T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SAFRANDAN GIDA BOYASI ÜRETİMİ VE MİKROENKAPSÜLASYONU

YÜKSEL BAYRAM

DOKTORA TEZİ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI
GIDA MÜHENDİSLİĞİ PROGRAMI

DANIŞMAN
PROF. DR. OSMAN SAĞDIÇ

İSTANBUL, 2019

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SAFRANDAN GIDA BOYASI ÜRETİMİ VE MİKROENKAPSÜLASYONU

Yüksel BAYRAM tarafından hazırlanan tez çalışması 05.04.2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı'nda **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı
Prof. Dr. Osman SAĞDIÇ
Yıldız Teknik Üniversitesi

Eş Danışman
Dr. Öğr. Üyesi Salih KARASU
Yıldız Teknik Üniversitesi

Jüri Üyeleri
Prof. Dr. Osman SAĞDIÇ
Yıldız Teknik Üniversitesi _____

Prof. Dr. Muhammet ARICI
Yıldız Teknik Üniversitesi _____

Prof. Dr. Tuncay GÜMÜŞ
Namık Kemal Üniversitesi _____

Doç. Dr. Lütfiye EKİCİ
Erciyes Üniversitesi _____

Dr. Öğr. Üyesi Görkem ÖZÜLKÜ
Yıldız Teknik Üniversitesi _____

Bu çalışma, TÜBİTAK-Bilim İnsanı Destek Programları (BİDEB), 2211-A Genel Yurt İçi Doktora Burs Programı tarafından desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Doktora çalışmalarım boyunca engin bilgi birikimleri ve tecrübeleriyle beni yönlendiren, ilgi ve yardımlarıyla bana her konuda, her zaman destek olan, birlikte çalışmaktan onur duyduğum çok kıymetli danışman hocam sayın Prof. Dr. Osman SAĞDIÇ'a sonsuz saygı ve şükranlarımı sunuyorum.

Tez çalışmalarım süresince, çok yoğun olmasına rağmen her zaman vaktini ayırıp, özverili yaklaşımlarıyla bana yardımcı olan ve yol gösteren eş danışman hocam sayın Dr. Öğr. Üyesi Salih KARASU'ya en içten teşekkürlerimi sunuyorum.

Lisans, yüksek lisans ve doktora sürecinde bilgi, tecrübe ve destekleriyle kazandırdıkları her şey için, çok değerli hocam sayın Prof. Dr. Muhammed ARICI'ya saygı ve teşekkürlerimi sunuyorum.

Tez çalışmalarım boyunca, özellikle analiz aşamasında titizlikle bana yardımcı olan, varlığını her zaman yanımda hissettiğim ve her konu da katkısını gördüğüm çok sevgili arkadaşım Kübra ÖZKAN'a sonsuz teşekkür ederim.

TÜBİTAK-Bilim İnsanı Destek Programları (BİDEB), (2211-A Genel Yurt İçi Doktora Burs Programı)'na destekleri için teşekkür ederim.

Ayrıca, hayatım boyunca hiçbir konuda benden desteklerini esirgemeyen ve her zaman yanımda olan canım aileme sonsuz şükranlarımı sunarım.

Nisan, 2019

Yüksel BAYRAM

İÇİNDEKİLER

Sayfa

SİMGE LİSTESİ viii

KISALTMA LİSTESİ ix

ŞEKİL LİSTESİ xi

ÇİZELGE LİSTESİ xii

ÖZET xiii

ABSTRACT xv

BÖLÜM 1

GİRİŞ 1

1.1 Literatür Özeti 2
1.2 Tezin Amacı 8
1.3 Hipotez 9

BÖLÜM 2

KURAMSAL TEMELLER 10

2.1 Gıda Boyaları 10
2.1.1 Sentetik Gıda Boyaları 13
2.1.2 Doğala Özdeş Gıda Boyaları 16
2.1.2.1 Karamel 16
2.1.2.2 Klorofilinler ve Bakır Kompleksleri 18
2.1.3 Doğal Gıda Boyaları 19
2.1.3.1 Antosiyaninler 20
2.1.3.2 Klorofiller 22
2.1.3.3 Betalainler 24
2.1.3.4 Koşinel, Karminik Asit, Karminler 25
2.1.3.5 Mikroorganizmalar (*Monascus* kırmızısı) 26
2.1.3.6 İridoidler 27
2.1.3.7 Karotenoidler 28
2.1.3.7.1 Doğal Renk Maddesi Olarak Karotenoidler 32
2.1.3.7.2 Karotenoidlerin Ekstraksiyonu 33

2.1.3.7.3 Karotenoid Ekstraksiyon Yöntemleri 34
2.1.3.7.4 Karotenoidlerin Tespiti ve Tanımlanması 35
2.1.3.7.5 Karotenoidlerin Sağlık Üzerine Etkileri 36
2.2 Safran 38
2.2.1 Safranın Sağlık Üzerine Etkileri 43
2.3 Ultrasonografi Teknolojisi 46
2.4 Mikroenkapsülasyon Teknolojisi 49

BÖLÜM 3

MATERYAL ve YÖNTEM 53

3.1 Materyal 53
3.2 Yöntem 54
3.2.1 Krosin Pigmenti İçin Ekstraksiyon Optimizasyonu (RSM) ve Ekstraktlara Uygulanan Analizler 54
3.2.1.1 Krosin Ekstraksiyonunun Optimizasyonu 54
3.2.1.2 Ultrasonik Su Banyosu ile Safranın Ekstraksiyon İşlemleri 54
3.2.1.3 pH Analizleri 55
3.2.1.4 Toplam Fenolik Madde Miktarı Tayini 55
3.2.1.5 Toplam Flavonoid Madde Miktarı Tayini 56
3.2.1.6 Antioksidan Kapasite Tayini (CUPRAC Yöntemi) 56
3.2.1.7 Renk Analizleri 57
3.2.1.8 Krosin İçeriğinin Belirlenmesi 57
3.2.2 Mikroenkapsülasyon Üretimi ve Kapsüllere Uygulanan Analizler 58
3.2.2.1 Mikroenkapsülasyon için Safran Ekstraktının Hazırlanması 58
3.2.2.2 Ekstraktların Evaporatör ile Konsantre Edilmesi 58
3.2.2.3 Mikroenkapsülasyon İçin Çözeltinin Hazırlanması 59
3.2.2.4 Püskürtmeli Kurutucuda Mikroenkapsülasyon 59
3.2.2.5 Nem Tayini 60
3.2.2.6 Enkapsülasyon Etkinliğinin Belirlenmesi (EE) 60
3.2.2.7 Mikrokapsüllerin Mikroyapısal Özelliklerinin Belirlenmesi 60
3.2.2.8 Mikrokapsüllerde Toplam Fenolik ve Flavonoid Madde Miktarı Tayini 61
3.2.2.9 Mikrokapsüllerde Antioksidan Kapasite Tayini 61
3.2.2.10 Mikrokapsüllerde Renk Analizi 61
3.2.2.11 Safranın ve Mikrokapsüllerin Aroma Profillerinin Belirlenmesi 61
3.2.2.12 Krosin Mikrokapsüllerinin Bozunma Kinetiği 62
3.2.2.13 İstatistiksel Analiz 62
3.2.3 Mikrokapsül Gıda Boyasının Meyve Suyunu Renklendirme Amacıyla Kullanımı 63
3.2.4 Renklendirilen Model Sistemlerde Yapılan Analizler 63
3.2.4.1 Meyve Sularında Toplam Fenolik, Flavanoid Madde Tayini 63
3.2.4.2 Meyve Sularında Antioksidan Kapasite Tayini 63
3.2.4.3 Meyve Sularında Renk Analizi 63
3.2.4.4 Meyve Sularının pH Analizi 64
3.2.4.5 Duyusal Analiz 64

BÖLÜM 4

ARAŞTIRMA BULGULARI 65

4.1 Krosin Renk Maddesinin Ekstraksiyonu 65

4.1.1 Ekstraksiyon Parametrelerinin Krosin İçeriğine Etkisi 65
4.1.2 Ekstraksiyon Parametrelerinin Optimizasyonu 69
4.1.3 Safran Ekstraktlarının pH Değerleri 69
4.1.4 Safranın Toplam Fenolik ve Flavonoid Bileşen Miktarları 71
4.1.5 Safranın Toplam Antioksidan Kapasitesi 73
4.1.6 Safran Örneklerinin Renk Değerleri (L, a, b) 74
4.1.7 Safran Örneklerinin Toplam Krosin Miktarları 75
4.2 Mikroenkapsülasyon Süreci 75
4.2.1 Mikrokapsüllerin Nem Oranları 75
4.2.2 Mikrokapsüllerin Toz Karakteristikleri 76
4.2.3 Enkapsülasyon Etkinliğinin (EE) Belirlenmesi 78
4.2.4 Kapsülleme İşleminin Aroma Bileşenlerinin Yüzdesine Etkisi 79
4.2.5 Mikrokapsüllerin pH ve Sıcaklık Stabilitesi 82
4.2.6 Mikrokapsüllerde Toplam Fenolik ve Flavonoid Madde Miktarı 84
4.2.7 Mikrokapsüllerde Antioksidan Kapasite Miktarı 85
4.2.8 Mikrokapsüllerin Renk Değerleri (L, a, b) 86
4.3 Mikrokapsül Gıda Boyasının Meyve Suyunu Renklendirme Amacıyla Kullanımı 87
4.3.1 Meyve Sularında Toplam Fenolik, Flavanoid Madde Miktarı 88
4.3.2 Meyve Sularının Antioksidan Kapasitesi 89
4.3.4 Meyve Sularının Renk Değerleri (L, a, b) 89
4.3.5 Meyve Sularının pH Değerleri 90
4.3.6 Meyve Sularının Duyusal Değerleri 90

BÖLÜM 5

SONUÇ VE ÖNERİLER 93

KAYNAKLAR 97

EK-A

DUYUSAL ANALİZ FORMU 111

ÖZGEÇMİŞ 112

SİMGE LİSTESİ

a*	Kırmızı ve yeşil renk değeri
A^o	Absorbsiyon
$A_{kontrol}$	Kontrol absorbans değeri
$A_{örnek}$	Örnek absorbans değeri
b*	Sarı ve mavi renk deperi
°C	Santigrat derece
CCl_4	Karbon tetra klorür
COOH	Karboksil grubu
DPPH	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
Ea	Aktivasyon enerjisi
E	Her gıda katkı maddesi için Avrupa Birliği tarafından belirlenen kod
He	Helyum
Fe	Demir
k	Reaksiyon hız sabiti
L*	Lightness
MHz	Megahertz
-N=N-	Azo grubu
OH	Hidroksil iyonu
OCH_3	Metoksil
p	İstatistiksel önem değeri
pH	Asitlik ve bazlık derecesi
R^2	Regresyon katsayısı
$t_{1/2}$	Yarılanma süresi
%	Yüzde
α	Alfa
β	Beta
±	Standart sapma
x	Ortalama değer

KISALTMA LİSTESİ

AA	Antioksidan aktivite
AB	Avrupa Birliği
ABD	Amerika Birleşik Devletleri
ADI	Adcebtable Daily Intake
ATR	Attenuated Total Relectance
BS	50 mg/L mikrokapsül ilaveli elma suyu
CAE	Kateşin eşdeğeri
CAC	Codex Alimentarius Commission
CAR/PDMS	Carboxen/polydimethylsiloxane
CIE	International Commission on Illumination
Cu-Chl	Copper Chlorophyllin
CUPRAC	Cupric Reducing Antioxidant Capacity
EE	Enkapsülasyon etkinliği
EC	European Community
EFSA	European Food Safety Authority
ES	Elma suyu içeren kontrol örneği
F	F değeri
FAO	Food and Agriculture Organization
FD&C	Federal Food-Drug and Cosmetic Act
FDA	Food and Drug Administration
FC	Folin-Ciocalteau
FRAP	Ferric Reducing Ability of Plasma
FTIR	Fourier Dönüşüm Kızılötesi
IC_{50}	Enzim aktivitesini %50 oranında inhibe eden konsantrasyon
ISO	International Organization for Standardization
g	Gram
GA	Gum Arabik
GAE	Gallik asit eşdeğeri
GCMS	Gas Chromatography Mass Spectroscopy
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HTCC	4-hydroxy-2,6,6-trimethyl-1-carboxaldehyde-1-cyclohexene
JECFA	Joint Expert Committee on Food Additives
KM	Kuru Madde
L/S	Sıvı: katı oranı
MD	Maltodekstrin
MFC_7	Göğüs kanseri hücresi

mg	Miligram
mL	Mililitre
µ	Mikro
µm	Mikrometre
nm	Nanometre
OES	120 mg/L mikrokapsül ilaveli elma suyu
OS	180 mg/L mikrokapsül ilaveli elma suyu
ppm	Milyonda bir kısım
PVP	Polivinilprolidin
RI	Retention Index
RSM	Response Surface Metodology
SAE	Aqueous Extract of Saffron
SEM	Scanning Electron Microscope
SD	Serbestlik derecesi
SOD	Süperoksitdismutaz
SPME	Solid Phase Microextraction
SS	Standard sapma
TEAC	Trolox eşdeğeri antioksidan kapasite ölçümü
TGK	Türk Gıda Kodeksi
TFM	Toplam Flavonoid Miktarı
TSE	Türk Standartları Enstitüsü
TS	Toplam katı madde
UAE	Ultrasound-Assisted Extraction
US	Ultrasonic wave
UV	Ultra Viyole
UV-VIS	Ultraviolet-visible Spectroscopy
ÜS	30 mg/L mikrokapsül ilaveli elma suyu
WHO	World Health Organisation
WPC	Whey Protein Concentrate
QS	Quantum Satis

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2. 1 Önemli antosiyaninler 22
Şekil 2. 2 Klorofil a ve klorofil b'nin yapısı 23
Şekil 2. 3 Betalamik asit 25
Şekil 2. 4 Karminik asidin kimyasal yapısı 26
Şekil 2. 5 Karotenoidlerin kimyasal yapıları 31
Şekil 2. 6 Doğal kaynaklardan karotenoidlerin ekstraksiyonu, yöntem ve analizleri . 35
Şekil 2. 7 Safran çiçeği (A) ve ayrılmış stigmaları (B) 38
Şekil 2. 8 Safran bitkisi (*Crocus sativus*) 39
Şekil 2. 9 Safranın ana bileşenlerinin yapısı 41
Şekil 2. 10 Safranın renk maddelerinin molekül yapıları 42
Şekil 2. 11 Safranın biyoaktif bileşenlerinin zeaksantinden sentezi 43
Şekil 2. 12 Enkapsülasyon sürecinin şematik gösterimi 52
Şekil 3. 1 Safran stigmaları ve toz haline getirilen safran 53
Şekil 3. 2 Toz hale getirilmiş safran ve ekstraktların hazırlanmasından görüntü 55
Şekil 3. 3 Krosin standardının kalibrasyon eğrisi 57
Şekil 3. 4 Safran ekstraktları 58
Şekil 3. 5 Safran çözeltisine uygulanan evaporasyon işlemi 58
Şekil 3. 6 Püskürtmeli kurutucuda mikroenkapsülasyon işlemi görüntüleri 59
Şekil 3. 7 Toz safran ve mikrokapsüllenmiş safran boyası 60
Şekil 4. 1 Ekstraksiyon parametrelerinin krosin miktarı üzerine etkilerini gösteren yanıt yüzeyi-3D- grafikleri 70
Şekil 4. 2 Mikropkapsüllerin SEM görüntüleri 77
Şekil 4. 3 Mikrokapsüllerin kabuk kalınlığını gösteren SEM görüntüsü 77
Şekil 4. 4 Safranın örneğinin GC-MS ile tespit edilen aroma bileşenlerine ait kromotogram 81
Şekil 4. 5 Mikrokapsül örneğinin GC-MS ile tespit edilen aroma bileşenlerine ait kromotogram 81
Şekil 4. 6 Farklı pH ve sıcaklıklıktaki krosinin degradasyon kinetiği 82
Şekil 4. 7 Mikrokapsül safran boyasıyla renklendirilen elma suyu örnekleri 87

ÇİZELGE LİSTESİ

Sayfa

Çizelge 2. 1 Türk Gıda Kodeksine göre gıdalarda kullanımına izin verilen renklendiriciler 12
Çizelge 2. 2 TGK'ne göre gıdalarda kullanılabilecek maksimum renklendirici miktarı 13
Çizelge 2. 3 Bazı gıda boyalarının sağlık üzerine olan olumsuz etkileri 14
Çizelge 2. 4 Sentetik gıda boyaları 16
Çizelge 2. 5 Doğal gıda renklendiricileri 20
Çizelge 2. 6 Karotenoidlerin fonksiyonları 28
Çizelge 2. 7 Ticari önemi olan karotenoid kaynakları 33
Çizelge 4. 1 Yanıt Yüzey Metodolojisi kullanılarak belirlenen deneme noktaları ve krosin içeriği 66
Çizelge 4. 2 RSM sonucunda oluşturulan regresyon modellerinin (F ve p-değeri) varyans tablosu 67
Çizelge 4. 3 Safranın toplam fenolik, flavonoid madde, antioksidan kapasite miktarları ve pH değerleri 71
Çizelge 4. 4 Safran örneklerinin renk değerleri (L, a, b) 74
Çizelge 4. 5 Safran ve mikrokapsül ekstraktlarının uçucu bileşen profilleri 80
Çizelge 4. 6 Farklı pH ve sıcaklıklarda krosin mikrokapsüllerinin k değerleri 84
Çizelge 4. 7 Mikroenkapsülasyon öncesi ve sonrası safranın toplam fenolik, flavonoid madde ve antioksidan kapasite miktarları 85
Çizelge 4. 8 Safran stigmalarının ve mikrokapsüllerin L, a, b değerleri 86
Çizelge 4. 9 Meyve sularının toplam fenolik, flavonoid madde ve antioksidan kapasite miktarları 88
Çizelge 4. 10 Mikrokapsüllerle renklendirilen elma sularının renk parametreleri ve pH değerleri 89
Çizelge 4. 11 Mikrokapsüllerle renklendirilen elma suyu örneklerinin duyusal analiz bulguları 91

ÖZET

SAFRANDAN GIDA BOYASI ÜRETİMİ VE MİKROENKAPSÜLASYONU

Yüksel BAYRAM

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Doktora Tezi

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Osman SAĞDIÇ

Eş Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Salih KARASU

Safran olarak bilinen *Crocus sativus* L. özellikle doğal renk maddesi, gıda katkı maddesi, kozmetik amaçlı ve bitkisel ilaç olarak kullanılmaktadır. Safran stigmaları, renk maddesi olan krosin içermektedir.

Bu tez çalışması, üç aşamadan oluşmuştur. Birinci aşama, safran stigmalarından elde edilecek renk maddesi olan krosinin optimum ekstraksiyon koşullarının belirlenmesi amacıyla yapılmıştır. Bunun için, ultrason destekli ekstraksiyon işlemlerinin optimizasyonu, yanıt yüzey metodolojisi kullanılarak yapılmıştır. Proses parametreleri; ekstraksiyon süresi (3-15 dk), sıcaklık (25-65 ^{o}C), ultrases şiddeti (%20-100) ve çözücü:katı oranı (1000-3000 ml/g) olarak belirlenmiştir. Ekstrakte edilen maksimum krosin miktarı 440 nm de spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. Ayrıca optimum koşullara göre elde edilen ekstraktların biyoaktif bileşenleri, antioksidan kapasitesi, aroma profili ve renk parametreleri tespit edilmiştir.

İkinci aşamada, safranın renk maddesi olan krosinin stabilitesinin artırılması amacıyla püskürtmeli kurutucu ile mikroenkapsülasyon işlemi gerçekleştirilerek, mikrokapsüllerin karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir. Mikrokapsüllerin morfolojik özellikleri, enkapsülasyon etkinliği, aroma profili, biyoaktif özellikleri, antioksidan kapasitesi ve renk parametreleri belirlenmiştir. Ayrıca, krosin içeren mikrokapsüllere stabilizasyon testleri uygulanarak reaksiyon kinetiği incelenmiştir. Krosinin termal ve pH stabilitesi farklı sıcaklıklarda (60, 70, 80 ve 90 $^{\circ}$C) ve pH seviyelerinde (2, 4,5 ve 6) belirlenmiştir.

Üçüncü aşamada ise elde edilen kapsüllenmiş safran renk maddesinin bir gıda matriksi üzerinde uygulaması yapılmıştır. Bununla birlikte, model sistemin biyoaktif özellikleri, antioksidan kapasitesi, renk parametreleri, pH değerleri belirlenmiş ve eğitimli panalistlere duyusal analiz testleri yaptırılmıştır.

Sonuç olarak, işlem parametrelerinin krosin verimine etkisi, kuadratik modeller (R^2>0,99 ve adj R^2>0,98) ile başarılı bir şekilde belirlenmiştir. Tüm değişkenlerin krosin verimini önemli derecede etkilediği tespit edilmiştir (p<0,1). İşlem parametreleri, ekstraksiyon süresi (4,40 dk), sıcaklık (55 ^{o}C), ultrases şiddeti (%94) ve çözücü: örnek oranı (1000 ml/g) optimum ekstraksiyon koşulları olarak seçilmiştir.

Safran ve mikrokapsüllerin toplam fenolik, flavonoid miktarları ve CUPRAC yöntemi ile belirlenen antioksidan kapasitesi sırasıyla 31,61±0,26;14,05±0,22 mg GAE/g; 9,34±0,42;4,44±0,28 mg CAE/g; 302,6±10;81,86±0,32 mg TEAC/g olarak bulunmuştur. Renk parametreleri; toz haline getirilmiş ve ekstrakte edilmiş safranların CIE L *, a * ve b * değerleri sırasıyla 35,12±0,02;37,64±0,11, 41,67±0,13;2,10±0,01, 3,85±0,01;3,54±0,03 olarak tespit edilmiştir. Mikrokapsül ürün ve mikrokapsül ekstraktının CIE L *, a * ve b * değerleri sırasıyla 55,61±0,04;47,38±0,10, 76,44±0,07;2,48±0,07, 1,60±0,03;3,99±0,14 olarak belirlenmiştir.

Safranal, hem safran hem de mikrokapsül ekstraktında en fazla miktardaki uçucu bileşik olarak belirlenmiştir. Kapsülleme işleminin, yüzde olarak uçucu bileşen dağılımını önemli ölçüde etkilemediği görülmüştür (p>0,05).

Yapılan stabilite testleri sonucunda krosin degradasyonu, birinci dereceden reaksiyon kinetiği göstermiştir ve bozunma hız sabitinin (k), pH ve sıcaklıktan önemli ölçüde etkilendiği tespit edilmiştir (p<0,05). Yüksek sıcaklık ve düşük pH uygulamasının, krosin içeriğinde daha yüksek bozunmaya (k) neden olduğu belirlenmiştir.

Sonuç olarak bu çalışma ile safran renk maddesi olan krosinin püskürterek kurutma işlemi kullanılarak kapsüllenmesiyle uygun koruma sağlanacağı ve orta düzey ısıya maruz kalacak, yüksek veya orta asitli gıdalarda doğal bir gıda renklendiricisi olarak kullanılabileceği önerilmektedir.

Anahtar Kelimeler: Safran (*Crocus sativus*), Krosin, Yanıt Yüzey Metodolojisi (RSM), Stabilite, Doğal Gıda Boyası

ABSTRACT

FOOD COLORANT PRODUCTION AND MICROENCAPCULATION FROM SAFFRON

Yüksel BAYRAM

Department of Food Engineering

PhD. Thesis

Advisor: Prof. Dr. Osman SAĞDIÇ

Co-advisor: Assist. Prof. Dr. Salih KARASU

Crocus sativus L., known as Saffron, is essentially used as a natural pigment, food additive, cosmetic and herbal medicine. Saffron stigmas contain crocin which is related to its color.

This thesis consists of three stages. The first step was to determine the optimum extraction conditions of crocin, a colorant from saffron stigmas. For this purpose, optimization of ultrasound-assisted extraction was performed using Response Surface Methodology. Process parameters; extraction time (3-15 minutes), temperature (25-65 ^{o}C), ultrasound intensity (20-100%) and solvent: solids ratio (1000-3000 mL/g) was determined as. The maximum amount of crocin extracted was detected spectrophotometrically at 440 nm. In addition, bioactive components, antioxidant capacity, aroma profile and color parameters of the extracts obtained according to optimum conditions were determined.

In the second stage, microencapsulation was carried out with spray dryer to increase the stability of crocin, which is the colorant of saffron, and microcapsules were characterized. Morphological features, encapsulation efficiency, aroma profile, bioactive properties, antioxidant capacity and color parameters of microcapsules were determined. In addition, the reaction kinetics were investigated by applying stabilization tests. Thermal and pH stability of crocin was measured at different temperatures (60, 70, 80 and 90 $^{\circ}$C) and pH levels (2, 4.5 and 6).

In the third stage, the encapsulated saffron dye was applied on a food matrix. However, bioactive properties, antioxidant capacity, color parameters, pH values of the model system were determined and sensory analysis tests were conducted for trained panelists.

As a result, the effect of the process parameters on the yield of crocin was successfully determined by quadratic models (R^2>0.99 and adj R^2>0.98). All variables were found to significantly affect crocin yield (p<0.1). Process parameters, extraction time (4.40 min), temperature (55 °C), ultrasound intensity (94%) and solvent: sample rate (1000 ml/g) were selected as optimum extraction conditions.

Total phenolic, flavonoid amounts of saffron samples and antioxidant capacity determined by CUPRAC method were 31.61±0.26; 14.05±0.2 mg GAE/g, 9.34±0.42; 4.44±0.28 mg CAE/g; 302.6±10.00; 81.86±0.32 mg TEAC/g respectively. Color parameters; CIE L *, a * and b * values of the powdered and extracted saffron were 35.12±0.02; 37.64±0.11, 41.67±0.13; 2.10±0.01, 3.85±0.01; 3.54±0.03 respectively. CIE L *, a * and b * values of microencapsulated product and microcapsule extract were 55.61±0.04; 47.38±0.10, 76.44±0.07;2.48±0.07, 1.60±0.03; 3.99±0.14 respectively.

Safranal was the most abundant volatile compound in both saffron and microcapsule extracts. It was observed that the encapsulation process did not significantly affect the volatile component distribution as a percentage (p>0.05).

As a result of the stability tests, crocin degradation showed first degree reaction kinetics and the decay rate constant (k) was significantly affected by pH and temperature (p<0.05). The application of high temperature and low pH results in higher degradation (k) in crocin content.

As a result, it is suggested that crosin, which is a saffron colorant, can be used as a natural food colorant in high or medium acid foods which will be exposed to moderate heat and appropriate protection by encapsulation using spray-drying process.

Keywords: Saffron (*Crocus sativus)*, Crosin, Response Surface Methodology (RSM), Stability, Natural Food Coloring.

BÖLÜM 1

GİRİŞ

Gıdalarda renk, tüketici tercihini belirleyen en önemli kalite kriterlerinden biridir [1]. Gıda endüstrisinde kullanılan renklendiricilerin çoğu sentetik ve sağlığa olumsuz etkileri bulunmaktadır. Son yıllarda, tüketici tercihleri sentetik kimyasallar yerine doğal renklendiricilere yönelmiş ve bu renklendiricilerin küresel pazarı artmıştır [2]. Süs ve aroma amaçlı kullanılan bitkilerin yaprakları endüstriyel atıklardır ve doğal renklendirici kaynak olarak kabul edilir [3]. Bu atıkların doğal renklendiriciler olarak kullanılması hem ekonomik hem de çevresel faktörler açısından büyük önem taşımaktadır [4], [5].

Iridaceae familyasına ait olan safran (*Crocus sativus* L.) Asya, Avrupa ve Amerika da yaygın olarak tarımsal üretimi yapılmaktadır. Safran, sarı renk, acı tat ve yoğun aromaya sahip çiçeklerin kurutulmuş stigmalarından elde edilen bir baharattır. Gıda boyası, aroma verici, tatlandırıcı ve bitkisel tedavi edici gibi fonksiyonel özelliklerinden dolayı, safranın kurutulmuş stigmaları, antik dönemlerden beri ticari ürün olarak kullanılmaktadır [6], [7], [8].

Safranın renklendirme gücü çoğunlukla suda çözünür karotenoidler olan krosine bağlıdır. Safranın sulu ekstraktlarının rengi, safran stigmalarının miktarına bağlı olarak sarıdan kırmızıya kadar değişen renk tonu aralığı göstermektedir. Safran pigmentlerinin sudaki yüksek çözünürlüğü, gıda renklendiricisi olarak, sulu formülasyon sistemlerinde çözünebilir veya dağılabilir özel formülasyonlar gerektiren diğer karotenoidlere kıyasla güçlü bir avantaj sağlamaktadır. Gıda boyası olarak kullanımı genel olarak 1966 yılında FDA tarafından kabul edilmiştir [9], [10].

Mükemmel bir renklendirici olan krosin, serbest radikalleri süpürerek, hücreleri ve dokuları oksidasyona karşı koruduğundan bir antioksidan görevi görmektedir [11].

Krosinin gıda, kozmetik ve farmasötik ürünler de kullanımı diğer kaynaklardan da temin edilebilen hiperpigmentasyonla ilişkilidir [12].

Ekstraksiyon, biyoaktif bileşiklerin ve doğal renklendiricilerin üretiminde en pahalı adımlardan biridir. Ekstraksiyon verimi, sıcaklık, katı sıvı oranı, zaman ve çözücü tipi gibi çeşitli faktörlerden etkilenir. Bu nedenle, bu faktörler ekstraksiyon verimini artırmak ve üretim maliyetini azaltmak için optimize edilmelidir [5].

Doğal renklendiricilerin raf ömrü, ısı, ışık ve oksijen gibi çevresel faktörlere olan duyarlılıkları nedeniyle sınırlıdır. Bu renklendiricilerin depolama stabilitesini arttırmak için uygun koruma teknikleri uygulanmalıdır. Kapsülleme, duvar malzeme ile çekirdek materyale fiziksel bir engel oluşturarak, krosin benzeri doğal renklendiricilerin ve biyoaktif bileşiklerin, muhafaza edilmesi için uygun bir tekniktir [13], [14], [15]. Öte yandan, doğal renklendiricilerin düşük ısı ve pH stabilitesi, uygulamalarını sınırlandırmaktadır. Bu nedenle, doğal renklendiricinin pH ve sıcaklık stabiliteleri, uygulamalardan önce belirlenmelidir [16].

Bu tez çalışmasında, safrandan farklı ekstraksiyon faktörleri kullanılarak krosin eksraktları elde edilmiştir ve krosin ekstrakt verimi en yüksek ekstraksiyon parametreleri tespit edilmiştir. Bu kapsamda çalışma üç bölümden oluşmaktadır:

(1) Ekstraksiyon parametrelerinin Yanıt Yüzey Yöntemi kullanarak optimizasyonu,

(2) Optimum işlem koşullarında ekstrakte edilen krosinin mikrokapsülasyonu ve elde edilen mikrokapsüllerin sıcaklık ve pH stabilitesinin belirlenmesi,

(3) Krosin mikrokapsüllerinin model sistemde uygulanmasıdır.

1.1 Literatür Özeti

Ekstraksiyon işlemlerinde ultrason uygulaması genellikle ultrason destekli ekstraksiyon (UAE) olarak adlandırılır. Ultrason işlemleri, geleneksel yöntemlere göre düşük sıcaklık ve kısa işlem süresi gibi çeşitli avantajlar sunar, bu da enerji tasarrufu ve daha yüksek verim ile sonuçlanır [17].

Ultrason jeneratörleri, elektrik enerjisini ultrasonik enerjiye dönüştürerek, çözücünün bitki materyallerine daha fazla nüfuz etmesini sağlayarak kütle transferini artıran ultrasonik dalgalar yayar [18]. Ayrıca, ultrasonik uygulamalar, nispeten yüksek adsorpsiyon kapasitesi, basit operasyonel işlem, çevre dostu özellikler ve düşük

maliyetler gibi avantajları ile biyoaktif bileşiklerin tıbbi bitkilerden ekstraksiyonu için giderek daha popüler bir yöntem haline gelmiştir [19], [20].

Taherkhani vd. [21] yaptıkları bir çalışmada safran hücre kültürlerinde safranal ve krosin ekstraksiyonu ve birikimi üzerine ultrasonik dalgaların etkisini araştırmışlardır. Ultrason dalgalarını süspansiyon örneklerine etkili bir mekanik uyaran olarak uygulamışlardır. Yapılan çalışmada ultrason işlemlerinin, ekstraksiyon süresi ve bunların safran hücresi süspansiyon kültüründeki krosin ve safranal içerikleri üzerindeki ilişkilerinin anlamlı bulunduğu belirtilmiştir. Bu nedenle, ultrason işlemlerinin ikincil metabolitlerin biyosentezini uyarabiliceği vurgulanmıştır.

Ultrason destekli ekstraksiyon metodu, safranın biyoaktif bileşiklerinin ekstraksiyonunu önemli ölçüde artırmaktadır [21], [22].

Sarfarazi vd. [23] safranın üç ana maddesi olan pikrokrosin, safranal ve krosin ekstraksiyonunu optimize etmek için yanıt yüzey metodolojisi (RSM) uyguladıkları bir çalışmada, işlem parametrelerini; etanol konsantrasyonu (%0-100), ekstraksiyon süresi (2–7 s) ve sıcaklık (5–85 °C) olarak belirlemişlerdir. Ekstrakte edilen bileşikler, sırasıyla pikrokrosin, safranal ve krosinin maksimum absorbans değerleri 257, 330 ve 440 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. Çalışmada en iyi modelin, sırasıyla pikrokrosin, safranal ve krosin içeriği için R^2 değerleri 83,91, 86,60 ve 92,42 olan tam kuadratik model olduğunu tespit etmişlerdir. Elde edilen sonuçlara göre, yüksek sıcaklık, kısa süre ve orta düzey etanol konsantrasyonlarının, bileşiklerin ekstraksiyon verimleri üzerinde yüksek bir etkiye sahip olduğunu göstermiştir. Yanıt yüzey yöntemine göre, %33,33 etanol konsantrasyonu, 2 saat ekstraksiyon süresi ve 85 °C sıcaklık değeri, prosesin optimum koşulları olarak bulunduğu rapor edilmiştir.

Roohani vd. [24] İran safran çiçeğinin sepal, yaprak ve stamenleriyle ilgili yaptıkları çalışmada; karotenoid bileşikleri organik bir çözücü (N-hekzan, etanol ve aseton karışımı; 2:1:1 v:v) ile ultrason dalgaları, 24 kHz frekansta ve 5, 10 ve 15 dakika boyunca %20, %60 ve %100 genlik uygulayarak ekstre etmişler ve ekstraksiyon verimi, toplam karotenoid, fenolik bileşikler ve antioksidan değerleri (serbest radikallerin süpürülmesi ve Fe III'ün azaltıcı gücü) analiz edilmiştir. Elde edilen sonuçlar, ultrason dalgalarının safranın stamen ekstraktı karotenoid bileşikleri üzerinde önemli etkiye sahip olduğunu göstermiş ve %100 genlikte 15 dakika ultrasonik uygulamanın en yüksek ekstraksiyon verimini sağladığı (%8,88), %100

genlikli ultrason dalgaları 10 dk. en yüksek karotenoid ekstraksiyonu (485,2 mg/mL), toplam polifenol bileşikleri (551,7 mg/mL), Fe III (443,3 mmol Fe^{2+}/Kit) ve IC_{50} (23,59 mg/mL) olduğu sonucuna ulaşmışlardır. Toplamda, antosiyanin içeriği ve antioksidanlar için en etkili koşulların 10 ve 15 dakika boyunca %100 ultrasonik şiddet olduğunu belirtmişlerdir.

Crocus sativus L.'un kuru stigmalarından biyoaktif glikozitlerin (krosin ve pikrokrosin) ekstraksiyonu için ultrason destekli ekstraksiyon yönteminin kullanıldığı bir çalışmada ekstraksiyon parametrelerinin, metanol yüzdesinin, sürenin ve sonikasyon görev döngüsünün optimizasyonu yanıt yüzey metodolojisi (RSM) ile yapılmıştır. Metanol yüzdesi, sonikasyon süresi ve görev döngüleri kombinasyonu, sırasıyla %50, 30 dk, 0,2 s ve %0,44, 30 dak, 0,6 s ekstraksiyon için optimum parametreler olarak tavsiye edilmiştir. Ultrason destekli ekstraksiyonun, bu değerli apokarotenoidlerin ekstraksiyonunu hızlandırması bakımından önemli bulunduğu belirtilmiştir [22]. 30 kHz'lik sabit bir frekansta yüksek güçte ultrason kullanılarak ekstre edilen safranın aktif bileşikleri, akustik yoğunluğun, zamanın ve ultrason modunun safranın üç ana bileşeninin ekstraksiyonu için 20 °C' deki verimine etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, işlem verimliliği, ISO tarafından önerilen soğuk su ekstraksiyon yöntemiyle karşılaştırılmıştır. Sonuç olarak ultrason uygulamasının ekstraksiyon oranını büyük ölçüde artırdığı ve işlem süresini de ciddi ölçüde azalttığı belirtilmiştir. Ekstraksiyon veriminin, zaman ve sonikasyon genliğinin artmasıyla artış gösterdiği ve kısa aralıklı darbeli ultrason kullanımının sürekli ultrason kullanımından daha etkili olduğu vurgulanmıştır [25].

Dünyanın en pahalı baharatı olan safranın kalitesi, acılığını, karakteristik aromasını ve kırmızı sarımsı rengini oluşturan pikrokrosin, safranal ve krosin olan üç ana bileşen miktarı ile değerlendirilmektedir. Bu bileşenleri ekstrakte etmek için birçok yöntem vardır [26]. Ultrason destekli ekstraksiyon metodu, bu değerli bileşiklerin ekstraksiyonunu önemli ölçüde arttırmaktadır [21], [22]. Ekstraksiyon yönteminin etkinliği, çözücü konsantrasyonu, ekstraksiyon basıncı, zaman ve sıcaklık, çözücü oranı vb. gibi birçok faktöre bağlıdır. Ekstraksiyondaki ilk adım, en etkili faktörleri tanımlamakla başlamaktadır. Bu aşamada, Tam Faktöriyel tasarım, Kesirli Faktöryel tasarım ve Plackett-Burman tasarımı gibi birçok deneysel tasarım kullanılmaktadır. Bu tasarımlar, farklı faktörler arasındaki muhtemel etkileşimleri ve denemenin büyüklüğünde kayda değer bir azalmayı belirleyerek oldukça değişken bir taramaya

olanak tanımaktadır. Ekstraksiyon işlemindeki ikinci adım, tarama aşamasında seçilen en etkili faktörlerin optimizasyonundan oluşmaktadır. Bu ikinci adımda büyük ölçekte kullanılan deneysel tasarımlar Box-Behnken ve Box-Wilson veya Merkezi Kompozit tasarımlarıdır [26].

Safranın kalitesi krosin, pikrokrosin ve safranal gibi ikincil metabolitlerin konsantrasyonuna bağlıdır. İtalya'nın merkezindeki Cascia bölgesinde üretilen safranın sekonder metabolit içeriği üzerine kurutma koşullarının etkisini değerlendirmek için yapılan bir başka çalışma da, safran numunesi çeşitli dehidrasyon koşullarına maruz bırakılmış; krosin, pikrokrosin ve safranalın belirlenmesi için UV-VIS spektrofotometresi kullanılmıştır. Ayrıca, safranal yüksek çözünürlüklü gaz kromatografisi ile analiz edilirken, krosinler ve pikrokrosin, yüksek performanslı sıvı kromatografisi ile belirlenmiştir. Kromatografik analizlerin sonuçları, daha hafif koşullarda kurumuş numunelerin en düşük ikincil metabolit içeriğine sahip olduğunu göstermiştir. 55 dakika süre ile 60 °C'de kurutulan örnek, transkripin-4 ve pikrokrosinin en yüksek içeriğini sunarken, safranal en fazla 95 °C'de kurutulmuş safran içinde tespit edilmiştir [27].

Doğal renklendiriciler çoğunlukla dış etkenlere karşı çok hassastır ve er ya da geç renklerinin orijinalinden bozulur. Sıcaklık, UV ışığı, pH, gaz fazı, metal iyonları ve bazı kimyasallar rengin ağarmasını kolaylaştıran belirleyici faktörlerdir [28].

Safran, çok hassastır ve biyoaktif bileşiklerini çevre koşullarına bağlı olarak kaybeder. Yapılan çalışmada safran ekstraktının aktif bileşiklerini korumanın etkili bir yolu olarak çeşitli biyopolimerler ile mikrokapsüle edilmiştir. Safran özütü/duvar malzemesi 1:20 ve iki farklı toplam katı madde (TS %30 ve 40) hazırlanmıştır. Püskürterek kurutulduktan sonra pikrokrosin, safranal ve krosinin retensiyonu, sırasıyla 257, 330 ve 440 nm'deki absorbans değerlerinde tespit edilmiştir. %40 TS içeren bir karışımın, maltodekstrin, gum arabik ve jelatin ağırlıkça oranı 0,94:0,05:0,01'de; pikrokrosin, safranal ve krosin sırasıyla 90,06, 80,37 ve 91,03'lük retensiyon değerleri gösterdiği belirlenmiştir. Sprey kurutma kapsüllemesi sırasında %80'in üzerinde krosin, pikrokrosin ve safranal retensiyonu sağlanmıştır. Kapsülleme verimliliği, toplam katı içeriğinden olumlu bir şekilde etkilenmiştir. Sonuç olarak, maltodekstrin, gum arabik ve jelatin karışımı, safran ekstraktının kapsüllenmesi için püskürterek kurutma işlemi verimli bulunmuştur [15].

Kyriakoudi vd. [29] püskürtmeli kurutucu kullanılarak maltodekstrin içinde safran hidrofilik apokarotenoidlerin, yani krosin ve pikrokrosinin nanoenkapsülasyonlarının üretimini, karakterizasyonu, stabilitesini gerçekleştirmişler ve çekirdek: duvar oranının ürün verimi ve kapsülleme etkinliği üzerindeki etkisini incelemişlerdir. Küresel olarak elde ettikleri parçacıkların, krosin (%54-81) ve pikrokrosin (%56-82) için memnuniyet verici bir kapsülleme etkinliğine sahip olduğunu rapor etmişlerdir. Çalışma da çekirdek: duvar oranının safran hidrofilik apokarotenoidlerini, yani krosin ve pikrokrosin kapsülleme verimliliğini önemli ölçüde etkilediği bulunmuş, bu apokarotenoidlerin termal stabilitesi ve biyolojik olarak kullanılabilirliği nanoenkapsülasyon ile geliştirildiği belirtilmiştir.

Esfanjani, vd. [30] protein-polisakkarid kompleksi ile safranın biyoaktif bileşiklerini (W/O/W) çoklu emülsiyonlar ile kapladıkları bir çalışmada, yüklenmiş krosin, safranal ve pikrokrosinin, çoklu emülsiyonlarda stabilitesi ve salınımını 22 günlük depolama süresince araştırmışlar ve %5 iç sulu faz ile birlikte WPC/pektin/maltodekstrin çoklu emülsiyonu ile elde edilen kapsüllenmiş bileşiklerin, zaman içinde yüksek stabilite ve düşük salınım gösterdiğini tespit etmişlerdir.

Rahaiee vd. [31], krosin stabilitesini arttırmak amacıyla yaptıkları bir çalışmada modifiye iyonik jelasyon yöntemiyle yeni bir taşıyıcı olarak kitosan sodyum alginat kullanarak elde ettikleri nanoparçacıkları araştırmışlardır. Çalışma sonucunda, nanopartiküllerin 165–230 nm boyut aralığında, pürüzsüz ve küresel olmayan yapı gösterdiği belirtilmiştir. Fourier transform-infrared spektroskopisi ile krosin ve biyopolimerleri arasında geniş bir hidrojen bağı etkileşimi gösterdiğini ve kapsülleme verimliliğini, %38,16 olarak tespit ettiklerini bildirmişlerdir. Stabilite çalışmaları, elverişsiz çevresel koşullar altında, biyopolimerler ile kaplanmış krosin nanoenkapsülasyonları, standart krosin ile karşılaştırıldığında, kapsülleme işleminin stabiliteyi sağladığı rapor edilmiştir.

Rahaiee vd. [32], krosinin stabilitesini, nanoenkapsülasyon tekniği kullanılarak geliştirmeye çalışmışlardır. Safranda suda çözünen bir karotenoid olan krosin, pH varyasyonlarına, ısı ve oksidatif strese, hızlı emilime ve düşük biyoyararlanmaya karşı dengesizliğe bağlı olarak sınırlı kullanımı olan yüksek oranda biyoaktif bir bileşiktir. Yaptıkları çalışma sonucunda, krosin yüklü nanopartiküllerin antioksidan aktivitesinin DPPH (serbest radikal süpürücü etki) ve FRAP (Demir iyonu indirgeme yeteneği)

yöntemleri üzerinde aynı şekilde etkili olduğunu belirlemişlerdir. Ayrıca, kitosan-aljinat nanopartiküllerinin krosin için, antioksidan aktivite, biyoyararlanım ve antikanser aktivitesi açısından özelliklerini geliştirmek amacıyla yeni bir araç olarak kullanılabileceğini bildirmişlerdir.

Ahmad vd. [33] yaptıkları bir çalışmada safran antosiyaninlerini, olumsuz gastro-çevresel koşullar altındaki stabilitelerini sağlamak için α-glukan ve α-siklodekstrin ile sprey kurutma tekniği kullanarak kapsüllemişlerdir. Çalışmada, kapsüller stimüle edilmiş mide koşullarına maruz bırakılmış ve monomerik antosiyaninlerin, antioksidanların ve fenollerin salım davranışları incelenmiştir. Mikrokapsüllerin yapısal özellikleri SEM ve ATR-FTIR spektroskopisi ile analiz edilmiştir. Sonuç olarak, bağırsak koşullarında antosiyaninlerin, antioksidan ve fenollerin yüksek içerikte olduğunu, kapsülleme yoluyla midenin olumsuz koşullarından çekirdek malzemenin korunduğunu bildirmişlerdir.

Selim vd. [34], safranın suda çözünür karotenoidlerine üç farklı matriks olan pullulan ve farklı molekül ağırlığındaki polivinilpirolidon (PVP 40 ve PVP 360) kaplama materyalleri ile dondurarak kurutma yöntemi kullanarak mikroenkapsülasyon işlemi uygulamışlardır. Elde edilen mikrokapsülleri, 35 ^{o}C'de, su aktiviteleri 0,43, 0,53, 0,64 ve 0,75 olan karanlık ortamlarda bekletmişler ve karotenoidlerin (krosin) bozunmaları üzerine kinetik çalışmalar yaparak stabilitelerini belirlemişlerdir. Sonuç olarak tüm depolama koşullarında, krosetin glikozitlerinin oksidasyon oranlarını en büyük ölçüde azaltan duvar malzemesi olarak en iyi taşıyıcının PVP 40 olduğunu tespit etmişlerdir.

Maltodekstrin, arap zamkı, modifiye nişasta ve kitosan kullanılarak safran ve pancar ekstratlarına dondurarak kurutma işleminin uygulandığı bir çalışmada, üretilen tozlar 10 hafta boyunca 40 °C'de tutularak, renklendirme mukavemeti değerlendirilmiştir. Birinci dereceden kinetik reaksiyon sonucuna göre, MD ile GA kaplama materyallerinin, pancar ve safranın renk maddeleri için dondurarak kurutma yöntemiyle mikrokapsülleme işleminde etkili maddeler olduğu kanıtlanmıştır. MD, depolanma sırasında ısıya karşı en büyük korumayı, pancar ve safran için sırasıyla, ortalama 53,03 ve 60,03 haftalık ortalama yarı ömür ($t_{1/2}$) gösterdiği belirtilmiştir. Yapılan araştırmada, dondurarak kurutma ile mikrokapsülleme sadece pancar ve safran ekstrelerinin renk stabilizasyonu için değil, aynı zamanda gıda

renklendiricilerinin üretiminde de uygun bir yöntem olarak kullanılabileceği önerilmiştir [35].

Püskürtmeli kurutucuda kurutma, karotenoidlerin korunması için en popüler yöntemdir. Ayrıca, sadeliği ve esnekliği (farklı taşıyıcı maddeler, kurutma parametrelerindeki değişiklikler) koruma, verim ve kapsülleme etkinliğinin artırılmasını sağlamaktadır [36].

Norbixin, antioksidan özelliklere sahip bir karotenoittir. İşlenmiş ürünlerde doğal renklendirici olarak yaygın bir şekilde kullanılır; bununla birlikte, kimyasal yapısı bileşiği, ışık, oksijen ve sıcaklık gibi çevresel faktörlere karşı duyarlı hale getirir. Mikrokapsülleme tekniği, bileşiğin stabilitesini ve çözünürlüğünü arttırmak için kullanılır. Proses verimliliği kapsülleme ajanlarına ve operasyonel parametrelere bağlıdır. Yapılan çalışmada, duvar malzemesi olarak Gum Arabic (GA) ve Maltodextrin (MD) farklı oranlarda kullanılmıştır. Tüm formülasyonlar, çekirdek ve duvar malzemesi arasında aynı oranla hazırlanmıştır. Formülasyon 0:100 (MD: GA), toplam çözünür katıların %40'ı (%74,91-222,40 µg/g) ve iyi bir işlem verimi (%61,07) ile en yüksek mikrokapsülleme verimliliğini göstermiştir. Norbixin mikrokapsülleri, düzgün bir partikül çapı, iyi homojenlik, yüksek çözünürlük (>% 90), düşük nem (%2,86) ve antioksidan aktivite (77,77 µmol TE/g kuru örnek) göstermiştir. Stabilite çalışmaları, sulu model sisteminde, 300 dakika boyunca 60, 90 ve 98 °C'lik sıcaklıklarda gerçekleştirilmiştir. Termal bozunma kinetikleri, birinci dereceden bir kinetik reaksiyon izlemiştir. Norbixin mikrokapsüllerinin bozunması için gerekli olan aktivasyon enerjisi (Ea=15,08 kcal/mol), kapsüllenmemiş norbiksin (Ea=7,61 kcal/mol) için gerekli olandan iki kat daha yüksek bulunmuştur. Çalışma sonucunda, spreyle kurutma ile mikrokapsülleme işleminin, norbixinin termal stabilitesini geliştirdiği bildirilmiştir [37].

1.2 Tezin Amacı

Bu çalışma ile safran çiçeği (*Crocus sativus* L.) stigmalarından renk maddelerinin ultrason desteğiyle ekstrakte edilmesi, yanıt yüzey yöntemi ile optimum ekstraksiyon koşullarının belirlenmesi, ekstrakte edilen optimum renk bileşenlerinin biyoaktif bileşenlerinin ve renk parametrelerinin tespit edilmesi, stabilizasyonun sağlanması için renk maddesi olan krosin bileşiğine püskürtmeli kurutucuda mikrokapsülasyon işleminin gerçekleştirilmesi, üretilen krosin yüklü mikrokapsüllerin morfolojik, renk

ve biyoaktif özelliklerinin saptanması, mikrokapsüllere stabilizasyon testleri gerçekleştirilerek reaksiyon kinetiğinin incelenmesi ve elde edilen gıda boyasının bazı gıda matrikslerinde uygulanabilirliği üzerine araştırma yapılması amaçlanmıştır.

1.3 Hipotez

Safranın renk maddesi olan krosinin, ultrason destekli ekstraksiyonun optimizasyonu ile optimum ekstraksiyon koşullarının tespit edilmesi; enkapsülasyon işlemi sayesinde renk maddelerinin stabilitesinin sağlanarak, bu bileşenlerin daha iyi şekilde muhafaza edilmesi ve fonksiyonelliğinin artırılması; ayrıca, stabilite testlerinin uygulanmasıyla, mikrokapsüllerin model sistem üzerindeki performansının belirlenmesi bu çalışmanın hipotezini oluşturmaktadır.

BÖLÜM 2

KURAMSAL TEMELLER

2.1 Gıda Boyaları

Küresel gıda boya piyasası son yıllarda hızla büyümektedir ve bu büyümenin yıllık bazda %10 ile %15 oranları arasında artması beklenmektedir [38]. Renk, gıdanın genellikle lezzet, güvenlik ve genel kalite ile ilgili önemli duyusal özellikleriyle bağlantılı olmakla birlikte, ürünün pazarlama başarısını da büyük ölçüde etkilemektedir. Yapay olarak elde edilen renklendiricilerin doğal muadillerle değiştirilmesi konusunda artan bir ilgi vardır, çünkü bu renk maddelerinin hiperkinezi, deri döküntüsü, tümörler, böbrek hasarı ve migren dahil olmak üzere pek çok olumsuz sağlık etkileri bulunmaktadır [39]. Doğal renklendiricilerin zararsız olması ve faydalı sağlık etkilerinin yanısıra geniş bir renk yelpazesi avantajı sağladığı da görülmektedir [40]. Bununla birlikte, sentetik gıda renklendiricilerinin yüksek stabiliteye sahip olması ve düşük maliyetle elde edilmesi nedeniyle gıda sektörü tarafından doğal renklendiricilerin kullanımı sınırlıdır [41]. Ayrıca, federal otoriteler tarafından onaylanan sadece birkaç doğal alternatif bulunmaktadır [42], [43].

Doğal gıda boyaları alanındaki bilimsel araştırmalar uluslararası değer kazanmıştır [44], [45], [46]. Çünkü doğal seçeneklerin yelpazesini genişletmek ve yeni kaynaklar bulmak için (bitkiler, algler ve böcekler), aynı zamanda hedef bileşiklerin (antosiyaninler, karotenoidler ve pancar türevleri vd.) verimli bir şekilde geri kazanılması için sürdürülebilir süreçlerin geliştirilmesi gerekmektedir [43].

Genel olarak pigmentler, boyalar ve renklendiriciler olarak ifade edilen renklendirme maddeleri, ürünlerin rengini geliştirmek veya renk kaybını dengelemek için gıda

endüstrisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Doğal renklendiriciler, doğala özdeş renklendiriciler ve sentetik renklendiriciler gıda endüstrisinde kullanılan başlıca renklendirici maddelerdir. Doğal renklendiriciler, bitkiler (karotenoidler ve pancar kırmızısı), böcekler (karminik asit ve kermesik asit) ve mikroorganizmalar (*Monascus* kırmızısı ve *Penicillum* kırmızısı) gibi canlı organizmalardan elde edilir [47].

Renk maddeleri yasal düzenlemelere göre iki sınıfta incelenebilir. Bunlar,

1. Sertifikalı (onaylı) renk maddeleri (sentetik renk maddeleri)

1.1. Boyalar

1.2. Boyarmaddeler

2. Sertifikasız (onaysız) renk maddeleri (doğal renk maddeleri) [48].

Gıda katkı maddeleri ile ilgili çalışmalar, WHO ile FAO'nun 1956 yılında oluşturduğu, JECFA adlı ortak uzmanlar kurulu tarafından yapılmaktadır. JECFA'nın yapmış olduğu analiz raporlarını, Codex Alimetarius Commision (CAC) tarafından değerlendirilip katkı maddeleriyle ilgili dozları belirleyip Codex'te yayınlamaktadır. Pek çok ülke ulusal mevzuatlarını düzenlerken bu komisyonun belirlediği Codex Alimentarius belgelerini referans almaktadır. Ülkemizde, gıda katkı maddeleri ve bu katkılar için izin verilen maksimum miktarlar çeşitli tarihlerde ek yönetmeliklerle değiştirilen Türk Gıda Kodeksi (TGK) Yönetmeliği'nde belirtilmektedir. TGK'da tüm katkı maddeleri, CAC ve Avrupa topluluğu (EC) tarafından değerlendirilen ve onaylanan E kodu ile belirtilen maddelerdir. E numarasına göre gıda katkı maddelerinin sınıflandırılmasında renklendiriciler E 100-180 arasında yer almaktadır [48], [49]. Çizelge 2.1'de TGK 'ne göre gıdalarda kullanımına izin verilen renklendiriciler, Çizelge 2.2'de TGK'ne göre gıdalarda kullanılabilecek maksimum renklendirici miktarı verilmiştir [49].

Çizelge 2.1 TGK'ne göre gıdalarda kullanımına izin verilen renklendiriciler [49]

EC Kodu	Genel Adı
E 100	Kurkumin
E 101	Riboflavin, Riboflavin-5-fosfat
E 102	Tartrazin
E 104	Kinolin sarısı
E 110	Sunset Yellow FCF, Orange yellow S
E 120	Koşineal, Karminik asit, Karminler
E 122	Azorubin, Karmosin
E 123	Amarant
E 124	Ponso (ponceau) 4R, Koşineal Red A
E 127	Eritrosin
E 128	Red 2G
E 129	Allura Red AC
E 131	Patent Blue V
E 132	İndigotin (İndigo Karmin)
E 133	Brillant Blue FCF
E 140	Klorofiller ve Klorofilinler i.Klorofiller, ii.Klorofilinler
E 141	Klorofiller ve klorofillerin bakır kompleksleri i. Klorofillerin bakır kompleksleri ii. Klorofilinlerin bakır kompleksleri
E 142	Green S
E 150a	Sade karamel(1)
E 150b	Kostik sülfit karamel
E 151	Brillant Black BN, Black PN
E 153	Bitkisel karbon
E 154	Brown FK
E 155	Brown HT
E 160a	Karotenler i.Karışım halindeki karotenler, ii.Beta-karoten
E 160b	Anotta, Biksin, Norbiksin
E 160c	Paprika ekstraktı, Kapsantin, Kapsorubin
E 160d	Likopen
E 160e	Beta-apo-8'-karotenal
E 160f	Beta-apo-8'-karotenik asidin etil esteri
E 161b	Lutein
E 161g	Kantaksantin
E 162	Pancar kökü kırmızısı, Betanin
E 163	Antosiyaninler
E 170	Kalsiyum karbonat
E 171	Titanyum dioksit
E 172	Demir oksit ve hidroksitler
E 173	Alüminyum
E 174	Gümüş
E 175	Altın
E 180	Litolrubin BK

(1) Karamel, açık veya koyu kahverengi ürünlerde renklendirme için kullanılmaktadır.

Çizelge 2.2. TGK'ne Göre Gıdalarda Kullanılabilecek Maksimum Renklendirici Miktarı [49]

Gıda	Max. Doz
Alkolsüz aromalı içecekler	100 mg/l
Meyve ve sebze şekerlemeleri	200 mg/kg
Şekerlemeler	300 mg/kg
Süsleme ve kaplama ürünleri	500 mg/kg
Fırıncılık ürünleri	200 mg/kg
Yenebilir buz	150 mg/kg
Aromalı eritme peynirleri	100 mg/kg
Tatlılar (aromalı süt ürünleri dahil)	150 mg/kg
Soslar, çeşni ve turşular	500 mg/kg
Hardal	300 mg/kg
Balık ve kabuk ezmeleri	100 mg/kg
Ön pişirme uygulanmış kabuklular	250 mg/kg
Somon balığı benzerleri	500 mg/kg
Surimi	500 mg/kg
Balık yumurtası	300 mg/kg
Füme balık	100 mg/kg
-Kuru patates, tahıl veya nişasta bazlı çerezler -Patlamış veya hacimlendirilmiş çerezler	200 mg/kg
Diğer çerezler	100 mg/kg
Peynirlerin yenilebilen kabukları ve kılıfları	QS
Diyet amaçlı gıdalar	50 mg/kg
Tıbbi kontrol altında kullanılan formüller ve ek gıdalar	50 mg/kg
Sıvı gıda takviyeleri	100 mg/l
Katı gıda takviyeleri	300 mg/kg
Çorbalar	50 mg/kg
Bitkisel protein bazlı et ve balık analogları	100 mg/kg
Alkollü içkiler	200 mg/l

2.1.1 Sentetik Gıda Boyaları

Sentetik gıda boyaları, gıda ürünlerine yoğun ve kalıcı renk verme özellikleri, doğal boyalarının kararsız olması ve gıda işleme sırasında kolay bozunmaya uğraması gibi nedenlerden dolayı gıda endüstrisinde tercih edilmektedir. Çok yaygın olarak kullanılan bu gıda boyaları, Avrupa birliği kuruluşları tarafından, 94/36/WE sayılı yönerge uyarınca düzenlenip, kontrol edilmektedir. Tartrazine, Kinolin Sarısı, Sunset Yellow, Karmosin, Amarant, Ponceau 4R, Eritrozin, Allura Red, Patent Mavisi, Indigo Carmine, Brillant Blue FCF ve Brown HT en fazla kullanılan sentetik boyalardır [50].

Doğal boya üretimi ile kıyaslandığında üretim maliyetlerinin çok daha düşük olması gibi avantajlar, insan organizmaları üzerindeki olumsuz etkilerini doğrulayan birçok kaynağa rağmen üreticilerin bunları kullanmasını teşvik etmektedir. Örneğin, azo

boyaları, yetişkinlerde sıklıkla baş ağrısına neden olan ve genellikle dikkati dağıtan ve hiperaktif hale getiren aromatik aminlere doğal bağırsak florasında ayrışmaktadır [50]. Bazı renk maddelerinin sağlık üzerine olumsuz etkileri, Çizelge 2.3 'te verilmiştir [51].

Çizelge 2.3 Bazı gıda boyalarının sağlık üzerine olan olumsuz etkileri [51]

Adı	**Renk**	**Yan Etkileri**
Tartrazin	Sarı-portakal	Alerji
Kinolin sarısı	Sarı-portakal	Alerji, kanser, böbrek bozukluğu
Sunset yellow	Sarı-portakal	Alerji, kanser
Karmosin/Azorubin	Kırmızı	Alerji, kanser, doğum kusurları
Amarant	Kırmızı	Alerji
Ponceau 4R	Kırmızı	Alerji
Eritrosin BS	Kırmızı	Alerji
Patent Blue V	Mavi	Alerji
İndigo/İndigotin	Mavi	Alerji
Brillant Blue FCF	Mavi	Alerji, kanser
Carbon Black/ Vegetable Carbon	Kahverengi-siyah	Alerji

Sentetik renk maddelerinin sentezi için başlangıç maddesi olarak kömür katranı kullanıldığından, bu renk katkılarına kömür katranı boyalar adı verilir. Çoğu yapay boya, yapısında –(N=N)- grubu içerdiğinden, azo boyalar da denilmektedir. Tartarizin, Amarant, Ponceau 4R bu renk grubuna örnek gösterilebilir [48].

Bu renk maddelerinin kullanılabilmesi için izin (sertifika) alınması gerektiğinden bunlara "sertifikalı renk maddeleri" de denir. Sertifikalı renk maddelerinin tümü yapay olarak elde edilmektedir. Azo Boyalar, Trifenilmetan, Floresan Tip, Sülfonatlı Indigo suda çözünen FD&C dyes sertifikalı renk maddeleridir [48].

Sentetik renk maddeleri boyalar (dyes) ve boyarmaddeler (lakes) olarak iki grupta incelenmektedir. 1959 yılından sonra boyarmaddeler bu gruba eklenmiştir. Boyalar suda çözünen, boyarmaddeler suda çözünmeyen pigmentlerdir ve renk maddeleri esas olarak boyalardır. Gıda maddelerine, boyalar, çözündükten sonra; boyarmaddeler çözünmeyen pigmentler olarak dispersiyon fazında uygun çözücüde hazırlandıktan sonra, kullanım amacına göre katılarak etkilerini gösterip, renk vermektedir. Boyalar su bazlı, boyarmaddeler yağ bazlı ürünlerde kullanılmaktadır. Bu renk maddeleri toz,

granül, sıvı, sulandırılmış, macunsu gibi farklı formlarda bulunmaktadır. Boya maddesi ortama homojen olarak dağıtılarak ya da dolgu materyaline karıştırıldıktan sonra kullanılır [48].

Sentetik boyalar, önemli yapısal çeşitlilik göstermektedir. Endüstriyel ölçekte daha sık kullanılan boyaların kimyasal sınıfları azo, antrakinon, kükürt, indigoid, trifenilmetil ve ftalosiyanin türevleridir. Bununla birlikte, endüstride şu anda kullanılan sentetik boyaların büyük çoğunluğunun azo türevleri olduğu vurgulanmalıdır. Azo keto hidrazon dengesinin, azo boya sisteminin birçoğunun kolayca parçalanmasında hayati bir faktör olabileceği bildirilmektedir [52].

Bu renklendiriciler, bazı ülkelere özgü özel numaralandırma sistemlerine göre belirlenmektedir. Örneğin, Amerika Birleşik Devletleri FD & C sayılarını (gıdalarda, ilaçlarda ve kozmetiklerde kullanım için onaylanmış kimyasallar), Avrupa Birliği (AB) E sayılarını kullanır. Tüm sentetik renklendiriciler yoğun toksikolojik analizlere tabi tutulmaktadır. Brillant Blue FCF, Indigo Carmin, Fast Green FCF, Eritrosin zayıf emilir ve az toksisite gösterir. Alura Red AC'nin yüksek konsantrasyonları (yüzde 10'dan daha fazla) psikotoksisiteye ve Tartrazin aşırı duyarlı kişilerde bazı reaksiyonlara neden olmaktadır. Sentetik renklendiriciler, tüm ülkelerde evrensel olarak onaylanmamıştır [53].

1800'lü yılların 2. yarısından sonra sentetik gıda boyaları doğal boyaların yerini almaya başlamış ve bu zamandan 2000'li yıllara kadar geçen sürede sentetik boyaların sayısı yaklaşık 5000 civarına ulaşmıştır [54].

FDA tarafından son yıllarda yapılan yasal düzenlemelerde kullanımına izin verilen yapay boyaların sayısı 700'den 7'ye düşmüştür. AB tarafından kullanımına izin verilen renklendiriciler çok sıkı bir şekilde kontrol edilip ve 94/36/EC sayılı yönerge ile düzenlenmektedir [50], [51].

Sentetik renklendiricilerin tüketimine bağlı olarak sağlık üzerinde bazı olumsuz bulgulara rastlanılması nedeniyle, bu katkılarla ilgili FAO ve WHO tarafından düzenli bir şekilde gerçekleştirilen toksikolojik araştırma sonuçlarına göre, düzenlemeler yapılıp, kullanım limitleri güncellenmektedir [51]. Çizelge 2.4'te ABD ve Avrupa'da kullanılan sentetik gıda boyaları verilmiştir.

Çizelge 2.4 Sentetik gıda boyaları [53]

Yaygın ismi	ABD (FD&C)	Avrupa (E)	Kullanıldığı ürünler
Allura red AC	FD&C red no. 40	…	Jelatin, puding, süt ürünleri, içecekler, şekerlemeler,
Brilliant blue FCF	FD&C blue no. 1	E133	İçecekler, şekerlemeler, şuruplar, süt ürünleri
Eritrosin	FD&C red no. 3	E127	Likör
Fast green FCF	FD&C green no. 3	…	İçeçekler, puding, dondurma, şekerleme, şerbet
İndigo carmine	FD&C blue no. 2	E132	Şekerleme, dondurma, fırın ürünleri
Sunset yellow FCF	FD&C yellow no. 6	E110	Fırın ürünleri, tahıl, dondurma, sosis, içecek
Tartrazine	FD&C yellow no. 5	E102	Fırın ürünleri, tahıl, dondurma, sosis, içecek

2.1.2 Doğala Özdeş Gıda Boyaları

Doğal materyallerden elde edilen bazı bileşenlere kontrollü şartlarda çeşitli işlemlerin uygulanması sonucunda oluşan renk maddeleridir. Karamel, klorofilin ve bakır kompleksleri örnek olarak verilebilir [48].

2.1.2.1 Karamel

Karamel rengi, 150 yıldan uzun süredir yiyecek ve içeceklerde kullanılmaktadır ve dünya çapında bir renk katkı maddesi olarak düzenlenmiştir. Karamelli renkler (CAS No. 8028-89-5), çeşitli yiyecek ve içecek ürünlerinde renk katkısı olarak kullanılan kırmızımsı-koyu kahverengi renklerindeki sıvı veya toz formda bulunan renk katkılarıdır [55].

Karamelli renkler, kontrollü ısı (karamelizasyon) ve işleme koşulları altında karbonhidratların ısıtılmasıyla üretilen bileşiklerin karmaşık bir karışımıdır ve imalatında kullanılan bileşenlere göre dört sınıfa ayrılır: Sınıf I: Düz Karamel; Sınıf II: Sülfit Karamel; Sınıf III: Amonyak Karamel; ve Sınıf IV: Sülfit Amonyak Karamelleri. Yanmış şeker kokusu ve hoş, hafif acı tadı ile karakterize edilirler, ancak

çoğu gıda uygulamasında gerekli olan normal seviyelerde bitmiş ürüne önemli bir tat vermezler [55].

Karamel rengi, karamelizasyon işlemine yardımcı olmak ve daha fazla renk yoğunluğu sağlamak için farklı derecelerde (örneğin asitler, alkaliler, sülfit ve amonyum içeren bileşikler) ve farklı sıcaklıklarda karbonhidratları ısıtmak suretiyle kontrollü bir pişirme prosesiyle üretilir. Amerika'da, yüksek dekstrozlu mısır şurubu, karamel renginin üretiminde yaygın olarak kullanılan bir karbonhidrattır, ancak şeker, glukoz, glikoz şurupları, fruktoz, sukroz, bal ve melas da başlangıç karbonhidratları olarak kullanılmaktadır. Her biri birbirinden farklı kimyasal ve fonksiyonel özelliklere sahip olan, gıda ile uyumluluk sağlayan ve istenmeyen etkileşimleri (pus, flokülasyon, ayırma vb.) ortadan kaldıran dört farklı karamel rengi üretilir [55].

Karamel renkleri üretiminde kullanılan asitler; sülfürik veya sitrik asitlerdir, ancak fosforik, asetik veya karbonik asitler de kullanılabilir. Sodyum, potasyum, kalsiyum hidroksitler veya bunların karışımları yaygın olarak kullanılan alkalilerdir. Kullanılan tuzlar; karbonat, hidrojen karbonatlar, sülfatlar ve amonyum, sodyum, potasyum veya kalsiyum fosfattır. Kullanılan amonyum bileşikleri, amonyum karbonat, amonyum hidrojen karbonat ve amonyum hidroksit, amonyum sülfat, amonyum fosfat, amonyum sülfit ve amonyum hidrojen sülfittir. Kullanılan sülfit bileşikleri; sülfüröz asit, hidrojen sülfit ve sülfitler, potasyum, sodyum ve amonyum bisülfitlerdir. Yağ asitlerinin poligliserol esterleri, köpük önleyici maddeler olarak kullanılabilir [55].

Bu renklendirici maddelerin her sınıfı, benzersiz fonksiyonel özellikleri ile özel olarak renklendirme amacıyla kullanılır ve karamelize şekerlerden ve diğer katkı maddelerinden yapılan karamelize şeker şuruplarından ayırt edilebilir [56]. Her ne kadar renk kullanımına yönelik olsa da, bu maddeler gıdalarda başka fonksiyonel etkiler de gösterebilirler. Örneğin, kolloidal sistemleri stabilize ettikleri ve emülsifiye edici özelliklere sahip oldukları, böylece tadın tutulmasını ve esansiyel yağlar gibi suda çözünmeyen bileşenlerin dağılımını kolaylaştırdığı bilinmektedir. Karamel renginin, güneş ışığının bir sonucu olarak bazı içeceklerde meydana gelen lezzet değişikliklerini geciktirdiği de bilinmektedir [55].

Yapılan mevcut çalışmalar karamel renklerinin genotoksik veya karsinojenik olmadığı ve maruz kalma tahminlerinin karamel renk ve bileşenlerin alımının güvenlik riskleri

oluşturmadığını göstermektedir. Karamel renklerinin normal alımları için EFSA tarafından belirlenen ADI değeri, 300 mg/kg/gün altındadır [55].

2.1.2.2 Klorofilinler ve Bakır Kompleksleri

Klorofilinlerin alkali tuzları, yenilebilir ot, bitki, yonca ve ısırgandan elde edilen, potasyum ve/veya sodyum tuzlarıdır [57].

Bakır klorofilin (Cu-Chl), doğal yeşil pigment olan klorofilin yarı sentetik bir türevidir. Klorofil pigmentine göre daha fazla hidrofilik özellik, tinktoryal güç, asit ve ışığa karşı daha yüksek stabilite gibi bazı teknolojik avantajlar gösterir [58]. Doğal kaynaklardan elde edilen [57] ham klorofilin merkez atomu olan magnezyum yerine bakır iyonunun bağlanmasıyla bakır klorofilin bileşiği elde edilmektedir [54].

Doğal klorofiller birkaç nedenden dolayı renklendirici olarak nadiren kullanılmaktadır. Birincisi, karotenoidler, saflaştırma aşamalarını vazgeçilmez hale getiren, çeşitli bileşime ve değişken pigment seviyelerine sahip ürünler ile sonuçlanan, fosfolipitler ve diğer yağda çözünen maddelerle birlikte özütlenir. İkincisi, kullanılan endojen bitki enzimleri ve ekstraksiyon koşulları, hassas klorofiller üzerinde kimyasal modifikasyonu kolaylaştırarak feofitinler ve feoforitler gibi istenmeyen kahverengimsi-yeşil bozunma ürünlerini üretebilir. Sonuç olarak, söz konusu zorluklar dikkate alındığında, üretim maliyetleri çok yüksektir ve bu nedenle doğal klorofillerin renklendirici olarak yaygın bir şekilde uygulanmasını sınırlamaktadır. Bu sınırlamaların bazılarının üstesinden gelmek amacıyla, klorofilinler olarak adlandırılan yarı-sentetik, metal-şelatlanmış ve suda çözünür, daha yüksek stabilite ve tinktoryal mukavemete sahip klorofil türevleri renklendiriciler üretilmiştir [54].

Sodyum bakır klorofilin, toz veya sıvı halde bulunur ve çoğunlukla karotenoidler veya kurkumin ile kombinasyon halinde, tatlılar, dondurma, tatlılar, peynir ve salatalık lezzetlerinde bir renklendirici olarak Avrupa'da kullanılmaktadır [54]. Hem klorofil hem de bakır klorofilin, Avrupa ve Brezilya'da gıda renklendiricisi olarak izin verilirken; bakır klorofiline Amerika Birleşik Devletleri'nde sadece diş macunu ve narenciye içeceğinde izin verilmektedir [58]. Bakır klorofillerin çok farklı gıda maddelerinde kullanımına Türk Gıda Kodeksinde izin verilmiştir [57].

2.1.3 Doğal Gıda Boyaları

Gıdaların rengi, tüketici tercihini etkileyen en önemli faktörlerden biri olduğundan renk maddeleri gıda sektöründe yaygın olarak kullanılmaktadır. Son yıllarda bazı sentetik gıda boyalarının sağlık üzerine olumsuz etkilerinin açığa çıkmasıyla doğal kaynaklara olan eğilim artmış ve bu kaynaklardan elde edilen boyalar üzerine yapılan çalışmalar giderek önem kazanmıştır [59].

Doğal renk maddeleri bitki, hayvan ve mineral maddelerin yapısında doğal olarak bulunan ya da mikroorganizmalar tarafından sentezlenen bileşiklerdir. Anotto, antosiyaninler, karotenler, klorofil, kurkumin (turmerik), talk, titandioksit doğal renk maddelerine örnek verilebilir. Bitkisel kökenli renk maddeleri çeşitli çözgenlerle ekstraksiyon yoluyla elde edilir. Çözgen olarak genellikle su, etilalkol veya aseton kullanılır [60].

En doğal renklendiriciler, bitki dokularından elde edilen ekstraktlardır. Bu ekstrelerin gıda endüstrisinde kullanımı, tutarlı renk yoğunluklarının olmaması, ışığa ve sıcağa karşı dengesizlik, arz değişkenliği, diğer gıda bileşenleriyle reaksiyon ve ikincil lezzet ve kokuların eklenmesi gibi, bazı problemlere sahiptir. Ayrıca, birçoğu suda çözünmez ve bu nedenle, gıda ürünü boyunca eşit bir dağılım elde etmek için bir emülsiyonlaştırıcı eklenmelidir [53]. Çizelge 2.5'te doğal gıda renklendiricileri görülmektedir.

Renk, gıdaların en önemli özelliklerinden biri olup, kalite göstergesi olarak kabul edilmekte ve sıklıkla kabul görmektedir. Meyve ürünleri gibi doğal olarak renkli olan birçok gıda, işleme sırasında renk kayıplarına uğramasına bağlı olarak renklendiricilerin kullanılmasını gerektiren bazı durumlar oluşmaktadır. Doğal renklendiriciler, kullanımda daha yüksek maliyet ve daha düşük stabilite dahil olmak üzere, sentetik ürünlere kıyasla birçok dezavantaja sahiptir. Ancak insanlar, zararsız ve hatta sağlıklı oldukları düşünülen doğal pigmentleri tercih ederek, sentetik renklendiricilerin giderek önlenmesini sağlamıştır. Bu gereksinimler dünya çapında çok sayıda düzenlemeler gerektirmiştir. Örneğin, XXI yüzyılın başına kadar Amerika tarafından izin verilen sentetik renklendiriciler listesi 700'den sadece yediye, düşmüştür. Tüm gıda renklendiricileri için mevcut pazarın 1 milyar dolar olduğu tahmin edilmektedir. Doğal pigmentler toplamın sadece dörtte birine karşılık

gelmektedir. Şimdiye kadar, sentetik renklendiriciler için olan pazar, doğal gıdaların lehine dönüşme eğilimindedir [1].

Çizelge 2.5 Doğal gıda renklendiricileri [53], [61]

Kimyasal sınıfı	**Renk**	**Bitki kaynağı**	**Pigment**	**Kullanıldığı Ürünler**
Antosiyaninler	Kırmızı	Çilek *(Fragaria* türleri)	pelargonidin 3-glukozit	İçecek, şekerleme, meyve ürünleri, konserve
	Mavi	Üzüm (*Vitis species*)	Malvidin 3- glukozit	İçecek
Betalain	Kırmızı	Pancar (*Beta vulgaris*)	betanin	Süt ürünleri, tatlılar
Karotenoidler*	Sarı-Turuncu	Anatto (*Bixa orellana*)	bixin	Süt ürünleri, Margarin
	Sarı	Safran (*Crocus sativus*)	krosin	Pirinç yemekleri, Fırın ürünleri
	Kırmızı-turuncu	Kırmızıbiber (*Capsicum annuum*)	Kapsantin	Çorba, sosis
	Turuncu	Havuç (Daucus carota)	Beta-karoten	Fırın ürünleri, şekerleme
	Kırmızı	Mantar (*Cantharellus cinnabarinus*)	Kantaksantin	Sosis, çorba, sos
	Turuncu-Sarı	Zerdeçal (*Curcuma longa*)	Kurkumin	Süt ürünleri, Şekerleme
Klorofiller	Mavi-Yeşil, Sarı-Yeşil	Meyve, sebzeler	Klorofil a, b	Fırın ürünleri, içecekler, hamur işleri

* Gıda boyası olarak kullanılan birçok karotenoid kimyasal olarak sentezlenir.

2.1.3.1 Antosiyaninler

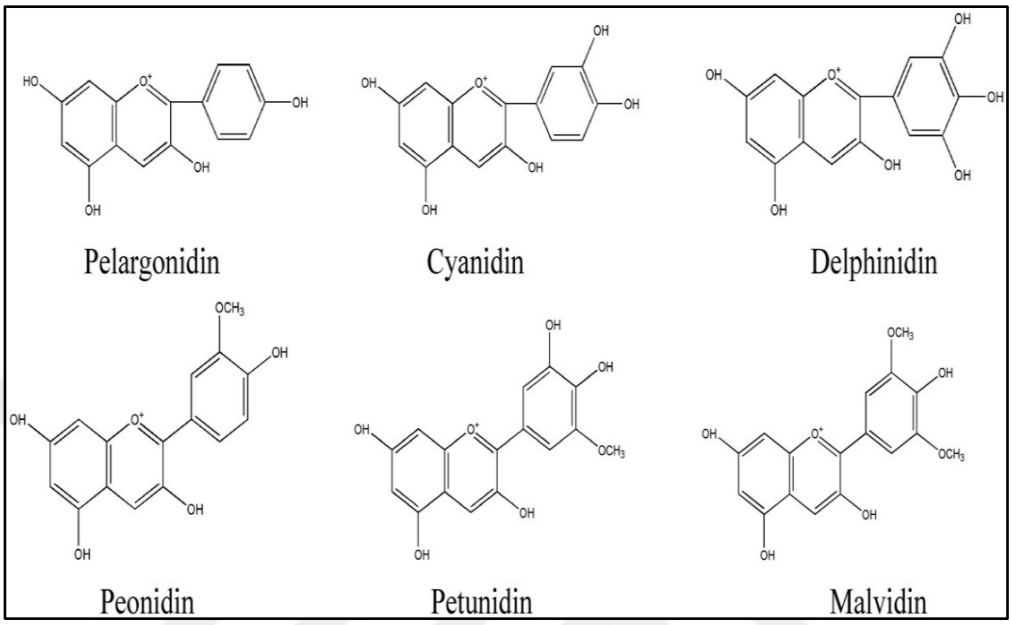
Sentetik boyaların kullanımına alternatif olabilecek doğal kırmızı renklere büyük bir tüketici talebi vardır. Bu ilgi, yapılan çalışmalar, artan tüketici algısı ve doğal bitkisel katkı maddelerinin potansiyel fonksiyonel faydası hakkındaki farkındalık ile büyük ölçüde artmıştır [54]. Güçlü antioksidan özelliklere sahip olan bu renklendiriciler, gıdanın sadece estetik değeri ve kalite özelliklerine katkıda bulunmakla kalmayıp, aynı zamanda olumlu sağlık etkileri de sağlamaktadır [62].

Antosiyaninler, pek çok çiçek, meyve ve sebze de bulunan kırmızıdan pembe, mavi ve mor renklere kadar değişen geniş aralıktaki renk maddeleridir [54]. Gıda endüstrisi tarafından kullanılan geleneksel doğal pigmentlerden kırmızı renkler sağlayan antosiyaninler, doğada yaygın olarak bulunan flavonoidler grubundandır [16]. Suda çözünen ve zararsız pigmentler oldukları için, biyo fonksiyonel değeri eklenmiş gıda ürünlerini renklendirmek için büyük bir potansiyele sahiptir. Bununla birlikte, antosiyaninlere dayanan renk formülasyonlarının bazı sınırlamaları vardır. Antosiyaninler, pH değişiklikleri, ısı, ışık, oksijen, sıcaklık, metaller, ağartma maddeleri gibi çeşitli faktörlere karşı oldukça duyarlıdır [63]. Bu yüzden antosiyaninlerin stabilizasyonu önemli bir sorundur [64], [65]. Genellikle antosiyaninlerin rengini ve stabilitesini korumak için kapsülleme işlemi yapılmaktadır. Antosiyanin gıda renklendirici ekstraktları, konsantre veya toz formunda bulunmaktadır. Toz formu, kolay nakledildiği ve depolandığı için konsantrelere kıyasla daha yaygın kullanılmaktadır [62].

Fenolik bileşiklerin alt grubu olan flavonoidler sınıfındaki antosiyaninlerin yapısı, aglikonlara (antosiyanidin) bağlı şekerlerin glikozitleri formundadır; şeker grubu, antosiyanidinlere mono-, di- veya trisakkarit olarak bağlanmaktadır. Glikoz, galaktoz, arabinoz, ramnoz ve ksiloz mevcut en yaygın şekerlerdir. Antosiyaninler, antosiyanidinlerin yapısında bulunan hidroksi ve metoksi gruplarına, şekerin türüne, sayısına ve konumlarına, ayrıca şekere bağlı alifatik veya aromatik asitlerin yapısına, sayısına ve kapsamına bağlı olarak değişiklik göstermektedir [62]. Aglikonun yapısındaki hidroksil (-OH) sayısı arttıkça mavilik, metoksil (-OCH_3) sayısı arttıkça kırmızılık artış göstermektedir [60]. Doğada bulunan antosiyaninlerin muazzam çeşitliliği (600'den fazla), onları çok karmaşık ve ilginç bir grup haline getirmiştir. Şimdiye kadar 19 tür antosiyanidin bilinmektedir, bunlardan sadece altı tanesi yenilebilir bitkilerde en çok bulunan siyanidin, delfinidin, petunidin, peonidin, pelargonidin ve malvidindir. Yapısal desenler, turuncu-kırmızıdan (pelargonidin) mavi-mor (delfinidin) 'e kadar renk tonları üretir [62]. Şekil 2.1 de antosiyaninlerin kimyasal formülleri görülmektedir [66]. Antosiyaninler görünür bölgedeki ışığı emerler, çünkü asidik koşullar altında heterosiklik oksijen halkasında protonlanırlar [54].

Antosiyaninler, en iyi doğal renk maddelerinden olmalarına rağmen, stabil yapıya sahip olmaması ve zor elde edilmelerinden dolayı yaygın bir kullanım alanına sahip

değildir. Üzümsü meyveler, sebzeler, kökler, yumru kökler, soğanlar (çiçek soğanları), baklagiller ve tahıllar, bazı yaprak ve çiçekler önemli antosiyanin kaynakları olarak sayılabilir. Mürver, yaban mersini, acai, siyah üzüm, kırmızılahana, siyah havuç, tatlı patates, kırmızıturp ve kırmızı patates, mor mısır örnek olarak gösterilebilir [51], [66].



Şekil 2.1 Önemli antosiyaninler [66]

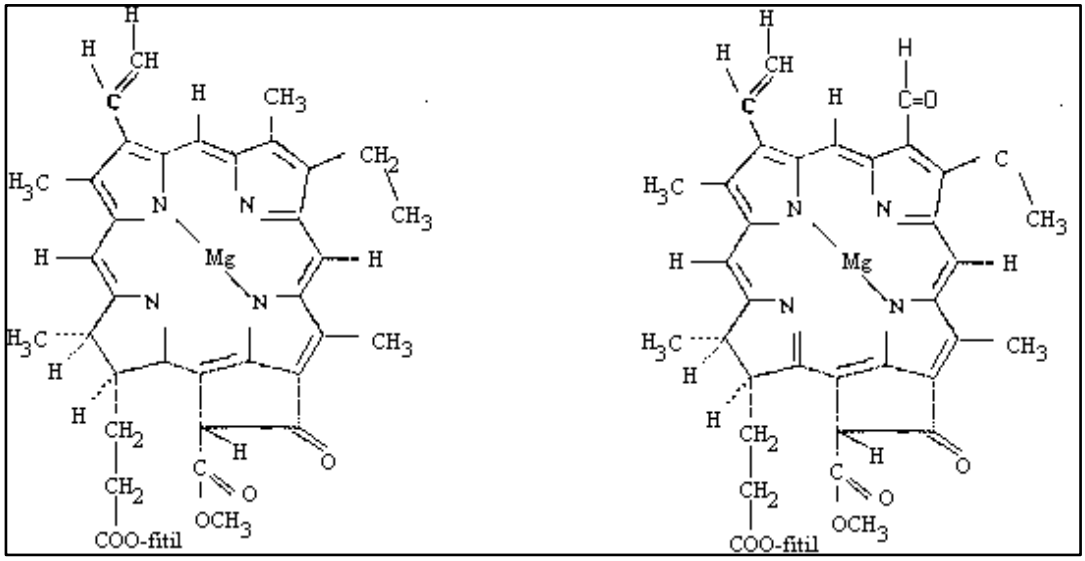
2.1.3.2 Klorofiller

Doğal klorofiller, asıl işlevi dünyadaki yaşam için temel süreç olan fotosentez olup, doğada en bol bulunan yeşil renkli pigmentlerdir. Bununla birlikte, doğada bu kadar açık bir şekilde bulunmasına rağmen, renklendirici olarak kullanımı kimyasal dengesizlikleri ve yüksek üretim maliyetleri nedeniyle oldukça kısıtlıdır. Gerçek bir kullanım potansiyeli olan suda çözünen metal-şelatlı klorofil türevleri elde edilmektedir. Bu pigmentlerin, eşsiz fizikokimyasal ve fotokimyasal özelliklere sahip olmasına bağlı olarak gıda renklendiricisi ve çok çeşitli diğer endüstriyel uygulamalar için kullanımı önerilmiştir. Klorofiller, insan sağlığına potansiyel yararlı etkiler uygulamak ve seçkin biyolojik aktiviteleri için de araştırılmıştır. Bütün yeşil bitki özleri ve doğal klorofil türevli pigmentler, çeşitli diyet ve tıbbi kullanımlar için farklı farmasötik formlarda pazarlanmaktadır. Popüler tedavi yöntemleri arasında, antiinflamatuar aktivite, yara iyileşmesini hızlandırıcı, immün modülatör özellikleri ve geriatrik ve ileostomi hastalarında vücut deodorizasyonu yer almaktadır [54].

Klorofiller, fotosentez için gerekli pigmentlerdir ve tüm bitkilerde, eğrelti otlarında, yosunlarda, ayrıca su ve deniz ortamlarından yosun ve bazı fotosentetik bakterilerde bulunabilir. Yeryüzünde yaşam, fotosenteze dayanır ve klorofillerin yanı sıra bazı ilgili tetrapiroller ve karotenoidler, güneş enerjisinin kimyasal enerjiye dönüştürülmesinin ve aynı zamanda maddelerin oluşturulmasının kompleks düzenleyici işlevinden sorumludur [54].

Klorofiller, bir klorin yarısı ve genellikle diterpen fitolü olan uzun bir alkolik karbon zincirinden oluşan lipofilik bileşiklerdir [67]. Bitkilerde ve fotosentetik organizmalarda bulunan bazı doğal klorofiller zaten tanımlanmıştır ve klorofil a, b, c, d ve e isimleriyle bilinmektedir. Daha yüksek bitkilerde sadece klorofil a, b ve bunların feofitinler, klorofilidler ve feoforürler gibi kendi parçalanma metabolitleri bulunur. Klorofil a ve b'ye ek olarak, klorofil c, d ve e, alg içinde ve fotosentetik bakterilerde de bakteriyoklorofiller bulunur [54]. Klorofil fotosentetik porfirin pigmentinin bütün sınıflarını kapsamaktadır. Şekil 2.2'de klorofil a ve klorofil b'nin kimyasal yapısı görülmektedir [68].

Klorofiller uzun zamandan beri sadece yaşam sistemindeki önemlerinden dolayı değil, aynı zamanda renklendirici olarak sınırlı uygulama alanlarındaki doğal pigmentler ile potansiyel oluşturmaları nedeniyle de dikkat çekmiştir. Doğal klorofillerin yoğun yeşil rengi, gıdalarda, farmasötik ve kozmetik ürünler ile tuvalet ürünlerinde ticari olarak temin edilebilen lipit-çözülebilir katkı maddeleri olarak yararlı olabileceğini düşündürmektedir [54].



Şekil 2.2 Klorofil a ve klorofil b'nin yapısı [68]

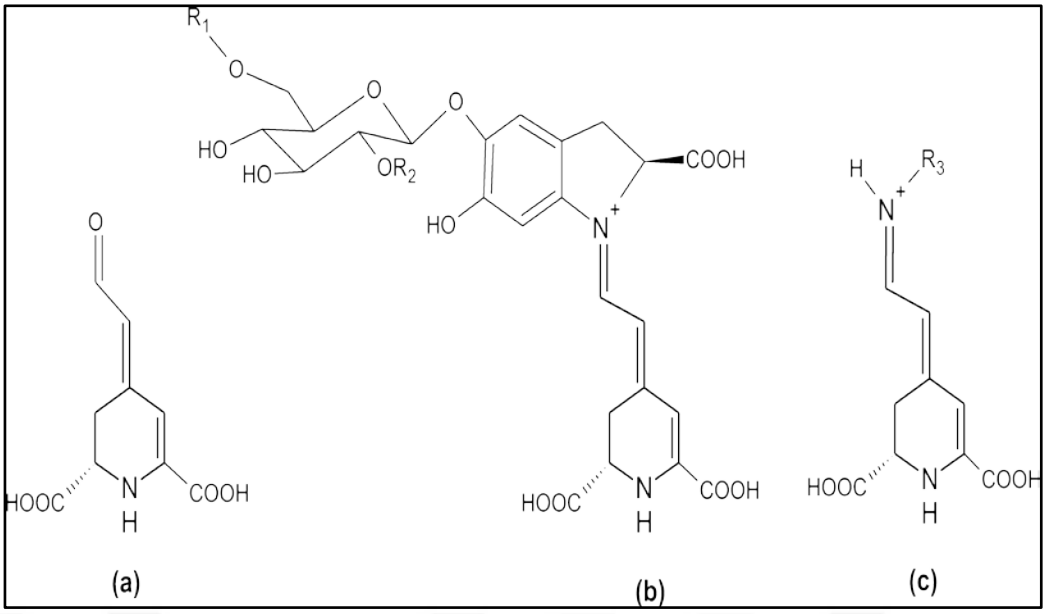
Doğal klorofillere Batı Avrupa'da gıda renklendiricileri olarak izin verilir ve bunlar yeşil yapraklardan ve çeşitli yosunlardan elde edilebilir. Bununla birlikte, uygulamada doğal klorofiller birkaç nedenden dolayı renklendirici olarak nadiren kullanılmaktadır. Birincisi, karotenoidler, daha sonra saflaştırma aşamalarını vazgeçilmez hale getiren, çeşitlendirilmiş bileşime ve değişken pigment seviyelerine sahip ürünler ile sonuçlanan, fosfolipitler ve diğer yağda çözünen maddelerle birlikte özütlenir. İkincisi, kullanılan endojen bitki enzimleri ve ekstraksiyon koşulları, hassas klorofiller üzerinde kimyasal modifikasyonu kolaylaştırarak feofitinler ve feoforitler gibi çekici olmayan kahverengimsi-yeşil bozunma ürünlerini üretebilir. Sonuç olarak, söz konusu zorlukları dikkate alındığında, üretim maliyetleri çok yüksektir ve bu nedenle doğal klorofillerin renklendirici olarak yaygın bir şekilde uygulanmasını sınırlamaktadır. Bu sınırlamaların bazılarının üstesinden gelmek için, klorofilinler olarak adlandırılan yarı-sentetik, metal-şelatlanmış ve suda çözünür klorofil türevleri, daha yüksek stabilite ve tinktoryal mukavemete sahip renklendiriciler elde etmek için alternatif olarak üretilmiştir [54].

2.1.3.3 Betalainler

Betalainler, kırmızı-mor renkli betasiyanatları ve sarı-turuncu renkli betaksantinleri içeren suda çözünür azot içeren pigmentlerdir [1]. Betalainler doğal kırmızı-mor renkler için izin verilen renklendiricilerdir. Pancardan elde edilen betalainler, gıda, ilaç ve kozmetik endüstrilerinde doğal renklendirici olarak geniş uygulamaya sahiptir. [69]. Betalamik asit, tüm betalain pigmentleri için ortak olan kromofordur. Betalainlerin kimyasal yapıları Şekil 2.3'te verilmiştir [70].

Betalainler kök, meyve ve çiçeklerde bulunur. Görünür ışığı 476–600 nm aralığında, pH 5,0'da maksimum 537 nm de [(betasiyaninler (mor) 540 nm ve betaksantinler (sarı) ise 480 nm'de] absorbe ederler. Bilinen az sayıdaki betalain kaynakları; kırmızı ve sarı renkli pancar (*Beta vulgaris* L. ssp. *vulgaris*), renkli İsviçre pazısı (*Beta vulgaris* L. ssp. *cicla*), tane ya da yapraklı amaranth (*Amaranthus* sp.) ve *Opuntia* ve *Hylocereus* cinslerine ait kaktüs meyveleridir [1].

Betalainler antosiyaninlerden daha fazla suda çözünürdür. Antosiyaninlerden üç kat daha fazla renklendirme mukavemetine sahiptir [1].



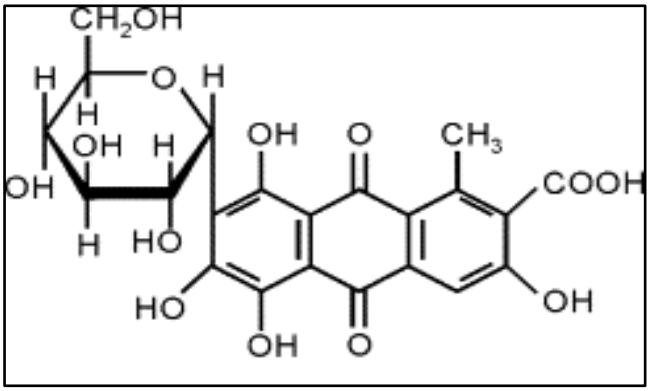
Şekil 2.3 Betalamik asit (a), betasiyanin (b), betaksantin (c), (Betanin:R_1=R_2=H, R_3=Amin ya da aminoasit grubu) [70]

Betalainler, tatlılar, şekerlemeler, kuru karışımlar, süt ve et ürünleri gibi çeşitli gıdalarda kullanılmaktadır. Pancarlardan çıkarılan "pancar kırmızısı" olarak bilinen gıda renklendiricisi, Avrupa Birliği ve ABD'de gıda renklendirici olarak ticarileştirilmiştir [71]. Ticari pancar renklendiricileri, vakum konsantratörler ile üretilen %60-65 kuru madde içeriğine sahip konsantreler veya dondurarak/püskürtmeli kurutucularla elde edilen %0.3-1 pigment içeren tozlar olarak mevcuttur [1].

2.1.3.4 Koşinel, Karminik Asit, Karminler

Karminler ve karminik asit, dişi *Dactylopius coccus* Costa 'nın kurutulmuş vücutlarından oluşan Koşineal'in su, su-alkol veya alkol ile ekstraksiyonu sonucu elde edilen kırmızı, suda çözünen gıda renklendiricisidir [72], [73].

Renk maddesi karminik asittir. Karmin, alüminyum ve karminik asitin 1:2 molar oranında hidratlanmış alüminyum şelatıdır. Antrakinon sınıfından bir renklendirici olan karmin ($C_{22}H_{20}O_{13}$), 7-D-glukopiranozil- 3,5,6,8-tetrahidroksi 1-etil-9,10-dioksoantrasen2-karboksilik asit yapısındadır [74]. Şekil 2.4'te karminik asidin kimyasal yapısı görülmektedir.



Şekil 2.4 Karminik asidin kimyasal yapısı [75]

Güney Amerika ve Meksika'da *Opuntia* cinsi kaktüslerin üzerinde parazit olarak yaşam süren koşineallar, diğer böcekleri kaktüsten uzak tutmak amacıyla kırmızı renkli karminik asit içeren pigment sentezlemektedir. Boya maddesi, yaklaşık doksan günlük dişi koşineal böceklerinden ekstraksiyon yoluyla elde edilmektedir. Renk maddesi, bu böceklerin sıcak suya batırılması, güneş ışığında ya da fırında kurutulması sonucunda elde edilir [74]. Kurutulmuş böcekler %22'ye kadar karminik asit içermektedir. Renk maddesi kurutulmuş böcekten ekstrakte elde edilir; 1 kg renklendirici üretmek için yaklaşık 80.000 ila 100.000 böceğin gerekli olduğu bildirilmektedir. Ekstraksiyon etanol ile gerçekleştirilmekte ve kırmızı bir çözelti elde edilmektedir. Alkol uzaklaştırıldıktan sonra ana renklendirici bileşik olan %2 ila %4 karminik asit içeren konsantre bir solüsyonla sonuçlanır [76].

Koşineal böceklerinden elde edilen karminin ticari ürünleri, böcekten gelen proteinli maddeleri, ayrıca serbest karminat ve alimünyum kalıntıları içerebilmektedir [77].

Türk Gıda Kodeksine göre, E120 Kodu ile koşinal, karminik asit ve karminler, gıda renklendiricisi olarak kullanımına izin verilmektedir [57].
Karmin, gıdalarda, et, pasta ve fırın ürünlerinde, dondurma, şekerleme, reçel ve marmelatlarda, kurutulmuş balık, sakız, yoğurt, elma şarabı, maraska kirazı ve domates ürünlerinde doğal gıda boyası olarak kullanılmaktadır [78].

2.1.3.5 Mikroorganizmalar (*Monascus* kırmızısı)

Mikrobiyal pigment üretimi, diğer kimyasal işlemlerle karşılaştırıldığında daha hızlı ve daha verimli bir işlemdir.

Monascus pigmentleri tipik olarak altı ana azapilon pigmenti içermektedir. Bunlar; iki sarı pigment (monaskin ve ankaflavin), iki turuncu pigment (rubropunctatin ve

monascorubrin) ve iki kırmızı pigmenttir (rubropunktamin ve monaskorubramin). *Monascus* tarafından geleneksel pigment üretimi genellikle katı hal fermentasyonu kullanılarak gerçekleştirilir. Endüstriyel ölçekte pigment üretimi, maliyeti yüksek olduğu için ekonomik değildir. Bu nedenle, son yıllarda, çeşitli agro-endüstriyel atıklar, pigment üretimi için substrat veya katkı maddesi olarak kullanılmaktadır. Mısır unu, fıstık unu, hindistan cevizi artığı, soya unu, jackfruit tohumu, tapyoka nişastası, üzüm atığı ve buğday taneleri farklı *Monascus* türleri için substrat veya yetiştirme ortamı katkı maddeleri olarak kullanılmaktadır [47].

Son yıllarda, *Monascus* gıda pigmenti üretimi ve kullanımı için Japonya, Amerika Birleşik Devletleri, Fransa ve Almanya'da kayıtlı birçok patent bulunmaktadır [47].

2.1.3.6 İridoidler

En iyi bilinen iridoid içeren bitkiler, safran (*Crocus sativus* L.) ve cape yasemin meyvesidir (*Gardenia jasminoids* Ellis). Bununla birlikte, farklı kaynaklardan çok sayıda iridoid bileşiği tanımlanmıştır [76]. İridoidler ve iridiod glikozitleri arasında genipin, geniposid ve gardenosid bulunmaktadır. Renksiz iridoidler, en önemli olan mavi ve kırmızı renk pigmentlerine dönüştürülebilir. Pigment üretimindeki ilk adım, β-glukozidaz enzimi kullanılarak aglikon genipini hazırlamaktadır. Bir sonraki aşama, aglikonun aminler, amino asitler veya protein hidrolizatları ile reaksiyona sokulmasını içermektedir. Bu, suda çözünür polimerik maddeler olan pigmentlerin oluşmasına yol açar. Mavi, yeşil, sarı ve kırmızı gardenya ticari olarak mevcuttur [79].

Gardenia iridoidlerinde geniposit, ana bileşenidir. Geniposidik asit, kırmızımsı-mor renkteki sitrik asit üreten polimerlerin fazlalığı ile amino asitlerle (arginin ve glutamik asit) hazırlanmıştır. Bu polimerler suda çözünürdür, pH 3 ila 8 aralığında iyi stabilite gösterirler, pH 3 ve 4'te iyi bir termostabiliteye sahiptirler, ışığa karşı hassastırlar ve gıda endüstrisi için bir pigment kaynağı olarak kabul edilirler. Geniposid glisin polimerleri geliştirilmiş ışık stabilitesine sahiptir [76].

Gardenia pigmentleri, şekerler, tatlılar, dondurma, erişte, taklit yengeç, havyar, likör, fırınlanmış ürünlerde kullanılmak üzere önerilmiştir. Bu pigmentler FDA tarafından onaylanmamıştır [76].

2.1.3.7 Karotenoidler

Karotenoidler, bitkiler, algler ve fotosentetik bakteriler tarafından metabolize edilen çeşitli meyve ve sebzelerde bulunan sarı, turuncu ve kırmızı renklerden sorumlu olan doğal pigmentlerdir [80]. Karotenoidler fonksiyonel gruplarına göre iki gruba ayrılabilir; lutein ve zeaksantin dâhil olmak üzere fonksiyonel grup olarak oksijen içeren ksantofiller ve α-karoten, β-karoten, likopen gibi herhangi bir fonksiyonel grup olmaksızın sadece ana hidrokarbon zincirini içeren karotenlerdir. Polar grupların eklenmesi (epoksi, hidroksil ve keto) karotenoidlerin polaritesini değiştirir ve biyolojik fonksiyonları etkiler [81].

Karotenoidler doğal olarak oluşan pigment gruplarının içinde en yaygın olanlarıdır. Karotenoidlerin çoğu ksantofillerdir ve yaprak döken ağaçların yapraklarındaki sonbahar renklerine ve vahşi horoz kuşu, flamingo gibi kuşların etkileyici tüylerine katkıda bulunurlar. Pek çok kırmızı ve sarı meyve ve sebzenin çekici renkleri de karotenoid içeriğine bağlıdır [54].

Karotenoidler, fotosentetik organizmalar, bazı fotosentetik olmayan bakteriler ve mantarlar tarafından da sentezlenen en yaygın izoprenoid pigment sınıfıdır [82]. Karotenoidler, yosunlar, mayalar, küfler, mantarlar, bakteriler ve memeliler de dâhil olmak üzere tüm bitki ve hayvan sınıflarında görülmektedir [54]. Hayvanlar (bazı yaprak bitleri hariç) karotenoidleri sentezleyemedikleri için, bu bileşikleri tükettikleri besinlerden karşılamaktadır [54], [82]. Domates, kırmızıbiber, safran, mısır, papaya, karpuz, kayısı, turunçgiller, şeftali, havuç, kadife çiçeği gibi bitkisel; yumurta, som balığı, ıstakoz, yengeç hayvansal ürünlerdeki renklerden sorumlu pigmentlerdir [83], [84]. Karotenoidlerin fonksiyonları Çizelge 2.6 da verilmiştir [76].

Çizelge 2.6 Karotenoidlerin fonksiyonları [76]

Fonksiyonları	**Açıklaması**
Ekolojik fonksiyon	Renk, üreme ile ilişkilidir, örn. tohum rengi, onları dağıtan hayvanları çeker.
Fotosentez	Klorofil döngüsünde ışığa karşı koruyucu olarak
Ksantofil döngüsü	Işığa karşı koruma
Antioksidan	Karotenoidlerin koruyucu rolü, antioksidan aktivitesi ile ilişkilidir.

Karoteniodler 8 adet izoprenoid ünitesinden oluşan 40 karbonlu terpenoidlerdir. Konjuge yapıda reaktif çift bağ içerir. Kimyasal yapılarına göre karotenoidler; karotenler (oksijen içermeyen) ve ksantofiller (oksijen içeren) olmak üzere iki kısımda incelenir. Karotenler hidrokarbon yapıda, ksantofiller ise yapısında hidroksil, metoksil, karboksil, keto veya epoksi gibi gruplar içermektedir. α- karoten, β-karoten ve likopen en yaygın karotenlere; lutein, zeaksantin, kapsantin, kantaksantin, astaksantin, β-kriptoksantin, bixin de ksantofillere örnek verilebilir. Karotenoidler, yağ asitleri, şekerler ve hatta proteinler dâhil olmak üzere diğer moleküller ile bağlı yapıda olabilirler. Ksantofiller tipik olarak birçok meyvede çiçek ve yumrular gibi diğer bitki organlarında yağ asitleri ile esterifiye edilir. Benzer şekilde, krosin ve krosetin bileşiklerinde olduğu gibi şekerlerle glikozidik bağlarla bağlı karotenoidler de vardır [61]. Diğer yandan, bazı karotenoidler suda çözünür ve karotenoidi stabilize ettikleri görülen proteinler (karotenoproteinler) ile kompleksler oluşturabilirler [85], [86].

Karotenoidlerin renkleri proteinlerle oluşturdukları bileşiklerde değişiklik gösterir. Örneğin, kırmızı renkteki antaksantin proteinlerle komplex oluşturduğunda mavi renge dönüşmektedir [61].

Bazı karotenoidler, sindirim ve emilim sırasında oksidatif metabolizma ile değişime uğrayabilmektedir [54]. Karotenoidler zincir uzunluğu kısaldıkça sarı, uzadıkça kırmızı renk alır.

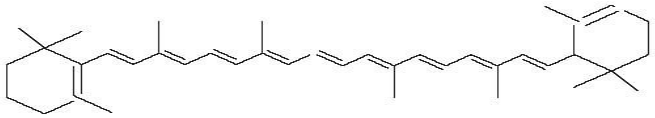
Karotenoidler, çok çeşitli gıdaların renginden sorumlu olan yağda çözünen pigmentlerdir [87]. Bunlar genel olarak suda çözünmeyip, yağda çözünen bileşikler olmasına rağmen, suda çözünen krosin ve norbiksin gibi karotenoidler de mevcuttur. Bu bileşikler ışık ve oksijene karşı aşırı duyarlılık gösterirken, ısıya karşı farklı duyarlılık göstermektedir. Isıya karşı karotenler ksantofillere göre daha fazla dirençlidir. Oksidatif parçalanma sonucunda karotenoidlerden çeşitli aroma bileşenleri oluşmaktadır [61].

Bugüne kadar doğal kaynaklardan yaklaşık 750 kadar karotenoid (cis-trans izomerleri dâhil değil) belirlenmiş olup, bunlardan kimyasal yapılarına bağlı olarak 60 tanesinin pro A vitamini aktivitesine sahip olduğu tespit edilmiştir [54], [61]. Bu bileşiklerden en önemli pro A vitamin aktivitesine sahip olan karotenoidler, α-karoten, β-karoten ve β-kriptoksantindir [87]. Likopen doğada çok yaygın bulunmaktadır. Likopenin A vitamini aktivitesi olmamasına rağmen, β–karotenden daha fazla antioksidan

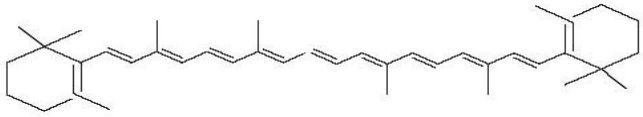
kapasiteye sahip olan bir karotendir [61]. Safran stigmaları, yüksek antioksidan özelliklere sahip önemli miktarda karotenoid içermektedir [24]. Bazı karotenoid bileşiklerin kimyasal yapıları Şekil 2.5 de verilmiştir [61].

Bitkilerde karotenoidler serbest formda veya yağ asitleri ile esterleşmiş olarak bulunabilmektedir. Her ne kadar esterifikasyon, karotenoidin kromofor özelliklerini değiştirmese de kimyasal ve biyolojik özelliklerini değiştirmektedir [88]. Bu özellikler aynı zamanda karotenoid molekülüne bağlı olan yağlı asit türüne de bağlıdır. Esterifikasyon, yüksek lipofilik moleküllerin lipit açısından zengin plastoglubullar içerisine entegrasyonuna yardımcı olarak karotenoid depolanmasını kolaylaştırır [89].

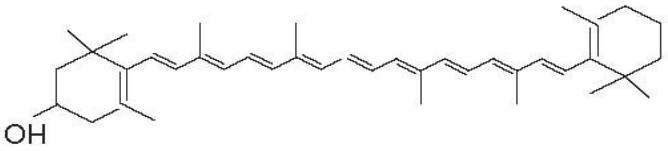
Karotenoidler, fiziksel ve kimyasal özelliklerini değiştirebilen ve biyolojik rollerini etkileyebilen yağ asitleri, şekerler, proteinler veya diğer bileşiklere bağlı olarak bulunabilmektedir. Ayrıca, karotenoidlerin oksidatif bölünmesi sonucu, bazı önemli pigment ve uçucu (aroma) bileşikler olan apokarotenoidler gibi daha küçük moleküller oluşmaktadır. Karotenoidlerin enzimatik olarak kırılması ile hem bitkide (hormonlar, retrograd sinyaller) ve hem de hayvanlarda (retinoidler) biyolojik olarak aktif moleküllerin oluşumunu sağlamaktadır [85].



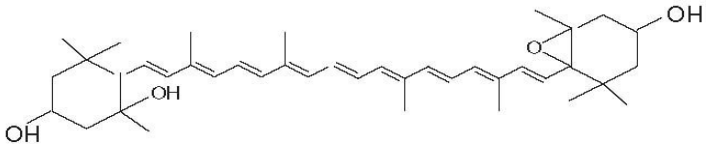
α-karoten



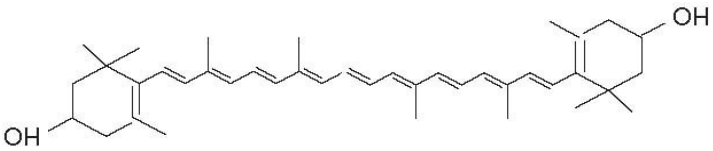
β-karoten



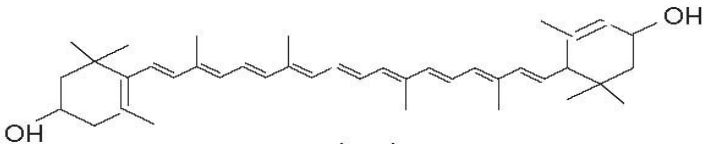
β-kriptoksantin



Neoksantin



Zeaksantin



Lutein

Şekil 2.5 Karotenoidlerin kimyasal yapıları [61]

2.1.3.7.1 Doğal Renk Maddesi Olarak Karotenoidler

İnsanlar yüzyıllardır gıdaların renklendirmesi amacıyla karotenoidleri kullanmışlardır. Ticari önemi olan karotenoid kaynakları ve kullanım alanları Çizelge 2.7'de verilmiştir. Safran, kırmızıbiber, yapraklar ve kırmızı palmiye yağı en çok kullanılan pigmentlerden bazılarıdır. Bu ürünler, pigmentlerin ve tanımlanamayan bazı maddelerin karışımlarını içermektedir. Yüzyıllar boyunca doğal karotenoid kaynakları devam etmiştir ve bunların yenileri ortaya çıkmıştır. Karotenoidlerin çok önemli biyolojik aktiviteleri vardır ve bunların gıda ve yem olarak kullanımı günümüzde yaygındır. A vitamini ve antioksidan aktivitelerinden dolayı tavsiye edilmektedir ve vücut sağlığının korunması için çok önemlidir. Bununla birlikte, karotenoidler lipitlerdir ve gıda endüstrisinde uygulanmaları için, farklı yapılara (örn. kolloidal preparatlar, proteinli kompleksler) dahil edilmesi, yağlı (örn. margarin, tereyağı) veya sulu ortamlarda (örn., içecekler, konserve edilmiş çorbalar) kullanım için gerekli olmuştur [76].

Karotenoidlerin çok azı renk katkısı olarak elde edilmiştir. Gıdalarda en çok kullanılan doğal karotenoid ekstraktları annatto (biksin ve norbiksin), kırmızı acı biber ekstraktları (kapsantin ve kapsorubin), safran, kadife çiçeği, havuç ekstraktları, likopen ve β-karotendir [54]. Renklendirici olarak margarin, tereyağı, dondurma, peynir, yoğurt, şekerleme, çikolata, meyve suları gibi ürünlerde kullanılmaktadır [76].

Zeaksantinden türetilen apokarotenoidler (ör., krosin, krosetin glikozitleri), safranın kırmızı rengine katkıda bulunur. Benzer şekilde, *Bixa orellana*'dan üretilen kırmızı bir apokarotenoid, biksin (annatto), gıdalarda ve kozmetiklerde yaygın olarak kullanılan bir aroma ve renklendirme ajanıdır [90], [91].

Karotenoidlerin bileşimi, bitki kaynakları arasında hem kantitatif hem de kalitatif olarak farklık göstermektedir. Bileşimleri, bitkinin kaynağına, olgunluk derecesine, çeşit veya tür farklılıklarına, iklimsel ya da coğrafi etkilere, kullanılan bitkinin kısmına, tarımsal üretim koşullarına, hasat sonrası işleme, imalat ve depolama gibi faktörlere bağlı olarak değişmektedir [54].

Çizelge 2.7 Ticari önemi olan karotenoid kaynakları [76]

Kaynaklar	Başlıca Karotenoidler	Kullanım Alanları	Kullanım Şekli
Annotto (*Bixa orellana*)	Biksin ve norbiksin	Gıda, kozmetik ve tekstilde renklendirici olarak	Yağda çözünen ekstrakt (%0.2-0.3) Yağ süspansiyonu (% 4) Suda çözünen ekstrakt (~%5)
Karotenler (Sebzeler; sebze yağları, havuç)	β-karoten	Yem katkısı	Oleoresinler
Dunaliella sp.(Alg)	β -karoten	Gıda ve yem katkısı, diyet takviyesi	Bitkisel yağ ve suda dağılabilir tozlarda çözelti veya süspansiyonlar
Haematococcus sp. (Alg)	Antaksantin	Yem ve fonksiyonel gıda katkısı	Çözelti, süspansiyon veya emülsiyonlar, dondurularak kurutulmuş ürünler
Marigold (*Tagetes erecta*, Kadife Çiçeği)	Lutein ve zeaksantin	Piliç ve balık yemi katkısı, Avrupa'da gıda katkısı olarak (makarna, sebze yağları, margarin, fırın ürünleri)	Kurutulmuş çiçek yaprakları, oleoresin, saflaştırılmış oleoresin
Paprika (*Capsicum annum*, kırmızı biber	Kapsaksantin	Gıdalara (pizza, et, çorba, soslar, peynir, fırın ürünleri) renk ve tat vermek amacıyla baharat olarak kullanılır.	Kırmızı biber tozu ve oleoresin
Safran (*Crocus sativus*)	Krosin ve krosetin	Gıda (pahalı olması nedeni ile özel ürünlerde) ve Farmosotik ürünlerde	Safran tozu ve ekstraktları
Domates (*Lycopersicum esculentum*)	Likopen ve β-karoten	Gıda maddesi olarak domates ve nutrasötik ve gıda renklendirici olarak likopen preparatları	Farklı domates sunumları
Sentetik karotenoidler	β-karoten, β-apo-8'-karotenal, kantaksantin	Gıda ve yem katkısı, diyet takviyesi	Suda dağılabilir ürünler, kolloidal süspansiyonlar, yağlı çözeltiler

2.1.3.7.2. Karotenoidlerin Ekstraksiyonu

Karotenoid pigmentleri genel olarak polar çözgenlerle ekstrakte edilmekle birlikte apolar çözücülerle de ektraksiyonu gerçekleştirilmektedir [61].

Genel olarak karotenoidler, aseton, kloroform, hekzan, izopropanol, metanol, metilen klorür ve dietil eter gibi organik çözücüler kullanılarak ekstrakte edilir. Karotenoidlerin ekstraksiyonu üzerinde sinerjik bir etki sağlayan çok çeşitli solvent kombinasyonları da kullanılmaktadır. Uygun çözücü ya da çözücü karışımları seçimi,

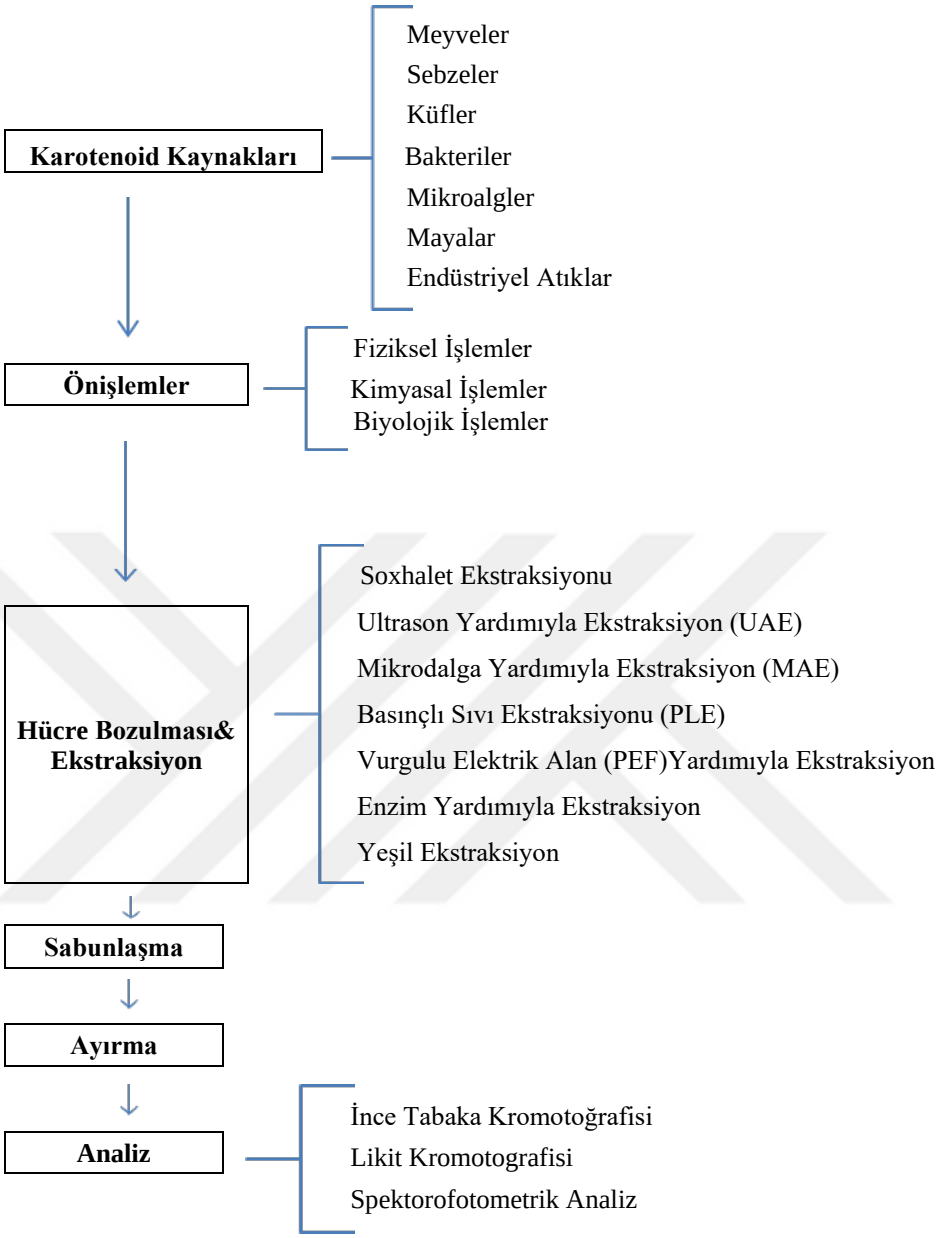
karotenoidlerin etkili biçimde çıkarılması için en kritik faktörlerden biridir. Bununla birlikte, uygun çözücü seçimi her zaman kolay değildir, çünkü mevcut karotenoidlerin fonksiyonel grubu (polarite), zincir uzunluğu, örnek matriksi, bileşenleri ve nem içeriği önemli roller oynamaktadır [82].

Ekstraksiyon için kullanılan çözücülerin çoğu (etanol, heksan ve aseton dahil) çevresel (hava, su vb), sağlık (kronik ve akut toksisite ve tahriş) ve güvenlik (ayrışma, patlama) tehlikelerine sahiptir. Bununla birlikte, çevre, sağlık ve güvenlik konularına dayanarak, genellikle karotenoidlerin ekstraksiyonu için etanol ve aseton kullanımı hekzan, dietil eter, diklorometan ve kloroform ile karşılaştırıldığında daha fazla tercih edilen çözücülerdir [82].

2.1.3.7.3. Karotenoidlerin Ekstraksiyon Yöntemleri

Gıda matrikslerinden karotenoid ekstraksiyonu için yöntem seçimi, çeşitli polarite seviyelerine sahip çeşitli karotenoidlerin varlığı ile gıda matrikslerinde çeşitli fiziksel ve kimyasal engellerin varlığı nedeniyle çok önemlidir. Bitki ve mikroalgal hücreler, çözücünün hücreye girmesine engel teşkil eden dinamik, kompleks ve sert hücre duvarlarından oluşur. Ayrıca, proteinler ve yağ asitleri gibi diğer makromoleküllerle karotenoidler arasındaki sıkı ilişki, ekstraksiyon sırasında karotenoidlerin kütle transferini engeller. Böylece, ekstraksiyonun ilk adımında, ekstraksiyonu kolaylaştırmak için bu bariyerler, fiziksel (pişirme, kurutma, ozmotik şok, donma-çözülme, kriyojenik öğütme), kimyasal (asit, baz, sürfaktanlar), enzimatik veya biyolojik yollarla bozulur. Bunun için uygun yöntemlerin seçimi temel olarak hücresel matriks ve hücre duvarı özelliklerine bağlıdır. Doğal kaynaklardan karotenoidlerin ekstraksiyonu, yöntem ve analizi ile ilgili çeşitli adımlar Şekil 2.6'da özetlenmiştir [82]. Ultrason, kavitasyon yoluyla proteinler gibi kimyasal bileşenleri değiştirmek için gıda işlemede kullanılmaktadır [17].

Doku numuneleri düşük sıcaklıkta ve antioksidan varlığında ekstraksiyondan önce homojenize edilir. İyi bir ekstraksiyon işlemi, tüm karotenoidleri dokudan çıkarmalı ve yapılarını değiştirmeden bunları çözeltiye almalıdır. Analiz edilen malzemelerin (gıda maddeleri, bitkiler, hayvan ve insan örnekleri) geniş spektrumundan ve mevcut olan karotenoidler nedeniyle standart bir ekstraksiyon yöntemi bulunmamaktadır [54].



Şekil 2.6 Doğal kaynaklardan karotenoidlerin ekstraksiyonu, yöntem ve analizleri [82]

2.1.3.7.4. Karotenoidlerin Tespiti ve Tanımlanması

Karotenoidlerin absorbsiyonu 400 ile 500 nm arasında gerçekleşmektedir. Bilinen yapıya sahip olan karotenoidler, kromatografik davranışın, UV-görünür absorpsiyon spektrumlarının (maksimum absorpsiyonların dalga boyları ve spektral ince yapının şekli) birleştirilmiş kullanımı ile tür, yer ve sayısının doğrulanması için spesifik grup kimyasal reaksiyonları ile kesin olarak tanımlanabilir [54]. HPLC alıkonma süresi ve

absorpsiyon spektrumları, kütle spektrumları, NMR spektrumları gibi spektroskopik yöntemler olmak üzere olağan karotenoidlerin tanımlanması için genel yöntemler kullanılmaktadır [92].

2.1.3.7.5. Karotenoidlerin Sağlık Üzerine Etkileri

Hem karotenoidler hem de enzimatik parçalanma ürünleri, insan sağlığını olumlu etkileyen süreçlerle ilişkilidir. Karotenoidler, gıda maddeleri, yem katkı maddeleri ve takviyeleri olarak endüstride yaygın olarak kullanılmaktadır [85].

Meyve ve sebzeler, genellikle sağlıklı bir diyette önemli katkılar olarak kabul edilir ve bunların besinlerle alımı, kanser, kardiyovasküler hastalıklar, nöral tüp defektleri ve katarakt gibi spesifik hastalıkların riskini azaltmak için son derece yararlıdır. Meyve ve sebzelerden gelen karotenoidler, folik asit ve diyet lifi gibi biyoaktif bileşenler bu hastalıkların önlenmesinde önemli rol oynamaktadır. Karotenoidler ve türevleri çok yönlü izoprenoidlerdir ve hücresel antioksidan özelliklerden gen regülasyonuna kadar bitkilerde ve hayvanlarda hayati rol oynarlar, böylece hücresel ve moleküler düzeyde önemleri belirlenir. Diyetimizdeki karotenoidlerin en önemli özellikleri, antioksidan ve provitamin A aktivitesi ile besinimize verdikleri renktir. Gıdalardaki karotenoidlerin bileşimi ve biyoyararlanımı, işleme ve diğer hasat sonrası teknolojilerden önemli ölçüde etkilenmektedir [81].

Meyve ve sebzeler, karotenoidlerin başlıca kaynağıdır ve vitamin A aktivitesi nedeniyle diyette önemli bir rol oynar. Bunun dışında, karotenoidler antioksidan aktivite, hücreler arası iletişim ve bağışıklık sistemi aktivitesi için de önemlidir [81], [93].

Tipik bir insan diyetinde yaklaşık 40 tür karotenoid vardır. İnsan kanında ve dokularında yaklaşık 20 çeşit karotenoid tespit edilmiştir [94]. Bazı karotenoidler (özellikle ksantofiller) esas olarak şilomikronların yüzeyinde lokalize olduğu için, karotenoidlerin bir fraksiyonu muhtemelen lipoproteinlerin diğer sınıflarına ve/veya bazı dokularda intravasküler metabolizma sırasında transfer edilir. Şilomikronlar yoluyla karaciğere ulaşan karotenoidler, bu organda depolanır veya safrada elimine edilir ya da periferal dokulara dağıtılmak üzere gönderilir [89].

Karotenoidler, antioksidan/anti3 enflamatuar özelliklere sahip C-30 veya C-40 bazlı pigmentlerdir. Özellikle meyve ve sebzeler ile alımı, tip 2 diyabet, kardiyovasküler

hastalıklar, yaşa bağlı maküler dejenerasyon ve çeşitli kanser türleri gibi kronik hastalık riskini azaltmaktadır [89].

Vitamin A, vitamin A eksikliğinin deney hayvanlarının enfeksiyonlarının şiddetini arttığını gösterdiği için yirminci yüzyılın başlarında antienfektif vitamin olarak adlandırılmıştır [93].

Bazı çalışmalar, karotenoidlerin diyet ile alımında, farklı dokularda potansiyel koruyucu ve/veya terapötik etkilerini ortaya koyan antitümör etkileri olduğunu göstermiştir [94]. Ayrıca, antimikrobiyal ve antiviral olmak üzere kardiyovasküler hastalıklar, diyabet ve bazı kanser türleri gibi dejeneratif hastalıkların önlenmesi için bağışıklık sistemini düzenleyici ve anti-inflamatuar aktivite sergiledikleri de görülmektedir [95].

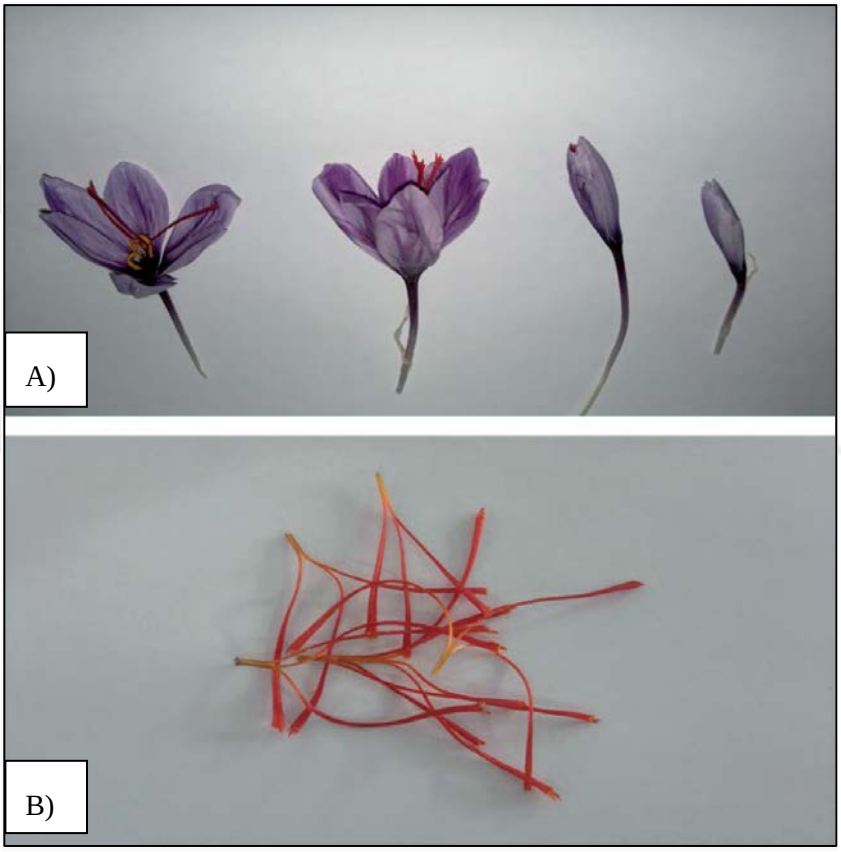
Pro A vitamini aktivitesine sahip olsun veya olmasın karotenoid tüketimi kanser, kalp ve damar hastalıkları, diğer kronik hastalıkların (örn. katarakt ve yaşa bağlı dejenerasyon) ve dejeneratif hastalıkların önlenmesi (örn. Alzheimer Hastalığı) gibi birtakım sağlık yararları gösterdiği görülmektedir [87].

Karotenoidlerin absorpsiyon etkinliğinin 20-30 mg'a kadar sabit kaldığı ve daha sonra karışık misellerin karotenoidleri çözme kapasitesi, bağırsak taşımalarında yer alan membran proteinlerinin doyması, doygunluk hücre içi bölme ve/veya şilomikronların çözünme kapasitesi gibi bazı faktörlere bağlı olarak daha büyük miktarlarda azaldığı düşünülmektedir. Emici kapasitenin bu doygunluğu likopen için rapor edilmiştir [89].

Fonksiyonel gıdalara ilgi son yıllarda artmaktadır. Bir gıda bileşeni sağlığın iyileştirilmesine veya hastalık riskini azaltıcı etki gösterilebiliyorsa, fonksiyonel kabul edilir. Fonksiyonel katkı maddeleri arasında, karotenoidler, oksidatif strese karşı koruma sağlayan antioksidan kapasiteleri nedeniyle değerli bileşikler olarak vurgulanmıştır [95].

2.2 Safran (*Crocus sativus* L.)

Safran dünyadaki en eski ve en pahalı baharatlardan biridir [27]. Iridaceae (süsengiller) familyasına ait olan *Crocus sativus* L.'un (safran) Asya, Avrupa ve Amerika da yaygın olarak tarımsal üretimi yapılmaktadır. Kırmızı altın olarak bilinen safran, sarı renk, acı tat ve yoğun aromaya sahip çiçeklerin kurutulmuş stigmalarından elde edilen bir baharattır. Gıda boyası, aroma verici, tatlandırıcı ve bitkisel tedavi gibi fonksiyonel özelliklerinden dolayı, safranın (*Crocus sativus* L.) kurutulmuş stigmaları, antik dönemlerden beri ticari bir ürün olarak kullanılmıştır [8], [9], [96]. Şekil 2.7'de safran çiçeği (A) ve ayrılmış stigmaları (B) görülmektedir [9].



Şekil 2.7 Safran çiçeği (A) ve ayrılmış stigmaları (B) [9]

Safranın, geleneksel tıpta depresyon, kanser gibi çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanıldığı ve antikanser aktivitelerinin olduğu bildirilmektedir [97]. In vitro, in vivo ve klinik ortamlarda yapılan son çalışmalarda safran tüketiminin, anti-depresan ve anti-anksiyete gibi ruh sağlığını, premenstruasyon sendromu önleyici ve doğurganlığı destekleyici olumlu etkiler de dâhil olmak üzere çeşitli tıbbi endikasyonlarda potansiyel sağlık faydalarının olduğu tanımlanmıştır [98].

Safran, tarlada ya da doğal ortamlarda farklı iklim koşullarında yetiştirilmektedir [99], ancak, çiçekleri uzun süre kötü hava koşullarına maruz kaldığında özelliklerini kaybedebilmektedir, bu yüzden yetiştirildiği bölgeler sınırlıdır [96].

Dünya çapında her yıl 190 ton safran üretilmektedir [97]. Başlıca safran üreten ülkeler arasında İran, Türkiye, Yunanistan, İspanya, İtalya ve Hindistan bulunur. Bu ülkelerden, İran dünyanın en büyük safran üreticisi ve ihracatçısıdır; dünyada ki tüm safranın neredeyse %90'ı İran'da üretilmektedir [100], [101].

Anadolu'da yüzyıllardır üretilen safran bitkisinin, tarımı günümüzde en fazla Safranbolu'da yapılırken, Tokat, Kastamonu, Denizli ve Şanlıurfa gibi illerde de yetiştirme denemeleri uygulanmaktadır. Safran, Türkiye'de Akdeniz Bölgesi'nin nemli kısımları dışında kalan pek çok yerde, uygun olan topraklarda yetiştirilebilmektedir. Şekil 2.8'de safran bitkisi görülmektedir [102].



Şekil 2.8 Safran bitkisi (*Crocus sativus*) [102]

Safran bitkisi sonbaharda mor renkli çiçek açan, 20-30 cm boyunda, soğanlı bir kültür nebatıdır. Bitki yumruları ile üretilir. Çiçeğin hasadı ekimde başlayıp kasımın ortalarına kadar sürmektedir [103]. Hasat sonrası tüm işlemler (stigmaların çiçeklerden ayrılması, kurutulması ve paketlenmesi), kalite ve dolayısıyla ticari değeri üzerinde önemli etkiye sahiptir. Kurutma işlemi kritik bir adımdır: uygulanan koşullar, üretici deneyimleri, deneme-yanılma yaklaşımları, gelenekler, mevcut kaynaklar ve kurutma araçları ile birlikte geniş çapta değişebilmektedir. Bu işlemler, renklendirme gücü, aroma ve lezzet gibi duyusal özellikleri içeren genel kaliteyi önemli ölçüde etkilemektedir [96].

Safranın kalitesi; toprak, iklim, yağış, hasat zamanı ve hasat sonrası işlemler gibi birçok faktöre bağlı olan rengi, tadı ve aroması ile belirlenir [104].

Yapılan çalışmalar, safranın 160'dan fazla bileşene sahip olduğunu göstermiştir [105]. *C. sativus*, polisakkaritler, lipidler, protein, mineraller (potasyum, demir, bakır, çinko, sodyum ve manganez vb.), vitaminler (riboflavin ve tiamin vb.), lif, terpen, flavonoid, antosiyanin ve karotenoid içeren sekonder metabolitlerin varlığı ile karakterize edilir [94], [106]. Çevresel koşullara ve yetiştirildiği ülkeye bağlı olarak bazı kimyasal bileşenlerde değişiklik görülebilmektedir [6], [96], [99].

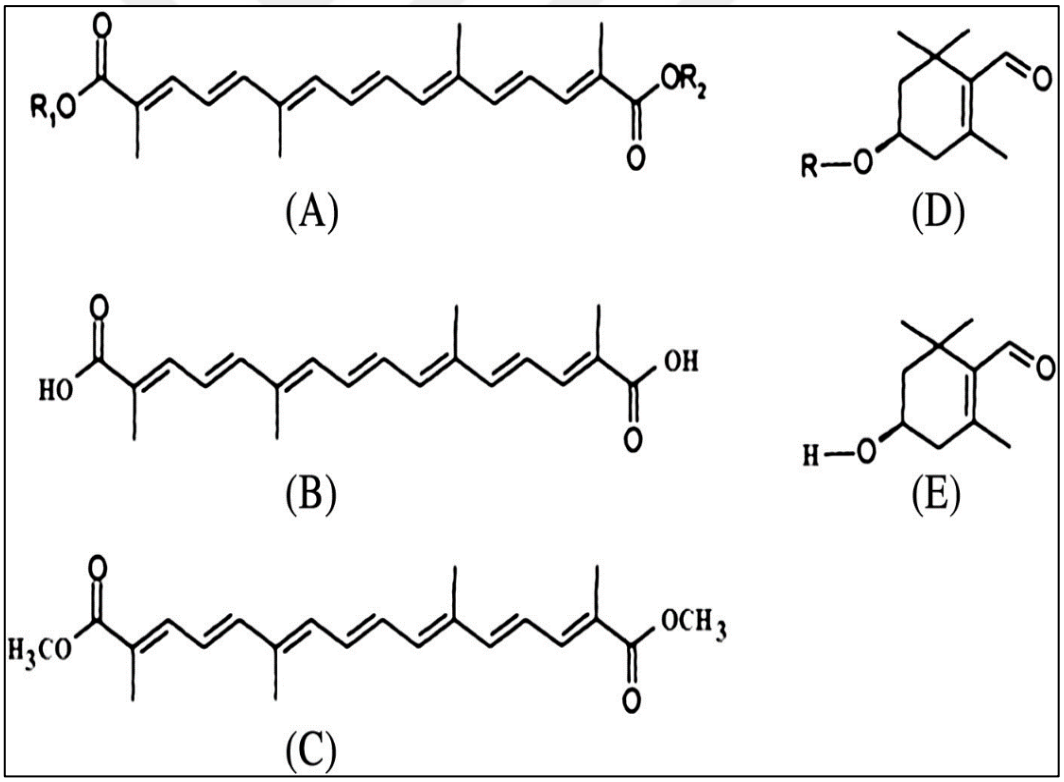
Safranın önemi, içeriğindeki üç ana bileşenin, krosin ($C_{44}H_{64}O_{24}$), pikrokrosin ($C_{16}H_{26}O_7$) ve safranalın ($C_{10}H_{14}O$) [99] varlığına bağlı olarak; renk, tat ve aroma gibi kendine özgü nitelik ve duyusal özellikleriyle ilgilidir. Bu özelliklerinin yanısıra çeşitli sağlık faydaları gösterdiği kabul edilmiştir [96], [107].

Krosin, çeşitliliğe, büyüme koşullarına ve işleme yöntemlerine bağlı olarak safranın toplam kuru maddesinin yaklaşık %6-16'sını içerir. Ağırlıkça ikinci en fazla bulunan bileşen olan pikrokrosin, safranın gerçek acı tadını verir ve safranın kuru maddesinin %1-13'ünü oluşturur. Bir başka önemli kimyasal bileşen olan safranal, safranın aromasından sorumludur. Stigmalarda 160'dan fazla uçucu safran bileşeni tespit edilmiştir. Safranal, uçucu bileşenlerin yaklaşık %30-70'ini ve safranın kuru maddesinin %0,001'ini oluşturur [99], [108]. Şekil 2.10'da, safranın ana bileşenlerinin yapıları görülmektedir [94].

Krosin, esas olarak safranın renginden sorumludur ve suda çözünür karotenoid (krosetin *cis* ve *trans* glukozil esterleri) dir [97]. Safran pigmentlerinin sudaki yüksek çözünürlüğü, gıda renklendiricisi olarak, sulu formülasyon sistemlerinde çözünebilir veya dağılabilir özel formülasyonlar gerektiren diğer karotenoidlere kıyasla güçlü bir avantajdır. Safran, mutfak, fırıncılık, şekerleme, alkollü ve alkolsüz içeceklerde renklendirme özelliklerine sahip baharat olarak 1-260 ppm arasında değişen miktarlarda kullanılmaktadır. Safranın toplam pigment miktarı UV spektorofotometre ile 440 nm'de belirlenir. Genel olarak safranın gıda boyası olarak kullanımı 1966 yılında FDA tarafından kabul edilmiştir [76].

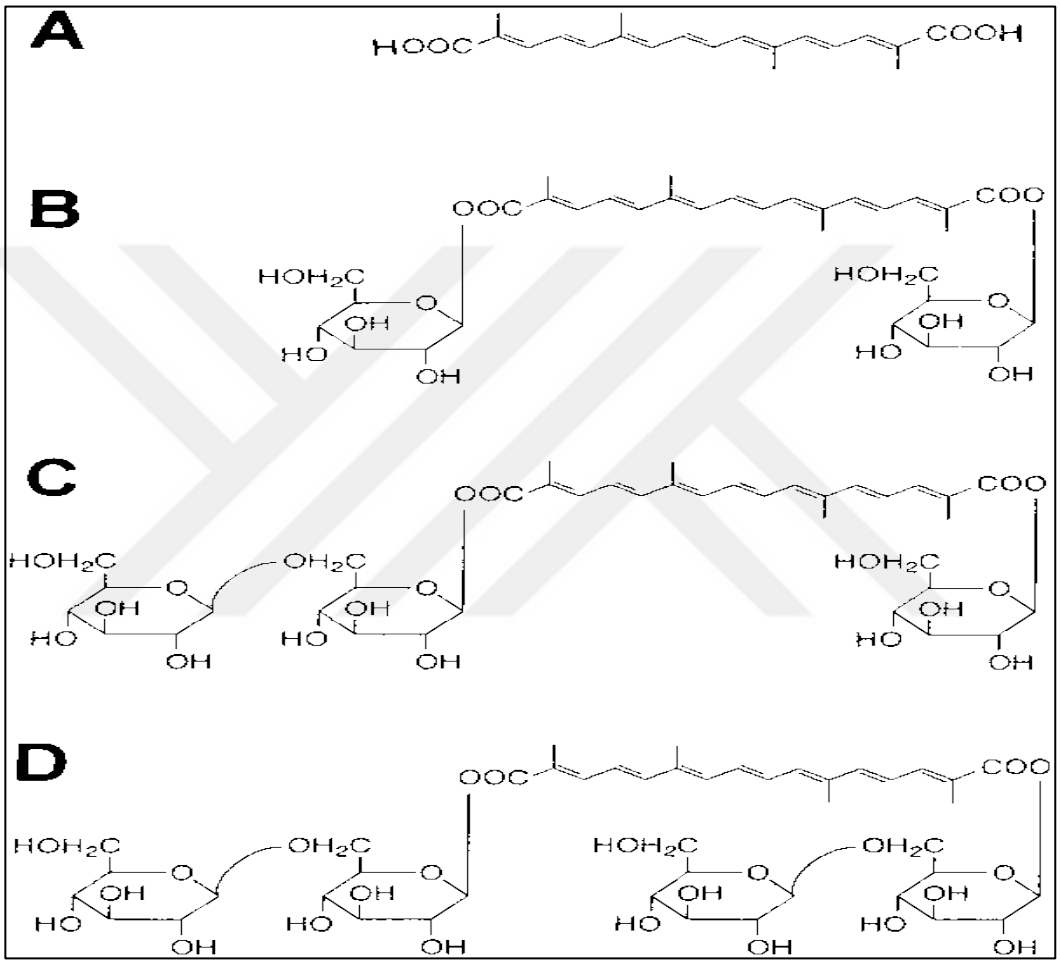
Karotenoid bakımından zengin olan *Crocus sativus*, iki ana doğal karotenoid olan krosin ve krosetin içerir. Karotenoidler, baharatın renginden ve tadından sorumlu olan önemli birer yardımcıdır [94].

Safranda lipofilik karotenoidler ve hidrofilik karotenoidler belirlenmiştir [109]. Lipofilik karotenoidler, likopen, α- ve β-karoten ve zeaksantin eser miktarlarda bulunmaktadır. Hidrofilik karotenoidler olan krosinler, safranın türüne, yetiştirilme koşullarına ve üretim yöntemlerine bağlı olarak değişik oranlarda bulunmaktadır [94]. Krosinin en fazla miktarını oluşturan krosin 1 (veya α-krosin), yüksek çözünürlüğe sahiptir ve digentibiyoz şeker moleküllerine bağlı olarak bulunmaktadır. Safranın rengi, krosin pigmentlerinin bir sonucudur [97]. Krosin koyu kırmızı renktedir, suda hızla çözünür ve sudaki çözeltisi konsantrasyonuna bağlı olarak kırmızıdan sarıya kadar değişen renk tonlarında bulunmaktadır [9]. Bundan dolayı yaygın olarak doğal gıda renklendiricisi olarak kullanılmaktadır. Erime noktası 186 ° C'dir. Krosetin, 285 ° C' lik bir erime noktasına sahip kırmızı kristaller oluşturan doğal bir karotenoiddir [6], [94]. Yüksek kaliteli bir ürün elde etmek için, işlem sırasında krosin hidrolizini kontrol etmek gereklidir [97].



Şekil 2.10 Safranın ana bileşenlerinin yapısı: A) Krosin: R_1=R_2=β-D-gentiobiosil ve/veya glukoz, B) krosetin: R_1=R_2=H, C) dimetilkrosetin: R_1=R_2=CH_3, D) Pikrokrosin: R=β-D-gentiobiosil ve/veya glukoz, E) Safranal, pikrokrosin'in aglikon susuz türevidir (R=H) [94]

Krosin(ler) glikozit karotenoid yapıya sahiptir. Renklerden sorumlu olan tüm krosinler trans-krosetin di-(β-D-gentiobiosyl) ester, trans-krosetin (β D-glucosyl)-(β-D-gentiobiosyl) ester, cis-krosetin di-(β-D-gentiobiosyl) ester, trans krosetin (β-D-gentiobiosyl) ester, trans-krosetin di-(β-D-glucosyl) ester and cis krosetin (β-D-glucosyl)-(β-D-gentiobiosyl) ester olarak adlandırılırlar [94]. Şekil 2.11 Safranın renk maddelerinin molekül yapılarını göstermektedir [110].

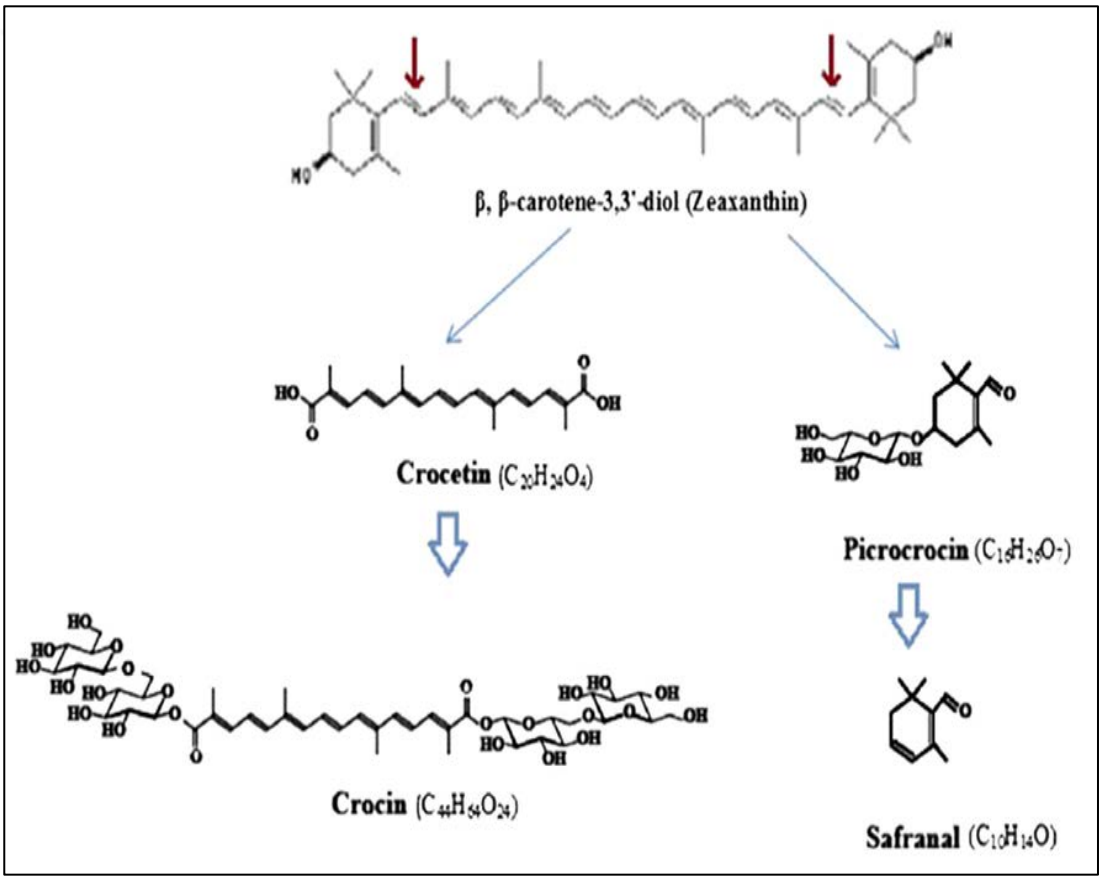


Şekil 2.11 Safranın renk maddelerinin molekül yapıları. A:krosetin, B:krosetin diglukoz ester, C:krosetin gentibioz glukoz ester, D:krosin [110]

Safran kalitesi ve saflığı en çok sorgulanan baharatlar arasındadır. Yüksek irtifa menzilleri, soğuk iklim koşulları ve ekstraksiyon sürecinin zahmetli olmasından dolayı sınırlı ekimi ve üretimi dikkate alındığında safran, ticari güdümlü sahtekarlık için potansiyel bir adaydır [101]. Safranın kalitesi, uluslararası ticari anlaşmalarda kullanılan, ISO 3632'e göre belirlenmektedir. Bu resmi yöntem, safran metabolitlerinin suda çözündürülmesini ve pikrokrosin, safranal ve krosin için sırasıyla 257 nm, 330 nm ve 440 nm'de ölçüm yapılacağını açıklamaktadır. Safran metabolitlerinin

konsantrasyonlarını daha kesin bir şekilde standardize etmek için ISO 3632'nin uygun bir kromatografik analiz ile karşılaştırılması önemlidir [98]. ISO yöntemi gerçek ve katkılı safranı birbirinden ayırt etmekte yeterli değildir. Çeşitli çalışmacılar safranın tanımlanması ve parametrelerin belirlenmesi için daha spesifik analitik yöntemleri önermişlerdir [111].

Safranın renk ve koku aktif bileşiklerinin biyojenezi, zeaksantin bölünme dioksijenazı ile 7, 8 (7', 8') noktalarında zeaksantinin biyo-oksidatif bölünmesiyle elde edilir. *C. sativus* stigmalarında, son adım, glikozil transferaz enzimi tarafından stigmaların kromoplastında üretilen zeaksantin bölünme ürünlerinin glikosilasyonunu içerir. Şekil 2.12, safran bileşenlerinin biyosentez yolunu göstermektedir [94].



Şekil 2.12 Safranın biyoaktif bileşenlerinin zeaksantinden sentezi [94]

2.2.1. Safranın Sağlık Üzerine Etkileri

Yapılan bazı çalışmalar, karotenoidlerin diyet ile alımında, farklı dokularda potansiyel koruyucu ve/veya terapötik etkilerini ortaya koyan antitümör etkileri olduğunu göstermiştir [94].

Mükemmel bir renklendirici olan krosin, serbest radikalleri süpürerek, hücreleri ve dokuları oksidasyona karşı koruyarak bir antioksidan görevi görür [6]. Krosinin kozmetik, gıda ve farmasötik ürünler de kullanımı diğer kaynaklardan da temin edilebilen hiperpigmentasyonla ilişkilidir [9], [12].

Safranın biyolojik veya farmakolojik potansiyeli safranda bulunan çok sayıda fitokimyasala bağlıdır. Bu fitokimyasallar, krosin, krosetin, pikrokrosin ve safranal en çok tıbbi olarak kabul edilen in vitro ve in vivo çalışmalarda incelenen bileşiklerdir. Deneysel çalışmalar safran tüketiminin metabolik bozukluklar (gastrik bozukluk), premenstrual sendrom, depresyon, uykusuzluk ve anksiyete, kardiyovasküler hastalıklar ve birçok kanser türü gibi daha düşük hastalık riski ile pozitif ilişkili olduğunu göstermektedir [6].

C. sativus, antihipertansif, antitusif, antijenotoksik, antikonvülsan ve antioksidan, antidepresan, anti-inflamatuar, sitotoksik etkiler, anksiyolitik afrodizyak, antinosiseptif ve gevşeme aktivitesi gibi tıbbi açıdan birçok önemli özelliklere sahiptir. Ayrıca, öğrenme ve hafıza artışını etkiler, retinanın ve choroid kan akışını arttırır, morfin geri çekilmesinin fiziksel belirtilerinin azalmasını sağlar [94], [110], [112].

C. sativus, gastrointestinal bozukluklar, ürolojik enfeksiyonlar ve habis tümörü gibi çeşitli tıbbi durumları tedavi etmek için kullanılmıştır [113]. Örneğin safranın sulu ekstresi, sıçanlarda mide kanserinin ilerlemesini doza bağlı bir şekilde inhibe ettiği görülmüştür [94], [114].

Safran karotenoidlerin insan sağlığı üzerindeki etkilerine, *C. sativus* çiçeklerinde bulunan birçok bileşiğin yüksek miktardaki antioksidan kapasitesinden dolayı artan bir ilgi vardır. Hidrojen peroksit, süperoksit anyon radikali, peroksil radikali, hidroksil radikali gibi reaktif oksijen türleri, insan vücudundaki en önemli oksidatif hasar kaynaklarıdır. Çeşitli etki mekanizmaları safran ekstrelerinin antioksidan etkisi ile ilişkili olabilir: a) enzimler (süperoksit dismutaz: SOD, peroksidaz) ile etkileşim veya monositlerdeki serbest radikallerin sinyal iletimi. Çünkü krosin yapısı terminal COOH gruplarına bağlı şeker kısımlarının varlığı hücre zarlarının penetrasyonunda rol oynar. İnsülin ilavesiyle uyarımdan sonra hipoksik koşullarda serbest radikaller üretilir. İnsülin ile uyarılmış monositlerin safran ekstreleri ile inkübasyonu, serbest radikal üretiminin belirgin bir şekilde azalmasıyla sonuçlanır, neredeyse insülinin olumsuz etkisini ortadan kaldırır; b) bileşiklere bağlı olarak değişen ROS'un doğrudan

baskılanması. Krosetinin serbest radikal süpürücü aktivitesi dimetilkrosetinden üstündür. Bunun nedeni karotenoidlerin yapısal özellikleridir. Konjuge çift bağların uzunluğu aynıdır. İki karotenoid arasındaki fark, krosetin içindeki karboksilik grubun hidroksil kısmının varlığı ve dimetilkrosetin içinde doymamış hidrokarbon zinciri üzerindeki metil ester grubunun varlığıdır. Serbest radikaller H-donörleri ile reaksiyona girme eğilimindedir; böylece krosetinde karboksilik grupta hidroksil bulunması, dimetilkrosetinden daha etkili olmasını sağlar. Dahası, krosetin içindeki antioksidan aktivite konsantrasyon arttıkça artar; fakat dimetilkrosetin içinde belirli bir noktaya ulaşır ve daha sonra azalmaya başlar. Ayrıca safranal, krosetin ve dimetilkrosetinden daha düşük antioksidan aktiviteye sahiptir. Bu nedenle, safranda bulunan krosin ile tedavi, beyin iskemi hacmini azaltabilir, SOD ve glutatyon peroksidaz aktivitelerini ve azalmış olan dialdehid içeriğini arttırabilir. Dialdehit, oksidatif stresin biyo-belirtecidir, çünkü poli-doymamış lipidlerin bozulması sırasında ROS'dan üretilmiştir [94].

Birçok araştırma safranın ve içerdiği bileşenlerin antikanser etkisi olduğunu ve yeni bir kemoterapi ilacı adayı olabileceğini göstermiştir. Mousavi vd., safran etanolik ekstresinin, göğüs kanseri hücresi (MCF-7) proliferasyonunun inhibisyonu üzerinde çalışmışlardır. Safranın, MCF-7 hücrelerine karşı %50 hücre büyümesini inhibe ettiğini bildirmişlerdir [115]. Safran ekstraktının MCF-7 hücrelerindeki canlılığı, konsantrasyon ve zamana bağlı bir şekilde azalttığını göstermişlerdir [32].

Rhaiee vd. [32] ’ nin yapmış olduğu başka bir çalışmada, krosin ve krosin yüklü nanopartiküllerin hücre canlılığı üzerindeki etkisini değerlendirilmiştir. Ayrıca, tedavi edilmemiş kanser hücrelerini kontrol örneği olarak test etmişlerdir. Sonuç olarak, kanser hücresi canlılık yüzdesinin, krosin konsantrasyonunun (2,5 ila 10 mg/ml) artmasıyla azaldığını belirlemişlerdir. Sonuç olarak, krosin yüklü nanopartiküllerin kanser hücreleri üzerindeki antikanser etkisinin, krosin varlığına bağlı olduğunu bildirmişlerdir.

Arihan vd’nin [116] yapmış olduğu bir çalışma da, CCl_4’ün neden olduğu eritrosit frajilitesi üzerinde, safranın aktif bileşenlerinin koruyucu etkisinin olduğunu belirlemişlerdir.

Safran ekstraktı güçlü antioksidan etkileri olan birçok karotenoid içermektedir ve CNS nöronlarını oksidatif hasara karşı korumaktadır. Bu nedenle, safran ve aktif bileşenleri,

bellek ve bilişsel işlevlerin bozulmasına eşlik eden CNS nörodejeneratif hastalıkların tedavisi için yararlı olduğu belirtilmektedir. Öncelikle, krosinin öğrenme davranışı ve LTP üzerindeki etkilerinin tutarlılığı, hipokampal LTP'nin bellek oluşumunda rol oynadığı hipotezini desteklemektedir. İkincisi, krosin, etanol kaynaklı hafıza bozukluğunun mekanizmasını incelemek için yeni bir farmakolojik araç olarak faydalı olabileceği öngörülmektedir [117].

2.3. Ultrasonografi Teknolojisi

Ultrason, insan kulağının işitme sınırını (~ 20 kHz) aşan frekansa sahip ses dalgaları olarak tanımlanır. Ultrason, prosesi en aza indirmek, kaliteyi en üst düzeye çıkarmak ve gıda ürünlerinin güvenliğini sağlamak için geliştirilen yeni teknolojilerden biridir [118].

Ultrason saniyede 20.000 veya daha fazla titreşimde dalga oluşturan bir enerji türüdür. Ultrasonik uygulamalarda hücre duvarları mekanik olarak parçalanarak kütle aktarımını kolaylaştırmaktadır. Ayrıca ultrasonun mekanik işlevi, çözgenin dokuya dağılımını da hızlandırmaktadır. Hücre içi bileşenlerin, mekanik olarak parçalanan hücre duvarından çözgene geçişi daha kolay gerçekleşerek etkili bir ekstraksiyon işlemi sağlanabilmektedir. Son yıllarda protein, antosiyanin, tartarik asit, aroma bileşenleri ve polisakkaritler gibi farklı bileşenlerin ekstraksiyonu için ultrason tekniğinin yaygın olarak kullanıldığı görülmektedir [51].

Ultrason, insan işitme sınırının ötesinde frekanslı ses dalgalarından oluşur. Frekans ayarlanarak, ultrason gıda dahil olmak üzere birçok endüstriyel uygulamada kullanılabilir. Ultrason dalgaları kullanılarak ekstraksiyon tekniği nispeten ucuz, basit [24] ve enerji tasarrufludur ve bu nedenle gıda ürünlerinin araştırılması ve değiştirilmesi için yeni bir teknoloji haline gelmiştir [118].

Ultrason (US), gıda endüstrisinde, daha yüksek ürün verimi, daha kısa işlem süresi, daha düşük işletme ve bakım maliyeti, gelişmiş tat, doku, lezzet ve renk eldesi gibi süreçler üzerinde önemli etkileri nedenleriyle uygulama bulan ve gelecek vaat eden teknolojidir [119]. Ultrason destekli ekstraksiyon (UAE) bitki materyallerinin analizi için etkili bir ekstraksiyon tekniği olarak son yıllarda kullanılmaktadır. Ultrason, katı maddeden sıvı faza kütle transferini yoğunlaştırarak [119], ekstraksiyon süresini kısaltmakta ve çözücü tüketimini azaltmaktadır [24], [120]. Ayrıca ısıl işlemlerin desteklenmesi, kütle transferini verimli hale getirmek ve gıda muhafazasının yanı sıra

doku tahrifi ve analizi gibi çeşitli uygulamalar için olumlu etkiler gösterdiği bildirilmiştir [121].

Ekstraksiyon, gıda ve farmasötik endüstrilerinde çeşitli uygulamalarla birlikte yürütülen operasyondur. Geleneksel ekstraksiyon işlemleri, geniş bir temas süresi için büyük miktarda çözücü ve ısı kullanır. Ekstraksiyon için ultrason kullanımı, hayvan ve sebze dokusundan birkaç çeşit ürünün ayıklanması için uygun şekilde çalışılmış ve kanıtlanmıştır. Ekstraksiyon işlemlerinde ultrason uygulaması genellikle ultrason destekli ekstraksiyon (UAE) olarak adlandırılır ve düşük sıcaklık ve daha az işlem süresi gibi geleneksel yöntemlere göre çeşitli avantajlar sunar, bu da enerji tasarrufu ve daha yüksek verim ile sonuçlanır [17].

Ultrason kullanımı birçok durumda (1) ekstraksiyon verimini arttırır; (2) organik çözücüler olmadan sulu ekstraksiyon işlemlerini geliştirir; (3) ekstraksiyon performansını iyileştirir ve (4) düşük veya kabul edilemez verime sahip olacak şartlar altında ısıya duyarlı bileşenlerin ekstraksiyonunu arttırarak alternatif ve ekouyumlu çözücüler kullanma fırsatı sağlamaktadır [122].

Ultrason çeşitli moleküller ve biyomateryaller için kullanılan ekstraksiyon teknolojisidir; polisakkaritler, uçucu yağlar, proteinler ve peptidler, ince kimyasallar (boyalar ve pigmentler), metaller, biyoaktif moleküller, alkaloidler, glikozidler, stilbenler, lignanlar ve kumarin gibi bileşenlerin ekstraksiyonu için kullanılan ekstraksiyon tekniklerinden biri olarak geniş çapta uygulanmaktadır [120], [122]. Ayrıca, ultrason teknolojisi son zamanlarda toprakta, gıda endüstrisinde, insan ve çeşitli organizmalarda bulunan pestisit kalıntıları, toksik maddeler ve ağır metallerin ortamdan uzaklaştırılması için yaygın olarak kullanılmaktadır. UAE, laboratuar ve araştırma enstitülerinde de yoğun bir şekilde kullanılmaktadır. Genellikle sıcaklık kontrolü ile donatılmış ultrasonik banyo, kullanımı kolay ve ucuzdur. Su banyosunda aynı anda çok sayıda numune işlem görebilmektedir. Ultrasonik banyonun tabanında belirli sayıda transdüser bulunur. Ultrasonik banyonun ana bileşeni olan dönüştürücüler, elektrik enerjisinin ultrason titreşimlerine dönüştürülmesi için özel bir güce sahiptir. Bu arada, jeneratörler, belirli bir frekans ve ışınlama gücünde transdüserler için arzu edilen bir dalga formu üretme üzerinde çalışır [120].

Elde edilen fiziksel, kimyasal ve biyokimyasal etkiler, uygulanan enerjiye güçlü bir şekilde bağlıdır [121]. Frekans aralığına dayalı olarak, gıda işleme, analiz ve kalite

kontrolünde 20 kHz ile 10 Mhz frekans aralığında ki düşük şiddetli ultrases ve yüksek şiddetli ultrases olarak iki farklı şekilde ultrason uygulaması yapılmaktadır [123]. Düşük şiddetli (düşük güç, düşük yoğunluklu) ultrason, yüksek kalite ve güvenlik sağlamak için işleme ve depolama sırasında non-invaziv analiz ve çeşitli gıda maddelerinin izlenmesi için kullanılabilen 0,1 W/cm^{2}'nin altındaki yoğunluklarda 100 kHz'den daha yüksek frekanslara sahiptir [118]. Düşük güçteki US, basınç dalgaları akustik akışa neden olurken, yüksek güçteki US (>1 W/ cm^{2}) ve düşük frekans (<0,1 MHz) yerel basınçlara neden olur. Bu, gaz kabarcıklarının sürekli olarak büyümesine yol açar [121], [123].

Düşük güç ultrason, gıda bileşenlerinin ve ürünlerin gıda özelliklerini kontrol etmek ve kalitesini arttırmak için önemli olan işleme ve depolama sırasında bileşimin ve fizikokimyasal özelliklerinin izlenmesi için kullanılır. Taze sebze ve meyvelerin hem hasat öncesi, hem de hasat sonrası, peynir işleme, ticari pişirme yağları, ekmek ve tahıl ürünleri, dökme ve emülsifiye yağ bazlı gıda ürünleri, gıda jelleri, havalandırılmış ve dondurulmuş gıdalarda kalite kontrolü için de kullanılır. Öte yandan, yüksek güç ultrason, kavitasyon yoluyla mekanik, fiziksel ve kimyasal/biyokimyasal değişiklikleri başlatır, bu da gıdayla temas eden yüzeylerde ekstraksiyon, donma, kurutma, emülsifikasyon ve patojenik bakterilerin inaktivasyonu gibi birçok gıda işleme tekniğini destekler. Ultrason uygulamaları arasında et ürünleri, sebze ve meyveler, tahıl ürünleri, gazlı gıdalar, bal, gıda jelleri, gıda proteinleri, gıda enzimleri, mikrobiyal inaktivasyon, dondurma, kurutma ve ekstraksiyon yer almaktadır [118].

Ultrason tekniğinde, termal etki, ultrason dalgalarının kinetik enerjisi, maddedeki turbülans artışına bağlı olarak termal enerjiye dönüştürüldüğünde ortaya çıkar. Mekanik etki, kavitasyon olgusundan kaynaklanmaktadır. Başka bir deyişle, ultrason sürekli bir akışkan üzerine uygulandığında, sinüzoidal akustik dalgalar üretir ve lokal basınç sıvının buhar basıncının altına düştüğünde sıvı içinde küçük gaz kabarcıkları büyür. Kabarcık büyümesi kritik bir boyuta ulaşırsa, yüksek güçlü ultrasonda en önemli etki olan kavitasyon olgusuna neden olur. Genel olarak şiddetli kabarcık patlamaları olgusu, yüksek basınç farkları, şok dalgaları ve sıvı jetleri gibi aşırı yerel koşullarla karakterizedir, böylece, sıvı ortamda bulunan katıların kopmasını teşvik etmektedir [119].

Ultrason işleminin sıvı veya katı gıdaların kalitesi üzerindeki etkileri, dış faktörlere (Ultrason gücü, işlem süresi, ultrasonik frekans, sıcaklık vb.) ve iç faktörlere (gıdanın çeşidi, bileşimi ve pH vb.) bağlı olarak değişmektedir [124].

Sonikasyon kontaminantların veya matrisin türüne bağlı olarak, daha hızlı ekstraksiyon süreleri avantajına sahiptir. Çözücü veya çözücü bileşimi, ekstraksiyon süresi, numune yükü ve su içeriği dâhil olmak üzere ultrasonik ekstraksiyon parametrelerinin optimizasyonu, daha verimli ve tekrarlanabilir ekstraksiyonlar için gerekli görülmektedir [125].

Ultrasonikasyon genellikle ayrıntılı cam malzeme ve enstrümantasyon gerektirmeden küçük miktarlarda organik çözücü kullanılarak yapılan nispeten düşük maliyetli bir yöntemdir [125].

2.4. Mikroenkapsülasyon Teknolojisi

Mikroenkapsülasyon, hassas maddelerin kalite koruma yöntemlerinden biridir ve yeni özelliklere sahip maddelerin üretimi için uygulanan bir tekniktir. Mikrokapsülleme, polimerik bir kabuk içinde mikron boyutlu parçacıkların bir araya getirilmesi işlemidir [126].

Doğal kaynaklardan elde edilen renk maddeleri ısı, ışık, pH, oksijen, nem vb. faktörlerden etkilenebilmektedir. Renk maddelerinin enkapsülasyonu ile renk bozulmaları engellenerek raf ömrünün uzatılması sağlanmaktadır. Sıcaklık, ışık, oksijen vb. çevresel faktörlere karşı renk maddeleri, kaplayıcı materyallerle enkapsüle edilerek stabilitesi artırılabilmektedir [127].

Mikrokapsülleme, bir maddeyi (aktif madde) başka bir madde (duvar malzemesi) ile kaplamak için bir süreç olarak tanımlanmaktadır. Kapsüllemenin temel amacı, ana malzemenin, ışığın, nemin ve oksijenin istenmeyen etkileri gibi olumsuz çevresel koşullardan korunması, böylece ürünün raf ömrünün artmasına katkıda bulunulması ve kapsüllenen maddenin kontrollü bir şekilde serbest bırakılmasının teşvik edilmesidir [128].

Mikrokapsülleme, mikron büyüklüğündeki katı parçacık veya sıvı damlacıklarını, inert bir kabuk içerisinde kapatacak bir süreç olarak tanımlanır ve bu da onları dış çevreden izole eder ve korur. Bu işlemle elde edilen ürünler, morfolojide ve içyapıda farklılaşan mikropartiküller, mikrokapsüller ve mikroküreler olarak adlandırılır [126].

Mikrokapsüllerin çapı birkaç mikrometreden birkaç milimetreye kadar değişen büyüklüktedir [129]. 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 [126]. Mikrokapsüllerin yapısı genellikle küresel yapıda bulunmasına rağmen, uygulanan mikroenkapsülasyon yöntemi, kaplanan materyalin ve duvar materyalinin bileşimi ile özellikleri mikrokapsüllerin şekline etki etmektedir [130].

Mikropartiküller veya mikrokapsüller, çekirdek bileşen ve kaplama veya kabuk malzemesi olmak üzere iki bileşenden oluşur [126]. Mikrokapsül içerisindeki materyal öz veya iç faz; mikrokapsül duvarı; kabuk, membran ya da kaplama olarak adlandırılır [131]. Çekirdek malzeme bir aktif bileşen içerirken, kaplama veya kabuk malzemesi çekirdek malzemeyi örterek korur. Aktif farmasötik bileşenler, proteinler, peptidler, uçucu yağlar, gıda maddeleri, pigmentler, boyalar, monomerler, katalizörler, pestisitler, vb. etil selüloz, hidroksil propilmetil selüloz, sodyum karboksi metil selüloz, sodyum aljinat, jelatin, polyesterler, kitosanlar, vb. gibi farklı kaplama veya kabuk malzemesi türleri ile kapsüllenebilir [126].

Mikroenkapsülasyonda kaplama materyali olarak karbonhidratlar (maltodekstrin, arap zamkı, guar gam, akasya gamı, laktoz, sükroz, nişasta, pullulan, alginatlar, karragenan vb.), proteinler (jelatin, gluten, sodyum kazeinat, yağsız peyniraltı suyu konsantresi, peptitler vb.) ve yağlar (balmumu, monogliseritler, katılaştırılmış yağlar) kullanılmaktadır [132].

Enkapsülasyon tekniği ile; antioksidan maddeler, esansiyel yağ asitleri, probiyotikler, prebiyotikler, bazı proteinler, mineral ve vitaminler, organik asitler, enzimler, tatlandırıcılar, renk maddeleri ve aroma maddeleri en yaygın kapsüllenen bileşenlerdir [133].

İdeal bir kaplama materyali; kapsüllenen materyal ile işleme, depolama sırasında etkileşime girmemeli, yüksek konsantrasyonda akışkan özelliği iyi olmalı, oluşturulan emülsiyon stabil olmalı, ürünün dağılmasını engellemeli, enkapsülasyon işlemindeki kurutma aşamasında çözgenin ayrılmasına izin vermelidir. Gıda endüstrisinde kullanılan çözücülerde (su, etanol vb.) kolay çözünebilmeli, enkapsüle ürünün ısı, ışık, nem gibi çevresel şartlardan etkilenmesini önlemeli, toksik olmamalı, ekonomik ve

uygulanabilirliği yüksek olmalı, yüksek hücre yükünü kaldırabilmelidir. Bu özelliklere sahip tek bir kaplama materyali olmadığı için kapsüle edilecek ürüne göre uygun konsantrasyonda, belli kaplama materyalleri seçilmelidir [132].

Enkapsülasyon, yaklaşık olarak 50 yıldır tıp, eczacılık, biyoloji ve gıda gibi sektörlerde biyoaktif bileşenlerin muhafazası amacıyla uygulanan bir yöntemdir [134]. Gıda sanayinde mikroenkapsülasyon birçok alanda kullanılmaktadır. Gıda endüstrisinde mikroenkapsülasyon tekniği aşağıdaki amaçlar için kullanılmaktadır;

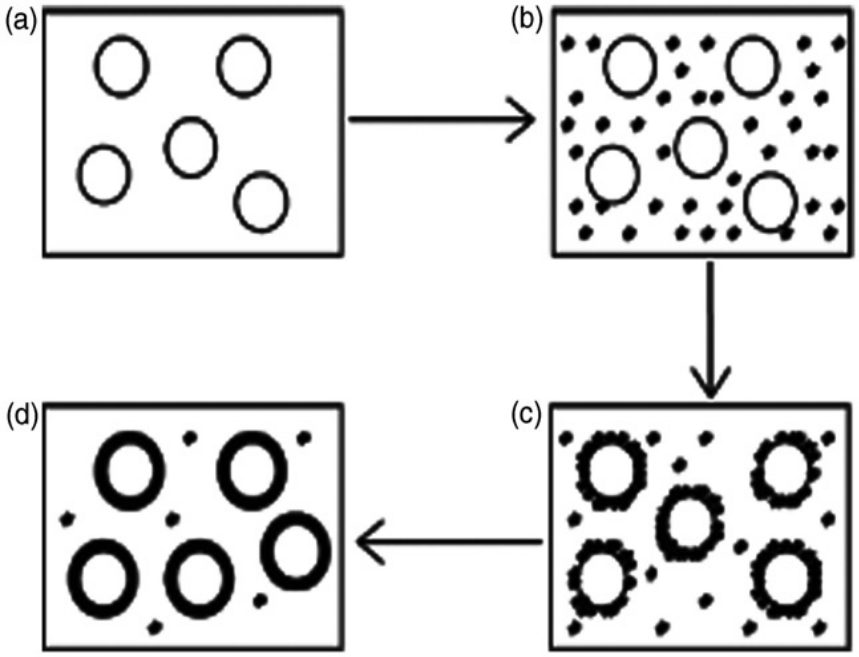
- Enkapsüle edilen madde ile çevre koşulları (ışık, oksijen, nem vb.) arasındaki etkileşimi azaltmak,
- Kapsüllenen maddenin evaporasyonunu düşürmek,
- Materyalin kullanım kolaylığı (sıvıdan katı forma dönüştürmek, topaklaşmayı engellemek vb.)
- İstenilen koşullarda kontrollü salınım sağlanması ve içeriklerin korunması,
- Maddenin renk, tat ve kokusunu değiştirmek,
- Kullanılacağı ortamda homojen dağılım sağlamak [135].

Mikroenkapsülasyon uygulamaları; püskürterek kurutma, dondurarak kurutma, püskürterek soğutma ve dondurma, akışkan yatakta kaplama, koaservasyon, ekstrüzyon- emülsiyon, santrifüj ekstrüzyon, ko-kristalizasyon, lipozomla kaplama, inklüzyon kompleksi oluşturma gibi tekniklerdir. En uygun yöntem ve kaplama materyalinin seçimi, kapsüllenecek materyalin özelliklerine göre yapılmaktadır [127].

Çeşitli kapsülleme teknikleri arasında sprey kurutma, gıda endüstrisinde en eski kapsülleme yöntemlerinden biridir [15]. Püskürtmeli kurutma ekonomik, esnek ve sürekli bir işlem olduğundan ve iyi kalitede ürün üretildiğinden, gıda endüstrisinde en yaygın kullanılan mikrokapsülasyon tekniğidir. Tipik olarak kuru, stabil gıda katkı maddelerinin ve aroma maddelerinin hazırlanmasında kullanılır. Günümüze kadar, birçok fenolik bileşik sprey kurutma ile mikrokapsül haline getirilmiştir [136].

Doğal renklendiricinin raf ömrü, ışık, ısı ve oksijen gibi çevresel faktörlere olan duyarlılıkları nedeniyle sınırlıdır. Doğal renklendiricilerin depolama stabilitesini arttırmak için uygun bir koruma tekniği uygulanmalıdır. Kapsülleme, krosin benzeri doğal renklendirici ve biyoaktif bileşiklerin, duvar ve çekirdek malzemeleri arasında fiziksel bir engel oluşturarak muhafaza edilmesi için uygun bir tekniktir [13], [14],

[15]. Öte yandan, doğal renklendiricilerin düşük ısı ve pH stabilitesi, uygulamalarını sınırlamaktadır. Doğal renklendiricinin pH ve sıcaklık stabilitesi, uygulanmadan önce belirlenmelidir [16]. Şekil 2.13'te enkapsülasyon aşamaları gösterilmiştir.



Şekil 2.13 Enkapsülasyon sürecinin şematik gösterimi. (a) Kabuk polimer çözeltisinde ana malzemenin dispersiyonu; (b) koaservatın çözeltide dağılımı; (c) çekirdek malzemenin koaservatın mikro damlacıkları ile kaplanması; (d) çekirdek parçacıkların etrafında sürekli kabuk oluşturmak için koaservatın birleşmesi [126]

BÖLÜM 3

MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

Materyal olarak safran çiçeğinin (*Crocus sativus* L.) kurutulmuş stigmaları (Şekil 3.1) kullanılmıştır. Safran stigmaları, Safranbolu'da ki yerel bir satıcıdan temin edilmiştir. Laboratuvara getirilen stigmalara, vakumlu kurutucu (DaihanWOV-30, Gangwondo, Güney Kore) ile 45 ^{o}C'de kurutma işlemi uygulanmıştır. Vakum, vakum pompasıyla (EVP 2XZ-2C, Zhejiang, Çin) gerçekleştirilmiştir. Numuneler kurutulduktan sonra, öğütülerek analiz edilinceye kadar polietilen torbada, 4 ^{o}C'de karanlık bir yerde muhafaza edilmiştir. Kurutulmuş stigmaların nem içeriği %6,64' tür. Krosin standardı, maltodekstrin ve diğer kimyasallar Merck'ten (Darmstadt, Almanya) satın alınmıştır.



Şekil 3.1 Safran stigmaları ve toz haline getirilen safran

pH, pH metre (Sevencompact pH/Ion S220, İsviçre) kullanılarak ölçülmüştür. Numunenin ekstraksiyonu, ultrasonik su banyosu (WiseClean, DH.WUC.D10H,

Almanya) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Spektrofotometre (Shimadzu UV-1800, Japonya), absorbans olarak belirlenen krosin içeriğinin, biyoaktif bileşenlerin ve antioksidan kapasitenin belirlenmesinde kullanılmıştır. Numunelerin rengi HunterLab Renk Analizörü (ColorFlex EZ Standart Kutusu s/n: CFEZ 1010, HunterLab, ABD) ile ölçülerek, L *, a * ve b * değerleri olarak ifade edilmiştir.

Aroma profili için gaz kromotoğrafisi (GC)- kütle spektrofotometresi (MS) (Agilent 7890A GC sistemi, Agilent Technologies, Avondale, AZ, ABD) kullanılmıştır.

Model sistemde meyve suyu olarak Dimes marka ekşi elma suyu kullanılmıştır.

3.2. Yöntem

3.2.1. Krosin Pigmenti için Ekstraksiyon Optimizasyonu (RSM) ve Ekstraktlara Uygulanan Analizler:

3.2.1.1. Krosin Ekstraksiyonunun Optimizasyonu

Krosin pigmentlerinin ekstraksiyon optimizasyonu, Yanıt Yüzey Yöntemi (RSM), Tam Faktöriyel Merkezi Kompozit Dizayn (CCD) ile gerçekleştirilmiştir. Ekstraksiyon sıcaklığı (25-65 ^{o}C), ekstraksiyon süresi (3-15 dk), sıvı-katı oranı (L/S) (1000/3000 mL/g), genlik olarak ultrasonik şiddet (%20-100) bağımsız değişken olarak seçilmiş ve bağımlı değişken olarak maksimum krosin içeriği belirlenmiştir.

Design Expert Programı (Version 7; Stat-Easy Co., Minneapolis, MN, ABD) kullanılarak yirmi dokuz farklı deneme noktası elde edilmiştir (Çizelge 4.1). İşlem parametrelerinin, krosin içeriğinin ekstraksiyon verimine etkisi quadratik model ile belirlenmiştir. Modelin başarısı, belirleme katsayısına (R^2), lack of fit ve model p-value değerlerine göre değerlendirilmiştir ($p<0,01$).

Tüm deneme noktalarının analizleri üç kez tekrarlanmış ve sonuçlar ortalama değer alınarak standart sapma ile verilmiştir.

3.2.1.2. Ultrasonik Su Banyosu ile Safranın Ekstraksiyon İşlemleri

Toz haline getirilmiş safran stigmaları ultrasonik su banyosunda (WiseClean, DH. WUC.D10H, Almanya) ultrason destekli ekstraksiyon işlemi kullanılarak ekstrakte edilmiştir. Ekstraksiyon işlemlerinde kullanılan sıcaklık değerleri (25, 45 ve 65 ^{o}C) ön

deneme çalışmaları sonucu belirlenmiştir. Toz haline getirilmiş 10 mg safran stigması saf su ile belirli oranlarda karıştırılmış ve deney tasarımında belirtilen şartlara göre ekstraksiyona (Şekil 3.2) tabi tutulmuştur. Ekstraksiyonun sonunda, örnekler 4500 rpm'de santrifüj edilmiştir. Santrifüjlenmiş numuneler kaba filtreden geçirildikten sonra 0.25 µm'lik membran filtreden süzülmüştür. Elde edilen ekstraktlar analizlerde kullanılmak üzere hava almayacak şekilde şişelenerek 4^{o}C sıcaklıkta muhafaza edilmiştir [137].



Şekil 3.2 Toz hale getirilmiş safran ve ekstraktların hazırlanmasından görüntü

3.2.1.3. pH Analizleri

Numunelerin pH değerleri pH metre (Sevencompact pH/Ion S220, İsviçre) kullanılarak belirlenmiştir. pH metre, analiz öncesinde uygun tampon çözeltilerle kalibre edilmiştir [138].

3.2.1.4. Toplam Fenolik Madde Miktarı Tayini

Safran ekstraktlarındaki toplam fenolik madde içeriği, standart olarak gallik asit kullanılarak Folin-Ciocalteu yöntemi ile spektrofotometrik olarak belirlenmiştir [139]. Kalibrasyon eğrisi oluşturmak için gallik asittten (Merck) 10 mg/L-120 mg/L aralığında bir seri standart çözelti hazırlanmıştır.

Ekstrakte edilen örnekler, distile su ile 1:10 oranında seyreltilmiş ve 0,5 mL seyreltilmiş ekstrelere 2,5 mL Folin Ciocalteu reaktifi (0,2 N) ilave edilmiştir. Daha sonra, reaksiyon tüpüne 2 mL %7,5 (w/v) Na_2C0_3 eklenmiştir. Hazırlanan karışım oda sıcaklığında karanlık bir yerde 30 dakika tutulduktan sonra, örneklerin absorbansı 760 nm'de spektrofotometrik olarak belirlenmiştir (Shimadzu UV-1800, Japonya). Sonuçlar mg gallik asit (GAE) eşdeğeri cinsinden, mg GAE/g kuru stigma olarak ifade edililmiştir.

3.2.1.5. Toplam Flavonoid Madde Miktarı Tayini

Numunelerin toplam flavonoid içeriği, Zhishen vd. [140] tarafından belirlenen alüminyum klorür kolorimetrik yönteme göre yapılmıştır. 1 mL safran ekstreleri 4 mL damıtılmış su ile karıştırılmış, 0,3 mL $NaN0_2$ (damıtık su içinde %5) eklenmiş, 5 dakika sonra 0,3 mL $AlCl_3$ (su içinde %10) eklenmiştir. Oda sıcaklığında 6 dak. inkübasyondan sonra, 2 mL 1 M NaOH çözeltisi eklenmiş ve karışım, distile su ile 10 mL'ye ayarlanmıştır. Reaksiyon karışımının absorbansı, 510 nm'de spektrofotometrik olarak (Shimadzu UV-1800 spektrofotometre, Japonya) belirlenmiştir. Toplam flavonoid içeriği, kateşin eşdeğeri (CAE), mg CAE/g olarak ifade edilmiştir.

3.2.1.6. Antioksidan Kapasite Tayini (CUPRAC Yöntemi)

Apak vd. [141] tarafından geliştirilen bu yöntemde, antioksidan maddenin Cu (II)'yi Cu (I)'e indirgemesi esasına dayanmaktadır. Yöntem, örneğin Neokuproin-Nc'in bakır (II) ile reaksiyona girmesi sonucu oluşan bakır (II)-neokuproin (Cu (II)-Nc) bileşiğinin, 450 nm'de maksimum absorbans veren Cu (I)-neokuproin çelatına dönüştürme yeteneğine dayanarak hesaplanmaktadır. UV-VIS spektrofotometre (Shimadzu UV-1800 spectrophotometer, Japan) ile 440 nm'de örneklerin absorbans değerleri ölçülmüştür.

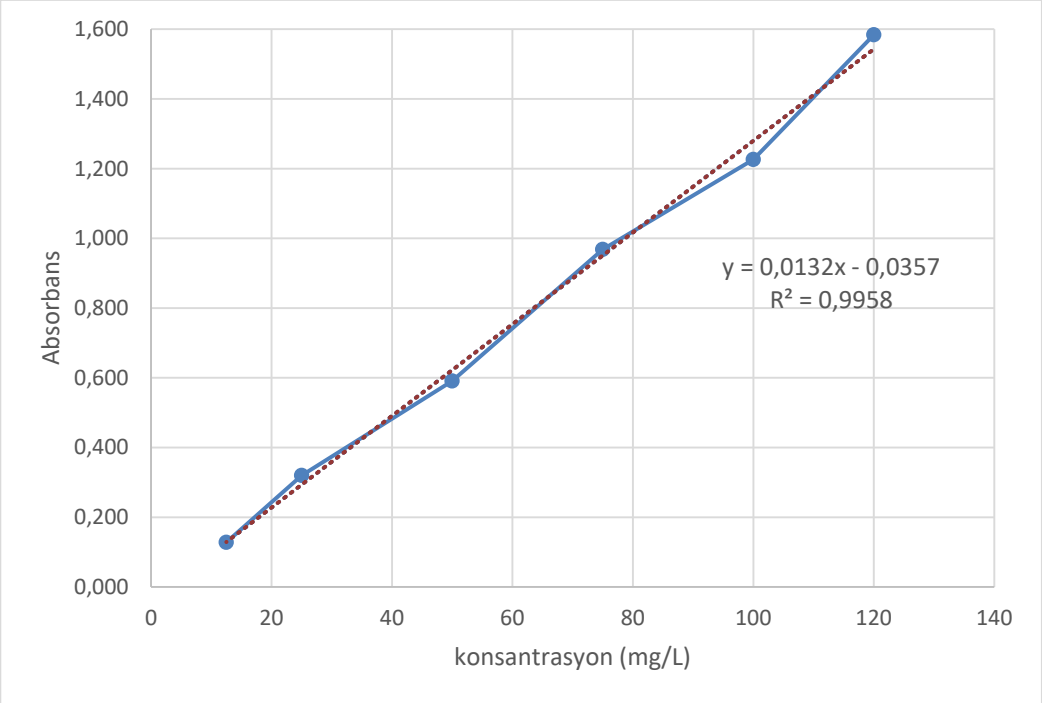
Yöntem; sulu bakır (II) klorür çözeltisi, alkolde hazırlanmış neokuprin çözeltisi ve pH 7 tamponu olan sulu amonyum asetat çözeltilerinin karıştırılarak üzerine antioksidan kapasitesi tayin edilecek örnek ilave edilmiştir. Absorbans değerleri oda sıcaklığında karanlıkta 1 saat inkübasyondan sonra spektrofotometrede (Shimadzu UV-1800 spektrofotometre, Japonya) 450 nm dalga boyunda ölçülmüştür [142]. Troloks standart olarak kullanılmıştır ve sonuçlar troloks eşdeğeri, mg TEAC/g olarak ifade edilmiştir.

3.2.1.7. Renk Analizleri

Toz haline getirilmiş 0.05 g safran stigması, damıtılmış su ile 50 ^{o}C, %100 amplitüd ile ultrasonik su banyosu kullanılarak ekstrakte edilmiş ve filtrelerden süzülmüştür. Renk analizi CIELAB kolorimetre (ColorFlex EZ Standart Kutu s/n: CFEZ 1010, HunterLab, ABD) kullanılarak belirlenmiş ve L*, a* ve b* değerleri olarak ifade edilmiştir [142]. Örneklerin renk parlaklığı (L*), kırmızı-yeşil (a*), sarı-mavi (b*) cinsinden belirtilmiştir. Renk ölçümleri 3 paralelli yapılmış ve tespit edilen değerlerin ortalaması alınarak ortalama değerler belirlenmiştir.

3.2.1.8. Krosin İçeriğinin Belirlenmesi

Toplam krosin içeriği, Tong vd. [143] tarafından belirlenen yönteme göre tespit edilmiştir. Buna göre, krosin standardı ile bir seri (10 mg/L-120 mg/L) dilüsyon çözeltileri hazırlanmıştır. Krosin içeriğinin belirlenmesi için spektrofotometre (Shimadzu UV-1800, Japonya) kullanılmıştır. Seyreltilmiş krosin ekstraktlarının konsantrasyonlarına karşılık gelen absorbans değerleri 440 nm'de kaydedilerek kalibrasyon eğrisi çizilmiştir. Elde edilen y=0,0132x-0,0357 (R^2=0,9958) regresyon denklemi ile krosin içeriği mg/g olarak hesaplanmıştır. Şekil 3.3'te krosin standardının kalibrasyon eğrisi görülmektedir.



Şekil 3.3 Krosin standardının kalibrasyon eğrisi

3.2.2. Mikroenkapsülasyon Üretimi ve Kapsüllere Uygulanan Analizler

3.2.2.1. Mikroenkapsülasyon için Safran Ekstraktının Hazırlanması

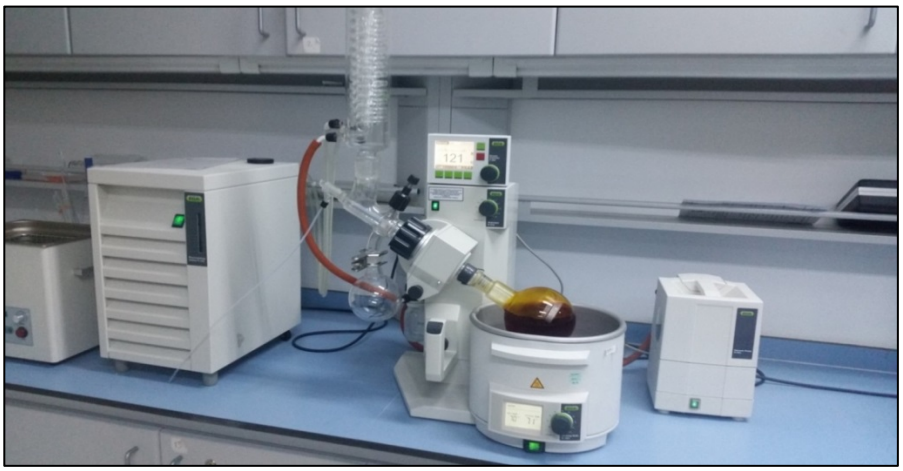
10 gr öğütülmüş safran stigması, 1000 mL distile su ile ultrasonik su banyosunda (Wise Clean, WUC-D10H, G. Kore) 55 ^{o}C de, %94 ultrasonik şiddette ve 4,4 dk ekstraksiyon işlemi uygulandıktan sonra kaba filtre kâğıdı ile süzülmüştür. Elde edilen ekstraktlar Şekil 3.3'te görülmektedir.



Şekil 3.4 Safran ekstratları

3.2.2.2. Ekstraktların Evaporatör ile Konsantre Edilmesi

Kaba filtre kâğıdından geçirilen ekstraktlar, banyo sıcaklığı 50^{o}C, kaynama sıcaklığı 30^{o}C ve basınç 85 mmbar vakum altında evaporasyon koşulları ayarlanarak evaporatör (BUCHI, Rotavapor R-210, İsviçre) cihazında konsantre edilerek briksi 1,2 den 4,3'e getirilmiştir. Safran çözeltilerine uygulanan evaporasyon işlemlerinden bir görüntü Şekil 3.5'te verilmiştir.



Şekil 3.5 Safran çözeltisine uygulanan evaporasyon işlemi

3.2.2.3 Mikroenkapsülasyon için Çözeltinin Hazırlanması

Briksi 4,3'e getirilen safran ekstraktının üzerine, kaplayıcı materyal olarak kullanılan maltodekstrin %10 olarak eklenmiş ve maltodekstrinin çözünmesi için karışım, 10.000 rpm'de Ultra Turaxta (IKA, Almanya) 3 dakika homojenize edilerek hazırlanmıştır.

3.2.2.4 Püskürtmeli Kurutucuda Mikroenkapsülasyon

Mikroenkapsülasyon işlemi, püskürtmeli kurutucuda (BUCHI mini spreydry B-290, İsviçre) hava giriş sıcaklığı (175±5 °C), hava çıkış sıcaklığı (95±5^{o}C), çözelti besleme debisi (5 mL/dk) ve aspirasyon çalışma hızı %20 olacak şekilde ayarlanan kurutma koşullarında (Şekil 3.6) gerçekleştirilmiştir. Elde edilen mikrokapsüller polietilen torbalarda paketlenerek analiz edilenceye kadar 4°C'de karanlıkta muhafaza edilmiştir. Mikroenkapsülasyon öncesi toz haldeki safran ve elde edilen safran mikrokapsüller Şekil 3.7 de görülmektedir.



Şekil 3.6 Püskürtmeli kurutucuda mikroenkapsülasyon işlemi görüntüleri



Şekil 3.7 Toz safran ve mikrokapsüllenmiş safran boyası

3.2.2.5 Nem Tayini

Mikrokapsüllerin nem miktarı, nem tayin cihazı (RADWAG, AB-0066-K) ile belirlenmiştir. Nem miktarı tayini, mikrokapsüllerin sabit sıcaklıktaki kapalı bir kaba konarak, dengede olduğu atmosferin bağıl neminin ölçülmesi esasına göre belirlenmektedir [61].

3.2.2.6 Enkapsülasyon Etkinliğinin Belirlenmesi (EE)

Kapsülleme etkinliği yüzey pigmentleri ve toplam pigment içeriklerinin ölçülmesiyle belirlenmiştir. Bu amaçla, belli miktardaki numuneler, önce maltodekstrinin çözünmediği metanol ve alkol karışımı ile yıkanmıştır. Filtrelerin altındaki sıvıdan yüzey safran pigment miktarı tespit edilmiştir. Daha sonra yine aynı miktardaki mikrokapsüller maltodektrinin çözündüğü su ile çözündürülerek mikrokapsüllerin toplam pigment miktarı bulunmuştur. Buna göre, enkapsülasyon etkinliği Eşitlik 3.1 ile hesaplanmıştır [144].

$$\text{Enkapsülasyon Etkinliği (\%EE)} = 1 - \frac{Yüzey\ pigment\ miktarı}{Toplam\ pigment\ miktarı} * 100 \qquad (3.1)$$

3.2.2.7 Mikrokapsüllerin Mikroyapısal Özelliklerinin Belirlenmesi

Optimum kuruma koşullarında üretilen mikrokapsüllerin morfolojisi, 1000-10000 büyütme aralığı ile 2 kV'da taramalı elektron mikroskobu (SEM) (FEI QUANTA FEG 250, ABD) ile görüntülenmiştir. Tozun morfolojik özellikleri, 7,4-8 mm'lik bir mesafe ile yüksek vakum altında taranarak belirlenmiştir.

3.2.2.8 Mikrokapsüllerde Toplam Fenolik ve Flavonoid Madde Miktarı Tayini

Mikrokapsüllerin toplam flavonoid madde miktarları, ‘’3.2.1.4 Toplam Fenolik Madde Miktarı Tayini’’ başlığı altında verilen yönteme göre belirlenmiştir.

Mikrokapsüllerin toplam flavonoid madde miktarları, ‘’3.2.1.5 Toplam Flavonoid Madde Miktarı Tayini’’ başlığı altında verilen yönteme göre belirlenmiştir.

3.2.2.9 Mikrokapsüllerde Antioksidan Kapasite Tayini

Mikrokapsüllerin antioksidan kapasitesi ‘’3.2.1.6 Antioksidan Kapasite Tayini (CUPRAC Yöntemi)’’ başlığı altında verilen yönteme göre belirlenmiştir.

3.2.2.10 Mikrokapsüllerde Renk Analizi

Kapsüllerin renk özellikleri ‘’3.2.1.7 Renk Analizleri’’ başlığı altında anlatılan şekilde Hunter Lab renk cihazıyla belirlenmiştir.

3.2.2.11 Safranın ve Mikrokapsüllerin Aroma Profillerinin Belirlenmesi

Örneklerin aroma profilleri, gaz kromatografisi − kütle spektrometresi (GC-MS) cihazları kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bunun için Gaz kromotoğrafisi (GC) (Agilent 7890A GC system, Agilent Technologies, Avondale, AZ, ABD) ve kütle spektrofotometresi (MS) (Agilent Technologies) cihazları ve DBwax kolon (60m-0,25mm-0,25 µ m) kullanılmıştır.

Aroma bileşenlerinin 100 µm PTFE yüzlü silikon septum (Supelco, PA, ABD) üzerine tutunması sağlanmıştır. Bu amaçla öğütülen safran ve mikrokapsüller 20 mL’lik Headspace viallere 0,1g tartılarak GC-MS cihazına enjekte edilmiş [145] ve PTFE yüzlü silikon septum (Supelco, Bellefonte, PA, ABD) ile kapatılmıştır. Bileşikler, 1 saat boyunca 40^{o}C’de, SPME lifi (75 um, 23 g, karboksan / polidimetilsiloksan (CAR / PDMS)] (Supelco, Bellefonte, PA, ABD) tarafından adsorbe edilmiştir. Bölünmesiz modda 50 °C fırın sıcaklığı 10 dakika boyunca 40 °C'ye ayarlanmış, daha sonra 3 °C /dak.'da 110 °C'ye, 4 °C /dak'da 110 ila 150 ° C'ye ısıtılmıştır. 10 °C /dk'da nihayet 210 °C /dk'ya yükseltilmiş ve 15 dakika tutulmuştur. Taşıyıcı gaz olarak 1 mL /dak akış hızı ile helyum kullanılmıştır. Elektron iyonizasyon detektörünün voltajı 70 eV'ye ayarlanmıştır. Uçucu bileşikler, Flavor 2, NIST 05 ve Wiley kütüphaneleri tarafından tanımlanmıştır. Analizler 2 kez tekrarlanmıştır.

3.2.2.12 Krosin Mikrokapsüllerinin Bozunma Kinetiği

Krosin ekstrelerinin stabilitesini belirlemek için Wang ve Xu [146] tarafından tanımlanan yönteme göre farklı pH (2, 4,5 ve 6) ve farklı sıcaklıklarda (60, 70, 80 ve 90 °C) digital termometreli su banyosunda 6 saat işleme tabi tutularak gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, degradasyon kinetiğini tespit etmek için optimum şartlara göre elde edilen krosin ekstraktları 20 ml'lik cam tüplere koyulmuş ve her bir saat başında örnek alınarak pH, sıcaklık ve ısıl işlem süresinin krosin miktarına olan etkileri belirlenmiştir. Degradasyon verileri, krosinin birinci mertebeden kinetik davranışını belirlemek için üssel kinetik modele (Eşitlik 3.2) yerleştirilmiştir:

$$C = Co \times \exp(-k \times t) \quad (3.2)$$

C_0, başlangıç krosin içeriği olduğunda, C, belirli bir sıcaklıkta ısıtıldıktan sonraki krosin konsantrasyonudur ve k, birinci mertebeden kinetik model için sabittir. Yarılanma ömrü ($t_{1/2}$) (Eşitlik 3.3) aşağıdaki gibi hesaplanır.

$$t_{1/2} = \ln(0,5)/-k \quad (3.3)$$

3.2.2.13 İstatistiksel analiz

Tez çalışmasında, ekstraksiyon aşamasında optimizasyon işlemleri Design Expert 7.0 paket programı (Stat-Ease, Minneapolis, ABD) ile gerçekleştirilmiştir.

Doğrusal olmayan regresyon analizi, bozunma kinetiği sabitini (k) ve yarı ömür değerini ($t_{1/2}$) hesaplamak için kullanılmıştır. Duncan testi ile pH ve sıcaklığın k ve $t_{1/2}$ üzerindeki etkisi 0.05 güven aralığında değerlendirilmiştir. İstatistiksel ve doğrusal olmayan regresyon analizleri, İstatistik yazılım programı (StatSoft, Inc., Tulsa, ABD) kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Renklendirilen ürünlerde biyoaktif bileşenler, renk analizi ve duyusal analizlerde kullanılan gıda boyasının ürünlerdeki etkisi tek faktörlü varyans analizi ve Duncan testi ile gerçekleştirilmiştir. Araştırma sonuçlarının değerlendirilmesi için SPSS (PASW Statistics 18) istatistik programından yararlanılmıştır.

3.2.3. Mikrokapsül Gıda Boyasının Meyve Suyunu Renklendirme Amacıyla Kullanımı

Model sistem olarak kullanılan Dimes marka ekşi elma suyu farklı miktarlarda (30 ppm-180 ppm) safran mikrokapsülleri ile renklendirilmiştir. (ES: Mikrokapsül içermeyen kontrol örneği, ÜS: 30 mg/L mikrokapsül ilaveli elma suyu, BS: 50 mg/L mikrokapsül ilaveli elma suyu, OES: 120 mg/L mikrokapsül ilaveli elma suyu, OS: 180 mg/L mikrokapsül ilaveli elma suyu).

3.2.4. Renklendirilen Model Sistemlerde Yapılan Analizler

3.2.4.1. Meyve Sularında Toplam Fenolik, Flavanoid Madde Tayini

Mikrokapsüllerle renklendirilen meyve sularının toplam fenolik madde miktarı, ‘’3.2.1.4 Toplam Fenolik Madde Miktarı Tayini’’ başlığı altında verilen yönteme göre belirlenmiştir.

Mikrokapsüllerle renklendirilen meyve sularının toplam flavonoid madde miktarı, ‘’3.2.1.5 Toplam Flavonoid Madde Miktarı Tayini’’ başlığı altında verilen yönteme göre belirlenmiştir.

3.2.4.2. Meyve Sularında Antioksidan Kapasite Tayini

Mikrokapsüllerle renklendirilen meyve sularının antioksidan kapasitesi ‘’3.2.1.6 Antioksidan Kapasite Tayini (CUPRAC Yöntemi)’’ başlığı altında verilen CUPRAC yöntemine göre belirlenmiştir.

3.2.4.3. Meyve Sularında Renk Analizi

Mikrokapsüllerle renklendirilen meyve sularının renk özellikleri ‘’3.2.1.7 Renk Analizleri’’ başlığı altında anlatılan şekilde Hunter Lab renk cihazıyla ölçülmüştür.

Cihaz, standart kalibrasyon skalası ile kalibre edildikten sonra, farklı miktarlarda ilave edilen mikrokapsüllerin elma sularına verdiği renk özellikleri L*, a*, b* parametreleri ölçülerek tespit edilmiştir.

3.2.4.4. Meyve Sularının pH Analizi

Farklı miktarlarda safran boyasıyla renklendirilen elma sularının pH analizi ‘’3.2.1.3 pH Analizleri’’ başlığı altında verilen yönteme göre yapılmıştır.

3.2.4.5. Duyusal Analiz

Çalışma kapsamında elma suyu örneklerine farklı miktarlarda ilave edilen mikrokapsüle edilmiş gıda boyasının duyusal kalite üzerine olan etkilerinin belirlenebilmesi için eğitilmiş 17 panelist ile hedonik skala yöntemine göre duyusal analizler yapılmıştır. Mikrokapsüllerle renklendirilen elma suyu örnekleri için kullanılan duyusal analiz formu EK-A’da gösterilmiştir.

BÖLÜM 4

ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1 Krosin Renk Maddesinin Ekstraksiyonu

4.1.1 Ekstraksiyon Parametrelerinin Krosin İçeriğine Etkisi

Çizelge 4.1, yirmi dokuz farklı deneme noktalarını ve elde edilen krosin içeriğini göstermektedir. Krosin içeriği 0,56 ila 1,615 mg/g arasında değişmektedir. Yüksek sıcaklık ve düşük L/S değeri, krosinin ekstraksiyon verimini artırmıştır. Quadratik model, ekstraksiyon parametrelerinin krosin verimine olan etkisini modellemiştir. Tüm model parametreleri, krosin verimini önemli ölçüde etkilemiştir ($p<0,1$). R^2 ve Adj R^2 değerleri 0,9932 ve 0,9863'tür, lack of fit değeri önemsizdir (Çizelge 4.2), bu da quadratik modelde işlem parametrelerinin krosin verimi üzerindeki etkisini başarıyla tanımladığını göstermektedir. Aşağıdaki ikinci dereceden denklem, ekstraksiyon parametrelerinin krosin ekstraksiyonu üzerindeki etkisini göstermektedir.

$$Krosin=0,83+0,024x_1+0,075x_2-0,44x_3+0,037x_4-0,011x_1x_2-0,038x_1x_3-x_1x_4\ 0,016-0,057x_2x_3+0,096x_2x_4-0,066x_3x_4+0,01x_1^2+0,04x_2^2+0,19x_3^2+0,017x_4^2$$

Burada, x_1, x_2, x_3 ve x_4, zaman, sıcaklık, L/S ve UU amplitüte olarak güçtür. Çizelge 4.2'ye göre, sıcaklık ve L/S model parametreleri daha küçük p-değeri göstermiştir, bu da bu faktörlerin krosin ekstraksiyon verimi üzerinde etkili olduğu anlamına gelmektedir.

L/S oranı, ekstraksiyon verimini ve üretim maliyetini etkileyen en kritik parametrelerden biridir.

Çizelge 4.1 Yanıt Yüzey Metodolojisi kullanılarak belirlenen deneme noktaları ve krosin içeriği

Deneme Sayısı	Süre (dk)	Sıcaklık (^{o}C)	L/S (mL/g)	Ultrasonik Şiddet (%)	Krosin (mg/g)
1	15,00	65,00	2000,00	60,00	0,972
2	3,00	45,00	2000,00	100,00	0,8985
3	9,00	25,00	2000,00	100,00	0,798
4	9,00	45,00	1000,00	20,00	1,384
5	9,00	65,00	1000,00	60,00	1,564
6	9,00	45,00	2000,00	60,00	0,835
7	15,00	45,00	1000,00	60,00	1,491
8	3,00	65,00	2000,00	60,00	0,9035
9	9,00	25,00	1000,00	60,00	1,435
10	9,00	45,00	2000,00	60,00	0,8625
11	15,00	45,00	2000,00	100,00	0,8795
12	9,00	45,00	2000,00	60,00	0,77
13	9,00	45,00	3000,00	20,00	0,594
14	3,00	25,00	2000,00	60,00	0,7715
15	15,00	45,00	2000,00	20,00	0,852
16	9,00	45,00	2000,00	60,00	0,8595
17	9,00	65,00	2000,00	20,00	0,9585
18	3,00	45,00	1000,00	60,00	1,4435
19	9,00	25,00	2000,00	20,00	0,757
20	15,00	25,00	2000,00	60,00	0,883
21	3,00	45,00	3000,00	60,00	0,58
22	15,00	45,00	3000,00	60,00	0,61
23	9,00	45,00	2000,00	60,00	0,83
24	9,00	45,00	1000,00	100,00	1,615
25	3,00	45,00	2000,00	20,00	0,805
26	9,00	65,00	3000,00	60,00	0,678
27	9,00	45,00	3000,00	100,00	0,56
28	9,00	25,00	3000,00	60,00	0,572
29	9,00	65,00	2000,00	100,00	1,038

Düşük L/S seviyesi seçimi, gıda matriksindeki biyoaktif bileşiklerin daha yüksek bulunmasını sağlarken, L/S'nin çok yüksek seviyesi proses maliyetini artırabilir. Bu nedenle, L/S optimizasyonu çok önemli bir adımdır

Çizelge 4.2 RSM sonucunda oluşturulan regresyon modellerinin (F ve p-değeri) varyans tablosu

		Krosin (mg/g)		
Source	**df**	**Mean square**	**F-Value**	**p-value (Prob>F)***
Model	14	0,19	145,335	< 0,0001
Linear				
A-Süre	1	$6{,}793\times10^{-3}$	5,070	0,0409
B-Sıc.	1	0,067	50,111	< 0,0001
C-L/S	1	2,37	1772,981	< 0,0001
D-US Güç	1	0,016	11,962	0,0038
Cross product				
AB	1	$4{,}622\times10^{-4}$	0,345	0,5663
AC	1	$7{,}656\times10^{-5}$	0,057	0,8145
AD	1	$1{,}089\times10^{-3}$	0,812	0,3825
BC	1	$1{,}323\times10^{-4}$	0,098	0,7580
BD	1	$3{,}706\times10^{-4}$	0,276	0,6071
CD	1	0,018	13,106	0,0028
Quadratik				
A^2	1	$6{,}965\times10^{-4}$	0,519	0,4827
B^2	1	0,011	7,937	0,0137
C^2	1	0,23	174,785	< 0,0001
D^2	1	$1{,}790\times10^{-4}$	1,336	0,2670
Lack of Fit	10	$1{,}321\times10^{-4}$	0,95	0,5701
R^2	0,9932			
Adj R^2	0,9863			

df: df-serbestlik derecesi, * "Prob> F" değeri 0,1000'den küçük olması modelin önemli olduğunu belirtir.

Ekstraksiyon sıcaklığı ve L/S, krosinin ekstraksiyon verimi üzerinde çok önemli etki göstermiştir. Bu nedenle, sıcaklığın ve L/S değerlerinin optimizasyonu, yüksek verimde krosin ekstraksiyonu için çok önemlidir. Kyriakoudi ve Tsimidou [147], krosetin içeriğinin ekstraksiyon verimi için iki maksimum noktanın gözlemlendiğini, düşük seviyede çözücü oranının ve sonikasyon süresinin toplam krosetin içeriğinin artmasına neden olduğunu bildirmişlerdir. Mevcut çalışmada, düşük sonikasyon süresi (4,4) ve S/L oranı (1/1000) düzeyinde, maksimum desirability (maksimum krosin

miktarı) elde edilmiştir. Bulgularımız Kyriakoudi ve Tsimidou'ya [147] benzer şekilde, sonikasyon süresinin safran biyoaktif bileşiklerinin ekstraksiyon verimini geliştirdiğini göstermiştir.

Şekil 4.1, işlem parametrelerinin etkisini ve bu parametrelerin, krosin verimi üzerindeki etkileşimini göstermektedir. Şekil 4.l'de gösterildiği gibi, orta bir zaman seviyesinde, sıcaklık ve genlik değeri (9 dk, 45 ° C, %60), L/S seviyesinde küçük bir değişiklik, krosinin ekstraksiyon verimini önemli ölçüde değiştirmiştir. Krosin içeriği, daha düşük bir L/S'de önemli ölçüde artmıştır, bu da L/S'nin, krosin verimini en üst düzeye çıkarmak için 1000'de ayarlanması gerektiğini göstermektedir.

Ekstraksiyon sıcaklığı, krosin verimi üzerinde başka önemli bir etki gösteren faktördür. Diğer parametreler orta seviyede tutulduğunda, sıcaklıktaki biraz artış, krosin verimini önemli ölçüde arttırmıştır. Çalışmada, krosin ekstraksiyon veriminde sıcaklığın pozitif quadratik etkisi, kütle transfer hızının artması ile açıklanabilir.

Sarfarazi vd. [23], sıcaklığın başlangıçta pozitif bir karesel etki gösterdiğini ve sıcaklığın belirli bir değerden sonra olumsuz bir etki gösterdiğini bildirmişlerdir. Belirli bir değerden sonra sıcaklığın krosin verimine olan negatif kuadratik etkisi, doymamış uzun zincirli kimyasal yapısından dolayı krosinin oksidasyonu ve termal duyarlılığı ile açıklanabilir. Çalışmalarında sıcaklık, krosin degradasyon seviyesi aralığında olabilir. Mevcut çalışmada sıcaklık artışı ile krosinin sürekli artış göstermesi, sıcaklığın maksimum seviyesinin krosinin degradasyon seviyesinden daha yüksek olmaması ile açıklanabilir.

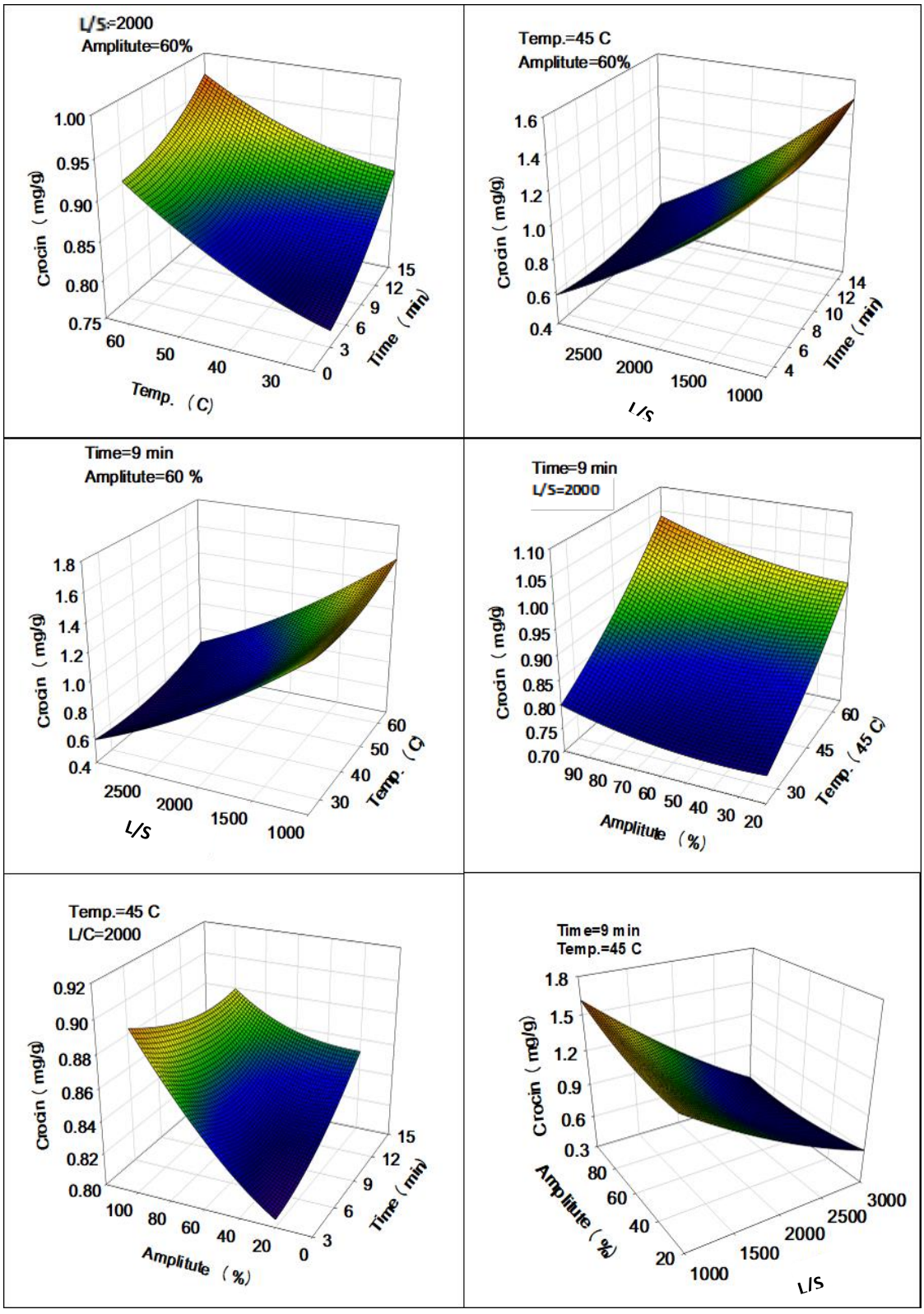
Başka bir ekstraksiyon faktörü olarak, ultrason gücü ve zamanı, krosin ekstraksiyon verimi üzerinde pozitif kuadratik bir etki göstermiştir. Krosin konsantrasyonu hem ultrasonik şiddetin hem de ekstraksiyon süresinin artmasıyla artış göstermiştir. Zamanın önemi, ultrasonik şiddete göre daha düşüktür. Ekstraksiyon oranı artışı daha yüksek amplitüd değeri ve daha uzun ekstraksiyon süresinde gözlenmiştir. Ultrasonikasyon gücünün artmasıyla birlikte, krosinin daha yüksek ekstraksiyon oranı, bitki hücresinin parçalanmasına ve kütle transfer oranının artmasına neden olan kavitasyon etkisi ile açıklanabilir. Benzer şekilde safran biyoaktif bileşiklerinin ultrason gücüyle arttığı Gazeran vd. [137] tarafından yapılan çalışmada bildirilmektedir.

4.1.2 Ekstraksiyon Parametrelerinin Optimizasyonu

Optimum proses parametreleri, maksimum miktardaki krosin verimine göre belirlenmiştir. Optimum deneysel noktaları belirleme kriteri olarak, desirability (arzu edilebilirlik) değeri seçilmiştir. RSM'nin sonuçları, sıcaklık, genlik ve süre gibi süreç parametrelerinin arttırılması gerektiğini, L/S'nin maksimum ekstraksiyon verimi için azaltılması gerektiğini önermektedir. Bu nedenle, optimum proses parametreleri 1000 L/S, 55^{o}C, 4,40 dk ve %94,72 genlik seviyesi olarak belirlenmiştir. Design Expert programından elde edilen matematiksel denkleme göre, bu deneysel noktalardan elde edilen krosin konsantrasyonu 1,62 mg/g'dır. Bu deneysel noktada, krosin içeriği istatistiksel sonuçların doğrulanması için deneysel olarak belirlenmiştir. Krosin konsantrasyonu 1,65 mg/g olarak tespit edilmiştir. Şekil 4.1 Ekstraksiyon parametrelerinin krosin miktarı üzerine etkilerini gösteren yanıt yüzeyi-3D- grafikleri verilmiştir. Modellerin 3 boyutlu grafiklerine (Şekil 4.1) bakıldığında ultrasonik güç %60 ve L/S oranı 2000 iken, sıcaklık ve ekstraksiyon süresinin artışına paralel olarak krosin miktarınında artış gösterdiği görülmektedir. Utrasonik güç %60 ve sıcaklık 45 ^{o}C iken, L/S oranı azaldıkça ve süre arttıkça krosin içeriği artmaktadır. Ultrasonik güç %60 ve süre 9 dakika iken, L/S azaldıkça ve sıcaklık arttıça krosin miktarı artış göstermiştir. Süre 9 dakika ve L/S oranı 2000 iken ultrasonik gücün ve sıcaklığın artışına paralel olarak krosin miktarı da artmaktadır. Sıcaklık 45 ^{o}C ve L/S oranı 2000 iken ultarasonik gücün artışına paralel olarak krosin miktarı artış göstermiştir. Bu noktada en yüksek miktar, 3. dakikada %100 ultrasonik güçte tespit edilmiştir. 45 ^{o}C de 9. dakikada düşük L/S oranında, yüksek ultrasonik gücün uygulandığı aralıkta en fazla miktarda krosin elde edilmiştir.

4.1.3 Safran Ekstarktlarının pH Değerleri

pH değeri, önceden kalibre edilmiş pH metre probunun sıvıya batırılmasıyla ölçülmüştür [110]. Safran ekstrelerinin ortalama pH değeri 7,32±0,02 olarak belirlenmiştir. Sonuçlar Çizelge 4.2'de gösterilmiştir.



Şekil 4.1 Ekstraksiyon parametrelerinin, krosin miktarı üzerine etkilerini gösteren yanıt yüzeyi-3D- grafikleri

4.1.4 Safranın Toplam Fenolik ve Flavonoid Bileşen Miktarları

Safran ekstraktlarındaki toplam fenolik bileşen miktarları, standart olarak gallik asit ile Folin-Ciocalteu yöntemine göre 760 nm de spektrofotometrik (Shimadzu UV-1800 spektrofotometre, Japonya) olarak belirlenmiştir [139]. Sonuçlar mg gallik asit (GAE) eşdeğeri cinsinden 31,61±0,26 mg GAE/g kuru madde olarak belirlenmiştir. Numunelerin toplam flavonoid bileşen miktarları da, Zhishen, Mengcheng ve Jianming [140] tarafından belirlenen yönteme göre yapılmıştır. Reaksiyon karışımının absorbansı, 510 nm'de spektrofotometrik olarak (Shimadzu UV-1800 spektrofotometre, Japonya) belirlenmiştir. Toplam flavonoid içeriği, kateşin eşdeğeri cinsinden (CAE) 9,34±0,42 mg CAE/g olarak tespit edilmiş ve sonuçlar Çizelge 4.2 de verilmiştir.

Çizelge 4.3 Safranın toplam fenolik, flavonoid ve antioksidan kapasite miktarları, pH değerleri

Örnek	Toplam Fenolik Madde (GAE mg/g)	Toplam Flavonoid Madde (CAE mg/g)	Antioksidan Kapasite CUPRAC (TE mg/g)	pH
Toz safran	31,61±0,26	9,34±0,42	302,6±10,01	7,32±0,02

Mevcut çalışmaya benzer şekilde yapılan bir çalışmada, farklı safran örneklerinin %80 metanol ve su ekstraktlarının toplam fenolik ve flavonoid maddeleri incelenmiştir. Çalışmada, farklı safran örneklerinin toplam fenolik ve flavonoid madde miktarları sırasıyla 14,07-34,04 mg GAE/g; 3,16-33,64 mg CAE/g kuru madde olarak bulunduğu bildirilmektedir [148].

Yapılan bir diğer araştırmada safranın toplam fenolik madde miktarları, etanol-fosfat ekstraktları, 19,18 mg GAE/g, etanol:su ekstraktları ise, 27,86 mg GAE/g olarak bulunmuştur [149]. Mevcut çalışmada bulduğumuz değerin daha yüksek olması çözücü veya ekstraksiyon parametrelerinin farklı olmasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Makhlouf vd. [150] safrandaki ve beyaz üzüm suyundaki toplam fenolik bileşikleri araştırmışlar. Çalışmada TFM sırası ile 16 mg GAE/L ve 6,285 mg GAE/L olarak bulunmuş ve safranın, beyaz üzüm ile karşılaştırıldığında mükemmel bir antioksidan kaynağı olarak daha fazla antioksidan kapasitesine sahip olduğu belirtilmiştir.

Amin vd. [151] tarafından safranın sağlığa etkilerini araştıran bir çalışmada, suda ve %80 etanolde elde edilen safran ekstraktlarının toplam fenolik madde içeriğinin, sırasıyla 64,25 mg GAE/g ve 67,62 mg GAE/g olduğunu rapor edilmiştir.

Sariri vd [12] İran'ın Ghaenat bölgesinden topladıkları taze safran stigmalarını metanolle ekstrakte ederek, elde ettikleri ekstraktın toplam fenolik madde miktarını 86,65 mg GAE/g olarak belirlemişlerdir [148].

Tekeli vd. [152] 'nin Safranbolu ve Yayladağı safranlarının toplam fenolik madde miktarlarını karşılaştırdığı bir çalışmada, Safranbolu'da yetiştirilen safranın toplam fenolik madde miktarının 75,11 mg GAE/g, Yayladağı'nda yetiştirilen safranın toplam fenolik madde miktarı ı ise 209,26 mg GAE/g olduğunu tespit etmişlerdir. Çalışmada Safranbolu safranının toplam fenolik madde miktarının Yayladağı safranından daha düşük değere sahip olduğu saptanmıştır. Analizlerde, toz haline getirilen safranların metanol ile 40 ^{o}C' de 3 saatte elde ettikleri ekstraktları kullanmışlardır. Tekeli vd. [152] 'nin elde etttiği sonuçların mevcut çalışmanın sonucundan farklı olmasının nedeni, işlem parametrelerinin ya da ürünün yetiştirildiği bölge farklılığından kaynaklı olabileceği düşünülmektedir.

Karimi vd. [153] tarafından yapılan çalışmada, toz halindeki safran örnekleri etanol, metanol ve kaynar su içinde ekstrakte edilmiş ve bunların fenolik bileşikleri 6,35, 6,54 ve 5,70 mg GAE/g; flavonoid bileşikleri sırasıyla 2,91, 5,88 ve 3,86 mg rutin eşdeğeri/g kuru ağırlık olarak bulunmuştur.

Baba vd. [154] safranın çeşitli dokularında toplam fenolik ve flavonoid bileşiklerini araştırmışlardır. Toplam fenolik madde miktarlarını, stigma, soğan ve yaprakları için etanollü ekstraktları sırasıyla, 8,28, 7,07, 5,62 ve sulu ekstraktları, 6,54, 5,97, 4,26 mg GAE/g kuru madde olarak belirlemişlerdir. Safranın stigma, soğan ve yapraklarının toplam flavonoidlerini de sırasıyla etanollü ekstraktlar için, 3,53, 2,46, 1,61; sulu ekstraktlar için ise sırasıyla, 3,61, 2,56, 2,00 mg rutin eşdeğeri/g kuru madde olarak tespit ettiklerini bildirmişlerdir.

Carmano vd. [155] ’nin bir çalışmasında, farklı kökenli safran örneklerinin toplam flavonoid içerikleri belirlenmiştir. Flavonoid içerikleri sırasıyla, İspanya safranı 1,09-3,12; Yunanistan safranı 0,61–2,24; İran safranı 0,59–1,47; Fas safranı 0,88-1,91 mg rutin/g olarak bulunmuş ve sonuçlar rutin eşdeğeri mg/g olarak ifade edilmiştir [155]. Yine yapılan bir çalışmada ultrason uygulamasının, üzüm kabuğu, kırmızı lahana ve siyah havuç ekstraktlarında toplam fenolik madde miktarının artmasına neden olduğu belirlenmiştir. Bu çalışmada üzüm kabuklarından, kırmızı lahanadan ve siyah havuçtan ultrason yöntemi ile elde edilen sulu ekstratlarında sırasıyla; 77,56, 21,71, 25,99 mg GAE/g kuru ekstrakt düzeyinde toplam fenolik madde içerdikleri saptanmıştır. Siyah havuçta çözgen olarak suyun kullanıldığı klasik ve ultrason ekstraksiyon uygulamalarında bu değer sırası ile 21,89 ve 25,99 mg GAE/g kuru ekstrakt olarak belirlenmiştir [51]. Mevcut çalışmaya göre safranın, kırmızı lahana ve siyah havuçtan daha yüksek toplam fenolik madde içerdiği görülmektedir.

Mevcut çalışmadan bulunan sonuçlar ile diğer araştırmacıların yapmış olduğu analiz değerleri karşılaştırıldığında; bazı verilerin paralellik gösterdiği, bazı verilerin farklılık gösterdiği belirlenmiştir. Verilerdeki farklılığın nedeni olarak safranın yetiştirildiği bölge, yetiştirilme koşulları, ekstraksiyon aşamasında kullanılan çözücü ve yöntem farklılığından kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

4.1.5 Safranın Toplam Antioksidan Kapasitesi

Örneklerin antioksidan kapasitesi Apak vd. [141] tarafından tespit edilen CUPRAC yöntemine göre yapılmıştır. Numunelerin absorbansı, 450 nm'de spektrofotometrik olarak belirlenmiştir. Sonuçlar troloks eşdeğerleri, 302,6±10,01 mg TEAC/g olarak bulunmuştur. Sonuçlar Çizelge 4.2’de gösterilmiştir.

Safran ekstraktının in vivo koşullarda yapılan analizlerde iyi antioksidan aktivite gösterdiğini bildirilmiştir [156].

Anuar vd. [157] yaptığı çalışmada, İran, İspanya ve Keşmir'den temin edilen safran örnekleri, metanol kullanılarak ekstrakte edilmiş ve toplam antioksidan kapasite DPPH (serbest radikal süpürücü deney) yöntemi ile araştırılmıştır. Buna göre örneklerin antioksidan aktiviteleri sırasıyla 10,14, 4,97, 22,52, % DPPH inhibisyon olarak bulunmuştur.

Başka bir çalışmada safran örneklerinin %80 metanol ve su ekstraktlarının antioksidan aktiviteleri araştırılmıştır. Safran örneklerinin antioksidan aktivite değerleri, çözücü ve safranların türlerine bağlı olarak μmol/g cinsinden 20,52-52,83 troloks eşdeğeri olarak tespit edilmiştir [148].

Üzüm kabuklarının farklı ekstraksiyon yöntemleri ile ekstrakte edildigi bir çalışmada, ultrason ekstraktlarının antioksidan aktivitesi 308,13 μmol Troloks eşdeğeri (TE)/g kuru madde düzeyinde iken kontrolde bu değerin 187,13 TE/g kuru madde olduğu belirlenmiştir [51]. Yapılan bir diğer çalışmada, safranın antioksidan aktivitesi, troloks eşdeğeri bakımından 53,04 mmol trolox/kg olarak bulunmuştur [158].

Yaptığımız çalışma ile diğer çalışmalarda, antioksidan kapasite tayininde farklı yöntemler kullanıldığından sonuçlar arası kıyaslama yapılamamıştır.

4.1.6 Safran Örneklerinin Renk Değerleri (L, a, b)

Safran numunelerinin renkleri (ekstrakt ve toz haline getirilmiş) HunterLab Renk Analizörü (ColorFlex EZ Standart Kutu s/n: CFEZ 1010, HunterLab, ABD) ile ölçülmüş ve L *, a * ve b * değerleri olarak ifade edilmiştir [142]. L *, a *, b * değerleri toz halindeki safranda ve bu numunelerden optimum koşullar altında elde edilen ekstre edilmiş safran numunesinde ölçülmüştür. Renk parametrelerinin analiz değerleri Çizelge 4.3'te gösterilmiştir. Anuar vd. [157] İran, Keşmir ve İspanyol safranlarının CIELab renk parametrelerini araştırmışlardır. CIE L, a, b değerleri sırasıyla İran (90,61, -0,11, 122,83); Keşmir (93,45, -9,34, 113,19); İspanya (92,26, -5,36, 118,37) olarak rapor edilmiştir.

Çizelge 4.4 Safran örneklerinin renk değerleri (L, a, b)

	L*	**a***	**b***
Toz haldeki safran	35,12±0,02	37,64±0,11	41,67± 0,13
Safran ektraktı	2,10± 0,01	3,85±0,01	3,54± 0,03

Azarabadi [148] ’nin, İran safranlarıyla ilgili yapmış olduğu bir çalışmada, safran örneklerinin toz ve ekstraktlarının renk değerleri belirlenmiş ve çalışma sonucunda

numunelerin L, a, b değerleri 51,99-54,02; 18,69-22,76; 14,00-19,67, ekstraktların L, a, b değerleri 37,00-37,67; 1,80-15,30; 7,50-8,74 olarak tespit edilmiştir. Mevcut çalışmada ki sonuçlar Anuar vd. [157] ile Azarabadi [148] 'nin bulmuş olduğu sonuçlardan farklılık göstermektedir. Bu farklılığın nedeninin, safranın yetiştirildiği bölge ve çeşit, ayrıca kullanılan ekstraksiyon yöntem ve parametrelerinin farklılığından kaynaklı olabileceği düşünülmektedir.

4.1.7 Safran Örneklerinin Toplam Krosin Miktarları

Ekstraktların absorbans değerleri, 440 nm'de UV-Visible spektrofotometre kullanılarak ölçülmüş ve toplam krosin miktarı kalibrasyon eğrisi kullanılarak hesaplanmıştır. Hesaplamalarda örneklerdeki seyreltme oranları göz önüne alınmıştır. Optimizasyon çalışmasında elde edilen krosin miktarları mg/g olarak Çizelge 4.1'de görülmektedir. Çizelgeye göre en düşük krosin içeriği 45 ^{o}C sıcaklık, 3000 mL/g L/S oranı, %100 ultrasonik güç ve 9 dakika optimizasyon şartlarında 0,56 mg/g olarak bulunurken, en yüksek krosin içeriği ise 45 ^{o}C sıcaklık, 1000 mL/g L/S oranı, %100 ultrasonik güç ve 9 dakika ekstraksiyon koşullarında 1,615 mg/g olarak tespit edilmiştir. Buna göre aynı koşullarda, çözücü miktarı arttıkça elde edilen pigment miktarı azalmaktadır.

4.2 Mikroenkapsülasyon Süreci

4.2.1 Mikrokapsüllerin Nem Oranları

Mikrokapsüllerin nem miktarı nem tayin cihazı (RADWAG, AB-0066-K) ile belirlenmiştir. Kapsüllerin nem içeriği %6,45 olarak ölçülmüştür. Bu sonuç, maltodekstrin ile doğal boyaların kaplanması hakkında daha önce yayınlanmış çalışmalarla karşılaştırılabilir bulunmuştur [15], [159], [160].

Yapılan bir çalışma da, safran ekstraktının, maltodekstrin, arap zamkı ve jelatin karışımının püskürterek kurutulmasıyla üretilen tozların nem içeriği, %2,7-5,3 aralığında bulunmuş olup, mevcut çalışmadan daha düşük olduğu görülmektedir [15].

Benzer şekilde safranın maltodekstrin ile nanoenkapsülasyonuyla üretilen kapsüllerin nem içeriği (%3,28-3,92) bulunmuş olup, mevcut çalışmadan daha düşük nem içerdiği görülmektedir. Çalışmada çekirdek: duvar oranının nanoenkapsüllerin nem içeriğini önemli ölçüde etkilemediği bildirilmektedir [29].

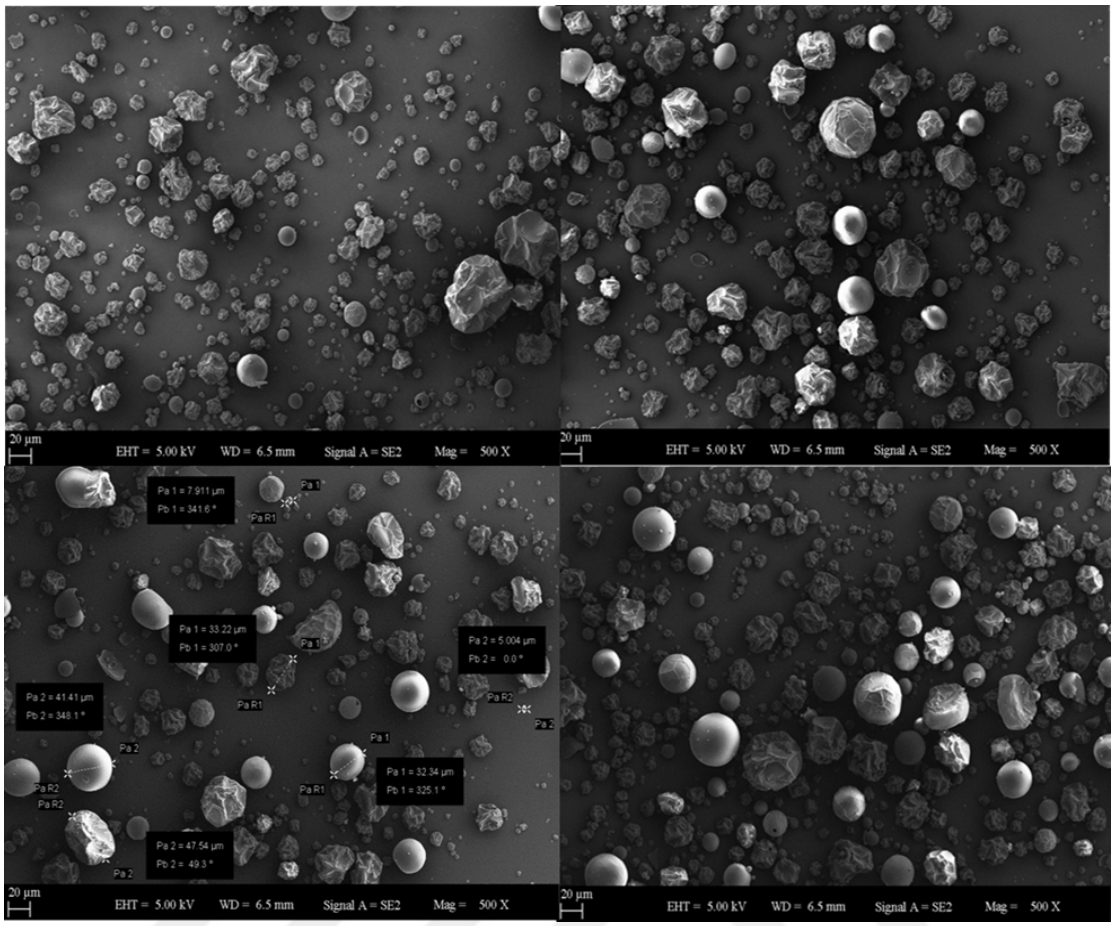
Pektin ve peynir altı suyu protein konsantresinin çift katmanlı çoklu emülsiyonları ile safran ekstraktının kapsüllenmesinden elde edilen tozlar için çalışmamızdan daha düşük nem içeriği değerleri (~%2,5) rapor edilmiştir [128].

4.2.2 Mikrokapsüllerin Toz Karakteristikleri

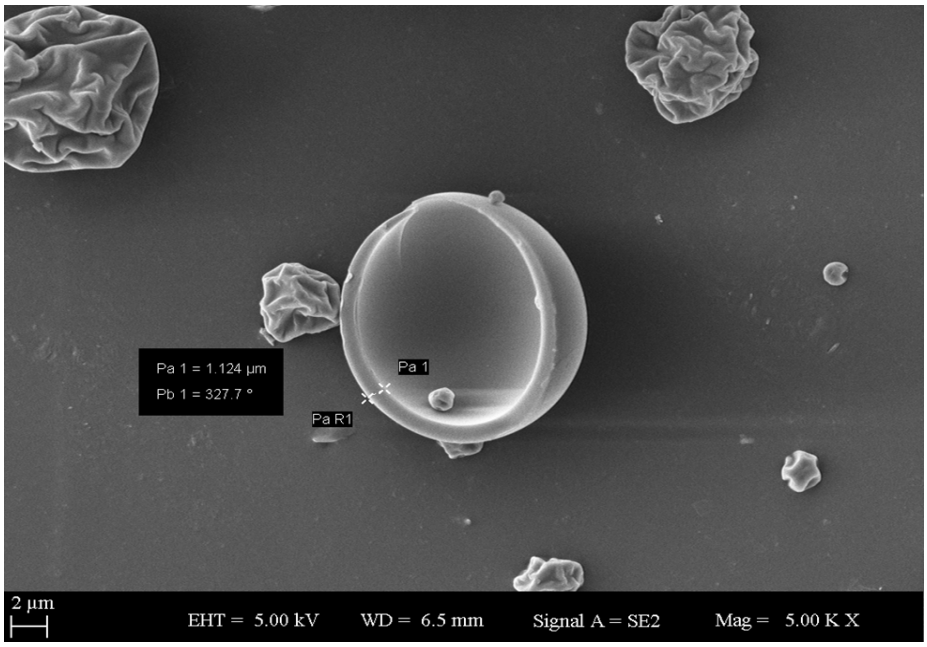
Mikrokapsüllerin SEM görüntüleri, Şekil 4.2 ve Şekil 4.3'te gösterilmiştir. Görülebileceği gibi mikrokapsüller genel olarak küresel yapıda, partikül çapları 3 ile 47 µm arasında değişen, herhangi bir çatlak olmayan, düzgün ve pürüzsüz bir yüzey göstermektedir. Kapsüllerin partikül çaplarının çoğu 20 µm'den daha küçüktür. Parçacıkların ortalama duvar kalınlığının 1,1 µm olduğu tespit edilmiştir. Benzer sonuçlar Rajabi vd. [15] 'nin çalışmasında da bildirilmiştir.

Rajabi vd. [15], safran ekstraktının çeşitli biyopolimerlerle (maltodekstrin, gam arabik ve jelatin) sprey kurutucu ile mikrokapsüllenmesi üzerine çalışmışlardır. Safran özütü/duvar malzemesini, 1:20 ve katı madde oranını (%30-40) kullanarak hazırlamışlardır. Çalışmalarında, safran ekstraktı mikrokapsüllerinin küresel bir şekil gösterdiğini, parçacık büyüklüğü dağılımının 0,54 ile 20,47 µm arasında değiştiğini ve toplam katı madde içeriğinin artmasıyla mikrokapsüllerin ortalama çapının arttığını bildirmişlerdir.

İçyer [132] yaptığı bir çalışmada, nar kabuğu ekstraktlarının maltodektrin ile mikroenkapsülasyonu sonucu elde ettiği kapsüllerin ortalama çapının 10-20 µm boyutuna sahip olduğunu bildirmiştir. Mevcut çalışmanın bulgularıyla İçyerin [132] yapmış olduğu, maltodekstrin ile mikroenkapsülasyon sonucu elde edilen partiküllerin ortalama çapının benzerlik gösterdiği görülmektedir. Mikrokapsüllerin şekilleri; uygulanan enkapsülasyon yöntemine, çekirdek materyalinin fizikokimyasal özelliklerine ve duvar malzemesinin bileşimine bağlı olarak değişmektedir [161].



Şekil 4.2 Mikropkapsüllerin SEM görüntüleri (5000 kat büyütme)



Şekil 4.3 Mikrokapsüllerin kabuk kalınlığını gösteren SEM görüntüsü

4.2.3 Enkapsülasyon Etkinliğinin (EE) Belirlenmesi

Kapsülleme etkinliği yüzey krosin içeriğinin ölçülmesiyle saptanmış ve %64 olarak bulunmuştur. Mevcut çalışmada ve Rajabi vd. [15] 'nin yapmış olduğu bir çalışmada emülsiyonların toplam katı içeriği sırasıyla %15 ve %10-40 olarak bulunmuştur. Bulgularımız enkapsülasyon etkinliğini %41,86 ile %91,03 arasında bulan Rajabi vd. [15] 'nin yaptığı çalışma ile uyumlu bulunmuştur. Rajabi vd. [15], katı içeriği ve duvar materyali bileşiminin, krosin retensiyonunu önemli ölçüde etkilediğini bildirmişlerdir. Krosin retensiyonundaki fark, katı içeriğindeki farklılıklar ile açıklanabilir.

Kyriakoudi ve Tsimidou [29] safranın pükürtmeli kurutma ile nanoenkapsülasyonu sonucu krosin etkinliğini %54-81 olarak bulduklarını bildirmişlerdir. Yapılan çalışma da, tespit ettiğimiz enkapsülasyon etkinliğine benzer sonuçlar elde ettikleri görülmektedir. Kyriakoudi ve Tsimidou [29] duvar kalınlığı azaldıkça enkapsülasyon etkinliğinin arttığını belirtmektedir.

Atefi vd. [162] safranın aroma bileşeni olan safranalın dondurarak kurutma tekniği ile mikroenkapsülasyonunu gerçekleştirdiği çalışmada enkapsülasyon etkinliğinin %72-98 aralığında bulduklarını rapor etmişlerdir. Sonucun mevcut çalışmadan farklı olması, uygulanan mikroenkapsülasyon tekniğinin, kullanılan materyalin ve duvar malzemesinin farklı olmasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Tupuna vd. [37] 'nin yaptığı norbixinin mikrokapsüllenmesi ile ilgili çalışmada enkapsülasyon etkinliğini formülasyonu 0:100 (MD:GA) olan mikrokapsüllerin, toplam çözünür katıların %40'ı (%74,91-222,40 µg/g) ve mikrokapsülleme verimliliğini %61,07 olarak tespit etmişlerdir.

Ahmad vd. [33] yapmış olduğu bir çalışmada enkapsülasyon etkinliğini α-glukan içinde kapsüllenmiş safran antosiyaninleri ve α-siklodekstrin içinde kapsüllenmiş safran antosiyaninleri sırasıyla %45 ve %63,25; toz verimini sırasıyla %45,33 ve %50 olarak tespit etmişlerdir. Bunlara yakın değerler, maltodekstrin/WPC matriksi ile krosin, pikrokrosin ve safranın kapsüllenmesi için rapor edilmiştir [128].

Rahaiee vd. [32] 'nin krosinin nanoenkapsülasyonunu gerçekleştirdikleri bir çalışmada, kapsülleme verimliliği %38,16 olarak bulmuşlardır.

İçyer [132] 'in yapmış olduğu bir çalışmada, püskürtmeli kurutucu ile farklı sıcaklıklarda yaptığı nar kabuğu ekstraktlarının maltodektrin ile mikroenkapsülasyon

işlemleri sonucu elde ettiği kurutulmuş ürünün miktarına göre mikroenkapsülasyon verimlilik yüzdelerinin 39,5-50,5 arasında değiştiğini tespit etmiştir.

Toz verimi, püskürterek kurutma işlemi sırasında duvar malzemelerinin özelliklerine ve tepkilerine bağlı olarak değişmektedir. Toz verimi besleme çözeltisinde toplam katı içeriğinden, harman kurutucusunun çalışma koşullarından ve duvar malzemesinden çekirdek malzeme oranından etkilenmektedir [15].

4.2.4 Kapsülleme İşleminin Aroma Bileşenlerinin Yüzdesine Etkisi

GC-MS ile yapılan analiz sonucunda safran stigmasında 66 farklı, mikrokapsül ekstraktlarında 63 farklı aroma bileşeni tespit edilmiştir. Bu aroma bileşenlerinden en büyük (>% 1) alana sahip on iki farklı uçucu bileşiklerin yüzde dağılımı Çizelge 4.5'te gösterilmiştir. Çizelgeden de görüldüğü gibi, daha önce yayınlanan [163], [164] çalışmalara benzer şekilde, safranal bileşiğinin (2,6,6-trimetil, 1,3-siklohexadien-1-carboxaldehid), hem safran hem de mikrokapsül ekstraktlarında aroma profilininin büyük bir kısmını oluşturduğu görülmektedir. Diğer uçucu bileşikler 2,4,4-trimetil-3-karboksaldehid-5-hidroksi-2,5-sikloheksadien-1-one, HTCC ve isoforon'dur. Safranın stigmasının ve mikrokapsüllerin GC-MS ile tespit edilen aroma bileşenlerine ait kromotogramlar Şekil 4.4 ve Şekil 4.5'te görülmektedir.

Çizelge 4.5'e göre, kapsülleme işleminin, uçucu dağılımı önemli ölçüde etkilemediğini göstermektedir. Bu sonuç safran ekstraktının kapsülleme işleminden sonra aroma yoğunluğunu koruyabileceğini göstermektedir. Safranal, monoterpenoid bir bileşiktir ve oda sıcaklığında oldukça uçucudur. Bu nedenle, safranal kaybını azaltmak için uygun koruyucu yöntem kullanılmalıdır.

Çalışmamızda safranal retensiyonu %71,2 olarak bulunmuştur. Rajabi vd. [15] 'nin yaptığı bir çalışmada en yüksek safranal retensiyonunu sprey kurutma mikroenkapsülasyonu ile %44,57-80,37 olarak bulduklarını bildirilmiştir. Toplam katı içeriğin arttırılmasının, safranal retensiyonu artırabileceğini öne sürmüşlerdir. Bizim sonuçlarımızda, püskürtmeli kurutma ile mikrokapsüllemenin, safranın uçucu bileşiklerinde yüksek degradasyona neden olmadığını göstermiştir. Bu nedenle, kapsülleme işleminin, yüksek bozunma ve profil değişikliği olmaksızın safran ekstraktı formunun çevresel faktörlerden korunması için faydalı olduğu söylenebilir.
Atefi vd. [162] safranalın dondurarak kurutma tekniği ile mikroenkapsülasyonu sonucunda safranal retensiyonunu, %29-67 aralığında bulduklarını bildirmişlerdir.

Sonucun mevcut çalışmadan düşük olması, farklı mikroenkapsülasyon tekniği, duvar malzemesi ve duvar kalınlığına bağlı olmasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

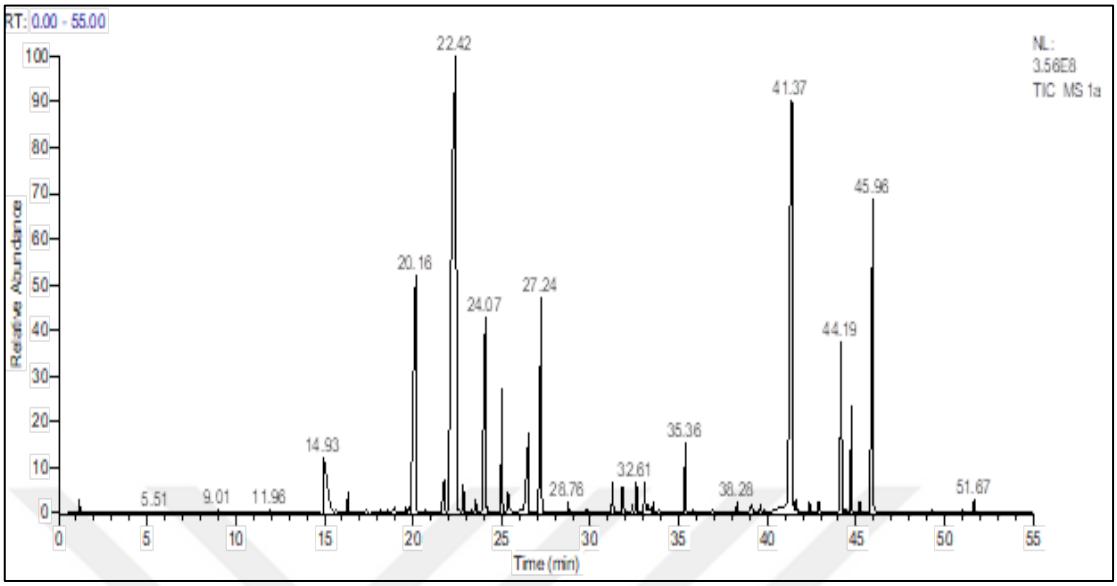
Çizelge 4.5 Safran ve mikrokapsül ekstraktlarının uçucu bileşen profilleri

No	Uçucu Bileşenler	Alan (%)	
		Ekstraktlar	Mikrokapsüller
1	Safranal-2,6,6-trimetil,1,3-siklohekzadien 1karboksaldehid	30,6 ±0,01	30,67±1,75
2	2,4,4-trimetil-3-karboksaldehid-5-hidroksi-2,5-siklohekzadien-1-one	15,50± 0,00	15,30± 0,75
3	α-Isophorone-3,5,5-trimetil, 2-siklololohekzen-1-on	7,72± 0,02	9,14±0,70
4	HTCC-2,6,6-trimetil-4-hidroksi-1-siklohekzen-1-karboksaldehid	6,91± 0,00	8,76±0,55
5	4-Ketoisoforon	5,90± 0,02	5,80±1,05
6	2(5H)-Furanon	5,21± 0,00	5,74±0,00
7	1-Dodecanol (CAS)	3,49± 0,02	4,19±0,05
8	2,6,6-trimethyl, 2,4-Cycloheptadien-1-one,	3,23± 0,01	2,96±0,01
9	1,4-Cyclohexanedione, 2,2,6-trimethyl	3,14± 0,00	2,76±0,05
10	2,3-dicyano-7,7-dimethyl-5,6-benzonorbornadiene	2,77± 0,03	2,39±0,00
11	Acetic acid	2,31± 0,02	2,13±0,01
12	4-Hydroxy-3,5,5-trimethylcyclohex-2-enone	1,49± 0,00	1,18±0,01

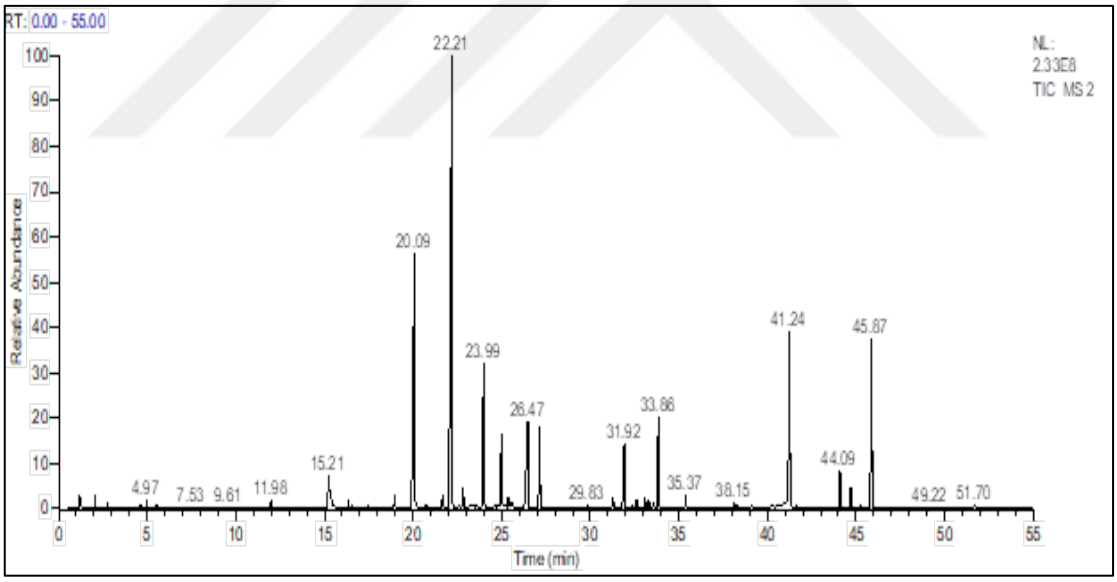
Silvis vd. [165] yapmış oldukları çalışmada safranalın, safranın temel aroma bileşiği olduğunu, ayrıca safran için spesifik bir bileşik olan lanirone, safrandan başka bitki materyallerinde de bulunan β-siklositral, safranda yüksek konsantrasyonda bulunan diğer bir anahtar aroma bileşiği olan furanon, benzer şekilde, birçok çiçek ve baharat bitkisinde bulunan ve hoş bir çiçek kokusuna sahip doğal bir terpen alkolü olan heterosiklik bileşik linalol ve diğer bileşen olarak da karakteristik nane kokusuna sahip olan izofuron bulunduğunu bildirmektedir. Silvis vd.nin rapor ettiği sonuçların, tespit ettiğimiz bulgulara paralellik gösterdiği görülmektedir.

Nenadis vd. [166] 'nin safranın aroma bileşenlerini tanımladıkları bir çalışma da, sırasıyla safranal (2,6,6-trimetil-l, 3-sikloheksadien-1-karboksaldehit), ardından izoforon (3,5,5-trimetil-2-sikloheksen-1-on), 4-ketoizo-izoforon (2,6,6 trimetil-2-sikloheksen-1,4-dion), izoforon ve safranal izomeri, 2,2,6-trimetil-l,4-sikloheksandion,

HTCC (4-hidroksi-2,6,6-trimetil-1-sikloheksen-1-karboksaldehid) ve 2-hidroksi-4,4,6-trimetil-2,5-sikloheksadien-1-on bileşiklerini tanımlamışlardır.



Şekil 4.4 Safranın örneğinin GC-MS ile tespit edilen aroma bileşenlerine ait kromotogram



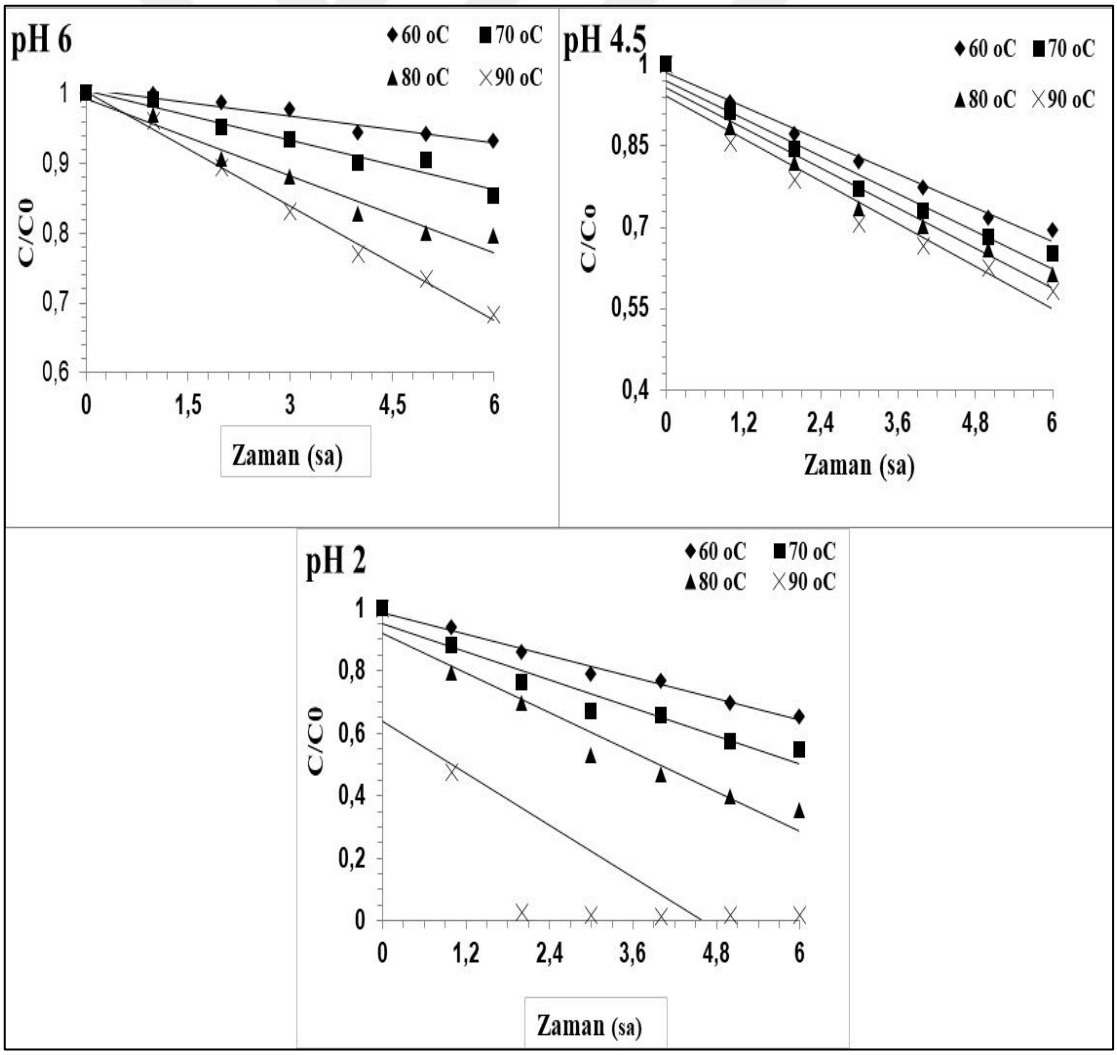
Şekil 4.5 Mikrokapsül örneğinin GC-MS ile tespit edilen aroma bileşenlerine ait kromotogram

Urbani vd. [167] 'nin, İtalya'nın Cascia bölgesinde üretilen safran numunelerine, farklı kurutma koşullarını uyguladıkları bir çalışmada, kurutma koşullarının safran uçucu profilini ciddi bir şekilde etkilediğini vurgulamışlardır. Mevcut çalışma sonuçlarına benzer şekilde, safranın ana uçucu bileşenlerinin, safranal, izofuran, 4 ketoizofuran ve 2,2,6-trimetil-1,4-siklohekzadion olduğunu bildirmişlerdir.

Amanpour vd. [108] İran safranında, farklı ekstraksiyon yöntemleri kullanarak aroma bileşenlerini tespit ettikleri çalışmalarında safranal, 4-ketoizofuron ve dihidroksifuran bileşiklerinin mevcut çalışmaya paralel bir şekilde, safranın en güçlü aromasını oluşturduğunu belirtmişlerdir.

4.2.5 Mikrokapsüllerin pH ve Sıcaklık Stabilitesi

Mikrokapsüllerin kullanım öncesi ısı ve pH stabilitelerinin belirlenmesi kritik bir konudur. Safran ekstrelerinin doğal renklendirici maddesi olan krosin, doymamış hidrokarbonlar içeren uzun zincirli bir yapıya sahiptir. Bu yapı, krosin bileşiğini sıcaklık ve oksijene karşı oldukça hassas hale getirmektedir. Safran bir monoterpenoid aldehittir ve termal süreç sırasında buharlaşabilmektedir. Sıcaklık ve pH stabilitesi hakkında bilgisizlik, renk ve lezzet bileşiklerinde önemli kayıplara yol açabilmektedir. Bu nedenle, stabilite göz önünde bulundurulmalıdır.



Şekil 4.6 Farklı pH ve sıcaklıklardaki krosinin degradasyon eğrileri

Bu tez kapsamında, farklı sıcaklıklarda (60, 70, 80 ve 90 °C) ve farklı pH seviyelerinde (2, 4,5 ve 6) krosinin termal ve pH kararlılığı belirlenmiştir. Şekil 4.6, mikrokapsül krosin ekstraktlarının farklı pH ve sıcaklıklardaki degradasyon eğrilerini göstermektedir. Krosin degradasyonu, birinci dereceden reaksiyon kinetiği göstermiştir. Önceki araştırmalar da doğal renklendirici olan safran pigmentlerinin birinci dereceden bozunma kinetiği gösterdiği belirtilmektedir [35], [168]. Görülebileceği gibi, krosin degradasyonu yüksek sıcaklıkta ve düşük pH değerinde artmıştır. Farklı sıcaklık ve pH değerinden elde edilen kinetik bozunma verileri, birinci dereceden bozunma kinetik modeline yerleştirilmiştir.

Modelin kabul edilebilirliği, regresyon katsayısı (R^2) ile değerlendirilmiştir. R^2 değerleri pH 2, 90 ^oC hariç, 0,94'den daha yüksek bulunmuştur, bu da birinci mertebeden kinetik modelin, krosinin degradasyon kinetiğini alkali ve pH değerinde başarıyla modellediğini göstermektedir. R^2 değeri pH 2 ve 90 ^oC için 0,71 olarak bulunmuştur. Hız sabiti (k), pH ve sıcaklığın, krosin bozunma hızına etkisini belirlemek için hesaplanmıştır. Yüksek k değeri, krosinin daha fazla bozunduğunun göstergesidir.

Çizelge 4.6, tüm pH ve sıcaklıktaki krosin mikrokapsüllerinin k değerini göstermektedir. Sıcaklık ve pH değeri, degradasyon kinetiğinin farklı sıcaklık ve pH'ta farklı olduğunu gösteren, k değerini önemli ölçüde etkilemiştir ($p<0,05$). k değeri, sırasıyla pH 2, 4,5 ve 6 için 0,071-0,99, 0,062 0,09 ve 0,013-0,065 olarak bulunmuştur. Aynı pH değerinde, k değeri, özellikle 80 ve 90 °C sıcaklıklarda, sıcaklık artışıyla önemli ölçüde artmıştır. Safranın sulu ekstrelerinde bulunan krosetinin ester yıkımı, 5 ila 70 °C arasında artan sıcaklık ile artmaktadır [169]. Krosinin ısıya duyarlılığı, yüksek ışık tutma kapasitesi ve çok sayıda doymamış uzun zincirlere sahip olması ile açıklanabilir.

k değeri üzerinde pH değerlendirildiğinde, pH 2 değerinin tüm sıcaklık derecelerinde daha yüksek k değeri gösterdiği görülmüştür. Özellikle, sıcaklık pH 2'de 90 °C'ye yükseldiğinde, k değeri önemli ölçüde artmıştır. 90 °C'de, pH 2'den elde edilen k değeri, sırasıyla pH 4,5 ve pH 6'dan elde edilen k değerlerinden 11 ve 15,2 kat daha yüksek bulunmuştur.

Çizelge 4.6 Farklı pH ve sıcaklıklardaki krosin mikrokapsüllerinin k değerleri

pH2				pH4,5				pH6			
Sıc. (°C)	1. dereceden parametreler			Sıc (°C)	1. dereceden parametreler			Sıc. (°C)	1. dereceden parametreler		
	k	R	$t_{1/2}$		k	R	$t_{1/2}$		k	R	$t_{1/2}$
60	0,071Ad	>0,94	9,743Ca	60	0,062Bc	>0,94	11,017Ba	60	0,013Cd	>0,94	51,897Aa
70	0,105Ac	>0,94	6,559Cb	70	0,073Bd	>0,94	9,372Bb	70	0,025Cc	>0,94	27,261Ab
80	0,183Ab	>0,94	3,778Cc	80	0,081Ab	>0,94	8,483Bc	80	0,041Cb	>0,94	16,504Ac
90	0,990Aa	>0,71	0,699Cd	90	0,090Ba	>0,94	7,655Bd	90	0,065Ca	>0,94	10,658Ad

*Aynı sütundaki farklı küçük harfler, sıcaklığın k ve $t_{1/2}$ değeri üzerindeki belirgin etkisini gösterir ($p < 0,05$). *Aynı satırdaki farklı büyük harfler, pH'nin k ve $t_{1/2}$ değeri üzerindeki belirgin etkisini gösterir ($p < 0,05$).

Sonuç olarak, düşük pH ve yüksek sıcaklık, krosinde hızlı degradasyona neden olmuştur. Tsimidou ve Tsatsaroni [168], düşük pH'ta krosinde yüksek degradasyon meydana geldiğini rapor etmişlerdir. Asidik koşullarda karotenoidlerin yüksek bozunumu izomerizasyon ile açıklanabilir [170].

Yarı ömür değerlerinin ($t_{1/2}$), farklı pH ve sıcaklık altındaki tahmini raf ömrü hesaplaması yapılmıştır. $t_{1/2}$ değerinin sıcaklık ve pH değerinden önemli ölçüde etkilendiği görülmüştür ($p<0,05$). $t_{1/2}$ değeri artan pH ile azalan sıcaklık değerlerinde artış göstermiştir, bu da krosinin yarı ömrünün düşük sıcaklık ve yüksek pH'ta daha yüksek olduğunu göstermektedir. Bu çalışma sonuçları, krosin bozunmasının pH ve sıcaklığa bağlı olduğunu ve ılımlı prosese maruz bırakılan yüksek pH'lı gıdaların formülasyonlarında doğal bir renklendirici olarak kullanılabileceğini ortaya koymaktadır. Yapılan çalışmalar safran ekstrelerini veya safran karotenoidlerini amorf polimerle kapsüllemenin, stabilitelerini ve antitümör etkilerini arttırdığını göstermiştir [32].

4.2.6 Mikrokapsüllerde Toplam Fenolik ve Flavonoid Madde Miktarı

Toplam fenolik madde miktarı Singleton ve Rossi [139] tarafından geliştirilen ve Li vd. [171] tarafından modifiye edilen metod esas alınarak gerçekleştirilmiştir. UV/VIS spektrofotometre cihazı (Shimadzu UV-1800, Japonya) ile örneklerin absorbans değerleri 760 nm dalga boyunda tespit edilmiştir. Sonuçlar gallik asit eşdeğeri (GAE) cinsinden 14,05±0,22mg GAE/g olarak bulunmuştur.

Toplam Flavonoid miktarı (TFM) analizi Zhinsen ve ark. [140] metoduna göre belirlenmiştir. UV-VIS spektrofotometre (Shimadzu UV-1800 spectrophotometer, Japan) ile örneklerin absorbans değerleri 510 nm dalga boyunda ölçülmüştür. Sonuçlar kateşin olarak 4,44±0,28 mg CAE/g olarak tespit edilmiştir. Enkapsülasyondan öncesi ve sonrası safranın toplam fenolik ve flavonoid madde miktarı ile antioksidan kapasite miktarları Çizelge 4.7'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.7 Mikroenkapsülasyon öncesi ve sonrası safranın toplam fenolik, flavonoid madde ve antioksidan kapasite miktarları

Örnek	Toplam Fenolik Madde (mg/g)	Toplam Flavonoid Madde (mg/g)	Antioksidan kapasite CUPRAC(mg/g)
Toz safran	31,61±0,26	9,34±0,42	302,6±10,01
Mikrokapsüle ürün	14,05±0,22	4,44±0,28	81,86±0,32

Fenolik bileşikler, normal gelişim sırasında veya çevresel stres koşullarına bir cevap olarak birçok bitki tarafından sentezlenen ikincil metabolitlerdir. Bu bileşiklere, bu nedenle, kimyasal, farmasötik ve gıda endüstrilerinde büyük ilgi gösterilen önemli fonksiyonel özellikler sunmaktadır [172].

Safran ekstrelerinin fenolik bileşiklerin ve antioksidan kapsitesinin yüksek içeriği, safranın doğal bir antioksidan fenolik bileşik kaynağı olarak büyük potansiyele sahip olduğunu doğrulamaktadır.

4.2.7 Mikrokapsüllerde Antioksidan Kapasite Miktarı

Apak ve arkadaşları [141] tarafından geliştirilen yönteme göre belirlenen antioksidan kapasite miktarı, trolaks eşdeğeri cinsinden 81,86±0,32 mg TEAC/g olarak tespit edilmiştir (Çizelge 4.7).

Literatürde mikrokapsüle edilmiş safranın antioksidan kapasitesi üzerine araştırmaya rastlanmamıştır. Bu nedenle elde edilen sonuçlar nanoenkapsüle edilmiş safranın antioksidan kapasitesini mevcut çalışmadan farklı bir yöntem kullanarak belirleyen Rahaiee vd. [32]'nin sonuçları ile kıyaslanmıştır. Rahaiee vd. [32] nanoenkapsüle ettikleri safranın antioksidan aktivitelerininin krosin yüklü nanopartiküllerin

konsantrasyonunun artmasıyla önemli ölçüde arttığını bildirmişlerdir. Yaptıkları bu çalışmada, ortalama FRAP değerleri, farklı konsantrasyonlardaki (2-10 mg/mL) krosin yüklü nanopartikeller için sırasıyla 0,094, 0,158, 0,219, 0,298 ve 0,323 µM Fe (II) olarak belirlemişlerdir. Bununla birlikte, kapsülleme yöntemi kısmen safran pigmentinin antioksidan aktivitesinin korunmasına yardımcı olmaktadır. Zhang vd. [173], kitosan ile in vitro koşullarda kuersetin yüklü nanopartiküllerinin antioksidan aktivitesini belirlemiş ve kuersetin antioksidan aktivitesinin, nanopartiküller ile kapsülleme sonrasında korunduğunu bildirmişlerdir [32]. Lee vd. [174] yaptıkları çalışmada, kapsülleme işlemlerinin kateşin, alfa-tokoferol, orizanol ve C vitamini gibi hassas bileşenler üzerinde koruyucu etkileri olduğunu bildirmişlerdir.

4.2.8 Mikrokapsüllerin Renk Değerleri (L, a, b)

Kapsüllerin renk özelliklerini belirlemede Hunter Lab renk cihazı kullanılmıştır. Mikrokapsüllerin ve mikrokapsül ekstraktının L*, a*, b* değerleri ölçülmüş ve mikrokapsüllerin L* değeri 55,61±0,04; a* değeri 47,38±0,10 ve b* değeri ise 76,44±0,07; 60 mg mikrokapsülün 30 mL saf suda çözülmesiyle elde edilen ekstraktların L* değeri 2,48±0,07; a* değeri 3,92±0,03 ve b* değeri ise 3,99±0,14 olarak tespit edilmiştir. Renk parametreleri Çizelge 4.8 de verilmiştir.

Çizelge 4.8 Safran stigmalarının ve mikrokapsüllerin L*, a*, b*değerleri

Örnek	L*	a*	b*
Toz haldeki safran	35,12±0,02	37,64±0,11	41,67± 0,13
Safran ektraktı	2,10± 0,01	3,85±0,01	3,54± 0,03
Mikrosapsüle toz ürün	55,61±0,04	47,38±0,10	76,44±0,07
Mikrokapsül ekstraktı	2,48± 0,07	3,92±0,03	3,99±0,14

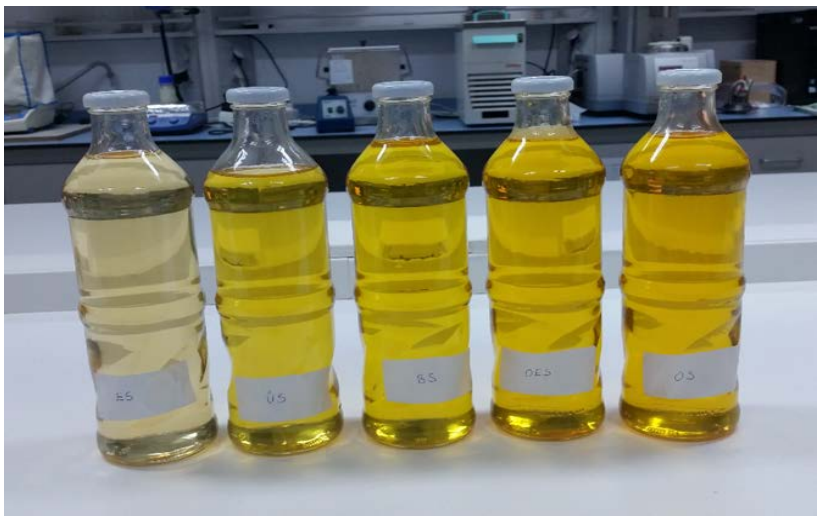
Toz haldeki safran ile mikrokapsül safranın renk değerleri olan L*, a* ve b* karşılaştırıldığında bu değerlerde belirgin bir artış görüldüğü tespit edilmiştir. L* değeri 100'e yaklaştıkça beyazlık artmaktadır. L* değerindeki artışın beyaz renkte olan maltodekstrinden kaynaklandığı, a* ve b* değerlerinin artışının da mikrokapsüllerdeki, sarıdan kırmızıya kadar değişen renk tonu aralığına sahip krosin

renk maddesinin konsantrasyonunun artışına bağlı olarak gerçekleştiği düşünülmektedir.

Yaşar [175], kaplama materyali olarak maltodekstrin kullanarak nar suyunu püskürtmeli kurutucu ile gerçekleştirdiği mikroenkapsülasyon işlemi sonucunda sıcaklık artışına bağlı olarak esmerleşmenin görüldüğünü ve L* değerinin azaldığını, a* değerinin artış gösterdiğini, bu durumun karamelizasyon sonucunda meydana geldiğini belirtmiştir. Ayrıca mikrokapsüllerin yapısındaki beyaz renkte olan maltodekstrin oranının artmasıyla mikrokapsüllerin renginde açılmaya sebep olacağını belirtmiş ve maltodekstrin miktarının artışına bağlı olarak L* değerinde artış, a* değerinde azalma görüldüğünü tespit etmiştir. Mevcut çalışmada, Yaşar [175]'ın bulmuş olduğu sonuçlara benzer şekilde L* değerinde artış görülmektedir. Ancak a* değerinde Yaşar [175]'ın tespit ettiği sonuçtan farklı olarak mevcut çalışmada artış görülmektedir. Bu farklılığın nedeninin kullanılan materyal ve maltodekstrin oranının farklılığından olabileceği düşünülmektedir.

4.3 Mikrokapsül Gıda Boyasının Meyve Suyunu Renklendirme Amacıyla Kullanımı

Model sistem olarak kullanılan elma suları (Dimes marka) farklı miktarlarda (30 ppm-180 ppm) mikrokapsül gıda boyası ile renklendirilmiştir (ES: Mikrokapsül içermeyen kontrol örneği, ÜS: 30 mg/L mikrokapsül ilaveli elma suyu, BS: 50 mg/L mikrokapsül ilaveli elma suyu, OES: 120 mg/L mikrokapsül ilaveli elma suyu, OS: 180 mg/L mikrokapsül ilaveli elma suyu). Şekil 4.7 de kontrol örneği ve mikrokapsül ilaveli elma suları görülmektedir.



Şekil 4.7 Safran boyasıyla renklendirilen elma suyu örnekleri

4.3.1 Meyve Sularında Toplam Fenolik, Flavanoid Madde Miktarı

Elma sularına uygulanan toplam fenolik, flavanoid madde miktarı sonuçları Çizelge 4.9'da gösterilmiştir.

Çizelge 4.9'da görüldüğü gibi meyve suyuna eklenen mikrokapsül miktarı arttıkça toplam fenolik madde miktarının artış gösterdiği, toplam flavonoid madde miktarında değişiklik meydana gelmediği görülmektedir.

Meyve sularının renklendirilmesinde farklı miktarlardaki mikrokapsül boyaların kullanıldığı bu araştırmada, ilave edilen mikrokapsül gıda boyasının örneklerdeki toplam fenolik madde miktarı üzerindeki etkisinin istatistiki olarak önemli ($p<0,05$) olduğu belirlenmiştir.

Yaptığımız çalışmada ilave edilen mikrokapsül gıda boyasının örneklerin toplam flavonoid madde miktarı üzerine etkisinin istatistiki olarak önemsiz ($p>0,05$) olduğu saptanmıştır.

Çizelge 4.9 Meyve sularının toplam fenolik, flavonoid ve antioksidan kapasite miktarları

Elma Suları	Toplam Fenolik Madde (mg GAE/L)	Toplam Flavonoid Madde (mg CAE/L)	Antioksidan Kapasite CUPRAC (mg TEAC/L)
ES	$65,26\pm0,18^{a}$	$9,65\pm0,01^{a}$	$160,00\pm0,01^{a}$
ÜS	$65,67\pm0,51^{ab}$	$9,65\pm0,01^{a}$	$165,00\pm0,01^{b}$
BS	$65,89\pm0,18^{bc}$	$9,65\pm0,01^{a}$	$167,00\pm0,02^{c}$
OES	$66,57\pm0,14^{c}$	$9,65\pm0,01^{a}$	$170,00\pm0,01^{d}$
OS	$67,47\pm0,07^{d}$	$9,65\pm0,01^{a}$	$175,00\pm0,01^{e}$

*±standart sapma, aynı sütunda gösterilen aynı harfler farkın one way ANOVA Duncan testine göre istatistiksel olarak önemli olmadığını ($p>0,05$) gösterirken, farklı harfler ise örnekler arasında istatistiksel fark ($p<0,05$) olduğunu göstermektedir.

* ES: Mikrokapsül içermeyen kontrol örneği, ÜS: 30 mg/L mikrokapsül ilaveli elma suyu, BS: 50 mg/L mikrokapsül ilaveli elma suyu, OES: 120 mg/L mikrokapsül ilaveli elma suyu, OS: 180 mg/L mikrokapsül ilaveli elma suyu.

4.3.2 Meyve Sularının Antioksidan Kapasitesi

Apak vd. [141] tarafından belirlenen CUPRAC metoduna göre gerçekleştirilen analiz sonuçları Çizelge 4.9 da verilmiştir.

Enkapsüle edilen safran miktarı artışına paralel olarak örneklerin antioksidan kapasitesinde artış görülmektedir. Bu durum istatistiksel açıdan önemli ($p<0,05$) bulunmuştur.

Fenolik madde miktarının artışına bağlı olarak antioksidan kapasitenin de artış gösterdiği görülmektedir.

4.3.4 Meyve Sularının Renk Değerleri (L, a, b)

Elma sularına farklı oranlarda eklenen mikrokapsüllerin verdiği renk, L*, a*, b* değerleri, otomatik renk tayin cihazı (Hunter Lab) ile belirlenmiştir. Analiz sonuçları Çizelge 4.10'de gösterilmiştir.

CIE L* değeri parlaklığın ölçüsüdür (100= beyaz, 0= siyah), a * değeri kırmızılık (pozitif değer) veya yeşillik (negatif değer) ve CIE b * değeri sarılık (pozitif değer) veya maviliğin (negatif değer) ölçüsüdür [176].

Çizelge 4.10 Mikrokapsüllerle renklendirilen elma sularının renk parametreleri ve pH değerleri

Elma Suyu Örnekleri	L*	a*	b*	pH
ES	4,37±0,02^{a}	-0,49±0,11^{b}	1,57±0,04^{a}	2,95±0,03^{b}
ÜS	4,21±0,00^{b}	-0,74±0,01^{a}	4,44±0,05^{b}	2,95±0,00^{ab}
BS	4,24±0,02^{b}	-0,60±0,08^{b}	5,81±0,15^{c}	2,94±0,00^{ab}
OES	3,84±0,01^{c}	-0,12±0,01^{c}	5,96±0,02^{d}	2,94±0,00^{a}
OS	3,67±0,02^{d}	0,14±0,03^{d}	5,80±0,07^{c}	2,40±0,00^{ab}

*±standart sapma, aynı sütunda gösterilen aynı harfler farkın one way ANOVA Duncan testine göre istatistiki olarak önemli olmadığını ($p>0,05$) gösterirken, farklı harfler, örnekler arasında istatistiki olarak fark ($p<0,05$) olduğunu göstermektedir.

* ES: Mikrokapsül içermeyen kontrol örneği, ÜS: 30 mg/L mikrokapsül ilaveli elma suyu, BS: 50 mg/L mikrokapsül ilaveli elma suyu, OES: 120 mg/L mikrokapsül ilaveli elma suyu, OS: 180 mg/L mikrokapsül ilaveli elma suyu.

Meyve suyularının renklendirilmesinde farklı miktardaki krosin mikrokapsüllerinin kullanıldığı bu araştırmada, örneklerin L* değeri üzerine gıda boyasının etkisi istatistiksel açıdan önemli ($p<0,05$) bulunmuştur. Örnekler arasında en yüksek L* değerini ES kodlu kontrol grubu oluşturmuştur. Krosin mikrokapsülleriyle renklendirilen meyve sularında en yüksek a* değeri OS kodlu örnekte görülmüştür. Renklendirilen örneklerin a* değerleri arasında istatistiksel olarak fark olduğu ($p<0,05$) görülmektedir. Renklendirilen elma suları arasında en yüksek b* değeri 5,96 olarak OES kodlu örnekte tespit edilmiştir. Örneklerin b* değeri üzerine gıda boyasının etkisinin istatistiksel olarak önemli olduğu ($p<0,05$) tespit edilmiştir.

4.3.5 Meyve Sularının pH Değerleri

Farklı miktarlarda safran boyasıyla renklendirilen elma sularının pH analizi pH metre ile belirlenmiştir. Sonuçlar Çizelge 4.10 da gösterilmiştir.

Meyve sularının renklendirilmesinde farklı miktardaki mikrokapsül boyaların kullanıldığı bu araştırmada, örneklerin pH değerinde meydana gelen değişimde gıda boyasının etkisinin istatistiksel olarak önemli olmadığı ($p>0,05$) belirlenmiştir.

4.3.6 Meyve Sularının Duyusal Değerleri

Çalışma kapsamında elma suyu örneklerine farklı miktarlarda ilave edilen mikrokapsül edilmiş gıda boyasının duyusal kalite üzerine olan etkilerinin belirlenebilmesi için eğitilmiş 17 panelist ile hedonik skala yöntemine göre duyusal analizler yapılmıştır. Duyusal analiz renk, koku, tat, lezzet, aroma ve genel beğeni açısından 1-5 puan aralığında değerlendirilmiştir. Mikrokapsül safran boyasıyla renklendirilen elma suyu örneklerinin duyusal analiz bulguları Çizelge 4.11'de gösterilmiştir.

Renk, gıdaların satın alınmasında tüketici tercihini belirleyen en önemli kalite parametrelerinden biridir. Renk skorları 3,41-4 arasında olan örneklerden renk bakımından en çok beğenilen örnek ÜS (4) kodlu elma suyu olurken en az beğenilen örnek OS (3,41) olarak belirlenmiştir. Meyve sularının renklendirilmesinde farklı miktarlardaki mikrokapsül boyaların kullanıldığı bu araştırmada, örneklerin renk parametresi üzerine yapılan duyusal analizlerde, tüm örneklerinin kontrol grubuna göre (ES) renk değeri için gıda boyasının etkisinin istatistiksel olarak önemli ($p<0,1$) olduğu saptanmıştır.

Çizelge 4.11 Mikrokapsüllerle renklendirilen elma suyu örneklerinin duyusal analiz bulguları

	ES	ÜS	BS	OES	OS
Renk	3,06±0,83[b]	4,00±0,61[a]	3,65±0,86[ab]	3,47±0,7[ab]	3,41±1,17[ab]
Koku	4,00±0,83[a]	3,88±0,78[a]	4,00±0,87[a]	3,76±1,5[a]	3,88±0,85[a]
Tat	3,58±1,23[a]	3,82±0,88[a]	3,82±1,01[a]	4,12±0,99[a]	4,00±0,79[a]
Lezzet	3,76±0,9[a]	4,12±0,33[a]	3,88±0,78[a]	4,12±0,7[a]	3,94±0,75[a]
Aroma	3,64±0,86[a]	4,00±0,94[a]	4,00±0,79[a]	4,24±0,83[a]	4,24±0,66[a]
Genel Beğeni	3,65±0,86[a]	4,10±0,75[a]	3,94±0,74[a]	3,82±0,73[a]	3,82±0,72[a]

*±standart sapma, aynı satırda gösterilen aynı harfler farkın one way ANOVA Duncan testine göre istatistiki olarak önemli olmadığını ($p>0,05$) gösterirken, farklı harfler, örnekler arasında istatistiki olarak fark ($p<0,1$) olduğunu göstermektedir.

* ES: Mikrokapsül içermeyen kontrol örneği, ÜS: 30 mg/L mikrokapsül ilaveli elma suyu, BS: 50 mg/L mikrokapsül ilaveli elma suyu, OES: 120 mg/L mikrokapsül ilaveli elma suyu, OS: 180 mg/L mikrokapsül ilaveli elma suyu.

Koku skorları 3,76-4,00 arasında değişmektedir. Koku açısından en çok beğenilen örnek BS olurken en az beğenilen örnek OES kodlu örnek olmuştur. Meyve sularının renklendirilmesinde farklı miktardaki mikrokapsül boyaların kullanıldığı bu araştırmada, örneklerin koku değeri üzerine gıda boyasının etkisinin istatistiksel olarak önemli olmadığı ($p>0,05$) belirlenmiştir.

Tat skorları 3,58-4,12 arasında değişmektedir. Tat bakımından en beğenilen örnek OES bulunurken en az beğenilen ÜS ve BS örnekleri olmuştur. Tüm örneklerin kontrol grubuna göre (ES) tat değeri üzerine gıda boyasının etkisinin istatistiksel olarak önemli olmadığı ($p>0,05$) tespit edilmiştir.

Lezzet skorları 3,88-4,12 arasında değiştiği görülmüştür. Buna göre en lezzetli ÜS ve OES örnekleri bulunurken en az lezzete sahip olan örneğin BS olduğu görülmüştür. Meyve sularının renklendirilmesinde farklı miktardaki mikrokapsül boyaların kullanıldığı bu araştırmada, örneklerin lezzet değeri üzerine gıda boyasının etkisinin istatistiksel olarak önemli olmadığı ($p>0,05$) belirlenmiştir.

Aroma skorları 4,00-4,24 arasında değiştiği görülmüştür. En belirgin aromaya sahip OS ve OES kodlu örnekler bulunurken en az aromaya sahip olan örnek ÜS ve BS olmuştur. Elma suları içinde çözünen safran boyası miktarı arttıkça daha belirgin bir aroma açığa çıktığı tahmin edilmektedir. Tüm örneklerin kontrol grubu (ES) ile aroma değeri bakımından kıyaslandığında gıda boyasının etkisinin istatistiksel olarak önemli olmadığı ($p>0,05$) belirlenmiştir.

Genel beğeni skorlarının da 4,10-3,82 arasında değiştiği görülmüştür. Mikrokapsül safran boyasıyla boyanmış örneklerden en fazla ÜS (4,10) kodlu örneğin genel beğeni aldığı görülmüştür. Gıda boyasının artışına paralel olarak genel beğeninin aynı doğrultuda artış göstermediği saptanmış olup, genel beğeni skorları üzerine gıda boyasının etkisinin istatistiksel olarak önemli olmadığı ($p>0,05$) belirlenmiştir.

Renk ve genel beğeni bakımından en çok beğenilen örnek ÜS kodlu örnek olmuştur. ÜS (30 mg/L) en az miktarda gıda boyasının kullanıldığı örnektir. Bu durumda çok az miktarda boya kullanımının ürünü daha çekici hale getirmesi ve daha çok beğeni alması bakımından yeterli olduğu sonucuna ulaşılmıştır.

En beğendiğiniz içeceğin üretimi yapılıp piyasaya sunulsa satın alır mısınız sorusuna panelistlerin büyük çoğunluğunun evet yanıtını verdiği görülmüştür. Yapılan duyusal analiz sonucuna göre 30 mg/L safran boyası ilavesiyle meyve suyunun renk, koku, lezzet parametrelerinin olumlu yönde etkilendiği tespit edilmiştir.

Meyve sularının renklendirilmesinde mikrokapsüle safran boyasının kullanımıyla rengin daha çekici hale getirilmesinin yanısıra toplam fenolik bileşenlerin ve antioksidan kapasitenin artışını da sağladığından yeni ürüne fonksiyonel özellik de kazandırdığı sonucuna ulaşılmıştır.

Mevcut çalışmaya benzer bir literatüre rastlanmadığından elde edilen verilerin kıyaslaması yapılamamıştır.

BÖLÜM 5

SONUÇ VE ÖNERİLER

Günümüzde tüketiciler, sağlık üzerine olumlu etkilerinden dolayı doğal katkı maddelerini daha fazla tercih etmektedir. Bu nedenle, bu katkıların üretimi için doğal kaynakların ve etkin ekstraksiyon yöntemlerinin belirlenmesi büyük önem taşımaktadır.

Bu çalışmanın ilk aşaması, yanıt yüzey metodu kullanılarak, ultrason yardımıyla safran stigmalarından renk maddelerinin optimum koşullarının belirlenmesi amacıyla yapılmıştır. Bu amaçla ekstraksiyon parametreleri; ekstraksiyon süresi (3-15 dk), sıcaklık (25-65 ^{o}C), sonikasyon şiddeti (%20-100) ve çözücü: örnek oranı (1000-3000 mg/L) olarak belirlenmiştir. Yanıt Yüzey metodu kullanılarak yapılan optimizasyon çalışmasının sonucuna göre, işlem parametrelerinin krosin verimine etkisi, kuadratik modeller (R^2>0,99 ve adj R^2>0,98) ile başarılı bir şekilde belirlenmiştir. Tüm bağımsız değişkenlerin krosin verimini önemli derecede etkilediği tespit edilmiştir ($p<0,01$). İşlem parametreleri, ekstraksiyon süresi (4,40 dk), sıcaklık (55 ^{o}C), ultrases şiddeti (%94,72) ve çözücü: örnek oranı (1000 mL/g) optimum ekstraksiyon koşulları olarak seçilmiştir. Ekstraksiyon süresi, sıcaklık, ultrasonik şiddet artışının krosin seviyesinde artışa ve çözücü: örnek oranı artışının da krosin seviyesinin azalmasına neden olduğu görülmüştür.

Ekstraksiyon aşaması sıcaklık, çözücü, zaman, katı konsantrasyonu gibi çeşitli faktörlerden etkilenmektedir. Bu nedenle, bu faktörlerin optimizasyonu önemlidir. Yapmış olduğumuz optimizasyon çalışmasında, ekstraksiyon parametrelerinin krosin verimini önemli ölçüde etkilediği görülmüştür. Mevcut çalışma, yüksek sıcaklık,

yüksek ultrason gücü ve düşük L/S değerlerinde krosin veriminin artabileceğini göstermiştir. Bu çalışma doğrultusunda, safrandan elde edilen maksimum renk pigmentleri için belirlenen ekstraksiyon koşulları, hem endüstriyel hem de analitik uygulamalarda kullanılabilir.

Çalışmamızın 2. aşamasında, safranın renk maddelerine, kaplama malzemesi olarak maltodekstrin kullanılarak sprey kurutma cihazı ile mikrokapsülleme işlemi gerçekleştirilmiştir. Maltodekstrin yüksek çözünürlüğe sahip olduğundan mikrokapsülleme işlemi için duvar malzemesi olarak seçilmiştir. Mikrokapsüllerin nem, renk, biyoaktif bileşenler ve enkapsülasyon etkinliği gibi özellikleri belirlenmiş, ayrıca morfolojisi taramalı elektron mikroskobu (SEM) tekniği kullanılarak karakterize edilmiştir. Ayrıca bu aşama da, krosin mikrokapsüllerinin sıcaklık ve pH stabilitesinin belirlenmesi için analizler yapılmıştır. Krosin'in termal ve pH stabilitesi farklı sıcaklıklarda (60, 70, 80 ve 90 $^{\circ}$C) ve pH seviyelerinde (2, 4,5 ve 6) belirlenmiştir. Yapılan stabilite testleri sonucunda krosin degradasyonu, birinci dereceden reaksiyon kinetiği göstermiştir ve bozunma hız sabitinin (k), pH ve sıcaklıktan önemli ölçüde etkilendiği saptanmıştır ($p<0,05$). Çalışmamıza göre, yüksek sıcaklık ve düşük pH uygulamasının krosin degradasyon oranını artırdığı tespit edilmiştir. Buna göre, krosinin, orta ısıl işlemde, orta ve düşük asidik veya bazik gıda formülasyonlarında doğal renklendirici olarak kullanılması önerilebilir**.** Ayrıca kapsüllenmiş krosinin farklı çevre koşullarında stabilitesinin artırılmasına yönelik ileri çalışmaların yapılması, gerekli görülmektedir.

Renk maddeleri ve biyoaktif bileşikler, fizikokimyasal faktörlere karşı oldukça duyarlıdır. Bundan dolayı bu gibi bileşenlerin muhafazası için mikroenkapsülasyon işlemi uygun bir teknik olarak görülmektedir. Mikrokapsülleme, hassas materyalleri olumsuz çevre koşullarından koruyan uygun bir tekniktir. Bununla birlikte, her bileşen için optimal koşul yoktur. Bu yüzden sıcaklık, hammadde akışı, besleme akışı ve taşıyıcı solüsyon konsantrasyonu gibi farklı parametreleri içeren daha fazla optimizasyon çalışması yapılabilir. Böylece optimum koşullar belirlenerek etkinlik değerleri artırılabilir. Ayrıca farklı kaplama materyalleri kullanılarak, kaplama materyallerinin mikrokapsüller üzerine etkisi incelenebilir. Kapsüllenmiş renk maddelerinin depolama koşulları incelenerek, depolamayla meydana gelebilecek değişiklikler belirlenebilir. Uygun koşullarda elde edilecek kapsüller, gıda ve sağlık sektörü uygulamalarında kullanılabilir.

Safranın kapsüllenmesi öncesi ve sonrası için aroma profilleri GC-MS metoduyla belirlenmiştir. Kapsülleme işleminin, yüzde olarak uçucu bileşen dağılımını önemli ölçüde etkilemediği görülmüştür ($p<0,05$). Bu sonuç, mikroenkapsülasyon tekniğinin aroma bileşenleri için de uygun bir koruma yöntemi olduğunu göstermiştir.

Bu çalışmada, safranın enkapsülasyonu ile aroma bileşenlerinin daha iyi muhafaza edilebileceği tespit edilmiştir. Safranın uçucu bileşenlerinden maksimum etkinlik elde etmek için daha fazla optimizasyon çalışmaları yapılmalıdır.

Tezin 3. aşamasında, krosin mikrokapsüllerinin model sistemde uygulaması yapılmıştır. Bu amaçla, farklı oranlarda mikrokapsül boyaları meyve sularına eklenerek, biyoaktif özellikleri ve renk değerleri tespit edilmiş, ayrıca eğitilmiş panalistlerce duyusal analizler yapılmıştır. Duyusal analiz sonuçlarına göre, litreye 30 mg düzeyinde mikrokapsül kullanılan meyve suları daha fazla beğeni almıştır. Buna göre az miktarda kapsül kullanımı hem yeterli olmakta hem de ek maliyet ücretleri azaltılmaktadır. Mevcut çalışmada, model sistem olarak meyve suyuna uygulama yapılmış olup, asiditesi orta ve düşük seviyede olan diğer sıvı ve katı gıdalara uygulanması önerilebilir.

Kullanım olarak, safran stigmaları ile mikrokapsül kıyaslandığında, mikrokapsüller her şeyden önce kullanım pratikliği; suda kolayca çözünebilir olması ve homojen dağılım sağlaması gibi avantajlara sahiptir. Mikrokapsüllerin gıdalara uygulanması için ön işleme gerek kalmadan, hızlı bir şekilde su bazlı gıda ürünlerinde çözünmesi gerçekleşmektedir. Böylece zamandan ve ön işlem maliyetlerinden tasarruf sağlanmaktadır. Ayrıca standart özelliklerde üretim yapılırken, kullanım dozlarının belirlenmesi ile işlemlerinin daha kolay yapılabileceği öngörülmektedir. Buna göre, safran mikrokapsülleri, su bazlı gıda formülasyonlarında da kullanılabilir.

Doğal renk maddelerinin sağlık üzerine olumlu katkılarına bağlı olarak sentetik gıda boyalarının yerini almaya başladığı bugünlerde farklı kaynakların araştırılıp, bunlar üzerine yapılacak çalışmaların artırılması önerilmektedir. Böylece karotenoidlerden elde edilecek safran gibi doğal gıda boyalarının endüstride kullanımı yaygınlaştırılabilir.

Renkler, gıdalardaki en önemli duyusal algılardan olup, tüketici tercihini etkilemektedir. Bu çalışma, uygulama işlemi kolay olan, içeriğindeki biyoaktif bileşenlerle yeni organoleptik ve teknolojik yeniliklere sahip gıda ürünlerinde doğal bileşenler içeren renk maddelerinin elde edilmesi ve doğada başka kaynaklar kullanılarak yapılacak çalışmalara örnek teşkil etmesi bakımından önemlidir.

KAYNAKLAR

[1] Azeredo, H.M.C., (2009). "Betalains: properties, sources, applications, and stability" – a review. International Journal of Food Science & Technology, 44(12):2365-2376.

[2] Tan, C., Celli, G.B., Selig, M.J., ve Abbaspourrad, A., (2018). "Catechin modulates the copigmentation and encapsulation of anthocyanins in polyelectrolyte complexes (PECs) for natural colorant stabilization". Food Chemistry, 264:342-349.

[3] Arici, M., Karasu, S., Baslar, M., Toker, O.S., Sagdic, O., ve Karaagacli, M., (2016). "Tulip petal as a novel natural food colorant source: Extraction optimization and stability studies". Industrial Crops and Products, 91:215-222.

[4] Galanakis, C.M., (2012). "Recovery of high added-value components from food wastes: Conventional, emerging technologies and commercialized applications". Trends in Food Science & Technology, 26(2):68-87.

5] Khazaei, K.M., Jafari, S.M., Ghorbani, M., Kakhki, A.H., ve Sarfarazi, M., (2016). "Optimization of Anthocyanin Extraction from Saffron Petals with Response Surface Methodology". Food Analytical Methods, 9(7):1993-2001.

[6] Melnyk, J.P., Wang, S., ve Marcone, M.F., (2010). "Chemical and biological properties of the most expensive spice: Saffron". Food Research International, 43(8):1981-1989.

[7] Rios, J.L., Recio, M.C., Giner, R.M., ve Manez, S., (1996)."An update review of saffron and its active constituents". Phytotherapy Research, 10(3):189-193.

[8] Shahi, T., Assadpour, E., ve Jafari, S.M., (2016). "Main chemical compounds and pharmacological activities of stigmas and tepals of 'red gold'; saffron". Trends in Food Science & Technology, 58:69-78.

[9] Bathaie, S. Z., Farajzade, A., ve Hoshyar, R., (2014). "A review of the chemistry and uses of crocins and crocetin, the carotenoid natural dyes in saffron, with particular emphasis on applications as colorants including their use as biological stains". Biotechnic & Histochemistry, 89(6):401-411.

[10] Delgado-Vargas, F., ve Paredes-López, O., (2002). "Natural colorants for food and nutraceutical uses". CRC press. Florida. ISBN 1-58716-076-5.

[11] Assimopoulou, A.N., Sinakos, Z., ve Papageorgiou, V., (2005). "Radical scavenging activity of Crocus sativus L. extract and its bioactive constituents". Phytotherapy Research, 19(11):997-1000.

[12] Sariri, R., Sabbaghzadeh, R. ve Poumohamad, F., (2011). "In-vitro antioxidant and anti-tyrosinase activity of methanol extracts from Crocus sativus flowers". Pharmacologyonline. 2:1205-1215.

[13] Dubey, R., Shami, T. C., ve Bhasker Rao, K. U., (2009). "Microencapsulation Technology and Applications". Defence Science Journal, 59 (1):82-95.

[14] Yamashita, C., Chung, M.M.S., dos Santos, C., Mayer, C.R.M., Moraes, I. C.F., ve Branco, I.G., (2017). "Microencapsulation of an anthocyanin-rich blackberry (Rubus spp.) by-product extract by freeze-drying". LWT, 84:256-262.

[15] Rajabi, H., Ghorbani, M., Jafari, S.M., Mahoonak, A.S., ve Rajabzadeh, G., (2015). "Retention of saffron bioactive components by spray drying encapsulation using maltodextrin, gum Arabic and gelatin as wall materials". Food Hydrocolloids, 51:327-337.

[16] Sigurdson, G.T., Tang, P., ve Giusti, M.M., (2017). "Natural Colorants: Food Colorants from Natural Sources". Annual Review of Food Science and Technology, 8(1):261-280.

[17] Rodrigues S., ve Fernandes F.A.N., (2017). "Extraction Processes Assisted by Ultrasound. Ultrasound: Advances for Food Processing and Preservation". 351-368.

[18] Mason, T. J., Paniwnky, L., ve Lorimer, J. P., (1996). "The uses of ultrasound in food technology". Ultrasonics Sonochemistry, 3:253–260.

[19] Du, Z.Q., Wang, K., Tao, Y., Chen, L.X., ve Qiu, F., (2012). "Purification of baicalin and wogonoside from Scutellaria baicalensis extracts by macroporous resin adsorption chromatography". Journal of Chromatography B, 908:143–149.

[20] Wu Z., Wang W., He F., Li D., Wang D., (2018). "Simultaneous Enrichment and Separation of Four Flavonoids from Zanthoxylum bungeanum Leaves by Ultrasound-Assisted Extraction and Macroporous Resins with Evaluation of Antioxidant Activities". Journal of Food Science, 83 (8):2109-2118.

[21] Taherkhani, T., Asghari Zakaria, R., Omidi, M., ve Zare, N., (2017). "Effect of ultrasonic waves on crocin and safranal content and expression of their controlling genes in suspension culture of saffron (Crocus sativus L.) ". Natural Product rRsearch, 1-8.

[22] Kyriakoudi, A., Chrysanthou, A., Mantzouridou, F., ve Tsimidou, M. Z., (2012). "Revisiting extraction of bioactive apocarotenoids from Crocus sativus L. dry stigmas (saffron) ". Analytica Chimica Acta. 755:77-85.

[23] Sarfarazi, M., Jafari, S. M., ve Rajabzadeh, G., (2015). "Extraction optimization of saffron nutraceuticals through response surface methodology". Food Analytical Methods, 8(9):2273-2285.

[24] Roohani, R., EinAfshar, S., ve Ghavidel, R., (2016). "Effect of time and ultrasonic amplitude on extraction carotenoid compounds from saffron

stamen". Agricultural Engineering International: CIGR Journal, 18(4):171-176.

[25] Kadkhodaee, R., ve Hemmati-Kakhki, A., (2006). "Ultrasonic extraction of active compounds from saffron". In II International Symposium on Saffron Biology and Technology 739:417-425.

[26] Douaik, A., (2016). " Design of experiments for screening and optimizing factors influencing extraction of bioactive compounds from saffron". In V International Symposium on Saffron Biology and Technology: Advances in Biology, Technologies, Uses and Market 1184:151-158.

[27] Cossignani, L., Urbani, E., Simonetti, M. S., Maurizi, A., Chiesi, C., ve Blasi, F., (2014). "Characterisation of secondary metabolites in saffron from central Italy (Cascia, Umbria)". Food Chemistry. 143:446-451.

[28] Kanehira, T., Naruse, A., Fukushima, A., ve Saito, K., (1990). "Decomposition of carthamin in aqueous solutions: influence of temperature, pH, light, buffer systems, external gas phases, metal ions, and certain chemicals". Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung, 190(4):299-305.

[29] Kyriakoudi, A., ve Tsimidou, M. Z., (2018). "Properties of encapsulated saffron extracts in maltodextrin using the Büchi B-90 nano spray-dryer". Food Chemistry, 266:458-465.

[30] Esfanjani, A. F., Jafari, S. M., ve Assadpour, E. (2017). "Preparation of a multiple emulsion based on pectin-whey protein complex for encapsulation of saffron extract nanodroplets".Food Chemistry, 221:1962-1969.

[31] Rahaiee, S., Shojaosadati, S. A., Hashemi, M., Moini, S., ve Razavi, S. H. (2015). "Improvement of crocin stability by biodegradeble nanoparticles of chitosan-alginate". International Journal of Biological Macromolecules, 79:423-432.

[32] Rahaiee, S., Hashemi, M., Shojaosadati, S.A., Moini, S., ve Razavi, S.H., (2017). "Nanoparticles based on crocin loaded chitosan-alginate biopolymers: Antioxidant activities, bioavailability and anticancer properties". International Journal of Biological Macromolecules. 99:401-408.

[33] Ahmad, M., Ashraf, B., Gani, A., ve Gani, A., (2018). "Microencapsulation of saffron anthocyanins using β glucan and β cyclodextrin: Microcapsule characterization, release behaviour & antioxidant potential during in-vitro digestion". International Journal of Biological Macromolecules, 109:435-442.

[34] Selim, K., Tsimidou, M., ve Biliaderis, C. G., (2000). "Kinetic studies of degradation of saffron carotenoids encapsulated in amorphous polymer matrices". Food Chemistry, 71 (2):199-206.

[35] Chranioti, C., Nikoloudaki, A., ve Tzia, C., (2015). "Saffron and beetroot extracts encapsulated in maltodextrin, gum Arabic, modified starch and chitosan: Incorporation in a chewing gum system". Carbohydrate Polymers, 127: 252-263.

[36] Janiszewska-Turak, E., (2017). "Carotenoids microencapsulation by spray drying method and supercritical micronization". Food Research International, 99: 891-901.

[37] Tupuna, D. S., Paese, K., Guterres, S. S., Jablonski, A., Flôres, S. H., ve de Oliveira Rios, A., (2018). "Encapsulation efficiency and thermal stability of norbixin microencapsulated by spray-drying using different combinations of wall materials". Industrial Crops and Products, 111: 846-855.

[38] Carle, R., ve Schweiggert, R. M., (2016). "Handbook on natural pigments in food and beverages: Industrial applications for improving food color". Woodhead Publishing.

[39] Ramesh, M., ve Muthuraman, A., (2018). "Flavoring and coloring agents: Health risks and potential problems". In A. M. Grumezescu, & A. M. Holban (Eds.). Natural and artificial flavoring agents and food dyes (pp. 1–28). Academic Press.

[40] Castañeda-Ovando, A., Pacheco-Hernández, M.de L., Páez-Hernández, M. E., Rodríguez, J.A., ve Galán-Vidal, C.A,. (2009). "Chemical studies of anthocyanins: A review". Food Chemistry, 113(4): 859–871.

[41] Carocho, M., Morales, P., ve Ferreira, I. C. F. R., (2015). "Natural food additives: Quo vadis?" Trends in Food Science & Technology, 45(2):284–295.

[42] Martins, N., Roriz, C. L., Morales, P., Barros, L., ve Ferreira, I. C., (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.

[43] Pinela, J., Prieto, M. A., Pereira, E., Jabeur, I., Barreiro, M. F., Barros, L., ve Ferreira, I. C., (2019). "Optimization of heat-and ultrasound-assisted extraction of anthocyanins from Hibiscus sabdariffa calyces for natural food colorants". Food Chemistry, 275 (1):309-321.

[44] Almeida, H.H.S., Barros, L., Barreira, J.C.M., Calhelha, R.C., Heleno, S.A., Sayer, C., Ferreira, I.C.F.R., (2018). "Bioactive evaluation and application of different formulations of the natural colorant curcumin (E100) in a hydrophilic matrix (yogurt)". Food Chemistry, 261:224–232.

[45] Carocho, M., Barros, L., Barreira, J.C.M., Calhelha, R.C., Soković, M., Fernández-Ruiz, V., Ferreira, I.C.F.R., (2016). "Basil as functional and preserving ingredient in “Serra da Estrela” cheese". Food Chemistry, 207:51-59.

[46] Pinela, J., Prieto, M.A., Barreiro, M.F., Carvalho, A.M., Oliveira, M.B.P.P., Curran, T.P., ve Ferreira, I.C.F.R., (2017). "Valorisation of tomato wastes for development of nutrient-rich antioxidant ingredients: A sustainable approach towards the needs of the today’s society". Innovative Food Science & Emerging Technologies, 41:160–171.

[47] Duraklı-Velioğlu, S., Boyacı, İ. H., Şimşek, O., ve Gümüş, T., (2013). "Optimizing a submerged Monascus cultivation for production of red pigment with bug damaged wheat using artificial neural network"s. Food Science and Biotechnology, 22(6):1639-1648.

[48] Çakmakçı, S., (2007). "Gıda Katkı Maddeleri". Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Ders Notu, No:164, Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Ofset Tesisi, Erzurum, 2007.

[49] Türk Gıda Kodeksi Gıdalarda Kullanılan Renklendiriciler Tebliği (Tebliğ No:2002/ 55). Resmi Gazete: 25.8.2002 – 24857.

[50] Kucharska, M., ve Grabka, J., (2010). "A review of chromatographic methods for determination of synthetic food dyes". Talanta, 80(3):1045-1051.

[51] Ekici, L., (2011). "Üzüm kabuğu, Siyah havuç ve Kırmızı Lahanadan Ekstrakte Edilen Antosiyanin Bazlı Renk Maddelerinin Biyolojik Özelliklerinin Belirlenmesi ve Bazı Gıda maddelerinin Renklendirilmesi". Doktora Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erciyes Üniversitesi, Kayseri, p.249.

[52] Forgacs, E., Cserhati, T., ve Oros, G., (2004). "Removal of synthetic dyes from wastewaters": a review. Environment international, 30(7):953-971.

[53] Food additive. https://www.britannica.com/topic/food-additive#ref502233. Erişim tarihi:03.11.2018.

[54] Bechtold, T. ve Mussak, R. (Eds.). (2009). Handbook of natural colorants, John Wiley & Sons. ISBN:978-0-470-51199-2.

[55] Vollmuth, T. A., (2018). "Caramel color safety–an update". Food and Chemical Toxicology, 111:578-596.

[56] Sengar, G., ve Sharma, H. K., (2014). "Food caramels": a review. Journal of Food Science and Technology, 51(9):1686-1696.

[57] Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği. Gıda Maddelerinde Kullanılan Renklendiricilerin Saflık Kriterleri Tebliği (Tebliğ No: 2002/27). Yayımlandığı Resmi Gazete: 10.04.2002-24722.

[58] Tumolo, T., ve Lanfer-Marquez, U. M., (2012). "Copper chlorophyllin: A food colorant with bioactive properties? " Food Research International, 46(2):451-459.

[59] Bayram Y., ve Sağdıç O., (2017). "Natural Food Colorants". I. Uluslararası Bilimsel ve Mesleki Çalışmalar Kongresi (BILMES). Ürgüp, Nevşehir.

[60] Marcus, F.K., (1991). "Proccesding of The 3rd International Congress on Food Industry (Foda Ed.:Saygın, Güvenç, Üçüncü, Altuğ, Nov. 4-18: 1991, Kuşadası, Türkiye), s.28-49: s.302-312.

[61] Saldamlı, İ., (2007). Gıda Kimyası, Hacettepe Üniversitesi Yayınları, Ankara.

[62] Muhamad, I. I., Jusoh, Y. M., Nawi, N. M., Aziz, A. A., Padzil, A. M., ve Lian, H. L., (2018). "Advanced Natural Food Colorant Encapsulation Methods: Anthocyanin Plant Pigment". In Natural and Artificial Flavoring Agents and Food Dyes. pp. 495-526.

[63] Ioannou, I., Hafsa, I., Hamdi, S., Charbonnel, C., ve Ghoul, M., (2012). "Review of the effects of food processing and formulation on flavonol and anthocyanin behaviour". Journal of Food Engineering, 111(2): 208-217.

[64] Cortez, R., Luna-Vital, D. A., Margulis, D., ve Gonzalez de Mejia, E., (2017). "Natural pigments: stabilization methods of anthocyanins for food applications". Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 16(1):180-198.

[65] Gordillo, B., Sigurdson, G. T., Lao, F., González-Miret, M. L., Heredia, F. J., Giusti, M. M., (2018). "Assessment of the color modulation and stability of

naturally copigmented anthocyanin-grape colorants with different levels of purification". Food Research International, 106:791-799.

[66] Anthocyanın. https://www.extrasynthese.com/anthocyanin.html. Erişim tarihi:20.10.2018.

[67] Grimm, B. (2001). Chlorophyll: Structure and Function. e LS.

[68] Klorofiller. http://www.kimyaevi.org/TR/Genel/. Erişim tarihi:12.10.2018.

[69] Mereddy, R., Chan, A., Fanning, K., Nirmal, N., ve Sultanbawa, Y., (2017). "Betalain rich functional extract with reduced salts and nitrate content from red beetroot (Beta vulgaris L.) using membrane separation technology". Food Chemistry, 215:311-317.

[70] Strack, D., Vogt, T. ve Schliemann, W., (2003). "Recent advances inbetalain research". Phytochemistry, 62:247–269.

[71] Castellar, M.R., Obo´ n, J.M. & Ferna´ ndez-Lo´ pez, J.A., (2006). "The isolation and properties of a concentrated red-purple betacyanin food colourant from Opuntia stricta fruits". Journal of the Science of Food and Agriculture, 86:122–128.

[72] EFSA Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to Food (ANS)., (2015). "Scientific Opinion on the re-evaluation of cochineal, carminic acid, carmines (E 120) as a food additive". EFSA Journal, 13(11):4288.

[73] Karminler ve karminik asit. http://www.food-info.net/tr/e/e120.htm. Erişim tarihi:15.12.2018.

[74] Velioğlu, H.M., Yılmaz, İ., Velioğlu, S.D., (2006). "Gıdalarda Kullanılan Doğal Renklendiricilerden Karmin". Türkiye 9. Gıda Kongresi; 24-26 Mayıs 2006, Bolu 347.

[75] Marczenko, Z., ve Balcerzak, M., (2000). "Separation, preconcentration and spectrophotometry in inorganic analysis". Vol. 10, Elsevier.

[76] Delgado-Vargas, F., ve Paredes-Lopez, O., (2003). "Natural Colorants for Food and Nutraceutical Uses". Vol. 14.

[77] Karminik Asit. http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/jecfa_additives/docs/Monograph1/additive-108-m1.pdf. Erişim tarihi:20.10.2018.

[78] Koşineal (Kırmızı boya), Karmin, Karminik asit (E120). http://forum.gidagundemi.com/kosineal-kirmizi-boya-karmin-karminik-asit-e120-t5711.html. Erişim tarihi:18.11.2018.

[79] Xiao, W., Li, S., Wang, S., ve Ho, C. T., (2017). "Chemistry and bioactivity of Gardenia jasminoides". Journal of food and drug analysis, 25(1):43-61.

[80] Namitha, K. K., ve Negi, P. S., (2010). "Chemistry and biotechnology of carotenoids". Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 50(8):728–760.

[81] Saini, R. K., Nile, S. H., ve Park, S. W., (2015). "Carotenoids from fruits and vegetables: Chemistry, analysis, occurrence, bioavailability and biological activities". Food Research International, 76:735-750.

[82] Saini, R.K., ve Keum, Y.S., (2018). "Carotenoid extraction methods: A review of recent developments". Food Chemistry, 240:90-103.

[83] Özcan, M. ve Akgül, A., (1995). "Gıdalar için doğal renk maddeleri 2", Gıda 20:(4), Ankara, s.365–369,

[84] Rodriguez-Amaya, D. B., (2018). "Update on natural food pigments-A mini-review on carotenoids, anthocyanins, and betalains. Food Research International". DOI: 10.1016/j.foodres.2018.05.028.

[85] Concepcion, M. R., Avalos, J., Bonet, M. L., Boronat, A., Gomez-Gomez, L., Hornero-Mendez, D., ve Ribot, J., (2018). "A global perspective on carotenoids: Metabolism, biotechnology, and benefits for nutrition and health". Progress in lipid research.

[86] Bhosale, P., ve Bernstein, P. S., (2007). "Vertebrate and invertebrate carotenoid-binding proteins". Archives of Biochemistry and Biophysics, 458(2):121-127.

[87] Amorim-Carrilho, K. T., Cepeda, A., Fente, C., ve Regal, P., (2014). "Review of methods for analysis of carotenoids". TrAC Trends in Analytical Chemistry, 56:49-73.

[88] Pérez-Gálvez, A., ve Mínguez-Mosquera, M. I., (2005). "Esterification of xanthophylls and its effect on chemical behavior and bioavailability of carotenoids in the human". Nutrition Research, 25(7):631-640.

[89] Desmarchelier, C., ve Borel, P., (2017). "Overview of carotenoid bioavailability determinants: From dietary factors to host genetic variations". Trends in Food Science & Technology, 69:270-280.

[90] Cazzonelli, C.I., (2011). "Carotenoids in nature: insights from plants and beyond". Funct. Plant Biol. 38:833–847.

[91] Nisar, N., Li, L., Lu, S., Khin, N. C., ve Pogson, B. J., (2015). "Carotenoid metabolism in plants". Molecular Plant, 8(1):68-82.

[92] Takaichi, S., (2014). "General methods for identification of carotenoids". Biotechnology letters, 36(6):1127-1128.

[93] Stephensen, C. B., (2013). "Provitamin A carotenoids and immune function". In Carotenoids and Human Health. pp. 261-270. Humana Press, Totowa, NJ.

[94] Bolhassani, A., Khavari, A., ve Bathaie, S. Z., (2014). "Saffron and natural carotenoids: Biochemical activities and anti-tumor effects". Bochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer, 1845(1):20-30.

[95] Cerón-García, M. C., González-López, C. V., Camacho-Rodríguez, J., López-Rosales, L., García-Camacho, F., ve Molina-Grima, E., (2018). "Maximizing carotenoid extraction from microalgae used as food additives and determined by liquid chromatography (HPLC) ". Food Chemistry, 257:316-324.

[96] Rocchi, R., Mascini, M., Sergi, M., Compagnone, D., Mastrocola, D., ve Pittia, P., (2018). "Crocins pattern in saffron detected by UHPLC-MS/MS as marker of quality, process and traceability". Food Chemistry, 264, 241-249.

[97] Amini, M., Ghoranneviss, M., ve Abdijadid, S., (2017). "Effect of cold plasma on crocin esters and volatile compounds of saffron". Food Chemistry, 235:290-293.

[98] Moras, B., Loffredo, L., ve Rey, S., (2018). "Quality assessment of saffron (Crocus sativus L.) extracts via UHPLC-DAD-MS analysis and detection of

adulteration using gardenia fruit extract (Gardenia jasminoides Ellis) ". Food chemistry, 257:325-332.

[99] Kiani, S., ve Minaei, S., (2016). "Potential application of machine vision technology to saffron (Crocus sativus L.) quality characterization". Food chemistry, 212:392-394.

[100] Khilare, V., Tiknaik, A., Prakash, B., Ughade, B., Korhale, G., Nalage, D., ve Khedkar, G., (2019). "Multiple tests on saffron find new adulterant materials and reveal that Ist grade saffron is rare in the market". Food Chemistry, 272:635-642.

[101] Vahedi, M., Kabiri, M., Salami, S. A., Rezadoost, H., Mirzaie, M., ve Kanani, M. R., (2018). "Quantitative HPLC-based metabolomics of some Iranian saffron (Crocus sativus L.) accessions". Industrial Crops and Products, 118:26-29.

[102] Safran bitkisi. http://www.tarimsalfikirler.com/2013/07/safran-yetistiriciliği-oldukca-karl.html. Erişim tarihi:17.09.2018.

[103] Baytop, T., (1984). "Türkiye'de Bitkiler ile Tedavi (Geçmişte ve Bugün) ". İstanbul.

[104] Masi, E., Taiti, C., Heimler, D., Vignolini, P., Romani, A., ve Mancuso, S., (2016). "PTR-TOF-MS and HPLC analysis in the characterization of saffron (Crocus sativus L.) from Italy and Iran". Food Chemistry, 192:75-81.

[105] Bathaie, S. Z., ve Mousavi, S. Z., (2010). "New applications and mechanisms of action of saffron and its important ingredients". Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 50(8): 761-786.

[106] Gismondi, A., Serio, M., Canuti, L., ve Canini, A., (2012). "Biochemical, antioxidant and antineoplastic properties of Italian saffron (Crocus sativus L.) ". American Journal of Plant Sciences, 3(11):1573.

[107] Bukhari, S. I., Manzoor, M., ve Dhar, M.K., (2018). "A comprehensive review of the pharmacological potential of Crocus sativus and its bioactive apocarotenoids". Biomedicine & Pharmacotherapy, 98:733-745.

[108] Amanpour, A., Sonmezdag, A. S., Kelebek, H., ve Selli, S., (2015). "GC–MS–olfactometric characterization of the most aroma-active components in a representative aromatic extract from Iranian saffron (Crocus sativus L.) ". Food Chemistry, 182:251-256.

[109] Alonso, G. L., Salınas, M. R., Garıjo, J., ve Sánchez-Fernández, M.A., (2001). "Composition of crocins and picrocrocin from Spanish saffron (Crocus sativus L.) ". Journal of Food Quality, 24(3): 219-233.

[110] Alavizadeh, S. H., ve Hosseinzadeh, H., (2014). "Bioactivity assessment and toxicity of crocin": a comprehensive review. Food and Chemical Toxicology, *64*:65-80.

[111] Bononi, M., Milella, P., ve Tateo, F., (2015). "Gas chromatography of safranal as preferable method for the commercial grading of saffron (Crocus sativus L.) ". Food Chemistry, 176:17-21.

[112] Srivastava, R., Ahmed, H., ve Dixit, R. K., (2010). "Crocus sativus L. ": a comprehensive review. Pharmacognosy reviews, 4(8):200.

[113] Samarghandian, S., Shoshtari, M.E., Sargolzaei, J., Hossinimoghadam, H., Farahzad J.A., (2014). "Anti-tumor activity of safranal against neuroblastoma cells". Pharmacognosy Magazine, 10:419-S424.

[114] Bathaie, S. Z., Miri, H., Mohagheghi, M. A., Mokhtari-Dizaji, M., Shahbazfar, A. A., ve Hasanzadeh, H., (2013). "Saffron aqueous extract inhibits the chemically-induced gastric cancer progression in the Wistar albino rat". Iranian Journal of Basic Medical Sciences, 16(1):27.

[115] Mousavi, S. H., Tavakkol Afsharic, J., ve Brook, A., (2008). "Study of cytotoxic effects of saffron in MCF-7 cells". Iranian Journal of Pharmaceutical Sciences, 4(4):261-268.

[116] Arihan, O., Oto, G., Bayram, I., ve Aras, I., (2016). "Effect of safran, safranal and crocin which are active ingredients of Saffron (Crocus) on erythrocyte fragility and hematological parameters in carbon tetrachloride intoxicated rats". Eastern Journal Of Medicine, 21(4):173.

[117] Abe, K., ve Saito, H., (2000). "Effects of saffron extract and its constituent crocin on learning behaviour and long-term potentiation". Phytotherapy Research, 14(3):149-152.

[118] Awad, T. S., Moharram, H. A., Shaltout, O. E., Asker, D., ve Youssef, M. M., (2012). "Applications of ultrasound in analysis, processing and quality control of food": A review. Food Research International, 48(2):410-427.

[119] Amirante, R., Distaso, E., Tamburrano, P., Paduano, A., Pettinicchio, D., ve Clodoveo, M. L., (2017). "Acoustic cavitation by means ultrasounds in the extra virgin olive oil extraction process". Energy Procedia, 126:82-90.

[120] Wei, M., ve Yang, L., (2017). "Determination of orientin in Trollius chinensis using ultrasound-assisted extraction and high performance liquid chromatography: Several often-overlooked sample preparation parameters in an ultrasonic bath". Journal of Chromatography A, 1530:68-79.

[121] Knorr, D., Froehling, A., Jaeger, H., Reineke, K., Schlueter, O., ve Schoessler, K., (2011). "Emerging technologies in food processing". Annual Review of Food Science and Technology, 2:203-235.

[122] Chatel, G., (2018). "How sonochemistry contributes to green chemistry" Ultrasonics Sonochemistry, 40:117-122.

[123] Baysal T ve İçier F., (2012). "Gıda Mühendisliğinde ısıl olmayan teknolojiler". ISBN:978-605-133-330-4. İzmir.

[124] Charoux, C. M., O'Donnell, C. P., ve Tiwari, B. K., (2017). "Ultrasound Processing and Food Quality". In Ultrasound: Advances for Food Processing and Preservation. pp. 215-235.

[125] Oluseyi, T., Olayinka, K., Alo, B., ve Smith, R. M., (2011). "Comparison of extraction and clean-up techniques for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in contaminated soil samples". African Journal of Environmental Science and Technology, 5(7):482-493.

[126] Jyothi, N. V. N., Prasanna, P. M., Sakarkar, S. N., Prabha, K. S., Ramaiah, P. S., ve Srawan, G. Y., (2010). "Microencapsulation techniques, factors influencing encapsulation efficiency". Journal of Microencapsulation, 27(3):187-197.

[127] Bayram Y., Özkan K., Sağdıç O., (2018). "Doğal Gıda Boyaları Üretiminde Mikroenkapsülasyon Uygulamaları". 2nd International Conference on Agriculture, Forest, Food Sciences and Technologies (ICAFOF 2018). Çeşme-İzmir.

[128] Mahdavi, S. A., Jafari, S. M., Assadpoor, E., ve Dehnad, D., (2016). "Microencapsulation optimization of natural anthocyanins with maltodextrin, gum Arabic and gelatin". International Journal of Biological Macromolecules, 85:379-385.

[129] Umer, H., Nigam, H., Tamboli, A. M., ve Nainar, M. S. M., (2011). "Microencapsulation: Process, techniques and applications". International journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences, 2(2):474-481.

[130] Dedetaş, N., (2016). "Sporopollenin Ekzin Kapsül İle Balık Yağı Enkapsülasyonuna Ultrases Teknolojisinin Etkisinin İncelenmesi". Doktora Tezi, İstanbul Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.

[131] Burgain, J., Gaiani, C., Linder, M., ve Scher, J., (2011). "Encapsulation of probiotic living cells: From laboratory scale to industrial applications". Journal of Food Engineering, 104 (4): 467-483.

[132] İçyer, N.C., 2012. "Nar Kabuğu Fenolik Bileşiklerinin Su İle Ekstraksiyonu ve Ekstraktların Mikroenkapsülasyonu". p.110, Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erciyes Üniversitesi, Kayseri,.

[133] Quintanilla-Carvajal, M. X., Camacho-Diaz, B. H., Meraz-Torres, L. S., Chanona-Perez, J. J. ve Alamilla-Beltran, L., (2010). “Nanoencapsulation: A New Trend in Food Engineering Processing”, Food Engineering Review,2:39-50.

[134] Zuidam, N. ve Shimoni, E., (2010). “Overview of Microencapsulates for Use in Food Products or Processes and Methods to Make them”, In: Zuidam, N.J., Nedovic, V. (Eds.), Encapsulation Technologies for Active Food Ingredients and Food Processing. Springer, New York, pp. 329.

[135] Özcan, T., ve Altun, B., (2013). "Süt Ürünlerinde Probiyotik Bakterilerin Mikroenkapsülasyonu I: Enkapsülasyon Teknikleri". Uludağ Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Dergisi, 27 (2):93-104.

[136] Kaderides, K., Goula, A. M., ve Adamopoulos, K. G., (2015). A process for turning pomegranate peels into a valuable food ingredient using ultrasound-assisted extraction and encapsulation. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 31:204-215.

[137] Gazeran, S., Tajalli, F., ve Mohamadi Sani, A., (2016). "Effect of Ultrasonic Extraction on Qualitative Parameters of Saffron Edible Extract". Journal of Essential Oil Bearing Plants, 19 (5):1286-1291.

[138] Cemeroglu, B., (2007). Gıda Analizler. Gıda Teknolojisi Dernegi Yayınları, Yayın No: 34, Ankara, 535 s.

[139] Singleton, V. L., Orthofer, R., ve Lamuela-Raventós, R. M., (1999). "Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent". In Methods in Enzymology. 299:152-178. Academic press.

[140] Zhishen, J., Mengcheng, T., ve Jianming, W., (1999). "The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals". Food Chemistry, 64(4):555-559.

[141] Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., ve Karademir, S. E., (2004). "Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method". Journal of Agricultural and Food Chemistry, 52(26):7970-7981.

[142] Bakker, J., Bridle, P. ve Timberlake, C. F., (1986). "Tristimulus measurements (CIELAB 76) of port wine colour". Vitis, 25:67-78.

[143] Tong, Y., Jiang, Y., Guo, D., Yan, Y., Jiang, S., Lu, Y., Wang, P., (2018). "Homogenate Extraction of Crocins from Saffron Optimized by Response Surface Methodology". Journal of Chemistry, Article ID 9649062, 6, 6.

[144] Moomand, K., ve Lim, L. T., (2014). "Oxidative stability of encapsulated fish oil in electrospun zein fibres". Food Research İnternational, 62:523-532.

[145] D'Auria, M., Mauriello, G., Racioppi, R., ve Rana, G. L., (2006). "Use of SPME-GC-MS in the study of time evolution of the constituents of saffron aroma: modifications of the composition during storage". Journal of Chromatographic Science, 44(1):18-21.

[146] Wang, W. D., ve Xu, S.Y., (2007). "Degradation kinetics of anthocyanins in blackberry juice and concentrate". Journal of Food Engineering, 82(3):271-275.

[147] Kyriakoudi, A., ve Tsimidou, M. Z., (2015). "A Food-Grade Approach to Isolate Crocetin from Saffron (Crocus sativus L.) Extracts". journal article. Food Analytical Methods, 8(9):2261-2272.

[148] Azarabadi, N., (2011). "Farklı Kalitedeki İran Safranının Renk ve Aroma Bileşenlerinin Belirlenmesi". Yüksek Lisans Tezi. Akdeniz Üniversitesi. Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı. Antalya

[149] Montalvo-Hernández, B., Rito-Palomares, M., ve Benavides, J., (2012). "Recovery of crocins from saffron stigmas (Crocus sativus) in aqueous two-phase systems". Journal of Chromatography A, 1236:7-15.

[150] Makhlouf, H., Saksouk, M., Habib, J., ve Chahine, R., (2011). "Determination of antioxidant activity of saffron taken from the flower of Crocus sativus grown in Lebanon". African Journal of Biotechnology, 10(41):8093-8100.

[151] Amin, A., Hamza, A. A., Bajbouj, K., Ashraf, S. S., ve Daoud, S. (2011). "Saffron: a potential candidate for a novel anticancer drug against hepatocellular carcinoma". Hepatology, 54(3):857-867.

[152] Tekeli Y., Danahaliloğlu H., Yakar Y., Bucak S., Sarıhan E.Ö., (2014). "Yayladağı ve Safranbolu'da Yetişen Safran Bitkisinin (Crocus sativus L.) Antioksidan Özellikleri". MKÜ Ziraat Fak. Dergisi, 19(1):11-18.

[153] Karimi, E., Oskoueian, E., Hendra, R., ve Jaafar, H. Z., (2010). "Evaluation of Crocus sativus L. stigma phenolic and flavonoid compounds and its antioxidant activity". Molecules, 15(9):6244-6256.

[154] Baba, S. A., Malik, A. H., Wani, Z. A., Mohiuddin, T., Shah, Z., Abbas, N., ve Ashraf, N., (2015). " Phytochemical analysis and antioxidant activity of different tissue types of Crocus sativus and oxidative stress alleviating potential of saffron extract in plants, bacteria, and yeast". South African Journal of Botany, 99:80-87.

[155] Carmona, M., Sánchez, A. M., Ferreres, F., Zalacain, A., Tomás-Barberán, F., ve Alonso, G. L., (2007). "Identification of the flavonoid fraction in saffron spice by LC/DAD/MS/MS: Comparative study of samples from different geographical origins". Food Chemistry, 100(2):445-450.

[156] Samarghandian, S., Azimi-Nezhad, M., ve Farkhondeh, T., (2017). "Immunomodulatory and antioxidant effects of saffron aqueous extract (Crocus sativus L.) on streptozotocin-induced diabetes in rats". Indian Heart Journal, 69(2):151-159.

[157] Anuar, N., Taha, R. M., Mahmad, N., Mohajer, S., Che Musa, S. A. N. I., ve Zainal Abidin, Z. H., (2017). "Correlation of colour, antioxidant capacity and phytochemical diversity of imported saffron by principal components analysis". Pigment & Resin Technology, 46(2):107-114.

[158] Pellegrini, N., Serafini, M., Salvatore, S., Del Rio, D., Bianchi, M., ve Brighenti, F., (2006). "Total antioxidant capacity of spices, dried fruits, nuts, pulses, cereals and sweets consumed in Italy assessed by three different in vitro assays". Molecular Nutrition & Food Research, 50(11):1030-1038.

[159] Mahdavee Khazaei, K., Jafari, S. M., Ghorbani, M., ve Hemmati Kakhki, A., (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.

[160] Otálora, M. C., Carriazo, J. G., Iturriaga, L., Nazareno, M. A., ve Osorio, C. (2015). "Microencapsulation of betalains obtained from cactus fruit (Opuntia ficus-indica) by spray drying using cactus cladode mucilage and maltodextrin as encapsulating agents". Food Chemistry, 187:174-181.

[161] Koç, M., Sakin, M., ve Ertekin, F. K., (2010). "Mikroenkapsülasyon ve gıda teknolojisinde kullanımı". Pamukkale Üniversitesi Mühendislik Bilimleri Dergisi, 16(1):77-86.

[162] Atefi, M., Nayebzadeh, K., Mohammadi, A., ve Mortazavian, A. M., (2017). "Using ß-cyclodextrin and Arabic gum as wall materials for encapsulation of Saffron essential oil". Iranian journal of pharmaceutical research: IJPR, 16(1):93.

[163] Kosar, M., Demirci, B., Goger, F., Kara, I., ve Baser, K. H. C., (2017). "Volatile composition, antioxidant activity, and antioxidant components in saffron cultivated in Turkey". International Journal of Food Properties, 20(sup1), S746-S754.

[164] Maggi, L., Carmona, M., Zalacain, A., Kanakis, C. D., Anastasaki, E., Tarantilis, P. A., Alonso, G. L., (2010). "Changes in saffron volatile profile according to its storage time". Food Research International, 43(5):1329-1334.

[165] Silvis, I. C. J., Luning, P. A., Klose, N., Jansen, M., ve Van Ruth, S. M., (2019). "Similarities and differences of the volatile profiles of six spices

explored by Proton Transfer Reaction Mass Spectrometry". Food Chemistry, 271:318-327.

[166] Nenadis, N., Heenan, S., Tsimidou, M. Z., ve Van Ruth, S., (2016). "Applicability of PTR-MS in the quality control of saffron". Food Chemistry, 196:961-967.

[167] Urbani, E., Blasi, F., Chiesi, C., Maurizi, A., ve Cossignani, L., (2015). "Characterization of volatile fraction of saffron from central Italy (Cascia, Umbria) ". International Journal of Food Properties, 18(10):2223-2230.

[168] Tsimidou, M., ve Tsatsaroni, E., (1993). "Stability of Saffron Pigments in Aqueous Extracts" (Vol.58).

[169] Sánchez, A. M., Carmona, M., A. Ordoudi, S., Z. Tsimidou, M., ve Alonso, G. L., (2008). "Kinetics of Individual Crocetin Ester Degradation in Aqueous Extracts of Saffron (Crocus sativus L.) upon Thermal Treatment in the Dark". Journal of Agricultural and Food Chemistry, 56(5):1627-1637.

[170] Chen, B. H., Peng, H. Y., ve Chen, H. E., (1995). "Changes of carotenoids, color, and vitamin A contents during processing of carrot juice". Journal of Agricultural and Food Chemistry, 43(7):1912-1918.

[171] Li B.B., Smith B., Hossain M., (2006). "Extraction of phenolics from citrus peels I. Solvent extraction method". Separation and Purification Technology, 48:182-188.

[172] Ballesteros, L. F., Ramirez, M. J., Orrego, C. E., Teixeira, J. A., ve Mussatto, S. I., (2017). "Encapsulation of antioxidant phenolic compounds extracted from spent coffee grounds by freeze-drying and spray-drying using different coating materials". Food Chemistry, 237: 623-631.

[173] Zhang, Y., Yang, Y., Tang, K., Hu, X., ve Zou, G., (2008). "Physicochemical characterization and antioxidant activity of quercetin-loaded chitosan nanoparticles". Journal of Applied Polymer Science, 107(2):891-897.

[174] Lee, J. S., Kim, G. H., ve Lee, H. G., (2010). "Characteristics and antioxidant activity of Elsholtzia splendens extract-loaded nanoparticles". Journal of Agricultural and Food Chemistry, 58(6):3316-3321.

[175] Yaşar, M., (2008). "Nar suyuna farklı oranlarda maltodekstrin eklenerek püskürtmeli kurutucu ile nar suyu tozu elde edilmesi üzerine bir çalışma", Harran Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi, Gıda Mühendisligi Anabilim Dalı, Şanlıurfa.

[176] Wrostald, R.E., (1976). "Color and pigment analyses in fruit products. Agric. Exp. Stn., Corvallis, Oregon State University, Station Bulletin 624, 17 p.

[177] Aizpurua-Olaizola, O., Navarro, P., Vallejo, A., Olivares, M., Etxebarria, N., ve Usobiaga, A., (2016). "Microencapsulation and storage stability of polyphenols from Vitis vinifera grape wastes". Food Chemistry, 190:614-621.

[178] Davidov-Pardo, G., Arozarena, I., ve Marín-Arroyo, M. R., (2013). "Optimization of a wall material formulation to microencapsulate a grape seed extract using a mixture design of experiments". Food and Bioprocess Technology, 6(4):941-951.

[179] Almodóvar, P., Prodanov, M., Arruñada, O., ve Inarejos-García, A. M., (2018). "Saffron eye, a natural extract of saffron (Crocus sativus L.) with colorant properties as novel replacer of saffron stigmas in culinary and food applications". International Journal of Gastronomy and Food Science, 12:1-5.

EK-A

DUYUSAL ANALİZ FORMU

DUYUSAL ANALİZ FORMU					
	ÖRNEK KODU				
	ES	**ÜS**	**BS**	**OES**	**OS**
Renk					
Koku					
Tat					
Lezzet					
Aroma					
Genel Beğeni					
	1: Hiç beğenmedim **2:** Az beğendim **3:** Orta derecede beğendim **4:** Beğendim **5**: Çok beğendim Bunlardan en beğendiğiniz içeceğin üretimi yapılıp, piyasaya sunulsa satın alır mısınız? o Evet o Hayır o Kararsızım				

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı :Yüksel BAYRAM

Doğum Tarihi ve Yeri :01.02.1973, Kütahya

Yabancı Dili :İngilizce

E-posta :ybayram@pau.edu.tr

ÖĞRENİM DURUMU

Derece	**Alan**	**Okul/Üniversite**	**Mezuniyet Yılı**
Y. Lisans	Gıda Mühendisliği	Namık Kemal Üniversitesi	2012
Lisans	Gıda Mühendisliği	Namık Kemal Üniversitesi	2010
Lisans	Kimya Bölümü	Yıldız Teknik Üniversitesi	1997
Lise	Fen Bölümü	Pertevniyal Lisesi	1990

İŞ TECRÜBESİ

Yıl	**Firma/Kurum**	**Görevi**
2013 – Devam Ediyor	Pamukkale Üniversitesi/Çal Meslek Yüksekokulu	Öğretim Görevlisi
2012-2013	Milli Eğitim Bakanlığı, İstanbul	Matematik Öğretmeni

Yıl	Firma/Kurum	Görevi
1999–2000	Bil Dersanesi, İstanbul	Kimya Öğretmeni
1998–1999	Birikim Dersanesi, İstanbul	Kimya Öğretmeni
1997-1998	Erdem Dersanesi, İstanbul	Stajyer Öğretmen

YAYINLARI

MAKALELER

1. Karasu S., Bayram Y., Özkan K., Sağdiç O., "Extraction optimization crocin pigments of saffron (Crocus sativus) using response surface methodology and determination stability of crocin microcapsules", JOURNAL OF FOOD MEASUREMENT AND CHARACTERIZATION, no.0067, pp.1-9, 2019. DOI: 10.1007/s11694-019-00067-x.

BİLDİRİLER

1. Bayram Yüksel, Torlak Yasemin (2019). Üvez (Sorbus Aucuparia L.) Meyvesinin Biyoaktif Özelliklerinin Belirlenmesi. 4. Uluslararası Anadolu Tarım, Gıda, Çevre ve Biyoloji Kongresi. Afyonkarahisar.
2. Bayram Yüksel, Özkan Kübra, Karasu Salih, Sağdıç Osman (2018). Safrandan Renk Pigmentlerinin Ultrason Destekli Ekstraksiyonunun Optimizasyonu ve Elde Edilen Ekstraktların Biyoaktif Bileşenlerinin Belirlenmesi. 2nd International Conference on Agriculture, Forest, Food Sciences and Technologies (ICAFOF 2018). Çeşme-İzmir.
3. Bayram Yüksel, Özkan Kübra, Sağdıç Osman (2018). Doğal Gıda Boyaları Üretiminde Mikroenkapsülasyon Uygulamaları. 2nd International Conference on Agriculture, Forest, Food Sciences and Technologies (ICAFOF 2018). Çeşme-İzmir.
4. Bayram, Y., Özkan, K., Karasu, S., Sağdıç, O. (2018). The Importance of Rheological Propertıes in Encapsulation Applications. The International Symposiumon Food Rheology and Texture, İstanbul.
5. Bayram, Y., Sağdıç, O. (2017). Natural Food Colorants. I. Uluslararası Bilimsel ve Mesleki Çalışmalar Kongresi (BILMES 2017). Ürgüp, Nevşehir.
6. Sağdıç, O., Bayram, Y. (2017). Production of Food Coloring from Saffron and Safflower. I. Uluslararası Tıbbi ve Aromatik Bitkiler Kongresi. Konya.
7. Bayram, Y., Özkan, K., Sağdıç, O. (2017). Bioactive Compounds and Microbiological Effect of Vinegar from Persimmon (Diospyros kaki) Peels. I. Uluslararası Bilimsel ve Mesleki Çalışmalar Kongresi (BILMES 2017). Ürgüp, Nevşehir.
8. Bayram, Y., Elgin Karabacak, Ç. (2018). Karabaş Otu (Lavandula stoechas) ve Sağlık Üzerine Etkileri. Uluslararası Tarım, Çevre ve Sağlık Kongresi. Aydın.

9. Bayram, Y., Çulha Enes, F., Atli Atahan, C. (2018). Emülsifiye Et Ürünlerinde Gıda Güvenliği. Uluslararası Tarım, Çevre ve Sağlık Kongresi. Aydın.
10. Bayram, Y.,, Elgin Karabacak, Ç.,, Çulha, E.F. (2018). Fermente Gıdaların Sağlık Üzerine Etkileri. 1st International Health Science and Life Congress (Ihslc 2018). Burdur.
11. Bayram, Y., Elgin Karabacak, Ç. (2018). Boza. 1st International Health Science and Life Congress (Ihslc 2018). Burdur.
12. Elgin Karabacak, Ç., Bayram, Y., Karabacak, H. (2018). Organik Tarım Ürünleri ve Sağlıklı Beslenme. 1st International Health Science and Life Congress (Ihslc 2018). Burdur.
13. Elgin Karabacak, Ç.,, Bayram, Y. (2018). Kefir ve Kefir Tarhanası. 1st International Health Scıence and Life Congress (Ihslc 2018). Burdur.
14. Elgin Karabacak, Ç., Bayram, Y. (2017). Kekik Uçucu Yağı ve Farklı Kullanım Alanları. I. Uluslararası Bilimsel ve Mesleki Çalışmalar Kongresi (BILMES 2017). Ürgüp, Nevşehir.
15. Bayram, Y., Çulha, E.F. (2017). Zeytinyağındaki Biyoaktif Bileşen: Skualen. Yabited III. Bitkisel Yağ Kongresi, 1, 85-85. (Yayın No:3463918). İzmir.
16. Bayram, Y., Elgin Karabacak, Ç. (2017). Çörekotunun Yağ Asitleri Bileşimi ve Sağlık Üzerine Etkileri. Yabited III. Bitkisel Yağ Kongresi, 1, 82-82. (Yayın No:3463836). İzmir.
17. Elgin Karabacak, Ç.,, Bayram, Y., Karabacak, H. (2016). Organik Çay Üretim ve İşlenmesi. Organik Tarım Sempozyumu. Kayseri.
18. Bayram, Y., Özakça, S., Kaptan, B., Uçak, G. (2015). Susam Yağının Besleyici ve Fonksiyonel Özellikleri. II. Bitkisel Yağ Kongresi, 1, 160-160., (Yayın No:1520107). Tekirdağ.
19. Bayram, Y., Özakça, S. (2015). Karadut Kurusu. Pamukkale Gıda Sempozyumu III, 1, 101-101., (Yayın No:1520123). Denizli.
20. Bayram, Y, Özakça, S.,, Elgin Karabacak, Ç., Davulcu Tümer,, Tümer, E., Karabacak, H. (2015). Kurutulmuş Yoğurt: Kurut. Pamukkale Gıda Sempozyumu III, 1, 99-100., (Yayın No:1520120). Denizli.
21. Özakça, S., Başar, Ş., Bayram, Y, Yurdunuseven, A. (2015). Kurutulmuş Bir Kurutulmuş Bir Gıda: Kokoç. Pamukkale Gıda Sempozyumu III, 1, 274-275., (Yayın No:1520127). Denizli.
22. Özakça, S., Yurdunuseven, A., Bayram, Y. (2015). Kurutulmuş Sumak ve Sağlık Üzerine Etkileri. Pamukkale Gıda Sempozyumu III, 1, 262-263., (Yayın No:1520131). Denizli.
23. Elgin Karabacak, Ç., Bayram Y., Davulcu Tümer, B., Tümer E., Karabacak, H. (2014). Yediveren Üzüm Çeşidinden Elde Edilen Koruk Suyu ve Ekşisinin Geleneksel Yöntemle Yapımı, Muhafaza ve Tüketim Şekilleri. 4. Geleneksel Gıdalar Sempozyumu, 1, 376-379. Adana.
24. Elgin Karabacak, Ç., Davulcu Tümer, B., Bayram, Y., Tümer, E., Karabacak, H. (2014). Psıhalıve – Haluj. 4. Geleneksel Gıdalar Sempozyumu, 1, 380-380. Adana.