

SİYAH HAVUÇ POSASINDAN ANTOSİYANİNLERİN EKSTRAKSİYONUNA FARKLI ÇÖZGEN ve ASİT KONSANTRASYONLARININ ETKİLERİ

Erdal Ağçam*, Asiye Akyıldız

Çukurova Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Adana

Geliş tarihi / Received: 07.11.2014

Düzeltilerek Geliş tarihi / Received in revised form: 21.01.2015

Kabul tarihi / Accepted: 28.01.2015

Özet

Bu çalışma ile ülkemizde yetiştiriciliği yapılan ve meyve-sebze suyu işleme sanayimizde yoğun işlenen siyah havucun artan posasından, antosiyaninlerin farklı asit konsantrasyonlarındaki çözgenlerle geri kazanım düzeyleri belirlenmiştir. Farklı ekstraktlardan elde edilen bulgulara göre siyah havuç posasının toplam monomerik antosiyanin miktarları 656.2-1191.9 mg/kg arasında değiştiği belirlenmiştir. Siyah havuç posasından antosiyaninlerin ekstraksiyonunda en etkili çözücü asitlendirilmiş metanol (MeOH) iken; bunu asitlendirilmiş etanol (EtOH) ve saf su takip etmiştir. Çözgenlerin asitlik düzeyinin antosiyanin geri kazanımı üzerine önemli düzeyde etki ettiği tespit edilmiştir. HPLC sonuçlarına göre antosiyanin bileşenlerden siyanidin-3-ksilozil-glukozil-galaktozit-ferulik asidin (298.3-398.8 mg/kg) ve siyanidin-3-ksilozil-galaktozidin (217.7-330.4 mg/kg) siyah havuç posasında en baskın oldukları belirlenmiştir.

Anahtar kelimeler: Siyah havuç posası, ekstraksiyon, monomerik antosiyanin, antosiyanin bileşenleri

EFFECTS of DIFFERENT SOLVENTS and ACID CONSANTRATIONS on EXTRACTION of ANTHOCYANINS from BLACK CARROT POMACE

Abstract

In this study, effects of different solvents and acid concentrations on extraction of anthocyanins from black carrot pomace obtained after processing in fruit-vegetable juicing industry were investigated. According to results from different extraction processes, total monomeric contents of black carrot pomace ranged between 656.2-1191.9 mg/kg. The best solvent for anthocyanins extraction from black carrot pomace was determined as acidified methanol (MeOH); it was followed by acidified ethanol (EtOH) and pure water. Acidity levels of the solvents significantly affected recovery of anthocyanins from black carrot pomace. Based on HPLC results, the most abundant anthocyanins were cyanidin-3-xyloside-galactoside-glucoside-ferulic acid (298.3-398.8 mg/kg) and cyanidin-3-xyloside-galactoside (217.7-330.4 mg/kg) in the black carrot pomace.

Keywords: Black carrot pomace, extraction, monomeric anthocyanin compounds.

*Yazışmalardan sorumlu yazar / Corresponding author;

✉ eagcam@cu.edu.tr,

☎ (+90) 322 338 6084,

☎ (+90) 322 338 6614

GİRİŞ

Apiaceae (Eski adı *Umbelliferae*) familyasından (1) iki yıllık bir bitki olan havucun bilimsel adı *Daucus carota*'dır (2, 3) ve binlerce yıldan beri yetiştirilmektedir. Havuç, kökü sebze olarak kullanılan en önemli köksü sebze bitkilerinden biridir (4, 5). Botanik sınıflandırmaya göre havuç iki gruba ayrılmaktadır. Türkiye, Afganistan, Mısır, Pakistan ve Hindistanda geleneksel olarak yetiştirilen antosiyanin (doğuya ait) grup (*Daucus carota* ssp. *sativus* var. *atorubens* Alef.) ve dünya genelinde yetiştirilen karoten (batıya ait) grup (*Daucus carota* ssp. *sativus* var. *sativus*)'tur. Antosiyanin grubuna ait havuçlar mor antosiyanin pigmentlerine sahiptir (3, 4, 6, 7). Sıcak iklim ürünü olan siyah havuç, Türkiye'nin bazı bölgelerinde yıl boyunca yetiştirilmektedir (8). Türkiye'nin en önemli üretim bölgesi İç Anadolu bölgesidir. Ereğli ilçesi (Konya) bu bölge genelinde en önemli üretim yeridir (9). Günümüzde doğal gıda renklendiricilerine talep artışı nedeniyle her geçen gün siyah havuç üretimi artmaktadır (4, 5).

Dünya genelinde en büyük havuç ve şalgam (birlikte verilmiştir) üreticisi 2011 yılında 16.22 milyon ton ile Çin'dir. Bunu Rusya (1.74 milyon ton), Amerika Birleşik Devletleri (1.30 milyon ton), Özbekistan (1.22 milyon ton) ve Polonya (887 bin ton) izlemektedir. Türkiye 2002 yılında (235 bin ton) dünya'da 19. sırada iken 2005 yılında üretimini 390.3 bin tona çıkararak 11. sıraya ve 2008 yılında 591.538 ton ile 9. sıraya yükselmiş ve son olarak 2011 yılında da 602.078 ton ile tekrar 11. sırada yer almıştır (10). Turuncu ve siyah havuç olmak üzere iki türü olan bu havuçların büyük bir kısmını turuncu havuç oluşturmaktadır.

Ülkemizin Konya Ereğli Bölgesinde yoğun yetiştiriciliği yapılmakta olan siyah havuç yapısında barındırmış olduğu önemli düzeydeki antosiyanin bileşenler, vitaminler, mineraller ve lif içeriği ile meyve-sebze suyu işleme sektörünün dikkatini çekmiştir. Siyah havucun adeta bir antosiyanin deposu olmasından ötürü işlenmesi ile elde edilen suyun doğrudan tüketilmesinin yanı sıra, gıda sektöründe doğal renk maddesi olarak kullanılmasına neden olmaktadır. Siyah havuç suyu ve konsantresi süt, dondurma, reçel-marmelat, pasta, meyve-sebze suyu, alkollü içkiler, konserve vb gıda işleme kollarında doğal renklendirici olarak kullanılmaktadır. Bu özelliklerinden ötürü havuç suyu ve konsantresi dünya genelinde giderek artan bir trendle talep edilmekte ve ülkemiz adına

artı değeri yüksek olan bu talebi karşılamak için meyve-sebze işleme sektörü yoğun bir tempoda çalışmaktadır. Siyah havuç suyu ve konsantresinin uluslararası ticaretinde en önemli faktör antosiyanin içeriğidir. Bu nedenle siyah havucun işlenmesi sırasında temel parametre antosiyaninlerin en yüksek düzeyde ekstraksiyonudur. Sektörün sahip olduğu mevcut teknolojik koşullarla gerçekleştirilen ekstraksiyonda havuç suyu posasında oldukça önemli düzeyde antosiyanin kalmaktadır. Siyah havuç suyu ve konsantresinin ticaretinde varlığı önemli bir unsur olan antosiyaninlerin posada kalması bu ürünlerin daha düşük bir bedelle satılmasına neden olmaktadır. Bu nedenle siyah havuçtan antosiyaninlerin ekstraksiyonunun optimizasyonu ve alternatif teknolojilerin etkinliğinin araştırılması gerekmektedir.

İnsan nüfusunun artmasına paralel olarak daha fazla doğal kaynak ihtiyacı doğarken bir taraftan da yüksek miktarlarda artık üretilmektedir. Yeni teknolojilerin gelişmesi ile birlikte bu artıkların geri dönüşümü daha mümkün hale gelmiştir (11, 12). Bu artıkların yapısında taşıdıkları bileşenlerden ötürü antibakteriyel, antiviral, antioksidan, anti-inflamatuar ve antikansorejen özellikler taşıdığı rapor edilmektedir (13-16). Sonuç olarak bu maddelerin ilaç üretiminde, metalürji ve gıda endüstrisi alanında kullanımları yüksek potansiyel sergilemektedir.

Dünya genelindeki sınırlı tarımsal kaynakların etkin kullanımının önemini anlaşılması ile dikkatler bu kaynakları işleyen gıda sanayisine çevrilmiştir. Kaynakların etkin kullanımı için çeşitli tedbirler alınmasına rağmen hatırı sayılır düzeyde gıda artıkları oluşmaktadır. Yapılan bilimsel çalışmalar, bu artıkların insan sağlığı açısından oldukça önemli olan biyoaktif bileşenleri yüksek miktarlarda içerdiğini ortaya koymuştur. Ancak zengin besin ve katma değeri yüksek potansiyele sahip bu artıklar hayvan yemi, gübre vb gibi katma değeri daha düşük olan ürünlere işlenmektedir. Ülkemizde havucun konsantreye (65 °Briks) işleme verileri 2007 yılı itibari ile mevcut olup 2007 yılında konsantreye işlenen toplam havuç miktarı 30.6 bin ton, 2008'de 30.7 bin ton, 2009'da 12.3 bin tona düşmüş, 2010 yılında 24.6 bin ton ile tekrar artmıştır. 2009 ve 2010 yılında işlenen havuçların sırasıyla 9.0 ve 23.0 bin tonu siyah havuç olarak gerçekleşmiştir. Sektöre ilişkin 2010 yılında tutulan verilere göre havuç işlenen toplam meyve ve sebzenin % 3'ünü oluşturmaktadır. Ayrıca

2009 yılında 1.2 bin ton ve 2010 yılında 3.1 bin ton siyah havuç konsantresi (65 °Briks) üretimi yapılmıştır (17). Meyve-sebze suyu işleme sektörünün verileri dikkate alınarak yapılan hesaplama göre siyah havuçtan % 70 düzeyinde verim sağlanabilmektedir. Bu verimlilikten yola çıkılarak 2009 yılında yaklaşık 2.7 bin ton ve 2010 yılında katlanarak 6.9 bin ton siyah havuç posasının işleme artığı olarak oluştuğu söylenebilir. Ayrıca bu posada başta antosiyeninler olmak üzere oldukça önemli düzeyde biyoaktif bileşenler kalabilmektedir. Siyah havuç üretimi ve sektördeki konsantreye işleme hacmine bakıldığında dünya genelinde artan talebe orantılı olarak siyah havuç üretiminin ve işleme hacminin daha da artacağı görülmektedir. Siyah havucun konsantreye işleme hacmindeki artışa paralel olarak ticari değeri yüksek potansiyele sahip siyah havuç posası üretimi de artacaktır. Bu nedenle oluşacak bu posanın katma değeri daha yüksek ürünlere dönüşümü için gerekli tedbirlerin alınması kaçınılmaz olacaktır.

Bu çalışmanın amacı; ülkemizde yetiştiriciliği yapılan ve meyve-sebze suyu işleme sanayimizde yoğun işlenen siyah havucun artan posasından, antosiyeninlerin farklı asit konsantrasyonlarındaki çözümlerle (metanol, etanol, saf su) geri kazanım düzeylerini belirlemektir. Ayrıca bahsi geçen çözümler kullanılarak elde edilen ekstraktların farklı analiz yöntemlerle (kromatografik ve spektrofotometrik) antosiyenin miktarları karşılaştırılmıştır.

MATERYAL ve YÖNTEM

Materyal

Bu çalışmada, Konya/Ereğli Bölgesinde yetiştirilen siyah havuçların TARGID AŞ'de siyah havuç konsantresine işlenmesi sırasında elde edilen artık posaları kullanılmıştır.

Yöntem

Ekstraksiyon Çözeltilerinin Hazırlanması

Siyah havuç posasından antosiyeninlerin ekstraksiyonu için çözümler olarak saf metanol (MeOH), saf etanol (EtOH) ve saf su kullanılmıştır. Metanol ve etanol içine 0.1N; 0.2N; 0.4N; 0.8N ve 1.6N olacak şekilde hidroklorik asit (HCl, %37) ve saf su içine ise 0.1N; 0.2N; 0.4N; 0.8N ve 1.6N olacak şekilde sitrik ilave edilerek ekstraksiyon çözeltileri hazırlanmıştır. Bunu takiben MeOH, EtOH ve su için elde edilen asidik çözeltiler siyah havuç posasından antosiyeninlerin ekstraksiyonunda kullanılmıştır.

Ekstraksiyon

Homojenize edilmiş siyah havuç posasından 5 g örnek alınarak 50 mL'lik teflon tüpe aktarılmış ve üzerine 20 mL ekstraksiyon çözeltisi ilave edilerek karıştırılmış ve 5 dakika oda koşullarında bekletilmiştir. Bunu takiben tüpteki karışım 30 saniye yüksek devirde vortekslenmiş ve sonrasında santrifüjlenmiştir (4000 rpm, 4 °C, 10 dakika). Santrifüjleme sonrasında elde edilen berrak kısım 50 mL'lik balona aktarılmış ve posa kalıntısı aynı koşullarda ikinci kez ekstrakte edilmiştir. Berrak kısımlar birleştirilmiş ve balon hacmine aynı ekstraksiyon çözeltisi ile tamamlanmıştır. Elde edilen ekstrakt çalışma kapsamında yapılan analizler için kullanılmıştır. Çalışma 3 tekerrürlü gerçekleştirilmiştir.

Toplam Monomerik Antosiyenin Tayini

Monomerik antosiyenin tayini için Fuleki ve Francis (18) tarafından önerilen ve Giusti ve Wrolstad (19) tarafından geliştirilen pH diferansiyel metodu kullanılmıştır. Bu metodun ilkesi, monomerik antosiyeninlerin pH=1'de renkli oksonium formunun, pH=4.5'te ise, renksiz hemiketal formunun egemen olmasına dayanmaktadır. Buna göre, ortam pH=1 ve pH=4.5 olduğu zaman ölçülen absorbans değerlerinin farkı, doğrudan antosiyenin konsantrasyonu ile orantılı bulunmaktadır. pH değerlerini istenen değerlere ayarlamak için 0.025M potasyum klorür (KCl, pH=1'e HCl ile ayarlı) ve 0.4M sodyum asetat ($\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, pH=4.5'e HCl ile ayarlı) tampon çözeltileri kullanılmıştır. Kullanılacak potasyum klorür (pH=1.0) ve sodyum asetat tampon çözeltileri (pH=4.5) miktarları en uygun seyreltme oranına göre belirlenir. Bu seyreltme oranı her çözelti için uygulanır ve 15 dakika denge koşulu sağlandıktan sonra okuma yapılır. Bu doğrultuda, analiz için iki cam tüpe 0.5 mL ekstrakt alınmış ve ilk tüpe 7.5 mL 0.025M potasyum klorür çözeltisi, diğerine ise 7.5 mL 0.4M sodyum asetat çözeltisi ilave edilmiştir. Absorbans okumaları siyah havuç antosiyeninlerinin maksimum absorbans verdiği dalga boyunda (λ_{maks}) ve pus haldeki bulanıklığın belirlenmesi için ise; 700 nm'de yapılmıştır. 15 dakikalık bekleme süresi sonunda absorbans ölçümleri, 1 cm kalınlığındaki tek kullanımlık kuvvetlerde Perkin Elmer Lambda 25 UV/VIS spektrofotometresinde (Massachusetts, USA, 2005) yapılmıştır. Siyah havuç antosiyeninlerinin maksimum absorbans verdiği dalga boyunu (λ_{maks}) belirlemek için spektrofotometre ile 470-570 nm arasında tarama yapılmıştır. Bu çalışmada λ_{maks}

518 nm olarak tespit edildiğinden hesaplamalar bu dalga boyundaki absorpsiyon değerlerine göre yapılmıştır. Siyah havuçtaki monomerik antosiyanin miktarı, doğada yaygın bulunan siyanidin-3-glikozit cinsinden (20) aşağıda verilen eşitliğe göre hesaplanmıştır. Sonuçlar bir kg posaya karşılık gelen konsantrasyon cinsinden verilmiştir (mg/kg).

$$\text{Monomerik antosiyanin miktarı} \left(\frac{\text{mg}}{\text{kg}} \right) = \frac{(A \cdot MW \cdot SF)}{(\epsilon \cdot L)} \times 1000$$

A: Absorbans farkı (pH=1 ve 4.5 değerlerinde ölçülen absorpsiyon farkı);

$$A = ((\lambda_{\text{maks}} - A700)_{\text{pH1}} - (\lambda_{\text{maks}} - A700)_{\text{pH4.5}})$$

Formüldeki, MW: baz alınacak antosiyaninin molekül ağırlığını (449.2); SF: seyreltme faktörünü; ϵ : molar absorpsiyon katsayısını (26900); L: absorpsiyon kütvetinin ışın yolunu (1 cm) ifade eder.

Antosiyanin Bileşenlerinin Belirlenmesi

Araştırmada, HPLC (Shimadzu, LC-20AT, Kyoto, Japonya, 2006) ile antosiyanin bileşenlerin tayini yapılmıştır. Siyah havuç posasından karışımının santrifüjlenmesi ile elde edilen berrak ekstrakt 0.45 μm teflon membran filtreden geçirilerek cihaza doğrudan enjekte edilmiştir. Analizin kromatografik koşulları aşağıdaki gibi olmuştur.

Antosiyanin bileşenler için kromatografi koşulları;

Kolon: XTERRA RP C18, 5 μm , 4.6x250 mm

Mobil faz: % 5 formik asit (A); % 20 A + % 80 Asetonitril (B), gradiyent akış (0. dakika % 5 B, 25. dakika % 20 B)

Kolon sıcaklığı: 30°C

Detektör: Fotodiyot düzen detektör (PDA)

Dalga boyu: 520 nm

Mobil faz akış debisi: 1 mL/dk

Enjeksiyon hacmi: 20 μL

Siyah havuç antosiyanin bileşenlerinin tanımlanması piklerin çıkış süreleri ve spektrumları dikkate alınarak gerçekleştirilmiştir. Antosiyanin piklerinin hesaplanması için siyanidin-3-glikozit standardı yardımıyla oluşturulan kalibrasyon eğrisi kullanılmıştır. Sonuçlar bir kg posaya karşılık gelen konsantrasyon cinsinden verilmiştir (mg/kg).

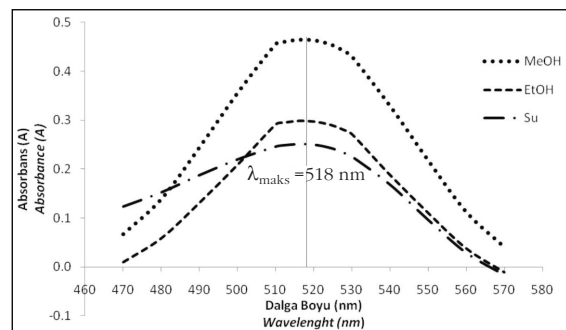
İstatistik Analiz

Analiz sonuçları, SPSS 20.0 paket programı kullanılarak varyans analizine tabi tutulmuş ve önemli bulunan farklılıklar Duncan çoklu karşılaştırma testine göre belirlenmiştir.

BULGULAR ve TARTIŞMA

Siyah havuç posasından farklı çözücülerden elde edilen ekstraktların spektrofotometrede pH diferansiyel yöntemine göre tespit edilen farklı dalga boylarındaki absorpsiyon değerleri Şekil 1'de verilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre siyah havuç posasından antosiyaninlerin ekstraksiyonunda en etkili çözücü metanol (MeOH) iken; bunu etanol (EtOH) ve saf su takip etmiştir. Ayrıca siyah havuçta bulunan antosiyaninlerin maksimum absorpsiyon verdiği dalga boyu (λ_{maks}) her üç çözücü ortamında da 518 nm olarak belirlenmiştir (Şekil 1). Antosiyaninler polar karakterli bileşenler olduğu için metanol, etanol, aseton ve su gibi polar karakterli çözücülerde en iyi çözünürler (21). Antosiyaninlerin ekstraksiyonunda kullanılan çözücülerin asitlendirilmesi ile daha etkin sonuçlar elde edilmektedir. Yapılan çalışmalarda en iyi sonuçların asitlendirilmiş metanol ve etanol çözücülerinde elde edildiği bildirilmektedir (22-27). Antosiyanin ekstraksiyonu için bunlardan metanolun en iyi sonuç verdiği rapor edilmiştir (28). Üzüm pulpundaki antosiyaninlerin farklı çözücülerle ekstraksiyonu üzerine yapılan bir araştırmaya göre metanolun etanolden %20 ve sudan %73 daha fazla etkili olduğu tespit edilmiştir (29). Siyah havuç ekstraktı üzerine yapılan önceki çalışmaların sonuçlarına göre siyah havuç antosiyaninlerinin λ_{maks} değeri 520-530 nm arasında değiştiği rapor edilmiştir (30-34).

MeOH, EtOH ve saf suyun farklı asit konsantrasyonlarındaki çözeltilerinin siyah havuç posasındaki antosiyaninleri ekstraksiyon düzeyleri farklı dalga boylarındaki absorpsiyon cinsinden; sırayla Şekil 2, Şekil 3 ve Şekil 4'te verilmiştir. Elde edilen bulgulara göre MeOH'ın asit konsantrasyonu arttıkça, elde edilen

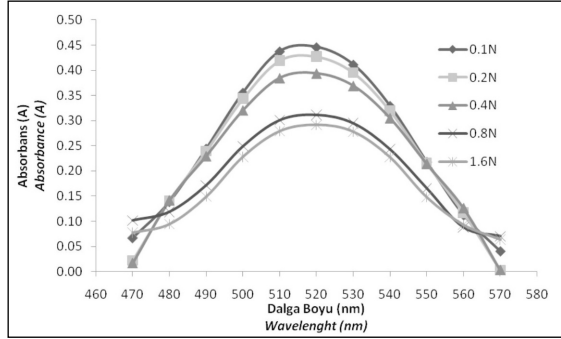


Şekil 1. Siyah havuç posası antosiyaninlerinin farklı çözücülerde ve dalga boylarındaki absorpsiyon değerleri

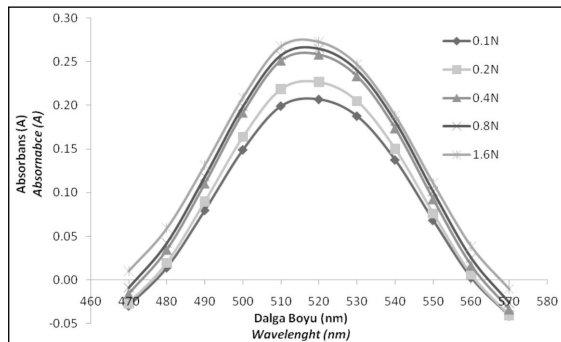
Figure 1. Absorbance values in different solvents and the wavelengths of anthocyanins of black carrot pomace

ekstraktların ölçülen spektrofotometrik absorbans değerleri azalmıştır (Şekil 2). 0.1N HCl içeren MeOH ile elde edilen ekstraktın en yüksek absorbans verdiği tespit edilmiştir. EtOH için ise bu durumun tam tersi belirlenmiş olup asit konsantrasyonu arttıkça absorbans değeri artmıştır (Şekil 3). Şekilden de anlaşılacağı üzere 1.6N HCl içerikli EtOH ile elde edilen ekstraktın diğer asit konsantrasyonlu EtOH kullanılarak elde edilen ekstraktlardan daha yüksek düzeyde absorbans verdiği belirlenmiştir. Saf suyun sitrik asit konsantrasyonu arttıkça elde edilen ilgili ekstraktların absorbans değerleri arasında anlamlı bir fark tespit edilememiştir (Şekil 4). Türker ve Erdoğan (33) antosiyaninleri farklı pH koşullarında ekstrakte ettikleri çalışmalarında asidik pH düzeylerinde antosiyaninlerin kütle transfer katsayısının arttığını rapor etmişlerdir.

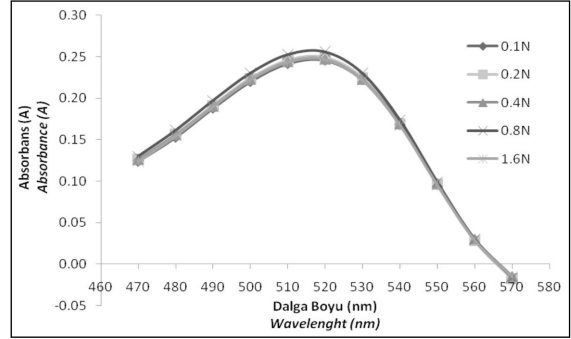
Siyah havuç posasının farklı çözücü ve asit konsantrasyonlu ortamlarda muamele edilmesiyle elde edilen ekstraktların sonuçlarına göre posaların toplam monomerik antosiyanin ve antosiyanin bileşen içerikleri Çizelge 1'de verilmiştir.



Şekil 2. Siyah havuç posasından farklı asit konsantrasyonlu metanolün antosiyanin ekstraksiyonu üzerine etkisi
Figure 2. Effect of different acid concentration of methanol on anthocyanin extraction from black carrot pomace



Şekil 3. Siyah havuç posasından farklı asit konsantrasyonlu etanolün antosiyanin ekstraksiyonu üzerine etkisi
Figure 3. Effect of different acid concentration of ethanol on anthocyanin extraction from black carrot pomace



Şekil 4. Siyah havuç posasından farklı asit konsantrasyonlu saf suyun antosiyanin ekstraksiyonu üzerine etkisi
Figure 4. Effect of different acid concentration of pure water on anthocyanin extraction from black carrot pomace

Ekstraktların monomerik antosiyanin içerikleri 518 nm'de (spektrofotometre, λ_{maks}) elde edilen absorbans (A) değerlerine göre hesaplanmıştır. Farklı ekstraksiyon çözeltilerinden elde edilen bulgulara göre siyah havuç posasının toplam monomerik antosiyanin miktarları 656.2-1191.9 mg/kg arasında değiştiği belirlenmiştir. Siyah havucun toplam antosiyanin içeriği üzerine yapılan araştırmalarda Khandere ve ark. (30) toplam antosiyanin miktarını siyah havuç suyunda 504 mg/L ve Türkyılmaz ve ark. (34) ise 488 mg/L olarak tespit etmişlerdir. Bu sonuçlara göre siyah havuç posasının hala yüksek düzeyde antosiyanin içerdiği ve tekrar değerlendirilerek içerdiği antosiyaninlerin geri kazanılması gerektiği anlaşılmaktadır.

Toplam monomerik antosiyanin miktarı en yüksek 1191.9 mg/kg ile 0.1N HCl içerikli MeOH'ta tespit edilmiştir. Bunu takiben 728.7 mg/kg ile 1.6N HCl içerikli EtOH ve 684.1 mg/kg ile 0.8N sitrik asit içerikli saf su olmuştur. Siyah havuç posası antosiyaninlerini geri kazanmak için kullanılan çözümlerden MeOH'ın antosiyaninlerin ekstraksiyonunda EtOH ve saf sudan daha etkili olduğu tespit edilmiştir ($P < 0.05$). Çözümlerin farklı asit konsantrasyonlarından elde edilen ekstraktların monomerik antosiyanin sonuçları MeOH çözgenin asitliği arttıkça azaldığı ($P < 0.05$), EtOH çözgenin asitliği arttıkça arttığı ($P < 0.05$) ve son olarak saf suyun asitliğinin artmasıyla ise değişmediği ($P > 0.05$) belirlenmiştir. Türker ve Erdoğan (33) siyah havuç antosiyaninlerinin farklı pH (2, 3 ve 4) ve sıcaklık (25, 37.5 ve 50 °C) ortamlarında ekstraksiyon etkinliklerini araştırmış ve antosiyaninlerin difüzyon katsayılarını belirlemişlerdir. Elde edilen sonuçlara göre en yüksek difüzyon katsayısını pH=2 ve 50 °C'de

Çizelge 1. Siyah havuç posasının farklı ekstraktlarının antosiyanin bileşen ve toplam monomerik antosiyanin içerikleri (mg/kg)
Table 1. Anthocyanin compounds and total monomeric anthocyanin contents of different extracts of black carrot pomace (mg/kg)

*+	♣	S3KGG	S3KG	S3KGGs	S3KGGF	S3KGGK	Toplam Total (HPLC)	Monomerik Antosiyanin Monomeric Anthocyanin
Metanol (MeOH) ^A	0.1N	58.9±0.7 ^b	330.4±4.6 ^a	74.3±0.7 ^b	398.8±4.1 ^a	144.1±1.9 ^{ab}	1006.4±12.0 ^a	1191.9±56.1 ^a
	0.2N	55.8±2.4 ^c	323.0±7.3 ^{ab}	75.6±1.6 ^a	392.1±3.4 ^{bc}	142.0±3.9 ^{ab}	994.4±11.8 ^{ab}	1128.8±49.1 ^{ab}
	0.4N	57.8±0.6 ^{bc}	320.0±2.9 ^{bc}	74.8±0.8 ^b	393.8±3.4 ^{ab}	145.6±2.2 ^a	992.0±9.9 ^{ab}	1053.0±83.4 ^b
	0.8N	59.2±0.4 ^b	313.8±0.7 ^c	73.1±0.2 ^{bc}	386.9±0.5 ^{cd}	144.7±1.0 ^{ab}	977.8±0.7 ^b	831.5±63.2 ^c
	1.6N	64.2±0.1 ^a	302.1±2.6 ^c	71.7±0.5 ^c	381.1±3.2 ^d	140.6±1.5 ^b	959.7±7.8 ^c	778.9±64.7 ^c
Etanol (EtOH) ^B	0.1N	47.0±0.4 ^b	291.0±1.8 ^a	59.6±0.8 ^{ab}	347.8±0.6 ^a	124.8±1.2 ^a	870.2±0.1 ^{ab}	552.0±6.9 ^b
	0.2N	42.4±0.2 ^c	269.9±2.2 ^b	53.6±0.5 ^c	318.9±1.9 ^b	112.5±0.8 ^a	797.3±5.6 ^c	605.5±49.8 ^b
	0.4N	47.4±0.5 ^b	298.8±3.7 ^a	59.6±1.0 ^{ab}	349.1±3.0 ^a	124.0±1.0 ^a	878.9±9.2 ^a	690.0±25.7 ^b
	0.8N	45.5±2.2 ^b	279.0±11.0 ^b	57.0±3.2 ^b	330.6±15.2 ^b	121.9±13.3 ^a	834.1±45.0 ^{bc}	708.2±54.3 ^a
	1.6N	49.5±0.8 ^a	295.8±6.1 ^a	61.2±0.9 ^a	355.9±12.0 ^a	122.4±4.1 ^a	884.9±23.9 ^a	728.7±12.9 ^a
Saf Su ^C	0.1N	47.0±0.5 ^c	217.7±1.5 ^c	57.9±0.7 ^c	298.3±2.4 ^c	107.2±0.8 ^c	728.1±5.9 ^d	656.2±13.6 ^a
	0.2N	49.9±0.7 ^b	236.0±3.5 ^c	63.3±1.1 ^b	321.3±4.7 ^b	127.0±2.4 ^a	797.5±12.4 ^b	665.9±24.0 ^a
	0.4N	46.9±0.1 ^c	228.2±0.5 ^d	58.5±0.3 ^c	302.0±0.1 ^c	108.8±0.2 ^c	744.3±0.6 ^c	660.1±1.5 ^a
	0.8N	51.1±0.1 ^a	251.8±1.2 ^b	64.7±0.2 ^a	333.8±1.6 ^a	120.5±0.8 ^b	821.9±3.2 ^a	684.1±29.8 ^a
	1.6N	51.5±0.5 ^a	258.0±3.6 ^a	65.4±0.3 ^a	334.6±2.6 ^a	121.1±0.6 ^b	830.6±7.6 ^a	658.3±4.8 ^a

*Çizelgede küçük harf ile gösterilenler aynı çözgenin farklı asit konsantrasyonlu ekstraktları arasındaki farkı göstermektedir. (±) standart sapma. + Çizelgede büyük harf ile gösterilenler çözgenlerin ekstraktları arasındaki farkı göstermektedir (HPLC'de tespit edilen antosiyanin bileşen miktarlarının toplamı üzerinden). ♣ Metanol ve etanol HCl ile asitlendirilmiş iken saf su sitrik asitle asitlendirilmiştir. Sonuçlar bir kg posadaki konsantrasyon cinsinden verilmiştir.

^ASuperscript lowercase letters on the same column show the significant difference between different acid concentrations of solvent. (±) standard deviations. + Superscript uppercase letters show the significant difference between different solvents (according to total of anthocyanin compounds). ♣ While methanol and ethanol were acidified with HCl, pure water was acidified with citric acid. The results were given in terms of the concentration in kg pomace.

hesaplamışlardır. Araştırmada kullanılan pH koşullarının tamamında sıcaklık artışlarına bağlı olarak difüzyon katsayıları artmıştır. Fakat pH artışı ile birlikte difüzyon katsayısında önemli düşüşler olmuştur. Sonuç olarak siyah havuçtan antosiyanin ekstraksiyonu sırasında seçilecek pH ve sıcaklığın önemli olduğunu vurgulamışlardır.

Siyah havuçta bulunan temel antosiyanin bileşikler (açılsız antosiyaninler) siyanidin-3-ksilozil-glukozil-galaktozid ve siyanidin-3-ksilozil-galaktozid, (açıllı antosiyaninler) sinapik, ferulik ve kumarik asitlerle açillenmiş siyanidin-3-ksilozil-glukozil-galaktozid'lerdir (4, 35, 36).

Siyah havuç posasından elde edilen ekstraktların antosiyanin bileşen analiz sonuçları Çizelge 1'de verilmiştir. Siyah havuç posasından antosiyanin bileşen olarak siyanidin-3-ksilozil-glukozil-galaktozid (S3KGG), siyanidin-3-ksilozil-galaktozid (S3KG), siyanidin-3-ksilozil-glukozil-galaktozid-sinapik asit (S3KGGs), siyanidin-3-ksilozil-glukozil-galaktozid-ferulik asit (S3KGGF) ve son olarak siyanidin-3-ksilozil-glukozil-galaktozid-kumarik asit (S3KGGK) tespit edilmiştir. Bu antosiyanin bileşenlerden S3KGGF (298.3-398.8 mg/kg) ve S3KG'nin (217.7-330.4 mg/kg) siyah havuçta en baskın

oldukları belirlenmiştir. Antosiyanin bileşen miktarları en yüksek MeOH ekstraktlarında belirlenmiştir ($P < 0.05$). Ayrıca elde edilen bulgulara göre ekstraktların antosiyanin bileşen içeriği bakımından her üç çözgenin asit konsantrasyonları arasındaki fark (S3KGGK'nın EtOH ekstraktları hariç) önemli bulunmuştur ($P < 0.05$). Ekstraktların kromatografik (HPLC) analiz sonucu elde edilen antosiyanin bileşen miktarlarının toplamı ile elde edilen bulgular Çizelge 1'de verilmiştir. MeOH'ın asit konsantrasyonu arttıkça elde edilen siyah havuç posası ekstraktlarının toplam antosiyanin miktarları spektrofotometrik analiz sonuçlarında olduğu gibi azalmıştır ($P < 0.05$). HPLC sonuçlarına göre; EtOH'un asit konsantrasyonunun artmasıyla toplam antosiyanin miktarlarında değişimler olmasına rağmen spektrofotometrik sonuçlarla paralellik göstermemiştir. Çünkü spektrofotometrik sonuçlara göre EtOH'ın asitlik konsantrasyonu arttıkça antosiyanin miktarında artış belirlenmiştir ($P < 0.05$). Bu durumun tam tersi sitrik asitli saf su çözgeninde tespit edilmiştir. Çözgen kullanılarak elde edilen siyah havuç posası ekstraktlarının toplam antosiyanin miktarları spektrofotometrik bulgulara göre asit konsantrasyonuna bağlı olarak

değişim göstermediği belirlenmiştir. Fakat HPLC sonuçlarına göre sudaki sitrik asit arttıkça elde edilen antosiyanin miktarlarında artışlar tespit edilmiş ve bu artışlar önemli bulunmuştur ($P < 0.05$). Sonuç olarak; siyah havuç posasından farklı çözücü ve asit konsantrasyonlu çözeltilerle yapılan ekstraksiyonlarla elde edilen ekstraktların antosiyanin içerikleri kıyaslandığında en yüksek değerlerin 0.1N HCl içerikli MeOH'de (1006.4 ± 12.0 mg/kg) olduğu tespit edilmiştir.

Bu çalışmadan edilen bir diğer önemli bulgu ise, ekstraktların antosiyanin içeriklerinin HPLC ve spektrofotometrik analizlerde farklı sonuçlar vermesidir. HPLC'de antosiyaninler bileşen bazında analiz edilip elde edilen sonuçlar spektrofotometre sonuçlarından daha kesindir. HPLC sonuçları antosiyanin içerikleri açısından ölçüt olarak alındığında spektrofotometrik sonuçların hata düzeyinin azımsanamayacak düzeyde olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışma özelinde spektrofotometrede antosiyanin analizi sırasında hata oluşturacak nedenler sorgulandığında en temel nedenin ekstraksiyonunda kullanılacak çözücünün asitlik düzeyi olduğu düşünülmektedir. Çünkü spektrofotometrede antosiyanin analizinde (bu çalışmada da kullanılmıştır) en yaygın yöntem pH diferansiyel yöntemidir. Bu yöntem farklı pH düzeylerindeki absorbans değerlerinden yola çıkarak sonuç vermektedir. Tamda burada ekstraksiyonda kullanılacak çözgen tipinin yanında çözgenin sahip olduğu asitlik düzeyi de spektrofotometrede doğru sonuçların elde edilmesi açısından önemli olduğu araştırma sonuçları ile de ortaya konmuştur.

SONUÇ

Antosiyaninlerin gıda sanayisinde doğal renklendirici olarak kullanılması antosiyanince zengin olan siyah havuç üzerine dikkatleri çekmiştir. Siyah havuç konsantreye işlenerek dünya genelinde doğal gıda renklendiricisi olarak kullanılmaya başlanmıştır. Elde edilen bulgulara göre siyah havucun işlenmesinden sonra elde edilen posada antosiyanin bileşenlerinin yüksek miktarlarda kaldığı tespit edilmiştir. Siyah havuç posasından beş farklı antosiyanin bileşen tespit edilmiştir. Bu antosiyanin bileşenlerden siyanidin-3-ksilozil-glukozil-galaktozit-ferulik asidin ($298.3-398.8$ mg/kg) ve siyanidin-3-ksilozil-galaktozidin ($217.7-330.4$ mg/kg) siyah havuç posasında en baskın oldukları belirlenmiştir. Antosiyaninlerin posadan geri kazanımı için kullanılan asitlendirilmiş çözücülerden metanol en iyi sonuç verirken

bunu etanol ve saf su takip etmiştir. Araştırma ile ayrıca, spektrofotometrik antosiyanin analiz sonuçlarının asitlikten önemli ölçüde etkilendiği belirlenmiştir.

Bu çalışmadan elde edilen sonuçlara göre siyah havuç posasının hala ticari değeri yüksek potansiyele sahip antosiyanin bileşenler içerdiği ve bunları geri kazanmak için asitlendirilmiş metanol ve etanol bazlı çözücüler kullanıldığında suya göre daha fazla geri kazanım sağlanacağı tespit edilmiştir. Metanol ve etanolun düşük kaynama noktasına sahip olduklarından ekstraksiyon sonrasında evaporasyon ile kolayca ayrıştırılmaları bir diğer önemli noktadır.

TEŞEKKÜR

Araştırmacılar, çalışma materyali olan siyah havuç ve işleme artığı olan posa temini konusunda desteklerinden ötürü TARGID AŞ'ye teşekkürlerini sunar.

KAYNAKLAR

1. Just BJ. 2004. Genetic Mapping of Carotenoid Pathway Structural Genes and Major Gene Qtls for Carotenoid Accumulation in Wild and Domesticated Carrot (*Daucus carota* L.). University of Wisconsin-Madison, Doctor of Philosophy (Plant Breeding and Plant Genetics), (PhD Dissertation).
2. Rodriguez-Sevilla MD, Villanueva-Suárez MJ, Redondocuenca A. 1999. Effects of Processing Conditions on Soluble Sugars Content of Carrot, Beetroot and Turnip. *Food Chem*, 66: 81-85.
3. Tangüler H, Erten H. 2009. Geleneksel Laktik Asit Fermantasyonu Ürünü Şalgam Suyu ve Üretim Yöntemleri, II. Geleneksel Gıdalar Sempozyumu, Van, Türkiye, 650-654.
4. Kammerer D, Carle R, Schieber A. 2004. Quantification of Anthocyanins in Black Carrot Extracts (*Daucus carota* ssp. *sativus* var. *atrorubens* Alef.) and Evaluation of Their Color Properties. *Eur Food Res Technol*, 219(5): 479-486.
5. Erten H, Tangüler H, Canbaş A. 2008. A Traditional Turkish Lactic Acid Fermented Beverage: Shalgam (Shalgam). *Food Rev Int*, 24: 352-359.
6. Sethi V. 1990. Lactic Fermentation of Black Carrot Juice for Spiced Beverage. *Indian Food Packer*, 44(3): 7-12.
7. Pistrick K. 2001. *Umbelliferae (Apiaceae)* (P. Harelt, Edt.). Mansfeld's Encyclopedia of Agricultural and Horticultural Crops, 1st edn., Springer, Berlin-Heidelberg, pp:1259-1267.

8. Canbaş A. 1991. Recovery of Anthocyanins from Black Carrot to be used in Foodstuffs, European Patent, Patent no: EP 0480297/ TR 90/929.
9. Yiğincinar H. 2007. Kontrollü Şartlarda Şalgam Suyu Üretimi Üzerine Farklı Formülasyonların Etkisi. Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü-Yüksek Lisans Tezi.
10. FAO. 2013. www.faostat.fao.org, (03.09.2013).
11. Butz P, Tauscher B. 2002. Emerging Technologies: Chemical Aspects. *Food Rev Int*, 35: 279-284.
12. Corrales M, Toepfl S, Butz P, Knorr D, Tauscher B. 2008. Extraction of Anthocyanins From Grape By-Products Assisted by Ultrasonic, High Hydrostatic Pressure or Pulsed Electric Fields: A Comparison. *Innov Food Sci Emerg Technol*, 9: 85-91.
13. Namiki M. 1990. Antioxidants/Antimutagens in Foods. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 29: 273-300.
14. Halliwell B. 2007. Dietary polyphenols: Good, Bad, or Indifferent for Your Health?. *Cardiovasc Res*, 73: 341-347.
15. Prasad NK, Yang B, Zhao M, Wang B, Chen F, Jiang Y. 2009. Effects of High Pressure Treatment on The Extraction Yield, Phenolic Content and Antioxidant Activity of Litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) Fruit Pericarp. *Int J Food Sci Technol*, 44: 960-966.
16. Sun, J, Jiang Y, Shi S, Wei X, Xue SH, Shi J, Yi C. 2010. Antioxidant Activities and Contents of Polyphenol Oxidase Substrates from Pericarp Tissues of Litchi Fruit. *Food Chem*, 119: 753-757.
17. MEYED. 2013. www.meyed.org.tr, Sektör İstatistikleri, (03.09.2013).
18. Fuleki T, Francis FJ. 1968. Quantitative Methods for Anthocyanins. 2. Determination of Total Anthocyanin and Degradation Index for Cranberry Juice. *J Food Sci*, 33: 78-82.
19. Giusti MM, Wrolstad RE. 2001. Characterization and Measurement with UV-Visible Spectroscopy (Wrolstad RE, Schwartz SJ, Edts.). *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, John Wiley and Sons, New York, pp: 1-13.
20. Gil MI, Tomás-Barberán FA, Hess-Pierce B, Holcroft DM, Kader AA. 2000. Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing. *J Agric Food Chem*, 48: 4581-4589.
21. Kahkonen MP, Hopia AI, Heinonen M. 2001. Berry phenolics and their antioxidant activity. *J Agric Food Chem*, 49(8): 4076-4082.
22. Amr A, Al-Tamimi E. 2007. Stability of the crude extracts of *Ranunculus asiaticus* anthocyanins and their use as food colourants. *Int J Food Sci Technol*, 42: 985-991.
23. Awika JM, Rooney LW, Waniska RD. 2005. Anthocyanins from black sorghum and their antioxidant properties. *Food Chem*, 90(1-2): 293-301.
24. Cacace JE, Mazza G. 2003. Mass transfer process during extraction of phenolic compounds from milled berries. *J Food Eng*, 59(4): 379-389.
25. Donner H, Gao L, Mazza G. 1997. Separation and characterization of simple and malonylated anthocyanins in red onions, *Allium cepa* L. *Food Res Int*, 30(8): 637-643.
26. Fossen T, Andersen ØM. 2003. Anthocyanins from red onion, *Allium cepa*, with novel aglycone. *Phytochem*, 62(8): 1217-1220.
27. Phippen WB, Simon JE. 1998. Anthocyanins in Basil (*Ocimum basilicum* L.). *J Agric Food Chem*, 46(5): 1734-1738.
28. Kapasakalidis PG, Rastall RA, Gordon MH. 2006. Extraction of polyphenols from processed black currant (*Ribes nigrum* L.) residues. *J Agric Food Chem*, 54(11): 4016-4021.
29. Metivier RP, Francis FJ, Clydesdale FM. 1980. Solvent extraction of anthocyanins from wine pomace. *J Food Sci*, 45(4): 1099-1100.
30. Khandare V, Walia S, Singh M, Kaur C. 2011. Black Carrot (*Daucus carota* spp. *sativus*) Juice: Processing Effects on Antioxidant Composition and Color. *Food Bioprod Process*, 89: 482-486.
31. Kırca A, Özkan M, Cemeroglu B. 2006. Stability of black carrot anthocyanins in various fruit juices and nectars. *Food Chem*, 97: 598-605.
32. Kırca A, Özkan M, Cemeroglu B. 2007. Effects of Temperature, Solid Content and pH on the Stability of Black Carrot Anthocyanins. *Food Chem*, 101: 212-218.
33. Türker N, Erdoğan F. 2006. Effects of pH and Temperature of Extraction medium on Effective Diffusion Coefficient of Anthocyanin Pigments of Black Carrot (*Daucus carota* var. L.). *J Food Eng*, 76: 579-583.
34. Türkyılmaz M, Yemiş O, Özkan M. 2012. Clarification and Pasteurisation Effects on Monomeric Anthocyanins and Percent Polymeric colour of Black Carrot (*Daucus carota* L.) Juice. *Food Chem*, 134: 1052-1058.
35. İstanbullu Ö. 2007. Kara Havuç (*Daucus carota* var. L.) Antosiyaninlerinin Ferulik Asit ile Kopigmentasyonu. Mersin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü-Yüksek Lisans Tezi.
36. Türker N, Aksay S, İstanbullu Ö, Artuvan E. 2007. A Study on the Relation Between Anthocyanin Content and Product Quality: Şalgam as A Model Beverage. *J Food Qual*, 30: 953-969.