

KIRMIZI PANCAR (*Beta vulgaris* L.) BETALAINLERİ ÜZERİNE TERMAL DESTEKLİ ULTRASONİK EKSTRAKSİYONUN ETKİSİ

Atilla ŞİMŞEK*

Ordu Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Ordu, Türkiye

Geliş / Received: 07.01.2019; Kabul / Accepted: 14.02.2019; Online baskı / Published online: 23.03.2019

Şimşek, A. (2019). Kırmızı pancar (*Beta vulgaris* L.) betalainleri üzerine termal destekli ultrasonik ekstraksiyonun etkisi. *GIDA* (2019) 44 (2): 318-327 doi: 10.15237/gida.GD19027

Şimşek, A. (2019). The effect of thermal assisted ultrasonic extraction on the red beetroot (*Beta vulgaris* L.) betalain. *GIDA* (2019) 44 (2): 318-327 doi: 10.15237/gida.GD19027

ÖZ

Bu çalışmada, kırmızı pancarın (*Beta vulgaris* L.) betalainlerinin ultrasonik banyoda, farklı sıcaklık ve sürelerde (40-80°C, 5-210 dk) değişimi incelenmiştir. Sıcaklık derecesi (I), süre (t) ve T_{xt} interaksiyonunun betalainler, toplam fenolik madde (TFM), DPPH radikal süpürme aktivitesi (DPPH-RSA), Hunter L, a ve b değerleri üzerine etkisi önemli ($P < 0.001$) bulunmuştur. Termal destekli ultrasonik ekstraksiyonun (TDUE), 60°C-40 dk ve 80°C-25 dk uygulamaları ile betalainlerin en yüksek değere ulaştığı, daha sonra artan sürelerin ise azalmalara neden olduğu belirlenmiştir. TDUE'nun 40°C uygulamasında ise betalainlerin yavaş artış gösterdiği fakat bu artışın diğer proseslere (60-80°C) ait değerlerin altında kaldığı tespit edilmiştir. Diğer taraftan, betalainlerin değişiminin TFM, DPPH-RSA ve Hunter L, a ve b değeri değişimi ile ilişkili olduğu ve TDUE koşullarında elde edilen matematiksel eşitliklerin ($R^2 = \%84-87$), betalainlerdeki değişime ait optimum koşulları belirlemede kullanılabileceği ortaya çıkmıştır.

Anahtar kelimeler: Kırmızı pancar, *Beta vulgaris* L., betalainler, doğal renk maddeleri, ultrasonik ekstraksiyon

THE EFFECT OF THERMAL ASSISTED ULTRASONIC EXTRACTION ON THE RED BEETROOT (*Beta vulgaris* L.) BETALAINS

ABSTRACT

In this study, the change of red beet (*Beta vulgaris* L.) betalains was investigated in ultrasonic bath at different temperature and times (40-80°C, 5-210 min). The effect of temperature (I), time (t) and T_{xt} interaction on betalains, total phenolic matter (TFM), DPPH radical scavenging activity (DPPH-RSA), Hunter L, a and b values were significant ($P < 0.001$). It was determined that maximum betalain values were reached at 60°C-40 min and 80°C-25 min of thermal assisted ultrasonic extraction (TAUE) then decreased with increasing time. In the 40°C application of TAUE, betalains increased slowly but remained below the values of other processes (60-80°C). On the other hand, it has been found that the change of betalains is related to TFM, DPPH-RSA and Hunter L, a and b value changes, and the mathematical equations ($R^2 = 84-87\%$) obtained in TDUE conditions can be used to determine the optimum conditions for betalains changes.

Keyword: Red beetroot, *Beta vulgaris* L., betalains, natural colorants, ultrasonic extraction

*Yazışmalardan sorumlu yazar / Corresponding author;

✉ atillasimsek62@yahoo.com,

☎ (+90) 545 795 3934

☎ (+90) 452 234 6632

GİRİŞ

Renk, tüketici kabulü ve ürünlerin tercihinde önemli rol oynayan bir kalite parametresidir. Tüketicilerin gıdalarda görünüş, beslenme ve güvenlik konusundaki beklenti ve artan ilgisi, gıda endüstrisinde alternatif renklendirici olarak kullanılacak betalainler gibi doğal pigmentlere olan talebi artırmıştır. Bu amaçla günümüzde suda çözünür antosiyaninler ve betalainler ile yağda çözünür karotenoidler ve kurkuminoidler gibi çeşitli pigmentler üretilmekte ve bunların birçoğu gıda boyası olarak muhtelif gıdalarda kullanılmaktadır (Gliszczynska-Świgło vd. 2006; Gengatharan, vd. 2015).

Kırmızı pancarda (*Beta vulgaris* L.) yüksek konsantrasyonda bulunan betalainler, suda çözünebilir ve çekirdek yapısında azot içeren betalamik asit [4-(2-oksoetiliden)-1,2,3,4-tetrahidropiridin-2,6-dikarboksilik asit] 'den oluşur. *Caryophyllales* altında sınıflandırılan 15'ten fazla familyaya ait bitkilerde yapısal olarak ve kesin olarak tanımlanmış yaklaşık 75 betalain (32 betaksantin and 42 betasiyanin) vardır, bunlar kemostatik tanımlamada kullanılırlar. Betalainler, betasiyanin (kırmızı-mor) ve betaksantin (sarı-turuncu) olmak üzere iki alt sınıftan oluşmuştur (Delgado-Vargas vd., 2000; Khan ve Giridhar, 2015). Betalainlerin yıllık üretiminin tahmini 96.8 Gt (Gigaton)'dur. Bu oranın yaklaşık % 99.99'u kırmızı pancardan ve geri kalan kısım amarant tohumu (0.02t), kırmızı pitaya (60.3t) ve kaktüs meyvesinden (18.7t) elde edilmektedir (Khan ve Giridhar, 2015).

Günümüzde betalain pigmentleri ve pigment karışımları hem gıdalar zenginleştirmek, hem de renk değişikliğini engellemek amacıyla, şekerleme, yoğurt, dondurma, salata sosları, hazır kek, et ürünleri, toz içecek, krema, puding, marşmelov, alkolsüz içecekler ve jelatin kaynaklı tatlılarda renklendirici olarak kullanılmaktadır. Çoğu gıdalara 50 mg/kg düzeyinde katılan betanin istenilen rengi sağlamada yeterlidir (Delgado-Vargas vd., 2000; Khan, 2016). Ayrıca pancar suyu konsantresi veya pancar tozu şeklinde gıda yanı sıra ilaç ve kozmetik ürünler için de doğal katkı maddesi olarak kullanılmaktadır. Gıda renk maddesi olarak betalainlerin kullanılmasına

Avrupa birliği E-162 kodu ile onay vermiştir (Gliszczynska-Świgło vd., 2006; Gengatharan, vd., 2015). Diğer taraftan sarı turuncu renk aralığı için karotenoidler doğal renk maddesi olarak gıdalarda kullanılmaktadır, ancak suda çözünürlüğünün zayıf olması nedeniyle yerine betalainlerden betaksantin daha çok tercih edilmektedir (Khan, 2016).

Gıdalara kırmızı-mor renk tonunu vermek amacıyla, antosiyaninler kullanılıyor olsa da antosiyaninlere göre geniş bir pH ve sıcaklık aralığında stabil olan betalainlerin kullanımı daha yaygındır. Ekstraksiyonu sırasında, ortamın pH'sı, su aktivitesi, sıcaklık, ışık, oksijen, metaller (demir, bakır, kalay ve alüminyum gibi metal katyonlar) ve enzimatik aktivite betalainlerin konsantrasyonunu etkilemektedir. Betalainlerin renk yoğunluğu pH 3 ile 7 arasında nispeten değişmez, fakat 3'ten düşük pH değerlerinde mor-viyoleye döner. Renk 7'den yüksek pH değerlerinde ise betanin kaybı nedeniyle daha sarımsı-kahverengiye dönüşür. Bununla birlikte, optimal pH'da betalain parçalanmasını etkileyen en belirleyici faktör sıcaklıktır. Diğer taraftan, uygulanan ısıl prosesler, beta-bağları ve dolayısıyla gıda rengini ve antioksidan aktivitesini değiştirmede etkilidir (Roy vd., 2004; Stintzing ve Carle, 2004). Betalainleri stabilize etmek için, kompleks oluşturma (β -siklodekstrin (β -CD), hidrokspipil- β -CD (HP- β -CD) ve sülfobütiler- β -CD (SBE- β -CD) betanin, kompleksleri), kopigmentasyon ve enkapsulasyon teknikleri son yıllarda başarıyla uygulanmaktadır (Khan, 2016).

Yapılan çalışmalar, betalainlerin antimikrobial, antiviral etkiye sahip olduğunu, antioksidan ve radikal süpürücü özelliklerinden dolayı ise bazı oksidatif stresle ilişkili hastalıklara karşı korunmada, kardiyovasküler hastalıkların ve kanserin (kemoterapik etki) önlenmesinde kullanılabileceğini göstermiştir (Strack vd., 2003; Gliszczynska-Świgło vd., 2006; Ravichandran vd., 2013; Swarna, vd., 2013). Bir diğer çalışmada, betalainlerin kaynağı olan kırmızı pancar, amarant, kaktüs meyvesi ve kırmızı pitahaya (ejder meyvesi) gibi meyvelerin antioksidan, anti-kanser, anti-lipidemik (kolesterolü ve kısa zincirli yağ asitlerin oluşumunu engellediği) ve

antimikrobiyal aktivite gibi farmakolojik özelliklere sahip olduğunu, bu meyvelerin fonksiyonel gıdaların yapısında yer alması gerektiği belirtilmiştir (Ninfalı ve Angelino, 2013; Gengatharan vd., 2015).

Kırmızı pancardan betalainlerin ekstraksiyonunda, ısıl prosesler (Delgado-Vargas vd., 2000; Herbach, 2004; Ravichandran vd., 2013), mikrodalga (Ravichandran vd. 2013; Cardoso-Ugarte vd. 2014) ve konsantrasyonunda mikroltrasyon (Amirasgari ve Mirsaeedghazi, 2015) ve ozmotik distilasyon (Amirasgari ve Mirsaeedghazi, 2016) yöntemlerinin kullanıldığı ve söz konusu yöntemlerin betalainler üzerine etkisinin tartışıldığı çalışmalar mevcuttur. Yapılan bu çalışmada, kırmızı pancara ultrasonik banyoda farklı sıcaklık ve sürede ısıl işlem (TDUE) uygulayarak betalainler yanında TFM, DPPH-RSA ve Hunter L, a ve b değerindeki değişimin izlenmesi ve betalainlerdeki değişimin matematiksel eşitliklerle ortaya konulması hedeflenmiştir.

MATERYAL VE YÖNTEM

Araştırmada hammadde olarak kullanılan kırmızı pancar örnekleri Ordu ili ve çevresinden önceden belirlenmiş bahçelerden hasat olum evresinde örnekleme kurallarına göre sökülmüş, Ordu Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, araştırma laboratuvarlarına getirilen örnekler yaprak, kök kesildikten sonra üzerindeki çamur musluk suyunda yıkanarak uzaklaştırılmıştır. Dilimleme aparatında 1x1 cm boyutlarında küplere ayrılan kırmızı pancar örnekleri falkon tüplere tartılmış (3.07±0.10 g) ağırlığının 15 katı saf su ilave edilerek 40, 60 ve 80 °C'de 5-210 dk içerisinde ultrasonik banyoda (ISOLAB-3L, ultrasonik güç; 120W, 40 Hz, 5-80°C, 1-60 dk) betalainlerin ekstraksiyonu sağlanmıştır. Özellikle uzun süreli ekstraksiyonlarda sıcaklığın sabit tutulması için ortama soğuk su ilavesi ve fazla suyun tahliyesi sağlanarak, sıcaklık sapmaları (±2°C) düşürülmüştür. Ekstraksiyon süresi tamamlanan örnekler, buzlu su içerisinde soğutulup, süzildikten sonra analiz süresine kadar 4°C'de muhafaza edilmiştir.

Betalainler ve toplam betalain miktarı tayini:

Ultrasonik banyoda belirlenen sıcaklık (40, 60 ve 80°C) ve sürelerde (5-210 dk) bekletilmiş ve süzülüş kırmızı pancar örneklerinin sulu (1:15 w/v) ekstraktları santrifüjde 4000 rpm'de 5 dk santrifüj edildikten sonra elde edilen pigment (betasiyanin ve betaksantin) özütlerinin miktarları, 1 cm kuvars küvet kullanılarak, iki farklı dalga boyunda (483 ve 535 nm), Lambert Beer'in yasasına göre UV-VIS spektrofotometrede (Shimadzu UV mini-1240, Japonya) absorbans okuması yapılmış ve aşağıda verilen formüle göre hesaplanmıştır (Castellanos-Santiago ve Yahia, 2008). Sonuçlar kg ekstrakt başına mg pigment olarak ifade edilmiştir.

$$BC = [(A \cdot DF \cdot MW \cdot Vd \cdot 1000) / (e \cdot I \cdot Wd)]$$

BC: Betalain miktarı (mg/kg)

A: 535 nm (betasiyanin) ve 483 nm (betaksantin) dalga boyunda okunan absorbans

DF: Seyreltme faktörü

MW: Betasiyanin (550 g/mol) ve betaksantin (308 g/mol) molekül ağırlığı

Vd: Ekstraksiyon çözeltisinin hacmi (ml)

Wd: Örnek miktarı (g)

e: Molar absorptivite katsayısı, betasiyanin için 60000 L/mol cm, (su içerisinde) betaksantin için 48000 L/mol cm, (su içerisinde)

I: Küvetin çapı (1cm)

Toplam fenolik madde tayini:

Fenolik bileşiklerin alkali ortamda Folin-Ciocalteu çözeltisi ile verdiği rengin absorbansı spektrofotometrede (UV-VIS Shamadzu UV mini-1240), şahit numuneye karşı 725 nm'de okuma yapılarak saptanmıştır (Singleton ve Rossi, 1965). Örnekler ekstrakte edildikten sonra bulanıklığı gidermek amacıyla 4000 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiş, ve renk oluşumu karanlık ortamda 90 dk bekletilerek sağlanmıştır. Toplam fenolik madde miktarı (TFM) gallik asit çözeltisi ile elde edilen kalibrasyon eğrisi kullanılarak gallik asit eşdeğeri (mg GAE/100 g ekstrakt) üzerinden hesaplanmıştır.

DPPH radikal süpürme aktivitesi (% İnhibisyon) tayini:

Örneklerin DPPH radikal süpürme aktivitesi (DPPH-RSA veya % inhibisyon) mor renkli stabil

bir bileşik olan 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) radikalini indirme gücünün ölçülmesine dayanan DPPH yöntemi ile belirlenmiştir (Cemeroğlu, 2010). Analiz için 0.1 ml ekstrakt alınarak 2.9 ml DPPH çözeltisi ilave edilmiştir. 30 °C'de 30 dk bekletildikten sonra 517 nm dalga boyunda ki absorbans değerleri okunmuştur. DPPH radikalinin inhibisyon oranı aşağıdaki eşitliğe göre hesaplanmıştır.

$$\% \text{İnhibisyon} = (\text{Abs}_{\text{kontrol}} - \text{Abs}_{\text{örnek}}) / \text{Abs}_{\text{kontrol}} \times 100$$

Hunter renk değerleri:

Örneklerin Hunter L, a ve b değerleri renk ölçüm cihazı (Konica Minolta Cr-410) ile ölçülmüştür. Örneklerin renkleri, aletin beyaz plakaya göre L=97.79, a= -0.44 ve b=+2.04 olacak şekilde kalibre edilmesinden sonra okunmuştur (Mc Guire, 1992).

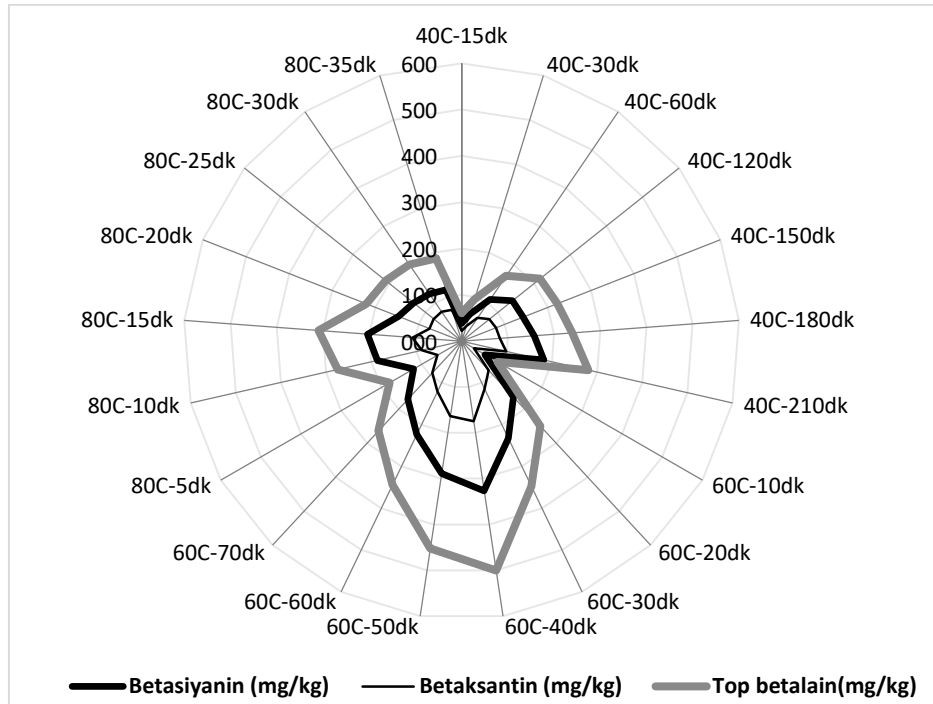
İstatistiksel analiz:

Araştırma Tesadüf Parselleri Faktöriyel Deneme düzende (3 sıcaklık x 7 süre x 2 tekrerrür olmak üzere toplam 42 örnek) kurulup yürütülmüştür.

Verilerin analizinde MİNİTAB 18 istatistik programı kullanılmıştır. Varyans Analizi (ANOVA) sonucunda önemli bulunan varyasyon kaynaklarına ait ortalamalar Tukey Çoklu Karşılaştırma Test'i ile karşılaştırılmıştır (Düzgüneş vd., 1987).

ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

Yapılan Varyans Analizi (ANOVA) sonucunda, araştırmada kullanılan kırmızı pancarın betalainleri (betasiyanin, betaksantin), TFM miktarı, DPPH-RSA ve Hunter renk değerleri (L, a ve b) üzerine, TDUE'da kullanılan sıcaklık (T =40, 60 ve 80°C), süre (t =5-210 dk) ve Txt interaksyonlarının etkisi önemli (P <0.001) bulunmuştur. Önemli çıkan ortalamaların Tukey Çoklu Karşılaştırma Test sonuçları Çizelge 1'de ve grafik ile Şekil 1, 2 ve 3' de gösterilmiştir. TDUE'un sıcaklık derecesi (60 ve 80°C) ve bekletme süresine (5-70 dk) bağlı olarak betalainlerin değişimini yansıtan matematiksel eşitlikler ise Çizelge 2'de verilmiştir.



Şekil 1. Betalainler üzerine termal destekli ultrasonik ekstraksiyonun (°C, dk) etkisi
Figure 1. Effect of thermal assisted ultrasonic extraction (°C, min.) on betalaines

A. Şimşek

Çizelge 1. Termal destekli ultrasonik ekstraksiyona göre kırmızı pancarın bazı bileşimin öğelerine ait ortalamaların Tukey çoklu karşılaştırma testi sonuçları

Table 1. Tukey multiple comparison test results of means of some components of red beetroot according to thermal assisted ultrasonic extraction

Proses (Process) (°C, dak) (°C, min)	N	Betalaınler (mg/kg) (Betalains)			TFM (mg GAE/100g) (TPC)	DPPH-RSA (%) (DPPH-RSA)	Hunter renk değerleri (Hunter colour values)		
		Betasiyanin (Betacyanin)	Betaksantin (Betaxanthin)	Top.Betalain (Total Betalain)			L	a	b
40-15	2	38.079 ^J	22.360 ^H	60.440 ^I	1.765 ^L	2.34 ^J	57.70 ^A	17.98 ^J	-0.99 ^I
40-30	2	61.049 ^U	33.977 ^{FGH}	95.026 ^{GHI}	5.608 ^{KL}	4.38 ^U	52.93 ^B	22.35 ^I	0.88 ^{HI}
40-60	2	109.592 ^{HI}	61.181 ^{EF}	170.772 ^{FGH}	12.513 ^{IJKL}	7.53 ^U	44.48 ^C	33.26 ^{FGH}	5.06 ^{FG}
40-120	2	140.554 ^{EF}	76.155 ^{CDEF}	216.708 ^{DEF}	26.079 ^{GHIJK}	23.46 ^{GHIJ}	39.01 ^{DE}	40.21 ^{ABCD}	9.27 ^{DE}
40-150	2	142.788 ^{EF}	79.409 ^{CDE}	222.198 ^{DEF}	28.223 ^{FGHIJK}	32.79 ^{DEFGH}	37.68 ^{DE}	40.53 ^{ABCD}	9.57 ^{DE}
40-180	2	156.958 ^{DE}	82.774 ^{CDE}	239.732 ^{CDEF}	33.667 ^{FGHI}	32.41 ^{EF}	37.29 ^{DEF}	39.78 ^{ABCD}	9.74 ^{DE}
40-210	2	181.801 ^{CDE}	98.767 ^{CDE}	280.569 ^{CDE}	35.251 ^{EF}	35.94 ^{DE}	36.73 ^{DEF}	39.56 ^{ABCDE}	10.41 ^{CD}
60-10	2	58.507 ^{IJ}	30.740 ^{GH}	89.247 ^{HI}	9.244 ^{JKL}	7.14 ^{IJ}	48.34 ^C	31.03 ^H	2.29 ^{GH}
60-20	2	164.057 ^{CDE}	85.889 ^{CDE}	249.946 ^{CDEF}	29.731 ^{FGHIJ}	26.80 ^{FGHI}	37.05 ^{DEF}	41.49 ^{AB}	10.85 ^{CD}
60-30	2	232.755 ^{BC}	114.631 ^{CD}	347.386 ^{BC}	41.744 ^{EF}	42.05 ^{CDE}	35.98 ^{DE}	41.89 ^A	10.52 ^{CD}
60-40	2	326.347 ^A	174.446 ^A	500.793 ^A	89.474 ^{AB}	69.74 ^{AB}	32.51 ^H	37.10 ^{CDEF}	13.02 ^{BC}
60-50	2	288.830 ^{AB}	163.386 ^{AB}	452.215 ^{AB}	91.190 ^A	68.20 ^{AB}	32.68 ^{GH}	36.66 ^{DE}	12.83 ^{BC}
60-60	2	223.739 ^{BCD}	120.080 ^{BC}	343.819 ^{BC}	66.061 ^{BCD}	60.91 ^{ABC}	33.31 ^{FGH}	36.81 ^{CDEF}	13.36 ^{BC}
60-70	2	170.646 ^{CDE}	93.019 ^{CDE}	263.665 ^{CDEF}	50.710 ^{CDEF}	52.92 ^{AB}	35.65 ^{EF}	36.43 ^{DE}	14.51 ^{AB}
80-5	2	119.393 ^{FGHI}	59.986 ^{EF}	179.379 ^{EF}	23.174 ^{HIJKL}	14.29 ^{HIJ}	39.93 ^D	41.25 ^{AB}	5.80 ^F
80-10	2	186.193 ^{CDE}	87.991 ^{CDE}	274.183 ^{CDEF}	36.224 ^{EF}	33.10 ^{DE}	38.51 ^{DE}	40.91 ^{ABC}	7.26 ^{EF}
80-15	2	203.695 ^{CDE}	106.342 ^{CD}	310.037 ^{CD}	44.022 ^{DE}	47.73 ^{BCDE}	36.65 ^{DE}	40.16 ^{ABCD}	13.36 ^{BC}
80-20	2	146.231 ^{EF}	74.816 ^{DE}	221.048 ^{DEF}	40.767 ^{EF}	55.1075 ^{ABCD}	37.85 ^{DE}	38.65 ^{AB}	14.69 ^{AB}
80-25	2	132.701 ^{FGH}	77.099 ^{CDEF}	209.800 ^{DEF}	48.676 ^{CDE}	59.7926 ^{ABC}	37.76 ^{DE}	37.41 ^{BCDE}	15.69 ^{AB}
80-30	2	123.616 ^{FGHI}	76.749 ^{CDEF}	200.365 ^{EF}	71.115 ^{ABC}	71.6974 ^A	38.23 ^{DE}	35.50 ^{EF}	16.84 ^A
80-35	2	115.969 ^{GHI}	70.655 ^{DE}	186.624 ^{EF}	57.760 ^{CDE}	64.4393 ^{ABC}	39.2225 ^{DE}	32.83 ^{GH}	17.06 ^A

TFM (Toplam fenolik madde), TPC (Total phenolic content)

DPPH-RSA (DPPH-Radikal süpürme aktivitesi), DPPH-RSA (DPPH-Radical scavenging activity)

^{A-L} Aynı harfle işaretlenmiş ortalamalar birbirinden istatistiki açıdan farklıdır.

** Prosesse göre bileşim unsurları ortalamaları arasındaki farkı gösterir ($P < 0.01$)

^{A-L} The averages marked with the same letter are not statistically different from each other.

** Indicates the difference between composition component averages according to process ($P < 0.01$)

Toplam betalaınlerin içerisinde betasiyaninlerin betaksantinlere göre yaklaşık 2 kat daha fazla olduğu, ekstraksiyon ilerledikçe artan sıcaklık (40, 60 ve 80°C) ve süreye (5-210 dk) göre bu oranın korunduğu Çizelge 1 ve Şekil 1'den izlenebilir. Kırmızı pancarın 40°C-15 dk ekstraksiyonu sonrasında ekstraktlardaki betasiyanin, betaksantin ve toplam betalaın değerleri sırasıyla 38.08, 22.36 ve 60.44 mg/kg, 40°C-210 dk

uygulamanın sonunda ise 181.80, 98.77 ve 280.57 mg/kg değerini almıştır. TDUE'un 60 ve 80°C'de farklı sürelerdeki uygulamaları ile mukayese edildiğinde, ulaşılan en yüksek süre olan 210 dk'da dahi betalaınlerin ekstraksiyonun tamamlanmadığı ve betalaınlerde azalma veya ısıl bozulmanın ise olmadığı tesbit edilmiştir. TDUE'da ekstraksiyon sıcaklığının 20°C artırılarak 60°C'ye çıkarılması halinde ilk 10 dk sonunda

betalainlerden, betasiyaninlerin % 52 (58.50 mg/kg), betaksantinlerin % 36 (30.74 mg/kg) ve toplam betalainlerin % 48 (89.24 mg/kg) oranında artış gösterdiği saptanmıştır. Betasiyanin, betaksantin ve toplam betalainler, 60°C'de artan ekstraksiyon süreleri ile 40 dk sonuna kadar artış gösterip, maksimum değere ulaşırken (326.35, 174.45 ve 500.79 mg/kg), bu süreyi takip eden sürelerde ise betainlerin azalmaya başladığı, 60°C'nin 70 dk uygulaması ile % 48 kayıpla en düşük değeri (263.66 mg/kg) aldığı görülmüştür. TDUE'un 80°C'de ilk bekletme süresi olan 15 dk sonunda sulu ekstraktta toplam betalainlerin en fazla 310 mg/kg'a kadar çıktığı, fakat artan süreler ile belirgin şekilde azaldığı izlenmiştir. Aynı zamanda 80°C'de 15 dk sonunda ulaşılan en yüksek toplam betalain değerinin, 60°C'nin 60 dk uygulamasında ulaşılan değerinden altında kaldığı saptanmıştır (Çizelge 1 ve Şekil 1).

Diğer taraftan, kırmızı pancar ve kaktüs meyvesi betalainlerin en iyi kaynakları arasında gösterilmektedir. Kaktüs meyvelerinden (*S. stellatus*) alınan 32 pulp örneğinde toplam kuru maddede olmak üzere 856.07–9248 µg/g arasında (Pérez-Loredo, vd., 2016), kırmızı pancarda 8600 µg/g, dikenli armutta (*Opuntia* spp.) 170-8150 µg/g, (Castellanos-Santiago ve Yahia, 2008), aynı meyvenin (*Opuntia ficus indica*) sarı renkli meyvelerinde 37.8 µg/g (betaksantin olarak) ve kırmızı renkli meyvelerinde ise 102 µg/g (betalain ve betaksantin toplamı) (Khatabi, vd., 2016) betalain tesbit edilmiştir. Örneklerimizden termal ultrasonik ekstraksiyon yolu ile elde edilen toplam betalain miktarı (500.79 mg/kg ekstrakt) yukardaki bulgular ile karşılaştırıldığında nispi azalış göstermesine rağmen, betalainlerin büyük kısmının elde edilebildiği ortaya çıkmıştır. Kayıpların sıcaklık ve süre yanında kırmızı pancarın bileşimi (su, mineral madde, ortamın pH'sı, VitC, vs), pancarın parçalanması ve bekletilmesi sırasındaki enzimatik faaliyetler, ışık ve oksijen teması ilgili olduğu düşünülmektedir (Roy vd. 2004; Stintzing ve Carle, 2004). Nitekim, konuyla ilgili olarak yapılan bir çalışmada, betalainlerin ekstraksiyonunda renk maddelerinin stabilitesinin sağlanması için ortamın pH'nın 5, Vit C'nin ise % 0.25 oranında bulunmasının önemli olduğu, ayrıca ortamdaki şeker, pektik

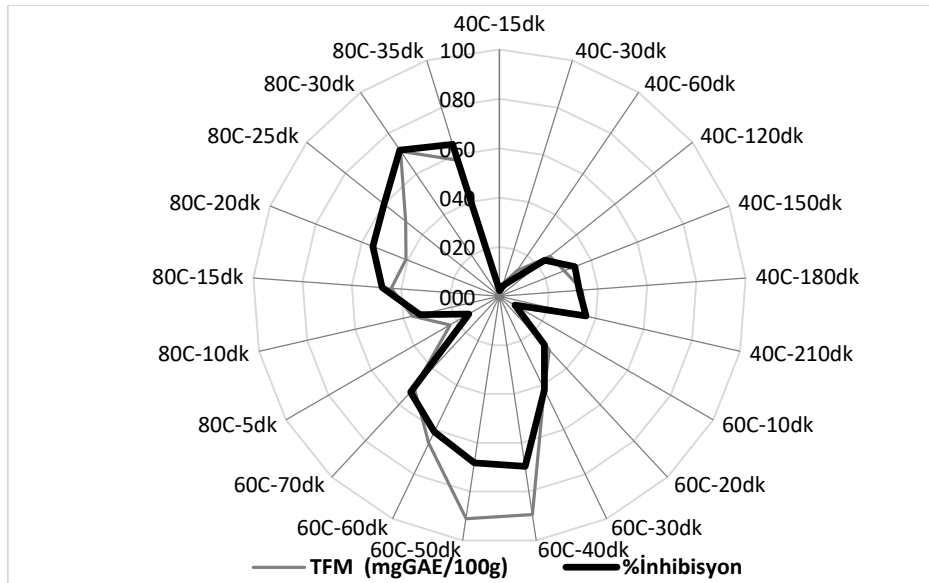
madde ve organik asitlerin çözücüye geçen pigment konsantrasyonunu etkilediği vurgulanmıştır. Bununla birlikte ortamda bulunan flavanların (kateşinler ile schiff bazı oluşturma) betalainleri koruduğu (Khan ve Giridhar, 2015; Khan, 2016) belirtilmektedir ki, yapılan çalışmalar kırmızı pancarın fenolik bileşikler açısından zengin olduğunu göstermektedir (Ninfali ve Angelino, 2013).

Bir diğer önemli sonuç, termal ultrasonik ekstraksiyonda uygulanan 60 ve 80°C'e ait artan sürelerin, betalainleri etkilediği ve betalainlerde kısmi bir azalmaya veya parçalanmaya sebep olduğudur. Farklı araştırmacılar 70°C altındaki sıcaklıklarda betalainlerin parçalanmasında enzimlerin (glikozoksidaz, peroksidaz ve polifenoloksidaz) etkili olabileceğini, inaktivasyonu için 70°C'de 2 dk uygulamanın yeterli olduğunu vurgulamışlardır (Delgado-Vargas vd., 2000; Ravichandran vd., 2013). Bir diğer araştırmacı, betalainlerin korunmasında etkili bir diğer yöntemin ortamdaki serbest suyun bağlanması ((β-siklodekstrin (β-CD), hidroksipropil-β-CD (HP-β-CD) ve sülfobütiler-β-CD (SBE-β-CD)) olduğunu belirtmiştir (Khan, 2016). Bir model sistemindeki betaksantinlerin ışık ve oksijen hariç tutulursa 40°C'de stabil, fakat 40°C'nin üzerindeki sıcaklıklarda ise betasiyaninler gibi sıcaklık derecelerine karşı hassas olduğu vurgulanmıştır (Cai vd., 2001; Roy vd., 2004). İşlenen gıdalara uygulanan mikrodalga, pişirme, kızartma ve vakumda koyulaştırma gibi ısı işlemlerin, betalainlerin parçalanmasına neden olduğu birçok araştırmacı tarafından belirtilmektedir. Fakat bir kısım araştırmacı, özellikle mikrodalga'nın 900W, 30 s (% 7) ve 1800W, 30 s (% 19) gibi yüksek ışınlamalarının betaksantinlerde artışa neden olduğunu belirtmektedir (Ravichandran vd., 2013). Cardoso-Ugarte vd. (2014) dondurularak kurutulmuş kırmızı pancarda mikrodalga ekstraksiyonu ile optimum miktarda betainlerin eldesinde 400W, 90-120 s'in, maksimum miktarda betaksantinlerinin eldesinde ise 400W, 140-180 s'in yeterli olduğunu bildirmişlerdir. Aynı çalışmada, çözücü içerisine ilave edilen 0.04 mol/L askorbik asitin iki aşamalı mikrodalga ekstraksiyonunda daha zengin pigment konsantrasyonu

(187.67±26.99 mg/100g) verdiği saptanmıştır. Bir diğer çalışmada vakum altında kurutulmuş kırmızı pancar dilimlerinden elde edilen ekstraktlardaki betasiyanin ve betaksantin miktarının vakum uygulanmadan kurutulmuş örneklerle göre daha yüksek bulunmuş, kontrol örneğine göre betasiyaninlerin % 20 oranında, betaksantinlerin ise % 12 oranında arttığı belirlenmiştir. Betalainlerin korunmasını, ortamdaki oksijenin olumsuz etkisinin ortadan kaldırılmasıyla açıklamışlardır. Isıl işlemlerde kaynama ve kızartma derecelerine ulaşırsa betalainlerde parçalanma olduğu bildirilmektedir ki, konuyla ilgili olarak kırmızı pancar ile yapılan çalışmada, kaynama derecelerinde 60, 120 ve 180 s'lik kısa süreli uygulamaların betasiyaninleri sırasıyla % 6, % 22 ve % 51, betaksantinleri ise % 18, % 23 ve % 33 oranında azalttığı belirlenmiştir (Khan, 2016). Sıcaklığın etkisi ile betalainlerin parçalanması; aldimin bağının bozulması, izomerizasyon, dehidrojenizasyon, dekarboksilasyon, deglikosilasyon reaksiyonları ve ısı-asit ortak etkisi ile ilişkilendirilerek açıklanmıştır (Herbach vd. 2004; Ravichandran vd., 2013; Khan, 2016).

TDUE'da 40°C de 15-210 dk arasında bekletilen ekstraktlardaki TFM miktarı 1.76 mg

GAE/kg'dan 35.25 mg GAE/kg'a ve DPPH-RSA ise % 2.34'den % 35.94'de kadar artış göstermiştir. Toplam betalain değerinin yanı sıra TFM miktarı arttıkça, DPPH-RSA değerinin de artış gösterdiği görülmüştür. TDUE'da, 60°C'de 40-50 dk arasında bekletilen sulu ekstraktlarda, TFM ve DPPH-RSA değeri maksimum değere ulaşmış sırasıyla 89-91.2 mg GAE/100 g ekstrakt ve % 68-69.7 arasında değişmiştir. Söz konusu sıcaklık derecesinde artan süreler, betalainlerde olduğu gibi TFM'nin ve dolayısıyla DPPH-RSA değerinin de azalmasına neden olmuştur. TDUE'da sıcaklık derecesinin 80°C'ye çıkarılması halinde 5 dk süre sonunda TFM'nin, 40°C'nin 15 dk'a göre 13 kat ve 60°C'nin 10 dk'a göre ise 2.5 kat, DPPH-RSA'nın ise aynı sıcaklık derecelerinde sırasıyla 2 ve 3 kat arasında arttığı belirlenmiştir. TFM değişimine benzer değişim ve DPPH-RSA değerinde de görülmüştür. Betalainlerin değişiminden farklı olarak TFM miktarı ve DPPH-RSA değeri 80°C'nin 30 dk'a kadar artış göstermiş, sonra düşmüştür. Diğer taraftan 80°C'de ulaşılan en yüksek TFM ve DPPH-RSA değerleri, 60°C'de ulaşılan maksimum TFM değerinden daha düşük değer vermiş, DPPH-RSA değeri ise benzer sınırlar içerisinde yer almıştır.

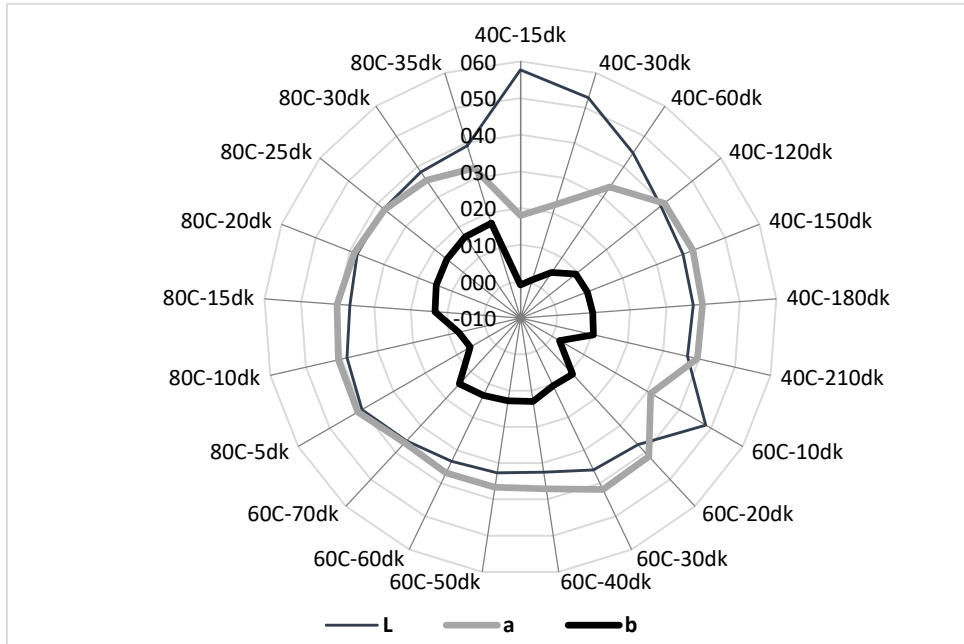


Şekil 2. TFM ve DPPH-RSA (% İnhibisyon) üzerine termal destekli ultrasonik ekstraksiyonun (°C, dk) etkisi

Figure 2. Effect of thermal assisted ultrasonic extraction (°C, min.) on TPM and DPPH-RSA (Inhibition %)

Hunter L değerinin üzerine 40°C'de farklı sürelerde uygulanan termal ultrasonik etki ile azaldığı, başlangıçta negatif olan (mor-viyole) Hunter b değeri ortalamasının daha sonra artan TDUE süresi ile artış göstererek pozitif değere yani betanın kaybı nedeniyle rengin daha sarımsı-

kahverengiye dönüştüğü, kırmızılığın göstergesi olan a değerinin ise 40°C-150 dk'lık TDUE uygulamasına kadar arttığı daha sonra hafifçe azaldığı bu azalışın ise istatistiki olarak önemli olmadığı saptanmıştır (Çizelge1, Şekil 3).



Şekil 3. Hunter renk değerleri (L, a ve b) üzerine termal destekli ultrasonik ekstraksiyonun (°C, dk) etkisi

Figure 3. Effect of thermal assisted ultrasonic extraction (°C, min.) on Hunter color values (L, a and b)

Diğer taraftan TDUE'un 60°C-40 dk uygulamasının sonuna kadar Hunter L değeri azalış göstermiş, aynı sıcaklık derecesinin 50, 60 ve 70 dk sonunda ise hafifçe yükselme göstermiştir. Hunter a değeri 60°C-40 dk uygulamasına kadar artış, aynı sıcaklık derecesinin artan sürelerinde ise azalma eğilimi göstermiştir. Hunter b değeri ise 60°C'nin tüm bekletme sürelerinde dalgalanma olmasına karşın artış göstermiş ve 70 dk sonunda 14.51 ortalama değerine ulaşmıştır. TDUE'un uygulandığı bir diğer sıcaklık derecesi 80°C'nin 5-15 dakikalıkları arasında Hunter L değerinin, 39.93 den 36.65'e düştüğü, 15-35. dakikalıkları arasında ise değişimin olmadığı veya ortalamaların istatistiki olarak benzer olduğu ortaya çıkmıştır. Hunter a değeri ise 80°C'nin 5-35 dakikalık bekletme sürelerinde 41.25 den 32.83'e kadar azalış gösterirken, Hunter b değeri ise 5.80 den 17.06'a kadar artış göstermiştir.

Kırmızı pancarın betalainleri, TDUE'un 60 ve 80 °C'de 5-70 dk uygulamaları ile en yüksek değere ulaşmış ve daha sonra artan sıcaklık süresi ile belirgin şekilde azalış gösterdiği için bu sıcaklık derecelerinde değişim gösteren betalainlere ait veriler, çoklu regresyon analizine tabi tutulmuş ve regresyon katsayıları ($R^2 > \% 80$) yüksek olan eşitlikler ortak matematiksel model olarak Çizelge 2' de verilmiştir.

Betasiyanin, betaksantin ve toplam betalain verilerine göre regresyon analizi sonucunda daha yüksek R^2 değerlerine (% 85-87) sahip parabolik regresyon eşitliği veya üç boyutlu polinom eşitliklerinin hesaplamalarda kullanılması halinde TDUE koşullarında sıcaklık (T) ve süreye (t) bağlı olarak betalainlerin değişiminin daha doğru olarak hesaplanabileceği ortaya çıkmıştır.

Çizelge 2. Kırmızı pancar betalain bileşimi ile TDUE'nin farklı sıcaklık (60-80°C) ve süreleri (5-70 dk) arasındaki matematiksel eşitlikler ($P < 0.01$)Table 2. The mathematical equations between betalain composition of red beetroot and different temperature and time of TAUE ($P < 0.01$)

Parametre (Parameter)		Matematiksel Eşitlikler (Mathematical Equations)	Model R ² (%)
Betasiyanin (Betacyanin)	BS	= -783 + 11.23 T + 52.71 t - 0.2049 t ² - 0.5749 T*t	87.80
	P	(0.000) (0.000) (0.000) (0.000) (0.000)	(0.000)
Betaksantin (Betaxanthin)	BK	= -392.9 + 5.531 T + 26.33 t - 0.1078 t ² - 0.2769 T*t	85.22
	P	(0.000) (0.000) (0.000) (0.000) (0.000)	(0.000)
Toplam betalain (Total betalain)	TB	= -1176 + 16.76 T + 79.04 t - 0.3127 t ² - 0.8518 T*t	87.36
	P	(0.000) (0.000) (0.000) (0.000) (0.000)	(0.000)

T: Sıcaklık (°C), t: Süre (saat)

T: Temperature (°C), t: Time (hour)

Matematiksel modellerde, betalainlerin üzerine sıcaklık (T) ve sürenin (t) linear (primer), sürenin kuadratik (sekonder) etkisi yanında sıcaklık ve sürenin interaksiyon (T*t) etkisinin de önemli olduğu tespit edilmiştir ($P < 0.001$). Modellerin T ve t'ye ait katsayıları incelendiğinde, betalainlerin değişiminde t'nin linear etkisinin, T'nin linear etkisi, t'nin kuadratik etkisi ile T*t etkisinden daha yüksek olduğu görülmüştür ($P < 0.001$). Ayrıca, tüm regresyon eşitlikleri incelendiğinde T ve t'ye ait katsayıların linear etkisinin betasiyanin, betaksantin ve toplam betalain eşitliklerinde pozitif, t ve T*t'nin katsayılarının ise negatif yönde etkide bulunduğu tespit edilmiştir. Bir başka ifadeyle, denklemin ilk kısmında T ve t'nin linear etkisinin ekstraktlarda betalainlerin artışına neden olduğu, denklemin ikinci kısmında yer alan t'nin kuadratik ve T*t interaksiyon etkisi ile de betalainlerin azalışına neden olduğu belirlenmiştir.

SONUÇ

Kırmızı pancar ülkemizin de dahil olduğu Akdeniz diyetinde yer alan, salatalarda ve turşu veya fermente suyu olarak yaygın şekilde tüketilen bir sebzedir. Diğer taraftan kırmızı pancardan elde edilen betalainler gıda sanayinde doğal renklendirici olarak muhtelif gıdalarda kullanılmaktadır. Betalainlerin dahil olduğu tüm doğal renk maddelerinin ekstraksiyonu için uygun ekstraksiyon metodlarının yanı sıra optimal koşullarının ortaya konulması günümüzde

tartışılmakta ve araştırılmaktadır. Bu çalışma kapsamında TDUE yönteminin uygunluğu kırmızı pancar betalainleri üzerinde araştırılmış, sonuçta 40°C de uygulanan TDUE ait sürelerin, hem betalainler hem de TFM'nin ekstraksiyon için yeterli olmadığı çok uzun süre gerektirdiği ve uygulamada kullanılmasının anlam taşımadığı ortaya çıkmıştır. TDUE kullanılan sıcaklık dereceleri ve sürelerine karşılık betalainler, TFM, DPPH-RSA, Hunter L, a ve b değerinin değişimi karşılaştırıldığında 60-80°C'de uygulanan sürelerin daha belirgin sonuç verdiği saptanmıştır. Elde edilen matematiksel eşitliklerin betalainlerdeki değişimi yansıttığı ve optimum sıcaklık ve süreleri belirlemede yüksek doğrulukta ($R^2 = \% 84-87$) kullanılabileceği ortaya çıkmıştır.

KAYNAKLAR

- Amirasgari, N., Mirsaeedghazi, H. (2015). Microfiltration of red beet juice using mixed cellulose ester membrane *J Food Process Preserv*, 39, 614-623.
- Amirasgari, N., Mirsaeedghazi, H. (2016). Non-thermal production of natural betalain colorant concentrate from red beet extract by using the osmotic distillation. *Nutr Food Sci Res*, 3(2): 27-34.
- Cai, Y., Sun, M., Schliemann, W., Corke, H. (2001). Chemical Stability and Colorant Properties of Betaxanthin Pigments from *Celosia argentea*, *J Agric Food Chem*, 49, 4429-4435.

- Castellanos-Santiago, E., Yahia, E.M. (2008). Identification and quantification of betalains from the fruits of 10 mexican prickly pear cultivars by high-performance liquid chromatography and electrospray ionization mass spectrometry, *J Agric Food Chem*, 56, 5758–5764.
- Cardoso-Ugarte, G.A., Sosa-Morales, M.E., Ballard, T., Liceaga, A., San Martin-Gonzalez, M.F. (2014). Microwave-assisted extraction of betalains from red beet (*Beta vulgaris*). *LWT- Food Sci Technol*, 59, 276-282.
- Cemeroğlu, B. (2010). Gıda Analizleri, Gıda Teknolojisi Derneği Yayınları, No: 34, Ankara, 657 s., ISBN 978-975-98578-6-8.
- Delgado-Vargas, F., Jiménez, A.R., Paredes-López, O. (2000). Natural pigments: Carotenoids, anthocyanins, and betalains characteristics, biosynthesis, processing, and stability, *Crit Rev Food Sci Nutr*, 40, 173–289.
- Düzgüneş, O., Kesici, T., Gürbüz, F. (1987). Araştırma ve deneme metotları. Ankara Üniv. Yayın No:1021, 381s. Ankara.
- Gengatharan, A., Dykes, G.A., Choo, W.S. (2015). Betalains: Natural plant pigments with potential application in functional foods, *LWT - Food Sci Technol*, 64, 645-649.
- Gliszczynska-Świgło, A., Szymusiak, H., Malinowska, P. (2006). Betanin the main pigment of red beet- molecular origin of its exceptionally high free radical scavenging activity, *Food Addit Contam*, 23(11): 1079-1087.
- Herbach, K.M., Stintzing, F.C., Carle, R. (2004). Impact of thermal treatment on color and pigment pattern of red beet (*Beta vulgaris* L.) preparations. *J Food Sci*, 69(6): 491-498.
- Khan, M.I., Giridhar, P. (2015). Plant betalains: Chemistry and biochemistry, *Phytochemistry*, 117, 267-295.
- Khan, M.I. (2016). Stabilization of betalains: A review, *Food Chem*, 197, 1280-1285
- Khatabi, O., Hanine, H., Elothmani, D., Hasib, A. (2016). Extraction and determination of polyphenols and betalain pigments in the Moroccan Prickly pear fruits (*Opuntia ficus indica*), *Arab J Chem*, 9(1): 278-281.
- Mc Guire, R.G. (1992). Reporting of objective color measurements. *Hortscience*, 27(12): 1254-1255.
- Ninfali, P., Angelino, D. (2013). Nutritional and functional potential of *Beta vulgaris* and *rubra*. *Fitoterapia*, 89, 188-199.
- Pérez-Loredo, M.G., García-Ochoa, F., Barragán Huerta B.E. (2016). Comparative analysis of betalain content in *stenocereus stellatus* fruits and other cactus fruits using principal component analysis, *Int J Food Prop*, 19, 326-338.
- Ravichandran, K., Thaw Saw, N.M.M., Mohdaly, A.A.A., Gabr, A.M.M., Kastell, A., Riedel, H., Cai, Z., Knorr, D., Smetanska, I. (2013). Impact of processing of red beet on betalain content and antioxidant activity, *Food Res Int*, 50, 670-675.
- Roy, K., Gullapalli, S., Roy Chaudhuri, U., Chakraborty, R. (2004). The use of a natural colorant based on betalain in the manufacture of sweet products in India, *Int J Food Sci Technol*, 39, 1087-1091.
- Singleton, V.L., Rossi, J.A.Jr. (1965). Colorimetry of total phenolics with phophomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am J Enol Vitic*, 6:144-158.
- Stintzing, F.C., Carle, R. (2004). Functional properties of anthocyanins and betalains in plants, food, and in human nutrition, *Trends Food Sci Technol*, 15(1): 19-38.
- Strack, D., Vogt, T., Schliemann W. (2003). Recent advances in betalain research, *Phytochemistry*, 62, 247-269.
- Swarna, J., Lokeswari, T.S., Smita, M., Ravindhran, R. (2013). Characterisation and determination of in vitro antioxidant potential of betalains from *Talinum triangulare* (Jacq.) Willd, *Food Chem*, 141(4): 4382-4390.