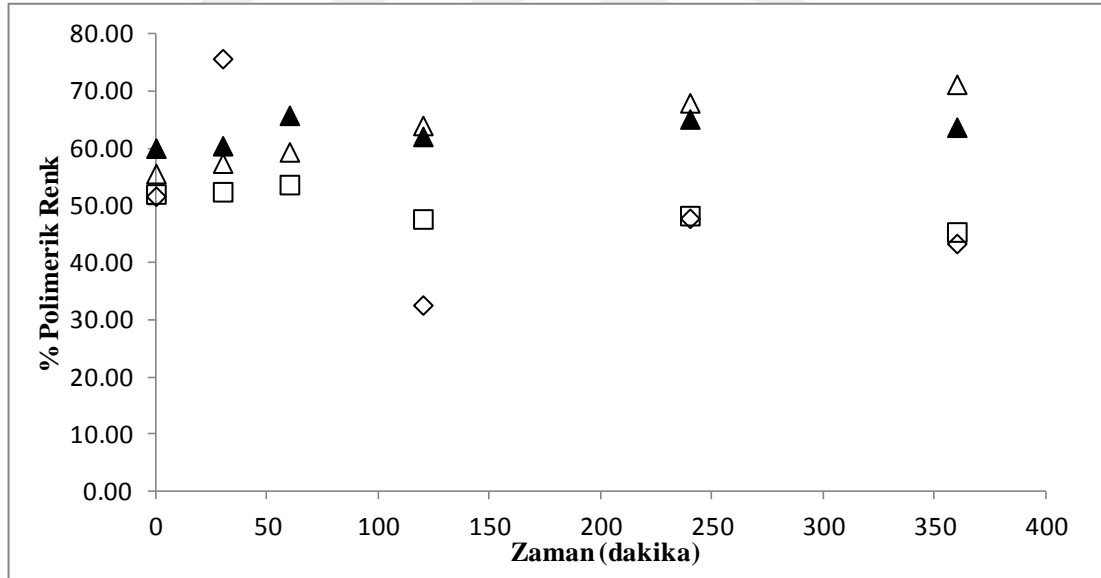
Referans antosiyanin çözeltisi ve nar kabukları ile kopigmente edilmiş antosiyanin çözeltisinde pH etkisi net olarak görülmektedir. Her iki örnekte de benzer davranış görülmüş olup, pH artışı ile ısı işlem süresince % polimerik rengin azaldığı, pH değerlerinin azalması ile % polimerik rengin %50'den %60-70 aralığına doğru kaydığı gözlemlenmiştir (Şekil 4.39, 4.40).

Nar kabukları ile kopigmente edilmiş antosiyanin çözeltisine ait kinetik veriler incelendiğinde elde edilen sonuçlar, pH 3,2 değerinde 360. dakikada kaydedilen sonuçlar nar kabukları ile kopigmentasyona bırakılmış antosiyanin çözeltisinde, referans antosiyanin çözeltisine göre %30 daha fazla polimerik renk oluştuğunu işaret etmektedir. Nar kabukları ile kopigmente antosiyanin çözeltisinde yüksek pH değerlerinde düşük pH değerlerine oranla polimerizasyondaki azalışın daha belirgin olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 4.39. Referans antosiyanin çözeltisi % polimerik renk (Δ – pH 2,2 ▲ - pH 3,6 ◇ – pH 4,2 □ – pH 5,4*)

*Diğer pH değerlerine ait % polimerik renk verileri Ek 14’te verilmiştir.



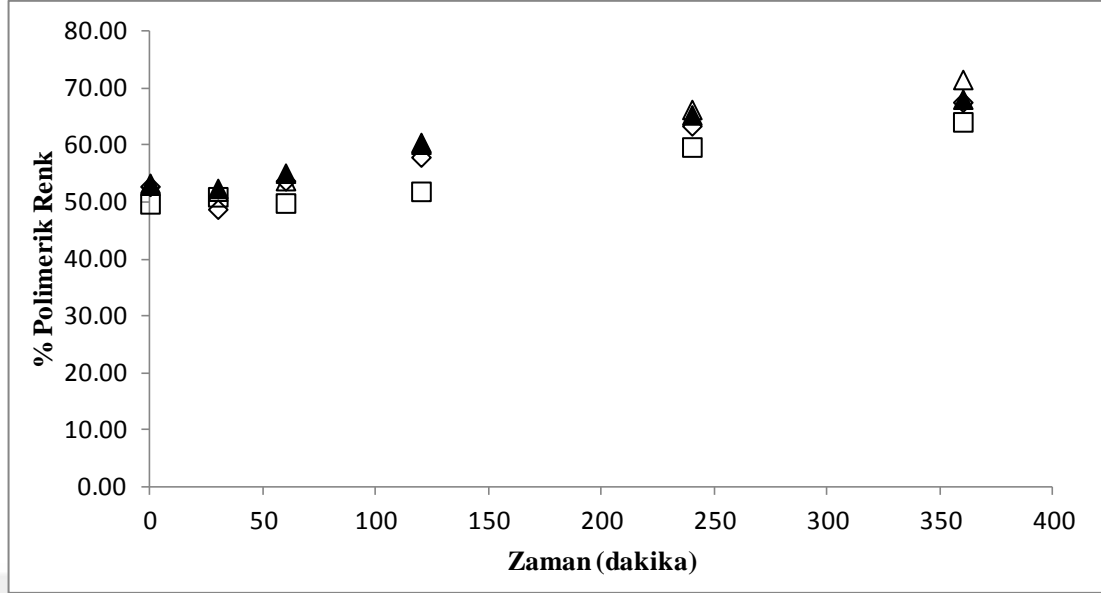
Şekil 4.40. Nar kabukları ile kopigmente antosiyanin çözeltisi % polimerik renk (Δ – pH 2,2 ▲ - pH 3,6 ◇ – pH 4,2 □ – pH 5,4*)

*Diğer pH değerlerine ait % polimerik renk verileri Ek 15’te verilmiştir.

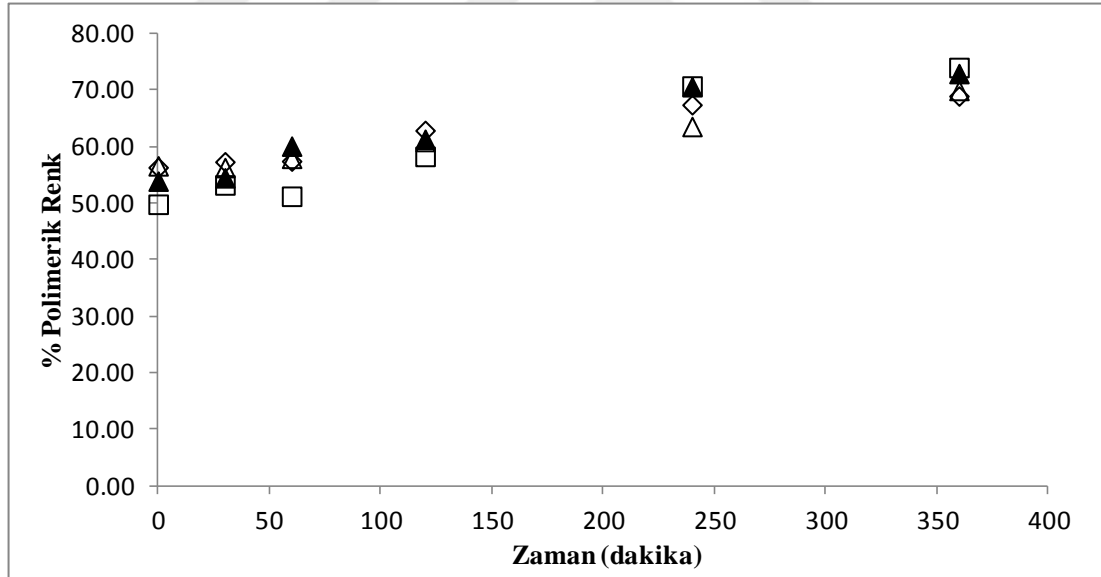
Mandalina kabukları ve gül petalleri ile kopigmente edilmiş antosiyanin çözeltilerinde % polimerik renk üzerinde pH'nın belirgin bir etkisi görülmemiştir. Mandalina kabukları ile kopigmentasyon tepkimeleri gerçekleştirilmiş antosiyanin çözeltilerine ait polimerik renk analizleri sonucunda, düşük pH değerlerinde polimerik renk oranında meydana gelen artışın referans antosiyanin çözeltilerinden yaklaşık %7 daha fazla olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.41). Isıl işlem süresi arttıkça mandalina kabukları ile kopigmente antosiyanin çözeltisinde referans antosiyanin çözeltisine kıyasla polimerik renk oranının pH 2,8'de %23, pH 3,2'de %29 daha fazla olduğu belirlenmiştir. pH 4,8'de %50-59 aralığında değişim gösteren polimerik renk oranının pH 5,4'te %49-64 aralığında değerlere sahip olduğu görülmektedir.

Şekil 4.42.'de görüldüğü gibi, ısıl işlem, gül petalleri ile kopigmente edilmiş antosiyanin çözeltisinde % polimerik renk değerinde bir miktar artışa neden olmuştur. pH 2,2'de sıfırıncı dakikada polimerik renk oranı %56 iken, 360. dakikada %70'e ulaşmıştır.

Bu sonuçlar, termodinamik ölçümler ile belirlenen mandalina kabukları ve gül petalleri ile kopigmente örneklerin pH kararlılıklarının referans ve nar kabukları ile kopigmente antosiyanin örneklerine kıyasla daha yüksek olduğunu desteklemektedir (Şekil 4.41 ve 4.42).

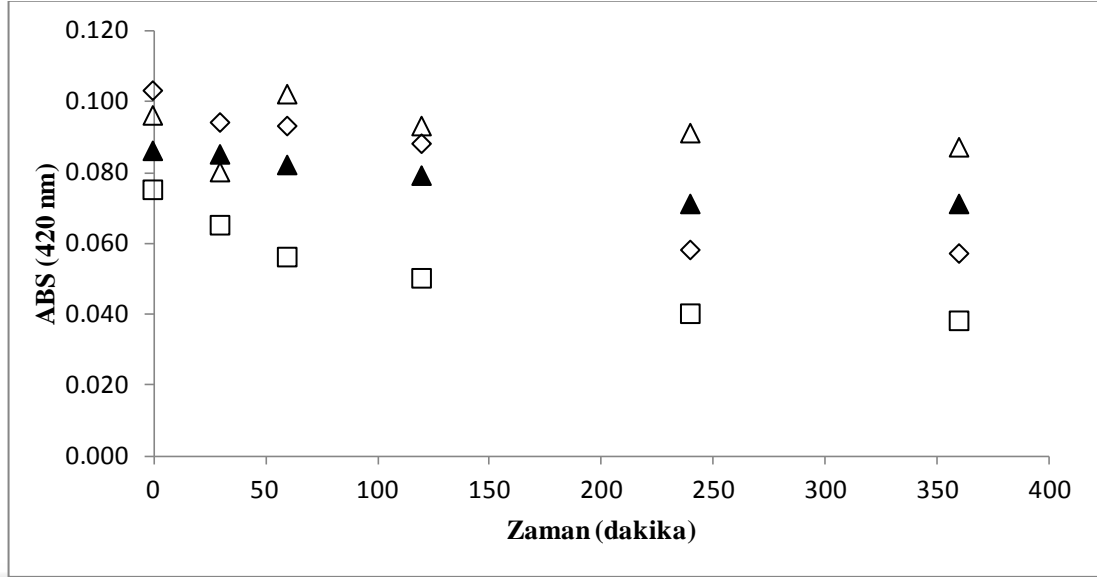


Şekil 4.41. Mandalina kabukları ile kopigmente antosiyanin çözeltisi % polimerik renk (Δ - pH 2,2 \blacktriangle - pH 3,6 \diamond - pH 4,2 \square - pH 5,4*)
*Diğer pH değerlerine ait % polimerik renk verileri Ek 16'da verilmiştir.



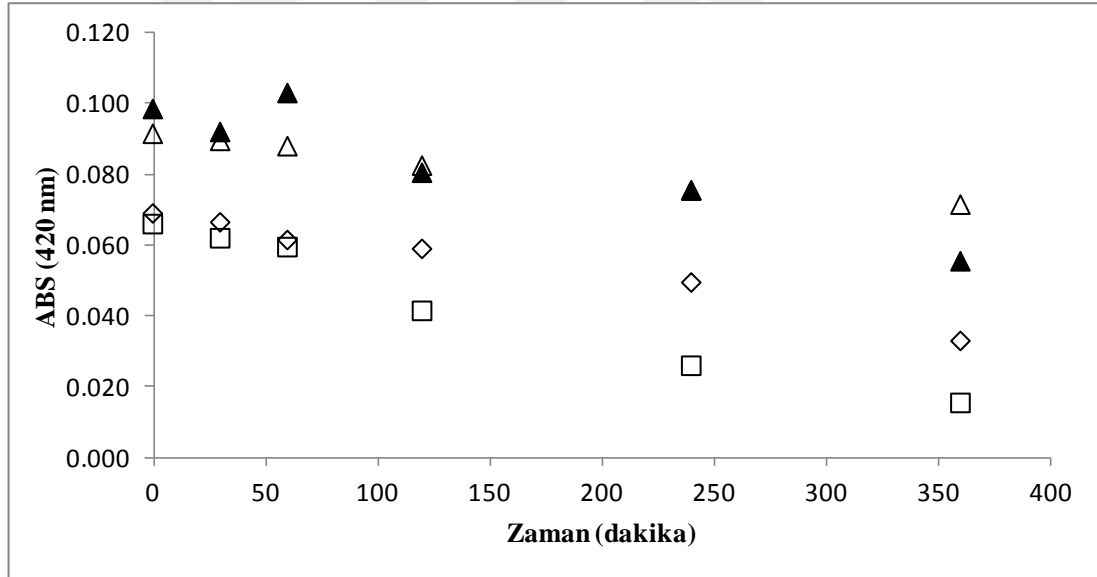
Şekil 4.42. Gül petalleri ile kopigmente antosiyanin çözeltisi % polimerik renk (Δ - pH 2,2 \blacktriangle - pH 3,6 \diamond - pH 4,2 \square - pH 5,4*)
*Diğer pH değerlerine ait % polimerik renk verileri Ek 17'de verilmiştir.

Referans ve nar kabukları ile kopigmente edilmiş örneklerde ısı işlem süresinin ve pH'nın artması ile birlikte kahverengileşmenin azaldığı, düşük pH değerlerinde ısı işlem süresince nispeten sabit kaldığı gözlemlenmiştir (Şekil 4.43 ve 4.44).



Şekil 4.43. Referans antosiyanin çözeltisi kahverengileşme değerleri (Δ – pH 2,2 ▲ - pH 3,6 ◇ – pH 4,2 □ – pH 5,4*)

*Diğer pH değerlerine ait kahverengileşme indisi verileri Ek 18'de verilmiştir.

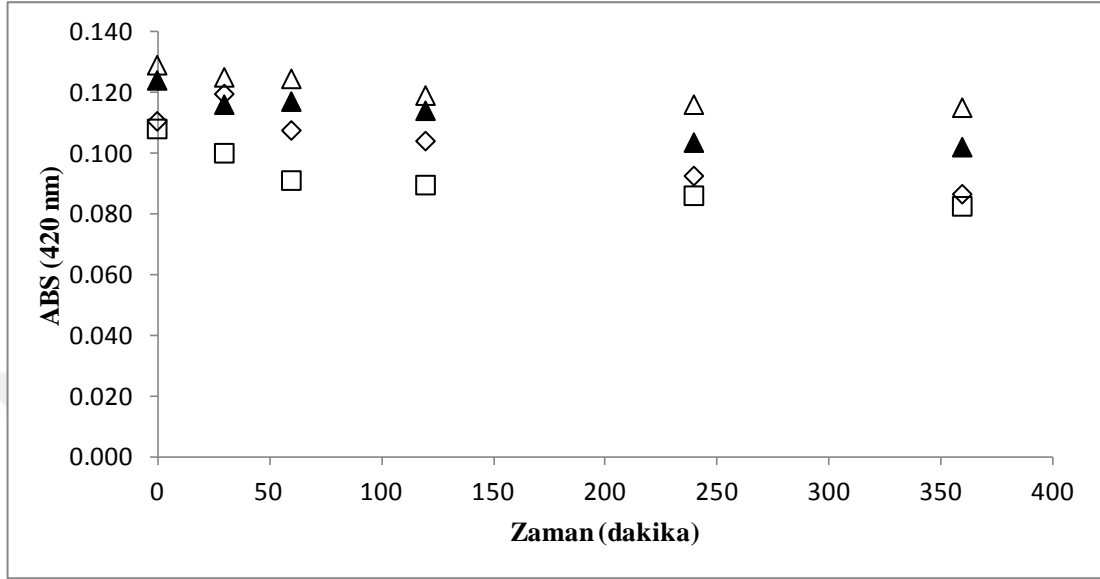


Şekil 4.44. Nar kabukları ile kopigmente antosiyanin çözeltisi kahverengileşme değerleri (Δ – pH 2,2 ▲ - pH 3,6 ◇ – pH 4,2 □ – pH 5,4*)

*Diğer pH değerlerine ait kahverengileşme indisi verileri Ek 19'da verilmiştir.

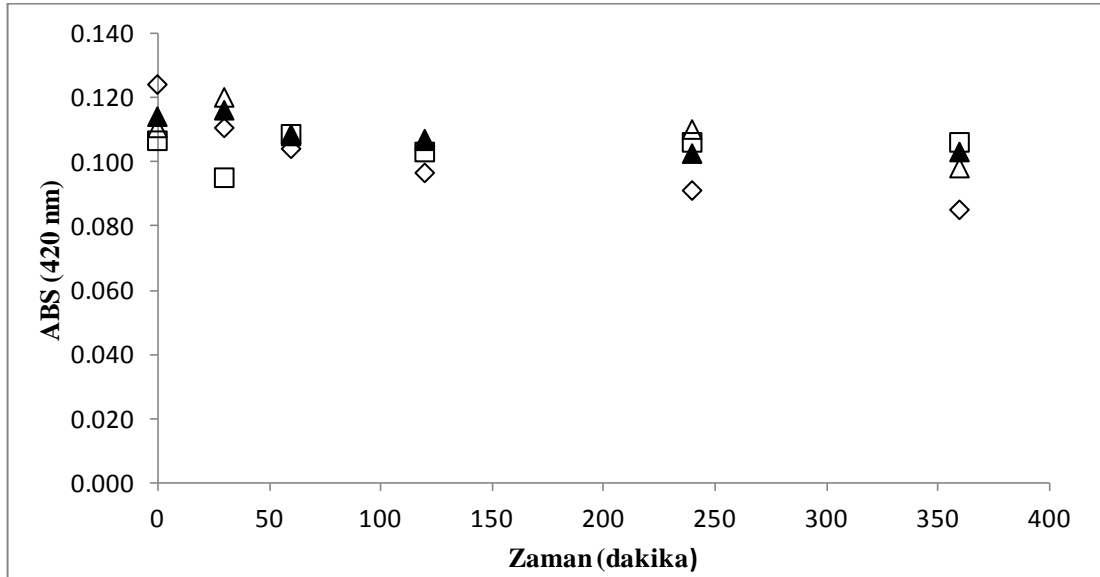
Mandalina kabukları ve gül petalleri ile kopigmente edilmiş örneklerde kahverengileşmenin pH'dan bağımsız olarak pek değişim göstermediği gözlemlenmiştir. Mandalina kabukları ile kopigmente örneklerde kahverengileşmenin 0,130-0,09 aralığında, gül petalleri ile kopigmente örneklerde

0,12-0,08 aralığında değişim gösterdiği tespit edilmiştir (Şekil 4.45 ve 4.46). Sonuç olarak, mandalina kabukları ve gül petalleri ile kopigmente örneklerde ısıl işlemin kahverengileşme üzerinde belirgin bir etkisi olmadığı görülmüştür.



Şekil 4.45. Mandalina kabukları ile kopigmente antosiyanin çözeltisi kahverengileşme değerleri (Δ - pH 2,2 ▲ - pH 3,6 ◇ - pH 4,2 □ - pH 5,4*)

*Diğer pH değerlerine ait kahverengileşme indisi verileri Ek 20'de verilmiştir.



Şekil 4.46. Gül petalleri ile kopigmente antosiyanin çözeltisi kahverengileşme değerleri (Δ - pH 2,2 ▲ - pH 3,6 ◇ - pH 4,2 □ - pH 5,4*)

*Diğer pH değerlerine ait kahverengileşme indisi verileri Ek 21'de verilmiştir.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

1. Kopigmentasyon sonrası örneklerin maksimum dalga boyunda meydana gelen kayma kopigmentasyonun gerçekleştiğinin bir göstergesidir. HPLC analizleri sonucu bozunum ürünü harici yeni bir pikin oluşmaması kopigmentasyonun hidrojen bağı veya van der Waals bağı gibi zayıf etkileşimler aracılığıyla gerçekleşen moleküller arası kopigmentasyon olduğuna işaret etmektedir.

2. Termodinamik lm sonuçları mandalina kabukları ve gl petalleri ile gerçekleştirilen kopigmentasyon tepkimeleri sonucunda örneklerin pH kararlılığında artış meydana geldiğini göstermiştir. Mandalina kabukları ve gl petallerinin aksine nar kabukları ile gerçekleştirilen kopigmentasyon tepkimelerinin örneklerin pH ve ısı kararlılığı üzerinde belirgin bir etkisi olmadığı grlmştr.

3. Toplam antosiyanin miktarı üzerinden unimoleküler birinci mertebe kinetik mekanizması yerine, kara havuçta bulunan her antosiyanin ile bozunum ürünlerinin dikkate alındığı yeni bir mekanizma önerilerek tartışılmıştır. Mekanizmanın ayrıştırılmış saf kara havuç antosiyaninleri üzerinde ayrı ayrı çalışılması önerilmektedir.

4. Kopigmentasyonun örneklerin ısı kararlılığı üzerinde belirli bir kararlılık artışı göstermediği belirlenmiştir. Etkinin belirginleşmesi için fenolik maddelerin özütlenerek kara havuç üzerinde farklı derişimlerde uygulanması önerilmektedir.

KAYNAKLAR

- Acar, J., Gökmen, V., “Fenolik Bileşikler ve Doğal Renk Maddeleri”, Gıda Kimyası, 4. Baskı (Editör: Saldamlı, İ.), Hacettepe Üniversitesi Yayınları, Ankara, 557-590, (2014).
- Awika, J. M., "Behavior of 3-deoxyanthocyanidins in the presence of phenolic copigments", Food Research International, 41(5): 532-538, (2008).
- Bakowska, A., Kucharska, A. Z., Oszmiański, J., "The effects of heating, UV irradiation, and storage on stability of the anthocyanin–polyphenol copigment complex", Food Chemistry 81(3): 349-355, (2003).
- Barry, A. M., “Encapsulation, Color Stability, and Distribution of Anthocyanins from Purple Corn (*Zea mays L.*), Blueberry (*Vaccinium sp.*), and Red Radish (*Raphanus sativus*) in a Cold-Setting Pectin-Alginate Gel”, Academic Dissertation, University of The Ohio State, Department of Food Science and Nutrition, Columbus, (2013).
- Baydar, N. G., Baydar, H., "Phenolic compounds, antiradical activity and antioxidant capacity of oil-bearing rose (*Rosa damascena* Mill.) extracts", Industrial Crops and Products, 41: 375-380, (2013).
- Brenes, C. H., Del Pozo-Insfran, D., Talcott, S. T., “Stability of copigmented anthocyanins and ascorbic acid in a grape juice model system”, Journal of Agricultural Food Chemistry, 53: 49-56, (2005).
- Castaneda-Ovando, A., de Lourdes Pacheco-Hernández, M., Páez-Hernández, M. E., Rodríguez, J. A., Galán-Vidal, C. A., "Chemical studies of anthocyanins: A review", Food Chemistry, 113(4): 859-871, (2009).
- Cavalcanti, R. N., Diego, T. S., ve Maria, A. A. M., "Non-thermal stabilization mechanisms of anthocyanins in model and food systems—An overview", Food Research International 44(2): 499-509, (2011).
- Dangles, O., Stoeckel, C., Wigand, M. C., & Brouillard, R., “Two very distinct types of anthocyanin complexation: copigmentation and inclusion”. Tetrahedron Letters, 33: 5227–5230, (1992).

- Durst, R. W., Wrolstad, R. E., "Separation and characterization of anthocyanins by HPLC", In *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, Wrolstad, R. E., Acree, T. E., An, H., Decker, E. A., Penner, M. H., Reid, D. S., Schwatz, S. J., Shoemaker, C. F., Sporns, P., Eds.; John Wiley and Sons: New York, pp F1.3.1-F1.3.13, (2001).
- Figueiredo P., Elhabiri M., Saito N., Brouillard R., "Anthocyanin intramolecular interactions. A new mathematical approach to account for the remarkable colorant properties of the pigments extracted from *Matthiola incana*, *Journal of the American Chemical Society*, 118: 4788-4793, (1996).
- Figueiredo, P., George, F., Tatsuzawa, F., Toki, K., Saito, N., Brouillard, R., "New features of intramolecular copigmentation by acylated anthocyanins", *Phytochemistry*, 51(1): 125-132, (1999).
- Fischer, U. A., Reinhold C., Kammerer, D. R., "Identification and quantification of phenolic compounds from pomegranate (*Punica granatum* L.) peel, mesocarp, aril and differently produced juices by HPLC-DAD-ESI/MS n", *Food Chemistry*, 127(2): 807-821, (2011).
- Giusti, M. M., Wrolstad, R. E., "Characterization and measurement of anthocyanins by UV-visible spectroscopy", *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, (2001).
- Giusti, M. M., Wrolstad, R. E., "Acylated anthocyanins from edible sources and their applications in food systems", *Biochemical Engineering Journal*, **14**: 217-225, (2003).
- González-Manzano, S., vd., "Studies on the copigmentation between anthocyanins and flavan-3-ols and their influence in the colour expression of red wine", *Food Chemistry*, 114(2): 649-656 (2009).
- Gris, E. F., Ferreira, E. A., Falcão, L. D., Bordignon-Luiz, M. T., "Caffeic Acid copigmentation of anthocyanins from Cabernet Sauvignon", *Food Chemistry*, 100(3):1289-1296, (2007).

- Harbourne, N., Jacquier, J. C., Morgan, D. J., Lyng, J. G., “Determination of the degradation kinetics of anthocyanins in a model juice system using isothermal and non-isothermal methods”, *Food Chemistry*, 111(1): 204-208,(2008).
- Hayat, K., Abbas, S., Jia, C., Xia, S., Zhang, X., “Comparative Study On Phenolic Compounds and Antioxidant Activity Of Feutrell’s Early And Kinnow Peel Extracts”, *Journal of Food Biochemistry* 35(2): 454–471, (2011).
- İstanbulu, Ö., “Kara havuç (*Daucus carota var L.*) antosiyaninlerinin ferulik asit ile kopigmentasyonu”, Mersin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 46 s., (2007).
- Jettanapornsumran, M., “Copigmentation Reactions of Boysenberry Juice”, Academic Dissertation, University of Massey, Department of Food Technology, Albany, (2009).
- Kelebek, H., Canbaş, A., “Hicaz Narı Şirasının Organik Asit Şeker ve Fenol Bileşikleri İçeriği ve Antioksidan Kapasitesi”, *Gıda*, 35 (6): 439-444, (2010).
- Kırca, A., Mehmet, Ö., Cemeroglu, B., "Stability of black carrot anthocyanins in various fruit juices and nectars", *Food Chemistry*, 97(4): 598-605, (2006).
- Kırca, A., Özkan M., Cemeroglu B., “Effects of temperature, solid content and pH on the stability of black carrot anthocyanins”, *Food Chemistry*, 101(1): 212–218, (2007a).
- Kırca, A., Özkan M., Cemeroglu B., “ Storage stability of strawberry jam color enhanced with black carrot juice concentrate”, *Journal of Food Processing and Preservation*, 31(5): 531–545, (2007b).
- Kunsági-Máté, S., Szabó, K., Nikfardjam, M. P., Kollár, L., "Determination of the thermodynamic parameters of the complex formation between malvidin-3-O-glucoside and polyphenols. Copigmentation effect in red wines", *Journal of biochemical and biophysical methods*, 69(1): 113-119, (2006).

- Levaj, B., Dragović-Uzelac, V., Danijela Bursać Kovačević, D. B., Krasnići, N., “Determination of Flavonoids in Pulp and Peel of Mandarin Fruits”, *Agriculturae Conspectus Scientificus*, 74 (3): 221-225, (2009).
- Li, Y., Guo, C., Yang, J., Wei, J., Xu, J., Cheng, S.,” Evaluation of antioxidant properties of pomegranate peel extract in comparison with pomegranate pulp extract”, *Food Chemistry*, 96(2): 254-260, (2006).
- Limón, P. M., Gavara, R., Pina, F., "Thermodynamics and Kinetics of Cyanidin 3-Glucoside and Caffeine Copigments", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(22): 5245-5251, (2013).
- Montilla, E. C., Arzaba, M. R., Hillebrand, S., Winterhalter, P., “Anthocyanin Composition of Black Carrot (*Daucus carota* ssp. *Sativus* var. *atrorubens* Alef.) Cultivars Antonina, Beta Sweet, Deep Purple, and Purple Haze”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(7): 3385–3390, (2011).
- Oliveira, J., vd., "Grape anthocyanin oligomerization: A putative mechanism for red color stabilization?", *Phytochemistry*, 105: 178-185, (2014).
- Pacheco-Palencia, L. A., Stephen T. T., "Chemical stability of açai fruit (*Euterpe oleracea* Mart.) anthocyanins as influenced by naturally occurring and externally added polyphenolic cofactors in model systems", *Food chemistry*, 118(1): 17-25, (2010).
- Patras, A., Brunton, N. P., O'Donnell, C., Tiwari, B. K., "Effect of thermal processing on anthocyanin stability in foods; mechanisms and kinetics of degradation", *Trends in Food Science & Technology*, 21(1): 3-11, (2010).
- Rein, M., “Copigmentation reactions and color stability of berry anthocyanins”, Academic Dissertation, University of Helsinki, Department of Applied Chemistry and Microbiology, Helsinki, (2005).
- Rodríguez-Saona, L.E., Wrolstad, R. E., “Extraction, isolation and purification of anthocyanins”, In *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, Wrolstad, R. E., Acree, T. E., An, H., Decker, E. A., Penner, M. H., Reid, D. S., Schwatz, S. J., Shoemaker, C. F., Sporns, P., Eds.; John Wiley and Sons: New York, pp F1.1.1-F1.1.11, (2001).

- Sadilova, E., Stintzing, F. C., Carle, R., "Thermal degradation of acylated and nonacylated anthocyanins", Journal of Food Science, 71(8): C504-C512, (2006).
- Schieber, A., Mihalev, K., Berardini, N., Mollov, P., Carle, R., "Flavonol Glycosides from Distilled Petals of *Rosa damascena* Mill.", Zeitschrift fr Naturforschung C, 60c: 379-384, (2005).
- Shikov, V., Kammerer, D. R., Mihalev, K., Mollov, P., Carle, R., "Heat stability of strawberry anthocyanins in model solutions containing natural pigments extracted", Journal of Agricultural and Food Chemistry, 56: 8521-8526, (2008).
- Shikov, V., Kammerer, D. R., Mihalev, K., Mollov, P., Carle, R., "Heat Stability of Strawberry Anthocyanins in Model Solutions Containing Natural Copigments Extracted from Rose (*Rosa damascena* Mill.) Petals", Journal of Agricultural and Food Chemistry, 56(18): 8521–8526, (2008).
- Turker, N., Aksay, S., Ekiz, H. E., "Effect of storage temperature on the stability of anthocyanins of a fermented black carrot (*Daucus carota* var. L.) beverage: Shalgam", Journal of Agricultural and Food Chemistry, 52(12): 3807-3813, (2004).
- Turker, N., Gizir, M., Kuş, N. ř., Aksay, S., İstanbullu, ., "Kara Havuç (*Daucus carota* var. L.) antosiyaninlerinin molekül-içi ve moleküller-arası kopigmentasyon ile renk kararlılıklarının artırılması", TUBİTAK Proje Sonuç Raporu (TOVAG 105 O 388), Mersin, 56 s., (2009).
- Wang, W.D., Xu, S. Y., "Degradation kinetics of anthocyanins in blackberry juice and concentrate", Journal of Food Engineering, 82(3): 271-275, (2007).
- Zhang, Y., Sun, Y., Xi, W., Shen, Y., Qiao, L., Zhong, L., Ye, X., Zhou, Z., "Phenolic compositions and antioxidant capacities of Chinese wild mandarin (*Citrus reticulata* Blanco) fruits", Journal of Food Chemistry, 145: 674-680, (2014).

EKLER

Ek 1. Referans antosiyanin çözeltisi toplam alan verileri

Zaman (dakika)	pH 2,2	pH 2,8	pH 3,2	pH 3,6	pH 4,2	pH 4,8	pH 5,4
0	633,90 ±23,56	643,27 ±9,22	644,47 ±16,60	1270,60 ±5,20	525,03 ±21,77	699,20 ±14,08	454,30 ±22,27
30	652,70 ±4,27	629,17 ±34,70	606,30 ±9,84	552,70 ±23,26	502,77 ±6,40	423,77 ±18,31	340,67 ±6,45
60	622,83 ±13,18	635,40 ±20,54	579,33 ±4,67	504,00 ±27,69	435,33 ±15,86	364,50 ±8,20	264,03 ±2,25
120	498,23 ±12,59	530,07 ±16,40	530,20 ±26,61	432,63 ±11,89	362,27 ±12,77	256,70 ±11,33	134,30 ±3,72
240	478,50 ±5,86	513,03 ±38,43	493,30 ±18,89	360,40 ±11,07	237,93 ±28,23	128,43 ±17,39	33,63 ±5,24
360	408,65 ±24,63	467,13 ±21,54	449,40 ±7,78	296,30 ±29,18	232,93 ±40,60	58,10 ±8,65	6,83 ±1,64

Ek 2. Nar kabukları ile kopigmente edilmiş antosiyanin çözeltisi toplam alan verileri

Zaman (dakika)	pH 2,2	pH 2,8	pH 3,2	pH 3,6	pH 4,2	pH 4,8	pH 5,4
0	642,50 ±28,44	647,40 ±12,28	610,00 ±11,35	601,87 ±32,71	580,13 ±20,13	477,73 ±37,52	351,07 ±42,17
30	629,30 ±32,34	629,00 ±13,55	640,83 ±18,32	574,93 ±10,41	504,83 ±8,68	397,80 ±4,92	271,50 ±9,30
60	585,43 ±19,86	568,53 ±14,96	589,40 ±31,95	554,43 ±10,50	446,77 ±20,26	251,77 ±5,97	197,47 ±31,93
120	511,40 ±14,28	530,13 ±25,97	486,40 ±5,74	460,77 ±11,58	321,15 ±23,03	102,97 ±2,80	115,50 ±66,68
240	414,20 ±11,23	519,47 ±22,03	396,27 ±14,39	379,37 ±21,71	169,63 ±5,11	8,30 ±0,70	41,33 ±3,90
360	387,17 ±23,54	396,27 ±33,92	359,20 ±37,74	330,10 ±27,10	190,50 ±5,99	0,00 ±4,62	9,67 ±4,65

Ek 3. Mandalina kabukları ile kopigmente edilmiş antosiyanin çözeltisi toplam alan verileri

Zaman (dakika)	pH 2,2	pH 2,8	pH 3,2	pH 3,6	pH 4,2	pH 4,8	pH 5,4
0	666,00 ±8,19	705,07 ±22,39	619,60 ±19,00	615,45 ±2,46	592,57 ±16,65	585,15 ±2,05	515,20 ±19,50
30	721,33 ±30,26	723,90 ±15,98	542,63 ±38,52	571,60 ±3,90	534,75 ±12,05	488,00 ±1,74	411,85 ±7,33
60	671,40 ±15,62	615,40 ±33,24	611,97 ±48,90	552,47 ±39,81	460,33 ±21,70	409,50 ±22,49	301,20 ±2,69
120	558,70 ±7,24	535,37 ±26,90	505,23 ±21,04	464,50 ±13,77	387,30 ±9,55	280,57 ±37,40	165,65 ±10,95
240	516,70 ±24,19	451,03 ±28,29	416,10 ±25,63	373,03 ±10,39	245,10 ±8,34	156,25 ±23,92	50,52 ±14,05
360	451,43 ±28,92	406,10 ±8,03	380,00 ±31,05	322,27 ±18,74	170,50 ±31,09	74,63 ±10,29	15,35 ±0,78

Ek 4. Gül petalleri ile kopigmente edilmiş antosiyanin çözeltisi toplam alan verileri

Zaman (dakika)	pH 2,2	pH 2,8	pH 3,2	pH 3,6	pH 4,2	pH 4,8	pH 5,4
0	578,77 ±12,23	596,17 ±9,53	589,10 ±8,48	590,57 ±27,67	567,97 ±24,61	569,77 ±14,55	502,20 ±31,09
30	582,63 ±18,79	587,20 ±28,26	575,97 ±15,16	562,43 ±18,18	531,80 ±37,83	500,23 ±23,98	358,37 ±10,36
60	545,17 ±15,08	564,03 ±9,94	514,97 ±10,75	502,60 ±13,05	474,37 ±11,89	374,87 ±9,51	226,03 ±4,65
120	496,47 ±5,73	490,37 ±2,90	439,07 ±6,97	444,87 ±7,92	335,77 ±6,62	254,97 ±10,24	98,60 ±5,40
240	428,33 ±20,36	400,97 ±27,89	398,57 ±5,65	341,63 ±31,10	247,97 ±12,62	104,20 ±2,42	11,10 ±0,30
360	407,23 ±21,72	398,00 ±43,92	370,53 ±22,07	329,80 ±32,92	181,43 ±27,06	57,27 ±5,54	5,13 ±0,15

Ek 5. Referans antosiyanin çözeltisi monomerik antosiyanin (mg/L) verileri

Zaman (dakika)	pH 2,2	pH 2,8	pH 3,2	pH 3,6	pH 4,2	pH 4,8	pH 5,4
0	147,28 ±1,69	143,78 ±2,41	126,08 ±0,71	123,07 ±13,12	123,57 ±15,11	125,41 ±21,16	113,39 ±3,73
30	142,94 ±1,35	135,43 ±2,17	112,55 ±1,24	122,40 ±3,73	121,90 ±24,30	116,06 ±3,06	104,70 ±17,56
60	139,60 ±3,51	123,24 ±4,20	93,68 ±3,78	100,19 ±14,24	113,55 ±9,25	84,50 ±15,51	75,98 ±9,33
120	99,53 ±1,42	105,37 ±1,09	90,51 ±4,01	92,68 ±21,03	89,84 ±2,43	62,12 ±10,42	61,28 ±4,12
240	93,51 ±7,89	94,01 ±5,24	83,83 ±11,37	75,81 ±5,98	58,95 ±4,52	35,40 ±1,45	21,54 ±23,04
360	55,11 ±10,25	75,48 ±1,48	71,14 ±7,90	50,60 ±12,27	48,43 ±6,11	10,69 ±2,27	10,19 ±5,15

Ek 6. Nar kabukları ile kopigmente edilmiş antosiyanin çözeltisi monomerik antosiyanin (mg/L) verileri

Zaman (dakika)	pH 2,2	pH 2,8	pH 3,2	pH 3,6	pH 4,2	pH 4,8	pH 5,4
0	127,41 ±0,71	118,90 ±0,47	115,89 ±0,94	104,70 ±1,42	85,33 ±1,55	83,16 ±0,56	75,98 ±1,71
30	115,22 ±0,94	98,69 ±0,71	85,50 ±0,89	84,66 ±0,47	75,65 ±1,32	72,14 ±0,93	57,78 ±1,88
60	106,20 ±1,42	99,36 ±0,71	80,15 ±1,36	72,47 ±0,71	62,12 ±1,41	61,95 ±1,42	47,76 ±7,56
120	102,20 ±1,42	88,17 ±1,48	74,64 ±1,89	57,28 ±1,07	54,44 ±1,21	56,94 ±3,25	19,04 ±2,83
240	57,11 ±2,83	56,78 ±1,68	54,61 ±1,73	52,77 ±1,88	43,08 ±0,81	32,40 ±2,66	7,35 ±5,67
360	44,75 ±3,05	46,09 ±1,83	44,12 ±2,36	43,08 ±1,33	40,75 ±1,19	13,36 ±4,18	5,51 ±4,87

Ek 7. Mandalina kabukları ile kopigmente edilmiş antosiyanin çözeltisi

monomerik antosiyanin (mg/L) verileri

Zaman (dakika)	pH 2,2	pH 2,8	pH 3,2	pH 3,6	pH 4,2	pH 4,8	pH 5,4
0	138,71 ±2,36	137,04 ±5,43	113,00 ±3,07	103,00 ±6,65	95,07 ±4,79	74,03 ±4,61	103,59 ±6,61
30	100,69 ±2,36	101,25 ±2,36	108,43 ±3,78	101,03 ±7,56	73,92 ±0,94	90,17 ±2,13	75,98 ±4,25
60	88,06 ±4,96	89,84 ±0,94	96,02 ±3,54	89,56 ±1,18	78,65 ±0,71	82,72 ±5,43	59,17 ±2,13
120	82,99 ±0,24	86,28 ±13,70	72,14 ±4,49	67,13 ±4,72	61,56 ±3,31	67,57 ±8,74	40,30 ±0,24
240	62,62 ±3,78	62,01 ±2,13	50,26 ±1,65	48,09 ±0,47	33,12 ±5,11	26,55 ±0,94	11,97 ±1,42
360	44,98 ±3,54	37,02 ±0,00	40,30 ±1,18	33,18 ±3,78	18,76 ±8,50	14,47 ±1,18	10,46 ±1,89

Ek 8. Gül petalleri ile kopigmente edilmiş antosiyanin çözeltisi monomerik

antosiyanin (mg/L) verileri

Zaman (dakika)	pH 2,2	pH 2,8	pH 3,2	pH 3,6	pH 4,2	pH 4,8	pH 5,4
0	119,90 ±0,24	115,06 ±8,50	114,05 ±1,8	113,89 ±11,57	113,55 ±2,83	113,39 ±2,60	107,71 ±8,74
30	116,89 ±10,86	108,88 ±17,48	102,36 ±2,1	99,69 ±11,10	98,86 ±6,38	96,19 ±4,72	92,34 ±1,98
60	102,03 ±21,02	101,53 ±1,18	94,68 ±2,4	92,85 ±0,71	80,99 ±2,13	82,49 ±1,89	92,18 ±7,63
120	87,34 ±7,08	74,81 ±3,31	73,64 ±1,8	79,49 ±0,47	58,61 ±0,24	54,44 ±0,94	47,93 ±3,14
240	77,82 ±14,41	73,64 ±22,67	68,63 ±2,47	60,62 ±1,18	42,08 ±2,36	19,54 ±4,72	18,87 ±2,63
360	73,14 ±0,00	71,64 ±72,50	60,95 ±6,8	57,61 ±8,50	31,06 ±2,36	17,53 ±0,94	14,70 ±4,09

Ek 9. P1+2 antosiyanini k (1/dakika) değerleri

pH	1	2	3	4
2,2	0,0043±0,0004	0,0044±0,0002	0,0040±0,0016	0,0036±0,0002
2,8	0,0036±0,0005	0,0040±0,0005	0,0044±0,0003	0,0037±0,0003
3,2	0,0035±0,0001	0,0042±0,0003	0,0044±0,0002	0,0039±0,0002
3,6	0,0047±0,0003	0,0043±0,0004	0,0046±0,0009	0,0041±0,0002
4,2	0,0045±0,0005	0,0052±0,0014	0,0052±0,0004	0,0048±0,0002
4,8	0,0062±0,0018	0,0132±0,0004	0,0060±0,0014	0,0062±0,0001
5,4	0,0091±0,0006	0,0118±0,0005	0,0089±0,0023	0,0103±0,0001

1- Referans antosiyanin çözeltisi 2- Nar kabukları ile kopigmente edilmiş antosiyanin çözeltisi 3- Mandalina kabukları ile kopigmente edilmiş antosiyanin çözeltisi 4- Gül petalleri ile kopigmente edilmiş antosiyanin çözeltisi

Ek 10. P3+4 antosiyanini k (1/dakika) değerleri

pH	1	2	3	4
2,2	0,0089±0,0010	0,0195±0,0028	0,0088±0,0041	0,0082±0,0006
2,8	0,0084±0,0006	0,0124±0,0007	0,0093±0,0002	0,0078±0,0009
3,2	0,0093±0,0005	0,0135±0,0020	0,0080±0,0009	0,0106±0,0002
3,6	0,0106±0,0023	0,0117±0,0025	0,0112±0,0018	0,0096±0,0007
4,2	0,0100±0,0006	0,0110±0,0007	0,0126±0,0025	0,0088±0,0008
4,8	0,0166±0,0055	0,0166±0,0100	0,0111±0,0023	0,0131±0,0016
5,4	0,0116±0,0006	0,0147±0,0009	0,0135±0,0019	0,0076±0,0031

1- Referans antosiyanin çözeltisi 2- Nar kabukları ile kopigmente edilmiş antosiyanin çözeltisi 3- Mandalina kabukları ile kopigmente edilmiş antosiyanin çözeltisi 4- Gül petalleri ile kopigmente edilmiş antosiyanin çözeltisi

Ek 11. P5 antosiyanini k (1/dakika) değerleri

pH	1	2	3	4
2,2	0,0004±0,0001	0,0006±0,0002	0,0004±0,0000	0,0003±0,0001
2,8	0,00002±0,0001	0,0002±0,0003	0,0007±0,0002	0,0003±0,0002
3,2	0,00003±0,0001	0,0008±0,0003	0,0004±0,0002	0,0005±0,0002
3,6	0,0009±0,0002	0,0009±0,0004	0,0009±0,0001	0,0009±0,0002
4,2	0,0018±0,0006	0,0028±0,0004	0,0028±0,0006	0,0027±0,0004
4,8	0,0066±0,0019	0,0145±0,0003	0,0065±0,0010	0,0072±0,0003
5,4	0,0108±0,0003	0,0089±0,0004	0,0112±0,0039	0,0187±0,0004

1- Referans antosiyanin çözeltisi 2- Nar kabukları ile kopigmente edilmiş antosiyanin çözeltisi 3- Mandalina kabukları ile kopigmente edilmiş antosiyanin çözeltisi 4- Gül petalleri ile kopigmente edilmiş antosiyanin çözeltisi

Ek 12. P6 antosiyanini k (1/dakika) değerleri

pH	1	2	3	4
2,2	0,0005±0,0001	0,0005±0,0002	0,0004±0,0003	0,0004±0,0001
2,8	0,00006±0,0002	0,0002±0,0003	0,0007±0,0002	0,0004±0,0002
3,2	0,00008±0,0001	0,0008±0,0003	0,0004±0,0002	0,0005±0,0002
3,6	0,0009±0,0002	0,0009±0,0004	0,0009±0,0001	0,0009±0,0001
4,2	0,0015±0,0007	0,0026±0,0018	0,0027±0,001	0,0024±0,0003
4,8	0,0057±0,0018	0,0134±0,0002	0,0045±0,0010	0,0061±0,0003
5,4	0,017±0,0014	0,0071±0,0006	0,0086±0,0013	0,0143±0,0003

1- Referans antosiyanin çözeltisi 2- Nar kabukları ile kopigmente edilmiş antosiyanin çözeltisi 3- Mandalina kabukları ile kopigmente edilmiş antosiyanin çözeltisi 4- Gül petalleri ile kopigmente edilmiş antosiyanin çözeltisi

Ek 13. P7 antosiyanini k (1/dakika) değerleri

pH	1	2	3	4
2,2	0,0009±0,0003	0,0007±0,0002	0,0005±0,0004	0,0003±0,0002
2,8	0,0002±0,0003	0,0004±0,0004	0,001±0,0002	0,0003±0,0002
3,2	0,0002±0,0003	0,0009±0,0002	0,0007±0,0002	0,0005±0,0002
3,6	0,0014±0,0002	0,0011±0,0003	0,0012±0,0001	0,0009±0,0001
4,2	0,0019±0,0008	0,0045±0,0016	0,0028±0,0006	0,0027±0,0003
4,8	0,007±0,0023	0,0111±0,0025	0,0047±0,0029	0,0072±0,0001
5,4	0,0094±0,0010	0,0068±0,0037	0,0095±0,0011	0,0187±0,0015

1- Referans antosiyanin çözeltisi 2- Nar kabukları ile kopigmente edilmiş antosiyanin çözeltisi 3- Mandalina kabukları ile kopigmente edilmiş antosiyanin çözeltisi 4- Gül petalleri ile kopigmente edilmiş antosiyanin çözeltisi

Ek 14. Referans antosiyanin çözeltisi % polimerik renk verileri

Zaman (dakika)	pH 2,2	pH 2,8	pH 3,2	pH 3,6	pH 4,2	pH 4,8	pH 5,4
0	49,34 ±1,00	50,94 ±0,58	51,24 ±0,64	50,82 ±0,15	51,27 ±0,21	52,00 ±0,43	46,58 ±0,02
30	47,96 ±0,33	48,99 ±0,06	53,98 ±7,39	53,50 ±0,03	51,50 ±0,39	49,95 ±0,02	44,06 ±0,02
60	49,67 ±1,31	52,24 ±0,02	52,27 ±1,65	55,20 ±0,02	52,40 ±0,40	51,42 ±0,02	46,20 ±0,09
120	59,89 ±1,21	56,35 ±0,27	55,06 ±0,28	59,76 ±0,05	55,86 ±0,66	51,43 ±0,02	44,62 ±0,02
240	61,14 ±1,22	54,65 ±0,35	55,21 ±1,25	58,85 ±0,06	56,27 ±6,46	50,04 ±0,38	46,74 ±0,29
360	55,02 ±4,60	52,78 ±0,54	50,84 ±3,23	68,06 ±0,19	39,55 ±2,23	49,07 ±0,03	49,41 ±0,42

Ek 15. Nar kabukları ile kopigmente edilmiş antosiyanin çözeltisi % polimerik renk verileri

Zaman (dakika)	pH 2,2	pH 2,8	pH 3,2	pH 3,6	pH 4,2	pH 4,8	pH 5,4
0	55,40 ±2,12	57,11 ±0,45	55,79 ±3,64	59,85 ±0,45	51,45 ±7,43	49,30 ±12,12	51,84 ±2,73
30	57,23 ±1,52	59,09 ±0,30	60,91 ±0,30	60,27 ±5,30	75,49 ±10,91	45,07 ±0,76	52,23 ±1,82
60	59,20 ±0,61	57,38 ±2,15	62,32 ±0,15	65,59 ±13,33	81,84 ±17,12	48,67 ±4,55	53,48 ±1,36
120	63,81 ±2,88	59,51 ±7,43	64,92 ±0,61	61,89 ±1,06	32,43 ±10,61	48,76 ±0,76	47,47 ±3,03
240	67,77 ±2,27	64,22 ±2,13	69,29 ±1,52	64,95 ±1,97	47,59 ±14,55	33,47 ±3,64	48,05 ±9,70
360	71,01 ±1,36	71,87 ±3,15	73,03 ±2,58	63,51 ±1,52	43,18±1 ,24	25,18 ±5,46	45,20 ±2,12

Ek 16. Mandalina kabukları ile kopigmente edilmiş antosiyanin çözeltisi % polimerik renk verileri

Zaman (dakika)	pH 2,2	pH 2,8	pH 3,2	pH 3,6	pH 4,2	pH 4,8	pH 5,4
0	53,14 ±0,07	61,25 ±12,41	55,25 ±5,80	52,84 ±0,83	52,60 ±0,83	50,45 ±0,35	49,53 ±0,19
30	51,76 ±1,70	52,15 ±0,55	54,32 ±0,30	52,24 ±0,73	48,59 ±0,52	50,50 ±0,40	50,77 ±0,59
60	53,61 ±0,28	54,41 ±0,11	54,65 ±3,27	54,92 ±0,34	53,58 ±3,96	50,33 ±2,19	49,68 ±0,71
120	60,02 ±0,55	52,92 ±10,42	59,82 ±1,15	60,32 ±0,80	57,75 ±0,65	50,09 ±7,64	51,73 ±0,92
240	66,11 ±0,49	56,68 ±0,48	66,94 ±0,70	65,16 ±1,06	63,24 ±1,39	57,11 ±0,36	59,52 ±1,15
360	71,39 ±1,04	68,61 ±0,48	71,62 ±0,80	67,93 ±3,06	67,40 ±0,79	59,94 ±1,93	63,94 ±1,48

Ek 17. Gül petalleri ile kopigmente edilmiş antosiyanin çözeltisi % polimerik renk verileri

Zaman (dakika)	pH 2,2	pH 2,8	pH 3,2	pH 3,6	pH 4,2	pH 4,8	pH 5,4
0	56,45 ±0,32	53,73 ±0,07	53,52 ±0,28	53,75 ±0,52	56,18 ±9,44	45,67 ±10,55	49,65 ±0,54
30	56,15 ±1,67	56,22 ±0,44	54,76 ±0,85	54,33 ±0,49	57,17 ±0,75	55,58 ±0,11	53,07 ±1,63
60	57,78 ±0,71	57,87 ±0,75	57,95 ±0,06	59,93 ±0,36	57,29 ±3,06	56,50 ±0,40	51,07 ±0,98
120	60,75 ±0,11	62,58 ±0,10	63,14 ±0,44	61,16 ±0,29	62,71 ±0,59	59,25 ±0,86	58,12 ±0,03
240	63,41 ±1,47	67,24 ±0,41	68,54 ±0,28	70,44 ±0,30	67,25 ±0,04	66,99 ±0,51	70,56 ±0,90
360	69,78 ±0,66	70,34 ±1,25	70,46 ±2,10	72,77 ±0,32	68,79 ±0,44	67,83 ±0,16	73,84 ±7,14

Ek 18. Referans antosiyanin çözeltisi kahverengileşme verileri

Zaman (dakika)	pH 2,2	pH 2,8	pH 3,2	pH 3,6	pH 4,2	pH 4,8	pH 5,4
0	0,096 ±0,076	0,097 ±0,061	0,089 ±0,061	0,086 ±0,065	0,103 ±0,054	0,090 ±0,052	0,075 ±0,058
30	0,080 ±0,037	0,093 ±0,065	0,092 ±0,059	0,085 ±0,057	0,094 ±0,049	0,079 ±0,052	0,065 ±0,052
60	0,102 ±0,049	0,096 ±0,050	0,094 ±0,051	0,082 ±0,053	0,093 ±0,057	0,065 ±0,044	0,056 ±0,040
120	0,093 ±0,033	0,093 ±0,042	0,084 ±0,046	0,079 ±0,042	0,088 ±0,037	0,059 ±0,039	0,050 ±0,037
240	0,091 ±0,020	0,097 ±0,033	0,082 ±0,000	0,071 ±0,041	0,058 ±0,018	0,048 ±0,026	0,040 ±0,025
360	0,087 ±0,032	0,090 ±0,000	0,080 ±0,000	0,071 ±0,034	0,057 ±0,011	0,037 ±0,025	0,038 ±0,024

Ek 19. Nar kabukları ile kopigmente edilmiş antosiyanin çözeltisi kahverengileşme verileri

Zaman (dakika)	pH 2,2	pH 2,8	pH 3,2	pH 3,6	pH 4,2	pH 4,8	pH 5,4
0	0,092 ±0,001	0,096 ±0,000	0,081 ±0,002	0,099 ±0,001	0,069 ±0,001	0,066 ±0,001	0,066 ±0,002
30	0,090 ±0,001	0,091 ±0,005	0,094 ±0,001	0,092 ±0,004	0,067 ±0,001	0,062 ±0,000	0,062 ±0,003
60	0,088 ±0,000	0,072 ±0,001	0,091 ±0,001	0,103 ±0,018	0,062 ±0,000	0,053 ±0,001	0,060 ±0,001
120	0,083 ±0,002	0,068 ±0,001	0,087 ±0,001	0,081 ±0,004	0,059 ±0,001	0,042 ±0,004	0,042 ±0,002
240	0,076 ±0,002	0,064 ±0,001	0,081 ±0,002	0,076 ±0,001	0,050 ±0,000	0,024 ±0,001	0,026 ±0,001
360	0,072 ±0,001	0,074 ±0,001	0,076 ±0,004	0,056 ±0,001	0,033 ±0,000	0,020 ±0,002	0,016 ±0,004

Ek 20. Mandalina kabukları ile kopigmente edilmiş antosiyanin çözeltisi kahverengileşme verileri

Zaman (dakika)	pH 2,2	pH 2,8	pH 3,2	pH 3,6	pH 4,2	pH 4,8	pH 5,4
0	0,129 ±0,001	0,148 ±0,027	0,125 ±0,009	0,124 ±0,001	0,111 ±0,004	0,117 ±0,000	0,108 ±0,001
30	0,125 ±0,001	0,119 ±0,001	0,122 ±0,004	0,116 ±0,001	0,120 ±0,001	0,116 ±0,001	0,100 ±0,000
60	0,125 ±0,002	0,116 ±0,001	0,121 ±0,003	0,117 ±0,001	0,108 ±0,025	0,107 ±0,001	0,091 ±0,000
120	0,119 ±0,001	0,101 ±0,033	0,113 ±0,001	0,114 ±0,001	0,104 ±0,003	0,104 ±0,005	0,090 ±0,001
240	0,116 ±0,001	0,117 ±0,002	0,110 ±0,001	0,104 ±0,001	0,093 ±0,004	0,088 ±0,001	0,086 ±0,001
360	0,115 ±0,000	0,105 ±0,001	0,107 ±0,000	0,102 ±0,001	0,087 ±0,001	0,085 ±0,001	0,083 ±0,001

Ek 21. Gül petalleri ile kopigmente edilmiş antosiyanin çözeltisi kahverengileşme verileri

Zaman (dakika)	pH 2,2	pH 2,8	pH 3,2	pH 3,6	pH 4,2	pH 4,8	pH 5,4
0	0,111 ±0,004	0,113 ±0,003	0,113 ±0,001	0,114 ±0,001	0,124 ±0,017	0,099 ±0,017	0,107 ±0,004
30	0,120 ±0,095	0,110 ±0,003	0,115 ±0,002	0,116 ±0,000	0,111 ±0,002	0,106 ±0,003	0,095 ±0,077
60	0,109 ±0,002	0,109 ±0,002	0,107 ±0,001	0,108 ±0,001	0,104 ±0,083	0,097 ±0,000	0,109 ±0,002
120	0,107 ±0,003	0,104 ±0,001	0,103 ±0,001	0,107 ±0,002	0,097 ±0,005	0,088 ±0,000	0,103 ±0,083
240	0,110 ±0,004	0,098 ±0,002	0,104 ±0,003	0,103 ±0,002	0,091 ±0,003	0,081 ±0,001	0,106 ±0,085
360	0,098 ±0,001	0,099 ±0,080	0,104 ±0,001	0,103 ±0,003	0,085 ±0,000	0,080 ±0,001	0,106 ±0,073

ÖZGEÇMİŞ

Adı-Soyadı: Betül BAY

Doğum Tarihi: 27.09.1988

Eğitim Durumu:

Derece	Bölüm/Program	Üniversite	Yıl
Lisans	Gıda Mühendisliği	Gaziantep Üniversitesi	2007-2012
Yüksek Lisans	Gıda Mühendisliği	Mersin Üniversitesi	2012-

Görevler:

Görev Unvanı	Görev Yeri	Yıl
Arş. Gör.	Mersin Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü	2013-