



T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü



**SİYAH HAVUÇTAN ANTOSİYANİNLERİN
SAFLAŞTIRILMASI VE GIDA SANAYİSİNDE
KULLANILABİLİRLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI**

Doktora Tezi

Gamze DEMİRKAN

Biyoteknoloji Anabilim Dalı

İzmir
2024

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü

**SİYAH HAVUÇTAN ANTOSİYANİNLERİN
SAFLAŞTIRILMASI VE GIDA SANAYİSİNDE
KULLANILABİLİRLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI**

Gamze DEMİRKAN

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Seçil ÖNAL

Biyoteknoloji Anabilim Dalı
Biyoteknoloji Doktora Programı

İZMİR
2024

Gamze DEMİRKAN tarafından Doktora tezi olarak sunulan “**Siyah havuçtan antosiyaninlerin saflaştırılması ve gıda sanayisinde kullanılabilirliğinin araştırılması**” başlıklı bu çalışma EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile EÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi'nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 08/03/2024 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

İmza

Jüri Başkanı : Prof. Dr. Seçil ÖNAL

.....

Raportör Üye : Prof. Dr. Şenay ŞANLIER

.....

Üye : Prof. Dr. Ayşe DİNÇER

.....

Üye : Prof. Dr. Gülşah ŞANLI MOHAMED

.....

Üye : Doç. Dr. Seda ERSUS

.....



EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Doktora Tezi olarak sunduğum “**Siyah havuçtan antosiyaninlerin saflaştırılması ve gıda sanayisinde kullanılabilirliğinin araştırılması**” başlıklı bu tezin kendi çalışmam olduğunu, sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı, bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

08 / 03 / 2024

İmzası

Adı-Soyadı

Gamze DEMİRKAN



ÖZET

SİYAH HAVUÇTAN ANTOSİYANİNLERİN SAFLAŞTIRILMASI VE GIDA SANAYİSİNDE KULLANILABİLİRLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI

Demirkan, Gamze

Doktora Tezi, Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Seçil ÖNAL

Mart 2024, 157 sayfa

Antosiyaninler, yaprak, kök, çiçek ve meyve de dâhil olmak üzere tüm bitki dokularında bulunan, pH'ya bağlı olarak kırmızı, mor veya mavi renkte olan ve suda çözünen pigmentlerdir. Siyah havuç yüksek düzeyde antosiyanin içermesi ve bu antosiyaninlerin açilli antosiyaninler olması nedeniyle kararlılıklarının yüksek olması, diğer kaynaklardan elde edilen antosiyaninlere kıyasla ısı ve pH değişimine karşı nispeten daha kararlı olması nedeniyle değerli bir antosiyanin kaynağıdır. Siyah havuç antosiyaninlerinin, asidik pH'larda dahi oldukça iyi düzeyde parlak kırmızı rengi sağlamalarından dolayı, reçellerin, marmelatların, şekerlemelerin, meşrubatların meyve suları ve nektarların renklendirilmesinde siyah havuç suyu veya konsantreleri kullanılmaktadır.

Antosiyanin içeriği bakımından zengin olan siyah havuçtan (*Daucus carota ssp.*) (102,94 mg/L), antosiyaninler sulu ikili faz ekstraksiyon (ATPE) sistemiyle ekstrakte edilerek saflaştırılmıştır. ATPE'de kullanılacak örnek, direkt homojenizasyon sonrası ham ekstrakt (7,2 mg/L), direkt homojenizasyon sonrası ısıl işlem görmüş ham ekstrakt (102,94 mg/L) ve direkt homojenizasyon sonrası askorbik asit ile muamele edilmiş ham ekstrakt (38,40 mg/L) olarak 3 farklı şekilde hazırlanmıştır. Direkt homojenizasyon sonrası ısıl işlem uygulaması için çalışma sıcaklığı ve çalışma süresi optimize edilmiş ve 80°C ve 10 dk olarak belirlenmiştir. Siyah havuçtan antosiyaninlerin maksimum verimle ekstraksiyonu için; ekstraksiyon basamağında ortama su ilave edilmesinin (1:1 v/v) etkisi araştırılmıştır. ATPE için hazırlanan ham ekstrakta toplam karbohidrat (2,81 mg/100 g), flavonoid (2,51 mg/100 g), toplam antosiyanin (5,62 mg/mL) ve fenolik bileşik (160,8 mg/100 g) içeriği belirlenmiştir. Saflaştırma için ATPE yöntemini oluşturan bileşenler, amonyum sülfat (%22, w/v), etanol (%26, v/v), pH 6 ve ham ekstrakt miktarı (%5, v/v) optimize edilerek en yüksek verimin elde edildiği optimum değerler bulunmuştur. ATPE sonrası optimize edilen sistemin

tekrarlanabilir olduğu belirlenmiş ve ATPE sisteminde ölçek büyütme çalışmaları yapılmıştır. ATPE sonrası saflaştırılmış örnekte renk analizi ile L*, a*, b*, C ve h ((L*; 19,49 ± 0,2), (a* 1,38 ± 0,1), (b* 0,79 ± 0,1), (C 1,59) ve (h 29,8)) değerleri belirlenmiş ve HPLC-MS yapılarak siyah havuçta bulunan baskın siyanidin türevi Siyanidin-3-kilosil-feruloil-glukosil-galaktozid olarak bulunmuştur. ATPE sonrası saflaştırılmış ekstrakt maltodextrin ile mikroenkapsüle (hava giriş sıcaklığı 150°C, hava çıkış sıcaklığı 127±5°C) edilerek toz örnek hazırlanmıştır. Mikroenkapsüle edilmiş toz örnek, taramalı elektron mikroskobu (1,5µm -24µm) ve Zetasizer ile partikül boyutu dağılımı (293,9 nm) ile tanımlanmıştır. Mikroenkapsülasyon işleminin verimi (% 88,84) hesaplanarak toz örnekte kararlılık çalışmaları yapılmıştır. Toz örneğin depo (0. ve 60. gün), termal (40°C-80°C) ve pH (1-6) kararlılıkları incelenmiş ve literatürde yapılan diğer çalışmalarla uyumlu olduğu görölmüştür. Toz örnek ile dondurma renklendirme çalışmaları yapılmış ve renklendirilen örneklerin ΔE değeri hesaplanarak toplam renk farkı (%0,5→21,04, %1→36,88 ve %2→97,7) bulunmuş ve bu antosiyanin preparatı ile gıdaların renklendirilebileceği ortaya konulmuştur.

Anahtar sözcükler: Renklendirici, siyah havuç, antosiyaninler, ATPE, püskürtmeli kurutma, mikroenkapsülasyon.

ABSTRACT**PURIFICATION OF ANTHOCYANINS FROM BLACK
CARROTS AND INVESTIGATION OF THEIR USABILITY IN
FOOD INDUSTRY**

DEMİRKAN, Gamze

PhD in Biotechnology

Supervisor: Prof. Dr. Seçil ÖNAL

March 2024, 157 pages

Anthocyanins are water-soluble pigments that are red, purple or blue in color depending on pH, and are found in all plant tissues, including leaves, roots, flowers and fruits. Black carrot is a valuable source of anthocyanins because it contains high levels of anthocyanins, their stability is high due to the fact that these anthocyanins are acylated anthocyanins, and they are relatively more stable against heat and pH changes compared to anthocyanins obtained from other sources. Since black carrot anthocyanins provide a very good bright red color even at acidic pH, black carrot juice or concentrates are used to color jams, marmalades, candies, soft drinks, fruit juices and nectars.

Anthocyanins were extracted and purified from black carrot (*Daucus carota* *ssp.*), which is rich in anthocyanin content (102.94 mg/L), using an aqueous dual phase extraction (ATPE) system. The sample to be used in ATPE is the crude extract after direct homogenization (7.2 mg/L), the crude extract treated with heat after direct homogenization (102.94 mg/L) and the crude extract treated with ascorbic acid after direct homogenization (38, 40 mg/L) was prepared in 3 different ways. For heat treatment application after direct homogenization, the working temperature and working time were optimized and determined as 80°C and 10 min. For maximum efficiency extraction of anthocyanins from black carrots; The effect of adding water to the medium (1:1 v/v) in the extraction step was investigated. Total carbohydrate (2.81 mg/100 g), flavonoid (2.51 mg/100 g), total anthocyanin (5.62 mg/mL) and phenolic compound (160.8 mg/100 g) in the crude extract prepared for ATPE. The content quantities have been determined. For purification, the components that make up the ATPE method, ammonium sulfate (22% w/v), ethanol (26% v/v), pH 6 and the amount of crude extract (5% v/v) were optimized and optimum values were

found to achieve the highest efficiency. After ATPE, it was determined that the optimized system was repeatable and scale-up studies were carried out on the ATPE system. By color analysis in the purified sample after ATPE, L^* , a^* , b^* , C and h (L^* ; 19.49 ± 0.2), (a^* 1.38 ± 0.1), (b^* $0, 79 \pm 0.1$), (C 1.59) and (h 29.8)) values were determined and the dominant cyanidin derivative Cyanidin-3-xylosyl-feruloyl-glucosyl-galactoside found in black carrots was found by HPLC-MS. After ATPE, the purified extract was microencapsulated with maltodextrin (air inlet temperature 150°C , air outlet temperature $127 \pm 5^\circ\text{C}$) and a powder sample was prepared. The microencapsulated powder sample was characterized by scanning electron microscopy ($1.5\mu\text{m}$ - $24\mu\text{m}$) and particle size distribution (293.9 nm) with Zetasizer. Stability studies were carried out on the powder sample by calculating the efficiency of the microencapsulation process (88.84%). Storage (0th and 60th day), thermal (40°C - 80°C) and pH (1-6) stabilities of the powder sample were examined and found to be compatible with other studies in the literature. Ice cream coloring studies were carried out with powder samples and by calculating the ΔE value of the colored samples, the total color difference ($0.5 \rightarrow 21.04\%$, $1\% \rightarrow 36.88$ and $2 \rightarrow 97.7\%$) was found and it was demonstrated that foods could be colored with this anthocyanin preparation.

Keywords: Colourant, black carrot, anthocyanins, ATPE, spray drying, microencapsulation.

ÖNSÖZ

Günümüzde hazır ve işlenmiş gıdaya olan talep katlanarak artmaktadır. Tüketicilerin gıdaların içeriklerini giderek daha fazla fark etmeleri ve bu nedenle, gıdaların mümkün olduğu kadar doğal olmasını talep etmeleri, gıda endüstrisini hem görsel olarak çekici ve damak tadına uygun hem de içeriği bakımından yüksek kalitede değer sunan gıda sağlama zorluğuyla karşı karşıya bırakmıştır. Gıdaların içeriğine dahil edilen gıda katkı maddelerinin doğal olarak elde edilmesi konusunda araştırmacılar tarafından pek çok çalışma yapılmış ve halende yapılmaktadır.

Bu çalışma ile antosiyanin içeriği bakımından oldukça zengin olan siyah havuçtan antosiyaninlerin, gıdalara katılacak kalitede doğal bir şekilde ekstraksiyonu ve saflaştırılması yapılmış, saflaştırılan antosiyaninlerin tanımlanması gerçekleştirilmiş, tanımlanan antosiyaninler mikroenkapsülasyon tekniği ile toz haline getirilmiş ve toz üründe kararlılık testleri yapılarak belirli gıda ürünlerinde kullanılabilirliği değerlendirilmiştir.

Tez çalışma sürecim boyunca tez konusunun belirlenmesinden deneysel çalışmaları içeren her aşamada bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, her konuda desteğini hissettiğim saygıdeğer danışmanım Prof. Dr. Seçil ÖNAL'a ve birlikte çalıştığım tüm laboratuvar ekibine sonsuz teşekkür ederim.

İZMİR

Gamze DEMİRKAN



İÇİNDEKİLERSayfa

ÖZET	vii
ABSTRACT	ix
ÖNSÖZ	xi
İÇİNDEKİLER	xiii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xviii
TABLolar DİZİNİ	xxii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xxiv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	7
2.1 Gıdaların Renklendirilmesi	7
2.1.1 Doğal Renklendiriciler	8
2.1.2 Doğala Özdeş Renklendiriciler	10
2.1.3 Sentetik (Yapay) Renklendiriciler	14
2.2 Antosiyaninler	18
2.2.1 Antosiyaninlerin Yapısı ve Kararlılığı	20
2.2.2 Siyah Havuç ve Siyah Havuç Antosiyaninleri	32
2.3 Ekstraksiyon, Sulu İkili-Faz Ekstraksiyon (ATPE) ve Antosiyaninlerin Ekstraksiyonu	41
2.3.1 Ekstraksiyon	41

İÇİNDEKİLER (Devam)

	<u>Sayfa</u>
2.3.2 Sulu İkili-Faz Ekstraksiyon (ATPE)	43
2.3.3 Antosiyaninlerin Ekstraksiyonu	52
2.4 Mikroenkapsülasyon	56
2.4.1 Püskürtmeli Kurutma	67
3. GEREÇ ve YÖNTEM.....	72
3.1 Gereç	72
3.1.1 Hammadde	72
3.1.2 Kullanılan Kimyasal ve Ekipmanlar	72
3.2 Yöntem.....	73
3.2.1 Siyah Havuç Homojenatından Antosiyaninlerin Ekstraksiyonu.....	73
3.2.2 Toplam Monomerik Antosiyanin Tayini (pH Differansiyel Yöntem)	74
3.2.3 Toplam Karbohidrat Tayini.....	75
3.2.4 Toplam Flavanoid Tayini	76
3.2.5 Toplam Fenolik Bileşik Tayini	76
3.3 Siyah Havuç Antosiyaninlerinin Sulu-İkili Faz Ekstraksiyonu ile Saflaştırılması.....	77
3.3.1 Sulu İkili-Faz Ekstraksiyon Sisteminin Optimizasyonu	78
3.3.2 Sulu İki Fazlı Ekstraksiyon Sisteminde Ölçek Büyütme	80

İÇİNDEKİLER (Devam)

	<u>Sayfa</u>
3.4 Siyah Havuç Antosiyaninlerinin HPLC-MS ile Ayrılması ve Renk Özellikleri	80
3.4.1 Siyah Havuç Antosiyaninlerinin HPLC-MS ile Ayrımı.....	80
3.4.2 Siyah Havuç Antosiyaninlerinin Renk Özellikleri	81
3.5 Siyah Havuç Antosiyaninlerinin Mikroenkapsülasyonu	82
3.5.1 Besleme Karışımlarının Hazırlanması.....	82
3.5.2 Püskürtmeli Kurutma İşlemi.....	82
3.6 Mikroenkapsüle Edilmiş Toz Örneğin Karakterizasyonu	82
3.6.1 Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM).....	82
3.6.2 Partikül Boyutu Dağılımı (Zetasizer)	83
3.7 Mikroenkapsüle Edilmiş Toz Örneğin Kararlılığı.....	83
3.7.1 Mikroenkapsülasyon Verimi.....	83
3.7.2 Depo Kararlılığı.....	83
3.7.3 Isı Kararlılığı.....	84
3.7.4 pH Kararlılığı.....	84
3.8 Dondurmanın Renklendirilmesinde Antosiyanin Kullanımı	84

İÇİNDEKİLER (Devam)

	<u>Sayfa</u>
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	85
4.1 Siyah Havuç Homojenatından Antosiyaninlerin Ekstraksiyonu	85
4.2 Siyah Havuç Antosiyaninlerinin ATPE ile Saflaştırılması	89
4.3 Sulu İkili-Faz Ekstraksiyon Sisteminin Optimizasyonu	91
4.3.1 Amonyum sülfat ((NH ₄) ₂ SO ₄) Konsantrasyonunun Antosiyanin Verimine Etkisi.....	91
4.3.2 Etanol Konsantrasyonunun Antosiyanin Verimine Etkisi	94
4.3.3 pH'ın Antosiyanin Verimine Etkisi.....	96
4.3.4 Ham Ekstrakt Miktarının Antosiyanin Verimine Etkisi.....	99
4.4 Optimize Edilmiş Sulu İkili-Faz Ekstraksiyon Sistemin Tekrarlanabilirliği	100
4.5 Sulu İkili Faz Ekstraksiyon Sisteminde Ölçek Büyütme	101
4.6 Siyah Havuç Antosiyaninlerinin HPLC-MS ile Tanımlanması ve Renk Özellikleri.....	103
4.6.1 Siyah Havuç Antosiyaninlerinin HPLC-MS ile Tanımlanması	103
4.6.2 Siyah Havuç Antosiyaninlerinin Renk Özellikleri.....	106
4.7 Siyah Havuç Antosiyaninlerinin Mikroenkapsülasyonu.....	106
4.7.1 Besleme Karışımlarının Hazırlanması	106
4.7.2 Püskürtmeli Kurutma	107

İÇİNDEKİLER (Devam)

	<u>Sayfa</u>
4.8 Mikroenkapsüle edilmiş Toz Örneklerin Karakterize Edilmesi	109
4.8.1 Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM).....	109
4.8.2 Partikül Boyutu Dağılımı (Zetasizer)	110
4.9 Mikroenkapsüle Edilmiş Toz Örneğin Kararlılığının Araştırılması	112
4.9.1 Mikroenkapsülasyon Verimi	112
4.9.2 Depo Kararlılığı	112
4.9.3 Isı Kararlılığı.....	114
4.9.4 pH Kararlılığı.....	116
4.10 Mikroenkapsüle Edilmiş Toz Örneğin Dondurmanın Renklendirilmesinde Kullanılması.....	118
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	121
KAYNAKLAR DİZİNİ.....	128
TEŞEKKÜR	156
ÖZGEÇMİŞ.....	157

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
1.1 Dünya genelinde kullanılan gıda renklendiricilerinin dağılımı.....	2
2.1 Antosiyaninlerin biyosentezi	19
2.2 Genel antosiyanin yapısı	20
2.3 Yaygın antosiyanidinlerin görünür renk aralığı.....	22
2.4 Antosiyaninlerde bulunan yaygın monosakkaritler.....	23
2.5 Antosiyaninlerde bulunan yaygın disakkaritler.....	23
2.6 Sakkaritlerin antosiyanidinlere genel bağlanma şekli.....	24
2.7 Siyanidin 3-glikozit yapısı	24
2.8 Antosiyaninlere bağlanan yaygın aromatik fenolik asitler.....	25
2.9 Antosiyaninlere bağlanan yaygın alifatik dikarboksilik asitler	25
2.10 Antosiyanidin ve antosiyaninlerin kimyasal yapısı.....	25
2.11 pH değıştikçe dört farklı yapının birbirine dönüşümü	27
2.12 pH değışikliğinin renk üzerindeki etkisi	27
2.13 Molekül-içi kopigmentasyon.....	29
2.14 Moleküller arası kopigmentasyon	29

ŞEKİLLER DİZİNİ (Devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.15 Antosiyaninlerin kendi kendilerine birleşmesi	30
2.16 Antosiyaninlerin metaller ile şelat oluşturmaları	30
2.17 Açilli antosiyaninlere bağlanan aromatik asitler.....	36
2.18 Siyah havuçta bulunan baskın antosiyaninlerin kimyasal yapıları	37
2.19 Peonidin ve Pelargonidin antosiyaninlerinin kimyasal yapıları	39
2.20 Antosiyanidinlerin fenolik asitlere yıkımı	40
2.21 Sulu ikili- faz ekstraksiyon sistemleri ile hedef molekülün ayrılması	45
2.22 Sulu ikili- faz ekstraksiyon sistemlerinin faz diyagramı	48
2.23 Binodiyal değerleri belirlemek için üç yöntemin grafiksel gösterimi	49
2.24 Mikroenkapsülasyon teknolojisini kullanan endüstri alanları	58
2.25 Mikrokapsüllerin sınır boyutları	60
2.26 Farklı kaynaklara ait karbohidrat türleri	62
2.27 Farklı kaynaklara ait protein türleri	63
2.28 Mikrokapsül şekilleri	64
2.29 Püskürterek kurutma yöntemi	68
3.1. Flavanooidlerin temel yapısı.....	76
4.1 Glukoz standart grafiği	87

ŞEKİLLER DİZİNİ (Devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.2 Kateşin standart grafiği	88
4.3 Gallik asit standart grafiği	88
4.4 ATPE ile antosiyaninlerin ayrılmasında alt ve üst fazlar.....	90
4.5 ATPE ile antosiyaninlerin ayrılmasında alt faz ve üst faz verimleri	90
4.6 Amonyum sülfat konsantrasyonunun antosiyanin miktarına etkisi.....	91
4.7 Amonyum sülfat konsantrasyonunun şeker miktarına etkisi.....	92
4.8 Amonyum sülfat konsantrasyonunun antosiyanin miktarına ve ekstraksiyon verimine etkisi	92
4.9 Etanol konsantrasyonunun antosiyanin miktarına etkisi	95
4.10 Etanol konsantrasyonunun şeker miktarına etkisi	95
4.11 Etanol konsantrasyonunun antosiyanin miktarına ve ekstraksiyon verimine etkisi	96
4.12 pH'ın antosiyanin miktarına etkisi	97
4.13 pH'ın antosiyanin miktarı ve verime etkisi	97
4.14 Siyah havuç antosiyaninlerinin pH değerine bağlı renk değişimi.....	98
4.15 Ekstrakt miktarının antosiyanin miktarına etkisi	99
4.16 Ekstrakt miktarının antosiyanin miktarı ve ekstraksiyon verimine etkisi	100

ŞEKİLLER DİZİNİ (Devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.17 Antosiyaninlerin ATPE sistemi ile ayırımının tekrarlanabilirliği	101
4.18 Antosiyanin ayırımı için optimize edilmiş ATPE sisteminde ölçek büyütme	102
4.19 ATPE ile ayrılan üst fazdaki siyah havuç antosiyaninlerinin HPLC kromatogramları	103
4.20 ATPE ile ayrılan üst faz antosiyaninlerinden etanolün evaporatör ile uzaklaştırılması.....	107
4.21 Mini Spray Dryer B-290 ile yapılan püskürtmeli kurutma işlemi.....	108
4.22 Kurutulmuş toz örnek mikrokapsüllerinin SEM görüntüleri.....	110
4.23 Toz örneğin parçacık boyutu dağılımı	111
4.24 Toz antosiyanin örneğinin depo kararlılığı.....	113
4.25. Toz örneğin $\ln(C_t/C_0)$ – Zaman grafiği	114
4.26. Toz antosiyanin örneğinin zamana bağlı ısı kararlılığı.....	115
4.27. Toz antosiyanin örneğinde pH değişimine bağlı renk değişimi.....	116
4.28. Toz antosiyanin örneğinin pH kararlılığı.....	117
4.29. VITA Easyshade Advance cihazı.....	118
4.30. Toz antosiyanin örneği ile renklendirilen dondurmaların fotoğrafları...	119

TABLolar DİZİNİ

<u>Tablo</u>	<u>Sayfa</u>
1.1 Bitkilerde en sık görülen başlıca pigment sınıfları.....	3
2.1 Doğal ve doğala özdeş renklendiriciler	12
2.2 Sentetik renklendiricilerin E kodları, ADI değerleri ve genel kullanım alanları.....	16
2.3 Temel antosiyanidinlerin kimyasal yapısı	21
2.4 Son iki yıla ait havuç üretimi	33
2.5 Siyah havuçta bulunan baskın antosiyanin türevleri	35
2.6 Siyah havucun polifenolik profili.....	38
2.7 Bazı antosiyanidinlerin fenolik asitlere yıkımı	40
2.8 Farklı çözücülerle ekstrakte edilen bazı biyoaktif bileşikler.....	43
2.9 ATPE sistemlerinin temel özelliklerine göre sınıflandırılması.....	47
2.10 Gıda endüstrisinde kullanılan mikrokapsüllenmiş bileşen örnekleri	59
2.11 Kaplama maddesi olarak kullanılan doğal ve sentetik polimerler	61
2.12 Gıda endüstrisinde kullanılan enkapsülasyon yöntemleri.....	65
4.1 Ekstraktlardaki toplam monomerik antosiyanin miktarları.....	85
4.2 Farklı ekstraksiyon sıcaklığında hazırlanan ekstraktın toplam monomerik antosiyanin miktarları.....	86

TABLolar DİZİNİ (Devam)

<u>Tablo</u>	<u>Sayfa</u>
4.3 Farklı sıcaklık sürelerinde hazırlanan ekstraktların toplam monomerik antosiyanin miktarları	86
4.4 Antosiyanin ekstraksiyonuna su etkisi.....	87
4.5 Ham ekstraktın toplam karbohidrat, fenolik bileşik, flavonoid ve monomerik antosiyanin miktarları.....	89
4.6 ATPE sistemlerinin içeriği.....	102
4.7 Siyah havuç antosiyaninlerinin kompozisyonu ve miktarları.....	104
4.8 ATPE sonrası siyah havuç antosiyaninlerinin renk özellikleri	106
4.9 Püskürtmeli kurutma işleminin çalışma koşulları	107
4.10. Toz antosiyanin örneğinin toplam karbohidrat, fenolik bileşik, flavonoid ve antosiyanin miktarları	112
4.11 Toz örneğin 25°C’de 1. dereceden reaksiyon hız sabiti ve yarılanma ömrü.	113
4.12 Dondurmaların içerdiği antosiyanin miktarları ve L*, a*, b*, C*, h*ve ΔE değerleri	119

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklama</u>
O	Oksijen
H	Hidrojen
Ca	Kalsiyum
P	Fosfor
Mg	Magnezyum
Fe	Demir
Al ₂ O ₃	Alüminyum oksit
AlCl ₃	Alüminyum klorür
KCl	Potasyum klorür
NaAc	Sodyum Asetat
NaNO ₂	Sodyum nitrat
(NH ₄) ₂ SO ₄	Amonyum sülfat
SO ₃ H	Sülfon grubu
COOH	Karboksil grubu
OH	Hidroksil
Ome	Metoksil
α	Alfa

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (Devam)

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklama</u>
β	Beta
L*	Lightness
a*	Yeşilden kırmızıya
b*	Maviden sarıya
c*	Chroma
h	Hue
ΔE	Toplam Renk Farkı
nm	Nanometre
μm	Mikrometre
mm	Milimetre
cm	Santimetre
w	Weight
mg	miligram
g	gram
v	Volume
mL	Mililitre
L	Litre

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (Devam)

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklama</u>
dk	Dakika
kv	Kilovat
°C	Santigrat derece
MDX	Maltodextrin

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
FDA	Food and Drug Administration
ADI	Acceptable Daily Intake
FAO	Food and Agriculture Organization
WHO	World Health Organization
EFSA	European Food Safety Authority
EC	Effect Concentration
C4H	Sinnamik asit sinnamat 4-hidroksilaz
4CL	4- kumarat-CoA ligaz
CHI	Kalkon izomeraz
F3H	Flavanon 3-hidroksilaz
Dp	Delfinidin
Mv	Malvinidin

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (Devam)**Kısaltmalar Açıklama**

Pg Pelargonidin

Pn Peonidin

Pt Petunidin

Cy Siyanidin

ATPE Sulu İki-Faz Ekstraksiyon

Abs Absorbans

1. GİRİŞ

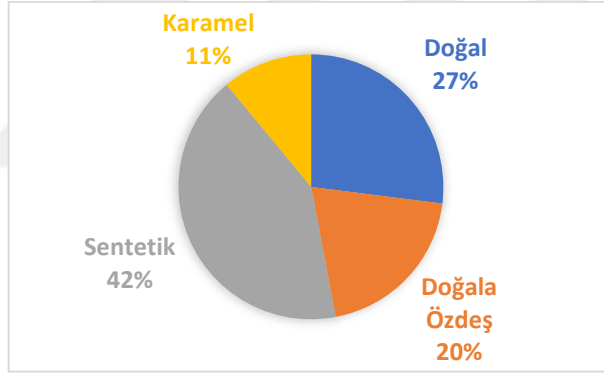
Gıdalar, insanların yediği ve içtiği, işlenen, bir kısmı işlenebilen veya işlenmeden yenilen bütün maddeleri ifade eder. Gıdaları tercih edilebilir, görünür ve cazip kılan en önemli özelliklerinden bir tanesi renkleridir. Aynı zamanda gıdanın tadını tamamlayan, gıdaya özgü tadın alınmasını sağlayan etmenler arasında gıdanın rengi gelir.

Renk, yiyecek ve içeceklerin temel bir bileşeni olmakla birlikte, özellikle hazır gıdaların uygun renklerde görünmesi, tüketiciler tarafından 'sağlıklı yiyecek' algısı ile eşanlamlı olabileceğinden, gıda seçiminde önemli bir rol oynar (Herrera et al., 2023). Doğal gıdalar renklerini, kendilerini oluşturan ve yapılarında var olan birtakım maddelerden alırlar. Bu maddeler genel olarak pigment olarak adlandırılırlar. Pigmentler çok çeşitli kimyasal formlara sahip olabilirler. Hazır gıdalar ise renklendiriciler olarak bilinen maddeler yardımıyla renklendirilirler. Renklendiriciler, gıdalara eklenen ve katkı maddeleri olarak kabul edilen bir gruptur. Uluslararası Gıda Kodeks Komisyonuna göre (The Codex Alimentarius) "gıdanın rengini düzenleyen veya renk vermek amacıyla katılan madde" şeklinde belirtilmektedir. Gıdalara renk katmanın amacı, onları çekici kılmak, gıdaların işlenmesi sırasında renk kaybını en aza indirmek, kaliteyi artırmak ve tüketiciyi bir ürünü satın almaya ikna etmek olarak sıralanabilir (Chaitanya, 2014). Gıdaların rengi, üretimi sırasında kullanılan teknoloji, kullanılan hammaddenin nitelikleri, depolama koşulu ve depolama süresi gibi değişik faktörler hakkında da ipuçları verebileceğinden ayrıca önem taşımaktadır (Kırca, 2004).

Son elli yılda dünyada, çalışan kadın nüfusunun ve buna bağlı olarak bebek ve çocuk bakım hizmetlerine talebin artması, aynı zamanda yaşlı nüfusun artması ve buna bağlı olarak yaşlı bakım ve hizmetlerine talebin artması, hazır ve işlenmiş gıdaya talebin katlanarak artmasına neden olan faktörlerin başında gelmektedir. Bununla birlikte, tüketiciler, gıdaların içeriklerinin giderek daha fazla farkına varmışlar ve bu nedenle gıdaların mümkün olduğu kadar doğal olmasını talep etmektedirler. Böylece gıda endüstrisi hem görsel olarak çekici ve damak tadına uygun hem de içeriği bakımından optimum değer sunan gıda sağlama zorluğuyla karşı karşıya kalmaktadır (Downham and Collins, 2000). Tüketiciler giderek daha fazla saf ve doğal gıda ve dolayısıyla doğal renkler talep

ettikçe ve bu talebin neleri kapsadığı daha yakından inceledikçe, gıdaları renklendirmenin öneminin artması ve doğal ile eşanlı hale gelmesi beklenmektedir. Doğal renklendiricilere olan ilgi hem yasal düzenlemelerin hem de tüketicinin gıdalarında sentetik katkı maddelerinin kullanımına ilişkin farkındalığının bir sonucu olarak önemli ölçüde artmıştır (Giusti and Wrolstad, 2003).

Renklendiriciler; sentetik, doğal ve doğala özdeş boyalar olarak isimlendirilen 3 genel sınıfa ayrılmaktadır. Ayrıca bazı monosakkarit ve disakkaritlerin kontrollü ısıtılarak hazırlanan karamel, dünyada kullanılan renklendiricilerin %11 gibi oldukça büyük bir kısmını oluşturmamasından dolayı önemli bir gıda renklendiricisi olarak kabul edilmektedir. Tüm ülkelerde gıda renklendiricilerinin kullanımı yasal düzenlemelerle kontrol edilmektedir. Dünyada yaygın olarak kullanılan gıda renklendiricilerinin kullanım oranı Şekil 1.1'de gösterilmiştir (Kırca, 2004).



Şekil 1.1 Dünya genelinde kullanılan gıda renklendiricilerinin dağılımı (Kırca, 2004)

Sentetik boyalar, doğal olarak var olmayan, reaksiyonlar sonucunda elde edilen renklendiricilerdir. Örneğin gün batımı sarısı (sunset yellow), karnozin ve tartrazin vb. Doğala özdeş boyalar, kimyasal yapıları doğada bulunan renklendiricilerle özdeş olacak şekilde kimyasal sentez yoluyla üretilen renklendiricilerdir. Örneğin; β -karoten, riboflavin ve kantaksantin vb. doğal renklendiriciler, doğal yenilebilir kaynaklardan gıda hazırlama yöntemleri kullanılarak üretilen organik renklendiricilerdir. Örneğin; kurkumin, biksin ve antosiyanin vb. (Hendry and Houghton, 1996).

Doğal renklendiriciler, pigment içeren pek çok kaynaktan elde edilebilirler. Pigment içeren başlıca kaynaklar, algler dahil bitkiler, omurgalılar,

omurgasızlar, mantarlar, likenler ve bakteriler olarak sıralanmaktadır. Bu sınıflandırmada bitkiler çok çeşitli sayıda içerdikleri pigmentler ile oldukça kullanışlı kaynak sınıflarından biri olarak değerlendirilmektedirler. Bitkilerde en sık görülen başlıca pigment sınıfları Tablo 1.1’de gösterilmiştir.

Antosiyaninler, bitkilerde yaygın olarak bulunan en önemli renkli pigment grubudur. Bu yoğun renkli ve suda çözünür pigmentler, yüksek bitkilerin taç yaprakları, yaprakları ve meyvelerindeki neredeyse tüm pembe, kırmızı, mor ve mavi renklerden sorumludur (Harborne, 1998). Antosiyaninler, antioksidan, antiinflamatuvar, antibakteriyel, anti-kanserojen ve uzun süreli devam eden hastalıklara karşı koruma olmak üzere çok sayıda biyolojik aktiviteye ve terapötik özelliğe sahip olmalarından dolayı sentetik renklendiricilere alternatif olarak gıda ve kozmetik alanında giderek daha çekici hale gelmektedir (Zhang et al., 2020). Antosiyanin pigmentlerinin doğal gıda boyaları olarak bilinmesine rağmen kullanımları henüz çok yaygın değildir. Bu durumun nedenleri arasında; buldukları kaynaktan saflaştırılmalarının zorluğu, kimyasal kararlılıklarının yeterince olmaması, renklendirme kapasitelerinin sentetik olanlara oranla daha az olması, gıdaların işleme koşulları aşamasında oluşan reaksiyonlardan etkilenmeleri ve ticari ürün olarak piyasada yeteri kadar mevcut olmamaları gelmektedir (Mazza and Brouillard, 1987). Tüm bunlara rağmen saflaştırma yöntemlerinin gelişmesi ve kaynakların giderek artması antosiyaninlere olan ilginin devam etmesini sağlamaktadır.

Tablo1.1. Bitkilerde en sık görülen başlıca pigment sınıfları (Hendry, and Houghton, 1996)

Pigment	Yaygın Hali	Bulunduğu Kaynak
Klorofiller	a	Tüm fotosentetik ökaryotlar
	b	Tüm kara bitkileri ve birçok alg
	c,d	Kahverengi ve diğer algler
Fikobilinler	Fikosiyantin	Mavi-yeşil ve diğer algler
	Fikoeritrin	Kırmızı ve diğer algler
Karotenoidler	Lutein	Çoğu fotosentetik organizmada bulunan en bol ksantofil
	β -karoten	Çoğu fotosentetik organizmada bulunan en bol karoten
	Violaksantinler	Yüksek bitkilerde yaygın
	Neoksantinler	Yüksek bitkilerde yaygın
Antosiyanidinler	Fukoksantin	Kahverengi ve diğer algler
	Siyanidin	Yüksek bitkilerde en yaygın bulunan antosiyanidin
		Yüksek bitkilerde yaygın
		Yüksek bitkilerde yaygın
Betalainler	Pelargonidin	Belirli bir bitki türünde yaygın
	Delfinidin	
Betasiyanin	Betasiyanin	

Antosiyaninlerin en önemli kaynağı şarap üretiminden elde edilen üzüm posasıdır. Diğer önemli kaynaklar kırmızı lahana, mürver, siyah frenk üzümü, siyah havuç, tatlı patates ve kırmızı turptur. AB'de sebzeler ve yenilebilir meyveler antosiyanin kaynağı olarak kabul edilirken ABD'de sadece üzümlere izin verilir (Mortensen, 2006).

"Siyah havuç" (*Daucus carota ssp. sativus var. atrorubens Alef.*), gıda endüstrisinde pigment, renklendirici olarak kullanılan antosiyaninlerin kaynağı olarak bilinen endüstriyel bir üründür. Türkiye, dünyada hızla artan talep nedeniyle siyah havuç üretiminde her yıl artan tonajla dünya lideridir. Siyah havuç antosiyaninleri, ABD FDA (Gıda ve İlaç Dairesi) tarafından gıdalardaki karnozinin yerine geçmesi için onaylanmıştır. Dolayısıyla siyah havuçtan ekstrakte edilen antosiyaninler yüksek bir ticari potansiyele sahiptir. Özellikle kırmızı lahana, siyah havuç, kırmızı turp, mor patates veya mor mısır gibi sebzelerde bol miktarda bulunan açillenmiş (yani fenolik veya alifatik asitler) antosiyanin pigmentleri oldukça kararludur (Bkowska-Barczak, 2005). Antosiyaninlerin siyah havuçtan ekstraksiyonu, pigmentlerin hücre duvarı matrisine sıkı bir şekilde bağlı olmasından dolayı zorlu bir süreçtir ve ekstraksiyon prosedürünün optimize edilmesi kritik önem taşımaktadır (Kumar et al., 2022).

Antosiyaninlerin kimyasal yapılarının polar olması nedeniyle ekstrakte edilirken yaygın olarak kullanılan çözücüler etanol, metanol veya asetonun sulu karışımlarıdır (Castañeda-Ovando et al., 2009). Bu nedenle sıvı-sıvı ekstraksiyonlarla başarılı bir şekilde buldukları kaynaktan saflaştırılabilirler.

Sulu ikili-faz ekstraksiyon (ATPE) ayırma tekniği, ilk olarak 1986 yılında İsveçli bir biyokimyacı olan P. A. Albertsson tarafından geliştirilmiştir. O yıllardan beri, bir sıvı-sıvı ekstraksiyon yöntemi olan ATPE, proteinler, enzimler, fitokimyasallar, nükleik asitler ve pigmentler gibi birçok biyoteknolojik materyali işlemek için güçlü bir biyoayırma aracı haline gelmiş ve geniş çapta kullanılmıştır (Phong et al., 2018). Metanol, etanol, 1-propanol ve 2-propanol gibi alifatik alkollerin sulu çözeltileri, uygun konsantrasyonlardaki tuz çözeltileri ile karıştırıldığında, birbiri ile karışmayan alkol fazı ve tuz fazı olmak üzere sulu ikili-faz sistemi elde edilir (Marco et al., 2017). ATPE yönteminin,

moleküllerin biyolojik aktivitesini koruma, yüksek ürün saflığı, yüksek ekstraksiyon kapasitesi, düşük maliyet, yüksek verim ve düşük toksisite gibi birçok avantajı bulunmaktadır (Castañeda-Ovando et al., 2009).

Farklı kaynaklardan değişik metodlarla ekstrakte edilen antosiyaninlerin tanımlanması için sıvı kromatografisi yöntemleri kullanılmaktadır. Kullanılan kromatografik yöntemler içerisinde en yaygın olanı "Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (High Performance Liquid Chromatography; HPLC)" yöntemidir. Antosiyaninlerin ayrıntılı bir şekilde tanımlanması bütünleşik yöntemlerin ortaya çıkışı ile daha da mümkün olmuştur. HPLC ile bütünleşen "Diode array dedektör (DAD)", kütle spektrofotometresi (Mass Spectrophotometer-MS) ya da iki yönteminde katıldığı ayrıntılı tanımlamalar için tercih edilen yöntemler arasındadır.

Antosiyaninlerin gıda endüstrisinde doğrudan uygulanmasını zorlaştıran nedenlerin başında pH, oksidasyon, enzimler, yüksek sıcaklık (≥ 50 °C) ve ışık gibi çeşitli çevresel faktörler gelmektedir. Bu faktörler antosiyaninlerin, kararsızlık, bozunma ve renk değişikliği göstermelerine neden olurlar. Bu durum, antosiyaninlerin biyoerişilebilirliklerinin düşmesine neden olarak özellikle insan sağlığı üzerindeki pozitif etkilerini engellemektedir. Son araştırmalar, mikroenkapsülasyon tekniklerinin, antosiyaninlerin kararlılığını ve biyoerişilebilirliğini arttırmanın yanı sıra acı tat ve burukluk gibi hoş olmayan tatlarını maskeleyerek için de etkili ve pratik bir strateji olabileceğini ileri sürmektedir (Zhang et al., 2020).

Bu tez çalışmasında "siyah havuç" (*Daucus carota ssp. sativus var. atrorubens Alef.*) meyvesinden antosiyaninlerin ekstraksiyonu gerçekleştirilmiş, ekstrakte edilen antosiyaninler tanımlanarak karakterize edilmiştir. Ardından antosiyaninler püskürterek kurutma tekniği ile enkapsüle edilerek toz haline getirilmiş ve toz üründe kararlılık testleri yapılmıştır. Kurutulan antosiyanin örneğinin gıda sanayisinde kullanılabilirliğini göstermek amacıyla dondurma ile renklendirme çalışmaları yapılmıştır. Üç temel bölümden oluşan tez çalışmasının ilk bölümünde siyah havuç antosiyaninlerinin ekstraksiyonu için kullanılan homojenizasyon ve ATPE yönteminin optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. İkinci bölümde, optimize edilen koşullar altında ekstrakte

edilen antosiyaninler HPLC yöntemi ile tanımlanmış ve püskürtmeli kurutucu ile enkapsüle edilmiştir. Üçüncü bölümde ise enkapsüle edilen toz örneğın kararlılık testleri yapılmış ve ticari olarak satılan dondurmada renklendirme çalışmaları yapılmıştır.



2. GENEL BİLGİLER

2.1 Gıdaların Renklendirilmesi

Gıdaların en önemli kalite özellikleri arasında, lezzetleri, renkleri ve kokuları gelmektedir. Bunlar, tüketicilerin öncelikli önem verdikleri özellikler olmasından dolayı gıda endüstrisinin ayrıca önemle üzerinde durduğu konuların başında gelmektedir. Son yıllarda gıda endüstrisinde yaşanan bilimsel evrim, hem tüketicinin tat ve görünüm açısından memnuniyetini kazanan hem de sağlıklı beslenme güvencesini sağlayan gıdaların üretilmesini sağlamıştır (Martines et al., 2016).

Gıdaların rengi, duyuşsal bir özellik olmasından dolayı tüketici tercihinin ortaya çıkmasında ve gıdanın kabul edilebilirliğinde, renkte meydana gelen değişikliğin gıdanın güvenliği ile doğrudan ilişkilendirilip kalite belirteci olarak değerlendirilmesinden dolayı çok önem taşımaktadır. Gıdaların işlenmeleri ve depolanmaları esnasında birtakım etkilere bağlı olarak renkleri değişiklik göstermektedir. Bu etkiler; gümüşęi, sıcaklık, oksijen ve metal iyonları olarak bilinmektedir. Rengi değişen ve kabul edilebilir renk beklentisini karşılamayan gıdalar, uygun koşullarda üretilmediği ya da depolanmadığı algısı oluşturacağından tüketiciler tarafından güvenilir bulunmamaktadır. Gıdanın doğal renginin yoğunlaştırılması, işleme esnasında kaybolan orijinal ve homojen rengin geri kazandırılması ve korunması gibi farklı sebeplerden dolayı gıda renklendiricilerinin gıdalara katılması gerekmektedir (Ekici, 2011). Bunun yanısıra, gıdalara renklendirici eklemenin diğer nedenleri arasında, gıdanın renginin homojen olması ve etkileyici görsellik kazanması, rengi olmayan maddelerin renklenmesi, hasat zamanı dışında üretilen ürünlerin görünümündeki değişiklikleri önleyerek meyvelerin renklerinin benzer olmasını sağlamak, meyve ve sebzelerden konserve hazırlarken sıcaklığın etkisiyle kaybolan doğal rengi ve görünüşü korumak, meyveli süt ve yoğurt, gazoz, meyve suları ve tat vericilerde meyvelerin rengi olması gerekenden soluk göstermesi durumunda renklerini koyulaştırmak ve ürünlerin tatlılık düzeyinin algılanmasına yardımcı olmak gelmektedir (Şimşek, 2011).

Gıdaların renklendirilmesi için, renk maddelerinin kullanımı ulusal ve uluslararası düzenlemeler çerçevesinde gerçekleştirilmekte olup aynı zamanda yasal olarak denetlenmektedir. "Türk Gıda Kodeksi Gıda Katkı Maddeleri Yönetmeliği"nce renklendiriciler "*Renklendiriciler, gıdalara renk veren veya rengini geri kazandıran, gıdaların doğal bileşenlerini ve genel olarak olduğu gibi gıda olarak tüketilmeyen doğal kaynakları içeren ve genellikle gıdanın karakteristik bir bileşeni olarak kullanılmayan maddeler ve ayrıca gıda maddelerinden ve diğer yenilebilir doğal kaynaklardan fiziksel ve/veya kimyasal ekstraksiyonla elde edilen diğer besleyici veya aromatik bileşenleri içermeyecek şekilde pigmentlerin selektif ekstraksiyonuyla oluşturulan preparatlarıdır*" olarak tanımlanmaktadır. Türkiye’de kullanılmasında sakınca olmayan renk vericiler ve kullanılabilir en yüksek miktarları "Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği’nde" yer alan "Gıdalarda Kullanılan Renklendiriciler Tebliği" dikkate alınarak belirlenmektedir (Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, 2013). Türk Gıda Kodeksi Gıda Katkı Maddeleri Yönetmeliği’nde gıdalara renk veren maddelerin miktarlarının belirlenmesinde "*Belirlenmemiş miktar (Quantum Satis)*" ilkesi güdülmektedir. Bu ilke, renklendiricilerin kullanılmasında sınır bir değerin olmadığı ancak kullanım maksadına ulaşmak için gerekli olan seviyeden fazla olmaması ve kullanan kişilerin algısını değiştirmeyecek bir oranda bulunmasını söyler (Akal, 2019). Amerikan Gıda ve İlaç İdaresi (Food and Drug Administration/ FDA) renk veren maddeleri; sebzeler, hayvanlar, mineraller, başka çıkış maddelerinden elde etme, özütleme, ayırma veya farklı yollarla elde edilen, gıdaya katıldığında istenen renk görüntüsünü sağlayan boyalar, pigmentler veya diğerleri şeklinde belirtmiştir. Yenilen maddelerde kullanılan renklendiriciler "doğal", "doğala özdeş" ve sentetik (yapay) renk veren maddeler şeklinde üçe ayrılmaktadır.

2.1.1 Doğal renklendiriciler

Doğal renklendiriciler, renklendirici maddelerin özelliklerinin çok çeşitli olması nedeniyle doğadaki çeşitli kaynaklardan elde edilebilirler. Bu nedenle doğal renklendiriciler, bitkiler, hayvanlar, mikroorganizmalar, algler ve mineraller olarak değişik kaynak maddelerden çeşitli yöntemleri deneyerek özütlenen, eklendiği gıdaları, tıbbi preparatları renklendiren maddeler olarak tanımlanabilirler. Çeşitli kaynaklardan elde edildikleri için kimyasal bileşimleri

de farklıdır ve bu durum çözünürlüklerini ve kararlılıklarını farklı şekillerde etkiler (Sigurdson et al., 2017). Doğal renklendiriciler, yapısal özelliklerine göre, benzopiran türevleri (oksijenli heterosiklik bileşikler) (antosiyeninler ve diğer flavonoid pigmentler), izoprenoid türevleri (karotenoidler ve iridoidler), kinonlar (benzokinon, naftokinon, antrakinin), melaninler, tetrapireol türevleri (klorofiller ve hem) ve tetrapireol türevlerinden farklı olarak N-heterosiklik bileşikler (pürinler, pterinler, flavinler, fenazinler, fenoksazinler ve betalainler) şeklinde sınıflandırılabilirler (Delgado-Vargas et al., 2000).

Doğal renklendiriciler, gıdalara eklendiğinde gıda maddesiyle reaksiyona girer ve gıdayı renklendirirler. Dolayısıyla kullanımına karar verilirken göz önünde bulundurulması gereken bir takım önemli noktalar vardır. Bunlar; gıdalarda istenilen renk tonu (genellikle iki veya daha fazla boyanın karıştırılması gerekebilir), gıdanın satışa sunulduğu ülkelerdeki yasal düzenlemeler, fiziksel hali (sıvı doğal boyalar, toz olarak kullanılan boyalardan daha pahalıdır), gıdanın bileşimi, sulu bir yapıya sahip olup olmadığı, hangi miktarda ve hangi türde yağları bulundurduğu (tanen ve proteinlerin varlığı, antosiyeninlerin kullanılmasını sınırlamaktadır), üretim kayıtları (sıcaklığı ve üretim süresi), gıdanın asidik veya bazik olması (çoğu doğal renklendiricinin renk tonu ve kararlılığı, gıdanın asidik veya bazik olmasından etkilenmektedir), gıdanın ambalajı (paketleme, ürüne ulaşan oksijen ve ışık miktarını etkileyeceğinden karotenoid gibi bazı renklendiriciler için önemlidir), gıdanın istenilen raf ömrü ve depolama koşulları olarak sıralanabilir (Hendry et al., 1992).

Doğal gıda renklendiricileri, çözünme ve kararlılık açısından farklılıklar gösterdiği için uygulama esnasında dikkatli olunmasını gerektiren hassas kısımlar barındırmaktadır. Bu hassas kısımlar;

Çözünürlük: Doğal renklendiricilerinden antosiyenin ve betalain suda çözünürler. Kurkumin, klorofil ve ksantofil ise yağda çözünürler. Bazı annatto-kurkumin karışımlarıysa suda ve yağlarda çözünebilirler.

Fiziksel form: Doğal renklendiriciler akışkan, partikül, kıvamlı partikül veya süspansiyon olarak bulunurlar. Süspansiyonlar kullanılırken (β -karoten ve annatto), uygulama yapılırken ki sıcaklık artışı, süspansiyon halindeki

renklendiricinin çözülmesi için yeterlidir. Sıvı ve yapışkan formdaki renklendiricilerde viskozite sıcaklıkla ilgilidir ve sıcaklık azaldıkça, renklendiricilerin gıdaya nüfus etmesi zorlaşır.

pH: Suda çözünebilir gıda boyaları, gösterdikleri yüksek kararlılıklarındaki pH değerlerinde üretilir. Örnek olarak norbiksin bulunan özütler bazıya yakın davranırken, antosiyanin bulunduranlar asidik özelliktedirler.

Mikrobiyal kalite: Yağda çözünen renklendiriciler düşük neme sahiptirler ve mikrobiyal bozunmaya daha az duyarlıdır. Ancak, antosiyaninli ekstraktlar ve pancar özütü bulunduranlar yüksek oranda su ve şeker bulundurduklarından bozunmaya eğilimlidirler ve mikrobiyal kalitenin sağlanması için önlemler alınmalıdır.

Diğer bileşenler: β -karoten, kurkumin olarak bilinen ve yağ içerisinde çözünebilir gıda renklendiricileri bulunduran maddelere zamlar, stabilize ediciler ve emülsifiyerlerin katılması gerekmektedir. Bu bileşenlerin, gıda boyasının eklendiği gıda sistemiyle uyumlu olması önem taşımaktadır (Kırca, 2004).

Doğal renklendiricilerin birçoğunun (özellikle bitkisel kökenli olanların), aynı zamanda antibakteriyel ve antioksidan özellikleri de bulunmakta olup, bu renklendiricilerle renklendirilen gıdalarda söz konusu bu etkiler görülmektedir. Dolayısıyla doğal renklendiricilerin temel kullanım amacı olan gıdada istenen rengin elde edilmesi ve görüntünün iyileştirilmesinin yanısıra sağlık açısından pozitif aktivite gösteren sağlığa yararlı özelliklerinin gıdalara aktarılması da sağlanmış olur (Güngörmez, 2015; İler vd., 2017).

2.1.2 Doğala özdeş renklendiriciler

Kimyasal olarak doğal renklendiricilerle aynı olan, doğal kaynakların kullanılmasıyla üretilen pigment ve renklendiricilerin karşılıkları şeklinde kimyasal yollarla üretilen renklendiricilere doğala özdeş renklendiriciler denilmektedir. Doğala özdeş renklendiricilerin en yaygın olanları, " β -karoten" (sarı-turuncu), " β -apo-8-karotenol" (turuncu-kırmızı), "kantaksantin" (kırmızı) ve "titanyum dioksit" (beyaz), klorofilin bakır kompleksi ve karameldir. β -karoten, ilk kez 1954 yılında satışa sunulmuş olup, gıda renklendirici

piyasaının çoğunluğunu (Avrupa piyasasının % 40' ı, dünya piyasasının % 17' si) oluşturmaktadır. β -karoten, margarinler, meşrubatlar, şekerler ve fırın mamulleri olarak çok sayıdaki gıda ürününde sıklıkla tercih edilmektedirler. Şekerin yaklaşık 150 °C'de NaOH, NH₄OH gibi katalizörler varlığında yakılmasıyla üretilen karamel, doğala özdeş renk maddesi ya da ayrı kategorize edilebilmektedir. Karamel, alkol içeren veya alkolsüz içilen maddelerin renklendirilmesinde kullanıldığından, ülkemizde üretimi endüstriyel olarak yapılmaktadır (Vural, 2017). Doğal ve doğala özdeş renklendiricilerin bir kısmı Tablo 2.1'de gösterilmiştir.



Tablo 2.1 Doğal ve doğala özdeş renklendiriler (Sigurdson et al., 2017)

Kimyasal Sınıflandırma	Renklendirici	Kaynak	Sağladığı Renk
Antosiyanin	Üzüm kabuğu ekstresi	Üzüm (preslemeden kalan kabuk	Kırmızıdan mora maviye
	Üzüm ekstresi	Concord üzümleri (<i>Vitis labrusca</i>)	
	Meyve suyu	Çilek	
	Sebze suları	Havuç, lahana ve diğerleri	
Betalain	Pancar tozu	Pancar (<i>Beta vulgaris</i>)	Pembeden kırmızıya
Karamel	Karamel	Şekerlerin ısıtılması	Kahverengi
Karminik asit	Cochineal ekstresi	<i>Dactylopius coccus</i>	Turuncudan kırmızıya
Karotenoid	Kantaksantin	Sentezlenmiş	Sarıdan turuncuya kırmızıya
	Havuç yağı	Havuç (<i>Daucus carota L.</i>)	
	Mısır endosperm yağı	Sarı mısır (<i>Zea mays</i>)	
	Oleoresin	Kırmızı biber (<i>Capsicum annum L.</i>)	
	Safran	Stigma (<i>Crocus sativus L.</i>)	
	Tagetler	Aztek kadife çiçeği (<i>Tagetes erecta L.</i>)	
	Likopen	Domates (<i>Solanum lycopersicum</i>)	
β -Apo-8-karotenol	Sentezlenmiş		

Tablo 2.1 Doğal ve doğala özdeş renklendiriciler (Sigurdson et al., 2017) (devamı)

Kimyasal Sınıflandırma	Renklendirici	Kaynak	Sağladığı Renk
Klorofil	Sodyum bakır klorofil	Yonca (<i>Medicago sativa</i>)	Yeşil
Zerdeçal	Oleoresin (Zerdeçal)	Rizom (<i>Curcuma longa L.</i>)	Sarı
Mineral	Demir oksit	Sentezlenmiş	Sarıdan turuncuya, kırmızıdan kahverengiye ve siyaha
	Mika sedefli	Sentezlenmiş	Sedefli
	Titanyum dioksit	Sentezlenmiş	Beyaz
	Demir glukonat	Sentezlenmiş	Sarımsı gri
	Demir laktat	Sentezlenmiş	Yeşilimsi beyaz
Fikosiyanin	Spirulina özü	Algler (<i>Arthrospira platensis</i>)	Mavi-yeşil
Vitamin	Riboflavin	Mikrobiyal fermantasyon	Sarı
Diğer	Kızarmış kısmen yağı alınmış pişmiş pamuk tohumu unu	Pamuk tohumu (<i>Gossypium hirsutum</i>)	Açıktan koyu kahverengiye

2.1.3 Sentetik (Yapay) renklendiriciler

Sentetik (yapay) renklendiriciler, araştırmaları tamamlanarak belirlenen güvenli koşullarda kimyasal yollarla üretilmiş ve yapısal olarak doğada bulunmayan gıda renklendiricileridir. Sentetik gıda renklendiricilerinin ilki olarak gösterilen “muavine”, Sir William Henry Perkin tarafından 1856 yılında çıkarılmıştır. Sonrasında üretilen sentetik gıda renklendiricileri dünyada yaygın olarak kullanılmışlardır (Downham, and Collins, 2000). Sentetik renklendiricilerin gıda sanayisinde yaygın kullanılmalarının nedenleri, boyar özelliklerinin iyi olması, katıldıkları ürüne aroma katmamaları, üretimlerinin basit ve maksimum kapasitede yapılabilmesi, sıcaklık, gün ışığı, O₂ ve basınç gibi şartlara dayanıklı olmaları, eklendikleri ürünlere küçük miktarlarda katılmaları, herhangi olumsuz bir değişikliğe neden olmamaları ve ucuz olmalarıdır (Rajapaksha et al., 2015).

Sentetik renklendiriciler genellikle asidik tabanlı olup birçoğu aslen kömür katranından elde edilir ve azo grubu içerirler. Genellikle kömür katranı boyaları olarak da adlandırılırlar (Rajapaksha et al., 2015).

Gıda renklendiricileri yasal yollarla yapılan kullanım esaslarına göre sertifikası olan ve sertifikası olmayan renklendiriciler olarak ikiye ayrılmaktadırlar. Sertifikalı renklendiricilerin hepsi sentetik (yapay) olup, arge çalışmaları tamamlanarak kullanım izinleri alınmış, kullanıldıkları takdirde gıdalarda yapısal olarak kararlı özellik gösteren ve zamana bağlı olarak kullanılan miktarlarında herhangi bir azalma görülmeyen renklendiricilerdir. Doğal renklendiriciler, sertifikası olmayan grupta bulunurlar. Sertifikası olmayanların listesi sürekli değişebilir ve bu gruptaki araştırmalar devam etmektedir (Çakmakçı, 2012; Mol, 2016).

Sentetik renklendiriciler çözünürlüklerine göre üç gruba ayrılmaktadır. Bunlar; lake renklendiriciler, yağda çözünen renklendiriciler ve suda çözünen renklendiricilerdir. Sunset yellow, Brilliant blue ve Allura red gibi suda çözünen sentetik renklendiriciler kullanım kolaylığından dolayı gıda üretiminde tercih edilmektedirler. Yağda çözünen sentetik renklendiricilerin toksik özelliklerinden dolayı gıdalarda kullanımları yasaklanmıştır. Lake renklendiriciler, suda çözünen yapay renklendiricilerin alüminyum oksit (Al₂O₃) üzerine alüminyum

klorür ($AlCl_3$) ilave edilerek oluşan alüminyum tuzunun çöktürülmesi şeklinde elde edilen renklendiricilerdir. pH 3.5-9.5 arasında en yüksek özellik gösteren lake renklendiriciler, ağızda renk bırakmamalarından dolayı genellikle sakız, bonbon ve draje tipi şekerlemelerde kullanılmaktadırlar.

Sentetik gıda renklendiricilerinin su ve yağ çözünürlükleri oldukça iyi olmalarından dolayı uygulandıkları gıdaların sayısı çoktur. Bu gıdalara kurabiye, bisküvi ve pasta gibi fırın mamulleri, sütlü ürünler, meşrubatlar, dolgu maddeleri, şekerlemeler, ayak üstü yenen maddeler ve çikletler örnek sayılabilir. Suda iyi çözümlerinin nedeni, bir mol asidik grup (sülfon grubu- SO_3H , karboksilik grup-COOH) içermelerinden ileri gelmektedir (Carocho et al., 2014). Gereğinden fazla kullanılan sentetik renklendiricilerin insan sağlığına olumsuz etkilerinin olduğu bilinmektedir. Günlük olarak kabul edilen alım miktarı (ADI: Acceptable Daily Intake), renklendiricilerin de dahil edildiği tüm katkı maddelerinin toksik düzeyinin ölçüsüdür. ADI, Gıda Katkılarında Uzman FAO/WHO (FAO: Food and Agriculture Organization, WHO: World Health Organization) komitesi ve Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi (EFSA) bünyesinde ortaya konmaktadır. Sentetik renklendiricilerin E kodları (EC Code), her bir gıda katkı maddesi için Avrupa Birliği tarafından belirlenen kod numaralarıdır. Kullanıldıkları yerler ve ADI değerleri Tablo 2.2' de verilmiştir.

Sentetik renklendiricilerin kararlılıkları, kullanıldıkları ortam, konsantrasyonları, gıdaya ilave edilen diğer katkı maddelerinin konsantrasyonları, sıcaklık ve süre gibi faktörlerle ilişkili olsa da yüksektir. Suda yüksek oranlarda çözünebilmektedirler. Büyük bir çoğunluğu ısı, ışık, koruyucu maddeler, alkali ve asitlere karşı daha kararlı olup, raf ömürleri daha uzun, verdikleri renkler açısından aralıkları daha geniş ve renklendiricilikleri yüksektir (Dinç, 2007). Bu özellikleri nedeniyle gıdalarda kullanımları zamanla artmış olup, doğal renklendiricilere olan üretici ilgisini azaltmıştır. Ancak yapılan araştırmalar sentetik renklendiricilerin sağlığa olumsuz etkilerini gün yüzüne çıkarmış ve tüketiciler tarafından doğal renklendiricilere olan ilgi her geçen gün artarak devam etmiştir (Özen, 2008).

Tablo 2.2 Sentetik renklendiricilerin E kodları, ADI değerleri ve genel kullanım alanları (Martins et al., 2016)

	Sentetik Renklendirici	E Kodu	ADI	Kullanım Alanları
	Allura kırmızısı AC	E129	7 mg/kg v.a.	Yumuşak içecekler ve işlenmiş et ürünleri İçecekler, alkollü içkiler ve havyar
	Amarant	E123	0,8 mg/kg v.a.	Soslar, süt, baharat karışımları, soslar,
	β -Karoten	E160a	5 mg/kg v.a.	içecekler, kaplamalar, meyve suları ve margarin
Kırmızı-Turuncu Renk Veren	Karminik asit	E120	5 mg/kg v.a.	Fırıncılık ürünleri, Şekerlemeler, soslar, dondurma, yoğurt, jeli bon, domates ürünleri, sakız, haplar, içecekler Reçel, şekerlemeler, yoğurt Kokteyl ve şekerlemeler
	Azorubin	E122	4 mg/kg v.a.	Peynir dış kabuğu
	Eritrosin	E127	0,1 mg/kg v.a.	Alkolsüz içecekler, tatlılar ve şekerlemeler
	Lithol rubin	E180	BK 1,5 mg/kg v.a.	Dolgu malzemeleri ve et ürünleri
	Ponso 4R	E124	4 mg/kg v.a.	
	Kırmızı 2G	E128	0,1 mg/kg v.a.	Süt ürünleri, renkli içecekler, şekerlemeler, kaplamalar, şuruplar
Mavi Renk Veren	Parlak mavi FCF	E133	10 mg/kg v.a.	

Tablo 2.2 Sentetik renklendiricilerin E kodları, ADI değerleri ve genel kullanım alanları (Martins et al., 2016) (devamı)

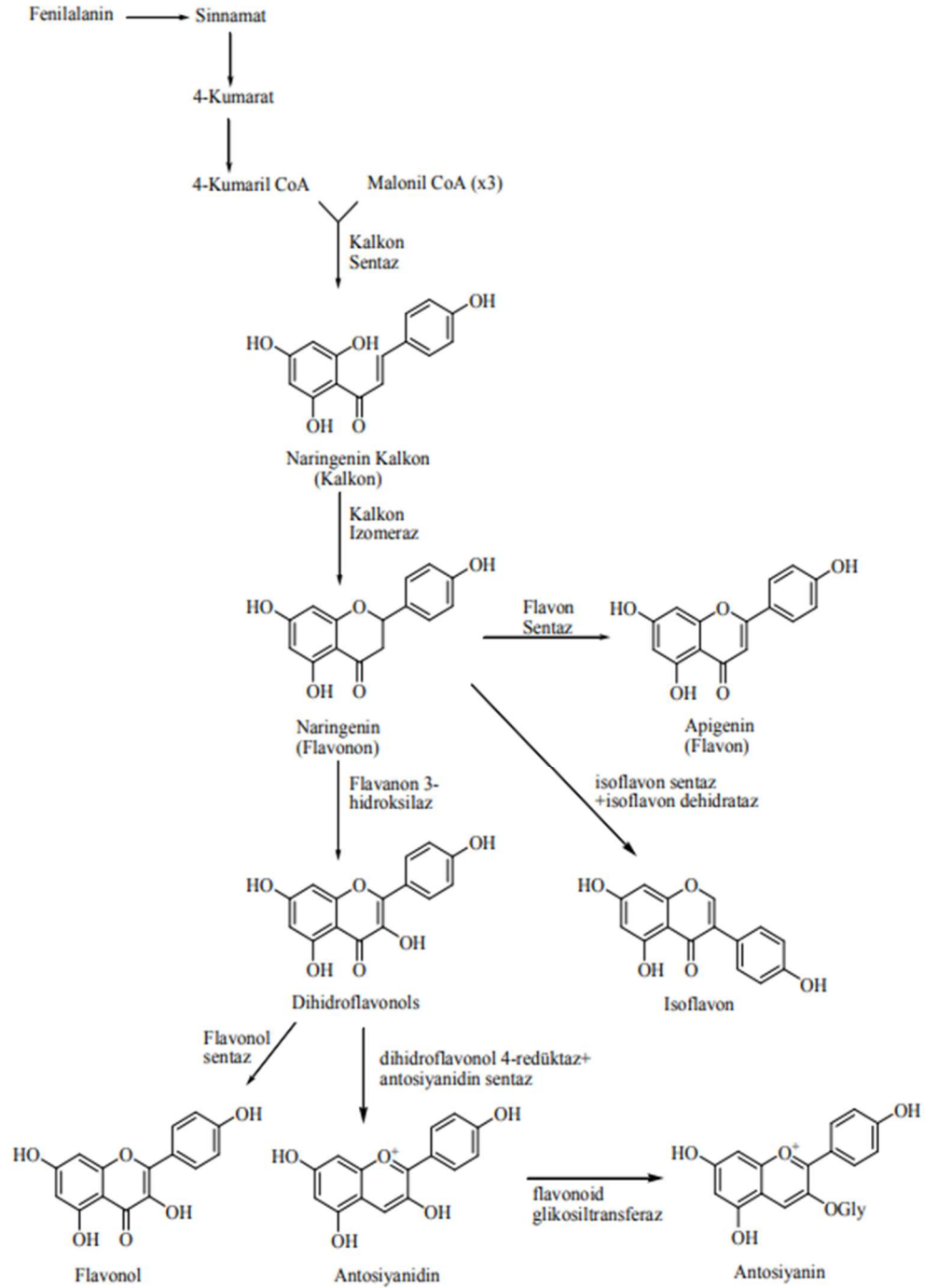
	Sentetik Renklendirici	E Kodu	ADI	Kullanım Alanları
	İndigo karmin	E132	5 mg/kg v.a.	Dondurma, tatlılar, fırıncılık ürünleri, dolgu malzemeleri ve bisküviler
Sarı Renk Veren	Patent mavi V	E131	15 mg/kg v.a.	Şekerlemeler
	Kinolin sarısı	E104	10 mg/kg v.a.	Meyve ve sebze suları
	Gün batımı sarısı FCF	E110	2,5 mg/kg v.a.	Alkolsüz içecekler, tatlılar
	Tartrazine	E102	7,5 mg/kg v.a.	Alkolsüz içecekler, tatlılar, şekerlemeler
Yeşil Renk Veren	Bakır klorofilin kompleksleri	E141ii	7,5 mg/kg v.a.	Yeşil zeytin ve ürünler
	Yeşil S	E142	5 mg/kg v.a.	Kavanoz bezelye, kek miksleri, naneli şekerler
Beyaz Renk Veren	Titanyum dioksit	E171	Belirli değil	Dolgu ve süs malzemeleri, fırıncılık ürünleri

2.2 Antosiyaninler

Benzen halkasına (aromatik halkaya) bir veya birkaç sayıda hidroksil grubunun bağlanmasıyla oluşan moleküllere fenolik bileşikler denir. Bitkilerde bulunan fenolikler bitkilere özgüdür ve serbest olarak bulunmayıp ester veya glikozit formunda bulunur. Fenolikler, gıdalarda kekremsi tada neden olan, bitkisel gıdalarda farklı niteliklerde bulunan ve miktarları değişen bileşiklerdir. İnsan sağlığı üzerine antimikrobiyal ve antioksidan etkileri, gıdaların aroma ve renklerine katılmaları gibi birçok özellik fenolik bileşiklerin önemli olduğunu göstermektedir (Saldamlı, 2007). Fenolikler, fenolik asitler ve flavonoid gruplar şeklinde ikiye ayrılmaktadırlar. Flavonoid grup, fenolik bileşiklerin içindeki en önemli sınıfı oluştururlar ve aromatik halkalar arasındaki hidroksilasyona ve konjugasyona göre altıya ayrılırlar. Bu altı ana grup, flavonlar, flavanoidler, izoflavonlar, antosiyaninler, flavonoller ve flavanol türevleridir (Fang et al., 2017). Flavonoidler arasında en önemli gruplardan bir tanesi antosiyaninlerdir. Antosiyaninler, yaprak, kök, çiçek ve meyve de dâhil olmak üzere bitkisel dokuların tamamında bulunan, pH'nın farklanmasıyla kırmızı, mor veya mavi renklerde olabilen ve suda çözünen pigmentlerdir (Ignat et al., 2011).

Bitkilerde ikincil (sekonder) metabolit olarak bulunan antosiyaninler, bitkilerin fotosentezle oluşturdukları, yaşam gereksinimleri için kullandıkları birincil (primer) metabolitler olan karbohidratlar, amino asitler, v.b. gibi metabolitlerden türerler. Antosiyaninlerin sentezlenmesi fenilalanin varlığına bağlıdır (Mathley and Buslig, 1998, Markham, 1982; Smith, 1982). Fenilalaninden başlayarak gerçekleşen enzimatik reaksiyonlar sonucu antosiyaninler sentezlenmektedir. Reaksiyonun başlangıcında fenilalanin, amonyum grubunu kaybeder ve sinamik asit oluşur. Ardından sinamik asit sinamat 4-hidroksilaz (C4H) ve 4- kumarat-CoA ligaz (4CL) sayesinde 4-kumarol-CoA'ya çevrilir. Bir mol (mol; maddelerin konsantrasyonları için kullanılır) 4-kumarol-CoA ile üç mol malonil CoA enzimatik bir reaksiyon sonucu naringenin kalkonu meydana getirirler. "Naringenin kalkon", kalkon izomerazın (CHI) katalizi ile hızlıca naringenini oluşturur. Ardından flavanon 3-hidroksilaz (F3H), naringenini hidroksiller ve dihidroflavonole dönüştürür. Dihidroflavonoller, dihidroflavonol 4-redüktaz (DFR) enziminin katalizi ile lökoantosiyanidinlere dönüştürülür. Lökoantosiyanidinler, antosiyanin sentaz

(ANS) enziminin katıldığı reaksiyon ile antosiyanidinlere dönüştürülür. Son basamakta antosiyanidinler, UDPG-flavonoid-3-O-glukoziltransferaz (UFGT) enzimi ve UDP tarafından aktive edilen şeker taşıyıcıları ile glikozillenip antosiyaninleri oluştururlar (Xie, 2011; Mercan, 2017) (Şekil 2.1).



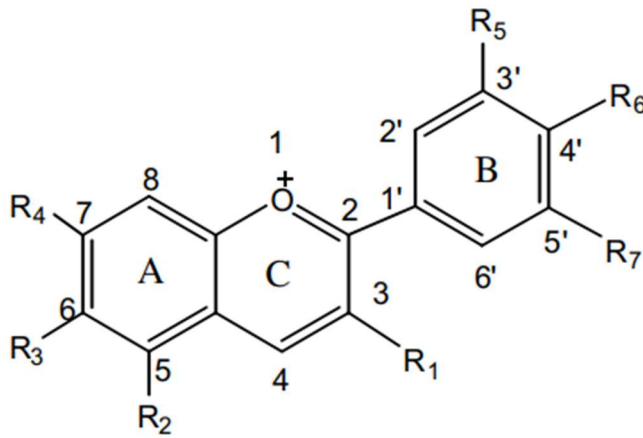
Şekil 2.1 Antosiyaninlerin biyosentezi (Markham, 1982; Çelik, 2012)

Antosiyaninlerin bitki dokularındaki sentez konsantrasyonları farklılık göstermektedir. Konsantrasyon farklılığı, bitkinin genetik yapısına, maruz kaldığı stres koşullarına, büyüme esnasındaki çevresel faktörlere, kullanılan suyun ölçüsüne, yetiştirildiği toprağın mineral ve organik bileşik içeriğine bağlıdır (Gonçalves et al., 2004).

2.2.1 Antosiyaninlerin yapısı ve kararlılığı

Antosiyanin kelimesi Yunanca "anthos" (çiçek) ve "kyanos" (mavi) sözcüklerinden türetilmiştir. Antosiyaninler, bitkilerde bulunan pigmentler içerisinde suda çözünebilen pigmentler grubunun en geniş temsilcisidir. Bitki dokularında bulunan kırmızı, mavi ve mor rengin oluşmasında birinci derecede rol oynarlar. Antosiyaninlerin, renkli bitki dokularının özellikle arılar üzerindeki çekiciliği arttırarak, polen ve tohumların dağılmasında rol alması, dokularda meydana gelen ultraviyole ışığın neden olduğu bozulma ve fitoaleksin olarak bilinen mikrobiyal enfeksiyonlar karşısında koruyucu etki göstermeleri bitkiler için önem taşımaktadır (Kong et al., 2003).

Kimyasal açıdan yapıları, antosiyanidinlerin şekerle bağlanmış halleri (glikozid oluşturmuş şekilde) flavilyum tuz yapılarının ya da 2-fenil benzopirillium halinin polimetoksi ve polihidroksi olarak türemiş glikozitleri olan polifenolik bileşiklerdir. Antosiyaninler, aglikon kısmına antosiyanidin denilen glikozit bir yapıya sahiptirler (Fidan, 2014).



Şekil 2.2 Genel antosiyanin yapısı (Castañeda-Ovando et al., 2009)

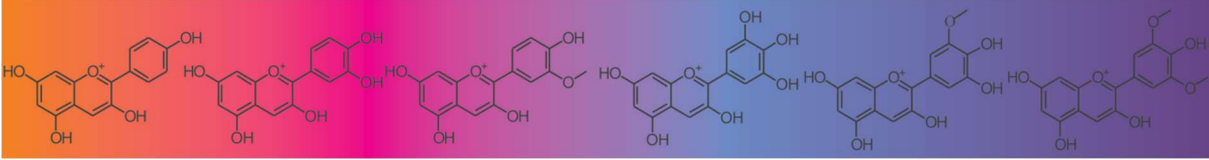
Genel bir antosiyanin yapısı Şekil 2.2’de verilmiştir. A, B ve C halkalarından oluşan heterosiklik bu bileşikte, aromatik halka bulunduran A ve B 6 karbon bulundurmakta, hetero halkalı C 3 karbon bulundurmaktadır. Hetero halkanın yükseltgenmesiyle bileşiklerde değişiklikler meydana gelmektedir (Heim et al., 2002). Glikozidin aglikon kısmına genel olarak antosiyanidin denilmektedir. Antosiyanidinlerde, halka C’de hidroksil grubu (OH) grubu vardır. Antosiyanidin sınıfını oluşturan flavonoidlerin yapısı A ve B halkalarındaki H, OH ve OCH₃ gruplarının varlığıyla çeşitlenir. Belirlenmiş 23 tane antosiyanidin bulunmaktadır ancak molekülde yer alan (-OH) sayısına, hidroksil gruplarındaki metilasyon derecesine, molekülde bulunan şekerlerin sayısı ve şekerlerin moleküle hangi pozisyondan bağlandığı, şekerlere bağlı olan alifatik ve aromatik asitlerin yapısı ve sayılarına göre birbirinden farklılıklar gösteren 500’ den fazla antosiyanin oluşmuştur. Bitkilerde yaygın olarak en çok bulunan 6 temel antosiyanidin vardır. Bu antosiyanidinler, siyanidin, delfinidin, pelargonidin, malvidin, peonidin ve petunidindir. Bitkilerin yenilebilir kısımlarında bu antosiyanidinlerin bulunma oranları şu şekildedir; delfinidin (%12), malvidin (%7), pelargonidin (%12), peonidin (%12), petunidin (%7) ve siyanidin (%50) (Kong et al., 2009). Temel antosiyanidinlerin kimyasal yapısı, yapıya bağlı gruplar ve renkleri Tablo 2.3’te verilmiştir.

Tablo 2.3 Temel antosiyanidinlerin kimyasal yapısı (Castañeda-Ovando et al., 2009)

Antosiyanidin(Kısaltma)	Gruplar (H, OH ve OCH ₃)							Gösterdiği Renk
	3	5	6	7	3'	4'	5'	
Delfinidin (Dp)	OH	OH	H	OH	OH	OH	OH	Mavi-Kırmızı
Malvinidin (Mv)	OH	OH	H	OH	OMe	OMe	OMe	Mavi-Kırmızı
Pelargonidin (Pg)	OH	OH	H	OH	H	OH	H	Turuncu
Peonidin (Pn)	OH	OH	H	OH	OMe	OH	H	Turuncu-Kırmızı
Petunidin (Pt)	OH	OH	H	OH	OMe	OH	OH	Mavi-Kırmızı
Siyanidin (Cy)	OH	OH	H	OH	OH	OH	H	Mor-Kızıl

Antosiyaninlerin rengi, antosiyanidinlerin B halkasındaki değişikliklerle ilişkilendirilmiştir. Hidroksilasyon varlığı maviliği, metoksilasyon varlığının kırmızılığı arttırdığı bildirilmiştir. Antosiyanin molekülündeki metoksil grubunun (-OCH₃) sayısı arttıkça renk kırmızıya döner. Bunun aksine

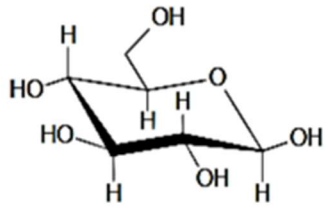
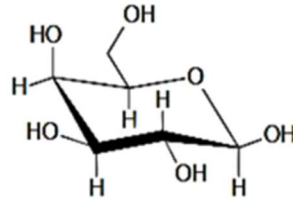
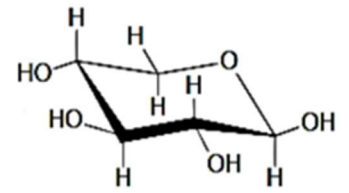
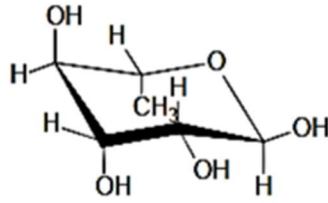
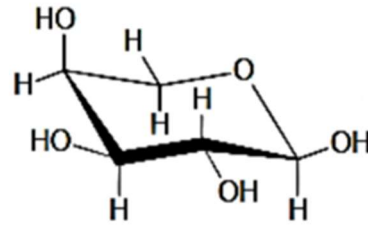
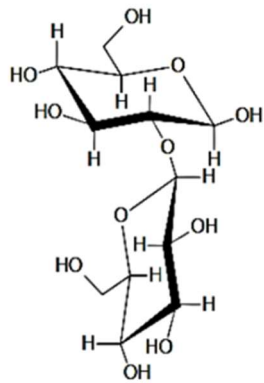
moleküldeki hidroksil grubu (-OH) sayısındaki artış rengin maviye doğru dönmesini sağlamaktadır (Jackman and Smith, 1992). Pelargonidin, siyanidin ve delphinidin antosiyanidinlerindeki -OH bağı sayısına göre mavimsi rengin arttığı görülmüştür (Şekil 2.3). Ayrıca antosiyanidin moleküllerindeki glikosillenme ve metillenmenin kırmızı rengin oluşmasına neden olduğu belirlenmiştir. Bunun bir örneği siyanidinden peonidine kırmızılığın yoğunlaşmasıdır.



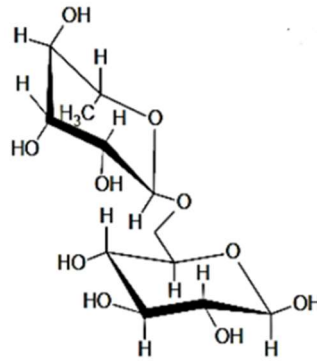
Pelargonidin Siyanidin Peonidin Delphinidin Petunidin Malvidin

Şekil 2.3 Yaygın antosiyanidinlerin görünür renk aralığı (Ananga et al., 2013)

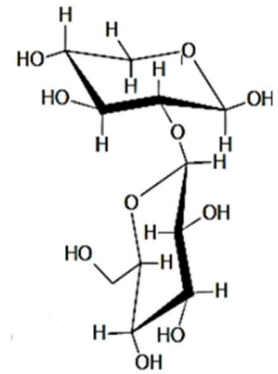
Antosiyanidinlerin, bitkilerde bulunma şekli serbest formda olmayıp, şekerlerle birlikte oluşturdukları glikozit ya da antosiyanin formunda olmalarıdır. Yaygın olarak antosiyaninler, glukoz, ramnoz, galaktoz, arabinoz ve ksiloz monosakkarit türü şekerleri bulundururlar. Rutinoz, sophoroz, sambubioz ve glukorutinoz disakkaritleri ve trisakkaritler antosiyanin yapılarında yer almaktadırlar (Rein, 2005) (Şekil 2.4 ve 2.5). Yapılarında bulunan glikozil birimlerinin sayısına göre antosiyaninler sınıflandırılabilir. Antosiyaninlerin aglikonlarında bulunan 3-hidroksil grubuna sakkaritlerin bağlanmasıyla monoglikozitler oluşur (Brouillard et al., 1991; Kähkönen, et al., 2003). Diglikozitler ise iki monosakkaritin antosiyanidinlerin 3 ve 5 karbonunda bulunan hidroksil gruplarına veya çok enderde olsa 3 ve 7 karbonunda bulunan hidroksil grubuna bağlanmasıyla oluşurlar (De Ancos et al., 1999). Ayrıca bu iki monosakkarit C-3'e de bağlanabilir. Triglikozitler, monosakkaritlerin aglikonun, iki tanesi 3 numaralı karbonuna bir tanesi 5 numaralı karbona ya da 7 numaralı karbona bağlanmasıyla oluşmuşlardır. Trisakkaritli bir antosiyaninde C-3'e bağlı monosakkaritler, doğrusal veya dallanmış olabilirler. Glikolizasyon 3', 4' ve 5' numaralı karbonlarda da gerçekleşir ve 3-glikozitler, 3,5-diglikozidlere göre 2,5 kat daha fazla bulunduğu düşünüldüğünde bol miktarda bulunan antosiyaninin siyanidin 3-glikozit olduğu söylenebilir (Kırca, 2004).

 β -D-Glukoz β -D-Galaktoz β -D-Ksiloz α -L-Ramnoz α -L-Arabinoz**Şekil 2.4** Antosiyaninlerde bulunan yaygın monosakkaritler (Rein, 2005)

Sophoroz

 β -D-Glikozil-
D-Glukoz

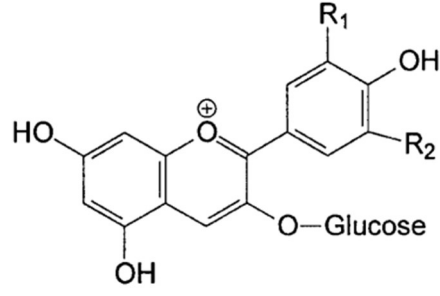
Rutinoz

 α -L-Ramnozil-
D-Glukoz

Sambubioz

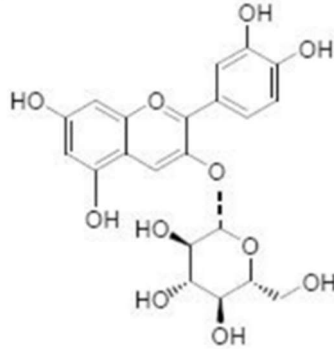
 β -D-Ksilozil
D-Glukoz**Şekil 2.5** Antosiyaninlerde bulunan yaygın disakkaritler (Rein, 2005)

Antosiyanidinlere, sakkaritlerin genel olarak bağlanma Şekil 2.6'da gösterilmiştir (Clifford, 2000).



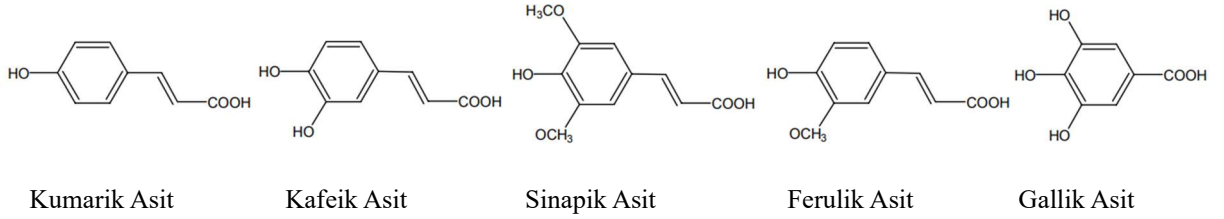
Şekil 2.6 Sakkaritlerin antosiyanidinlere genel bağlanma şekli (Clifford, 2000)

Siyanidinde bulunan 3. pozisyona bir glikoz bağlanması ile, doğada çok miktarda bulunan siyanidin 3-glikozit meydana gelmiş ve kimyasal yapısı Şekil 2.7'de verilmiştir (Karaca, 2011). Antosiyaninlerin temel yapısı antosiyanidinlere bağlı şeker grupları dışında açıl asit grupları da bulunmaktadır ve bu gruplar aromatik ve/veya alifatik asitlerden oluşur. Bu asit gruplarının moleküle bağlanmasına açillenme denir. Antosiyanin glikozil birimlerine bir ester bağıyla bağlanan organik asitler, genellikle aromatik fenolik asitler, alifatik dikarboksil asitler veya her ikisinin bir kombinasyonudur. Asitler en yaygın olarak monosakkaridin 6-pozisyonuna bağlanır, ancak monosakkaridin 2-, 3- ve 4-konumlarında açıl süstitüsüyonu olan antosiyaninler de bildirilmiştir.

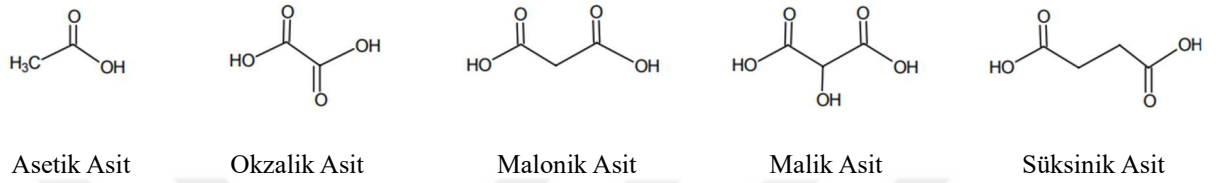


Şekil 2.7 Siyanidin 3-glikozit yapısı (Bruneton, 1995)

Antosiyaninlerde yaygın olarak bulunan fenolik asitler, hidroksisinamik asitlerin türevleri olan p-kumarik, ferulik, kafeik, sinapik asitler veya hidroksibenzoik asit türevi olan gallik asittir. Antosiyanin moleküllerinde yaygın olarak bulunan alifatik asitler, malonik, asetik, malik, süksinik ve oksalik asitlerdir (Bruneton, 1995). Antosiyanin moleküllerinin bir parçası olan en yaygın aromatik fenolik asitler Şekil 2.8'de ve alifatik dikarboksilik asitler Şekil 2.9'da gösterilmiştir (Rein, 2005).



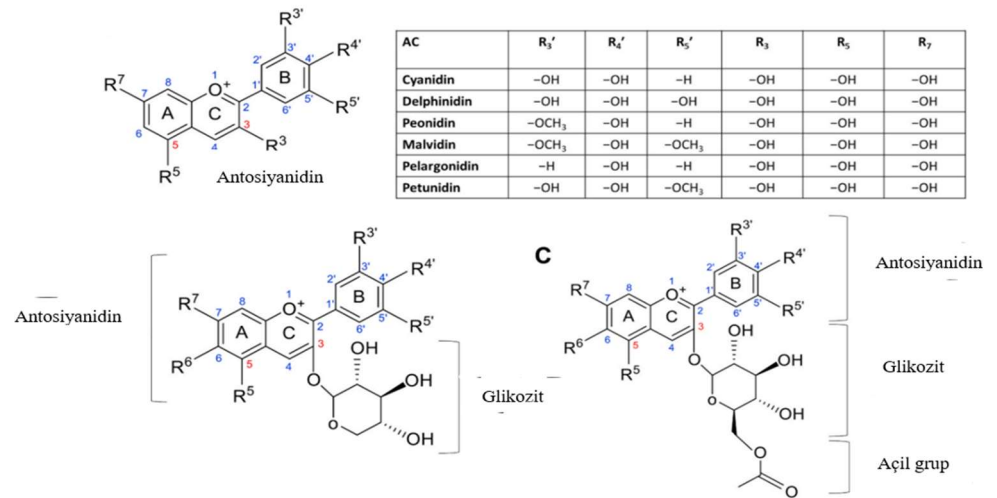
Şekil 2.8 Antosiyaninlere bağlanan yaygın aromatik fenolik asitler (Rein, 2005)



Şekil 2.9 Antosiyaninlere bağlanan yaygın alifatik dikarboksilik asitler (Rein, 2005)

Antosiyanin moleküllerinin açilli olması, renk ve pigment kararlılığını arttıran bir durumdur. İstenilen renk ve kararlılık özelliklerini gösteren açilli, yenilebilen antosiyaninler içinde başlıcaları, siyah havuç, kırmızı turp, patates ve lahana gelmektedir (Giusti and Wrolstad, 2003).

Antosiyaninlerin temel yapısı antosiyanidinler, antosiyanidinlere şeker gruplarının bağlanması ile oluşan glikozit formdaki antosiyaninler ve şeker grupları dışında aromatik olan ya da alifatik olan asitler üçüncü bir bileşen şeklinde bağlanmasıyla oluşan açil yapısı Şekil 2.10'da verilmiştir.

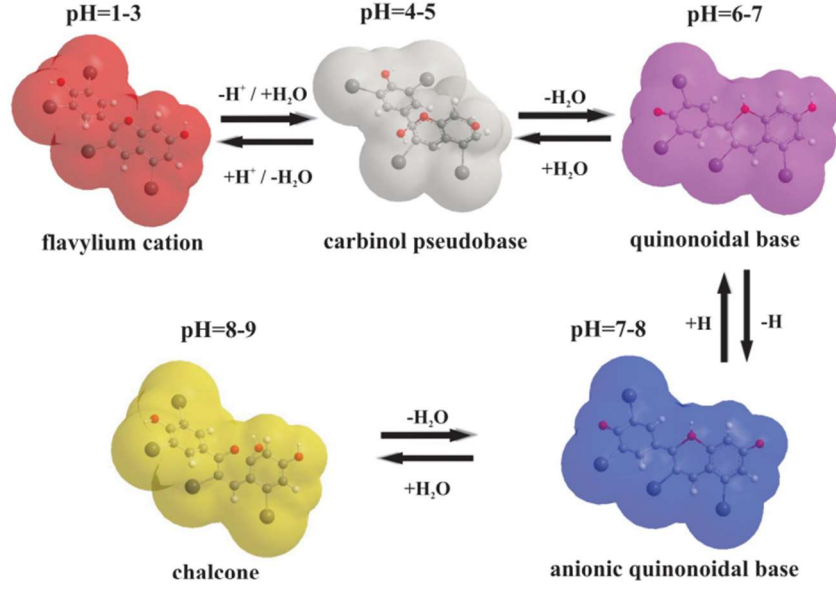


Şekil 2.10 Antosiyanidin ve antosiyaninlerin kimyasal yapısı (Giusti and Wrolstad, 2003)

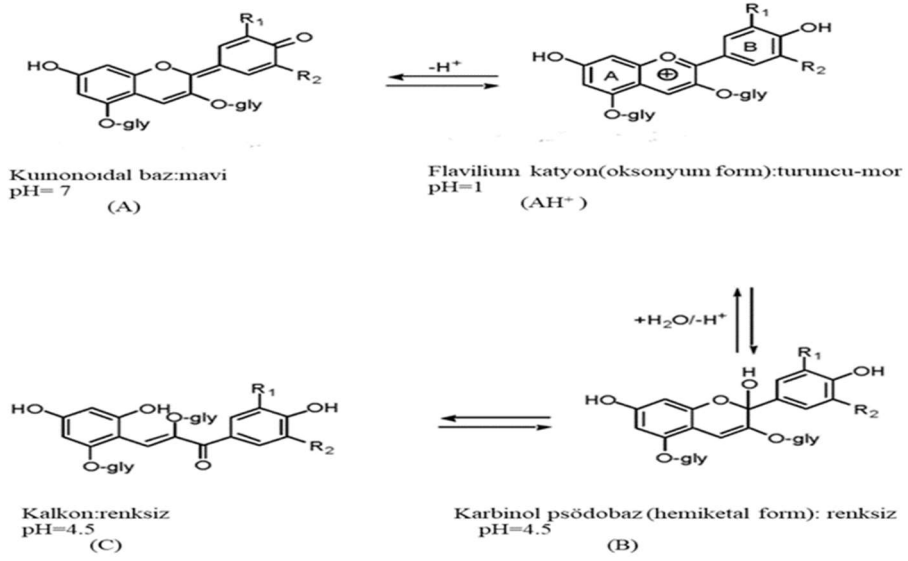
Temel antosiyanidin kimyasal yapısı ve en yaygın altı antosiyanidini tanımlayan hidroksil ve metoksil gruplarının dağılımı, antosiyanidin 3. pozisyonda glikozillenerek oluşturduğu bir antosiyaninin kimyasal yapısı ve açillenmiş bir antosiyaninin kimyasal yapısının ayrı ayrı gösterildiği Şekil 2.10 aynı zamanda doğada antosiyaninlerin kimyasal olarak nasıl bulduklarını da göstermektedir.

Açillenmiş antosiyaninler, asil kısımları (molekül içi etki) tarafından su moleküllerinin hidrofilik saldırısından korunurlar ve bu durum önemli ölçüde üstün ısı ve ışık kararlılığı sağlamaktadır. Isı ve ışık kararlılığı doğal gıda renklendiricileri açısından uzatılmış raf ömrü sağlayacağı için açillenmiş antosiyaninlerce zengin ekstraktlar, gıda renklendirici endüstrisi için ana doğal gıda renk kaynağı olarak oldukça önem taşımaktadır (Netzel et al., 2007).

Antosiyaninlerde bulunan gruplar onları pH'ya karşı hassas hale getirmişler ve bundan dolayı pH'nın antosiyaninlerin rengi, renk şiddeti, kararlılığı ve yapısı üzerinde etkili olduğu bildirilmiştir. Ayrıca antosiyaninlerin çoğu, sulu çözeltilerde indikatör olarak davranırlar. Düşük pH değerlerinde kırmızı, yüksek pH değerlerinde mavi-mor olmakta, ikisi arasında ise renksiz halde bulunurlar (Özen, 2008). Asidik çözeltilerde, antosiyanin dört formda ve denge halinde bulunmaktadır. Bunlar kuinidal baz (A), flavilium katyonu (AH^+), karbinol psödobaz (B) ve çalkon (C) formudur. Bu dört farklı yapı pH değıştikçe birbirlerine dönüşebilmektedirler (Jackman et al., 1987). pH değıştikçe farklı yapıların birbirlerine dönüşümü Şekil 2.11'de gösterilmiştir. Benzer olarak Şekil 2.12'de, pH'daki değışikliklerin, antosiyanin molekülleri üzerinde geri dönüşümlü yapısal dönüşümlere neden olarak renkleri üzerindeki çarpıcı etkilerini göstermektedir (Ananga et al., 2013).



Şekil 2.11 pH değıştikçe dört farklı yapının birbirine dönüşümü (Ananga et al., 2013)



Şekil 2.12 pH değışikliğinin renk üzerindeki etkisi (Ananga et al., 2013)

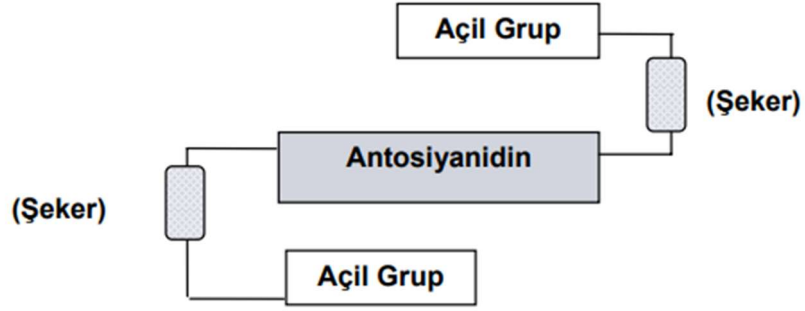
Antosiyaninlerin renksiz karbinol psödobaz halinde buldukları pH aralığı geniştir (pH 4-5) (Şekil 2.12). Dolayısıyla, birçok meyve ve sebze, antosiyaninlerin doğal pH değęerlerinde teorik olarak görünüş bir renk vermesi mümkün değildir. Fakat doğal pH değęerlerinde sebzelerin ve meyvelerin çoğunluğunda antosiyaninlerin rengi baskındır. Bu durumun sebebi bir takım maddeler, antosiyaninlerin renkli formlarını kararlı hale getirerek, pH değęerinin, renksiz karbinol formlarını oluşturmaları uygun olmasına rağmen bu oluşumu engellemeleridir (Mazza et al., 1987; Hepsağ, 2015). Antosiyaninlerle kompleks

oluşturarak, antosiyaninlerin renklerini kararlı hale getiren ve farklı renkli bileşiklerde oluşturabilen maddelere "kopigment" ve gerçekleşen reaksiyona ise "kopigmentasyon" denir. Kopigment denilen bu maddeler, antosiyaninlerin renkli formlarını kalıcı hale getirirler ve uygun pH olmasına rağmen renksiz karbonil formun oluşmasını engellerler. Kopigmentasyon, kopigment molekülünün antosiyanin (flavilyum iyonu, kuinoidal formları) molekülüne bağlanmasıyla meydana gelmektedir. Böylece, renksiz hemiketal ve kalkon hallerinin oluşmasından sorumlu pirilyumdaki C2 konumu, su molekülünün nükleofilik atağından nispeten korunmuş ve renksiz formların oluşmasının önüne geçilmiş olur. Sonuç olarak herhangi bir pH'da, antosiyanin preparatları oldukça belirli bir renk gösterirler ve bu durum "hiper kromik etki" olarak ifade edilmektedir (Dangles et al., 1992; Bloor, 1999). Antosiyaninler ile kopigment molekülleri arasındaki etkileşimin diğer bir sonucu da antosiyanin-kopigment komplekslerinin görünür bölgede oluşan absorbanların dalga boylarında değişiklik oluşturmasıdır ve bu etki de "batokromik kayma" olarak ifade edilmektedir (Bakowska et al., 2003). Kopigmentler, flavonoid, polifenol, alkaloid, aminoasit, organik asitler ve antosiyaninlerin kendileri olması kaydıyla çeşitli bileşikleri kapsamaktadır. Kopigment molekülü renksiz olup antosiyaninlerle kompleks oluşturduklarında antosiyaninlerin renklerini güçlendirip kararlı hale getirmektedirler. Kopigmentler esas olarak, flavilyum katyonu ile karbonil psödobaz formu arasında gerçekleşen hidrasyonun oranını dengelerler (Mazza et al., 1993; Kırca, 2004). Kopigmentasyonun etkisi, antosiyaninin çeşit ve konsantrasyonuna, kopigmentin çeşidi ve konsantrasyonuna, pH ve ortamın sıcaklığı olmak üzere çoklu değişkenlere göre değişmektedir.

Kopigmentasyon reaksiyonları birkaç farklı etkileşim yoluyla meydana gelmektedir. Kopigmentasyon reaksiyonlarında, molekül-içi ve moleküller-arası kompleks oluşum reaksiyonları en önemlileridir. Kopigmentasyon reaksiyonlarının; antosiyanin moleküllerinin kendi içinde birleşmesi yoluyla veya antosiyaninlerin metallerle kompleks oluşturmasının sonucunda gerçekleştiği bilinmektedir.

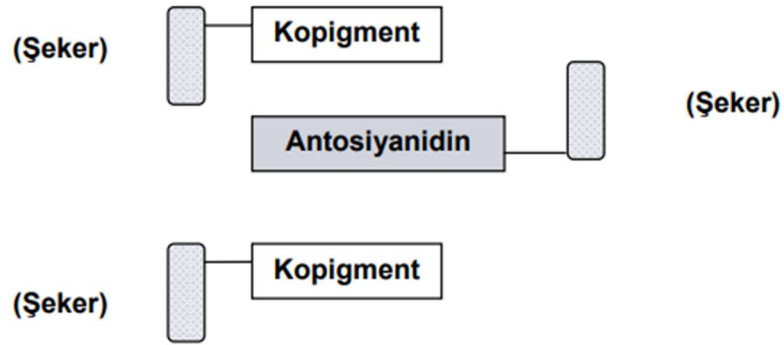
Aromatik veya alifatik asitlerin, antosiyanidin çekirdeğine şeker molekülü aracılığıyla açılması yoluyla gerçekleşen molekül içi

kopigmentasyon en etkili kopigmentasyon reaksiyonlarından biridir. Bu tip kopigmentasyon, antosiyaninlerin kromofor grupları ile antosiyanin molekülünün bir parçası olan kopigment kısmının, kovalent bağlar aracılığıyla şeker molekülüne bağlanmasıyla meydana gelir (Cavalcanti et al., 2011). Molekül içi kopigmentasyon Şekil 2.13'te verilmiştir.



Şekil 2.13 Molekül-içi kopigmentasyon (İstanbulu, 2007)

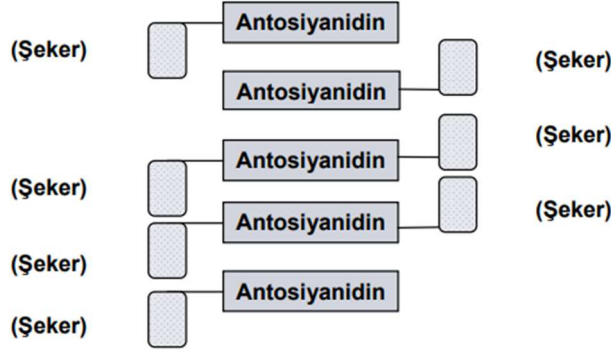
Antosiyanin ve kopigment moleküllerinin, non-kovalent etkileşimleri sonucu moleküller arası meydana gelen kopigmentasyon, moleküller-arası kopigmentasyon olarak tanımlanmaktadır. Kopigmentasyonun, flavilyum katyonu ile kuinoidal arasında, hidrojen bağı oluşumu veya hidrofobik etkileşme yoluyla olduğu düşünülmektedir. Moleküller arası kopigmentasyon Şekil 2.14'te gösterilmiştir.



Şekil 2.14 Moleküller arası kopigmentasyon (İstanbulu, 2007)

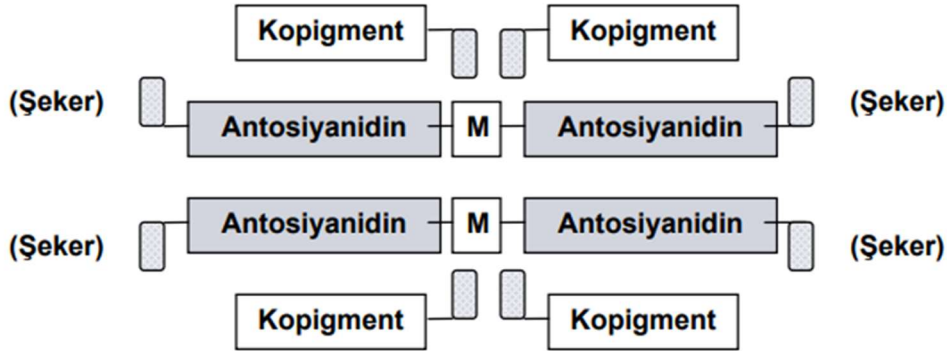
Antosiyanin moleküllerinin kendi aralarında birleşmesi sonucu kararlılıklarının arttığı bildirilmiştir. Antosiyanin konsantrasyonunun artırılmasıyla görünür bölgede antosiyaninlerin verdiği en yüksek absorbansın değişmiş olması ve belirli pH değerinde renk yoğunluğunun arttığı görülmüştür. Bu durum, moleküllerin kendi aralarında birleşerek gerçekleştirdiği bir

kopigmentasyon reaksiyonu olarak tanımlanmaktadır (Asen et al., 1972). Antosiyaninlerin kendi kendine birleşmesi Şekil 2.15'te verilmiştir.



Şekil 2.15 Antosiyaninlerin kendi kendilerine birleşmesi (İstanbulu, 2007)

Antosiyaninlerin o-hidroksi grupları ile demir, magnezyum, alüminyum, potasyum, bakır ve diğer birçok metal iyonları ile birleşerek kompleks oluşturmaları ve bu sayede kararlılıklarını artırmaları farklı bir kopigmentasyon türü olarak tanımlanmıştır (Timberlake and Bridle, 1980). Antosiyaninlerden siyanidin, delfinidin ve petunidinin ağıkon kısmında bulunan B-halkasında serbest hidroksil gruplarının sayısı fazlaca olup bu antosiyaninlerin metal şelat oluşturma istekleri fazladır. Antosiyaninlerin metaller ile şelat oluşturmaları Şekil 2.16'da gösterilmiştir.



Şekil 2.16 Antosiyaninlerin metaller ile şelat oluşturmaları (İstanbulu, 2007)

Antosiyaninlerin kararlılığı sıcaklıktan etkilenir. Antosiyaninlerin ağıkonlarının kararlılığı glikozidik formları ile karşılaştırıldığında daha düşük olduğundan sıcaklığın artırılmasıyla ağıkon ve şeker arasındaki bağlar hidrolize olur ve bu durum daha çok renk kaybına yol açar. İşleme ve depolama sırasında sıcaklık arttıkça antosiyaninlerin bozunma hızı artar. Sıcaklığın artması

ile antosiyaninlerin bozunma hızı doğrusal olarak artar. Antosiyaninlerin bulunduğu ortamın pH kararlılığını artıran yapısal faktörler aynı zamanda termal kararlılıklarını da arttırır. Ortamın pH değeri düşürülerek termal bozunma engellenebilir (Rein, 2005).

Sıcaklığın genelde olumsuz etkilerine karşın, antosiyaninlerin oluşumunda olumlu etkileri de vardır. Yapılan araştırmalarda, taze meyvelerin depolanması sırasında sıcaklığın artırılmasıyla birlikte antosiyanin miktarında artış olduğu gözlemlenmiştir. Örneğin; sekiz gün boyunca taze olarak depolanan çilek ve ahududadaki antosiyanin içeriği, 0°C'nin üzerindeki depolama sıcaklıklarında artmıştır (Kalt et al., 1999).

Ortamdaki oksijen varlığı, antosiyaninlerin kararlılığına etki eden diğer bir faktördür. Oksijen, antosiyaninler ile doğrudan reaksiyona girerek onları parçalayabilir (doğrudan oksidatif mekanizma) veya dolaylı olarak farklı maddeleri okside ederek oluşturduğu oksitlenmiş ürünler (renksiz veya kahverengi ürünler) ile antosiyaninlerin reaksiyona girmesi sonucu onların parçalanmasına (dolaylı oksidasyon yolu) neden olabilmektedir (Jackman et al., 1987). Oksijenden kaynaklı antosiyaninlerin kararlılığının bozulması pH değerine göre değişir. Oksijen varken pH değerinin yüksekliği antosiyaninlerin bozunmasına neden olur (Markakis, 1982). Aynı zamanda, yüksek sıcaklıkla birlikte oksijenin varlığı, diğer tüm faktörlerin içinde, antosiyaninlerin renk kararlılıklarının bozulmasını etkileyen en zararlı kombinasyon olarak bildirilmiştir (Nebesky et al., 1949). Antosiyaninler peroksi radikalleri olarak bilinen oksijen radikalleriyle reaksiyona girerler ve antioksidan görevi görürler. Bu özellikleri sayesinde dolaşım sistemi hastalıklarına karşı koruyucu etki gösterdikleri düşünülmektedir (Matsufuji, et al., 2003; Rein, 2005). Diğer taraftan, ortamda bulunan serbest SO₂ ile de tepkimeye giren antosiyaninler renklerini kaybederler. Bu tepkime geri dönüşümlü olarak gerçekleşir. pH 3.2'de SO₂'in % 96'sı bisülfid (HSO₃⁻) anyonuna dönüşür ve bisülfidin flavilyum katyonu ile reaksiyona girmesi sonucu renksiz bileşikler oluşmaktadır (Bakker et al., 1998; Kelebek, 2009).

Antosiyaninler üzerine ışığın etkisi ise iki farklı şekildedir. Antosiyaninlerin sentezlenmesi için gün ışığına ihtiyaç duyulurken, diğer

tarafından ışık antosiyaninlerin bozunmalarını hızlandırır (Markakis, 1982). Yapılan çalışmalarda, antosiyaninlerin karanlık ortamda renklerini korudukları belirlenmiştir. Benzer koşullarda, oda sıcaklığında, ışık altında ve karanlıkta bekletilen antosiyaninler karşılaştırıldığında, 24 saatin sonunda renk farkı belirgin bir şekilde görülmüştür. Ayrıca açılmış diglikozit yapısına sahip antosiyaninler daha karardır (Cavalcanti et al., 2011). Depolama süresi boyunca, şeker varlığında ışığın yol açtığı antosiyanin bozulmasının hızı yüksektir. Işığın etkisi ile antosiyaninlerin bozunması bitkilerin yapısındaki antosiyaninlerin farklı olmasından kaynaklanır. Antosiyaninlerin ışığın etkisiyle artan bozunması sonucu açığa çıkan son ürünler, sıcaklığın etkisiyle bozunma sonucu oluşan son ürünler ile aynıdır. Ancak ışığın etkisiyle bozunma reaksiyonunun kinetik yolu, flavilyum katyonunun uyarılmasını içermesi noktasında farklılık gösterir (Furtado et al., 1993).

Antosiyaninlerin majör görevi, bitkilere pembe, kırmızı, menekşe moru, mavi ve mor tonlarında kendilerine has renkleri vermektir. Bunun yanı sıra, UV ışınlarından, anti-viral ve anti-mikrobiyal aktivitesi ile mikroorganizmalara karşı bitkileri korurlar. Ayrıca antosiyaninlerin insan sağlığı üzerine, özellikle, kalp-damar hastalıklarının oluşmasını azaltma ve anti-karsinojen özelliklerinden dolayı dolaşım sistemi hastalıkları ve göz hastalıklarının bazı türlerinde tedaviye yardımcı özelliklerinin bulunması bildirilmiştir. Antosiyaninlerin, oksidasyonu engelleyici özelliklerinin kronik hastalıkları engellediği bildirilmiştir (Kırca 2004; Wrolstad, 2004).

2.2.2 Siyah havuç ve siyah havuç antosiyaninleri

Son yıllarda sağlıklı ve doğal beslenme kavramlarının öneminin artması, Türkiye’de büyük ölçüde yetiştiriciliğinin yapılması, içerdiği antosiyaninler ve karotenoidler gibi fenolik bileşikler ve diğer fitokimyasal maddelerden dolayı zengin besin içeriği bakımından farkındalığının artmasıyla havuç, önemli ve ekonomik bir bitki olarak bilinmektedir. Tür adı *Daucus carota* olarak bilinen havuç, maydanozgiller (Apiaceae) familyasından tarımsal değeri ve verimi yüksek olan bir bitkidir. İnsanların ve hayvanların besin ihtiyaçlarını karşılaması amacıyla tohum ve kökü için yetiştirilmektedir. Havucun en sık görülen turuncu renginin haricinde, sarı, beyaz, siyah ve mor renkli çeşitleri bulunmakla birlikte

koni şeklindeki kökleri yaklaşık 15-20 cm uzunluğa kadar çıkabilir. *Daucus carota* cinsinde yaklaşık 60 kadar türünün olduğu bilinmektedir. Havuç serin iklimde yetişen bir tür olup, çimlenmesi için 10-15°C, gelişmesi için ise 15-20°C sıcaklığa ihtiyaç duymaktadır. Çimlenme ve gelişme koşullarının değişmesi havuçların kök boylarının ve renklerinin farklı olmasına neden olmaktadır (Akdoğan, 2019). Havucun içerdiği A vitamini değerinin zengin olmasının yanısıra B3, B6, C, D vitaminleri, folik asit, demir, kalsiyum ve fosfor içerdiği bilinmektedir. 100 gram havuçta, 1,0 g protein, 8,0 g karbohidrat, 0,2 g yağ, 35 mg kalsiyum, 10000 IU A vitamini, 0,06 g B1, 0,04 mg B2, 0,6 mg niasin, 5 mg C vitamini içerdiği ve ortalama kalori değerinin 41 kcal olduğu bilinmektedir (Baysal, 1999; Akdoğan, 2019). Havucun ülkemizde en çok yetiştirildiği yerler, İç Anadolu Bölgesinde Konya (Ereğli) ve Ankara (Beypazarı), Akdeniz, Ege ve Marmara bölgelerimizdir. Türkiye İstatistik Kurumu verilerine göre 2022 yılında 788.578 ton üretilerek bir önceki yılın üretim verilerine kıyasla % 33,5 artış olduğu bildirilmiştir (Türkiye İstatistik Kurumu, 2023). Türkiye’de gerçekleşen havuç üretiminin son iki yıla ait verileri Tablo 2.4’te verilmiştir.

Tablo 2.4 Son iki yıla ait havuç üretimi (Türkiye İstatistik Kurumu, 2023)

	Yıllık Üretim (ton)	Değişim (%)
Havuç	2021→590,483	2021 ve 2022 yılları arasında artış %33,5
	2022→788,578	

Havucun botanik olarak iki grubu bulunmaktadır ve bu gruplar; antosiyanin (*Daucus carota ssp. sativus var. atrorubens Alef.*) ve karoten (*Daucus carota ssp. sativus var. sativus*) olarak bilinmektedir. Karoten grup, "batı grup" olarak da bilinmektedir ve havucun bileşiminde yer alan karoten, turuncu renkli pigmentten kaynaklanmaktadır. Genellikle ülkemizde çiğ olarak salatalarda tüketilmektedir. Turuncu havucun kökeni Orta Asya'ya dayansa da batı toplumlarında daha çok bilinmekte olup yaygın bir türdür. Antosiyanin grup, rengini içerisinde bulunan antosiyanin adı verilen pigmentten almış olup, bu grup siyah havuç ile özdeşleşmiştir. Siyah havuç ayrıca "doğu grup" havuç olarak da bilinmektedir. Ülkemizde, siyah havuç üretimi İç Anadolu bölgesinde Konya Ereğli’de tarım alanlarının ve iklimin uygun olması nedeniyle yüksek verimle yapılmaktadır. Bu nedenle yetiştirilen siyah havuçların coğrafi işareti ve

patenti bulunmaktadır. Siyah havuçlar doğal renklendirici olarak değerlendirilmek üzere Batı ülkelerine yüksek miktarda ihraç edilmektedir (Akdoğan, 2019). Siyah havuçtan ülkemizde en çok şalgam suyu yapılmakta olup üretilen miktarın yarısından fazlası ihraç edilmektedir. Doğal gıda boyası, vücut ve güneş yağı olarak kozmetik sektöründe, havuç konservesi, dondurması, reçeli, suyu veya sofralık olarak ise gıda sektöründe kullanılmaktadır (Türkiye Patent ve Marka Kurumu, 2023). Dünya geneline bakıldığında ise, Türkiye, Almanya, Çin, Rusya ve Amerika Birleşik Devletleri'nde, 2021 yılı Gıda ve Tarım Örgütü (FAO, Food and Agriculture Organization of The United Nations) verileri ile havuç üretimine bakıldığında, en yüksek tarımsal üretim değerinin, 5,02 milyar dolar ile Çin'in gerçekleştirdiği ve sırasıyla Amerika, Rusya, Almanya ve Türkiye'nin geldiği görülmektedir.

Siyah havucun, fenolik bileşiklerce zengin, karbohidrat, mineral (Fe, Ca, Mg ve P), vitamin (tiamin, riboflavin, niyasin, folik asit, askorbik asit ve alfa-tokoferol) ve %86 ila %89 arasında değişen yüksek su içeriğine sahip olduğu bilinmektedir. Bu içeriği iklim, toprak ve genetik ile ilgili çeşitli faktörler çeşitlendirmektedir (Smeriglio, 2017). Siyah havucu son yıllarda değerli kılan özellikler, yüksek antosiyanin içeriği ve kararlılıklarının yüksek olmasıdır. Yapılan bir çalışmada, siyah havucun işlenmemiş suyunun 488 mg/L düzeyinde toplam monomerik antosiyanin bulundurduğu ve ham suyun HPLC-MS yöntemiyle yapılan analizlerinde siyah havuçta bulunan antosiyaninlerin % 84 oranında mono açillenmiş yapıda olduğu belirtilmiştir (Özkan, 2019). Asidik pH'larda siyah havuç antosiyaninleri, oldukça iyi düzeyde parlak kırmızı rengi sağlamalarından dolayı, reçellerin, marmelatların, şekerlemelerin, meşrubatların meyve suları ve nektarların renklendirilmesinde siyah havuç suyu veya konsantreleri kullanılmaktadır (Downham and Collins, 2000).

Yaşamsal faaliyetlere devam edebilmek için gereken enerji; glukoz ve yağ asitleri gibi moleküllerden sağlanmaktadır. Enerjinin sağlanması sırasında, oksijenli radikaller ve radikal olmayan türler açığa çıkmaktadır. Radikal olup olmamasına bakılmaksızın, kimyasal yapısında oksijen bulunduran maddeler, reaktif oksijen türleri "(ROS, Reactive Oxygen Species)" olarak değerlendirilmektedir. Oksijen radikalleri; süperoksit anyon, hidroksi, peroksi, alkoksi ve hidroperoksi radikalleridir. Oluşan reaktif oksijen (RO) türleri,

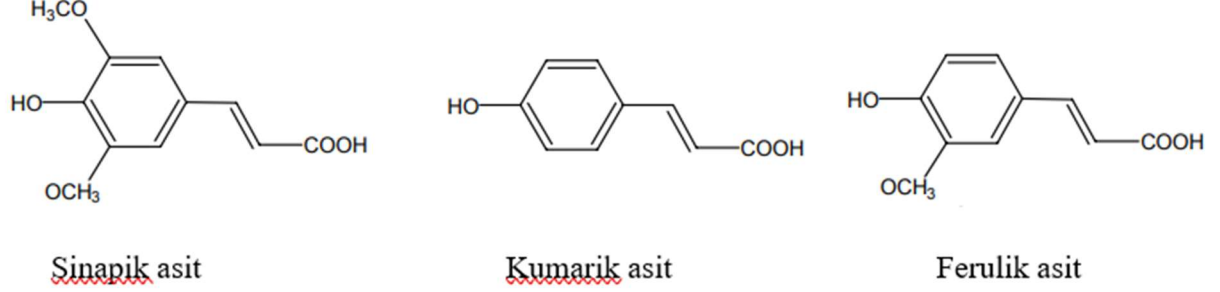
doymamış yağ asitleriyle reaksiyona girip lipit peroksidasyonu, protein ve DNA'ların (Deoksiribonükleik asit) zarar görmesine neden olduğundan hücrenin inaktivasyonuna sebep verirler (Dereli, 2010). Gıdalarda bulunan bileşenlerin ve dokularda bulunan lipit, protein ve DNA olarak bilinen biyomoleküllerin oksidasyonunu geciktiren veya engelleyen maddelere antioksidan denilmektedir. Antioksidanların görevi, oksidatif zincir reaksiyonlarının (chain-breaking) başlamasını veya gelişmesini durdurmaktır (Javanmardi et al., 2003). Ortamda bulunan antioksidanları RO türleri okside ederek biyolojik moleküllerin (lipid ve protein) oksidasyonuna engel olurlar (Dereli, 2010). Antosiyaninler polar bileşenler olup suda kolay çözünebildikleri için, fenolik bileşikler olan flavonoidlerin yapısına katılmakta ve antioksidan aktivite göstermektedirler. Dolayısıyla, siyah havucun önemli ölçüde yoğun olan antosiyanin içeriğinden dolayı antioksidan aktiviteleri de paralel olarak yüksektir. Turuncu havuç suyunun antioksidan kapasitesi, siyah havuç suyunun antioksidan kapasitesine göre 13–14 kat daha az olduğu bilinmektedir (Kırca, 2004).

Siyah havuç, baskın olarak siyanidin aglikona sahiptir ve bu siyanidin türevleri açılız (iki farklı), açilli (üç farklı) olmak üzere beş tane antosiyanin içermektedir. Açilli olmayanlar siyanidin-3-ksilozil-glikozil-galaktozit ve siyanidin-3-ksilozil-galaktozit; açilli olanlar ise siyanidin-3-ksilozil-glikozil-galaktozitin sinapik, ferulik ve kumarik asitlerle açillenmiş türevleridir. Siyah havuçta bulunan baskın antosiyanin türevleri ve miktarları Tablo 2.5'te verilmiştir.

Tablo 2.5 Siyah havuçta bulunan baskın antosiyanin türevleri (Schwarz et al., 2004)

Antosiyanin Türevi	Miktarı (%)
siyanidin 3-ksilozil-glukozil-galaktozid-ferulik asit	43.0
siyanidin 3-galaktozit-ksilozit	28.8
siyanidin 3-galaktozil-ksilozil-glukozid-kumarik asit	12.6
siyanidin 3-galaktozil-ksilozil-glukozid	9.3
siyanidin 3-galaktozil-ksilozil-glukozil-kumarik asit-sinapik asit	6.2

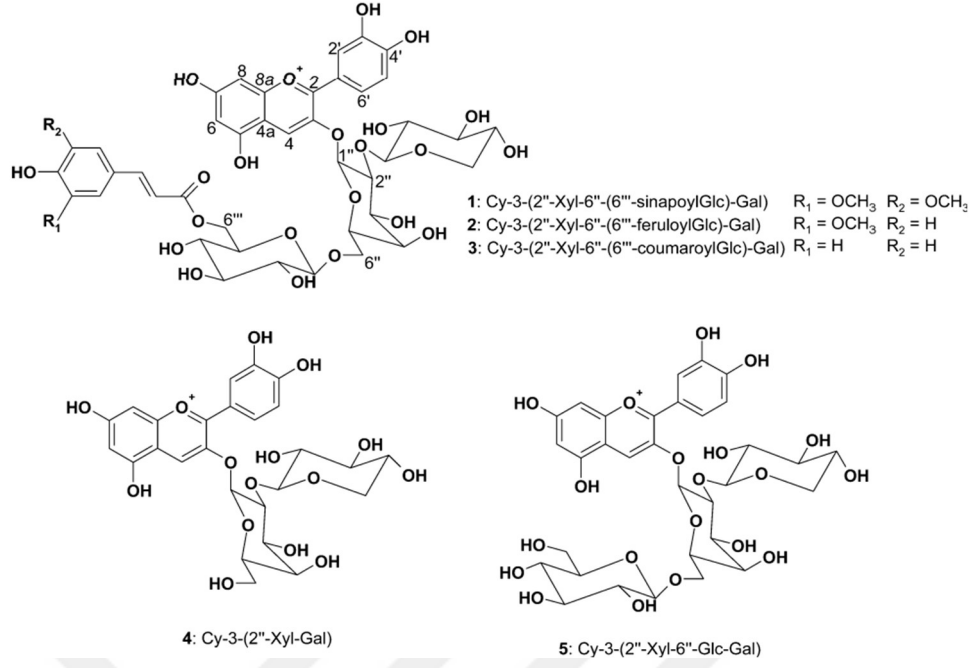
Siyah havuçta bulunan açilli antosiyaninlere bağlanan aromatik asitler, sinapik, kumarik ve ferulik asittir. Sinapik, kumarik ve ferulik asitlerin yapıları Şekil 2.17’de gösterilmiştir.



Şekil 2.17 Açilli antosiyaninlere bağlanan aromatik asitler (Schwarz et al., 2004)

Siyah havuçta bulunan ailllenmiŐ antosiyaninler, siyanidin-3-ksilozil-sinapoil-glikozil-galaktozit, siyanidin-3-ksilozil-feruloil-glikozil-galaktozit ve siyanidin-3-ksilosil-kumaril-glikozil-galaktozit’lerdir. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda, siyah havuçta, peonidin veya pelargonidin tipi ağlikon içeren antosiyaninler de tanımlanmıştır, ancak bu antosiyaninler eser miktarlardadır (Schwarz et al., 2004).

Siyah havuçta bulunan açil grulu ve açil grulu olmayan 5 baskın antosiyanin türünün açık yapısı Şekil 2.18’de verilmiştir. Şekilde 1., 2., ve 3. açil grulu olan antosiyanin türlerini, 4. ve 5. açil grulu olmayan antosiyanin türlerini göstermektedir.



Şekil 2.18 Siyah havuçta bulunan baskın antosiyaninlerin kimyasal yapıları (Schwarz et al., 2004)

Siyah havuç, yüksek oranda sahip olduğu açilli antosiyaninlerden dolayı, ısı ve pH değişikliğine karşı oldukça karardır. Yapılan bir çalışmada, üzüm posasından elde edilmiş ve asilasyonu düşük antosiyanin özlerine göre daha kararlı olduğu belirtilmiştir (Khandare et al., 2011). Siyah havucun polifenolik profilinin incelendiği bir başka çalışmada ise en bol bulunan sınıfın antosiyaninler olduğu, bunu hidroksisünamik asitlerin ağırlıklı olduğu fenolik asitler ve flavonların olduğu flavonoidlerin izlediği bildirilmiştir. Bu bol bulunan antosiyaninlerin ferulik, kumarik ve sinapik asitlerle monoaçillenmiş antosiyaninler olmasının yanısıra ilginç bir şekilde, düşük konsantrasyonlarda da olsa malvidin-3-O-galaktosidin varlığı vurgulanmıştır. Ayrıca antosiyaninlere benzer konsantrasyonlarda bulunan farklı polifenol sınıflarından klorojenik asit, protokatekuik asit (hidroksibenzoik asit), kafeik ve ferulik asitler (hidroksisünamik asitler) gibi farklı fenolik asitler, epikateşin, naringenin-7-O-glukozit ve kaempferol-3-O-rutinosid gibi flavanol ve flavanonların ağırlıklı olarak bulunduğu bildirilmiştir (Smeriglio et al., 2017). Bu çalışmadan yola çıkılarak siyah havucun polifenolik profiline ait temel fenolik bileşikler ve miktarları Tablo 2.6'da belirtilmiştir.

Tablo 2.6 Siyah havucun polifenolik profili (Smeriglio et al., 2017)

Bileşik	Miktar (mg/100 g TA*)
<i>Hidroksi benzoik asitler</i>	
Gallik asit	0.137±0.006
Protokateşuik asit	0.673±0.035
4- Hidroksibenzoik asit	0.188±0.045
Siringik asit	0.807±0.035
<i>Hidroksisinamik asitler</i>	
Klorojenik asit	4.658±0.175
Kafeik asit	0.574±0.018
Kumarik asit	0.029±0.001
Ferulik asit	0.475±0.024
<i>Flavanoller</i>	
Kateşin	0.198±0.012
Epikateşin	0.355±0.022
<i>Flavonoller</i>	
Kuersetin-3-O-galaktozid	0.068±0.004
Kamferol-3-O-rutinozid	0.075±0.003
Kuersetin	0.034±0.002
<i>Antosiyaninler</i>	
Siyanidin 3-O-galaktozid	0.239±0.016
Siyanidin 3-O-glukozit	0.419±0.035
Siyanidin 3-ksilozil-glukozil-galaktozid	0.307±0.025
Siyanidin 3-ksilozil-galaktozid	0.610±0.038
Siyanidin 3-ksilozil(sinapoilglukozil)galaktozid	1.047±0.055
Siyanidin 3-ksilozil(feruloilglukozil)galaktozid	29.181±1.065
Siyanidin 3-ksilozil(kumaroilglukozil)galaktozid	1.219±0.065
Malvidin 3-O-galaktozid	0.029±0.002
Siyanidin	0.754±0.042

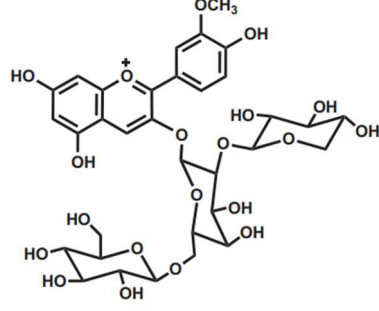
TA*: Taze ağırlık, ± SD, 3bağımsız deneyin ortalaması

Yine aynı çalışmada, siyah havuç için belirlenen temel fenolik bileşiklerin yüzdesel miktarları; antosiyaninler %78,06, fenolik asitler %17,89 ve diğer flavonoidler %4,06 olarak bulunmuştur (Smeriglio et al., 2017).

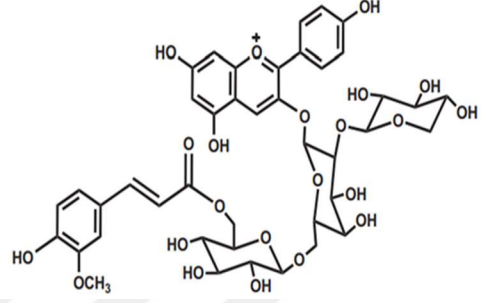
Siyah havuç antosiyaninleri, gıdalarda farklı pH değeri aralıklarında renk kararlılığına sahip, açilli antosiyaninlerin fazla olduğu, ayrıca, kırmızı lahana gibi açilli antosiyanin içeren diğer antosiyanin kaynaklarına oranla, olumsuz etki yaratan kötü kokan maddelere sahip olmaması gibi duyusal avantajları vardır. Bu özellikler, siyah havucun gıda boyası olarak kullanımını teşvik etmektedir (Stintzing and Carle, 2004).

Siyah havuç ile yapılan farklı bir çalışmada, siyah havuç antosiyanin profili içinde peonidin ve pelargonidin aglikonlarına karşılık gelen, çok küçük (eser) miktarlarda da olsa farklı üç antosiyanin daha bulunmuştur. Bu

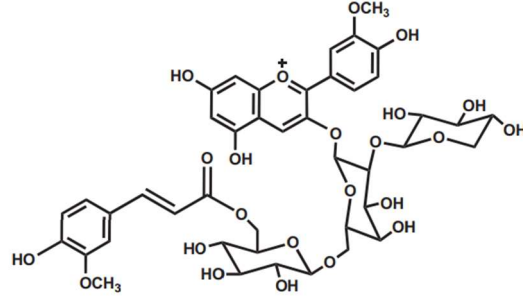
antosiyeninlerin, peonidin 3-ksilozilglukozilgalaktozit, pelargonidin 3-ksilozilglukozilgalaktozidin "ferulik asit" türevi ve peonidin 3-ksilozilglukozilgalaktozidin "ferulik asit" türevine karşılık geldiği bildirilmiştir (Algarra et al., 2014). Peonidin ve Pelargonidin aglikonlarını içeren antosiyeninlerin kimyasal yapıları Şekil 2.19'da verilmiştir.



peonidin 3-ksilozilglukozilgalaktozit
ksilosilferuloilglukozilgalaktozid



pelargonidin 3-



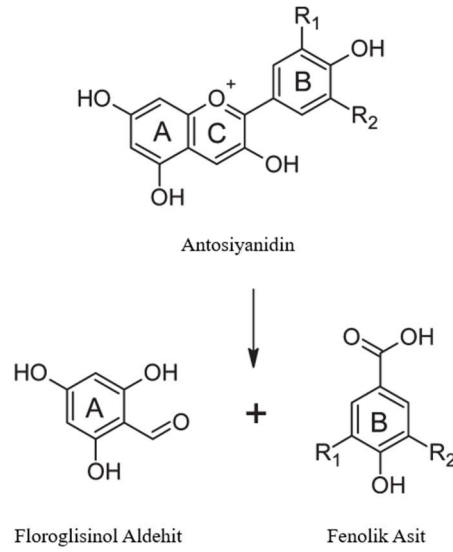
peonidin 3-ksilosilferuloilglukozilgalaktozid

Şekil 2.19 Peonidin ve Pelargonidin antosiyeninlerinin kimyasal yapıları (Algarra et al., 2014)

Aynı çalışmada, tanımlanan Peonidin ve Pelargonidin aglikonları içeren antosiyeninlerin kararlılık çalışmalarının yapılmadığı ancak antosiyenin-O-glikozitlerin bir aromatik asitle açılmasının renk stabilitesini iyileştirdiği gösterilmiştir (Algarra et al., 2014).

Siyah havuç antosiyeninleri, yan etkilerinin düşük ve aktivitelerinin yüksek olması nedeniyle literatürde oldukça geniş bir şekilde araştırılmışlardır. Araştırmalarda siyah havuç antosiyeninlerinin, antioksidan, antimikrobiyal, antidiyabetik, antiobezite, nöroprotektif, antiinflamatuvar, kardiyoprotektif ve antikanser etkinlikleri kanıtlanmaya çalışılmıştır. Bu çalışmalarda,

antosiyeninlerin aktivite çalışmalarının yanında biyoyararlanım çalışmaları da gerçekleştirilmiştir (Smeriglio et al., 2016). Antosiyeninlerin glikozit formları mide ve barsakta emilirler ancak biyoyararlanımlarının aglikon formlarına göre düşük olduğu belirlenmiştir. Bunun nedeninin, glikozitlerin aglikona göre suda daha iyi çözünmesi ve bu nedenle glikozitlerin pasif taşınımının zor olup, aglikonların hidrofobik yapısından dolayı pasif taşınma yoluyla dokulardan geçtiği gösterilmiştir. Siyah havuç antosiyeninlerinin aglikon veya glikozit forma dönüşmeden emilimi için bazı aktif taşıma mekanizmalarına ihtiyaç vardır. Diğer taraftan bir takım enzimatik reaksiyonlar ile aglikonlara hidrolize olup ince barsakta emilimleri gerçekleşebilir. Ortamın pH değerinin yüksek olduğu durumlarda kararlılıklarının düşük olmasına karşılık, fizyolojik pH'da protokateşik asit gibi fenolik asitlere çevrilerek aktivitelerini metabolitleri aracılığıyla gösterdikleri belirtilmiştir (Woodward et al., 2009). Antosiyeninlerin fenolik asitlere yıkımı Şekil 2.20'de gösterilmiştir.



Şekil 2.20 Antosiyeninlerin fenolik asitlere yıkımı (Woodward et al., 2009)

Antosiyeninlerin fenolik asitlere yıkımına ait örnekler Tablo 2.7'de verilmiştir.

Tablo 2.7 Bazı antosiyeninlerin fenolik asitlere yıkımı (Smeriglio et al., 2016)

Antosiyenin	Fenolik Asit	R1	R2
Siyanidin	Protokateşik asit	OH	H
Pelargonidin	4-hidroksibenzoik asit	H	H
Delfinidin	Gallik asit	OH	OH

Antosiyaninlerin toksikolojik çalışmalarda, mutasyona, doğumsal ve üreme döneminde meydana gelebilecek bir anomaliye neden olabilecek bir etkilerinin olmadığı veya çok düşük olduğu belirtilmiştir (Smeriglio et al., 2016).

2.3 Ekstraksiyon, Sulu İkili-Faz Ekstraksiyon (ATPE) ve Antosiyaninlerin Ekstraksiyonu

2.3.1 Ekstraksiyon

Gıdaların işleme basamaklarında, özütleme, ham maddeden bir veya birden fazla değerli molekülün ayrılması şeklinde tanımlanırken, farmasötik anlamda, medikal olarak değerli biyoaktif bileşenlerin bitkisel ya da hayvansal dokulardan uygun çözücüler ile bilimsel yöntemler kullanılarak ayrılması işlemi şeklinde tanımlanmaktadır. Biyoaktif bileşiklerin ayrıştırılması, tanımlanması ve karakterizasyonu ancak uyumlu ekstraksiyon işleminin ardından gerçekleşebilir. Farklı ve doğal kaynaklardan özütleme yapılırken, seçiciliği anlayabilmek için koşulların farklılaştırılabildiği ekstraksiyon teknikleri kullanılması gerekmektedir. Birçoğu uzun zaman değişmeden kalan farklı tekniklerin ortak amaçları vardır. Bu ortak amaçlar;

- (a) karmaşık bitki örneklerinden hedeflenen biyoaktif bileşikleri çıkarmak,
- (b) analitik yöntemlerin seçiciliğini artırmak,
- (c) hedeflenen bileşiklerin konsantrasyonunu artırarak biyokompleks tahlilinin hassasiyetini artırmak,
- (d) biyoaktif bileşikleri tespit ve ayırma için daha uygun bir forma dönüştürmek,
- (e) örnek matrisindeki varyasyonlardan bağımsız, güçlü ve tekrarlanabilir bir yöntem sağlamak olarak sıralanabilir (Azmir et al., 2013).

Çözücü kullanımına göre ekstraksiyon yöntemleri, ne kadar çözücü kullanıldığının önemli olmadığı konvansiyonel (geleneksel) yöntemler ve sınırlı olarak çözücü kullanılan veya çözücü kullanılmadan gerçekleştirilen ileri ekstraksiyon (geleneksel olmayan) yöntemleri olarak sınıflandırılabilir (Yalavarthi and Thiuruvengadarajan, 2013).

Biyoaktif bileşikler çeşitli geleneksel ekstraksiyon teknikleri ile ekstrakte edilebilir. Bu tekniklerin çoğu, kullanılan farklı çözücülerin özütleme gücüne, ısı ve karıştırma uygulamasına dayanmaktadır. Bu klasik teknikler şunlardır; Soxhlet ekstraksiyonu, Maserasyon ve Hidrodistilasyon.

Soxhlet ekstraksiyonu ilk olarak Alman kimyager Franz Ritter Von Soxhlet (1879) tarafından önerilmiştir. Esas olarak lipid ekstraksiyonu için tasarlanmıştır ancak sadece bununla sınırlı değildir. Soxhlet ekstraksiyonunun yaygın kullanılmasının yanında, yeni ekstraksiyon alternatifleri ile karşılaştırmada model olarak kullanılmaktadır. Maserasyon, uçucu yağları ve biyoaktif bileşikleri elde etmenin popüler ve ucuz bir yoludur. Küçük ölçekli bir ekstraksiyonda maserasyon genellikle birkaç adımdan oluşur. İlk olarak, yüzeyi artırmak için bitki materyalleri ufak parçacıklar halinde öğütülür, İkinci olarak, uygun çözgen kapalı kaptaki eklenir ve üçüncü olarak, sıvı süzülür ve ekstraksiyon işleminin katı kalıntısı çözeltiyi geri kazanmak için preslenir. Elde edilen süzölmüş ve preslenmiş sıvı karıştırılır ve filtrasyon yoluyla yabancı maddelerden ayrılır. Maserasyon sırasında ara sıra çalkalamak, difüzyonu artırmayı ve çözeltiyi numune yüzeyinden uzaklaştırıp yüzeye konsantrasyon çözelti değişimi sağlayarak ekstraksiyon verimini artırıp ekstraksiyonu kolaylaştırır. Hidrodistilasyon, biyoaktif bileşenler ve uçucu yağların bitkilerden ekstraksiyonunda tercih edilen geleneksel metottur. Organik çözücüler kullanılmaz. Üç tür hidrodistilasyon vardır: su, su ve buhar ve doğrudan buhar distilasyonu (Vankar, 2004). Hidrodistilasyonda, bitki materyalleri bir bölmede paketlenir ve daha sonra yeterli miktarda su eklenerek kaynatılır. Alternatif olarak, bitki örneğine doğrudan buhar enjekte edilir. Sıcak su ve buhar, bitki dokusundaki biyoaktif bileşikleri serbest bırakmak için ana etkili faktörlerdir. Su ile dolaylı soğutma, su ve yağın buhar karışımını yoğunlaştırır. Yoğunlaşan karışım farklı bir tarafa geçer ve burada yağ ve biyoaktif bileşikler otomatik olarak sudan ayrılır (Silva et al., 2005). Yüksek ekstraksiyon sıcaklığı, bazı uçucu bileşenler kaybolmasına neden olduğundan termo kararsız bileşiklerin ekstraksiyonu için kullanımı sınırlıdır. Herhangi bir geleneksel yöntemin ekstraksiyon verimliliği esas olarak çözücünün ne kadar uygun seçildiğine göre değişir. Hedef molekülün polarlığı çözücüyü seçmek için en önemli etkidir. Çözücü seçiminde dikkate alınması gereken öğeler; çözücü ve çözünen madde

arasındaki moleküler afinite, kütle transferi, yardımcı çözücü kullanımı, çevre güvenliği, insan toksisitesi ve finansal fizibilitedir (Azmir et al., 2013). Bazı biyoaktif örnekler farklı çözücüler kullanılarak ekstrakte edilen bileşikler Tablo 2.8'de verilmiştir.

Tablo 2.8 Farklı çözücülerle ekstrakte edilen bazı biyoaktif bileşikler (Cowan, 1999)

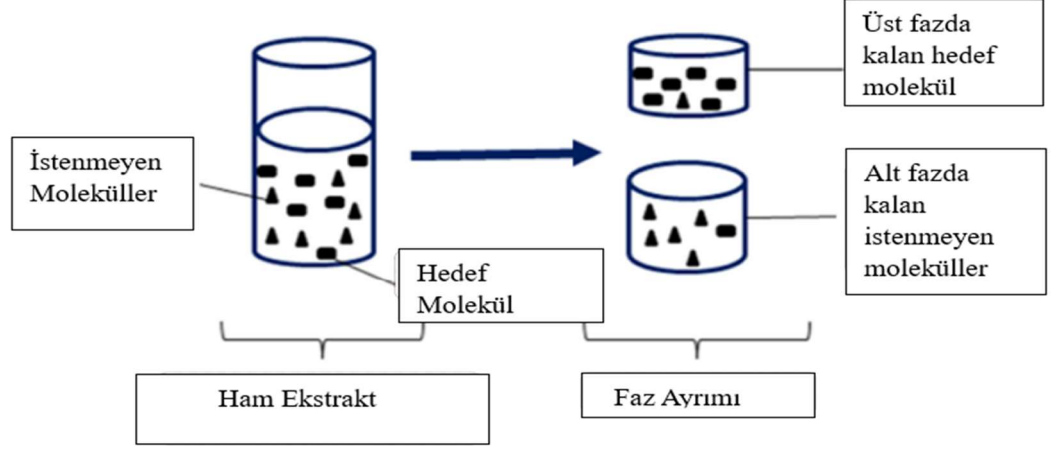
Su	Etanol	Metanol	Kloroform	Diklorometanol	Eter	Aseton
Antosiyanin	Tannin	Antosiyanin	Terpenoid	Terpenoid	Alkoloid	Flavonoid
Tannin	Polifenol	Terpenoid	Flavonoid		Terpenoid	
Saponin	Flavanol	Saponin				
Terpenoid	Terpenoid	Tannin				
	Alkoloid	Flavon				
		Polifenol				

Geleneksel ekstraksiyonun başlıca zorlukları uzun ekstraksiyon süresi, pahalı ve yüksek saflıkta çözücü gereksinimi, büyük miktarda çözücünün buharlaşması, düşük ekstraksiyon seçiciliği ve ısı kararsız bileşikler için uygun olmamasıdır (Luque de Castro and Garcia-Ayuso, 1998). Geleneksel ekstraksiyon yöntemlerinin bu kısıtlamalarının üstesinden gelmek için yeni ve gelecek vaat eden ekstraksiyon yöntemleri ortaya konulmuştur. Bu teknikler geleneksel olmayan ekstraksiyon teknikleri olarak adlandırılmaktadır. En umut verici tekniklerden bazıları ultrason destekli ekstraksiyon, enzim destekli ekstraksiyon, mikrodalga destekli ekstraksiyon, darbeli elektrik alan destekli ekstraksiyon, süperkritik sıvı ekstraksiyonu ve basınçlı sıvı ekstraksiyonudur. Bu tekniklerden bazıları, Amerika Birleşik Devletleri Çevre Koruma Ajansı (EPA) tarafından tanımlanan koşullara uygun olduklarından dolayı "yeşil teknikler" olarak kabul edilmektedir.

2.3.2 Sulu ikili-faz ekstraksiyon (ATPE)

Sulu ikili-faz ekstraksiyon (ATPE), proteinlerin, membranların, virüslerin, enzimlerin, nükleik asitlerin ve diğer biyomoleküllerin ekstraksiyonu, ayrılması, saflaştırılması ve zenginleştirilmesi için bir sıvı-sıvı fraksiyonlama tekniğidir. 1896 yılında Martinus Willem Beijerinck, tesadüfen, nişasta ve jelatinin sulu çözeltisini karıştırırken ikili fazın oluşumunu gözlemlemesiyle bulmuştur. Ancak gerçek uygulama 1956 yılında Albertsson tarafından keşfedilmiş olup sulu ikili-faz sistemleri olarak adlandırılmış, biyomoleküllerin geri kazanılmasında ilk kez kullanılmış ve biyomoleküllerin fazlar arasında geçişinin istemli olarak meydana geldiğini ileri sürmüştür (Iqbal et al., 2016).

ATPE için polimerler, tuzlar, şekerler, alkoller veya yüzey aktif maddeler gibi hidrofilik maddeler belirli konsantrasyonların üzerinde oluşturulan karışımların içerisinde birbirlerini yapısal olarak itmeleri sebebiyle ikili fazlar oluştururlar. ATPE'nin oluşumu ve fazların ayrılmasında rol oynayan fizikokimyasal olaylar son derece karmaşıktır. ATPE'nin iki ana bileşiği primer olarak hidrofilik olmasına rağmen, bu bileşikler arasındaki hidrasyon entalpisi farklıdır. Sistemdeki enerji miktarı, entropi ve hidrasyon entalpisi arasındaki net farkın üstesinden gelecek kadar yüksekse, iki ana kimyasal bileşik mevcut konsantrasyonlarında tek bir homojen faz oluştururken, düşükse iki bileşiğin ayrılması enerjik olarak tercih edilir ve iki faz oluşturur. Sulu ikili faz ekstraksiyon sistemlerini oluşturan faz bileşenleri fizikokimyasal ve biyokimyasal özelliklerine göre dağılım göstermektedirler. Fazları oluşturan bileşenler birbiri içerisinde dağıldıktan sonra ekstrakte edilmek istenen bileşik fazlardan birine geçer (Phong et al., 2018). ATPE kullanılarak istenilen biyomolekülün ayrılması Şekil 2.21'de verilmiştir. Günümüzde, ATPE, polimer-polimer sistemleri, polimer-tuz sistemleri, alkol-tuz sistemleri, misel ve iyonik sıvı bazlı olmak üzere beş farklı grupta sınıflandırılabilir. Polimer-polimer sisteminde fazları oluşturan bileşenler kendi polimeri bakımından zengindir. Polimer-tuz sistemlerinde, faz bileşenlerinden bir tanesi polimer miktarı bakımından, diğeri ise tuz miktarı bakımından zengindir. Polimer-tuz ve polimer-polimer sistemlerinin içerdiği su miktarı yüksek olduğundan biyolojik moleküller için uyumlu ve herhangi bir kirlilik içermeyen ayırma ortamı sağlanmış olur (Palomares and Lozano, 2017). Genel olarak, sulu iki fazlı polimerik sistemler polimer/elektrolit veya polimer/düşük molekül ağırlıklı çözünen maddelere dayanmaktadır. Yüksek molekül ağırlıklı dekstran ve Poli Etilen Glikol (PEG), iyi bilinen fiziksel ve kimyasal yapıları nedeniyle çok kullanılan iki polimerdir. Her iki polimer de ucuzdur, yalnızca orta düzeyde konsantrasyon gerektirir, hızla ayrılır, orta düzeyde düşük viskoziteye sahiptir ve kolayca tamponlanabilir (Schindler and Nothwang, 2006).



Şekil 2.21 Sulu iki fazlı ekstraksiyon sistemleri ile hedef molekülün ayrılması (Phong et al., 2018)

Polimer-polimer sistemlerinin iyonik gücünün son derece düşük olduğu göz önüne alındığında, tercihen iyonik ortamlara karşı son derece hassas olan çözünen maddelerin yanı sıra ozmotik şoka duyarlı canlı hücrelerin ve organellerin ayrılması için kullanılırlar (Benavides et al., 2011). Bu sistemler, polimerlerin doğası gereği yüksek viskoziteye sahiptir. Bazı polimerlerin yüksek maliyetli olması nedeniyle büyük ölçekli kullanımlarının sınırlandırılması bir dezavantaj olarak görülmektedir (Hatti-Kaul, 2001).

Polimer-tuz sistemleri, polimerik çözeltilerle birlikte tuz çözeltilerinin karıştırılmasıyla oluşturulur. Polimer-polimer sistemlerine göre, bir polimerin yerine tuz kullanımı ile maliyeti daha düşüktür ve biyoteknolojik uygulamalarda maliyetinin daha düşük olması sebebiyle özel bir öneme sahiptir. Proteinlerin saflaştırılması için yaygın olarak kullanılmaktadırlar. Polimer-tuz sistemleri, fazlar arasında belirgin hidrofobik farklılığa sahiptir. Faz ayrımını teşvik etmede tuzların etkinliği önemli rol oynamaktadır (Huddleston et al., 1991). Belirli bir tuzun etkinliğini belirlemede tuzun anyonunun katkısı katyonununkinden daha önemlidir. HPO_4^{2-} ve SO_4^{2-} gibi çok değerlikli anyonlar, PEG ile faz ayrımını indüklemeye en etkili olanlardır. (Huddleston et al., 1991; Hatti-Kaul, 2001). Polimer-tuz sistemlerinde, PEG-fosfat ile hazırlanan ATPE sistemleri, düşük viskozite, kısa ayırma süresi ve pH'ın altı ila dokuz aralığında stabil olması dahil olmak üzere çeşitli proses avantajları nedeniyle yaygın olarak kullanılmaktadır (Rito-Palomares, 2004). Aynı zamanda, sitrat tuzlarının PEG ile oluşturduğu ATPE sistemleri de, sitrat tuzlarının biyolojik olarak parçalanabilir ve toksik

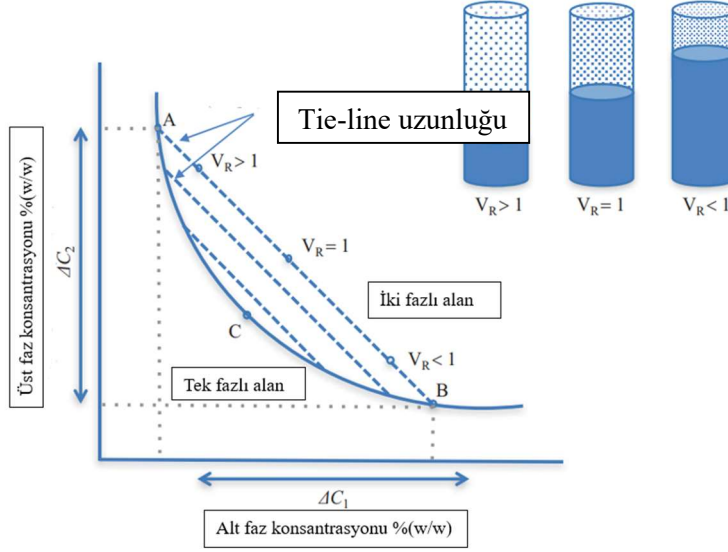
olmaması nedeniyle oldukça yaygındır. Alkol-tuz sisteminde, su ile karışabilen metanol, etanol, 1-propanol ve 2-propanol gibi alifatik alkoller uygun konsantrasyonlarda sulu tuz çözeltileri ile karıştırıldığında alkol bakımından zengin bir üst faza ve tuz bakımından zengin bir alt faza sahip ATPE sistemi oluşturur. Alkolün uzaklaştırılmasıyla, hedef ürün kolayca ekstrakte edilebilir (Greve and Kula, 1991). Bu sistemlerin spesifik avantajları, bileşenlerin ucuz olması (özellikle bazı pahalı polimerler ile karşılaştırıldığında), bileşenlerin kolay bir şekilde geri kazanımı ve yeniden kullanımı, faz oluşma sürelerinin kısa olması, yüksek polarite, düşük viskozite ve çevreye düşük toksisitedir (Ooi et al., 2009). ATPE sistemlerinin temel özelliklerinin verildiği sınıflanma Tablo 2.9'da verilmiştir.

Sulu ikili-faz ekstraksiyon (ATPE) sistemleri iki adımda gerçekleşir. İlk adım dengeleme ve ikinci adım faz ayırımıdır. Dengeleme adımı, bileşenler ile ekstraktın karıştırılıp iki fazın kendiliğinden dengeye gelip dağılımın olduğu adımdır ve oldukça hızlı gerçekleşir. Bu adım, hafifçe karıştırılarak ve bekleme süresi eklenerek yapılabilir. Oluşan fazlarda ayırma işlemi gerçekleşirken, öncelikle fazlar belirginleşir ve ardından santrifüj işlemi yapılır. Bu aşama, fazların yoğunluk ve viskoziteleri arasındaki farklardan ötürü dakikadan saate değişebilen zaman aralığına sahiptir. Santrifüjün süresi ve hızı, ayrılmak istenen biyomolekülün yapısına ve diğer bileşenlerin özelliklerine göre değişiklik gösterebilir (Güleç, 2015).

Tablo 2.9 ATPE sistemlerinin temel özelliklerine göre sınıflandırılması (Ooi et al., 2009)

Polimer-Polimer	Polimer-Tuz	Alkol-Tuz	Misel	İyonik Sıvı Bazlı
Polimer/elektrolit veya polimer/düşük molekül ağırlıklı çözünen maddelerden oluşur.	Sistemi oluşturan bileşenler tuzlar ve polimerlerdir.	Sistem alifatik alkoller ve tuz çözeltilerinden oluşur.	Sistem yüzey aktif maddelerin belirli konsantrasyonlarında oluşturulur.	Sistem iyonik sıvılarla kozmotropik tuzlardan oluşur.
Protein, nükleik asit, hücre ve organellerin ayrılmasında kullanılır.	Protein, nükleik asit, nanopartiküller ve düşük molekül ağırlıklı bileşenlerin ayrılmasında kullanılır.	Düşük molekül ağırlıklı bileşiklerin ayrılmasında kullanılır.	İyonik güce duyarlı bileşiklerin ayrılmasında kullanılır.	İyonik güce duyarlı makromoleküllerin ayrılmasında kullanılır.
İyonik güce duyarlı biyomoleküller ve proteinlerin ayrıştırılması için uygundur.	Düşük maliyetlidir.	Çözücünün geri kazanımının kolay olduğu düşük viskoziteli ve düşük maliyetli bir sistemdir.	Sistemin bileşenleri kolay bir şekilde tekrar kullanılabilir.	Organik çözücüler ile karşılaştırıldığında uçucu olmayan ve alevlenmeyen sıvılar avantajdır.
Bazı polimerler oldukça pahalıdır.	Tuzların yüksek konsantrasyonları yüksek iyonik güç sağlar.			Bu sistemlerde kullanılan bazı iyonik sıvılar oldukça toksiktir.

Faz diyagramları, sulu ikili-faz sistemlerinde potansiyel çalışma bölgelerini gösteren diyagramlar olup, sıcaklık, pH ve tuz miktarı olmak üzere etkenlerin her birinin sulu ikili-faz sistemini oluşturmak için "parmak izi" niteliğindeki özelliklerdir. Sulu ikili-faz sistemini oluşturabilmek için fazları oluşturan bileşenlerin (alkol ve tuz gibi) miktarları ve faz hacimlerinin birbirlerine göre oranları hakkında sayısal değerleri verir. Faz diyagramı binodiyal (iki düğümlü eğri) eğri ve "tie-line" şeklinde isimlendirilen birbiriyle ilişkili bağlantılar içermektedir. İki düğümlü eğri faz diyagram bölgesini iki parçaya böler ve fazları meydana getiren bileşenlerin hangi miktarlarda homojen bir karışım oluşturduğunu veya birbiri ile karışmayan fazlar oluşturduğunu verir (Şekil 2.22). Binodiyal eğrinin altında kalan miktarlarda faz bileşenleri, homojen olarak karışırken, eğrinin üstünde kalan miktarlarda birbirleri ile karışmayan fazlar oluşturmaktadır (Rito-Palomores and Lozano, 2017).

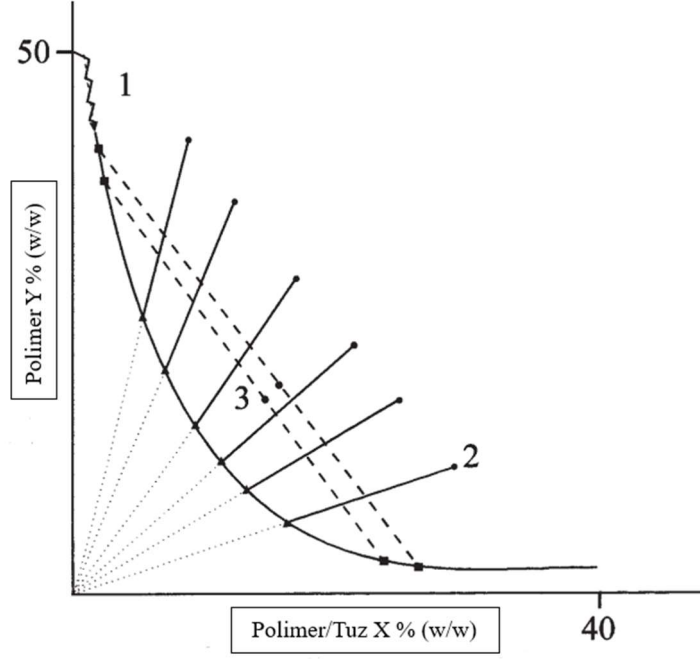


Şekil 2.22 Sulu ikili-faz ekstraksiyon sistemlerinin faz diyagramı (Rito-Palomores and Lozano, 2017)

Oluşturulabilecek bütün sulu ikili-faz ekstraksiyon sistemleri binodiyal eğrinin üzerinde birbirleriyle ilişkili iki düğüm arasında çizilen ve "tie-line" şeklinde isimlendirilen bağlantılar boyunca işaretlenmişlerdir. Tie-line, iki ayrı fazdaki bileşenlerin maksimum miktarlarını göstermektedir (A ve B). Aynı tie-line bağlantı noktaları üzerinde yol alındığında farklı fazlardaki bileşenlerin maksimum olabilecekleri miktarları aynı kalırken, sistemlerin toplam bileşimi ve fazların hacimce miktarları değişir ($V_R > 1$, $V_R = 1$ ve $V_R < 1$). C noktası "kritik nokta" olarak bilinir ve her iki fazın toplam bileşimi ile hacimce miktarlarının eşit olduğu noktadır. Binodiyal eğrinin oluşturulmasında;

1. Bulutlanma noktası (Cloud point) metodu,
2. Turbidometrik titrasyon metodu,
3. Düğüm belirleme (Node determination) metodu olmak üzere üç yöntem kullanılmaktadır.

Binodiyal değerleri belirlemek için kullanılan üç yöntemin grafiksel gösterimi Şekil 2.23'te verilmiştir.



Şekil 2.23 Binodiyal değerleri belirlemek için üç yöntemin grafiksel gösterimi (Rito-Palomores and Lozano, 2017)

Bulutlanma noktası (Cloud-point) metodunda, miktarı bilinen polimer çözeltisi deney tüpüne konulur ve üzerine miktarı bilinen ikinci polimer veya tuz çözeltisi (inorganik tuzlar) yavaşça eklenerek karışımları sağlanır. Başlarda oluşturulan karışım saydamdır, yavaşça eklenen diğer çözelti belirli miktarın üzerine çıktığı kritik noktanın ardından bulanıklaşmaya başlar ve iki faz oluşur. Bu noktada meydana gelen iki fazlı karışımın kütlece miktarı belirlenerek eğri üzerinde belirtilir. Elde edilen iki fazlı karışım tekrar berrak görünüme kadar seyreltme yapılarak işlem tekrar edilir. Binodiyal eğri oluşturma metodlarından en hızlı ve en çok kullanılanı turbidometrik titrasyon yöntemidir. Yöntemde yer alan faz oluşturucu bileşenler karıştırılır ve bulanık sistemler oluşturulur. Sonrasında tek ve saydam bir faz oluşturulana kadar su veya çözügen eklenerek seyreltilir. Bulanık halden berrak hale geçtiği yerde bileşimin sayısal değerleri hesaplanır ve eğri üzerinde belirlenir. Düğüm belirleme (Node determination) metodu, farklı tie-line hatları üzerinde yer alan bir dizi sistem hazırlanarak, üst ve alt fazdaki bileşenlerin konsantrasyonu analiz edilerek gerçekleştirilir (Hatti-Kaul, 2000; Güleç, 2015). Üst ve alt fazlardaki faz oluşturucuların maksimum miktarlarını gösteren tie-line hattının uzunluğu, genellikle sulu iki fazlı ekstraksiyon sisteminde yer alan bileşenlerin, faz ayrımı üzerindeki etkisini ifade

etmek için kullanılır. Tie-line uzunluğu (tie-line length (TLL)) aşağıda verilen bağıntıya göre hesaplanmaktadır:

$$\sqrt{\Delta C_1^2 + \Delta C_2^2}$$

$\Delta C_1 \rightarrow$ Alt faz konsantrasyon farkı

$\Delta C_2 \rightarrow$ Üst faz konsantrasyon farkı

Yukarıda verilen bağıntıda, ΔC_1 ve ΔC_2 alt ve üst fazdaki bileşenlerin miktarları arasındaki farkı gösteren değişkenlerdir. Tie-line çizgisi üzerindeki bağlantılar faz oluşturucularının değişen miktarlarını göstermektedir. Aynı tie-line hattında alt ve üst fazdaki bileşenlerin miktarları değişiklik göstermez. Tie-line uzunluğu azaldıkça binodiyal eğrinin üzerinde yer alan kritik noktaya (C) ulaşılır (Rito-Palomores and Lozano, 2017).

Aynı bağlantı hattı üzerinde, alt ve üst fazlarda bulan bileşenlerin miktarları değişiklik göstermezken, hacimce oranları (Volume ratio; V_R) değişiklik gösterir. Hacimce oranlar alt ve üst fazlar arasındaki ilişkiyi verirler ve şu bağıntıya göre hesaplanmaktadır:

$$V_R = \frac{V_{TP}}{V_{BP}}$$

$V_R \rightarrow$ Hacim oranı (Volume ratio, V_R)

$V_{TP} \rightarrow$ Üst faz (Top phase, V_{TP}) hacmi

$V_{BP} \rightarrow$ Alt faz (Bottom phase, V_{BP}) hacmi

Hacim oranının (V_R) uygun şekilde kullanılması, ekstraksiyon işlemi gerçekleştirilirken aynı zamanda örneğin deriştirilmesini de sağlar. Sulu ikili-faz ekstraksiyon sistemlerinde, biyomoleküllerin ayrılmasını etkileyen mekanizmaların çoğu tie-line uzunluğu ve hacim oranı ile doğrudan ilişkilidir. Bu nedenle, bu iki sistem parametresinin, biyolojik bileşiklerin dağılımı ve ayrılması üzerindeki etkilerini ölçmek için uygun şekilde karakterize edilmesi gerekmektedir (Benavides et al., 2011).

Biyomoleküllerin fazlar arasında dağılım davranışı, dağılım katsayısı (K_p) kullanılarak açıklanır. K_p şu şekilde hesaplanır:

$$K_p = \frac{C_T}{C_B}$$

C_T → Ayrılması istenen molekülün üst faz denge konsantrasyonu

C_B → Ayrılması istenen molekülün alt faz denge konsantrasyonu

Sulu ikili-faz ekstraksiyon sistemlerinde K_p genellikle biyomoleküllerin ayrılmasını değerlendirmek için kullanılır. K_p , fazların, maddenin özelliklerinin ve ayrıca sıcaklığın fonksiyonu olarak belirtilir. Ancak çözünen madde miktarı ve hacimce faz oranından bağımsız olduğu söylenebilir (Chu and Chen, 2000). K_p , hedef biyomolekül ve sulu ikili faz sistemlerinde yer alan diğer biyomoleküller için önemli ölçüde farklı olduğu zaman, ekstraksiyonun daha iyi gerçekleştiğini gösterir. Dağılmayı etkileyen birçok etken bulunmaktadır. En verimli dağılmayı sağlayan dağılma katsayısını bulmak için, deneysel optimizasyon çalışmaları yapılarak dağılma katsayısını etkileyen etkenler belirlenerek etkisiz hale getirilmelidir. Dağılma katsayısı ve dağılma katsayısını etkileyen etkenler logaritmik olarak ($\ln K_p$) ifade edilmektedir. Pozitif bir $\ln K_p$ değeri, moleküllerin üst fazı tercih ettiğini gösterirken, negatif bir değer molekülün alt fazı tercih ettiğini gösterir (González-Valdez et al., 2011).

Sulu ikili-faz ekstraksiyon sistemlerinin dağılma mekanizması tam olarak bilinmemekle birlikte henüz aydınlatılamamıştır. Birkaç termodinamik model tanımlanmış olsa da bu konuda farklı fikirler bulunmaktadır. Fazlarda bulunan moleküller, diğer moleküllerle birtakım etkileşimler içindedir. Bu etkileşimler, hidrojen bağları, van der Waals etkileşimleri, elektrostatik etkileşimler ve hidrofobik etkileşimler gibi etkileşimlerdir. Bu etkileşimlerin, katkılarını tahmin etmek oldukça zor olsa da fazlarda bulunan moleküller üzerine etkisi, her iki faz için farklı olmaktadır.

Geri kazanım verimi (Y_T), sulu ikili-faz ekstraksiyon sistemlerinin verimliliğini değerlendirmek için bir diğer önemli parametredir. Y_T , hedef molekülün tercihi olarak faza geçtiği zaman hesaplanır ve sulu ikili-faz ekstraksiyon sisteminin başlangıcında ATPE'ye yüklenen numunedeki hedef molekülün başlangıç miktarına göre ifade edilir. Y_T aşağıda verilen formül ile hesaplanmaktadır:

$$Y_T = \frac{C_t V_t}{C_i V_i} \times \%100$$

C_t → Hedef molekülün bulunduğu fazdaki konsantrasyonu

V_t → Hedef molekülün bulunduğu fazdaki hacmi

C_i ve V_i → Sisteme eklenen çözeltinin konsantrasyonu ve hacmi

Farklı biyomoleküllerin saflaştırılması için kullanılan ATPE sistemleri için hesaplanabilecek önemli parametrelerden bir diğeri de saflıktır. Saflık (%), belirli bir örnekte bulunan hedef bileşenin fraksiyonudur, başka bir deyişle, toplam içerik veya ekstrakttaki hedef bileşenin kütlece yüzdesidir. Aşağıdaki saflık formülü kullanılarak hesaplanır:

$$Saflık(\%) = \frac{C_0 V_0}{M_e} \times 100$$

C_0 ve V_0 → Üst fazın konsantrasyonu ve hacmi

M_e → toz ekstrakt kütlesi

Sulu ikili-faz ekstraksiyon sistemlerinde; moleküllerin fazlar içerisinde dağılması, sulu ikili faz sisteminin ve moleküllerin kendi özelliklerine ve moleküllerin faz sistemi ile ne kadar etkileştiğine bağlıdır. Moleküllerin dağılımı, bileşenlerin özellikleri, pH, konsantrasyon, sıcaklık, mol ağırlığı ve oranı, tuzun türü-oranı ve alkolün türü-oranı gibi sulu ikili faz sistemini oluşturan bileşenler tarafından etkilenir. Sulu ikili-faz ekstraksiyon sistemleri ile biyomoleküllerin ayırımı, konvansiyonel çözücü ile ekstraksiyon yöntemlerine alternatif olarak son yıllarda dikkatleri üzerinde toplamaktadır. Konvansiyonel ekstraksiyon yöntemlerinde saflaştırma yapılırken ilave işlemlere ihtiyaç duyulurken, sulu ikili-faz ekstraksiyon yönteminde biyomoleküller hem ekstrakte edilip hem de kısmi olarak saflaştırılmaları gerçekleştirilir (Odabaş, 2019).

2.3.3 Antosiyeninlerin ekstraksiyonu

Farklı bitkisel kaynaklardan, antosiyenin ekstraksiyonu için kullanılan yöntemler, ekstraksiyon amacı ve antosiyenin yapısına bağlı olarak değişmektedir. Ekstraksiyon işlemlerinde, antosiyenin yapısı ve kararlılığını

etkileyebilecek etkilerin bilinmesi çok önemlidir. Ekstraksiyon sonucu elde edilen pigmentin renklendirici veya gıdalara katılarak kullanılması durumunda pigment verimliliği, boyayabilme gücü ve kararlılığı gibi özellikleri önemli hale gelmektedir. Aynı zamanda ekstraksiyonun ve temizlik basamaklarının basit olması, zaman alıcı ve ucuz olması gereklidir (Ersus, 2006).

Antosiyaninler ekstrakte edilirken kullanılan çözücüler, özel olarak sadece antosiyaninleri ekstrakte etmezler. Antosiyaninlerin yanında diğer fenolik bileşikler, organik, asitler, şekerler gibi diğer molekülleride beraberinde ekstrakte ederler (Castañeda-Ovando et al., 2009). Antosiyaninler nötr ve bazik çözeltilerde kararlı olmadığı için ekstraksiyon esnasında asit çözeltilerinin kullanılması tavsiye edilmektedir. Antosiyaninlerin ekstraksiyonunda sıklıkla kullanılan ve eskiden beri bilinen yöntem bitkisel kaynağın, az miktarda mineral asit içeren ve kaynama noktası düşük bir alkolle ekstraksiyonudur (Timberlake and Bridle, 1980; Ersus, 2006). Metanolün toksik etkisinden dolayı, kaynama noktası daha yüksek, ekstraksiyon gücü düşük ve konsantre edilmesi daha güç olmasına rağmen etanol gıda esaslı maddelerin hazırlanmasında tercih edilen alkoldür (Ersus, 2006). Hidroklorik asit gibi mineral asitlerin kullanılması, antosiyanin pigmentlerinin kompleks yapısının doğal halini değiştirip sonraki aşamalarda dayanıklı olmayan açıl ve şeker bileşenlerinin kayıplarına sebep vermektedir. Bundan dolayı, mineral asitlerin kullanımı, açilli pigmentlerin bozulmasını engellemek için çok düşük miktarlar ile sınırlandırılmıştır (Du and Francis, 1974). Antosiyaninleri doğal formlarına yakın elde etmek için pek çok araştırmacı tarafından başlangıç pigment ekstraksiyonunda nötral çözenlerin kullanımı (% 60 metanol, aseton/metanol/ su karışımları, n- butanol, soğuk aseton veya kaynamış su) önerilmiştir. Ayrıca zayıf organik asitlerin de (çoğunlukla formik asit, asetik asit, sitrik asit ve tartarik asit) ekstraksiyon çözenlerinde kullanıldığı bildirilmektedir (Jackman and Smith, 1992). Antosiyaninlerin saflaştırılmasında, ham ekstrakt içinde safsızlık olarak değerlendirilen bileşikler antosiyaninlerin kararlılığını etkilemektedir. Ekstraktta yer alan serbest şeker molekülleri, Maillard reaksiyonu sonucu kahve renkli bileşikler oluşturabilirler. Antosiyanin içeriği yüksek ekstraktlardan şekerlerin ayrılması, antosiyaninlerin renklendirici olarak gıdalarda kullanımını daha mümkün kılmaktadır (Jampani and Raghavarao, 2015). Antosiyanin

kaynağı olarak kırmızı lahana ve turp kullanıldığında, bu kaynakların izotiyosiyanat, nitril, sülfid ve aldehit gibi bileşenleri içermelerinden ötürü elde edilen renklendiricilerde hoş olmayan bir koku ve aroma ortaya çıkmaktadır. Ayrıca kaynaktan gelen bu bileşikler, işleme ve depolama süreçlerinde antosiyaninlerin kararlılığını da olumsuz etkilemektedirler (Müller-Maatsch et al., 2019).

Literatürde antosiyaninlerin ekstraksiyonu için kullanılan yöntemler incelendiğinde ağırlıklı olarak mineral asit içeren düşük kaynama noktasına sahip olan alkoller ile ekstraksiyonları görülmektedir. Örneğin, üzümlerden antosiyanin eldesi üzerine yapılan bir çalışmada, % 37'lik hidroklorik asit içeren % 99,5'lik metanol çözeltisi kullanılmıştır (Yıldız ve Dikmen, 1988). Kırmızı üzüm cibresinden boyar bileşiklerin eldesi ve gıdalarda kullanılabilirliği üzerine yapılan bir diğer çalışmada, üzümlerden boyar bileşiklerin ekstraksiyonunda sitrik asit içeren metanol çözeltisi kullanılmıştır (Kocabıyık ve Yurdagel, 1987). Kırmızı yaban mersini pulpundan antosiyanin eldesi üzerine yapılan bir çalışmada ise 1,5 N HCl ile asitlendirilmiş % 95'lik etanol çözeltisi ekstraksiyon için kullanılmıştır (Woo et al., 1980). Kızılcığa benzer bir meyveden (*Vaccinium oxycoccus*) antosiyaninleri ekstrakte etmek amacıyla yapılan bir çalışmada % 0.03 oranında HCl içeren metanol çözeltisi kullanılmış olup HCl'nin asetik asitten daha iyi sonuç verdiği bildirilmiştir (Timberlake and Bridle, 1980). Bir çeşit erik meyvesinin (*Prunus cerasifera*) kabuğu ve yapraklarının antosiyanin kaynağı olarak kullanılabilme durumunun araştırıldığı bir başka çalışmada, siyanidin ve peonidin 3-glikozit ve 3-rutinozidler içeren erik antosiyaninlerinin, asitlendirilmiş etanol kullanılarak ekstrakte edildiği bildirilmiştir (Jackman et al., 1987).

Kâğıt kromatografisi, ince tabaka kromatografisi, jel filtrasyon kromatografisi, yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC), karşı akım kromatografisi ve elektroforez gibi laboratuvar ölçekli saflaştırma yöntemleri daha sıklıkla antosiyaninlerin yapılarının aydınlatılması amacıyla tercih edilen yöntemler olup maksimum ölçekli üretim planlandığında ortaya çıkan maliyet hesabının çok yüksek olduğu görülebilir. Sonuç olarak antosiyaninlerin yapılarının aydınlatılmasında tercih edilen bu yöntemlerin pahalı maliyetleri ve

yöntem olarak verimlerinin düşük olması eksik yönleri olarak bildirilmiştir (Müller-Maatsch et al., 2019).

Endüstriyel ölçek gerektiren saflaştırma basamaklarında kullanılabilen diğer yöntemler membran temelli yöntemler (ultrafiltrasyon/nanofiltrasyon, ozmotik membran distilasyonu ve ileri ozmos) ile adsorbsiyon temelli (kolon kromatografisi/katı-hal ekstraksiyon) yöntemlerdir. Yöntemlerin tercih edilmesinin sebepleri, enerji ihtiyaçlarının az, ayırım gücünün etkin, yöntemin veriminin yüksek olması, fazlar arası kaymanın olmaması, büyük miktarlarda üretim yapabilmek için ölçeklendirmenin basit olması ve farklı çözümlere ihtiyaç duyulmaması olarak sıralanabilir (Odabaş, 2019). Ancak oligomerik antosiyaninler agregat oluşturma eğiliminde olup membran yüzeyinde kalabilme olasılıklarından ötürü özellikle ultrafiltrasyon yönteminde işlem basamaklarının uzun sürdüğü durumlarda kullanılan cihazların tasarımı ve membranların değişmesi ve ayrıca ultrafiltrasyonun benzer molekül ağırlıklı bileşenlerin ayrılmasında etkili olamaması bu yöntemlerin bazı dezavantajlarıdır (Bridle and Timberlake, 1997; Jampani and Raghavarao, 2015; Müller-Maatsch et al., 2019).

Antosiyaninlerin endüstriyel alanlarda (gıda ve kozmetik endüstrisinde renklendirici, farmasötik alanda antioksidan vb.) kullanılmaları önündeki en büyük engel fiziksel ve kimyasal etkilerden (ortamın asitlik ve bazlık seviyesi, sıcaklık, antosiyaninlerin kimyasal formları ve miktarları, ışık, hava, enzimler, proteinler, flavonoidler, glikoz ve diğer sakkaritler ve parçalanmaları sonucunda açığa çıkan maddeler, kükürt ve metaller) etkilenerek kararlılıklarının ve biyoyararlanımlarının etkilenmesidir (Cavalcanti et al., 2011; Das et al., 2019). Bundan dolayı son dönemlerde antosiyaninlerin kararlılıklarını artırmaya yönelik birçok çalışmanın yapıldığı bildirilmiştir. Bildirilen çalışmaların yoğun olarak mikroenkapsülleme, birbirine bağlanan antosiyaninler (self association), molekülüçi ve molekül arası kopigmentasyon (intramolecular veya intermolecular) ve metal şelatlama çalışmalarının olduğu görülmüştür (Cavalcanti et al., 2011).

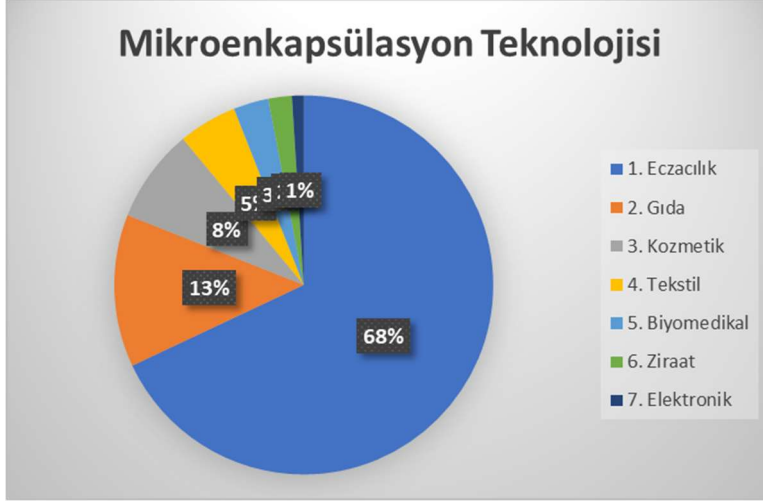
2.4 Mikroenkapsülasyon

Gıdanın tanımı, yeni talepler ve yeni uygulamaların artmasıyla sürekli yenilenmektedir. Gıdalar, açlık duygusunu gidermekten öteye insan vücudunun ihtiyaç duyduğu besinleri sağlamak, beslenmeden kaynaklı hastalıkların önüne geçmek ve fiziksel/ruhsal sağlığın iyileştirilmesini de kapsayacak şekilde düşünüldüğü için günümüzde gıdaları tanımlarken fonksiyonel gıda olarak tanımlamak gerekmektedir. Fonksiyonel gıdalar, besin olma görevlerinden öteye kronik hastalıkların önlenmesine yardımcı olan insan sağlığına yararlı olabilecek fizyolojik olarak aktif ve oldukça duyarlı biyoaktif bileşenlerle zenginleştirilmiş gıdalardır. Biyoaktif bileşenler arasında proteinler, vitaminler, mineraller, lipitler, antioksidanlar, fitokimyasallar ve probiyotik bakteriler bulunur. Biyoaktif bileşenlerin yapısı çok hassastır ve fizyolojik aktif özellikleri etkilenmeden gıdalara uygulanmaları endüstri için oldukça zor bir süreçtir (Jeyakumari et al., 2016).

Antosiyaninlerin de dahil olduğu polifenolik bileşikler de biyoaktif bileşikler olup gıda işleme endüstrisinin birçok sektöründe doğal katkı maddeleri (doğal renklendirici maddeler, koruyucu maddeler, doğal antioksidanlar, besinsel katkı maddeleri), farmasötik formülasyonlara bitki özütü gıda tamamlayıcısı, kozmetik ürünlere doğal gıda renklendiricisi ve antioksidan olarak entegre edilebilmektedir. Polifenolik bileşiklerin, *in vitro* ve/veya *in vivo* olarak ödemi inhibe ederek inflamasyonu azaltma, tümör gelişimini durdurma, proapoptotik ve anti-anjiyojenik etkiler gösterme, bağışıklık sistemini kontrol etme, osteoporozda suçlanan kemiksel bozuklukları önleme, kan damarlarının yapısını etkileyerek kılcal damar direncini arttırma, kardiyovasküler sistemi ve retinayı koruma ve kilo alımını sınırlama gibi etkilerinden dolayı ekonomik anlamının en önemli olduğu alan insan sağlığıdır. Ne yazık ki, bu değerli doğal bileşiklerin kullanım alanları büyük ölçüde sınırlı olup etkinlikleri uygulama yoluna göre biyoyararlanımlarına ve bütünlüklerine bağlıdır. Gıda işleme, dağıtım, depolama sırasında veya gastrointestinal sistem (pH, enzimler, diğer besinlerin varlığı, yetersiz gastrik kalma süresi, düşük geçirgenlik ve/veya düşük çözünürlük) dengesizlikleri, polifenollerin aktivitesini ve potansiyel sağlık yararlarını sınırlar. Ayrıca polifenolik bileşiklerin serbest formlarının suda çözünürlükleri sınırlı olup, gıda maddelerine veya oral ilaçlara dahil edilmeden

önce maskelenmesi gereken hoş olmayan bir tada sahip olabilirler. Bu nedenle, polifenolik bileşiklerin yapısal bütünlüğünü tüketime veya uygulamaya kadar koruyabilen, tadını maskeleyebilen, suda çözünürlüğünü ve biyoyararlanımını artırabilen ve fizyolojik bir hedefe doğru tam olarak iletebilen koruyucu bir son ürünün formülasyonu çok değerlidir. Mikroenkapsülasyon mevcut stabilizasyon yöntemleri arasında ilgi çekici bir yöntemdir (Munin and Edwards-Levy, 2011).

Enkapsülasyon, biyolojik olarak aktif bileşiklerin (antioksidanlar, mineraller, polifenolik bileşikler, vitaminler, fitosteroller, lutein, yağ asitleri, likopen vb.) ve canlı hücrelerin (probiyotikler vb.) gıdaların içine hapsolmesi amacıyla geliştirilen; aktif bileşenin başka bir maddeyle kaplandığı veya başka bir materyalin içine hapsedildiği, özel şartlarda kapsülün içeriğinin kontrollü olarak salındığı bir teknolojidir (Kahraman, 2019). Enkapsülasyonda; katı, sıvı veya gaz halindeki gıda bileşenleri, enzimler, hücreler, mikroorganizmalar ve diğer maddeler, protein veya karbonhidrat esaslı bir kaplama materyaliyle kaplanır (Gökmen vd., 2012). Mikroenkapsülasyon, 1920'lerde kapsüllerin oilgum acadia ile kaplanıp püskürterek kurutulmasına dayanan bir yöntemdir. Gıda sanayisinde kullanılan moleküllerin etrafının sarılarak veya kaplanarak hazırlanması mikroenkapsülasyonun önemini günümüzde fazlasıyla artırmıştır (Gibbs et al., 1999). Mikroenkapsülasyon teknolojisini kullanan endüstriler arasında eczacılık ilk sırada yer alırken farklı birçok alan bu teknolojiyi kullanılmaktadır. Endüstriyel alanların mikroenkapsülasyon teknolojisini kullanım yüzdeleri Şekil 2.24'te verilmiştir. Eczacılık alanı (% 68), gıda sanayisi (% 13), kozmetik sektörü (% 8), tekstil sanayisi (% 5), biyomedikal alanı (% 3), ziraat (% 2) ve elektronik alanı (% 1) olarak sıralanmaktadır (Paulo and Santos, 2016).



Şekil 2.24 Mikroenkapsülasyon teknolojisini kullanan endüstri alanları (Paulo and Santos, 2016)

Gıda endüstrisi, mikroenkapsülasyon teknolojisini en fazla kullanan ikinci ana endüstriyel alandır. Gıdalarda bu teknolojinin kullanılmasının nedenleri;

- Enkapsüle edilen gıda bileşeniyle çevre koşullarının (ışık, oksijen, nem vb.) etkileşimi azaltılarak dış ortama karşı koruma ve bozulmasını engellemek,
- Ana malzeme uçucu bir bileşik ise buharlaşarak kaybolmasını engellemek ya da dış çevreye göre buharlaşma ya da iletim hızını yavaşlatmak,
- Kaplanacak olan çekirdek maddesinin rahatsız edici koku, tat ve aromasını bastırmak ve rengini değiştirmek,
- İşlem esnasında ve depolama süresince ya da son üründe biyoaktif bileşenlerin kararlılığını korumak,
- Herhangi bir karışımda tepkimeye girebilecek olan belirli maddeleri ayırmak,
- Biyoaktif bileşiğin içeriği korunacak şekilde, istenilen koşullarda, doğru zamanda ve doğru yerde ortama kontrollü olarak yavaş yavaş salınımını sağlamak,
- Kullanılabilirliğini (sıvı formdan katı forma dönüştürme, topaklanmasını engelleme, nem çekme oranını azaltma, yoğunluğunu ayarlama vb.yöntemlerle) kolaylaştırmak,

- Aktif bileşenlerin renk, büyüklükleri ve çözünürlüklerinin artırılması gibi özellikleri değiştirmek,
- Kaplanacak materyale duyulan ihtiyaç sadece çok küçük miktarlarda ise seyreltme yapılmasına olanak sağlamak

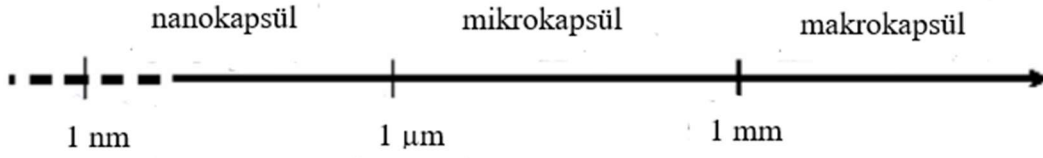
şeklinde sıralanabilir (Andres, 1977; Ersus, 2006; Gibbs, 1999; Nedovic et al., 2011; Shadidi and Han, 1993; Tontul, 2011; Özgün, 2015; Özcan ve Altun, 2013; Gökmen vd., 2012). Gıda endüstrisinde kullanılan mikrokapsülenmiş bileşenlere ait örnekler Tablo 2.10'da verilmiştir.

Tablo 2.10 Gıda endüstrisinde kullanılan mikrokapsülenmiş bileşen örnekleri (Jyothi et al., 2010)

Gıda Bileşenin Sınıfı	Uygulama Alanı	Örnekler	Referanslar
Biyoaktif moleküller	Aroma verici madde	Limon yağı Nane yağı Vanilya yağı	Bhandari vd.,1999 Koo vd.,2014 Yang vd.,2014
	Tatlandırıcı	Aspartam Sukraloz Ksilitol	Rocha-Selmi vd.,2013 Rocha-Selmi vd.,2013 Santos vd., 2015
	Renklendirici	Annatto β-karoten Turmeric oleoresin	De Marco vd., 2013 Donhowe ve Kong, 2014
	Yağda çözünen vitaminler	A vitamini D ₂ vitamini E vitamini	Junyaprasert vd., 2001 Shi ve Tan, 2002 Sharipova vd., 2016
	Suda çözünen vitaminler	C vitamini	Desai ve Park,2005
Canlı Hücreler	Probiyotikler	<i>Bifidobacterium</i> <i>spp.</i> <i>Bifidobacterium</i> <i>longum</i>	Hansen vd., 2002 Amine vd., 2014

Mikrokapsüller iki farklı bileşenden oluşmaktadır. Bu bileşenler, çekirdek ve kaplama (kabuk) malzemesidir. Çekirdek malzemesi aktif bir bileşen iken, kaplama (kabuk) malzemesi çekirdek malzemesinin üstünü örter ve korur (Jyothi et al., 2010). Çekirdek malzeme olarak kaplanan aktif madde, çoğunlukla

sıvı halde olmakla birlikte katı veya gaz halde de olabilir. Kaplama materyali; duvar materyali, taşıyıcı, membran, kabuk, kapsül, taşıyıcı materyal, dış faz veya matriks olarak adlandırılır. Mikrokapsülleme işlemiyle üretilen kapsüller, mikropartiküller, mikrokapsüller ve mikroküreler olarak adlandırılır. Parçacık boyutu 1 μm 'nin altında olduğunda nanopartiküller, nanokapsüller, nanoküreler; çapı 3-800 μm olan partiküller mikropartiküller, mikrokapsüller veya mikroküreler; 1000 μm 'den daha büyük partiküller ise makropartiküller olarak adlandırılır (Jyothi et al., 2010). Mikrokapsüllerin çapı mikrometreden milimetreye kadar değişebilir (Umer et al., 2011). Mikrokapsüllerin sınır boyutları Şekil 2.25'te gösterilmiştir.



Şekil 2.25 Mikrokapsüllerin sınır boyutları (Konuklu, 2008)

Mikroenkapsülleme yapılırken birinci sırada uygun bir kaplama maddesinin belirlenmesi gerekmektedir. Mikrokapsülün, istenen özelliklerinin ve belirli bir içeriğin performansını artırmaya yönelik kullanılmasını belirleyen en önemli şey kaplama maddesinin bileşimidir. Kullanıma uygun bir kaplama maddesinde olması gereken özellikler;

- Reolojik özellikleri maksimum miktarlarda bekleneni karşılamalı ve kapsülasyon işleminde basit bir şekilde kullanılabilmesi,
- Biyolojik olarak aktif olan maddenin dağılımı veya emülsiyon olması ve böylece oluşan emülsiyonun dengeleme kabiliyetinin olması,
- Proses esnasında ve depolama süresi uzadığında içindeki aktif içeriği tutabilmeli ve kapsüllenecek malzeme ile reaksiyona girmemeli,
- Biyolojik olarak aktif olan maddenin çevre şartlarına (örneğin havadaki oksijen, sıcaklık, ışık ve nem) dayanıklı olması için üst düzey koruma sağlamalı,

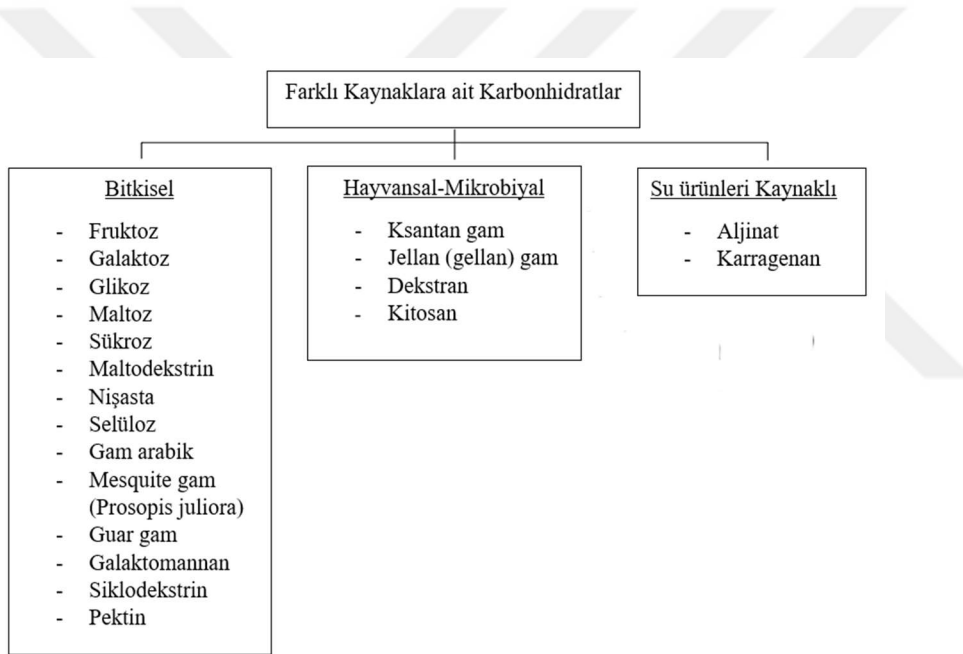
- Çözgenlerdeki çözünme oranı gıda sanayisinin belirlediği değerler aralığında olmalı (örneğin su ve etanol),
- Biyolojik olarak aktif olan madde ile kimyasal tepkime vermemeli,
- Gıdalarda kullanılabilir saflıkta (food-grade) olmalı,
- Düşük maliyetli olmasıdır (Shadidi and Han, 1993).

İstenilen bu özelliklerin tek bir kaplama maddesinde olması pek mümkün değildir. Bu nedenle, farklı kaplama maddelerinin birlikte kullanılması etkinliği arttırabilecektir. Bununla birlikte fiziksel ve mekaniksel özellikleri güçlü olan ve yapısında değişiklik yapılması mümkün kaplama materyalleri de (örnek; modifiye selüloz) bulunmaktadır. Gıda enkapsülasyonunda kullanılan duvar materyalleri karbohidratlar, proteinler, lipitler ve gıda saflığında (food-grade) polimerler olmak üzere dört temel başlık altında toplanabilir. Mikrokapsüllerin hazırlanmasında kullanılan polimerler, iki ana gruba doğal ve sentetik polimerler olarak ayrılabilirler. Doğal polimerlerin; biyobozunur, kullanıldıkları organizmalarda toksik herhangi bir bileşen oluşturmamaları ve suda çözünürlüğü yüksek olan etkin maddelere uygun taşıyıcılar olmalarından dolayı tercih edilmeleri daha yüksektir. Sentetik polimerler ise kendi içlerinde biyobozunur olan ve biyobozunur olmayan polimerler iki gruba ayrılırlar. Sentetik polimerler, istenen özelliklere göre sentezlenebilmeleri, büyük ölçekli üretimler için uygun olmaları, hazırlık ve depolama süresinde dayanıklılık göstermeleri ve yüksek saflıkta üretilmeleri nedeniyle tercih edilen polimerlerdir (Akoğlu, 2012). Kaplama maddesi olarak kullanılan doğal ve sentetik polimerler Tablo 2.11’de verilmiştir.

Tablo 2.11 Kaplama maddesi olarak kullanılan doğal ve sentetik polimerler (Eyüpoğlu ve Kut, 2016)

Doğal Polimerler		Sentetik Polimerler	
Agar	Selüloz	Akrilik polimerler	Polivinil alkol
Albümin	Kazein	Alifatik polimerler	Silikonlar
Alginat	Pektin	Polietilen glikol	Selüloz türevleri
Arap zımkı	Kitosan	Poliamidler	Polilizin
Nişasta	Dekstran	Poliüretanlar	
Jelatin		Polistiren	

Karbohidratları enkapsülasyon işlemi için tercih edilebilir kılan özellikleri düşük maliyetleri ve gıda sanayisinde çok sık kullanılmalarıdır. Kaplama materyali olarak kullanıldıklarında küresel ve pürüzsüz kapsüllerin oluşmasını sağlar. Ayrıca yüksek katı içeriklerinde dahi düşük viskozite ve yüksek çözünürlüğe sahiptirler (Madene et al., 2006). Karbohidrat kullanımı, kaplama materyali ile çekirdek materyalinin arasındaki yapışma kuvvetini artırır. Karbohidratlar, bitkisel, mikrobiyal ya da hayvansal ve su ürünleri kaynaklı olmak üzere sınıflandırılabilir. Bu sınıflara ait karbohidrat türleri Şekil 2.26'da verilmiştir.

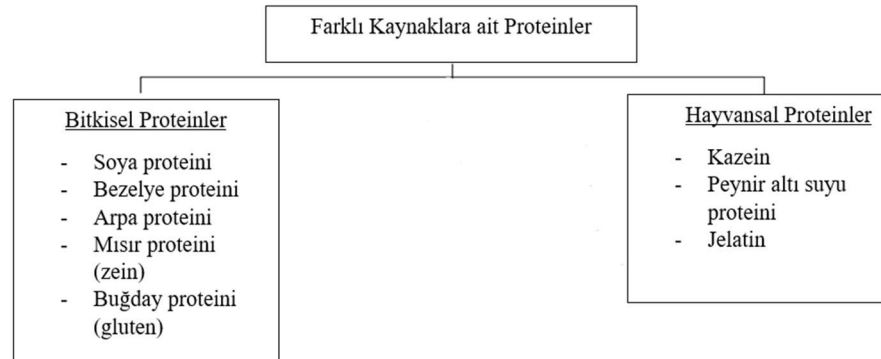


Şekil 2.26 Farklı kaynaklara ait karbohidrat türleri (Wandrey et al., 2010; Jan and Nedovic, 2010)

α -1,4 glikozidik bağlar aracılığıyla bağlanmış α -D-glukoz birimlerinden oluşan maltodekstrin dekstroz eşdeğeri (DE) 20'den az tadı olmayan bir sakkarittir. DE değeri nişasta polimerinin hidroliz derecesinin bir ölçüsüdür. Gıda bileşenlerinin mikroenkapsülasyonunda yaygın bir taşıyıcı materyal olarak kullanılan, nişastanın asit veya enzimlerle kısmi hidrolizi ile üretilen hidrolize bir nişastadır. Özellikle püskürterek kurutma uygulamalarında kullanılan, en çok tercih edilen karbohidratlardan biri olan maltodekstrin, yüksek oranda suda çözünürlük (yaklaşık % 70), düşük maliyet, nötr aroma ve tat,

yüksek katı konsantrasyonlarında düşük viskozite, gıda sistemlerindeki yapışma ve aglomerasyon problemlerinde önemli düzeyde azalma sağlama, biyoaktif maddelerin oksidasyon ve termal bozunmalara karşı korunmasını sağlama etkilerine sahiptir. Bununla birlikte, maltodekstrinin en büyük sınırlaması, düşük emülsifiye etme kapasitesidir. Bu nedenle, genellikle diğer taşıyıcı materyaller kullanılmaktadır (Pınarbaşı, 2023).

Proteinler pek çok fonksiyonel özelliklere sahiptirler ve bu özellikleri proteinleri mikroenkapsüllemede kullanılmaları için istenen materyaller yapmaktadır. Proteinler tat veren maddelerin birleştirilmesinde çok tercih edilirler (Landy et al., 1995). Mikroenkapsüllemede kaplama maddesi şeklinde kullanılan proteinler, jelatin, peynir altı suyu proteinleri, kazein ve kazeinatlardır. Jelatin, suda çözünübilirliği yüksek, emülsiyon özelliği iyi olan, film oluşturma etkisi gösteren ve yenilebilir özelliğinden dolayı mikroenkapsülasyon için tercih edilen kaplama maddesidir. Jelatin çoğunlukla akasya gamıyla beraber kullanılarak kaplama maddesi oluşturulur. Bitkilerden üretilen bir akasya gamının yapısında karboksilik asit grupları yer almaktadır. pH, izoelektrik nokta değerinden düşük olduğunda, jelatin polikasyonik olur ve böylece polikasyonik jelatin ile polianyonik akasya gamının arasında, koaservasyon ile neticelenen bağlantı oluşur. Tercih edilen jelatin ve akasya gamından üretilen karışım, geçirgenliğini etkileyebilmektedir (Kondo, 1979). Proteinler, hayvansal ve bitkisel proteinler olmak üzere sınıflandırılabilirler. Bu sınıflara ait kaplama maddesi olarak kullanılan farklı protein türleri Şekil 2.27'de verilmiştir.



Şekil 2.27 Farklı kaynaklara ait protein türleri (Wandrey et al., 2010; Jan and Nedovic, 2010)

Kaplama materyali olarak kullanılan bir başka sınıf ise lipitlerdir. Mikroenkapsülasyonda yaygın olarak kullanılan lipitler, yağlar (süt yağı, soya yağı gibi), polar lipit maddeleri (monogliserit, fosfolipit, glikolipit gibi) ve vakslardır (mumlar). Yağlar, yüksek koloidal kararlılığa ve reolojik özelliklere sahiptirler. Ayrıca nem bariyeri özellikleri de iyidir. Ekonomik olmaları tercih edilmelerinde önemli rol oynar. Polar lipitler, hidrofilik ve hidrofobik özellikleri bir arada gösteren moleküllerdir. Yüzey aktivitesi yüksek ve emülsiyonu kararlı hale getirme özelliğine sahiptirler. Ancak yüksek maliyetleri dezavantajlarıdır. Vakslar, nem tutucu olma özelliğine sahip olup püskürtmeli soğutma/dondurma işlemleri (erime noktası $>45^{\circ}\text{C}$) için ideal maddelerdir. Eriyik hallerinin vizkoziteleri düşüktür. Maliyetlerinin düşük olması ayrıca bir avantajdır.

Aktif bileşenin bulunduğu çekirdek, duvar malzemesi ile kaplanarak oluşan mikrokapsüllerin yapısı, çekirdek materyalinin özelliklerine ve mikrokapsülasyona göre değişiklik göstermektedir. Mikrokapsüllerin şekilleri, küre ya da düzensiz olabilir. Tek çekirdekli, çok çekirdekli veya matriks yapıda olabilirler. Mikrokapsül tek çekirdekli ise çekirdek materyali bir kabuk tarafından kesintisiz olarak sarılmıştır. Çok çekirdekli ise çekirdek materyali mikrokapsül içerisinde farklı yerlerde toplanmış, etrafı kabuk materyali tarafından sarılmıştır. Matriks tipi mikrokapsüllerde çekirdek materyali kabuk materyali içerisinde homojen olarak dağılmıştır (Eyüpoğlu ve Kut, 2016). Mikrokapsül şekilleri Şekil 2.28’te verilmiştir.



Şekil 2.28 Mikrokapsül şekilleri (Ersus, 2006; Gibbs et al., 1999)

Gıdalarda kullanılan maddelerin kaplama materyalleriyle kapsüllenmesinin farklı yöntemleri vardır. Uygulanacak enkapsülasyon yöntemi ile üretilen mikroenkapsül, tüketici taleplerini, besleyicilik değerini ve gıdanın işlenme-depolanma sürecinde kararlılığını geliştirecek bir son ürün olmalıdır. Bu nedenle enkapsülasyon yöntemi rasgele seçilmemelidir. Mikrokapsülasyon yöntemiyle, çekirdek materyali oldukça aktif, aşındırıcı ve zararlı çevre koşullarından korunabilir, işlenebilirliği (çözünürlüğün, akışkanlığın artması v.b.), raf ömrünü artabilir, tehlikeli olabilecek toksik maddeler güvenle taşınabilir, enzimlerin ve mikroorganizmaların immobilizasyonu sağlanabilir, istenmeyen tat ve kokular baskılanabilir, sıvı maddeler katı halde taşıyıp ve salınımları kontrol edilebilir (Eyüpoğlu ve Kut, 2016). Mikroenkapsülasyon tekniği seçilirken, çekirdek ve kaplama malzemelerinin fiziksel ve kimyasal özellikleri dikkate alınmalıdır. Ayrıca mikroenkapsülasyon tekniği gıda bileşenlerinin kullanım amacına göre seçilmelidir. Mikroenkapsülasyon tekniği ve kaplama materyali birbirine uygun olmalıdır (Desai and Park, 2005). Mikrokapsülasyon tekniğini seçerken, çekirdek materyali, mikroenkapsülün partikül boyutu, kabuk materyalinin geçirgenliği gibi özelliklerde dikkate alınmalıdır. Mikroenkapsülasyonda kullanılan yöntemin, elde edilen son üründe olması gereken özellikleri sağlaması gerekmektedir. Mikrokapsüller farklı fiziksel ve kimyasal özelliklerine göre karakterize edilebilirler. Bu özellikler, duvar kalınlığı, geçirgenlik, mikrokapsül büyüklüğü, salınım özellikleri, renk, mekanik ve akış özellikleri mikrokapsüllerde incelenebilen başlıca özelliklerdir. Gıda sanayisinde en çok tercih edilen mikroenkapsülleme teknikleri üç başlıkta toplanmaktadır. Bu yöntemler; Fiziksel, Kimyasal ve Fizikokimyasal yöntemler olarak Tablo 2.12’de verilmiştir.

Tablo 2.12 Gıda endüstrisinde kullanılan enkapsülasyon yöntemleri

Fiziksel Yöntemler	Kimyasal Yöntemler	Fizikokimyasal Yöntemler
Püskürtmeli Kurutma	Süper Kritik Akışkan	Koaservasyon
Püskürtmeli Soğutma	Basit Koaservasyon	Lipozom tutuklama
Akışkan Yatak Kaplama	Kompleks Koaservasyon	
Ekstrüzyon	<i>İn-situ</i> Polimerizasyon	
Kokristalizasyon	Ara yüzey Polimerizasyonu	
Santrifüj ekstrüzyon		
Dondurarak kurutma		

Mikrokapsül üretiminde yaygın olarak kullanılan yöntemlerin başında; ekstrüder, püskürtmeli kurutma, *in-situ* polimerizasyonu, ara yüzey polimerizasyonu, koaservasyon ve akışkan yatak mikrokapsülasyon yöntemleri gelmektedir. Akışkan yatak yönteminde temel işlemler; kabuk malzemenin çözülmesi, çekirdek partiküllerin akışkan hale getirilmesi ve son olarak çekirdek partiküllerin kaplanmasıdır. Toz halindeki çekirdek partikül akışkan yatak kullanılarak sıcak bir gaz içinde süspansiyon edilir. Partiküllerin üzerine kapsülün çeperini oluşturmak için çözelti halindeki kabuk malzeme püskürtülür ve çözücü uzaklaştırılarak kabuk maddenin çekirdek materyalini kaplaması sağlanır (Sarier and Onder, 2012). *In-situ* polimerizasyon yöntemi, ara yüzey polimerizasyon yöntemine benzerdir. Burada çekirdek malzemenin bulunduğu kaptaki reaktif madde bulunmaz. Polimerizasyon sadece sürekli fazda ve dispers çekirdek materyali ile sürekli fazın oluşturduğu ara yüzeyin, sürekli faz kısmında gerçekleşir. Ara yüz polimerizasyonu ile mikrokapsül elde edilmesinde genellikle iki reaktif monomer kullanılmaktadır. Reaktif monomerlerden birisi ve kabuk malzeme bir çözgen içinde çözülür. Diğer reaktif monomer de farklı bir çözgen içinde çözülür. Ardından bu iki dispersiyon karıştırılır ve iki sıvı fazın ara yüzeyinde monomerlerin birbiri ile reaksiyona girmesiyle dispers fazı hapsedecek şekilde film oluşur (Cireli vd., 2006). Kapsülleme teknolojisinin orijinal yöntemi olarak da bilinen koaservasyon yönteminde çekirdek materyali polimer çözeltisi içerisinde dispers haline getirilir. Kabuk materyali oluşturulurken, polimer çözeltisinin çözünürlüğü değiştirilir, karıştırılıp sıcaklığın düşmesi sağlanır, pH değiştirilerek faz ayrımı gerçekleştirilir ve kabuk materyali oluşturulur (Güler ve Kut, 2011).

Farklı teknikler olsa da mikroenkapsülasyon teknikleri içerisinde kurutma temelli yöntemler sıklıkla kullanılmaktadır. Tercih edilmelerinin başlıca nedenleri; kolay uygulanabilen işlemler olmaları, ekipman olanaklarının oldukça geniş olması, minimum ürün hacminde çalışılabilir olması ve minimum depolama hacmi olmasının nakliye maliyetlerini düşürmesi, nem içeriği az olan ürünlerin elde edilmesine olanak vermeleri ve ürünlerin kararlılığının ve kalitesinin oldukça yüksek olmasıdır (Fang and Bhandari, 2012).

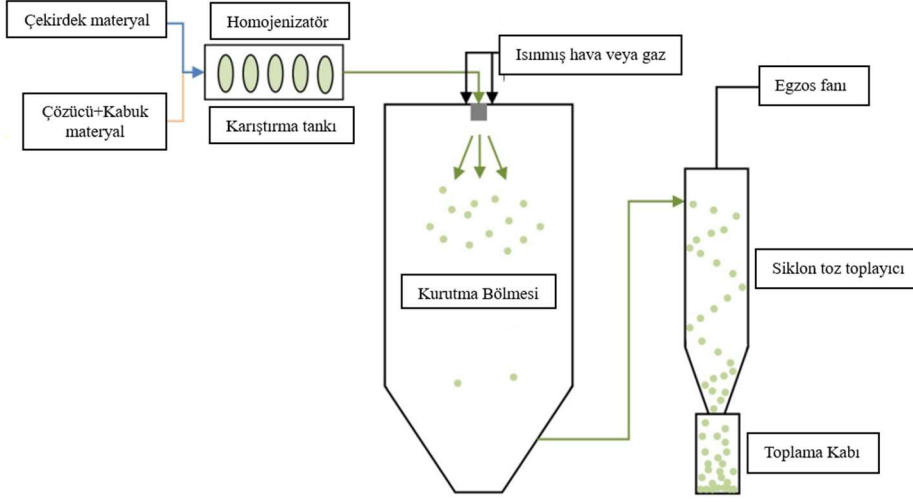
2.4.1 Püskürtmeli kurutma

Püskürtmeli kurutma yöntemi, gıdalara aroma veren maddelerin oksidasyon ve degradasyona karşı kararlı olmaları, sıvı haldeki maddelerin toz haline getirilmesi için 1950 yılının sonlarında gıda sanayisinde kullanılmaya başlanmıştır (Desai and Park, 2005). Püskürtmeli kurutma yönteminin, esnek ve yüksek oranda tekrarlanabilir olması, diğer enkapsülasyon yöntemleri ile karşılaştırıldığında üretim maliyetinin daha düşük olması, ekipmanının bulunabilir olması ve ekonomik bir yöntem olması endüstriyel uygulamalar için avantajdır (Burgain et al., 2011; Nedovic et al., 2011; Risch, 1995). Püskürtmeli kurutma, sıvı halde bulunan maddenin atomizer aracılığıyla sıcak havanın bulunduğu ortama püskürtülmesiyle çok kısa bir sürede toz forma dönüşmesi için yapılan bir işlemdir (Gharsallaoui et al., 2007).

Püskürtmeli kurutma yönteminin esası; aktif bileşenin ve kaplama malzemesinin çözünmesinden sonra bir atomizer kullanılarak küçük damlalar şeklinde oldukça sıcak havanın bulunduğu kabine püskürtülmesine dayanır. Püskürterek kurutma yönteminde, kurutucuya beslenen ilk sıvı çözelti, bir emülsiyon veya süspansiyon olabilir. Kabinde kurutma gazı maksadıyla azot gazı reaksiyon vermeyen diğer gazlar kullanılır. Kabin içerisindeki sıcak hava nedeniyle çözücü buharlaşarak uzaklaştırılır ve mikrokapsül oluşturulur (Drusch, 2007). Atomize parçacıklar püskürtmeli kurutucunun çember kısmında sıcak havayla karşı karşıya kaldığında su, kaplama maddesinden buharlaşarak ayrılır ve bu durum kısa zamanda gerçekleşir. Böylece çekirdek diye kullanılan biyolojik olarak aktif bileşenin sıcaklıktan korunması sağlanarak ısınması engellenir. Kurutulmuş olan madde, kurutma için kullanılan cihazın ayrı bir bölmesinde toplanır veya cihazda bulunan gaz-katı maddeyi birbirinden ayıran farklı bir birim tarafından ayrılırlar. Bu yöntem hem hidrofobik hem de hidrofilik aktif bileşenlerin mikrokapsülleme için kullanılabilir. Aynı zamanda termal bozulma olmaksızın çeşitli taşıyıcılara uygulanabilir. Bununla birlikte, ısıya maruz kalma süresini saniyelere hatta milisaniyelere düşürerek ısıya duyarlı maddeler için kullanılabilir (Binesh et al., 2023).

Püskürtmeli kurutma tekniğiyle kurutulan maddeler besleme materyaline ve işlem koşullarına göre 10-50 µm gibi oldukça küçük ya da 2-3 mm gibi

oldukça büyük parçacık büyüklüklerinde olabilirler (Gharsallaoui et al., 2007). Püskürtmeli kurutma yöntemi ile mikroenkapsülasyonda, kurutma işleminde kaplama maddelerinin sahip olduğu özelliklerin yanında emülsiyon karışımının kuru madde bileşimi, işlem sırasında kullanılan sıcaklık, emülsiyonun kararlılığı toz ürünün kalitesini etkileyen faktörlerdir. Püskürterek kurutma yönteminin şematik gösterimi Şekil 2.29’da verilmiştir.



Şekil 2.29 Püskürterek kurutma yöntemi (Chàvarri, et al., 2012)

Püskürtmeli kurutma yöntemi; atomizasyon, püskürtmeyle oluşan damlaların sıcak havayla karşılaşması, damlalardan suyun buharlaşarak ayrılması ve kurutma ürününün ayrılarak toplanması olmak üzere dört aşamadan oluşmaktadır. Atomizasyon işleminin temel amacı, sıvı ve kuru hava arasında maksimum ısı transfer yüzeyi oluşturarak ısı ve kütle transfer işlemlerini dolaylı olarak optimize etmektir. En yaygın kullanılan atomizörler arasında basınçlı nozul, pnömomatik valf, homojenleştirici atomizörler, sonik nozul, iki akışkanlı nozul ve dönen disk konfigürasyonu bulunmaktadır. Kullanılan atomizörün seçimi besleme malzemesinin viskozitesine bağlıdır. Sıcak hava ve sıvı teması eş akımlı veya karşı akımlı olabilir. Eş akım kullanılan çalışmalarda, sıvı ve sıcak hava aynı yönde püskürtülür ve giriş ve çıkış sıcaklıkları 140-220°C ve 50-80°C arasında değişir, bu da termal bozunmayı sınırlar. Karşı akım akışı sırasında, kuru ürünler termal bozunmayı sınırlayan yüksek sıcaklıklara maruz kalır. Sıcak hava ve sıvı teması sırasında sıvının sıcaklığı artar ve damlacıktan çevreye nem difüzyonu gerçekleşir. Bu süreç, damlacık sıcaklığı hava sıcaklığına ulaşana

kadar devam eder (Gharsallaoui et al., 2007). Paralel akım, damlacıklarla kurutma sıcaklığındaki havanın akış yönlerinin aynı olup ortamı kuşatmasıyla oluşmakta ve atomizör ile havayı dağıtan mekanizma birlikte bulunmaktadır. Atomizörle meydana gelen damlalar sıcak hava ile buluştuğunda su hızla buharlaşarak ayrılır. Suyun buharlaşmasıyla kuru havanın sıcaklığı azalır. Süt ve süt ürünlerinin üretim aşamalarında sıklıkla kullanılan bir yöntemdir (Duman, 2009; Çevik, 2017). Damlacıktan suyun buharlaşması üç aşamada oluşur. Sıcak havayla damlacıklar karşılaştığında aradaki sıcaklık farkı damlacıkları ısıtır ve sıcaklık belli bir aralığa kadar artar. Ulaşılan sıcaklık değerine "yaş termometre sıcaklığı" denilir. Damlacıkların üzerinde bulunan suyun hızlı bir şekilde buharlaşması sağlanmıştır. Damlacıkların sıcaklık değeri kritik bir aralığa geldiğinde dışta kabuklaşma olur ve kuruma hızının azalmasıyla işleme devam edilir. Kurutma işleminin sonunda ürünler yer çekiminin etkisiyle farklı bir yerde bulunan haznede toplanır (Gharsallaoui et al., 2007). Bu noktada havadan gelebilecek nem önemlidir ve ürünün verimini, kalitesini doğrudan etkileyebilmektedir. Bu durum ürünün son aşamada nem içeriğini istenmeyen seviyelere getirebilir. Kurutma işleminin sonrasında gaz temizleyicilerinden geçirilen hava atmosfere bırakılır (Dinçel, 2015; Çevik, 2017).

İyi bir mikroenkapsülasyon verimi elde etmek için püskürtmeli kurutma koşulları optimize edilmelidir. Püskürtmeli kurutma koşullarını optimize eden en önemli faktörler, besleme akış hızı, hava giriş/çıkış sıcaklığı ve besleme sıcaklığıdır (Liu et al., 2001). Besleme sıcaklığı emülsiyonun viskozitesinden sorumludur. Besleme sıcaklığı artırıldığında, viskozite ve damlacık boyutu azaltılmalıdır. Besleme akış hızı da püskürtülen her damlacığın kurutma odasına gelmeden önce istenen seviyede kurutulmasını sağlamak için ayarlanmalıdır. Hava giriş sıcaklığı, kurutma hızını ve ürünün son nem içeriğini belirler. Püskürtülerek kurutulan tozların çözünürlük özelliklerinin iyi olduğu görülmektedir. Nemin kısa sürede hızla buharlaşması, çekirdek malzeme sıcaklığının 40°C'nin altında kalmasını sağlar. Dondurarak kurutma ile karşılaştırıldığında püskürtmeli kurutma işleminin 50 kat ucuz olduğu görülmüştür (Desobry et al., 1997). Püskürtmeli kurutma ile mikroenkapsülasyonun en büyük sınırlaması, mevcut duvar malzemelerinin

sınırlı sayıda olması ve suda çözünebilir olmasının gerekliliğidir (Kandansamy and Somasundaram, 2012).

Püskürtmeli kurutma yöntemi ile yapılan mikroenkapsülasyon çalışmaları literatürde oldukça fazla yer almaktadır. Taşıyıcı materyal olarak maltodekstrin ve peynir altı suyu proteininin farklı konsantrasyonlarda (% 80, % 100 ve % 120) kullanıldığı, püskürtmeli kurutma ile nar kabuğu ekstraktlarının enkapsülasyonunun gerçekleştirildiği çalışmada, farklı taşıyıcı türü ve konsantrasyon seçimlerinin son toz kapsüller üzerindeki kalite ve stabiliteye olan etkisi incelenmiştir (Savikin et al., 2021). Püskürterek kurutma yöntemi ile nar kabuğu ekstraktı, portakal suyu yan ürünlerinin taşıyıcı materyal olarak kullanılıp enkapsüle edilmiş ve mikroenkapsül fenolik maddeler ve ham ekstrakt kullanarak kurabiye yapımında kullanılmıştır. Bu çalışmada, mikroenkapsülasyon yöntemi ile elde edilen ürünün sağladığı antioksidan içeriği ve depo kararlılığı nedeniyle fonksiyonel gıdaların geliştirilmesi için bu yöntemin olumlu etkiye sahip olduğu görülmüştür (Kaderides et al., 2020). Türk kekik ekstraktının püskürterek kurutma yöntemiyle, kekik bitkisinin ana aktif bileşikleri olan rosmarinik asit ve karvakrolün mikroenkapsülasyonunda, yüksek ürün verimi, kapsülleme etkinliği ve daha küçük parçacık boyut dağılımının optimize edilmesinin amaçlandığı bir çalışmada, ana kaplama malzemesi olarak jelatin, arabik gamı, Tween 20 ve β -siklodekstrin ile takviye edilerek kullanılmış ve hazırlanan mikrokapsüllerin fizikokimyasal özellikleri, mikroskobik morfolojileri ve *in vitro* salınımları karakterize edilmiştir (Baranauskaite et al., 2019). Farklı bir başka çalışmada, arabik gam ve ksantan gam ile nar suyu ile zenginleştirilmiş nar çekirdeği yağının püskürterek kurutma yöntemiyle mikroenkapsülasyonu gerçekleştirilmiş ve mikrokapsüllerin özellikleri ve oksidatif stabilitesinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Ön testlerle emülsiyon formülasyonunu optimize etmek için sabit miktarda arap zamkı ile değişen miktarlarda ksantan gam kullanılmıştır. Nar çekirdeği yağı (duvar malzemesi ağırlığının % 15, % 20, % 30'u) farklı oranları uygulanmış ve nar çekirdeği yağının yüksek kapsülleme verimliliği ve yükleme kapasitesi araştırılmıştır. Sonuçlar, mikroenkapsülasyon işlemi için duvar materyalleri kompozisyonunda nar suyu kullanımının mikroenkapsülasyon verimini arttırdığını, nar suyu ile kapsüllemenin, nar çekirdeği yağının oksidatif stabilitesini iyileştirmede başarılı

olduğunu ortaya koymuştur (Yekdane and Goli, 2019). Peony tohumu yağının, peynir altı suyu proteini izolatu, mısır şurubu ve soya lesitininin kaplama materyali olarak kullanıldığı bir çalışmada püskürtmeli kurutma yöntemi kullanılmıştır. Bu karışım ile elde edilen formülasyonun yüksek kapsülleme verimi, oksidatif kararlılık ve en az biyoaktif bileşik kaybı sergilediği bildirilmiştir. Mikrokapsüller incelendiğinde, pürüzsüz yüzeyle ve çatlak olmayan bir çekirdek kabuk yapısı olduğu görülmüştür. *In vitro* sindirim davranışı, gastrointestinal sindirimden sonra kapsüllenmiş yağın %80'inden fazlasının mikrokapsüllerden salındığını göstermiştir (Wang et al., 2018). Başka bir çalışmada, püskürtmeli kurutma yöntemi ile ceviz yağının mikrokapsülasyonu, SEM ve farklı duvar materyallerinde ve kurutma koşullarında parçacık boyutu ile ölçüm yapılarak karakterize edilmiştir. Yüksek sıcaklıkta kurutma ile elde edilen mikrokapsüllerin pürüzsüz yüzeylerinin daha düşük büzülme oranına sahip olduğu ve mikrokapsüllerin basınç artışı ile kümelenmesinin daha görünür düzeyde olduğu bildirilmiştir (Shamaei et al., 2017). Çörek otu oleoresini, arabik gam/maltodekstrin (1:1 w/w) kullanılarak, giriş ve çıkış sıcaklık değerleri 160°C ve 80°C ($\pm 1^\circ\text{C}$) olacak şekilde püskürtmeli kurutma yöntemiyle mikrokapsüllenmiş ve toz kapsüllerin fizikokimyasal özellikleri incelenmiştir (Edris et al., 2016). Nar çekirdeği ve nar kabuğunda bulunan fenolik maddelerin geri kazanımını sağlamak amacıyla, ultrases destekli ekstraksiyon işleminin uygulandığı ve ardından püskürterek kurutma işlemiyle mikroenkapsülasyonun yapıldığı bir çalışmada, farklı kaplama materyalleri olarak maltodekstrin/yağsız süt tozu, maltodekstrin/peyniraltı suyu protein izolatu, maltodekstrin/arap zamkı kombinasyonları kullanılmıştır. Nar çekirdeği yağı enkapsülasyonu için optimum kapsülleme materyalleri, çekirdek/kapsülleme materyali oranı ve giriş sıcaklıkları optimize edilmiştir (Goula and Lazarides, 2015). Püskürterek kurutma tekniğiyle giriş hava sıcaklığı 160°C ve fenolik madde/maltodekstrin oranı 1/1 veya 1/3 olacak şekilde enkapsüle edilmiş nar kabuğu ekstraktı ile zenginleştirilmiş dondurmaların olduğu bir çalışmada, dondurmaların kontrol örneklerine kıyasla önemli ölçüde geliştirilmiş fonksiyonel özelliklere sahip olduğu ve nar fenoliklerinin dahil edilmesinin dondurmanın *in vitro* biyoaktivitesini iyileştirdiği gözlemlenmiştir (Çam vd., 2014).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1 Gereç

3.1.1 Hammadde

Bu tez çalışmasında antosiyanin kaynağı olarak taze siyah havuç (*Daucus carota ssp. sativus var. atrorubens Alef*) kullanılmıştır. Siyah havuç Konya'nın Ereğli ilçesi Kuzukuyusu köyünden satın alınmıştır. Siyah havuçlar -20°C derecede deneysel çalışmalar tamamlanana kadar depolanmıştır.

3.1.2 Kullanılan kimyasal ve ekipmanlar

Bu çalışmada izlenen yöntemler ve gerçekleştirilen deneysel çalışmalarda kullanılan tüm kimyasal maddeler ve cihazlar aşağıda verilmekle birlikte ilgili bölümlerde de ayrıntılı bir şekilde açıklanmıştır.

Kullanılan kimyasallar: Askorbik asit ($C_6H_8O_6$), Potasyum Klorür (KCl), Gallik asit ($C_7H_6O_5$), Amonyum Sülfat ($(NH_4)_2SO_4$), Aseto nitril (C_2H_3N), Sigma Aldrich'den, Sodyum Asetat (CH_3COONa), Alüminyum Klorür ($AlCl_3$), Sodyum Karbonat (Na_2CO_3) Riedel de Haen'dan, glukoz, Sülfürik Asit (H_2SO_4), Kateşin ($C_{15}H_{14}O_6$) Fluka'dan, Fenol, Sodyum Nitrit ($NaNO_2$), Sodyum Hidroksit (NaOH), Folin Ciocalteu reaktifi, Formik asit (CH_2O_2) Merck'den, Etanol (C_2H_5OH) (HPLC Plus Gradient) Carlo Erba, delphinidin-3-glucoside, cyanidin-3-glucoside, petunidin-3-glucoside, peonidin-3-glucoside ve malvidin-3-glucoside standartları Extrasynthese'den (Lyon, Genay-Fransa), maltodextrin (Alfosol Maltodextrin Fransa) temin edilmiştir.

Kullanılan cihazlar: Rondo (Arzum Mio Lux AR 186), ısıtıcılı manyetik karıştırıcı (Ika RH Basic 2), pH metre (Hanna Instruments HI 2211 pH/ORP meter), spektrofotometre (Perkin Elmer, Lambda 35 Uv/vis spectrometer), vorteks (Cat Vortex VM3), çalkalamalı su banyosu (Mettler WNB 14), naylon membran filtre (Whatman Inc., Clinton, NJ, ABD), HPLC sistemi (6430 model Triple Quadrupole kütle spektroskopili (Agilent Technologies, Palo Alto CA-USA) yüksek performanslı sıvı kromatografisi (LCDAD-ESI-MS/MS)), evaporatör (Heidolph Laborota 4001 Rotary Evaporator System), püskürtmeli

kurutma (Buchi Mini Spray Dryer B-290), taramalı elektron mikroskobu (Thermo Scientific Apreo S), ZetasizerUltra (Malvern Panalytical Ltd.), renk ölçüm cihazı VITA Easyshade Advance.

3.2 Yöntem

3.2.1. Siyah havuç homojenatından antosiyaninlerin ekstraksiyonu

Verimli bir şekilde antosiyaninlerin ekstrakte edilebilmesi için homojenat hazırlanmasında enzimatik kararmaya neden olan polifenol oksidazların ve diğer endojen enzimlerin varlığı da düşünülerek aşağıda verilen üç farklı yöntem kullanılmıştır. Siyah havuçtan antosiyaninlerin maksimum verimle ekstraksiyonu için her üç yöntemde ortama su ilavesinin etkisi de araştırılmıştır.

3.2.1.1 Direkt ekstraksiyon

Siyah havuç önce musluk suyu ardından distile su ile yıkandıktan sonra tartıldı (100 g). Bıçakla küçük parçalara ayrıldıktan sonra rondodan (Arzum Mio Lux AR 186) geçirilerek homojenize edildi. Homojenat lifsi yapıları uzaklaştırmak için önce dört katlı tülbentten geçirilerek filtre edildi ve ardından 5000 rpm'de 10 dk santrifüjlendi. Santrifüj sonrası elde edilen pellet atıldı ve süpernatantta toplam monomerik antosiyanin miktarı tayin edildi.

3.2.1.2 Direkt ekstraksiyon sonrası ısı işlemi

Siyah havuç önce musluk suyu ardından distile su ile yıkandıktan sonra tartıldı (100 g). Bıçakla küçük parçalara ayrıldıktan sonra rondodan (Arzum Mio Lux AR 186) geçirilerek homojenize edildi. Homojenat 90-100 °C 'ye ayarlanmış ısıtıcı manyetik karıştırıcı üzerinde 5-10 dk ısıtıldı. Ardından lifsi yapıları uzaklaştırmak için dört katlı tülbentten geçirilerek filtre edildi ve sonra 5000 rpm'de 10 dk santrifüjlendi. Santrifüj sonrası elde edilen pellet atıldı ve süpernatantta toplam monomerik antosiyanin miktarı tayin edildi. (Bu yöntemle elde edilen ekstraktın toplam monomerik antosiyanin içeriği en yüksek değerde bulunduğu için daha sonra yapılan çalışmalarda bu yöntem ile hazırlanan ekstrakt kullanılmıştır).

3.2.1.3 Direkt ekstraksiyon sonrası askorbik asitle muamele

Siyah havuç önce musluk suyu ardından distile su ile yıkandıktan sonra tartıldı (100 g). Bıçakla parçalara ayrıldıktan sonra rondodan (Arzum Mio Lux AR 186) geçirilerek homojenize edildi. Homojenat % 0,1 (w/v) askorbik asit içeren sulu ortamda oda sıcaklığında 1 saat kadar manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. Daha sonra lifsi yapıları uzaklaştırmak için dört katlı tülbenntten geçirilerek filtre edildi ve sonra 5000 rpm'de 10 dk santrifüjlendi. Santrifüj sonrası elde edilen pellet atıldı ve süpernatantta toplam monomerik antosiyanin miktarı tayin edildi.

3.2.2 Toplam monomerik antosiyanin tayini (pH Diferansiyel Yöntem)

pH-Diferansiyel yönteminin temeli, antosiyaninlerde bulunan pigmentlerin, ortam pH'ına göre geçici olarak renk değişikliğine uğramasıyla absorbans spektrumunda meydana gelen farklılığın ölçülmesine dayanır (Giusti and Wrolstad, 2003). pH 4,5'ta, ana yapısal form renksiz hemiketal formudur. pH 1 'de ise, renkli (mor kırmızı), oksonyum formu oluşmaktadır. pH 4,5'da monomerik antosiyaninler absorbans vermezler. pH 4,5'ta sadece polimerik ve bozunmuş antosiyaninler absorpsiyon verir. Antosiyanin örneklerinin farklı pH değerleri arasında UV-vis spektrofotometre ile ölçülen absorbans farkı, örnekteki toplam monomerik antosiyanin miktarının doğruya çok yakın ve hızlı ölçülebilmesini sağlar (Hosseinian et al., 2008).

Toplam monomerik antosiyanin miktarının tayini, siyah havuç homojenatında, sulu ikili-faz ekstraksiyonu yapıldıktan sonra hem alt faz hemde üst fazda ve kurutulmuş toz örnekte gerçekleştirilmiştir. Aynı homojenata ait iki ayrı örnek (0,5 mL) üzerine sırasıyla, 2 ml 0,025 M KCl çözeltisi (pH 1.0) ve ardından diğerine 2 mL 0,4 M NaAc (sodyum asetat) tamponu (pH 4,5) ilave edilip 510 ve 700 nm'de ölçüm alınmıştır. 0.025 M KCl çözeltisi (100 mL) hazırlanmış, pH'ı pH metre ile pH 1'e ayarlanmıştır. 0,4 M sodyum asetat tamponu (100 mL) hazırlanmış, pH'ı pH metre ile pH 4,5'a ayarlanmıştır. Antosiyanin örneklerinin maksimum absorbansının dalga boyu, antosiyanin türüne ve kaynağa bağlı olarak farklılık gösterebilir. Siyah havuçta, maksimum

absorbans için 510 nm dalga boyunda ölçüm yapılmış ve toplam monomerik antosiyanin miktarı siyanidin-3-glukozit eşdeğeri şeklinde ifade edilmiştir. Hazırlanan örnek karışımları dengelenmenin sağlanması için karanlıkta 30 dakika bekletilmiştir. Daha sonra, spektrofotometre (Perkin Elmer, Lambda 35 uv/vis spectrometer) kullanılarak 510 nm ve 700 nm'de ölçümler gerçekleştirilmiştir. Ölçüm yapılırken kuartz küvetler kullanılmıştır. Örneklerin antosiyanin miktarları aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\text{Toplam Monomerik Antosiyanin Miktarı} \left(\frac{\text{mg}}{\text{L}} \right) = \frac{\text{Abs} \times \text{Mw} \times \text{DF} \times 1000}{\epsilon \times l}$$

$$\text{Abs} = (A_{510} - A_{700})_{\text{pH}1} - (A_{510} - A_{700})_{\text{pH}4,5}$$

A; absorbans farkı, DF; seyreltme faktörü, Mw,; moleküler ağırlık (449,2 g/mol Cy-3-gly), ϵ ; ekstinksiyon katsayısı ($\epsilon = 26.900$) ve l ; alınan yol uzunluğunu (1 cm) belirtmektedir.

3.2.3 Toplam karbohidrat tayini

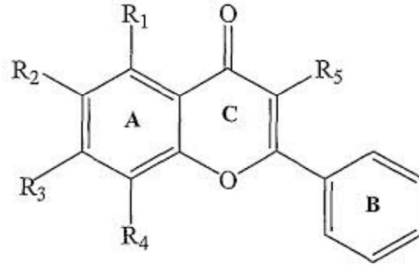
Basit şekerler, oligosakkaritler, polisakkaritler ve bunların metil eter ve serbest veya potansiyel olarak indirgeyici gruplara sahip türevleri, fenol ve konsantre sülfürik asit ile muamele edildiğinde spektrofotometrik olarak ölçülebilen turuncu-sarı bir renk verir. Reaksiyon hassastır ve renk kararlıdır. Fenol-sülfürik asit yöntemi, şekerlerin ve ilgili maddelerin oldukça hassas miktarlarını belirlemek için geliştirilmiş bir yöntemdir. Yöntem basit, hızlı, hassas ve tekrarlanabilir sonuçlar verir. Kullanılan reaktifler ucuz ve dayanıklıdır. Her bir şeker türü için sadece bir standart grafiği gerektirir. Üretilen renk kalıcıdır ve koşulların kontrolü için özel bir dikkat göstermeye gerek yoktur (Dubois et al., 1956).

Glukoz stok çözeltisi konsantrasyonu 1 mg/mL olacak şekilde hazırlanmıştır. Bu glukoz çözeltisinden, 0,01-0,1 mg/mL' lik standart çözeltiler hazırlanmış ve glukoz standart grafiği oluşturulmuştur. Fenol-sülfirik asit (Dubois) yöntemi ile toplam karbohidrat tayini için, 0,5 mL örnek üzerine 0,5 mL % 5'lik (w/v) fenol (C₆H₅OH) ve 2,5 mL % 96'lık (v/v) H₂SO₄ (sülfirik asit) eklenip vorteks (Cat Vortex VM3) ile karıştırılmıştır. 25-30°C arasında çalkalamalı su banyosunda (Memmert WNB 14) 20 dk inkübe edildikten sonra

spektrofotometre ile 490 nm'de ölçülmüştür. Glukoz eşdeğeri olarak verilen sonuçlar için $y=8,783x$ denklemi kullanılmış ve toplam karbohidrat miktarı hesaplanmıştır.

3.2.4 Toplam flavanoid tayini

Toplam flavonoid içeriği, Zhinsen vd., (1999)'nin uyguladığı Alüminyum klorür ($AlCl_3$) kolorimetrik yöntemi ile belirlenmiştir. Yöntemin temeli, alüminyum klorürün C-4 keto grupları ve flavon ve flavonollerin C-3 veya C-5 hidroksil grubu ile aside dayanıklı kompleksler oluşturmaya ve flavonoidlerin A veya B halkalarındaki ortodihidroksil gruplarıyla da aside dayanıklı kompleks bileşikler oluşturmaya dayanır. Flavonoidlerin temel yapısı Şekil 3.1'de verilmiştir (Bag et al., 2015).



Şekil 3.1 Flavonoidlerin temel yapısı (Bag et al., 2015)

Standart grafiğinin hazırlanmasında, farklı konsantrasyonlarda kateşin (100, 80, 60, 40 ve 20 $\mu g/mL$) çözeltisi kullanılmıştır. Alüminyum klorür kolorimetrik yöntemi için, 0,5 mL örnek üzerine 2 mL su, 0,15 mL % 5'lik $NaNO_2$ eklenip 5 dk. beklendikten sonra 0,15 mL %10'luk (w/v) $AlCl_3$ çözeltisi ve 1 mL 1M NaOH eklenmiş ve son hacim 5 mL'ye 1,2 mL distile su eklenerek tamamlanmıştır. Daha sonra spektrofotometre ile 510 nm'de ölçümler gerçekleştirilmiştir. Kateşin eşdeğeri olarak verilen sonuçlar için $y= 0,0026x$ denklemi kullanılmış ve toplam flavonoid miktarı hesaplanmıştır.

3.2.5 Toplam fenolik bileşik tayini

Toplam fenolik madde ölçümü için Folin Ciocalteu yöntemi kullanılmıştır. Gıdalarda toplam fenolik madde miktarının belirlenmesi, antioksidan aktiviteyi sağlayan hidroksil gruplarıyla ilgili bilgi vermesi

açısından da önemlidir. Temel mekanizma redoks reaksiyonlarına dayanır. Folin reaktifi ile fenolik bileşiklerin oksidasyonu sonucunda 745-765 nm absorbans aralığında tanımlanabilen renkli ürün oluşur (Prior et al., 2005). Fenolik bileşenler, folin reaktifi ile bazı şartlarda reaksiyona girerler. Ortama sodyum karbonat ilavesi ile pH yaklaşık 10' a ayarlanır. Fenolik protonların disosiyasyonu ile fenolat anyonu oluşur ve bu anyon Folin reaktifini indirgeme özelliği gösterir (Huang et al., 2005).

Fenolik bileşik tayininde kullanılan standart gallik asittir. Toplam fenol içeriği gallik asit standart grafiğinden yararlanılarak gallik asit eşdeğeri olarak verilmiştir. Standart grafiği için 10- 500 mg/L aralığındaki konsantrasyonlarda gallik asit çözeltileri kullanılmıştır. 1 mL örnek üzerine 9 mL distile su ilave edildikten sonra 2,5 mL 10 kat seyreltilerek hazırlanan Folin reaktifi eklenip, 5 dk. oda sıcaklığında inkübasyondan sonra, 10 mL %7,5'luk (w/v) Na₂CO₃ çözeltisi ilave edilmiş ve distile su ile hacim 20 mL'ye tamamlanmıştır. Karışım, oda sıcaklığında 90 dk. boyunca karanlıkta inkübasyona bırakılmış ve spektrofotometre ile 760 nm'de ölçümler yapılmıştır (Mythili et al., 2014). Gallik asit eşdeğeri (GAE) olarak verilen sonuçlar için $y=0,0009x$ denklemi kullanılmış ve toplam fenolik bileşik miktarı hesaplanmıştır.

3.3. Siyah Havuç Antosiyaninlerinin Sulu İkili-Faz Ekstraksiyon ile Saflaştırılması

Sulu ikili-faz ekstraksiyon sistemi (ATPE) ile siyah havuç antosiyaninlerinin saflaştırılması için tuz/alkol ekstraksiyon sistemi kullanılmıştır. Tuz olarak amonyum sülfat ((NH₄)₂SO₄) ve alkol olarak etanol (C₂H₅OH) seçilmiştir. Literatürden elde edilen amonyum sülfat/etanol binoidal eğrileri vasıtasıyla; sistemin toplam ağırlığı %100 (w/w) olacak şekilde, % 22 (w/v) tuz, % 26 alkol (v/v), % 10 antosiyanin ekstraktı (v/v) ve % 42 (v/v) su kullanılarak bir model ayırma sistemi kurulmuştur. Sulu ikili-faz ekstraksiyon sistemi, 15 mL'lik dereceli santrifüj tüpünde hazırlanmıştır. Konsantrasyonu % 22 (w/v) olacak şekilde tuz tartılıp, üzerine % 42 (v/v) oranında su ilave edilerek çözülmüştür. Tuz çözeltisi üzerine konsantrasyonu % 10 (v/v) olacak şekilde siyah havuç ekstraktı ilave edilip karıştırılmıştır. Ardından karışıma konsantrasyonu % 26 (v/v) olacak şekilde etanol ilave edilerek iyice vortekslenmiştir. Faz ayrımının tamamlanması için 30 dk. oda sıcaklığında ve

karanlıkta inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında 5000 rpm’de 10 dk. santrifüjlenmiştir. Alt faz ve üst faz pasteur pipetiyle ayrıldıktan sonra faz hacimleri ölçülmüş ardından toplam monomerik antosiyanin, toplam fenolik madde, flavanoid ve şeker miktarları belirlenmiştir.

3.3.1 Sulu ikili-faz ekstraksiyon sisteminin optimizasyonu

Sulu ikili-faz ekstraksiyon sistemi ile saflaştırılacak olan biyomolekülün bulunduğu ekstraktın içeriğindeki bileşenlerin türü ve bulunma miktarı kullanılan hammaddeye bağlı olarak farklılıklar göstermektedir. Bu farklılıklardan dolayı sulu ikili-faz ekstraksiyon sistemlerinde dağılım farkları. Ayrıca sulu ikili-faz ekstraksiyon sistemlerinde ayırma birçok faktör etki eder. Bu etkiler incelenerek saflaştırılması amaçlanan biyomolekül için en verimli ve etkili sulu ikili-faz ekstraksiyon sistemi geliştirilmelidir. Sulu ikili-faz ekstraksiyon sistemlerinde tuz, etanol, pH ve ham ekstrakt miktarının siyah havuç antosiyaninlerinin saflaştırılmasına etkisini incelemek maksadıyla optimizasyon çalışmaları yapılmıştır. Bu nedenle parametrelerin farklı oranlarda değişmesi ile içeriği değişen sulu ikili-faz ekstraksiyon sistemleri kurulmuştur.

3.3.1.1 Tuz konsantrasyonunun antosiyanin verimine etkisi

Antosiyaninlerin ATPE ile ayırımında tuz olarak amonyum sülfat $[(NH_4)_2SO_4]$ kullanılmıştır. $(NH_4)_2SO_4$ miktarının, antosiyaninlerin ayırımına etkisini belirleyebilmek için ham ekstrakt miktarı % 10 (w/v) ve etanol miktarı % 26 (v/v) olarak sabit tutulmuştur. Faz diyagramlarından yararlanılıp amonyum sülfat miktarı % 14 ile % 24 (w/w) arasında farklılaştırılarak pH ayarı yapılmadan (pH 6’da; kendi pH’sında) total hacim %100 (v/v) olacak şekilde distile su eklenerek sistemler kurulmuştur. Fazların ayırımından sonra alt faz ve üst fazda toplam monomerik antosiyanin miktarı ve şeker miktarı ölçülmüştür.

3.3.1.2 Etanol konsantrasyonunun antosiyanin verimine etkisi

Antosiyaninlerin ATPE ile ayırımına etanol miktarının etkisini araştırmak amacıyla, ham ekstrakt miktarı (% 10, w/v) ve bir önceki aşamada optimize edilerek belirlenen tuzun miktarı (% 22 w/w) sabit tutulmuştur. Etanol miktarı

% 24 ile % 32 (v/v) arasında kullanılmıştır. pH ayarı yapılmadan total hacim %100 (v/v) olacak şekilde distile su eklenip sistemler kurulmuştur. Fazların ayırımı sonrasında alt ve üst fazda toplam monomerik antosiyanin ve şeker miktarları belirlenmiştir.

3.3.1.3 pH'in antosiyanin verimine etkisi

Sulu ikili faz ekstraksiyon sisteminin (ATPE) pH değeri, biyomoleküllerin dağılımını etkilemektedir. Siyah havuç antosiyaninlerinin saflaştırılmasında, ATPE sistemine pH'in etkisi araştırılmıştır. Dolayısıyla, ham ekstrakt miktarı (% 10, v/v) ve belirlenen tuz miktarı (%22, w/v) ile etanol miktarı (% 26, v/v) sabit tutulmuş ve kurulan sistemlerin pH'sı 2-10 aralığında ayarlanıp ayırım gerçekleştirilmiştir. Alt ve üst fazlarda toplam monomerik antosiyanin miktarı tayin edilmiştir.

3.3.1.4 Ham ekstrakt miktarının antosiyanin verimine etkisi

Siyah havuç ham ekstrakt miktarının, sulu ikili-faz ekstraksiyon sistemine etkisi de araştırılmıştır. Bu amaçla, etanol miktarı (% 26, v/v), amonyum sülfat miktarı (% 22, w/v) ve sistemin pH'sı sabit tutularak ham ekstrakt miktarı %1 ile %20 arasında olacak şekilde kendi pH'sında farklı sistemler kurulmuştur. Alt ve üst fazda toplam monomerik antosiyanin miktarı belirlenmiştir.

3.3.1.5 Sulu ikili-faz sistemin tekrarlanabilirliği

Siyah havuç antosiyaninlerinin maksimum verimle elde edildiği optimum koşullar; % 22 (w/v) amonyum sülfat, % 26 (v/v) etanol, % 5 ham ekstrakt (v/v) ve pH 6 (kendi pH'sı) olarak belirlenmiştir. ATPE sisteminin optimizasyonu ile belirlenen koşullarda sistemin tekrarlanabilirliği çalışılmış ve sistem dört kez tekrarlanmıştır. Her bir sistemin alt ve üst fazlarında toplam monomerik antosiyanin miktarı belirlenmiştir.

3.3.2 Sulu ikili-faz ekstraksiyon sisteminde ölçek büyütme

Siyah havuç antosiyaninlerinin ekstraksiyonu ve saflaştırılmasına yönelik ATPE sisteminde ölçek büyütme çalışması yapılmıştır. Bu amaçla, 15 mL, 30 mL ve 45 mL'lik ATPE sistemleri kurulmuş ve antosiyaninlerin ayrımı gerçekleştirilmiştir. Ayrım sonrasında alt ve üst fazlarda toplam monomerik antosiyanin miktarı ölçülmüştür.

3.4 Siyah Havuç Antosiyaninlerinin HPLC-MS ile Ayrılması ve Renk Özellikleri

3.4.1 Siyah havuç antosiyaninlerinin HPLC-MS ile ayrımı

Antosiyaninlerin tanımlanmasında, antosiyanin örnekleri enjeksiyondan önce 0,45 µm gözenek boyutlu naylon membran filtreden (Whatman Inc., Clinton, NJ, ABD) geçirilmiştir. Analiz için Windows NT tabanlı ChemStation yazılımı ile donatılmış bir 6430 model Triple Quadrupole kütle spektroskopili (Agilent Technologies, Palo Alto CA-USA) yüksek performanslı sıvı kromatografisi (LCDAD-ESI-MS/MS) kullanılmıştır. HPLC ekipmanı, otomatik örnekleyici (G1367 E, 1260 HIP ALS), ikili pompa (G1312 B, 1260 Bin pompa), gaz giderici (G1322 A, 1260 Gaz Giderici) ve diyot dizi dedektöründen (G1351D 1260 DAD VL) oluşmaktadır. Analizlerde, ters fazlı C18 kolon (4,6 mm*250 mm, 5 µm iç çapında Phenomenex Luna) (Torrance, CA, ABD) kullanılmıştır (Tanrıseven vd., 2020). Hareketli faz iki çözüğenden oluşmuştur. Çözücü A, su/formik asit (99:1; v/v) ve çözücü B, asetonitril/çözücü A /formik asit (60:39:1; v/v) kullanılmıştır. Antosiyaninler verilen bu koşullar altında elüe edilmiştir: akış hızı 0,6 mL / dk ve sıcaklık 25 °C'ye ayarlanmış, 1 dakikada %0 ila %5 B, 29 dakikada %5 ila %40 B, 10 dakikada %40 ila %100 B arasında doğrusal gradyanlarla elüsyonun ardından kolon yıkanmış ve yeniden koşullandırılmıştır. Dalga boyu: 280, 320, 360 ve 520 nm olarak çalışılmıştır. Tüm pikler ultra violet görünür (200 nm'den 600 nm) bölgede kaydedilmiştir. LC-MS/MS analizleri, antosiyaninler için pozitif iyonizasyon modu kullanılmıştır. LC-MS'de kapiler sıcaklık 400°C, kapiler voltaj -3V, nebulizatör gaz akışı 1.75 L/dk., çözünme gaz akışı 1L/dk. ve sprey voltaj 5 kV olarak

belirlenmiştir (Kelebek et al., 2011). Antosiyaninler, orijinal standartların kullanıldığı standart grafikleri, alıkonma süreleri ve ultra violet görünür spektrumları, literatür bilgisi ile karşılaştırılarak tanımlanmıştır. Standartlar, Extrasynthese'den (Lyon, Genay-Fransa) sağlanmış, delphinidin-3-glucoside, cyanidin-3-glucoside, petunidin-3-glucoside, peonidin-3-glucoside ve malvidin-3-glucoside, ilgili pik ve türevleri olarak ticari standartlar kullanılmıştır.

Kullanılan ticari standartların konsantrasyonları, normalde siyah havuçta bulunan konsantrasyonlarda (yaklaşık 1-100 mg/L) kullanılmış ve tüm durumlarda regresyon katsayıları 0.995'in üzerinde (R^2 , R kare) alınarak bulunmuştur. Referans bileşiklerin yokluğu göz önüne alındığında, moleküler ağırlık düzeltme faktörü dikkate alınmış, yapısal olarak ilişkili bileşiklerin standartları kullanılmıştır. Antosiyaninlerin miktar tayini 520 nm'deki pik alanlarına dayandırılmıştır (Kelebek et al., 2006, 2011, 2013).

3.4.2 Siyah havuç antosiyaninlerinin renk özellikleri

Antosiyaninlerin renk özelliklerini belirlemek amacıyla, Hunter Lab Scan (Hunter Associates Laboratory, Inc., Reston, VA, USA) cihazı ve Minolta Spectrophotometer CM-3600d kullanılarak L^* , a^* , b^* , chroma (c^*) ve hue açısı değerleri kaydedilmiştir (Kelebek vd., 2018; Uzuner vd., 2011; Keskin vd., 2021). Parlaklık değeri L , kırmızılık indeksi a^* (yeşilden kırmızıya), sarılık indeksi b^* (maviden sarıya), renk yoğunluğunun göstergesi c^* , renk tonunu veren Hue açısı h değerleri belirlenmiştir. Renk yoğunluğunun göstergesi olan c^* değeri, ($C = (a^2 + b^2)^{0.5}$) ve Hue açısı, $H^\circ = \tan^{-1}(b^*/a^*)$ kullanılarak bulunmuştur. L^* değeri, beyaz, parlak, mat indeksine göre gıda renginin ölçülmesiyle bulunan bir değerdir. 0 ile 100 aralığında değişir. Sıfır (0) siyaha, yüz (100) beyaza karşılık gelir. Ayrıca L değeri, tazelik, parlaklık ve işlem öncesi gıdanın ilk rengine olan yakınlığının da göstergesidir. a^* değeri, gıdanın renginin kırmızı ile yeşil renk skalası içinde nerede bulunduğunu gösteren ve L^* değerinden sonraki en önemli göstergedir. Renk tonu (Hue, H), renklerin açıklık karakteristiğini gösterir. Bir cisim, radiant enerjiyi belli bir dalga boyunda, farklı dalga boylarına oranla daha çok absorblarsa; bu durum insanlarda renk olarak algılanır. Bu durum fiziksel olarak baskın dalga uzunluğu olarak adlandırılırken, duyuşal olarak renk tonu (Hue) olarak adlandırılır. Kroma (C), ışığın belirli bir

dalga boyunda yansıyan miktardır ve saflık, aralık, yoğunluk, koyuluk ya da genellikle “kroma (doygunluk)” olarak bilinmektedir. (Okurkan, 2018).

3.5 Siyah Havuç Antosiyaninlerinin Mikroenkapsülasyonu

3.5.1 Besleme karışımlarının hazırlanması

Püskürtmeli Kurutma işlemi için toplamda 500 mL ve 1000 mL olacak şekilde iki adet sulu ikili-faz ekstraksiyon (ATPE) sistemi kurularak ham ekstraktan antosiyanin örnekleri hazırlanmıştır. ATPE sonrası üst fazlar toplanmış ve üst fazın alkol (etanol) içeriği Ege Üniversitesi Kimya Bölümü Organik Kimya laboratuvarında evaporatör (Heidolph Laborota 4001 Rotary Evaporator System) ile uzaklaştırılmıştır. Kaplama maddesi olarak maltodextrin (Alfosol Maltodextrin, Fransa) kullanılmıştır. Mikroenkapsülasyon için toplamda 300 mL besleme karışımı hazırlanmıştır.

3.5.2 Püskürtmeli kurutma işlemi

Besleme karışımının kurutma işlemi, Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü, TUBITAK MAM Yaşam Bilimleri BY Gıda İnovasyon Teknolojileri (TÜGİP) laboratuvarında, laboratuvar ölçekli Mini Spray Dryer B-290 kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Püskürtmeli kurutucunun çalışma koşulları; hava giriş sıcaklığı 150°C, hava çıkış sıcaklığı 127±5 °C, besleme pompası kapasitesi %10 ve çalışma süresi 3 saat.

3.6 Mikroenkapsüle edilmiş Toz Örneğin Karakterizasyonu

3.6.1 Taramalı elektron mikroskobu (SEM)

Toz mikrokapsüllerin taramalı elektron mikroskobu (SEM) görüntüleri, Ege Üniversitesi Merkezi Araştırma Test ve Analiz Laboratuvarı Uygulama ve Araştırma Merkezi (MATAL) Görüntüleme ve İç Yapı Analiz Laboratuvarında, Thermo Scientific Apreo S elektron mikroskobu kullanılarak elde edilmiştir. Cihazın donanımı ve özellikleri: dedektörler; ETD (SE), T1 (In-Column BSE)-T2 (In-Column SE), geri çağrılabilen BSE, EBIC, STEM, LVD, EDS, numune odası iç çapı; 340 mm, vakum; yüksek vakum – düşük vakum, elektron

tabancası; Schottky FEG tabancası olarak belirtilmiştir. Numuneler altın paladyum ile kaplanmış ve 7,5 kV hızlandırıcı voltajda çalıştırılmıştır. Görüntüler 200 ila 2500 kat büyütmede gözlenmiştir.

3.6.2 Partikül boyutu dağılımı (Zetasizer)

Partikül boyutu dağılımı analizi için, mikroenkapsüle edilmiş 0.5 g toz örnek, 100 mL damıtılmış su (filtre edilmiş) içinde çözüldü ve 30 dakika boyunca manyetik karıştırıcı kullanılarak oda sıcaklığında karıştırıldı. Mikroenkapsüllerin ortalama parçacık büyüklüğü, ZsXplorer yazılımı ile donatılmış parçacık boyutu analiz cihazı ZetasizerUltra (Malvern Panalytical Ltd.) kullanılarak Ege Üniversitesi İlaç Geliştirme ve Farmakokinetik Araştırma-Uygulama Merkezinde (ARGEFAR) ölçülmüştür.

3.7 Mikroenkapsüle Edilmiş Toz Örneğin Kararlılığı

3.7.1 Mikroenkapsülasyon verimi

Mikroenkapsülasyon sonrası toz örnek ağırlığının, besleme karışımının kuru madde miktarına oranı mikroenkapsülasyon verimi olarak belirtilir (Fazaeli et al., 2012). Mikroenkapsülasyon verimi, aşağıda verilen eşitlik ile bulunmuştur.

Mikroenkapsülasyon Verimi (%)

$$= \frac{\text{Mikroenkapsüle Toz Örnek Ağırlığı (g)}}{\text{Başlangıç Toplam Kuru Madde (g)}} \times 100$$

3.7.2 Depo kararlılığı

Püskürtmeli kurutma sonrası elde edilen toz örneğin, depolama süresinin antosiyanin içeriği üzerine etkisini belirlemek amacıyla oda sıcaklığında saklanan toz örnekte 0.gün, 7.gün, 15.gün, 30.gün ve 60.gün olmak üzere belirli aralıklarla toplam monomerik antosiyanin miktarı tayin edilmiştir. 1.dereceden reaksiyon hız sabiti (k) ile antosiyaninlerin yarılanma ömrü ($t_{1/2}$) belirlenmiştir.

3.7.3 Isı kararlılığı

Püskürtmeli kurutma sonrası elde edilen toz örneğın zaman bağılı ısı kararlılığını belirlemek amacıyla 30, 60, 90 ve 180 dk boyunca 40, 60, 70 ve 80°C sıcaklığa maruz bırakılmış ve ardından geri kalan toplam monomerik antosiyanin miktarı tayin edilmiştir.

3.7.4 pH kararlılığı

Püskürtmeli kurutma sonrası elde edilen toz antosiyanine ortam pH'sının etkisinin belirlenmesi için, örneğın pH'sı 100 mM sitrat-fosfat tamponu ile pH (1, 2, 3, 4, 5, 6) olacak şekilde ayarlanmıştır. Örnekler oda sıcaklığında ve karanlık ortamda 1, 2, 4 ve 6 saat bekletilmiştir. Bekleme süresinin sonunda standart koşullarda toplam monomerik antosiyanin miktarları tayin edilmiştir.

3.8 Dondurmanın Renklendirilmesinde Antosiyanin Kullanımı

Püskürtmeli kurutma sonrası elde edilen toz örneğın, dondurmayı renklendirmesi amacıyla yerel bir pastaneden alınan dondurmanın 25 gramına % 0,5'i, % 1'i ve % 2'sine karşılık gelecek şekilde sırasıyla mikroenkapsüle edilmiş toz örnek tartılarak eklenmiştir. Toz örnek homojen olarak çözdürüldükten sonra renk analizleri yapılmış ve örnekler fotoğraflanmıştır.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Siyah Havuç Homojenatından Antosiyaninlerin Ekstraksiyonu

Siyah havuç antosiyaninlerinin saflaştırılması için ilk basamakta siyah havuçtan bir ön ekstrakt hazırlandı. Bu amaçla, enzimatik kararmaya neden olan polifenol oksidazların ve diğer endojen enzimlerin varlığı da düşünülerek üç farklı yöntem kullanıldı. Direkt Ekstraksiyon (1), Direkt Ekstraksiyon Sonrası Isıl İşlem (2) ve Direkt Ekstraksiyon Sonrası Askorbik Asitle Muamele (3). Bu yöntemler ile hazırlanan ekstraktlarda, toplam monomerik antosiyanin miktarları belirlendi. Her üç ekstraktın toplam monomerik antosiyanin miktarları aşağıda Tablo 4.1’de verilmiştir.

Tablo 4.1 Ekstraktlardaki toplam monomerik antosiyanin miktarları

Ekstraksiyon Yöntemi	1*	2*	3*
Toplam Monomerik Antosiyanin Miktarı (mg/mL)	0,28	5,35	4,32
Toplam Monomerik Antosiyanin Miktarı (mg/L)	7,2	102,94	38,40

1. Direkt Ekstraksiyon
2. Direkt Ekstraksiyon Sonrası Isıl İşlem
3. Direkt Ekstraksiyon Sonrası Askorbik Asit ile Muamele

1., 2., ve 3. yöntemle siyah havuçtan hazırlanarak elde edilen ekstraktlarda antosiyanin içerikleri sırasıyla 0,28 mg/ mL, 5,35 mg/ mL ve 4,32 mg/ mL olarak belirlenmiştir. Her ekstraksiyon yöntemi için başlangıçta 100 g siyah havuçtan yola çıkılarak ekstraksiyonlar gerçekleştirilmiştir. 2. yöntem (Direkt Ekstraksiyon Sonrası Isıl İşlem) ile hazırlanan siyah havuç ekstraktının en yüksek antosiyanin miktarına sahip olduğu belirlenmiş ve bundan sonraki çalışmalarda bu ekstrakt ile devam edilmesine karar verilmiştir.

Siyah havuç antosiyaninlerinin ön ekstraksiyonunda, ‘‘Direkt Ekstraksiyon Sonrası Isıl İşlem ‘‘uygulanmasına karar verilmiştir. Ancak enzimatik kararmaya neden olan enzimlerin denaturasyonu için işlem esnasında belli bir sıcaklıkta

çalışılması gerektiğinden, denatürasyon çalışma sıcaklığının belirlenmesi için optimizasyon yapılmıştır. Bunun için 70°C, 80°C ve 90°C sıcaklık değerleri seçilmiş, bu sıcaklıklarda ekstraksiyon yapılmış ve sonrasında toplam monomerik antosiyanin miktarı belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar Tablo 4.2’de verilmiştir. Tablodan görüldüğü üzere 80°C’de gerçekleştirilen ekstraksiyon sonrası elde edilen toplam monomerik antosiyanin içeriği 6.94 mg/mL olarak belirlenmiştir.

Tablo 4.2 Farklı ekstraksiyon sıcaklığında hazırlanan ekstraktın toplam monomerik antosiyanin miktarları

Çalışma Sıcaklığı	70°C	80°C	90°C
Toplam Monomerik Antosiyanin Miktarı (mg/mL)	5,049	6,94	7,35

Ekstraksiyon sıcaklığı kadar diğer bir önemli parametre ekstraksiyon süresidir. Bu nedenle, 70°C, 80°C ve 90°C’ler de 5,10,15 ve 20 dk süreyle ekstraksiyon yapılarak ekstrakt hazırlanmış ve ekstraktlarda toplam monomerik antosiyanin miktarı belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar Tablo 4.3’te verilmiştir.

Tablo 4.3 Farklı sıcaklık sürelerinde hazırlanan ekstraktların toplam monomerik antosiyanin miktarları

Süre/ Sıcaklık→	70°C	80°C	90°C
5 dk	1,109	1,283	2,170
10 dk	1,750	1,806	1,745
15 dk	1,870	1,740	1,197
20 dk	1.840	1,800	1,307

Tablo 4.3’te verilen sonuçlar değerlendirildiğinde, ekstraksiyon sıcaklığı 80°C ve ekstraksiyon süresi 10 dk olarak belirlenmiş ve bundan sonraki aşamalarda bu koşullar kullanılarak ekstrakt hazırlanmıştır.

Siyah havuç kök sebze grubuna aittir ve çok su içermez. Siyah havuçtan antosiyaninlerin maksimum verimle ekstraksiyonu için ekstraksiyon basamağında ortama su ilave edilmesinin etkisi araştırılmıştır. Bu nedenle iki farklı koşulda ekstraksiyon yapılmıştır.

- 1) 20 g siyah havuç + 20 mL distile su (1:1)
- 2) 20 g siyah havuç +10 mL distile su (1:0.5)

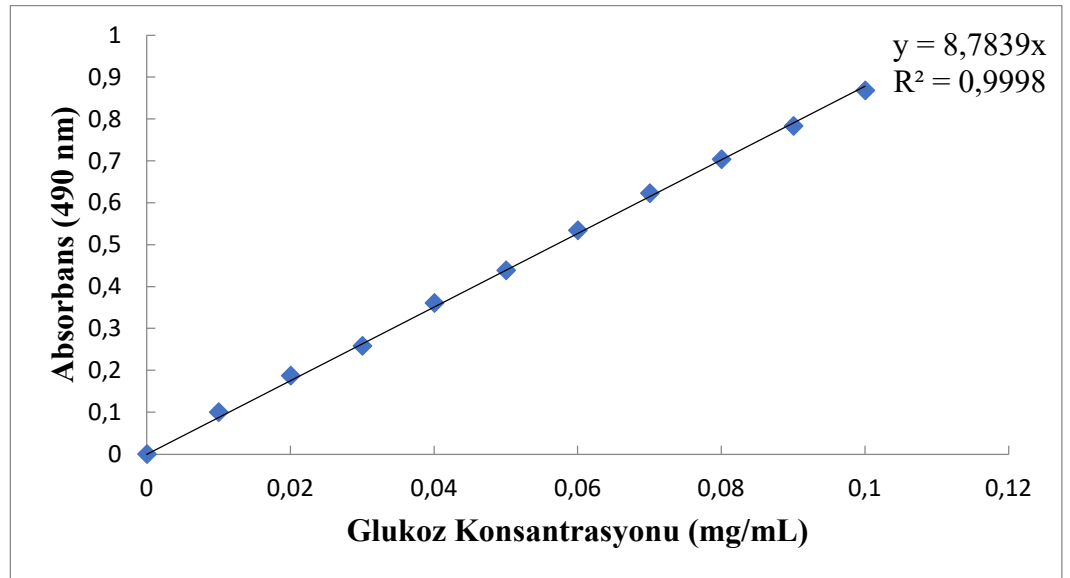
Her iki ekstraktta toplam monomerik antosiyanin miktarı belirlenmiştir (Tablo 4.4).

Tablo 4.4 Antosiyanin ekstraksiyonuna su etkisi

İlave edilen distile su miktarı (v/v)	1:1	1:0,5
Toplam Monomerik Antosiyanin Miktarı (mg/mL)	5,1	4,09

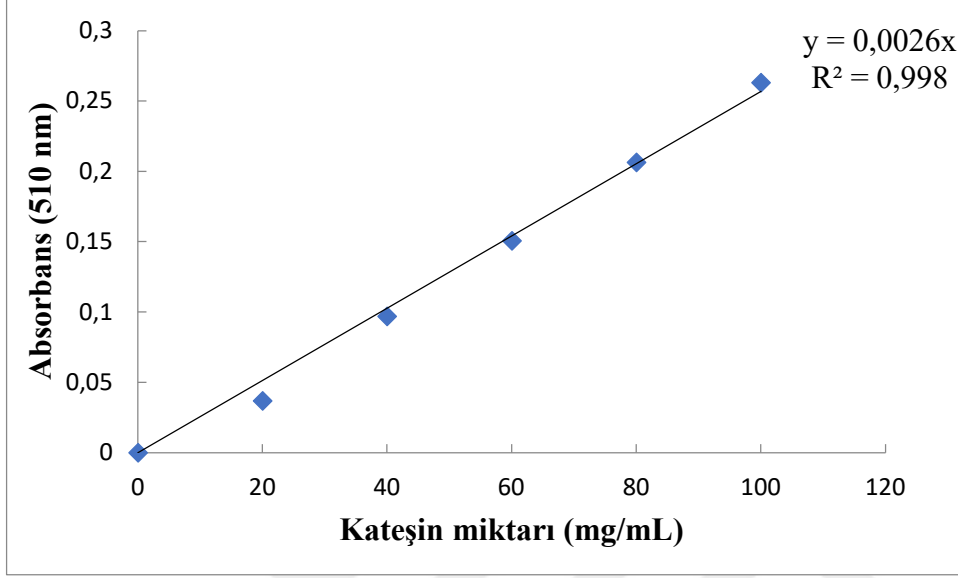
Elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde, ekstraksiyon esnasında ortama ilave edilecek distile su miktarının 1:1 (v/v) oranında olmasına karar verilmiştir.

Ham ekstraktın hazırlanmasına yönelik yapılan optimizasyon sonrası elde edilen ekstraktta, toplam karbohidrat, flavonoid, antosiyanin ve fenolik bileşik miktarları belirlenmiştir. Toplam karbohidrat miktarı, Fenol-sülfirik asit (Dubois) yöntemi ile tayin edilmiş ve sonuçlar glukoz eşdeğeri olarak verilmiştir. Standart glukoz stok çözeltisinin konsantrasyonu 1 mg/mL olacak şekilde glukoz ve distile su ile hazırlanmıştır. Bu stok glukoz çözeltisinden, 0,01-0,1 mg/mL' lik standart çözeltiler hazırlanmış ve glukoz standart grafiği oluşturulmuştur. Glukoz standart grafiği Şekil 4.1'de verilmiştir.



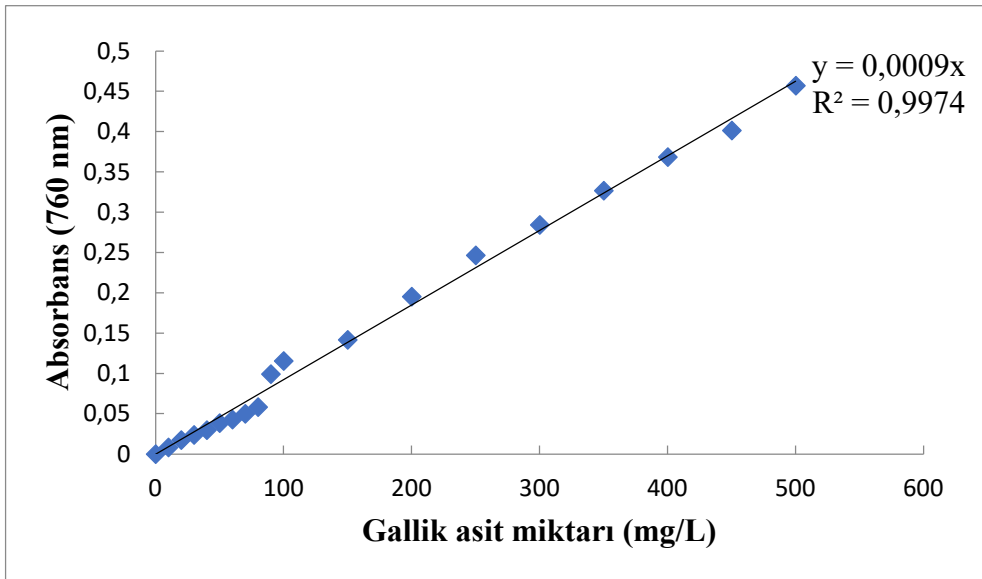
Şekil 4.1 Glukoz standart grafiği (mg/mL)

Toplam flavonoid miktarı, alüminyum klorür kolorimetrik yöntemi ile belirlenmiş ve sonuçlar kateşin eşdeğeri olarak verilmiştir. Standart grafiğinin hazırlanması için, çeşitli konsantrasyonlarda kateşin (100, 80, 60, 40 ve 20 µg/mL) çözeltisi kullanılmıştır. Kateşin standart grafiği Şekil 4.2’de verilmiştir.



Şekil 4.2 Kateşin standart grafiği (mg/mL)

Toplam fenolik bileşik miktarı, Folin Ciocalteu yöntemi ile belirlenmiş ve sonuçlar gallik asit eşdeğeri olarak verilmiştir. Standart grafiği için 10- 500 mg/L aralığında konsantrasyonları bilinen gallik asit çözeltileri kullanılmıştır. Gallik asit standart grafiği Şekil 4.3’te verilmiştir.



Şekil 4.3 Gallik Asit Standart Grafiği (mg/L)

Optimizasyon sonrası hazırlanan ham ekstraktın toplam antosiyanin, flavonid, karbohidrat ve fenolik madde içerikleri Tablo 4.5'te verilmiştir.

Tablo 4.5 Ham ekstraktın toplam karbohidrat, fenolik bileşik, flavanoid ve monomerik antosiyanin miktarları

Toplam Monomerik Antosiyanin (mg/L)	102,94
Toplam Karbohidrat (g/100 g)	2,81
Flavanoid (g/100 g)	2.51
Toplam Fenolik Bileşik (mg/100 g)	160,8

İspanya'nın Cuevas Bajas bölgesi siyah havuçlarının (*Daucus carota L. ssp. sativus var. atrorubens Alef.*) antosiyanin profili ve antioksidan kapasitesinin incelendiği çalışmada, antosiyanin içerikleri 93,8±3,0 mg ve 126,4±6,0 mg olarak bulunmuştur (Algarra et al., 2014). Siyah havuç antosiyaninlerinin püskürtmeli kurutucu ile mikroenkapsülasyonunun gerçekleştirildiği bir başka çalışmada, siyah havuçların antosiyanin içeriği 125,17±17,22 mg olarak bulunmuştur (Uyan, 2004). Mor havuçtan karotenlerini ayırdıktan sonra antosiyaninlerinin ölçüldüğü bir çalışmada, antosiyanin içeriği 98,4±19,9 mg olarak bulunmuştur (Lazcano et al., 2001). Siyah havuçtaki antosiyaninlerin ekstraksiyonunun yapıldığı ve özelliklerinin incelendiği bir diğer çalışmada antosiyanin içeriği 93,3±0,70 mg olarak bulunmuştur (Uysal, 2000). Literatürde yer alan bu çalışmalar ile benzer sonuçlar elde edildiği görülmüştür.

4.2 Siyah Havuç Antosiyaninlerinin ATPE ile Saflaştırılması

Siyah havuç ekstraktından antosiyaninlerin saflaştırılmasında sulu ikili-faz ekstraksiyon (ATPE) sistemlerinden tuz/alkol sistemi kullanılmıştır. Tuz olarak amonyum sülfat ve alkol olarak etanol kullanılmasına karar verilerek, literatürden elde edilen amonyum sülfat/etanol binoidal eğrilerinden yararlanılarak; % 22 (w/v) amonyum sülfat, % 26 etanol (v/v), % 10 ham ekstrakt (v/v) ve % 42 (v/v) su kullanılarak model bir ayırma sistemi kurulmuştur. Hazırlanan sistemde alt ve üst fazın net bir şekilde oluştuğu gözlemlenmiş, alt ve üst fazda toplam monomerik antosiyanin miktarları

ölçülmüştür. ATPE sistemleri çift tekrarlı çalışılmıştır. Alt ve üst fazın net bir şekilde ayrıldığı Şekil 4.4'te görülmektedir.



Şekil 4.4 ATPE ile antosiyaninlerin ayrılmasında alt ve üst fazlar

Model ayırma sisteminde ATPE'yi oluşturan bileşenler ve konsantrasyonları literatür bilgisine dayanarak seçilmiştir. Elde edilen toplam monomerik antosiyanin miktarları başlangıç için seçilen modelin % 49,1 verimle antosiyaninleri üst fazda topladığını göstermektedir (Şekil 4.5). Etkin ve en yüksek verimde ayırmanın sağlanabilmesi için ATPE sisteminin optimizasyonuna geçilmiştir.



Şekil 4.5 ATPE ile antosiyaninlerin ayrılmasında alt faz ve üst faz verimleri

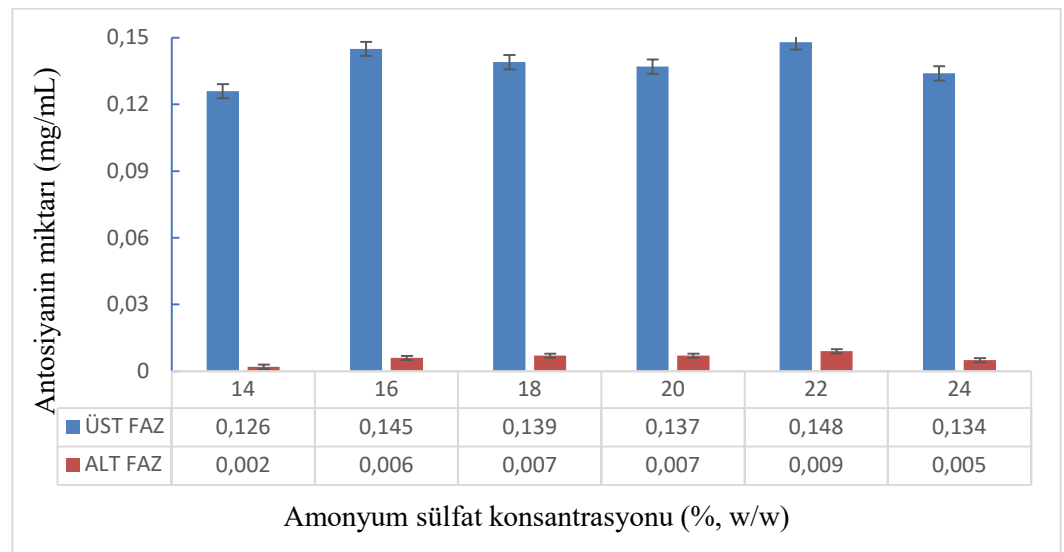
Maviyemiş (*Vaccinium uliginosum Linn*) atıklarının kullanıldığı ve sulu ikili-faz sistemi (amonyum sülfat-etil alkol) ile antosiyaninlerin ekstrakte edildiği bir çalışmada, asitlendirilmiş etil ekstraksiyonu ve konvansiyonel

çözücü ekstraksiyon gibi yöntemlere göre, sulu ikili faz sistemi ile yüksek verimlerde ve yüksek saflık derecelerinde antosiyanin ekstrakte edildiği, ATPE ile gerçekleştirilen ekstraksiyonun etil alkol tüketimi, süre ve enerji bakımından daha üstün olduğu ve ayrıca ekstrakta safsızlık unsuru olarak bulunan proteinler ve şekerlerin sırasıyla % 58 ve % 66 oranında uzaklaştırıldığı bildirilmiştir (Hua et al, 2013).

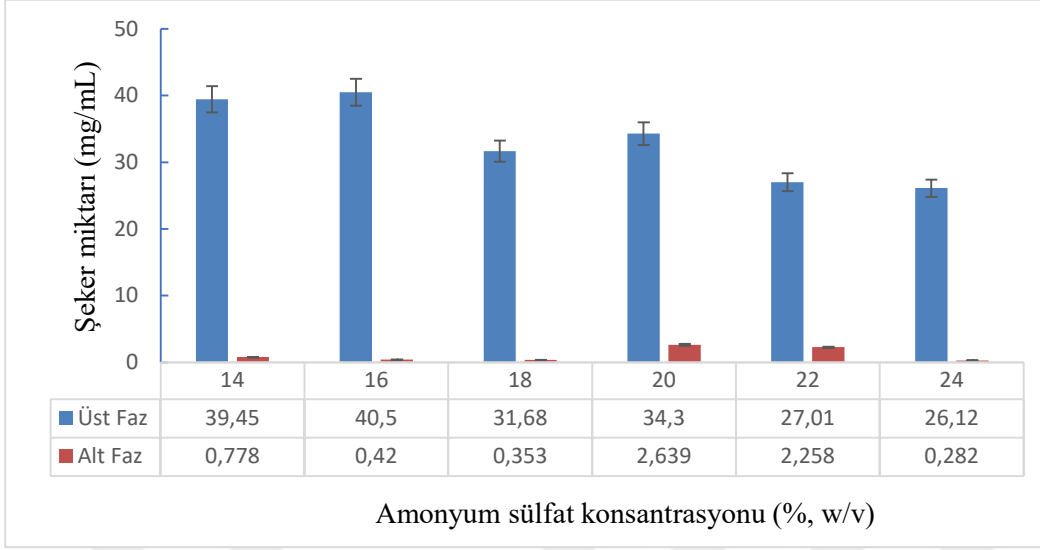
4.3 Sulu İki Fazlı Ekstraksiyon Sisteminin Optimizasyonu

4.3.1 Amonyum sülfat ((NH₄)₂SO₄) konsantrasyonunun antosiyanin verimine etkisi

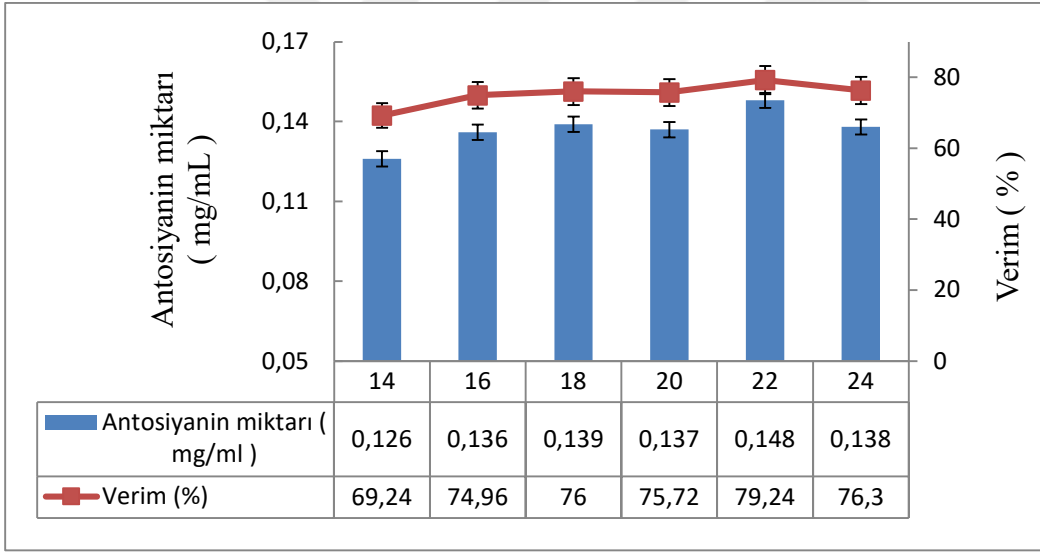
Tuz olarak kullanılan amonyum sülfat [(NH₄)₂SO₄] miktarının, antosiyaninlerin ayırımına etkisini belirleyebilmek için ham ekstrakt miktarı (% 10, w/v) ve etanol miktarı (% 26, v/v) olarak sabit tutulmuştur. Faz diyagramları kullanılarak amonyum sülfat miktarı %14 ile %24 (w/w) arasında farklılaştırılarak ATPE sistemleri hazırlanmıştır. Alt faz ve üst fazda toplam monomerik antosiyanin ve toplam şeker miktarları ölçülmüştür. Her bir sistemin antosiyanin verimi belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar sırasıyla Şekil 4.6, 4.7 ve 4.8’de verilmiştir.



Şekil 4.6 Amonyum sülfat konsantrasyonunun antosiyanin miktarına etkisi



Şekil 4.7 Amonyum sülfat konsantrasyonunun şeker miktarına etkisi



Şekil 4.8 Amonyum sülfat konsantrasyonunun antosiyenin miktarına ve ekstraksiyon verimine etkisi

DeneySEL sonuçlardan elde edilen verilere göre siyah havuç antosiyeninlerinin etkin bir şekilde üst fazda (etanol fazı) toplandığı görülmüştür. Her iki fazda toplam monomerik antosiyenin miktarları ölçülmüş ve % verim hesabı yapılmıştır. Tuz konsantrasyonu % 14 (w/v)'ten % 22 (w/v)'ye doğru artarken buna paralel olarak verim artmış olsa da tuz

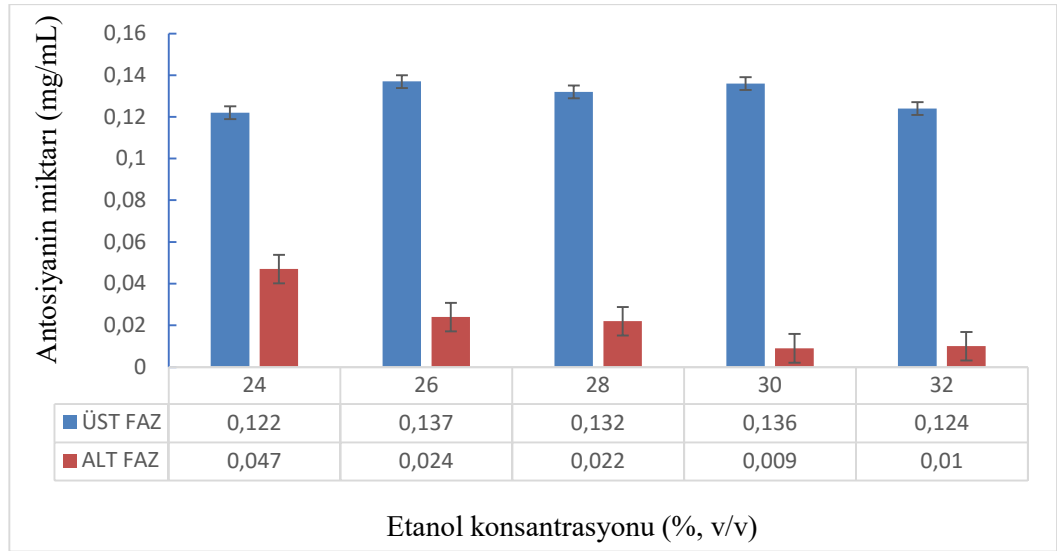
konsantrasyonu % 22 (w/v)'nin üzerine çıkıldığında verimde azalma görülmüştür. Ayrımda en etkili tuz miktarı, % 22 (w/v) tuz konsantrasyonu ile üst fazda 0,148 mg/mL antosiyanin miktarı elde edilirken verim % 79,24 olarak belirlenmiştir.

Mor tatlı patateslerden sulu ikili-faz (etil alkol-amonyum sülfat) ekstraksiyonu ile antosiyaninlerin ekstraksiyonu için optimizasyon yapılan bir çalışmada, % 25 (w/w) etil alkol, % 22 (w/w) amonyum sülfat ve pH 3.3 değerleri optimum değerler şeklinde belirlenmiştir (Liu et al, 2013). Litospermik asidin ATPE sistemi ile ekstraksiyonunda, % 97,28 verimin sağlandığı optimum sistemin tuz konsantrasyonunun % 22 (w/w) olduğu bildirilmiştir (Guo et al., 2012). Flavonoidlerin *Artemisia argyi* yapraklarından ATPE ile saflaştırılmasının sağlandığı diğer bir çalışmada optimum sistemin tuz konsantrasyonunun % 18,87 (w/w) olduğu bildirilmiştir (Xie et al, 2012). *Taraxacum mongolicum*'dan flavonoidlerin mikrodalga destekli sulu ikili-faz ekstraksiyonu ile saflaştırılmasının yapıldığı diğer bir çalışmada amonyum sülfat konsantrasyonunun optimum değeri % 20 (w/w) olarak bulunmuştur (Yang and Lü, 2016). ATPE ile saflaştırılması istenen biyomolekülün çözünürlüğü üzerine tuz miktarının etkisi önemli olmakla birlikte tuzun yüksek konsantrasyonunun neden olduğu hacim dışlama etkisinden dolayı (salting-out etkisi) daha fazla biyomolekül üst faza (alkol açısından zengin faz) doğru daha kolay bir şekilde ayrılır. Bu nedenle, amonyum sülfat (NH₄)₂SO₄ miktarının artmasıyla antosiyanin verimi önce artar ancak sonrasında azalmaktadır (Wang et al., 2009). Bu durumun sebebi, amonyum sülfat miktarı belli bir değerin üzerine çıktığında, alt faz tutması gerekenden çok daha fazla su tutarak üst fazın polarlığını artırırken hacminin de azalmasına neden olur. Antosiyaninleri üst fazda tutan çözücü karakteri değişirken aynı zamanda üst fazın katı maddelerle etkileşimi azalır. Siyah kuşburnu (*Rosa pimpinellifolia l.*) meyvesinden sulu ikili-faz sistemiyle antosiyaninlerin ekstrakte edildiği ve sonrasında mikroenkapsülasyonunun yapıldığı bir çalışmada amonyum sülfat konsantrasyonunun % 19 (w/w) olduğu bildirilmiştir (Odabaş, 2019).

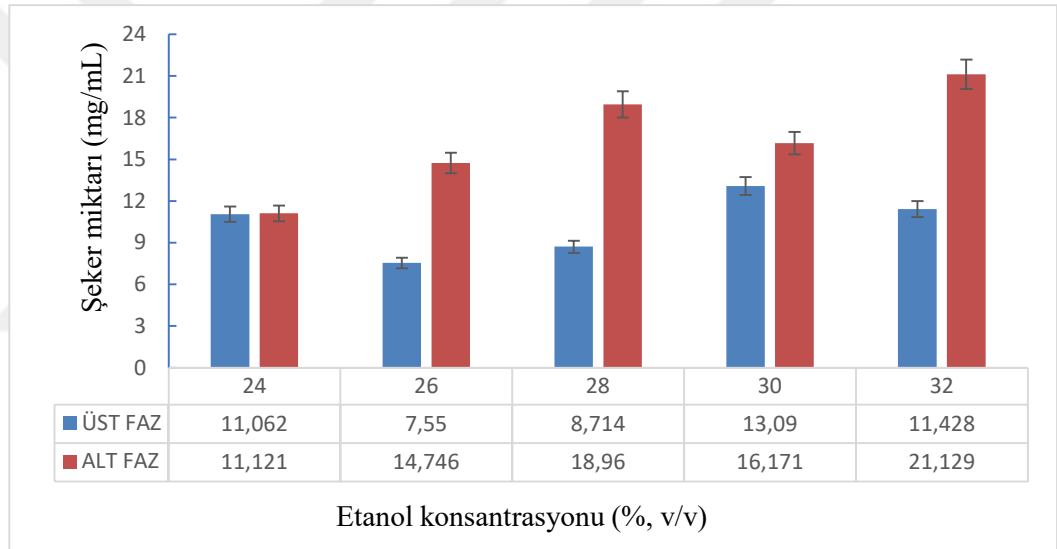
4.3.2 Etanol konsantrasyonunun antosiyanin verimine etkisi

Alkol olarak kullanılan etanol miktarının, antosiyaninlerin ayırımına etkisini belirleyebilmek için optimize edilerek bulunan tuz miktarı % 22 (w/w) ve ham ekstrakt miktarı % 10 (w/v) olarak sabit tutulmuştur. Faz diyagramlarından yararlanılarak etanol miktarı % 24 ile % 32 (v/v) arasında farklılaştırılarak ATPE sistemleri hazırlanmıştır. Alt faz ve üst fazda toplam monomerik antosiyanin ve toplam şeker miktarları ölçülmüştür. Her bir sistemin antosiyanin verimi belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar sırasıyla Şekil 4.9, 4.10 ve 4.11’de verilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, siyah havuç antosiyaninleri % 26 (v/v) etanol konsantrasyonunda % 75,75 verim ile elde edilmiştir ve optimum etanol konsantrasyonu değeri % 26 (v/v) olarak bulunmuştur. Etanol konsantrasyonunun % 24 (v/v)’ten % 32 (v/v)’ye arttırılmasıyla antosiyaninlerin miktarı ve verimi genellikle artmıştır. Sisteme etanolün ilave edilmesi üst faz hacmini artırır. Siyah havuç antosiyaninlerinin etanolde çözünüyor olması ve dolayısıyla üst fazda toplanması, üst faz hacminin artmasıyla faz ayırımını hızlandırmış ve siyah havuç antosiyaninlerinin üst faza doğru geçişini sağlamıştır.

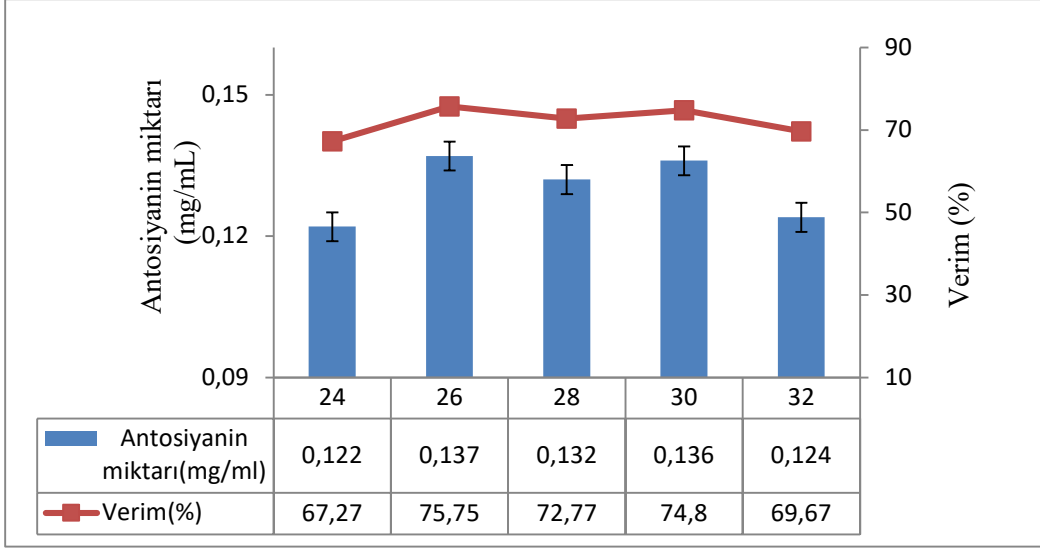
Siyah dut antosiyaninlerinin sulu ikili-faz ile ekstraksiyonunun yapıldığı diğer bir çalışmada, etil alkol miktarının % 20 (v/v)’den % 30 (v/v)’a kadar artmasıyla antosiyaninlerin geri kazanımının ve dağılım katsayısının arttığı bulunmuştur (Wu et al, 2011). *Zanthoxylum Bungeanum Maxim* yapraklarından quercitrin, hyperoside, rutin ve afzelin’in sulu ikili-faz ekstraksiyon sistemi kullanılarak saflaştırıldıkları bir çalışmada etanol konsantrasyonunun optimum değeri % 25 (v/v) olarak bulunmuştur (He et al., 2016). *Taraxacum mongolicum*’dan flavonoidlerin mikrodalga destekli sulu ikili-faz ekstraksiyonu ile saflaştırılmasının yapıldığı diğer bir çalışmada etanol konsantrasyonunun optimum değeri ise % 26 (v/v) olarak bulunmuştur (Yang and Lü, 2016). Üzüm suyundan antosiyaninlerin ATPE sistemi ile ekstraksiyonu ve kısmi saflaştırılmasının yapıldığı çalışmada etanol konsantrasyonunun optimum değeri % 25 (v/v) olarak bulunmuştur (Wu et al., 2014).



Şekil 4.9 Etanol konsantrasyonunun antosiyanin miktarına etkisi



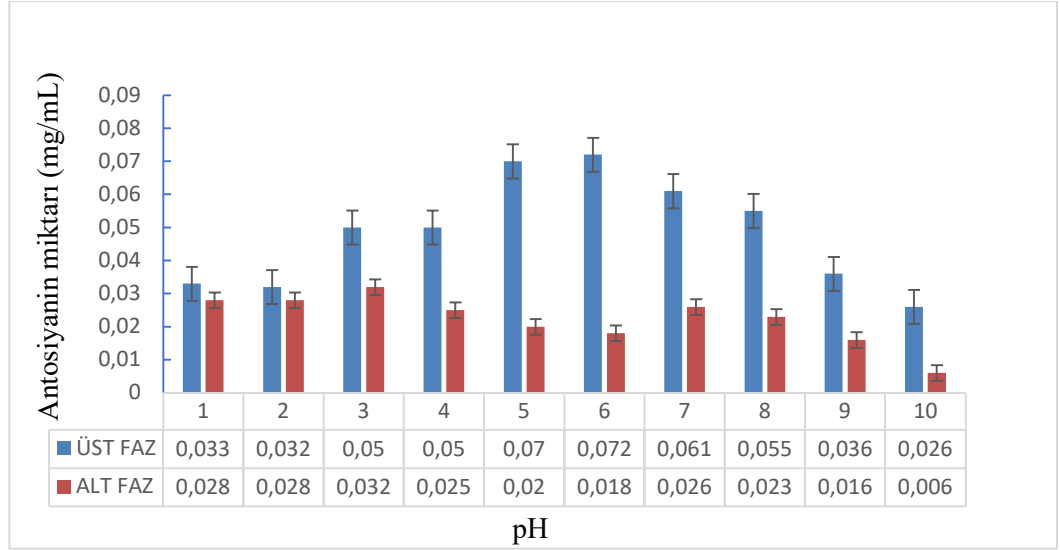
Şekil 4.10 Etanol konsantrasyonunun şeker miktarına etkisi



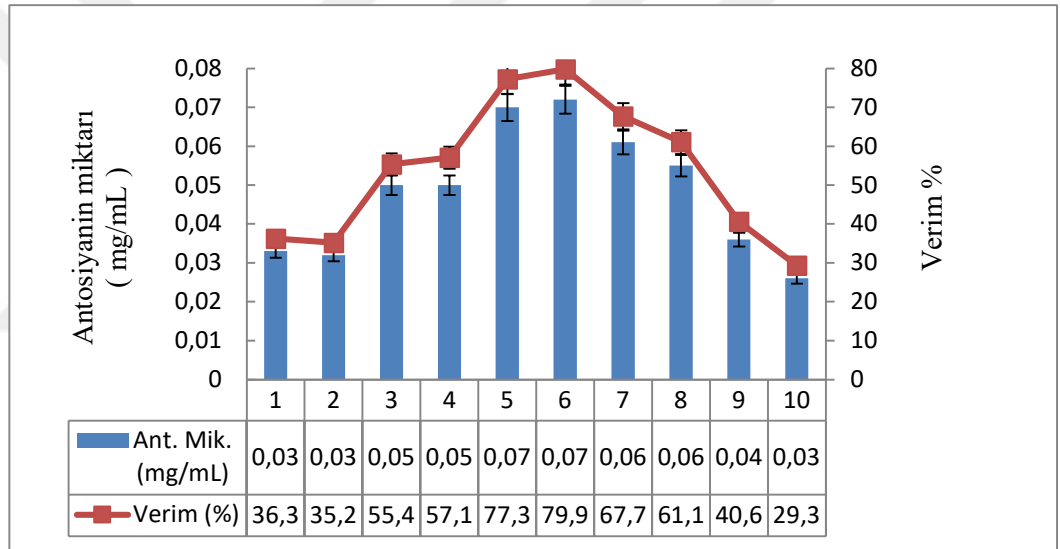
Şekil 4.11 Etanol konsantrasyonunun antosiyanin miktarı ile ekstraksiyon verimine etkisi

4.3.3 pH'ın antosiyanin verimine etkisi

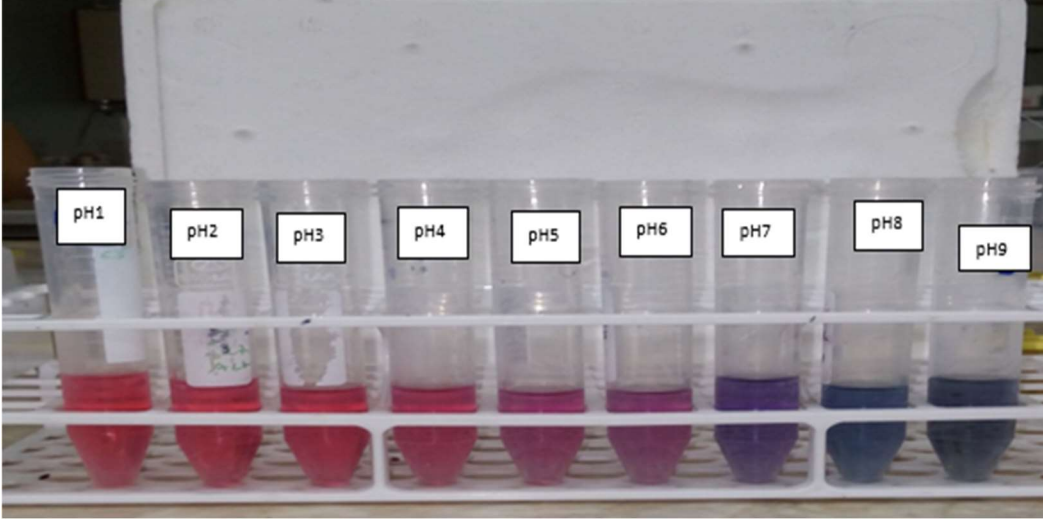
Sulu ikili-faz ekstraksiyon sisteminin pH değeri, biyomoleküllerin dağılımını önemli oranda etkilemektedir. Siyah havuç antosiyaninlerinin saflaştırılmasında, ATPE sistemine pH'ın etkisi araştırılmıştır. Ham ekstrakt miktarı (% 10, v/v) ve amonyum sülfat konsantrasyonu (% 22, w/v) ve etanol konsantrasyonu (% 26, v/v) sabit tutulmuş ve kurulan sistemlerin pH'sı 2-10 aralığında ayarlanıp antosiyaninlerin ayırımı gerçekleştirilmiştir. Ayırım sonrasında alt ve üst fazlarda toplam monomerik antosiyanin miktarları ölçülmüştür. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.12 ve Şekil 4.13'te verilmiştir. Siyah havuç antosiyaninlerinin pH 1 ila pH 9.0 arasındaki renk değişimleri Şekil 4.14'te verilmiştir.



Şekil 4.12 pH'ın antosiyanin miktarına etkisi



Şekil 4.13 pH'ın antosiyanin miktarı ve verime etkisi



Şekil 4.14 Siyah havuç antosiyaninlerinin pH değerine bağlı renk değişimi

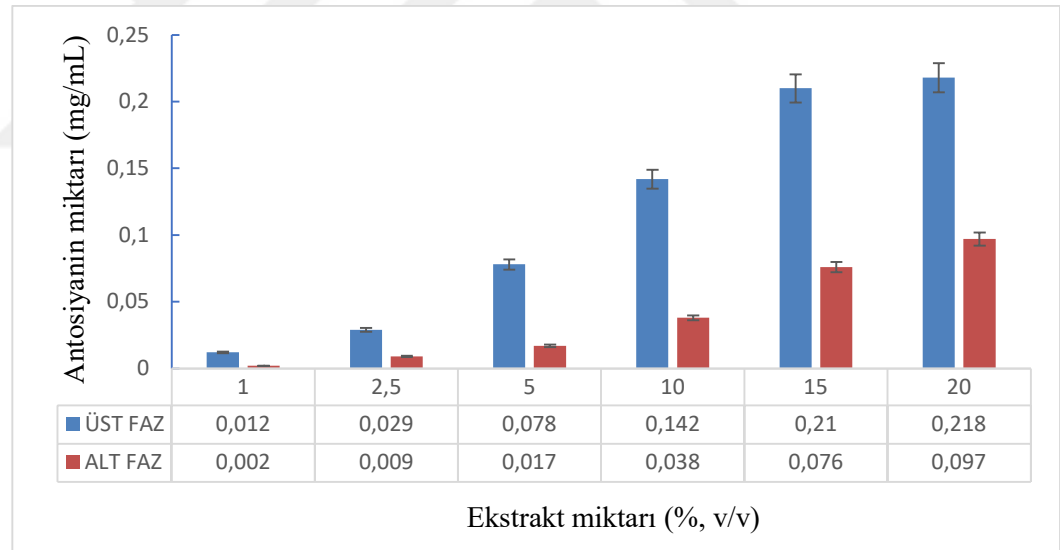
Elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde ve Şekil 4.14'te görüldüğü gibi siyah havuç antosiyaninlerinin rengi pH'ın değişmesi ile değişmektedir. pH 3'e kadar parlak kırmızı, pH 4-5 ve 6'da kırmızı -mor ve pH 7'den sonra mavi-yeşil renk aldığı görülmektedir. Diğer taraftan pH 1'den pH 6'ya kadar pH değeri arttıkça antosiyaninlerin miktarı ve verimi artmış, pH 6'nın üzerinde ise azalmıştır. pH 5'de ve pH 6'da ölçülen antosiyanin miktarları yaklaşık aynı olmakla birlikte sırasıyla % 77,3 ve % 79,9 verim elde edilmiştir. pH 6 aynı zamanda siyah havuç antosiyanin ekstraktının kendi pH'ı olduğundan bundan sonraki ATPE çalışmaları için pH 6 değeri optimum değer olarak bulunmuştur (Şekil 4.13).

Sulu çözeltilerde, antosiyaninlerin çeşitli pH değerlerinde renk kararlılığının araştırıldığı bir çalışmada, siyanidinin açillenmiş türevleri, pH'ın 1'den 10'a kadar değiştirildiği farklı pH değerindeki çözeltilerde farklı sürelerde inkübasyonları sağlanmış ve renk değişiklikleri incelenmiştir. pH 1-4 aralığında tüm pigmentler inkübasyon süresi boyunca renklerini korumuş ancak ortamın alkali olduğu çözeltilerde ise tüm pigmentler dramatik renk değişimleri yaşamıştır (Torskangerpoll and Andersen, 2005). Siyah dut türünden (*Morus atropurpurea*), sulu ikili-faz (etil alkol-amonyum sülfat) ekstraksiyon ile antosiyaninlerin elde edilmesinin yapıldığı bir çalışmada, optimum ekstraksiyon koşulları belirlenirken, pH için yapılan çalışmalarda pH 4,5 (ATPE sisteminin doğal pH'si) değeri optimum değer olarak bulunmuştur (Wu et al., 2011). Sulu

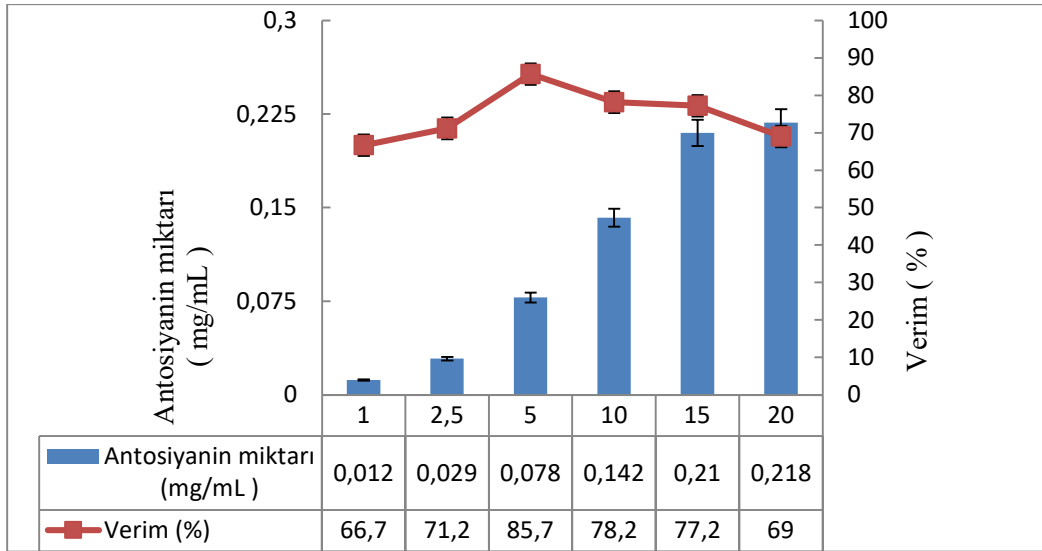
ikili-faz sisteminde üzüm suyundan antosiyaninlerin ekstraksiyonu ve ön saflaştırılmasının yapıldığı bir çalışmada, sistemin pH'ında herhangi bir değişiklik yapılmadan kendi pH'ında yapılan ayırımın veriminin en yüksek olduğu bildirilmiştir (Wu et al., 2014). Literatürde yer alan bu çalışmalar ile benzer sonuçların alındığı görülmüştür.

4.3.4 Ham ekstrakt miktarının antosiyanin verimine etkisi

Siyah havuç ham ekstrakt miktarının, sulu ikili-faz ekstraksiyon sistemine etkisi incelenirken, etanol miktarı (% 26, v/v), amonyum sülfat miktarı (% 22, w/v) ve sistemin pH'ı 6'da (kendi pH'ın da) sabit tutularak ham ekstrakt miktarı % 1 ile % 20 oranında olacak şekilde farklı ATPE sistemleri kurulmuş, ayırım sonrası alt ve üst fazda toplam monomerik antosiyanin miktarı ölçülmüştür. Elde edilen sonuçlar aşağıda Şekil 4.15 ve Şekil 4.16 da verilmiştir.



Şekil 4.15 Ekstrakt miktarının antosiyanin miktarına etkisi



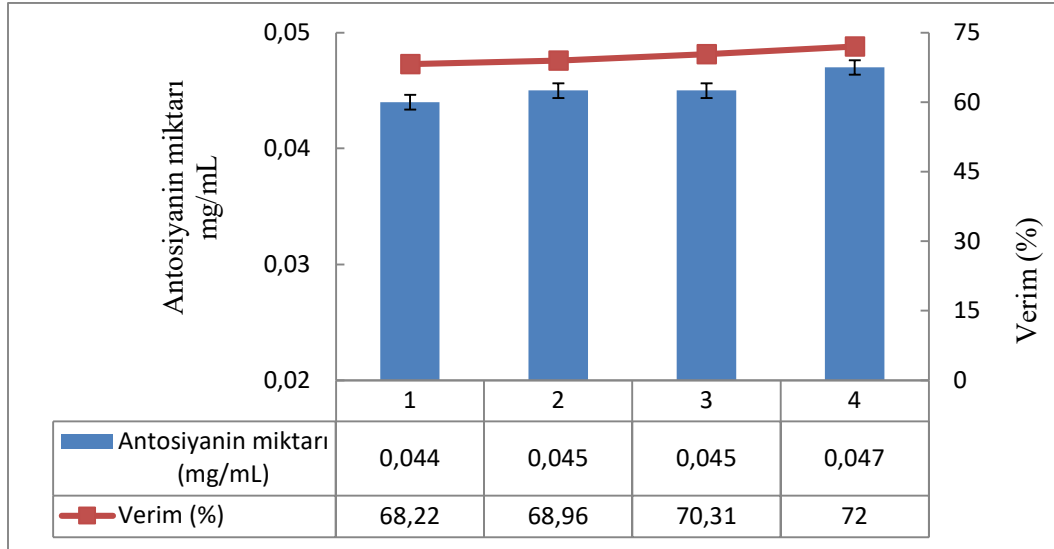
Şekil 4.16 Ekstrakt miktarının antosiyanin miktarı ve ekstraksiyon verimine etkisi

Elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde, ham ekstrakt miktarı artırıldığında buna bağlı olarak antosiyanin miktarı artmıştır. Ancak ATPE sistemi, antosiyaninlerin ayrımını ham ekstrakt miktarı % 5 iken % 85,7 verimle etkili bir şekilde gerçekleştirmiştir. Bundan sonraki çalışmalarda ham ekstrakt miktarı % 5 (v/v) olarak kullanılmıştır.

Gardenya meyvesinden geniposid izolasyonu için sulu ikili-faz ekstraksiyonun kullanıldığı bir çalışmada, sisteme yüklenen ham ekstrakt miktarının etkisini incelemek için gardenyadan elde edilen ve 0.048 g - 0.12 g geniposid içeren farklı konsantrasyonlardaki ve farklı hacimlerdeki ekstraktlar ile hazırlanmış sistemlerde, artan numune yüklemesiyle hacim oranının (V) hafifçe arttığı ancak bölme katsayısı ve dağılım oranının azaldığı bildirilmiştir (Pan et al., 2002).

4.4 Optimize Edilmiş Sulu İkili-Faz Ekstraksiyon Sisteminin Tekrarlanabilirliği

Yapılan optimizasyon çalışmalarında siyah havuç antosiyaninlerinin maksimum verimle elde edildiği optimum koşullar; % 22 (w/v) amonyum sülfat konsantrasyonu, % 26 (v/v) etanol konsantrasyonu, % 5 (v/v) ham ekstrakt miktarı ve pH 6 (kendi pH'sı) olarak belirlenmiştir. ATPE sisteminin optimize edilen koşullarda tekrarlanabilirliği çalışılmış ve sistem dört kez tekrarlanmıştır. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.17'de verilmiştir.



Şekil 4.17 Antosiyaninlerin ATPE sistemi ile ayırımının tekrarlanabilirliği

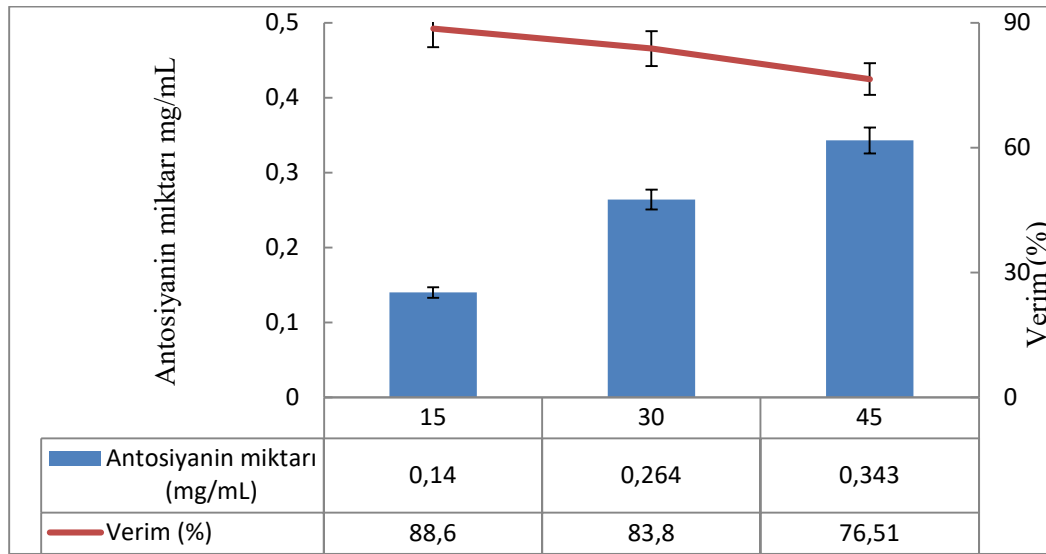
Optimize edilmiş koşullar ile hazırlan dört farklı ATPE sisteminin toplam monomerik antosiyanin değerlerine ve buna bağlı olarak bulunan % verim değerlerine bakıldığında dört sistemde yaklaşık benzer sonuçlarla ayırım sağladığı görülmektedir. Bu durum, optimum koşullarda ATPE sisteminin tekrar edilebilirliğinin oldukça iyi olduğunu göstermektedir.

4.5 Sulu İkili-Faz Ekstraksiyon Sisteminde Ölçek Büyütme

Çoğunlukla kimya endüstrisinde kullanılan organik temelli ekstraksiyon yöntemlerinin ölçek büyütme için uygun ve sürekli işlemlere uygulanabilir olması bu sistemleri büyük ölçek gerektiren endüstriyel alanlar için cazip kılmaktadır (Marcos et al., 1999). Sulu ikili-faz sistemlerinin saflaştırma adımlarını tek bir aşamada birleştirmesi ve faz ortamının toksik olmaması gibi özelliklere sahip olması son yıllarda büyük ölçekli biyomoleküllerin saflaştırılmasında tercih edilmelerini sağlamıştır. Buradan yola çıkılarak siyah havuç antosiyaninlerinin saflaştırılmasında sulu ikili-faz ekstraksiyon sisteminde ölçek büyütme çalışması yapılmıştır. Bu amaçla, 15 mL, 30 mL ve 45 mL'lik sistemler kurulmuş ve siyah havuç antosiyaninlerinin ayırımı gerçekleştirilmiştir. Üst fazda toplam monomerik antosiyanin miktarı ölçülmüştür. Ölçek büyütme çalışmaları için hazırlanan ATPE sistemlerinin içeriği Tablo 4.6'da ve ayırım sonrası elde edilen sonuçlar Şekil 4.18'de verilmiştir.

Tablo 4.6 ATPE sistemlerinin içeriği

	15 (mL)	30 (mL)	45 (mL)
Amonyum sülfat (% 22, w/v)	3,30	6,6	9,90
Etanol (% 26, v/v)	3,90	7,8	11,70
Antosiyanin miktarı (% 5, v/v)	0,75	1,5	2,25
Distile su (v/v)	7,05	14,1	21,25

**Şekil 4.18** Antosiyanin ayrımı için optimize edilmiş ATPE sisteminde ölçek büyütme

Ölçek büyütme çalışmalarından elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde, siyah havuç antosiyaninleri farklı ölçeklerde yakın verim değerleri ile elde edilebilmiştir. Ölçek büyütme çalışması aynı zamanda ilerleyen bölümde sunulacak olan püskürtmeli kurutma işleminde besleme karışımının hazırlanması için ayrıca öncü bir çalışma olmuştur.

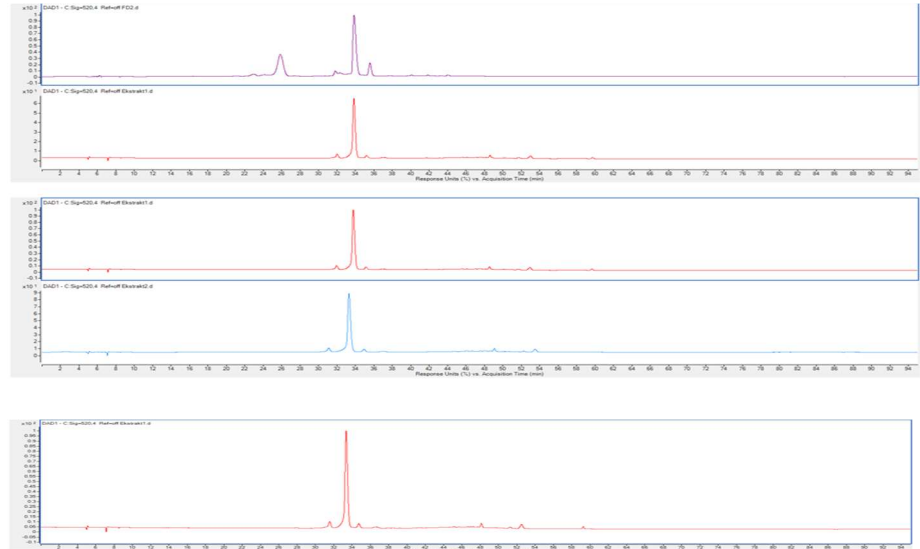
Literatürde ilk olarak ölçeği büyütülerek hazırlan ATPE sistemi, piruvat ve fenilpiruvatın indirgenmesi için D-Laktat dehidrojenaz enziminin geri kazanıldığı çalışmada kullanılmıştır (Hummel et al, 1983). PEG/tuz veya PEG/dekstran sistemleri ile çok aşamalı (4 ardışık sistem) ayırma prosedürü kullanılarak format dehidrojenazın saflaştırılmasının yapıldığı diğer bir çalışmada, ATPE sistemi 10 mL' den başlangıç hacminin 20.000 ile 40.000 katı (200 ile 400 L) arasında bir aralıkta ölçeklendirilmiştir. Format dehidrojenaz

enziminin üst ve alt fazlar arasında dağılımı sonucu yaklaşık % 75'lik bir geri kazanımla pratik olarak saf enzim çözeltisi elde edilmiştir (Kroner et al., 2007).

4.6 Siyah Havuç Antosiyaninlerinin HPLC-MS ile Tanımlanması ve Renk Özellikleri

4.6.1 Siyah havuç antosiyaninlerinin HPLC-MS ile tanımlanması

Yapılan HPLC-MS çalışması ile siyah havucun antosiyanin kompozisyonu tanımlanmış ve miktarları belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar Tablo 4.7’de ve Şekil 4.19’da verilmiştir. Cya 3-xyl-sin gluc-gal, Cya 3-xyl-fer-gluc-gal, Cya 3-xyl-p-coum-glc-gal ve Cya 3-xyl-galac+vinyl phen olmak üzere 4 farklı antosiyanin tanımlanmış ve miktarları belirlenmiştir. Antosiyanin miktarları kromotogramlarda yer alan piklerin alanından yola çıkılarak hesaplanmıştır. Antosiyaninlerin miktarı pik yüksekliği ve pik alanı ile doğru orantılı olarak artmaktadır. Sırasıyla; Cya 3-xyl-sin gluc-gal 4,45 mg/mL, Cya 3-xyl-fer-gluc-gal 72,54 mg/mL, Cya 3-xyl-p-coum-glc-gal 2,69 mg/mL ve Cya 3-xyl-galac+vinyl phen 1,90 mg/mL olarak hesaplanmıştır. Açılmiş antosiyaninler arasında, Cya 3-xyl-fer-gluc-galaktozitin siyah havuçta en bol bulunan antosiyanin olduğu görülmektedir.



Şekil 4.19 ATPE ile ayrılan üst fazdaki siyah havuç antosiyaninlerinin HPLC kromatogramları (Kolon ters faz C₁₈, akış hızı 0,6 mL/dak, sıcaklık 25°C, elüsyon süresi 40 dak, hareketli faz çözücü A, su/formik asit (99:1; v/v) ve çözücü B, asetonitril/çözücü A /formik asit (60:39:1; v/v))

Tablo 4.7 Siyah havuç antosiyaninlerinin kompozisyonu ve miktarları

Antosiyaninler	Alan		Antosiyanin miktarı (mg/mL)		Ort.	Std
	1	2	1	2		
Cya 3-xyl-sin gluc-gal	331,71	330,36	4,47	4,42	4,45	0,03
Cya 3-xyl-fer-gluc-gal	5418,11	5415,55	72,56	72,53	72,54	0,02
Cya 3-xyl-p-coum-glc-gal	200,38	201,87	2,68	2,70	2,69	0,01
Cya 3-xyl-galac+vinyl phen	141,74	142,23	1,90	1,90	1,90	0,00
Toplam			81,61	81,56	81,59	0,04

*Çalışmalar iki tekrarlı yapılmıştır.

Cya-3-xyl-singluc-gal: Cıyanidin-3-xylosyl-sinapoyl glucosyl-galactoside

Cya-3-xyl-fer-gluc-gal: Cıyanidin-3-xylosyl-feruloyl-glucosyl-galactoside

Cya-3-xyl-p-coum-glc-gal: Cıyanidin-3-xylosyl-para coumaroyl-glucosyl-galactoside

Cya-3-xyl-galac+vinyl phen: Cıyanidin-3-xylosyl-vinyl phenol galactoside

Siyah havuç antosiyaninlerinin tespiti uygulanan tanımlama tekniklerine ve kullanılan siyah havucun hammadde türüne bağlı olarak çeşitlilik gösterse de siyah havuçta temelde siyanidin türevi antosiyaninlerin varlığı pek çok çalışmada gösterilmiştir. Antosiyanidinler ve antosiyaninlerin, gıda, ilaç bileşenleri olarak potansiyel sağlık yararlarının araştırıldığı bir çalışmada, tanımlanan siyah havuç antosiyaninlerinin, cya-3-xylosyl-glucosyl-gal, cya-3-xylosyl-gal, cya-3-xylosyl-glucosyl-gal-coumaric acid, cya-3-xylosyl-glucosyl-gal-ferulic acid, cya-3-xylosyl-glucosyl-gal-sinapic acid olduğu bildirilmiştir (Khoo et al., 2017). Siyah havuçtan ekstrakte edilen pigment profilinin tanımlandığı, antioksidan özelliğinin ve doğal gıda boyası olarak kullanılmasının araştırıldığı bir diğer çalışmada, ekstrakte edilen başlıca antosiyanin türevinin, ferulik asitle açılmış cıyanidin-3-xylosyl-glucosyl-galactoside olduğu bulunmuştur (Assous et al., 2014). Siyah havuç posası ile çeşitli kurutma yöntemlerinin kullanılarak siyah havuç tozunun üretildiği bir çalışmada, etkin antosiyanin türlerinin Cıyanidin-3-xylosyl-feruloyl-glucosyl-galactoside, Cıyanidin-3-xylosyl-galactoside ve Cıyanidin-3-xylosyl-coumaroyl-glucosyl-galactoside olduğu belirlenmiştir (Akdoğan, 2019). Siyah havuç

antosiyenin ekstraktının püskürtmeli kurutucu kullanarak mikroenkapsülasyonunun gerçekleştirildiği bir çalışmada ise cyanidin-3-xylosyl-6-glucosyl-galactoside, cyanidin-3-xylosyl-galactoside, cyanidin-3-xylosyl-6-sinapoyl-gucosyl-galactoside, cyanidin-3-xylosyl-6-4-coumaroyl-gucosyl-galactoside ve cyanidin-3-xylosyl-6-4-hidroksibenzoyl-gucosyl-galactoside başta olmak üzere tüm antosiyaninlerin siyanidin türevi olduğu bulunmuştur (Uyan, 2004). Farklı siyah havuç türlerinin antosiyanin kompozisyonunun çalışıldığı bir çalışmada, baskın siyah havuç antosiyaninlerinin, cyanidin 3-xylosylgalactoside, cyanidin 3-xylosyl(feruloylglucosyl)galactoside, cyanidin 3-xylosyl(coumaroylglucosyl)galactoside ve sinapik asit, ferulik asit ve kumarik asit ile açillenmiş 3-xylosyl(glucosyl)galactoside olduğu bulunmuştur (Montilla et al., 2011). Siyah havuç antosiyaninlerini tanımlayan bir başka çalışmada, siyah havucun baskın olarak beş siyanidin türevine (cyanidin 3-xylosylglucosylgalactoside, cyanidin 3-xylosylgalactoside ve cyanidin 3-xylosylglucosylgalactoside'in sinapik, ferulik ve kumarik asit türevleri) sahip olduğu belirtilmiştir. Siyah havuçta bulunan antosiyaninler, (Purple Haze ve Antonina çeşitleri için) toplam fenolik içeriğin % 25 ve % 50'sini oluşturmaktadır (Sadilova et al., 2006; Akal, 2019).

4.6.2 Siyah havuç antosiyaninlerinin renk özellikleri

ATPE sonrası siyah havuç antosiyaninlerinin bulunduğu üst fazda renk ölçümü yapılmıştır. L*, a*, b*, chroma (c) ve hue açısı (h) renk tayin cihazıyla ölçülmüş ve elde edilen değerler Tablo 4.8’de verilmiştir.

Tablo 4.8 ATPE sonrası siyah havuç antosiyaninlerinin renk özellikleri

Renk Özellikleri	Renk Değerleri
L*	19,49±0,2
a*	1,38±0,1
b*	0,79±0,1
C	1,59
h	29,8

4.7 Siyah Havuç Antosiyaninlerinin Mikroenkapsülasyonu

4.7.1 Besleme karışımlarının hazırlanması

Püskürtmeli kurutma öncesi hazırlanan örneğin alkol içeriği evaporatör yardımıyla uçurulmuştur. Bu işlem için kullanılan düzenek Şekil 4.20’de verilmiştir. Evaporatörün çalışma koşulları için devir hızı 90 rpm ve sıcaklık 40°C olarak kullanılmıştır. Alkolün uçurulma işleminden sonra örnekte toplam monomerik antosiyanin miktarı ölçülmüştür. Ölçüm sonrası elde edilen toplam monomerik antosiyanin miktarı 55,041 mg/mL olarak bulunmuştur. Evaporatör sonrası elde edilen antosiyanin ekstraktının refraktometrik kuru maddesi %6 (6°Brix) olacak şekilde manyetik karıştırıcı kullanılarak 1 saat 200 rpm’de karıştırılmıştır (Nayak and Rastogi, 2010). Karışımda son konsantrasyonda suda çözünür kuru madde içeriği % 20 olarak sabit tutulmuştur.

Böğürtlenden püskürtmeli kurutma yöntemi ile elde edilen toz antosiyanin örneğinin fizikokimyasal özelliklerinin üzerine kurutma yöntemi koşullarının etkisinin incelendiği bir çalışmada, kurutmaya tabi tutulan

böğürtlen posasının antosiyanin miktarı $77.90 \pm 2,11$ mg/100 g olduğu belirtilmiştir (Ferrari et al., 2012). Literatürde yapılan bu çalışma ile benzer sonuçların alındığı görülmektedir.



Şekil 4.20 ATPE ile ayrılan üst faz antosiyaninlerinden etanolün evaporatör ile uzaklaştırılması

4.7.2 Püskürtmeli kurutma

Püskürtmeli kurutma işlemi için ATPE sistemleri kurularak hazırlanan örneklerin üst fazları toplanmış ve Kimya bölümünde alkol içeriği evaporatör ile uzaklaştırılmıştır. Refrakrometrik olarak kuru maddesi % 20 olacak şekilde kaplama maddesi (Maltodextrin) ile karıştırılarak kurutmaya hazır hale getirilmiştir. Kurutma işlemi, Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü, TUBITAK MAM Yaşam Bilimleri BY Gıda İnovasyon Teknolojileri (TÜGİP) Laboratuvarında Mini Spray Dryer B-290 ile yapılmıştır. Püskürtmeli kurutma işleminin çalışma koşulları Tablo 4.9’da ve Mini Spray Dryer B-290 ile yapılan işlemin şekli, Şekil 4.21’de verilmiştir.

Tablo 4.9 Püskürtmeli kurutma işleminin çalışma koşulları

Hava Giriş Sıcaklığı (C°)	150
Hava çıkış sıcaklığı (°C)	127±5
Besleme Pompası Kapasitesi (%)	10
Çalışma Süresi (saat)	3



Şekil 4.21 Mini Spray Dryer B-290 ile yapılan püskürtmeli kurutma işlemi

Yapılan kurutma işlemi sonucunda elde edilen toz üründe toplam monomerik antosiyanin miktarı ölçülmüş toplam monomerik antosiyanin içeriği 100 g kuru maddede, 150°C hava giriş sıcaklığında kurutulan örnekte toplam 11,5 mg olarak bulunmuştur.

Püskürtmeli kurutma esnasında gıda aromalarının ve yağlarının kapsülleme verimliliğinin incelendiği bir çalışmada, maltodekstrinin etkili bir kurutma maddesi olduğu ve mikroenkapsüle antosiyaninlerin korunmasına yardımcı olduğu ortaya konmuş ayrıca maltodekstrinin fiyatından ve bulunabilirliğinden kaynaklanan ekonomik avantaja sahip olduğu bildirilmiştir (Jafari et al., 2008). Antosiyaninlerin nano/mikrokapsülasyonu üzerine sistematik bir inceleme ve metaanalizin yapıldığı bir çalışmada, maltodekstrinin tek başına veya diğer biyopolimerlerle birlikte, 16 çalışmanın 11'inde (% 68,75) duvar malzemesi olarak esaslı bir şekilde kullanıldığı belirtilmiştir (Sharif et al., 2020). Yaban mersininden (*Vaccinium spp.*) ekstrakte edilen antosiyanin bileşiklerinin püskürtmeli kurutucu ile mikroenkapsülasyonunun yapıldığı bir çalışmada, 140°C hava giriş sıcaklığında % 74,40 - % 85,22 verimle kurutmanın gerçekleştirildiği bildirilmiştir (Rigi da Rosa et al., 2018). Böğürtlen antosiyaninlerinin püskürtmeli kurutucu ile kurutulduğu ve kopigmentasyonun antosiyanin kararlılığı üzerine etkisinin incelendiği diğer bir çalışmada, hava giriş sıcaklığı 150°C olup kurutma işleminin %78-%84 verimle gerçekleştiği

bildirilmiştir (Weber et al., 2017). Kırmızı lahana antosiyaninlerince zengin ekstraktın doğal gıda renklendiricisi üretimi için saflaştırılıp püskürtmeli kurutma yöntemi ile mikroenkapsülasyonunun yapıldığı bir diğer çalışmada, evaporatör sonrası örnekte toplam monomerik antosiyanin miktarının 100g meyvede $50.76 \pm 1,13$ mg olduğu bildirilmiştir (Machado et al., 2022). Siyah havuç (*Daucus carota* L.) antosiyanin pigmentlerinin MDX 29, Glucodry 210 ve SD 10 kaplama materyallerinin kullanıldığı ve püskürtmeli kurutucu ile mikroenkapsülasyonunun yapıldığı bir çalışmada, çalışmanın kaplama materyali MDX 29 ile yapılan kısmında hava giriş sıcaklığı 160° C'de kurutulan örnekte en yüksek antosiyanin miktarı elde edilmiştir (Ersus and Yurdagel, 2007). Nar suyundan püskürtmeli kurutma yöntemiyle elde edilen toz örnekte, kurutma koşullarının çözünürlük, yoğunluk ve antosiyanin içeriğine etkisinin incelendiği bir çalışmada, maltodextrin türlerine göre farklılaşan antosiyanin miktarının 5,9 mg/mL ile 8,01 mg/mL arasında değiştiği bildirilmiştir (Jafari et al., 2017). Literatürde yer alan bu çalışmalar ile benzer sonuçların alındığı görülmüştür.

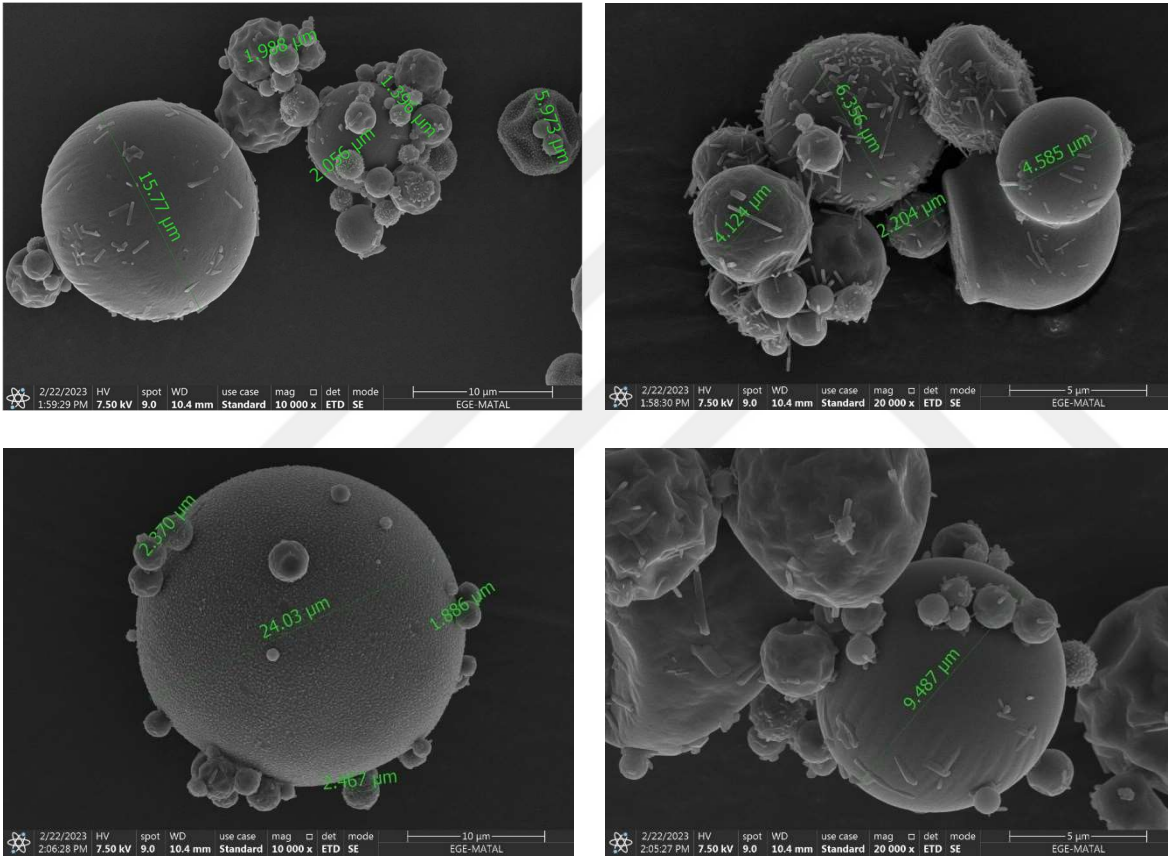
4.8 Mikroenkapsüle Edilmiş Toz Örneklerin Karakterize Edilmesi

4.8.1 Taramalı elektron mikroskobu (SEM)

Taramalı elektron mikroskobu kullanılarak sağlanan görüntüler Şekil 4.22'de verilmiştir. Elde edilen toz örneğin partikül boyutları 1,5 µm ile 24 µm arasında değişim göstermiştir. Duvar materyallerinin görünüşü düzgün bir yapı göstermiştir. Mikrokapsüllerin işlem sırasında uygulanan vakuma genellikle dayanıklı olduğu görülmüş ve üzerlerinde bulunan düzlük ve içbükey alanlar, evaporasyon esnasında suyun hızlıca evaporasyonu sonucu oluşmuştur (Rosenberg et al., 1985). Mikrokapsüllerin kararlı ve kapsüllenen öz maddenin kontrollü bir şekilde salıverilmesi için az gözenekli olmaları istenen bir özelliktir (Khazaei et al., 2014).

Açai (*Euterpe oleracea* Mart.) suyu antosiyaninlerinin farklı taşıma materyalleri kullanılarak püskürtmeli kurutucu ile mikroenkapsüle edildiği ve toz mikrokapsüllerin kararlılığının ve antioksidan aktivitesinin incelendiği bir

çalışmada, mikrokapsüllerin yaklaşık olarak 0,1 ila 41,0 μm arasında değişen çaplarla geniş bir boyut yelpazesi sergilediği bildirilmiştir (Tonon et al., 2010). Duvar materyallerinin ve depolama sıcaklığının mikrokapsüllenmiş yaban mersini ekstraktının antosiyanin kararlılığına etkisinin incelendiği çalışmada, mikrokapsüllerin 11,80 μm ile 15,20 μm arasında farklılık gösterdiği belirtilmiştir (Rigi da Rosa et al., 2021). Farklı maltodekstrin türlerinin ve kurutma yöntemlerinin fiziko-kimyasal ve duyuşal özellikler üzerine etkisinin incelendiği bir çalışmada, mikrokapsül ortalama parçacık boyutu 1-15 μm aralığında bildirilmiştir (Che Man et al., 1999).



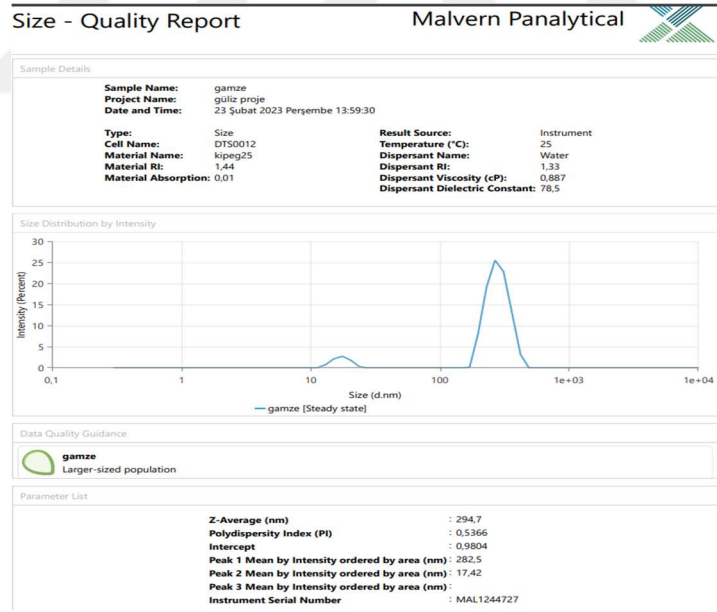
Şekil 4.22 Kurutulmuş toz örnek mikrokapsüllerinin SEM görüntüleri

4.8.2 Partikül boyutu dağılımı (Zetasizer)

Enkapsülasyonu yapılan siyah havuç antosiyaninlerine ait toz örneğin parçacık boyutu dağılımı Şekil 4.23'te verilmiştir. Parçacıkların değişen çaplarla geniş bir boyut aralığı sergilediği ve her biri baskın bir boyutu temsil eden iki farklı zirveye sahip iki modlu bir dağılım gösterdiği görülmektedir. Bimodal

dağılım, toz örnekler söz konusu olduğunda ilgi çekicidir, çünkü daha küçük parçacıkların "popülasyonu" daha büyük olanlar arasındaki boşluklara nüfuz ederek daha az yer kaplayabilir.

Üzüm kabuğundan ekstrakte edilen antosiyaninlerin emülsifikasyon/iç jelleşme ve ardından püskürterek/dondurarak kurutma teknikleri ile mikrokapsülasyonunun yapıldığı, antosiyaninlerin karakterizasyonu, kararlılığı ve biyoerişilebilirliğinin incelendiği bir çalışmada, parçacık boyutu dağılımı 0,56 µm olan tek bir pik gözlenmiş ve bu değerden önemli ölçüde daha büyük olan 99,8 µm'lik bir değer daha elde edilmiştir (Zang et al., 2020) Aserola posası ve kalıntısından elde edilen biyoaktif bileşikler içeren mikrokapsüllerin mikroyapısı üzerinde püskürtmeli kurutma ve dondurarak kurutmanın etkisinin araştırıldığı çalışmada da; püskürtmeli kurutma ve dondurarak kurutma ile elde edilen mikrokapsüllerin ortalama boyutu sırasıyla 27,08 µm ve 99,26 µm'dir (Rezende et al., 2018).



Şekil 4.23 Toz örneğin parçacık boyutu dağılımı

4.9 Mikroenkapsüle Edilmiş Toz Antosiyanin Örneğinin Kararlılığının Araştırılması

Hava giriş sıcaklığı 150°C’de 3 saatlik bir çalışma ile kurutulan toz örnekte toplam monomerik antosiyanin miktarı, toplam karbonhidrat miktarı, toplam fenolik bileşik miktarı ve flavonoid miktarı ölçülmüş ve sonuçlar Tablo 4.10’da verilmiştir.

Tablo 4.10 Toz antosiyanin örneğinin toplam karbonhidrat, fenolik bileşik, flavanoid ve antosiyanin miktarları

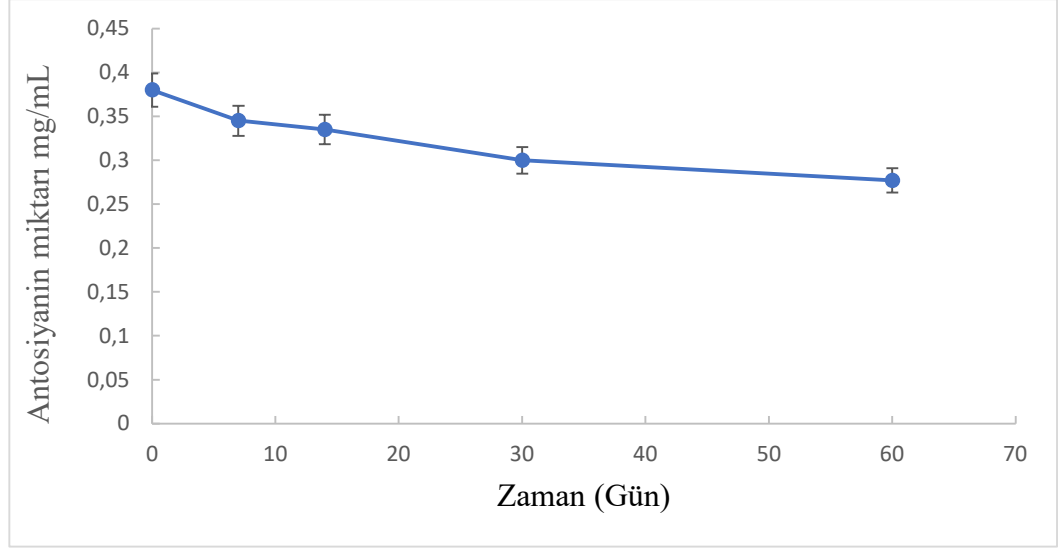
Toplam Monomerik Antosiyanin (mg/100g)	11,5
Toplam Karbonhidrat (g/100g)	0,439
Flavanoid (mg/mL)	16,5
Toplam Fenolik Bileşik (mg/100g)	81,83

4.9.1 Mikroenkapsülasyon verimi

Mikroenkapsülasyon sonrası toz örnek ağırlığının, besleme karışımının kuru madde miktarına oranı ile bulunan mikroenkapsülasyon verimi % 88,84 olarak belirlenmiştir.

4.9.2 Depo kararlılığı

Püskürtmeli kurutucu sonrası elde edilen toz örneğin antosiyanin içeriğine depolama süresinin etkisini belirlemek amacıyla oda sıcaklığında (25°C’de) saklanan toz örnekte, 0., 7., 14., 30. ve 60. gün total antosiyanin içeriğine bakılmıştır. Sırasıyla antosiyanin miktarları, 0,380 mg/mL, 0,345 mg/mL, 0,335 mg/mL, 0,300 mg/mL ve 0,277 mg/mL olarak bulunmuştur. Toz örnekte yapılan antosiyanin analizlerinde elde edilen sonuçlar Şekil 4.24’te grafikte verilmiştir.



Şekil 4.24 Toz antosiyenin örneğinin depo kararlılığı

Antosiyeninlerin bozulmasının 1. dereceden reaksiyon kinetiğine göre gerçekleştiğini bildiren pek çok çalışma vardır (Ersus ve Yurdagel, 2007) 1. Dereceden reaksiyon hızı sabiti (k) ve yarılanma ömrü ($t_{1/2}$) aşağıdaki eşitliklerle hesaplanmıştır.

$$\ln \left(\frac{C_t}{C_0} \right) = -kt$$

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k}$$

C_0 → başlangıçtaki antosiyenin miktarı

C_t → t süre sonraki antosiyenin miktarı

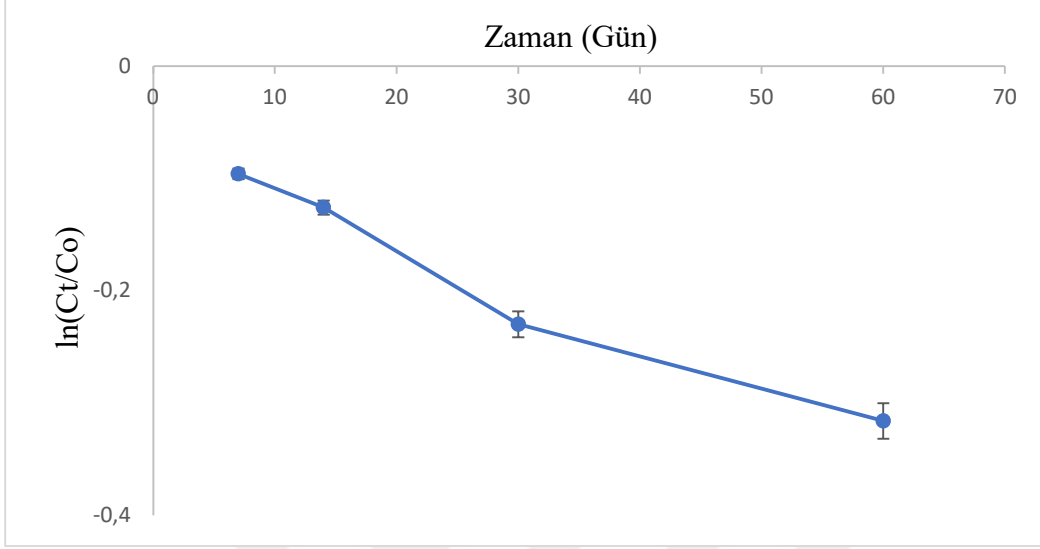
Toz örneğin 25°C’de 1. dereceden reaksiyon hız sabiti ve yarılanma ömrü aşağıda Tablo 4.11’de verilmiştir.

Tablo 4.11 Toz örneğin 25°C’de 1. dereceden reaksiyon hız sabiti ve yarılanma ömrü

Sıcaklık	k (gün ⁻¹)	t _{1/2} (ay)	R ²
25°C	0,0034	6,79	0,9641

R^2 değerinin 0.95'ten büyük olması antosiyaninlerin bozulmasının 1.dereceden reaksiyon kinetiğine göre gerçekleştiğini göstermektedir.

Toz örneğin $\ln(C_t/C_0)$ – zaman grafiği Şekil 4.25'te verilmiştir.



Şekil 4.25 Toz örneğin $\ln(C_t/C_0)$ – Zaman grafiği

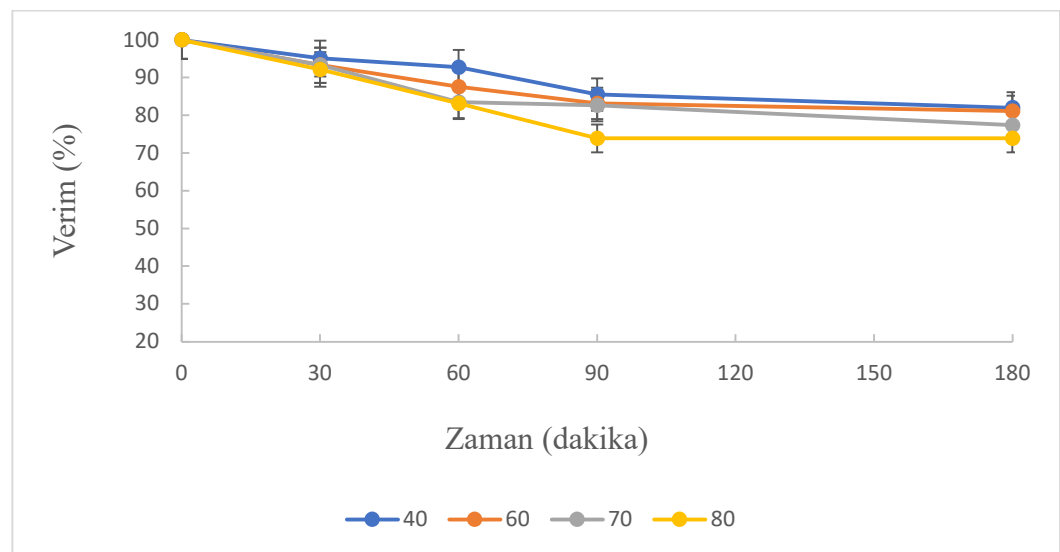
Yaban mersininden (*Vaccinium spp.*) ekstrakte edilen antosiyaninlerin püskürtmeli kurutma ile mikroenkapsülasyonunun yapıldığı, simüle edilmiş gastrointestinal koşullarda kararlılığının incelendiği bir çalışmada, 25°C'de yarı ömürlerinin 3.85-4,67 ay arasında olduğu bildirilmiştir (Righi da Rosa et al., 2019). Hibiscus sabdariffa L antosiyaninlerinin püskürtmeli kurutma ile kaplama maddesi olarak maltodekstrin-gam arabik karışımı kullanılarak kurutulmasının ve elde edilen kapsüllenmiş örneklerin bozunma kinetiği ve renk kararlılığının incelendiği bir çalışmada, 25°C sıcaklıkta yarı ömürleri 5,4 ay ve hız sabiti 0,0043 gün⁻¹ olarak bildirilmiştir (Idham et al., 2012).

4.9.3 Isı kararlılığı

Püskürtmeli kurutucu sonrası elde edilen toz örnekteki antosiyanin miktarı üzerine sıcaklığın etkisini incelemek için toz örnek, 30, 60, 90 ve 180 dk boyunca 40°,60°,70° ve 80°C sıcaklığa maruz bırakılıp sonrasında örneklerde toplam monomerik antosiyanin içeriğine bakılmış ve sonuçlar % Verim üzerinden verilmiş olup sonuçlar Şekil 4.26'da gösterilmiştir. Farklı sıcaklıkların

toz örnekte siyah havuç antosiyaninlerini nasıl etkilediğine bakılacak olursa, 40°C’de antosiyanin miktarları, 30. dakikada 0,328 mg/mL, 60. dakikada 0,320 mg/mL, 90. dakikada 0,295 mg/mL ve 180. dakikada 0,283 mg/mL olarak belirlenmiş olup 40°C’de 180 dakikanın sonunda verim % 82,02 olarak bulunmuştur. 80° C’de antosiyanin miktarları, 30. dakikada 0,318 mg/mL, 60. dakikada 0,287 mg/mL, 90. dakikada 0,255 mg/mL ve 180. dakikada 0,255 mg/mL olarak belirlenmiş olup 80°C’de 180 dakikanın sonunda verim % 73,91 olarak bulunmuştur. Antosiyaninlerin ısıya karşı duyarlı olduğu ve sıcaklık artışında bozunmanın daha hızlı gerçekleştiği görülmektedir.

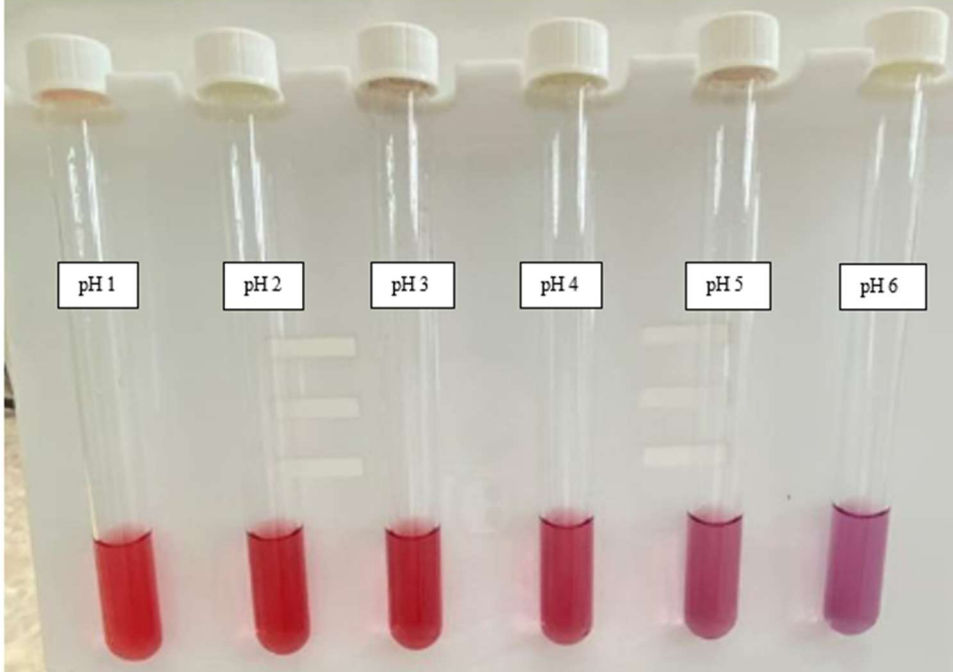
Siyah havuçtan ekstrakte edilen pigmentin profilinin tanımlandığı, antioksidan özelliğinin ve doğal gıda boyası olarak kullanılmasının araştırıldığı bir çalışmada, ısı karalılığı 80°C, 90°C ve 100°C’de, 30, 60, 90, 120, 150 ve 180 dk boyunca inkübe edilen örneklerde incelenmiş olup sıcaklık artırıldığında bozunmanın daha yüksek miktarlarda gerçekleştiği bildirilmiştir (Assous et al., 2014). Kırmızı turp ve kırmızı etli patates antosiyaninlerinin meyve suyu model sistemlerinde renk ve pigment stabilitesinin araştırıldığı bir diğer çalışmada 25°C’de depolanan antosiyaninlerin 2°C’de depolananlara göre daha hızlı bozunduğu belirtilmiştir (Rodriguez -Saona et al., 1999). Kan portakalı suyundaki siyah havuç antosiyaninlerinin termal kararlılığının araştırıldığı bir çalışmada, 70°, 80° ve 90°C’de sırasıyla 5.6, 2.5 ve 1,4 saat olduğu ortaya koyulmuştur (Kırca et al, 2003).



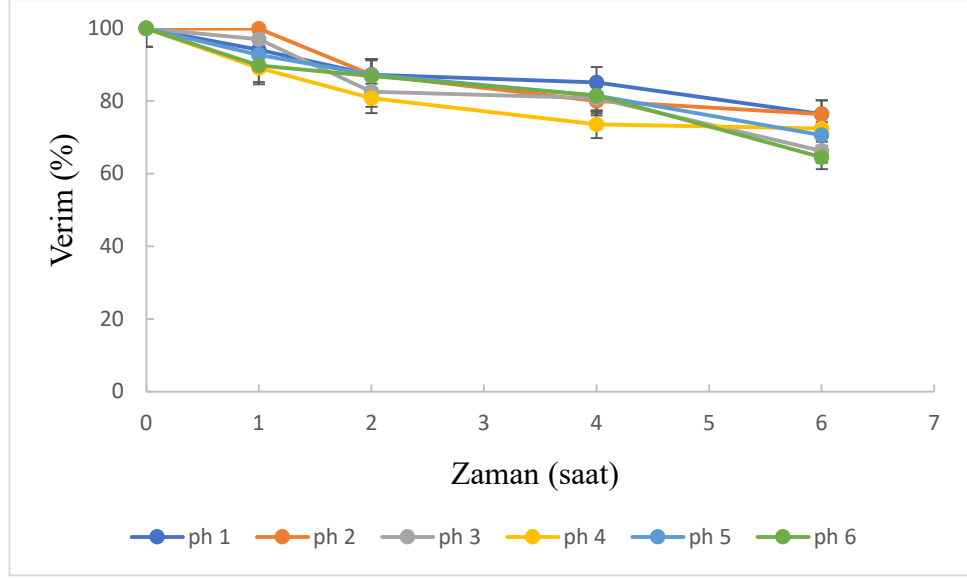
Şekil 4.26 Toz antosiyanin örneğinin zamana bağlı ısı kararlılığı

4.9.4 pH kararlılığı

Püskürtmeli kurutucu sonrası elde edilen toz örneğin antosiyanin miktarı üzerine ortam pH'ının etkisini incelemek için, toz örnekten saf su ile hazırlanmış (30 mg:10 ml m/v) örneğin pH'ı 25°C'de 100 mM sitrat-fosfat tamponu ile 1, 2, 3, 4, 5 ve 6'ya ayarlanıp, pH'ı ayarlanan her bir örneğin 1., 2., 4. ve 6.saatın sonunda toplam monomerik antosiyanin miktarları ölçülmüştür. Toz örnekteki siyah havuç antosiyaninlerinin pH değişikliğine bağlı renk değişimi Şekil 4.27'de ve verimler Şekil 4.28'de verilmiştir. Şekil 4.27'den görüldüğü üzere pH 1 ve pH 2'de siyah havuç antosiyaninleri parlak kırmızı, pH 3'te verdiği renk daha çok çilek ve şeftali kırmızısı, pH 4'te kırmızı, pH 5'te magenta kırmızısı da denilen mor renge geçiş ve pH 6'da mor olarak tanımlanabilmektedir. Antosiyaninlerin pH değişimlerine karşı duyarlı olduğu ve pH artışının rengi kırmızıdan mora kadar değiştirdiği belirlenmiştir.



Şekil 4.27 Toz antosiyanin örneğinde pH değişimine bağlı renk değişimi



Şekil 4.28 Toz antosiyanin örneğinin pH kararlılığı

Mor mısır (And Dağları) ve kırmızı tatlı patates antosiyaninlerinin sulu ekstraktlarının sentetik ve doğal renklendiricilere kıyasla kararlılığının incelendiği bir çalışmada, karşılaştırma olarak siyah havuçtan elde edilen ticari renklendiricide yer almış ve pH 1- 6 aralığında yapılan kararlılık denemelerinde, açillenmiş antosiyaninler bakımından zengin olan kırmızı tatlı patates ve siyah havuç renklendiricileri, açillenmemiş antosiyaninler bakımından zengin olan mor mısır ve kırmızı üzüm renklendiricilerinden daha yüksek kararlılık gösterdiği bildirilmiştir (Cevallos-Casals and Cisneros-Zevallos, 2004). Siyanidin ve siyanidin 3-O- β -glukopiranosidin pH kaynaklı yapısal formlarının araştırıldığı bir çalışmada, pH etkisi, 2 ile 9 arasında dört farklı pH değerindeki tamponlarda test edilmiştir. pH 2.0, pH 4.0, pH 7.0 ve pH 9.0 değerlerinde siyanidin kararlılığının pH'ın artmasıyla birlikte azaldığı ve pH 2.0'de en kararlı ve pH 9.0'da en az kararlı olduğu bildirilmiştir (Rakic et al., 2019). pH'a duyarlı antosiyaninler içeren kolorimetrik indikatör filmlerin hazırlandığı ve dinamik yanıt özelliklerinin incelendiği bir çalışmada, antosiyanin çözeltilerinin rengi, pH 5.0'den düşük olduğunda kırmızı ve pH 5.0-6.0'da pembe- mor, pH 7.0'de mora dönüştüğü görülmüştür (Huang et al., 2021).

4.10 Mikroenkapsüle Edilmiş Toz Örneğinin Dondurmanın Renklendirilmesinde Kullanılması

Püskürtmeli kurutma sonrası elde edilen toz antosiyanin örneğinin, dondurmaya renklendirmesi amacıyla yerel bir pastaneden alınan dondurmanın 25 gramına % 0,5'i, % 1'i ve % 2'sine karşılık gelecek şekilde sırasıyla mikroenkapsüle edilmiş toz örnek tartılarak eklenmiştir. Toz örneğinin dondurmaya eklenmesinden sonra homojen olarak çözünmesi için karıştırılmış sonrasında VITA Easyshide Advance cihazı ile renk analizi yapılmıştır. Renk analizi ile L^* , a^* , b^* , C^* , h^* değerleri ölçülmüştür. Ölçülen L^* , a^* , b^* değerleri kullanılarak örneklerin toplam renk farkı (ΔE) hesaplanmıştır. Toplam renk farkını (ΔE) belirlemek için aşağıdaki eşitlik kullanılmıştır.

$$\Delta E = \sqrt{(L^* - L_0)^2 + (b^* - b_0)^2 + (a^* - a_0)^2}$$

Eşitlikteki L_0 , b_0 ve a_0 değerleri kontrol örneğinin renk değerlerini göstermektedir. ΔE değerinin 3'ten büyük veya 3'e eşit olması, örneğin kontrole göre oldukça farklı renkte olduğunu, 1.5 ve 3 arasında olması farklı olduğunu, 1.5'tan küçük olması ise farklılığın az olduğunu ifade etmektedir (Tiwari et al., 2008). Literatürde, $\Delta E=1$ eşik değerinin üzerindeki ΔE değerlerinin gözle fark edilebilir olduğu belirtilmiştir (Sadilova et al., 2006). VITA Easyshide Advance cihazı Şekil 4.29'da verilmiştir.

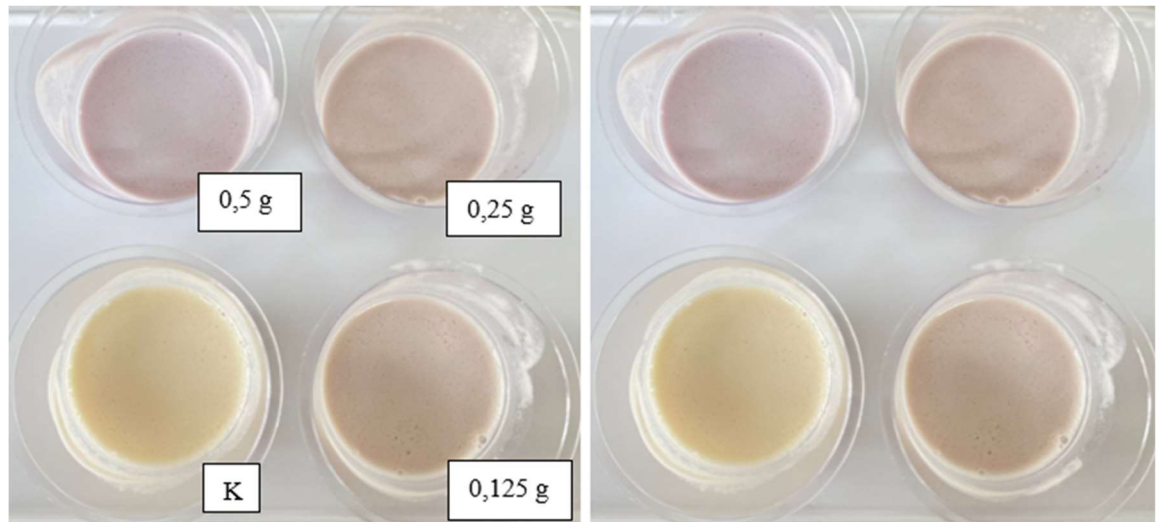


Şekil 4.29 VITA Easyshide Advance cihazı

Eklenen antosiyanin miktarları ve L^* , a^* , b^* , C^* , h^* ve ΔE değerleri Tablo 4.12'de ve renklendirilen dondurmalar Şekil 4.30'da verilmiştir.

Tablo 4.12 Dondurmaların içerdiği antosiyanin miktarları ve L*, a*, b*, C*, h* ve ΔE değerleri

	Toz Örnek	Kontrol (Sade Dondurma)	% 0,5 toz örnek içeren dondurma	% 1 toz örnek içeren dondurma	% 2 toz örnek içeren dondurma
İlave edilen toz örnek miktarı		Kontrol	0,125 g	0,25 g	0,5 g
Toz örnekteki antosiyanin miktarı		Kontrol	15,75 mg	31,5 mg	63 mg
L*	31,6	90,8	70,8	56,8	-6,9
a*	1,4	-0,3	5,8	11,8	X
b*	3,4	17,7	15,3	10,1	X
C	3,7	17,7	16,3	15,6	-10,6
Hue	67,1	90,9	69,2	40,5	-63,2
ΔE			21,04	36,88	97,7

**Şekil 4.30** Toz antosiyanin örneği ile renklendirilen dondurmaların fotoğrafları

Tablo 4.12’de görüldüğü üzere toz örneğin L* değeri 31,6, kontrol örneğin (sade dondurma) L* değeri, 90,8, % 0,5 antosiyanin içeren örneğin L* değeri 70,8, % 1 antosiyanin içeren örneğin L* değeri 56,8 ve % 2 antosiyanin

içeren örneğin L* değeri -6,9 olarak bulunmuştur. L* değerinin 100'e yakın olması rengin beyaza yakın olduğunu göstermektedir. Antosiyanin miktarı arttıkça L* değeri azalmıştır. L* değerinin azalması dondurmadaki renk yoğunluğunun arttığını göstermektedir ve bu sonuç ekstraktların antosiyanin içeriği ile desteklenmektedir. Kontrol örneğin a* değeri -0,3 olarak ölçülmüştür. Dondurma örneklerinde a* değeri sırasıyla 5,8 ve 11,8 olarak ölçülmüştür. Antosiyanin miktarı arttıkça a* değerinin de yüksek olması beklenen bir durumdur.

Siyah havuç (*Daucus carota ssp. sativus*) suyunun antioksidan bileşimi ve işleme koşullarının renk üzerindeki etkilerinin incelendiği bir çalışmada, artan antosiyanin içeriğine paralel olarak a* değerinin arttığı bildirilmiştir (Khandere et al., 2011). Beyaz kuş üzümü suyunda renklendirici olarak kırmızı pancar (*Beta vulgaris*) betalainleri ve üzüm (*Vitis vinifera*) antosiyaninlerinin kullanıldığı ve depolama koşullarının renk stabilitesi ve duyusal özellikler üzerindeki etkisinin incelendiği bir çalışmada, antosiyanin ile renklendirilen numunelerin antosiyanin yüzdesi arttıkça, yüksek C* ve a* ile daha yoğun ve kırmızı görüldüğü bildirilmiştir (Yang et al., 2021). Siyah havuç posasından farklı yöntemlerle antosiyanin ekstraksiyonunun yapıldığı diğer bir çalışmada, etanol ve suyun kullanıldığı ekstraksiyon yöntemleri ile elde edilen örneklerin L* değerleri 21,0-27,3 aralığında bulunmuştur (Akal, 2019). Literatürde yer alan bu çalışmalar ile benzer sonuçların alındığı görülmüştür.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Gıdanın tadını tamamlayan, gıdaya özgü tadın alınmasını sağlayan etmenler arasında gıdanın rengi gelir. Gıdaları tercih edilebilir, görünür ve cazip kılan en önemli özelliklerinden bir tanesi renkleridir. Renk, yiyecek ve içeceklerin temel bir bileşeni olmakla birlikte, özellikle hazır gıdaların uygun renklerde görünmesi, tüketiciler tarafından 'sağlıklı yiyecek' algısı ile eşanlamlı olabileceğinden, yiyecek seçiminde önemli bir rol oynar (Herrera et al., 2023). Doğal gıdalar renklerini, kendilerini oluşturan ve yapılarında var olan birtakım maddelerden alırlar. Bu maddeler genel olarak pigment olarak adlandırılırlar. Pigmentler çok çeşitli kimyasal formlara sahip olabilirler. Hazır gıdaların rengi ise renklendiriciler olarak bilinen maddeler yardımıyla renklendirilirler.

Renklendiriciler; sentetik, doğal ve doğala özdeş boyalar olarak genelde 3 sınıfa ayrılmaktadır. Ayrıca sakkaroz, glukoz ve fruktoz gibi karbohidratların kontrollü olarak ısıtılmasıyla elde edilen karamel, dünyadaki gıda boya pazarının %11 gibi oldukça büyük bir kısmını oluşturmasından dolayı önemli bir gıda renklendiricisi olarak kabul edilmektedir (Downham and Collins, 2000). Doğal renklendiriciler, pigment içeren pek çok kaynaktan elde edilebilirler. Pigment içeren başlıca kaynaklar, algler dahil bitkiler, omurgalılar, omurgasızlar, mantarlar, likenler ve bakteriler olarak sıralanmaktadır. Bitkiler çok çeşitli sayıda içerdikleri pigmentler ile oldukça kullanışlı kaynak sınıflarından biri olarak değerlendirilmektedirler.

Antosiyaninler, bitkilerde yaygın olarak bulunan en önemli renkli pigment grubudur. Bu yoğun renkli ve suda çözünür pigmentler, yüksek bitkilerin taç yaprakları, yaprakları ve meyvelerindeki neredeyse tüm pembe, kırmızı, mor ve mavi renklerden sorumludur (Harborne, 1998).

Siyah havuç (*Daucus carota ssp. sativus var. atrorubens Alef.*), gıda endüstrisinde pigment olarak kullanılan antosiyaninlerin kaynağı olarak bilinen endüstriyel bir üründür. Siyah havuçtan ekstrakte edilen antosiyaninler yüksek bir ticari potansiyele sahiptir. Özellikle kırmızı lahana, siyah havuç, kırmızı turp, mor patates veya mor mısır gibi sebzelerde bol miktarda bulunan açılmiş (yani fenolik veya alifatik asitler) antosiyanin pigmentleri daha kararludur (Bkowska-Barczak, 2005). Antosiyaninlerin siyah havuçtan ekstraksiyonu,

pigmentlerin hücre duvarı matrisine sıkı bir şekilde bağlı olmasından dolayı zorlu bir süreçtir ve ekstraksiyon prosedürünün optimize edilmesi kritik önem taşımaktadır (Kumar et al., 2022).

ATPE ayırma tekniği, metanol, etanol, 1-propanol ve 2-propanol gibi alifatik alkollerin sulu çözeltileri, uygun konsantrasyonlardaki tuz çözeltileri ile karıştırıldığında, alkol açısından zengin bir üst faz ve tuz açısından zengin bir alt faz olmak üzere sulu iki fazlı sistem elde edilir (Marco et al., 2017). ATPE yönteminin, moleküllerin biyolojik aktivitesini koruma, yüksek ürün saflığı, yüksek ekstraksiyon kapasitesi, düşük maliyet, yüksek verim ve düşük toksisite gibi birçok avantajı bulunmaktadır (Castañeda-Ovando et al., 2009).

Antosiyaninlerin tanımlanması için kullanılan kromatografik yöntemler içerisinde en yaygın olanı HPLC yöntemidir.

Antosiyaninlerin gıda endüstrisinde doğrudan uygulanması zorlaştıran nedenlerin başında pH, oksidasyon, enzimler, yüksek sıcaklık (≥ 50 °C) ve ışık gibi çeşitli çevresel faktörler gelmektedir. Bu faktörler antosiyaninlerin, kararsızlık, bozunma ve renk değişikliği göstermelerine neden olurlar. Mikroenkapsülasyon tekniklerinin, antosiyaninlerin stabilitesini ve biyoerişilebilirliğini arttırmanın yanı sıra acı tat ve burukluk gibi hoş olmayan tatlarını maskeleyen için de etkili ve pratik bir strateji olabileceği birçok çalışmada gösterilmiştir (Zhang et al., 2020).

Bu çalışmada;

- Gıda endüstrisinde pigment olarak kullanılan antosiyaninlerin kaynağı olarak bilinen, endüstriyel bir ürün olan ve içerdiği antosiyaninler bakımından yüksek bir ticari potansiyele sahip olan siyah havuç, antosiyanin kaynağı olarak seçilmiştir. Siyah havucun antosiyanin miktarı 102,94 mg/L olarak bulunmuştur. **Böylece seçilen antosiyanin kaynağının içerik bakımından zengin olduğu gösterilmiştir.**
- Siyah havuçtan 3 farklı yöntemle ham ekstrakt hazırlanmış, hazırlanan ham ekstraktlarda bulunan antosiyanin miktarına göre en etkili ham ekstrakt hazırlama yöntemine karar verilmiştir. Uygulanan yöntemlerde, antosiyanin miktarları, direkt ham

ekstrakt (7,2 mg/L), direkt sonrası ısıtma işlemi görmüş ham ekstrakt (102,94 mg/L) ve direkt sonrası askorbik asit ile muamele edilmiş ham ekstrakt (38,40 mg/L) olarak ölçülmüştür. En etkili ham ekstrakt hazırlama yönteminin direkt sonrası ısıtma işlemi uygulanan yöntem olduğu görülmüştür. Direkt sonrası ısıtma işlemi uygulaması için çalışma sıcaklığı ve çalışma süresi optimize edilmiş, çalışma sıcaklığının optimum değeri 80°C ve çalışma süresinin optimum değeri 10 dk olarak bulunmuştur. Siyah havuçtan antosiyaninlerin maksimum verimle ekstraksiyonu için; ekstraksiyon basamağında ortama su ilave edilmesinin ham ekstrakt hazırlama verimine katkısı incelenmiş ve ortama (1:1 v/v) oranında distile su katılmasının ham ekstrakt hazırlama verimini artırdığı görülmüştür. **Verimi artırmış olmakla saflaştırma öncesi hazırlanan ham ekstraktın en etkili verimi sağlayacak şekilde hazırlandığı gösterilmiştir.**

- ATPE için hazırlanan ham ekstrakta toplam karbonhidrat, flavonoid, toplam antosiyanin ve toplam fenolik bileşik miktarı ölçülerek hazırlanan ham ekstraktın içeriği tanımlanmıştır. Sırasıyla toplam karbonhidrat 2,81 mg/100g, flavonoid 2,51 mg/100g, toplam antosiyanin 5,62 mg/mL ve fenolik bileşik 160,8 mg/100g olarak miktarları belirlenmiştir. **Ham ekstrakt içeriğinin tanımlanması ileride renklendirici olarak düşünülen kaynağın değerleri bileşenleri bulundurduğu gösterilmiştir.**
- Siyah havuçtan antosiyaninleri saflaştırmak için ATPE yöntemi kullanılmıştır. ATPE yöntemini oluşturan bileşenlerin kullanım oranları yöntemin verimini etkilediği için optimizasyon çalışması yapılmıştır. Yapılan optimizasyon çalışmasının sonucunda, amonyum sülfat konsantrasyonu (% 22), etanol konsantrasyonu (% 26), pH (6) ve ham ekstrakt miktarı (% 5) olarak optimum değerler elde edilmiştir. Optimum değerler kullanılarak 4 farklı ATPE sistemi hazırlanmış ve üst fazlarda antosiyanin miktarları ölçülerek %Verim hesaplanmış ve ATPE sistemlerinin tekrarlanabilirliği incelenmiştir. Elde edilen %Verim değerleri

sırasıyla % 68,22, % 68,96, % 70,31 ve % 76,51 olarak bulunmuştur. **Sonuçların yaklaşık olarak birbirine benzer çıkması ile ATPE sistemlerinin tekrarlanabilir olduğu sonucu gösterilmiştir.** Saflaştırma yöntemleri pek çok endüstriyel alanda kullanılan ve gerekli olan yöntemlerdir. Bu nedenle saflaştırma yöntemlerinin ölçeklendirilebilir olması gerekmektedir. Farklı endüstriyel alanlarda, farklı miktarlarda saflaştırma yapılma ihtiyacının karşılanabilmesi hakkında fikir vermesi için ATPE sisteminde ölçek büyütme çalışmaları yapılmıştır. Bu amaçla laboratuvar koşullarında 15 mL, 30 mL ve 45 mL olacak şekilde sistemler hazırlanmış ve antosiyanin miktarları ölçülmüş ve % Verim hesaplanmıştır. Elde edilen %Verim değerleri sırasıyla % 88,6, % 83,8 ve % 76,51 olarak bulunmuştur. **%Verim olarak benzer sonuçların elde edilmesiyle ATPE sisteminin ölçeklendirilebilir olduğu sonucu gösterilmiştir.**

- ATPE ile saflaştırılan siyah havuç antosiyaninlerinin tanımlanması için saflaştırılmış örnekte HPLC-MS çalışması yapılmıştır. Çalışma sonucunda elde edilen verilere göre siyah havuçta siyanidin türevi 4 farklı antosiyanidin tanımlanmış ve miktarları belirlenmiştir. Bu siyanidin türevi antosiyaninler ve miktarları sırasıyla; Cya 3-xyl-sin gluc-gal 4,45 mg/ml, Cya 3-xyl-fer-gluc-gal 72,54 mg/ml, Cya 3-xyl-p-coum-glc-gal 2,69 mg/ml ve Cya 3-xyl-galac+vinyl phen 1,90 mg/ml'dir. Cya 3-xyl-fer-gluc-gal türevinin en yaygın olan siyanidin türevi olduğu görülmüştür. **Açillenmiş antosiyanidin türevlerinin varlığı belirlenerek mikroenkapsülasyon koşullarına dayanıklı bir örnek hazırlandığı gösterilmiştir.** Bu aşamada saflaştırma sonrası örneğin renk analizi yapılmış, L*, a*, b*, C ve h değerleri belirlenmiştir. Bu değerler sırasıyla, (L*; 19,49 ± 0,2), (a* 1,38 ± 0,1), (b* 0,79 ± 0,1), (C 1,59) ve (h 29,8) olarak ölçülmüştür. **Renk değerleri belirlenerek gıdaların renklendirilmesine uygun olabilecek bir hammaddenin elde edildiği gösterilmiştir.**

- ATPE ile saflaştırılan siyah havuç antosiyaninleri püskürtmeli kurutma yöntemi ile mikroenkapsüle edilmiştir. Kurutma işleminin yapılması için besleme karışımı hazırlanmıştır. 300 mL'lik bir besleme karışımı hazırlamak için büyük ölçekte ATPE sistemleri hazırlanmış, üst fazlar ayrılarak toplanmış ve etanol içeriği evaporatör ile uzaklaştırılmıştır. Alkolü uzaklaşmış örneğe taşıma materyali olarak seçilen maltodextrin, kuru madde oranı % 6° Brix olacak şekilde ilave edilmiş ve besleme karışımı hazır hale getirilmiştir. Püskürtmeli kurutucunun giriş hava sıcaklığı 150°C ve hava çıkış sıcaklığı 127±5°C, besleme pompasının gücü % 10 olacak şekilde 3 saat çalıştırılarak kurutma işlemi gerçekleştirilmiştir.
- Kurutulmuş toz örneğin SEM ile partikül boyutu ve zetasizer ile partikül boyutu dağılımı gösterilmiştir. SEM sonuçlarından elde edilen değerler ile örneğin 1,5µm -24µm arasında geniş bir aralıkta boyuta sahip olduğu ve zetasizer ile partikül boyutu dağılımının 293,9 nm olduğu gösterilmiştir.
- Kurutulmuş toz örneğin içeriği belirlenmiş ve kararlılık çalışmaları yapılmıştır. Toz örneğin içeriğinin belirlenmesi için toplam antosiyanin, toplam karbonhidrat, flavonoid ve toplam fenolik bileşik miktarları ölçülmüştür. Elde edilen değerler sırasıyla 11,5 mg/100g, 0,439 mg, 16,5 mg ve 81,33 mg olarak bulunmuştur. **Toz örneğin içeriği belirlenerek renklendirici olarak kullanılması durumunda antosiyanin, fenolik bileşik ve flavonoid açısından değerli bir içeriğe sahip olduğu, toplam karbonhidrat açısından başlangıçtaki şeker miktarının azalmasından dolayı saflaştırma adımının etkili olduğu gösterilmiştir.** Toz örneğin kararlılık çalışmaları yapılarak depo kararlılığı, ısı kararlılığı ve pH kararlılığı belirlenmiştir. Toz örneğin depo kararlılığı (0. ve 60. gün), ısı kararlılığı (40°C-80°C) ve pH kararlılığı (1-6) aralığında incelenmiş ve geniş aralıklarda kararlılığını koruduğu yarılanma ömrünün 6,79 ay olduğu sonucuna varılmıştır. **Farklı yönlerden kararlılığının**

ortaya konulmasıyla elde edilen toz örneğin farklı endüstriyel alanlarda kullanılabileceği gösterilmiştir.

- Elde edilen toz örnek dondurmanın renklendirilmesinde kullanılmış ve renk değerleri ölçülmüştür. Toz örneğin renk değerleri sırasıyla ($L^*=31,6$, $a^*=1,4$, $b^*=3,4$, $C=3,7$ ve $h=67,1$) olarak bulunmuştur. **Saflaştırma sonrası renk değerleri ve mikroenkapsülasyon sonrası renk değerleri karşılaştırıldığında siyah havuç antosiyaninlerinin saflaştırma koşulları ve mikroenkapsülasyon koşullarından fazla etkilenmediği gösterilmiştir.** Farklı miktarlarda antosiyanin içeriğine sahip toz örnek ile yerel bir pastaneden alınan dondurmanın renklendirilmesi yapılmış ve renk değerleri ölçülmüştür. Elde edilen renk değerleri yardımıyla toplam renk farkı (ΔE) hesaplanmıştır. ΔE değerleri sırasıyla % 0,5 antosiyanin içeren örnekte 21,04, % 1 antosiyanin içeren örnekte 36,88 ve % 2 antosiyanin içeren örnekte 97,7 olarak bulunmuştur. **ΔE değerlerinin bulunmasıyla artan antosiyanin miktarına paralel olarak toplam renk farkının arttığı ve daha yoğun bir şekilde renklendirmenin sağlandığı gösterilmiştir.**

Dünyada son elli yılda, çalışan kadın nüfusunun katlanarak artması buna bağlı olarak bebek ve çocuk bakım hizmetlerine talebin artmasına, diğer taraftan, yaşlı nüfusun artması yaşlı bakım ve hizmetlerine talebin artmasına neden olmuştur. Bu noktalarda meydana gelen değişiklik beraberinde hazır ve işlenmiş gıdaya ihtiyacı çok yüksek oranda artırmıştır (Downham and Collins, 2000). Tüketiciler giderek daha fazla saf ve doğal gıda (ve dolayısıyla doğal renkler) talep ettikçe ve bu talebin neleri kapsadığı daha yakından incelendikçe, “gıdaları renklendirmenin” öneminin artması ve doğal ile eşanlı hale gelmesi kaçınılmaz olmuştur. Doğal renklendiricilere olan ilgi hem yasal düzenlemelerin hem de tüketicinin gıdalarında sentetik katkı maddelerinin kullanımına ilişkin farkındalığının bir sonucu olarak önemli ölçüde artmıştır (Giusti and Wrolstad, 2003). Antosiyanin pigmentlerinin bilinen en iyi doğal gıda boyaları olmalarına rağmen kullanımları henüz yaygın değildir. Antosiyaninler, antioksidan, anti-inflamatuar, antibakteriyel, anti-kanserojen ve kronik hastalıklara karşı

koruma dahil olmak üzere çok sayıda biyolojik aktiviteye ve terapötik özelliğe sahip olmalarından dolayı sentetik renklendiricilere alternatif olarak gıda ve kozmetik alanında giderek daha çekici hale gelmektedir (Zhang et al., 2020).

Antosiyaninlerin doğal gıda boyası olabilecek kadar güçlü renkli özellikleri ile birbirinden değerli biyolojik aktivite ve terapötik özelliklerinin birleştiği gıda katkı maddeleri geçmiş dönemde olduğu kadar gelecek dönemde de hem tüketicilerin hemde üreticilerin daima ilgisinin yüksek olduğu maddeler olduğu görülmektedir.



KAYNAKLAR DİZİNİ

- Akal, G. Y.**, 2019, Siyah Havuç Posasından Antosiyanin Ekstraksiyonu, Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 219s.
- Akdoğan, Ş.**, 2019, Kara Havuç Posasından Farklı Kurutma Yöntemleri Kullanılarak Kara Havuç Tozu Üretimi, Yüksek Lisans Tezi, Mersin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 70s.
- Akoğlu, İ. T.**, 2012, Konjuge Linoleik Asidin (Kla) Mikroenkapsülasyonu ve Kaplamalı Tavuk Eti Ürünlerinin Kla ile Zenginleştirilmesi, Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 120s.
- Algarra, M., Fernandes, A., Mateus, N., Freitas, V., Silva, J. C. G. E., and Casado, J.**, 2014, Anthocyanin profile and antioxidant capacity of black carrots (*Daucus carota L. ssp. sativus var. atrorubens Alef.*) from Cuevas Bajas, Spain, *Journal of Food Composition and Analysis*, 33(1):71-76 pp.
- Amine, K. M., Champagne, C. P., Salmieri, S., Britten, M., St-Gelais, D., Fustier, P., and Lacroix, M.**, 2014, Effect of palmitoylated alginate microencapsulation on viability of *Bifidobacterium longum* during freeze-drying, *LWT- Food Science and Technology*, 56(1):111-117 pp.
- Amr, A., and Al-Tamimi, E.**, 2007, Stability of the crude extracts of *Ranunculus asiaticus* anthocyanins and their use as food colourants, *International Journal of Food Science and Technology*, 42(8):985–991 pp.
- Ananga, A., Georgiev, V., Ochieng, J., Phills B., and Tsolova, V.**, 2013, Production of anthocyanins in grape cell cultures: a potential source of raw material for pharmaceutical, food, and cosmetic industries, *The Mediterranean Genetic Code- Grapevine and Olive*, 11:247-287 pp.
- Andres, C.**, 1977, Encapsulation ingredients: I., *Food Processing*, 38(12):44-56 pp.
- Asen, S., Stewart, R. N., and Norris, K. H.**, 1972, Copigmentation of anthocyanins in plant tissues and its effect on color, *Phytochemistry*, 11(3):1139-1144 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Assous, M. T. M., Abdel-Hady, M. M. and Medany, G. M.,** 2014, Evaluation of red pigment extracted from purple carrots and its utilization as antioxidant and natural food colorants, *Annals of Agricultural Sciences*, 59(1):1–7 pp.
- Azmir, J., Zaidul, I. S. M., Rahman, M. M., Sharif, K. M., Mohamed, A., Sahena, F., Jahurul, M. H. A., Ghafoor, K., Norulaini, N. A. N., and Omar, A. K. M.,** 2013, Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review, *Journal of Food Engineering*, 117(4): 426-436 pp.
- Bag, G. C., Devi, P. G. and Bhaigyabati, T.,** 2015, Assessment of total flavonoid content and antioxidant activity of methanolic rhizome extract of three Hedychium species of Manipur valley, *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 30(28): 154-159 pp.
- Bakker, J., Bridle, P., Bellworthy, S. J., Garcia-Viguera, C., Reader, H. P., and Watkins, S. J.,** 1998, Effect of Sulphur Dioxide and Must Extraction on Colour, Phenolic Composition and Sensory Quality of Red table Wine, *J. Sci. Agric.*, 78(3):297-307 pp.
- Bakowska, A., Kucharska, A. Z., and Oszmiański, J.,** 2003, The effects of heating, UV irradiation, and storage on stability of the anthocyanin–polyphenol copigment complex, *Food Chemistry*, 81(3): 349-355 pp.
- Baysal, A.,** 1999, Genel Beslenme, Hatipoğlu Yayınevi, Ankara, 278s.
- Benavides, J., Rito-Palomares, M., and Asenjo, J. A.,** 2011, Aqueous two-phase systems, *Comprehensive Biotechnology*, 697–713 pp.
- Bhandari, B., D’Arcy, B., and Padukka, I.,** 1999, Encapsulation of lemon oil by paste method using β -cyclodextrin: Encapsulation efficiency and profile of oil volatiles, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(12):5194-5197 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Binesh, N., Babaloo, H., and Farhadian, N.,** 2023, Microencapsulation: spray drying, 271-296, *Principles of Biomaterials Encapsulation*, Sefat, F., Farzi, G. and Mozafari, M. (Eds), Woodhead Publishing, Sawstone, 489p.
- Bkowska-Barczak, A.,** 2005, Acylated anthocyanins as stable, natural food colorants – a review, *Polish Journal Of Food And Nutrition Sciences*, 14/55(2):107-116 pp.
- Bloor, S. J.,** 1999, Novel pigments and copigmentation in the blue marguerite daisy, *Phytochemistry*, 50(8):1395-1399 pp.
- Brouillard, R., Wigand, M. C., Dangles, O., and Cheminat, A.,** 1991, pH and solvent effects on the copigmentation reaction of malvin with polyphenols, purine and pyrimidine derivatives. *Journal of the Chemical Society*, 2(8):1235–1241 pp.
- Bruneton, J.,** 1995, *Pharmacognosy, Phytochemistry, Medicinal Plants* 2nd ed., Lavoisier Publishing, Paris, 265p.
- Burgain, J., Gaiani, C., Linder, M., and Scher, J.,** 2011, Encapsulation of probiotic living cells: From laboratory scale to industrial applications, *Journal of Food Engineering*, 104(4):467-483 pp.
- Cavalcanti, R. N., Diego, T. S., and Maria, A. A. M.,** 2011, Non-thermal stabilization mechanisms of anthocyanins in model and food systems—An overview, *Food Research International*, 44(2): 499-509 pp.
- Carocho, M., Barreiro, M. F., Morales, P., and Ferreira, I. C.,** 2014, Adding Molecules to Food, Pros and Cons: A Review on Synthetic and Natural Food Additives, *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13(4):377-399 pp.
- Castañeda-Ovando, A., Pacheco-Hernández, M. de L., Páez-Hernández, M. E., Rodríguez, J. A., and Galán-Vidal, C. A.,** 2009, Chemical studies of anthocyanins: A review, *Food Chemistry*, 113(4):859-871 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Cemeroğlu, B., Yemenicioğlu, A. ve Özkan, M.,** 2009, Meyve ve sebzelerin bileşimi, Meyve ve Sebze İşleme Teknolojisi, Bizim Grup Basımevi, Ankara, 217s.
- Cevallos-Casals, B. A. and Cisneros-Zevallos L.,** 2004, Stability of anthocyanin-based aqueous extracts of Andean purple corn and red-fleshed sweet potato compared to synthetic and natural colorants, *Food Chemistry*, 86(1):69–77 pp.
- Chaitanya L. G.,** 2014, Food coloring: the natural way, *Research Journal of Chemical Sciences*, 4(2):87-96 pp.
- Chàvarri, M., Marañón, I. and Villaràn, M. C.,** 2012, Encapsulation technology to protect probiotic bacteria, *Probiotics*, 501-540 pp.
- Che Man, Y. B., Irwandi, J. and Abdullah, W. J. W.,** 1999, Effect of different types of maltodextrin and drying methods on physico-chemical and sensory properties of encapsulated durian flavour, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 79(8): 1075-1080 pp.
- Chu, I. M., and Chen, W. Y.,** 2000, Partition of amino acids and peptides in aqueous two-phase systems, 95-105, *Aqueous Two-Phase Systems: Methods And Protocols*, Hatti-Kaul, R. (Ed.), Humana Press, 440p.
- Cireli, A., Kutlu, B., Onar, N., ve Erkan, G.,** 2006, Tekstilde ileri teknolojiler, *Tekstil ve Mühendis*, 61:7-20 s.
- Clifford, M. N.,** 2000, Anthocyanins – nature, occurrence and dietary burden, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(7):1063-1072 pp.
- Cowan, M. M.,** 1999, Plant products as antimicrobial agents, *Clinical Microbiology Reviews* 12(4):564–582 pp.
- Çakmakçı, S.,** 2012, Gıda katkı maddeleri 7. Baskı, Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Ofset Tesisi, Erzurum, 249s.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Çam, M., İçyer, N.C. and Erdoğan, F.,** 2014, Pomegranate peel phenolics: Microencapsulation, storage stability and potential ingredient for functional food development, *LWT-Food Science and Technology*, 55 (1):117-123 pp.
- Çelik, F.,** 2012, Antosiyanin Glikozitlerinin Sentezi ve Karakterizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 146s.
- Çevik, K.,** 2017, Palm Yağı ve Fraksiyonlarının Püskürtmeli Kurutucu ile Mikroenkapsülasyonu, Yüksek Lisans Tezi, Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 93s.
- Dangles, O., Stoeckel, C., Wigand, M. C., and Brouillard, R.,** 1992, Two very distinct types of anthocyanin complexation: copigmentation and inclusion, *Tetrahedron Letters*, 33(36):5227-5230 pp.
- Das, A. B., Goud, V. V. and Das, C.,** 2019, Microencapsulation of anthocyanin extract from purple rice bran using modified rice starch and its effect on rice dough rheology, *International Journal of Biological Macromolecules*, 124:573-581 pp.
- De Ancos, B., Gonzalez, E., and Cano, M. P.,** 1999, Differentiation of raspberry varieties according to anthocyanin composition, *Z Lebensm Unters Forsch A*, 208(1):33– 38 pp.
- De Marco, R., Vieira, A. M. S., Ugri, M. C. A., Monteiro, A. R. G., and Bergamasco, R. D. C.,** 2013, Microencapsulation of annatto seed extract: stability and application, *Chemical Engineering Transactions*, 32:1777-1782 pp.
- Delgado-Vargas, F., Jiménez, A. R., and Paredes-López, O.,** 2000, Natural pigments: carotenoids, anthocyanins, and betalains-characteristics, biosynthesis, processing, and stability, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 40(3):173-289 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Dereli, U.**, 2010, Siyah Havuç Suyu Konsantresi Üretimi ve Depolanması Sürecinde Fenolik Maddelerdeki Değişimler ve Bu Değişimlerin Antioksidan Aktivite ile İlişkisi, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 80s.
- Desai, K. G. H., and Park, H. J.**, 2005, Recent developments in microencapsulation of food ingredients, *Drying Technology*, 23(7):1361-1394 pp.
- Desobry, S. A., Netto, F. M., and Labuza, T.**, 1997, Comparison of spray drying, drum drying, and freeze drying for beta carotene encapsulation and preservation, *Journal of Food Science*, 62(6):1158- 1162 pp.
- Dinç, M.**, 2007, Gıdalara Katılan Bazı Suda Çözünen Sentetik Boyaların Belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Namık Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 79s.
- Dinçel, E.**, 2015, Kakao Yağı Enkapsülasyonunun Çikolatada Yağ Kusmasına Etkisinin İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Aydın Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 85s.
- Donhowe, E. G., and Kong, F.**, 2014, Beta-carotene: digestion, microencapsulation, and invitro bioavailability, *Food and Bioprocess Technology*, 7(2):338–354 pp.
- Downham, A., and Collins, P.**, 2000, Colouring our foods in the last and next millennium, *International Journal of Food Science & Technology*, 35(1):5-22 pp.
- Du, C. T., and Francis, F. J.**, 1974, Anthocyanin of rosella, *J.of Food Sci.*, 38(5):810-812 pp.
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A. and Smith, F.**, 1956, Colorimetric method for determination of sugars and related substances, *Analytical Chemistry*, 28(3):350-356 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Duman, Ş.**, 2009, Püskürtmeli Kurutma Tekniği ile ZnO-PVA Kompozit Tozlarının Hazırlanması ve Bu Tozların Yüksek Sıcaklık Davranışlarının Etüdü, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 107s.
- Drusch, S.**, 2007, Sugar beet pectin: A novel emulsifying wall component for microencapsulation of lipophilic food ingredients by spray-drying, *Food Hydrocolloids*, 21(7):1223–1228 pp.
- Edris, A.E., Kalemba, D., Adamiec, J. and Piątkowski, M.**, 2016, Microencapsulation of *nigella sativa* oleoresin by spray drying for food and nutraceutical applications, *Food chemistry*, 204: 326-333 pp.
- Ekici, L.**, 2011, Üzüm Kabuğu, Siyah Havuç ve Kırmızı Lahanadan Ekstrakte Edilen Antosiyanin Bazlı Renk Maddelerinin Biyolojik Özelliklerinin Belirlenmesi ve Bazı Gıda Maddelerinde Renklendirici Olarak Kullanımı, Doktora Tezi, Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 270s.
- Ersus, S.**, 2006, Antosiyaninlerin ekstraksiyonu, tanımlanması ve antioksidant kapasitesi, *Akademik Gıda Dergisi*, 4(6):17-22 s.
- Ersus, S. and Yurdagel, U.**, 2007, Microencapsulation of anthocyanin pigments of black carrot (*Daucus carota L.*) by spray drier, *Journal of Food Engineering*, 80:805-812 pp.
- Eyüpoğlu, Ş., ve Kut, D.**, 2016, Mikrokapsülasyon teknolojisi ve tekstil sektöründe kullanımı, *İstanbul Ticaret Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 29;9-28 s.
- Fang, R., Redfern, S.P., Kirkup, D., Porter, E.A., Kite, G.C., Terry, L.A., Berry, M.J. and Simmonds, M. S. J.**, 2017, Variation of theanine, phenolic, and methylxanthine compounds in 21 cultivars of *Camellia sinensis* harvested in different seasons, *Food Chemistry*, 220:517–526 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Fang, Z., and Bhandari, B.,** 2012, Spray drying, freeze drying and related processes for food ingredient and nutraceutical encapsulation, 73-109, Encapsulation Technologies and Delivery Systems for Food Ingredients and Nutraceuticals, Nissim, G. and McClements, D.J. (Eds), Woodhead Publishing Limited, Cambridge, 640p.
- Fazaeli, M., Emam-Djomeh, Z., Ashtari, A.K. and Omid, M.,** 2012, Effect of spray drying conditions and feed composition on the physical properties of black mulberry juice powder. *Food and Bioproducts Processing*, 90(4):667–675 pp.
- Ferrari, C. C., Germer, S. P. M. and Aguirre, J. M.,** 2012, Effects of spray-drying conditions on the physicochemical properties of blackberry powder, *Drying Technology*, 30(2):154-163 pp.
- Fidan, M. N. H.,** 2014, Kara Havuç Ekstresinin Farklı Tekniklerle Enkapsülasyonu Ve İn Vitro Salım Kinetiğinin Belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 126s.
- Francis F. J., and Pericles C. M.,** 1989, Food colorants: anthocyanins, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 28(4):273-314 pp.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations, " Value of Agriculture Production", <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QV> (Erişim tarihi: 12 Temmuz 2023)
- Furtado, P., Figueiredo, P., Chaves das Neves, H., and Pina, F.,** 1993, Photochemical and thermal degradation of anthocyanidins, *J. Photochem. Photobiol. Chem.*, 75(2):113-118 pp.
- Gao, G., Chen, P., Chen, J., Chen, K., Wang, X., Abubakar, A.S., Liu, N., Yu, C. and Zhu, A.,** 2019, Genomic survey, transcriptome, and metabolome analysis of *Apocynum venetum* and *Apocynum hendersonii* to reveal major flavonoid biosynthesis pathways, *Metabolites*, 9:1–15 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Gharsallaoui, A., Roudaut, G., Chambin, O., Voilley, A., and Saurel, R.,** 2007, Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview, *Food Research International*, 40(9):1107-1121 pp.
- Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, 2013, Türk Gıda Kodeksi Gıda Katkı Maddeleri Yönetmeliği, *Resmî Gazete*, 28693, Ankara.
- Gibbs, B. F., Kermasha, S., Alli, I., and Mulligan, C. N.,** 1999, Encapsulation in the food industry: A review, *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 50(3):213-224 pp.
- Gil, M. I., Tomas-Barberan, F. A., Hess-Pierce, B., Holcroft, D. M. and Kader, A. A.,** 2000, Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(10):4581-4589 pp.
- Giusti, M. M., and Wrolstad, R. E.,** 2003, Acylated anthocyanins from edible sources and their applications in food systems, *Biochemical Engineering Journal*, 14(3):217-225 pp.
- Gonçalves, B., Landbo, A. K., Knudsen, D., Silva, A. P., Moutinho-Pereira, J., Rosa, E., and Meyer, A.S.,** 2004, Effect of ripeness and postharvest storage on the phenolic profiles of cherries (*prunus avium l.*), *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(3):523–530 pp.
- González-Valdez, J., Cueto, L. F., Benavides, J., and Rito-Palomares, M.,** 2011, Potential application of aqueous two-phase systems for the fractionation of RNase A and α -Lactalbumin from their PEGylated conjugates, *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 86(1):26–33 pp.
- Gökmen, S., Palamutoğlu, R., ve Sariçoban, C.,** 2012, Gıda Endüstrisinde Enkapsülasyon Uygulamaları, *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi*, 7(1):36-50 s.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Greve, A., and Kula M. R.,** 1991, Cost structure and estimation for the recycling of salt in a protein extraction process, *Bioprocess Engineering*, 6(4):173–177 pp.
- Guo, Y. X., Han, J., Zhang, D. Y., Wang, L. H. and Zhou, L. L.,** 2012, An ammonium sulfate/ethanol aqueous two-phase system combined with ultrasonication for the separation and purification of lithospermic acid B from *salvia miltiorrhiza bunge*. *Ultrasonics Sonochemistry*, 19(4):719–724 pp.
- Güleç, E.,** 2015, Sulu İkili Faz Sistemi ile Agaricus Bisporus Atıklarından Lakkaz Geri Kazanımı, Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 84s.
- Güler, Z., ve Kut, D.,** 2011, Poliester perdelik kumaşta ısı regülasyon sağlamaya yönelik mikrokapsül hazırlanması ve uygulanması, *Uludağ Üniversitesi Mühendislik-Mimarlık Fakültesi Dergisi*, 16 (1):105-115 s.
- Güngörmez, H.,** 2015, Doğal boyalar ve tuz, *Iğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 5(1): 57-63 s.
- Hansen, L. T., Allan-Wojtas, P., Jin, Y.-L., and Paulson, A.,** 2002, Survival of Ca-alginate microencapsulated Bifidobacterium spp. In milk and simulated gastrointestinal conditions, *Food Microbiology*, 19(1):35-45 pp.
- Harborne, J.B.,** 1998, Phytochemical Methods A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis Third Edition, Chapman and Hall, London, 317p.
- Hatti-Kaul, R.,** 2000, Aqueous two-phase systems, *Mol. Biotechnol.*, 19(3):269–277 pp.
- He, F., Li, D., Wang, D. and Deng, M.,** 2016, Extraction and purification of quercitrin, hyperoside, rutin, and afzelin from *zanthoxylum bungeanum* maxim leaves using an aqueous two-phase system, *Journal of Food Science*, 81(7):1593–1602 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Heim, K.E., Taglieferro, A.R., and Babilya, D.J.,** 2002, Flavanoid antioxxsidants: chemistry Metabolism and structure-activity relationship, *Journal of Nutritional Biochemisty*, 13(10):572-584 pp.
- Hendry, G. A. F., and Houghton, J. D.,** 1996, Natural Food Colorants, Springer-Science+Business Media, B.V., London, 363p.
- Hepsağ, F.,** 2015, Siyah Dut Meyvesinden Antosiyaninlerin Elde Edilmesi ve Elde Edilen Doğal Renk Maddesinin Gıda Sanayinde Kullanım Olanakları, Doktora Tezi, Harran Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 128s.
- Herrera, M., Viera, I. and Roca, M.,** 2023, Study of the authentic composition of the novel green foods: Food colorants and coloring foods, *Food Research International*, 170(112974):1-9 pp.
- Hosseinian, F. S., Li, W. and Beta, T.,** 2008, Measurement of anthocyanins and other phytochemicals in purple wheat, *Food Chemistry*, 109:916-924 pp.
- Hua, Z., Yuesheng, D., Ge, X., Menglu, L., Liya, D., LiJia, A. and Zhilong, X.,** 2013, Extraction and purification of anthocyanins from the fruit residues of *vaccinium uliginosum linn*, *Journal of Chromatography & Separation Techniques*, 4(2):1-5 pp.
- Huang, D., Ou, B. and Prior, R.L.,** 2005, The chemistry behind antioxidant capacity assays, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(6):1841-1856 pp.
- Huang, S., Wang, G., Lin, H., Xiong, L., Liu, X. and Li, H.,** 2021, Preparation and dynamic response properties of colorimetric indicator films containing pH-sensitive anthocyanins, *Sensors and Actuators Reports*, 3(100049):1-9 pp.
- Hummel, W., Schütte, H., and Kula, M. R.,** 1983, Large scale production of D-lactate dehydrogenase for the stereospecific reduction of pyruvate and phenylpyruvate. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, 18(2):75-85 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Idham, Z., Muhamad, I. I. and Sarmidi, M. R.,** 2012, Degradation kinetics and color stability of spray-dried encapsulated anthocyanins from Hibiscus sabdariffa L., *Journal of Food Process Engineering*, 35(4):522-542 pp.
- Ignat, I., Volf, I. and Popa, V. I.,** 2011, A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables, *Food Chemistry*, 126:1821–1835pp.
- Iqbal, M., Tao, Y., Xie, S., Zhu, Y., Chen, D., Wang, X., Huang, L., Peng, D., Sattar, A., Shabbir, M. A. B., Hussain, H. I., Ahmed, S., and Yuan, Z.,** 2016, Aqueous two-phase system (ATPS): an overview and advances in its applications, *Biological Procedures Online*, 18:1-18 pp.
- İlter, I., Akyl, S., Koç, M., ve Kaymak-Ertekin, F.,** 2017, Alglerden elde edilen ve gıdalarda doğal renklendirici olarak kullanılan pigmentler ve fonksiyonel özellikleri, *Türk Tarım-Gıda Bilim ve Teknoloji Dergisi*, 5(12):1508-1515 s.
- İstanbulu, Ö.,** 2007, Kara Havuç (Daucus Carota Var L.) Antosiyaninlerinin Ferulik Asit ile Kopigmentasyonu, Yüksek Lisans Tezi, Mersin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 46s.
- Jackman, R. L., Yada, R.T., Tung M.A., and Speers, R.A.,** 1987, Anthocyanins as food colorants-a review, *Journal of Food Biochemistry*, 11(3):201-247 pp.
- Jackman, R. L., and Smith, J. L.,** 1992, Anthocyanins and betalains. 183-241 Natural Food Colorants, Hendry, G.A. F., and Houghton, J. D. (Eds.), Blackie and Son Ltd, London, 66p.
- Jafari, S. M., Ghalegi Ghalenoei, M. and Dehnad, D.,** 2017, Influence of spray drying on water solubility index, apparent density, and anthocyanin content of pomegranate juice powder. *Powder Technology*, 311:59–65 pp.
- Jafari, S. M., Assadpoor, E., He, Y. and Bhandari, B.,** 2008, Encapsulation efficiency of food flavours and oils during spray drying, *Drying Technology*, 26(7):816–835 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Jampani, C., and Raghavarao, K. S. M. S.,** 2015, Differential partitioning for purification of anthocyanins from *Brassica oleracea L.*, *Separation and Purification Technology*, 151:57-65 pp.
- Javanmardi, J., Stushnoff, C., Locke, E. and Vivanco, J.M.,** 2003, Antioxidant activity and total phenolic content of Iranian Ocimum accessions, *Food Chemistry*, 83(4):547-550 pp.
- Jeyakumari, A., Zynudheen, A. A., and Parvathy, U.,** 2016, Microencapsulation of bioactive food ingredients and controlled release – a review, *MOJ Food Processing & Technology*, 2(6):214-224 pp.
- Junyaprasert, V. B., Mitrevej, A., Sinchaipanid, N., Boonme, P., and Wurster, D. E.,** 2001, Effect of process variables on the microencapsulation of vitamin a palmitate by gelatin-acacia coacervation, *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 27(6):561-566 pp.
- Jyothi, N. V. N., Prasanna, P. M., Sakarkar, S. N., Prabha, K. S., Ramaiah, P. S., and Srawan, G. Y.,** 2010, Microencapsulation techniques, factors influencing encapsulation efficiency, *Journal of Microencapsulation*, 27(3):187-197 pp.
- Kaderides, K., Mourtzinis, I. and Goula, A.M.,** 2020, Stability of pomegranate peel polyphenols encapsulated in orange juice industry by-product and their incorporation in cookies, *Food chemistry*, 310(125849):1-28 pp.
- Kähkönen, M. P., Heinämäki, J., Ollilainen, V., and Heinonen, M.,** 2003, Berry anthocyanins: isolation, identification and antioxidant activities, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 83(14):1403–1411 pp.
- Kahraman, S.,** 2019, Bazı Duvar Materyalleri ve Enkapsülasyon Tekniklerinin Zeytin Yaprağı Ekstraktının Mikroenkapsülasyonu Üzerine Etkilerinin İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Bursa Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 86s.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Kalt, W., Forney, C. F., Martin, A., and Prior, R. L.,** 1999, Antioxidant capacity, vitamin c, phenolics, and anthocyanins after fresh storage of small fruits, *J. Agric. Food Chem.*, 47(11):4638-4644 pp.
- Kandansamy, K., and Somasundaram, P.D.,** 2012, Microencapsulation of colors by spray drying-A review, *International Journal of Food Engineering*, 8(2):1-15 pp.
- Karaca, E.,** 2011, Nar Suyu Konsantresi Üretiminde Uygulanan Bazı İşlemlerin Fenolik Bileşenler Üzerine Etkisi, Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 157s.
- Kelebek, H., Canbas, A., Selli, S., Saucier, C., Jourdes, M. and Glories, Y.,** 2006, Influence of different maceration times on the anthocyanin composition of wines made from *Vitis vinifera* L. cvs. Boğazkere and Oküzgözü, *Journal of Food Engineering*, 77(4):1012–1017 pp.
- Kelebek, H.,** 2009, Değişik Bölgelerde Yetiştirilen Öküzgözü, Boğazkere ve Kalecik Karası Üzümlerinin ve Bu Üzümlerden Elde Edilen Şarapların Fenol Bileşikleri Profili Üzerinde Araştırmalar, Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 278s.
- Kelebek, H., Canbas, A., Jourdes, M. and Teissedre, P.L.,** 2011, HPLC-DAD-MS Determination of colored and colorless phenolic compounds in kalecik karasi wines: effect of different vineyard locations, *Analytical Letters*, 44(6):991-1008 pp.
- Kelebek, H., Jourdes, M., Selli, S. and Teissedre, P. L.,** 2013, Comparative evaluation of the phenolic content and antioxidant capacity of sun-dried raisins, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93(12):2963–2972 pp.
- Kelebek, H., Kadiroglu, P., Sonmezdag, A.S., Guclu, G., Kola, O. ve Selli, S.,** 2018, Fermente içeceğin biyoaktif bileşiklerinin ve antioksidan potansiyelinin karakterizasyonu: Şalgam, Uluslararası Hammaddelerden İşlenmiş Gıdalar Konferansı, 11–13 Nisan, <http://rpfoods2018.org/>.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Keskin, M., Güçlü, G., Şekerli, Y. E., Soysal, Y., Selli, S. ve Kelebek, H.,** 2021, Taze siyah havuçtan (*Daucus carota L.*) üç kurutma yöntemiyle hazırlanan tozların uçucu ve fenolik profillerinin karşılaştırmalı değerlendirmesi, *Scientia Horticulturae*, 287:110256 p.
- Khandare, V., Walia, S., Singh, M. and Kaur, C.,** 2011, Black carrot (*Daucus carota ssp. Sativus*) juice: Processing effects on antioxidant composition and color. *Food and Bioproducts Processing*, 89(4):482-486 pp.
- Khazaei, K. M., Jafari, S., Ghorbani, M. and Kakhki, A. H.,** 2014, Application of maltodextrin and gum Arabic in microencapsulation of saffron petal's anthocyanins and evaluating their storage stability and color, *Carbohydrate Polymers*, 105:57-62 pp.
- Khoo, H. E., Azlan, A., Tang, S. T. and Lim, S. M.,** 2017, Anthocyanidins and anthocyanins: colored pigments as food, pharmaceutical ingredients, and the potential health benefits, *Food & Nutrition Research*, 61(1):1361779.
- Kırca, A.,** 2004, Siyah Havuç Antosiyaninlerinin Bazı Meyve Ürünlerinde Isıl Stabilitesi, Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 109s.
- Kırca, A., Özkan, M and Cemeroglu B.,** 2003, Thermal stability of black carrot anthocyanins in blond orange juice, *Food and Environment*, 26(5):361–366 pp.
- Kocabıyık, S. ve Yurdagel, Ü.,** 1987, Kırmızı Üzüm Cibresinden Boyar Bileşiklerin Eldesi ve Gıda Sanayiinde Kullanım Olanakları Üzerine Araştırma, *Gıda*, 12(1): 47-53 s.
- Koç, M., Sakin, M., ve Kaymak, E. F.,** 2010, Mikroenkapsülasyon ve gıda teknolojisinde kullanımı, *Pamukkale Üniversitesi Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 16(1):77-86 s.
- Kondo, A.,** 1979, Microencapsulation utilizing phase separation from an aqueous solution system, *Microcapsule Processing and Technology*, Wade van Valkenburg, J. (Ed.), Marcel Dekker, Inc., New York, 70p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Kong, J. M., Chia, L. S., Goh, N. K., Chia, T. F., and Brouillard, R., 2003,** Analysis and biological activities of anthocyanins, *Phytochemistry*, 64(5):923-933 pp.
- Konuklu, Y., 2008,** Mikrokapsüllenmiş Faz Değiştiren Maddelerde Termal Enerji Depolama ile Binalarda Enerji Tasarrufu, Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 190s.
- Koo, S. Y., Cha, K. H., Song, D. G., Chung, D., and Pan, C. H., 2014,** Microencapsulation of peppermint oil in an alginate-pectin matrix using a coaxial electrospray system, *International Journal of Food Science and Technology*, 49(3):733-739 pp.
- Kroner, K. H., Schütte, H., Stach, W. and Kula, M. R., 2007,** Scale- up of formate dehydrogenase by partition, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 32(1):130-137 pp.
- Kumar, M., Dahuja, A., Sachdev, A., Tomar, M., Lorenzo, J. M., Dhumal, S., Radha, Deepak, C., Varghese, E., Saha, S., Sairam, K.V.S.S., Surinder, S., Senapathy, M., Amarowicz, R., Kaur, C., Kennedy, J. K., and Mekhemar, M., 2022,** Optimization of the use of cellulolytic enzyme preparation for the extraction of health promoting anthocyanins from black carrot using response surface methodology, *LWT*, 163(113528).
- Landy, P., Druaux, C. and Voilley, A., 1995,** Retention of aroma compounds by proteins in aqueous solution, *Food Chemistry*, 54(4):387-392 pp.
- Lazcano, C. A., Yoo, K. S. and Pike, L.M., 2001,** A method measuring anthocyanins after removing carotenes in purple colored carrots, *Scientia Horticulturae*, 90(3-4):312-324 pp.
- Lee, J., Durst, R. V., and Wrolstad, R. E., 2005,** Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines by the ph differential method: collaborative study, *Journal Of Aoac International*, 88(5):1269-1278 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Liu, X. D., Atarashi, T., Furuta, T., Yoshii, H., Aishima, S., Ohkawara, M., and Linko, P.,** 2001, Microencapsulation of emulsified hydrophobic flavors by spray drying, *Drying Technology*, 19(7):1361–1374 pp.
- Liu, X., Mu, T., Sun, H., Zhang, M. and Chen, J.,** 2013, Optimisation of aqueous two-phase extraction of anthocyanins from purple sweet potatoes by response surface methodology, *Food Chemistry*, 141(3):3034-304 pp.
- Machado, M. H., Almeida, A.R., Maciel, M. O. V. B., Vitorino, V. B., Bazzo, G. C., Rosa, C. G., Sganzerla, W. G., Mendes, C. and Barreto, P. L.M.,** 2022, Microencapsulation by spray drying of red cabbage anthocyanin-rich extract for the production of a natural food colorant, *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 39:10287p.
- Madene, A., Jacquot, M., Scher, J., and Desobry, S.,** 2006, Flavour encapsulation and controlled release – a review, *International Journal of Food Science and Technology*, 41(1):1-21 pp.
- Marco, R. P., and Benavides, J.,** 2017, [Food Engineering Series] Aqueous Two-Phase Systems for Bioprocess Development for the Recovery of Biological Products, Springer, Switzerland, 196p.
- Marcos, J.C., Fonseca, L.P., Ramalho, M.T. and Cabral, J.M.S.,** 1999, Partial purification of penicilin acylase from *Escherichia coli* in poly(ethylene glycol)-sodium citrate aqueous two-phase systems, *Journal of Chromatography B*, 734:15-22 pp.
- Markakis, P.,** 1982, Anthocyanins as Food Colors 1st Edition, Academic Press, London, 280p.
- Markham, K. R.,** 1982, Techniques of Flavonoid Identification, Academic Press, London, 1982.
- Martins, N., Roriz, C.L., Morales, P., Barros, L., and Ferreira, I.C.F.R.,** 2016, Food colorants: challenges, opportunities and current desires of agro-industries to ensure consumer expectations and regulatory practices, *Trends in Food Science & Technology*, 52:1-15 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Mathley, J., and Bushlg, B.**, 1998, Flavonoids In The Living System, Plenum Press, NewYork, 278p.
- Matsufuji, H., Otsuki, T., Takeda, T., Chino, M., and Takeda, M.**, 2003, Identification of reaction products of acylated anthocyanins from red radish with peroxy radicals, *J. Agric. Food Chem.*, 51(10):3157-3161 pp.
- Mazza, G., and Brouillard, R.**, 1987, Recent developments in the stabilization of anthocyanins in food products, *Food Chemistry*, 25(3):207–225 pp.
- Mercan, E. E.**, 2017, Farklı Elma Çeşitlerinde Antosiyanin Biyosentezinin Düzenlenmesinde Rol Oynayan Mdmyba, Mdmyb10 Ve Mdmyb3 Transkripsiyon Faktörlerinin Ekspresyonlarının Belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 81s.
- Mol, Z.**, 2016, Kırmızı Lahana (*Brassica Oleracea L.*)’Dan Ekstrakte Edilen Antosiyaninler ile Doğal Mavi Renk Maddesi Üretimi Ve Enkapsülasyon Tekniği İle Stabilitesinin Artırılması, Yüksek Lisans Tezi, On Dokuz Mayıs Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 95s.
- Montilla, E.C., Arzaba, M.R., Hillebrand, S. and Winterhalter, P.**, 2011, 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 pp.
- Mortensen, A.**, 2006, Carotenoids and other pigments as natural colorants, *Pure and Applied Chemistry*, 78(8):1477–1491 pp.
- Munin, A., and Edwards-Levy, F.**, 2011, Encapsulation of natural polyphenolic compounds; a review, *Pharmaceutics*, 3(4):793-829 pp.
- Murthy, K. N. C., Jayaprakasha, G. K., and Singh, R. P.**, 2002, Studies on antioxidant activity of pomegranate (*Punica granatum*) peel extract using in vivo models. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(1):4791-4795 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Müller-Maatsch, J., Gurtner, K., Carle, R. and Björn Steingass, C., 2019,** Investigation into the removal of glucosinolates and volatiles from anthocyanin-rich extracts of red cabbage, *Food Chemistry*, 278;406-414 pp.
- Mythili, K., Umamaheswara, R. C., Chamundeeswari, D. and Manna, P. K., 2014,** Determination of total phenol, alkaloid, flavonoid and tannin in different extracts of *Calanthe triplicate*, *Research and Review Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 2(2):40-44 pp.
- Nayak, C. A. and Rastogi, N. K., 2010,** Effect of Selected Additives on Microencapsulation of Anthocyanin by Spray Drying, *Drying Technology: An International Journal*, 28(12):1396-1404 pp.
- Nebesky, E. A., Esselen, W. B., McConnell, J. E. W. and Fellers, C. R., 1949,** Stability of color in fruit juices, *Food Research*, 14:261-274 pp.
- Nedovic, V., Kalusevic, A., Manojlovic, V., Levic, S. and Bugarski, B., 2011,** An overview of encapsulation technologies for food applications, *Procedia Food Science*, 1:1806-1815 pp.
- Netzel, M., Netzel, G., Kammerer, D. R., Schieber, A., Carle, R., Simons, L., Bitsch, I., Bitsch, R. and Konczak, I., 2007,** Cancer cell antiproliferation activity and metabolism of black carrot anthocyanins, *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 8(3):0-372 pp.
- Odabaş, H. İ., 2019,** Siyah Kuşburnu (*Rosa Pimpinellifolia L.*) Meyvesinden Sulu İki Faz Sistemiyle Antosiyanin Ekstraksiyonu ve Mikroenkapsülasyonu, Doktora Tezi, On Dokuz Mayıs Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 201s.
- Okurkan, M., 2018,** Karamuk (*Berberis Crataegina*) Antosiyaninlerinin Enkapsülasyonu ve Dondurma Üretiminde Kullanılabilirliğinin İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Cumhuriyet Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 111s.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Ooi, C. W., Tey, B. T., Hii, S. L., Kamal, S. M. M., Lan, J. C. W., Ariff, A. and Ling, T. C.,** 2009, Purification of lipase derived from *Burkholderia pseudomallei* with alcohol/salt-based aqueous two-phase system, *Process Biochemistry*, 44(10):1083–1087 pp.
- Özcan, T. ve Altun, B.,** 2013, Süt ürünlerinde probiyotik bakterilerin mikroenkapsülasyonu: enkapsülasyon teknikleri, *Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 27 (2):93-104 ss.
- Özen, G.,** 2008, Siyah Havuç Suyu Konsantresinin Türk Lokumunda Renklendirici Olarak Kullanılması ve Depolama Stabilitésinin Belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 80s.
- Özgün, N.,** 2015, Nane Uçucu Yağının Siklodekstrinler ile Mikroenkapsülasyonu, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 57s.
- Özkan, M.,** 2019, Siyah Havuç Suyu Konsantresi Üretimi ve Depolanması Sürecinde Fenolik Maddeler ve Antosiyaninlerdeki Değişimler ve Bu Değişimlerin Antioksidan Aktivite ile İlişkisi, Bilimsel Araştırma Projesi Kesin Raporu, Ankara Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri, 106s.
- Pan, I. H., Chiu, H. H., Lu, C. H., Lee, L. T. and Li, Y. K.,** 2002, Aqueous two-phase extraction as an effective tool for isolation of geniposide from gardenia fruit, *Journal of Chromatography A*, 977(2):239-246 pp.
- Paulo, F., and Santos, L.,** 2016, Design of experiments for microencapsulation applications: A review, *In Materials Science and Engineering C.*, 77:1327-1340 pp.
- Phong, W. N., Show, P. L., Chow, Y. H. And Ling, Tau, C.,** 2018, Recovery of biotechnological products using aqueous two phase systems, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 20(20):1-9 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Pınarbaşı, N.**, 2023, Nar Kabuğu Kaynaklı Ellajik Asitin Biyoyararlılığını Artırmaya Yönelik Mikroenkapsülasyon Çalışmaları, Yüksek Lisans Tezi, Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 96s.
- Prior, R.L., Wu, X. and Scaich, K.**, 2005, Standardized methods for the determination antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(10):4290-4302 pp.
- Raja, S., Murty, V. R., Thivaharan, V., Rajasekar, V., and Ramesh, V.**, 2011, Aqueous two phase systems for the recovery of biomolecules – A Review, *Science and Technology*, 1(1): 7-16 pp.
- Rajapaksha, G. K., Wansapala, J. M., and Silva, A. B.**, 2015, Detection of synthetic colours in selected foods & beverages available in Colombo district, Sri Lanka, *International Journal of Science and Research*, 6(5):801-808 pp.
- Rakić, V., Rinnan, A., Polak, T., Skrtić, M., Miljković, M. and Ulrih, N. P.**, 2019, pH-induced structural forms of cyanidin and cyanidin 3-O- β -glucopyranoside, *Dyes and Pigments*, 165:71-80 pp.
- Rein, M.**, 2005, Copigmentation reactions and color stability of berry anthocyanins. PhD thesis, University of Helsinki, 87p.
- Rezende, Y. R. R. S., Nogueira, J. P. and Narain, N.**, 2018, Microencapsulation of extracts of bioactive compounds obtained from acerola (*Malpighia emarginata* DC) pulp and residue by spray and freeze drying: Chemical, morphological and chemometric characterization. *Food Chemistry*, 254:281-291 pp.
- Righi da Rosa, J., Nunes, G. L., Motta, M. H., Fortes, J. P., Cezimbra Weis, G. C., Rychecki Hecktheuer, L. H., Muller, E. I., Ragagnin de Menezes, C. and Severo da Rosa, C.**, 2019, Microencapsulation of anthocyanin compounds extracted from blueberry (*Vaccinium* spp.) by spray drying: characterization, stability and simulated gastrointestinal conditions, *Food Hydrocolloids*, 89:742-748 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Righi da Rosa, J., Weis, G. C.C., Moro, K.I.B., Robalo, S. S., Assmann, C. E., Silva, L. P., Muller, E. I., Silva, C. B., Menezes, C. R. and Rosa, C. S.,** 2021, Effect of wall materials and storage temperature on anthocyanin stability of microencapsulated blueberry extract, *LWT- Food Science and Technology*, 142:111027p.
- Risch, S. J.,** 1995, Encapsulation: overview of uses and techniques, 2-7, Encapsulation and Controlled Release Of Food Ingredients, Risch, S. J. and Reineccius, G. A. (Eds), American Chemical Society, 214p.
- Rito-Palomares, M.,** 2004, Practical application of aqueous two-phase partition to process development for the recovery of biological products, *Journal of Chromatography B*, 807(1):3–11 pp.
- Rito-Palomares, M. and Lozano, J.A.B.,** 2017, Aqueous Two-Phase Systems for Bioprocess Development for the Recovery of Biological Products, Food Engineering Series, Springer, Cham, 196p.
- Rocha-Selmi, G. A., Theodoro, A. C., Thomazini, M., Bolini, H. M. A., and Favaro-Trindade, C. S.,** 2013, Double emulsion stage prior to complex coacervation process for microencapsulation of sweetener sucralose, *Journal of Food Engineering*, 119(1):28–32 pp.
- Rosenberg, M., Kopelman, I. J. and Talmon, Y.,** 1985, A scanning electron microscopy study of microencapsulation, *Journal of Food Science*, 50(1):139-144 pp.
- Sadilova, E., Stintzing, F.C. and Carle, R.,** 2006, Thermal Degradation of Acylated and Nonacylated Anthocyanins, *Journal of Food Science*, 71(8):504-512 pp.
- Saldamli, İ.,** 2007, Gıda Kimyası, Hacettepe Üniversitesi Yayınları.
- Santos, M. G., Bozza, F. T., Thomazini, M., and Favaro-Trindade, C. S.,** 2015, Microencapsulation of xylitol by double emulsion followed by complex coacervation, *Food Chemistry*, 171:32–39 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Sarier, N., and Onder, E.,** 2012, Organic phase change materials and their textile applications: An overview, *Thermochimica Acta*, 540:7– 60 pp.
- Šavikin, K., Nastić, N., Janković, T., Bigović, D., Miličević, B., Vidović, S., Menković, N. and Vladić, J.,** 2021, Effect of type and concentration of carrier material on the encapsulation of pomegranate peel using spray drying method, *Foods*, 10 (9): 1968p.
- Schwarz, M., Wray, V., and Winterhalter, P.,** 2004, Isolation of Novel Pyranoanthocyanins from Black Carrot (*Daucus carota L.*) Juice, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(16):5095-5101 pp.
- Schindler, J. and Nothwang, H.G.,** 2006, Aqueous polymer two-phase systems: effective tools for plasma membrane proteomics, *Proteomics*, 6(20):5409–5417 pp.
- Sezgin, A. C. ve Ayyıldız, S.,** 2019, Çocukların tükettiği atıştırmalık gıdalarda kullanılan renklendiricilere ilişkin bir araştırma, *Uluslararası Toplum Araştırmaları Dergisi*, 11(18):879-913 s.
- Shahidi, F., and Han, X. Q.,** 1993, Encapsulation of food ingredients, *Food Science and Nutrition*, 33(6):501-547 pp.
- Shamaei, S., Seiedlou, S. S., Aghbashlo, M., Tsotsas, E. and Kharaghani, A.,** 2017, Microencapsulation of walnut oil by spray drying: Effects of wall material and drying conditions on physicochemical properties of microcapsules, *Innovative food science & emerging technologies*, 39:101-112 pp.
- Sharif, N., Khoshnoudi-Nia, S. and Mahdi Jafari, S.,** 2020, Nano/microencapsulation of anthocyanins; a systematic review and meta-analysis. *Food Research International*, 132:109077 p.
- Sharipova, A. A., Aidarova, S. B., Grigoriev, D., Mutalieva, B., Madibekova, G., Tleuova, A., and Miller, R.,** 2016, Polymer-surfactant complexes for microencapsulation of vitamin E and its release, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 137:152–157 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Shi, X. Y. and Tan, T. W.**, 2002, Preparation of chitosan/ethylcellulose complex microcapsule and its application in controlled release of Vitamin D₂, *Biomaterials*, 23(23):4469–4473 pp.
- Sigurdson, G. T., Tang, P. and Giusti, M. M.**, 2017, Natural colorants: Food colorants from natural sources, *Annual Review of Food Science and Technology*, 8(1):261-280 pp.
- Silva, L. V., Nelson, D. L., Drummond, M. F. B., Dufossé, L. and Glória, M. B. A.**, 2005, Comparison of hydrodistillation methods for the deodorization of turmeric, *Food Research International*, 38 (8–9):1087–1096 pp.
- Smeriglio, A., Barreca, D., Bellocco, E. and Trombetta, D.**, 2016, Chemistry, pharmacology and health benefits of anthocyanins, *Phytotherapy Research*, 30(8):1265-1286 pp.
- Smeriglio, A., Denaro, M., Barreca, D., D'Angelo, V., Germanò, M.P. and Trombetta, D.**, 2017, Polyphenolic profile and biological activities of black carrot crude extract (*Daucus carota L. ssp. sativus var. atrorubens Alef.*), *Fitoterapia*, 124:49- 57 pp.
- Smith, K.**, 1992, Solid Supports and Catalysts in Organic Synthesis, Ellis Horwood and PTR Prentice Hall, New York, 338p.
- Stintzing, F. C. and Carle, R.**, 2004, Functional properties of anthocyanins and betalains in plants, food and in human, *Trends in Food Science and Technology*, 15(1):19-38 pp.
- Şimşek H.**, 2011, Gıda Katkı Maddeleri Rehberi (2. Baskı), Lemi Yayınları, İstanbul, 300s.
- Tanriseven, D., Kadiroglu, P., Selli, S. ve Kelebek, H.**, 2020, Şalgamlardaki fenolik bileşiklerin LC-DAD-ESI-MS/MS destekli aydınlatılması: Geleneksel ve doğrudan yöntemlerin karşılaştırılması, *Food Chemistry*, 305:125505 s.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Timberlake, C. F. and Bridle, P.**, 1980, Anthocyanins, In: Developments in food colours, Walford Applied Science Publishers, London, 115–149 pp.
- Tiwari, B. K., Muthukumarappan, K., O'Donnell, C. P. and Cullen, P. J.**, 2008, Effects of Sonication on the Kinetics of Orange Juice Quality Parameters. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(7):2423–2428 pp.
- Tonon, R. V., Brabet, C. and Hubinger, M. D.**, 2010, Anthocyanin stability and antioxidant activity of spray-dried açai (*Euterpe oleracea* Mart.) juice produced with different carrier agents, *Food Research International*, 43(3):907–914 pp.
- Tontul, I.**, 2011, Keten Tohumu Yağının Püskürterek Kurutmayla Mikroenkapsülasyonu Üzerine Farklı Taşıyıcı Madde ve Emülsiyon Uygulamalarının Etkilerinin Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 85s.
- Torskangerpoll, K. and Andersen Ø. M.**, 2005, Colour stability of anthocyanins in aqueous solutions at various pH values, *Food Chemistry*, 89(3):427–440 pp.
- Türkiye İstatistik Kurumu, "Bitkisel Üretim İstatistikleri", <https://data.tuik.gov.tr/Bulten/Index?p=Bitkisel-Uretim-Istatistikleri-2022-45504> (Erişim tarihi: 12 Temmuz 2023)
- Türkiye Patent ve Marka Kurumu, "Coğrafi İşaret Sicil Belgesi", <https://ci.turkpatent.gov.tr/Files/GeographicalSigns/fb6c5a1f-8bc1-49f9-9a0d-6e41914716f5.pdf> (Erişim tarihi: 12 Temmuz 2023)
- Umer, H., Nigam, H., Tamboli, A. M. and Nainar, M. S. M.**, 2011, Microencapsulation: Process, techniques and applications, *International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences*, 2(2):474- 481 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Uyan, E. S.**, 2004, Kara Havuç (*Daucus carota* L.) Antosiyanin Ekstraktının Püskürtmeli Kurutucu Kullanılarak Mikroenkapsülasyonu, Doktora Tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 189 s.
- Uysal, V.**, 2000, Kara Havuçtaki Renk Maddelerinin (Antosiyaninlerin) Ekstraksiyonu ve Özelliklerinin İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 71 s.
- Uzuner, S., Onsekizoglu, P. ve Acar, J.**, 2011, Üretim teknikleri ve soğukta depolamanın nar suyundaki ellajik asit miktarı ve bazı kalite parametreleri üzerine etkileri, *Gıda Dergisi*, 36 (5): 263-269 s.
- Xie, M., Guo, Y. and Li, L.**, 2012, Aqueous two-phase extraction of flavonoids from *artemisia argyi* leaves using an ethanol-ammonium sulfate system, *Advanced Materials Research*, 524(527):2254–2258 pp.
- Xie, R., Zheng, L., He, S., Zheng, Y., Yi, S. and Deng, L.**, 2011, Anthocyanin biosynthesis in fruit tree crops: genes and their regulation, *African Journal of Biotechnology*, 10(86):19890-19897 pp.
- Vankar, P. S.**, 2004, Essential oils and fragrances from natural sources, *Resonance*, 9(4):30–41 pp.
- Vermerris W. and Nicholson R.**, 2006, Phenolic Compound Biochemistry, Springer, Dordrecht, 285s.
- Vural, E.**, 2017, Karanfil Çiçeğinden Antosiyanin Ekstraktı Eldesi ve Doğal Gıda Renklendiricisi Olarak Stabilitesinin İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 102s.
- Wandrey, C., Bartkowiak, A. and Harding, S.E.**, 2010, Materials for encapsulation, 31-101, Encapsulation Technologies for Active Food Ingredients and Food Processing, Zuidam, N. J. and Viktor, N. (Eds), Springer, New York, 391p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Wang, S., Shi, Y. and Han, L.,** 2018, Development and evaluation of microencapsulated peony seed oil prepared by spray drying: Oxidative stability and its release behavior during in-vitro digestion, *Journal of Food Engineering*, 231:1-9 pp.
- Weber, F., Boch, K. and Schieber, A.,** 2017, Influence of copigmentation on the stability of spray dried anthocyanins from blackberry, *LWT-Food Science and Technology*, 75:72–77 pp.
- Woo, A. H., Elbe, J. H. and Amundson, C. H.,** 1980, Anthocyanin Recovery From Cranberry Pulp Wastes by Membrane Technology, *J.of Food Sci.*, 45(4):875- 879 pp.
- Woodward, G., Kroon, P., Cassidy, A. and Kay, C.,** 2009, Anthocyanin stability and recovery: implications for the analysis of clinical and experimental samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(12):5271–5278 pp.
- Wrolstad, R. E.,** 2004, Anthocyanin pigments-bioactivity and coloring properties, *Journal of Food Science*, 69(5):419–421pp.
- Wu, Y., Wang, Y., Zhang, W., Han, J., Liu, Y., Hu, Y. and Ni, L.,** 2014, Extraction and preliminary purification of anthocyanins from grape juice in aqueous two-phase system, *Separation and Purification Technology*, 124:170–178 pp.
- Wu, X., Liang, L., Zou, Y., Zhao, T., Zhao, J., Li, F. and Yang, L.,** 2011, Aqueous two phase extraction, identification and antioxidant activity of anthocyanins from mulberry (*Morus atropurpurea* Roxb.), *Food Chemistry*, 129(2):443-453 pp.
- Yalavarthi C, S. and Thiuruvengadarajan V. S.,** 2013, A review on identification strategy of phyto constituents present in herbal plants, *International Journal of Research in Pharmaceutical Science*, 4(2):123-140 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Yang, L. and Lü, J.**, 2016, Microwave-assisted aqueous two-phase extraction of the total flavonoids from taraxacum mongolicum, *Academia Journal of Scientific Research*, 4(11): 380-392 pp.
- Yang, Z., Peng, Z., Li, J., Li, S., Kong, L., Li, P. and Wang, Q.**, 2014, Development and evaluation of novel flavour microcapsules containing vanilla oil using complex coacervation approach, *Food Chemistry*, 145:272- 277 pp.
- Yang, W., Kaimainen, M., Järvenpää, F., Sandell, M., Huopalahti, R., Yang, B. and Laaksonen, O.**, 2021, Red beet (*Beta vulgaris*) betalains and grape (*Vitis vinifera*) anthocyanins as colorants in white currant juice – Effect of storage on degradation kinetics, color stability and sensory properties, *Food Chemistry*, 348:128995 p.
- Yekdane, N. and Goli, S. A. H.**, 2019, Effect of pomegranate juice on characteristics and oxidative stability of microencapsulated pomegranate seed oil using spray drying, *Food and Bioprocess Technology*, 12(9):1614-1625 pp.
- Yıldız, F. ve Dikmen, D.**, 1988, Kırmızı Üzüm ve Kırmızı Üzüm Kabuğundan Antosiyaninlerin Özütlenmesi, Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Grubu, TÜBİTAK, Ankara, 51s.
- Zhang, R., Zhou, L., Li, J., Oliveira, H., Yang, N., Jin, W. and He, J.**, 2020, Microencapsulation of anthocyanins extracted from grape skin by emulsification/internal gelation followed by spray/freeze-drying techniques: Characterization, stability and bioaccessibility, *LWT- Food Science and Technology*, 123(109097).
- Zhinsen, J., Mengcheng, T. and Jianming, W.**, 1999, The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals, *Food Chemistry*, 64(4):555-559 pp.

TEŞEKKÜR

Lisans eğitimi ile başlayan ve doktora eğitimime kadar geçen süreçte desteğini, sınırsız bilgi ve tecrübelerini, anlayışını ve güler yüzünü her zaman hissettiğim değerli danışmanım Prof. Dr. Seçil ÖNAL'a, doktora eğitim sürem boyunca hep yanımda hissettiğim, tez izleme kurulu toplantılarında kattığı değerli fikir ve yönlendirmelerinden, laboratuvar çalışmalarında deneyim ve katkılarından yararlandığım değerli hocam Prof. Dr. Şenay ŞANLIER'e, doktora eğitim sürem boyunca tez izleme kurulu toplantılarında verdiği fikir ve yönlendirmelerinden yararlandığım değerli hocam Doç. Dr. Seda ERSUS'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarım esnasında belirli dönemlerde laboratuvar imkanlarından ve kıymetli bilgilerinden yararlandığım değerli hocam Prof. Dr. Haşim KELEBEK ve öğrencilerine teşekkürlerimi sunarım. Tez çalışmamda destek aldığım ve bilgilerine başvurduğum değerli araştırmacı Levent Yasin Kurt'a teşekkür ederim.

Tezimin laboratuvar çalışmalarını gerçekleştirdiğim Biyokimya Araştırma Laboratuvarında birlikte çalıştığım, cihaz, malzeme ve yardımlarını esirgemeyen tüm doktora ve yüksek lisans öğrencilerine çok teşekkür ederim.

Bugüne birlikte geldiğim, uzun doktora eğitim süreci ve diğer tüm zamanlarda yanımda olan, sevgi ve sabırlarını esirgemeyen başta annem Hatice ÇELEBİ, eşim Murat DEMİRKAN, oğlum Yiğit Utkan DEMİRKAN ve kızım Azra DEMİRKAN'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

08 / 03 / 2024

İmzası

Adı-Soyadı

ÖZGEÇMİŞ

Gamze DEMİRKAN

Biyokimya Ağırlıklı Kimyager

EĞİTİM

1994-1998 Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü, Lisans

2007-2009 Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü,
Yüksek Lisans

2015-2023 Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoteknoloji Anabilim
Dalı, Doktora

YAPMIŞ OLDUĞU TEZLER

Yüksek Lisans- *Climacocystis borealis*'den β -glukozidaz enziminin
saflaştırılması ve karakterizasyonu, 2009, Trabzon

Doktora- Siyah Havuçtan Antosiyaninlerin Saflaştırılması ve Gıda Sanayisinde
Kullanılabilirliğinin Araştırılması, 2023, İzmir