

**KARA HAVUÇ (*Daucus carota* var L.) ANTOSİYANİNLERİNİN
FERULİK ASİT İLE KOPİGMENTASYONU**

ÖZLEM İSTANBULLU

**Mersin Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü**

**Gıda Mühendisliği
Ana Bilim Dalı**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Tez Danışmanı
Doç. Dr. İ. Nüzhet TÜRKER**

**MERSİN
HAZİRAN – 2007**

Bu tezin gerek bilimsel içerik, gerekse elde edilen sonuçlar açısından tüm gerekleri sağladığı kanaatine ulaşan ve aşağıda imzaları bulunan biz jüri üyeleri, sunulan tezi oy birliği ile Yüksek Lisans Tezi olarak kabul ediyoruz.

Tez Danışmanı
Doç. Dr. İ. Nüzhet TÜRKER

Jüri Üyesi
Prof. Dr. H. İbrahim EKİZ

Jüri Üyesi
Prof. Dr. Mahir TURHAN

Jüri Üyesi
Doç. Dr. A. Murat GİZİR

Jüri Üyesi
Yrd. Doç. Dr. Nermin ŞİMŞEK KUŞ

Bu tezin Fen Bilimleri Enstitüsü yazım kurallarına uygun olarak yazıldığı Enstitü Yönetim Kurulu'nun/...../.....tarih ve/..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Mahir TURHAN
Enstitü Müdürü

Not: Bu tezde kullanılan özgün bilgiler, şekil, çizelge ve fotoğraflardan kaynak göstermeden alıntı yapmak 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunu hükümlerine tabidir.

ÖZ

Bu çalışmada kara havuçta bulunan beş farklı antosiyanin saflaştırılıp ayrıştırılmıştır. Antosiyanin pigmentlerinde ayrıştırılmadan (5P) ve ayrıştırıldıktan sonra (P1, P2, P3, P4 ve P5) pH 1-5 aralığında ve 10, 20, 30°C sıcaklıklarda ferulik asit ile kopigmentasyon tepkimesi gerçekleştirilmiştir.

Kopigment eklenmiş tüm antosiyanin çözeltilerinin ve referans antosiyanin çözeltilerinin HPLC'de analizleri yapılmıştır. Elde edilen kromotogramlarda 280 nm (fenolik bileşikler), 330 nm (açillenme) ve 520 nm (antosiyanin) dalga boylarında ilgili referans kromotogramlarından farklı, yeni bir bileşik oluştuğunun göstergesi olan, yeni pikler saptanmamıştır.

Tüm kara havuç antosiyaninlerinde (P1-P5 ve 5P) kopigmentasyon sonrasında, maksimum dalga boyunda ($\lambda_{\max\text{-kopigment}}$) kayma meydana geldiği görülmüştür. P1-P5'in maksimum dalga boyundaki kayma değerleri ($\Delta\lambda_{\max\text{-kopigment}}$) pH 1-5 aralığında genel olarak 8-13 birim, 5P için ise 3-8,5 birimdir.

Kopigment eklenen antosiyanin çözeltilerinin referans çözeltilerine göre absorbans artışlarının (ΔABS) pH 2'nin üzerinde başladığı görülmüştür. ΔABS değerleri pH 3-5 aralığında 0,01-0,05 birim olarak belirlenmiştir.

Anahtar kelimeler: Kopigmentasyon, kara havuç, antosiyanin

ABSTRACT

In this study five different anthocyanins present in black carrot were purified and thereafter separated. Copigmentation reactions were carried with ferulic acid in anthocyanin pigments before separation (5P) and after separation (P1, P2, P3, P4 and P5) at pH 1-5 range and at 10, 20, 30°C.

HPLC analysis of all the anthocyanin-copigment and reference solutions were done. New and different peaks from the related reference chromatograms indication of the formation new compounds were not detected in the chromatograms at the wavelengths 280 nm (phenolic compounds), 330 nm (acylation) and 520 nm (anthocyanin).

After copigmentation, a shift was observed at the maximum wavelength ($\lambda_{\text{max-copigment}}$) for all of the anthocyanins (P1-P5 ve 5P). Shifts at the maximum wavelength ($\Delta\lambda_{\text{max-copigment}}$) at the pH 1-5 range were generally in the range 8-13 units for P1-P5 and 3-8,5 units for 5P.

The absorbance of the anthocyanin-copigment solutions, based on the absorbances of the reference solutions (ΔABS) increased over pH 2. ΔABS values were calculated as 0,01-0,05 unit at the pH range of 3-5.

Key words: Copigmentation, black carrot, anthocyanin

TEŞEKKÜR

Bu tezin her aşamasında büyük emeği geçen, bana her konuda her zaman yardımcı olan ve yol gösteren değerli danışman hocam Doç. Dr. İ. Nüzhet 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. Mahir TURHAN'a, sayın Prof. Dr. H. İbrahim EKİZ'e ve Gıda Mühendisliği Bölümü değerli öğretim üyelerine,

Değerli katkılarından dolayı Kimya Bölümü öğretim üyeleri Doç. Dr. A. Murat GİZİR ve Yrd. Doç. Dr. Nermin ŞİMŞEK KUŞ'a,

Bana her konuda yardımcı olup yanımda olan Arş. Gör. A. Başak KIRIT'a, Gıda Mühendisi Erdem ARTUVAN'a ve bana her zaman destek olan tüm bölüm arkadaşlarıma,

Her zaman benim yanımda olan sevgili ev arkadaşlarım Sevil ve Sevilay'a

Sevgi ve destekleri ile hep yanımda olan annem, babam, kardeşim ve halama sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZ	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ÇİZELGELER DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR	ix
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI	3
2.1. ANTOSİYANİNLER.....	3
2.2. ANTOSİYANİNLERİN YAPISI.....	4
2.3. ANTOSİYANİNLERİN KARARLILIĞINA ETKİ EDEN FAKTÖRLER	5
2.4. ANTOSİYANİNLERİN KOPİGMENTASYONU.....	5
2.4.1. Kopigmentler.....	6
2.4.2. Molekül-içi Kopigmentasyon.....	7
2.4.3. Moleküller-arası Kopigmentasyon.....	9
2.4.4. Moleküllerin Kendi Aralarında Birleşmesi.....	10
2.4.5. Moleküllerin Metaller ile Kompleks Oluşturması.....	11
2.5. KARA HAVUÇ ANTOSİYANİNLERİ.....	12
3. MATERYAL ve METOT	12
3.1. KARA HAVUÇ ANTOSİYANİNLERİNİN ÖZÜTLENMESİ.....	15
3.2. ANTOSİYANİN ÖZÜTLERİNİN SAFLAŞTIRILMASI.....	15
3.3. ANTOSİYANİN PİGMENTLERİNİN AYRIŞTIRILMASI.....	15
3.4. ANTOSİYANİN PİGMENTLERİNİN DERİŞTİRİLMESİ VE	18
KURUTULMASI	

3.5. ANTOSİYANİN PİGMENTLERİNİN KOPİGMENTASYONU.....	18
3.6. HPLC ANALİZLERİ.....	19
4. BULGULAR ve TARTIŞMA.....	21
4.1. P1 KOPİGMENTASYONU.....	21
4.2. P2 KOPİGMENTASYONU.....	25
4.3. P3 KOPİGMENTASYONU.....	27
4.4. P4 KOPİGMENTASYONU.....	29
4.5. P5 KOPİGMENTASYONU.....	31
4.6. 5P KOPİGMENTASYONU.....	33
5. SONUÇ ve ÖNERİLER	40
KAYNAKLAR	41
ÖZGEÇMİŞ.....	46

ÇİZELGELER DİZİNİ

ÇİZELGE		<u>Sayfa</u>
Çizelge 4.1.	P1-P5 ve 5P antosiyaninlerinin farklı pH ve sıcaklıklarda kopigmentasyonu sonucu elde edilen $\Delta\lambda_{\max}$ değerleri.....	23
Çizelge 4.2.	P1-P5 ve 5P antosiyaninlerinin farklı pH ve sıcaklıklarda kopigmentasyonu sonucu elde edilen Δ ABS değerleri.....	24

ŞEKİLLER DİZİNİ

ŞEKİL		Sayfa
Şekil 2.1.	Antosiyanidin' in yapısı.....	3
Şekil 2.2.	Sulu ortamda antosiyaninin dengedeki formları.....	4
Şekil 2.3.	Molekül-içi kopigmentasyon.....	7
Şekil 2.4.	Pelargonidin 3- <i>O</i> -[6- <i>O</i> -malonyl- β -D-glucopyranoside]-7- <i>O</i> -[6- <i>O</i> -(<i>trans</i> -caffeyl)- β -D-glucopyranosyl)-caffeyl)- β -D-glucopyranoside].....	8
Şekil 2.5.	Moleküller-arası kopigmentasyon.....	9
Şekil 2.6.	Moleküllerin kendi aralarında birleşmesi.....	11
Şekil 2.7.	Antosiyaninlerin metaller ile kompleks oluşturması.....	12
Şekil 2.8.	Kara havuçta bulunan fenolik asitlerin kimyasal yapıları.....	12
Şekil 2.9.	Kara havuçta bulunan açilli antosiyaninlerin kimyasal yapıları....	13
Şekil 2.10.	Kara havuçta bulunan antosiyaninlere ait kromatogram.....	13
Şekil 3.1.	Ayrıştırılan kara havuç antosiyaninlerine ait kromatogramlar.....	16-17
Şekil 4.1.	P1'in 10°C, 20°C ve 30°C'de kopigmentasyonu sonucu elde edilen λ_{max} değerleri.....	22
Şekil 4.2.	P1'in referans ve kopigmente göre 10°C, 20°C ve 30°C'deki ABS değişim oranları.....	24
Şekil 4.3.	P2'nin 10°C, 20°C ve 30°C'de kopigmentasyonu sonucu elde edilen λ_{max} değerleri.....	26
Şekil 4.4.	P2'nin referans ve kopigmente göre 10°C, 20°C ve 30°C'deki ABS değişim oranları.....	27
Şekil 4.5.	P3'ün 10°C, 20°C ve 30°C'de kopigmentasyonu sonucu elde edilen λ_{max} değerleri.....	28
Şekil 4.6.	P3'ün referans ve kopigmente göre 10°C, 20°C ve 30°C'deki ABS değişim oranları.....	29
Şekil 4.7.	P4'ün 10°C, 20°C ve 30°C'de kopigmentasyonu sonucu elde edilen λ_{max} değerleri.....	30
Şekil 4.8.	P4'ün referans ve kopigmente göre 10°C, 20°C ve 30°C'deki ABS değişim oranları.....	31

Şekil 4.9.	P5'in 10°C, 20°C ve 30°C'de kopigmentasyonu sonucu elde edilen λ_{\max} değerleri.....	32
Şekil 4.10.	P5'in referans ve kopigmente göre 10°C, 20°C ve 30°C'deki ABS değişim oranları.....	33
Şekil 4.11.	5P'nin 10°C, 20°C ve 30°C'de kopigmentasyonu sonucu elde edilen λ_{\max} değerleri.....	34
Şekil 4.12.	5P'nin referans ve kopigmente göre 10°C, 20°C ve 30°C'deki ABS değişim oranları.....	35
Şekil 4.13.	5P'nin 20 °C pH 3'te (a) referans ve (b) kopigment eklenmiş antosiyanin çözeltilerinin kromatogramları.....	36
Şekil 4.14.	Ferulik asit ve siyanidin-3-ksilozil-glukozil-galaktozit arasında oluşabilecek hidrojen bağları.....	37

SİMGELER ve KISALTMALAR

ABS	: Absorbans
λ_{\max}	: Maksimum dalga boyu
$\lambda_{\max\text{-kopigment}}$: Kopigment eklenmiş çözeltilerin maksimum dalga boyu
$\lambda_{\max\text{-referans}}$: Referans çözeltilerinin maksimum dalga boyu
ΔABS	: Absorbans farkı
$\Delta\lambda_{\max\text{-kopigment}}$: Kopigment eklenmiş çözeltilerin maksimum dalga boyundaki kayma değeri
P1	: Siyanidin-3-ksilozil-glukozil-galaktozit
P2	: Siyanidin-3-ksilozil-galaktozit
P3	: Sinapik asit ile açillenmiş siyanidin-3-ksilozil-glukozil-galaktozit
P4	: Ferulik asit ile açillenmiş siyanidin-3-ksilozil-glukozil-galaktozit
P5	: Kumarik asit ile açillenmiş siyanidin-3-ksilozil-glukozil-galaktozit
5P	: Ayırıştırılmamış kara havuç antosiyaninleri

1. GİRİŞ

Bir ürünün kabul edilebilirliği o üründen beklenen renk özelliklerine bağlıdır. Tüketiciler, bir ürünün kalitesine ilk önce, satın alma kararlarını da etkileyen ürün rengine bakarak karar verirler. Gıdaların daha çekici olması için renklendirilmesi yeni bir buluş değildir. Çok eski zamanlardan beri gıdalara eklenen baharat ve çeşniler sadece tadı geliştirmek için değil aynı zamanda rengi de geliştirmek için kullanılmıştır.

1856 yılında ilk sentetik boyanın bulunuşundan sonra başka boyalar için araştırmalar başlamıştır. Sonraki yıllarda 700' e yakın sentetik boya bulunmuştur. Daha sonra, bu boyalardan zararlı olanların kaldırılmasıyla kullanılacak sentetik boya sayısı azaltılmıştır. Sentetik boya kullanımının güvenliği sorgulanmış ve kullanılabilir sentetik boyaların azalmasıyla birlikte daha uygun seçenekler araştırılmaya başlanılmıştır. Bu da insanları doğal boyalar ile ilgili araştırma yapmaya yöneltmiştir [1, 2].

Yapay gıda boyalarına getirilen kısıtlamalar, doğal kaynaklardan elde edilen boyalara olan ilginin artmasına neden olmuştur. Bunların arasında antosiyaninler, doğada yaygın olarak bulunmaları ve renk özellikleri nedeniyle en çok çalışılan renk maddelerinden biridir. Antosiyaninler birçok meyve ve sebzeye kırmızı, mavi ve mor rengini veren, doğada yaygın olarak bulunan renk maddeleridir. Renk özelliklerinin yanı sıra sağlık açısından yararlı olmaları nedeniyle antosiyaninlere olan ilgi son zamanlarda artmıştır. Antosiyaninler bazı renkli gıdaların antioksidan özelliklerine önemli katkıda bulunmaktadır [1-4].

Ancak kararlılıklarının düşük olması, kolayca bozunabilmeleri veya başka maddelerce kolayca tepkimeye girmeleri sonucu renksiz veya esmer renkli bileşiklere dönüşebilmeleri, karmaşık gıda sistemlerinde önemli bir problem olarak karşımıza çıkmaktadır.

Son yıllarda yapılan araştırmalar bitkilerdeki renk kararlılığını sağlayan ana mekanizmanın antosiyaninler ile kopigmentler arasındaki moleküler etkileşimler ile oluşan kopigmentasyon olduğunu gstermektedir. Kopigmentasyonun en etkili şekillerinden biri aromatik ve/veya alifatik asitlerin antosiyanidin çekirdeğine şeker molekölü aracılığı ile açillenmesidir (molekül-içi kopigmentasyon) [5, 6]. Diğer bir kopigmentasyon şekli ise, antosiyanin ve kopigment moleküllerinin moleküller arası kovalent olmayan etkileşimidir (moleküller arası kopigmentasyon) [5, 7, 8].

Kara havuçta hepsi siyanidin türevleri olan beş farklı antosiyanin bulunmaktadır. Bunlardan iki tanesi açilsiz, üç tanesi tek-açilli antosiyaninlerdir. Açilsiz antosiyaninler siyanidin-3-ksilozil-glukozil-galaktozit ve siyanidin-3-ksilozil-galaktozit; diğer üçü ise sinapik, ferulik ve kumarik asitlerle açillenmiş siyanidin-3-ksilozil-glukozil-galaktozit'lerdir [1, 9, 10]. Kara havuçtaki tek-açilli ve açilsiz antosiyaninlerin kararlılığı moleküller arası kopigmentasyon ile arttırılabilir.

Bu çalışmada kara havuçta bulunan beş farklı antosiyanin özütlenip saflaştırılmıştır. Saflaştırılan antosiyanin özütünden her bir antosiyanin ayrıştırılarak saf antosiyaninler elde edilmiştir. Antosiyaninlerde kopigmentasyon tepkimeleri sonucunda maksimum dalga boyundaki kayma (batokromik kayma) ve maksimum dalga boyunda absorbans artışı (hiperkromik etki) meydana gelmesi kopigmentasyonun gerçekteştiğini gstermektedir. Bu sebeple ayrıştırılmamış saf antosiyanin özütünde ve beş farklı antosiyaninde kopigmentasyon gerçekteştirmek amacıyla farklı pH (1-5) ve sıcaklık (10, 20 ve 30°C) değerlerinde ferulik asit eklenerak batokromik kayma ve hiperkromik etki incelenmiştir.

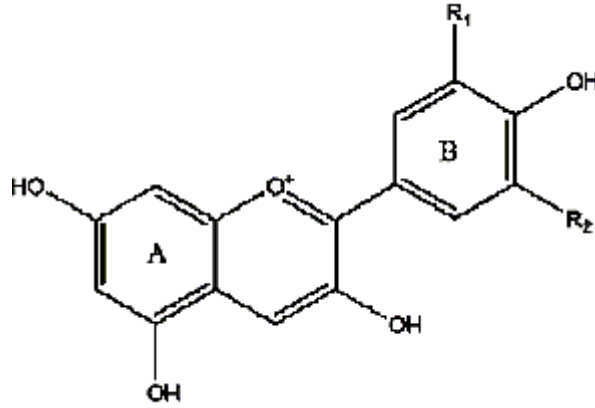
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. ANTOSİYANİNLER

Antosiyaninler meyve, sebze ve çiçeklerin kendilerine özgü, pembe, kırmızı, viole, mavi ve mor tonlarındaki çeşitli renklerini veren, suda çözünebilir nitelikli doğal renk maddeleridir.

Antosiyaninler, antosiyanidinlerin glikozitleridir ve flavonoid grubuna dahildirler. Doğada antosiyaninler serbest halde bulunmazlar ve daima bir veya birkaç şeker molekülü ile esterleşmiş halde yani antosiyaninler halinde bulunurlar.

Antosiyaninlerin yapısının temelini, 2-fenilbenzopirilium (flavilium katyonu) (Şekil 2.1) oluşturmaktadır [2, 5, 11, 12].



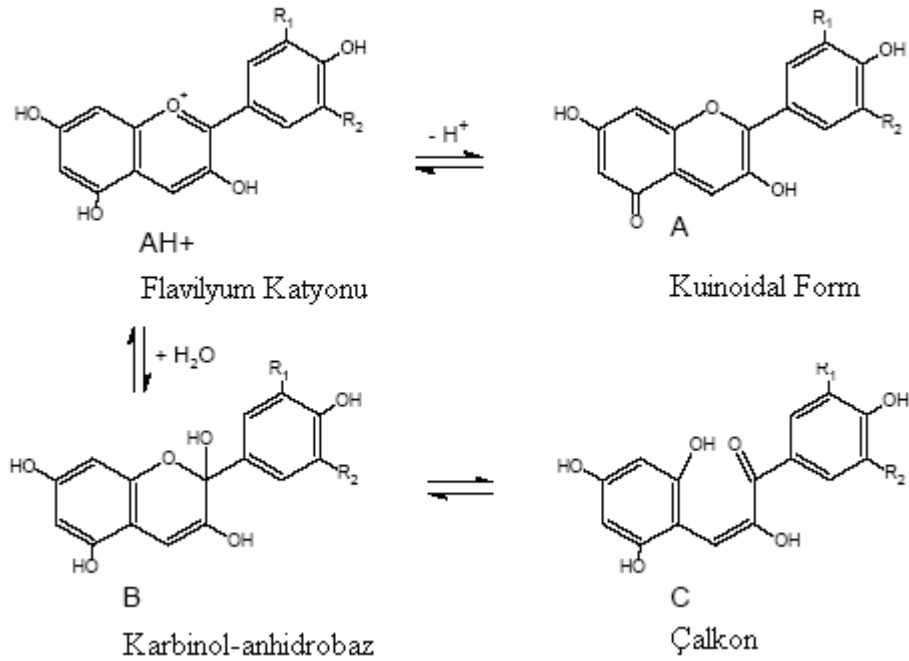
Şekil 2.1. Antosiyanidin' in yapısı

R_1 ve R_2 gruplarına farklı grupların bağlanmasıyla farklı antosiyanidinler oluşur. Başlıca antosiyanidinler; pelargonidin, siyanidin, delphinidin, peonidin ve malvidindir. Bunlar arasında en yaygın bulunanı siyanidindir [5, 11, 13].

2.2. ANTOSİYANİNLERİN YAPISI

Antosiyaninler doğada antosiyanidinlerin glikozitleri olarak bulunurlar ve glikozit uçlara bağlanmış alifatik veya aromatik asitler de içerebilirler. Ferulik asit, sinapik asit, gallik asit, *p*-hidroksibenzoik asit, *p*-kumarik asit gibi aromatik asitlerle açillenme antosiyaninler üzerinde kararlılığın artması açısından önemli etkiye sahiptir [1].

Antosiyaninler asitli sulu çözeltilerinde kuinoidal form A, flavilyum katyonu AH^+ , karbinol veya psödobaz B, ve çalkon C formu olmak üzere dört ayrı denge formunda bulunurlar (Şekil 2.2). Ortamın pH değeri 2'nin altına düşünce antosiyanin flavilyum katyonu (AH^+) halinde ortama hakim olur ve renk kırmızıdır. pH yükselince karbinol psödobaz formunun (B) miktarı artarken, buna paralel olarak flavilyum katyonu formu (AH^+) aynı düzeyde azalır. Denge halindeyken hangi formun hakim olduğu, ortamın pH değerine bağlıdır. pH değeri değiştikçe bu dört farklı yapı birbirine dönüşebilir [5, 6, 11].



Şekil 2.2. Sulu ortamda antosiyaninin dengedeki formları

2.3. ANTOSİYANİNLERİN KARARLILIĞINA ETKİ EDEN FAKTÖRLER

Antosiyaninlerin kararlılığını etkileyen etmenler moleköl yapısı, sıcaklık, pH, kopigmentler, ışık, metalik iyonlar, oksijen, askorbik asit, şekerler ile bunların bozunma ürünleri, proteinler ve sülfür dioksittir [14].

Antosiyaninin kimyasal yapısı; yapısal değişiklik, glikosillenme örüntüsü, B halkasının hidroksillenme ve metoksillenmesi ve aromatik ve / veya alifatik asitlerle açillenme, antosiyaninin kararlılığını etkilemektedir [9, 15-17]. Antosiyanin molekülünde hidroksil grubu (-OH) sayısı arttıkça renkte mavilik, metoksil grubu (-OCH₃) sayısı arttıkça kırmızılık artmaktadır [13, 18].

Açilli antosiyaninler, özellikle düzlemsel aromatik bileşenlere sahip olanlar, asitliği düşük çözeltilerde tutulduklarında mono- ve diglikozidik antosiyaninlere oranla çok daha kararlı renge sahiptirler [19]. Çoğu antosiyaninlerin rengi ortamın pH değerine bağlı olarak bir indikatör gibi değişim gösterirler. Düşük pH değerlerinde mor-kırmızı, daha yüksek pH değerlerinde ise yeşil-mavi bir renk alırlar [11, 13].

2.4. ANTOSİYANİNLERİN KOPİGMENTASYONU

Son yıllarda yapılan araştırmalar bitkilerdeki renk kararlılığını sağlayan ana mekanizmanın antosiyaninler ile diğer fenolik maddeler, daha genel bir tanımlamayla kopigmentler, arasındaki moleküler etkileşimler olduğunu göstermektedir. Kopigmentasyon, renkli antosiyaninin düzlemsel polarize çekirdek formuna (flavilyum iyonu, kuinoidal formları) kopigment molekülünün tutunmasıyla oluşmaktadır. Bu şekilde, renksiz hemiketal ve kalkon formlarının oluşmasına neden olan, pirilyum çekirdeğindeki C2 konumuna suyun nükleofilik atağı kısmen de olsa engellenmiş olur. Bunun sonucunda, verilen bir pH değerinde, antosiyanin çözeltileri çok daha yoğun renge sahip olur (hiperkromik etki). Ayrıca, antosiyanin-kopigment kompleksinin görünür bölgedeki maksimum absorbansının dalga boyu serbest antosiyanininkinden daha yüksektir (batokromik kayma) [20-23].

Kopigmentasyonun yoğunluğu antosiyanin ve kopigmentasyon derişimlerine, bunların kimyasal yapılarına, ortam pH ve sıcaklığına, çözelti özelliklerine bağlıdır. Araştırmalar, kopigmentasyonun gerçekleşmesi için ortam polaritesinden çok sıvı suyun benzersiz hidrojen-bağ moleküler yapısının önemli olduğunu ortaya koymuştur. Hidrofobik etkileşimler pigment ve kopigmenti bir araya getiren önemli kuvvetlerdir. Kopigment etkisi, sadece sulu çözeltilerin özelliği olan bir çözelti-çözgen etkileşimi olarak görünmektedir [24].

Antosiyanin-kopigment derişimleri, sıcaklık, iyonik güç, çözücü ve pH değerinin benzer olduğu koşullar altında antosiyaninin metoksillenme ve glikozillenme derecesi ile birlikte kopigmentasyon etkisi artmaktadır [7].

Kırmızı üzüm antosiyaninlerinin model meyve suyunun askorbik asit varlığında 25 °C ve 35 °C' de depolanmasının kararlılığına etkisi incelenmiştir. Biberiye polifenolik kofaktörleri (0, 0,2 ve %0,4) kullanılmıştır. Kofaktör eklenmesinin meyve sularında daha yoğun kırmızı renk gözlenmesine, hiperkromik etki (%178) ve batokromik kayma (23 nm) meydana gelmesine sebep olduğu belirtilmiştir [25].

Açilli antosiyaninlerin rutin ve farklı kopigmentlerle yapılan kopigmentasyonu UV/Vis spektrofotometre ile incelenmiştir. Kopigmentasyon sonrasında batokromik kayma ve hiperkromik etki meydana geldiği bulmuşlardır. Batokromik kayma ve hiperkromik etki şiddetinin kopigment miktarına ve kullanılan kopigmentlere göre farklılık gösterdiği belirtilmiştir [26]

Malvinin klorojenik asit ile yapılan kopigmentasyonunda sıcaklığın yükseltilmesinin, metanol, formamid veya sodyum klorür eklenmesinin kopigment etkisini azalttığı belirtilmiştir [24].

2.4.1. Kopigmentler

Antosiyaninlerle kompleks oluşturarak kararlı ve farklı renkli bileşikler oluşturan maddelere kopigment denir. Kopigmentler genellikle renksizdirler, ancak

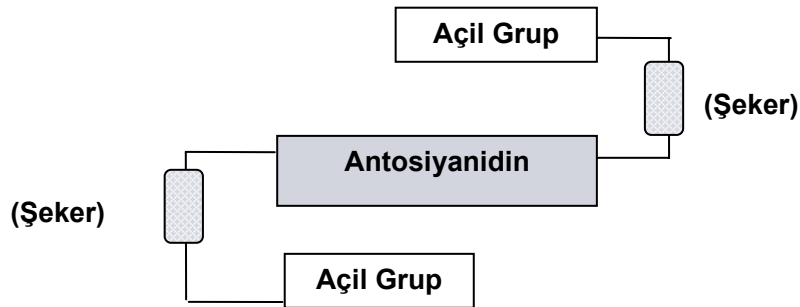
antosiyeninlerle kompleks oluşturunca onların renklerini güçlendirip kararlı hale getirmektedir. Kopigment olarak flavanoidler, polifenoller, alkaloidler, amino asitler, organik asitler, bazı mineraller ile antosiyeninlerin kendileri gösterilebilir [11, 21, 24].

Fenolik asitlerden hidroksisünamik asitler bitkisel gıdalarda yaygın olarak bulunurlar. Bunlar arasında yer alan ferulik asit, kafeik asit ve kumarik asit önem taşımaktadır [11, 13].

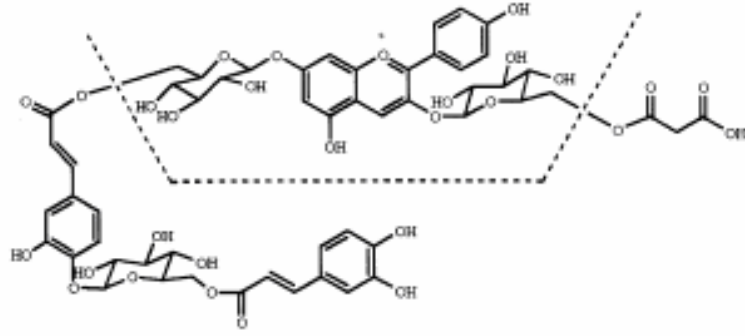
Farklı antosiyeninlerle yapılan kopigmentasyon çalışmaları sonucunda en etkili kopigmentlerin ferulik asit, rosmarinik asit olduğu belirtilmiştir [27].

2.4.2. Molekül-içi Kopigmentasyon

Kopigmentasyonun en etkili şekillerinden biri pigment ile kopigmentin uygun bir ara molekül aracılığıyla kovalent bağlanmasıdır. Bu da antosiyenidlere bağlı şeker gruplarının fenolik asitlerle açillenmesi şeklinde olmaktadır. Bu açillenmiş pigmentlerde, kopigmentasyon aromatik açil gruplarının flavilyum çekirdeği üzerine düzlemsel katlanmasıyla gerçekleşir (Şekil 2.3, Şekil 2.4). Açilli antosiyeninlerin özellikle gıda boyası olarak tercih edilmesinin nedeni, açilsiz antosiyeninlerin neredeyse renksiz oldukları pH 4-5 aralığında kararlı bir renge sahip olmalarıdır [19, 22, 28-31].



Şekil 2.3. Molekül-içi kopigmentasyon



Şekil 2.4. Pelargonidin 3-O-[6-O-malonyl-β-D-glucopyranoside]-7-O-[6-O-(*trans*-caffeyl)-β-D-glucopyranosyl)-caffeyl]-β-Dglucopyranoside]

Kırmızı şarapların olgunlaşması sırasında antosiyaninler ve kopigment arasındaki etkileşimler meydana gelmektedir. Farklı çeşitlerdeki şaraplara pirüvik asit eklenmesi sonucunda malvidin-3-glukozit ve pirüvik asit arasındaki etkileşimden dolayı vitisin A oluşumunun arttığı belirtilmiştir [32, 33]. Bu yeni antosiyanin türevlerinin maksimum oluşumunun pH 2,7-3,0 aralığında ve yüksek pirüvik asit derişimlerinde olduğu bildirilmiştir [32].

Dört farklı şarap türünün yıllandırılması sırasında antosiyanin miktarının kopigment kompleksinin oluşması için yeterli olduğu, fakat kopigmentlerin antosiyaninlere göre molar oranlarının renk üzerinde önemli bir etki meydana gelebilmesi için çok düşük olduğu belirtilmiştir [34]. Şaraplarda fermentasyon öncesinde kafeik asit eklenmesinin renk gelişimine katkıda bulunduğu belirtilmektedir. Bu da kırmızı şaraplarda kopigmentasyonun önemli bir etkileşim olduğunu göstermektedir [35].

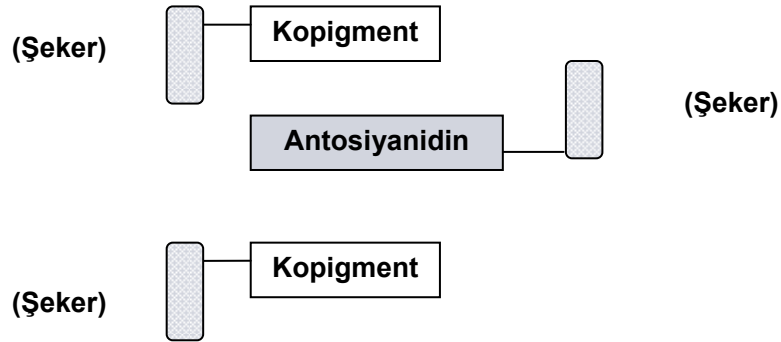
Remy ve ark. [36], farklı şarap örneklerinde, tiyoliz öncesi ve sonrasında yapılan LC/MS analizleri ile tanenler ve antosiyaninler arasında kovalent yapı oluşumunu ortaya koymuşlardır.

2.4.3. Moleküller-arası Kopigmentasyon

Diğer bir kopigmentasyon şekli ise, antosiyanin ve kopigment moleküllerinin moleküller-arası kovalent olmayan etkileşimidir (hidrofobik kompleks oluşumu) (Şekil 2.5) [7, 29]. Bu kopigmentasyon şekli, *in vivo* koşullarda antosiyaninlerin yapısal kararlılığını arttıran en etkili faktör olarak görülmektedir [8].

Eiro ve Heinonen [27], beş farklı antosiyanin ve fenolik asit kullanarak 6 aylık depolama süresinde moleküller arası reaksiyonları incelemişler ve kullanılan antosiyaninler için en iyi kopigmentlerin ferulik asit ve rosmarinik asit olduğunu belirtmişlerdir. Depolama süresince, eklenen kopigmentler ile antosiyanin kararlılığının arttığını görmüşlerdir.

Tek-açilli antosiyaninlerde molekül-içi kopigmentasyona ek olarak fenolik asitlerle moleküller arası kopigmentasyon ile de renk kararlılığı artırılabilir [22].



Şekil 2.5. Moleküller-arası kopigmentasyon

Farklı antosiyanin ve kopigmentler ile çalışmalar yapılarak molekül yapısı, pH, pigment-kopigment derişiminin antosiyanin ve renksiz fenolik bileşiklerin kopigmentasyon reaksiyonları üzerine etkisi incelenmiştir [7, 21]. Klorojenik asit, kafeik asit ve rutin için açilli pelargonidin, monardein için gösterdikleri kopigmentasyon etkisinin pelargonidin-3-glikozit ve malvin çözeltileri için gösterdikleri etkiden daha büyük olduğu belirtilmiştir. Maksimum kopigmentasyon

etkisi klorojenik asit için pH 3,2-3,7; kafeik asit ve rutin için pH 3,5-4,7 aralığında gözlenmiştir [21].

Malvinin pH 2,50 ve pH 3,65 değerlerinde kafeik asit ve ferulik asit ile kopigmentasyonu gerçekleştirilmiştir. Kopigmentasyon sonrası sadece görünür bölge spektrumlarındaki batokromik kayma ve hiperkromik etki dışında UV bölgede açıl gruplarının oluşumunu gösteren yeni band oluşumu gözlenmemiştir [8]. Yeni band oluşumunun gözlenmemesi, batokromik kayma ve hiperkromik etkinin meydana gelmesi moleküller arası kopigmentasyonun gerçekleştiğini göstermektedir.

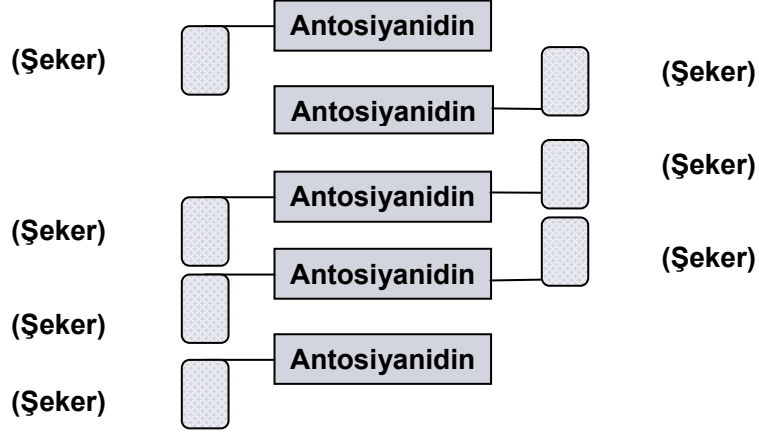
Malvidin 3,5-diglukozit ve apigenin 7-glukozit arasındaki kopigmentasyon tepkimesinin varlığı ortaya konulmuş ve optimum tepkime koşulları belirlenmiştir. pH 3,65 tampon çözeltisinde 1:2 optimum molar oranda gerçekleşen kopigmentasyon tepkimesi sonucunda batokromik kayma ($\Delta\lambda=24$ nm)ve hiperkromik etki ($\Delta A=0,340$) meydana geldiği bildirilmiştir [37].

Kopigmentasyon kompleksinin stabilitesi üzerine sıcaklık, UV ışını ve karanlıkta ve ışık altında üç aylık depolamanın etkisi incelenmiştir. Kopigment olarak kuersetin-5-sülfonik asit, morin-5-sülfonik asit, rutin, kuersetin, klorojenik asit, tannik asit ve *Scutellaria baicalensis* Georgi flavonları kullanılmıştır. Kullanılan kopigmentler siyanidin-3-glukozit'in renk kararlılığını ve yoğunluğunu geliştirdiği belirtilmiştir. Maksimum kopigmentasyon etkisi ise pH 3,5 değerinde olduğu rapor edilmiştir. UV ışını kopigment kompleksi üzerinde 80 °C'de ısıtmaktan daha fazla bir degradasyon etkisi gösterdiği depolama süresince direk güneş ışığı antosiyanin-kopigment kompleksinin kararsızlığını tanımlamada önemli bir etken olduğu belirtilmiştir [38].

2.4.4. Moleküllerin Kendi Aralarında Birleşmesi

Asen ve ark. (1972)'na göre [6], antosiyanin konsantrasyonunun 10^{-4} M' dan 10^{-2} M' a artırılması sonucunda maksimum dalga boyunun 507 nm'den 502 nm' ye

değişmekte ve renk yoğunluğunda 300 kat artış olmaktadır. Bu değişimin antosiyanin moleküllerinin kendi aralarında birleşmesi sonucu olduğunu belirtilmiştir (Şekil 2.6).



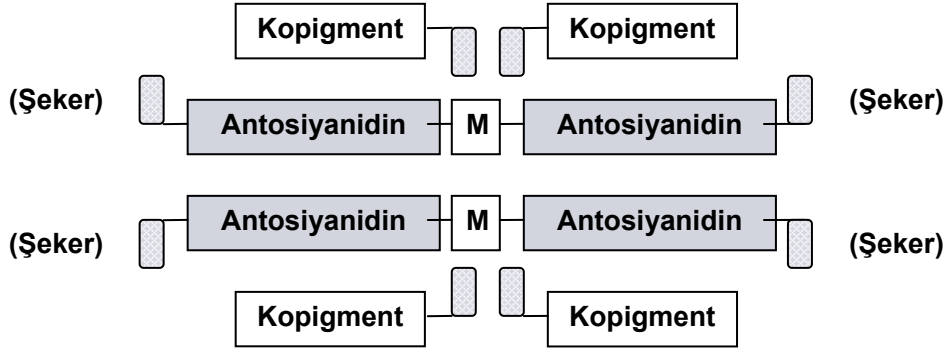
Şekil 2.6. Moleküllerin kendi aralarında birleşmesi

Ribéreau-Gayon (1982)'na göre [6], şarapların yıllandırılması sırasında antosiyaninlerin kendi aralarında birleştiği gözlenmiş ve kendi aralarında birleşmesi sonucu olarak, yıllanmış şarapların renk özelliklerine katkıda bulunabilecekleri ifade edilmiştir.

2.4.5. Moleküllerin Metaller ile Kompleks Oluşturması

Bazı antosiyaninler demir, magnezyum, alüminyum, potasyum, bakır ve diğer bir çok metal iyonları ile kompleks oluşturarak kararlılığı artırmaktadır (Şekil 2.7) [6, 11].

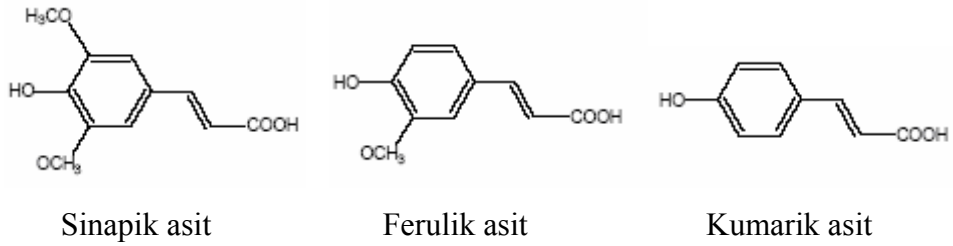
Osawa (1982)'ya göre [6], sadece siyanidin, delfinidin ve petunidin gibi aglikonun B-halkasında birden fazla serbest hidroksil grubuna sahip sahip antosiyaninler metal şelat oluşumuna eğilimlidirler.



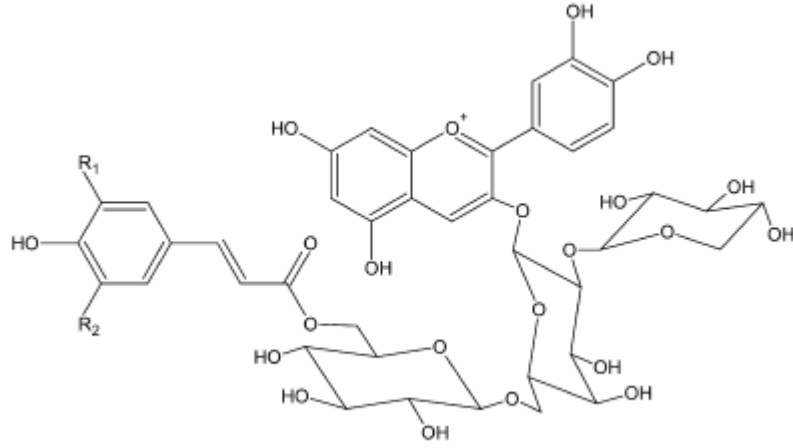
Şekil 2.7. Antosiyaninlerin metaller ile kompleks oluşturması

2.5. KARA HAVUÇ ANTOSİYANİNLERİ

Kara havuç antosiyaninleri, gıda pH'sında rengini kaybetmeyen ve yüksek ısı kararlılığına sahip, büyük oranda üç şeker birimi içeren tek-açilli olan antosiyaninler olarak tanımlanmaktadır. Kara havuçta yer alan ve hepsi siyanidin türevleri olan beş farklı antosiyanin bulunmaktadır. Bunlardan iki tanesi açılız, üç tanesi açilli antosiyaninlerdir. Açılız antosiyaninler siyanidin-3-ksilozil-glukozil-galaktozit ve siyanidin-3-ksilozil-galaktozit; diğer üçü ise sinapik, ferulik ve kumarik asitlerle (Şekil 2.8) açillenmiş siyanidin-3-ksilozil-glukozil-galaktozit'lerdir (Şekil 2.9) [1, 9, 10].



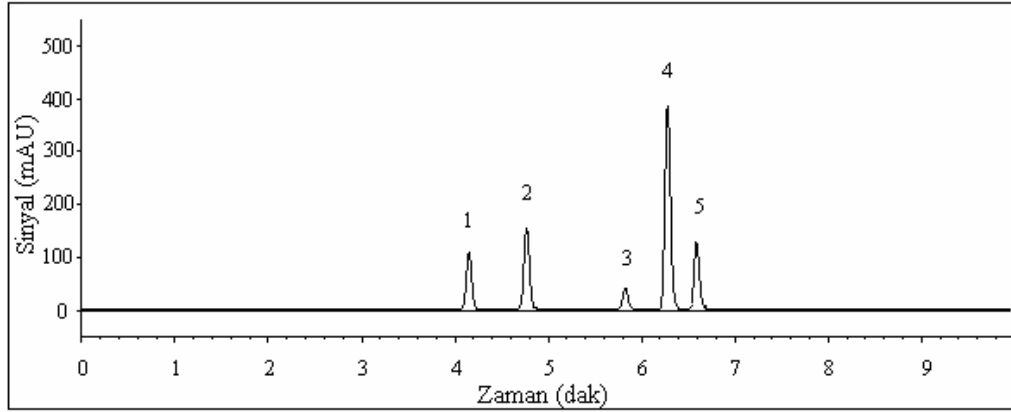
Şekil 2.8. Kara havuçta bulunan fenolik asitlerin kimyasal yapıları



Cy 3-(2''Xyl-6''-p-coumaroylGlc-Gal) :	R ₁ =H	R ₂ =H
Cy 3-(2''Xyl-6''-feruloylGlc-Gal) :	R ₁ =H	R ₂ =H
Cy 3-(2''Xyl-6''-sinapoylGlc-Gal) :	R ₁ =H	R ₂ =H

Şekil 2.9. Kara havuçta bulunan açilli antosiyaninlerin kimyasal yapıları

Kara havuçta bulunan antosiyaninlerin profili Şekil 2.10'de gösterilmiştir.



Şekil 2.10. Kara havuçta bulunan antosiyaninlere ait kromatogram; 1: siyanidin-3-ksilozil-glukozil-galaktozit, 2: siyanidin-3-ksilozil-galaktozit; 3: Sinapik asit ile açillenmiş siyanidin-3-ksilozil-glukozil-galaktozit, 4: Ferulik asit ile açillenmiş siyanidin-3-ksilozil-glukozil-galaktozit, 5: Kumarik asit ile açillenmiş siyanidin-3-ksilozil-glukozil-galaktozit

Kara havuç, gıda pH değerlerinde artan renk kararlılığına sahip yüksek oranda tek-açilli antosiyanin yapısı ile tanımlanması, kolayca oksitlenebilen antosiyanin

olmayan fenolik maddelerden yoksun olması açısından son derece uygun bir antosiyanin kaynağıdır. Ayrıca, diğ er havuç kùltùrlerine gùre duyusal avantajlara sahiptir. Bu üç özellik, kara havucun gıda boyası olarak kullanımını desteklemektedir [39].

3. MATERYAL ve METOT

3.1. KARA HAVUÇ ANTOSİYANİNLERİNİN ÖZÜTLENMESİ

Çalışmada özütleme işleminin yapılması amacıyla Konya bölgesinden temin edilen Kara havuç, Sitrik Asit (Riedel-de Haën), kaba filtre kağıdı ve cam hazneli parçalayıcı (8011ES MODEL HGB2WTS3, USA) kullanılmıştır.

Kara havuç, 0,1 M Sitrik Asit çözeltisi içerisine konularak parçalayıcıda parçalanmış ve kaba filtreden geçirilmiştir.

3.2. ANTOSİYANİN ÖZÜTLERİNİN SAFLAŞTIRILMASI

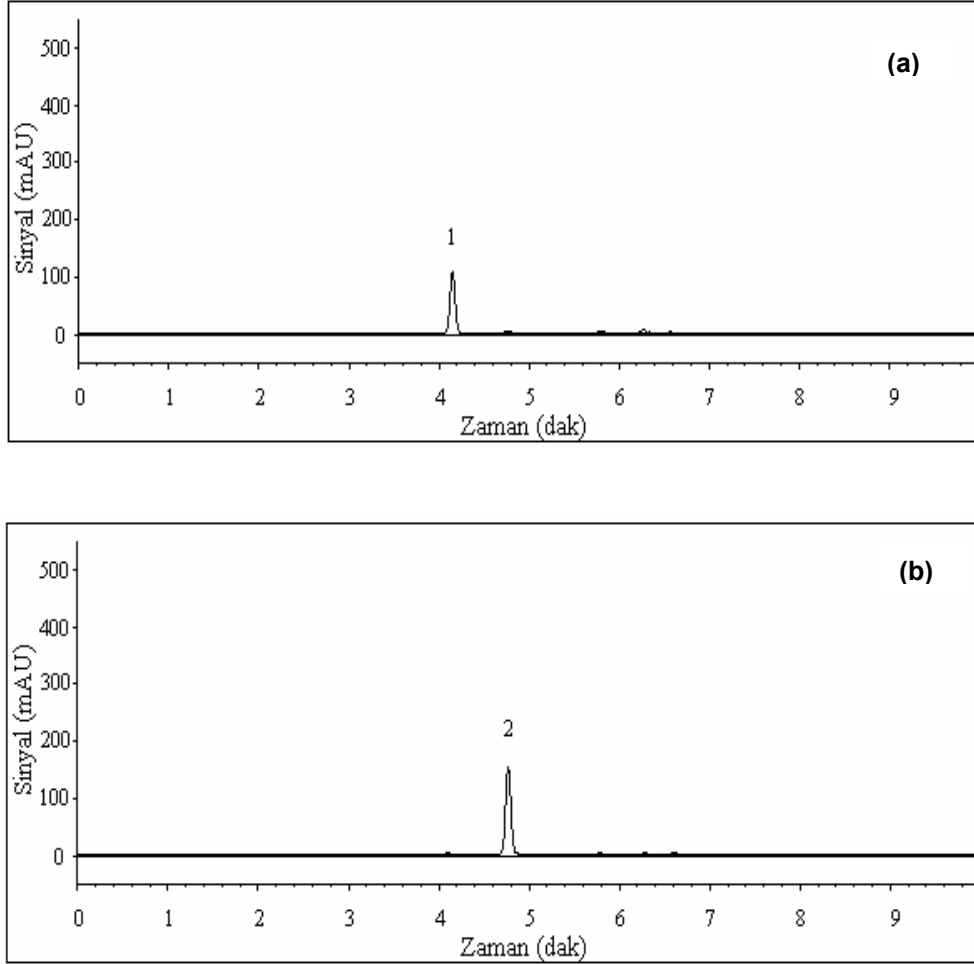
Özütün saflaştırılması için Amberlite XAD7 (Sigma, 37380-43-1, Germany) reçinesi, cam kolon (İdam, Teflon musluklu, 325 mL), vakumlu evaporatör (BUCHI Rotavapor R-3000, Switzerland), metanol (J.T.Baker, 8045, Holland), hidroklorik asit (Merck, 1.00314.2500, Germany) ve saf su kullanılmıştır.

Kaba filtreden geçirilen özüt Amberlite XAD7 reçinesi ile doldurulmuş cam kolonlarda saflaştırılmıştır. Reçine doldurulmuş cam kolondan metanol geçirilerek 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 [40]. Elde edilen saf antosiyanin özütü vakumlu evaporatörde 35°C' de deriştirilmiş ve derin dondurucuya (-18°C) konulmuştur.

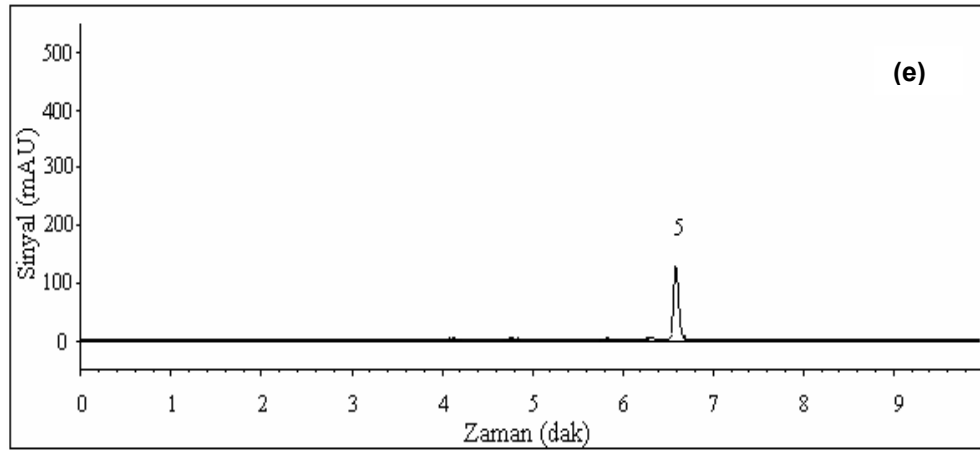
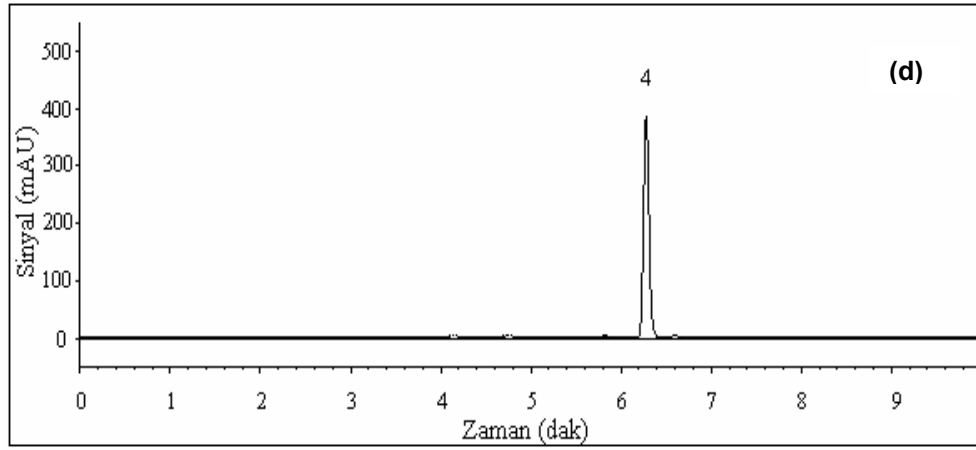
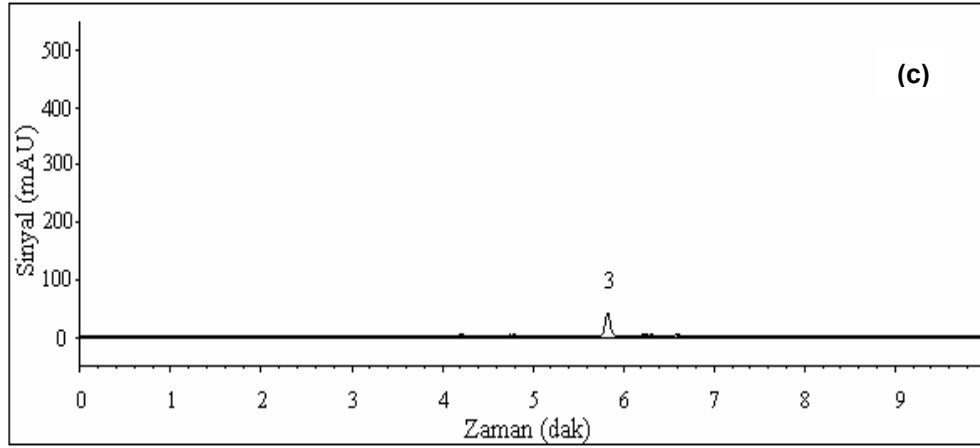
3.3. ANTOSİYANİN PİGMENTLERİNİN AYRIŞTIRILMASI

Deriştirilen özütteki antosiyanin pigmentlerinin ayrıştırılmasında Chemstation (Agilent Tech. 1990-2003) yazılım sistemine sahip, pompa (Agilent 1101, G1311A), gaz giderici (Agilent 1102, G1379A), çoklu dalga boylu dedektör (Agilent 1100,

G1365B), enjektör (manuel, Agilent 1106, G1328B), analitik fraksiyon toplayıcı (Agilent 1200, G1364C)' dan oluşan Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) cihazı kullanılmıştır. Şekil 3.1' de ayrıştırılan kara havuç antosiyaninlerine ait kromatogramlar verilmiştir.



Şekil 3.1. Ayrıştırılan kara havuç antosiyaninlerine ait kromatogramlar: (a) siyanidin-3-ksilozil-glukozil-galaktozit, (b) siyanidin-3-ksilozil-galaktozit



Şekil 3.1. (devam) Ayrıştırılan kara havuç antosiyaninlerine ait kromatogramlar: (c) Sinapik asit ile açılmış siyanidin-3-ksilozil-glukozil-galaktozit, (d) Ferulik asit ile açılmış siyanidin-3-ksilozil-glukozil-galaktozit, (e) Kumarik asit ile açılmış siyanidin-3-ksilozil-glukozil-galaktozit

Hareketli faz olarak %100 asetonitril (Sigma-Aldrich, 34851, Switzerland) (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), % 20 A (55 dak) ve hareketli fazın akış hızı 2 mL/dak olarak ayarlanmıştır. Ayırıcı kolon olarak preparatif C18 kolon (Econosil C18 10u, Lot No.3281, 250x10mm) kullanılmış ve çoklu dalga boylu dedektörde 520 nm dalga boyu ayarlanmıştır.

Kara havuçtan elde edilen saf antosiyanin özütü 0,45 µm'lik filtreden süzöldükten sonra preparatif HPLC'ye 1 mL enjekte edilmiş ve özütte bulunan beş farklı antosiyanin ayrıştırıldıktan sonra (Şekil 3.1) dedektör çıkışına bağlanan fraksiyon toplayıcıda ayrı ayrı şişelere alınmıştır.

3.4. ANTOSİYANİN PİGMENTLERİNİN DERİŞTİRİLMESİ VE KURUTULMASI

Ayrı ayrı şişelerde toplanan beş farklı antosiyanin pigmenti, metanol ile aktifleştirilen Amberlite XAD7 içeren ayrı cam kolonlara (İldam, teflon musluklu, 125 mL) yüklenmiştir. Ayrı kolonlarda tutulan beş farklı antosiyanin pigmenti %0,01 HCl içeren metanol ile kolonlardan alınmıştır. Elde edilen antosiyanin pigmentleri vakumlu evaporatörde 35°C' de deriştirilerek kurutulmuş ve desikatöre konulmuştur.

3.5. ANTOSİYANİN PİGMENTLERİNİN KOPİGMENTASYONU

Kopigmentasyon deneyleri için UV/VIS spektrofotometre (Perkin Elmer Lambda EZ201, USA), pH metre (Hanna Instruments,), inkübatör (Velp Scientifica FOC 225 I, Europe), filtre (0,45µm HV, Millipore Durapore Membrane Filters, Ireland), terazi (Sartorius, BP221 S, Germany), manyetik karıştırıcı (Velp Scientifica, Italy) kullanılmıştır.

Kurutulan antosiyanin pigmentleri bilinen hacimdeki %0,5'lik trifloroasetik asit (Merck, 8.08260.0100, Germany) çözeltisi ile yaklaşık 0,8 ABS olacak şekilde çözündürülmüştür.

Antosiyanin pigmentlerinin kopigmentasyonu için %10 dimetilsülfoksit (Merck, 1.16743.1000, Germany) içeren 0,02 M amonyum asetat (Merck, 1115, Darmstadt-Germany) çözeltisi ile hazırlanan 0,02 M ferulik asit (Alfa Aesar, A13890, Germany) çözeltisi kullanılmıştır.

Kopigmentasyon deneylerinde antosiyanin çözeltileri hacimce 1:1 (antosiyanin çözeltisi:kopigment çözeltisi) olacak şekilde seyreltilerek pH'ı istenen değere derişik amonyak veya hidroklorik asit ile ayarlanmıştır. Referans çözeltileri ise %10 dimetilsülfoksit içeren 0,02 M amonyum asetat çözeltisi ile aynı şekilde hazırlanmıştır. İstenen sıcaklık derecesine ayarlanmış inkübatörde manyetik karıştırıcı üzerinde 30 dak. bekletilmiş ve 0,45 µm'lik filtreden süzöldükten sonra spektrofotometrede 450-700 nm dalga boyları aralığında spektrumları alınarak hiperkromik etki ve batokromik kayma değerleri elde edilmiştir [27].

10, 20 ve 30°C' de, açılız antosiyanin pigmentleri ile pH 1-4, açilli antosiyanin pigmentleri ile pH 2-5, tüm antosiyanin özütüne ise pH 1-5 değerlerinde kopigmentasyon yapılmıştır.

3.6. HPLC ANALİZLERİ

Hareketli faz olarak %100 asetonitril (Sigma-Aldrich, 34851, Switzerland) (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 [41]. 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 ve 520 nm dalga boylarındaki kromatogramları elde edilmiştir.

4. BULGULAR ve TARTIŞMA

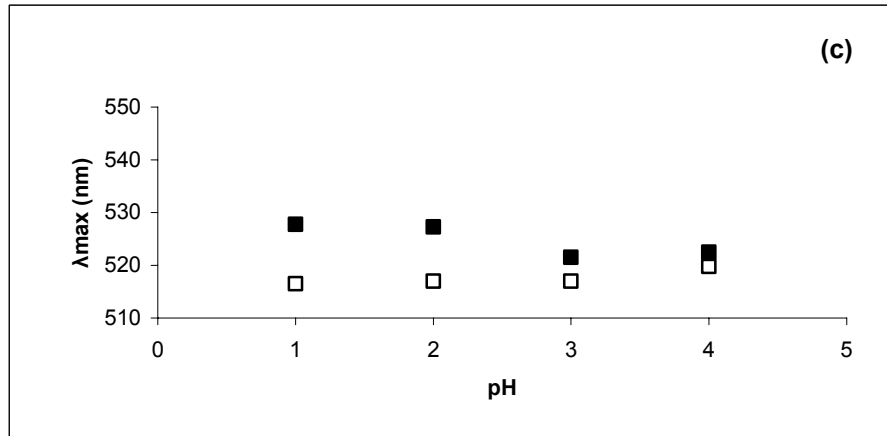
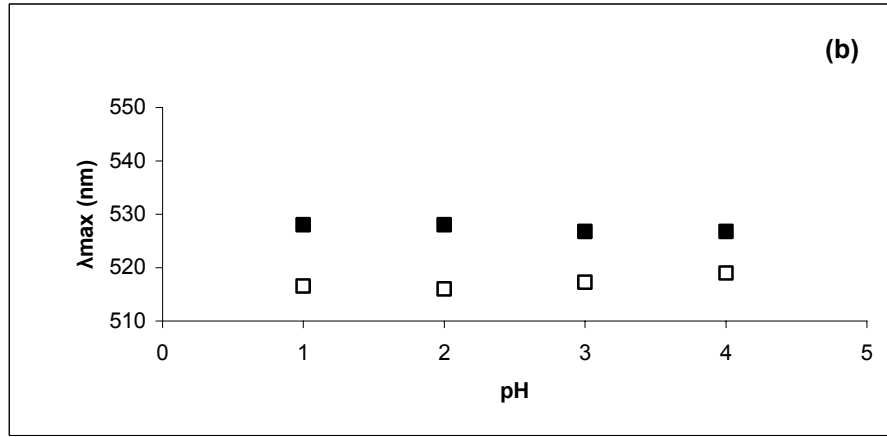
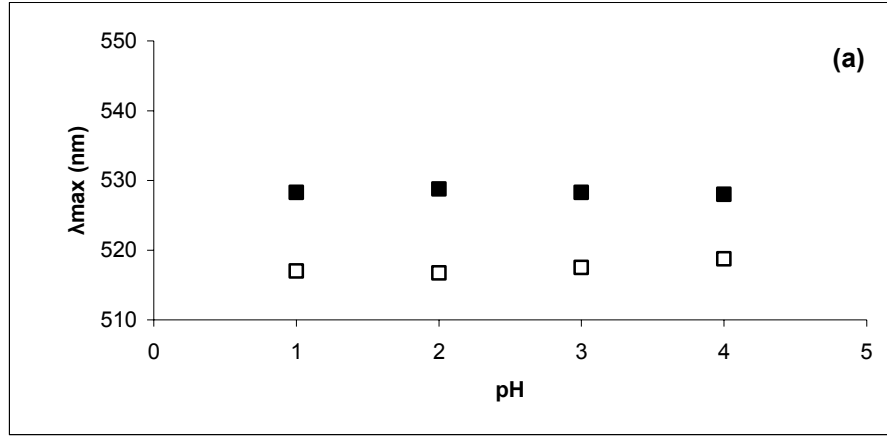
Çalışmada kara havuçta bulunan iki tanesi açısız (P1: siyanidin-3-ksilozil-glukozil-galaktozit; P2: siyanidin-3-ksilozil-galaktozit), üç tanesi tek-açilli (P3: sinapik asit ile açillenmiş siyanidin-3-ksilozil-glukozil-galaktozit; P4: ferulik asit ile açillenmiş siyanidin-3-ksilozil-glukozil-galaktozit; P5: kumarik asit ile açillenmiş siyanidin-3-ksilozil-glukozil-galaktozit) olan beş farklı antosiyanin saflaştırılıp ayrıştırılmıştır. Antosiyanin pigmentlerine ayrıştırılmadan (5P) ve ayrıştırıldıktan sonra (P1, P2, P3, P4 ve P5) farklı pH (1-5) ve sıcaklık (10, 20, 30°C) değerlerinde ferulik asit ile kopigmentasyon gerçekleştirilmiştir. Kopigmentasyon sonrasında hiperkromik etki ve batokromik kayma değerleri incelenmiştir.

4.1. P1 KOPİGMENTASYONU

P1 çözeltisinin 10°C'de pH 1-4 değerlerinde ferulik asit ile gerçekleştirilen kopigmentasyon tepkimesi sonucunda kopigment çözeltilerinin maksimum dalga boylarının ($\lambda_{\max\text{-kopigment}}$), referans çözeltilerinin maksimum dalga boylarından ($\lambda_{\max\text{-referans}}$) daha yüksek değerlerde olduğu saptanmıştır (Şekil 4.1.a).

20°C'de pH 1 değerinde ferulik asit ile gerçekleştirilen kopigmentasyon tepkimesi sonucunda $\lambda_{\max\text{-kopigment}}$ değerlerinin $\lambda_{\max\text{-referans}}$ değerlerinden daha yüksek olduğu belirlenmiştir. pH 2-4 değerleri için de aynı sonuçlar elde edilmiştir (Şekil 4.1.b).

P1 çözeltisinin 30°C'de ferulik asit ile gerçekleştirilen kopigmentasyon tepkimesi sonucunda pH 3 ve pH 4 değerlerinde elde edilen maksimum dalga boylarındaki kayma değerleri ($\Delta\lambda_{\max\text{-kopigment}}$) pH 1 ve pH 2'de elde edilen kayma değerlerine göre daha azdır (Şekil 4.1.c).



Şekil 4.1. P1'in (a)10°C (b) 20°C (c) 30°C'de kopigmentasyonu sonucu elde edilen λ_{max} değerleri, referans (\square) ve kopigment (\blacksquare)

$\Delta\lambda_{max-kopigment}$ değerleri pH 1-2'de tüm sıcaklıklar için yüksek ve birbirine yakın değerler olmasına karşın 20°C'de pH 3 değerinde daha az, pH 4 değerinde ise en az

olduğu belirlenmiştir. 30°C’de ise $\Delta\lambda_{\max\text{-kopigment}}$ değeri 20°C’de elde edilen değerlerden daha azdır (Çizelge 4.1). P1 antosiyaninin iyonlaşma sabitinin sıcaklığa bağlı olarak değişeceğinden elde edilen kayma değerlerinin farklılık gösterdiği düşünülmektedir.

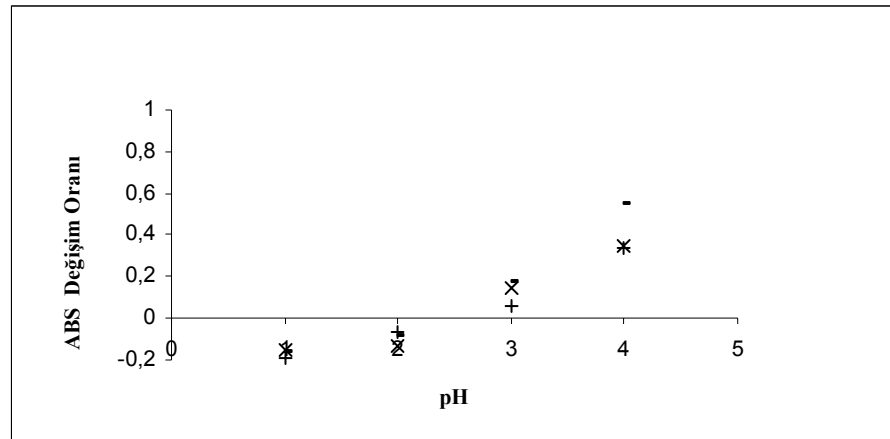
Çizelge 4.1. P1-P5 ve 5P antosiyaninlerinin farklı pH ve sıcaklıklarda kopigmentasyonu sonucu elde edilen $\Delta\lambda_{\max}$ değerleri

T (°C)	pH	$\Delta\lambda_{\max}$					
		P 1	P 2	P 3	P 4	P 5	5P
10°C	1	11,3	12,5				-
	2	12,0	13,0	11,8	7,3	10,8	-
	3	10,8	12,0	11,3	7,3	9,8	-
	4	9,3	8,5	3,3	11,5	9,0	3,5
	5			0,3	10,5	9,3	4,5
20°C	1	11,5	12,5				7,5
	2	12,0	11,8	11,8	11,5	10,5	7,5
	3	9,5	10,5	10,3	10,5	10,3	6,5
	4	7,8	8,5	4,3	5,8	9,8	3,3
	5			1,0	10,0	11,8	3,8
30°C	1	11,3	12,0				8,5
	2	10,3	10,8	11,5	10,8	10,5	8,0
	3	4,5	8,8	9,8	9,0	9,3	7,0
	4	2,8	2,0	3,8	1,8	9,3	3,0
	5			1,3	10,3	0,3	5,8

Kopigment eklenen P1 çözeltilerinin referans çözeltilerine göre absorbanlarında (ABS) tüm sıcaklıklarda pH 1 ve pH 2’de artış olmazken pH 3 ve pH 4 değerlerinde artış olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.2). ABS değişim oranlarının pH artışıyla birlikte pozitif değerlere doğru kaydığı görülmektedir (Şekil 4.2).

Çizelge 4.2. P1-P5 ve 5P antosiyaninlerinin farklı pH ve sıcaklıklarda kopigmentasyonu sonucu elde edilen Δ ABS değerleri

		Δ ABS					
T (°C)	pH	P 1	P 2	P 3	P 4	P 5	5P
10°C	1	-0,063	-0,069				-
	2	-0,030	-0,038	-0,012	-0,061	-0,017	-
	3	0,034	0,029	0,047	0,011	-0,001	-
	4	0,036	0,038	0,051	0,045	0,038	0,037
	5			0,020	0,014	0,017	0,031
20°C	1	-0,061	-0,050				-0,037
	2	-0,043	-0,059	-0,020	-0,018	-0,028	-0,018
	3	0,022	0,017	0,042	0,042	0,014	0,031
	4	0,019	0,008	0,019	0,018	0,018	0,042
	5			0,019	0,007	0,011	0,029
30°C	1	-0,064	-0,068				-0,034
	2	-0,015	-0,037	-0,023	-0,014	-0,009	-0,016
	3	0,005	-0,004	0,007	0,023	0,009	0,011
	4	0,011	0,007	0,009	0,013	0,015	0,030
	5			0,001	0,005	0,012	0,025



Şekil 4.2. P1'in referans ve kopigmente göre 10°C (-), 20°C (x) ve 30°C (+)'deki ABS değişim oranları $((\text{ABSmaxK}-\text{ABSmaxR})/\text{ABSmaxR})$

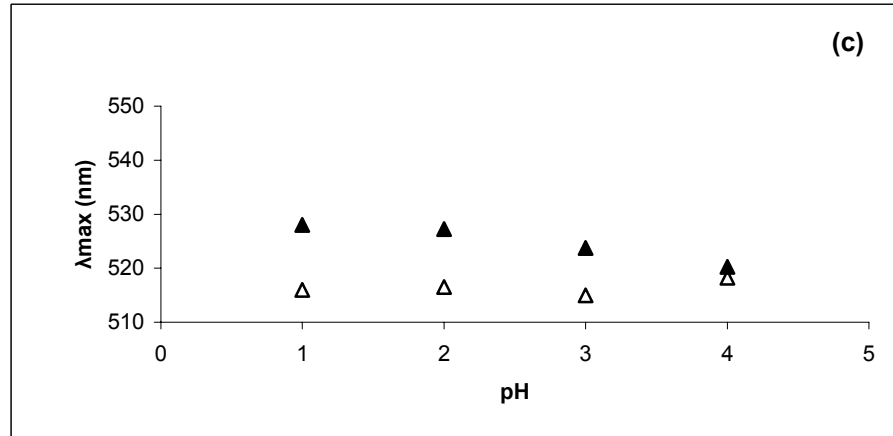
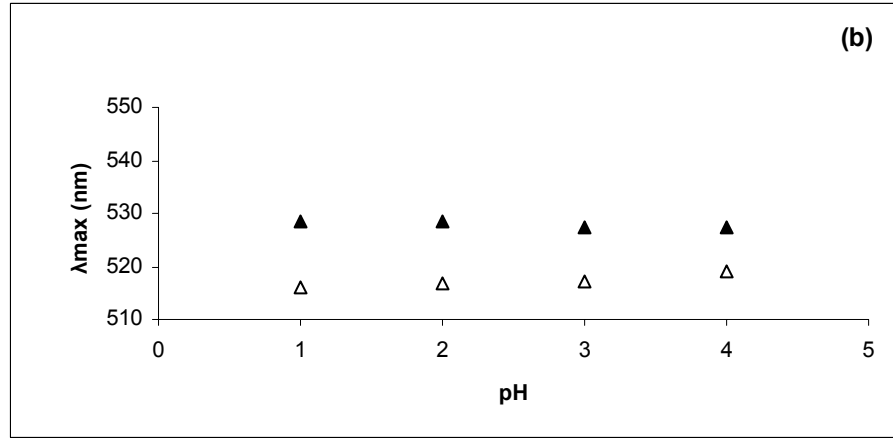
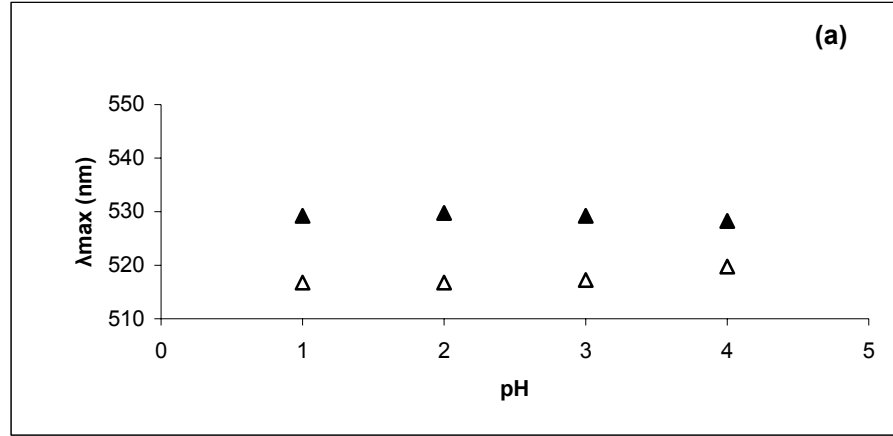
4.2. P2 KOPİGMENTASYONU

10°C’de P2 çözeltilisinin ferulik asit ile gerçekleştirilen kopigmentasyon sonucu en yüksek $\Delta\lambda_{\text{max-kopigment}}$ değeri pH 2’de elde edilirken pH 1 ve pH 3 değerinde daha az, pH 4 değerinde ise en az kayma değerini elde edilmiştir (Şekil 4.3.a).

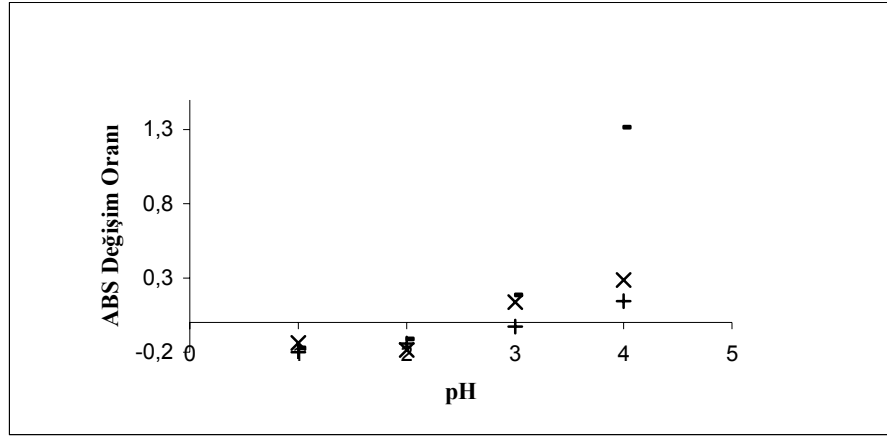
20°C’de pH 1’de ($\lambda_{\text{max-kopigment}}$) değerinin ($\lambda_{\text{max-referans}}$) değerinden daha yüksek olduğu belirlenmiştir. $\Delta\lambda_{\text{max-kopigment}}$ değeri pH 1 değerinde en yüksek iken pH 4 değerine gidildikçe bu değerler azalmaktadır (Şekil 4.3.b).

P2 çözeltilisinin 30°C’de gerçekleştirilen kopigmentasyon tepkimesi sonucunda pH 3’te elde edilen $\Delta\lambda_{\text{max-kopigment}}$ değeri pH 1 ve pH 2 değerlerinde elde edilen $\Delta\lambda_{\text{max-kopigment}}$ değerlerine göre daha azdır, pH 4 değerinde ise en azdır (Şekil 4.3.c).

ABS değerlerinde tüm sıcaklıklarda pH 1 ve pH 2’deki artış olmazken pH 3’te 20 °C’de ABS artışı olmadığı gözlenmiştir (Çizelge 4.2). pH 4 değerlerinde tüm sıcaklıklarda artış olduğu belirlenmiştir. pH 4 değerinde en çok ABS değişim oranı 10°C’de elde edilmiştir. pH artışıyla birlikte ABS değişim oranlarının pozitif değerlere doğru kaydığı görülmektedir (Şekil 4.4).



Şekil 4.3. P2'nin (a) 10°C, (b) 20°C, (c) 30°C'de kopigmentasyonu sonucu referans (△) ve kopigment eklendikten sonraki (▲) λ_{max} değerleri



Şekil 4.4. P2'nin referans ve kopigment 10°C (-) 20°C (x) 30°C (+)'deki ABS değişim oranları ((ABS_{maxK}-ABS_{maxR})/ABS_{maxR})

4.3. P3 KOPİGMENTASYONU

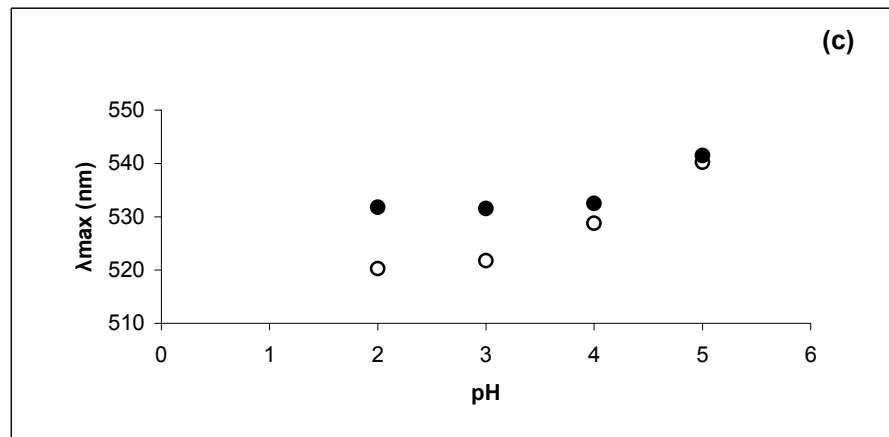
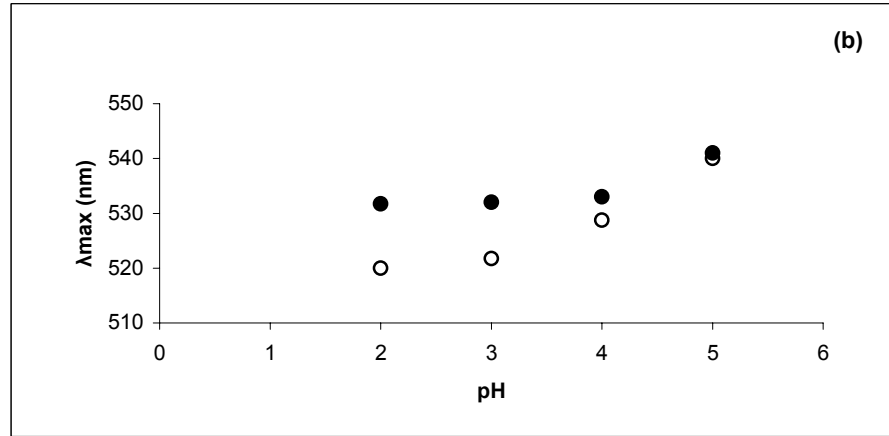
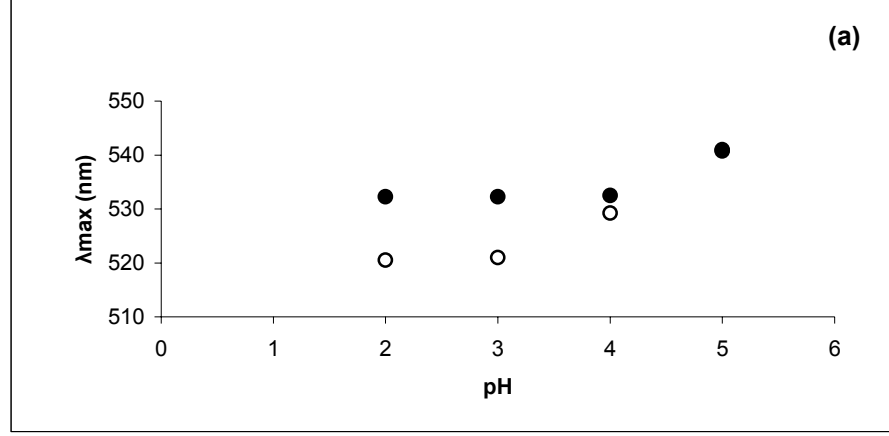
10°C'de P3 çözeltisinin ferulik asit ile gerçekleştirilen kopigmentasyon tepkimesi sonucu en yüksek $\Delta\lambda_{\text{max-kopigment}}$ değeri pH 2 değerinde elde edilirken pH 5 değerine doğru $\Delta\lambda_{\text{max-kopigment}}$ değerinin azaldığı, en az ise pH 5 değerinde olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.5.a).

20°C'de pH 2 değerinde gerçekleştirilen kopigmentasyon tepkimesi sonucunda $\lambda_{\text{max-kopigment}}$ değerinin $\lambda_{\text{max-referans}}$ değerinden daha yüksek olduğu belirlenmiştir. pH 3-5 değerlerinde de aynı sonuçlar elde edilmiştir (Şekil 4.5.b). $\Delta\lambda_{\text{max-kopigment}}$ değerleri pH 2 değerinde en yüksek iken pH 5 değerinde en düşük olduğu saptanmıştır.

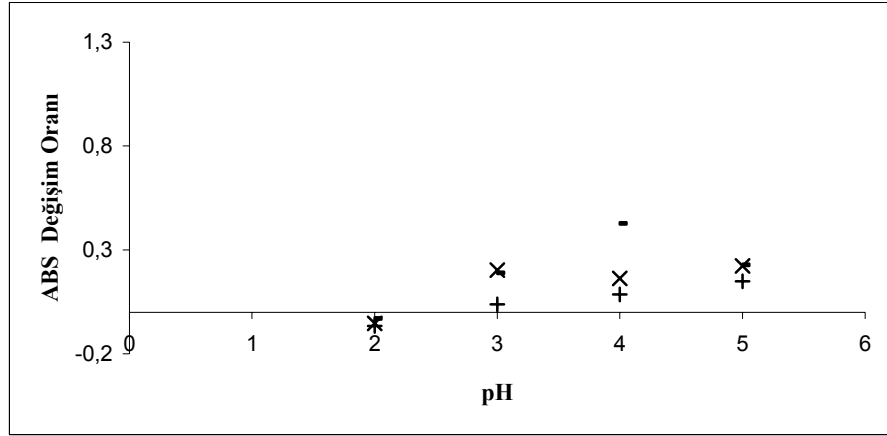
P3 çözeltisinin 30°C'de gerçekleştirilen kopigmentasyon tepkimesi sonucunda kopigment çözeltileri için pH 4-5 değerlerinde elde edilen $\Delta\lambda_{\text{max-kopigment}}$ değerlerinin pH 2-3'te elde edilen $\Delta\lambda_{\text{max-kopigment}}$ değerlerine göre daha az olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.5.c).

ABS değişim oranlarının tüm sıcaklıklarda pH 2 değerinde negatif değerlerde iken pH 3-5 değerlerinde pozitif değerlere doğru kaydığı saptanmıştır. pH 4 değeri

için 10 °C’de değişimin diğer sıcaklık değerlerine göre daha fazla olduğu belirlemiştir (Şekil 4.6).



Şekil 4.5. P3’ün (a)10°C, (b) 20°C, (c) 30°C’de kopigmentasyonu sonucu referans (○) ve kopigment eklendikten sonraki (●) λ_{max} değerleri



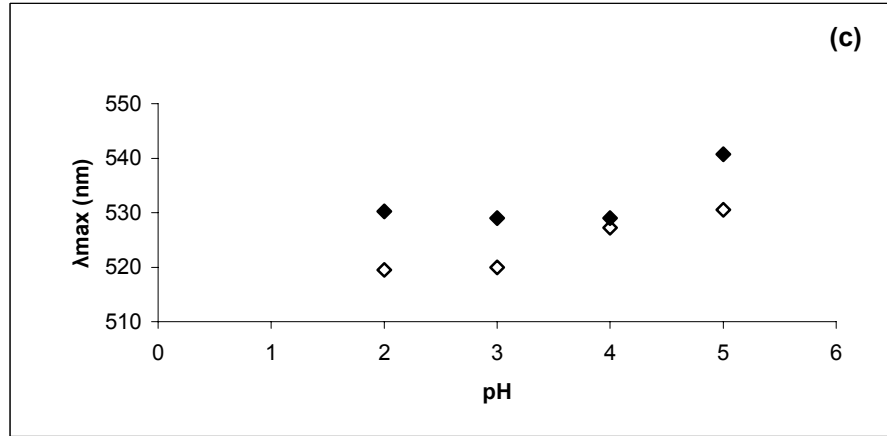
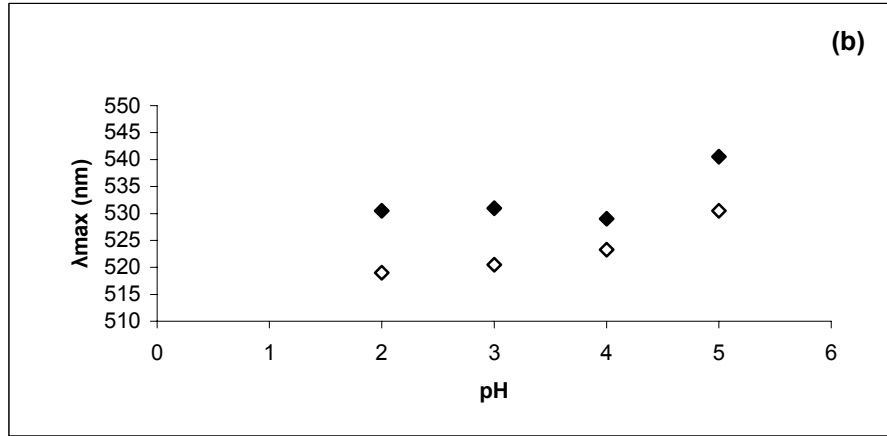
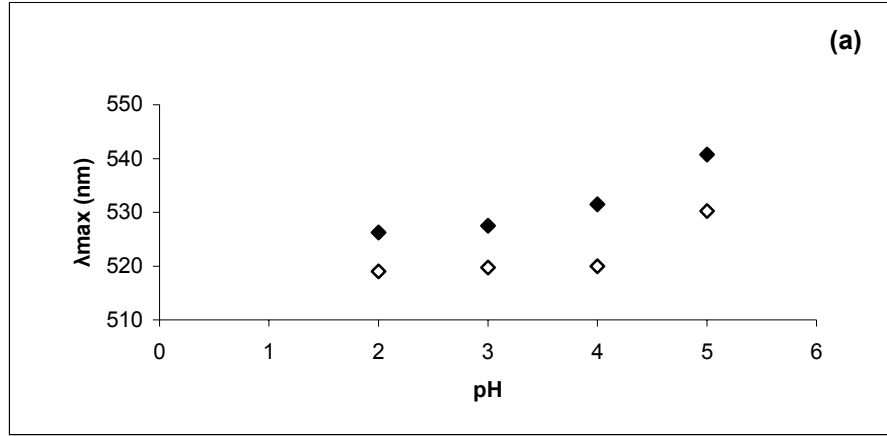
Şekil 4.6. P3'ün 10°C (-) 20°C (x) 30°C (+)'deki ABS değişim oranları ((ABSmaxK-ABSmaxR)/ABSmaxR)

4.4. P4 KOPİGMENTASYONU

10°C'de P4 çözeltisinin ferulik asit ile gerçekleştirilen kopigmentasyon tepkimesi sonucu en yüksek $\Delta\lambda_{\max\text{-kopigment}}$ değerleri pH 4 ve pH 5 değerlerinde elde edilirken pH 2 ve pH 3 değerlerinde elde edilen kayma değerlerinin daha az olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.7.a).

20°C'de pH 4 değerinde gerçekleştirilen kopigmentasyon tepkimesi sonucunda elde edilen $\Delta\lambda_{\max\text{-kopigment}}$ değerinin pH 2-5'te elde edilen kayma değerlerine göre daha az olduğu belirlenmiştir. Elde edilen en yüksek $\Delta\lambda_{\max\text{-kopigment}}$ değeri ise pH 2 değerinde olmuştur (Şekil 4.7.b)

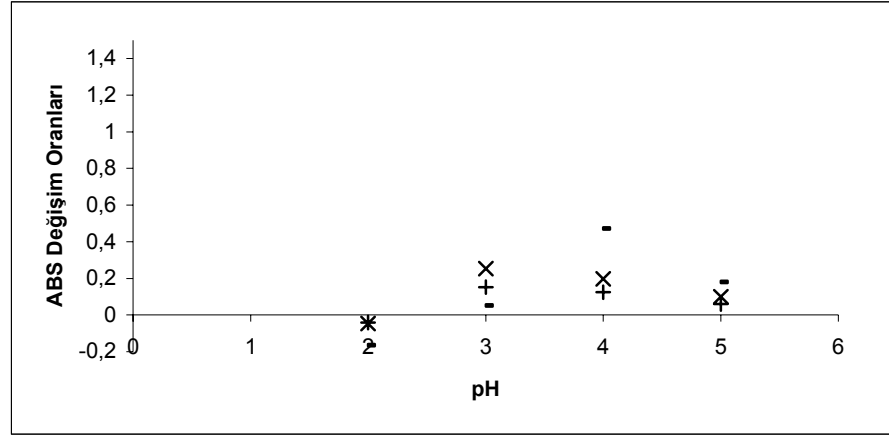
P4 çözeltisinin 30°C'de gerçekleştirilen kopigmentasyon tepkimesi sonucunda $\Delta\lambda_{\max\text{-kopigment}}$ değeri pH 4 değerinde en az olurken, pH 2-5 değerlerinde elde edilen $\Delta\lambda_{\max\text{-kopigment}}$ değerlerinin daha çok olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.7.c).



Şekil 4.7. P4'ün (a)10°C, (b) 20°C, (c) 30°C'de kopigmentasyonu sonucu referans (◇) ve kopigment eklendikten sonraki (◆) λ_{max} değerleri

ABS değişim oranlarının tüm sıcaklıklarda pH 2 değerinde negatif değerde iken pH 3-5 aralığında pozitif değerlere doğru kaydığı saptanmıştır. pH 4 değeri için

10°C’de değişimin diğer sıcaklık değerlerine göre daha fazla olduğu belirlenmiştir (şekil 4.8). ΔABS değerleri izelge 4.2’de verilmiştir.



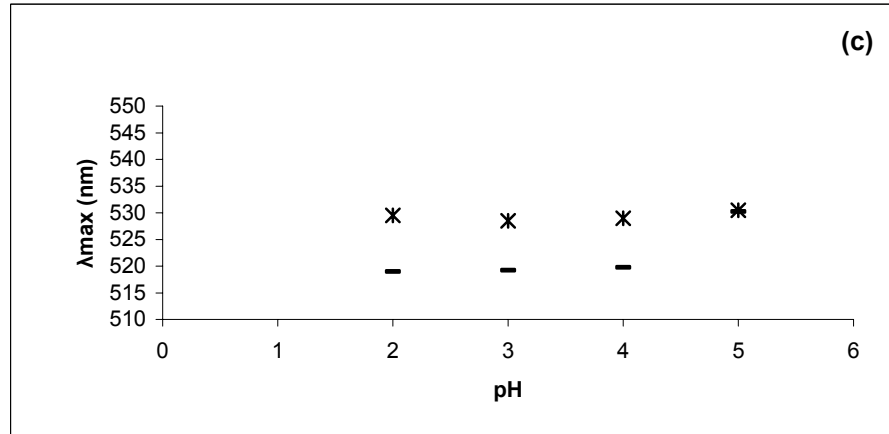
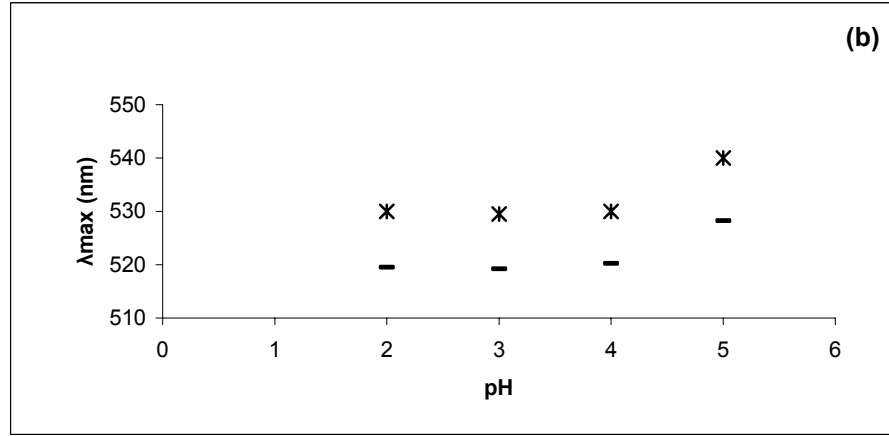
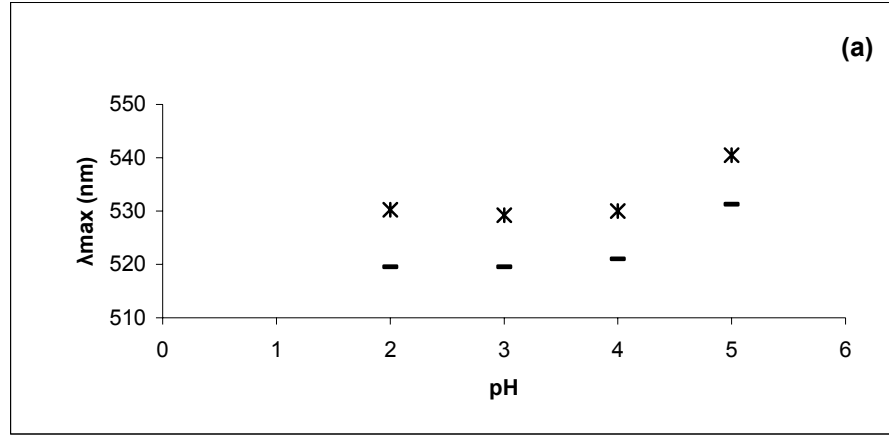
şekil 4.8. P4’n 10°C (-) 20°C (x) 30°C (+)’deki ABS değişim oranları $((\text{ABS}_{\text{maxK}}-\text{ABS}_{\text{maxR}})/\text{ABS}_{\text{maxR}})$

4.5. P5 KOPİGMENTASYONU

10°C’de P5 zeltisinin ferulik asit ile gerçekleştirilen kopigmentasyon tepkimesi sonucu en yüksek $\Delta\lambda_{\text{max-kopigment}}$ değeri pH 2 değerinde elde edilirken en az $\Delta\lambda_{\text{max-kopigment}}$ değerinin ise pH 4 değerinde olduğu belirlenmiştir (şekil 4.9.a).

20°C’de gerçekleştirilen kopigmentasyon tepkimesi sonucunda $\lambda_{\text{max-kopigment}}$ değerlerinin $\lambda_{\text{max-referans}}$ değerlerinden daha yüksek olduğu belirlenmiştir. $\Delta\lambda_{\text{max-kopigment}}$ değerleri pH 5 değerinde en yüksek iken pH 4 değerinde en düşük olduğu saptanmıştır (şekil 4.9.b).

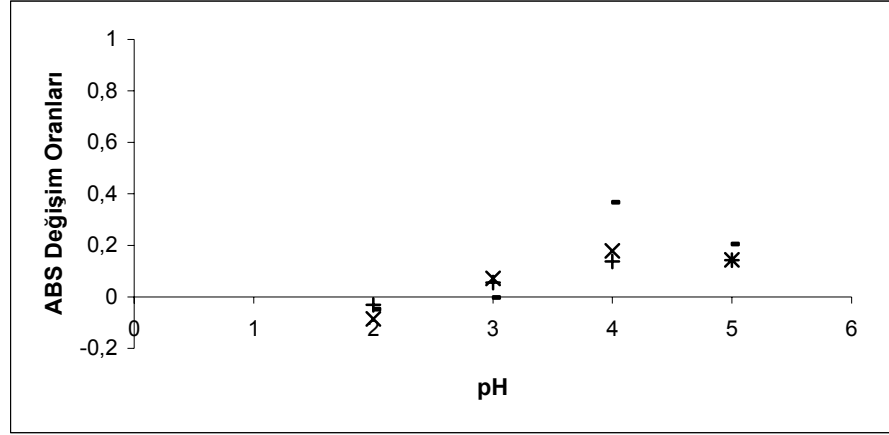
30°C’de gerçekleştirilen kopigmentasyon tepkimesi sonucunda kopigment çözeltileri için pH 2-4’te elde edilen $\Delta\lambda_{\text{max-kopigment}}$ değerlerinin pH 5 değerinde elde edilen $\Delta\lambda_{\text{max-kopigment}}$ değerine göre daha fazla olduğu belirlenmiştir. En yüksek kayma değerinin pH 2 değerinde olduğu, pH 3-4 değerlerinde elde edilen kayma değerlerinin aynı olduğu saptanmıştır (şekil 4.9.c).



Şekil 4.9. P5'in (a)10°C, (b) 20°C, (c) 30°C'de kopigmentasyonu sonucu referans (-) ve kopigment eklendikten sonraki (*) λ_{max} değerleri

Kopigment çözeltilerinin referans çözeltilerine göre ABS değişimlerinin tüm sıcaklıklarda pH 2 değerinde negatif değerlerde iken pH 3, pH 4 ve pH 5

değerlerinde pozitif değerlerde olduğu saptanmıştır. 10 °C’de pH 4 değeri için ABS değişim oranının diğer sıcaklık değerlerinde olan ABS artış oranına göre daha fazla olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.10).



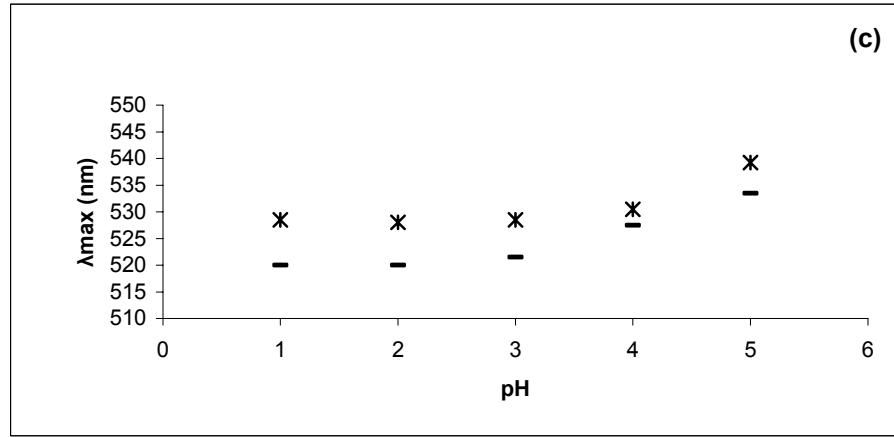
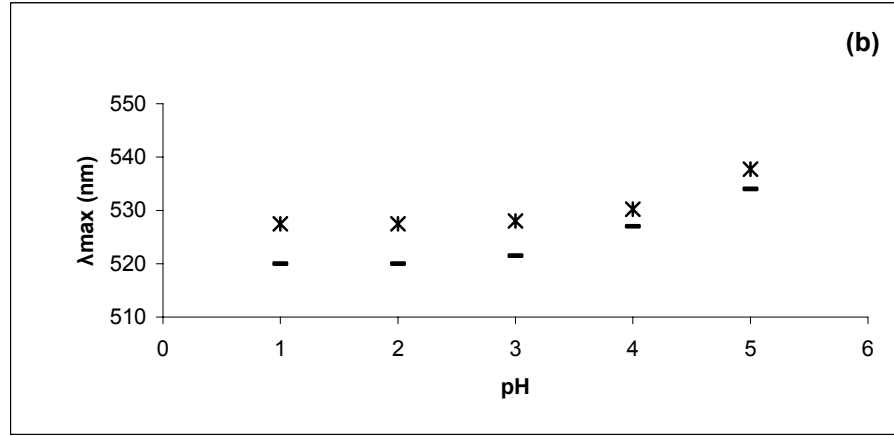
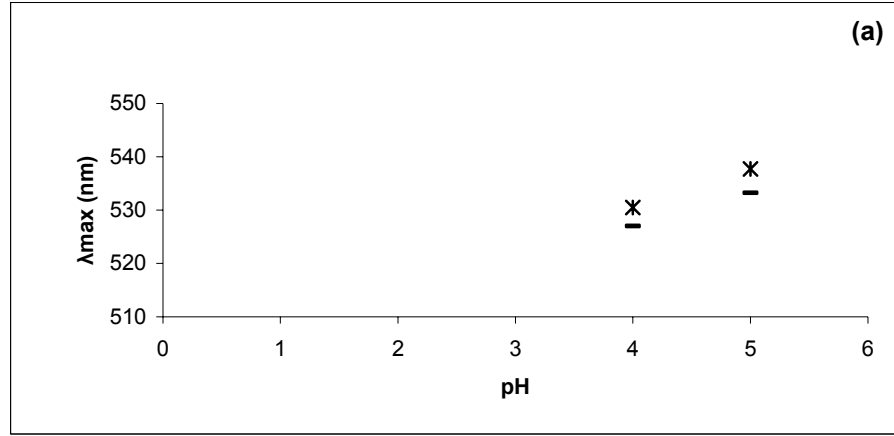
Şekil 4.10. P5'in 10°C (-) 20°C (x) 30°C (+)'deki ABS değişim oranları ((ABSmaxK-ABSmaxR)/ABSmaxR)

4.6. 5P KOPİGMENTASYONU

Kara havuçta bulunan pigmentler ayrıştırılmadan ferulik asit ile 10°C’de gerçekleştirilen kopigmentasyon sonucu en yüksek $\Delta\lambda_{\max\text{-kopigment}}$ değeri pH 5 değerinde elde edilirken pH 4 değerinde daha az $\Delta\lambda_{\max\text{-kopigment}}$ değeri elde edildiği saptanmıştır (Şekil 4.11.a). pH 1-3 değerlerinde ferulik asit eklendikten sonra çökme meydana gelmesi sebebiyle kopigmentasyon yapılamamıştır.

20°C’de değerinde gerçekleştirilen kopigmentasyon tepkimesi sonucunda kopigment çözeltilerinin $\Delta\lambda_{\max\text{-kopigment}}$ değerlerinin en çok pH 1 ve pH 2 değerlerinde elde edildiği, pH değeri 4’e doğru arttıkça $\Delta\lambda_{\max\text{-kopigment}}$ değerinin azaldığı, pH 5 değerinde ise tekrar arttığı belirlenmiştir (Şekil 4.11.b)

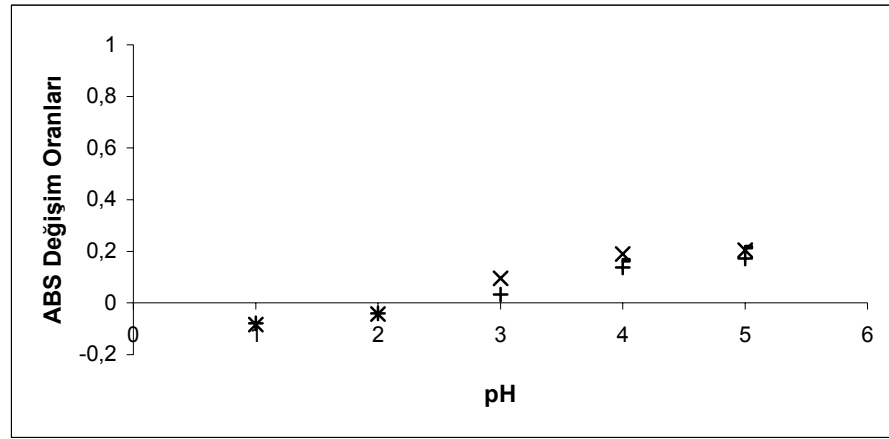
30°C’de gerçekleştirilen kopigmentasyon tepkimesi sonucunda $\Delta\lambda_{\max\text{-kopigment}}$ değerlerinin en çok pH 1’de, en az ise pH 4 değerinde olduğu belirlenmiştir. pH değerinin 2’den 4’e doğru artması durumunda $\Delta\lambda_{\max\text{-kopigment}}$ değerlerinin azaldığı, pH 5 değerinde ise tekrar arttığı belirlenmiştir (Şekil 4.11.c).



Şekil 4.11. 5P'nin (a)10°C, (b) 20°C, (c) 30°C'de kopigmentasyonu sonucu referans (-) ve kopigment eklendikten sonraki (*) λ_{max} değerleri

Kopigmentasyon sonrası kopigment ve referans çözeltilerinin ABS değerleri ölçülmesi sonucunda ABS değişim oranlarının tüm sıcaklıklarda pH 1 ve pH 2 değerlerinde negatif değerlerde iken pH 3-5 aralığında pozitif değerlerde olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.12).

Kopigment çözeltisi eklenen tüm antosiyanin çözeltilerinin (P1-P5 ve 5P) maksimum dalga boylarının referans antosiyanin çözeltilerinin maksimum dalga boylarından daha fazla olduğu görülmüştür.

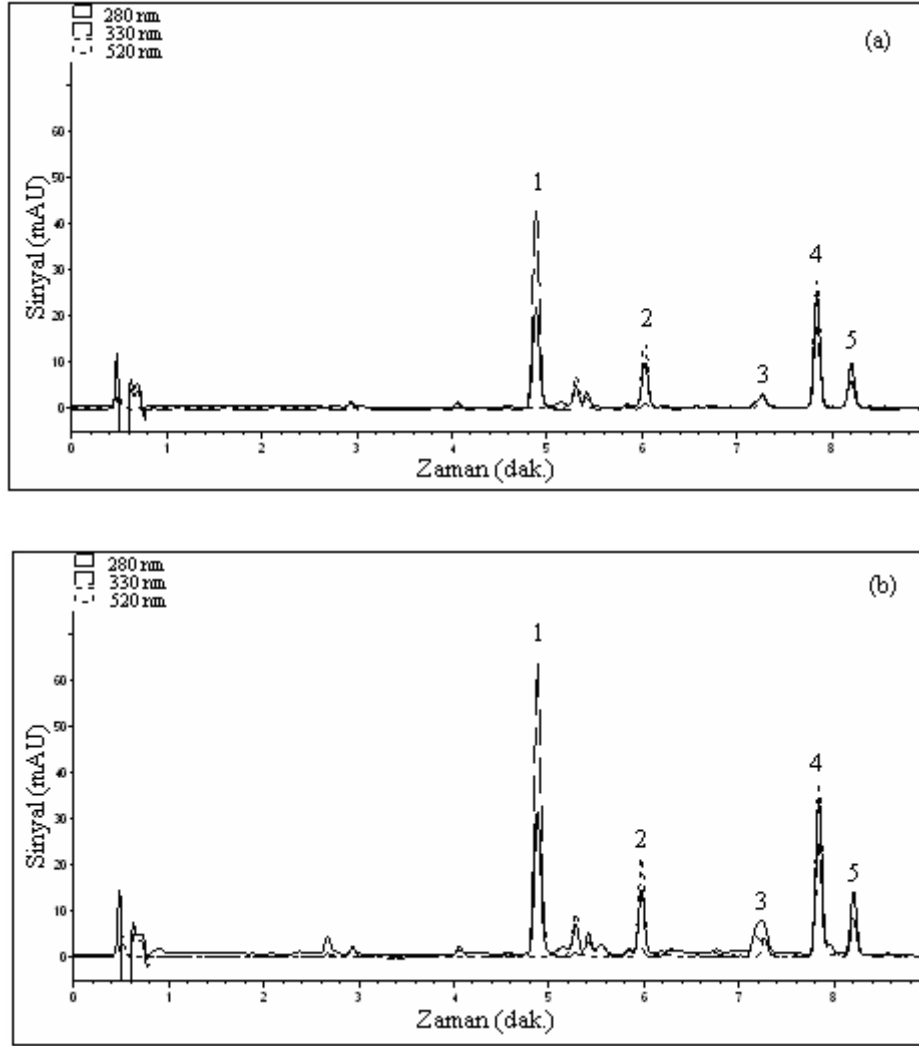


Şekil 4.12. 5P'nin 10°C (-) 20°C (x) 30°C (+)'deki ABS değişim oranları ((ABSmaxK-ABSmaxR)/ABSmaxR)

P1-P5 antosiyaninleri ve 5P'nin ferulik asit ile 10°C, 20°C ve 30°C'de kopigmentasyonu sonucunda sıcaklık artışının kopigmentasyon üzerinde fazla etkili olmadığı, 10°C'de diğer sıcaklıklara göre kısmen daha fazla kopigmentasyon etkisinin olduğu görülmüştür. Değişik antosiyanin ve kopigmentlerle farklı sıcaklıklarda yapılan kopigmentasyon çalışmalarında sıcaklık arttıkça absorbanstaki artış miktarlarının azaldığı rapor edilmiştir [7, 8, 24]. Absorbans değerlerindeki en fazla artış miktarının ise 10°C' de meydana geldiği ifade edilmiştir [24].

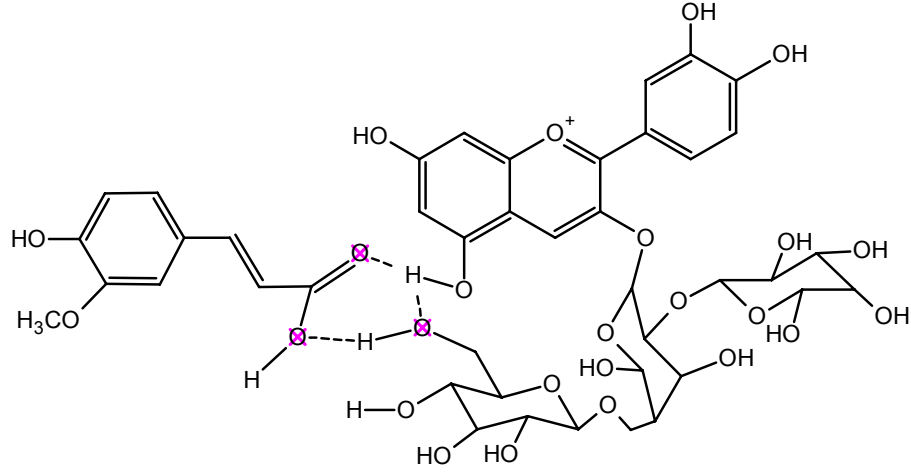
Referans antosiyanin çözeltileri ve kopigment eklenmiş tüm antosiyanin çözeltileri HPLC'de incelenmiştir. Elde edilen kromotogramlarda (Şekil 4.13), 280 nm (fenolik bileşikler), 330 nm (açillenme) ve 520 nm (antosiyanin) dalga boylarında ilgili referans kromotogramından farklı, yeni bir bileşik oluştuğunun

göstergesi olan, yeni pikler saptanmamıştır. Bu sonuçlar, kopigmentasyonun molekül-içi kovalent bağlanma mekanizması ile gerçekleşmediğini, sadece zayıf etkileşimlerin olduğunu göstermektedir [8].



Şekil 4.13. 5P'nin 20 °C pH 3'te (a) referans ve (b) kopigment eklenmiş antosiyanin çözeltilerinin kromatogramları

Moleküller-arası kopigmentasyonun antosiyaninin kuinoidal formunun keto grupları ve flavanol kopigmenti arasında hidrojen bağlarının oluşması [6] yada hidrofobik etkileşim yolu ile gerçekleştiği öne sürülmektedir [6, 7]. Kara havuç antosiyaninlerinden siyanidin-3-ksilozil-glukozil-galaktozit'in ferulik asit ile moleküller arası kopigmentasyonu sonucu oluşabileceği düşünülen hidrojen bağları Şekil 4.14.' de gösterilmiştir.



Şekil 4.14. Ferulik asit ve siyanidin-3-ksilozil-glukozil-galaktozit arasında oluşabilecek hidrojen bağları

Tüm kara havuç antosiyaninlerinde (P1-P5 ve 5P) kopigmentasyon sonucu, referans çözeltilere göre, absorbans artışının pH 2 değerinin üzerinde başladığı görülmüştür. Bu artış pH 3-4 aralığında daha fazla gözlenmiştir. Bu sonuçlar literatür verileri ile uyumludur. Farklı antosiyanidin grupları ile yapılan deneyler maksimum absorbans artışının, yani maksimum kopigmentasyonun, pH 3,6 ve yakın değerlerde olduğunu göstermiştir [7, 8]. Bu değerlerde malvin ve siyanin moleküllerinin renksiz hemiasetal ve *cis*-kalkon formlarının denge halinde bulunduğu öne sürülmektedir. Kopigmentin, flavilyum katyonu ve kuinoidal form ile etkileşime girerek hidrasyonun oluşmasını engellediği ve daha yüksek pH değerinde de daha fazla flavilyum katyonu bulunmasına neden olduğu öne sürülmektedir [7, 24].

5P çözeltilisinin kopigmentasyonu sonucu $\Delta\lambda_{\max}$ değerleri antosiyaninlerin ayrı ayrı kopigmentasyonu sonucu elde edilen $\Delta\lambda_{\max}$ değerlerinden daha düşüktür. 5P çözeltilisinde beş ayrı antosiyanin bir arada bulunmaktadır. Antosiyanin molekülleri kendi aralarında birbirleriyle moleküler etkileşim gösterirler [6]. Aynı şekilde, P1-P5 arasında aynı şekilde etkileşim nedeniyle kopigmentasyon etkisinin daha az görüldüğü düşünülmektedir.

P3, P4 ve P5 üç şekerli bir açıl grubu içeren siyanidinlerdir. Bu antosiyaninlere ferulik asit eklendiğinde λ_{\max} değerlerinde kayma görülmüştür. Bu da kopigmentasyonun gerçekleştiğinin bir göstergesidir. Literatürde bu konuda farklı görüşler vardır. Eiro ve ark. [27]'na göre, bir açıl grubu ve üç şeker biriminin varlığı moleküller arası kopigmentasyon oluşumunu engellemek için yeterlidir. Öte yandan, açilli antosiyaninlerle yapılan çalışmalar, açıl gruplarının kopigmentasyonu engellemediğini ortaya koymuştur [21]. Kopigmentasyon mekanizmasının henüz tam olarak anlaşılammış olmasının, farklı değerlendirmeler üzerinde etkisi büyüktür.

Kopigmentasyon sonrası P1-P5 antosiyaninleri için $\Delta\lambda_{\max}$ değerlerinin birbirine yakın değerler olduğu görülmüştür. Kopigmentasyon etkisini artıran antosiyanin kromoforuna bağlı şeker grubu sayısından çok şeker gruplarının bağlanma pozisyonunun sayısı olduğu öne sürülmüştür [27]. Bu çalışmada kullanılan P1-P5 antosiyaninlerinin hepsinde şeker grupları, C3 pozisyonundan bağlı olan şekere bağlanmaktadır. Bu sebeple kopigmentasyon etkisinin fazla farklılık göstermediği düşünülmektedir.

P3 antosiyanini için $\Delta\lambda_{\max}$ kayması pH 4-5 aralığında aniden azalmaktadır. P3 antosiyaninin referans çözeltisinin λ_{\max} değeri pH arttıkça diğer antosiyaninlere (P1, P2, P4, P5) göre daha fazla artmaktadır. Tüm açilli antosiyaninlerde kopigmentasyon sonrası λ_{\max} değeri yaklaşık olarak pH 2-3 aralığında 520 nm, pH 4'te 530 nm ve pH 5'te 540 nm' ye yükselmektedir. $\Delta\lambda_{\max}$ değerinin pH 4-5 aralığında azalması aslında referans çözeltisinin λ_{\max} değeri artışının yüksek olmasından kaynaklanmaktadır. P3 antosiyanininin pH duyarlılığının diğer antosiyaninlere oranla daha fazla olmasının yapısında bulunan sinapik asit açıl grubundan kaynaklabileceği düşünülmektedir.

5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

1. Maksimum dalga boyunda kayma meydana gelmesi kopigmentasyonun gerçekleştiğinin bir göstergesidir. HPLC analizleri sonucu referans antosiyanin çözeltilerinde görülen bileşikler dışında yeni bir bileşik görülmemesi yapılan kopigmentasyonun kovalent bağlanma ile oluşan moleküller içi kopigmentasyon olmadığını, zayıf etkileşimlerin etkili olduğu moleküller arası kopigmentasyon olabileceği düşünülmektedir.
2. Yapılan tüm kopigmentasyon tepkimelerinde düşük pH değerlerinde absorbans artışı olmamasına karşın pH 3-5 aralığında absorbans artışı olduğu saptanmıştır. Bu absorbans değerlerin antosiyanin çözeltilerinin pK_a değerlerine yakın değerlerde meydana geldiği düşünülmektedir. Her bir antosiyanin çözeltisi için pK_a değerleri hesaplanarak kopigmentasyon için optimum pH değeri belirlenebilir.
3. Antosiyanin ve kopigmentin kopigmentasyon oranları değiştirilerek denge sabiti değerleri hesaplanması önerilmektedir.
4. 1P-5P antosiyaninleri için farklı kopigmentler kullanılarak kopigmentasyon yapılması durumunda daha etkin kopigmentasyon sağlanabileceği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- [1] Giusti, M. M., Wrolstad, R. E., “Acylated anthocyanins from edible sources and their applications in food systems”, *Biochemical Engineering Journal*, **14**: 217-225, (2003).
- [2] Demirağ, K., Uysal, V., “Renklendiriciler”, Altuğ, T. (ed), Gıda Katkı Maddeleri, Meta Basım, İzmir, s. 175-199, (2001).
- [3] Espin, J. C., Soler-Rivas, C., Wichers, H. J., Garcia-Viguera, C., “Anthocyanin-based natural colorants: A new source of antiradical activity for foodstuff”, *Journal of Agricultural Food Chemistry*, **48**: 1588-1592, (2000).
- [4] Einbond, L. S., Reynertson, K. A., Luo, X. D., Basile, M. J., Kennelly, E. J., “Anthocyanin antioxidants from edible fruits”, *Food Chemistry*, **84**: 23-28, (2003).
- [5] Wrolstad, R. E., “Anthocyanins”, Lauro, G. J. and Francis, F. J. (eds), Natural Food Colorants, Marcel Dekker Inc., USA, p. 237-252, (2000).
- [6] Rein, M., “Copigmentation reactions and color stability of berry anthocyanins”, Academic Dissertation, University of Helsinki, Department of Applied Chemistry and Microbiology, Helsinki, p. 88, (2005).
- [7] Mazza, G., Brouillard, R., “The mechanism of co-pigmentation of anthocyanins in aqueous solutions”, *Phytochemistry*, **29**: 1097-1102, (1990).
- [8] Dimitric-Markovic, J. M., Petranovic, N. A., Baranac, J. M., “A spectrophotometric study of the copigmentation of malvin with caffeic and ferulic acids”, *Journal of Agricultural Food Chemistry*, **48**: 5530-5536, (2000).
- [9] Stintzing, F. C., Stintzing, A. S., Carle, R., Frei, B., Wrolstad, R. E., “Color and antioxidant properties of cyanidin-based anthocyanin pigments”, *Journal of Agricultural Food Chemistry*, **50**: 6172-6181, (2002).
- [10] Kammerer, D., Carle, R., Schieber, A., “Quantification of anthocyanins in black carrot extracts (*Daucus carota* ssp. *sativus* var. *atrorubens* Alef.) and evaluation of their color properties”, *European Food Research and Technology*, **219**: 479-486, (2004).

- [11] Cemeroğlu, B., Yemenicioğlu, A., Özkan, M., “Meyve ve Sebzelerin Bileşimi Soğukta Depolanmaları”, Gıda Teknolojisi Derneği Yayınları, Ankara, s. 95-107, (2001).
- [12] Francis, F. C., “Colorants”, Eagan Press, USA, p.55-66, (1999).
- [13] Saldamlı, İ. ve Sağlam, F., “Fenolik Bileşikler ve Renk Maddeleri”, Saldamlı, İ. (ed), Gıda Kimyası, Hacettepe Üniversitesi Basımevi, Ankara, s. 434-449, (1998).
- [14] Rodriguez-Saona, L. E., Giusti, M. M., Wrolstad, R. E., “Color and pigment stability of red radish and red fleshed potato anthocyanins in juice model systems”, Journal of Food Science, **64**: 451-456, (1999).
- [15] Shi, Z., Lin, M., Francis, F. J., “Stability of anthocyanins from *Tradescantia pallida*”, Journal of Food Science, **57**: 758-760, (1992).
- [16] Baublis, A., Spomer, A., Berber-Jimenez, M. D., “Anthocyanin pigments: Comparison of extract stability”, Journal of Food Science, **59**: 1219-1221, (1994).
- [17] Giusti, M. M., Rodriguez- Saona, L. E., Wrolstad, R. E., “Molar absorptivity and color characteristics of acylated and nonacylated pelargonidin-based anthocyanins”, Journal of Agricultural Food Chemistry, **47**: 4631-4637, (1999).
- [18] Mazza, G., Brouillard, R., “Recent developments in the stabilization of anthocyanins in food products”, Food Chemistry, **25**: 207-225, (1987).
- [19] Figueiredo, P., El Habiri M., Toki K., Saito N., Dangles, O., Brouillard, R., “New aspects of anthocyanin complexation. Intramolecular copigmentation as a means for color loss?”, Phytochemistry, **41(1)**: 301-308, (1996).
- [20] Dangles, O., Stoeckel, C., Wigand, M. C., Brouillard, R., “Two very distinct types of anthocyanin complexation: Copigmentation and inclusion”, Tetrahedron Letters, **33(36)**: 5227-5230, (1992).
- [21] Davies, A. J., Mazza, G., “Copigmentation of simple and acylated anthocyanins with colorless phenolic compounds”, Journal of Agricultural Food Chemistry, **41**: 716-720, (1993).
- [22] Malien-Aubert, C., Dangles, O., Amiot, M. J., “Color stability of commercial anthocyanin based extracts in relation to the phenolic composition. Protective

- effects by intra- and intermolecular copigmentation”, *Journal of Agricultural Food Chemistry*, **49**: 170-176 (2001).
- [23] Bloor, S. J., “Novel pigments and copigmentation in the blue marguerite daisy”, *Phytochemistry*, **50**: 1395-1399, (1999).
- [24] Brouillard, R., Mazza, G., Saad, Z., Albrecht-Gary, A. M., Cheminat, A., “The copigmentation reactions of anthocyanins: A microprobe for structural study of aqueous solutions”, *Journal of the American Chemical Society*, **111**: 2604-2610, (1989).
- [25] 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).
- [26] Oszmianski, J., Bakowska, A., Piacente, S., “Thermodynamic characteristics of copigmentation reaction of acylated anthocyanin isolated from blue flowers of *Scutellaria baicalensis* Georgi with copigments”, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **84**: 1500-1506, (2004).
- [27] Eiro, M. J., Heinonen, M., “Anthocyanin color behaviour and stability during storage: Effect of intermolecular copigmentation”, *Journal of Agricultural Food Chemistry*, **50**: 7461-7466, (2002).
- [28] Dangles, O., Saito, N., Brouillard, R., “Anthocyanin intramolecular copigment effect”, *Phytochemistry*, **34(1)**: 119-124, (1993).
- [29] Brouillard, R., “The in vivo expression of anthocyanin colour in plants”, *Phytochemistry*, **22(6)**: 1311-1323, (1983).
- [30] 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).
- [31] Figueiredo, P., George, F., Tatsuzawa, F., Toki, K., Saito, N., Brouillard, R., “New features of intramolecular copigmentation by acylated anthocyanins”, *Phytochemistry*, **51**: 125-132, (1999).
- [32] Romero, C., Bakker, J., “Interactions between grape anthocyanins and pyruvic acid, with effect of pH and acid concentration on anthocyanin

- composition and color in model solutions”, *Journal of Agricultural Food Chemistry*, **47**: 3130-3139, (1999).
- [33] Romero, C., Bakker, J., “Anthocyanin and colour evolution during maturation of four port wines: Effect of pyruvic acid addition”, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **81**: 252-260, (2000).
- [34] Gutierrez, I. H., Lorenzo, E.S., Espinoza, A. V., “Phenolic composition and magnitude of copigmentation in young and shortly aged red wines made from the cultivars, Cabernet, Sauvignon, Cencibel, and Syrah”, *Food Chemistry*, **92**: 269-283, (2005).
- [35] Darias-Martin, J., Carrillo, M., Diaz, E., Boulton, R. B., “Enhancement of red wine colour by pre-fermentation addition of copigments”, *Food Chemistry*, **73**: 217-220, (2001).
- [36] Remy, S., Fulcrand, H., Labarbe, B., Cheynier, V., Moutounet, M., “First confirmation in red wine of products resulting from direct anthocyanin-tannin reactions”, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **80**: 745-751, (2000).
- [37] Baranac, J., Petranovic, N. A., Dimitric-Markovic, J. M., “Spectrophotometric study of anthocyan copigmentation reactions. 4. Malvin and Apigenin-7-glucoside”, *Journal of Agricultural Food Chemistry*, **45**: 1701-1703, (1997).
- [38] Bakowska, A., Kucharska, A. Z., Oszmianski, J., “The effects of heating, UV irradiation, and storage on stability of the anthocyanin-polyphenol copigment complex”, *Food Chemistry*, **81**: 349-355, (2003).
- [39] Stintzing, F. C., Carle, R., “Functional properties of anthocyanins and betalains in plants, food, and in human”, *Trends in Food Science and Technology*, **15**:10-38, (2004).
- [40] Rodrigez-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).

- [41] 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).

ÖZGEÇMİŞ

ÖZLEM İSTANBULLU

EĞİTİM DURUMU

Yüksek Lisans Derecesi 2004-
Mersin Üniversitesi
Gıda Mühendisliği Bölümü, Mersin

Lisans Derecesi 2000-2004
Mersin Üniversitesi
Gıda Mühendisliği Bölümü, Mersin

GÖREVLERİ

Araştırma Görevlisi Aralık 2004-
Mersin Üniversitesi
Gıda Mühendisliği, Mersin

YAYINLAR

1. Bakır, E., Turker, N., **İstanbulu, O.**, “Chemical composition of peaches used for commercial juice production in Turkey: Sugars, organic acids and amino acids”, Gıda **32(1)**: 15-23, (2007).

Sunumlar

1. **İstanbulu, Ö.**, Türker, N. “Antosiyanin Kararlılığının Moleküler Etkileşim ile Artırılması”, Mersin Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü, Mersin, Mayıs 2005 (*Sözlü Sunum*).

2. **İstanbullu, Ö.**, Turhan, M., Türker, N., “Kara Havucun Kurutularak Değerlendirilmesi”, *Proje Pazarı*, Mersin Üniversitesi, Mersin, Mayıs 2006 (*Sözlü Sunum*).
3. **Istanbullu, O.**, Turker, N., Turhan, M., “Effect of Drying on Anthocyanin Content of Black Carrot (*Daucus carota* var L)”, *4th International Congress on Pigments in Food*, Stuttgart-Germany, October 2006 (*Poster Sunum*).