



T.C.  
NECMETTİN ERBAKAN  
ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**KOPİGMENTASYON İLE *Hibiskus*  
*Sabdariffa*'DAN STABİL ANTOSİYANİN BAZLI  
GIDA RENKLENDİRİCİLERİNİN ÜRETİMİ VE  
MODEL GIDALARA UYGULANMASI**

**Vildan EYİZ**

**DOKTORA TEZİ**

**Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı**

**Ekim-2024  
KONYA  
Her Hakkı Saklıdır**

## TEZ KABUL VE ONAYI

Vildan EYİZ tarafından hazırlanan “Kopigmentasyon ile Hibiskus sabdariffa’ dan Stabil Antosiyanin Bazlı Gıda Renklendiricilerinin Üretimi ve Model Gıdalara Uygulanması” adlı tez çalışması 03/10/2024 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Necmettin Erbakan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı’nda DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.

### Jüri Üyeleri

### İmza

#### Başkan

Prof. Dr. Derya ARSLAN DANACIOĞLU

.....

#### Danışman

Prof. Dr. Selman TÜRKER

.....

#### Üye

Doç. Dr. Kübra Sultan ÖZDEMİR BİLİCİ

.....

#### Üye

Prof. Dr. Kürşat DEMİR

.....

#### Üye

Dr. Öğr. Üyesi Mine ASLAN

.....

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu’nun ....../.../20.. gün ve ..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Havvanur UÇBEYİAY  
FBE Müdürü

## **TEZ BİLDİRİMİ**

Bu tezdeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edildiğini ve tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

## **DECLARATION PAGE**

I hereby declare that all information in this document has been obtained and presented in accordance with academic rules and ethical conduct. I also declare that, as required by these rules and conduct, I have fully cited and referenced all material and results that are not original to this work.

Vildan EYİZ

Tarih: 03.10.2024

## ÖZET

### DOKTORA TEZİ

# KOPİGMENTASYON İLE *Hibiskus Sabdariffa*'DAN STABİL ANTOSİYANİN BAZLI GIDA RENKLENDİRİCİLERİNİN ÜRETİMİ VE MODEL GIDALARA UYGULANMASI

Vildan EYİZ

Necmettin Erbakan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü  
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Selman TÜRKER  
Doç. Dr. İsmail TONTUL

2024, 197 Sayfa

Jüri

Prof. Dr. Selman TÜRKER  
Prof. Dr. Derya ARSLAN DANACIOĞLU  
Doç. Dr. Kübra Sultan ÖZDEMİR BİLİCİ  
Prof. Dr. Kürşat DEMİR  
Dr. Öğr. Üyesi Mine ASLAN

Bu çalışmada bezelye protein izolatu, pirinç protein izolatu, gluten ve peynir altı suyu protein izolatlarından farklı şartlarda (distile su veya NaCl çözeltileri içinde 24, 36 ve 48 saat asidik ısıtma ile) düz ve kıvrımlı nanofibriller elde edilmiştir. Elde edilen nanofibrille proteinler *Hibiskus sabdariffa* antosiyaninleri ile kopigmente edilerek elde edilen örneklerde batokromik kayma, hiperkromik etki ve termal stabilite testleri yapılmıştır. Kontrol amaçlı hiçbir ön işleme tabi tutulmayan doğal protein izolatları ile de kopigmentasyon gerçekleştirilerek aynı analizler gerçekleştirilmiştir. Termal stabilite testi için toplam monomerik antosiyanin (TMA) ve polimerik renk tayini gerçekleştirilmiştir. Analiz sonuçları kinetik hesaplamalarda kullanılmış ve bozulma kinetiğinin parametreleri belirlenmiştir. Kinetik hesaplamalar sonucunda elde edilen aktivasyon enerjisi ( $E_a$ ) ve termal direnç sıcaklığı ( $z$ ) değerlerine göre en uygun kopigmentasyon ajanları belirlenmiştir. Kopigmentasyonun gerçekleştiğini kanıtlamak ve oluşan bağları daha detaylı incelemek amacıyla Fourier Dönüşümlü Kızılötesi (FTIR) Spektroskopi ve Floresans Spektroskopi analizleri gerçekleştirilmiştir. Seçilen kopigmentasyon ajanları ile kopigmente edilen hibiskus ekstraktları kırınım pencereci kurutulucuda kurutulmuş toz haline getirilmiştir. Toz ürünlerde toplam fenolik madde (TFM), TMA, 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl radikalinin inhibisyonu (DPPH), Demir İndirgeme Antioksidan Gücü (FRAP) ve Bakır (II) İyonu İndirgeme Esaslı Antioksidan Kapasitesi (CUPRAC) analizleri gerçekleştirilerek örneklerin bazı kimyasal özellikleri belirlenmiştir. Elde edilen toz kopigmente örnekler belirli oranlarda yoğurt (%1.5) ve yumuşak şekerleme ürünlerine (%1) katılarak depolama stabilitesi de belirlenmiştir. Bu aşamada kontrol olarak doğal renk maddesi (siyah havuç özütü) ve sentetik renk maddesi (allura red) kullanılmıştır. Yumuşak şekerleme örnekleri 32 gün, yoğurt örnekleri ise 16 gün depolanarak belirli günlerde TMA ve renk tayini yapılmıştır. Yapılan analizler sonucunda depolamaya en dayanıklı kopigmente örnekler belirlenmiştir.

Kopigment eklenmiş hibiskus ekstraktlarının maksimum dalga boyundaki absorpsiyon artışı (hiperkromik etki) ve maksimum dalga boyunda kaymanın meydana gelmesi (batokromik kayma) kopigmentasyonun gerçekleştiğini göstermektedir. Kontrol örneğinin maksimum dalga boyu 519 nm iken düz nanofibrillerle kopigmente edilmiş örneklerinin dalga boyları 519-524 nm değerleri arasında bulunmuştur. Pozitif yönde 1-6 birim arasında bir kayma meydana gelmiştir. Düz nanofibriller ile kopigmente edilmiş örnekler %0.23-33.84 değerleri arasında hiperkromik etki göstermiştir. Kıvrımlı nanofibriller ile kopigmente edilmiş örneklerin dalga boyları ise 519-522 nm değerleri arasında bulunmuştur. Pozitif yönde 1-4 birim arasında bir kayma meydana gelmiştir. Kıvrımlı nanofibriller ile kopigmente edilen örnekler %5.79-40.32 değerleri arasında hiperkromik etki sağlamıştır.

Düz nanofibrillerle kopigmente edilen örneklerde protein çeşidine göre polimerik renk yüksekten düşüğe sırasıyla gluten (NG), peyniraltı suyu proteini (NPAS), bezelye (NB) ve pirinç (NP) örneklerine ait bulunmuştur. Kıvrımlı nanofibrille pirinç proteini ile kopigmente edilen hibiskus ekstraktlarının polimerik renk değerleri bezelye (CB) ve peynir altı suyu proteini ile kopigmente edilen örneklerden (CPAS) daha yüksek bulunmuştur. Polimerik renk değerinin yükselmesi antosiyaninlerin parçalanmasına bağlı olarak kahverengi bileşenlerin meydana geldiğinin bir göstergesidir. Hem düz hem de kıvrımlı nanofibrillerle kopigmente edilen örneklerde sıcaklık artışı ile polimerik renk değerlerinde artış meydana gelmiştir. 24 saat boyunca nanofibrilasyona tabi tutulan proteinlerle kopigmente edilen örneklerin polimerik renk değerleri 36 ve 48 saat nanofibrilasyona tabi tutulanlara oranla daha düşük bulunmuştur.

Kinetik hesaplamalar sonucunda antosiyanin değişiminin parçalanma hız sabitleri (k), korelasyon katsayıları ( $R^2$ ), z değerleri ve  $E_a$  belirlenmiştir. Farklı kopigmentasyon ajanları ile kopigmente edilen hibiskus ekstraktlarının kinetiğine ait regresyon denkleminin  $R^2$  değerleri 0.90'ın üzerinde bulunmuştur. Kopigmente hibiskus örneklerinde antosiyanin degradasyonu beklenildiği gibi sıcaklığın artmasıyla beraber hızlanmıştır. Çalışmanın devamında kullanılacak örnekler seçilirken z ve  $E_a$  değerleri yararlanılmıştır. Hesaplamalar sonucunda yüksek z değerleri nedeniyle 24NP (24 saat fibrilasyona tabi tutulmuş düz nanofibrille pirinç proteini ile kopigmente edilen hibiskus ekstraktı), 24NG (24 saat fibrilasyona tabi tutulmuş düz nanofibrille gluten ile kopigmente edilen hibiskus ekstraktı), 24CB (24 saat fibrilasyona tabi tutulmuş kıvrımlı nanofibrille bezelye proteini ile kopigmente edilen hibiskus ekstraktı) ve 48CP (48 saat fibrilasyona tabi tutulmuş kıvrımlı nanofibrille pirinç proteini ile kopigmente edilen hibiskus ekstraktı) örnekleri, yüksek  $E_a$  değerleri ve uygun parçalanma hız sabiti (k) değerleri nedeniyle 24NPAS (24 saat fibrilasyona tabi tutulmuş düz nanofibrille peynir altı suyu proteini ile kopigmente edilen hibiskus ekstraktı) ve 48CPAS (48 saat fibrilasyona tabi tutulmuş kıvrımlı nanofibrille peynir altı suyu proteini ile kopigmente edilen hibiskus ekstraktı) örnekleri seçilmiştir.

Nanofibrille edilmiş proteinler ve antosiyaninler arasında gerçekleşen bağ oluşumunu izlemek ve doğrulamak amacıyla FTIR analizi gerçekleştirilmiştir. 3000-3500  $cm^{-1}$  (-OH gerilimi) ve 1600-1650 ( $C=O$  gerilimi)  $cm^{-1}$  dalga boylarında büyük pikler görülürken, 2000-2200 (N-H gerilimi)  $cm^{-1}$  ve 600-1000  $cm^{-1}$  ( $C=C$  gerilimi) aralığında da bazı dalgalanmalar meydana gelmiştir. Kopigmentasyon ile oluşan bu dalgalanmalar protein ve antosiyanin arasında oluşan bağlara atfedilmektedir. Özellikle proteinlerin yapısında meydana gelen konformasyonel değişimleri incelemek amacıyla 1600-1700  $cm^{-1}$  arası bölgeye bakılmaktadır. Nanofibrilasyon işlemi ile bu bölgede kaymalar meydana gelmiştir. Bu kayma  $\alpha$ -heliks yapılarının azalması, antosiyaninler ile asil etkileşimin gerçekleştiğini ve  $\beta$ -plaka yapılarının artması ile pik kaymasının meydana geldiğini göstermektedir.

Kopigmentasyon ajanlarının hibiskus antosiyaninleri ile etkileşimini incelemek amacıyla floresan spektroskopisi analizleri gerçekleştirilmiştir. Bu analiz sonuçlarına göre kopigmente örneklerin floresans yoğunluğu düz ve kıvrımlı nanofibrille proteinlere oranla çok düşüktür. Yani kopigmentasyon floresans yoğunluğunu oldukça fazla miktarda sönmüştür. Bu da iki molekül arasında (düz nanofibrille protein-antosiyanin) güçlü bir etkileşim olduğunu göstermektedir. Bunun yanında nanofibrille proteinler doğal protein izolatlarına oranla, nanofibrille proteinlerle kopigmente edilen örneklerde doğal protein izolatları ile kopigmente edilen örneklere oranla daha yüksek floresans emisyonu sağlamıştır. Sonuçlar antosiyaninler ve proteinler arasındaki etkileşimin, proteinlerin floresan kromoforlarının mikro ortamını değiştirdiği, bunun da ikincil yapıyı değiştirerek kompleksin stabilitesini arttırdığını göstermiştir.

Seçilen nanofibrille proteinlerle kopigmente edilen hibiskus ekstraktları köpük haline getirildikten sonra kırınım penceresi kurutucuda 90 °C sıcaklıkta yaklaşık 30 dakika boyunca kurutularak toz haline getirilmiştir. Toz ürünlerde yapılan analizlere göre kontrolle kıyaslandığında 24CB en yüksek toplam monomerik antosiyanin miktarına sahip bulunurken, FRAP sonuçlarına göre 24NP, CUPRAC sonuçlarına göre 48CP'nin antioksidan aktivitesi daha yüksek bulunmuştur.

Hem yumuşak şekerleme hem de yoğurt örneklerinde denenen kopigmente hibiskus ekstraktı tozları arasında 48CP örneğinin toplam monomerik antosiyanin miktarını diğer örneklere kıyasla daha iyi koruduğu gözlenmiştir.

Tez çalışması kapsamında elde edilen sonuçlar genel olarak incelendiğinde düz ve kıvrımlı nanofibriller ile kopigmente edilen hibiskus ekstraktlarının antosiyanin ve renk değerlerinin stabilitesini doğal protein izolatları ile kopigmente edilenlere oranla daha iyi koruduğu gözlemlenmiştir. Ayrıca nanofibrille kopigmente örneklerin model gıdalarda sentetik renk maddeleri yerine uygulanabilir olduğu belirlenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Antosiyanin, nanofibrille protein, kopigmentasyon, model gıda denemeleri, renklendiriciler

## **ABSTRACT**

### **Ph.D THESIS**

# **PRODUCTION OF STABLE ANTHOCYANIN BASED FOOD COLORANTS FROM *Hibiscus Sabdariffa* BY COPIGMENTATION AND THEIR APPLICATION TO MODEL FOODS**

**VİLDAN EYİZ**

**THE GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCE OF  
NECMETTİN ERBAKAN UNIVERSITY  
THE DEGREE OF DOCTOR OF PHILOSOPHY  
IN FOOD ENGINEERING**

**Advisor: Prof. Dr. Selman TÜRKER  
Assoc. Prof. Dr. İsmail TONTUL**

**Year 2024, 197 Pages**

### **Jury**

**Prof. Dr. Selman TÜRKER  
Prof. Dr. Derya ARSLAN DANACIOĞLU  
Assoc. Prof. Dr. Kübra Sultan ÖZDEMİR BİLİCİ  
Prof. Dr. Kürşat DEMİR  
Asst. Prof. Dr. Mine ASLAN**

In this study, straight and curved nanofibrils were obtained from pea protein isolate, rice protein isolate, gluten protein isolate and whey protein isolates with different applications (by keeping them in a water bath for 24, 36 and 48 hours). The resulting nanofibrillated proteins were copigmented with *Hibiscus Sabdariffa* anthocyanins and bathochromic shift, hyperchromic effect and thermal stability tests were performed on the samples obtained. For control purposes, co-pigmentation was carried out with natural protein isolates that were not subjected to any pre-treatment and were subjected to all analyses. Total monomeric anthocyanin (TMA) and polymeric color were determined for thermal stability testing. Kinetic calculations were carried out according to the analysis results. The most suitable copigmentation agents were determined according to the Activation energy ( $E_a$ ) and  $z$  (thermal resistance temperature) values obtained as a result of kinetic calculations. Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy and Fluorescence spectroscopy analyzes were performed to prove that copigmentation had occurred and to examine the bonds formed in more detail. *Hibiscus* extracts mixed with selected copigmentation agents were dried in a diffusion window dryer and turned into powder. Total phenolic content (TFM), TMA, DPPH radical scavenging capacity, Iron Reduction Antioxidant Power (FRAP) and Copper (II) Ion Reduction Based Antioxidant Capacity (CUPRAC) analyzes were performed on powder products and some chemical properties were determined. The obtained powder copigmented samples were added to yoghurt (1.5%) and soft confectionery products (0.3%) in certain proportions to check their storage stability. 0.3% natural colorant (black carrot extract) and 50 ppm synthetic colorant was used for control. Soft candy samples were stored for 32 days and yoghurt samples were stored for 16 days, and total monomeric anthocyanin and color were determined on certain days. As a result of the analyses, the copigmented samples that were most resistant to storage were determined.

The increase in absorbance at the maximum wavelength (hyperchromic effect) and the occurrence of a shift in the maximum wavelength (bathochromic shift) of *hibiscus* extracts with added copigment indicate that copigmentation has occurred. While the maximum wavelength of the control sample was 519 nm, the wavelengths of the samples copigmented with flat nanofibrils were found to be between 519-524 nm. There was a shift between 1-6 units in the positive direction. Samples copigmented with flat nanofibrils increased the hyperchromic effect between 0.23-33.84%. While the maximum wavelength of the control sample was 518 nm, the wavelengths of the samples copigmented with folded nanofibrils were found to be

between 519-522 nm. There was a shift of 1-4 units in the positive direction. Samples copigmented with curved nanofibrils increased the hyperchromic effect by 5.79-40.32%.

In the samples copigmented with straight nanofibrils, the polymeric color was found to belong to gluten (NG), whey protein (NPAS), pea (NB) and rice (NP) samples, in order from largest to smallest, depending on the protein type. The polymeric color values of hibiscus extracts (CP) copigmented with folded nanofibrillated rice protein were found to be higher than those copigmented with pea (CB) and whey protein (CPAS). An increase in the polymeric color value is an indication that anthocyanins are broken down and brown components are formed. In samples copigmented with both straight and curved nanofibrils, polymeric color values increased with increasing temperature. The polymeric color values of the samples copigmented with proteins subjected to nanofibrillation for 24 hours were found to be lower than those subjected to nanofibrillation for 36 and 48 hours.

As a result of kinetic calculations, fragmentation rate constants ( $k$ ), correlation coefficients ( $R^2$ ),  $z$  values and  $E_a$  of anthocyanin change were determined. The  $R^2$  values of the regression equation of the kinetics of hibiscus extracts copigmented with different copigmentation agents were found to be above 0.90. As expected, anthocyanin degradation in copigmented hibiscus samples accelerated with increasing temperature and the reaction occurred in accordance with second-order kinetics.  $Z$  and  $E_a$  values were used when selecting the samples. By determining the samples with the highest  $z$  value and  $E_a$  value, copigmented hibiscus extracts suitable for use in the future stages of the study were determined. As a result of the comparisons, due to their high  $z$  values, 24NP (hibiscus extract copigmented with straight nanofibrillated rice protein subjected to 24 hours of fibrillation), 24NG (hibiscus extract copigmented with straight nanofibrillated gluten protein subjected to 24 hours of fibrillation), 24CB (folded hibiscus extract subjected to 24 hours of fibrillation) samples (hibiscus extract copigmented with nanofibrillated pea protein) and 48CP (hibiscus extract copigmented with curly nanofibrillated rice protein subjected to 48 h fibrillation) samples were classified as 24NPAS (straight fibrillated for 24 h) due to their high  $E_a$  values and appropriate fragmentation rate constant ( $k$ ) values. samples were selected.

FTIR analysis was performed to monitor and verify the bond formation between nanofibrillated proteins and anthocyanins. While large peaks are seen at wavenumbers of  $3000-3500\text{ cm}^{-1}$  (-OH tension) and  $1600-1650\text{ (C=O voltage)}\text{ cm}^{-1}$ ,  $2000-2200\text{ (N-H tension)}\text{ cm}^{-1}$  and  $600-1000\text{ cm}^{-1}$  (C= Some fluctuations also occurred in the C voltage range. These fluctuations caused by copigmentation are attributed to the bonds formed between protein and anthocyanin. In order to examine the conformational changes that occur in the structure of proteins, the region between  $1600-1700\text{ cm}^{-1}$  is examined. Shifts occurred in this region with the nanofibrillation process, indicating that the  $\alpha$ -helix structures decreased, the acyl interaction with anthocyanins took place, and the peak shift occurred as the  $\beta$ -sheet structures increased.

Fluorescence spectroscopy was performed to examine the interaction of copigmentation agents with hibiscus anthocyanins. When the graphs are examined, the fluorescence intensity of copigmented samples is very low compared to straight and curved nanofibrillated proteins. In other words, copigmentation dampened the fluorescence intensity considerably. This shows that there is a strong interaction between the two molecules (flat nanofibrillated protein-anthocyanin). In addition, nanofibrillated proteins provided higher fluorescence emission in samples copigmented with nanofibrillated proteins than in samples copigmented with natural protein isolates, compared to natural protein isolates. The results showed that the interaction between anthocyanins and proteins changes the microenvironment of the fluorescent chromophores of the proteins, which increases the stability of the complex by changing the secondary structure.

Hibiscus extracts copigmented with selected nanofibrillated proteins were dried in a diffraction window dryer at  $90\text{ }^\circ\text{C}$  for approximately 30 minutes and turned into powder. According to the analysis performed on powder products, 24CB was found to have the highest total monomeric anthocyanin amount compared to the control, while the antioxidant activity of 24NP was found to be higher according to FRAP results, and 48CP was found to be higher according to CUPRAC results.

Determination of total monomeric anthocyanin by adding 1% copigmented hibiscus powder to soft candy, 0.3% commercially purchased natural coloring agent (black carrot extract) and 50ppm synthetic coloring agent (Allura Red) for the control sample and keeping it at room temperature ( $25\pm 5^\circ\text{C}$ ) for 32 days. Color analyzes were carried out. It was observed that 48 CP sample preserved the total amount of monomeric anthocyanin better than other samples throughout storage.

It was prepared by adding copigmented hibiscus powder to yoghurt (1.5%), and 0.3% natural colorant (black carrot extract) and 50ppm synthetic colorant (Allura Red) for control, and was stored for 16 days at  $8\text{ }^\circ\text{C}$  for total monomeric anthocyanin and color analysis. has been carried out. It is seen that the most stable samples in terms of total monomeric anthocyanin amount during 16 days of storage are 48CP sample.

When the results obtained within the scope of the thesis study were examined in general, it was observed that hibiscus extracts copigmented with straight and curved nanofibrils preserved the stability of

anthocyanin and color values better than those copigmented with natural protein isolates. It has also been determined that nanofibrillar copigmented samples can be applied instead of synthetic colorants in model foods.

**Keywords:** Anthocyanin, colorants, copigmentation, model food experiments, nanofibrillated protein.

## ÖNSÖZ

Bu araştırmanın gerçekleştirilmesi sırasında kıymetli bilgi, birikim ve tecrübeleri ile bana yol gösterici ve destek olan değerli Danışman Hocam Prof. Dr. Selman TÜRKER'e

Yönlendirme ve bilgilendirmeleriyle çalışmamın planlanması, gerçekleştirilmesi ve yazımına kadar her aşamasında yol göstericim olan, akademik hayatım boyunca beni laboratuvar çalışmalarım konusunda yetiştiren kıymetli Eş Danışman Hocam Doç. Dr. İsmail TONTUL'a

Tezimin hazırlanması sırasında, yardımlarını, desteğini ve fikirlerini esirgemeyen Dr. Öğr. Üyesi Mine ASLAN'a

Laboratuvar çalışmalarım sırasında yardımlarını ve dostluklarını esirgemeyen ve beni hiçbir zaman yalnız bırakmayan Dr. Ayşenur ACAR, Canan KURU ve Dr. Merve AYDIN'a,

Tüm hayatım boyunca maddi ve manevi büyük fedakarlıklar yaparak bu noktaya gelmemi sağlayan aileme,

Bu süreçte daima yanımda olan, desteğini esirgemeyen sevgili eşim Enes EYİZ'e tüm içtenliğimle sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Vildan EYİZ  
KONYA-2024

## İÇİNDEKİLER

ÖZET .....	iv
ABSTRACT .....	vi
ÖNSÖZ .....	ix
İÇİNDEKİLER .....	x
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xii
<b>1. GİRİŞ.....</b>	<b>1</b>
<b>2. KAYNAK ARAŞTIRMASI .....</b>	<b>3</b>
2.1. Antosiyaninlerin Özellikleri, Önemi ve Stabiliteleri .....	3
2.1.1. Antosiyaninlerin kimyasal yapısı .....	3
2.1.2. Antosiyaninlerin renklendirici özellikleri .....	4
2.1.3. Antosiyaninlerin biyolojik özellikleri .....	6
2.1.4. Antosiyaninlerin stabilitesi üzerine etkili faktörler .....	8
2.1.4.1. pH.....	8
2.1.4.2. Sıcaklık.....	9
2.1.4.3. Oksijen.....	9
2.1.4.4. Işık.....	10
2.1.4.5. Askorbik asit.....	10
2.1.4.6. Şekerler.....	11
2.1.4.7. Enzimler .....	12
2.1.4.8. Diğer faktörler.....	12
2.2. Antosiyaninlerin Stabilizasyonu.....	13
2.2.1. Asilasyon .....	13
2.2.2. Enkapsülasyon .....	14
2.2.3. Kopigmentasyon .....	19
2.3. Doğal ve modifiye proteinlerin kopigmentasyonda kullanımı.....	25
2.3.1. Antosiyanin-nanofibrile protein komplekslerinin teorik temelleri .....	27
2.4. Protein nanofibrilasyonu .....	28
2.4.1. Nanofibrile proteinlerin üretimi ve etkili faktörler .....	28
2.4.2. Protein fibril kaynakları .....	29
2.5. <i>Hibiscus sabdariffa</i> L.....	30
2.6. Kopigmente antosiyaninlerin toz forma işlenmesi .....	32
2.6.1. Köpük kurutma .....	32
2.6.2. Kırınım Pencereli Kurutma .....	35
<b>3. MATERYAL VE YÖNTEM.....</b>	<b>36</b>
3.1. Materyal .....	36
3.2. Yöntem.....	36
3.2.1. Deneme Deseni .....	36
3.2.2. Nanofibrile protein eldesi.....	37
3.2.3. Hibiskustan antosiyanin ekstraksiyonu .....	39

3.2.4. Elde edilen antosiyanin ekstraktının protein nanofibrilleri ile kopigmente edilmesi .....	40
3.2.5. Seçili komplekslerin köpürtülmesi ve kırınım pencereli kurutma yöntemi ile toz forma işlenmesi.....	41
3.2.6. Toz forma işlenen komplekslerin model gıdalara uygulanması .....	42
3.2.7. Yapılan analizler .....	43
<b>4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA .....</b>	<b>48</b>
4.1. Batokromik kayma ve hiperkromik etki .....	48
4.1.1. Protein izolatları ile kopigmente edilmiş örneklerin batokromik kayma ve hiperkromik etki analiz sonuçları .....	48
4.1.2. Düz nanofibriller ile kopigmente edilmiş örneklerin batokromik kayma ve hiperkromik etki analiz sonuçları .....	49
4.1.3. Kıvrımlı nanofibriller ile kopigmente edilmiş örneklerin batokromik kayma ve hiperkromik etki analiz sonuçları .....	51
4.2. Termal stabilite testi.....	54
4.2.1. Polimerik renk .....	54
4.2.2. Toplam monomerik antosiyanin tayini .....	68
4.3. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi (FTIR) Spektroskopi .....	88
4.4. Floresans Spektrometre.....	101
4.5. Toz ürün analizleri.....	110
4.6. Depolama analizleri .....	112
4.6.1. Yumuşak şekerleme .....	112
4.6.2. Yoğurt .....	128
<b>5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER .....</b>	<b>145</b>
5.1 Sonuçlar .....	145
5.2 Öneriler .....	151
<b>6. KAYNAKLAR.....</b>	<b>152</b>

## SİMGELER VE KISALTMALAR

°C	: Santigrad derece
K	: Kelvin
$a^*$	: (a+) kırmızı ve (a-) yeşil renk değeri
$b^*$	: (b+) sarı ve (b-) mavi renk değeri
$L^*$	: (0-100) Parlaklık renk değeri
%	: Yüzde
$\Delta\lambda_{\max}$	: Batokromik kayma
$\Delta A$	: Hiperkromik etki
-OH	: Hidroksil
-NH <sub>2</sub>	: Amonyum
-C=O	: Karbonil
a.u.	: Floresans yoğunluk birimi
CUPRAC	: Bakır (II) İyonu İndirgeme Esaslı Antioksidan Kapasitesi
dk	: Dakika
DPPH	: 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl radikalinin inhibisyonu
FRAP	: Demir İndirgeme Antioksidan Gücü
FTIR	: Fourier Dönüşümlü Kızılötesi
E <sub>a</sub>	: Aktivasyon enerjisi (kJ/ mol)
g	: Gram
GAE	: Gallik asit eşdeğeri
Kal	: Kalori
kJ	: Kilojoule
L	: Litre
mg	: Miligram
mL	: Mililitre
nm	: Nanometre
NaCl	: Sodyum klorür
pH	: Potansiyel hidrojen
ppm	: Milyonda bir kısım
R <sup>2</sup>	: Korelasyon katsayısı
rpm	: Dakikadaki devir sayısı

S3G	Siyanidin-3-glukozit
TEAA	: Troloks eşdeğeri antioksidan aktivite
TFM	: Toplam fenolik madde (FRAP) ve
TMA	: Toplam monomerik antosiyanin
z	: Termal direnç sıcaklığı

## 1. GİRİŞ

Bir gıdanın rengi ürünün görsel çekiciliğini etkilediği için renklendiriciler gıda endüstrisinde kullanılan önemli katkı maddelerindedir. Gıda renklendiricileri sentetik ve doğal olmak üzere iki grupta incelenebilir. Sentetik renk maddelerinin (tartrazin, Allura red, indigo karmin vb.) farklı sıcaklık, pH, ışık yoğunluğu ve oksijen konsantrasyonu koşulları altında yüksek stabiliteye sahip olduğu bilinmektedir (Kucharska ve Grabka, 2010). Bununla birlikte, sentetik renklendiriciler toksik etki, alerjik reaksiyonlar, davranışsal ve nörolojik yan etkiler dahil olmak üzere çeşitli sağlık sorunlarına neden olabilmektedir. Bu nedenle sentetik renklendiricilere alternatif olarak doğal kaynaklardan elde edilmiş ve kimyasal olarak kararlı gıda renklendiricilerinin geliştirilmesine artan bir ilgi vardır. Özellikle pembe, mavi, mor gibi renkler söz konusu olduğunda, sentetik gıda renklendiricilerine alternatif olarak antosiyaninler öne çıkmaktadır. Üstelik antosiyaninler renk vermenin yanı sıra eklendiği gıdanın fonksiyonel özellikleri de geliştirmektedir (Houghton ve ark., 2021).

Antosiyaninler; meyvelerde, sebzelerde, tahıllarda ve diğer bitkilerde sıklıkla bulunan flavonoid ailesine ait bileşenlerdir. Üzüm, çilek, patlıcan, mor patates, siyah havuç, böğürtlen gibi ürünler yapılarında yüksek miktarda antosiyanin bulundurmaktadır. Antosiyaninler, antioksidan, anti-viral ve yaşlandırmayı geciktirici özelliklere sahiptir. Bunun yanında antosiyaninlerin kanser riskini azaltma, iltihaplanmayı engelleme (Cassidy ve ark., 2015; Venancio ve ark., 2017), kardiyovasküler hastalıklar ile diyabeti önleme (Gowd ve ark., 2017) ve obeziteyi azaltma (Xie ve ark., 2018) gibi sağlığa faydalı etkileri bulunmaktadır. Güçlü antioksidan özellikleri nedeniyle antosiyaninler bitkileri UV hasarından korumaya da yardımcı olur. In vitro çalışmalar, sinsityal virüs, parainfluenza virüsü, herpes simpleks, adenovirüs ve rotavirüs gibi virüslerin çoğalmasını engelleyebileceklerini göstermiştir (Mohammadi Pour ve ark., 2019).

Bu faydalarının yanında antosiyaninlerin gıda işleme proseslerine ve çevresel faktörlere karşı düşük stabiliteleri, gıda formülasyonlarında kullanımlarını sınırlandırmaktadır. Antosiyaninler çevre şartlarına karşı bozulmalarını önlemek için karanlık, serin ve oksijensiz ortamlarda işlenmeli ve depolanmalıdır. Bununla birlikte, ısıl işlem ve fermentasyon gibi karmaşık gıda işleme süreçlerinde olumsuz koşullar kaçınılmazdır. Bu nedenle antosiyaninlerin stabilitelerinin artırılmasına yönelik çeşitli önlemlerin alınması gerekmektedir.

Literatürde antosiyaninlerin stabilizasyonu için yaygın olarak kullanılan yöntemler enzimatik veya kimyasal asilasyon, diğer fenolik bileşiklerle birlikte kopigmentasyon ve metal kompleksleşmesidir. Bu yöntemler ile hem işleme stabilitesi artırılmakta hem de renk tonu değiştirilebilmektedir (Yoshida ve ark., 2009). Son zamanlarda arzu edilen kararlılıkta antosiyanin üretimi ve proantosiyanidin üretiminin hızlandırılması için biyosentez uygulamaları ile ilgili çalışmalar da hız kazanmıştır (Cai ve ark., 2022).

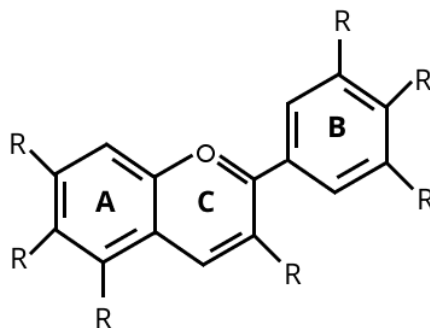
Yapılan bu çalışmada antosiyaninlerin stabilitesini arttırmak amacıyla kopigmentasyon işlemi uygulanmıştır. Bunun için çalışmanın ilk aşamasında *Hibiskus Sabdariffa*'dan antosiyanin ekstraksiyonu gerçekleştirilmiştir. Diğer aşamada farklı protein izolatlarından (bezelye, pirinç, gluten ve peynir altı suyu proteini izolatu) düz ve kıvrımlı nanofibrile proteinler elde edilmiştir. Elde edilen düz ve kıvrımlı nanofibriller hibiskustan elde edilen antosiyanin ekstraktı ile kopigmente edilerek antosiyaninlerin termal stabilitesi belirlenmiştir. Kinetik hesaplamalar sonucunda en stabil kopigmente hibiskus antosiyaninleri seçilmiştir. Seçilen kopigmente ürünler toz haline getirildikten sonra model gıdalara uygulanarak (yumuşak şekerleme ve yoğurt) depolama stabilitesi belirlenmiştir.

## 2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

### 2.1. Antosiyaninlerin Özellikleri, Önemi ve Stabiliteleri

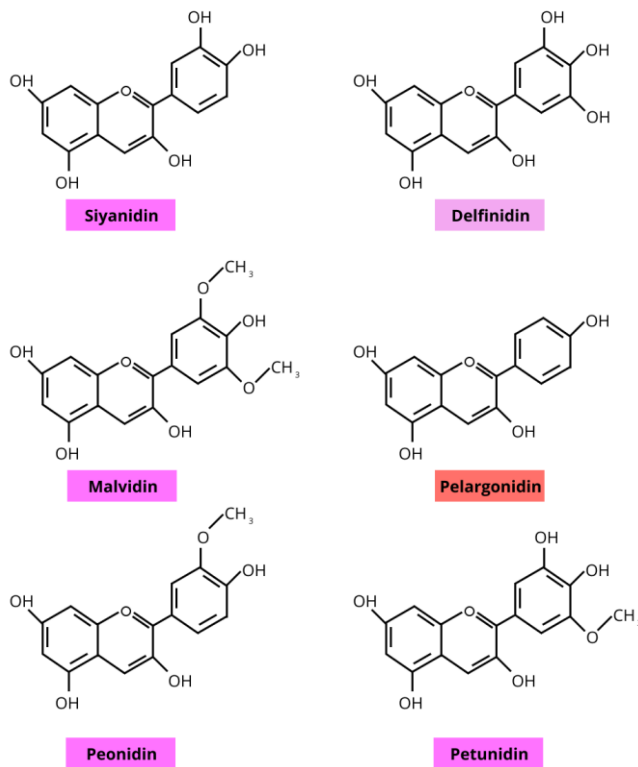
#### 2.1.1. Antosiyaninlerin kimyasal yapısı

Antosiyaninler, antosiyanidinlerin (aglikonlar) glikosile olmuş formlarıdır. Bu bileşikler, farklı pozisyonlarda (genellikle C3, C5, C6, C7 ve C3', C4', C5' karbonlarında) hidroksile edilmiş bir flavilyum katyonundan oluşmaktadır. Antosiyaninler kimyasal olarak, heterosiklik C-3 halkasıyla birleştirilmiş iki C-6 benzoil halkası ile 2 fenilbenzopirilyumdan (flavilyum katyonu) türetilen antosiyanidinlerin suda çözünür glikozitleri ve asil-glikozitleridir (Castañeda-Ovando ve ark., 2009) (Şekil 2.1). Arabinoz, galaktoz, glukoz, ramnoz ve ksiloz gibi doğal şekerler antosiyanidinlere bağlanarak antosiyaninleri oluşturmaktadır. Şekerler genellikle C halkasında 3. karbona ya da A halkasında 5. ve 7. karbona bağlanmaktadır (Prior ve Wu, 2006). Ayrıca, şeker kalıntılarının yaygın asile edici ajanları sinnamik (p-kumarik, kafeik, ferulik, sinapik, gallik ve p-hidroksibenzoik) ve/veya alifatik (asetik, malonik, malik, süksinik ve oksalik) asitlerdir (Giusti ve Wrolstad, 2003).



Şekil 2.1. Antosiyanidin kimyasal yapısı (R = H, OH)

Antosiyaninlerin hidroksil (OH) gruplarının metilasyon derecesi, sayısı ve konumu, şekerle bağlı aromatik veya alifatik grupların sayısı ve moleküle bağlı şekerlerin yapısı ve sayısına göre farklı türleri mevcuttur (Sunil ve Shetty, 2022). 30 farklı çekirdek yapıya sahip 700'den fazla antosiyanin tanımlanmıştır (Gowd ve ark., 2017). Doğada en yaygın bulunan antosiyanin çeşitleri siyanidin, delfinidin, malvidin, pelargonidin, peonidin ve petunidin türevleridir (Şekil 2.2).



**Şekil 2.2.** Doğada en yaygın bulunan antosiyanin türevleri

### 2.1.2. Antosiyaninlerin renklendirici özellikleri

Antosiyaninler bazı bitkilerin çiçek ve meyvelerindeki parlak turuncu, pembe, kırmızı, mor ve mavi renklerden sorumludur. Diğer doğal pigmentlerden farklı olarak antosiyaninler suda çözünür özellikte olup, genellikle bitki hücrelerinin kofulunda sulu ortamda bulunmaktadır (Castañeda-Ovando ve ark., 2009).

B halkasındaki hidroksil gruplarının sayısı arttıkça antosiyaninin renginde mavilik artmaktadır. Metilasyon ise antosiyaninlerin renginde kırmızı renge doğru bir kaymaya yol açmaktadır (Onyilagha ve Grotewold, 2004).

Gün geçtikçe büyüyen doğal, organik ve sürdürülebilir gıda pazarları nedeniyle sentetik olmayan gıda renklendiricilerine olan talep artmaya devam etmektedir. Sentetik renklendiricilerin karaciğer, böbrek gibi organlara olan toksik etkisi, bağışıklığı düşürmesi, toplam kolesterolün yükselmesine neden olması gibi olumsuz özellikleri de doğal pigmentlere olan ilgiyi arttırmaktadır (Demirci ve ark., 2022). Doğal renklendiricilerin 2024 yılında pazar değeri 2.07 milyar dolar iken bunun 2024-2029 yılları arasında %8.47 oranında bir artışla 3.11 milyar dolara yükseleceği düşünülmektedir. Antosiyaninler turuncudan maviye canlı renkleri ve sağlığa olan

faydaları ile bu boşluğu doldurmaktadır. Antosiyaninlerin, içecek ve gıda ürünlerinde ve ayrıca sağlık, nutrasötik ve kozmetik ürünlerinde doğal renklendirici olarak artan kullanımı, pazar gereksinimlerini de büyük lde artırmaktadır. Bu değerli doğal bileşiklere olan yüksek talebin yanı sıra iklim değişikliği ve diğer çevresel sorunlar, tedarik zinciri üzerinde büyük bir baskı oluşturmaktadır; dolayısıyla alternatif çözümlere ihtiyaç duyulmaktadır (Belwal ve ark., 2020). Antosiyaninlere yönelik artan taleple birlikte, 2024'de 355.67 milyon dolar olduğu tahmin edilen Pazar değerinin 2019-2024 yılları arasında %5.15'lik büyüme oranıyla 457.19 milyon dolara yükseleceği tahmin edilmektedir (Mordor, 2024).

Antosiyaninlerin renklendirici olarak kullanılması ile ilgili pek çok çalışma yürütülmüştür (Cortez ve ark., 2017; Jimenez-Gonzalez ve ark., 2018; Mojica ve ark., 2017). Yapılarında bulunan konjuge çift bağlar sayesinde antosiyaninler 500 nm dalga boyunda ışığı emerek doğada mavi, mor, kırmızı renkler ve ara tonların oluşumunu sağlamaktadır (Kay ve ark., 2004). Iecek ve gıda sektörlerinde kullanılan doğal ve alternatif renklendiriciler olmaları nedeniyle antosiyanin üretimine olan ihtiyaç artmıştır (Cortez ve ark., 2017).

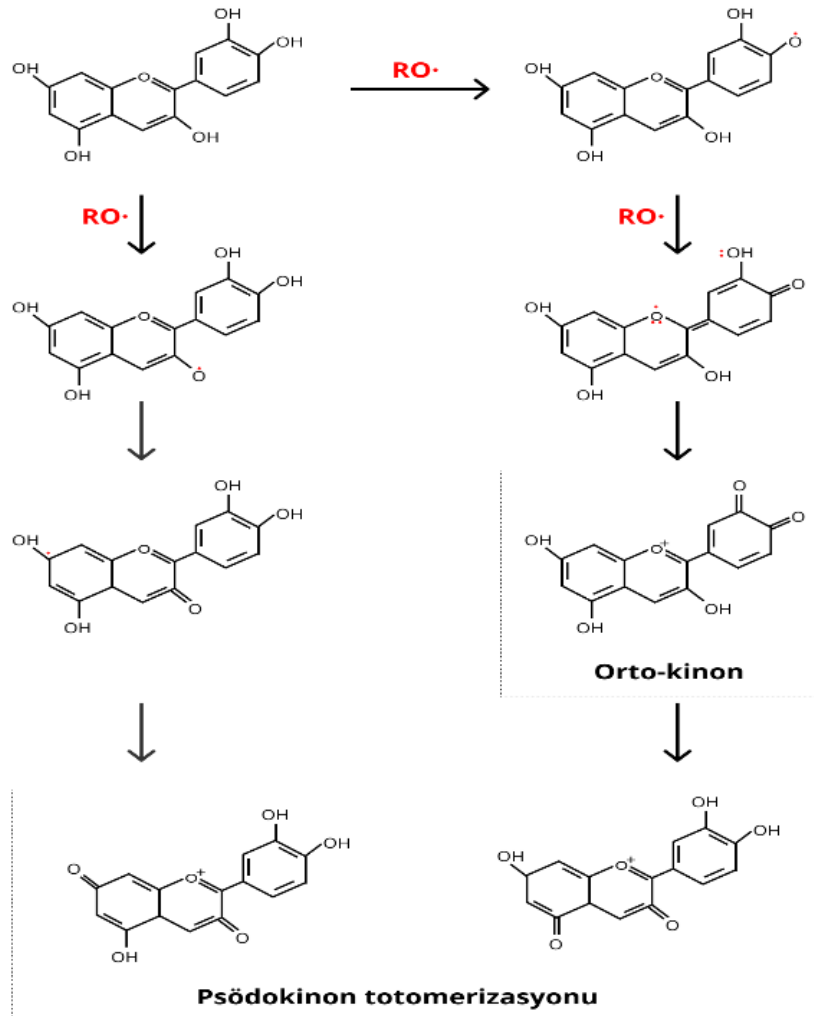
Doğal renklendirici olarak antosiyaninlerin en yaygın kaynakları mor üzüm, kiraz, erik, ahududu, ilek, böğürtlen, yaban mersini, kızılıcık, aronia, kırmızı lahanadır (Eker ve ark., 2019; MacDougall, 2002). zm kabuğu, turp, kırmızı patates ve siyah havuç asillenmiş antosiyanin kaynaklarıdır. Antosiyaninlerin pH'a duyarlılığı, farklı kırmızı ve mavi yapısal formlar arasında dönüŐümüne ve mor renklerin gelişmesine olanak sağlamaktadır. Asidik koŐullardan pH arttıkça flavilyum katyonları (genellikle kırmızı görünür,  $\text{pH} \leq 3$ ) protondan arındırılmakta, renk kaybetmekte ( $\text{pH} 3-6$ ) ve sonunda kinonoidal bazlar oluşmaktadır (mor-mavi görünür;  $\text{pH} \geq 6$ ). Bu yapısal değişiklikler nedeniyle antosiyaninler, birçok gıda ürününün hafif asidik pH ortamlarında tipik olarak kırmızı veya büyük lde renksiz görünmektedir (Sigurdson ve ark., 2017).

Ancak antosiyaninlerin stabilitelerinin düşük olması kullanımını sınırlandırmaktadır. Gıda endüstrileri, kararsızlığı, diğer bileşiklerle etkileşimi ve bozunma oranı nedeniyle antosiyaninin kullanımını sınırlamıŐtır. Sıcaklık, pH ve ışık gibi çeşitli faktörler antosiyanin stabilitesini ciddi Şekilde etkilemektedir. Düşük pH ve sıcaklık, gıda ürünlerinde antosiyanin stabilitesini desteklemektedir (Liu ve ark., 2018). Ancak gıda işleme proseslerinde gıdalar yüksek sıcaklıklara ve farklı pH değerlerine maruz kalabilmektedir. Genel olarak, glikosilasyon ve asilasyon, antosiyaninlerin yapısal stabilitelerini geliştirmektedir. Örneğin, di-, tri- veya poliasillenmiŐ antosiyaninler,

monoasillenmiş ve basit formlara kıyasla gelişmiş stabiliteye sahiptir (Mazza ve ark., 2004). Gıda işlem proseslerine olan dayanımını arttırmak amacıyla kopigmentasyon, çeşitli metal iyonları ile kompleksleştirme, çeşitli organik asitlerle asilasyon ve enkapsülasyon uygulamaları yapılmaktadır (Alappat ve Alappat, 2020). Sayılan yöntemlerle stabilitesi artırılan antosiyaninler farklı gıdalarda renklendirici olarak kullanılmaktadır. Bunlar çoğunlukla yoğurt, karışık meyve suları, ekmek, kek, kurabiye, jöle, kefir ve karbonatlı sular olarak sayılmaktadır (Kanatt, 2020).

### **2.1.3. Antosiyaninlerin biyolojik özellikleri**

Antosiyaninler, pozitif yüklü oksijen atomları nedeniyle diğer flavonoidlerden daha yüksek bir antioksidan aktiviteye sahiptir (Kong ve ark., 2003). Antosiyaninlerin antioksidan aktivitesi, B halkasındaki hidroksilasyon derecesinin yanı sıra asilasyon ve glikosilasyonun tipi ve kapsamına bağlıdır (Sadilova ve ark., 2006). B halkasındaki hidroksilasyon antioksidan kapasiteyi arttırmaktadır ( $-OH > -OCH_3 > -H$ ). Antioksidan kapasite bakımından antosiyanidinler delfinidin > petunidin > malvidin= siyanidin > peonidin > pelargonidin şeklinde sıralanmaktadır (Pojer ve ark., 2013). Ayrıca, glikosilasyon, antosiyaninlerin hidrojen verme, metal şelatlama ve elektron delokalizasyon yeteneklerini azaltarak, aglikon formlarına kıyasla serbest radikal süpürme kabiliyetini azaltmaktadır (Zhao ve ark., 2014). C3 ve C5 pozisyonundaki şeker birimleri ne kadar fazlaysa, antioksidan aktivite o kadar düşük olmaktadır (Sadilova ve ark., 2006). Kısaca antioksidan aktivite B halkasındaki hidroksil gruplarının sayısı ile artarken, A ve C halkasına bağlı glikozil gruplarının sayısı ile azalmaktadır. Şekil 2.3'de doğada en yaygın bulunan antosiyanin olan siyanidininin antioksidan mekanizması gösterilmiştir.



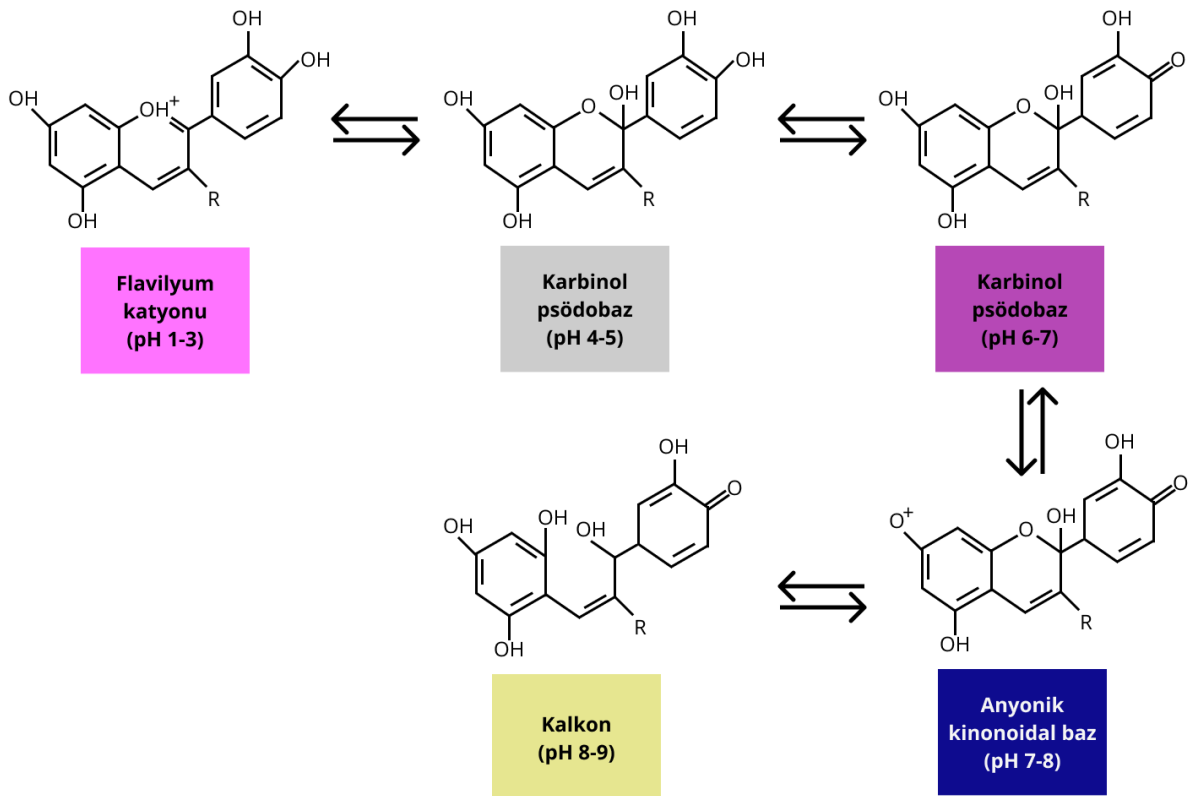
Şekil 2.3. Siyanidinin antioksidan mekanizması

Antosiyaninler, nöronal hastalıklar, kardiyovasküler hastalıklar, kanser, diyabet, iltihap ve diğer birçok hastalığı önlemeye yardımcı olan güçlü antioksidan aktiviteye sahiptir. Antosiyaninlerin kanseri tedavi etme (Nichenametla ve ark., 2006) ve insan beslenmesini geliştirmede (Stintzing ve Carle, 2004) etkili olduğu ve tümör oluşumunu baskıladığı bildirilmektedir (Koide ve ark., 1996). Antosiyaninlerin kan damarlarını gevşettiği ve kan damarı duvarlarını kaplayan endotel hücrelerinin bütünlüğünü koruduğu bulunmuştur. Antosiyaninlerin diğer sağlık yararları arasında alerjiyi azaltma, kalp sağlığını koruma (Basu ve ark., 2010), görme özelliğini iyileştirme (Ghosh ve Konishi, 2007) ve ülseri tedavi etme (Moskovitz ve ark., 2002) sayılabilmektedir.

## 2.1.4. Antosiyaninlerin stabilitesi üzerine etkili faktörler

### 2.1.4.1. pH

Moleküler yapılarının iyonik olması nedeniyle, antosiyaninlerin rengi ortam pH değerinden etkilenmektedir. Antosiyaninler, ortam pH değerine bağlı olarak dört farklı kimyasal formda bulunmaktadır; flavilyum katyon (kırmızı, pH 1-3), karbinol psödobaz (renksiz, pH 4-5), nötr kinoidal baz (mor veya mavi, pH 6-7) ve kalkon (renksiz, pH 8-9) (Oliveira ve ark., 2020). Asidik bir ortamda (pH 1-3) antosiyaninler, suda çözünürlüğü daha yüksek olan flavilyum katyonu (kırmızı renk) şeklinde bulunmaktadır ve bu form aynı zamanda kırmızı ve mor renkten de sorumludur. 4-5 arasındaki bir pH değerinde karbinol psödobaz ve renksiz bileşikler olan kalkon ortaya çıkmaktadır. Son olarak, 7'den yüksek bir pH değerinde antosiyaninler, ikame gruplarına göre bozunmaktadır. Bununla birlikte, antosiyaninlerin dört formu pH 4-6 aralığında bir arada bulunabilir, bu formların dengesi flavilyum katyonu tarafından korunmaktadır (Şekil 2.4) (Pina ve ark., 2012).



Şekil 2.4. Antosiyaninlerde pH'ya bağlı renk değişimi

#### 2.1.4.2. Sıcaklık

Sıcaklık, antosiyaninlerin moleküler stabilitesini etkileyen en önemli faktörlerden birisidir. Sıcaklık 60 °C'ye yükseldiğinde stabilitenin bozulup antosiyaninlerin renksiz kalkon formuna dönüştüğü bildirilmiştir (Graf ve ark., 2013). Antosiyaninlerin yüksek sıcaklık ortamına maruz kaldıklarında ciddi şekilde zarar görebilecekleri ve içeriklerinin önemli ölçüde azalabileceği genel olarak kabul edilmiştir (Lin ve Chou, 2009; Mulinacci ve ark., 2008). Isıl işlem nedeniyle antosiyaninler, glikosilasyon, bölünme ve polimerizasyon gibi mekanizmalar ile bozunmaya uğramaktadır (Rodriguez-Amaya, 2019). Sıcaklığın artışıyla monomerik antosiyaninlerden kaynaklanan renk yoğunluğu azalırken, kahverengi pigment/polimer fraksiyonu miktarı artmaktadır. Sadilova ve ark. (2006), mürver antosiyanin içeriğinde 95 °C sıcaklıkta 3 saatlik ısıtma sonucunda %50 azalma meydana geldiği bildirilmiştir. Üzüm özleri üzerine yapılan bir çalışmada, 35 °C'de ısıl işlemin toplam antosiyanin içeriğinin, 25°C'lik bir ısıl işleme tabi tutulan aynı üzüm özü ile karşılaştırıldığında %50 daha az olduğu ortaya koyulmuştur (West ve Mauer, 2013). Yaban mersini püresi üretiminde uygulanan ağartma ve pastörizasyon (95 °C sıcaklıkta 3 dakika) gibi yüksek sıcaklık gerektiren ısıl işlemler, taze meyvede gözlenen miktara kıyasla toplam monomerik antosiyaninlerin %43'ünün kaybına neden olmuştur (Brownmiller ve ark., 2008).

Öte yandan antosiyaninlerin parçalanmasına neden olan polifenoloksidaz (PPO) enzimi kısa süreli bir ısıl işlemle inaktive edilerek sıcaklığın faydalı bir etkisi ortaya koyulabilir (Patras ve ark., 2010; Ziabakhsh Deylami ve ark., 2016). Sıcaklığın bu şekilde antosiyaninlere zararlı olan doğal enzimleri inhibe ederek antosiyaninlerin stabilitesini iyileştirdiğini bildiren çalışmalar da bulunmaktadır (He, 2008).

#### 2.1.4.3. Oksijen

Antosiyaninlerin doymamış kimyasal yapısı nedeniyle, bu bileşikler moleküler oksijen ile reaksiyona girmeye fazlasıyla yatkındırlar (Schwartz ve ark., 2017). Oksijenin varlığı, oksidatif mekanizma yoluyla ve polifenol oksidaz gibi oksitleyici enzimler vasıtasıyla antosiyaninlerin bozunmasına yol açabilmektedir (Alvarez-Suarez ve ark., 2021). Oksijen varlığında bu enzimler, fenolik asitlerin o-kinona oksidasyonunu katalize etmektedir ve oluşan kinon kahverengi polimerik ürünleri oluşturmak için antosiyaninlerle reaksiyona girmektedir (Kader ve ark., 1999). Oksijen ayrıca, askorbik asit oksidasyonunu kolaylaştırmakta, hidrojen peroksit miktarını arttırmakta ve daha fazla

antosiyenin bozunmasına neden olmaktadır (Ghareaghajlou ve ark., 2021). Antosiyenin çözeltilisinden oksijenin uzaklaştırılması termal bozunmayı önlemektedir. Yüksek sıcaklık ve oksijenin varlığının, bu bileşiklerin stabilitesini etkileyen tüm faktörler arasında en zararlı kombinasyon olduğu kanıtlanmıştır (Cavalcanti ve ark., 2011). Ayrıca antosiyeninler peroksiradikaller gibi oksijen radikalleriyle reaksiyona girdiğinden antioksidan karaktere sahiptirler ve bu bileşikleri kardiyovasküler hastalıklara karşı faydalı kılmaktadırlar (Enaru ve ark., 2021).

#### **2.1.4.4. Işık**

Işık, fotokimyasal reaksiyonları (fotooksidasyon) uyararak antosiyeninleri bozabilmektedir. Işık etkisiyle antosiyenin bozulması iki numaralı karbon halkasının aglikon kısmının kalkon gibi renksiz bileşikler oluşturacak şekilde açılmasıyla gerçekleşmektedir (Hendry ve Houghton, 1996; Maccarone ve ark., 1987). Bozunma mekanizması büyük ölçüde flavilyum katyonunun uyarılmasıyla gerçekleşmektedir (Oliveira ve ark., 2020). Işığın neden olduğu antosiyenin bozunmasının son ürünleri, termal bozunma ürünleri ile benzerdir. Fotodegradasyon reaksiyonuna karşı asillenmiş diglikozit içeren antosiyeninler, asillenmemiş diglikozitli antosiyeninlerden; diglikozit yapısındaki antosiyeninler monoglikozit yapıda olanlardan daha stabildir (Cai ve ark., 2022).

Oda sıcaklığında saklanan ve 10 saat floresan ışığına maruz bırakılan dut meyvesi ekstraktlarının antosiyenin içeriği ve antioksidan aktivitesinde önemli bir azalma gözlenmiştir. Ekstraktın ışığa maruz kalma süresi ne kadar uzun olursa, antosiyenin içeriği ve antioksidan aktivitesinin o kadar azaldığı bildirilmiştir (Aramwit ve ark., 2010). Chen ve ark. (2018), çalışmalarında kırmızı lahanada antosiyeninlerinin fotostabilitesini değerlendirmiş ve antosiyeninlerin bozunmasının doğal oda ışığı ve simüle edilmiş güneş ışığı altında arttığını bulmuştur. Pencere ışığına maruz kalan üzüm suyunun renk yarı ömrü, aynı saklama koşullarında karanlıkta bekletilen ürünün %50'si olarak tespit edilmiştir (Gomes ve ark., 2021).

#### **2.1.4.5. Askorbik asit**

Askorbik asit bir antioksidan olarak, meyveler ve meyve ürünlerindeki antosiyeninler ve diğer polifenoller gibi biyoaktif bileşiklerin stabilitesini etkilemektedir (Martinsen ve ark., 2020). Oksijen varlığında askorbik asit, antosiyeninlerin bozunmasını

hızlandırmaktadır (Levy ve ark., 2019). Hem oksijen hem de askorbik asit seviyeleri yüksek olduğunda, parçalayıcı etki daha belirgindir. Bakır iyonlarının da bu süreci hızlandırdığı bilinmektedir (Hocine ve ark., 2018).

Antosiyaninlerin askorbik asit tarafından bozulması 3 farklı şekilde gerçekleşmektedir. İlk olarak, C4 pozisyonunda askorbik asit ve antosiyaninler arasında bir yoğunlaşma reaksiyonu gözlenmiştir (Huang ve ark., 2021). İkinci olarak, bir moleküler oksijen aktivatörü olarak askorbik asit, antosiyaninlerin piridin halkasını kıran serbest radikaller üretebilir, ancak bu süreç ilk reaksiyondan çok daha düşük bir yoğunlukta meydana gelmektedir (De Rosso ve Mercadante, 2007). Üçüncü olarak askorbik asit bir otooksidasyon reaksiyonu yoluyla hidrojen peroksit ve dehidroaskorbik aside ayrılmaktadır. Hidrojen peroksit, yukarıda bahsedildiği gibi bozunmaya neden olurken, dehidroaskorbik asit antosiyaninleri kahverengi polimerlere dönüştürmektedir (Tiwari ve ark., 2009).

Li ve ark. (2014) askorbik asitin 4 °C ve 25 °C'de antosiyaninlerinin bozunma oranını arttırdığını belirlemiştir. Bu çalışmada 360 mg/L'lik askorbik asit seviyesindeki bozunma hızının, 120 mg/L'dekinin on katından fazla olduğu ortaya konulmuştur.

Öte yandan askorbik asitin asillenmiş antosiyaninlerin stabilitesini artırabildiği (Barbosa ve ark., 2021) ve antosiyaninleri enzimatik bozulmadan koruyabildiğini gösteren çalışmalar da bulunmaktadır (Cavalcanti ve ark., 2011; Talcott ve ark., 2003).

#### **2.1.4.6. Şekerler**

Meyve suları, şarap ve reçeller gibi farklı gıdalarda yaygın olarak bulunan şekerlerin antosiyanin stabilitesi üzerine etkisiyle alakalı pek çok çalışma yapılmış ve farklı etkileri ortaya koyulmuştur (Hubbermann ve ark., 2006). Şeker, antosiyaninlerin stabilitesini desteklemektedir. Antosiyanin içeren sistemin su aktivitesini azaltarak suyun antosiyanin molekülleri üzerindeki nükleofilik saldırısını yavaşlatmaktadır. Yani şekerin koruyucu etkisi, disakkarite (sakaroz) kıyasla monosakkaritlerin (glikoz ve fruktoz) daha yüksek etkinliği ile kanıtlanan su aktivitesinin azalmasına bağlı bulunmaktadır (Huang ve ark., 2021). 90 °C'de ısıtılmış böğürtlen suyuna %10'luk konsantrasyonda glikoz ve trehaloz gibi şekerler eklendiğinde özellikle bir kopigment (klorojenik asit) varlığında, depolama sırasında antosiyaninlerin stabilitesinin arttığı ortaya koyulmuştur (Kopjar ve Piližota, 2011).

Bununla birlikte, düşük konsantrasyonda şeker ve bozunma ürünleri antosiyanin stabilitesini azaltıcı etki gösterebilmektedir. Örneğin, Maillard reaksiyon ürünlerinin (furfural ve hidroksimetilfurfural) pigment bozulmasından sorumlu olduğu ortaya koyulmuştur (Cai ve ark., 2022).

#### **2.1.4.7. Enzimler**

Antosiyaninler, glikozidazlar (antosiyanaazlar), PPO ve peroksidazlar gibi bitki dokularındaki enzim sistemleri tarafından parçalanabilmektedir (Grace ve ark., 2014). Bu enzimler bitki tarafından üretilmekte, dokularında bulunabilmekte veya mikrobiyal kontaminasyonun bir etkisi olarak ortaya çıkabilmektedir. Ayrıca meyve suyuna işleme esnasında eklenen enzimler nedeniyle de antosiyanin kaybı meydana gelebilmektedir. Glikozidazlar, antosiyaninlerin glikozidik bağlarını parçalayarak antosiyaninlerin renksizleşmesine neden olmaktadır (Seeram ve ark., 2001). Peroksidaz ve fenolazlar ise antosiyanin stabilitesini dolaylı olarak etkilemektedir (Marszałek ve ark., 2017). PPO ve peroksidazlar bitki dokularının enzimatik esmerleşmesinde rol oynayan başlıca enzimlerdir. Antosiyaninlerin ilk olarak  $\beta$ -glukosidaz tarafından hidrolize edilerek PPO ve/veya peroksidaz tarafından oksitlenebilen antosiyanidinleri oluşturduğu öne sürülmüştür. PPO basit fenollerini okside ederek antosiyaninlerle reaksiyona girip kahverengi pigmentlerin oluşturan o-kinonların ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Bu enzimler hafif ısıtma ile etkisiz hale getirilebilir ve bu nedenle yapılan çalışmalarda yaklaşık 50°C'ye kadar ısıtma ile enzim inaktif edilip antosiyaninlerin stabilitesinin arttırılabileceği bildirilmiştir (Patras ve ark., 2010).

#### **2.1.4.8. Diğer faktörler**

Tüm bu faktörlerin yanında antosiyaninlerin yapısal özellikleri, konsantrasyonu, sülfidlerin varlığı ve mikrobiyal etkenler de antosiyaninlerin stabilitesi üzerinde etkilidir (Farr ve ark., 2018).

Aglıkona bağlı glikozil birimleri ve asil grupları ile hidroksil ve metoksil gruplarının sayısı ve yerleşimi, antosiyanin molekülünün stabilitesi ve reaktivitesi üzerinde önemli bir etkiye sahiptir (Aşkın ve Küçüköner, 2019). Metoksil grubu arttıkça antosiyanin stabilitesi artarken, hidroksil grubu arttıkça azalmaktadır. Asillenmiş antosiyaninler, flavilyum katyonunun pirilyum halkası ile asil gruplarının yığılması nedeniyle stabildirler. Böylece kromoforları, kalkon veya psödobaz sentezine yol açan

suyun nükleofil saldırısından korumaktadırlar (Giusti ve Wrolstad, 2003). Asillenmemiş antosiyaninlerde renk stabilitesinin, moleküller arası kopigmentasyon mekanizmasına ( $\pi$ - $\pi$  etkileşimi, dipol-dipol ve hidrojen bağı etkileşimleri) bağlı olduğu varsayılmaktadır (Li ve ark., 2012). Artan antosiyanin konsantrasyonu, renk stabilitesini arttırmaktadır (Giusti ve Wrolstad, 2003).

Kükürt dioksit, meyve ve sebze muhafaza endüstrisinde antimikrobiyal olarak ve esmerleşmenin engellenmesi için yaygın olarak kullanılmaktadır (Hocine ve ark., 2018). Öte yandan, yüksek sülfite konsantrasyonlarında (10 g/kg'dan fazla) kükürt bileşikleri antosiyanine 2 veya 4 pozisyonlarında bağlanıp renksiz kükürt türevi yapılar oluşmaktadır (Cavalcanti ve ark., 2011).

Jiang ve ark. (2019a), sülfitle muamele edildiğinde antosiyaninlerinin tamamen renksizleşebileceğini göstermiştir. Sülfitle antosiyaninleri renksizleştirme reaksiyonu  $\text{HSO}_3^-$  elektrofilik C4 pozisyonunda antosiyanin moleküllerine saldırmasıyla gerçekleşmektedir. Antosiyaninlere  $\text{SO}_2$  bağlanmasıyla renginin bozulması, antosiyanin moleküllerindeki konjuge çift bağı sisteminin yıkılmasıyla meydana gelmektedir (Berké ve ark., 1998).

## 2.2. Antosiyaninlerin Stabilizasyonu

### 2.2.1. Asilasyon

Karmaşık glikosilasyon ve asilasyon modellerine sahip olan asillenmiş antosiyaninler, asil gruplarının bağlanmasından kaynaklanan yapısal değişiklik sayesinde benzersiz işlevlere ve asillenmemiş türlere kıyasla çeşitli avantajlara sahiptir (Luo ve ark., 2022). Asillenmiş antosiyaninler, birçok bitki türünde doğal olarak bulunmaktadır ve kökler, gövdeler, çiçekler ve meyveler gibi hemen hemen tüm bitki kısımlarına dağılmaktadır (Matsufuji ve ark., 2007). Doğada, antosiyanin molekülleri, şeker kalıntılarının p-kumarik, kafeik, ferulik, gallik, malonik, malik ve süksinik asitler gibi çok çeşitli organik asitlerle esterleştirilmesi yoluyla asillenebilmektedir. Asilasyon, hidrofobik ve  $\pi$ - $\pi$  etkileşimleri yoluyla antosiyanin stabilitesinin geliştirilmesinde önemli bir rol oynamaktadır (Xu ve ark., 2015). Ayrıca in vitro olarak kimyasal ve enzimatik asilasyon ile oluşturulabilirler. Bu şekilde oluşturulduklarında asillenmemiş antosiyaninlere kıyasla organik çözücülerde daha iyi stabiliteye ve daha yüksek çözünürlüğe sahiptirler. Asillenmiş antosiyaninlerin yapısal tanımlanması için yaygın olarak kullanılan yöntemler arasında TLC, HPLC ve HPLC-MS gibi kromatografik

yöntemler (Li ve ark., 2013; Zhao ve ark., 2014) ve UV-Vis spektroskopisi (Li ve ark., 2019), FTIR (Lu ve ark., 2010) ve NMR (Kirby ve ark., 2013; Terahara ve ark., 2009) gibi spektroskopik yöntemler bulunmaktadır.

Asilasyon, alifatik asil donörleri veya aromatik asil donörleri tarafından hidroksil gruplarının esterleştirilmesidir. Böylece değişken fiziksel ve biyolojik özelliklere sahip çeşitli ürünlerin üretimine katkıda bulunur (Cunningham ve Edwards, 2008).

### **2.2.2.Enkapsülasyon**

Antosiyaninlerin bozulmasını önlemek için etkili bir teknoloji olarak kabul edilen kapsülleme işlemi, aktif materyalin fonksiyonel özelliklerinin geliştirilmesi, raf ömrünün uzatılması, olumsuz çevre şartlarına karşı korunması ve kontrollü salınım sağlanması gibi amaçlarla uygulanan bir süreç olarak tanımlanmaktadır. Çekirdeğin partikül boyutu makro ( $>5000 \mu\text{m}$ ), mikro ( $1-5000 \mu\text{m}$ ) ve nano ( $<1 \mu\text{m}$ ) olarak sınıflandırılmaktadır (Jafari ve ark., 2016). Son çalışmalar, kapsülleme tekniğinin, antosiyaninlerin stabilitesini ve biyoerişilebilirliğini iyileştirmenin yanı sıra acı ve buruk tat dahil olmak üzere hoş olmayan tatlarını maskeleyerek amacıyla etkili ve pratik bir strateji olabileceğini öne sürmektedir (Ballesteros ve ark., 2017).

#### **2.2.2.1. Mikroenkapsülasyon**

Mikroenkapsülasyon, mikrometre veya nanometre boyutlarında kapsüller oluşturmak amacıyla çekirdek malzemeyi duvar malzemesi ile kaplama işlemidir (Mahdavi, ve ark., 2016a). Bu işlemde, aktif çekirdek malzemesi olarak katı, sıvı veya gaz halindeki maddelerin bir duvar veya taşıyıcı malzeme olarak bir polimere hapsedilmesiyle çok bileşenli bir yapı oluşturulmaktadır (Corrêa-Filho ve ark., 2019). Bu işlem kullanılarak elde edilen ürünler, 1 ila 1000  $\mu\text{m}$  arasında değişen boyutlara sahiptir. Mikroenkapsülasyon yoluyla üretilen yapılar mikroküre, mikrokapsül ve mikropartikül gibi çeşitli şekillerde olabilmektedir.

Mikroenkapsülasyon işleminde kaplama materyali olarak polisakkaritler (nişastalar, maltodekstrinler, modifiye nişasta, dekstrin, sükröz, selüloz, kitosan, gam arabik, aljinat, karagenan, mısır şurupları ve arap zamkı), lipidler (mum, parafin, stearik asit, mono- ve digliseritler) ve proteinler (jelatin, kazein, süt serumu, soya ve buğday proteini) dahil olmak üzere farklı malzemeler kullanılmaktadır (Desai ve Jin Park, 2005; Fávaro-Trindade ve ark., 2008). Mikroenkapsülasyon işleminde kaplama metodu olarak

püskürterek kurutma, liyofilizasyon ve elektrosprey/döndürme gibi fiziksel yöntemler, inklüzyon komplekslerinin oluşumu gibi kimyasal yöntemler, lipozomlar, emülsifikasyon, koaservasyon ve iyonik jelleşmeden oluşan fizikokimyasal yöntemler kullanılmaktadır (Mohammadalinejad ve Kurek, 2021).

#### **2.2.2.2. Nanoenkapsülasyon**

Antosiyanin pigmentlerinin uzun süre muhafaza edilip korunabilmesi ve gıda proseslerine katılabilecek kararlılıkta olabilmesi amacıyla uygulanan işlemlerden biride nanoenkapsülasyondur (Matalanis ve ark., 2011). Nanoenkapsülasyon, biyoaktif molekülleri işleme ve depolama sırasında kimyasal ve biyolojik faktörlerden korumak amacıyla dirençli biyomalzemelerle kaplandığı bir dizi tekniktir. Mikroenkapsülasyon, büyük partikül boyutları nedeniyle sınırlı kapsülleme etkinliği göstererek moleküler stabiliteyi ve bileşenin absorpsiyonunu engelleyebilmektedir. Bu nedenle daha küçük moleküler boyutta olan nano ölçekli partiküller çok sayıda avantaj sunmaktadır (Chen ve ark., 2019). Nanokapsüller, çapları 1 ila 1000 nm arasında değişen aktif maddeler içeren biyopolimerlerdir (Rosales ve Fabi, 2022). Küçük boyutları ve moleküler stabiliteyi nedeniyle nanokapsüllü antosiyaninlerin oral alımdan sonra biyoerişilebilirliği artmaktadır (Sekhon, 2010). Nanoenkapsülasyon moleküler stabiliteye ek olarak, diğer gıda bileşenleri ile etkileşimi önlemekte böylece farklı matris kompozisyonlarına sahip gıdalara eklenme potansiyeli göstermektedir (Carrasco-Sandoval ve ark., 2021). Antosiyaninler için kaplama materyali olarak kullanılan başlıca gıda kaynaklı biyopolimerler polisakkaritler, proteinler ve lipitlerdir (Sharif ve ark., 2020). Antosiyaninlerin nanokapsülasyonunda en çok kullanılan tekniklerden biri biyopolimerlerin kendi kendine montajıdır. Bu teknikte, antosiyaninler gibi küçük biyoaktif bileşiklerin kapsüllemesi için zıt yüklere sahip kaplama materyalleri arasında oluşturulan elektrostatik etkileşimlerle nanokapsüller elde edilmektedir (Akbari-Alavijeh ve ark., 2020; Quadrado ve Fajardo, 2020). Antosiyaninlerin kapsüllemesinde öncelikle doğru antosiyanin kaynağı seçilmeli, seçilen kaynaktan antosiyaninler organik çözücüler (su, aseton, etanol ve metanol) kullanılarak ekstrakte edilmeli, kaplama materyali olarak polisakkaritler, proteinler ve lipitler gibi gıda kaynaklı biyopolimerlerden uygun olanı seçilmeli ve uygun nanokapsülasyon tekniği (kendi kendine montaj, koaservasyon, püskürterek kurutma, elektrosprey, lipozomal sistem) kullanılmalıdır (Rosales ve Fabi, 2022). Yüksek sıcaklıklar kullanan bazı yöntemler, antosiyaninleri bozabileceğinden,

doğru sıcaklığı seşmek önemlidir. Antosiyaninlerin alkali pH'daki kararsızlığı nedeniyle pH da dikkatli bir şekilde gözlemlenmelidir. Moleküler bütünlüğün korunması için nanoyapıların hazırlanması sırasında antosiyanin optimal pH aralığında kalmalıdır (Fang ve Bhandari, 2010; Ghasemi ve ark., 2017). Farklı enkapsülasyon metotlarının uygulandığı çalışmalar (izelge 2.1) aşağıda verilmiştir.

Çizelge 2.1. Enkapsülasyon ile ilgili yapılan çalışmalar

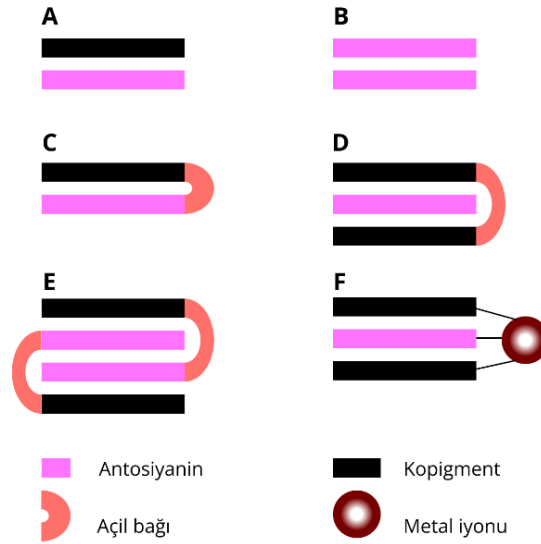
Enkapsülasyon metodu	Çekirdek	Kaplama materyali	Sonuç	Referans
Mikroenkapsülasyon, püskürterek kurutma	Yabanmersini antosiyanin ekstraktı	soya proteini izolatu ve yüksek metil pektin karışımı	Antosiyaninlerin in vitro salınımı ve depolama stabilitesi arttırılmıştır.	Pan ve ark. (2022)
Mikroenkapsülasyon, püskürterek kurutma	Dut antosiyanin ekstraktı	PASP	Sindirilebilirlik arttırılmıştır.	Khalifa ve ark. (2021)
Mikroenkapsülasyon, püskürterek kurutma	<i>Berberis vulgaris</i>	Maltodekstrin, arabik gam, PASP	Antosiyanin stabilizasyonu sağlanmıştır.	Maryam (2021)
Mikroenkapsülasyon, moleküler İnküzyon	Böğürtlen püresi	$\beta$ -siklodekstrin	Termal stabilite sağlanmıştır.	Fernandes ve ark. (2018)
Mikroenkapsülasyon, çift emülsiyon	Üzüm çekirdeği	Guar gam	Antosiyanin stabilitesi sağlanmıştır.	de Almeida Paula ve ark. (2018)
Mikroenkapsülasyon, lipozom	Kara mürver antosiyanin ekstraktı	Soya lesitini	Kararlı lipozomlar elde edilmiştir.	Bryła ve ark. (2015)
Mikroenkapsülasyon, biyopolimer partikülleri	Mor mısır ve yaban mersini özü	Aljinat ve pektin	Fotodegradasyon oranı azaltılmıştır.	Guo ve ark. (2018)
Mikroenkapsülasyon, püskürterek ve dondurarak kurutma	Hibiskus antosiyaninleri	Maltodekstrin, arap zamkı, inülin ve konjak glukomannan ile ikili karışımları	Çözünürlük arttırılmıştır.	Q.-D. Nguyen ve ark. (2022)
Mikroenkapsülasyon, elektrodöndürme	Çilek nektarı	Aljinat, PASP, pullunan	İstenen canlı renk elde edilmiştir.	Morsy ve ark. (2022)
Mikroenkapsülasyon, elektrodöndürme	Jambolan ekstraktı	Zein	Termal stabilite arttırılmıştır.	dos Santos ve ark. (2022)
Nanoenkapsülasyon, lipozom	Böğürtlen	Pektin	Antosiyanin stabilitesi arttırılmıştır. Yöntem gıda katkı maddesi üretmeye uygun bulunmuştur.	Rosales ve Fabi (2022)
Nanoenkapsülasyon, lipozom	Kırmızı lahana	Fosfatidilkolin	Üretilen nanolipozomlar depolama stabilitesi göstermiştir.	Ghareaghajlou ve ark. (2022)

Nanoenkapsülasyon, jelasyon	iyonik	Siyah havuç	Kitosan	Antosiyaninlerin in vivo antioksidan aktivitesi geliştirilmiştir. Stabilite ve biyoyararlanım artırılmıştır.	Chatterjee ve ark. (2021)
Nanoenkapsülasyon, jelasyon	İyonik	Siyah pirinç	Kondroitin sülfat ve kitosan	Stabilite ve biyolojik aktivite artırılmıştır.	Liang ve ark. (2019)
Nanoenkapsülasyon, jelasyon	İyonik	Yaban mersini	Kitosan hidroklorür ve karboksimetil kitosan	Antosiyaninin çevresel şartlara karşı stabilitesi artırılmıştır.	Ge ve ark. (2018)
Nanoenkapsülasyon, emülsiyon	çift	Antosiyanin ekstraktı	Guar gam	Termal stabilite artırılmıştır	de Almeida Paula ve ark. (2018)
Nanoenkapsülasyon, koaservasyon		Mürver özütü	Kitosan, kondroitin sülfat	Antosiyaninin antioksidan özelliği ve depolama stabilitesi geliştirilmiştir.	Tan ve ark. (2018)
Nanoenkapsülasyon, püskürterek dondurarak kurutma ve kritik antisolvent	kurutma, ve süper	Böğürtlen ekstraktı	Polivinilpirolidon	Antioksidan kapasite ve termal stabilite geliştirilmiştir.	Machado ve ark. (2018)

### 2.2.3 Kopigmentasyon

Kopigmentasyon, meyve, sebze ve çiçeklerde mavi, menekşe ve kırmızı gibi belirli renklerin korunmasını sağlayan kovalent olmayan kompleksleşmeye dayalı doğal bir süreçtir (Yoshida ve ark., 2009). Kopigmentasyon, antosiyaninleri yüksek sıcaklık, ışık ve oksijen gibi faktörlere karşı stabilize etmek için uygulanan etkili bir yöntem olarak bilinmektedir. Bu işlem antosiyaninlere özgüdür ve diğer polifenollerde gözlemlenmez (Kammerer, 2016). Antosiyaninler genişletilmiş  $\pi$ -konjuge sistemleri nedeniyle, fenolik asitler ve flavonoidler gibi kopigmentlerle kolayca supramoleküler yapılar oluşturabilmektedirler. Son zamanlarda gıda endüstrisinde tüketicilerin algısıyla doğrudan ilişkili olan renk paletini geliştirmeyi sağlayan kopigmentasyon işlemine artan bir ilgi vardır (Trouillas ve ark., 2016).

Potansiyel olarak kopigment olarak kullanılacak on binin üzerinde bileşik mevcuttur. Genel olarak, kopigmentler  $\pi$ - $\pi$  etkileşimlerini destekleyen  $\pi$  konjuge sistemlere ve OH ve C=O gibi hidrojen bağı verici/alıcı gruplara sahip olmalıdırlar (Trouillas ve ark., 2016) (Şekil 2.5). Tanımlanan başlıca doğal kopigmentler hidrolize edilebilir tanenler, flavonoidler (flavonoller, flavonları, flavanoller), fenolik asitler, antosiyaninler, alkaloidler, amino asitler, organik asitler, nükleotitler ve polisakkaritler olarak sıralanabilirler (He ve ark., 2012). Ancak bunların arasında fenolik kopigmentler diğerlerine oranla daha yüksek etkinliğe sahiptirler. Kopigmentler, elektronları oldukça zayıf olan flavilyum iyonlarıyla ilişki kurabilen  $\pi$  -elektron bakımından zengin sistemlerdir. Elektron eksikliği olan flavilyum iyonu,  $\pi$ -elektron bakımından zengin kopigment ile birleşmekte ve böylece flavilyumun 2 pozisyonunda suyun nükleofilik saldırısına ve 4 pozisyonunda SO<sub>2</sub> ve peroksitlere karşı stabilite sağlanmaktadır (García-Viguera ve Bridle, 1999). Kopigmentler genellikle renksizdir. Ancak bir antosiyanik çözelti ile karıştırıldığında, hiperkromik bir etki (antosiyanin renginin yoğunluğunun kopigmentasyon ile güçlendirilmesi) gösterir ve absorpsiyon spektrumunda (UV-Vis bölgesi) batokromik kayma [maksimum absorpsiyon dalga boyunun ( $\lambda_{max}$ ) görünür aralıkta daha yüksek dalga boyuna kaymasını sağlayan bir etkileşim (mavileştirme etkisi)] gerçekleştirir (Castañeda-Ovando ve ark., 2009).



Şekil 2.5. Antosiyanin ve kopigment arası  $\pi$ - $\pi$  etkileşimleri

Çizelge 2.2’de son yıllarda kopigmentasyon uygulaması ile ilgili yapılan çalışmalar özetlenmiştir.

### 2.2.3.1. Kopigmentasyon türleri

Kopigmentasyon reaksiyonları etkileşen türlere bağlı olarak farklı şekillerde gerçekleşmektedir. Bunlar molekül içi kopigmentasyon, moleküller arası kopigmentasyon, kendi kendine etkileşim ve metal iyonları ile kompleksasyon olarak gruplandırılmaktadır (Rein, 2005). Bu kompleksler kovalent bağ, hidrojen bağı, Van der Waals kuvveti ve kompleksleşme yoluyla oluşabilmektedir (Chitgar ve ark., 2018). Flavonoid kopigmentte ne kadar fazla hidroksil grubu bulunursa, kopigmentasyon ve kompleks oluşumu o kadar güçlüdür ve kompleks oluşumu için hidroksil grubunun C7’de yer alması etkiyi arttırmaktadır. Ayrıca, kopigmentlerin metoksil gruplarının kopigmentasyon etkisini azalttığı bildirilmiştir (Riaz ve ark., 2016).

Molekül içi kopigmentasyonda, bir organik asit, bir aromatik asil grubu veya bir flavonoid antosiyaninlere kovalent olarak bağlanmakta (Bloor ve Falshaw, 2000) ve katmanlı bir "sandviç" yapı oluşturmaktadır. Farklı grupların katlanması, dönmesi ve istiflenmesinden oluşan üçüncül yapı ile ilişkili hidrofobik kuvvetlerden oluşmaktadır (Şekil 2.5 C) (Malien-Aubert ve ark., 2001).

Moleküller arası kopigmentasyon ise antosiyaninlerle renksiz flavonoidlerin veya diğer fenolik bileşikler arasında zayıf hidrofobik kuvvetlerle meydana gelen kopigmentasyon türüdür (Şekil 2.5 A, E) (Eiro ve Heinonen, 2002).

Çizelge 2.2. Kopigmentasyon ile ilgili yapılmış çalışmalar

Kaynak	Kopigmentasyon türü	Antosiyanin tipi	Kopigment	Konsantrasyon	Sonuç	Referans
Karadut suyu	Moleküller arası	Siyanidin-3-O-glukozit	Flavonoidler (Kamferol, rutin, hiperosid, kuersetin, izokuersetin, kuersitrin ve kateşin)	1:20	Kamferol, hiperosid, rutin, kuersetin ve izokuersetinin kuersitrin ve kateşinden daha yüksek hiperkromik etki gösterdiği ortaya koyulmuştur.	Cao ve ark. (2023)
Frenk üzümü	Moleküller arası	Siyanidin-3-O-glukozit	Ferulik, kafeik, klorojenik ve rosmarinik asit	5:1	Kopigmentler antosiyanin çözeltisinin yarı ömrünü, renk stabilitesini ve antioksidan aktivitesini başarıyla arttırmıştır. Klorojenik ve ferulik asit ile kopigmentasyon ticari gıda uygulamaları için daha uygun bulunmuştur.	Azman ve ark. (2022)
Yaban mersini	Moleküller arası	Siyanidin-3-O-glukozit	Ferulik asit, tannik asit	%0.5	Tannik asit daha yüksek hiperkromik etki göstermiştir.	Jung ve ark. (2022)
Kırmızı şarap	Moleküller arası	Antosiyanidin-3,5-O-diglukozit Antosiyanidin-3-O-glukozit	Gallik asit, epikateşin, kuersetin-3-O-glukozit	1:5-1:80; 1:5-1:80; 1:0.5-1:2.5	Epikateşin daha yüksek hiperkromik etki ve batokromik kayma göstermiştir.	Zhao ve ark. (2022)
Üzüm kabuğu	Moleküller arası	Siyanidin-3-O-glukozit	Ferulik asit, kafeik asit, tannik asit, siringik asit tartarik asit	1:10, 1:50, 1:100, 1:150	Çeşitli organik asitlerle kopigmentasyonun renk yoğunluğunu	Lv ve ark. (2022)

						arttırdığı bulunmuştur. Tannik asit, tartarik asit ve ferulik asit için optimum oran 1:150 diğerleri için 1:100 olarak bildirilmiştir.	
Mor tatlı patates	Molekül içi ve Moleküller arası kopigmentasyon, kendi kendine birleşme	Peonidin-3-sofrozite-5-glukozit, Siyanidin-3-sofrozit-5-glukozit	Gallik asit, ferulik asit, kafeik asit	851 mg, 971 mg, 901 mg	Renk yoğunluğu artmıştır.	Qian ve ark. (2017)	
<i>Lycium ruthenicum</i> Murr.	Moleküller arası	Petunidin-3-O-kumarolirutinozit-5-O-glukozit	Proksilen, ektoin, dipotasyum glisirizinat, α-arbutin, β-arbutin, nikotinamid, ergotionin, allantoin, inositol	Proksilen: 10mg/mL Diğerleri: 100 mg/mL	Proksilen, ektoin ve dipotasyum glisirizinat mavi rengin gelişmesine yardımcı olmuştur.	Deng ve ark. (2022a)	
Siyah havuç ekstraktı	Moleküller arası	Siyanidin-3-glukozit	Saponin, vanilin, epigallokateşin gallat, yeşil çay özü ve protokateşaldehit	%0.2	Antosiyanin kararlılığını sağlamada en güçlü kopigment yeşil çay özü olarak bulunmuştur.	Chung ve ark. (2016)	
Çilek	Moleküller arası	Pelargonidin-3-glukozit Pelargonidin-3-rutinosid Siyanidin-3-O-glukozit	Amino asitler (aspartik asit, valin, prolin)	1:5	Aspartik asit, tüm sıcaklıklarda antosiyanin stabilitesini arttırmıştır.	Bingöl ve ark. (2022)	
Nar ve portakal suyu karışımı	Moleküller arası	Siyanidin-3,5-diglukozit, Pelargonidin-3,5-diglukozit, Siyanidin-3-glukozit, Delfinidin-3,5-diglukozit	Amino asitler (aspartik asit, valin, prolin)	1:5	Aspartik asit, 90 °C'de siyanidin-3,5-diglukozit stabilitesini arttırmıştır. Amino asitlerle kopigmentasyon,	Türkyılmaz ve ark. (2022)	

						antosiyeninleri askorbik aside karşı korumuştur.	
Siyah havuç ekstraktı	Moleküller arası	Siyanidin-3-glukozit	Aminoasit (L-fenilalanin, L-tirozin, L-triptofan) ve polipeptit (e-poli-L-lisin)	%0.1		Özellikle L-triptofan yarı ömür süresini uzatmıştır.	Chung ve ark. (2017)
Dut antosiyenin ekstraktı	Moleküller arası	Siyanidin-3-glukozit	Peynir altı suyu proteini (PASP) ve fenolik bileşikler (rutin, gallik asit, ferulik asit epigallokateşin)	PASP: 0.16 mg/ml Fenolik bileşikler: 0.8 mg/ml	0.16	Rutin en etkili kopigment olduğu bildirilmiştir.	Chen ve ark. (2022)
Üzüm kabuğu	Moleküller arası	Siyanidin-3-O-glukozit	Önceden ısıtılmış kazein ve peynir altı suyu proteini	1:1		pH 3.2 ve 6.3'te renk kaybı ve antosiyeninlerin bozulması önlenmiştir.	He ve ark. (2016b)
Siyah havuç ekstraktı	Moleküller arası	Siyanidin-3-glukozit	Peynir altı suyu proteini (PASP), denatüre peynir altı suyu proteini (DPASP), narenciye pektini ve pancar pektini	%1		DPASP depolama sırasında antosiyenin stabilitesini önemli ölçüde arttırmıştır.	Chung ve ark. (2015)
Mor patates, siyah goji meyvesi	Metal kompleksi	Petunidin-3-rutinoside-(p-kumaroil)-5-glukoz, petunidin 3-trans-p-kumaroil-rutinosid-5-glikozit	Al <sup>3+</sup> , Fe <sup>3+</sup>	1:0.1, 1:0.5, 1:1, 1:2, 1:5, 1:10, 1:30, 1:60		Metal iyonları ile kopigmentasyon renk kararlılığı artırılmıştır.	Tang ve Giusti (2020)
Kırmızı lahana	Metal kompleksi	Siyanidin-3-glukozit	Al <sup>3+</sup> , Ca <sup>2+</sup> , Fe <sup>3+</sup> , Sn <sup>2+</sup>	1:1		Metal iyonları antosiyenin stabilitesini olumsuz etkilemiştir. Sn <sup>2+</sup> en zararlı etkiyi oluştururken Al <sup>3+</sup> diğerlerine kıyasla	Jakaphan (2017)

					daha az zarara neden olmuştur.	
Yaban mersini	Metal kompleksi	Malvidin-3-galaktozit, delfinidin-3-galaktozid	Fe <sup>3+</sup>	%1	Demir iyonları ile kopigmentasyon antosiyanin stabilitesini arttırmıştır.	Jung ve ark. (2015)
Siyah soya fasulyesi tohumu kabuğu	Moleküller arası	Siyanidin-3-O-glukozit	Soya izolatu	protein 1:1	Antosiyanin stabilitesi arttırılmıştır. Önceden ısıtma işlemi soya proteininin etkisini arttırmıştır.	Chen ve ark. (2019)
Siyah havuç ekstraktı	Moleküller arası	Siyanidin-3-glukozit	Arap zamkı	%0.05-5.0	%1.5 arap zamkı ilavesi antosiyanin kararlılığını önemli düzeyde arttırmıştır.	Chung ve ark. (2016)
Siyah fasülye tohumu	Moleküller arası	Siyanidin-3-O-glukozit	β-siklodekstrin	%2	Işık ve farklı depolama koşulları altında antosiyaninlerin stabilitesini arttırmıştır.	Aguilera ve ark. (2016)

### 2.3. Doğal ve modifiye proteinlerin kopigmentasyonda kullanımı

Proteinler, antosiyanin stabilitesini geliştirmek için mükemmel biyouyumluluğa sahip umut verici bileşenlerdir. Ayrıca proteinlerin son zamanlarda polifenollerini koruyan bir tür taşıyıcı gibi davrandığı belirlenmiştir. Proteinler, polifenollere kovalent ve kovalent olmayan bağlanma kapasitesine sahip olup, bu nedenle gıda sisteminin morfolojisini, antioksidan kapasitesini, termal stabilitesini, emülsifikasyon özelliklerini ve biyoyararlanımını etkilemektedir. Başka bir deyişle proteinler, hidrofobik ve hidrofilik etkileşimler, van der Waals kuvvetleri ve hidrojen bağları dahil olmak üzere çeşitli kimyasal etkileşimler yoluyla antosiyaninlerle kompleksler oluşturmaktadır (Gençdağ ve ark., 2022). Yapı incelendiğinde daha çok tersine çevrilebilir nitelikteki kovalent olmayan bağlanma görülmektedir. Hidrojen bağı ve hidrofobik etkileşimler, antosiyanin-protein komplekslerindeki ana kuvvetlerdir. Hidrofobik etkileşimler esas olarak alifatik proteinler, aromatik amino asitler ve antosiyanin benzen halkaları arasında meydana gelirken, özellikle güçlü hidrojen bağları antosiyanin glikozit-protein komplekslerini stabilize etmektedir. Proteinlerin antosiyaninleri koruma etkinliği ve mekanizmasındaki farklılıklar, antosiyaninleri bağlama yeteneklerindeki farklılıklardan kaynaklanabilmektedir. Örneğin,  $\beta$ -kazeinin,  $\alpha$ -kazeinden biraz daha etkili olduğu bilinmektedir (Tang ve ark., 2022).

Ancak her gıda biyopolimerinin antosiyaninler üzerindeki koruyucu etkisi ve etki mekanizması da farklılık göstermektedir ve bu konuda çok az çalışma yapılmıştır. Yenilebilir proteinlerin işlenmeden önce çok ince öğütme, mikro parçacıklandırma ve ön ısıtma gibi ön işlemlerinin, fizikokimyasal özelliklerini değiştirerek antosiyanin stabilitesini koruduğu gösterilmiştir (Chen ve ark., 2019). He ve ark. (2016b) sırasıyla önceden 40-100 °C ve 45-60 °C'de 15 dakika ısıtılan kazein ve peynir altı suyu proteinleri ile üzüm kabuğu antosiyanin ekstraktlarında renk değişikliği üzerinde çalışmışlardır. Önceden 50 °C'de 15 dakika ısıtılan peynir altı suyu proteinlerinin, antosiyaninlerin termal, oksidatif ve foto-bozunmaya karşı stabilitesini daha iyi koruduğu belirlenmiştir. Attaribo ve ark. (2020) 80 °C'de önceden ısıtılan ipekböceği pupa proteininin, siyanidin-3-O-glikozite karşı en yüksek bağlanma afinitesini sergilediğini ve antosiyanin stabilitesi üzerinde daha iyi bir koruyucu etkiye sahip olduğunu belirtmiştir.

Proteinler, özellikle peynir altı suyu proteinleri, hidrofobik etkileşimler ve hidrojen bağı yoluyla antosiyaninlere yönelik yüksek bağlanma afiniteleri nedeniyle üstün kopigmentasyon etkilerine sahiptirler (Chung ve ark., 2015; He ve ark., 2016b; Khalifa ve ark., 2018). Khalifa ve ark. (2018), peynir altı suyu proteininin, antosiyaninlere karşı önemli ölçüde bağlanma

afinitesi ve stabilitesi gösterdiğini ortaya koymuştur. Bu etkileşim peynir altı suyu proteininin boyutunda, hidrofobikliğinde ve ikincil yapılarında değişikliklere neden olmuştur. Sonuçlar, peynir altı suyu proteini yüzeyinin hidrofobik etkilerinin öncelikle peynir altı suyu proteini-antosiyenin kompleksini şekillendirdiğini, bunun daha sonra hidrojen bağı ve van der Waals kuvvetleriyle stabilize edildiğini göstermiştir. Son zamanlarda bitki bazlı potansiyel protein kaynakları benzersiz fonksiyonel özellikleri nedeniyle kopigment olarak ilgi çekmektedir (Wang ve Xie, 2019). Quan ve ark. (2020) model içecek sistemlerinde  $\beta$ -siklodekstrin, peynir altı suyu proteini ve soya proteininin, mor etli tatlı patates antosiyenin ekstraktlarında antosiyenin renk kaybı ve bozulması üzerindeki etkilerini araştırmıştır. Peynir altı suyu proteini ve soya proteininin ekstraktların termal stabilitesini arttırdığını bildirmiştir. Ayrıca 100 °C'de 30 dakika bekletilen soya proteininin ilavesi antosiyenin rengini ve termal stabilitesini iyileştirmiştir. Başka bir çalışmada, depolama sırasında üç amino asitin (L -fenilalanin, L-tirozin ve L-triptofan) ve bir peptidin (poli-L-lizin) model içeceklerdeki antosiyenin genel kırmızı rengi üzerindeki etkileri, 40 °C'de ve ışık altında 7 gün süresince incelenmiştir. Sonuç olarak amino asitlerin eklenmesi, esas olarak hidrojen bağı yoluyla renk stabilitesini arttırmıştır. Ayrıca L-triptofanın, mor havuç antosiyenin rengi üzerindeki etkileri üzerinde önemli bir etkiye sahip olduğu bildirilmiştir (Chung ve ark., 2017).

Literatürde nanofibrile proteinler ile antosiyenin etkileşiminin araştırıldığı sınırlı sayıda çalışmaya ulaşılmıştır. Bu çalışmalardan birinde, siyah pirinç antosiyenin termal stabilitesine doğal ve nanofibrile ipek proteini ile kopigmentasyonun etkileri incelenmiştir (Ma ve Jing, 2020). Yapılan spektrofotometrik ve mikroskopik değerlendirmeler sonucunda nanofibrile ipek proteinleri ile kopigmente edilen antosiyenin termal stabilitesinin doğal proteinlerle kopigmente edilenlere kıyasla daha iyi koruduğu sonucuna varılmıştır [Nanofibrile ipek proteini-antosiyenin (%60.87) > İpek proteini-antosiyenin (%57.47) > tek başına antosiyenin (%40.33)]. Zhao ve ark. (2020c), çalışmalarında kırmızı pancardan elde edilen betalainin, soya protein izolatu fibrilleriyle etkileşimini incelemişlerdir. Soya proteini izolatu fibrillerine betalain bağlanmasıyla  $\beta$ -tabaka yapısında artış meydana gelmiştir. Soya protein izolatu fibrilleri ile kompleksleştirme sonucunda renk kaybının azaldığı ve betalainin termal stabilitesinin %55.3'ten %75.9'a çıktığı ortaya konulmuştur. Çalışma sonucunda betalain stabilitesini artırma açısından nanofibrile soya protein izolatının, doğal soya proteini izolatına kıyasla daha iyi olduğu tespit edilmiştir.

### 2.3.1. Antosiyanin-nanofibrile protein komplekslerinin teorik temelleri

Yapılan birçok çalışmada ısıtma işlemi sonucu denatürasyona uğratılmış proteinlerin antosiyaninler ile etkileşiminin doğal proteinlere göre daha yüksek olduğu bildirilmiştir. Örneğin Chung ve ark. (2015) ısıtma denatüre peynir altı suyu proteini ile stabilize edilen antosiyaninlerin renk bozulmasının doğal peynir altı suyu proteini ile stabilize edilenlere kıyasla daha düşük olduğunu gözlemiştir. Bu durum protein denatürasyonu ile hidrofobik grupların daha fazla açığa çıkması nedeniyle antosiyanin ile etkileşimlerin artması sonucu gerçekleştiği düşünülmektedir.

Ren ve ark. (2022) doğal ve ısıtma işlemi uygulanmış peynir altı suyu proteinlerinin antosiyanin stabilizasyonu üzerine etkilerini karşılaştırmalı olarak araştırmıştır. Çalışma sonucunda ısıtma işlemin yapıdaki  $\alpha$ -heliks bölgelerin azalmasına ve  $\beta$ -plaka bölgelerin artışına neden olduğunu bildirmiştir. Zhang ve ark. (2018) soya proteinine uygulanan ısıtma işlemi sonucunda  $\alpha$ -heliks ve  $\beta$ -plaka yapılarında önemli bir değişim gözlenmediğini bildirmiştir. Ancak doğal ve denatüre proteinlere antosiyanin eklenmesinin  $\beta$ -plaka yapılarında azalma sağladığını ve bu nedenle antosiyaninlerin  $\beta$ -plaka yapıları arasındaki hidrojen bağlarını bozarak burada tutulduğunu düşündüklerini bildirmişlerdir. Başka bir çalışmada da benzer şekilde papain ve pepsin ile hidrolize edilmiş proteinlere siyanidin-3-glukozit eklenmesi ile  $\beta$ -plaka yapılarında önemli düzeyde azalma meydana geldiği rapor edilmiştir (He ve ark., 2022).

Çizelge 2.3'te görüldüğü gibi ısıtma işlemiyle kıyaslandığında nanofibrilasyon işlemi protein yapısındaki  $\alpha$ -heliks yapılarını daha fazla azaltmakta ve  $\beta$ -plaka yapılarını daha fazla artırmaktadır (Alavi ve ark., 2020). Bu nedenle nanofibrile proteinler, antosiyaninler ile asil etkileşimin gerçekleştiği  $\beta$ -plaka yapıları bakımından daha zengindir. Dolayısıyla nanofibrile proteinler ile antosiyanin etkileşimlerinin daha fazla olacağı düşünülmektedir.

**Çizelge 2.3.** Nanofibrilasyonun protein yapısı üzerine etkileri (Alavi ve ark., 2020)

Yapı	Doğal	6 saat ısıtma ile nanofibrilasyon	24 saat ısıtma ile nanofibrilasyon	36 saat ısıtma ile nanofibrilasyon
$\alpha$ -heliks	24.8±0.2	21.5±0.3	20.0±0.2	19.1±0.4
$\beta$ -plaka	23.7±0.1	36.2±0.5	39.1±0.4	40.0±0.4
$\beta$ -kıvrım	15.6±0.2	16.2±0.2	15.6±0.3	15.0±0.4
Rastgele sarım	35.9±0.2	26.1±0.3	25.2±0.3	25.9±0.4

## 2.4. Protein nanofibrilasyonu

### 2.4.1. Nanofibrille proteinlerin üretimi ve etkili faktörler

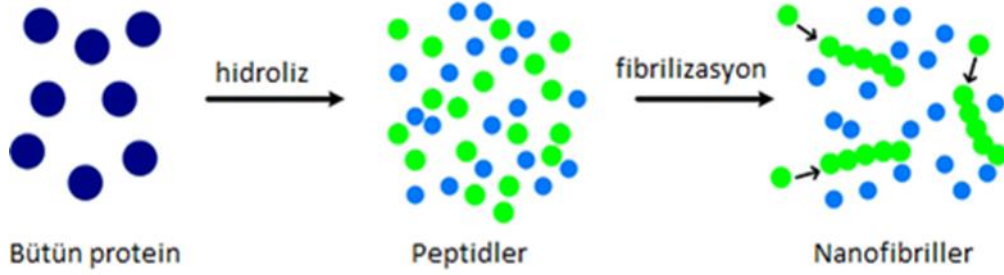
Proteinler emülsifikasyon, jelleşme, viskoziteyi artırma ve köpürme gibi özellikleri nedeniyle birçok gıda formülasyonunda kullanılmaktadır. Ancak proteinlerin bu teknolojik özellikleri ortam şartlarına bağlı olarak değişmektedir (Borzova ve ark., 2016). Nitekim pH, iyonik güç, çeşitli mineraller ve diğer bileşenler proteinlerin özelliklerini keskin şekilde değiştirebilmektedir. Dolayısıyla proteinlerin geniş bir aralıkta kullanılması, teknolojik özelliklerinin geliştirilmesi ve ortam şartlarına karşı direncinin artırılması ile mümkün olabilmektedir. Bu amaçla denatürasyon, hidroliz ve agregasyon reaksiyonları uygulamalar gerçekleştirilmektedir (Nunes ve Tavares, 2019).

Gıda biliminde, doğal olarak globüler formdaki proteinlerin in vitro koşullarda nanofibrilasyonu, gıda formülasyonları için yeni bileşenler üretmek için bir yaklaşım olarak öne çıkmaktadır. Genel olarak, protein fibrilasyonu teknolojik özellikler açısından (ara yüzey etkileşimleri, köpürtme, su ve yağ bağlama vb.) arzulanan sonuçlar sağlamaktadır (Mukherjee ve Gupta, 2017). Buna ek olarak, yapılan çalışmalar fibrilasyonun gıda proteinlerinin biyolojik aktivitesini (dolayısıyla sindirimini) ve antioksidan özelliklerini de etkilediği belirlenmiştir (Mohammadian ve Madadlou, 2016).

Proses koşullarına ve iyonik kuvvetlere bağlı olarak proteinlerin termal denatürasyonu, esnek iplikler, fibriller ve nano/mikropartiküller gibi farklı yapılar üretebilmektedir (Moayedzadeh ve Madadlou, 2015). Nitekim, izoelektrik noktaya yakın pH değerlerinde denatürasyon sıcaklıkları üzerinde ısıtma ile küresel agregatlar oluşturulurken, izoelektrik noktaya uzak pH değerlerinde, doğrusal esnek iplikler baskın olarak oluşmaktadır (Bolder ve ark., 2007). Nanofibriller ise proteinlerin elektrostatik itmenin yüksek olduğu yeterince düşük pH değerlerinde (izoelektrik nokta altında) denatürasyon sıcaklığından yüksek sıcaklıklarda uzun süre ısıtılması ile elde edilebilmektedir (Loveday ve ark., 2012).

Proteinlerin izoelektrik nokta altında (genellikle pH 2) denatürasyon sıcaklığının (> 70°C) üzerinde ısıtma işlem uygulanması (genellikle 2-48 saat), globüler proteinlerin nanofibrillere dönüşmesine yol açmaktadır (Şekil 2.6) (Mohammadian ve Madadlou, 2018). Proteinlerin asidik ısıtma ile nanofibrilasyonu polipeptid modeli ile açıklanmaktadır. Bu modele göre asidik koşullar altında proteinler öncelikle hidrolize olmakta ve daha sonra hidrolize peptitler nanofibriller oluşturmak üzere birleşmektedir. Elde edilen fibriller genellikle 1-10 µm uzunluğa ve yüksek oranda anizotropik olan yaklaşık 1-10 nm çapa sahiptir.

Bu nanofibrillerin büyüklüğü ve tipi, protein konsantrasyonuna, pH değeri, sıcaklık ve ısıtma süresine bağlı olduğu bildirilmektedir (Moayedzadeh ve Madadlou, 2015).



Şekil 2.6. Nanofibrilasyon işleminin mekanizması (Kroes-Nijboer ve ark., 2011)

Asidik ısıtma fibrilasyon amacıyla en çok kullanılan yöntemdir. Bu işlem düşük iyonik güce sahip ortamda uygulanmaktadır. Bu yöntemde proteinler öncelikle hidrolize uğramakta ve peptitler oluşmaktadır. Daha sonra oluşan bu peptitler uç uca dizilerek zincir formunda fibriller elde edilmektedir. Bu işlem sonunda oluşan modifiye proteinler geliştirilmiş teknolojik ve fonksiyonel özelliklere sahip olmaktadır (Mohammadian ve Madadlou, 2016).

İşlemin yüksek iyonik güce sahip ortamlarda gerçekleştirilmesi (örneğin  $\text{CaCl}_2$  varlığında) nanofibril morfolojisinde önemli değişikliklere neden olmaktadır. Nitekim bu şartlar altında elde edilen proteinlerin kıvrımlı (*curly*) yapıya sahip olduğu ve bu nedenle teknolojik özelliklerinin farklılık gösterdiği bildirilmiştir (Loveday ve ark., 2012). Düz nanofibrillerin daha düzgün homojen ve tek düze bir yapısı varken, kıvrımlı nanofibriller heterojen, kıvrıkcık ve dağınık bir yapıya sahiptirler (Shi, 2023).

#### 2.4.2. Protein fibril kaynakları

Protein fibrilleri hayvansal, bitkisel ve mikrobiyal kaynaklardan elde edilebilirler. Aşağıdaki tabloda farklı kaynaklardan elde edilen fibrillerle yapılan çalışmalara örnekler verilmiştir (Çizelge 2.2).

Çizelge 2.2. Farklı kaynaklardan elde edilen fibrillerle yapılan çalışmalar

	Proteinler	Fibrilleşme şartları	Referanslar
	$\beta$ -laktoglobulin	pH 2.0, 80 °C, 48 saat, glisin tamponu	Lin ve ark. (2020)
	$\alpha$ -Laktalbümin	pH 7.4, 37 °C, 30 saat, 20 mM DTT	Talebpour ve Ghahghaei (2020)
Hayvansal	Peynir altı suyu proteini izolatu	pH 2.0, 80 °C, 24 saat pH 2.0, 80 °C, 220 rpm'de 10 saat karıştırma	Hu ve ark. (2019) Feng ve ark. (2018)
	Tavuk yumurtası beyazı lizozimi	pH 2.0, 60 °C, 72 saat, 200 mM NaCl, 100 mM MgCl <sub>2</sub> , 100 mM AlCl <sub>3</sub>	Wawer ve ark. (2019)
	Sığır serum albümini	pH 7.4, 65 °C, 8 saat	Huo ve ark. (2020)
	$\kappa$ -kazein	pH 8.0, 37-80 °C, 24 saat, 10 mM fosfat tampon çözeltisi	Lee ve ark. (2019)
	Ovotransferrin	pH 2.0, 90 °C, 1-6 saat, 150 mM NaCl	Wei ve Huang (2019)
	Ovalbumin	pH 2.0, 90 °C, 24 saat pH 7.0, 78 °C, 22 saat, emülsifikasyon	Milošević ve ark. (2020) Huyst ve ark. (2021)
	Hemoglobin	pH 2.8, 80 °C, 24 saat, 125 mM NaCl	Jayawardena ve ark., 2017
Bitkisel	Pirinç glutelini	pH 2.0, 85 °C, 4 saat	Li ve ark. (2020)
	Soya proteini izolatu	pH 2.0, 85 °C, 8–10 saat ve 3 gün inkübasyon pH 2.0, 90 °C, 2 gün	Wang ve ark. (2020) Josefsson ve ark. (2019)
	Börülce, nohut ve mercimek proteini	pH 2.0, 90 °C, 0,5-24 saat, 150 mM NaCl	Li ve ark. (2021a)
	Barbunya, maş fasulyesi ve kırmızı fasulye proteini	pH 2.0, 85 °C, 6 saat, 200 mM NaCl	Liu ve Tang (2013)
Mikrobiyal	Maya proteini	pH 7.4, 37 °C, 9 gün, 20 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 150 mM NaCl	Pham ve ark. (2018)

## 2.5. *Hibiscus sabdariffa* L.

*Hibiscus sabdariffa* L., farklı bölgelerde hibiskus, roselle, bamya çiçeği, nar çiçeği, kerkede ve bissap olarak da bilinen Malvaceae familyasına ait bir çalıdır (Vildan ve Tontul, 2020). Asya veya Tropikal Afrika'ya özgü olduğu düşünülen bitki Hawaii, Hindistan, Karayipler, Filipinler, Brezilya, Orta Amerika, Afrika, Avustralya ve Florida gibi tropik bölgelerde yaygın olarak yetiştirilmektedir (Gautam, 2004).

*Hibiscus sabdariffa*'nın 300'den fazla ekili türü vardır. Özellikle flavonoidler olmak üzere önemli miktarda biyoaktif bileşik içeriği nedeniyle dünya çapında yaygın olarak tüketilmektedir (Sindi ve ark., 2014).

Bunların yanında sağlığa faydalı pek çok etkisinin olduğu bilinmektedir. Antioksidan, antimikrobiyal, antiseptik, sakinleştirici, idrar söktürücü, sindirimi kolaylaştırıcı, kalp rahatsızlıklarını, öksürük ve bronşiti tedavi edici özellikleri bulunmaktadır (Margesi ve ark., 2013).

Tek yıllık bir çalı olan hibiskus, genellikle jöle, reçel, sos, fermente ürünler ve içecek yapımında kullanılmaktadır. Parlak kırmızı rengi ve tüketiciye hitap eden tadı onu değerli bir gıda ürünü yapmaktadır (Tsai ve Ou, 1996). Antosiyanin bakımından zengin olan hibiskus, hem iyi bir renklendirici hem de potansiyel olarak iyi bir antioksidan kaynağıdır (Maciel ve ark., 2018).

*Hibiskus sabdariffa*'nın antosiyanin içeriğinin, kuru ağırlığın %1.7 ila %2.5'ine ulaştığı bildirilmiştir (Tseng ve ark., 1996). Antosiyanin olarak en fazla delfinidin-3-sambubiosid ve siyanidin-3-sambubiosid içermektedir. Bunlara ilaveten az miktarda mirtilin (delfinidin 3-monoglukozit), krizantenin (siyanidin 3-monoglukozit) ve delfinidin içermektedir. Kaliksleri yüksek miktarda sitrik asit, malik asit, tartarik asit ve protokateşik asit gibi organik asitleri de içermektedir. Hibiskus ekstraktı, antosiyaninlerin varlığı ve renk özelliklerinden dolayı çok zengin kırmızı pigmentasyona sahip olup, renklendirici olarak yaygın kullanılmaktadır (Shruthi ve ark., 2016).

Sharara (2017) çalışmasında 10°C'de 60 gün boyunca depolanan hibiskus özütündeki antosiyanin stabilitesini, kopigment olarak bazı fenolik asitler (ferulik, sinamik ve kumarik) ekleyerek arttırmayı amaçlamıştır. Depolama süresinin sonunda, antosiyanin içeriğindeki azalma, kontrol ve ferulik, sinamik, kumarik asitlerle kopigmente edilmiş özütler için sırasıyla %31,53, %20,48, %9,31 ve %5,52 bulunmuştur. Hibiskus özütüne fenolik asitlerin eklenmesi ile kopigmente edilmiş özütlerin kontrole kıyasla hiperkromik bir etki ve batokromik kayma sağladığı bildirilmiştir. Fenolik asitlerle stabilize edilen hibiskus antosiyanin özütleri, kontrol özütüne kıyasla belirgin bir antioksidan ve antimikrobiyal aktivite göstermiştir. Yapılan başka bir çalışmada saflaştırılmış antosiyanin çözeltileri, gallik asit, tannik asit, ferulik asit ve ellagik asitler gibi fenolik asitlerle ve rutin ve kuersetin gibi flavonoidlerle, farklı konsantrasyonlarda (1: 0, 1: 2, 1: 4, 1: 6) ve pH değerlerinde (1.5, 2.5, 3.5, 4.5) kopigmente edilmiştir. Hiperkromik etki tüm pH değerlerinde gözlenmiştir. Ferulik asitin, hiperkromik ve batokromik kaymalara neden olan etkili bir kopigment olduğu bildirilmiştir. Hibiskus antosiyanin özütünün asidik pH'da (pH 2.5) 1:6 konsantrasyonda ferulik asitle kopigmentasyonunun, ısı stabilitesini önemli ölçüde iyileştirdiği ortaya koyulmuştur (Jadhav ve Bhujbal, 2019). Saidji ve ark. (2023) çalışmalarında hibiskus antosiyanin ekstraktı ışığa maruz bırakıldığında, karanlıkta tutulduğunda veya 60 gün boyunca buzdolabında saklandığında pH 1 ila 4,5'te bozunma

davranışı incelenmiştir. Test edilen beş kopigment arasından (sitrik, kafeik, tannik, gallik ve askorbik asit) sitrik asit en yüksek antosiyanin stabilitesini sağlamış ve bunu askorbik asit ve ardından kafeik asit izlemiştir. En güçlü hiperkromik ve batokromik etki pH 2'de gözlenmiştir.

Literatürde protein izolatlarından elde edilen nanofibrile proteinlerin hibiskus antosiyaninlerin stabilitesine etkisi ile ilgili çalışma bulunmamaktadır.

## 2.6. Kopigmente antosiyaninlerin toz forma işlenmesi

Antosiyaninlerin kopigmentasyonu genellikle düşük konsantrasyonlara sahip sulu çözeltiler içinde gerçekleştirilmektedir. Her ne kadar bu çözeltilerin üretim koşulları üzerine onlarca çalışma yapılmış olsa da kopigmentasyondan sonraki stabilite üzerine çalışmalar oldukça kısıtlıdır.

*Hibiskus sabdariffa* kalikslerinden elde edilen antosiyaninlerin pullulan ile kopigmente edildiği bir çalışmada antosiyanin-pullulan kopigmente ürünü dondurarak kurutmaya tabi tutulmuştur. Dondurularak kurutulmuş pullulan-antosiyanin karışımlarında polisakkarit matrisi, serbest antosiyanin preparatlarına kıyasla renk bozulmasını 1,5-1,8 kat geciktirmiştir (Gradinaru ve ark., 2003). Weber ve ark. (2017) çalışmalarında rutin ve ferulik asit ile kopigmente ettikleri böğürtlen antosiyaninlerini püskürterek kurutma işlemine tabi tutmuşlardır. Toz haline getirilen kopigmentlerin raf ömrünün yarı yarıya arttığı bildirilmiştir. Gong ve ark. (2021a) yaptıkları çalışmada ferulik asit ve kafeik asit ile kopigmente ettikleri böğürtlen antosiyaninlerini ultrason destekli hava ile kurutmuşlardır. Kopigmentasyon işlemi kurutma sırasında böğürtlen antosiyaninlerinin daha iyi korunmasını sağlamıştır.

Kurutma, gıdaların muhafazasında eskilerden beri kullanılan bir yöntemdir ve gıdaların nem içeriğinin düşürülerek raf ömrünün uzatılması prensibine dayanmaktadır. Sulu kopigmente *Hibiskus sabdariffa* örnekleri kolayca bozulabilmektedir ve bu nedenle uzak mesafelere taze olarak ihraç edilmesi uygun değildir. Bu sorunun üstesinden gelmek için, mikrobiyal aktiviteyi azaltmak ve ürünün raf ömrünü uzatmak amacıyla kurutma işlemi gerçekleştirilmektedir (Hardy ve Jideani, 2017). Ayrıca kurutulmuş ürün daha az yer kaplamakta bu nedenle daha az ambalaj malzemesi kullanılmakta ve depolama ve taşıma maliyetleri azalmaktadır (Sagar ve Suresh Kumar, 2010).

### 2.6.1. Köpük kurutma

Gıdalarda kurutma sırasında kalite özelliklerinde meydana gelen değişiklikleri en aza indirmek amacıyla yeni kurutma teknikleri geliştirilmektedir. Böylece hem kurutma maliyetleri

azaltılmakta hem de stabil ve kaliteli yenilikçi gıdaların üretimi sağlanmaktadır (Moses ve ark., 2014).

Köpük kurutma sıvı bir ürünün stabil bir köpüğe dönüştürülerek kurutulmasını içeren bir işlemdir. Hem basit hem de ekonomik bir teknik olan köpük kurutma ısıya duyarlı, şeker içeriği fazla, viskoz ve düşük camsı geçiş sıcaklığına sahip gıdaların kurutulmasına uygun bir yöntemdir. Özellikle toz gıdaların üretimi için diğer kurutma yöntemlerine ekonomik bir alternatiftir (Qadri ve ark., 2020). Özellikle kuruması zor ve yapışkan olabilen ısıya duyarlı meyve suları ve sebze püreleri, köpük kurutma ile başarıyla kurutulabilmektedir. Sıvıların köpürtülmesi ile yüzey alanı artarak kütle transfer yüzeyi genişlemekte ve dolayısıyla kuruma süresi kısalmaktadır (Hardy ve Jideani, 2017). Daha düşük sıcaklıklarda kurutmanın yapılabildiği köpük kurutma ile kurutulmuş malzemelerin, köpüksüz kurutulmuş muadillerine kıyasla uçucu maddeleri daha iyi tuttuğu rapor edilmiştir (Wilson ve ark., 2012).

Bu yöntem sıvı gıdaların, köpürtme ajanı ve stabilizatör kullanılarak sabit köpüğe dönüştürülmesinden sonra ince tabaka halinde serilerek kurutulmasını kapsamaktadır (Sangamithra ve ark., 2015). Köpük, gazın sıvı içindeki dispersiyonudur ve sıvı, gazın dispersiyonundan sonra jel oluşturursa veya katılaşırsa katı köpük oluşmaktadır. Oluşan bu köpüğün kurutma işlemi boyunca stabil kalması kurutmanın verimi için çok önemlidir. Bu da köpürtme yöntemi, karıştırma süresi, köpürtme ajanı ve stabilizatörünün türü ve miktarı ile sıcaklık gibi değişkenlere bağlı olmaktadır (Brar, 2018).

Pek çok gıda köpürme özelliğine sahip değildir ve köpüklendirme yöntemlerinden herhangi birine tabi tutulsa bile stabil bir köpük oluşturamayabilmektedir. Bu tür gıdalar köpürtme ajanı ve köpük stabilizatörleri ile stabil köpüklere dönüştürülmektedir. Köpürtme ajanları arayüzler arasındaki yüzey gerilimini azalarak sıvının köpürmesine yardımcı olmaktadır (Sangamithra ve ark., 2015). Proteinler genellikle iyi yüzey aktif ajanlardır ve köpüklerdeki termodinamik kararsızlığı en aza indirerek kinetik stabilite sağlamaktadır (Indrawati ve ark., 2008). Peynir altı suyu proteini, yumurta albümini, jelatin ve soya proteini gibi protein bazlı maddeler en sık kullanılan köpürtme ajanlarıdır. (Brar, 2018).

Köpük stabilizatörleri köpüğün yapısını daha uzun süre korumasını sağlayan katkı maddeleridir. Polimerler, çözelti viskozitesini artırarak gazların geçirgenliğini azaltma yeteneklerinden dolayı köpük stabilizasyonu için daha çok tercih edilmektedir (Klitzing ve Müller, 2002). Jelatin, nişastalar, pektinler ve zamlar köpük kurutma da yaygın olarak kullanılan stabilizatörlerdendir (Walsh ve ark., 2008). Köpük stabilizatörleri ve köpürtme ajanları sıklıkla birbiri yerine kullanılmaktadır. Örneğin karboksimetil selüloz bazı çalışmalar da köpürtme ajanı (Kadam ve ark., 2012; Lobo ve ark., 2017) bazı çalışmalarda ise köpük

stabilizatörü (Sangamithra ve ark., 2015) olarak kullanılmış ve her iki amaca uygun olarak oldukça iyi performans göstermiştir.

Geleneksel sıcak havayla kurutma yöntemleri meyvelerin kurutulması için uygun değildir. Yüksek sıcaklık ve oksijen koşullarında uzun süre kurutulduğunda meyvelerdeki biyoaktif bileşenler büyük ölçüde bozulmakta ve ürünün kalitesi düşmektedir (Nawirska-Olszańska ve ark., 2017). Dondurularak kurutulmuş ürünlerin kalitesi yüksektir ancak yaklaşık 24-48 saat gibi uzun bir zaman almakta ve bu da üretim maliyetlerinin artmasına neden olmaktadır. Püskürterek kurutma, toz ürün elde etmenin birincil yöntemidir; ancak meyve püresinin yüksek viskozitesi nedeniyle homojen damlalar elde edilememektedir (Saha ve ark., 2019). Köpük kurutma, viskoz, yapışkan ve ısıya duyarlı ürünler için en çok tercih edilen bir yöntemlerdendir. Bu kurutma işleminde sıvı malzeme yenilebilir bir köpük oluşturucu madde ilave edildikten sonra çırpılarak köpük malzemeye dönüştürülmektedir (Sun ve ark., 2020). Hardy ve Jideani (2017), köpük mat kurutma yönteminin sıradan sıcak havayla kurutma, sprey kurutma ve tamburlu kurutma gibi diğer kurutma yöntemlerine kıyasla daha ucuz ve kullanışlı olduğunu bildirmiştir. çalışmalarında yabamersini suyu tozu üretiminde köpük kurutma ve püskürterek kurutma tekniklerini karşılaştırmışlardır. Köpük kurutma ile üretilen yabamersini tozlarında ve bundan üretilen sulandırılmış ürünlerde daha düşük kütle yoğunluğu, yüksek ürün miktarı ve daha canlı bir kırmızı renk elde edildiğini ortaya koymuşlardır. Köpük kurutma yöntemi ile elde edilen ürünlerde toplam monomerik antosiyanin içeriği, toplam fenolik içeriği ve siyanidin-3-glukozit, delfinidin-3-glukozit ve malvidin-3-glukozit içeriklerinin daha yüksek olduğunu belirtmişlerdir. Köpük mat kurutma tekniğinin artık meyve sularından veya posadan toz üretmek için etkili bir dehidrasyon yöntemi olduğu düşünülmektedir. Yapılan bir diğer çalışmada köpük kurutmayla üretilen jambolana suyu tozları 150 gün boyunca depolanmış ve antosiyaninlerde küçük bir azalma (%7-9) gözlemlenmiştir (de Carvalho Tavares ve ark., 2020). Siyah pirinç kepeği antosiyanin ekstraktlarının püskürterek, dondurularak ve köpük kurutma yöntemleri ile kurutulduğu bir çalışmada, köpük kurutma yöntemi ile elde edilen tozların antosiyanin miktarlarının diğer kurutma yöntemlerinden elde edilen tozlardan daha yüksek olduğu bulunmuştur (Kanha ve ark., 2022). Bunlara ek olarak antosiyanince zengin hibiskus (Djaeni ve ark., 2018), ahududu (Dachmann ve ark., 2018), çilek (Vimercati ve ark., 2019), vişne (Abbasi ve Azizpour, 2016), mavi hanımeli meyvesi (Sun ve ark., 2020) gibi pek çok meyvede köpük kurutma yöntemi denenmiştir.

Antosiyanin kopigmentlerinin köpük kurutma yöntemi kullanılarak kurutulduğu bir çalışma henüz yapılmamıştır. Bu nedenle yapılan bu çalışmanın diğer çalışmalara yol gösterici nitelikte olacağı düşünülmektedir.

### 2.6.2. Kırınım Pencereleli Kurutma

Kırınım pencereleli kurutma, farklı sıvı ve yarı sıvı gıda ürünlerini toz haline getirmek için kullanılan yeni bir kurutma tekniği olarak bilinmektedir. Sıcak sudan (30–95°C) gelen termal enerji, plastik bir taşıma bandı üzerinde ince bir film halinde serilen malzemeye iletilmektedir. Üründeki su buharlaşmakta ve bandın üzerindeki egzoz sistemi tarafından uzaklaştırılmaktadır. Ürün soğuk su banyosundan geçtikten sonra konveyörden kazanılmaktadır (Bernaert ve ark., 2019).

Kırınım pencereleli kurutucuda ürün ısı ile doğrudan temas etmediği için çapraz kontaminasyon engellenmiş olmaktadır. Ayrıca atmosferik basınç altında daha düşük sıcaklıklarda kurutma işlemi gerçekleştiği için maliyet daha düşüktür (Moses ve ark., 2014). Teknoloji, kısa kuruma süreleri (3-6 dakika) ve kurutma sırasında nispeten düşük ürün sıcaklıkları (30-70°C) ile karakterize edilmektedir ve böylece rengin, vitaminlerin ve antioksidanların daha iyi korunmasına olanak tanımaktadır (Baeghbali ve ark., 2016; Moses ve ark., 2014; Nindo ve Tang, 2007). Dezavantajları ise sistemin kapasitesinin düşük olması ve şeker içeriği yüksek (yapışkanlık) tozların işlenmesindeki zorluktur (Moses ve ark., 2014).

Antosiyaninler ısıya oldukça duyarlı bileşiklerdir ve geleneksel kurutma yöntemleri ile kurutulduğunda yüksek sıcaklıklardan etkilenerek parçalanmaktadırlar. Yapılan çalışmalarda kırınım pencereleli kurutucu ile kurutulan ürünlerde antosiyanin kaybının oldukça aza indirildiği bildirilmiştir. Celli ve ark. (2016) çalışmalarında haskap meyvesini bulamaç haline getirdikten sonra kırınım pencereleli kurutucu ile kurutmuş ve meyvede bulunan antosiyaninlerin %93.8'inin korunduğunu ortaya koymuşlardır. Baeghbali ve ark. (2016) çalışmalarında nar suyunu kırınım pencereleli kurutucu ile kurutarak püskürtmeli ve dondurarak kurutma yöntemlerine oranla antosiyaninlerin çok daha iyi korunduğunu bildirmişlerdir. Yapılan başka bir çalışmada kızılıçık posası hem konvektif hem de kırınım pencereleli kurutma yöntemleri ile kurutma işlemine tabi tutulmuştur ve antosiyanin miktarının kırınım pencereleli kurutucu ile elde edilen örneklerde daha iyi korunduğu belirlenmiştir (Tontul ve ark., 2018).

### 3. MATERYAL VE YÖNTEM

#### 3.1. Materyal

Çalışmada antosiyanin kaynağı olarak kullanılan *Hibiskus sabdariffa* yerel bir aktardan temin edilmiştir.

Kopigment olarak kullanılan pirinç protein izolatu (Naturiga Natural Foods, İstanbul, Türkiye), bezelye protein izolatu (Proteinocan, Ankara, Türkiye), gluten (Vatan enzymes, İstanbul, Türkiye) ve peynir altı suyu protein izolatu (PASP) (Hardline Nutrition, Kocaeli, Türkiye) temin edilmiştir.

Köpürtme ajanı olarak saponin (Sigma, Almanya), stabilizatör olarak ise karboksimetil selüloz (Alfasol, Çin) kullanılmıştır.

Kontrol amaçlı doğal renk maddesi siyah havuç özütü (Plant-Ex, Konya, Türkiye) ve sentetik renk maddesi olarak Allura Red (Neelicon, Hindistan) kullanılmıştır.

Elde edilen kopigmentlerin renklendirici olarak denendiği model gıdalar olarak kullanılan yoğurt yerel bir marketten temin edilmiştir. Yumuşak şekerleme ise çalışma kapsamında üretilmiş olup, yapımında ise glikoz şurubu (40 dekstroz eşdeğerine sahip) (yerel bir marketten), toz şeker (Torku, Konya, Türkiye) ve jelatin (Toz sığır jelatini, 220 Bloom) (Alfasol, Çin) kullanılmıştır.

#### 3.2. Yöntem

##### 3.2.1. Deneme Deseni

Çalışmanın ilk kısmında kopigmentasyon ajanı olarak kullanılmak üzere nanofibrile protein eldesi gerçekleştirilmiştir. Bitkisel protein olarak pirinç, bezelye ve gluten kullanılırken hayvansal protein kaynağı olarak peynir altı suyu proteini tercih edilmiştir. Seçilen protein kaynaklarından düz ve kıvrımlı nanofibrile proteinler elde edilmiştir.

Çalışmanın ikinci kısmında Hibiskus bitkisinden antosiyanin ekstraksiyonu gerçekleştirilmiştir.

Çalışmanın üçüncü kısmında elde edilen antosiyanin ekstraktı ve nanofibrile proteinler karıştırılarak kopigmentasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Kopigmentasyonun etkinliğinin belirlenmesi için termal stabilite testi ve batokromik kayma ile hiperkromik etki tespit edilerek en uygun kopigmentasyon ajanlarına karar verilmiştir.

Çalışmanın dördüncü kısmında belirlenen 6 kopigmentasyon ajanı ile kopigmente edilmiş antosiyanin ekstraktları ve kontrol örneği ön denemelerle belirlenen şartlarda köpürtme

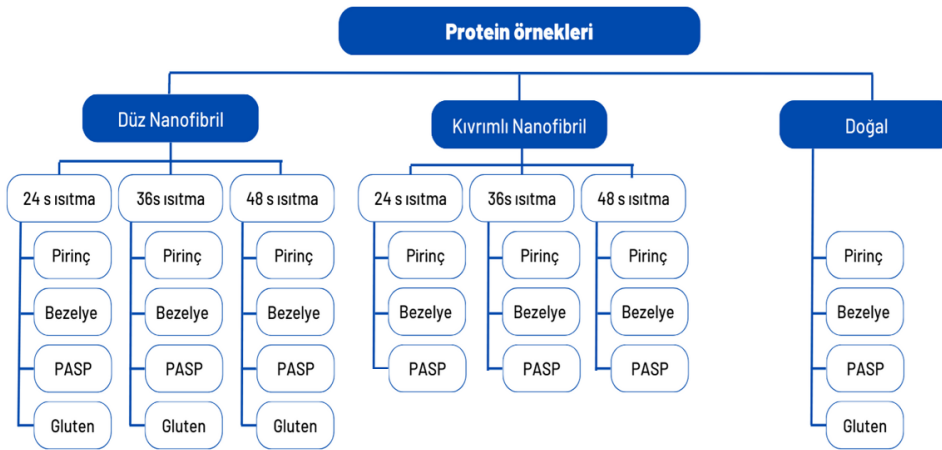
işlemine tabi tutulmuştur. Köpürtülen ekstraktlar ve kontrol örneği kırımın pencereli kurutucuda kurutularak toz ürünler elde edilmiştir. Elde edilen toz ürünlerde kimyasal analizler gerçekleştirilerek özellikleri ortaya koyulmuştur.

Çalışmanın beşinci ve son kısmında ise elde edilen toz kopigmente ekstraktlar ve piyasadan satın alınan kontrol renk maddesi ön denemelerle belirlenen oranlarda yumuşak şekerleme ve yoğurt formülasyonuna dahil edilmiştir. Yumuşak şekerleme ürünleri oda sıcaklığında ( $25\pm 1^\circ\text{C}$ ) 32 gün, yoğurt örnekleri ise  $8^\circ\text{C}$ ' de 16 gün boyunca depolanmıştır. Depolama boyunca yumuşak şekerleme örneklerinde 8 günde bir, yoğurt örneklerinde 4 günde bir toplam monomerik antosiyanin tayini ve renk tayini gerçekleştirilmiştir.

### 3.2.2. Nanofibrile protein eldesi

Nanofibrilasyon işleminde bezelye protein izolatı, pirinç protein izolatı, gluten ve peynir altı suyu proteini izolatı (PASP) kullanılmıştır. 2 farklı özellikte (düz ve kıvrımlı) nanofibril 3 farklı ısıtma süresinde üretilmiştir. Ayrıca doğal protein izolatları da sonraki denemelerde doğrudan kullanılmıştır. Bu nedenle 12 düz, 9 kıvrımlı ve 4 doğal protein izolatı olmak üzere 25 protein örneği elde edilmiştir. (Şekil 3.1).

Gluten ile kıvrımlı nanofibrillerin üretim denemelerinde peltelenme meydana gelmesi nedeniyle kıvrımlı gluten nanofibrilleri üretilenmemiş, bu nedenle çalışma kapsamında değerlendirilememiştir.



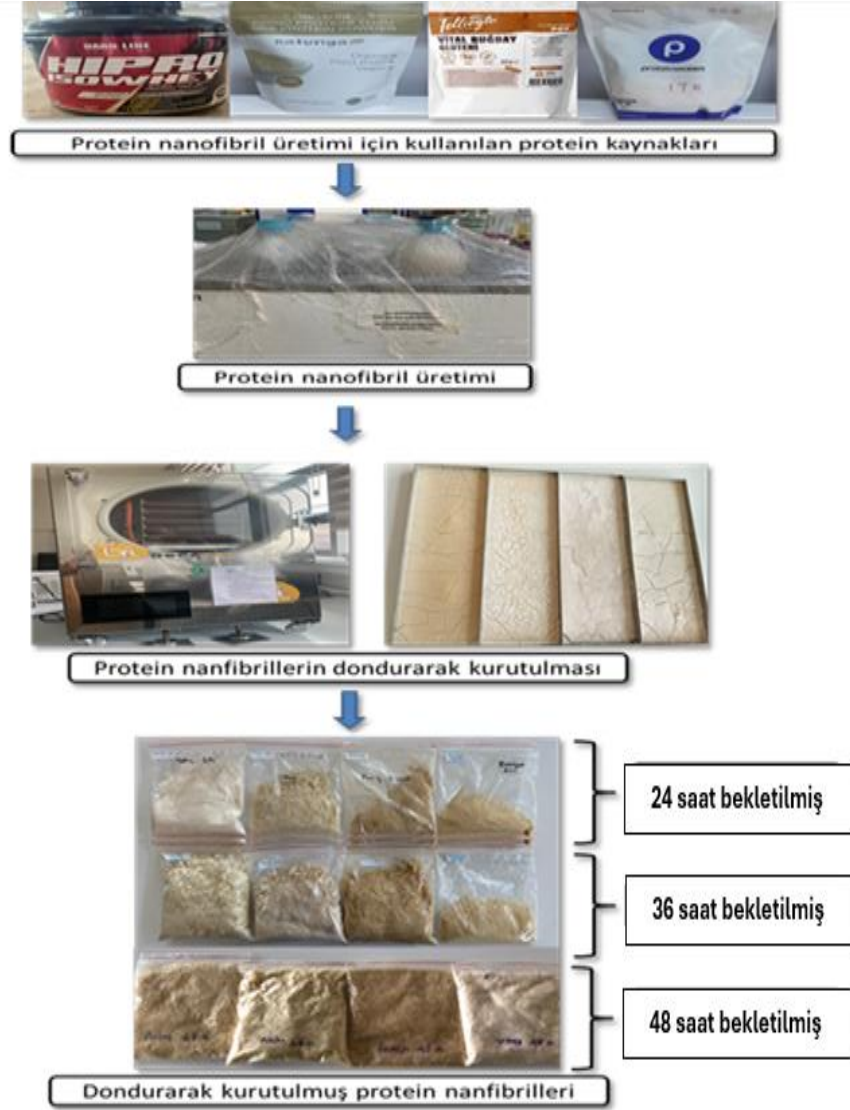
Şekil 3.1. Çalışmada kullanılan protein örnekleri

### 3.2.2.1. Düz nanofibrillerin üretimi

Protein nanofibrilleri Alavi ve ark. (2020) tarafından uygulanan metoda göre elde edilmiştir. Bu amaçla proteinler distile su içinde 30 mg/mL konsantrasyonda çözündürülmüştür. Tam çözünme sağlamak için çözeltiler manyetik karıştırıcıda 2 saat boyunca karıştırılmıştır. Ardından proteinlerin tamamen hidrate olması için 4°C'de bir gece bekletilmiştir. Buzdolabından alınan çözeltilerin pH değeri NaOH (6M) ve HCl (6M) ile 2'ye ayarlanarak 90°C su banyosunda 24 (Zhang ve ark., 2021), 36 veya 48 saat (Alavi ve ark., 2020) bekletildikten sonra hızla soğutulmuştur. Daha sonra çözelti pH değeri 3.7'ye ayarlanmış ve -80°C'de 1 saat bekletildikten sonra dondurarak kurutucuda (Befatek Makina, Konya, Türkiye) kurutularak toz haline getirilmiştir (Şekil 3.2). Elde edilen fibriller çalışma süresince -18°C'de depolanmıştır. Elde edilen protein örneklerin kimyasal karakterizasyonu için FTIR ve floresan spektroskopisi analizleri gerçekleştirilmiştir.

### 3.2.2.2. Kıvrımlı nanofibrillerin üretimi

Kıvrımlı nanofibriller, düz nanofibriller ile aynı şekilde üretilmiş ancak ilk aşamada protein çözeltisi distile su yerine 150 mM NaCl içerisinde hazırlanmıştır (Li ve ark., 2021b). Elde edilen protein örneklerin kimyasal karakterizasyonu için FTIR ve floresan spektroskopisi analizleri gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.2. Protein nanofibrillerinin elde edilme aşamaları

### 3.2.3. Hibiskustan antosiyanin ekstraksiyonu

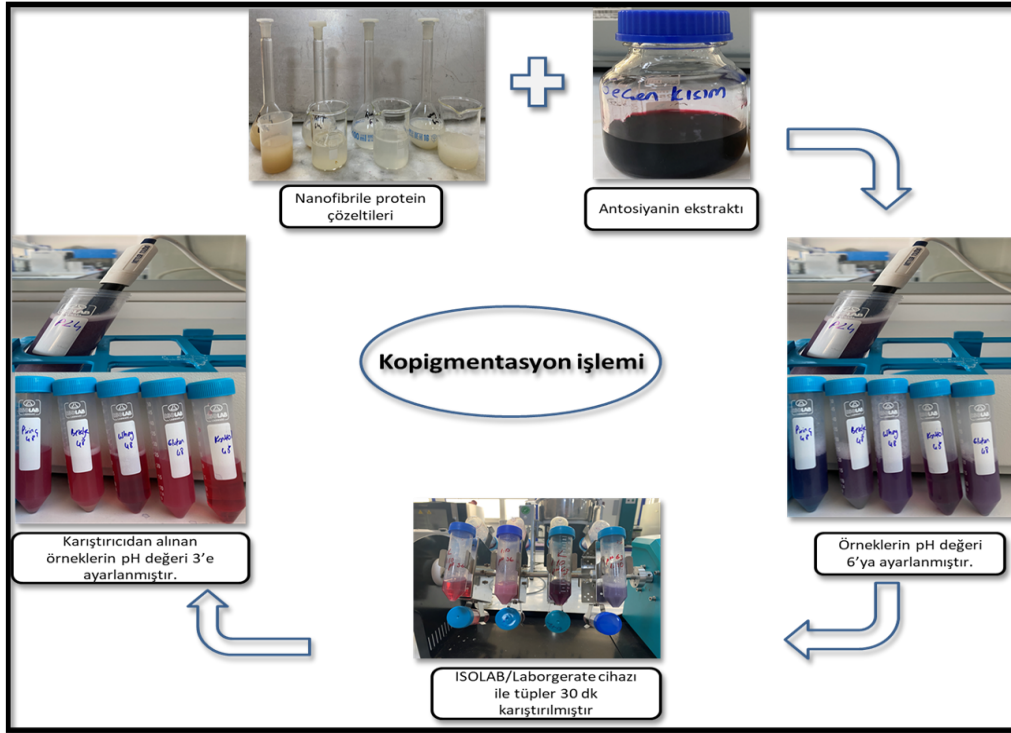
Hibiskustan antosiyanin eldesi Abou-Arab ve ark. (2011)'de belirtilen metodun modifiye edilmesiyle gerçekleştirilmiştir. Hibiskus öğütülerek toz haline getirilmiştir. Toz haline getirilen örnek 1:10 oranında 90 °C sıcaklıkta saf su ile karıştırılmıştır. 15 dakika boyunca mekanik karıştırıcı (DLAB-OS20-S, Çin) ile 600 RPM hızında karıştırılmıştır. Daha sonra 24 °C su banyosunda 100 d/d'da 24 saat boyunca çalkalanmıştır. Filtreden süzülerek posa kısmı uzaklaştırılmıştır (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. Hibiskus'tan antosiyanin elde edilme aşamaları

### 3.2.4. Elde edilen antosiyanin ekstraktının protein nanofibrilleri ile kopigmente edilmesi

Hibiskus antosiyaninleri ile nanofibrillerin kopigmentasyon şartları Li ve ark. (2021b) ve Ma ve Jing (2020)'e göre ön denemeler ile belirlenmiştir. Hibiskus antosiyanin ekstraktı ve hazırlanan protein nanofibril solüsyonları (distile su içinde 10 mg/mL) 1:5 oranında karıştırılmıştır. Daha sonra karışımın pH değeri NaOH çözeltisi (1M) kullanılarak 6'ya ayarlanmıştır. 30 dk boyunca rotatörde (Isolab Laborgerate, Almanya) karıştırılarak kopigmentasyon işlemi gerçekleştirilmiş ve süre sonunda çözelti pH değeri 3'e ayarlanmıştır. Bu aşamada 25 farklı protein ile oluşturulmuş 25 farklı kopigment ve protein solüsyonu yerine saf su kullanılmış olan kontrol üretilmiştir. Elde edilen kopigmente karışımların öncelikle batokromik kayma ve hiperkromik etkileri belirlenmiştir. Hemen ardından termal stabilite testi yapılarak toplam monomerik antosiyanin ve polimerik renk tayini, FTIR ve Floresan spektroskopisi analizleri gerçekleştirilmiştir. Bu analizler sonucunda en uygun nanofibril ve işleme şartları belirlenmiştir (Şekil 3.4).



Şekil 3.4. Kopigmentasyon işlem basamakları

### 3.2.5. Seçili komplekslerin köpürtülmesi ve kırınım pencereli kurutma yöntemi ile toz forma işlenmesi

Köpürtme amacıyla kopigmente kompleksler içerisine köpürtme ajanı olarak saponin, stabilizatör olarak ise karboksimetil selüloz ilave edilmiştir. Kopigmente komplekslere ve kontrol örneğine %0.3 saponin, %0.5 karboksimetil selüloz eklenerek 5 dakika boyunca çırpılarak köpük elde edilmiştir. Köpürtme işlemi çırpma aparatı takılmış Hobart (N50, Almanya) mikser ile gerçekleştirilmiştir. Elde edilen köpükler derhal kurutma işlemine tabi tutulmuştur.

Elde edilmiş köpürtülmüş karışım kızılötesi destekli kırınım pencereli kurutma yöntemi (özel imalattır) ile kurutularak toza dönüştürülmüştür. Kurutma işleminin en uygun şartlarını belirlemek amacıyla farklı serme kalınlıkları (1-3 mm) ve su sıcaklıklarında (80-100°C) ön denemeler yapılmış ve 2mm serme kalınlığı ile 90°C sıcaklığa karar verilmiştir. Kurutma ürün nem içeriğinin %3'ün altına düşmesine kadar devam ettirilmiştir ve yaklaşık 30 dakika sürmüştür. Daha sonra kurutulmuş ürün kurutucu film üzerinden kazınarak bir öğütücü yardımıyla toz forma dönüştürülmüştür. Toz ürün düşük yoğunluklu polietilen ambalajlarda ambalajlanarak analizlere kadar -18°C'de depolanmıştır. Elde edilen toz ürünlerde antioksidan aktivite (DPPH, FRAP ve CUPRAC), toplam fenolik madde tayini ve toplam monomerik antosiyanin tayini yapılarak özellikleri belirlenmiştir.

### 3.2.6. Toz forma işlenen komplekslerin model gıdalara uygulanması

Elde edilen toz renklendirici farklı gıdalara eklenerek (yumuşak şekerleme ve yoğurt) depolama stabilitesi belirlenmiştir.

Model gıda olarak kullanılan yumuşak şekerleme pişirme işlemi için glikoz şurubu (%30) ve toz şeker (%60) pişirme kabına tartılıp üzerine su ilave edilerek kaynayıncaya kadar karıştırılmıştır. Kaynamaya başladıktan sonra jelatin (%10) katılarak hızlı bir şekilde çözünmesi sağlanmıştır. Karışım yaklaşık 80 °Brix'e ulaşıncaya kadar karıştırmaya devam edilip sonrasında ocaktan alınarak yaklaşık 90 °C'de iken sitrik asit eklenerek pH değeri 3.5'e ayarlanmıştır (Prakash ve Priya, 2016). Son olarak %1 kopigmente hibiskus tozu ve kontrol örneği için %0.3 piyasadan satın alınan doğal renk maddesi (siyah havuç özütü) ve 50 ppm sentetik renk maddesi olarak Allura Red karışıma eklenmiştir. Bu oranlar antosiyanin içeriklerine göre belirlenmiştir. Hızlı bir şekilde karıştırılan şekerleme-ekstrakt karışımı silikon kaplara dökülerek -18°C'deki derin dondurucuda 2-3 saat soğumaya bırakılmıştır. Soğutulan yumuşak şekerlemeler kalıptan çıkarılarak depolama aşamasına geçilmiştir. Yumuşak şekerlemeler oda sıcaklığında (25±5 °C) 32 gün bekletilerek (Riedel ve ark., 2015) 0, 8, 16, 24, 32. günlerde toplam monomerik antosiyanin tayini ve renk tayini gerçekleştirilmiştir. Yumuşak şekerlemelerde toplam monomerik antosiyanin tayini Lee ve ark. (2005) çalışmalarında belirtilen metoda göre yapılmıştır.

Model gıda olarak yerel bir marketten alınan yoğurt (pH 4.6) kullanılmıştır. Yoğurda ön denemelerle belirlenen oranlarda (%1.5) kopigmente hibiskus tozu katılarak, kontrol içinse %0.3 doğal renk maddesi (siyah havuç özütü) ve 50ppm sentetik renk maddesi olarak Allura Red (Combeau ve ark., 2002) ilave edilerek örnekler hazırlanmıştır. Kopigmente hibiskus tozu içeren yoğurt ve piyasadan satın alınan siyah havuç özütü içeren kontrol yoğurdu 16 gün 8 °C'de depolamaya tabi tutularak (Baria ve ark., 2021) depolamanın 0, 4, 8, 12 ve 16. günlerinde toplam monomerik antosiyanin ve renk tayini yapılmıştır. Yoğurt örneklerinde toplam monomerik antosiyanin tayini Benchikh ve ark. (2021) çalışmalarında belirttiği metottan faydalanılarak gerçekleştirilmiştir.

### 3.2.7. Yapılan analizler

#### 3.2.7.1. Batokromik kayma ve hiperkromik etkinin belirlenmesi

Kopigmentasyon reaksiyonlarının belirlenmesinde hiperkromik etki ve batokromik kayma adı verilen 2 ayrı parametre kullanılmaktadır. Hiperkromik etki; kopigment ve antosiyanin etkileşimleri sonucunda,  $\lambda_{\text{vis-maks}}$  dalga boyundaki absorbansın artışı ile izlenmektedir. Bu artış, renk yoğunluğundaki artış olarak da tanımlanabilmektedir. Batokromik kayma ise; kopigmentasyon etkileşimine bağlı olarak, antosiyaninlerin maksimum absorbansının ( $A_{\text{maks}}$ ) gerçekleştiği dalga boyunda gözlemlenir. Bu özelliklerin ölçümü amacıyla 2 mL örnek 1 cm tabaka kalınlığındaki tek kullanımlık spektrofotometre küvetlerine alınarak spektrofotometrede 400–700 nm aralığında, maksimum absorbans verdikleri dalga boyları ( $\lambda_{\text{vis-maks}}$ ) ve bu dalga boyundaki absorbansları tespit edilmiştir. Aşağıda verilen eşitliklere göre absorbans ( $\Delta \lambda_{\text{maks}}$ ) ve dalga boyundaki kayma ( $\Delta A$ ) hesaplanmıştır (Malaj ve ark., 2013).

$$\Delta \lambda_{\text{maks}} = \lambda_{\text{maks}} - \lambda_{\text{maks0}} \quad (\text{Eşitlik 3.1})$$

$\lambda_{\text{maks0}}$ : Kopigment eklenmemiş örneğin maksimum absorbanstaki dalga boyu

$\lambda_{\text{maks}}$ : Kopigmente edilen örneğin maksimum absorbanstaki dalga boyu

$$\% (\Delta A) = (A - A_0) / A_0 \times 100 \quad (\text{Eşitlik 3.2})$$

$A_0$ : Kopigment eklenmemiş örneğin maksimum absorbansı

$A$ : Kopigmente edilen örneğin maksimum absorbansı

#### 3.2.7.2. Termal stabilite testi

Termal kararlılık testi, numunelerin 80, 90, 100°C'de 120 dakikaya kadar su banyosunda (Nüve ST30, Ankara, Türkiye) ısıtılması sırasında belirli aralıklarla örnekleme ve bu örneklerin hızlıca oda sıcaklığına soğutulması sonrası analiz edilmesi ile yapılmıştır (Ma ve Jing, 2020). Elde edilen çözelti 10000 g'de 30 dakika santrifüjlenerek süpernatantın polimerik renk değerleri ve toplam monomerik antosiyanin konsantrasyonu hesaplanmıştır. Bu testlerden elde edilen veriler kinetik hesaplamalarda kullanılmıştır.

Kopigmente edilmiş örnekler ve kontrol grubu örneklerinin termal stabilite testi sonucunda elde edilen verilere ait termal degradasyon kinetiği parametreleri Arrhenius eşitliği ve 2. dereceden reaksiyon kinetiğine göre (kinetik hesaplamalar sonucunda karar verilmiştir) aşağıdaki formüllere göre hesaplanmıştır (Eşitlik 3.3) (Simonin, 2016).

$$\frac{1}{A} - \frac{1}{A_0} = kt \quad (\text{Eşitlik 3.3})$$

A = t süre sonundaki konsantrasyon

A<sub>0</sub> = Başlangıç konsantrasyonu

k = Hız sabiti [(mg.L)<sup>-1</sup>.dk<sup>-1</sup>]

t = Zaman (dk)

Antosiyenin degradasyon reaksiyonuna etki eden sıcaklık ile hız sabiti (k) arasındaki ilişkiyi tanımlamak amacıyla Arrhenius denklemi kullanılmaktadır (Martinus ve Bookel, 2008). *lnk* ile (1/T) arasında doğrusal bir ilişki meydana getirilerek (Arrhenius grafiği), parametrelerin aktivasyon enerjisi (E<sub>a</sub>), çizilen doğrunun eğiminden hesaplanmıştır (Eşitlik 3.4) (Pohndorf ve ark., 2018).

$$\ln k = \ln A - (E_a/R) \cdot (1/T) \quad (\text{Eşitlik 3.4})$$

A = Arrhenius sabiti

E<sub>a</sub> = Aktivasyon enerjisi (depolama sırasında renk değişimi için gereken minimum enerji) (kal/mol<sup>-1</sup>)

k = Reaksiyon hız sabiti (dk<sup>-1</sup>)

R = Evrensel gaz sabiti (1.987 kal/mol<sup>-1</sup>)

### 3.2.7.3. Renk tayini

Kopigmente edilen ve edilmeyen örneklerin renk değerleri Konica-Minolta (CR-400, Japonya) renk ölçer ile ölçülmüştür. Örneklerin 10 farklı noktasından ölçüm alınmıştır. Renk ölçerde okunan *L\**, *a\** ve *b\** değerleri kullanılarak ton açısı ve doygunluk değerleri Francis (1998) tarafından bildirilen formüllere göre hesaplanmıştır (Buvé ve ark., 2018).

### 3.2.7.4. Polimerik renk tayini

Polimerik renk tayini K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub> çözeltisinin antosiyenin içeren çözeltiye eklenmesi ile doğal haldeki monomerik antosiyeninlerin bisülfitle reaksiyona girerek renksiz bileşikler oluşturması esasına dayanmaktadır.

Renk yoğunluğu ve polimerik renk değerlerinin belirlenmesi için monomerik antosiyenin tayininde olduğu gibi, örnekler KCl tampon çözeltisi (0.025 M) veya distile su ile

uygun oranda seyreltilmiştir. İki ayrı küvete her bir seyreltilmiş örneklerden 2.8 mL alınmış ve kuartz küvetin birine 0.2 mL  $K_2S_2O_5$  (%20, w/v) eklenip, diğerine ise 0.2 mL distile su ilave edilerek her iki küvet 15 dk karanlık ortamda bekletilmiştir. Daha sonra her iki küvetin absorbans değerleri 420 nm,  $\lambda_{vis-maks}$  ve 700 nm dalga boylarında saf suya karşı okunmuştur (Giusti ve Wrolstad, 2001).

**Polimerik renk ölçümü:**  $K_2S_2O_5$  eklenmiş küvette bulunan örneklerin 420 nm, 518 nm ( $\lambda_{vis-maks}$ ) ve 700 nm dalga boylarında absorbansları kullanılarak hesaplanmıştır (Eşitlik 3.5).

$$A = (A_{420}-A_{700}) + (A_{518}-A_{700}) \times Sf \quad (\text{Eşitlik 3.5})$$

Sf: Seyreltme faktörü

**Renk yoğunluğu:** Saf su eklenmiş küvette bulunan örneklerin 420 nm, 518 nm ( $\lambda_{vis-maks}$ ) ve 700 nm dalga boylarında absorbanslarının ölçülmesi ile hesaplanmıştır (Eşitlik 3.6).

$$A = (A_{420}-A_{700}) + (A_{518}-A_{700}) \times Sf \quad (\text{Eşitlik 3.6})$$

Sf: Seyreltme faktörü

**Polimerik renk oranı:** Polimerik rengin, renk yoğunluğuna oranından hesaplanmaktadır (Eşitlik 3.7). Polimerik renk oranı arttıkça antosiyaninlerin parçalandığı varsayılmaktadır.

$$\text{Polimerik renk oranı (\%)} = (\text{Polimerik renk} / \text{Renk yoğunluğu}) \times 100 \quad (\text{Eşitlik 3.7})$$

### 3.2.7.5. Toplam monomerik antosiyanin tayini

Örneklerin toplam monomerik antosiyanin miktarları pH diferansiyel metodu ile belirlenmiştir. Bu amaçla örnekler, uygun oranda potasyum klorür tampon çözeltisi (pH 1, 0.025 M) ve sodyum asetat tampon çözeltisi (pH 4.5, 0.4 M) ile seyreltilmiştir. Her iki seyreltik, karanlıkta 20 dk bekletildikten sonra absorbansları 510 ve 700 nm dalga boylarında ölçülmüştür. Toplam monomerik antosiyanin miktarı siyanidin-3-glikozit (S3G) cinsinden aşağıdaki eşitliklere (Eşitlik 3.8 ve Eşitlik 3.9) göre hesaplanmıştır (Tontul ve Topuz, 2017).

$$A = (A_{518}-A_{700})_{pH1.0} - (A_{518}-A_{700})_{pH4.5} \quad (\text{Eşitlik 3.8})$$

$$\text{TMA (mg/L)} = (A \times 449.2 \times Sf \times 1000) / 26900 \quad (\text{Eşitlik 3.9})$$

A518: 518 nm dalga boyunda belirlenen absorbans

A700: 700 nm dalga boyunda belirlenen absorbans

A: Düzeltilecek hesaplanmış absorbans farkı

Sf: Seyreltme faktörünü

### 3.2.7.6. Antioksidan Aktivite

Hibiskus içeriğinde bulunan antioksidanlar ve fenolik maddeler nedeniyle önemli bir antioksidan aktiviteye sahiptir. Nanofibrile proteinlerin de antioksidan aktivite gösterdiği bildirilmektedir (Mohammadian ve Madadlou, 2016). Bu nedenle komplekslerin antioksidan aktivitesinde sinerjistik bir artış olacağı düşünülmektedir. Kopigmente edilmiş örneklerin ve kontrol grubu örneklerin antioksidan aktivitesi; 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikalini süpürme aktivitesi (DPPH), Demir İndirgeme Antioksidan Gücü (FRAP) ve Bakır (II) İyonu İndirgeme Esaslı Antioksidan Kapasitesi (CUPRAC) olmak üzere üç farklı yöntemle göre belirlenmiştir. 3 analiz sonuçları da troloks ile hazırlanan kurvelere göre hesaplanmış ve mg troloks eşdeğeri antioksidan aktivite (TEAA) / 100 g km cinsinden ifade edilmiştir.

**DPPH metodu ile toplam antioksidan aktivite analizi;** DPPH radikalini indirgeme etkisi Tontul ve Topuz (2017) tarafından bildirilen yöntemle göre yapılmıştır. Seyreltilen örneklerden 0.05 mL alınarak üzerine 0.95 mL DPPH ilave edilerek vortekslenmiştir. 30 dakika karanlıkta bekletilen örneklerin absorbans değerleri 517 nm’de okunmuştur. Hazırlanan kurveye göre antioksidan aktivite hesaplanmıştır.

**FRAP metodu ile toplam antioksidan aktivite analizi;** Asetat tamponu (300 mmol/L), 2,4,6-Tris(2-pyridyl)-s-triazine (10 mmol/L) çözeltisi ve FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O çözeltisi (20 mmol/L) sırası ile 10:1:1 oranında karıştırılarak analiz çözeltisi hazırlanmıştır. 50 µl örnek ekstraktı üzerine 700 µl analiz çözeltisi ilave edilerek karanlıkta 30 dakika bekledikten sonra 593 nm’de absorbans ölçülmüştür. Hazırlanan kurveye göre antioksidan aktivite hesaplanmıştır (Gao ve ark., 2000).

**CUPRAC metodu ile toplam antioksidan aktivite analizi;** Deney tüpü içerisine CuCl<sub>2</sub> (10<sup>-2</sup> M), amonyum asetat tamponu (1M, pH 7) ve neokuproin çözeltisinden (7.5x10<sup>-3</sup> M) sırasıyla 1'er ml eklenmiş ve üzerine 0.1 ml örnek ve 1 ml distile su ilave edilip tüpler vortekslenmiştir. Toplam hacim 4.1 ml olacak şekilde hazırlanan çözeltiler oda koşullarında ağzı kapalı olarak 30 dakika boyunca bekletilmiştir. Bu süre sonunda içinde örnek yerine ekstraksiyon çözeltisi bulunan referans çözeltilere karşı 450 nm’de absorbans değerleri ölçülmüştür. Hazırlanan kurveye göre antioksidan aktivite hesaplanmıştır (Apak ve ark., 2008).

### 3.2.7.7. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektrometresi

Fourier dönüşümü kızılötesi spektroskopisi (FTIR), bir maddenin kızılötesi absorpsiyon veya emisyon spektrumunu elde etmek için kullanılan tekniktir. FTIR ile antosiyanin-

nanofibrile protein komplekslerinde hidrojen bağı etkileşimlerinin var olup olmadığı ve bu etkileşimlerin antosiyaninlerin ve proteinlerin spektroskopik özelliklerini nasıl değiştirdiği gösterilmektedir (Deng ve ark., 2022b).

Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektrometre analizi Thermo Scientific – Nicolet iS20 (CA, ABD) cihazı ile belirlenmiştir. 4000-600  $\text{cm}^{-1}$  dalga boyu aralığında, 2  $\text{cm}^{-1}$  çözünürlük ve her spektrum için 1  $\text{cm/s}$  tarama hızı ile okumalar yapılarak spektrum grafiği elde edilmiştir.

### **3.2.7.8. Floresans Spektrometre**

Floresans spektroskopisi, kolay erişilebilirliği ve doğruluğu nedeniyle proteinlerin polifenoller gibi diğer maddelerle bağlanma etkileşimini ve yapısal değişikliklerini karakterize etmede kullanılmaktadır. Floresans spektroskopisi, ekipman tarafından yayılan kızılötesi radyasyonla kovalent bağların elektronlarının uyarılması prensibi ile çalışmaktadır. Hızlı ve hassas bir yöntemdir ve kovalent bağların varlığı hakkında bilgi sağlamaktadır (Robert ve ark., 2022). Dolayısıyla molekül içi bağların tayini için kullanılan yaygın bir yöntemdir. Floresan emisyon yoğunluğundaki ve maksimum dalga boyundaki değişiklik proteinlerin yapısal değişikliklerinin yanı sıra mikroçevre farkını da tanımlayabilmektedir (Ren ve Giusti, 2021).

Floresan spektrometre ölçümleri, Agilent Cary Eclipse (Agilent, Almanya) cihazı ile gerçekleştirilmiştir. Emisyon spektrumları, 1.0  $\text{cm}^2$ 'lik bir kuvars küvette 280 nm'lik bir uyarma dalga boyu (yarık genişliği 5 nm) ile 300 ila 400 nm arasında kaydedilmiştir.

### **3.2.7.9. İstatistiksel analizler**

Çalışma faktöriyel deneme desenine göre yürütülmüştür. Üretimler 3 tekerrürlü, analizler ise en az 2 paralelli olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Elde edilen data varyans analizine tabi tutularak önemli farklılıklar Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi ile belirlenmiştir.

## 4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA

### 4.1. Batokromik kayma ve hiperkromik etki

#### 4.1.1. Protein izolatları ile kopigmente edilmiş örneklerin batokromik kayma ve hiperkromik etki analiz sonuçları

Kopigmentasyon, bir antosiyanin kromoforunun, kopigmentin düzlemsel elektronik olarak doymuş kısmı ile hidrofobik olarak yönlendirilen bir birleşimidir; yani sulu ortamdaki van der Waals etkileşimleri ve hidrofobik etkiler, antosiyanin ve kopigment moleküllerinin ' $\pi-\pi$ ' istiflenmesiyle sonuçlanmaktadır. Bu ilişki görünür aralıkta absorbans artışına (hiperkromik etki) ve  $\lambda_{max}$ 'ın daha yüksek dalga boylarına doğru kaymasına (batokromik etki) yol açmaktadır (Gradinaru ve ark., 2003).

Kopigmentasyon etkisinin büyüklüğü, kopigmentin çeşidi ve kimyasal yapısı gibi farklı faktörlere bağlı olup hiperkromik etki ve batokromik kayma parametreleriyle ölçülebilmektedir (Zhang ve ark., 2015). Kopigment eklenmiş antosiyanin çözeltilerinin maksimum dalga boyundaki absorbans artışı (hiperkromik etki) ve maksimum dalga boyunda kayma meydana gelmesi (batokromik kayma) kopigmentasyonun gerçekleştiğini göstermektedir (Yunilawati ve ark., 2019). Genellikle hiperkromik etki, hidrasyon dengesinin renksiz hidratlı hemiketal formdan renkli flavilyum formuna doğru yer değiştirmesini, batokromik kayma ise pigment ve kopigment arasındaki elektrostatik etkileşimleri göstermektedir (Ferreira da Silva ve ark., 2005).

Bezelye, pirinç, gluten ve peyniraltı suyu protein izolatları ile kopigmente edilen hibiskus örneklerine ait batokromik kayma ( $\Delta\lambda_{max}$ ) ve hiperkromik etki ( $\Delta A$ ) sonuçları Çizelge 4.1'de verilmiştir. Çizelgede de görüldüğü gibi protein izolatları ile kopigmente edilen örneklerde hem batokromik kaymada (BPİ örneği hariç) hem de hiperkromik etkide bir azalma meydana gelmiştir. Bu nedenle, herhangi bir işlem uygulanmamış protein izolatlarının etkili birer kopigmentasyon ajanı olmadığı belirlenmiştir. Genel olarak yapılan çalışmalarda doğal protein izolatları ile kopigmente edilen antosiyanin pigmentlerinin batokromik kayma ve hiperkromik etkilerinde iyileşme meydana gelirken (Chen ve ark., 2022; Miyagusuku-Cruzado ve ark., 2021) bizim çalışmamızda bir azalma söz konusudur. Bunun nanofibrile edilmeyen doğal protein izolatlarının hibiskus ekstraktının rengini bulandırmasından kaynaklı olduğu düşünülmektedir. Chen ve ark. (2022) çalışmalarında dut antosiyaninlerini peynir altı suyu protein izolatu ve peynir altı suyu protein izolatu-fenolik kompleksi ile kopigmente etmişler ve sadece protein izolatu

kullanılmasının antosiyaninlerin renginin zayıflamasına yol açtığını ve yüksek sıcaklıklarda kararsız ve çökelmeye eğilimli bir karışım elde ettiklerini bildirmişlerdir.

**Çizelge 4.1.** Kontrol ve protein izolatları ile kopigmente edilmiş örneklere ait batokromik kayma ve hiperkromik etki sonuçları

Örnek <sup>1</sup>	$\lambda_{max}$ (Batokromik kayma, dalga boyu (nm))	$\Delta \lambda_{max}$ (nm)	ABS (Hiperkromik etki, A)	$\Delta A$ (%)
Kontrol	519	-	1.964	-
BPI	519	0	1.149	-41.50
PPI	514	-5	1.098	-44.09
GPI	518	-1	1.019	-48.12
PASPI	518	-1	1.448	-26.27

BPI:Bezelye protein izolatı ile kopigmente edilmiş hibiskus ekstraktı, PPI:Pirinç protein izolatı ile kopigmente edilmiş hibiskus ekstraktı, GPI: Gluten ile kopigmente edilmiş hibiskus ekstraktı, PASPI: Peynir altı suyu proteini izolatı ile kopigmente edilmiş hibiskus ekstraktı

#### 4.1.2. Düz nanofibriller ile kopigmente edilmiş örneklerin batokromik kayma ve hiperkromik etki analiz sonuçları

Kontrol ve 24, 36 ve 48 saatlik asidik ısıtma ile elde edilen düz nanofibrile proteinlerle kopigmente edilen örneklere ait batokromik kayma ve hiperkromik etki sonuçları Çizelge 4.2’de verilmiştir. Sonuçlar incelendiğinde kontrol örneğinin maksimum dalga boyu 518 nm iken kopigmentli örneklerin dalga boyları 519-524 nm değerleri arasında bulunmuştur. Kopigmentli örnekler absorbansta %0.23-33.84 arasında artış sağlamıştır. Batokromik kayma ve hiperkromik etkide meydana gelen bu artışlar kopigment ve pigmentler arasındaki moleküller arası etkileşimi göstermektedir (Zhao ve ark., 2020c). En yüksek artış 24NPAS (%33), 36NPAS (%33.84) ve 36NB (%32.62) örneklerinde gözlenmiştir. Antosiyaninler üzerinde en belirgin hiperkromik etkiyi nanofibrile PASP’ın göstermesinin pek çok nedeni olabilir. Hidrasyon dengesinin renksiz hidratlı hemiketal formdan renkli flavilyum formuna doğru hareketi olan hiperkromik etki, antosiyaninler ve kopigmentlerin moleküller arası ilişkisi yoluyla meydana gelmektedir (Ferreira da Silva ve ark., 2005). Farklı proteinlerin farklı aminoasitler bulundurması, hayvansal veya bitkisel olması gibi faktörler hiperkromik ve batokromik kayma düzeyini etkilemektedir. Hayvansal ve bitkisel proteinler, yapısal farklılıkları nedeniyle fibrilasyon sırasında peptitleri farklı şekillerde serbest bırakırlar (An ve ark., 2022). Nanofibrile PASP, antosiyaninin flavilyum katyonunun  $\pi$ -elektron delokalizasyonunu arttırabilen ve sonuç olarak hiperkromik etkiler üretebilen bir polipeptit omurgası tabanlı yapıya ve amino asitler açısından zengin bileşime sahip olduğundan bezelye proteini, pirinç proteini ve glutenden daha iyi bir etki göstermiş

olabileceği düşünülmektedir (Malien-Aubert ve ark., 2001; Wu ve ark., 2018). Pirinç ve glutende 48 saat fibrilasyona tabi tutulan, bezelye ve PASP'de ise 36 saat fibrilasyona tabi tutulan örnekler en iyi hiperkromik etkiyi göstermiştir. Bezelye protein fibrillerinin elde edildiği bir çalışmada Liu ve ark. (2024) bezelye protein izolatını 2-20 saat aralığında fibrilasyona tabi tutmuşlardır. Isıtma süresinin artmasıyla birlikte, protein moleküllerinin kademeli olarak küçük moleküler ağırlıklı peptitlere ayrıştığını ve bunların daha sonra nanofibriller halinde birleştiğini bildirmişlerdir. Başlangıçta, fibrillerin uzunluğu ısıtma süresiyle artarken, sürenin daha da uzamasıyla azalmıştır ve bu durum fibril parçalanmasına bağlanmıştır. 36 saat boyunca fibrilasyona tabi tutulan bezelye proteinlerinin 48 saate oranla daha iyi sonuç vermesinin nedeni belirli süreden sonra fibrillerin parçalanması olarak düşünülmektedir. Hu ve ark. (2019) çalışmalarında fibrilasyon süresinin artmasının PASP nanofibrillerinin oluşumunu desteklediğini bildirmiştir.

Doğal protein izolatları ile karşılaştırıldığında nanofibrilasyon işlemine tabi tutulan proteinlerin kopigmentasyon etkisi gösterdiği belirlenmiştir. Proteinlerin nanofibrilasyon işlemiyle hem kimyasal yapıları hem de jelleşme gibi teknolojik özellikleri değişmekte ve bu nedenle hidrojeller oluşturarak antosiyanin pigmentleriyle daha sağlam etkileşimler oluşturabilmektedirler (Tan ve ark., 2021). Kara havuç ekstraktını doğal ve denatüre peynir altı suyu proteini ile kopigmente eden Chung ve ark. (2015) denatüre izolatın renk solmasını doğal izolata göre daha iyi engellediğini rapor etmiştir. Bu sonucun denatürasyon ile protein yapısının açılarak hidrofobik veya elektrostatik etkileşimlere dahil olabilen amino asitler gibi fonksiyonel grupların açığa çıkmasından kaynaklanmış olabileceği belirtilmiştir. Üstün biyoyoumluluğa sahip olan proteinler, antosiyanin stabilitesini geliştirmek için umut verici kopigmentlerdir (Gong ve ark., 2021b). Proteinler, polifenollere kovalent ve kovalent olmayan bağlanma kapasitesine sahiptirler ve bu, gıda sisteminin morfolojisini, antioksidan kapasitesini, termal stabilitesini, emülsifikasyon özelliklerini ve biyoyararlanımını etkilemektedir (He ve ark., 2016b). Hidrofobik ve hidrofilik etkileşimler, van der Waals kuvvetleri ve hidrojen bağları dahil olmak üzere çeşitli etkileşimler yoluyla antosiyaninlerle kompleksler oluşturmaktadırlar (Cortez ve ark., 2017). Antosiyaninlerin proteinlerle stabilizasyonu konusunda çok az çalışma yapılmıştır. Proteinlere çok ince öğütme, mikro parçacıklandırma ve ön ısıtma gibi ön işlemler uygulanmasının, fizikokimyasal özelliklerde değişime neden olarak daha iyi antosiyanin stabilizasyonu sağladığı gösterilmiştir (Gençdağ ve ark., 2022). Mohammadian ve ark. (2019) çalışmalarında

kurkuminin biyoyararlanımını arttırmak amacıyla peynir altı suyu proteini (PASP) izolatu ve nanofibrile peynir altı suyu proteini (NPASP) izolatu ile kompleksler oluşturmuşlardır. NPASP kurkuminin sudaki çözünürlüğünü 1200 kat artırırken, PASP 120 kat arttırmıştır. Kurkuminin nanofibrile protein moleküllerinin hidrofobik bölgelerine, özellikle de aromatik amino asit kalıntılarına bağlanmasıyla antioksidan aktivitesi ve biyoyararlanımının artırıldığı düşünülmektedir.

Farklı şartlarda üretilen nanofibriller ile kopigmentasyon sonucunda maksimum dalga boyu değerindeki değişim ile maksimum dalga boyundaki absorbans değişimi arasında ciddi farklılıklar gözlenmiştir (Çizelge 4.2). Literatüre göre maksimum dalga boyu ve bu dalga boyundaki absorbans orantılı olarak artış veya azalış göstermeyebilmektedir. Nitekim, Yunilawati ve ark. (2019) mor patates antosiyaninlerini yeşil çay fenolikleri ile kopigmente ettikleri çalışmalarında  $\Delta\lambda_{\max}$  sabit kalırken  $\Delta A$  yeşil çay ekstraktının konsantrasyonundan etkilenecek şekilde azalmıştır.

**Çizelge 4.2.** Kontrol ve düz nanofibriller ile kopigmente edilmiş örneklere ait batokromik kayma ve hiperkromik etki sonuçları

Örnek	$\lambda_{\max}$ (Batokromik kayma, dalga boyu nm)	$\Delta\lambda_{\max}$	ABS (Hiperkromik etki, A)	$\Delta A$ (%, abs)
Kontrol	518	-	1.312	-
24NB	522	4	1.568	19.51
24NP	519	1	1.315	0.23
24NG	519	1	1.356	3.35
24NPAS	520	2	1.745	33.00
36NB	520	2	1.740	32.62
36NP	522	4	1.455	10.90
36NG	522	4	1.422	8.38
36NPAS	524	6	1.756	33.84
48NB	523	5	1.434	9.30
48NP	519	1	1.570	19.66
48NG	522	4	1.476	12.50
48NPAS	519	1	1.551	18.22

Kontrol: Kopigmentasyon ajanı yerine saf su kullanılan ürün. 24: 24 saat boyunca su banyosunda bekletilerek nanofibrilasyona tabi tutulan ürün. 36: 36 saat boyunca su banyosunda bekletilerek nanofibrilasyona tabi tutulan ürün. 48: 48 saat boyunca su banyosunda tutularak nanofibrilasyona tabi tutulan ürün. NB: Düz nanofibrile bezelye protein ile kopigmente edilen hibiskus ekstraktı. NP: Düz nanofibrile pirinç protein ile kopigmente edilen hibiskus ekstraktı, NG: Düz nanofibrile gluten ile kopigmente edilen hibiskus ekstraktı. NPAS: Düz nanofibrile peynir altı suyu proteini ile kopigmente edilen hibiskus ekstraktı.

#### 4.1.3. Kıvrımlı nanofibriller ile kopigmente edilmiş örneklerin batokromik kayma ve hiperkromik etki analiz sonuçları

Kontrol ve 24, 36 ve 48 saat su banyosunda bekletilerek elde edilen kıvrımlı nanofibrillerle kopigmente edilen örneklere ait batokromik kayma ve hiperkromik etki

sonuçları Çizelge 4.3’de verilmiştir. Kontrol örneğinin maksimum dalga boyu 518 nm iken kopigmentli örneklerin dalga boyları 519-522 nm değerleri arasında bulunmuştur. Kopigmentasyon işlemi ile pozitif yönde 1-4 birim arasında batokromik kayma meydana gelmiştir. Kıvrımlı nanofibriller ile kopigmente edilen örnekler hiperkromik etkiyi %5.79-40.32 değerleri arasında arttırmıştır. En büyük etki sırasıyla 48CP (%40.32), 48CPAS (%34.68), 24CPAS (%32.09) örneklerinde gözlenmiştir. Görüldüğü üzere kıvrımlı nanofibriller, herhangi bir işlem uygulanmamış protein izolatlarının aksine batokromik kayma ve hiperkromik etki de kayda değer artış sağlayarak renk yoğunluğunu arttırmıştır. Düz ve kıvrımlı nanofibriller kıyaslandığında, 24 ve 48 saatlik fibrilasyona tabi tutulan kıvrımlı nanofibrillerle kopigmente edilen örnekler düz nanofibrillere oranla daha iyi hiperkromik etki gösterirken, 36 saatlik fibrilasyon süresinde düz nanofibrillerde daha iyi etki gözlenmiştir. 24CP (%8.38) 24 NP (%0.23)’den, 24CB (%23.55) 24NB (%19.51)’den, 48CB (%23.78) 48NB (%9.30)’den, 48CP (%40.32) 48NP (%19.66)’den, 48CPAS (%34.68) 48NPAS (%18.22)’dan daha yüksek hiperkromik etki göstermiştir. Kıvrımlı nanofibrillerle kopigmente edilen örneklerde 36 saatlik fibrilasyon süresinde hem batokromik kayma hem de hiperkromik etkide belirgin bir düşüş yaşanmıştır. Fibrilasyon sırasında protein kümeleri belirli süre sonra tamamen açılarak fonksiyonel özellikleri iyileşmektedir. Protein fibrillerinin oluşumu için çeşitli mekanizmalar ve modeller ileri sürülmüştür. Genel olarak gecikme, büyüme ve olgunluk olarak adlandırılan üç aşamadan oluşan “çekirdekli konformasyon dönüşümü” modeli kabul edilmektedir (Jansens ve ark., 2019). Fibrilasyonun ilk aşaması olan gecikme aşaması, yeni sıralı yapıların oluşumunu teşvik eden kendiliğinden çekirdeklenme sürecidir ve bu süreç yavaş ilerler. Burada oluşan yapıların en küçük birimi olan "çekirdeğin" oluşumu, gecikme fazında birincil çekirdeklenme aşaması olarak bilinmektedir. İkinci aşama, protein veya peptidin toplam dönüşüm oranının en yüksek olduğu büyüme fazı olarak adlandırılır ve bu aşamada oluşan protofilamentler, sürekli genişleme ile fibriller oluşturmak için hızla büyümeye devam etmektedirler. Protein fibrilleri denge durumuna ulaşana veya protein tükenene kadar devam eden nispeten kararlı aşama, olgunluk aşaması olarak adlandırılmaktadır (Šarić ve ark., 2016). Kıvrımlı fibriller oluşurken 24 saate kadar gecikme ve büyüme fazı, 36-48 saat aralığında olgunluk fazı gerçekleştiği düşünülmektedir. Bu nedenle 36 saatte 24 ve 48 saate göre daha düşük hiperkromik ve batokromik değerler gözlemlendiği değerlendirilmiştir. Düz fibrillerle kıyaslandığında kıvrımlı fibrillerde 48 saatlik fibrilasyon süresinde daha iyi hiperkromik etki gözlenmiştir. Bunun nedeninin fibrilasyon süresinin uzamasıyla düz fibrillerden yüksek

kristalliğe sahip olanların zamanla ayrılması olduğu düşünülmektedir (Wang ve ark., 2012). pH 2.0 ve 95 °C'de ısıtma ile  $\beta$ -konglisinin fibrilasyonu üzerine yapılan bir araştırma, ısıtma süresi 720 dakikaya uzatıldığında önceden oluşan protein fibriller yapısının ortadan kaybolduğunu doğrulamaktadır. İkincil yapı analizlerine göre bu ısıtma sırasında proteindeki  $\beta$ -tabaka yapısının azaldığını ve  $\beta$ -dönüş ile düzensiz sarmalların hakim olduğu düzensiz bir yapıya dönüştüğünü ortaya çıkarmıştır (Xia ve ark., 2017).

Ek olarak, protein fibrilleri mükemmel emülsifikasyon ve film oluşturma yeteneklerine sahip olduğundan ve yüksek ısıya ve geniş pH değerlerine dayanabildiğinden, duyarlı biyoaktif bileşiklerin taşınması ve korunması için son derece umut verici oldukları bildirilmiştir (Mohammadian ve Madadlou, 2018). Yapılan bir çalışmada kıvrımlı peynir altı suyu nanofibrillerinin düz nanofibrillere oranla daha viskoz bir yapıya sahip olduğu ve daha iyi jelleşme özelliği gösterdiği rapor edilmiştir (Loveday ve ark., 2012). Kıvrımlı nanofibriller daha esnek olup, daha yüksek viskozite sağlayabilmektedir. Düz nanofibriller ise daha düz, uzun ve yarı esnek yapıdadırlar. Kıvrımlı fibriller düz fibrillerden daha hızlı birleştikleri için doku oluşturma ve jelleştirme maddeleri olarak düz fibrillere göre daha fazla ticari potansiyele sahip olduğu rapor edilmiştir (Loveday ve ark., 2012).

Yapılan çalışmalar mercimek proteininden elde edilen kıvrımlı nanofibrillerin, ısıtılmamış protein çözeltilerine kıyasla daha güçlü ve daha kompakt bir ağ yapısı gösterdiğini ortaya çıkarmıştır (Jo ve ark., 2020; Li ve ark., 2021c). Bu ağ yapısı sayesinde antosiyaninlerin stabilitesi korunarak çevresel faktörlere daha dayanıklı hale gelmektedirler.

**Çizelge 4.3.** Kontrol ve kıvrımlı nanofibriller ile kopigmente edilmiş örneklere ait batokromik kayma ve hiperkromik etki sonuçları

Örnek	$\lambda_{\max}$ (Batokromik kayma, dalga boyu, nm)	$\Delta \lambda_{\max}$	ABS (Hiperkromik etki, A)	$\Delta A$ (%)
Kontrol	518	-	1.312	-
<sup>1</sup> 24CB	521	3	1.621	23.55
24CP	522	4	1.422	8.38
24CPAS	519	1	1.733	32.09
36CB	519	1	1.463	11.51
36CP	519	1	1.388	5.79
36CPAS	519	1	1.608	22.56
48CB	521	3	1.624	23.78
48CP	522	4	1.841	40.32
48CPAS	519	1	1.767	34.68

Kontrol: Kopigmentasyon ajanı yerine saf su kullanılan ürün. 24: 24 saat boyunca su banyosunda bekletilerek nanofibrilasyona tabi tutulan ürün. 36: 36 saat boyunca su banyosunda bekletilerek nanofibrilasyona tabi tutulan ürün. 48: 48 saat boyunca su banyosunda tutularak nanofibrilasyona tabi tutulan ürün. CB: Kıvrımlı nanofibrille bezelye protein ile kopigmente edilen hibiskus ekstraktı. CP: Kıvrımlı nanofibrille pirinç protein ile kopigmente edilen hibiskus ekstraktı, CPAS: Kıvrımlı nanofibrille peynir altı suyu proteini ile kopigmente edilen hibiskus ekstraktı.

## 4.2. Termal stabilite testi

Antosiyaninler oksijene, pH'ya, sıcaklığa, enzime, ışığa ve ayrıca metal iyonlarına maruz kaldıklarında kolayca etkilenen, kararsız bileşiklerdir. Bu da gıdanın hem kalitesini hem de rengini etkilemektedir (Fan ve ark., 2019). Antosiyanin ile renklendirilen ürünlerin renk stabilitesini sağlamak için bu pigmentlerin sıcaklığa karşı kararlı olmalarını sağlamak ve degradasyonunu en aza indirmek önem taşımaktadır (Cavalcanti ve ark., 2011). Bu amaçla enkapsülasyon, asilasyon, kopigmentasyon ve metalik iyonlarla kompleks oluşturma gibi farklı yöntemler uygulanmaktadır (Eiro ve Heinonen, 2002). Özellikle moleküler etkileşimlere dayanan kopigmentasyonun etkili bir yol olduğu düşünülmektedir. Organik asitlerin, flavonoidlerin, alkaloidlerin, polisakkaritlerin, proteinlerin vb. eklenmesi stabiliteyi artırmakta ve antosiyaninlerin biyoaktivitesini de etkilemektedir (Guan ve Zhong, 2015).

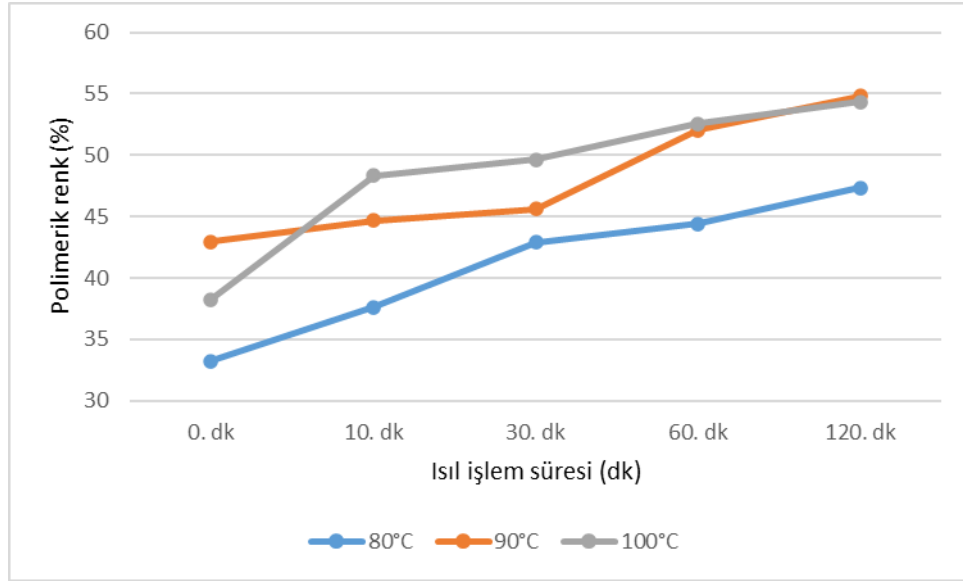
Kopigmentasyonun antosiyaninlerin stabilitesine olan etkisini incelemek amacıyla hazırlanan çözeltiler 80, 90 ve 100 °C sıcaklıklarda 120 dakika bekletilerek 0, 10., 30., 60. ve 120. dakikalarda polimerik renk ve toplam monomerik antosiyanin tayini yapılmıştır.

### 4.2.1. Polimerik renk

Polimerik renk yüzdesi polimerik rengin renk yoğunluğuna oranı olarak tanımlanmaktadır ve örneğin renginin yüzde kaçının polimerize olmuş bileşiklerden kaynaklandığının bir ölçütüdür. Örnekteki monomerik antosiyaninler bisülfite etkisi ile renksiz kompleksler oluştururken, polimerik antosiyanin-tanen komplekslerinin, bisülfite karşı direnç göstererek renklerini korudukları bilinmektedir (Bingöl ve ark., 2022; Giusti ve Wrolstad, 2001). Polimerik renk ve polimerik renk oranı değerlerinin artışı, polimerik bileşiklerden kaynaklanan renk yoğunluğunun fazla olduğunu göstermektedir. Isıl işlem, monomerik antosiyaninlerin parçalanmasına ve polimerlerin oluşmasına neden olmakta ve bunun sonucunda rengin bozulmasıyla kahverengi renk ortaya çıkmaktadır (Sinela ve ark., 2017). Yapılan çalışmalar polimerik renk artışının antosiyanin kaybıyla orantılı olduğunu göstermektedir (Jiang ve ark., 2019a; Martynenko ve Chen, 2016; Sinela ve ark., 2017).

Kopigmente edilmemiş kontrol ekstraktına uygulanan ısıl işlem sırasında polimerik renk değerlerinde meydana gelen değişim Şekil 4.1'de verilmiştir. Isıl işlem sıcaklığının artması ve süresinin uzamasına bağlı olarak polimerik renk yüzdesinde artış

gözlenmiştir. Isıl işlem sonrasında polimerik renk değerleri sıcaklığa bağlı olarak %33.22-54.34 aralığında bulunmuştur.



**Şekil 4.1.** Kontrol örneğine ait polimerik renk (%) değerleri üzerinde etkili 'ısl işlem süresi x sıcaklık' interaksyonu

#### 4.2.2.1. Doğal protein izolatları

Antosiyanin termal bozunması sırasında meydana gelen en önemli reaksiyonlardan biri polimerizasyon olduğundan, polimerik renk yüzdesi hem işleme hem de depolama sırasında antosiyanin bozunmasının göstergesidir (Türkyılmaz ve Özkan, 2012). Çizelge 4.4'de 80, 90 ve 100 °C'de 120 dakika boyunca tutulan protein izolatları ile kopigmente edilmiş hibiskus ekstraktlarına ait polimerik renk sonuçları verilmiştir. Örneklerin polimerik renk yüzdeleri 80, 90 ve 100°C'de sırasıyla %28.40-59.42, %28.01-55.56 ve %29.53-61.45 aralığında bulunmuştur. 120 dakikalık ısl işlem süresi boyunca polimerik renk yüzdesinin artış gösterdiği görülmektedir.

**Çizelge 4.4.** Protein izolatları ile kopigmente edilmiş hibiskus ekstraktlarına ait polimerik renk (%) değerleri

Sıcaklık (°C)	Örnek Adı	Isıl işlem Süresi (dk)				
		0	10	30	60	120
80	BPI	29.31±0.45	34.71±0.06	35.00±0.85	39.51±0.2	43.64±0.01
	PPI	30.62±0.04	39.14±0.59	42.25±0.44	53.33±0.08	59.42±0.62
	GPI	39.00±0.92	40.64±0.07	44.03±0.28	49.42±0.62	53.04±0.31
	PASPI	28.40±0.79	30.02±0.08	30.96±0.18	38.15±1.16	39.62±0.33
90	BPI	28.01±1.1	32.76±0.28	38.74±0.31	37.12±1.03	45.79±0.24
	PPI	28.11±3.51	30.02±0.86	37.79±1.8	41.12±0.57	53.85±0.16
	GPI	41.25±0.62	53.3±0.96	48.13±0.42	53.36±0.88	55.56±0.47
	PASPI	29.94±0.37	33.13±0.17	35.26±0.04	36.11±3.79	44.89±0.51
100	BPI	30.67±7.45	61.45±0.1	40.39±0.23	41.85±0.41	43.69±2.74
	PPI	29.53±0.21	33.82±0.11	39.31±0.48	51.7±0.27	57.57±0.45
	GPI	41.96±0.57	44.32±0.08	47.99±0.08	49.65±0.03	56.36±0.01
	PASPI	32.86±0.01	32.96±0.52	37.27±0.88	42.85±0.31	45.52±0.65

Sonuçlar iki tekrerrün ortalaması±standart hata şeklinde sunulmuştur. BPI: Bezelye protein izolatı ile kopigmente edilmiş hibiskus ekstraktı, PPI:Pirinç protein izolatı ile kopigmente edilmiş hibiskus ekstraktı, GPI: Gluten ile kopigmente edilmiş hibiskus ekstraktı, PASPI: Peynir altı suyu proteini izolatı ile kopigmente edilmiş hibiskus ekstraktı

Çizelge 4.5’de protein izolatları ile kopigmente edilen hibiskus ekstraktlarının polimerik renk değerlerine ait varyans analiz sonuçları verilmektedir. Polimerik renk yüzdesi üzerinde protein çeşidi, ısıl işlem süresi, sıcaklık ve bunların interaksiyonlarının önemli düzeyde ( $p<0.01$ ) etkili olduğu görülmektedir.

**Çizelge 4.5.** Protein izolatları ile kopigmente edilmiş hibiskus ekstraktlarının polimerik renk (%) değerlerine ait varyans analiz sonuçları

VK	SD	Polimerik Renk (%)	
		KO	F
Protein çeşidi (A)	3	2366.02	439.74**
Isıl işlem süresi (B)	4	4094.32	570.72**
Sıcaklık (C)	2	236.78	66.01**
A × B	12	1045.91	48.59**
A × C	6	586.53	54.50**
B × C	8	151.67	10.57**
A × B × C	24	834.29	19.38**
Hata	60		107.60

\*\* $p<0,01$  ve \* $p<0,05$  düzeyinde önemli, öd: önemli değil

Çizelge 4.6’da ise Duncan çoklu karşılaştırma testi sonuçları verilmiştir. Protein çeşidine göre polimerik renk değerleri karşılaştırıldığında polimerik renk büyükten küçüğe sırasıyla GPI, PPI, BPI ve PASPI örneklerine ait bulunmuştur. Bu nedenle peynir altı suyu proteini izolatı ile kopigmente edilen hibiskus ekstraktlarında renk daha iyi korunmuştur. Peynir altı suyu proteininin antosiyaninlerin bozunmasını engellediğine dair çalışmalar mevcuttur (Chung ve ark., 2015; Khalifa ve ark., 2018; Tan ve ark., 2021). Gluten ile kopigmente edilen örnekler ise en yüksek polimerik renk değerine sahiptir. Bunun nedeninin glutenin düşük çözünürlük nedeniyle örnekte bulanıklık meydana

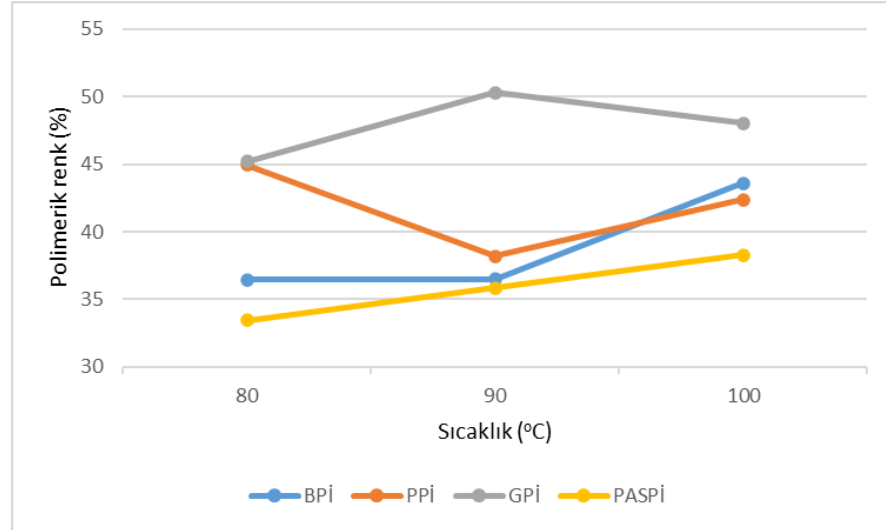
getirmesi olduğu düşünülmektedir. Bu nedenle çözünürlük özelliği geliştirilmiş nanofibrile glutenin kullanılması iyi bir alternatif olmuştur. Kopigmente edilen örnekler sıcaklık bakımından değerlendirildiğinde sıcaklık arttıkça polimerik renk yüzdesinde artış meydana gelmiştir. Bunun nedeninin antosiyanin bozulmasının bir ara ürünü olan kalkonların oluşumunun sıcaklıkla artması olduğu varsayılmaktadır (Patras ve ark., 2010). Isıtma süresinin uzamasına bağlı olarak polimerik renk yüzdesinde artış meydana gelmiştir. Isıl işlem sıcaklığının artışı antosiyaninlerin kalkonlara dönüşümünü teşvik eder. Kalkonlar reaktif özellikleri nedeniyle diğer bileşenlerle birleşerek polimerik rengin artmasına neden olmaktadır (Martynenko ve Chen, 2016).

**Çizelge 4.6.** Protein izolatları ile kopigmente edilmiş hibiskus ekstraktlarının polimerik renk (%) değerlerine ait Duncan çoklu karşılaştırma testi sonuçları

Faktör	N	Polimerik renk (%)
<b>Protein Çeşidi</b>		
BPI	30	38.84±8.30c
PII	30	41.83±10.79b
GPI	30	47.86±5.73a
PASPI	30	35.86±5.47d
<b>Sıcaklık (°C)</b>		
80	40	40.01±8.66b
90	40	40.21±9.04b
100	40	43.08±9.07a
<b>Isıl işlem Süresi (dk)</b>		
0	24	32.47±7.70d
10	24	38.85±9.80c
30	24	39.76±5.17c
60	24	44.51±6.54b
120	24	49.91±6.70a

Farklı harfle işaretlenmiş aynı sütundaki ortalamalar istatistiki olarak birbirinden farklıdır (p<0,05).

Şekil 4.2’de ise farklı protein izolatları ile kopigmente edilen örneklerin polimerik renk değerleri üzerinde etkili ‘Protein çeşidi x sıcaklık’ interaksyonu gösterilmektedir. BPI örneğinde özellikle 90 °C sıcaklıkta önemli bir değişiklik meydana gelmezken özellikle 100 °C’de artış olmuştur. PII örneğinde polimerik renk yüzdesi 90 °C’de azalırken 100 °C’de BPI gibi artış göstermiştir. GPI örneğinde sıcaklığın 90 °C’ye yükselmesiyle polimerik renk değeri artarken 100 °C’ye yükselmesiyle hafif bir düşüş yaşanmıştır. PASPI örneğinde ise sıcaklığın artmasıyla polimerik renk değeri de artış göstermiştir.



**Şekil 4.2.** Protein izolatlarına ait polimerik renk (%) değerleri üzerinde etkili 'Protein çeşidi x sıcaklık' interaksyonu

#### 4.2.2.2. Düz nanofibriller

Düz nanofibrillerle kopigmente edilen hibiskus ekstraktlarına uygulanan ısı işlem süresince belirlenen polimerik renk değerleri Çizelge 4.7'de verilmiştir. 80 °C sıcaklıkta bekletilen örneklerden sırasıyla 24, 36, 48 saat nanofibrilasyona tabi tutulan düz proteinlerle kopigmente edilenlerin polimerik renk değerleri %25.96-62.58, %25.85-69.63, %24.89-58.96 aralığında bulunmuştur. 90 °C sıcaklıkta bekletilen örneklerden sırasıyla 24, 36, 48 saat nanofibrilasyona tabi tutulan düz proteinlerle kopigmente edilenlerin polimerik renk değerleri %27.09-52.83, %20.50-62.11, %22.85-77.17 aralığında bulunmuştur. 100 °C sıcaklıkta bekletilen örneklerden sırasıyla 24, 36, 48 saat nanofibrilasyona tabi tutulan düz proteinlerle kopigmente edilenlerin polimerik renk değerleri %18.39-55.47, %29.71-75.76, %20.55-90.37 aralığında bulunmuştur.

Düz nanofibrillerle kopigmente edilen hibiskus ekstraktlarının polimerik renk değerlerine ait varyans analiz sonuçları Çizelge 4.8'de, Duncan çoklu karşılaştırma testi sonuçları ise Çizelge 4.9'da verilmiştir. Örneklerin polimerik renk değerleri protein çeşidi, ısı işlem süresi, sıcaklık ve fibrilasyon süresi ile bu faktörlerin interaksyonlarından önemli ( $p < 0.01$ ) düzeyde etkilenmiştir.

Protein çeşidine göre polimerik renk büyükten küçüğe sırasıyla NG, NPAS, NB, NP örneklerine ait bulunmuştur. %56.26 değeriyle düz nanofibrille gluten ile kopigmente edilen hibiskus ekstraktının polimerik renk değerinin diğerlerinden yüksek olduğu belirlenmiştir. Bunun nedeninin gluten nedeniyle ekstraktta oluşan bulanıklık olduğu düşünülmektedir. Bununla birlikte, buğday gluteninin fibrilasyonunun düşük bir hızda

ilerlediği ve toplam verimin çok düşük olduğu belirtilmiştir (Mackintosh ve ark., 2009). Daha önce de belirtildiği üzere polimerik renk değerinin yükselmesi antosiyaninlerin çeşitli reaksiyonlarla kahverengi renkli polimerik bileşenlere dönüştüğünün bir göstergesidir. Bu nedenle düz nanofibrile pirinç proteininin kopigment olarak hibiskus antosiyaninlerinde antosiyanin parçalanmasını en aza indirdiği söylenebilir. İşlem uygulanmamış doğal izolatlarla kopigmente edilen örnekler ve nanofibrile proteinlerle kopigmente edilen örnekler kıyaslandığında PPI (%41.83) örneğinin polimerik renk değeri, NP (%32.53) örneğinden daha yüksek bulunmuştur. Buradan da görüleceği üzere pirinç proteininin nanofibrilasyona uğratılması ile antosiyaninlerle bağ yapma kapasitesi artırılarak polimerik renk oranı azaltılmıştır. Yapılan çalışmalarda pirinç proteinlerinin nanofibrilasyona uğratılması ile kuvvetli ağ yapıda pirinç protein nanofibrilleri elde edildiği bildirilmiştir (Huang ve ark., 2014). Yapılan bir çalışmada 90 °C ve pH 2.0 koşulu altında, pirinç kepeği proteininde bulunan granüler proteinler çubuk benzeri fibriller haline gelmiş ve artan ısıtma süresi ile uzunluğu 500 nm veya daha fazla olan lineer fibriller agregatlara dönüşmüştür. Isıtma süresi 360 dakikaya ulaştığında proteinin iç konformasyonundaki değişikliklerden kaynaklanan daha esnek fibriller oluştuğu bildirilmiştir. Ayrıca, pirinç kepeği protein fibrillerinin görünümü, yapısal alanlarda fibrillerin yoğun birikimi nedeniyle çözeltinin viskozitesini ve kesme kuvvetini artırabilmektedir (Zhang ve ark., 2014).

24 saat nanofibrilasyona tabi tutulan proteinlerle kopigmente edilen hibiskus ekstraktlarının polimerik renk değeri 36 ve 48 saat nanofibrilasyona tabi tutulan ekstraktlardan daha düşük bulunmuştur. Sıcaklık artışı ile polimerik renk değerlerinde artış meydana gelmiştir. Sıcaklığın artmasıyla polimerizasyon reaksiyonları hızlanmaktadır. Martynenko ve Chen (2016) çalışmalarında yaban mersini püresinin antosiyanin bozunması ve polimerik renk oluşumunu incelemişler ve sıcaklığın yükselmesiyle polimerik renkte artış olduğunu bildirmişlerdir. Isıl işlem süresi arttıkça polimerik renk değerinde artış meydana gelmiştir. Isıl işlem süresince antosiyaninlerden oluşan kararsız yapılar bir dizi reaksiyona girerek polimerizasyona uğramaktadır (Delgado-Vargas ve Paredes-Lopez, 2002; Wrolstad ve ark., 2005).

Çizelge 4.7. Düz nanofibrillerle kopigmente edilmiş hibiskus ekstraktlarına ait polimerik renk (%) değerleri

Sıcaklık (°C)	Fibrilasyon Süresi (saat)	Örnek Adı	Isıl İşlem Süresi (dk)				
			0	10	30	60	120
80	24	NB	25.98±0.48	29.18±0.65	32.85±1.18	35.69±0.04	41.99±1.04
		NP	25.96±0.13	29.65±0.99	32.51±0.11	32.65±0.34	41.65±0.08
		NG	52.32±0.52	49.86±1.37	54.26±0	59.63±0.55	62.58±2.14
		NPAS	26.58±0.07	28.96±0.03	32.56±0.13	38.96±0.01	42.56±0.47
	36	NB	36.98±0.04	41.25±0.44	45.69±0.38	48.96±1.27	56.98±0.04
		NP	25.81±1.74	27.59±0.37	36.45±0.1	42.05±0.75	50.56±0.51
		NG	54.78±0.16	57.52±0.45	62.52±1.4	64.89±0.86	69.63±0.31
		NPAS	48.59±0.03	50.82±0.27	52.16±0.01	56.06±0.81	52.52±0.52
	48	NB	36.58±0.01	41.52±0.08	42.68±0.17	46.25±0.62	58.96±0.41
		NP	24.89±0.44	25.55±0.11	30.86±0.38	34.43±1.6	38.56±0.03
		NG	43.39±0.71	45.44±0.25	50.56±0.06	54.89±0	58.23±0.04
		NPAS	26.87±0.03	32.01±0.04	33.89±1.84	36.57±0.07	45.81±0.11
90	24	NB	31.89±0.52	34.94±1.95	36.19±0.42	42.47±1.4	56.36±0.06
		NP	40.78±1.15	41.86±0.38	43.53±0.04	46.83±0.21	52.14±0.06
		NG	39.96±1.8	41.86±0.01	44.56±0.06	48.96±0.47	52.83±0.28
		NPAS	27.09±0.06	32.21±0.06	35.86±0.82	39.56±0.16	44.65±1.06
	36	NB	21.64±1.34	25.95±0.04	28.98±0.49	32.36±0.33	37.14±0.07
		NP	20.50±0.28	24.23±0.08	26.27±0.16	28.83±0.04	36.88±0.44
		NG	38.17±0.03	40.78±0.75	46.29±0.34	52.63±0.07	62.21±0.03
		NW	28.00±0.91	29.83±0.25	35.29±0.04	44.62±1.32	51.89±0.37
	48	NB	32.51±0.01	38.81±0.11	45.59±0.99	52.72±0.51	55.89±1.44
		NP	22.85±1.26	25.86±1.37	27.21±2.5	32.52±0.06	38.32±0.06
		NG	52.57±1.39	56.73±0.14	61.78±2.19	66.87±1.39	77.17±1.44
		NPAS	26.26±0.13	28.44±0.72	28.59±0.04	38.77±2.53	54.51±0.11
100	24	NB	18.39±0.81	22.99±0.48	26.52±0.07	27.81±0.07	38.81±0.06
		NP	19.6±0.11	24.66±0.11	26.91±0.10	31.38±0.08	40.39±0.06
		NG	37.69±0.06	37.98±0.03	41.55±0.01	51.65±13.96	55.47±0.30
		NPAS	25.31±0.10	26.29±0.42	36.53±0.07	39.98±0.47	49.89±0.04
	36	NB	40.29±0.04	42.00±0.06	44.19±0.1	49.91±0.07	52.28±0.4
		NP	29.71±1.06	32.36±1.27	32.61±0.04	31.81±0.44	42.82±0.42
		NG	41.11±0.01	46.37±0.03	52.5±0.11	53.07±0.07	75.76±0.57
		NPAS	36.65±0.04	38.19±0.08	41±0.74	64.49±0.13	70.89±0.52
	48	NB	20.55±0.33	22.22±0.13	34.48±0.16	40.22±0.16	59.27±0.58
		NP	20.67±0.45	23.32±1.07	30.60±0.04	29.37±0.68	39.06±0.06
		NG	78.31±0.07	79.94±1.39	81.82±1.78	84.49±0.14	90.37±0.58
		NPAS	37.83±1.75	38.57±0.01	39.91±0.07	40.62±0.51	46.15±1.46

Sonuçlar iki tekerrürün ortalaması±standart hata şeklinde sunulmuştur. NB: Düz nanofibrile bezelye proteini ile kopigmente edilen hibiskus ekstraktı, NP: Düz nanofibrile pirinç proteini ile kopigmente edilen hibiskus ekstraktı, NG: Düz nanofibrile gluten ile kopigmente edilen hibiskus ekstraktı, NPAS: Düz nanofibrile peynir altı suyu proteini ile kopigmente edilen hibiskus ekstraktı.

**Çizelge 4.8.** Düz nanofibrillerle kopigmente edilmiş hibiskus ekstraktlarının polimerik renk (%) değerlerine ait varyans analiz sonuçları

VK	SD	Polimerik Renk (%)	
		KO	F
Protein çeşidi (A)	3	27972.23	5733.03**
Isıl işlem süresi (B)	4	16222.39	2493.64**
Sıcaklık (C)	2	450.24	138.41**
Fibrilasyon süresi (D)	2	2279.84	700.89**
A × B	12	237.88	12.18**
A × C	6	1777.92	182.19**
A × D	6	6094.56	624.55**
B × C	8	277.89	21.35**
B × D	8	74.09	5.69**
C × D	4	5580.90	857.87**
A × B × C	24	372.99	9.55**
A × B × D	24	738.61	18.92**
A × C × D	12	6003.91	307.63**
B × C × D	16	185.99	7.14**
A × B × C × D	48	1673.85	21.44**
Hata	180		292.75

\*\*p<0,01 ve \*p<0,05 düzeyinde önemli, öd: önemli değil

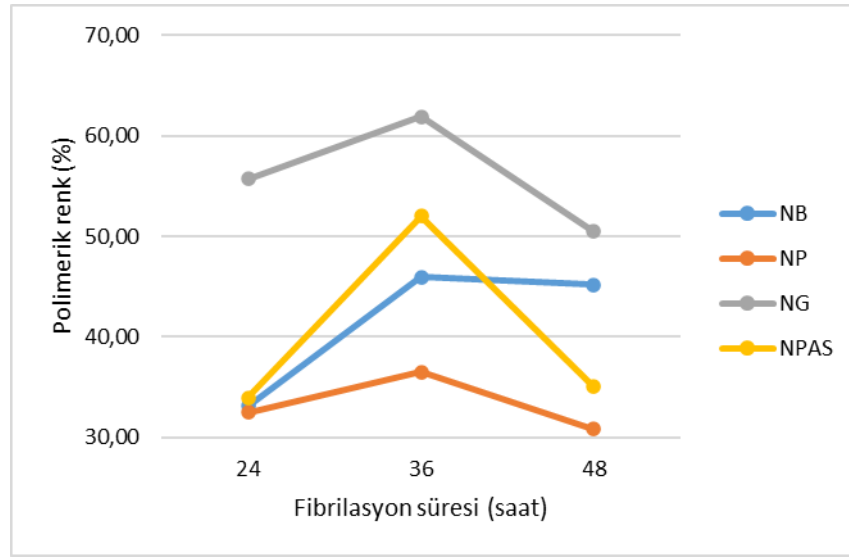
**Çizelge 4.9.** Düz nanofibrillerle kopigmente edilmiş hibiskus ekstraktlarının polimerik renk (%) değerlerine ait Duncan çoklu karşılaştırma testi sonuçları

Faktör	N	Polimerik renk (%)
<b>Protein Çeşidi</b>		
NB	90	38.55±10.86c
NP	90	32.51±8.06d
NG	90	56.26±13.50a
NPAS	90	39.61±10.58b
<b>Nanofibrilasyon Süresi (saat)</b>		
24	120	38.18±10.28b
36	120	43.54±12.91a
48	120	43.49±18.73a
<b>Sıcaklık (°C)</b>		
80	120	40.18±11.74c
90	120	42.38±12.12b
100	120	42.77±17.17a
<b>Isıl işlem Süresi (dk)</b>		
0	72	33.80±12.24e
10	72	36.54±11.81d
30	72	40.43±11.61c
60	72	45.08±12.31b
120	72	52.81±18.20a

Farklı harfle işaretlenmiş aynı sütundaki ortalamalar istatistiki olarak birbirinden farklıdır (p<0,05).

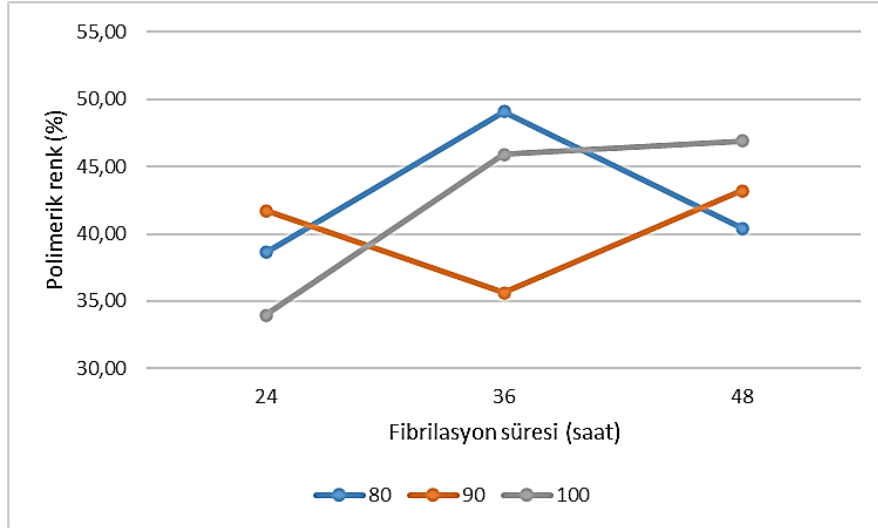
Şekil 4.3'te farklı düz nanofibriller ile kopigmente edilen örneklerin polimerik renk değerleri üzerinde etkili 'Fibrilasyon süresi x Protein çeşidi' interaksyonu gösterilmektedir. NB, NP ve NPAS örneklerinde fibrilasyon süresi 24 saatten 36 saate çıkarıldığında polimerik renk değerlerinde artış meydana gelirken 48 saate çıkarıldığında polimerik renk yüzdesi azalmıştır. NB örneğinde ise fibrilasyon süresinin 24 saatten 36 saate çıkarılmasıyla polimerik renk değerleri artarken 36 saatten 48 saate çıkarılmasıyla

önemli bir farklılık meydana gelmemiştir. En yüksek polimerik renk değerleri 36 saatlik fibrilasyon süresinde izlenmiştir.



**Şekil 4.3.** Düz nanofibrillerle kopigmente edilen örneklere ait polimerik renk değerlerinin 'Fibrilasyon süresi x protein çeşidi' interaksyonu

Şekil 4.4'te farklı düz nanofibriller ile kopigmente edilen örneklerin polimerik renk değerleri üzerinde etkili 'Sıcaklık x Fibrilasyon süresi' interaksyonu gösterilmektedir. 80 °C sıcaklığa tabi tutulan örnekler 36 saatlik fibrilasyon süresinde en yüksek polimerik renk değerine sahip olurken, 90 °C sıcaklığa tabi tutulanlar da en düşük polimerik renk değeri bu fibrilasyon süresinde gözlenmiştir. 100 °C sıcaklığa tabi tutulan örneklerde fibrilasyon süresi 36 saatten 48 saate çıkarıldığında önemli bir fark meydana gelmezken, 80 °C'de fibrilasyon süresinin 36 saatten 48 saate çıkmasıyla polimerik renk değerinde azalma, 90 °C' de ise artış meydana gelmiştir.



**Şekil 4.4.** Düz nanofibrillerle kopigmente edilen örneklere ait polimerik renk değerlerinin 'sıcaklık x fibrilasyon süresi' interaksiyonu

#### 4.2.2.3. Kıvrımlı nanofibriller

Kıvrımlı nanofibrillerle kopigmente edilen hibiskus ekstraktlarına ait polimerik renk değerleri Çizelge 4.10'da verilmiştir. 80 °C sıcaklıkta bekletilen örneklerden 24, 36, 48 saat nanofibrilasyona tabi tutulan kıvrımlı proteinlerle kopigmente edilenlerin polimerik renk değerleri sırasıyla % 13.19-38.29, % 19.49-58.98, % 16.80-58.96 aralığında bulunmuştur. 90 °C sıcaklıkta bekletilen örneklerden 24, 36, 48 saat nanofibrilasyona tabi tutulan kıvrımlı proteinlerle kopigmente edilenlerin polimerik renk değerleri sırasıyla % 20.16-46.63, % 21.40-39.67, % 25.25-51.56 aralığında bulunmuştur. 100 °C sıcaklıkta bekletilen örneklerden 24, 36, 48 saat nanofibrilasyona tabi tutulan kıvrımlı proteinlerle kopigmente edilenlerin polimerik renk değerleri sırasıyla % 19.78-60.33, % 20.38-61.85, % 20.10-47.22 aralığında bulunmuştur.

Örneklerin polimerik renk değerlerinin varyans analiz sonuçları incelendiğinde protein çeşidi, ısıl işlem süresi, sıcaklık ve fibrilasyon süresi faktörleri ile "protein çeşidi × sıcaklık", "protein çeşidi × fibrilasyon süresi", "sıcaklık × fibrilasyon süresi", "protein çeşidi × sıcaklık × fibrilasyon süresi" interaksiyonlarının önemli düzeyde ( $p < 0.01$ ) etkili olduğu görülmektedir (Çizelge 4.11).

Çizelge 4.12'de örneklerin polimerik renk değerlerine ait Duncan çoklu karşılaştırma testi sonuçları verilmiştir. Kıvrımlı nanofibrille pirinç proteini ile kopigmente edilen hibiskus ekstraktlarının polimerik renk değerleri bezelye ve peynir altı suyu proteini ile kopigmente edilen örneklerden daha yüksek bulunmuştur. Polimerik rengin yüksek olması antosiyaninlerin kahverengi bileşenlere dönüştüğünün bir

göstergesi olduğundan kıvrımlı nanofibrile bezelye ve peynir altı suyu ile kopigmente edilen örneklerin antosiyaninleri daha iyi koruduğunu göstermektedir. Polimerik renk değerleri düşükten yükseğe sırasıyla Bezelye protein izolatu için; CB, NB, BPİ, Pirinç protein izolatu için; NP, CP, PPI, Peynir altı suyu protein izolatu için; CPAS, PASPI, NPAS'dır. Bezelye ve peynir altı suyu proteini izolatu için kıvrımlı nanofibriller antosiyaninlerin stabilitesini sağlayarak daha iyi sonuçlar vermiştir. Loveday ve ark. (2012) çalışmalarında iyonik gücü yüksek çözelti ile hazırlanan kıvrımlı peynir altı suyu fibrillerinin düz fibrillere oranla daha dolaşık protein fibrillerine sahip olduğunu dolayısıyla ağ yapısının daha kuvvetli olduğunu bildirmiştir. Fibrilleşmiş proteinlerin akış davranışı, fibriller dolaşık hale geldikçe değişmektedir. Ağ yapısının yoğunlaşmasıyla protein fibrilleri daha dirençli hale gelmektedir (Mohammadian ve Madadlou, 2018). Pirinç protein izolatında ise düz fibriller kıvrımlılara oranla daha iyi sonuç göstermiştir. Bu konuda literatürde sınırlı sayıda çalışma mevcuttur. Pirinç protein nanofibrillerinin elde edildiği pek çok çalışmada pirinç proteinlerinden oldukça iyi ağ yapısına sahip uzun ve esnek fibriller elde edilmiştir (Li ve ark., 2020a; Zhang ve ark., 2014). Qi ve ark. (2023) pirinç proteininden hem düz hem de kıvrımlı nanofibriller elde ederek köpürme, viskozite, emülsiyon oluşturma gibi teknolojik özelliklerini karşılaştırmışlardır. Çalışmalarında kıvrımlı nanofibrillerin hızlı adsorbsiyona elverişli olmadığını, düz nanofibrillerin daha iyi viskozite ve emülsiyon stabilitesi gösterdiğini bildirmişlerdir. Bunun aksine, Song ve ark. (2023) farklı NaCl konsantrasyonlarında pirinç protein nanofibrilleri üreterek iyon kuvvetinin fibrilasyona etkisini araştırmışlardır. Çalışmalarının sonucunda NaCl eklenmesinin pirinç proteinlerinin fibrilasyonunu arttırdığını, proteinler arasındaki elektrostatik itmeyi kuvvetlendirdiği ve çözünürlüğü iyileştirdiği belirtmişlerdir. Böylece daha pozitif yüklü, yapı taşları bakımından zengin  $\beta$ -tabakasının üretimine yardımcı olmuş ve böylece fibrillerin tek yönlü ve düzenli uzamasını teşvik etmiştir.

Düz nanofibrillerle kopigmente edilen örneklerdekine benzer şekilde 24 saat boyunca nanofibrilasyona tabi tutulan proteinlerle kopigmente edilen örneklerin polimerik renk değerleri 36 ve 48 saat nanofibrilasyona tabi tutulanlara oranla daha düşük bulunmuştur. Buradan da anlaşılacağı üzere nanofibrilasyon ortamından bağımsız ısı nanofibrilasyon süresinin uzamasıyla polimerik renk değerleri artış göstermiştir. Bingöl ve ark. (2022) çalışmalarında çilek antosiyaninlerini aspartik asit, valin ve prolin ile kopigmente etmiş ve 90, 105 ve 150 °C sıcaklıklarda termal stabilite testine tabi tutmuşlardır. Benzer şekilde, sıcaklık artışıyla polimerik renk değerlerinde artış olduğunu

bildirmişlerdir. Başka bir çalışmada hibiskus ekstraktlarına sıcaklık uygulanması ile antosiyaninlerin bozulduğu, kırmızı rengin solarak kahverengiye döndüğü ve dolayısıyla polimerik renk oranının arttığı bildirilmiştir (Tsai ve Huang, 2004).

**Çizelge 4.10.** Kıvrımlı nanofibrillerle kopigmente edilmiş hibiskus ekstraktlarına ait polimerik renk (%) değerleri

Sıcaklık (°C)	Nanofibrilasyon Süresi (saat)	Örnek Adı	Isıl işlem süresi (dk)				
			0	10	30	60	120
80	24	CB	13.19±0.08	24±0.21	25.23±0.57	27.76±0.18	32.01±0.1
		CP	25.56±1.51	26.67±0.06	29.31±0.49	32.09±0.06	38.29±1.9
		CPAS	19.25±0.44	23.89±0.13	24.56±0.28	25.39±0.71	34.59±0.42
	36	CB	21.58±0.01	27.91±1.32	29.26±0.52	29.97±0.11	33.12±0.57
		CP	38.29±0.95	45.55±0.59	46.69±0.65	48.98±0.27	58.98±0.49
		CPAS	19.49±0.51	24.3±45.72	24.88±1.06	27.92±0.57	29.99±0.96
	48	CB	21.25±0.1	27.31±0.82	30.31±0.07	33.56±0.04	58.96±0.83
		CP	22.12±1.37	27.87±1.67	32.95±0.86	46.02±0.95	42.58±0.01
		CPAS	16.8±0.62	23.14±0.62	26.45±0.13	26.69±1.41	27.97±1.20
90	24	CB	25.79±0.14	26.63±1.41	27.63±0.37	44.09±0.01	46.63±0.57
		CP	20.16±0.28	31.25±0.48	33.66±0.13	39.71±0.21	41.69±0.18
		CPAS	21.42±0.24	24.4±0.66	25.82±0.76	29.46±0.24	30.98±0.47
	36	CB	21.4±0.06	28.5±0.03	29.88±0.35	30.47±0.07	35.97±1
		CP	21.97±0.11	27.21±0.86	32.75±0.27	34.56±0.44	35.63±0.59
		CPAS	24.82±0.37	26.36±0.23	32.8±0.34	35.69±0.68	39.67±0.78
	48	CB	28.51±2.05	30.01±0.88	32.56±0.03	32.96±0.13	39.68±0.17
		CP	25.89±5.61	28.64±0.45	32.96±1.51	33.65±0.13	36.98±0.65
		CPAS	25.25±0.38	33.26±0.23	43.93±1.29	45.69±0.68	51.56±0.51
100	24	CB	19.95±1.4	29.9±0.38	33.78±0.75	36.56±0.16	41.40±0.21
		CP	21.79±0.14	34.7±0.54	40.22±1.07	46.15±0.11	50.23±21.82
		CPAS	19.78±1.07	26.94±1.29	30.74±0.98	40.12±1.23	60.33±0.45
	36	CB	22.4±0.69	28.79±0.23	33.98±0.47	35.84±0.89	41.16±0.14
		CP	23.08±1.13	45.95±1.32	50.13±1.19	51.54±0.49	61.85±0.85
		CPAS	20.38±0.28	24.61±0.52	32.18±0.25	40.55±0.06	43.02±1.15
	48	CB	20.10±0.37	30.27±0.41	35.68±1.24	38.59±0	45.40±0.41
		CP	23.85±0.16	29.93±1.30	32.56±0.47	40.15±1.19	47.22±0.48
		CPAS	23.10±2.06	28.57±1.50	35.06±0.03	38.61±0.51	44.36±0.18

Sonuçlar iki tekerrürün ortalaması±standart hata şeklinde sunulmuştur. CB: Kıvrımlı nanofibrile bezelye proteini ile kopigmente edilen hibiskus ekstraktı, CP: Kıvrımlı nanofibrile pirinç proteini ile kopigmente edilen hibiskus ekstraktı, CPAS: Kıvrımlı nanofibrile peynir altı suyu proteini ile kopigmente edilen hibiskus ekstraktı.

Doğal pirinç protein izolatı (%41.83) ile kopigmente edilen ekstraktlarla karşılaştırıldığında pirinç protein nanofibrilleriyle (düz: %32.51, kıvrımlı: %36.05) kopigmente edilen ekstraktların antosiyaninlerinin daha az parçalandığı anlaşılmaktadır. Benzer şekilde PASPİ örneğinin polimerik renk değeri (%35.86), kıvrımlı nanofibril alternatifine göre (%30.55) daha yüksek bulunmuş ve izolat yerine kıvrımlı nanofibrile proteinler ile kopigmente edilen örneklerin antosiyaninlerinin daha stabil olduğu sonucuna varılmıştır. Bezelye proteini için ise doğal (%38.84) ve düz nanofibril (%38.55) örneklerin benzer polimerik renk oranı sağladığı ancak kıvrımlı formun (%31.33) polimerik renk oranını önemli düzeyde düşürdüğü tespit edilmiştir. Nanofibrilasyon işleminin proteinlerin yapılarını değiştirerek antosiyaninlerle reaksiyona girme ve bağ yapma kapasitesini arttırdığı, böylece antosiyanin pigmentini çevresel şartlara dayanıklı

hale getirildiği bilinmektedir (Li ve ark., 2021b; Ma ve Jing, 2020; Mohammadian ve Madadlou, 2018).

**Çizelge 4.11.** Kıvrımlı nanofibrillerle kopigmente edilmiş hibiskus ekstraktlarının polimerik renk (%) değerlerine ait varyans analiz sonuçları

VK	SD	Polimerik Renk (%)	
		KO	F
Protein çeşidi (A)	2	1596.65	40.30**
Isıl işlem süresi (B)	4	11910.50	150.32**
Sıcaklık (C)	2	1039.04	26.22**
Fibrilasyon süresi (D)	2	446.09	11.26**
A × B	8	161.04	1.01öd
A × C	4	1461.13	18.44**
A × D	4	1374.54	17.34**
B × C	8	571.95	3.60öd
B × D	8	117.06	0.73öd
C × D	4	751.74	9.48**
A × B × C	16	531.31	1.67öd
A × B × D	16	618.52	1.95öd
A × C × D	8	1615.21	10.19**
B × C × D	16	279.38	0.88öd
A × B × C × D	32	1445.97	2.28öd
Hata	135		2673.98

\*\*p<0,01 ve \*p<0,05 düzeyinde önemli, öd: önemli değil

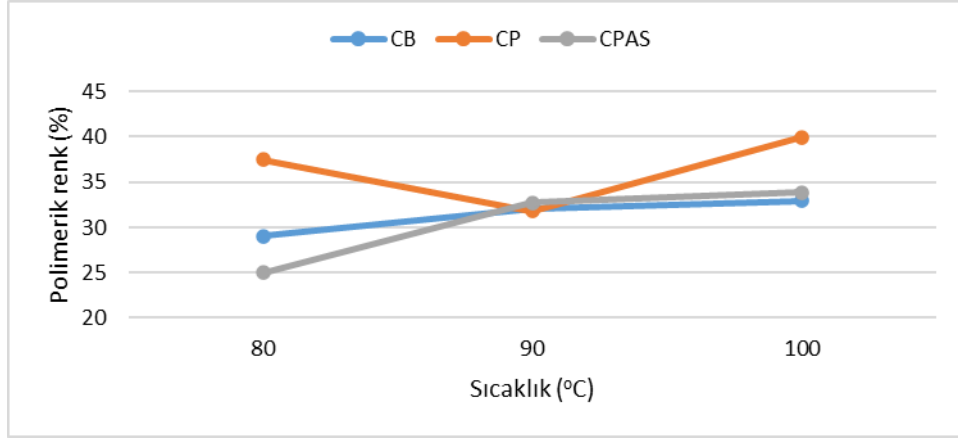
**Çizelge 4.12.** Kıvrımlı nanofibrillerle kopigmente edilmiş hibiskus ekstraktlarının polimerik renk (%) değerlerine ait Duncan çoklu karşılaştırma testi sonuçları

Faktör	N	Polimerik renk (%)
<i>Protein Çeşidi</i>		
CB	90	31.33±8.24b
CP	90	36.05±10.22a
CPAS	90	30.55±9.25b
<i>Nanofibrilasyon Süresi (saat)</i>		
24	90	30.84±9.39b
36	90	33.77±10.28a
48	90	33.31±9.00a
<i>Sıcaklık (°C)</i>		
80	90	30.50±9.99c
90	90	32.18±7.25b
100	90	35.24±10.61a
<i>Isıl işlem süresi (dk)</i>		
0	54	22.48±4.41e
10	54	29.13±5.54d
30	54	32.81±6.31c
60	54	36.76±7.12b
120	54	42.02±9.50a

Farklı harfle işaretlenmiş aynı sütundaki ortalamalar istatistiki olarak birbirinden farklıdır (p<0,05).

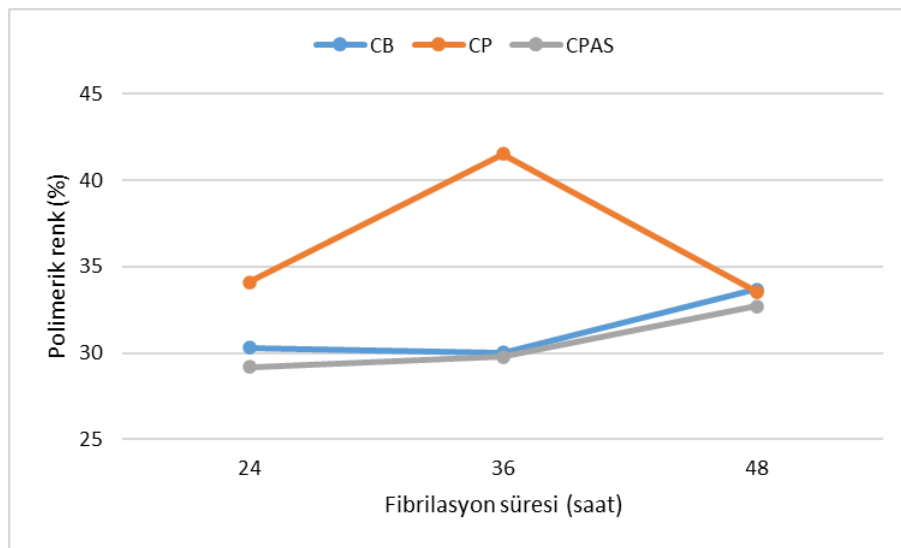
Şekil 4.5’de farklı kıvrımlı nanofibriller ile kopigmente edilen örneklerin polimerik renk değerleri üzerinde etkili ‘Sıcaklık x Protein çeşidi’ interaksyonu gösterilmektedir. CB ve CPAS örneklerinin polimerik renk değerleri sıcaklık 80 °C’den 90 °C’ye çıkarken artış gösterirken, 90 °C’den 100 °C’ye çıkarken önemli bir artış

meydana gelmemiştir. CP örneğinde ise sıcaklık 80 °C'den 90 °C'ye çıkarıldığında polimerik renk değerinde azalma olurken, sıcaklık 90 °C'den 100 °C'ye çıkarıldığında polimerik renk değeri en yüksek seviyeye ulaşmıştır.



**Şekil 4.5.** Kıvrımlı nanofibrillere kopigmente edilen örneklere ait polimerik renk değerlerinin sıcaklığa bağlı değişimi

Şekil 4.6'da farklı kıvrımlı nanofibriller ile kopigmente edilen örneklerin polimerik renk değerleri üzerinde etkili '*Fibrilasyon süresi x Protein çeşidi*' interaksyonu gösterilmektedir. CB ve CPAS örneklerinin polimerik renk değerleri fibrilasyon süresi 24 saatten 36 saate çıkarıldığında önemli bir değişiklik göstermezken, 36 saatten 48 saate çıkarıldığında artış olduğu görülmektedir. CP örneğinde ise fibrilasyon süresi 24 saatten 36 saate çıkarıldığında polimerik renk değerinde önemli bir artış meydana gelmiştir, 36 saatten 48 saate çıkarıldığında ise polimerik renk değeri düşmüştür.



**Şekil 4.6.** Kıvrımlı nanofibrillere kopigmente edilen örneklere ait polimerik renk değerlerinin fibrilasyon süresine bağlı değişimi

#### 4.2.2. Toplam monomerik antosiyanin tayini

Antosiyaninler oksijene, pH'ya, sıcaklığa, enzimlere, ışığa ve metal iyonlarına maruz kaldıklarında kolayca etkilenen, kararsız bileşiklerdir. Bu durum gıdanın hem kalitesini hem de rengini etkilemektedir (Fan ve ark., 2019). Antosiyanin ile renklendirilen ürünlerin renk stabilitesini sağlamak için bu pigmentlerin sıcaklığa karşı kararlı olmalarını sağlamak ve degradasyonunu en aza indirmek önem taşımaktadır (Cavalcanti ve ark., 2011). Bu amaçla enkapsülasyon, asilasyon, kopigmentasyon ve metalik iyonlarla kompleks oluşturma gibi farklı yöntemler uygulanmaktadır (Eiro ve Heinonen, 2002). Özellikle moleküler etkileşimlere dayanan kopigmentasyonun etkili bir yol olduğu düşünülmektedir. Organik asitlerin, flavonoidlerin, alkaloidlerin, polisakkaritlerin, proteinlerin vb. eklenmesi stabiliteyi artırmakta ve antosiyaninlerin biyoaktivitesini de etkilemektedir (Guan ve Zhong, 2015).

Kopigmentasyonun hibiskus ekstraktındaki antosiyanin miktarına etkisini görmek amacıyla örnekler termal stabilite testine tabi tutularak kinetik hesaplamalar yapılmıştır. Antosiyanin değişiminin parçalanma hız sabitleri (k), korelasyon katsayıları ( $R^2$ ), z değerleri ve aktivasyon enerjisi ( $E_a$ ) belirlenmiştir. D değerini 1 log azaltmak için gereken termal direnç sıcaklığı (z değeri), log D değeri ve sıcaklığın doğrusal grafiğinden belirlenmiştir (Nayak ve ark., 2011).

Herhangi bir kopigmentasyon uygulanmamış kontrol (kopigment yerine saf su ilave edilmiş) örneği için farklı sıcaklıklarda antosiyanin degradasyonu kinetiğine ait parametreler Çizelge 4.13'de verilmiştir. Kontrol örneğine uygulanan ısı işlem süresince belirlenen reaksiyon hız sabitleri 80, 90 ve 100 °C için sırasıyla  $0.21 \times 10^{-3}$ ,  $0.29 \times 10^{-3}$  ve  $0.40 \times 10^{-3} \text{ dk}^{-1}$  olarak belirlenmiştir (Şekil 4.1). Kontrol örneğinde bulunan antosiyaninlerin bozulma aktivasyon enerjisi 26.13 kJ/mol, z değeri ise 96.22 K olarak hesaplanmıştır.

##### 4.2.2.1. Doğal protein izolatları

Bezelye protein izolatı (BPI), pirinç protein izolatı (PPI), gluten (GPI) ve peynir altı suyu proteini izolatı (PASPI) ile kopigmente edilmiş örneklerin farklı sıcaklıklarda antosiyanin degradasyonu kinetiğine ait parametreler Çizelge 4.13'de verilmiştir.

**Çizelge 4.13.** Kontrol ve doğal protein izolatları ile kopigmente edilmiş örneklerin farklı sıcaklıklarda antosiyanin degradasyonu kinetiğine ait parametreler

Örnek	Sıcaklık(°C)	$k \cdot 10^3$ (mg/L) <sup>-1</sup> dk <sup>-1</sup>	Z (K)	E <sub>a</sub> (kJ/mol)	R <sup>2</sup>
Kontrol	80	0.25	96.22	26.13	0.94
	90	0.29			
	100	0.40			
BPİ	80	0.22	93.63	27.07	0.91
	90	0.33			
	100	0.37			
PPİ	80	0.23	52.65	47.98	0.99
	90	0.37			
	100	0.55			
GPİ	80	0.35	89.89	27.94	0.91
	90	0.41			
	100	0.59			
PASPİ	80	0.34	112.78	22.30	0.99
	90	0.43			
	100	0.51			

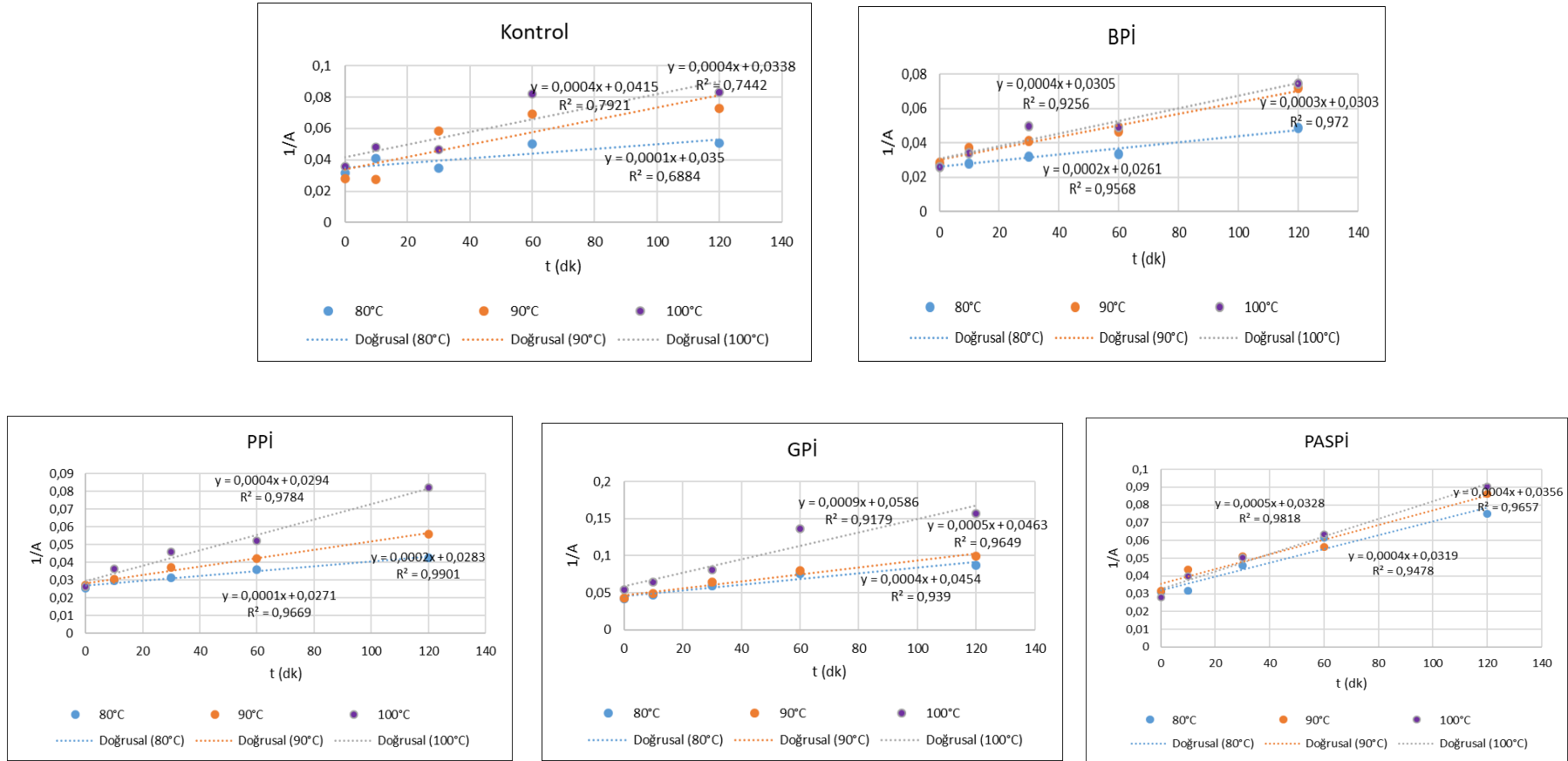
Kontrol: Kopigmentasyon ajanı yerine saf su kullanılan ürün. BPİ: Bezelye protein izolatı ile kopigmente edilen hibiskus ekstraktı. PPİ: Pirinç protein izolatı ile kopigmente edilen hibiskus ekstraktı. GPİ: Gluten ile kopigmente edilen hibiskus ekstraktı. PASPİ: Peynir altı suyu proteini izolat ile kopigmente edilen hibiskus ekstraktı

Farklı protein izolatları ile kopigmente edilen hibiskus antosiyaninlerinin degradasyonuna ilişkin aktivasyon enerjisi değerleri Arrhenius grafiğinin eğiminden hesaplanmış (Şekil 4.8) ve 22.39-47.98 kJ/mol arasında değişim göstermiştir (Çizelge 4.13). Bu değerler literatürde belirtilen 41.1-58.0 kJ/mol (Fan ve ark., 2019), 35–125 kJ/mol (Heldman, 2011), 49.16–77.77 kJ/mol (Mazhitova ve ark., 2022) antosiyanin bozunma aktivasyon enerjisi değerleriyle uyumlu bulunmuştur. En yüksek E<sub>a</sub> değeri PPİ örneğinde, en düşük E<sub>a</sub> değeri ise PASPİ örneğinde gözlenmiştir. BPİ ve GPİ ile kopigmente edilen ekstraktların aktivasyon enerjisi değerleri kontrol örneğine benzer bulunmuştur. Yüksek aktivasyon enerjisi değeri, bozunma reaksiyonunun ihtiyaç duyduğu yüksek enerjiyi gösterir. Enerji ne kadar yüksekse, antosiyanin o kadar kararlıdır.

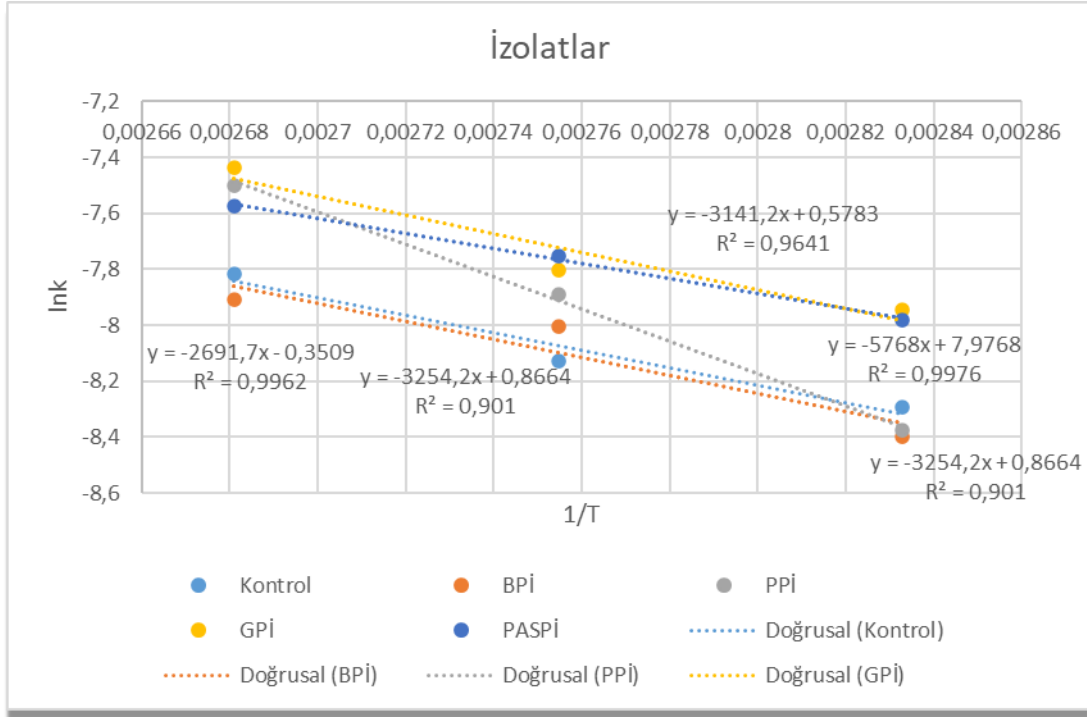
Kopigmente hibiskus örneklerinde antosiyanin degradasyonu ikinci dereceden kinetiğe uygun olarak gerçekleşmiştir. Örneklerin farklı sıcaklıklardaki parçalanma hız sabitleri (k)  $0.22 \cdot 10^{-3}$ - $0.59 \cdot 10^{-3}$  (mg/L)<sup>-1</sup>dk<sup>-1</sup> arasında değişmektedir. Protein izolatları ile kopigmente edilmiş örneklere ait 80, 90 ve 100°C sıcaklıklardaki antosiyanin konsantrasyonu değişimi Şekil 4.7’de verilmiştir. Görüldüğü üzere sıcaklığın artmasıyla antosiyanin degradasyon hızı da artış göstermiştir. Kanha ve ark. (2020) çalışmalarında siyah pirinç ekstraktını kopigmentasyon ve enkapsülasyona tabi tutarak 25, 35, 45 °C’de parçalanma hız sabitlerini hesaplamışlardır ve antosiyanin degradasyon hızının sıcaklık

artıkça artış gösterdiğini bildirmişlerdir. Yaban mersini suyunda antosiyanin degradasyonunun incelendiği bir çalışma da sıcaklık artışıyla beraber k değerinde bir artış olduğu yani sıcaklığın degradasyonu hızlandırıcı bir etki gösterdiği belirtilmiştir (Buckow ve ark., 2010). Li ve ark. (2016) mor tatlı patatesleri şekerler ve metal iyonlarıyla kopigmente ederek 80, 90, 100 °C’de hız sabitlerini belirlemişler ve sıcaklıkla hız sabitinin doğru orantılı olarak arttığını ortaya koymuşlardır.

Çalışma kapsamında reaksiyonuna ait z değerleri de hesaplanmıştır. z değeri; bir bileşiğin sabit bir sıcaklıkta desimal parçalanma süresinin 10 kat kısalması için bu sabit sıcaklığın ne kadar artırılması gerektiğinin göstergesidir. z değerinin azalması reaksiyonun sıcaklığa karşı hassasiyetini artırıcı etki gösterir. z değerleri 52.65-112.78 K değerleri arasında değişmekte olup en düşük z değeri PPI, en yüksek z değeri ise PASPI örneğine ait bulunmuştur. Genel olarak z değeri arttıkça termal direncin de arttığı varsayılmaktadır (Kanha ve ark., 2020). Bu nedenle yalnızca PASPI ile kopigmentasyon hibiskus antosiyaninlerin termal direncinde artış sağlamıştır.



**Şekil 4.7.** Farklı protein izolatları ile kopigmente edilmiş hibiskus ekstraktlarının 80, 90, 100°C sıcaklıklarda antosiyanin degradasyonu kinetiğine ait grafik



**Şekil 4.8.** Farklı protein izolatları kopigmente edilmiş hibiskus ekstraktlarının 80, 90, 100°C sıcaklıklarda antosiyanin degradasyonu kinetiğine ait Arrhenius grafiği

#### 4.2.2.2. Düz nanofibriller

24, 36 ve 48 saat süresince asidik ısıtma ile elde edilen düz nanofibrile proteinlerle (bezelye, pirinç, gluten ve peynir altı suyu proteini) kopigmente edilmiş (Şekil 4.9, 4.10 ve 4.11) ve kontrol örneklerine (Şekil 4.9) ait örneklerin farklı sıcaklıklarda antosiyanin degradasyonu kinetiğine ait parametreler Çizelge 4.14'te verilmiştir. Antosiyanin değişiminin parçalanma hız sabitleri (k), korelasyon katsayıları ( $R^2$ ), z değerleri ve aktivasyon enerjileri ( $E_a$ ) belirlenmiştir. Isıl işlem süresince örneklerde gözlenen toplam monomerik antosiyanin degradasyonunun ikinci derece kinetik modele uygun olarak gerçekleştiği gözlenmiştir. Literatürde de benzer şekilde antosiyanin degradasyonunun ikinci dereceden kinetik modele uygun bulunduğu çalışmalar mevcuttur (Li ve ark., 2020b; Qian ve ark., 2017; Zhou ve ark., 2017). Bunun sebebinin elektropozitif aglikonların (siyanidin +287, delfinidin +303, pelargonidin +271 ve peonidin +301) ikinci dereceden kinetiğe uygun olarak reaksiyon gerçekleştirmesi olarak bildirilmiştir (Jing ve ark., 2012; Luo ve ark., 2018; Sojka ve ark., 2009). İkinci derece reaksiyonlar reaktant konsantrasyonuna bağlıdır. Reaktantlar azaldıkça reaksiyon hızı azalmaktadır (Jing ve Giusti, 2005).

Düz nanofibrillerle kopigmente edilen örneklerin antosiyanin degradasyonu kinetiğine ait Arrhenius grafiği Şekil 4.12' de verilmiş olup  $E_a$  değerleri 33.35-141.08 kJ/mol arasında değişmiştir. Mazhitova ve ark. (2022) çalışmasında farklı meyve antosiyaninlerini doğal kaynaklarla kopigmente ederek termal stabilite testine tabi tutmuşlar ve  $E_a$  değerlerini 49.16–77.77 kJ/mol değerleri arasında bulmuşlardır. Costa ve ark. (2018) açai meyvesi antosiyaninlerinin termal degradasyonunu incelemişler ve aktivasyon enerjisini 24.16-80.4 kJ/mol değerleri arasında bulmuşlardır. Mor tatlı patates antosiyaninlerinin metal iyonları ve şekerlerle kopigmente edildiği bir çalışmada aktivasyon enerjisinin 54.16-65.59 kJ/mol değerleri arasında olduğu bildirilmiştir (Li ve ark., 2016).

En yüksek  $E_a$  değeri (141.08 kJ/mol) 24NB örneğinde gözlenmiş ve bunu 24NPAS örneği (103.54 kJ/mol) takip etmiştir. Kontrol ile kıyaslandığında (82.79 kJ/mol) 24NB, 24NPAS, 36NP, 48NB örneklerinin  $E_a$  değerleri daha yüksek bulunmuştur. Sırasıyla 24NB, 36NB, 48NB örnekleri için  $E_a$  değerleri; 141.08, 74.64, 87.22 kJ/mol olarak hesaplanmıştır. Bezelye proteini için fibrilasyon süresinin kısa tutulmasıyla  $E_a$  değeri daha yüksek bulunmuştur. Sırasıyla 24NP, 36NP, 48NP için  $E_a$  değerleri; 38.33, 89.69, 60.94 kJ/mol olarak belirlenmiştir. Pirinç proteini için en yüksek  $E_a$  değeri 36 saatlik fibrilasyon süresinde elde edilmiştir. Sırasıyla 24NG, 36NG ve 48NG için  $E_a$  değerleri 33.35, 63.88, 73.49 kJ/mol'dur. Glutenin fibrilasyon süresinin artmasıyla  $E_a$  değerinde de artış meydana gelmiştir. Monge-Morera ve ark. (2021) çalışmalarında gluteni ısıtma ve kaynatma işlemlerinin fibril oluşumunu teşvik ettiğini bildirmişlerdir. Yani fibrilasyon süresi arttıkça protein izolatu hibiskus ekstraktını daha stabil hale getirmiştir. Sırasıyla 24NPAS, 36NPAS ve 48NPAS için  $E_a$  değerleri; 103.54, 68.00, 57.52 kJ/mol bulunmuştur. Bezelye proteininde olduğu gibi en yüksek  $E_a$  değeri en düşük fibrilasyon süresinde hesaplanmıştır. Bunun nedeni fibrilasyon süresinin artmasıyla oluşan uzun ve esnek protein ağ yapısının parçalanarak bileşenlerin reaksiyona açık hale gelmesi varsayılabilir. Yapılan bir çalışmada fibrilasyon süresi uzadıkça proteinin yapısal olarak açılarak, polipeptit hidrolizi meydana geldiği bildirilmiştir (Hu ve Li, 2021).  $E_a$  değeri protein izolatları ile kopigmente edilen örneklerle karşılaştırıldığında (22.39-47.98 kJ/mol) düz nanofibrille proteinlerle kopigmente edilen örneklerin  $E_a$  değerlerinin genellikle daha yüksek olduğu görülmektedir.  $E_a$  değerinin yüksek olması reaksiyona girmek için daha fazla enerji gerektiğinin yani reaksiyonun gerçekleşmesinin daha zor olduğunun göstergesidir (Saidji ve ark., 2023). Buradan da anlaşılacağı üzere düz nanofibrillerle kopigmente edilen örneklerde antosiyanin degradasyonu daha zor

gerçekleşmektedir. Antosiyaninler sıcaklığa karşı daha dirençli hale gelmiştir. Bunun kopigmentlerin antosiyaninlerle yaptığı molekül içi ve moleküller arası bağlar sayesinde gerçekleştiği düşünülmektedir (Ma ve Jing, 2020). Ayrıca protein izolatları ile kopigmente edilen örneklerin  $E_a$  değerlerinin daha düşük olmasının nanofibrilasyon işlemi ile yüzey alanı artan ve bağ yapma kapasitesi yükselen proteinlerin antosiyaninleri daha iyi koruyarak termal olarak stabil hale getirmesi olduğu varsayılmaktadır (Hasan ve ark., 2023).

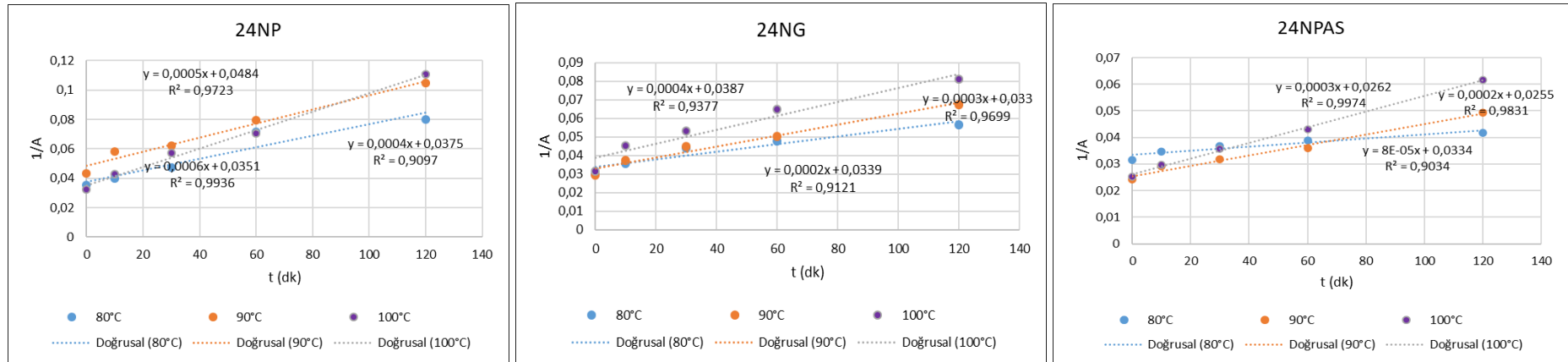
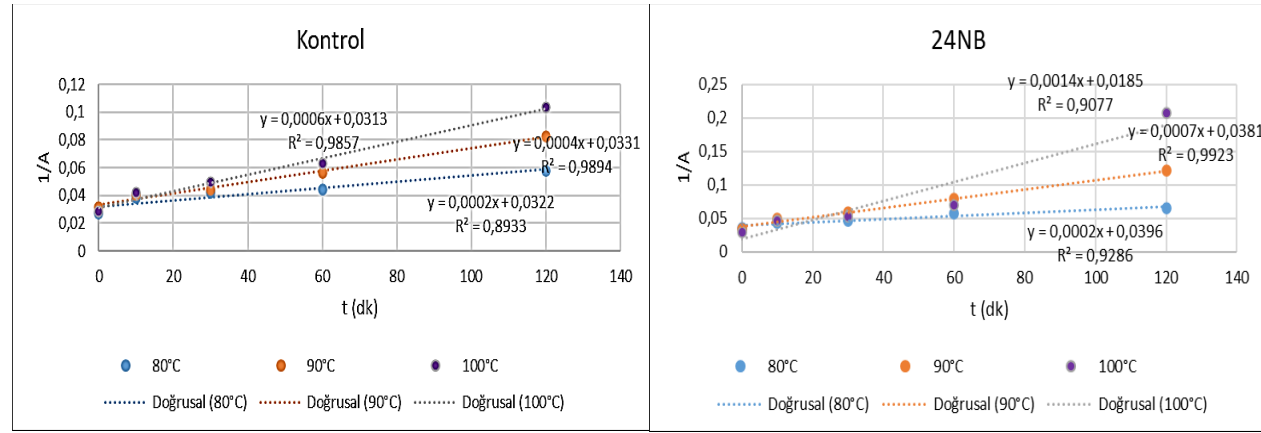
Düz nanofibrillerle kopigmente edilen örneklerin  $k$  değerleri  $0.12 \times 10^{-3}$ -  $0.87 \times 10^{-3}$   $(\text{mg/L})^{-1} \text{dk}^{-1}$  arasında değişmektedir. Protein izolatları ile kopigmente edilen örneklerde olduğu gibi nanofibrille proteinlerle kopigmente edilen örneklerde de sıcaklığın artmasıyla parçalanma hız sabiti artış göstermiştir (Buckow ve ark., 2010; Kanha ve ark., 2020). Kechinski ve ark. (2010) çalışmalarında yabanmersini suyuna 40-80 °C arasında uygulanan ısı sonucunda  $k$  değerinin sıcaklıkla arttığını ve  $0.064$ - $2.254 \times 10^{-3}$   $(\text{mg/L})^{-1} \text{dk}^{-1}$  değerleri arasında değiştiğini bildirmişlerdir. Mazhitova ve ark. (2022) çalışmalarında kopigmente edilmiş farklı meyve antosiyaninlerinin 70-90 °C sıcaklıklarda antosiyanin degradasyon hız sabiti değerlerini  $0.30$ - $2.00$   $(\text{mg/L})^{-1} \text{dk}^{-1}$  değerleri arasında bulmuşlardır. Yapılan diğer çalışmalarda  $k$  değerleri  $0.51$  ve  $3.23 \times 10^{-3}$   $(\text{mol})^{-1} \text{dk}^{-1}$  (Zhang ve ark., 2020b),  $0.62$ - $0.06 \times 10^{-3}$   $(\text{gmg}^{-1}) \text{dk}^{-1}$  çalışmamıza benzer aralıklarda bulunmuştur.

Düz nanofibriller ile kopigmente edilen hibiskus ekstraktlarının  $z$  değerleri  $17.92$ - $75.72$  K değerleri arasında değişmiştir. En düşük  $z$  değeri 24NB örneğinde, en yüksek  $z$  değeri ise 24NG örneğinde gözlenmiştir. Genel olarak  $z$  değeri arttıkça termal direncin de arttığı varsayılmaktadır (Kanha ve ark., 2020). Bu nedenle 24NG örneği hibiskus ekstraktlarının sıcaklık değişimine karşı direncini artırmada en etkili ajan olmuş ve bunu sırasıyla 24NP VE 48NPAS örnekleri takip etmiştir. Sırasıyla  $z$  değerleri 24NB, 36NB, 48NB için  $17.92$ ,  $33.69$ ,  $28.78$  K; 24NP, 36NP, 48NP için  $65.92$ ,  $28.12$ ,  $41.57$  K; 24NG, 36NG, 48NG için  $75.72$ ,  $39.54$ ,  $34.44$  K; 24NPAS, 36NPAS, 48NPAS için  $24.48$ ,  $37.18$ ,  $43.77$  K olarak bulunmuştur. Bezelye proteini için  $z$  değeri bakımından en iyi fibrilasyon süresi 36 saat, pirinç proteini ve gluten için 24 saat, peynir altı suyu proteini içinse 48 saat olduğu görülmektedir.

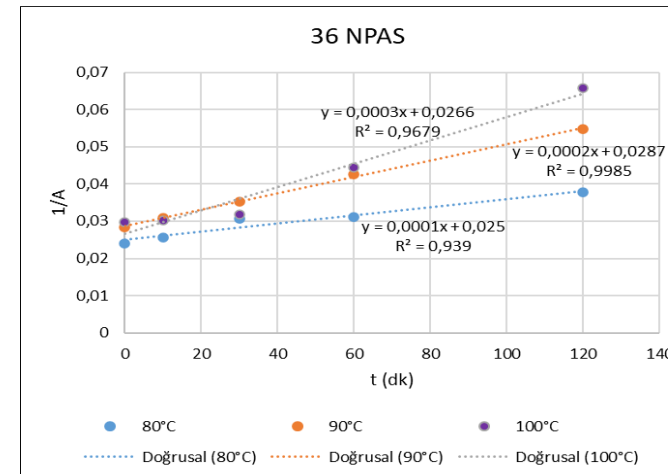
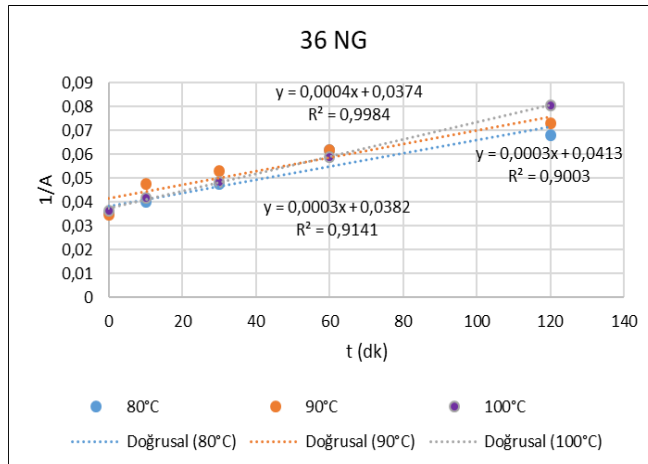
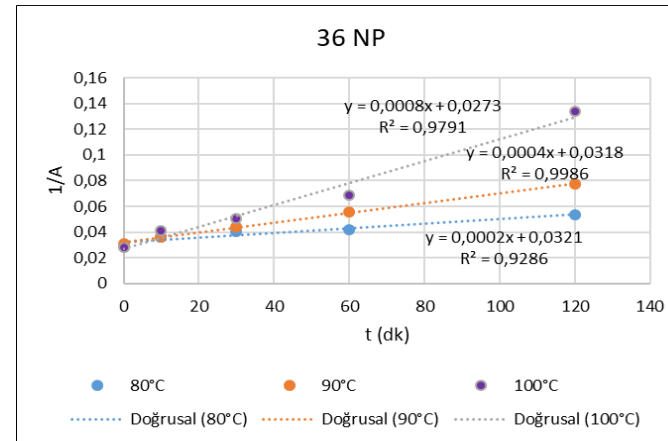
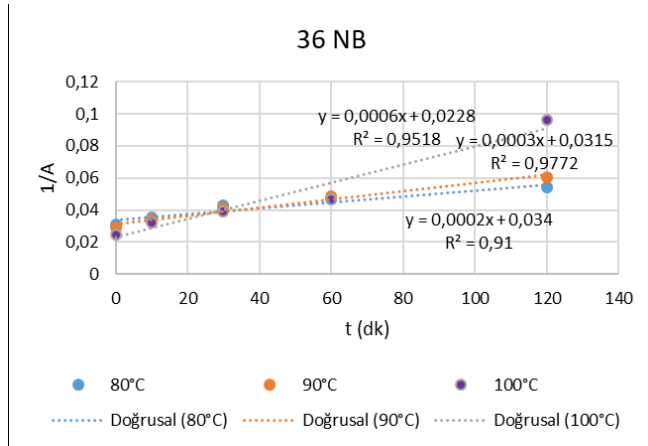
**Çizelge 4.14.** Farklı sıcaklıklarda termal stabilite testine tabi tutulmuş kontrol ve düz nanofibrillerle kopigmente edilmiş örneklere ait toplam antosiyanin miktarına ilişkin kinetik parametreler

Örnek	Sıcaklık(°C)	$k \cdot 10^3$ (mg/L) <sup>-1</sup> dak <sup>-1</sup>	Z (K)	E <sub>a</sub> (kJ/mol)	R <sup>2</sup>
Kontrol	80	0.22	30.40	82.79	0.91
	90	0.40			
	100	0.60			
24NB	80	0.13	17.92	141.08	0.97
	90	0.70			
	100	0.87			
24NP	80	0.31	65.92	38.33	0.99
	90	0.50			
	100	0.62			
24NG	80	0.20	75.72	33.35	0.99
	90	0.30			
	100	0.37			
24NPAS	80	0.04	24.48	103.54	0.98
	90	0.19			
	100	0.28			
36NB	80	0.16	33.69	74.64	0.90
	90	0.30			
	100	0.65			
36NP	80	0.16	28.12	89.69	0.95
	90	0.40			
	100	0.84			
36NG	80	0.23	39.54	63.88	0.99
	90	0.50			
	100	0.73			
36NPAS	80	0.09	37.18	68.00	0.99
	90	0.20			
	100	0.33			
48NB	80	0.25	28.78	87.22	0.90
	90	0.40			
	100	0.60			
48NP	80	0.21	41.57	60.94	0.97
	90	0.30			
	100	0.44			
48NG	80	0.21	34.44	73.49	0.99
	90	0.60			
	100	0.82			
48NPAS	80	0.12	43.77	57.52	0.94
	90	0.20			
	100	0.34			

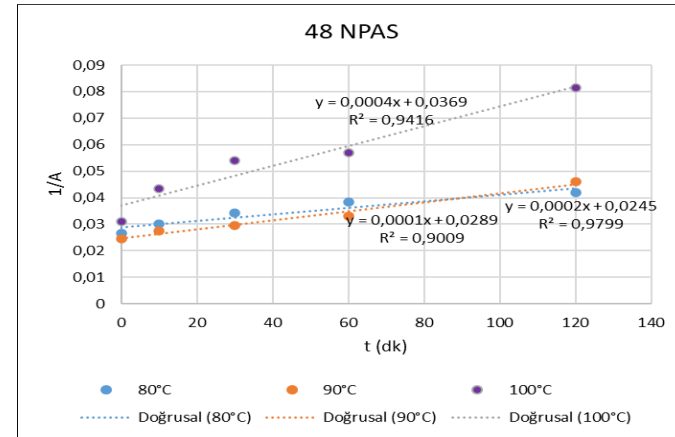
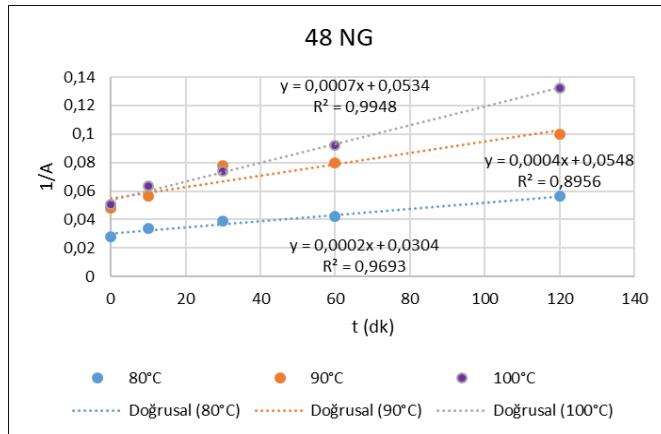
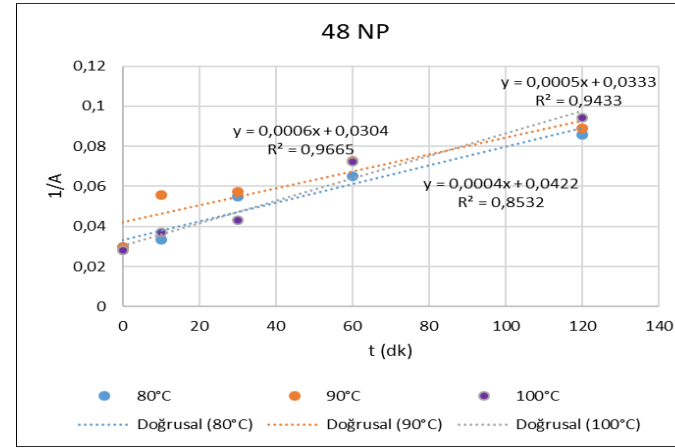
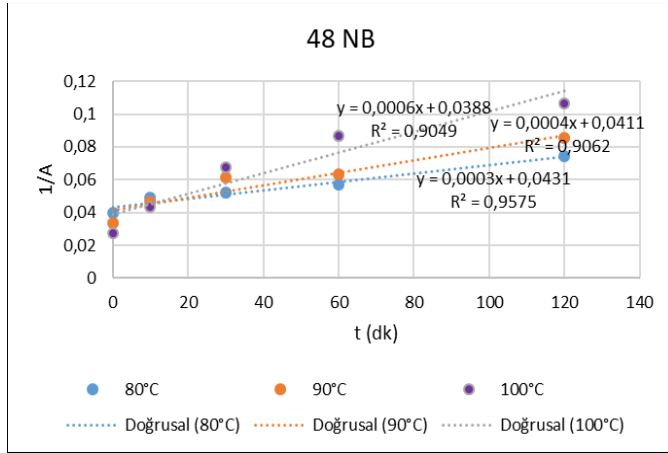
Kontrol: Kopigmentasyon ajanı yerine saf su kullanılan ürün. 24: 24 saat boyunca su banyosunda bekletilerek nanofibrilasyona tabi tutulan ürün. 36: 36 saat boyunca su banyosunda bekletilerek nanofibrilasyona tabi tutulan ürün. 48: 48 saat boyunca su banyosunda tutularak nanofibrilasyona tabi tutulan ürün. NB: Düz nanofibrile bezelye protein ile kopigmente edilen hibiskus ekstraktı. NP: Düz nanofibrile pirinç protein ile kopigmente edilen hibiskus ekstraktı, NG: Düz nanofibrile gluten ile kopigmente edilen hibiskus ekstraktı. PAS: Düz nanofibrile peynir altı suyu proteini ile kopigmente edilen hibiskus ekstraktı.



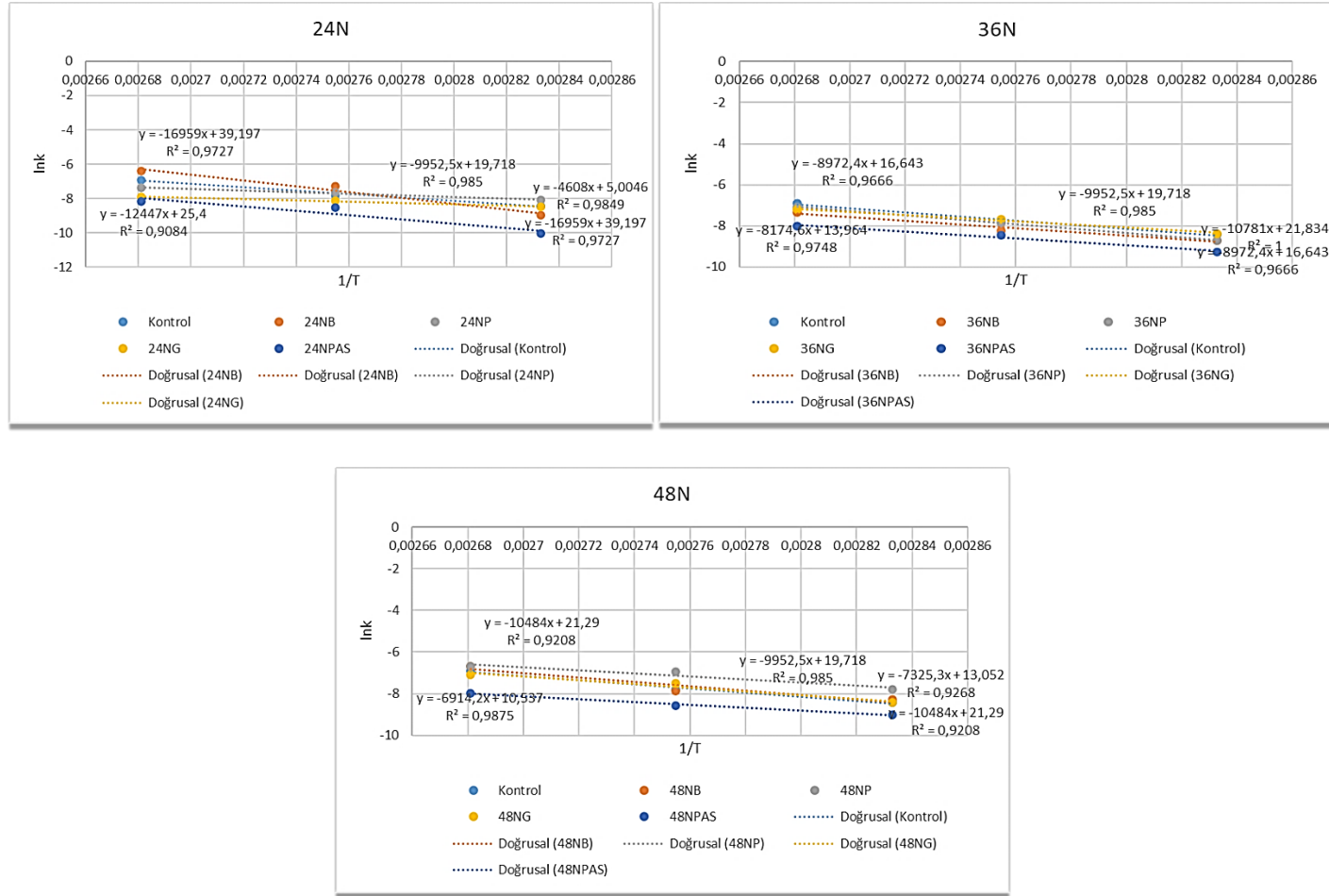
Şekil 4.9. Kontrol ve 24 saatlik metotla üretilen düz nanofibrile proteinlerle kopigmente edilmiş hibiskus ekstraktlarının 80, 90, 100°C sıcaklıklarda antosiyanin degradasyonu kinetiğine ait grafik



**Şekil 4.10.** 36 saatlik metotla üretilen düz nanofibrile proteinlerle kopigmente edilmiş hibiskus ekstraktlarının 80, 90, 100°C sıcaklıklarda antosiyanin degradasyonu kinetiğine ait grafik



**Şekil 4.11.** 48 saatlik metotla üretilen düz nanofibrile proteinlerle kopigmente edilmiş hibiskus ekstraktlarının 80, 90, 100°C sıcaklıklarda antosiyanin degradasyonu kinetiğine ait grafik



Şekil 4.12. Farklı düz nanofibrile proteinlerle kopigmente edilmiş hibiskus ekstraktlarının 80, 90, 100°C sıcaklıklarda antosiyanin degradasyonu kinetiğine ait Arrhenius grafiği

### 4.2.2.3. Kıvrımlı nanofibriller

24, 36 ve 48 saatlik ısıtma işlemi sonucu elde edilen kıvrımlı nanofibrille proteinlerle (bezelye, pirinç ve peynir altı suyu proteini) kopigmente edilmiş ve kontrol örneklerine ait örneklerin farklı sıcaklıklarda antosiyanin degradasyonu kinetiğine ait parametreler Çizelge 4.15’de verilmiştir. Antosiyanin degradasyonunun parçalanma hız sabitleri ( $k$ ), korelasyon katsayıları ( $R^2$ ),  $z$  değerleri ve aktivasyon enerjisi ( $E_a$ ) belirlenmiştir (Şekil 4.13-4.16).

Kıvrımlı nanofibrillerle kopigmente edilen örneklerin  $E_a$  değerleri 38.54-91.48 kJ/mol arasında değişmiştir. En yüksek  $E_a$  değeri 48CPAS örneğinde (91.48 kJ/mol) belirlenmiş ve bunu sırasıyla 36CP (87.99 kJ/mol) ve 36CB (87.63 kJ/mol) örneği takip etmiştir. Bu üç örnek dışındaki diğer tüm kıvrımlı nanofibriller kontrolden daha düşük aktivasyon enerjisi sağlamıştır. Ayrıca protein izolatları ile kopigmente edilen örneklerle karşılaştırıldığında (22.39-47.98 kJ/mol) kıvrımlı nanofibrille proteinlerle kopigmente edilen örneklerin  $E_a$  değerlerinin genellikle daha yüksek olduğu görülmektedir. Daha önce de belirtildiği gibi  $E_a$  değerinin yüksek olması antosiyanin degradasyonunun daha zor gerçekleştiğinin bir göstergesidir (Saidji ve ark., 2023). Kıvrımlı nanofibrillerle kopigmente edilen örnekler, protein izolatları ile kopigmente edilenlere kıyasla daha yüksek  $E_a$  değerine sahip olması nedeniyle degradasyonun daha zor gerçekleştiği söylenebilir.  $E_a$  değerleri sistematik olarak karşılaştırılacak olursa sırasıyla 24CB, 36CB ve 48CB için 58.70, 87.63, 71.31 kJ/mol olarak hesaplanmıştır. 24CP, 36CP ve 48CP için  $E_a$  değerleri sırasıyla 58.08, 87.99, 38.54 kJ/mol; 24CPAS, 36CPAS ve 48CPAS içinse 64.32, 75.55, 91.48 kJ/mol’dür. 24NPAS, 36NPAS ve 48NPAS örneklerinin aksine kıvrımlı fibrillerde fibrilasyon süresi uzadıkça  $E_a$  değerinde artış meydana gelmiştir. İyonik gücü yüksek çözelti ile gerçekleştirilen fibrilasyonda sürenin uzaması fibrillerin ağ yapısını genişleterek bozulma reaksiyonlarını geciktirmiştir. Düz ve kıvrımlı peynir altı suyu fibrillerinin stabilitesinin araştırıldığı bir çalışmada kıvrımlı fibrillerin düz fibrillere oranla daha dayanıklı olduğu ve hasar görmediği bildirilmiştir (Loveday ve ark., 2012). Yine başka bir çalışmada amiloid fibrillerin dallarının ısıtma süresinin artmasıyla görünür hale geldiği bildirilmiştir (Mohammadian ve Madadlou, 2016). Bezelye ve pirinç protein fibrilleri ile kopigmente edilen örneklerde ise en iyi fibrilasyon süresinin 36 saat olduğu görülmüştür. Bu durum 36 saate kadar fibril oluşumu desteklenirken belirli süreden sonra oluşan kıvrımlı ve esnek fibrillerin parçalanmış olmasıyla açıklanabilir.

Bezelye ve pirinç nanofibrilleri elde etmek amacıyla protein izolatlarının asitli ortamda ısıtıldığı bir çalışmada belirli bir süreden sonra fibrillerin parçalanma eğilimi gösterdiği bildirilmiştir (Kong ve ark., 2024).

Kıvrımlı nanofibrillerle kopigmente edilen örneklerin  $k$  değerleri  $0.14 \times 10^{-3}$ - $0.91 \times 10^{-3}$  (mg/L)<sup>-1</sup>dk-1 arasında değişmektedir. Protein izolatları ve nanofibrile proteinlerle kopigmente edilen örneklerde gözlemlendiği gibi sıcaklığın artmasıyla parçalanma hız sabiti de artış göstermiştir. Antosiyanin stabilitesinin kitosan ve aljinat ile sağlandığı bir çalışmada  $k$  değerleri ikinci dereceden reaksiyon kinetiğine göre çalışmamıza benzer şekilde  $0.6 \times 10^{-3}$  -  $3.2 \times 10^{-3}$  (g.mg<sup>-1</sup>dk<sup>-1</sup>) aralığında bulunmuştur (Pinheiro ve ark., 2021).

Termal direnç sıcaklığı ( $z$ ) değerleri 27.59-65.77 K değerleri arasında değişmekte olup en düşük  $z$  değeri 48CPAS, en yüksek  $z$  değeri ise 48CP örneğine ait bulunmuştur. Kanha ve ark. (2019) çalışmalarında kopigmentasyonun antosiyaninlerin termal direncini arttırdığını ve bu artışın  $z$  değeri ile doğrusal bir ilişkide gerçekleştiğini bildirmişlerdir. Kıvrımlı nanofibriller ile kopigmente edilen hibiskus ekstraktlarından  $z$  değeri bakımından termal olarak en dirençli örneğin 48CP olduğu görülmektedir.  $z$  değerleri sırasıyla 24CB, 36CB ve 48CB örnekleri için 42.85, 28.77, 35.42 K; 24CP, 36CP ve 48CP örnekleri için 43.58, 28.75, 65.77 K; 24CPAS, 36CPAS ve 48CPAS örnekleri için 39.18, 33.45, 27.59 K'dir. Bezelye ve peynir altı suyu proteinleri örnekleri için en iyi  $z$  değeri 24 saatte, pirinç için 48 saatte elde edilmiştir. En stabil kopigment belirlenirken  $z$  değerleri tek başına ele alınmayıp  $E_a$  değerleriyle birlikte değerlendirilmiştir.

Yapılan termal stabilite testleri sonucunda doğal protein izolatları, düz veya kıvrımlı nanofibriller ile kopigmente edilen hibiskus ekstraktları ve kontrol örneği kıyaslanarak antosiyanin degradasyon reaksiyonuna karşı en stabil örnekler seçilmiştir. Örnekler seçilirken  $z$  ve  $E_a$  değerlerinden yararlanılmıştır.  $z$  değeri ve  $E_a$  değeri en yüksek olan örnekler belirlenerek çalışmanın ileriki aşamalarında kullanıma uygun kopigmente edilmiş hibiskus ekstraktları belirlenmiştir. Kıyaslamalar sonucunda yüksek  $z$  değerleri nedeniyle 24NP, 24NG, 24CB ve 48CP örnekleri, yüksek  $E_a$  değerleri ve uygun parçalanma hız sabiti ( $k$ ) değerleri nedeniyle 24NPAS ve 48CPAS örnekleri çalışmanın ilerleyen aşamalarında model gıdalara uygulanmak üzere seçilmiştir.

Yukarıda yapılan tartışmalar sonucunda doğal proteinlere oranla düz ve kıvrımlı protein nanofibrilleri ile kopigmente edilen örneklerin daha yüksek  $E_a$  ve  $z$  değerleri gösterdikleri ve hibiskus ekstraktında bulunan antosiyaninleri reaksiyonlara karşı daha iyi koruduğu sonucuna varılmıştır. Nanofibrilasyon işlemi esnasında proteinler yüksek

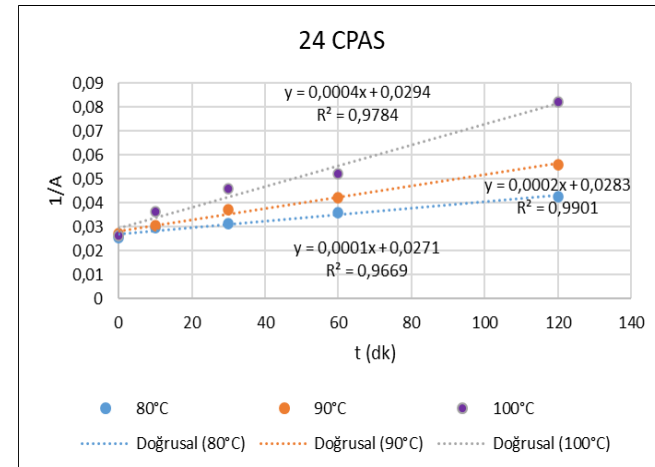
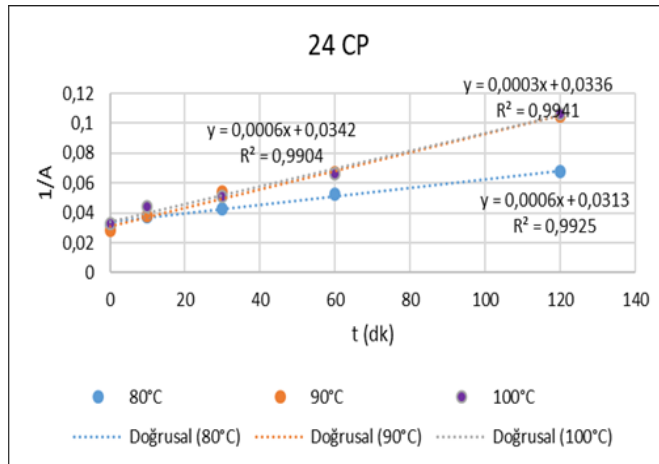
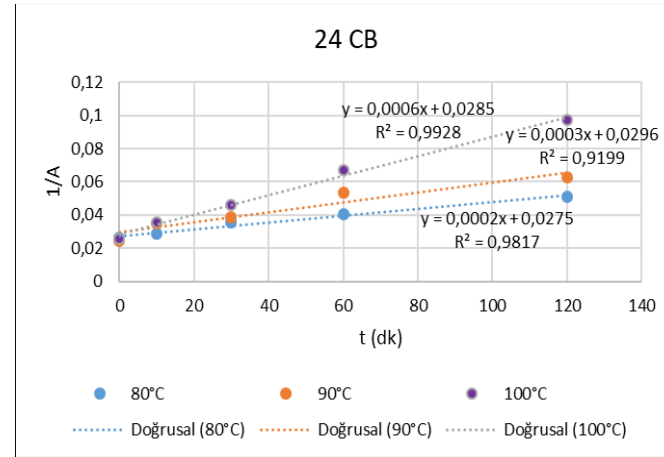
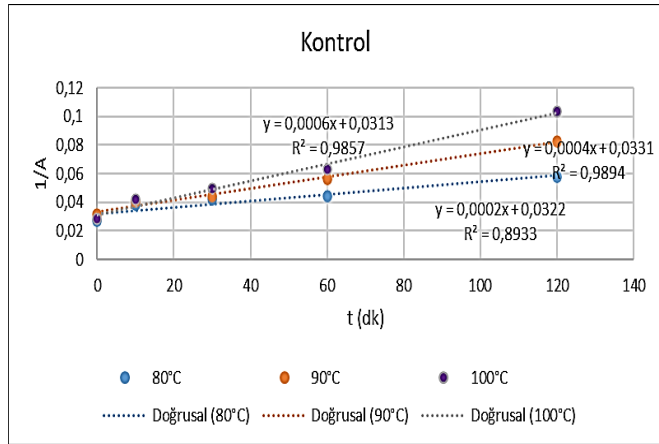
sıcaklıklarda ve asidik bir pH'da uzun ve ince (~10 nm çap) protein kümeleri olan ve  $\beta$ -tabakalı çekirdek yapısına sahip amiloid benzeri nanofibriller halinde kendiliğinden birleşmektedir (Cao ve Mezzenga, 2019). Proteinlerde bulunan  $\beta$ -tabakalar arasında bulunan yan zincirler birbirine geçerek sıkı ve kuru bir "sterik fermuar" arayüzü oluşturmaktadır (Eisenberg ve Sawaya, 2017).  $\beta$ -tabakaların omurgasından oluşan hidrojen bağ ağı ve yan zincirlerin de fermuar benzeri yapı oluşturmasıyla birlikte nanofibriller oldukça stabil bir yapı göstermektedir (Eisenberg ve Sawaya, 2017). Ayrıca nanofibrillerin benzersiz çapraz yapısı, fibrilasyon işlemi ile triptofan ve diğer amino asit kalıntılarının daha fazla açığa çıkması nedeniyle güçlü antioksidan aktivite sergilemektedir. Nanofibriller yüksek antioksidan aktivitesi ile gıdayı oksidatif reaksiyonlarla yapısında, tadında, aromasında ve renginde meydana gelebilecek bozulmalara karşı korumaktadır (Shi, 2023). Doğal proteinlerle karşılaştırıldığında teknolojik ve yapısal özellikleri bakımından oldukça üstündürler. Protein fibrillerinin yüksek en boy oranı, düşük konsantrasyonlarda bile bir dispersiyondaki fibril-fibril temaslarını kolaylaştırarak bağ yapma oranını arttırmaktadır (Lendel ve Solin, 2021). Oluşan dolaşmış ağ yapısı doğal proteinlere göre çok daha düşük konsantrasyonlarda jel oluşturma, viskoz yapı oluşturma, biyoaktif materyalleri koruma gibi özelliklere sahip olmalarını sağlamaktadır (Renard ve Lefebvre, 1992).

Son zamanlarda yapılan çalışmalarla doğal pigmentlerin proteinlerle kompleks oluşturarak stabilitesinin geliştirildiği rapor edilmiştir (Chen ve ark., 2019; Zou ve ark., 2019). Proteinler antosiyaninlere kovalent (Schiff bazları ve Michael katılma reaksiyonları) veya kovalent olmayan bağlarla (hidrojen bağları, van der Waals bağları, hidrofobik etkileşimler) bağlanarak onların stabilitesini arttırmaktadırlar (Rawel ve Rohn, 2010; Wei ve ark., 2015). Özellikle protein nanofibrilleri çok düzenli yapıları ve uyumlu en boy oranları ile teknolojik olarak gıda uygulamalarında kullanmaya elverişlidir (Shi, 2023).

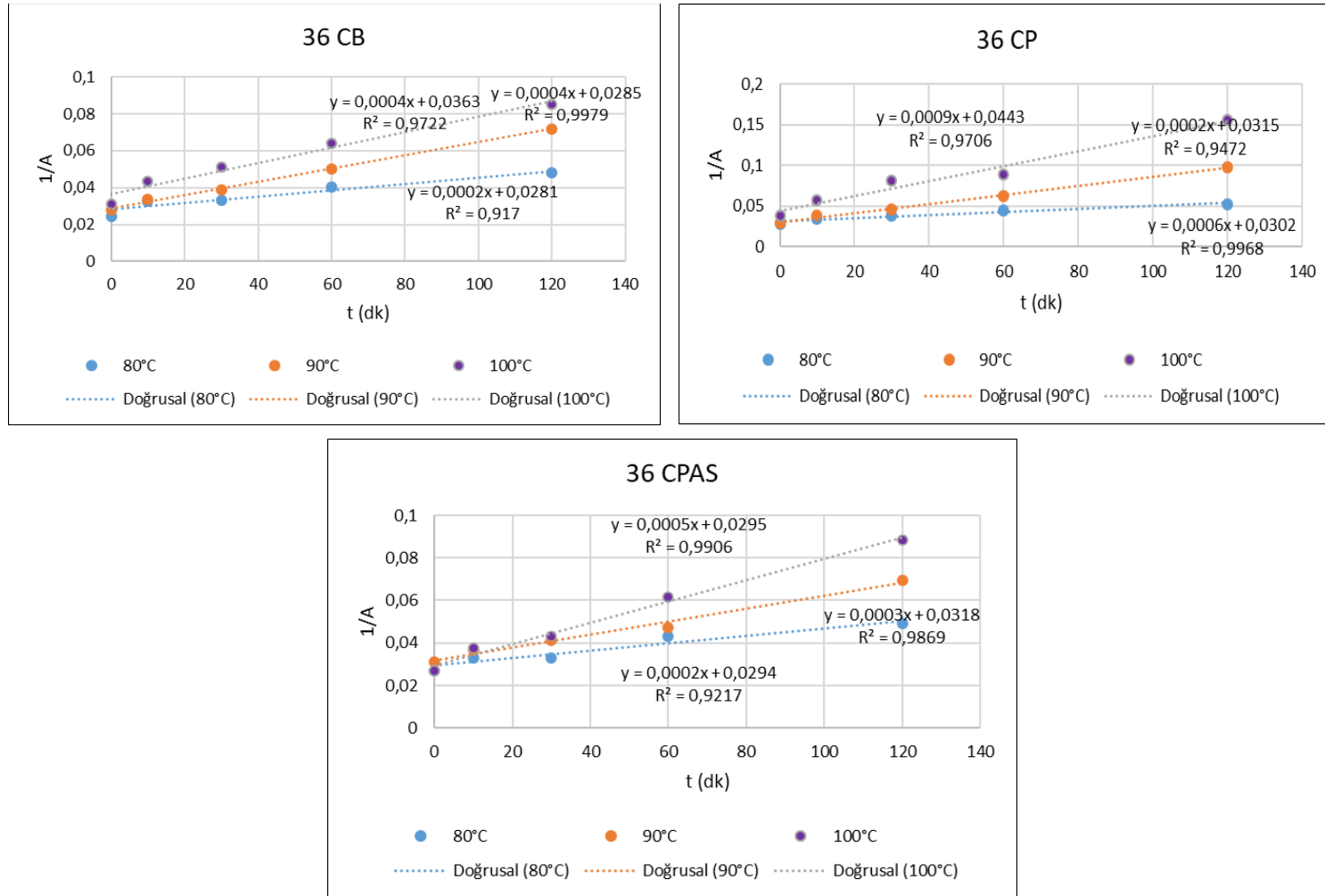
**Çizelge 4.15.** Farklı sıcaklıklarda termal stabilite testine tabi tutulmuş kontrol ve kıvrımlı nanofibrillerle kopigmente edilmiş örneklerle ait toplam antosiyanin miktarına ilişkin kinetik parametreler

Örnek	Sıcaklık(C <sup>o</sup> )	k*10 <sup>3</sup> (mg/L) <sup>-1</sup> (dk <sup>-1</sup> )	Z (K)	E <sub>a</sub> (kJ/mol)	R <sup>2</sup>
Kontrol	80	0.22	30.40	82.79	0.91
	90	0.40			
	100	0.42			
24CB	80	0.20	42.85	58.70	0.92
	90	0.30			
	100	0.58			
24CP	80	0.29	43.58	58.08	0.98
	90	0.60			
	100	0.67			
24CPAS	80	0.13	39.18	64.32	0.96
	90	0.20			
	100	0.43			
36CB	80	0.16	28.77	87.63	0.95
	90	0.36			
	100	0.45			
36CP	80	0.18	28.75	87.99	0.99
	90	0.55			
	100	0.91			
36CPAS	80	0.12	33.45	75.55	0.99
	90	0.30			
	100	0.50			
48CB	80	0.19	35.42	71.31	0.99
	90	0.40			
	100	0.72			
48CP	80	0.21	65.77	38.54	0.93
	90	0.40			
	100	0.42			
48CPAS	80	0.14	27.59	91.48	0.97
	90	0.40			
	100	0.69			

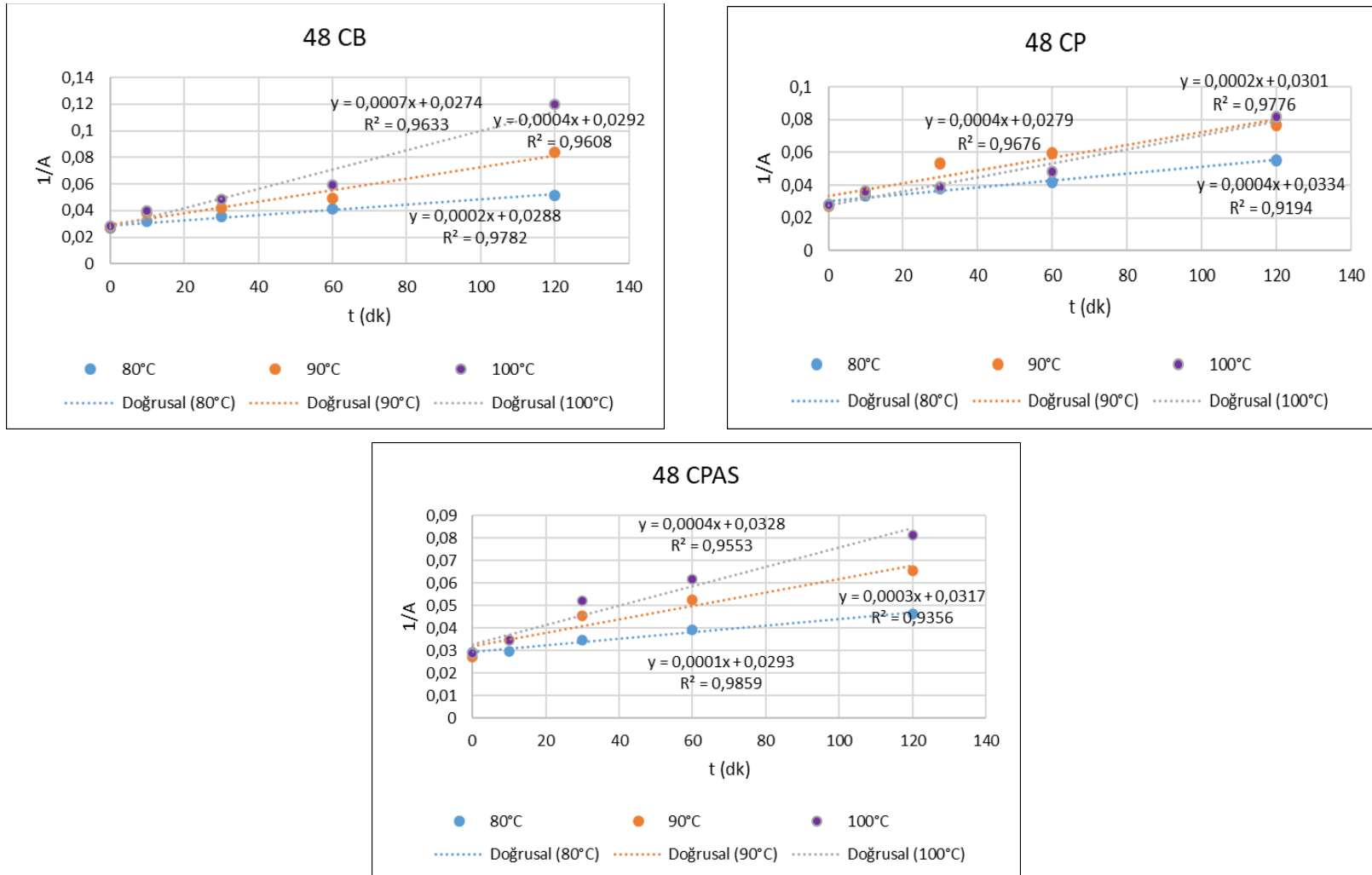
Kontrol: Kopigmentasyon ajanı yerine saf su kullanılan ürün. 24: 24 saat boyunca su banyosunda bekletilerek nanofibrilasyona tabi tutulan ürün. 36: 36 saat boyunca su banyosunda bekletilerek nanofibrilasyona tabi tutulan ürün. 48: 48 saat boyunca su banyosunda bekletilerek nanofibrilasyona tabi tutulan ürün. CB: Kıvrımlı nanofibrille bezelye protein ile kopigmente edilen hibiskus ekstraktı. CP: Kıvrımlı nanofibrille pirinç protein ile kopigmente edilen hibiskus ekstraktı, CPAS: Kıvrımlı nanofibrille peynir altı suyu proteini ile kopigmente edilen hibiskus ekstraktı.



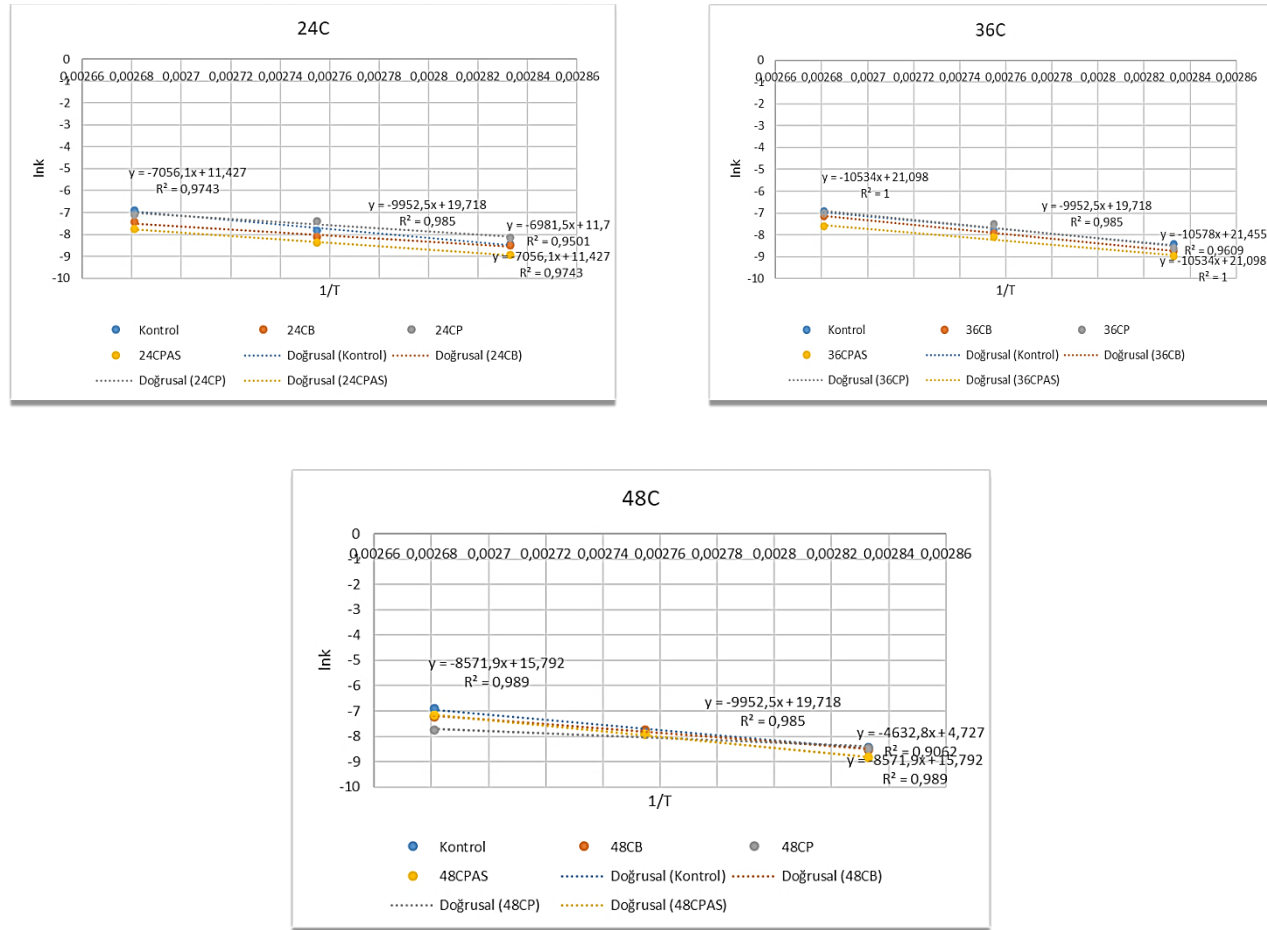
**Şekil 4.13.** Kontrol ve 24 saatlik metotla üretilen kıvrımlı nanofibrile proteinlerle kopigmente edilmiş hibiskus ekstraktlarının 80, 90, 100°C sıcaklıklarda antosiyanin degradasyonu kinetiğine ait grafik



**Şekil 4.14.** 36 saatlik metotla üretilen kıvrımlı nanofibrile proteinlerle kopigmente edilmiş hibiskus ekstraktlarının 80, 90, 100°C sıcaklıklarda antosiyanin degradasyonu kinetiğine ait grafik



**Şekil 4.15.** 48 saatlik metotla üretilen kıvrımlı nanofibrile proteinlerle köpigmente edilmiş hibiskus ekstraktlarının 80, 90, 100°C sıcaklıklarda antosiyanin degradasyonu kinetiğine ait grafik



**Şekil 4.16.** Farklı kıvrımlı nanofibrile proteinlerle kopigmente edilmiş hibiskus ekstraktlarının 80, 90, 100°C sıcaklıklarda antosiyanin degradasyonu kinetiğine ait Arrhenius grafiği

### 4.3. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi (FTIR) Spektroskopisi

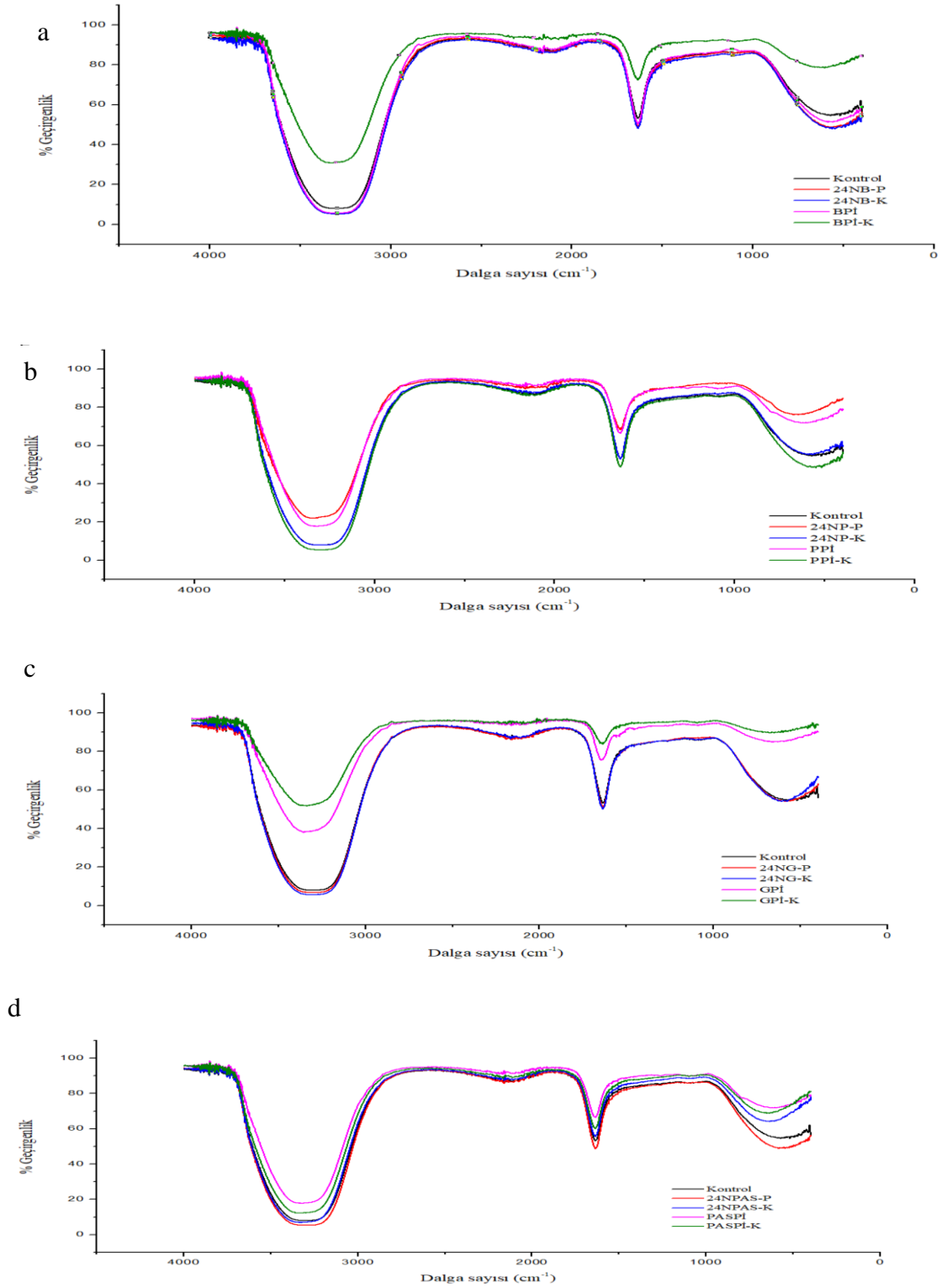
FTIR ölçümleri kopigmentasyon komplekslerinin oluşumuna dair kanıt niteliğindedir. Nanofibrilasyona uğratılmış proteinler ve antosiyaninler arasında gerçekleşen bağ oluşumunu izlemek ve doğrulamak ve proteinler ve diğer ligandlar arasındaki bağlanmanın genellikle proteinin ikincil yapısındaki konformasyonel değişikliklerle birlikte gerçekleştiğini göz önünde bulundurarak, nanofibrile proteinlerin ikincil yapısındaki değişiklikleri tespit etmek amacıyla FTIR analizi gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.17, 4.18 ve 4.19' da sırasıyla 24, 36 ve 48 saatlik metotla üretilen düz nanofibrile proteinlerle kopigmente edilmiş hibiskus ekstraktlarına ait FTIR grafikleri verilmiştir. Şekil 4.17'de 24 saatlik metotla ısıtma sonucu üretilen düz nanofibrile (a) bezelye protein izolatu, (b) pirinç protein izolatu, (c) gluten ve (d) peynir altı suyu proteini ile kopigmente edilen örneklerin kontrol ve protein izolatu örnekleriyle karşılaştırmalı FTIR spektrumları gösterilmiştir. FTIR spektrumları  $4000-400\text{ cm}^{-1}$  aralığında verilmiştir. Örneklerin spektrumları incelendiğinde kontrol, 24NB-P, 24NB-K, BPI VE BPI-K için sırasıyla  $3307\text{ cm}^{-1}$ ,  $3282\text{ cm}^{-1}$ ,  $3294\text{ cm}^{-1}$ ,  $3286\text{ cm}^{-1}$ ,  $3313\text{ cm}^{-1}$  dalga sayısında pikler oluştuğu gözlenmektedir. Kopigmentasyon ile FTIR spektrumları önemli değişikliklere uğramıştır. Bu değişiklikler özellikle hidrojen bağı oluşumunun karakteristiği olan  $3300-3400\text{ cm}^{-1}$  aralığında gözlenmiştir (Crews ve ark., 1998).  $3200-3300\text{ cm}^{-1}$  dalga boyu aralığında daha geniş olarak gözlenen pik  $-OH$  gruplarının ve  $-NH_2$ 'nin varlığını göstermektedir (Kumar ve Cumbal, 2016). Görüldüğü üzere protein izolatu ile kopigmente edilen hibiskus ekstraktına oranla nanofibrilasyona uğratılmış proteinlerle kopigmente edilen örneklerin spektrumunda  $3200-3650\text{ cm}^{-1}$  aralığında daha geniş pikler gözlenmiştir. Bu da  $-OH$  gerilme emiliminin daha yüksek olduğunu göstermektedir (Zhang ve ark., 2020a).

Bunun yanında örnekler  $1630-1650\text{ cm}^{-1}$  ve  $600-1000\text{ cm}^{-1}$  aralığında da pikler oluşturmuştur.  $1600-1680\text{ cm}^{-1}$  arasında oluşan pikler konjuge olmayan güçlü  $C=C$  titreşimlerini göstermektedir (Zainul ve Isara, 2019).  $600-1000\text{ cm}^{-1}$  aralığında absorpsiyon bandı aromatik halkaların varlığını göstermektedir. Zhang ve ark. (2020a) oenin farklı fenoliklerle kopigmentasyona tabi tuttuğu çalışmasında FTIR spektrumunda benzer sonuçlar elde etmiştir.

Şekil 17b'ye bakıldığında kontrol, 24NP-P, 24NP-K, PPI ve PPI-K karşılaştırılmıştır. Örnekler sırasıyla  $3320$ ,  $3325$ ,  $3323$ ,  $3302$  ve  $3305\text{ cm}^{-1}$  ve  $1614$ ,  $1620$ ,  $1616$ ,  $1648$  ve  $1636\text{ cm}^{-1}$  dalga boylarında pik vermiştir.

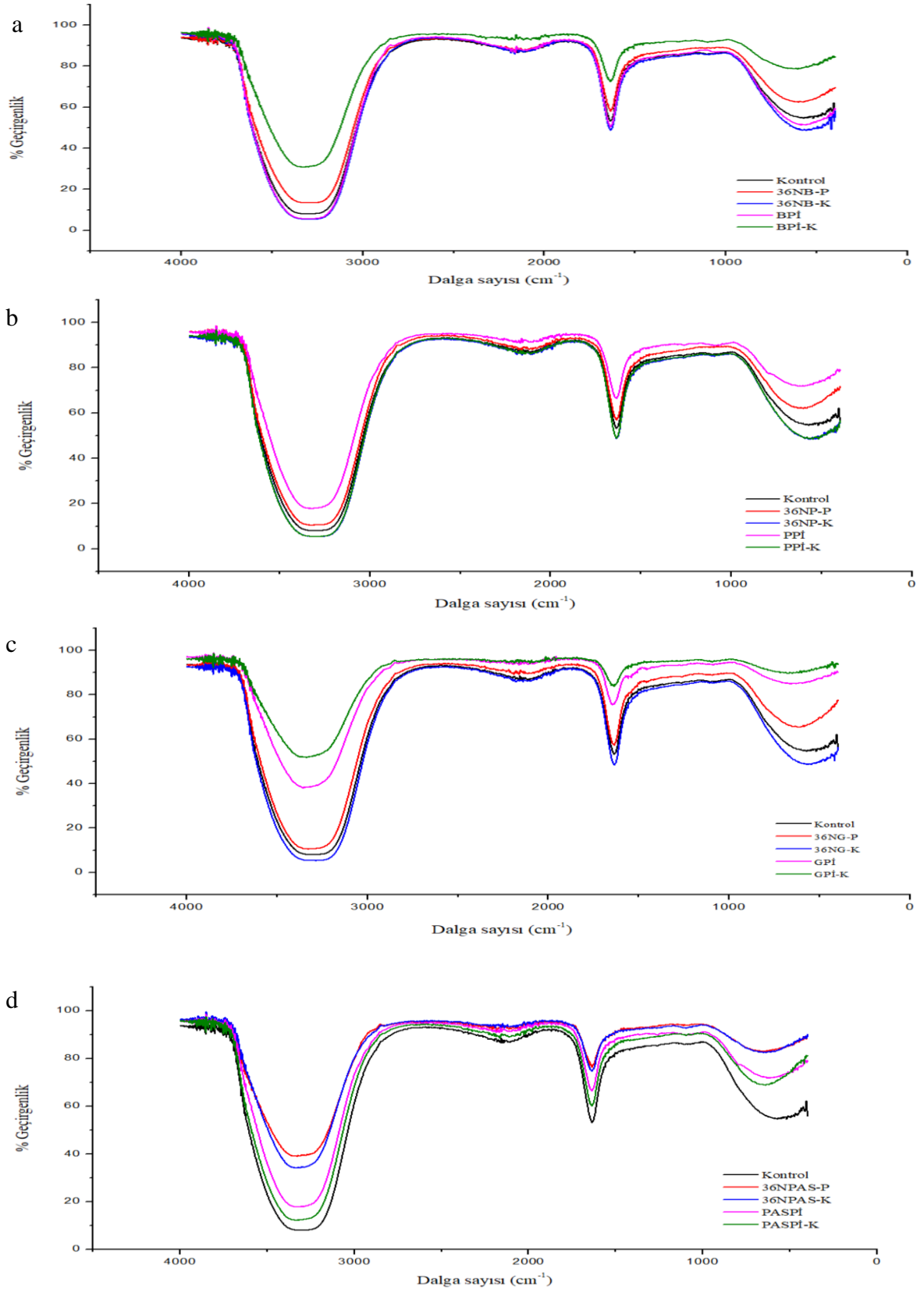
3300  $\text{cm}^{-1}$  civarında görülen güçlü ve geniş absorpsiyon bandı, antosiyanin pigmentinin proteinler ile alkolik hidroksil gruplarını içeren -OH'nin gerilme titreşimine atfedilmiştir. 1600  $\text{cm}^{-1}$  bandındaki spektrumun ise benzen halkası titreşiminden kaynaklandığı düşünülmektedir (Chen ve ark., 2022).

Şekil 17c ve 17d'de ise 3000-3400 $\text{cm}^{-1}$  (OH gerilmesi) ve 1600-1680  $\text{cm}^{-1}$  (C=O gerilmesi) dalga boyu aralığında daha geniş pikler gözlenmiştir. Bunun yanında 600-1000  $\text{cm}^{-1}$  (C=C gerilmesi) civarında da pik meydana gelmiştir (Saidji ve ark., 2023).



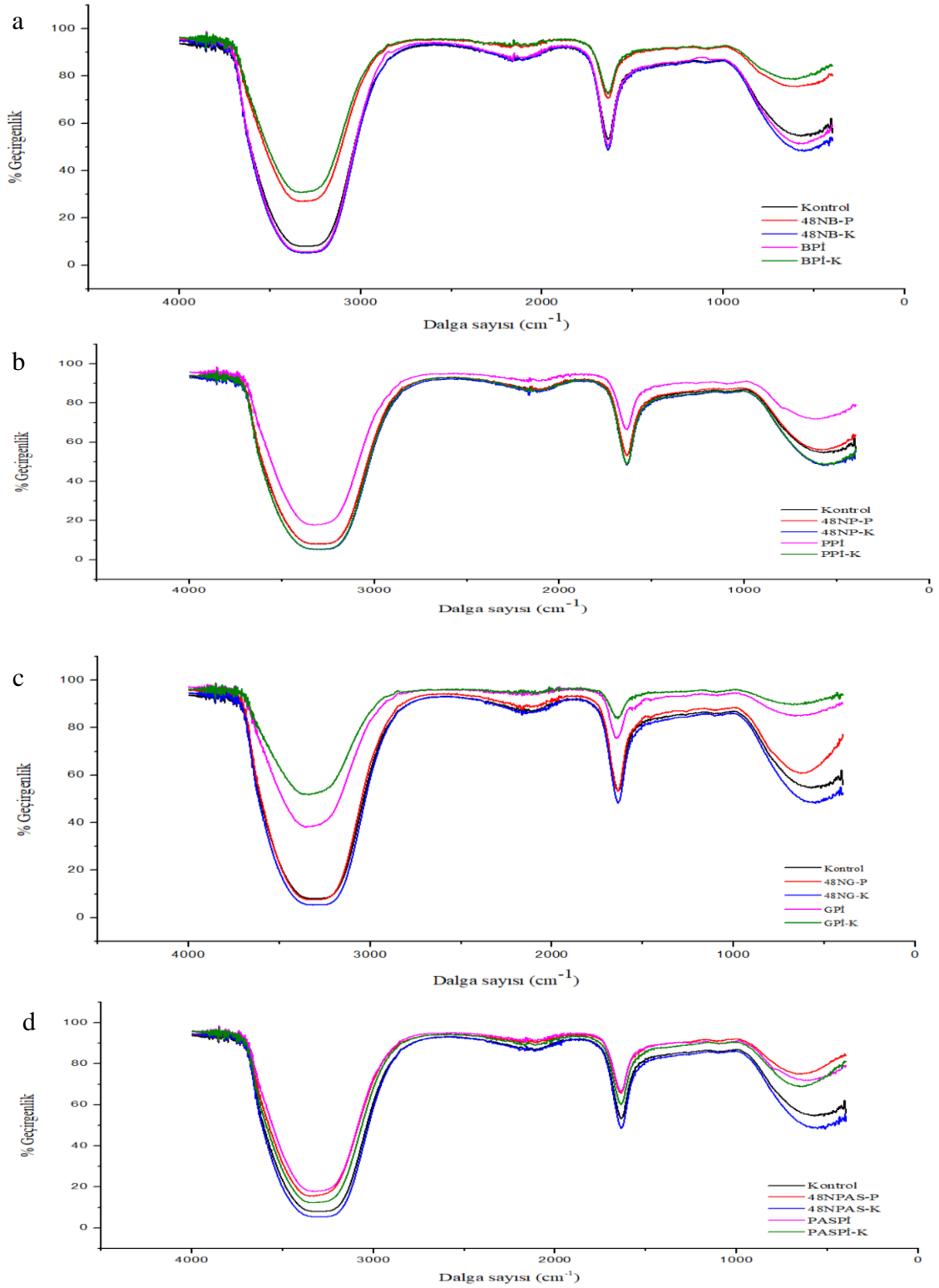
**Şekil 4.17.** 24 saatlik ısıtma sonucu üretilen düz nanofibrile (a) bezelye protein izolatu, (b) pirinç protein izolatu, (c) gluten ve (d) peynir altı suyu proteini ile kopigmente edilen örneklerin kontrol ve protein izolatu örnekleriyle karşılaştırmalı FTIR spektrumları. Kontrol (kopigmentasyon ajanı yerine saf su kullanılarak hazırlanan hibiskus ekstraktı), 24NB-P (24 saat nanofibrilasyona tabi tutulan düz bezelye nanofibrili), 24NB-K (24 saat nanofibrilasyona tabi tutulan düz bezelye nanofibrili ile kopigmente edilen hibiskus ekstraktı), BPİ (bezelye protein izolatu) ve BPİ-K (Bezelye protein izolatu ile kopigmente edilen hibiskus ekstraktı), 24NP-P (24 saat nanofibrilasyona tabi tutulan düz pirinç nanofibrili), 24NP-K (24 saat nanofibrilasyona tabi tutulan düz pirinç nanofibrili ile kopigmente edilen hibiskus ekstraktı), PPİ (pirinç protein izolatu) ve PPİ-K (pirinç protein izolatu ile kopigmente edilen hibiskus ekstraktı), 24NG-P (24 saat nanofibrilasyona tabi tutulan düz gluten nanofibrili), 24NG-K (24 saat nanofibrilasyona tabi tutulan düz gluten nanofibrili ile kopigmente edilen hibiskus ekstraktı), GPİ (gluten) ve GPİ-K (gluten ile kopigmente edilen hibiskus ekstraktı), 24NPAS-P (24 saat nanofibrilasyona tabi tutulan düz peynir altı suyu nanofibrili), 24NPAS-K (24 saat nanofibrilasyona tabi tutulan düz peynir altı suyu nanofibrili ile kopigmente edilen hibiskus ekstraktı), PASPİ (peynir altı suyu protein izolatu) ve PASPİ-K (peynir altı suyu protein izolatu ile kopigmente edilen hibiskus ekstraktı)

Şekil 4.18a'da kontrol, 36NB-P, 36NB-K, BPI VE BPI-K sırasıyla 3287, 3289, 3302, 3300, 3304  $\text{cm}^{-1}$  absorpsiyonlarında spektrum vermiştir. Bu da nanofibrile protein-antosiyenin arasında O-H gerilmesine bağlı bir bağlanma gerçekleştiğini göstermektedir. Aynı zamanda doğal protein izolatu olan BPI 3300  $\text{cm}^{-1}$ 'de pik gösterirken, 3287  $\text{cm}^{-1}$ 'e (36NB-P) bir kayma gözlenmiştir. Bu kayma, gerilme titreşimlerinin sıklığını azaltan NH gerilmesine atfedilmektedir (Gong ve ark., 2016). Kopigmentasyona tabi tutulan örnek (36NP-K) 3000-3400  $\text{cm}^{-1}$  aralığında nanofibrile proteine (36NB-P) oranla daha yüksek bir dalga boyuna sahiptir. Bu değişim, protein yapısındaki  $\beta$ -plaka içeriğinin azaldığı anlamına gelmektedir. Doğal ve denatüre proteinlere antosiyenin eklenmesinin  $\beta$ -plaka yapılarında azalma sağladığını ve bu nedenle antosiyeninlerin  $\beta$ -plaka yapıları arasındaki hidrojen bağlarını bozarak burada tutulduğu düşünülmektedir (Shih ve ark., 2011). Siyah pirinç antosiyeninleri ile ipek nanofibrillerinin kopigmente edildiği bir çalışmada benzer sonuçlar elde edilmiştir (Ma ve Jing, 2020). Bunun yanında 2000-2200  $\text{cm}^{-1}$  ve 1600-1650  $\text{cm}^{-1}$  pikler izlenmiştir. 2000-2200  $\text{cm}^{-1}$  arasındaki pikler antosiyenin-düz bezelye nanofibrili arasında oluşan N-H gerilimine, 1600-1650  $\text{cm}^{-1}$  arasındaki pikler ise C=O (karbonil) bağlarını göstermektedir (Saidji ve ark., 2023). Şekil 4.18b, c ve d'de de yukarıda bahsedildiği gibi 3000-3500  $\text{cm}^{-1}$  (-OH gerilimi) ve 1600-1650 (C=O gerilimi)  $\text{cm}^{-1}$  dalga boylarında pikler gözlenmiştir. Ayrıca spektrum alanı dar olmakla birlikte 2000-2200 (N-H gerilimi)  $\text{cm}^{-1}$  ve 600-1000  $\text{cm}^{-1}$  (C=C gerilimi) aralığında pikler izlenmektedir (Tan ve ark., 2023).



**Şekil 4.18.** 36 saatlik ısıtma sonucu üretilen düz nanofibrile (a) bezelye protein izolatu, (b) pirinç protein izolatu, (c) gluten ve (d) peynir altı suyu proteini ile kopigmente edilen örneklerin kontrol ve protein izolatu örnekleriyle karşılaştırmalı FTIR spektrumları 36NB-P (36 saat nanofibrilasyona tabi tutulan düz bezelye nanofibrili), 36NB-K (36 saat nanofibrilasyona tabi tutulan düz bezelye nanofibrili ile kopigmente edilen hibiskus ekstraktı), 36NP-P (36 saat nanofibrilasyona tabi tutulan düz pirinç nanofibrili), 36NP-K (36 saat nanofibrilasyona tabi tutulan düz pirinç nanofibrili ile kopigmente edilen hibiskus ekstraktı), 36NG-P (36 saat nanofibrilasyona tabi tutulan düz gluten nanofibrili), 36NG-K (36 saat nanofibrilasyona tabi tutulan düz gluten nanofibrili ile kopigmente edilen hibiskus ekstraktı), 36NPAS-P (36 saat nanofibrilasyona tabi tutulan düz peynir altı suyu nanofibrili ile kopigmente edilen hibiskus ekstraktı), 36NPAS-K (36 saat nanofibrilasyona tabi tutulan düz peynir altı suyu nanofibrili ile kopigmente edilen hibiskus ekstraktı)

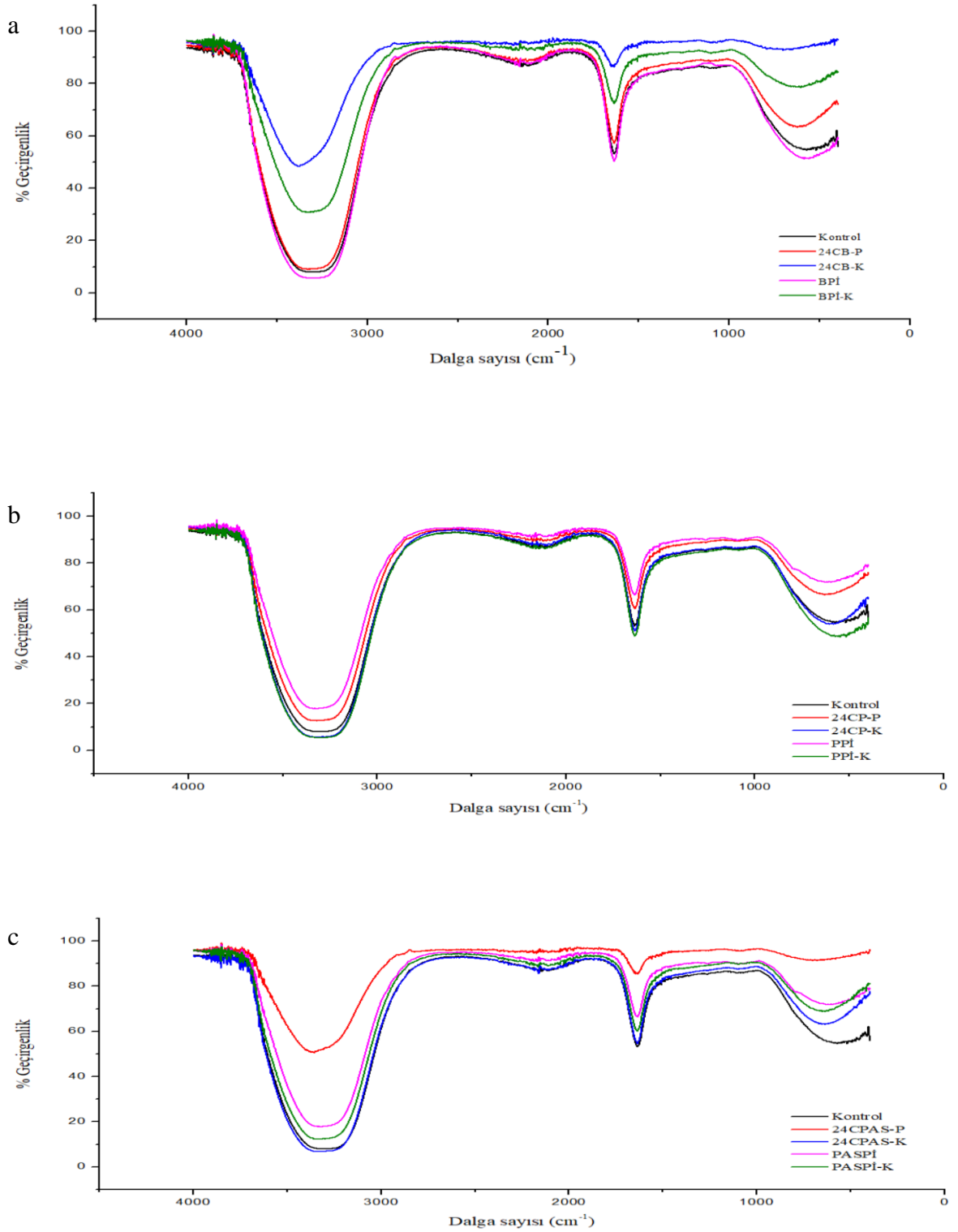
Şekil 4.19 a,b,c ve d'de 48 saat nanofibrilasyona tabi tutulmuş düz nanofibrile proteinlerin FTIR grafikleri verilmiştir. Grafikler incelendiğinde, 3000-3500  $\text{cm}^{-1}$  (-OH gerilimi) ve 1600-1650 (C=O gerilimi)  $\text{cm}^{-1}$  dalga boylarında büyük pikler görülürken, 2000-2200 (N-H gerilimi)  $\text{cm}^{-1}$  ve 600-1000  $\text{cm}^{-1}$  (C=C gerilimi) aralığında da bazı dalgalanmalar meydana gelmiştir. 48NB-P örneği 3290  $\text{cm}^{-1}$ 'de pik verirken, 48NB-K örneğinde 3296  $\text{cm}^{-1}$ 'e bir kayma meydana gelmiştir (Şekil 4.13a). Bu kaymanın antosiyanin ve kopigment arasında meydana gelen -OH gerilmelerinden kaynaklandığı düşünülmekte olup, benzer bulgular farklı çalışmalarda da bildirilmiştir (Chen ve ark., 2022; Kalantari ve ark., 2021; Khalifa ve ark., 2018). Ayrıca BPİ 1638  $\text{cm}^{-1}$ 'de, 48NB-P ise 1630  $\text{cm}^{-1}$  de pik gözlenmiştir. Bu kaymanın proteinin ikincil yapısında meydana gelen değişikliklerden kaynaklandığı düşünülmektedir (He ve ark., 2016c). 48NP-P örneği 3301  $\text{cm}^{-1}$  ve 1632  $\text{cm}^{-1}$ 'de, 48NP-K ise 3304  $\text{cm}^{-1}$  ve 1638  $\text{cm}^{-1}$ 'de pik vermiştir (Şekil 4.13b). Bu nedenle kopigmentasyon sırasında düz nanofibrile pirinç proteini ile hibiskus antosiyaninleri arasında bağlanmalar meydana geldiği düşünülmektedir. 1600  $\text{cm}^{-1}$  civarında oluşan kaymalar C=O ve C=N, 3000  $\text{cm}^{-1}$  civarında görülen kaymalar ise hidroksi gruplarının oluştuğunu göstermektedir (Maylinda ve ark., 2019). Proteinlerin ikincil yapılarında C=O ve C-N esneme titreşimlerinde değişiklik olduğu da anlaşılmaktadır (Figuroa-González ve ark., 2022). 48NPAS-P örneği 3312  $\text{cm}^{-1}$ 'de pik verirken, PASPİ ise 3305  $\text{cm}^{-1}$  de pik vermiştir (Şekil 4.13d). Bunun nedeni  $\alpha$ -heliks ve  $\beta$ -plaka yapılarında meydana gelen değişimler olabilir (Yang ve ark., 2015).



**Şekil 4.19.** 48 saatlik ısıtma sonucu üretilen düz nanofibrile (a) bezelye protein izolatu, (b) pirinç protein izolatu, (c) gluten ve (d) peynir altı suyu proteini ile kopigmente edilen örneklerin kontrol ve protein izolatu örnekleriyle karşılaştırmalı FTIR spektrumları 48NB-P (48 saat nanofibrilasyona tabi tutulan düz bezelye nanofibrili), 48NB-K (48 saat nanofibrilasyona tabi tutulan düz bezelye nanofibrili ile kopigmente edilen hibiskus ekstraktı), 48NP-P (48 saat nanofibrilasyona tabi tutulan düz pirinç nanofibrili), 48NP-K (48 saat nanofibrilasyona tabi tutulan düz pirinç nanofibrili ile kopigmente edilen hibiskus ekstraktı), 48NG-P (48 saat nanofibrilasyona tabi tutulan düz gluten nanofibrili), 48NG-K (48 saat nanofibrilasyona tabi tutulan düz gluten nanofibrili ile kopigmente edilen hibiskus ekstraktı), 48NPAS-P (48 saat nanofibrilasyona tabi tutulan düz peynir altı suyu nanofibrili ile kopigmente edilen hibiskus ekstraktı), 48NPAS-K (48 saat nanofibrilasyona tabi tutulan düz peynir altı suyu nanofibrili ile kopigmente edilen hibiskus ekstraktı).

Aynı protein izolatında ısıtma süresinin değiştirilmesi kopigmentasyon etkinliği üzerinde önemli bir etkiye neden olmasa da kurveyi kaydırmada ufak farklar görülmektedir. Düz bezelye nanofibrilleriyle ile kopigmente edilen örnekler; 24NB-K 3294  $\text{cm}^{-1}$ , 36NB-K 3302  $\text{cm}^{-1}$ , 48NB-K 3296  $\text{cm}^{-1}$ , düz pirinç nanofibrilleriyle kopigmente edilen örnekler; 24NP-K 3325  $\text{cm}^{-1}$ , 36NP-K 3308  $\text{cm}^{-1}$ , 48NP-K 3304  $\text{cm}^{-1}$ , düz gluten nanofibrilleriyle kopigmente edilen örnekler; 24NG-K 3304  $\text{cm}^{-1}$ , 36NG-K 3286  $\text{cm}^{-1}$ , 48NG-K 3282  $\text{cm}^{-1}$ , 24NPAS-K 3318  $\text{cm}^{-1}$ , 36NPAS-K 3313  $\text{cm}^{-1}$  ve 48NPAS-K 3301  $\text{cm}^{-1}$  değerlerine sahiptir. Bezelye örneklerinde en yüksek kayma 36 saatlik fibrilasyonda, pirinç, gluten ve peynir altı suyu örneklerinde 24 saatlik fibrilasyonda görülmektedir. Farklı protein izolatları birbiri ile karşılaştırıldığında 24 saat fibrilasyona tabi tutulan örneklerden en yüksek kayma değerine sahip olan 24NP-K, 36 saat fibrilasyona tabi tutulanlarda 36NPAS-K, 48 saat fibrilasyona tabi tutulanlarda ise 48NPAS-K olduğu görülmektedir.

Doğal protein izolatı ve nanofibrile proteinlerle kopigmente edilen örnekler sistematik olarak karşılaştırıldığında grafiklerin her birinde kayma meydana geldiği görülmektedir. 24NB-K 3294  $\text{cm}^{-1}$ , 24NB-P 3291  $\text{cm}^{-1}$ ; 36NB-K 3302  $\text{cm}^{-1}$ , 36NB-P 3294  $\text{cm}^{-1}$ ; 48NB-K 3296  $\text{cm}^{-1}$ , 48NB-P 3313  $\text{cm}^{-1}$ ; 24NP-K 3325  $\text{cm}^{-1}$ , 24NP-P 3313  $\text{cm}^{-1}$ ; 36NP-K 3308  $\text{cm}^{-1}$ , 36NP-P 3307  $\text{cm}^{-1}$ ; 48NP-K 3304  $\text{cm}^{-1}$ , 48NP-P 3314  $\text{cm}^{-1}$ ; 24NG-K 3304  $\text{cm}^{-1}$ , 24NG-P 3302  $\text{cm}^{-1}$ ; 36NG-K 3286  $\text{cm}^{-1}$ , 36NG-P 3311  $\text{cm}^{-1}$ ; 48NG-K 3282  $\text{cm}^{-1}$ , 48NG-P 3303  $\text{cm}^{-1}$ ; 24NPAS-K 3318  $\text{cm}^{-1}$ , 24NPAS-P 3307  $\text{cm}^{-1}$ ; 36NPAS-K 3313  $\text{cm}^{-1}$ , 36NPAS-P 3315  $\text{cm}^{-1}$ ; 48NPAS-K 3301  $\text{cm}^{-1}$ , 48NPAS-P 3328  $\text{cm}^{-1}$  olduğu grafiklerden okunmuştur. Düz nanofibrillerle kopigmente edilen örneklerde antosiyanin-protein arasındaki bağlanma şiddetinin arttığını ve hidroksil geriliminin meydana geldiğini göstermektedir. Yapılan bir çalışmada pik noktasındaki kaymanın oluşan H bağları nedeniyle meydana geldiği bildirilmiştir (Kanha ve ark., 2020). Başka bir çalışmada peynir altı suyu proteini ile dut antosiyaninlerinin kopigmentasyonu ile her bir amidin FTIR zirvesi hafifçe hareket etmiştir ve bunun dut antosiyaninleri-peynir altı suyu proteini arasındaki birleşmeyi gösterdiği bildirilmiştir (Khalifa ve ark., 2018). Bant yoğunluğunun artması antosiyanin stabilizasyonunu arttırdığına inanılan daha fazla hidrojen bağlı OH grubunun varlığını göstermektedir (Tan ve ark., 2023).



**Şekil 4.20.** 24 saatlik ısıtma sonucu üretilen kıvrımlı nanofibrile (a) bezelye protein izolatu, (b) pirinç protein izolatu, (c) peynir altı suyu proteini ile kopigmente edilen örneklerin kontrol ve protein izolatu örnekleriyle karşılaştırmalı FTIR spektrumları

24CB-P (24 saat nanofibrilasyona tabi tutulan kıvrımlı bezelye nanofibrili), 24CB-K (24 saat nanofibrilasyona tabi tutulan kıvrımlı bezelye nanofibrili ile kopigmente edilen hibiskus ekstraktı), BPI ve BPI-K, 24CP-P (24 saat nanofibrilasyona tabi tutulan kıvrımlı pirinç nanofibrili), 24CP-K (24 saat nanofibrilasyona tabi tutulan kıvrımlı pirinç nanofibrili ile kopigmente edilen hibiskus ekstraktı), PPI ve PPI-K, 24CPAS-P (24 saat nanofibrilasyona tabi tutulan kıvrımlı peynir altı suyu nanofibrili), 24CPAS-K (24 saat nanofibrilasyona tabi tutulan kıvrımlı peynir altı suyu nanofibrili ile kopigmente edilen hibiskus ekstraktı).

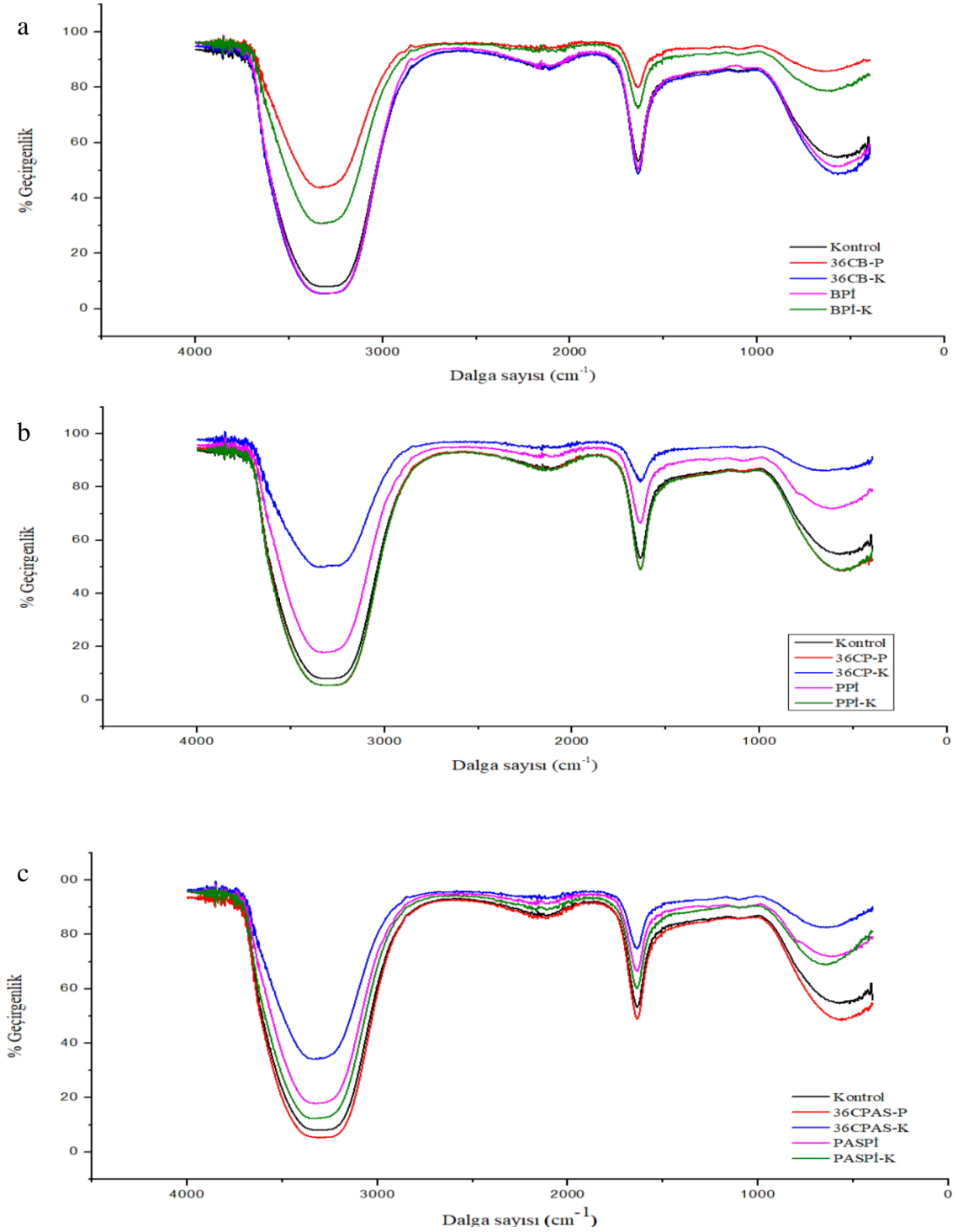
Şekil 4.20, 4.21 ve 4.22 toplu olarak incelendiğinde düz nanofibrile proteinlerin FTIR spektrumunda görülenle benzer şekilde 3000-3500  $\text{cm}^{-1}$  (-OH gerilimi) ve 1600-1650  $\text{cm}^{-1}$  (C=O gerilimi) dalga boylarında büyük pikler görülürken, 2000-2200  $\text{cm}^{-1}$  (N-H gerilimi) ve 600-1000  $\text{cm}^{-1}$  (C=C gerilimi) aralığında da bazı dalgalanmalar meydana gelmiştir. Şekil 4.14.a'da kontrol 3287  $\text{cm}^{-1}$ , 24CB-P 3296  $\text{cm}^{-1}$ , 24CB-K ise 3358  $\text{cm}^{-1}$ 'de en yüksek piki vermiştir. Görüldüğü gibi tek başına antosiyanin ve kıvrımlı nanofibrile proteine kıyasla kopigmente edilen örneklerde büyük bir kayma meydana gelmiştir. Şekil 4.15.b'de kontrol, 36CP-P, 36CP-K, PPI, PPI-K sırasıyla, 3307, 3298, 3302, 3316, 3296  $\text{cm}^{-1}$  ve 1628, 1626, 1635, 1633, 1637  $\text{cm}^{-1}$ 'de pik vermişlerdir. Dolayısıyla, kopigmentasyon ile bantlarda bir kayma meydana gelmektedir. Bu durum protein ve antosiyanin arasında oluşan hidroksil bağlarından kaynaklanmaktadır (Dai ve ark., 2016).

Özellikle proteinlerin yapısında meydana gelen konformasyonel değişimleri incelemek amacıyla 1600-1700  $\text{cm}^{-1}$  arası bölgeye bakılmaktadır. Genel olarak proteinlerin titreşim spektrumları amid I (1600–1700  $\text{cm}^{-1}$ ) ve amid II (1480–1600  $\text{cm}^{-1}$ ) olmak üzere iki ana bölge ile karakterize edilmektedir. Bunlar sırasıyla C=O ve NH /CH gerilmesine karşılık gelmektedir. Amid I bölgesi, proteinlerin ikincil yapısını karakterize etmek için kullanılmaktadır. Moleküller arası  $\beta$ -plaka (1610–1625  $\text{cm}^{-1}$ ), doğal  $\beta$ -plaka (1625–1635  $\text{cm}^{-1}$ ), rastgele bobin/ $\alpha$ - sarmal (1635–1665  $\text{cm}^{-1}$ ),  $\beta$  dönüşü (1665–1690  $\text{cm}^{-1}$ ) ve antiparalel amiloid  $\beta$  tabakaları (1690–1705  $\text{cm}^{-1}$ ) pik aralıklarında gözlenmektedir (Aggarwal ve ark., 2021). Burada doğal protein izolatları ve kıvrımlı nanofibriller karşılaştırıldığında, BPI 1636  $\text{cm}^{-1}$  iken, 24CB-P 1639, 36CB-P 1652, 48CB-P 1659  $\text{cm}^{-1}$ 'de; PPI 1635  $\text{cm}^{-1}$ , 24CP-P 1638  $\text{cm}^{-1}$ , 36CP-P 1637  $\text{cm}^{-1}$ , 48CP-P 1644  $\text{cm}^{-1}$  de; PASPI 1611  $\text{cm}^{-1}$ , 24CPAS-P 1632  $\text{cm}^{-1}$ , 36CPAS-P 1635  $\text{cm}^{-1}$ , 48CPAS-P 1634  $\text{cm}^{-1}$ 'de pik vermiştir. Nanofibrilasyon ile proteinlerin absorbanlarında pozitif yönde bir artış meydana getirmiştir. Bu durum ikincil yapıların C=O ve C-N esneme titreşimlerindeki değişikliği ortaya çıkarmıştır (Figueroa-González ve ark., 2022). Ayrıca nanofibrilasyon işlemi ile  $\alpha$ -heliks yapılarının azalması, antosiyaninler ile açil etkileşimin gerçekleştiği  $\beta$ -plaka yapılarının artması da pik kaymasının nedenleri arasında gösterilmektedir (Chen ve ark., 2019; He ve ark., 2016a). Attaribo ve ark. (2020) çalışmalarında antosiyaninle kopigmente ettikleri önceden ısıtılmış ipekböceği pupa proteininin ısıtılmamış olana oranla FTIR spektrumunda pozitif yönde bir kayma olduğunu ve bunun protein yapısının  $\alpha$ -sarmal içeriğinde bir azalmaya işaret ettiğini bildirmişlerdir.

Kıvrımlı bezelye nanofibrilleriyle ile kopigmente edilen örnekler; 24CB-K 3395  $\text{cm}^{-1}$ , 36CB-K 3327  $\text{cm}^{-1}$ , 48CB-K 3382  $\text{cm}^{-1}$ , düz pirinç nanofibrilleriyle kopigmente edilen örnekler; 24CP-K 3294  $\text{cm}^{-1}$ , 36CP-K 3350  $\text{cm}^{-1}$ , 48CP-K 3315  $\text{cm}^{-1}$ , kıvrımlı peynir altı suyu proteinleriyle kopigmente edilen örnekler; 24CPAS-K 3335  $\text{cm}^{-1}$ , 36CPAS-K 3329  $\text{cm}^{-1}$  ve 48CPAS-K 3305  $\text{cm}^{-1}$  değerlerine sahiptir. Bezelye ve peynir altı suyu örneklerinde en yüksek kayma 24 saatlik fibrilasyonda, pirinç örneklerinde 36 saatlik fibrilasyonda görülmektedir. Farklı protein izolatları birbiri ile karşılaştırıldığında 24 saat fibrilasyona tabi tutulan örneklerden en yüksek kayma değerine sahip olan 24CB-K, 36 saat fibrilasyona tabi tutulanlarda 36CP-K, 48 saat fibrilasyona tabi tutulanlarda ise 48CB-K olduğu görülmektedir.

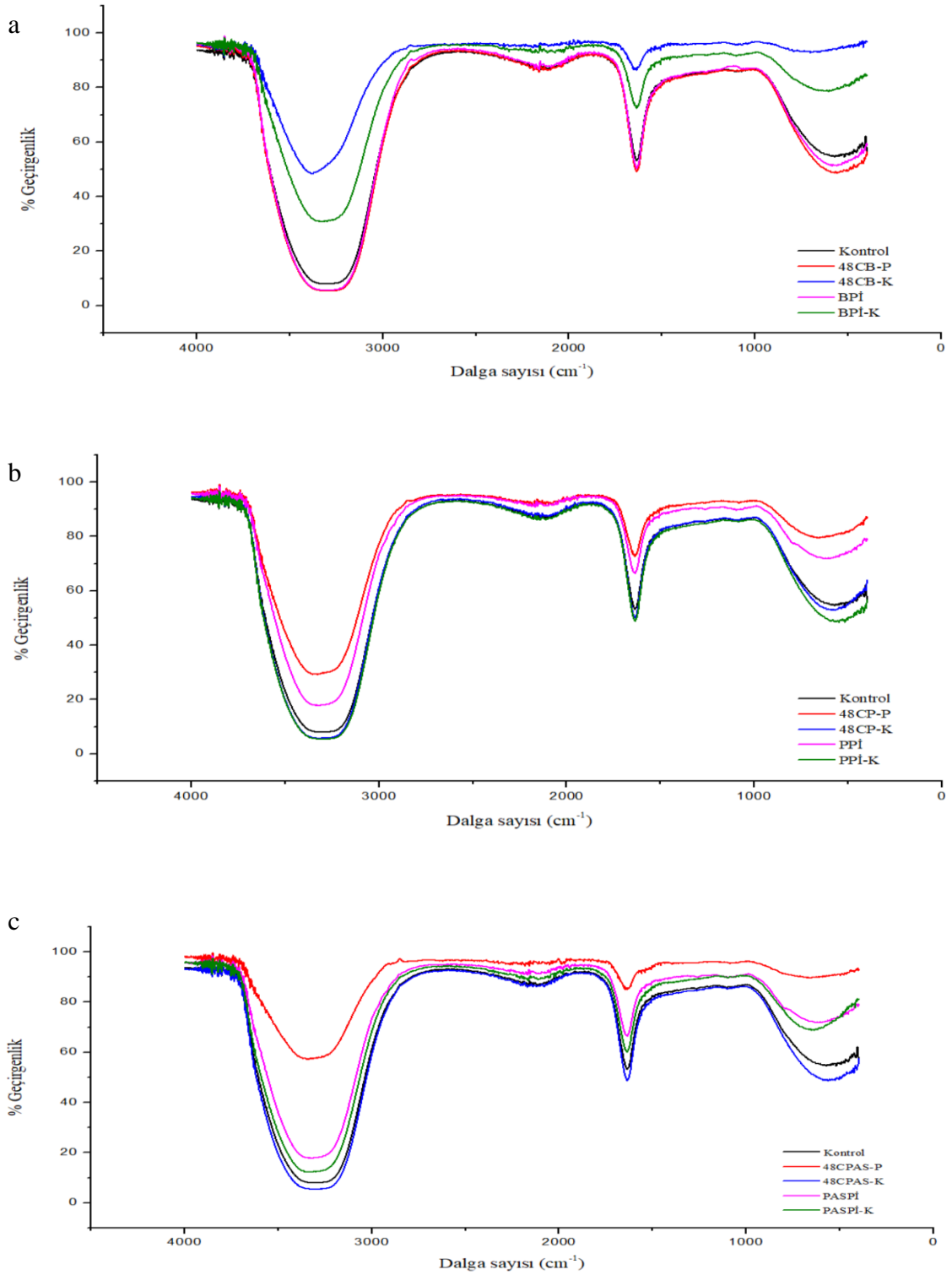
Doğal protein izolatu ve kıvrımlı nanofibrile proteinlerle kopigmente edilen örnekler sistematik olarak karşılaştırıldığında grafiklerin her birinde kayma meydana geldiği görülmektedir. Pik noktasındaki kaymadan anlaşılacağı üzere proteinlerin nanofibrile edilmesiyle güçlü hidrojen bağlı  $\beta$ -tabaka içeriğinde artış kısaca antosiyanin-protein bağlarında yoğunlaşma meydana gelmektedir (Tan ve ark., 2023).

Düz ve kıvrımlı bezelye nanofibrilleriyle kopigmente edilen örnekler kıyaslandığında kıvrımlı nanofibriller 24, 36 ve 48 saatlik fibrilasyon sürelerinden daha iyi bir pik kayması gösterip antosiyanin-protein bağlanmasının daha yoğun olduğu belirlenmiştir. Pirinç proteinlerine bakıldığında 24 saatlik fibrilasyon süresinde düz nanofibriller daha iyi sonuç verirken, 36 ve 48 saatlik fibrilasyonda kıvrımlı nanofibriller daha yüksek bir kayma meydana getirmiştir. Düz ve kıvrımlı peynir altı suyu nanofibrilleriyle kopigmente edilen örnekler kıyaslandığında bezelye proteininde olduğu gibi tüm fibrilasyon sürelerinde kıvrımlı nanofibriller daha iyi sonuç vermiştir. Genel olarak bakıldığında tuz çözeltisi kullanılarak hazırlanan kıvrımlı protein nanofibrilleri düz nanofibrillerden daha iyi sonuç vermiştir. Yapılan çalışmalarla kıvrımlı fibrillerin düz fibrillere göre daha iyi bir çapraz  $\beta$  yapısıyla paketlenmiş ve güçlü hidrojen bağı ağıyla birbirine bağlanmış yüksek  $\beta$ -tabaka içeriğine sahip olduğunu bildirmektedir. Protein çözeltisine NaCl eklenmesi ile fibrilasyon sürecinin hızı ve fibrillerin verimi önemli ölçüde hızlandırılmaktadır (Loveday ve ark., 2012; Moayedzadeh ve Madadlou, 2015; Nicolai ve Durand, 2013). Loveday ve ark. (2012) NaCl varlığında oluşan fibrillerin sıfır iyonik güçte oluşlarından daha kısa ve daha esnek olduğunu göstermiştir.



**Şekil 4.21.** 36 saatlik ısıtma sonucu üretilen kıvrımlı nanofibrile (a) bezelye protein izolatu, (b) pirinç protein izolatu, (c) peynir altı suyu proteini ile kopigmente edilen örneklerin kontrol ve protein izolatu örnekleriyle karşılaştırmalı FTIR spektrumları

36CB-P (36 saat nanofibrilasyona tabi tutulan kıvrımlı bezelye nanofibrili), 36CB-K (36 saat nanofibrilasyona tabi tutulan kıvrımlı bezelye nanofibrili ile kopigmente edilen hibiskus ekstraktı), BPI ve BPI-K, 36CP-P (36 saat nanofibrilasyona tabi tutulan kıvrımlı pirinç nanofibrili), 24CP-K (36 saat nanofibrilasyona tabi tutulan kıvrımlı pirinç nanofibrili ile kopigmente edilen hibiskus ekstraktı), PPI ve PPI-K, 36CPAS-P (36 saat nanofibrilasyona tabi tutulan kıvrımlı peynir altı suyu nanofibrili), 36CPAS-K (36 saat nanofibrilasyona tabi tutulan kıvrımlı peynir altı suyu nanofibrili ile kopigmente edilen hibiskus ekstraktı).



**Şekil 4.22.** 48 saatlik ısıtma sonucu üretilen kıvrımlı nanofibrille (a) bezelye protein izolatu, (b) pirinç protein izolatu, (c) peynir altı suyu proteini ile kopigmente edilen örneklerin kontrol ve protein izolatu örnekleriyle karşılaştırmalı FTIR spektrumları

48CB-P (48 saat nanofibrilasyona tabi tutulan kıvrımlı bezelye nanofibrili), 36CB-K (48 saat nanofibrilasyona tabi tutulan kıvrımlı bezelye nanofibrili ile kopigmente edilen hibiskus ekstraktı), BPİ ve BPİ-K, 48CP-P (48 saat nanofibrilasyona tabi tutulan kıvrımlı pirinç nanofibrili), 24CP-K (48 saat nanofibrilasyona tabi tutulan kıvrımlı pirinç nanofibrili ile kopigmente edilen hibiskus ekstraktı), PPİ ve PPİ-K, 48CPAS-P (48 saat nanofibrilasyona tabi tutulan kıvrımlı peynir altı suyu nanofibrili), 48CPAS-K (48 saat nanofibrilasyona tabi tutulan kıvrımlı peynir altı suyu nanofibrili ile kopigmente edilen hibiskus ekstraktı).

#### 4.4. Floresans Spektrometre

Floresan spektroskopisi moleküller arasındaki etkileşimi incelemek için kullanılan bir spektrometrik analiz çeşididir. Analiz kopigmentasyon ajanlarının hibiskus antosiyaninleri ile etkileşimini incelemek amacıyla gerçekleştirilmiştir. Nanofibrile proteinler ile antosiyanin arasındaki etkileşimler uyarılma dalga boyu olarak 280 nm'de incelenmiştir (Zhang ve Zhong, 2012). Şekil 4.23-4.25 düz nanofibrile proteinlerle, Şekil 4.26-4.28 ise kıvrımlı nanofibrile proteinlerle kopigmente edilen örneklerdir. Grafikler incelendiğinde kopigmente örneklerin floresans yoğunluğu düz ve kıvrımlı nanofibrile proteinlere oranla çok düşüktür. Yani kopigmentasyon floresans yoğunluğunu oldukça fazla miktarda sönmüştür. Bu da iki molekül arasında (protein ve antosiyanin) güçlü bir etkileşim olduğunu göstermektedir (Zhang ve ark., 2020a).

Genel olarak doğal proteinler ve düz nanofibrile proteinlerin floresans yoğunluğu 100-1000 au arasında gözlenirken, kopigmente edilmiş örneklerin floresans yoğunluğu 3-5 arasına düşmüştür (Şekil 4.17-4.19). Bunun yanında nanofibrile proteinler doğal protein izolatlarına kıyasla, nanofibrile proteinlerle kopigmente edilen örnekler de doğal protein izolatları ile kopigmente edilen örnekler kıyasla daha yüksek floresans emisyonu sağlamıştır. Kıvrımlı nanofibrillerde de benzer şekilde floresans yoğunluğunda sönmeler meydana gelmiştir (Şekil 4.20-4.22).

Antosiyanin molekülünde aromatik grupların varlığı, doğal floresansını 320 nm civarında çok zayıf hale getirmektedir. Proteinler, ultraviyole ışığı absorbe etmelerini ve güçlü doğal floresans yaymalarını sağlayan fenilalanin, tirozin ve triptofan kalıntıları içermektedir. Başka bir deyişle; proteinler, esas olarak triptofan, tirozin ve fenilalanin kalıntılarının belirli bir uyarım dalga boyunda floresans üretebilmesi nedeniyle içsel floresans özelliklerine sahiptirler (Choi ve ark., 2019). Floresans azaldığında antosiyanin-protein kompleksinin stabilitesi artış göstermektedir. Bunun nedeni, antosiyaninler ve proteinler arasındaki etkileşimin, proteinlerin moleküler konformasyonunun değişimini teşvik etmesi, dolayısıyla floresans sinyalinin zayıflaması ve stabilitenin artması olarak düşünülmektedir (Jiang ve ark., 2019b). Bir çalışmada soya protein izolatu-antosiyanin komplekslerinde gözlenen floresans yoğunluğundaki azalma, soya protein izolatu ile antosiyaninler arasında güçlü bir etkileşimle açıklanmıştır. Bu çalışma bulgularına göre kopigmentasyon ile soya protein izolatlarının polipeptit zinciri açılmış ve yapısal değişiklikler meydana gelmiştir (Sui ve ark., 2018). Khalifa ve ark. (2018) dut antosiyaninini peynir altı suyu proteinleriyle kopigmente etmişlerdir. Peynir altı suyu

proteinlerinin 340 nm'de maksimum floresans absorpsiyonuna sahip olduğunu ve karşılık gelen floresans yoğunluğunun 2800 a.u olduğunu göstermiştir. Kopigmentasyondan sonra kompleksin floresans yoğunluğu 2200 a.u'ya düşmüştür. Sonuçlar, antosiyaninler ve proteinler arasındaki etkileşimin, proteinlerin floresan kromoforlarının mikro ortamını değiştirdiğini, bunun da ikincil yapıyı değiştirerek kompleksin stabilitesini arttırdığını göstermiştir. Zhang ve ark. (2018) ve Chen ve ark. (2019) farklı antosiyaninleri soya protein izolatu ile kopigmente etmiştir. Komplekslerin floresans yoğunlukları sırasıyla, 285'ten 45 a.u'ya ve 800'den 400 a.u'ya düşmüştür. Lang ve ark. (2019) sığır serum albümini ile yaban mersini antosiyanini kopigmente etmiştir. Floresans spektroskopisi ile kompleksin yaban mersini antosiyanininin eklenmesinden önce ve sonra floresans yoğunlukları sırasıyla 700 ve 350 a.u olarak bulunmuştur. Yapılan başka bir çalışmada sığır laktoferrin peptitleri ve antosiyanin arasında meydana gelen bağlanma reaksiyonunu incelemek amacıyla floresans spektroskopisi analizi gerçekleştirilmiştir ve sığır laktoferrin peptitleri ile bağlandıktan sonra kompleksin floresansı 800 a.u. değerinden 300 a.u değerine sönümlenmiştir (Condurache ve ark., 2020). Mor patates antosiyaninlerinin kazein ve peynir altı suyu proteinleri ile kopigmente edildiği bir çalışmada antosiyanin konsantrasyonu arttıkça floresans yoğunluğunda azalma meydana geldiği bildirilmiştir (Gong ve ark., 2021b). Ma ve Jing (2020), doğal ve nanofibrile ipek proteinleri ile siyah pirinç antosiyaninlerini kopigmente etmiş ve kopigmentasyonla birlikte floresans yoğunluğunun oldukça azaldığını ortaya koymuştur ve antosiyaninlerin proteinlerin konformasyonel yapısını etkileyerek sönümlenme sağladığını belirtmişlerdir. Bu sonuçlar, antosiyaninler ve proteinler arasındaki etkileşimin, proteinlerin mikro ortamını değiştirdiğini ve bunun da floresans yoğunluğunu azaltıp ve kompleksin stabilitesini arttırdığını göstermiştir (Li ve ark., 2021d). Zang ve ark. (2021) peynir altı suyu proteini izolatu ve yaban mersini antosiyaninleri arasındaki etkileşimin, hidrojen bağları yoluyla hidrofobik kuvvetler tarafından meydana geldiğini bildirmiştir. Protein ve antosiyaninler arasındaki etkileşim, proteinin ikincil yapısını değiştirerek bağlanma afinitesini iyileştirebilmekte ve böylece antosiyaninlerin stabilitesini etkili bir şekilde koruyabilmektedir.

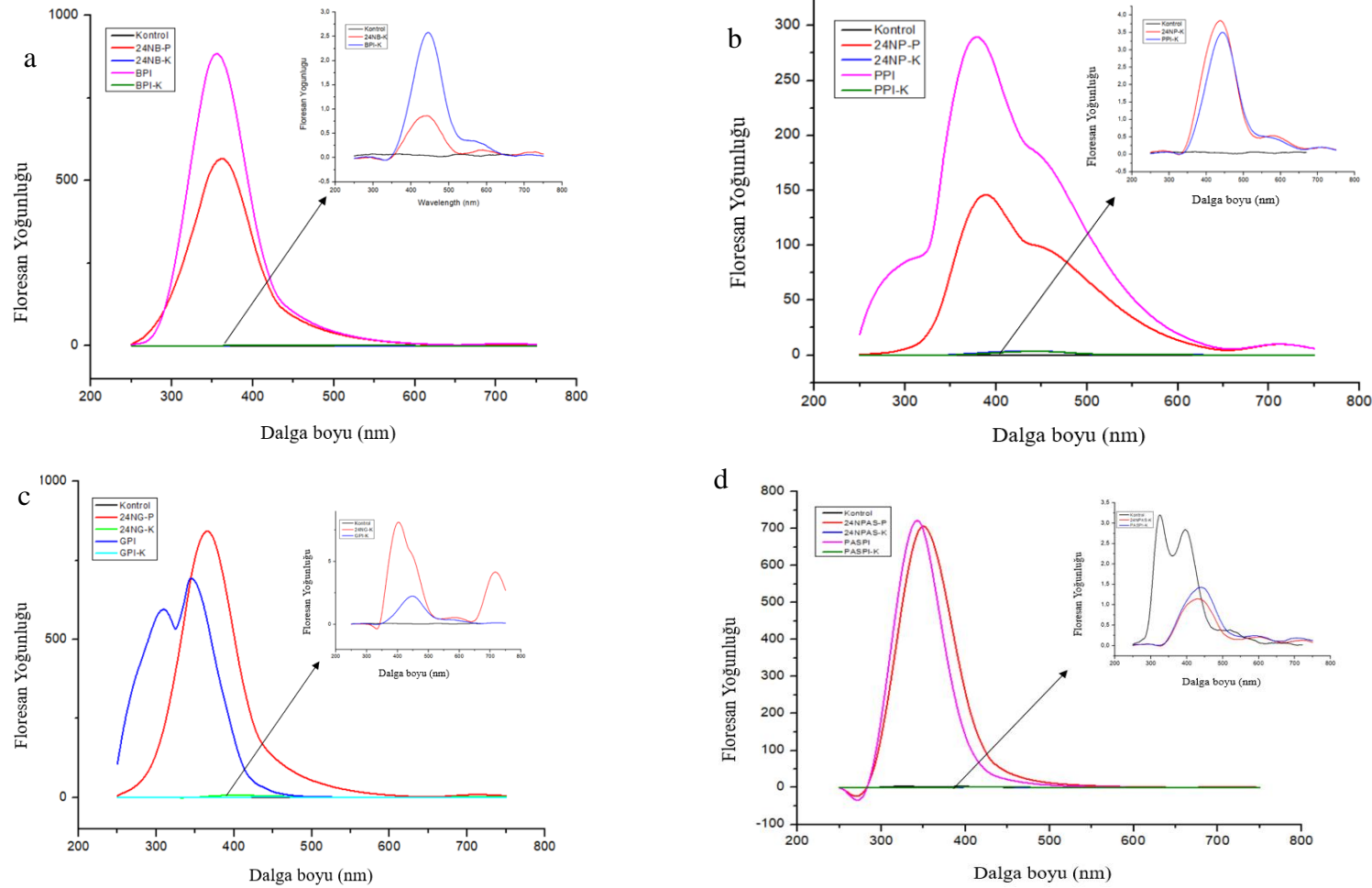
Yapılan bir çalışmada peynir altı suyu proteini izolatu-polifenol komplekslerinde floresan yoğunluğu belirgin şekilde azalmıştır. Bu bulgular, polifenollerin bağlanmasının proteinin üçüncül yapısında bir değişikliğe neden olduğunu göstermektedir. Özellikle, kırmızıya kaymış maksimum emisyon dalga boyu, proteinlerdeki triptofan kalıntılarının polifenollerle reaksiyonundan sonra daha hidrofilik bir ortama maruz kaldığını

göstermektedir. Polifenol eklenmesi ile triptofan kalıntıları açığa çıkmakta ve bu durum proteinlerin açılmasına neden olarak floresan yoğunluğunda bir azalmaya ve maksimum emisyon tepe noktasının kırmızıya kaymasına sebep olmaktadır. (Kristo ve ark., 2012).

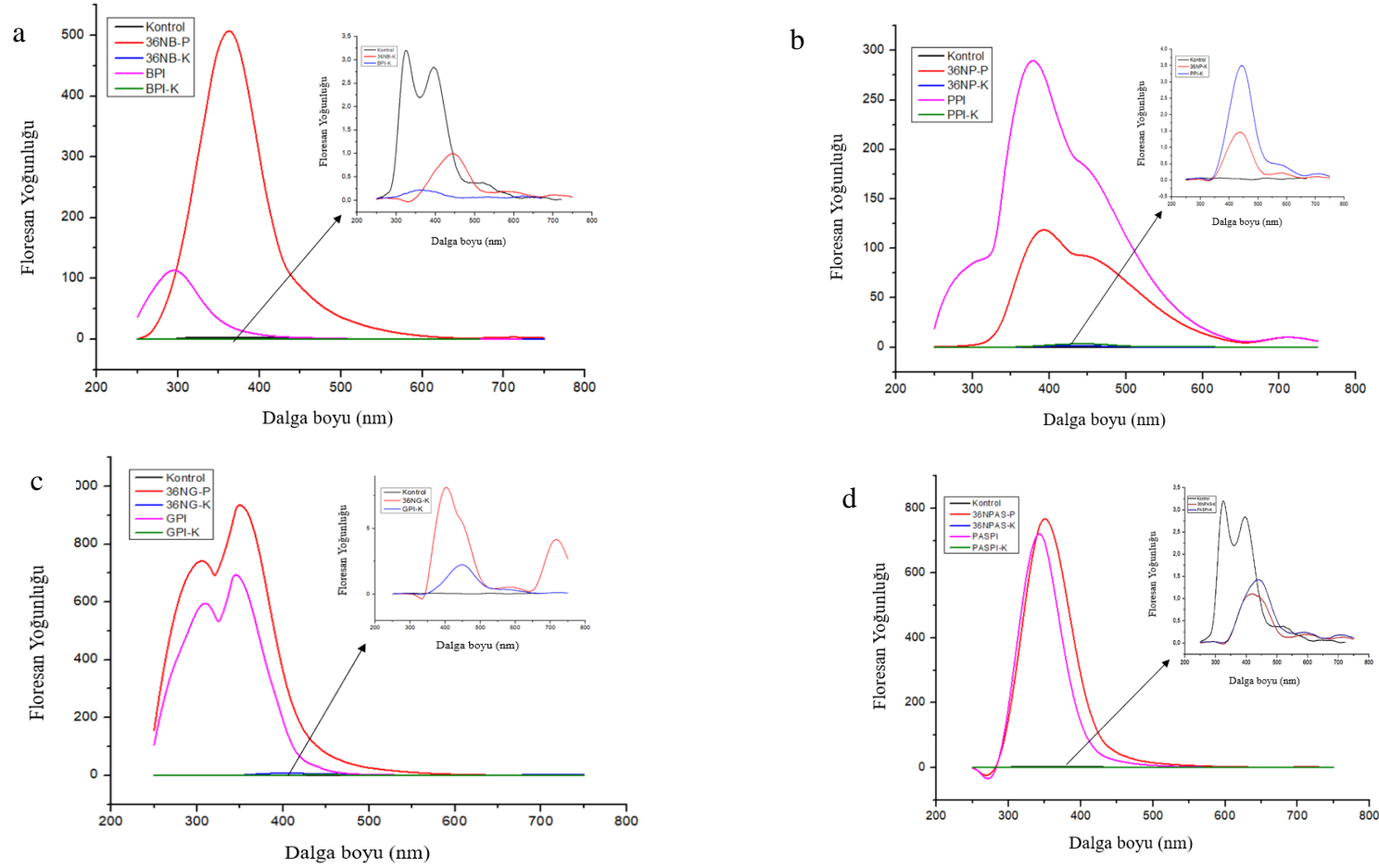
Öte yandan, bazı çalışmalarda floresans yoğunluğunda artış meydana geldiği de bildirilmiştir. Arroyo-Maya ve ark. (2016), pelargonidini süt proteinleri ile kopigmente etmiş ve elde edilen karışımın güçlü bir şekilde floresan yaydığını göstermiştir. Siyanidin-3-glukozit ile protein karışımının proteininin hidrojen bağları ve hidrofobik etkileşimleri yoluyla güçlü bir şekilde floresan yaydığını ve bağlanma afinitelerinin pH 6.3'te ön ısıtma sıcaklığı ile artış gösterdiğini ortaya koymuşlardır (He ve ark., 2018). Chung ve ark. (2015), denatüre protein- antosiyanin konsantresi karışımının floresan yoğunluğunu arttırdığını ve bunun antosiyanin ve proteinler arasında meydana gelen hidrojen bağına bağlı olabileceğini bildirmişlerdir. Tan ve ark. (2023) ısıtılmış peynir altı suyu proteini izolatu ile antosiyaninleri kopigmente ettiği çalışma da kopigmentasyon ile floresansın 338 nm'den 363 nm'ye çıktığı bildirilmiştir.

Çalışmamızda floresans şiddetindeki azalma literatürde bildirilenlere oranla daha yüksek bulunmuştur. Floresan spektroskopisi, proteinlerdeki floresan grupları etrafındaki mikroçevrenin değişimlerini yansıtmaktadır. Bu durum kopigmentasyon sonucunda protein yapısında daha fazla floroforu açığa çıkarmasıyla açıklanabilir (Dai ve ark., 2016). Proteinlerin nanofibrile edilmesiyle floresan sönümlenme kuvvetinde artış olduğu düşünülmektedir. Proteinin ikincil yapısının değişmesiyle floresans sönümlenme şiddetinde artış meydana gelebilmektedir (Zhang ve ark., 2018). Liu ve ark. (2023) soya protein izolatu ve peynir altı suyu protein izolatından nanofibriller elde ettiği çalışmada, amiloid fibrillerin floresans sönümlenme şiddetinin daha yüksek olduğunu yani floresans yoğunluğunun daha az olduğunu belirlemiştir. Floresans yoğunluğunun düşmesi protein yapısının genişlediğini ve hidrofobik protein gruplarının daha kutuplu bir ortama geçtiğini göstermektedir.

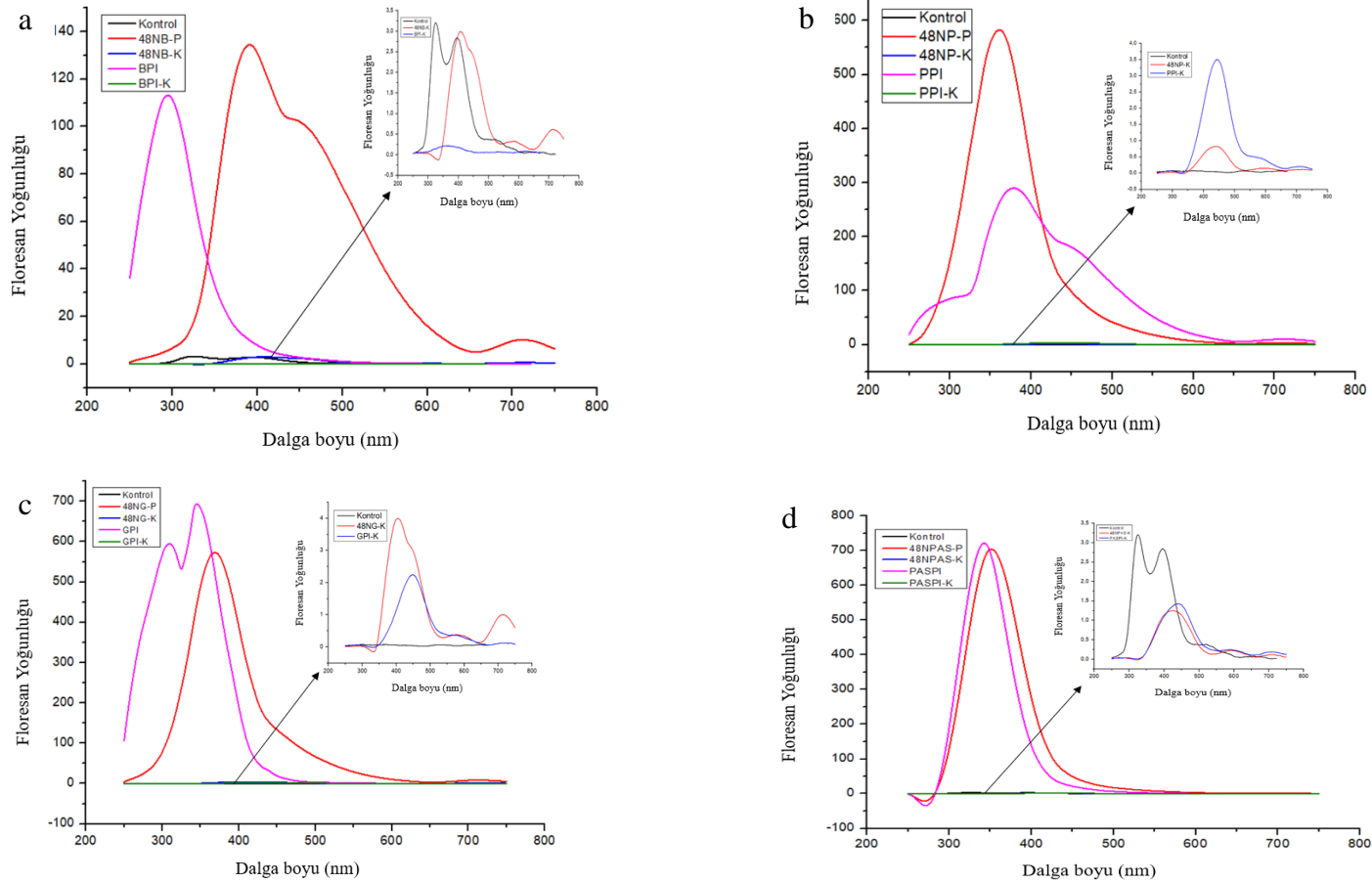
Fibrilasyon süresi, kullanılan protein izolatları ve fibrilasyon çeşidi bakımından karşılaştırıldığında önemli farklılıklar görülmemiştir. Floresans spektroskopisi protein ve antosiyanin arasındaki bağlanma sabiti ile söndürme eğrilerinden kopigmentasyonun gerçekleştiğini tahmin etmek amacıyla gerçekleştirilmiştir (Trouillas ve ark., 2016). Genel olarak düz ve kıvrımlı nanofibrile proteinler 100-1000 au arasında floresan şiddeti gösterirken, kopigmente edilmiş örneklerin floresans yoğunluğu 3-5 au arasına düşmüştür.



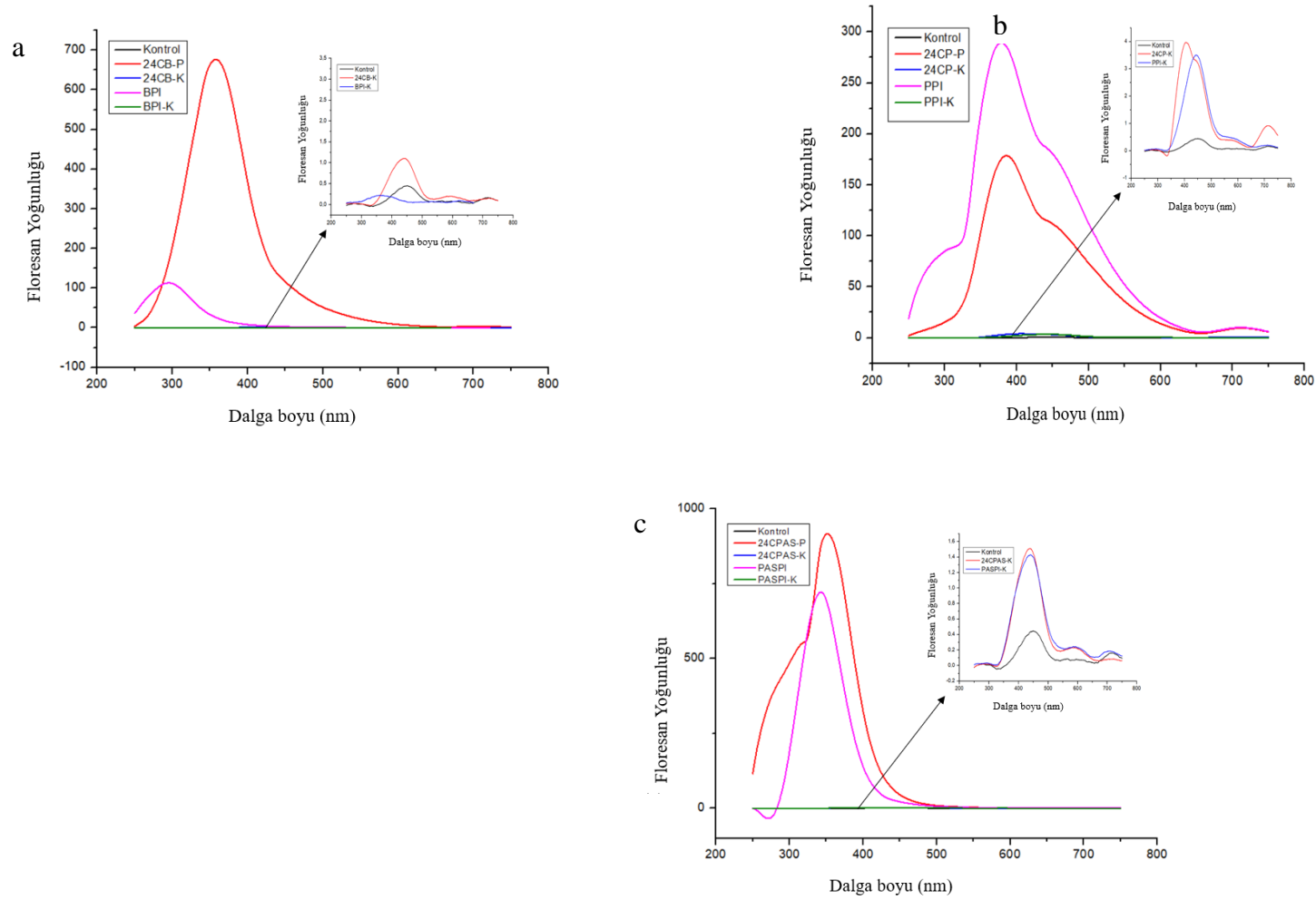
**Şekil 4.23.** 24 saatlik ısıtma sonucu düz nanofibrile (a) bezelye protein izolatı, (b) pirinç protein izolatı, (c) gluten ve (d) peynir altı suyu proteini ile kopigmente edilen örneklerin kontrol ve protein izolatı örnekleriyle karşılaştırmalı floresans spektrumları



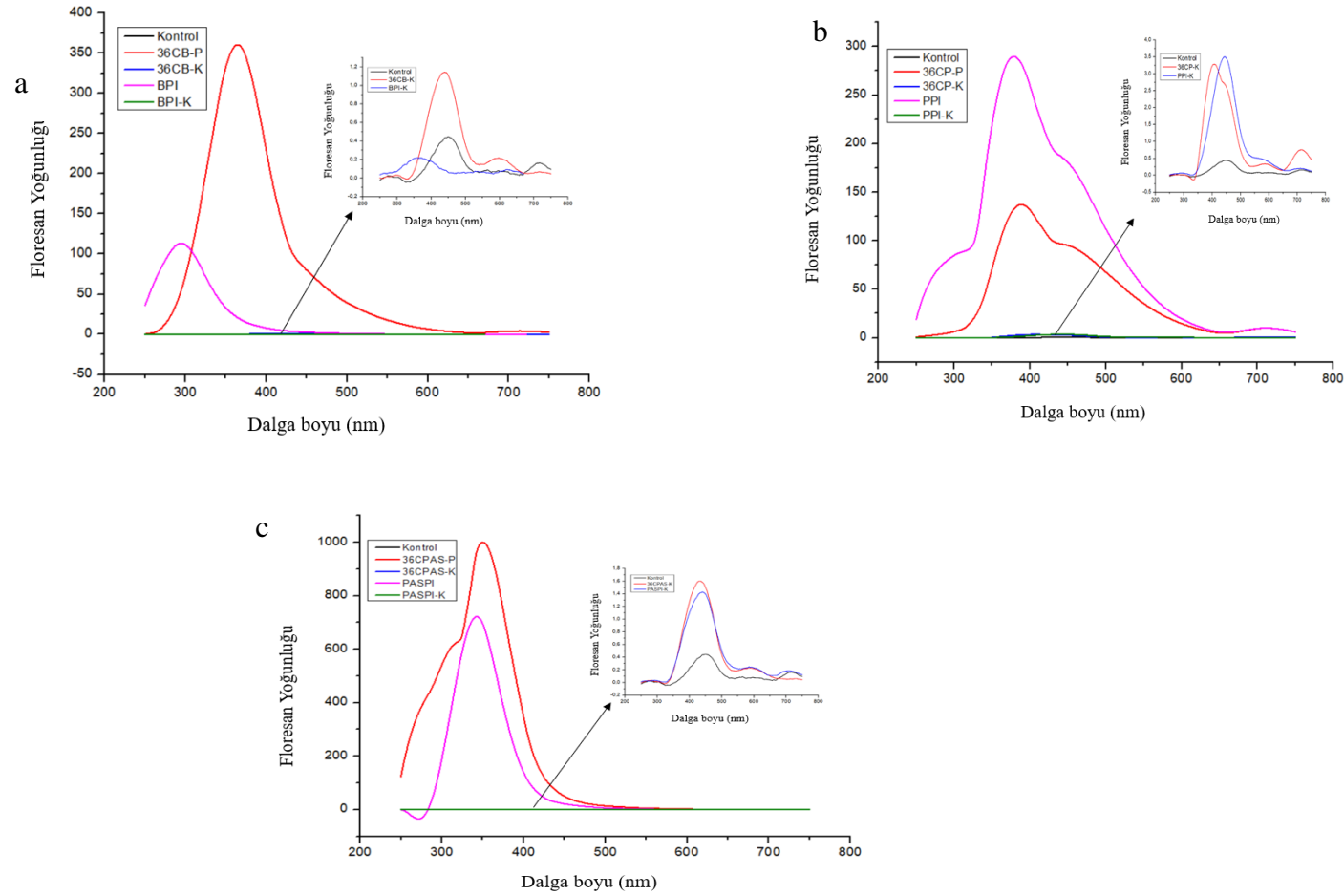
**Şekil 4.24.** 36 saatlik ısıtma sonucu düz nanofibrile (a) bezelye protein izolatu, (b) pirinç protein izolatu, (c) gluten ve (d) peynir altı suyu proteini ile kopigmente edilen örneklerin kontrol ve protein izolatu örnekleriyle karşılaştırmalı floresans spektrumları



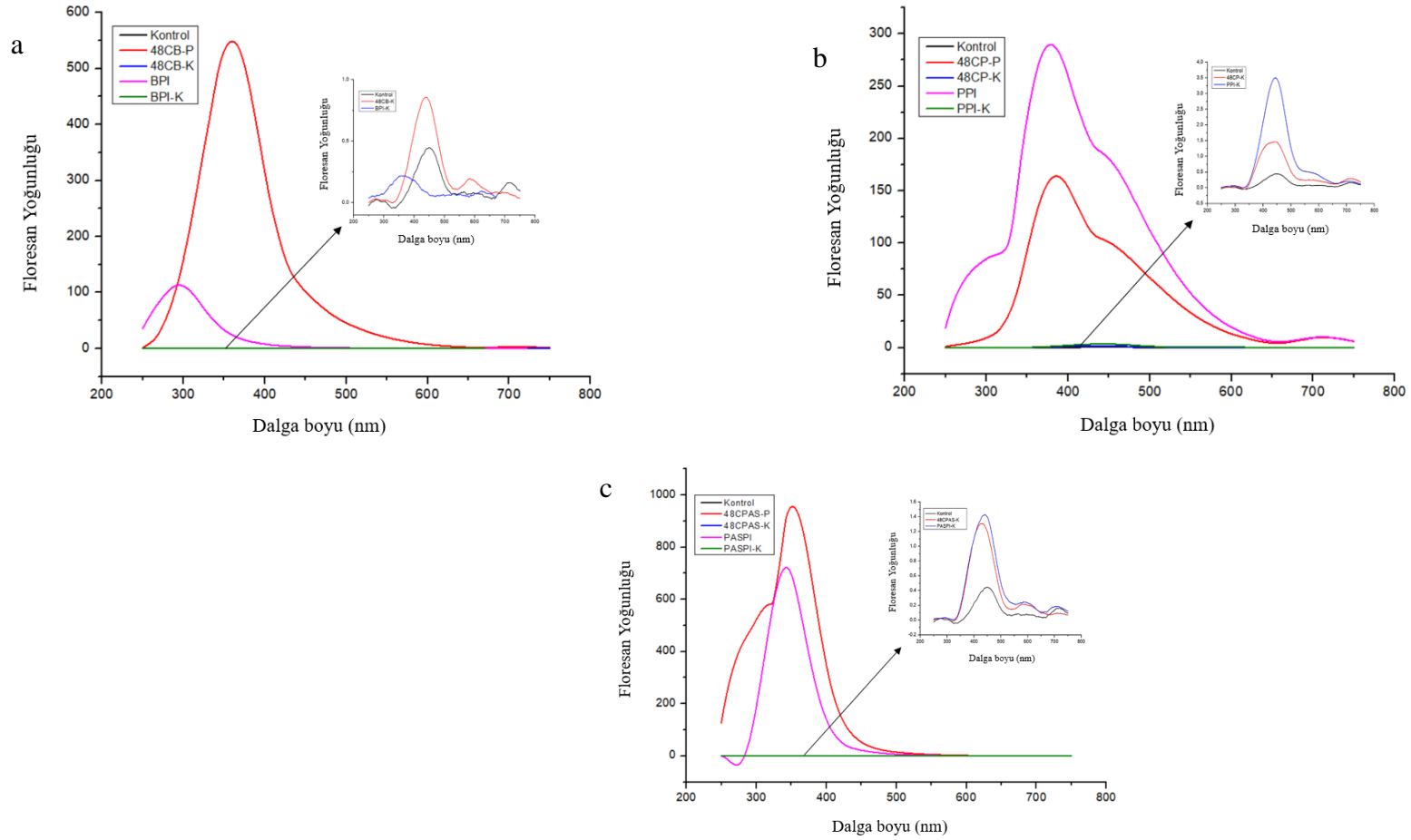
**Şekil 4.25.** 48 saatlik ısıtma sonucu düz nanofibrile (a) bezelye protein izolatı, (b) pirinç protein izolatı, (c) gluten ve (d) peynir altı suyu proteini ile kopigmente edilen örneklerin kontrol ve protein izolatı örnekleriyle karşılaştırmalı floresans spektrumları



**Şekil 4.26.** 24 saatlik ısıtma sonucu kıvrımlı nanofibrile (a) bezelye protein izolatu, (b) pirinç protein izolatu, (c) peynir altı suyu proteini ile kopigmente edilen örneklerin kontrol ve protein izolatu örnekleriyle karşılaştırmalı floresans spektrumlar



**Şekil 4.27.** 36 saatlik ısıtma sonucu kıvrımlı nanofibrile (a) bezelye protein izolatı, (b) pirinç protein izolatı, (c) peynir altı suyu proteini ile kopigmente edilen örneklerin kontrol ve protein izolatı örnekleriyle karşılaştırmalı floresans spektrumlar



**Şekil 4.28.** 48 saatlik ısıtma sonucu kıvrımlı nanofibrile (a) bezelye protein izolatu, (b) pirinç protein izolatu, (c) peynir altı suyu proteini ile kopigmente edilen örneklerin kontrol ve protein izolatu örnekleriyle karşılaştırmalı floresans spektrumları

#### 4.5. Toz ürün analizleri

Gerçekleştirilen termal stabilite testine göre seçilen kopigmentasyon ajanları ile kopigmente edilen hibiskus örnekleri (24NP, 24NG, 24NPAS, 24 CB, 48CP ve 48CPAS) kırınım pencereyi kurutucuda kurularak toz haline getirilmiştir. Aynı zamanda kopigmente edilmemiş hibiskus örneği aynı oranda saf su ile seyreltilerek kurutulmuş ve kontrol olarak kullanılmıştır. Çizelge 4.16'da elde edilen toz ürünlerin bazı kimyasal özellikleri verilmiştir.

Escobar-Ortiz ve ark. (2021), hibiskustan farklı koşullarda antosiyanin ekstrakte ederek bazı kimyasal özelliklerini belirlemişlerdir. Ekstraktların toplam fenolik madde miktarı; 0.92-2.37 g GAE/100 g km bulunmuştur. Borrás-Linares ve ark. (2015), 35 farklı hibiskus türünün bazı kimyasal özelliklerini belirlemişlerdir. Çalışma sonucunda toplam monomerik antosiyanin miktarı; 4408-969 mg S3G/100 g km, toplam fenolik madde miktarı 24-100 mg GAE/100 g km, DPPH 27.4-112 g TEAA/100 g km aralığında bulunmuştur. Yapılan bir çalışmada püskürterek kurutulmuş hibiskus tozlarının toplam monomerik antosiyanin miktarı 1000-8000 mg S3G/100 g km, toplam fenolik madde miktarı 25-40 g GAE/100 g km, DPPH 25-45 g TEAA/100 g km, FRAP 50-90 mg TEAA/g, CUPRAC 60-100 mg TEAA/g aralığında bulunmuştur (Q. D. Nguyen ve ark., 2022). Samadi ve Fard (2020) su ve etanolle ekstrakte ettikleri hibiskus tozlarının toplam fenolik madde miktarını sırasıyla 9.58 ve 9.37 g GAE/100 g km, DPPH indirgeme miktarını ise 28.22 ve 55.78 g TEAA/100 g km olarak belirlemişlerdir. Hibiskusun antioksidan aktivitesinin belirlendiği bir çalışmada; toplam fenolik madde değerleri 0.14 g GAE/100 g km, DPPH 24.50-26.54 g TEAA/100 g km, 137.86-140.61 m $Fe^{+2}$ /100 g aralığında bulunmuştur (Tahir ve ark., 2016).

Toplam monomerik antosiyanin tayini sonuçlarına göre 24CB örneğinin antosiyanin miktarı kontrol örneğinden daha fazla bulunurken, 24NG, 24NPAS, 48CP ve 48CPAS örneklerinin antosiyanin miktarları kontrol örneğine benzer bulunmuştur. 24NP örneğinin antosiyanin miktarının kontrol örneğinden daha düşük olduğu gözlenmiştir. Bunun NaCl varlığında daha uzun, esnek ve sağlam yapıda fibrillerin oluşmasından kaynaklı olduğu düşünülmektedir (Kavanagh ve ark., 2000; Loveday ve ark., 2010; Loveday ve ark., 2012).

Toplam fenolik madde içeriği sonuçlarına göre kopigmente edilen örneklerle kontrol arasında istatistiksel benzerlik bulunmuştur. Ancak 24NPAS örneğinin toplam

fenolik madde içeriği 24NG, 48CP, 48CPAS örneklerine kıyasla daha yüksektir. Polifenolün türü ve yapısı, proteinlere olan yakınlıkları bağlanma özelliklerini ve toplam fenolik içeriğini etkilemektedir (Yildirim-Elikoglu ve Erdem, 2018). Yapılan çalışmalarda peynir altı suyu proteinleri ile hibiskus ekstraktındaki polifenoller arasında moleküller arası kovalent ve çapraz bağlar meydana gelerek kuvvetli bir yapı oluştuğu bildirilmiştir (Chikhounne ve ark., 2017; Rawel ve ark., 2001).

**Çizelge 4.16.** Kırınım pencereleli kurutucuda kurutulmuş kopigmente toz hibiskus örneklerine ait toplam monomerik antosiyanin, toplam fenolik madde, DPPH, FRAP ve CUPRAC sonuçları

<sup>1</sup> Örnek Adı	Toplam monomerik antosiyanin (mg S3G/100 g km)	Toplam fenolik madde (g GAE/100 g km)	DPPH (g TEAA/100 g km)	FRAP (mg TEAA/g)	CUPRAC (mg TEAA/g)
Kontrol	1444.45±45.29b	8.39±0.52ab	26.47±5.86a	24.80±0.37a	102.0±4.44a
24NP	1110.48±76.59c	7.57±0.34ab	24.72±2.16a	22.35±1.23ab	44.91±0.16c
24NG	1394.36±96.16b	7.09±0.06b	25.76±1.47a	22.14±0.52b	53.07±3.76bc
24NPAS	1578.04±92.89b	9.03±0.95a	27.88±0.15a	21.85±0.16b	49.38±1.57bc
24CB	2070.66±77.83a	7.41±0.57ab	23.96±2.31a	22.00±0.42b	53.92±0.47bc
48CP	1452.80±20.44b	6.97±0.18b	17.85±1.39a	21.13±0.81b	56.03±1.25b
48CPAS	1461.15±54.58b	6.78±0.15b	24.94±2.16a	21.88±0.10b	55.66±4.07bc

24NP: 24 saat nanofibrilasyona tabi tutulan düz pirinç nanofibrili ile kopigmente edilmiş hibiskus tozu. 24NG: 24 saat nanofibrilasyona tabi tutulan düz gluten nanofibrili ile kopigmente edilmiş hibiskus tozu. 24NPAS: 24 saat nanofibrilasyona tabi tutulan düz peynir altı suyu nanofibrili ile kopigmente edilmiş hibiskus tozu. 48CB: 48 saat nanofibrilasyona tabi tutulan kıvrımlı bezelye nanofibrili ile kopigmente edilmiş hibiskus tozu. 48CP: 48 saat nanofibrilasyona tabi tutulan kıvrımlı pirinç nanofibrili ile kopigmente edilmiş hibiskus tozu. 48CPAS: 48 saat nanofibrilasyona tabi tutulan kıvrımlı peynir altı suyu nanofibrili ile kopigmente edilmiş hibiskus tozu

Antioksidan aktiviteyi belirlemek amacıyla DPPH radikal süpürme kapasitesi, Demir İndirgeme Antioksidan Gücü (FRAP) ve Bakır (II) İyonu İndirgeme Esaslı Antioksidan Kapasitesi (CUPRAC) olmak üzere üç farklı analiz gerçekleştirilmiştir. Çizelgede verilen DPPH sonuçlarına göre örneklerde istatistiki anlamda önemli bir farklılık gözlenmemiştir. FRAP sonuçları değerlendirildiğinde 24NP örneği kontrole benzer antioksidan aktivite gösterirken, diğer örneklerin demir indirgeme antioksidan gücünün kontrol örneğinden daha düşük olduğu belirlenmiştir. CUPRAC sonuçlarına göre kontrol örneğinin antioksidan aktivitesi diğer örneklerden daha yüksek bulunmuştur. 48CP örneğinin CUPRAC değeri kontrole yakın bulunmuştur. Ahmadi ve ark. (2023) çalışmalarında yaban mersini polifenollerini ile bezelye ve peynir altı suyu proteinleri arasındaki etkileşimlerin antioksidan aktiviteyi azalttığını bildirmiştir. Gallo ve ark. (2013) ve Stojadinovic ve ark. (2013) kararlı protein-polifenol kompleksinin oluşumu nedeniyle serbest polifenollerin azalmasından kaynaklı polifenol antioksidan aktivitesinde azalma olduğunu bildirmişlerdir. Antioksidan aktivitenin azalmasının

polifenollerin proteinlerle etkileşiminden kaynaklandığı düşünülmektedir (Heinonen ve ark., 1998). Arts ve ark. (2002), çay özütünde kazeinin gallik asitle kompleksleşmesi nedeniyle inhibitör etki gösterdiğini bildirmişlerdir.

Bu durumun aksine Yi ve ark. (2022) nanofibrile bezelye proteinleri ile kompleksasyonun resveratrolün antioksidan kapasitesini arttırdığını bildirmişlerdir. Bu durum nanofibrillerle kompleksasyon ile resveratrolün çözünürlüğünün artırılmasına ve yüzey alanının genişlemesine bağlanmıştır. Mohammadian ve ark. (2019) çalışmalarında peynir altı suyu protein nanofibrilleri ile kurkuminin çözünürlüğünün artmasıyla antioksidan aktivitesinin artırıldığını bildirmişlerdir.

#### **4.6. Depolama analizleri**

Elde edilen toz ürünler model gıdalara belirli oranlarda eklenerek depolamaya tabi tutulmuştur. Kopigmente örnekler sentetik renk maddesi, doğal renk maddesi ve kontrol ile karşılaştırılarak istatistiğe tabi tutulmuştur. Sentetik renk maddesi eklenen gıdalarda antosiyanin bulunmadığı için bu analiz sonuçlarının istatistiksel analizlerinde değerlendirmeye alınamıştır.

##### **4.6.1. Yumuşak şekerleme**

*Hibiscus sabdariffa* içerdiği antosiyaninler, organik asitler, polisakkaritler ve flavonoidler nedeniyle gıda sektöründe sıklıkla kullanılmaktadır. Yapılan çalışmalarda içerdiği ana antosiyaninlerin delphinidin-3-sambubiosid ve siyanidin-3-sambubiosid olduğu tanımlanmıştır (Da-Costa-Rocha ve ark., 2014). Gıda endüstrisinde çay, fermente içecekler, reçeller, dondurmalar, çikolatalar ve kek gibi çeşitli ürünlerde renklendirici ve besin değerini arttırıcı olarak kullanılmaktadır (de Moura ve ark., 2019). Şekerleme ürünleri çocuklardan yaşlılara kadar geniş bir kitleye hitap eden ve doğal renklendiriciler ve antioksidan maddeler katılarak fonksiyonel özellik kazandırmaya oldukça uygun olan ürün çeşitleridir (Cappa ve ark., 2015).

##### **4.6.1.1. Toplam monomerik antosiyanin**

Yumuşak şekerleme örneklerine ait depolama boyunca toplam monomerik antosiyanin değerleri Çizelge 4.17.'de verilmiştir. Nanofibrile proteinlerle kopigmente edilen örneklerin antosiyanin değerleri doğal ve kontrol örnekleri ile kıyaslanarak kopigmente hibiskus tozlarının stabilitesi belirlenmiştir. Çizelge incelendiğinde

depolama boyunca toplam monomerik antosiyanin miktarları doğal renklendirici için 7.93-15.45 mg S3G/100 g km, kontrol için 5.43-12.11 mg S3G/100 g km, 24NP için 8.35-14.61 mg S3G/100 g km, 24NG için 5.84-13.36 mg S3G/100 g km, 24NPAS için 10.02-16.70 mg S3G/100 g km, 24CB için 11.69-16.70 mg S3G/100 g km, 48CP için 7.93-10.85 mg S3G/100 g km ve 48CPAS için 7.10-11.69 mg S3G/100 g km arasında değişmiştir.

Çizelge 4.18’de varyans analizi sonuçları, Çizelge 4.19’da doğal, kontrol ve kopigmente örnekler için depolama süresince toplam monomerik antosiyanin değerlerinde meydana gelen ortalama değişim verilmiştir. Depolanan yumuşak şekerlemelerin toplam monomerik antosiyanin değerleri üzerinde örnek ve ısıl işlem süresi faktörlerinin istatistiki olarak önemli ( $p < 0.01$ ) olduğu ortaya koyulmuştur.

Oransal olarak baktığımızda depolamanın ilk gününden son gününe doğal %48, kontrol %55, 24NP %42, 24NG %56, 24NPAS %40, 24CB %30, 48CP %26 ve 48CPAS örneğinde %39 antosiyanin kaybı meydana gelmiştir. En stabil örneğin 48CP olduğu görülmüştür. 24NG hariç kopigmente örnekler hem kontrolden hem de doğal örnekten daha iyi sonuçlar vermiştir. Kopigmentasyon işlemi antosiyaninin stabilitesini artırarak yumuşak şekerleme içerisinde daha uzun süre bozunmadan kalmasını sağlamıştır (Do ve ark., 2023; Gordillo ve ark., 2015; Pangestu ve ark., 2020; Trouillas ve ark., 2016). Kopigmente örnekler arasında sıralama yapılacak olursa antosiyanin kaybı azdan çoğa doğru 48CP, 24CB, 48CPAS, 24NPAS, 24NP, 24NG şeklinde sıralanmaktadır. Görüldüğü gibi en iyi sonuçları kıvrımlı fibriller vermiştir. Qi ve ark. (2023) çalışmalarında pirinç proteininden NaCl varlığında kıvrımlı nanofibriller elde etmişlerdir. Kıvrımlı fibrillerin doğal izolatlardan ve düz nanofibrillerden daha stabil, esnek ve işlevsel bir yapıya sahip olduğunu bildirmişlerdir. Yapılan çalışmalar bezelye protein izolatlarının kıvrımlı fibril oluşturma kapasitesinin yüksek olduğunu ortaya koymuştur (Zhang ve Dee, 2023). Loveday ve ark. (2012) kıvrımlı peynir altı suyu protein fibrillerinin düz olanlara kıyasla daha esnek ve kırılma olmayan sağlam yapıya sahip olduğunu bildirmiştir.

**Çizelge 4.17.** Yumuşak şekerleme örneklerine ait depolama boyunca toplam monomerik antosiyanin değerleri<sup>1</sup>

Yumuşak şekerleme çeşidi	Toplam Monomerik Antosiyanin (mg S3G/100 g km)				
	0.gün	8.gün	16.gün	24.gün	32.gün
Doğal	15.45±0.26	12.11±2.65	10.44±0.31	8.35±0.43	7.93±0.18
Kontrol	12.11±0.19	10.44±1.14	8.77±1.55	7.51±1.52	5.43±0.76
24NP <sup>2</sup>	14.61±1.77	13.36±1.70	11.69±2.02	10.02±0.48	8.35±4.41
24NG <sup>3</sup>	13.36±1.70	11.69±2.06	7.10±1.06	6.26±0.81	5.84±4.43
24NPAS <sup>4</sup>	16.70±2.01	15.03±0.66	13.78±0.18	12.52±1.49	10.02±0.76
24CB <sup>5</sup>	16.70±1.63	15.45±0.58	14.19±0.55	13.36±1.7	11.69±2.04
48CP <sup>6</sup>	10.85±0.47	9.60±1.43	8.77±1.69	8.35±1.81	7.93±1.78
48CPAS <sup>7</sup>	11.69±2.04	9.18±0.32	7.93±1.84	7.51±0.11	7.10±0.19

<sup>1</sup>Sonuçlar iki tekerrürün ortalaması±standart hata şeklinde sunulmuştur. <sup>2</sup>24NP: 24 saat nanofibrilasyona tabi tutulan düz pirinç nanofibrili ile kopigmente edilmiş hibiskus tozu katılan yumuşak şekerleme. <sup>3</sup>24NG: 24 saat nanofibrilasyona tabi tutulan düz gluten nanofibrili ile kopigmente edilmiş hibiskus tozu katılan yumuşak şekerleme. <sup>4</sup>24NPAS: 24 saat nanofibrilasyona tabi tutulan düz peynir altı suyu nanofibrili ile kopigmente edilmiş hibiskus tozu katılan yumuşak şekerleme. <sup>5</sup>48CB: 48 saat nanofibrilasyona tabi tutulan kıvrımlı bezelye nanofibrili ile kopigmente edilmiş hibiskus tozu katılan yumuşak şekerleme, <sup>6</sup>48CP: 48 saat nanofibrilasyona tabi tutulan kıvrımlı pirinç nanofibrili ile kopigmente edilmiş hibiskus tozu katılan yumuşak şekerleme. <sup>7</sup>48CPAS: 48 saat nanofibrilasyona tabi tutulan kıvrımlı peynir altı suyu nanofibrili ile kopigmente edilmiş hibiskus tozu katılan yumuşak şekerleme.

Depolama boyunca toplam monomerik antosiyanin miktarında ortalama olarak %43 düşüş olmuştur. Antosiyanin pigmentleri çevresel şartlardan kolaylıkla etkilendiği için toplam monomerik antosiyanin miktarında oda sıcaklığında depolama süresince gerçekleşen bu düşüş beklendiği gibidir. de Moura ve ark. (2019) çalışmalarında yumuşak şekerlemeye iyonik jelasyonla enkapsüle edilmiş hibiskus antosiyaninlerini katarak 62 gün boyunca depolamış ve depolama boyunca toplam monomerik antosiyanin miktarında %30.9-41.4 aralığında düşüş meydana geldiğini bulmuştur. Yapılan bir çalışmada kapsüllenmiş kızılılık antosiyaninlerinin 90 günlük depolama boyunca toplam monomerik antosiyanin miktarında %60 düşüş olduğu bildirilmiştir (Mahdavi ve ark., 2016a). Bansode ve ark. (2020), mor patatesten elde ettiği antosiyanin ekstraktıyla yumuşak şekerlemeleri renklendirmiş ve oda sıcaklığında ve buzdolabı sıcaklığında 90 gün boyunca depolamıştır. Depolama süresince antosiyanin miktarının azaldığını belirtmiştir. Yapılan başka bir çalışmada, *Berberis vulgaris* antosiyaninleri ile renklendirilmiş yumuşak şekerlemeler 90 gün boyunca farklı sıcaklık ve bağıl nemlerde 90 gün boyunca depolanmış ve tüm şartlarda depolama boyunca antosiyanin miktarı yaklaşık %30-40 aralığında azalmıştır (Mahdavi ve ark., 2016b). da Silva ve ark. (2016) farklı şekillerde işlenmiş açai ile zenginleştirdiği şekerlemelerin 6 ay boyunca depolanması sırasında toplam monomerik antosiyanin miktarında istatistiksel olarak önemli bir düşüşün meydana geldiğini bildirmiştir. Üzüm antosiyaninleri ile jelatin ve pektin jellerinin renklendirildiği bir çalışmada, jeller 24 hafta boyunca depolanmış ve depolama süresince antosiyanin miktarında %27-72 aralığında azalma görülmüştür

(Maier ve ark., 2009). Bu nedenle çalışma kapsamında elde edilen sonuçlar literatür ile uyumludur.

**Çizelge 4.18.** Yumuşak şekerleme örneklerine ait depolama boyunca toplam monomerik antosiyanin değerlerine ait varyans analiz sonuçları

VK	SD	Toplam monomerik antosiyanin (mg S3G/100 g km)	
		KO	F
Örnek (A)	7	350.19	18.28**
Depolama süresi (B)	4	348.46	31.84**
A × B	28	45.68	0.59öd
Hata	40	109.43	

\*\*p<0.01 ve \*p<0.05 düzeyinde önemli. öd: önemli değil

Son zamanlarda yapılan çalışmalarla yapay renklendiricilerin insanlar için kanserojen veya nörotoksik olabileceği gösterilmiştir (Batada ve Jacobson, 2016). Bu nedenlerle yapay renklendiricilere bir alternatif olarak kopigmentasyon işlemine tabi tutularak stabilitesi arttırılan hibiskus antosiyaninleri yumuşak şekerlemede renklendirici olarak kullanılmıştır.

**Çizelge 4.19.** Yumuşak şekerleme örneklerine ait depolama boyunca toplam monomerik antosiyanin değerlerine ait Duncan çoklu karşılaştırma testi sonuçları<sup>1</sup>

Faktör	n	Toplam monomerik antosiyanin (mg S3G/100 g km)	
Doğal Kontrol Nanofibrile protein kaynağı	Doğal	10	10.85±3.07cd
	Kontrol	10	8.85±2.58d
	24NP	10	11.61±2.51bc
	24NG	10	8.85±3.43d
	24NPAS	10	13.61±2.53ab
	24CB	10	14.28±1.92a
	48CP	10	9.10±1.16d
	48CPAS	10	8.68±1.85d
	Depolama süresi (gün)	0	16
4		16	12.11±2.36b
8		16	10.33±2.67c
12		16	9.24±2.53cd
16		16	8.04±2.07d

<sup>1</sup>Farklı harfle işaretlenmiş aynı sütundaki ortalamalar istatistik olarak birbirinden farklıdır (p<0.05).

#### 4.6.1.2. L\* (parlaklık)

Depolama boyunca yumuşak şekerleme örneklerine ait L\* değerleri Çizelge 4.20'de verilmiştir. Örneklerin L\* değerleri, sentetik renklendirici için 30.94-35.25, doğal renklendirici için 28.18-36.11, kontrol için 34.84-37.04, 24NP için 36.71-43.80, 24NG için 35.49-37.69, 24NPAS için 35.06-42.23, 24CB için 32.75-39.49, 48CP için 38.25-43.78 ve 48CPAS için 34.86-37.65 arasında değişmektedir.

**Çizelge 4.20.** Yumuşak şekerleme örneklerine ait depolama boyunca  $L^*$  değerleri<sup>1</sup>

Yumuşak şekerleme çeşidi	$L^*$				
	0.gün	8.gün	16.gün	24.gün	32.gün
Sentetik	30.94±0.09	34.74±0.15	32.40±0.58	35.25±0.10	33.90±0.20
Doğal	28.18±1.35	30.73±0.62	31.24±0.01	36.11±1.05	34.42±0.17
Kontrol	36.34±1.39	35.22±0.52	34.84±0.01	36.86±0.26	37.06±0.15
24NP <sup>2</sup>	37.85±0.10	36.71±0.09	39.41±2.35	41.35±0.50	43.80±0.49
24NG <sup>3</sup>	35.49±1.35	35.94±0.12	37.69±0.29	35.69±0.18	37.10±0.25
24NPAS <sup>4</sup>	36.32±1.20	35.06±0.34	39.00±0.34	40.52±0.22	42.23±0.96
24CB <sup>5</sup>	32.75±2.24	39.49±0.18	36.47±0.39	32.90±0.35	36.97±0.12
48CP <sup>6</sup>	38.25±1.39	41.28±1.40	42.69±2.27	41.19±1.12	43.78±1.16
48CPAS <sup>7</sup>	34.86±2.83	37.65±0.16	36.94±0.37	36.68±0.81	37.58±0.12

<sup>1</sup>Sonuçlar iki tekerrürün ortalaması±standart hata şeklinde sunulmuştur. <sup>2</sup>24NP: 24 saat nanofibrilasyona tabi tutulan düz pirinç nanofibrili ile kopigmente edilmiş hibiskus tozu katılan yumuşak şekerleme. <sup>3</sup>24NG: 24 saat nanofibrilasyona tabi tutulan düz gluten nanofibrili ile kopigmente edilmiş hibiskus tozu katılan yumuşak şekerleme. <sup>4</sup>24NPAS: 24 saat nanofibrilasyona tabi tutulan düz peynir altı suyu nanofibrili ile kopigmente edilmiş hibiskus tozu katılan yumuşak şekerleme. <sup>5</sup>48CB: 48 saat nanofibrilasyona tabi tutulan kıvrımlı bezelye nanofibrili ile kopigmente edilmiş hibiskus tozu katılan yumuşak şekerleme, <sup>6</sup>48CP: 48 saat nanofibrilasyona tabi tutulan kıvrımlı pirinç nanofibrili ile kopigmente edilmiş hibiskus tozu katılan yumuşak şekerleme. <sup>7</sup>48CPAS: 48 saat nanofibrilasyona tabi tutulan kıvrımlı peynir altı suyu nanofibrili ile kopigmente edilmiş hibiskus tozu katılan yumuşak şekerleme.

Çizelge 4.21’de varyans analizi sonuçları, Çizelge 4.22’de Duncan çoklu karşılaştırma testi sonuçları verilmiştir. Depolanan yumuşak şekerlemelerin  $L^*$  değeri üzerinde örnek ve depolama süresi faktörlerinin ve ‘*örnek × depolama süresi*’ interaksiyonunun istatistiki olarak önemli ( $p<0.01$ ) etkisi olduğu ortaya koyulmuştur.

**Çizelge 4.21.** Yumuşak şekerleme örneklerine ait depolama boyunca  $L^*$  değerlerine ait varyans analiz sonuçları

VK	SD	$L^*$	
		KO	F
Örnek (A)	8	688.46	92.56**
Depolama süresi (B)	4	154.54	41.55**
A × B	32	210.57	7.07**
Hata	45		41.83

\*\* $p<0.01$  ve \* $p<0.05$  düzeyinde önemli. öd: önemli değil

Çizelge 4.22 incelendiğinde istatistiki olarak en yüksek  $L^*$  değerine sahip olan örneğin 48CP, en düşük  $L^*$  değerine sahip olanların ise sentetik ve doğal renklendirici ile elde edilen örneklerin olduğu görülmektedir. 48CP örneğinin diğerlerinden daha yüksek  $L^*$  değerine sahip olmasının nedeninin pirinç nanofibrillerinin örneğin rengini diğerlerine oranla daha çok ağartmasından kaynaklı olduğu düşünülmektedir (Patsanguan ve ark., 2014; Qadir ve Wani, 2023). Görüldüğü gibi kopigment olarak protein kullanılmayan doğal ve sentetik renk maddeleri ile renklendirilen yumuşak şekerlerin  $L^*$  değerleri kopigmentli örneklerden daha yüksek bulunmuştur. Kopigmentli örneklerde parçacık boyutu veya yapısal dizilimdeki değişimin ışık saçılım yoğunluğunun artmasına yol açmasıyla renkte solmaya neden olduğu düşünülmektedir (Mehrad ve ark., 2018). Ayrıca

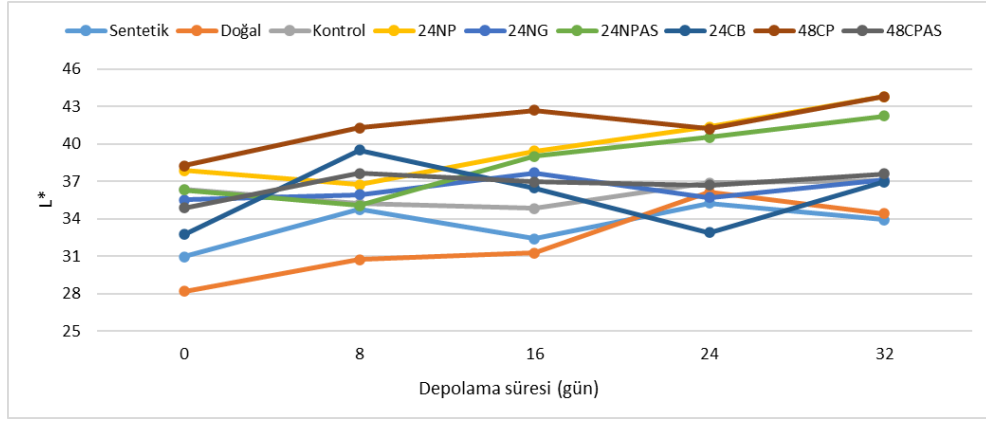
$L^*$  değerinin daha düşük olmasının nedeninin kopigmentasyonun neden olduğu hiperkromik etki olabileceği düşünülmektedir (Liu ve Tang, 2013). Depolama süresi boyunca  $L^*$  değerinde artış meydana gelmiştir. Maier ve ark. (2009), çalışmalarında üzüm antosiyaninleri ile renklendirdikleri jelatin ve pektin jellerini 24 hafta boyunca 6°C sıcaklıkta depolamaya tabi tutmuşlar ve depolama boyunca  $L^*$  değerinde artış olduğunu bildirmişlerdir. de Moura ve ark. (2019), yaptıkları çalışmada da doğal antosiyanin ekstraktıyla renklendirdiği yumuşak şekerlemelerin  $L^*$  değeri depolama süresince benzer şekilde artış göstermiştir.  $L^*$  değeri parlaklık ve beyazlığı gösteren bir değerdir. Zamanla örneklerin renginde bir açılma (renksizleşme) olduğunu belirtmektedir. Depolama süresince antosiyanin miktarında meydana gelen düşüşle beraber renkte kırmızıdan pembeye açılma meydana geldiği düşünülmektedir (de Moura ve ark., 2019; Reyes ve Cisneros-Zevallos, 2007)

**Çizelge 4.22.** Yumuşak şekerleme örneklerine ait depolama boyunca  $L^*$  değerlerine ait Duncan çoklu karşılaştırma testi sonuçları<sup>1</sup>

Faktör	n	$L^*$	
Nanofibrile protein kaynağı	Sentetik	10	33.44±1.77d
	Doğal	10	32.14±3.14d
	Kontrol	10	36.06±0.99c
	24NP	10	39.82±2.82b
	24NG	10	36.38±0.96c
	24NPAS	10	38.63±2.95b
	24CB	10	35.71±2.88c
	48CP	10	41.44±2.08a
	48CPAS	10	36.74±1.13c
Depolama süresi (gün)	0	18	34.55±3.33d
	8	18	36.31±3.19c
	16	18	36.74±3.8bc
	24	18	37.39±3.15b
	32	18	38.54±4.03a

<sup>1</sup>Farklı harfle işaretlenmiş aynı sütundaki ortalamalar istatistik olarak birbirinden farklıdır (p<0.05).

Şekil 4.29'da ise farklı yumuşak şekerleme örneklerinin  $L^*$  değerleri üzerinde etkili '*örnek x depolama süresi*' interaksiyonu gösterilmektedir. Şekil incelendiğinde sentetik ve doğal renk maddesi kullanılan yumuşak şekerlemelerin  $L^*$  değeri 24. güne kadar artış göstermiş 24-32. gün arasında kısmi bir düşüş meydana gelmiş ancak başlangıca göre  $L^*$  değerinde artış meydana gelmiştir. Kontrol örneğinde  $L^*$  değeri önce kısmi bir düşüş gösterirken sonra başlangıç seviyesine gelmiştir. 24CB örneğinin  $L^*$  değerinde 8. güne kadar artış, 8-24. gün arası düşüş, 24-32. gün arası tekrar artış meydana gelmiştir. Diğer protein fibrilleri ile kopigmente edilen ekstraktla renklendirilmiş yumuşak şekerlemelerde ise kademeli bir artış görülmektedir.



Şekil 4.29. Yumuşak şekerlemelere ait  $L^*$  değerlerinin depolama süresine bağlı değişimleri

#### 4.6.1.3. $a^*$ (kırmızılık)

Yumuşak şekerleme örneklerinin  $a^*$  değerleri sentetik renklendirici için 7.63-16.99, doğal renklendirici için 4.21-19.16, kontrol için 1.63-13.94, 24NP için 1.79-10.68, 24NG için 1.02-11.56, 24NPAS için 1.32-9.53, 24CB için 2.40-13.42, 48CP için 1.29-8.08 ve 48CPAS için 0.93-10.38 değerleri arasında değişmiştir (Çizelge 4.23).

Çizelge 4.24’de verilen varyans analiz sonuçlarına göre yumuşak şekerlemelerin  $a^*$  değeri üzerinde örnek ve depolama süresi faktörlerinin ve ‘*örnek × depolama süresi*’ interaksiyonunun istatistiki olarak önemli ( $p < 0.01$ ) etkisi olduğu ortaya koyulmuştur.

Çizelge 4.23. Yumuşak şekerleme örneklerine ait depolama boyunca  $a^*$  değerleri<sup>1</sup>

Yumuşak şekerleme çeşidi	$a^*$				
	0.gün	8.gün	16.gün	24.gün	32.gün
Sentetik	16.99±0.89	13.73±0.58	10.99±0.59	9.24±0.72	7.63±0.33
Doğal	19.16±1.36	13.61±1.77	7.25±1.37	5.48±0.50	4.21±0.19
Kontrol	13.94±0.81	10.76±0.11	5.73±0.38	2.83±0.01	1.63±0.05
24NP <sup>2</sup>	10.68±1.58	5.99±0.56	3.19±0.22	1.94±0.01	1.79±0.11
24NG <sup>3</sup>	11.56±0.74	8.15±0.29	3.96±0.64	2.92±0.47	1.02±0.00
24NPAS <sup>4</sup>	9.53±0.67	4.07±0.17	1.78±0.02	1.32±0.09	1.56±0.17
24CB <sup>5</sup>	13.42±1.80	6.29±0.84	4.66±0.43	3.99±0.10	2.40±0.08
48CP <sup>6</sup>	8.08±0.58	3.60±0.06	2.29±0.11	2.35±0.06	1.29±0.42
48CPAS <sup>7</sup>	10.38±1.00	5.46±0.48	3.00±0.72	2.25±0.15	0.93±0.31

<sup>1</sup>Sonuçlar iki tekerrürün ortalaması±standart hata şeklinde sunulmuştur. <sup>2</sup>24NP: 24 saat nanofibrilasyona tabi tutulan düz pirinç nanofibrili ile kopigmente edilmiş hibiskus tozu katılan yumuşak şekerleme. <sup>3</sup>24NG: 24 saat nanofibrilasyona tabi tutulan düz gluten nanofibrili ile kopigmente edilmiş hibiskus tozu katılan yumuşak şekerleme. <sup>4</sup>24NPAS: 24 saat nanofibrilasyona tabi tutulan düz peynir altı suyu nanofibrili ile kopigmente edilmiş hibiskus tozu katılan yumuşak şekerleme. <sup>5</sup>48CB: 48 saat nanofibrilasyona tabi tutulan kıvrımlı bezelye nanofibrili ile kopigmente edilmiş hibiskus tozu katılan yumuşak şekerleme. <sup>6</sup>48CP: 48 saat nanofibrilasyona tabi tutulan kıvrımlı pirinç nanofibrili ile kopigmente edilmiş hibiskus tozu katılan yumuşak şekerleme. <sup>7</sup>48CPAS: 48 saat nanofibrilasyona tabi tutulan kıvrımlı peynir altı suyu nanofibrili ile kopigmente edilmiş hibiskus tozu katılan yumuşak şekerleme.

**Çizelge 4.24.** Yumuşak şekerleme örneklerine ait depolama boyunca  $a^*$  değerlerine ait varyans analiz sonuçları

VK	SD	$a^*$	
		KO	F
Örnek (A)	8	637.69	161.58**
Depolama süresi (B)	4	1196.99	606.59**
A × B	32	109.85	6.96**
Hata	45		22.19

\*\* $p < 0.01$  ve \* $p < 0.05$  düzeyinde önemli. öd: önemli değil

Çizelge 4.25’de örneklerin depolama süresince  $a^*$  değerine ait Duncan çoklu karşılaştırma testi sonuçları verilmiştir. Örnekler birbiriyle karşılaştırıldığında sentetik örnek en yüksek  $a^*$  değerine sahipken, 24NP örneği en düşük  $a^*$  değerine sahip olmuştur. Kopigmente hibiskus örnekleri ile renklendirilmiş şekerlerin kontrol, doğal ve sentetik örneklerine göre daha düşük  $a^*$  değerlerine sahip olduğu görülmektedir. Bunun nedeninin eklenen nanofibrile protein çözeltilerinin şekerlemenin rengini açarak  $a^*$  değerini düşürmesi olduğu düşünülmektedir. Mahdavi ve ark. (2016b), enkapsüle karamuk ekstraktı ile hazırladıkları yumuşak şekerleme örneklerinde benzer şekilde kontrol örneğinin  $a^*$  değerini diğer örneklerden daha yüksek bulmuştur. Nanofibrile proteinlerle renklendirilen örnekler arasında 24CB örneğinin en yüksek  $a^*$  değerine sahip olduğu bulunmuştur. Bu nedenle 24CB örneğinin ürünün kırmızılığını daha iyi koruduğu düşünülmektedir. Depolama süresince  $a^*$  değerinde istatistiki anlamda önemli bir düşüş meydana gelmiştir. Bu düşüşün antosiyanin miktarındaki azalışla orantılı olduğu düşünülmektedir. Yapılan pek çok çalışmada da antosiyanin ile renklendirilen yumuşak şekerlemelerin  $a^*$  değerlerinde depolama boyunca düşüş meydana geldiği ortaya koyulmuştur. Gümüş ve ark. (2023), yumuşak şekerlemelere renklendirici olarak şarap tortusu katarak 60 gün boyunca depolamaya tabi tutmuşlar ve depolama boyunca  $a^*$  değerinde azalma olduğunu bildirmişlerdir. Yapılan başka bir çalışmada enkapsüle mor tatlı patates ekstraktları ile renklendirilmiş jöleler 30 gün boyunca oda sıcaklığında depolamaya tabi tutulmuş ve depolama boyunca  $a^*$  değerinde azalma meydana gelmiştir (Tensiska ve ark., 2017).

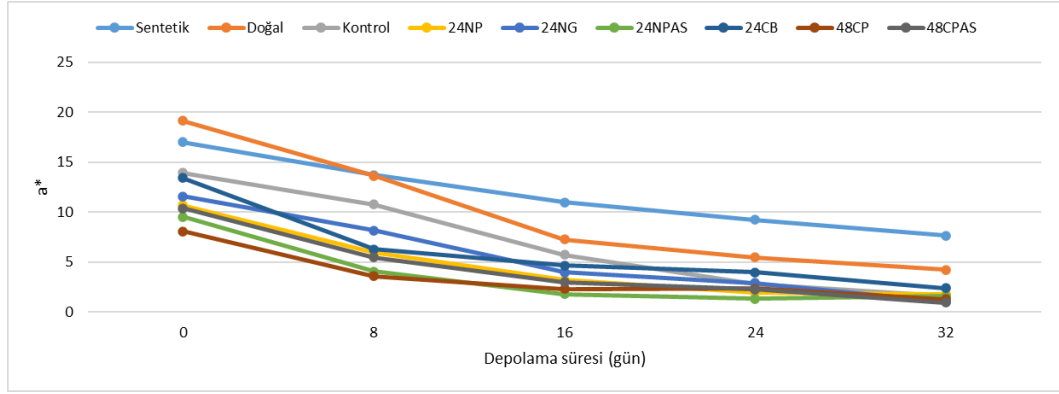
**Çizelge 4.25.** Yumuşak şekerleme örneklerine ait depolama boyunca  $a^*$  değerlerine ait Duncan çoklu karşılaştırma testi sonuçları<sup>1</sup>

Faktör	n	$a^*$	
Nanofibrile protein kaynağı	Sentetik	10	11.72±3.72a
	Doğal	10	9.94±6.29b
	Kontrol	10	6.98±5.25c
	24NP	10	4.72±3.73e
	24NG	10	5.52±4.27de
	24NPAS	10	3.65±3.46f
	24CB	10	6.15±4.3cd
	48CP	10	3.52±2.68f
	48CPAS	10	4.4±3.72ef
Depolama süresi (gün)	0	18	12.64±3.61a
	8	18	7.96±4.02b
	16	18	4.76±3.02c
	24	18	3.59±2.56d
	32	18	2.5±2.23be

<sup>1</sup>Farklı harfle işaretlenmiş aynı sütundaki ortalamalar istatistiki olarak birbirinden farklıdır ( $p<0.05$ ).

Díaz ve ark. (2006), depolama sırasında püskürtülerek kurutulmuş betasiyanin pigment içeriğindeki azalmanın,  $a^*$  değerlerindeki azalmayla doğru orantılı olduğunu, bunun da depolanan numunelerde kırmızı renk yoğunluğunda bir azalmaya işaret ettiğini belirtmiştir. Idham ve ark. (2012) hibiskustan elde ettikleri antosiyanin pigmentlerini enkapsüle ederek 4, 25 ve 37 °C sıcaklıklarda 105 gün boyunca depolamışlar ve depolama boyunca  $a^*$  değerinde düşüş meydana geldiğini belirlemişlerdir. Bu düşüşün kırmızı renkte meydana gelen bozulmalar nedeniyle olduğu ve görsel olarak gözlemlendiğini bildirmişlerdir.

Şekil 4.30'da ise farklı yumuşak şekerleme örneklerinin  $a^*$  değerleri üzerinde etkili '*Örnek x depolama süresi*' interaksyonu gösterilmektedir. Tüm örneklerde depolama boyunca düşüş meydana gelmiştir. Özellikle depolamanın ilk 16 gününde daha şiddetli bir düşüş gözlenirken, daha sonraki depolama süresince kısmi düşüşler olmuştur. Bunun nedeni olarak ilk 16 günlük depolama sürecinde stabil olmayan antosiyanin pigmentlerinin parçalanarak  $a^*$  değerinde düşüşe neden olduğu sonraki günlerde ise kalan stabil antosiyaninlerin daha yavaş bir parçalanma eğilimi gösterdiği düşünülmektedir.



Şekil 4.30. Yumuşak şekerlemelere ait  $a^*$  değerlerinin depolama süresine bağlı değişimleri

#### 4.6.1.4. $b^*$ (sarılık)

Depolama boyunca yumuşak şekerleme örneklerine ait  $b^*$  değerleri Çizelge 4.26’da verilmiştir. Örneklerin  $b^*$  değerleri, sentetik renklendirici için 3.20-8.96, doğal renklendirici için 8.13-0.30, kontrol için 2.65-11.56, 24NP için 6.12-9.33, 24NG için 2.63-9.37, 24NPAS için 3.32-9.20, 24CB için 2.77-9.21, 48CP için 6.10-9.78 ve 48CPAS için 2.76-12.17 arasında değişmiştir.

Çizelge 4.27’de varyans analizi sonuçları, Çizelge 4.28’de Duncan çoklu karşılaştırma testi sonuçları verilmiştir. Depolanan yumuşak şekerlemelerin  $b^*$  değeri üzerinde örnek ve depolama süresi faktörlerinin ve ‘örnek  $\times$  depolama süresi’ interaksiyonunun istatistiki olarak önemli ( $p < 0.01$ ) olduğu ortaya konulmuştur.

Çizelge 4.26. Yumuşak şekerleme örneklerine ait depolama boyunca  $b^*$  değerleri<sup>1</sup>

Yumuşak şekerleme çeşidi	$b^*$				
	0.gün	8.gün	16.gün	24.gün	32.gün
Sentetik	8.96±0.66	6.23±0.44	5.94±0.03	4.46±0.26	3.20±0.12
Doğal	8.13±0.5	4.16±0.75	2.60±0.37	1.14±0.15	0.30±0.08
Kontrol	11.56±0.6	8.32±0.16	6.02±0.21	3.65±0.02	2.65±0.03
24NP <sup>2</sup>	9.33±0.76	5.97±0.71	5.72±0.26	5.48±0.09	6.12±0.08
24NG <sup>3</sup>	9.37±0.31	7.15±0.11	4.43±0.53	3.85±0.27	2.63±0.04
24NPAS <sup>4</sup>	9.20±1.22	3.82±0.03	3.72±0.12	3.32±0.19	5.54±0.43
24CB <sup>5</sup>	9.21±1.74	4.63±0.32	3.59±0.32	3.50±0.03	2.77±0.07
48CP <sup>6</sup>	9.68±0.25	6.27±0.87	6.10±0.69	6.91±0.24	6.41±0.28
48CPAS <sup>7</sup>	12.17±2.07	5.63±0.32	4.05±0.37	4.40±0.02	2.76±0

<sup>1</sup>Sonuçlar iki tekerrürün ortalaması±standart hata şeklinde sunulmuştur. <sup>2</sup>24NP: 24 saat nanofibrilasyona tabi tutulan düz pirinç nanofibrili ile kopigmente edilmiş hibiskus tozu katılan yumuşak şekerleme. <sup>3</sup>24NG: 24 saat nanofibrilasyona tabi tutulan düz gluten nanofibrili ile kopigmente edilmiş hibiskus tozu katılan yumuşak şekerleme. <sup>4</sup>24NPAS: 24 saat nanofibrilasyona tabi tutulan düz peynir altı suyu nanofibrili ile kopigmente edilmiş hibiskus tozu katılan yumuşak şekerleme. <sup>5</sup>48CB: 48 saat nanofibrilasyona tabi tutulan kıvrımlı bezelye nanofibrili ile kopigmente edilmiş hibiskus tozu katılan yumuşak şekerleme, <sup>6</sup>48CP: 48 saat nanofibrilasyona tabi tutulan kıvrımlı pirinç nanofibrili ile kopigmente edilmiş hibiskus tozu katılan yumuşak şekerleme. <sup>7</sup>48CPAS: 48 saat nanofibrilasyona tabi tutulan kıvrımlı peynir altı suyu nanofibrili ile kopigmente edilmiş hibiskus tozu katılan yumuşak şekerleme.

**Çizelge 4.27.** Yumuşak şekerleme örneklerine ait depolama boyunca  $b^*$  değerlerine ait varyans analiz sonuçları

VK	SD	$b^*$	
		KO	F
Örnek (A)	8	102.62	35.1482**
Depolama süresi (B)	4	431.32	295.46**
A × B	32	87.45	7.48**
Hata	45		16.42

\*\* $p < 0.01$  ve \* $p < 0.05$  düzeyinde önemli. öd: önemli değil

Çizelge 4.28 incelendiğinde istatistiki olarak en yüksek  $b^*$  değerine sahip olan örneğin 48CP, en düşük  $b^*$  değerine sahip olanların ise doğal renklendirici kullanılan örnek olduğu görülmektedir. Ayrıca, kontrol ve 24NP örneklerinin  $b^*$  değerleri istatistiki olarak 48CP'ye benzer bulunmuştur. 32 günlük depolama boyunca  $b^*$  değerinde düşüş meydana gelmiştir. El-Messiry ve ark. (2021) çalışmalarında java eriğinden elde ettikleri antosiyanin ekstraktını şekerlemelere koyarak 3 hafta boyunca depolamışlar ve  $b^*$  değerinde bir azalma meydana geldiğini rapor etmişlerdir.  $b^*$  değerindeki azalmanın zamanla şekerlemelerin yapısında meydana gelen renk bozulmalarından kaynaklandığını öne sürmüşlerdir. Heras-Roger ve ark. (2016) fenolik bileşiklerle kopigmentasyonun kırmızı şarap üzerine etkisini belirlemeyi amaçladıkları çalışmalarında şarapların yıllandıkça esmerleşme reaksiyonlarından dolayı renginin daha koyu ve morumsu olması nedeniyle  $b^*$  değerinde düşüş meydana geldiğini belirlemişlerdir.

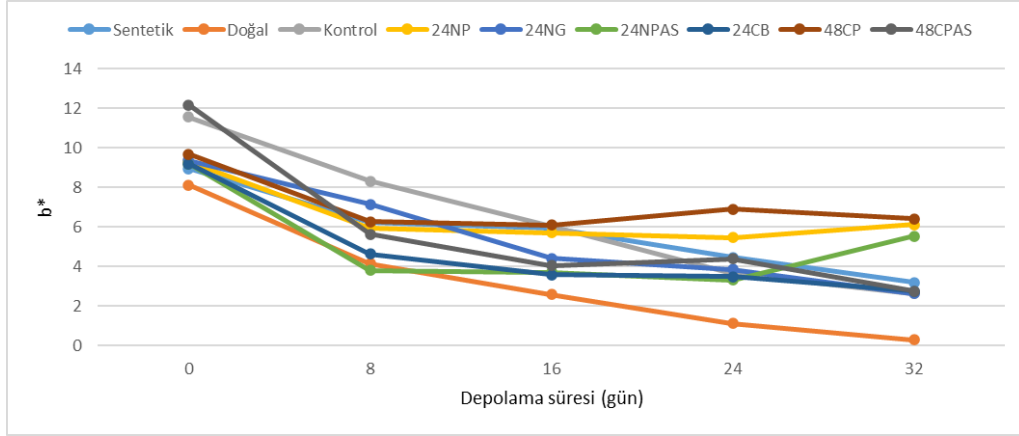
**Çizelge 4.28.** Yumuşak şekerleme örneklerine ait depolama boyunca  $b^*$  değerlerine ait Duncan çoklu karşılaştırma testi sonuçları<sup>1</sup>

Faktör	n	$b^*$
Sentetik	10	5.76±2.16bc
Doğal	10	3.27±3.09e
Kontrol	10	6.44±3.61ab
24NP	10	6.52±1.59ab
Nanofibrile	24NG	5.48±2.73cd
protein kaynağı	24NPAS	5.12±2.44cd
	24CB	4.74±2.58d
	48CP	7.07±1.49a
	48CPAS	6.53±3.29bc
	0	10.9±1.29a
Depolama	8	5.8±1.54b
süresi (gün)	16	4.69±1.36c
	24	4.08±1.69d
	32	3.6±2.12d

<sup>1</sup>Farklı harfle işaretlenmiş aynı sütundaki ortalamalar istatistiki olarak birbirinden farklıdır ( $p < 0.05$ ).

Şekil 4.31'de ise farklı yumuşak şekerleme örneklerinin  $b^*$  değerleri üzerinde etkili '*Örnek x depolama süresi*' interaksyonu gösterilmektedir. Tüm örneklerde depolama boyunca düşüş meydana gelmiştir. Protein nanofibrilleriyle kopigmente edilen

ekstraktlarla renklendirilen yumuşak şekerleme örneklerinde ilk 8 günlük süreçte önemli düşüş meydana gelirken sonrasında düşüş hızı azalmıştır. Sentetik örnekte ilk 16 günde daha şiddetli düşüş meydana gelmiştir. Kontrol örneğinde ilk 24 günde yoğun düşüş gözlenmiştir. Doğal örnekte ise depolama süresince düşüş yoğun şekilde devam etmiştir.



Şekil 4.31. Yumuşak şekerlemelere ait b\* değerlerinin depolama süresine bağlı değişimleri

#### 4.6.1.5. Ton açısı

Yumuşak şekerleme örneklerinin ton açısı değerlerinin sentetik renklendirici için 22.75-28.39, doğal renklendirici için 4.02-23.01, kontrol için 37.72-58.41, 24NP için 41.26-73.73, 24NG için 39.04-68.71, 24NPAS için 43.15-74.28, 24CB için 34.34-49.09, 48CP için 50.16-78.68 ve 48CPAS için 45.94-71.51 değerleri arasında değiştiği görülmektedir (Çizelge 4.29).

Çizelge 4.29. Yumuşak şekerleme örneklerine ait depolama boyunca ton açısı değerleri<sup>1</sup>

Yumuşak şekerleme çeşidi	Ton açısı				
	0.gün	8.gün	16.gün	24.gün	32.gün
Sentetik	27.78±0.49	24.38±0.62	28.39±1.17	25.79±0.42	22.75±1.65
Doğal	23.01±0.20	16.95±0.81	19.81±0.83	11.75±0.43	4.02±0.92
Kontrol	39.68±0.18	37.72±0.84	46.44±0.9	52.22±0.25	58.41±0.51
24NP <sup>2</sup>	41.26±1.89	44.91±0.7	60.87±0.61	70.51±0.4	73.73±0.76
24NG <sup>3</sup>	39.04±0.87	41.27±0.59	48.29±1.23	53.01±2.47	68.71±0.19
24NPAS <sup>4</sup>	43.92±1.78	43.15±1.44	64.34±0.53	68.29±0.29	74.28±0.51
24CB <sup>5</sup>	34.34±1.49	36.43±1.79	37.6±0.05	41.23±0.94	49.09±0.18
48CP <sup>6</sup>	50.16±2.77	59.95±3.02	69.31±3.01	71.24±0.17	78.68±3.13
48CPAS <sup>7</sup>	49.39±2.12	45.94±0.91	53.75±4.13	62.96±1.44	71.51±5.88

<sup>1</sup>Sonuçlar iki tekrerrün ortalaması±standart hata şeklinde sunulmuştur. <sup>2</sup>24NP: 24 saat nanofibrilasyona tabi tutulan düz pirinç nanofibrili ile kopigmente edilmiş hibiskus tozu katılan yumuşak şekerleme. <sup>3</sup>24NG: 24 saat nanofibrilasyona tabi tutulan düz gluten nanofibrili ile kopigmente edilmiş hibiskus tozu katılan yumuşak şekerleme. <sup>4</sup>24NPAS: 24 saat nanofibrilasyona tabi tutulan düz peynir altı suyu nanofibrili ile kopigmente edilmiş hibiskus tozu katılan yumuşak şekerleme. <sup>5</sup>24CB: 48 saat nanofibrilasyona tabi tutulan kıvrımlı bezelye nanofibrili ile kopigmente edilmiş hibiskus tozu katılan yumuşak şekerleme. <sup>6</sup>48CP: 48 saat nanofibrilasyona tabi tutulan kıvrımlı pirinç nanofibrili ile kopigmente edilmiş hibiskus tozu katılan yumuşak şekerleme. <sup>7</sup>48CPAS: 48 saat nanofibrilasyona tabi tutulan kıvrımlı peynir altı suyu nanofibrili ile kopigmente edilmiş hibiskus tozu katılan yumuşak şekerleme.

Çizelge 4.30’da verilen varyans analiz sonuçlarına göre depolanan yumuşak şekerlemelerin ton açısı değeri üzerinde örnek ve depolama süresi faktörlerinin ve ‘*örnek* × *depolama süresi*’ interaksiyonunun istatistiki olarak önemli ( $p<0.01$ ) olduğu ortaya koyulmuştur.

**Çizelge 4.30.** Yumuşak şekerleme örneklerine ait depolama boyunca ton açısı değerlerine ait varyans analiz sonuçları

VK	SD	Ton açısı	
		KO	F
Örnek (A)	8	22148.99	751.20**
Depolama süresi (B)	4	3890.85	263.92**
A × B	32	3673.59	31.14**
Hata	45		165.85

\*\* $p<0.01$  ve \* $p<0.05$  düzeyinde önemli. öd: önemli değil

Çizelge 4.31’de örneklerin ton açısı değerlerine ait Duncan çoklu karşılaştırma testi sonuçları verilmiştir. Çizelgede de görüldüğü gibi 48CP en yüksek ton açısı değerine sahipken onu 24NP, 24NPAS ve 48CPAS takip etmektedir. Doğal renklendirici ile renklendirilen örnek en düşük ton açısı değerine sahiptir. 32 günlük depolama boyunca ton açısı değerinde artış meydana gelmiştir. Ancak sentetik ve doğal renklendirici kullanılan örnekler tam tersi bir seyir göstermiştir. Ton açısındaki değişimin batokromik kaymaya verilen tepkinin sonucu olduğu düşünülmektedir (Liu ve Tang, 2013).

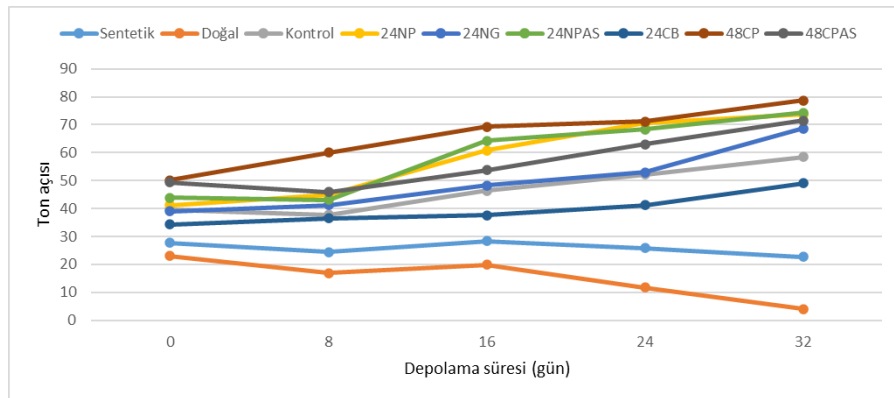
Yapılan bir çalışmada üzüm posasından elde edilen antosiyanin ekstraktları ile renklendirilen jeller 24 hafta boyunca ışıklı ve karanlık olmak üzere iki ayrı ortamda depolamaya tabi tutulmuş ve depolama süresince özellikle ışık altında depolanan örneklerde ton açısı değerinde artış meydana geldiği rapor edilmiştir (Maier ve ark., 2009). da Silva ve ark. (2016) farklı şekillerde işlenmiş açai ile renklendirilen şekerlemeleri 6 ay boyunca depolayarak ton açısı değerinde artış olduğunu bildirmişlerdir. Yapılan başka bir çalışmada antosiyaninlerin sulu çözeltileri farklı sıcaklıklarda depolamaya tabi tutulmuş ve depolama boyunca ton açısı değerinde artış olmuştur (Sui ve ark., 2016). Ton açısı değerinde meydana gelen bu artışın sarı kalkon türlerinin oluşumuyla ilgili olabileceği rapor edilmiştir (Reyes ve Cisneros-Zevallos, 2007).

**Çizelge 4.31.** Yumuşak şekerleme örneklerine ait depolama boyunca ton açısı değerlerine ait Duncan çoklu karşılaştırma testi sonuçları<sup>1</sup>

Faktör	n	Ton açısı	
Nanofibrile protein kaynağı	Sentetik	10	25.82±2.34f
	Doğal	10	15.11±7.45g
	Kontrol	10	46.78±8.92d
	24NP	10	58.02±15.3b
	24NG	10	50.06±12.27c
	24NPAS	10	58.8±14.38b
	24CB	10	39.74±5.79e
	48CP	10	65.87±11.03a
	48CPAS	10	56.71±10.45b
Depolama süresi (gün)	0	18	10.90±9.12d
	8	18	38.97±13.08d
	16	18	47.64±17.59c
	24	18	50.78±21.85b
	32	18	55.69±27.11a

<sup>1</sup>Farklı harfle işaretlenmiş aynı sütundaki ortalamalar istatistik olarak birbirinden farklıdır (p<0.05).

Şekil 4.32’de farklı yumuşak şekerleme örneklerinin ton açısı değerleri üzerinde etkili ‘Örnek x depolama süresi’ interaksiyonu gösterilmektedir. Sentetik ve doğal renklendirici kullanılan örneklerde ton açısı değerlerinde azalma olurken, kontrol ve protein fibrilleriyle kopigmente edilmiş ekstraktların kullanıldığı örneklerde artış meydana gelmiştir. Renklendirici kullanılan örneklerde kırmızılık artışı yani esmerleşme meydana gelirken, diğer örneklerde sarılık artışı yani ağarma gözlenmiştir. Yumuşak şekerlemelerin içinde bulunan şeker nedeniyle depolama süresince mailard reaksiyonunun gerçekleşmiş olması muhtemeldir. Yukarıda da belirtildiği gibi depolama süresince antosiyaninlerin parçalanmasıyla sarı kalkon türlerinin oluşması nedeniyle ton açısında artış olduğu düşünülmektedir. Sentetik ve doğal renk maddeleri kullanılan örneklerde ise mailard reaksiyonu ile kahverengileşme olduğu düşünülmektedir. Kopigmentasyon ile kahverengileşme reaksiyonlarına duyarlı antosiyaninlerin stabilitesinin arttırıldığı bildirilmiştir (Boulton, 2001; Gris ve ark., 2007).



**Şekil 4.32.** Yumuşak şekerlemelere ait ton açısı değerlerinin depolama süresine bağlı değişimleri

#### 4.6.1.6. Doygunluk

Yumuşak şekerleme örneklerine ait doygunluk değerleri Çizelge 4.32’de verilmiştir. Örneklerin doygunluk değerleri, sentetik renklendirici için 8.27-19.21, doğal renklendirici için 4.22-20.81, kontrol için 3.11-18.11, 24NP için 5.81-14.18, 24NG için 2.82-14.88, 24NPAS için 5.76-13.25, 24CB için 3.67-16.28, 48CP için 6.51-12.61 ve 48CPAS için 2.92-15.99 arasında değişmiştir.

Çizelge 4.33’de varyans analizi sonuçları, Çizelge 4.34’de Duncan çoklu karşılaştırma testi sonuçları verilmiştir. Depolanan yumuşak şekerlemelerin doygunluk değeri üzerinde örnek ve depolama süresi faktörlerinin ve ‘*örnek × depolama süresi*’ interaksiyonunun istatistiki olarak önemli ( $p < 0.01$ ) olduğu ortaya koyulmuştur.

Depolama boyunca örneklerin doygunluk değerindeki değişim sırasıyla; sentetik %56, doğal %79, kontrol %82, 24NP %55, 24NG %81, 24NPAS %56, 24CB %77, 48CP %48, 48CPAS %81’dir. Kopigmente örnekler arasında doygunluk değerini en iyi koruyan örneğin 48CP olduğu görülmektedir. Kontrolle karşılaştırıldığında 24NP, 24NPAS, 24CB ve 48CP örneklerinin doygunluk değerindeki oransal değişim daha az bulunmuştur. 48CP örneği doygunluk değerini hem kontrolden hem de sentetik ve doğal renklendiricilerden daha iyi korumuştur. Doygunluk değeri renk yoğunluğunu göstermektedir. Bu bakımdan 48 saat fibrilasyona tabi tutulmuş kıvrımlı pirinç proteini renk canlılığı bakımından yumuşak şekerlemelerde tercih edilebilir. Pirinç proteininin %80’ini hidrofobik glutenin içeriği oluşturmakta ve yapısını koruyan ana kuvvetler disülfür bağları ve hidrofobik etkileşimlerdir. Bu nedenle, asit-termal hidrolizle fibril oluşumunu başlatmak uzun zaman almakta ve bu da pirinç proteininde düşük fibrilasyon verimliliğine neden olmaktadır (Zhao ve ark., 2020b). Song ve ark. (2023) çalışmalarında farklı NaCl konsantrasyonlarında pirinç fibrilasyonu gerçekleştirmişlerdir. Çalışma sonucunda NaCl eklemek fibrilasyonu hızlandırmasının yanı sıra daha sağlam yapıda, çözünürlüğü ve fonksiyonel özellikleri gelişmiş protein fibrilleri elde edilmesini sağlamıştır. Özellikle 90 °C’de 24 saat ısıtmadan sonra  $\beta$ -tabaka yapısı artmış ve uzun fibriller oluşmaya başlamıştır.

**Çizelge 4.32.** Yumuşak şekerleme örneklerine ait depolama boyunca doygunluk değerleri<sup>1</sup>

Yumuşak şekerleme çeşidi	Doygunluk				
	0.gün	8.gün	16.gün	24.gün	32.gün
Sentetik	19.21±1.09	15.07±0.71	12.50±0.54	10.26±0.76	8.27±0.26
Doğal	20.81±1.45	14.23±1.91	7.70±1.41	5.59±0.52	4.22±0.19
Kontrol	18.11±1.00	13.60±0.01	8.31±0.42	4.62±0.02	3.11±0.05
24NP <sup>2</sup>	14.18±1.69	8.46±0.90	6.55±0.33	5.81±0.08	6.37±0.11
24NG <sup>3</sup>	14.88±0.76	10.84±0.29	5.94±0.83	4.83±0.50	2.82±0.04
24NPAS <sup>4</sup>	13.25±1.33	5.58±0.11	4.12±0.11	3.58±0.21	5.76±0.46
24CB <sup>5</sup>	16.28±2.47	7.81±0.87	5.88±0.53	5.31±0.06	3.67±0.10
48CP <sup>6</sup>	12.61±0.18	7.23±0.78	6.51±0.60	7.29±0.24	6.54±0.36
48CPAS <sup>7</sup>	15.99±2.22	7.84±0.56	5.05±0.73	4.94±0.08	2.92±0.10

<sup>1</sup>Sonuçlar iki tekerrürün ortalaması±standart hata şeklinde sunulmuştur. <sup>2</sup>24NP: 24 saat nanofibrilasyona tabi tutulan düz pirinç nanofibrili ile kopigmente edilmiş hibiskus tozu katılan yumuşak şekerleme. <sup>3</sup>24NG: 24 saat nanofibrilasyona tabi tutulan düz gluten nanofibrili ile kopigmente edilmiş hibiskus tozu katılan yumuşak şekerleme. <sup>4</sup>24NPAS: 24 saat nanofibrilasyona tabi tutulan düz peynir altı suyu nanofibrili ile kopigmente edilmiş hibiskus tozu katılan yumuşak şekerleme. <sup>5</sup>48CB: 48 saat nanofibrilasyona tabi tutulan kıvrımlı bezelye nanofibrili ile kopigmente edilmiş hibiskus tozu katılan yumuşak şekerleme, <sup>6</sup>48CP: 48 saat nanofibrilasyona tabi tutulan kıvrımlı pirinç nanofibrili ile kopigmente edilmiş hibiskus tozu katılan yumuşak şekerleme. <sup>7</sup>48CPAS: 48 saat nanofibrilasyona tabi tutulan kıvrımlı peynir altı suyu nanofibrili ile kopigmente edilmiş hibiskus tozu katılan yumuşak şekerleme.

Depolama süresince doygunluk değerinde azalma meydana gelmiştir. Doygunluk değeri rengin gücünü göstermekte ve canlılığı ile alakalıdır. Depolama boyunca meydana gelen bu düşüşün antosiyanin pigmentinin çevresel faktörlerden etkilenmesine bağlı olduğu düşünülmektedir. Pigment konsantrasyonunun artmasıyla doygunluğun arttığı, azalmasıyla da azaldığı bildirilmiştir (Sui ve ark., 2016). Yapılan bir çalışmada java eriğinden elde edilen antosiyanin ekstraktını şekerlemelere koyarak 3 hafta boyunca depolamışlar ve depolama süresince doygunluk değerinde düşüş olmuştur (El-Messiry ve ark., 2021). Başka bir çalışmada açai meyvesi ile renklendirilmiş şekerlemeler 6 hafta boyunca depolanmış ve bu süre boyunca doygunluk değerinde azalış meydana gelmiştir (da Silva ve ark., 2016). Renk doygunluğunda olan azalma rengin koyu kırmızıdan açık kırmızıya kaydığını göstermektedir (Wrolstad ve ark., 2005). Sui ve ark. (2016) antosiyanin sulu çözeltilerini 4, 25, 45 ve 65 °C'de depolamışlar ve depolama boyunca doygunluk değerinde azalma olduğunu bildirmişlerdir.

**Çizelge 4.33.** Yumuşak şekerleme örneklerine ait depolama boyunca doygunluk değerlerine ait varyans analiz sonuçları

VK	SD	Doygunluk	
		KO	F
Örnek (A)	8	314.07	49.06**
Depolama süresi (B)	4	1487.80	464.89**
A × B	32	210.56	8.22**
Hata	45		36.00

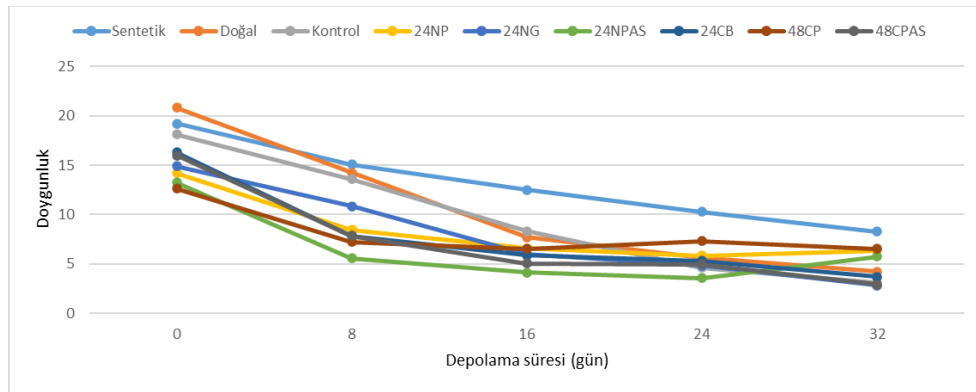
\*\*p<0.01 ve \*p<0.05 düzeyinde önemli. öd: önemli değil

**Çizelge 4.34.** Yumuşak şekerleme örneklerine ait depolama boyunca doygunluk değerlerine ait Duncan çoklu karşılaştırma testi sonuçları<sup>1</sup>

Faktör	n	Doygunluk	
Nanofibrile protein kaynağı	Sentetik	10	13.06±4.27a
	Doğal	10	10.51±6.92b
	Kontrol	10	9.55±6.26bc
	24NP	10	8.27±3.45cd
	24NG	10	7.86±4.91d
	24NPAS	10	6.46±3.91e
	24CB	10	7.79±4.97d
	48CP	10	5.87±11.03d
	48CPAS	10	7.35±5.14de
Depolama süresi (gün)	0	18	10.90±2.77a
	8	18	10.07±3.60b
	16	18	6.95±2.49c
	24	18	5.80±2.05d
	32	18	4.85±1.93e

<sup>1</sup>Farklı harfle işaretlenmiş aynı sütundaki ortalamalar istatistik olarak birbirinden farklıdır (p<0.05).

Şekil 4.33'te farklı yumuşak şekerleme örneklerinin doygunluk değerleri üzerinde etkili '*Örnek x depolama süresi*' interaksyonu gösterilmektedir. Tüm örneklerin doygunluk değerinde depolama boyunca azalma görülmektedir. 24NG örneğinde ilk 16 günde diğer kopigmente örneklerde ise ilk 8 günde belirgin bir azalma meydana gelmiştir. Sentetik örnekte depolama boyunca aynı hızda azalma devam ederken, doğal örnekte ilk 16 günde belirgin 16-32. günler arasında kısmi azalma olmuştur.



**Şekil 4.33.** Yumuşak şekerlemelere ait doygunluk değerlerinin depolama süresine bağlı değişimleri

## 4.6.2. Yoğurt

### 4.6.2.1. Toplam monomerik antosiyanin

Yoğurt örneklerine ait depolama boyunca toplam monomerik antosiyanin değerleri Çizelge 4.35'de mevcuttur. Nanofibrile proteinlerle kopigmente edilen örneklerin antosiyanin değerleri doğal ve kontrol örnekleri ile kıyaslanarak kopigmente

hibiskus tozlarının yoğurtların depolama stabilitesine etkisi belirlenmiştir. Çizelge incelendiğinde depolama boyunca toplam monomerik antosiyanin miktarları doğal renklendirici için 8.35-12.52, kontrol için 4.59-13.78, 24NP için 6.68-12.11, 24NG için 10.02-13.78, 24NPAS için 16.70-12.94, 24CB için 16.28-21.29, 48CP için 13.36-16.70 ve 48CPAS için 15.45-20.04 arasında değişmiştir.

Çizelge 4.36'da varyans analizi sonuçları, Çizelge 4.37'de Duncan çoklu karşılaştırma testi sonuçları verilmiştir. Depolanan yoğurtların toplam monomerik antosiyanin değerleri üzerinde örnek ve depolama süresi faktörlerinin istatistiki olarak önemli ( $p<0.01$ ) etkisi olduğu ortaya konulmuştur.

Nanofibrile protein kaynağına göre değerlendirildiğinde toplam monomerik antosiyanin miktarında depolama boyunca sırasıyla; doğal %33, kontrol %66, 24NP %44, 24NG %27, 24NPAS %22, 24CB %23, 48CP %20 ve 48CPAS %22 azalma meydana gelmiştir. Antosiyanin miktarını en iyi koruyan örnek 48CP'dir. Son zamanlarda pirinç fibrilleri ile ilgili çalışmalar yoğunlaşmıştır (Li ve ark., 2020a; Li ve ark., 2021c; Song ve ark., 2023). Protein iskelet yapısındaki çapraz- $\beta$ -tabaka yapısı ve bol miktarda hidrofobik amino asit içermesi nedeniyle pirinç proteini amiloid fibril oluşumuna çok uygundur (Li ve ark., 2020a). Özellikle NaCl eklenmesi ile nükleasyon sırasında fibrillerin aktivasyon entalpisi azalmakta ve böylece daha fazla peptit üretilebilmektedir (Morel ve ark., 2010). Tuz iyonları, proteinin etkili protein yüzeyini değiştirecek şekilde protein yüzeyine doğrudan bağlanarak, ilk hidrasyon tabakasının suyuyla etkileşime girerek veya protein solvasyon tabakasını değiştirerek etki etmektedir (Zhang ve Cremer, 2006).

**Çizelge 4.35.** Yoğurt örneklerine ait depolama boyunca toplam monomerik antosiyanin değerleri<sup>1</sup>

Yoğurt çeşidi	Toplam Monomerik Antosiyanin (mg S3G/100 g km)				
	0.gün	4.gün	8.gün	12.gün	16.gün
Doğal	12.52±0.90	10.44±0.80	8.77±1.71	9.18±0.76	8.35±0.41
Kontrol	13.78±2.55	11.27±1.43	10.85±1.41	9.60±1.43	4.59±0.42
24NP <sup>2</sup>	12.11±1.20	10.44±0.83	8.77±1.24	7.93±1.42	6.68±2.05
24NG <sup>3</sup>	13.78±1.25	12.94±1.83	11.69±1.65	11.27±1.50	10.02±1.47
24NPAS <sup>4</sup>	16.70±2.02	15.03±0.78	14.61±1.36	14.19±0.87	12.94±3.37
24CB <sup>5</sup>	21.29±1.32	20.46±0.84	19.62±1.23	19.20±1.91	16.28±1.02
48CP <sup>6</sup>	16.70±0.89	16.28±0.92	15.45±1.45	14.19±0.90	13.36±1.43
48CPAS <sup>7</sup>	20.04±1.07	19.62±1.27	18.79±1.41	16.28±0.60	15.45±0.84

<sup>1</sup>Sonuçlar iki tekerrürün ortalaması±standart hata şeklinde sunulmuştur. <sup>2</sup>24NP: 24 saat nanofibrilasyona tabi tutulan düz bezelye nanofibrilli ile kopigmente edilmiş hibiskus tozu katılan yoğurt. <sup>3</sup>24NG: 24 saat nanofibrilasyona tabi tutulan düz gluten nanofibrilli ile kopigmente edilmiş hibiskus tozu katılan yoğurt. <sup>4</sup>24NPAS: 24 saat nanofibrilasyona tabi tutulan düz peynir altı suyu nanofibrilli ile kopigmente edilmiş hibiskus tozu katılan yoğurt. <sup>5</sup>48CB: 48 saat nanofibrilasyona tabi tutulan kıvrımlı bezelye nanofibrilli ile kopigmente edilmiş hibiskus tozu katılan yoğurt. <sup>6</sup>48CP: 48 saat nanofibrilasyona tabi tutulan kıvrımlı pirinç nanofibrilli ile kopigmente edilmiş hibiskus tozu katılan yoğurt. <sup>7</sup>48CPAS: 48 saat nanofibrilasyona tabi tutulan kıvrımlı peynir altı suyu nanofibrilli ile kopigmente edilmiş hibiskus tozu katılan yoğurt.

Görüldüğü gibi kopigmente örnekler antosiyanin miktarını kontrole oranla çok daha iyi muhafaza etmişlerdir. Literatürde protein fibrillerinin renk pigmentlerinin stabilitesini sağlamada başarılı olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur (Ma ve Jing, 2020; Zhao ve ark., 2020a). Yapılan bir çalışmada kafeik asit ile kopigmente edilen üzüm ekstraktları model gıda olarak yoğurda eklenmiştir. Yoğurtlar 45 gün boyunca buzdolabı sıcaklığında depolanmış ve antosiyanin stabilitesi izlenmiştir. Kopigmente örneklerin kontrole oranla yoğurttaki antosiyanin stabilizasyonunu daha iyi sağladığı bulunmuştur (Gris ve ark., 2007).

**Çizelge 4.36.** Yoğurt örneklerine ait depolama boyunca toplam monomerik antosiyanin değerlerine ait varyans analiz sonuçları

VK	SD	Toplam monomerik antosiyanin (mg S3G/100 g km)	
		KO	F
Örnek (A)	7	1043.07	75.27**
Depolama süresi (B)	4	220.91	27.90**
A × B	28	39.59	0.71öd
Hata	40		79.19

\*\*p<0.01 ve \*p<0.05 düzeyinde önemli. öd: önemli değil

Depolama boyunca antosiyanin miktarında %30 azalma meydana gelmiştir. Baria ve ark. (2021) çalışmalarında yoğurda sentetik renklendirici yerine doğal kara havuç antosiyaninlerini ekleyerek 15 gün boyunca 7±1 °C’ de depolamışlardır. Depolama boyunca antosiyanin miktarında %3.7 azalma gözlenmiştir. Antosiyaninlerin polimerizasyona uğrayarak ve endojen veya eksojen enzimler tarafından bozularak konsantrasyonunda azalma meydana geldiği belirtilmiştir (Skrede ve ark., 2004). Yoğurta bulunan metabolitlerin, özellikle de hidrojen peroksitin, antosiyaninlerin oksidasyon yoluyla bozunmasını hızlandırabileceği düşünülmektedir (Ścibisz ve ark., 2012). Szołtysik ve ark. (2021), siyanidin, pelargonidin ve peonidine zengin mavi hanımeli meyvesi ekstraktıyla renklendirdikleri yoğurtları 14 gün boyunca depolamışlar ve depolama boyunca antosiyanin miktarında %42 azalma meydana geldiğini belirlemişlerdir. Yapılan bir çalışmada yoğurda antosiyanince zengin çilek ekstraktı eklenerek 28 gün boyunca 2 °C’de depolanmıştır. Depolama boyunca antosiyanin miktarında %24 bir azalma meydana geldiği bildirilmiştir (Oliveira ve ark., 2015). Byamukama ve ark. (2014) dut antosiyaninlerini yoğurda ekleyerek 2 hafta boyunca 8 °C sıcaklıkta depolamaya tabi tutmuşlar ve depolama sonunda antosiyanin miktarında %20 kayıp meydana geldiğini belirtmişlerdir. Yapılan başka bir çalışmada farklı üzüm çeşitleri ile yoğurdu zenginleştirerek 14 gün boyunca 4 °C sıcaklıkta depolamışlar ve depolama

süresince antosiyanin miktarında %40 azalma meydana geldiğini bildirmişlerdir (Karaaslan ve ark., 2011).

**Çizelge 4.37.** Yoğurt örneklerine ait depolama boyunca toplam monomerik antosiyanin değerlerine ait Duncan çoklu karşılaştırma testi sonuçları<sup>1</sup>

Faktör	n	Toplam monomerik antosiyanin (mg S3G/100 g km)	
Nanofibrile protein kaynağı	Doğal	10	9.85±1.69d
	Kontrol	10	10.02±3.39cd
	24NP	10	9.18±2.13d
	24NG	10	11.94±1.46c
	24NPAS	10	14.7±1.37b
	24CB	10	19.37±1.90a
	48CP	10	15.20±1.40b
	48CPAS	10	18.03±2.05a
Depolama süresi (gün)	0	16	15.86±3.43a
	4	16	14.56±3.98ab
	8	16	13.57±4.23bc
	12	16	12.73±3.90c
	16	16	10.96±4.22d

<sup>1</sup>Farklı harfle işaretlenmiş aynı sütundaki ortalamalar istatistiki olarak birbirinden farklıdır (p<0.05).

#### 4.6.2.2. $L^*$ (parlaklık)

Yoğurt örneklerine ait  $L^*$  değerlerindeki depolama boyunca değişim Çizelge 4.38’de verilmiştir. Örneklerin  $L^*$  değerleri, sentetik renklendirici için 73.98-74.6, doğal renklendirici için 67.94-70.03, kontrol için 62.17-63.32, 24NP için 64.49-65.71, 24NG için 63.13-65.86, 24NPAS için 63.18-66.91, 24CB için 65.24-66.50, 48CP için 65.76-66.48 ve 48CPAS için 65.15-67.24 arasında değişmiştir.

Çizelge 4.39’da varyans analizi sonuçları, Çizelge 4.40’da Duncan çoklu karşılaştırma testi sonuçları verilmiştir. Yoğurtların  $L^*$  değeri üzerinde örnek ve depolama süresi faktörlerinin ve ‘örnek × depolama süresi’ interaksiyonunun istatistiki olarak önemli (p<0.01) olduğu ortaya koyulmuştur.

Çizelge 4.40 incelendiğinde  $L^*$  değeri bakımından örnekler sırasıyla yüksekten düşüğe sentetik renklendirici, doğal renklendirici, 48CPAS, 48CP, 24CB, 24NPAS, 24NG=24NP ve kontrol şeklindedir. Sentetik renklendirici ile renklendirilen yoğurt örnekleri diğerlerine oranla daha koyu kırmızı olduğundan  $L^*$  değeri yüksek bulunmuştur. Baria ve ark. (2021) çalışmalarında sentetik renk maddesi ile renklendirdikleri yoğurtların  $L^*$  değerinin yaban mersini ile renklendirdikleri yoğurtlardan daha yüksek olduğunu bulmuşlar ve bunun yoğurda katılan sentetik boyanın özelliklerinden kaynaklandığını belirtmişlerdir. Carvalho ve ark. (2020) Jamelao

kapsülleri ile yoğurdu renklendirip 28 gün depoladıkları çalışmada kapsüllü yoğurtların mor rengin etkisiyle kontrole oranla  $L^*$  değerlerinin daha düşük olduğunu belirtmişlerdir.

**Çizelge 4.38.** Yoğurt örneklerine ait depolama boyunca  $L^*$  değerleri<sup>1</sup>

Yoğurt çeşidi	$L^*$				
	0.gün	4.gün	8.gün	12.gün	16.gün
Sentetik	74.60±0.22	74.47±0.04	73.98±0.04	74.87±0.00	74.51±0.01
Doğal	70.03±0.03	69.03±0.06	67.94±0.74	69.26±0.08	68.56±0.04
Kontrol	63.10±0.01	63.16±0.03	62.95±0.00	62.17±0.01	63.32±0.00
24NP <sup>2</sup>	65.25±0.03	64.49±0.56	64.66±0.03	65.71±0.01	65.02±0.26
24NG <sup>3</sup>	65.79±0.05	65.86±0.13	64.09±0.44	66.23±0.39	63.13±0.56
24NPAS <sup>4</sup>	66.91±0.25	65.76±0.02	63.18±1.30	64.63±0.32	65.95±0.00
24CB <sup>5</sup>	65.57±0.31	65.88±0.01	65.66±0.02	66.50±0.06	65.24±1.05
48CP <sup>6</sup>	66.30±0.02	66.35±0.02	66.06±0.02	66.48±0.51	65.76±0.47
48CPAS <sup>7</sup>	67.24±0.04	66.93±0.04	66.58±0.03	66.38±0.12	65.15±0.45

<sup>1</sup>Sonuçlar iki tekerrürün ortalaması±standart hata şeklinde sunulmuştur. <sup>2</sup>24NP: 24 saat nanofibrilasyona tabi tutulan düz pirinç nanofibrili ile kopigmente edilmiş hibiskus tozu katılan yoğurt. <sup>3</sup>24NG: 24 saat nanofibrilasyona tabi tutulan düz gluten nanofibrili ile kopigmente edilmiş hibiskus tozu katılan yoğurt. <sup>4</sup>24NPAS: 24 saat nanofibrilasyona tabi tutulan düz peynir altı suyu nanofibrili ile kopigmente edilmiş hibiskus tozu katılan yoğurt. <sup>5</sup>48CB: 48 saat nanofibrilasyona tabi tutulan kıvrımlı bezelye nanofibrili ile kopigmente edilmiş hibiskus tozu katılan yoğurt. <sup>6</sup>48CP: 48 saat nanofibrilasyona tabi tutulan kıvrımlı pirinç nanofibrili ile kopigmente edilmiş hibiskus tozu katılan yoğurt. <sup>7</sup>48CPAS: 48 saat nanofibrilasyona tabi tutulan kıvrımlı peynir altı suyu nanofibrili ile kopigmente edilmiş hibiskus tozu katılan yoğurt.

**Çizelge 4.39.** Yoğurt örneklerine ait depolama boyunca  $L^*$  değerlerine ait varyans analiz sonuçları

VK	SD	$L^*$	
		KO	F
Örnek (A)	8	887.17	921.32**
Depolama süresi (B)	4	14.99	31.14**
A × B	32	32.94	8.55**
Hata	45		5.41

\*\*p<0.01 ve \*p<0.05 düzeyinde önemli. öd: önemli değil

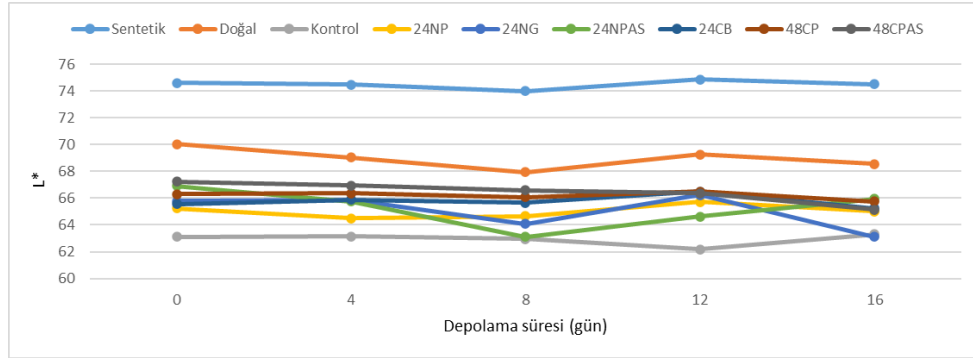
Depolama boyunca örneklerin  $L^*$  değerlerinde depolama süresince varyasyon gözlenmiştir. Trigueros ve ark. (2014) yoğurda nar suyu ekleyerek 28 gün boyunca buzdolabı sıcaklığında depolamışlardır.  $L^*$  değerinin depolama süresince istatistiksel olarak benzer olduğunu bildirmişlerdir. Bu sonuç araştırmacılar tarafından moleküller arası, moleküller içi veya kendi kendine birleşme ile meydana gelen kopigmentasyonun etkisiyle renkte stabilizasyon sağlanmasının bir sonucu olarak açıklanmıştır. Baria ve ark. (2021) çalışmalarında yoğurdu yaban mersini ekstraktı ile fonksiyonelleştirmiş ve 8 hafta boyunca depolamışlardır. Bu çalışmada da hem kontrol hem deney grubunda depolama süresince  $L^*$  değerlerinde önemli bir değişim gözlenmemiştir.

**Çizelge 4.40.** Yoğurt örneklerine ait depolama boyunca  $L^*$  değerlerine ait Duncan çoklu karşılaştırma testi sonuçları<sup>1</sup>

Faktör	n	$L^*$	
Nanofibrile protein kaynağı	Sentetik	10	74.44±0.33a
	Doğal	10	68.86±0.97b
	Kontrol	10	62.95±0.45g
	24NP	10	64.91±0.60f
	24NG	10	64.83±1.49f
	24NPAS	10	65.08±1.87ef
	24CB	10	65.58±0.75de
	48CP	10	66.06±0.38cd
	48CPAS	10	66.38±0.94c
Depolama süresi (gün)	0	18	67.20±3.33a
	4	18	66.88±3.49a
	8	18	66.12±3.60b
	12	18	66.91±3.76a
	16	18	66.29±3.67b

<sup>1</sup>Farklı harfle işaretlenmiş aynı sütundaki ortalamalar istatistiki olarak birbirinden farklıdır ( $p < 0.05$ ).

Şekil 4.34’de farklı yoğurt örneklerinin  $L^*$  değerleri üzerinde etkili ‘Örnek x depolama süresi’ interaksyonu gösterilmektedir. 24NG örneği haricinde  $L^*$  değerinde depolama boyunca önemli değişiklikler meydana gelmemiştir. 24 NG örneğinde ise depolama süresince zaman zaman artış ve azalışlar görülmektedir.



**Şekil 4.34.** Yoğurtlara ait  $L^*$  değerlerinin depolama süresine bağlı değişimleri

#### 4.6.2.3. $a^*$ (kırmızılık)

Yoğurt örneklerinin  $a^*$  değerlerinin sırasıyla sentetik renklendirici için 19.52-19.10, doğal renklendirici için 13.10-12.99, kontrol için 9.29-13.58, 24NP için 6.86-10.30, 24NG için 7.89-9.83, 24NPAS için 7.33-9.83, 24CB için 7.33-10.04, 48CP için 8.10-9.62 ve 48CPAS için 7.73-19.10 değerleri arasında değiştiği görülmektedir (Çizelge 4.41).  $a^*$  değerleri bakımından sentetik ve nanofibrile proteinler ile kopigmente edilen örneklerin arasında önemli farklılıkların bulunmaması kopigmente örneklerin sentetiğe alternatif olabileceğini göstermektedir. Pires ve ark. (2018) çalışmalarında gül,

peygamber çiçeği ve yıldız çiçeğinden elde edilen doğal renklendiricileri yoğurda ekleyerek 7 gün boyunca depolamışlardır. Sentetik ve doğal renklendiriciler katılan örnekler arasında  $a^*$  değerleri bakımından önemli farklılıklar gözlenmemiştir. Bu nedenle bu doğal renklendiriciler ile renklendirilen yoğurtların sentetik boyalara (E163 vb.) alternatif olabileceğini bildirmişlerdir.

Çizelge 4.42’de verilen varyans analiz sonuçlarına göre depolanan yoğurtların  $a^*$  değeri üzerinde örnek ve depolama süresi faktörlerinin ve ‘*örnek × depolama süresi*’ interaksiyonunun istatistiki olarak önemli ( $p < 0.01$ ) olduğu ortaya koyulmuştur.

**Çizelge 4.41.** Yoğurt örneklerine ait depolama boyunca  $a^*$  değerleri<sup>1</sup>

Yoğurt çeşidi	$a^*$				
	0.gün	4.gün	8.gün	12.gün	16.gün
Sentetik	19.10±0.16	19.00±0.03	19.70±0.08	19.72±0.10	19.52±0.06
Doğal	13.10±0.10	13.58±0.03	13.56±0.06	13.30±0.04	12.99±0.28
Kontrol	9.29±0.02	8.49±0.00	7.88±0.63	6.86±0.03	7.40±0.06
24NP <sup>2</sup>	10.30±0.03	9.63±0.01	9.51±0.06	8.75±0.57	7.89±0.38
24NG <sup>3</sup>	9.83±0.04	8.85±0.08	8.24±0.32	8.19±0.03	6.40±0.01
24NPAS <sup>4</sup>	7.30±0.05	8.91±0.02	7.35±0.56	7.39±0.12	7.33±0.01
24CB <sup>5</sup>	10.04±0.28	9.39±0.01	9.00±0.10	8.78±0.05	8.10±0.10
48CP <sup>6</sup>	9.62±0.03	8.78±0.05	8.54±0.03	8.06±0.23	7.73±0.14
48CPAS <sup>7</sup>	8.80±0.1	8.49±0.01	8.17±0.07	7.60±0.01	6.27±0.21

<sup>1</sup>Sonuçlar iki tekerrürün ortalaması±standart hata şeklinde sunulmuştur. <sup>2</sup>24NP: 24 saat nanofibrilasyona tabi tutulan düz pirinç nanofibrili ile kopigmente edilmiş hibiskus tozu katılan yoğurt. <sup>3</sup>24NG: 24 saat nanofibrilasyona tabi tutulan düz gluten nanofibrili ile kopigmente edilmiş hibiskus tozu katılan yoğurt. <sup>4</sup>24NPAS: 24 saat nanofibrilasyona tabi tutulan düz peynir altı suyu nanofibrili ile kopigmente edilmiş hibiskus tozu katılan yoğurt. <sup>5</sup>48CB: 48 saat nanofibrilasyona tabi tutulan kıvrımlı bezelye nanofibrili ile kopigmente edilmiş hibiskus tozu katılan yoğurt, <sup>6</sup>48CP: 48 saat nanofibrilasyona tabi tutulan kıvrımlı pirinç nanofibrili ile kopigmente edilmiş hibiskus tozu katılan yoğurt. <sup>7</sup>48CPAS: 48 saat nanofibrilasyona tabi tutulan kıvrımlı peynir altı suyu nanofibrili ile kopigmente edilmiş hibiskus tozu katılan yoğurt.

Çizelge 4.43’te yoğurt örneklerinin  $a^*$  değerlerine ait Duncan çoklu karşılaştırma testi sonuçları verilmiştir. Örnekler arasında en yüksek  $a^*$  değerine sentetik renklendirici kullanılan örnek, en düşük  $a^*$  değerine ise 48CPAS örneği sahiptir. Baria ve ark. (2021) çalışmalarında yoğurdu yaban mersini özü ile renklendirmiş ve kontrol olarak sentetik renk maddesi (eritrosin) kullanmıştır. Sonuç olarak eritrosin ile renklendirilen yoğurtların  $a^*$  değerlerini daha yüksek bulmuştur. Bu durumu katılan renk maddesinin renklendirme özelliklerine bağlamıştır. Kopigmente örnekler arasında en yüksek  $a^*$  değeri 24NP örneğine aittir. Çalışmamızda 24 saat fibrilasyona tabi tutulan düz pirinç kopigmentleri ilave edilen yoğurdun en yüksek  $a^*$  değerini vermesi antosiyaninlerle etkileşime girerek kaybını azalttığını ve kırmızı rengi koruduğunu göstermektedir. Literatürde polifenolik bileşikler ile amiloid benzeri pirinç fibrilleri arasındaki etkileşime ilişkin çalışmalar artmaktadır (Chen ve ark., 2024; Zhang ve ark., 2024). Fenolik bileşikler kovalent olmayan ve kovalent bağlar yoluyla pirinç protein fibrilleriyle güçlü bir şekilde

etkileşime girebilmektedir (Chen ve ark., 2024). Bazı araştırmalar, polifenollerin amiloid benzeri fibrillerin yüzeyinde etkili bir şekilde adsorbe edildiğini ve biriktiğini, bunun da supramoleküler nanofibrillerin oluşumuna yol açtığını ileri sürmektedir (Lu ve ark., 2020).

**Çizelge 4.42.** Yoğurt örneklerine ait depolama boyunca  $a^*$  değerlerine ait varyans analiz sonuçları

VK	SD	$a^*$	
		KO	F
Örnek (A)	8	1194.31	5482.80**
Depolama süresi (B)	4	26.31	241.57**
A × B	32	22.07	25.33**
Hata	45		1.22

\*\* $p < 0.01$  ve \* $p < 0.05$  düzeyinde önemli. öd: önemli değil

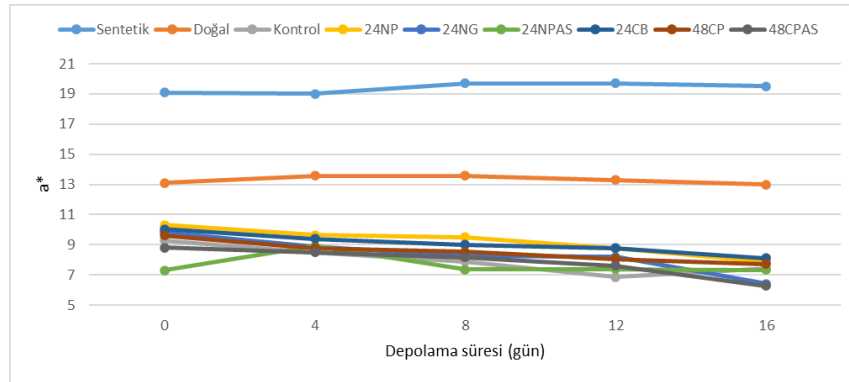
16 günlük depolama süresi boyunca  $a^*$  değerinde istatistiksel olarak önemli bir azalış meydana gelmiştir. Ścibisz ve ark. (2012) çalışmalarında yoğurdu yaban mersini ekstraktı ile renklendirmişler ve 8 haftalık depolama süresi boyunca  $a^*$  değerinde azalma meydana geldiğini bunun da antosiyanin içeriğinde meydana gelen düşüşe bağlı olduğunu belirtmişlerdir. Pinto ve ark. (2023) yoğurda renk maddesi olarak antosiyanin açısından zengin jaboticaba kabuğundan elde ettikleri ekstraktı eklemişler ve depolama boyunca antosiyaninlerin stabilitesinin düşük olmasından kaynaklı hem  $a^*$  değerinde hem de toplam monomerik antosiyanin miktarında bir düşüş olduğunu ortaya koymuşlardır. Du ve ark. (2021) dut pulpu ile renklendirdikleri yoğurtları 28 gün boyunca buzdolabı sıcaklığında depolamışlardır. Depolama boyunca  $L^*$  ve  $a^*$  değerlerinde azalma olduğu sonucuna varmışlardır.

**Çizelge 4.43.** Yoğurt örneklerine ait depolama boyunca  $a^*$  değerlerine ait Duncan çoklu karşılaştırma testi sonuçları<sup>1</sup>

Faktör	n	$a^*$	
Nanofibrile protein kaynağı	Sentetik	10	19.41±0.34a
	Doğal	10	13.31±0.27b
	Kontrol	10	7.98±0.95ef
	24NP	10	9.22±0.92c
	24NG	10	8.30±1.25e
	24NPAS	10	7.66±0.70g
	24CB	10	9.06±0.72de
	48CP	10	8.55±0.73cd
	48CPAS	10	7.87±1.00fg
Depolama süresi (gün)	0	18	10.82±3.46a
	4	18	10.57±3.69b
	8	18	10.22±4.19c
	12	18	9.85±4.34d
	16	18	9.29±4.45e

<sup>1</sup>Farklı harfle işaretlenmiş aynı sütundaki ortalamalar istatistiksel olarak birbirinden farklıdır ( $p < 0.05$ ).

Şekil 4.35'te farklı yoğurt örneklerinin  $a^*$  değerleri üzerinde etkili '*Örnek x depolama süresi*' interaksiyonu gösterilmektedir. Kopigmente örneklerde depolama boyunca genel olarak  $a^*$  değerinde azalma söz konusudur. 24NPAS örneğinde depolamanın ilk 4 gününde  $a^*$  değerinde artış olmuştur. 4-8. günler arasında ise azalma meydana gelmiştir. Tüm depolama sürecine baktığımızda ise  $a^*$  değerinde herhangi bir değişiklik meydana gelmemiştir. Sentetik ve doğal örneklerde de depolama süresince istatistiki anlamda önemli bir değişiklik olmamıştır.



Şekil 4.35. Yoğurtlara ait  $a^*$  değerlerinin depolama süresine bağlı değişimleri

#### 4.6.2.4. $b^*$ (sarılık)

Depolama boyunca yoğurt örneklerine ait  $b^*$  değerleri Çizelge 4.44'de verilmiştir. Örneklerin  $b^*$  değerleri, sentetik renklendirici için 10.90-11.81, doğal renklendirici için 3.02-3.60, kontrol için 9.16-11.06, 24NP için 7.56-8.58, 24NG için 7.89-8.67, 24NPAS için 7.15-8.56, 24CB için 7.67-8.66, 48CP için 8.35-9.19 ve 48CPAS için 7.89-8.49 arasında değişmiştir.

Çizelge 4.27'de varyans analizi sonuçları, Çizelge 4.28'de Duncan çoklu karşılaştırma testi sonuçları verilmiştir. Depolanan yoğurtların  $b^*$  değeri örnek ve depolama süresi faktörlerinin ve '*örnek x depolama süresi*' interaksiyonunun istatistiki olarak önemli ( $p < 0.01$ ) etkisi olduğu ortaya koyulmuştur.

Duncan çoklu karşılaştırma çizelgesi incelendiğinde nanofibrile protein kaynağı bakımından  $b^*$  değerleri yüksekten düşüğe doğru sentetik renklendirici, kontrol, 48CP, 24CB, 48CPAS=24NG, 24NP, 24NPAS ve doğal renklendirici şeklinde sıralanmaktadır.

**Çizelge 4.44.** Yoğurt örneklerine ait depolama boyunca  $b^*$  değerleri<sup>1</sup>

Yoğurt çeşidi	$b^*$				
	0.gün	4.gün	8.gün	12.gün	16.gün
Sentetik	10.90±0.02	10.90±0.03	11.16±0	11.81±0.13	11.39±0.03
Doğal	3.23±0.01	3.02±0.01	3.47±0.02	3.58±0	3.60±0.03
Kontrol	10.21±0.03	10.40±0.04	10.71±0	9.16±0.25	11.06±0.01
24NP <sup>2</sup>	7.56±0.02	7.81±0.02	8.26±0.03	8.23±0.06	8.58±0.12
24NG <sup>3</sup>	7.89±0.02	8.15±0.01	8.22±0.18	8.67±0.01	8.06±0
24NPAS <sup>4</sup>	7.15±0.13	7.78±0.01	7.18±0.56	7.78±0.17	8.56±0.01
24CB <sup>5</sup>	7.67±0.19	8.10±0	8.31±0.05	8.56±0.02	8.66±0.1
48CP <sup>6</sup>	8.35±0	8.60±0.01	8.89±0.03	8.89±0.2	9.19±0.08
48CPAS <sup>7</sup>	7.89±0.02	8.23±0.01	8.46±0.01	8.49±0.02	8.22±0.11

<sup>1</sup>Sonuçlar iki tekerrürün ortalaması±standart hata şeklinde sunulmuştur. <sup>2</sup>24NP: 24 saat nanofibrilasyona tabi tutulan düz bezelye nanofibrili ile kopigmente edilmiş hibiskus tozu katılan yoğurt. <sup>3</sup>24NG: 24 saat nanofibrilasyona tabi tutulan düz gluten nanofibrili ile kopigmente edilmiş hibiskus tozu katılan yoğurt. <sup>4</sup>24NPAS: 24 saat nanofibrilasyona tabi tutulan düz peynir altı suyu nanofibrili ile kopigmente edilmiş hibiskus tozu katılan yoğurt. <sup>5</sup>48CB: 48 saat nanofibrilasyona tabi tutulan kıvrımlı bezelye nanofibrili ile kopigmente edilmiş hibiskus tozu katılan yoğurt. <sup>6</sup>48CP: 48 saat nanofibrilasyona tabi tutulan kıvrımlı pirinç nanofibrili ile kopigmente edilmiş hibiskus tozu katılan yoğurt. <sup>7</sup>48CPAS: 48 saat nanofibrilasyona tabi tutulan kıvrımlı peynir altı suyu nanofibrili ile kopigmente edilmiş hibiskus tozu katılan yoğurt.

Sentetik renk maddesi doğal, kontrol ve nanofibrile proteinlerle kopigmente edilen örneklere oranla daha koyu bir renk verdiği için  $b^*$  değeri de yüksek bulunmuştur. Nanofibrile proteinlerle kopigmente edilen örneklerin  $b^*$  değerleri kontrole oranla daha düşük bulunmuştur.  $a^*$  değerinin yüksek,  $b^*$  değerininse düşük olması kırmızı renkli ürünlerde talep edilen bir durumdur. Kopigmente örnekler kontrole oranla ürünün kırmızılığını daha iyi muhafaza ederek renksiz veya sarımsı formlara dönüşmesini engellemiştir. Baria ve ark. (2021) yaptıkları çalışmada kontrol yoğurdunun (eritrosin katkılı)  $b^*$  değerinin antosiyanin katkılı yoğurtlardan daha yüksek olduğunu bunun nedenininse antosiyanin konsantrasyonunun artmasıyla yoğurt renginin mora dönmesinden kaynaklı olduğunu bildirmişlerdir.

**Çizelge 4.45.** Yoğurt örneklerine ait depolama boyunca  $b^*$  değerlerine ait varyans analiz sonuçları

VK	SD	$b^*$	
		KO	F
Örnek (A)	8	374.63	3457.68**
Depolama süresi (B)	4	5.21	96.24**
A × B	32	7.74	17.88**
Hata	45		0.60

\*\*p<0.01 ve \*p<0.05 düzeyinde önemli. öd: önemli değil

16 günlük depolama süresi boyunca  $b^*$  değerinde bir artış meydana gelmiştir.  $b^*$  değeri sarılık değeridir ve artması sarılıkta artış olduğunu göstermektedir. Meydana gelen antosiyanin parçalanması ile kırmızı renkte azalış sarı renkte artış olmuştur. Şcibisz ve

ark. (2012) çalışmalarında yaban mersini ekstraktı ile renklendirdiği yoğurtları 8 hafta boyunca depolayarak antosiyanin stabilitesi ve renk değerlerini ölçmüşlerdir. Örneklerin  $b^*$  değerlerinde depolama boyunca önemli artış görülmüştür. Bu durumun antosiyaninin renkli flavilyum katyonunun renksiz veya sarımsı formlara dönüşmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Yoğurdun yaban mersini ekstraktı ile renklendirildiği başka bir çalışmada 8 haftalık depolama süresi boyunca  $b^*$  değerinde artış meydana gelmiştir.  $b^*$  değerindeki artış mavimsi kuinon bazının kırmızı flavilyum katyonuna dönüşerek mavilikte azalma olduğunu göstermektedir (Baria ve ark., 2021). Anuyahong ve ark. (2020) çalışmalarında mor pirinç ile renklendirdikleri yoğurt örneklerini 21 gün boyunca buzdolabında depolamışlar ve depolama süresi boyunca yoğurtların renk morfolojisinde meydana gelen deformasyonlardan dolayı  $b^*$  değerinde artış,  $a^*$  ve  $L^*$  değerinde azalma olduğunu bildirmişlerdir. Yapılan başka bir çalışmada Jamelao kapsülleri ile yoğurt renklendirilip 28 gün boyunca depolamaya tabi tutulmuş ve depolama süresince renk değerlerini gözlemlenmiştir. Zaman geçtikçe sarı renklenmede bir artış gözlenmiştir (Carvalho ve ark., 2020). Renk parametrelerindeki bu değişikliğin çalışılan depolama süresinde antosiyaninlerde bozulma meydana geldiğinden oksidasyon reaksiyonunun oluşmasıyla ilgili olduğu düşünülmektedir (do Carmo Brito ve ark., 2017).

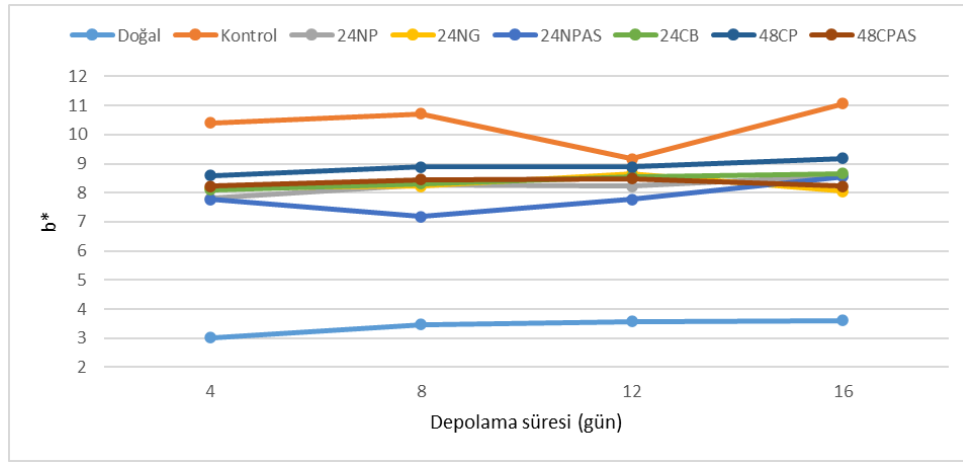
**Çizelge 4.46.** Yoğurt örneklerine ait depolama boyunca  $b^*$  değerlerine ait Duncan çoklu karşılaştırma testi sonuçları<sup>1</sup>

Faktör	n	$b^*$	
Nanofibrile protein kaynağı	Sentetik	10	11.23±0.38a
	Doğal	10	3.38±0.25g
	Kontrol	10	10.31±0.72b
	24NP	10	8.09±0.40e
	24NG	10	8.20±0.29de
	24NPAS	10	7.69±0.58f
	24CB	10	8.26±0.40d
	48CP	10	8.78±0.32c
	48CPAS	10	8.26±0.24de
Depolama süresi (gün)	0	18	7.87±2.15d
	4	18	8.11±2.09c
	8	18	8.29±2.36b
	12	18	8.35±2.27b
	16	18	8.60±2.37a

<sup>1</sup>Farklı harfle işaretlenmiş aynı sütundaki ortalamalar istatistiki olarak birbirinden farklıdır (p<0.05).

Şekil 4.36'da farklı yoğurt örneklerinin  $b^*$  değerleri üzerinde etkili '*Örnek x depolama süresi*' interaksyonu gösterilmektedir. Tüm örneklerin  $b^*$  değerlerinde depolama süresi boyunca artış meydana gelmiştir. Kontrol örneğinin  $b$  değeri 8-12. günler arasında azalırken 12-16. günler arasında tekrardan artış göstererek başlangıçtan daha yüksek bir değere ulaşmıştır. Doğal örneğin  $b^*$  değeri diğer örneklerden daha düşük bir

değerde seyretmiştir. Bunun nedeninin doğal renk maddesinin verdiği kendine özgü renkten kaynaklandığı düşünülmektedir.



Şekil 4.36. Yoğurtlara ait b\* değerlerinin depolama süresine bağlı değişimleri

#### 4.6.2.5. Ton açısı

Yoğurt örneklerinin ton açısı değerlerinin sırasıyla sentetik renklendirici için 29.53-30.93, doğal renklendirici için 12.54-15.48, kontrol için 47.69-56.2, 24NP için 36.29-47.42, 24NG için 38.75-51.54, 24NPAS için 41.14-49.43, için 24CB 37.40-46.93, 48CP için 40.96-49.94 ve 48CPAS için 41.88-52.65 değerleri arasında değiştiği görülmektedir (Çizelge 4.47).

Çizelge 4.47. Yoğurt örneklerine ait depolama boyunca ton açısı değerleri<sup>1</sup>

Yoğurt çeşidi	Ton açısı				
	0.gün	4.gün	8.gün	12.gün	16.gün
Sentetik	29.73±0.27	29.84±0.11	29.53±0.09	30.93±0.41	30.25±0
Doğal	13.86±0.07	12.54±0.01	14.35±0.02	15.08±0.05	15.48±0.19
Kontrol	47.69±0	50.76±0.08	52.15±0.01	53.17±0.63	56.2±0.18
24NP <sup>2</sup>	36.29±0.05	39.03±0.03	40.96±0.07	43.28±1.62	47.42±0.98
24NG <sup>3</sup>	38.75±0.2	42.67±0.02	44.95±0.47	46.64±0.06	51.54±0.02
24NPAS <sup>4</sup>	44.4±0.34	41.14±0.04	44.33±0.06	46.47±0.16	49.43±0.06
24CB <sup>5</sup>	37.4±0.09	40.78±0.01	42.74±0.16	44.28±0.08	46.93±0.03
48CP <sup>6</sup>	40.96±0.06	44.41±0.03	46.13±0.01	47.79±0.17	49.94±0.28
48CPAS <sup>7</sup>	41.88±0.25	44.11±0.01	45.98±0.2	48.15±0.1	52.65±0.77

<sup>1</sup>Sonuçlar iki tekerrürün ortalaması±standart hata şeklinde sunulmuştur. <sup>2</sup>24NP: 24 saat nanofibrilasyona tabi tutulan düz bezelye nanofibrili ile kopigmente edilmiş hibiskus tozu katılan yoğurt. <sup>3</sup>24NG: 24 saat nanofibrilasyona tabi tutulan düz gluten nanofibrili ile kopigmente edilmiş hibiskus tozu katılan yoğurt. <sup>4</sup>24NPAS: 24 saat nanofibrilasyona tabi tutulan düz peynir altı suyu nanofibrili ile kopigmente edilmiş hibiskus tozu katılan yoğurt. <sup>5</sup>48CB: 48 saat nanofibrilasyona tabi tutulan kıvrımlı bezelye nanofibrili ile kopigmente edilmiş hibiskus tozu katılan yoğurt, <sup>6</sup>48CP: 48 saat nanofibrilasyona tabi tutulan kıvrımlı pirinç nanofibrili ile kopigmente edilmiş hibiskus tozu katılan yoğurt. <sup>7</sup>48CPAS: 48 saat nanofibrilasyona tabi tutulan kıvrımlı peynir altı suyu nanofibrili ile kopigmente edilmiş hibiskus tozu katılan yoğurt.

Çizelge 4.48’de verilen varyans analiz sonuçlarına göre depolanan yoğurtların ton açısı değeri üzerinde örnek ve depolama süresi faktörlerinin ve ‘*örnek × depolama süresi*’ interaksiyonunun istatistiki olarak önemli ( $p<0.01$ ) etkisi olduğu ortaya koyulmuştur.

Çizelge 4.49’da yoğurt örneklerinin ton açısı değerlerine ait Duncan çoklu karşılaştırma testi sonuçları verilmiştir. Örneklerin ton açısı değerleri yüksekten düşüğe sırasıyla kontrol, 48CPAS, 48CP, 24NPAS = 24NG, 24CB, 24NP, sentetik renklendirici ve doğal renklendirici şeklinde sıralanmaktadır. Nanofibrile proteinlerle kopigmente edilen örneklerin ton açısı değerleri kontrole oranla daha düşük bulunmuştur. Kontrolden düşük bulunması nedeniyle kopigmentasyon ile kahverengi polimerizasyon ürünlerinin daha az oluştuğu ve rengin daha iyi korunduğu söylenebilir (Ścibisz ve ark., 2019). Ton açısı değeri antosiyaninlerin görsel olarak algılanabilir renk geçişlerini göstermektedir (Burtch ve ark., 2017). Sentetik ve doğal örneklerin başlangıç ton açısı değerleri kopigmente örneklerden daha düşük olduğu için kopigmente örneklerin ton açısı değerleri bunlardan yüksek bulunmuştur. Wallace ve Giusti (2008) yaptıkları çalışmada sentetik renk maddesi (FD&C ReD) ve doğal renk maddesi (betalain) eklenen yoğurtların ton açısı değerlerini antosiyanin ekstraktı ile hazırladığından daha düşük bulmuştur.

Pires ve ark. (2020) çalışmalarında yoğurda renklendirici olarak yaban mersini ekstraktı eklemişler ve sentetik renklendirici (E163) ile karşılaştırmışlardır. 7 gün boyunca depoladıkları yoğurtlarda yapılan renk analizi sonucunda yaban mersinli yoğurtların ton açısı değerlerini daha yüksek bulmuşlardır. Bunun  $b^*$  değerinin daha düşük,  $a^*$  değerinin ise daha yüksek olmasından kaynaklandığını belirtmişlerdir.

**Çizelge 4.48.** Yoğurt örneklerine ait depolama boyunca ton açısı değerlerine ait varyans analiz sonuçları

VK	SD	Ton açısı	
		KO	F
Örnek (A)	8	10320.05	3104.55**
Depolama süresi (B)	4	619.55	372.73**
A × B	32	177.28	13.33**
Hata	45		18.70

\*\* $p<0.01$  ve \* $p<0.05$  düzeyinde önemli. öd: önemli değil

Depolama boyunca ton açısı değerlerinde artış meydana gelmiştir. Yapılan bir çalışmada çilekli ve vişneli yoğurtlarda depolama boyunca ton açısında meydana gelen değişimin de gösterdiği gibi kırmızılıkta azalma görülmüştür. Yoğurt numuneleri ton açısı değerinde önemli bir artış göstermiştir; bu durum, büyük olasılıkla antosiyaninlerin bozunması ve/veya sarı ve kahverengi polimerizasyon bileşiklerinin oluşumu nedeniyle

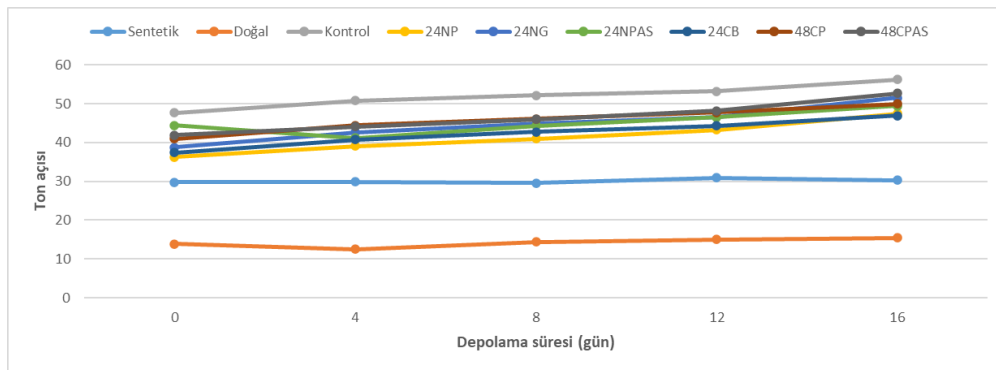
depolama sırasında rengin kırmızıdan turuncuya doğru değiştiğini göstermektedir (Ścibisz ve ark., 2019).

**Çizelge 4.49.** Yoğurt örneklerine ait depolama boyunca ton açısı değerlerine ait Duncan çoklu karşılaştırma testi sonuçları

Faktör	n	Ton açısı	
Nanofibrile protein kaynağı	Sentetik	10	30.06±0.56g
	Doğal	10	14.26±1.15h
	Kontrol	10	52±3.13a
	24NP	10	41.39±4.23f
	24NG	10	44.91±4.74d
	24NPAS	10	45.16±3.06d
	24CB	10	42.42±3.6e
	48CP	10	45.85±3.41c
	48CPAS	10	46.55±4.12b
Depolama süresi (gün)	0	18	35,81±10e
	4	18	38.36±11.7d
	8	18	40.12±11.96c
	12	18	41.75±12.22b
	16	18	44.43±13.58a

<sup>1</sup>Farklı harfle işaretlenmiş aynı sütundaki ortalamalar istatistik olarak birbirinden farklıdır (p<0.05).

Şekil 4.37’de farklı yoğurt örneklerinin ton açısı değerleri üzerinde etkili ‘*Örnek x depolama süresi*’ interaksiyonu gösterilmektedir. Tüm örneklerin ton açısı değerlerinde depolama süresi boyunca artış meydana gelmiştir. Bu depolama sırasında rengin kırmızılık kaybı ile kırmızıdan turuncuya doğru değiştiğini, bunun da büyük olasılıkla antosiyaninlerin bozunması veya sarı ve kahverengi polimerizasyon bileşiklerinin oluşumu nedeniyle olduğu düşünülmektedir (Ścibisz ve ark., 2019). Burtch ve ark. (2017) ton açısı değerindeki değişimin zamanla polimerize antosiyanin formlarının oluşmasıyla yeni renk tonlarının (kırmızıdan kırmızı-turuncu, turuncu ve turuncu-sarı tonlara) oluşumuna bağlı olduğunu bildirmiştir.



**Şekil 4.37.** Yoğurtlara ait ton açısı değerlerinin depolama süresine bağlı değişimleri

#### 4.6.2.7. Doygunluk

Yoğurt örneklerine ait doygunluk değerleri Çizelge 4.50’de verilmiştir. Örneklerin doygunluk değerleri, sentetik renklendirici için 21.90-22.98, doğal renklendirici için 13.48-13.99, kontrol için 11.44-13.31, 24NP için 11.66-12.78, 24NG için 10.29-12.60, 24NPAS için 10.22-11.83, 24CB için 11.86-12.63, 48CP için 12.00-12.74 ve 48CPAS için 10.34-11.82 arasında değişmektedir.

Çizelge 4.51’de varyans analizi sonuçları, Çizelge 4.52’de Duncan çoklu karşılaştırma testi sonuçları verilmiştir. Depolanan yoğurtların doygunluk değeri üzerinde örnek ve depolama süresi faktörlerinin ve ‘*örnek × depolama süresi*’ interaksiyonunun istatistiki olarak önemli ( $p < 0.01$ ) etkisi olduğu ortaya koyulmuştur.

Duncan çoklu karşılaştırma sonuçları incelendiğinde sentetik renklendirici kullanılan örnek en yüksek, 48CPAS ve 24NG ise en düşük doygunluk değerine sahiptir. Kontrol ile karşılaştırıldığında nanofibrile proteinlerle kopigmente edilen örneklerin doygunluk değerleri daha düşük bulunmuştur.

Yumuşak şekerleme kısmında belirtildiği gibi nanofibrile proteinlerle kopigmente edilen örneklerin doygunluk değerinin daha düşük olmasının nedeni proteinlerin hibiskus ekstraktına eklenmesiyle renkte bir miktar açıklık meydana getirmesi olabilir. Doygunluk değeri renk yoğunluğunu göstermektedir ve sentetik örneğin rengi diğer örneklerle kıyasla daha koyu bir kırmızı olduğundan en yüksek doygunluk değerine sahiptir.

Depolama sırasında tüm örneklerde doygunluk değerinin bir miktar azalması, zamanla yoğurdun renk yoğunluğunun azaldığını göstermektedir. (Ścibisz ve ark., 2019). Hernández-Herrero ve Frutos (2014) erik suyu konsantresi ile renklendirdikleri yoğurtları 24 gün boyunca 6 °C sıcaklıkta depolamışlar ve ton açısı değerlerinde önemli artışlar, doygunluk değerlerinde ise önemli düşüşler gözlemlemişlerdir.

Nontasan ve ark. (2012) çalışmalarında siyah pirinç kepeğinden elde ettikleri ekstrakt ile yoğurdu renklendirmişler ve 21 gün boyunca buzdolabı sıcaklığında depolamışlardır. Depolama süresince renk değerlerinde meydana gelen değişimlerin antosiyaninlerin sıcaklık, ışık, oksijen ve pH gibi pek çok çevresel etkenden kolayca etkilenerek bozunmalarından kaynaklandığını değerlendirmişlerdir. Pires ve ark. (2018), yoğurt maya kültürlerinin, antosiyaninlerin glikozidaz gibi enzimler yoluyla parçalanmasını hızlandırarak stabilitesi üzerinde olumsuz bir etkiye neden olabileceğini öne sürmüştür. Süt ürünlerinde antosiyaninlerin stabilitesi pH’dan ve proteinlerin varlığından etkilenmektedir (Oliveira ve ark., 2015). Ayrıca yoğurtlardaki antosiyaninler,

antosiyeninleri bozulmadan koruyan makromoleküllerle kompleksler oluşturabilir ancak bu tür bir etkileşim, antosiyeninleri daha az kullanılabilir hale getirebilir ve sonunda çökelmeleriyle sonuçlanabilmektedir (Jing ve Giusti, 2005).

**Çizelge 4.50.** Yoğurt örneklerine ait depolama boyunca doygunluk değerleri<sup>1</sup>

Yoğurt çeşidi	Doygunluk				
	0.gün	4.gün	8.gün	12.gün	16.gün
Sentetik	21.99±0.13	21.9±0.01	22.64±0.08	22.98±0.02	22.60±0.06
Doğal	13.49±0.19	13.91±0.03	13.99±0.06	13.78±0.04	13.48±0.28
Kontrol	13.80±0.03	13.43±0.04	13.56±0.21	11.44±0.22	13.31±0.04
24NP <sup>2</sup>	12.78±0.01	12.40±0.02	12.59±0.06	12.02±0.46	11.66±0.34
24NG <sup>3</sup>	12.60±0.02	12.03±0.22	11.63±0.35	11.93±0.03	10.29±0.01
24NPAS <sup>4</sup>	10.22±0.13	11.83±0.02	10.28±0.79	10.73±0.21	11.27±0.18
24CB <sup>5</sup>	12.63±0.33	12.40±0.13	12.25±0.11	12.26±0.05	11.86±0.14
48CP <sup>6</sup>	12.74±0.02	12.29±0.19	12.33±0.04	12.00±0.34	12.01±0.06
48CPAS <sup>7</sup>	11.82±0.09	11.79±0.01	11.76±0.05	11.39±0.01	10.34±0.03

<sup>1</sup>Sonuçlar iki tekerrürün ortalaması±standart hata şeklinde sunulmuştur. <sup>2</sup>24NP: 24 saat nanofibrilasyona tabi tutulan düz bezelye nanofibrili ile kopigmente edilmiş hibiskus tozu katılan yoğurt. <sup>3</sup>24NG: 24 saat nanofibrilasyona tabi tutulan düz gluten nanofibrili ile kopigmente edilmiş hibiskus tozu katılan yoğurt. <sup>4</sup>24NPAS: 24 saat nanofibrilasyona tabi tutulan düz peynir altı suyu nanofibrili ile kopigmente edilmiş hibiskus tozu katılan yoğurt. <sup>5</sup>48CB: 48 saat nanofibrilasyona tabi tutulan kıvrımlı bezelye nanofibrili ile kopigmente edilmiş hibiskus tozu katılan yoğurt, <sup>6</sup>48CP: 48 saat nanofibrilasyona tabi tutulan kıvrımlı pirinç nanofibrili ile kopigmente edilmiş hibiskus tozu katılan yoğurt. <sup>7</sup>48CPAS: 48 saat nanofibrilasyona tabi tutulan kıvrımlı peynir altı suyu nanofibrili ile kopigmente edilmiş hibiskus tozu katılan yoğurt.

**Çizelge 4.51.** Yoğurt örneklerine ait depolama boyunca doygunluk değerlerine ait varyans analiz sonuçları

VK	SD	Doygunluk	
		KO	F
Örnek (A)	8	978.86	2373.98**
Depolama süresi (B)	4	4.36	21.13**
A × B	32	19.81	12.01**
Hata	45		2.32

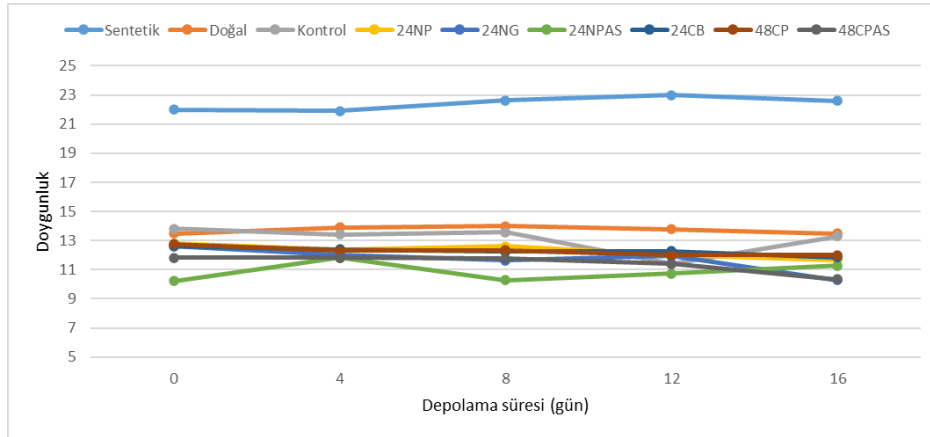
\*\*p<0.01 ve \*p<0.05 düzeyinde önemli. öd: önemli değil

**Çizelge 4.52.** Yoğurt örneklerine ait depolama boyunca doygunluk değerlerine ait Duncan çoklu karşılaştırma testi sonuçları<sup>1</sup>

Faktör	n	Doygunluk	
Nanofibrile protein kaynağı	Sentetik	10	22.42±0.46a
	Doğal	10	13.73±0.24b
	Kontrol	10	13.11±0.95c
	24NP	10	12.29±0.45d
	24NG	10	11.70±0.86e
	24NPAS	10	10.86±0.68f
	24CB	10	12.28±0.28d
	48CP	10	12.27±0.3d
	48CPAS	10	11.43±0.63e
Depolama süresi (gün)	0	18	13.56±3.32a
	4	18	13.56±3.36a
	8	18	13.45±3.80a
	12	18	13.17±3.97b
	16	18	13.02±3.89b

<sup>1</sup>Farklı harfle işaretlenmiş aynı sütundaki ortalamalar istatistiksel olarak birbirinden farklıdır (p<0.05).

Şekil 4.38’de farklı yoğurt örneklerinin doygunluk değerleri üzerinde etkili ‘Örnek x depolama süresi’ interaksiyonu gösterilmektedir. Depolama boyunca kontrol, 24NP, 24NG, 24CB, 48CP ve 48CPAS örneklerinin doygunluk değerinde kısmi bir azalma meydana gelmiştir. 24NPAS örneğinin doygunluk değeri depolama süresince düzensiz bir seyir göstermiştir. Sentetik ve doğal örneklerinin doygunluk değerinde depolama boyunca önemli bir değişiklik meydana gelmemiştir.



Şekil 4.38. Yoğurtlara ait doygunluk değerlerinin depolama süresine bağlı değişimleri

## 5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

### 5.1 Sonuçlar

Antosiyaninler, meyve ve sebzelerde bol miktarda bulunan pigmentlerdir ve ilgi çekici renkleri ve sağlığa yararları nedeniyle gıdalarda yaygın olarak kullanılmaktadırlar. Bununla birlikte, antosiyaninlerin kararsızlığı, kolayca bozunmasına, biyoaktivitesinin azalmasına ve gıda işleme ve depolama aşamalarında renk solmasına neden olarak uygulamalarını sınırlandırmakta ve ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Antosiyaninlerin stabilitesi kendi yapılarına ve çevresel faktörlere bağlı olarak değişmektedir. Nitekim, antosiyaninler pH, sıcaklık, ışık, oksijen gibi faktörlerden etkilenmektedir. Bu etkilerin en aza indirilmesi amacıyla kopigmentasyon işlemi ile stabil yapı oluşturulması, antosiyanin stabilitesini arttırmaya yönelik potansiyel bir çözüm olarak görülmektedir. Kopigmentasyon, antosiyaninlerin çeşitli ajanlar ile etkileşime girerek yapıyı stabilize etmek amacıyla kompleksler oluşturduğu bir yöntemdir. Bu tez çalışmasında antosiyaninlerin kararlılığını arttırmak amacıyla kopigmentasyon işlemi gerçekleştirilmiştir.

Çalışmada kopigmentasyon ajanı olarak kullanılmak üzere bezelye protein izolatu, pirinç protein izolatu, gluten ve peynir altı suyu protein izolatu farklı solüsyonlar içinde 24, 36 ve 48 saatlik nanofibrilasyon işlemine tabi tutularak hem düz hem de kıvrımlı nanofibrile proteinler elde edilmiştir. Antosiyanin kaynağı olarak *Hibiscus sabdariffa* tercih edilmiştir. Hibiskus ekstraktları ile kopigmentasyon ajanları karıştırılarak kopigmentasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Kontrol olarak hiçbir işlem uygulanmamış doğal protein izolatları da hibiskus ekstraktları ile kopigmentasyonda kullanılmıştır. Antosiyanin stabilitesinin sağlanıp sağlanmadığını ortaya koyabilmek amacıyla batokromik kayma ve hiperkromik etki belirlenmiş ve termal stabilite testi gerçekleştirilmiştir. Termal stabilitesini belirlemek amacıyla toplam monomerik antosiyanin ve polimerik renk analizleri yapılmıştır. Analizler sonucunda en uygun kopigmentasyon ajanları belirlenmiştir. Kopigmentasyonun gerçekleştiğini kanıtlamak ve oluşan bağları daha detaylı incelemek amacıyla Fourier Dönüşümlü Kızılötesi (FTIR) Spektroskopi ve Floresans spektroskopi analizleri gerçekleştirilmiştir.

Kopigmentasyon, hem absorpsiyon spektrumunun arttığı hiperkromik bir etki hem de absorpsiyon spektrumunun  $\lambda_{\max}$  noktasından daha yüksek dalga boyuna doğru bir kaymanın meydana geldiği bir batokromik kayma ile tespit edilmektedir. Kontrol örneği

ile kıyaslandığında (519 nm), BPİ (519 nm), PPİ (514 nm), GPİ (518 nm) ve PASPİ (518 nm) örneklerinde pozitif yönde bir kayma gerçekleşmemiştir. Aynı şekilde kontrol örneği ile kıyaslandığında (1.964), BPİ (1.149), PPİ (1.098), GPİ (1.019) ve PASPİ (1.448) örneklerinde absorbands azalışı gözlenmiştir. Elde edilen verilere göre protein izolatlarının etkili birer kopigmentasyon ajanı olmadığı belirlenmiştir. Bunun aksine düz nanofibrile proteinlerle kopigmente edilen örneklerde kontrol örneğinin maksimum dalga boyu 518 nm iken kopigmentli örneklerin dalga boyları 519-524 nm değerleri arasında bulunmuştur. Dolayısıyla, pozitif yönde 1-6 birim arasında bir kayma meydana gelmiştir. Kopigmentli örnekler %0.23-33.84 arasında hiperkromik etki sağlamıştır. Batokromik kayma ve hiperkromik etki de meydana gelen bu artış kopigment ve pigmentler arasındaki moleküller arası etkileşimi göstermektedir. En yüksek hiperkromik etkiyi 24NPAS (%33), 36NPAS (%33.84) ve 36NB (%32.62) örnekleri göstermiştir. Kıvrımlı nanofibriller ile kopigmente edilen örnekler değerlendirildiğinde, kontrol örneğinin maksimum dalga boyu 518 nm iken kopigmentli örneklerin dalga boyları 519-522 nm değerleri arasında bulunmuştur. Pozitif yönde 1-4 birim arasında bir kayma meydana gelmiştir. Kıvrımlı nanofibriller %5.79-40.32 değerleri arasında hiperkromik etki sağlamıştır. Hiperkromik etkide en büyük artış sırasıyla 48CP (%40.32), 48CPAS (%34.68), 24CPAS (%32.09) örneklerinde görülmüştür.

Monomerik antosiyanin kayıpları ısı işlem anında antosiyanin polimerlerinin oluşumundan kaynaklanmaktadır. Bu nedenle polimerik renk analizleri gerçekleştirilerek kopigmente antosiyaninlerin stabilitesine etkisi belirlenmiştir. Kontrol, protein izolatları ile kopigmente edilen ve düz ve kıvrımlı nanofibrile proteinlerle kopigmente edilen örnekler 80, 90 ve 100 °C'de 120 dakika boyunca tutularak 0, 10, 30, 60 ve 120 dakikalarda polimerik renk analizleri gerçekleştirilmiştir. Düz nanofibrillerle kopigmente edilen örnekler değerlendirildiğinde protein çeşidine göre polimerik renk büyükten küçüğe sırasıyla NG, NPAS, NB, NP örneklerine ait bulunmuştur. Düz nanofibrile gluten ile kopigmente edilen hibiskus ekstraktının (%56.26) polimerik renk değerinin diğerlerinden yüksek olduğu belirlenmiştir. Düz nanofibrile pirinç proteini (%32.51) kopigment olarak hibiskus antosiyaninlerinde polimerizasyonu en aza indirgemmiştir. Kıvrımlı nanofibrile pirinç proteini ile kopigmente edilen hibiskus ekstraktlarının polimerik renk değerleri (%36.05) bezelye (%31.33) ve peynir altı suyu proteini (%30.55) ile kopigmente edilen örneklerden daha yüksek bulunmuştur. Polimerik rengin yüksek olması antosiyaninlerin kahverengi bileşenlere dönüştüğünün bir göstergesi olduğundan kıvrımlı nanofibrile bezelye ve peynir altı suyu ile kopigmente edilen örneklerin

antosiyeninleri daha iyi koruduğu görülmektedir. Isıl işlem sıcaklığı bakımından değerlendirildiğinde sıcaklık arttıkça polimerik renk yüzdesinde artış meydana gelmiştir. Bunun nedeninin antosiyenin bozulmasının bir ara ürünü olan kalkonların oluşumunun sıcaklıkla artması olduğu düşünülmektedir. Sıcaklık arttıkça daha fazla oluşan kalkonlar kararsız bileşenlerdir ve kahverengi renkli bileşenlere dönüşerek polimerik rengin artmasına neden olmaktadır.

Örneklerin farklı sıcaklıklarda antosiyenin degradasyonu kinetiğine ait parametrelerden stabiliteyi en iyi koruyan kopigmentasyon ajanları belirlenmiştir. Parçalanma hız sabitleri (k), korelasyon katsayıları ( $R^2$ ), z değerleri ve aktivasyon enerjisi ( $E_a$ ) belirlenmiştir. Farklı kopigmentasyon ajanları ile kopigmente edilen örneklerin  $R^2$  değerleri 0.90'ın üzerinde bulunmuştur. Elde edilen  $R^2$  değerleri incelendiğinde; ısıl işlem süresince örneklerde gözlenen toplam monomerik antosiyenin degradasyonunun ikinci derece kinetik modele uygun olarak gerçekleştiği sonucuna ulaşılmıştır. Farklı kopigmentasyon ajanları ile kopigmente edilen örneklerin k değerleri ısıl işlem sıcaklığının artmasıyla artış göstermiştir. Düz nanofibrillerle kopigmente edilen örnekler değerlendirildiğinde en düşük z değeri 24NP, en yüksek z değeri ise 24NG örneğine ait bulunmuştur. Genel olarak z değeri arttıkça termal direnç artmaktadır. En yüksek  $E_a$  değeri 141.08 kJ/mol ile 24NP örneğine aitken, onu 103.54 kJ/mol ile 24NPAS örneği takip etmektedir. Kontrol ile kıyaslandığında (82.79 kJ/mol) 24NP, 24NPAS, 36NP, 48NB örneklerini  $E_a$  değerleri daha yüksek bulunmuştur. Protein izolatları ile kopigmente edilen örneklerle karşılaştırıldığında (22.39-47.98 kJ/mol) düz nanofibrille proteinlerle kopigmente edilen örneklerin  $E_a$  değerlerinin genellikle daha yüksek olduğu görülmektedir.  $E_a$  değerinin yüksek olması reaksiyona girmek için daha fazla enerji gerektiğinin yani reaksiyonun gerçekleşmesinin daha zor olduğunun göstergesidir. Kıvrımlı nanofibriller ile kopigmente edilen örnekler incelendiğinde en düşük z değeri 48CPAS, en yüksek z değeri ise 48CP örneğine ait bulunmuştur. En yüksek  $E_a$  değeri 91.48 kJ/mol ile 48CPAS örneğine aitken, onu 87.99 kJ/mol ile 36CP ve 87.63 kJ/mol ile 36CB örneği takip etmiştir. Sonuç olarak z değeri ve  $E_a$  değeri en yüksek olan örnekler belirlenerek çalışmanın ileriki aşamalarında kullanıma uygun kopigmente edilmiş hibiskus ekstraktları belirlenmiştir. Kıyaslamalar sonucunda yüksek z değerleri nedeniyle 24NP, 24NG, 24CB ve 48CP örnekleri, yüksek  $E_a$  değerleri ve uygun parçalanma hız sabiti (k) değerleri nedeniyle 24NPAS ve 48CPAS örnekleri çalışmanın ilerleyen aşamalarında model gıdalara uygulanmak üzere toz forma işlenecektir.

Nanofibrile edilmiş proteinler ve antosiyaninler arasında gerçekleşen bağ oluşumunu izlemek ve doğrulamak amacıyla FTIR analizi gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar incelendiğinde düz ve kıvrımlı nanofibriller ile kopigmente edilen hibiskus ekstraktlarının spektrumlarında  $3000-3500\text{ cm}^{-1}$  (-OH gerilimi) ve  $1600-1650\text{ cm}^{-1}$  (C=O gerilimi)  $\text{cm}^{-1}$  dalga boylarında büyük pikler görülürken,  $2000-2200\text{ cm}^{-1}$  (N-H gerilimi)  $\text{cm}^{-1}$  ve  $600-1000\text{ cm}^{-1}$  (C=C gerilimi) aralığında da bazı dalgalanmalar meydana gelmiştir. Kopigmentasyon ile bantlarda bir kayma meydana gelmiştir. Bu da protein ve antosiyanin arasında oluşan hidroksil bağlarına atfedilmektedir.  $3200-3300\text{ cm}^{-1}$  dalga boyu aralığında daha geniş olarak gözlenen pik -OH gruplarının ve -NH<sub>2</sub>'nin varlığını göstermektedir. Protein izolatu ile kopigmente edilen hibiskus ekstraktına oranla nanofibrilasyona uğratılmış proteinlerle kopigmente edilen örnekler  $3200-3650\text{ cm}^{-1}$  aralığında daha geniş pikler gözlenmiştir. Bu da -OH gerilme emiliminin daha yüksek olduğunu göstermektedir. Özellikle proteinlerin yapısında meydana gelen konformasyonel değişimleri incelemek amacıyla  $1600-1700\text{ cm}^{-1}$  arası bölgeye bakılmaktadır. Nanofibrilasyon ile proteinlerin absorpsanlarında pozitif yönde bir artış meydana getirmiştir. Bu durum ikincil yapıların C=O ve C-N esneme titreşimindeki değişikliği ortaya çıkarmıştır ve  $\alpha$ -heliks yapılarının azalması, antosiyaninler ile açıl etkileşimin gerçekleştiği  $\beta$ -plaka yapılarının artması pik kaymasının nedenleri arasındadır.

Moleküller arasındaki etkileşimi incelemek amacıyla gerçekleştirilen floresan spektroskopisi analiz sonuçları incelendiğinde kopigmente örneklerin floresans yoğunluğu düz ve kıvrımlı nanofibrile proteinlere oranla çok düşüktür. Kopigmentasyon floresans yoğunluğunu oldukça fazla miktarda sönmülemiştir. Bu da iki molekül arasında (düz veya kıvrımlı nanofibrile protein-antosiyanin) güçlü bir etkileşim olduğunu göstermektedir. Floresans azaldığında antosiyanin-protein kompleksinin stabilitesi artış göstermektedir. Bunun nedeni, antosiyaninler ve proteinler arasındaki etkileşimin, proteinlerin moleküler konformasyonunun değişimini teşvik etmesi, dolayısıyla floresans sinyalinin zayıflaması ve stabilitenin artması olarak düşünülmektedir. Nanofibrile proteinler doğal protein izolatlarına oranla, nanofibrile proteinlerle kopigmente edilen örneklerde doğal protein izolatları ile kopigmente edilen örneklere oranla daha yüksek floresans emisyonu sağlamıştır.

Belirlenen 6 kopigmentasyon ajanı ile kopigmente edilmiş örneklere ve kontrole % 0.3 saponin, %0.5 karboksimetil selüloz eklenerek 5 dakika boyunca çırpılarak köpük elde edilmiştir. Köpürtülen örnekler 2 mm serme kalınlığı ve 90°C sıcaklıkta kırınım

pencereli kurutucuda kurutulmuş toz ürünler elde edilmiştir. Toz ürünlerin toplam fenolik madde miktarı, toplam monomerik antosiyanin miktarı, DPPH radikal süpürme kapasitesi, Demir İndirgeme Antioksidan Gücü (FRAP) ve Bakır (II) İyonu İndirgeme Esaslı Antioksidan Kapasitesi (CUPRAC) belirlenmiştir.

Sonuç olarak, 24CB örneğinin antosiyanin miktarı kontrol örneğinden daha fazla, 24NPAS örneğinin fenolik madde miktarı kontrol örneğinden daha yüksek bulunmuştur. DPPH sonuçlarına göre örneklerde istatistiki anlamda önemli bir farklılık gözlenmemiştir. FRAP ve CUPRAC analiz sonuçlarına göre en yüksek antioksidan aktiviteye kontrol örneği sahip olmuştur. FRAP sonuçları değerlendirildiğinde 24 NB örneği kontrole benzer antioksidan aktivite gösterirken, diğer örneklerin demir indirgeme antioksidan gücünün daha düşük olduğu belirlenmiştir. CUPRAC sonuçlarına göre ise 48CP örneğinin CUPRAC değeri kontrole yakın bulunmuştur.

Elde edilen toz kopigmente örnekler belirli oranlarda yoğurt (%1.5) ve yumuşak şekerleme ürünlerine (%1) katılarak depolama stabilitesine bakılmıştır. Kontrol için %0.3 doğal renk maddesi (siyah havuç özütü) ve 50 ppm sentetik renk maddesi (allura red) kullanılmıştır. Yumuşak şekerleme örnekleri 32 gün, yoğurt örnekleri ise 16 gün depolanarak belirli günlerde TMA ve renk tayini yapılmıştır. Yapılan analizler sonucunda depolama stabilitesi en yüksek kopigmente örnekler belirlenmiştir.

Yumuşak şekerleme örneklerinde doğal renklendirici kullanılan örnek ve kontrol örneğine kıyasla nanofibrile proteinlerle kopigmente edilen örneklerde daha az antosiyanin kaybı gerçekleşmiştir. En az antosiyanin kaybının ise 48CP örneğinde olduğu görülmektedir. Kopigmentasyon işlemi antosiyaninin stabilitesini artırarak yumuşak şekerleme içerisinde daha uzun süre bozunmadan kalmasını sağlamıştır. Özellikle kıvrımlı fibriller diğer örneklere göre daha iyi antosiyanin stabilizasyonu sağlamıştır. Oda sıcaklığında depolama boyunca örneklerin toplam monomerik antosiyanin miktarında düşüş meydana gelmiştir. Antosiyanin pigmentleri çevresel şartlardan kolaylıkla etkilendiği için toplam monomerik antosiyanin miktarındaki düşüş beklendiği gibidir. Depolama süresi boyunca  $L^*$  değerinde artış meydana gelmiştir. Antosiyanin miktarında meydana gelen düşüşle beraber renkte kırmızıdan pembeye açılma meydana geldiği düşünülmektedir. Örnekler arasında en yüksek  $L^*$  değerine 48CP örneği sahiptir. Bunun pirinç nanofibrillerinin örneğin rengini diğerlerine oranla daha çok beyazlatmasından kaynaklı olduğu düşünülmektedir. Örnekler arasında 24CB örneğinin en yüksek  $a^*$  değerine sahip olduğu bulunmuştur. Depolama süresince  $a^*$  değerinde istatistiki anlamda önemli bir düşüş meydana gelmiştir. Bu düşüşün antosiyanin miktarındaki azalışla

orantılı olduğu düşünülmektedir. 32 günlük depolama süresince ton açısı değerinde artış meydana gelmiştir ve artışın sarı kalkon türlerinin oluşumuyla ilgili olabileceği değerlendirilmiştir. 48CP örneği doygunluk değerini hem kontrolden hem de sentetik ve doğaldan daha iyi korumuştur. Yapılan çalışmalarda NaCl eklenerek hazırlanan pirinç fibrillerinin daha sağlam yapıda, çözünürlüğü ve fonksiyonel özellikleri gelişmiş olduğu bildirilmiştir. Doymunluk değeri depolama süresince beklendiği gibi azalmıştır. Renk doymunluğunda olan azalma rengin koyu kırmızıdan açık kırmızıya kaydığını göstermektedir.

Yoğurt örnekleri arasında toplam monomerik antosiyanin miktarı bakımından en stabil örneğin 48CP olduğu görülmüştür. Yumuşak şekerleme örneklerinde de benzer şekilde toplam monomerik antosiyanin miktarı bakımından en stabil örnek 48CP olarak belirlenmiştir. 16 günlük depolama süresi boyunca yumuşak şekerleme örneklerinde görüldüğü gibi yoğurt örneklerinde de antosiyanin miktarında azalma meydana gelmiştir. Yoğurtta bulunan metabolitlerin, özellikle de hidrojen peroksitin, oksidasyon yoluyla antosiyaninlerin bozunmasını hızlandırdığı düşünülmektedir. Depolama boyunca yoğurt örneklerinin  $L^*$  değerlerinde varyasyon görülmüştür. Kopigmente örnekler arasında en yüksek  $a^*$  değeri 24NP örneğine ait bulunmuştur. Literatürde polifenolik bileşikler ile amiloid benzeri pirinç fibrilleri arasında kovalent ve kovalent olmayan bağlar yoluyla güçlü etkileşimlerin meydana geldiği bildirilmektedir. Depolama boyunca toplam monomerik antosiyanin miktarındaki düşüşe bağlı olarak  $a^*$  değerinde de düşüş meydana gelmiştir.  $a^*$  değerinin yüksek  $b^*$  değerininse düşük olması kırmızı renkli ürünlerde talep edilen bir durumdur. Nanofibrile proteinlerle kopigmente edilen örneklerin  $b^*$  değerleri kontrole oranla daha düşük bulunmuştur. Örneklerin  $b^*$  değerlerinde depolama boyunca artış olmuştur; bu durumun antosiyaninin renkli flavilyum katyonunun renksiz veya sarımsı formlara dönüşmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Nanofibrile proteinlerle kopigmente edilen örneklerin ton açısı değerleri kontrole oranla daha düşük bulunmuştur. Bu nedenle kopigmentasyon ile kahverengi polimerizasyon ürünlerinin daha az oluştuğu ve rengin daha iyi korunduğu söylenebilir. Depolama süresince ton açısı değerinde önemli bir artış meydana gelmiştir. Bu durum, büyük olasılıkla antosiyaninlerin bozunması ve/veya polimerize bileşiklerin oluşumu nedeniyle depolama sırasında rengin kırmızıdan turuncuya doğru değiştiğini göstermektedir.

## 5.2 Öneriler

Nanofibrile proteinler ile hibiskus antosiyaninlerinin kopigmente edilerek daha stabil renklendiricilerin elde edilmesini amaçlayan bu öncü çalışmada elde edilen bulgular neticesinde aşağıdaki öneriler yapılmıştır.

- Hibiskus antosiyaninleri yerine farklı antosiyanin kaynakları kullanılarak çalışma çeşitlendirilebilir. Özellikle ülkemizde yaygın bulunan kara havuç kullanılarak antosiyanin stabilizasyonuna yönelik çalışmalar yapılabilir.
- Protein fibrilasyon yöntemleri geliştirilebilir. Bu amaçla farklı bitkisel ve hayvansal protein izolatları kullanılarak farklı fibrilasyon şartlarında protein fibrilleri elde edilebilir.
- Fibrilasyonun gerçekleştiğini kanıtlamak amacıyla proteinlerin kimyasal yapıları daha detaylı incelenebilir.
- Kopigmente edilen antosiyanin ekstraktları farklı içeriklerde gıda ürünlerinde denenerek ürün çeşitliliği artırılabilir.

Kısaca antosiyanin-nanofibrile protein kopigmentasyonunun anlaşılması, doğal antosiyaninleri korumak için yeni bir fikir sunmakta ve antosiyaninlerin gıda endüstrisindeki uygulama alanının genişletilmesine yardımcı olmaktadır. Ancak kopigmentasyon karmaşık bir konudur ve kapsamlı yapı afinitesi ilişkileri henüz çözülmemiştir. Daha ileri araştırmalar, yapı-afinite ve yapı-optik-özellik ilişkilerini daha iyi kurmak için model kopigmentasyon komplekslerinin sistematik tasarımından ve gelişmiş yeni tekniklerden faydalanabilir.

## 6. KAYNAKLAR

- Abbasi, E. and Azizpour, M., 2016, Evaluation of physicochemical properties of foam mat dried sour cherry powder, *LWT-Food science and technology*, 68, 105-110.
- Abou-Arab, A. A., Abu-Salem, F. M. and Abou-Arab, E. A., 2011, Physico-chemical properties of natural pigments (anthocyanin) extracted from Roselle calyces (*Hibiscus subdariffa*), *Journal of American science*, 7(7), 445-456.
- Aggarwal, N., Eliaz, D., Cohen, H., Rosenhek-Goldian, I., Cohen, S. R., Kozell, A., Mason, T. O. and Shimanovich, U., 2021, Protein nanofibril design via manipulation of hydrogen bonds, *Communications chemistry*, 4(1), 62.
- Aguilera, Y., Mojica, L., Rebollo-Hernanz, M., Berhow, M., De Mejía, E. G. and Martín-Cabrejas, M. A., 2016, Black bean coats: New source of anthocyanins stabilized by  $\beta$ -cyclodextrin copigmentation in a sport beverage, *Food chemistry*, 212, 561-570.
- Ahmadi, L., Dent, T. and Maleky, F., 2023, A comparison of blueberry polyphenols bioaccessibility in whey and pea proteins complexes and the impact of protein conformational changes on it, *International Journal of Food Science & Technology*, 58(8), 4404-4414.
- Akbari-Alavijeh, S., Shaddel, R. and Jafari, S. M., 2020, Encapsulation of food bioactives and nutraceuticals by various chitosan-based nanocarriers, *Food hydrocolloids*, 105, 105774.
- Alappat, B. and Alappat, J., 2020, Anthocyanin pigments: Beyond aesthetics, *Molecules*, 25(23), 5500.
- Alavi, F., Emam-Djomeh, Z., Mohammadian, M., Salami, M. and Moosavi-Movahedi, A. A., 2020, Physico-chemical and foaming properties of nanofibrillated egg white protein and its functionality in meringue batter, *Food Hydrocolloids*, 101, 105554.
- Alvarez-Suarez, J. M., Cuadrado, C., Redondo, I. B., Giampieri, F., González-Paramás, A. M. and Santos-Buelga, C., 2021, Novel approaches in anthocyanin research-Plant fortification and bioavailability issues, *Trends in Food Science & Technology*, 117, 92-105.
- An, D., Ban, Q., Du, H., Wang, Q., Teng, F., Li, L. and Xiao, H., 2022, Nanofibrils of food-grade proteins: Formation mechanism, delivery systems, and application evaluation, *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 21(6), 4847-4871.
- Anuyahong, T., Chusak, C. and Adisakwattana, S., 2020, Incorporation of anthocyanin-rich riceberry rice in yogurts: Effect on physicochemical properties, antioxidant activity and in vitro gastrointestinal digestion, *LWT*, 129, 109571.

- Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M. and Çelik, S. E., 2008, Mechanism of antioxidant capacity assays and the CUPRAC (cupric ion reducing antioxidant capacity) assay, *Microchimica Acta*, 160, 413-419.
- Aramwit, P., Bang, N. and Srichana, T., 2010, The properties and stability of anthocyanins in mulberry fruits, *Food Research International*, 43(4), 1093-1097.
- Arroyo-Maya, I. J., Campos-Terán, J., Hernández-Arana, A. and McClements, D. J., 2016, Characterization of flavonoid-protein interactions using fluorescence spectroscopy: Binding of pelargonidin to dairy proteins, *Food Chemistry*, 213, 431-439.
- Arts, M. J., Haenen, G. R., Wilms, L. C., Beetstra, S. A., Heijnen, C. G., Voss, H.-P. and Bast, A., 2002, Interactions between flavonoids and proteins: effect on the total antioxidant capacity, *Journal of agricultural and food chemistry*, 50(5), 1184-1187.
- Aşkın, B. and Küçüköner, E. J. T. T. G. B. v. T. d., 2019, Antosiyaninlerin Stabilesini Etkileyen Faktörler.
- Attaribo, T., Jiang, X., Huang, G., Zhang, B., Xin, X., Zhang, Y., Zhang, N. and Gui, Z., 2020, Studies on the interactional characterization of preheated silkworm pupae protein (SPP) with anthocyanins (C3G) and their effect on anthocyanin stability, *Food Chemistry*, 326, 126904.
- Azman, E. M., Yusof, N., Chatzifragkou, A. and Charalampopoulos, D., 2022, Stability enhancement of anthocyanins from blackcurrant (*Ribes nigrum* L.) pomace through intermolecular copigmentation, *Molecules*, 27(17), 5489.
- Baeghballi, V., Niakousari, M. and Farahnaky, A., 2016, Refractance Window drying of pomegranate juice: Quality retention and energy efficiency, *LWT-Food science and technology*, 66, 34-40.
- Ballesteros, L. F., Ramirez, M. J., Orrego, C. E., Teixeira, J. A. and 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.
- Bansode, V., Chauhan, V., Pati, K., Nedunchezhiyan, M., Giri, N., Krishnakumar, T. and Mahanand, S., 2020, Development and storage study of Anthocyanin rich jelly from purple fleshed sweet potato (Variety Bhu-Krishna), *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 9(2), 388-391.
- Barbosa, M. P., Rigolon, T. C. B., Borges, L. L. R., Queiroz, V. A. V., Stringheta, P. C. and de Barros, F. A. R., 2021, Effect of light, food additives and heat on the stability of sorghum 3-deoxyanthocyanins in model beverages, *International Journal of Food Science & Technology*, 56(9), 4746-4755.
- Baria, B., Singh, A. K., Panjagari, N. R., Arora, S. and Minz, P., 2021, Colouring properties and stability of black carrot anthocyanins in yoghurt, *Journal of Food Science and Technology*, 58, 3953-3962.

- Basu, A., Rhone, M. and Lyons, T. J., 2010, Berries: emerging impact on cardiovascular health, *Nutrition reviews*, 68(3), 168-177.
- Batada, A. and Jacobson, M. F., 2016, Prevalence of artificial food colors in grocery store products marketed to children, *Clinical pediatrics*, 55(12), 1113-1119.
- Belwal, T., Singh, G., Jeandet, P., Pandey, A., Giri, L., Ramola, S., Bhatt, I. D., Venskutonis, P. R., Georgiev, M. I. and Clément, C., 2020, Anthocyanins, multi-functional natural products of industrial relevance: Recent biotechnological advances, *Biotechnology Advances*, 43, 107600.
- Benchikh, Y., Aissaoui, A., Allouch, R. and Mohellebi, N., 2021, Optimising anthocyanin extraction from strawberry fruits using response surface methodology and application in yoghurt as natural colorants and antioxidants, *Journal of Food Science and Technology*, 58, 1987-1995.
- Berké, B., Chèze, C., Vercauteren, J. and Deffieux, G., 1998, Bisulfite addition to anthocyanins: Revisited structures of colourless adducts, *Tetrahedron Letters*, 39(32), 5771-5774.
- Bernaert, N., Van Droogenbroeck, B., Van Pamel, E. and De Ruyck, H., 2019, Innovative refractance window drying technology to keep nutrient value during processing, *Trends in food science & technology*, 84, 22-24.
- Bingöl, A., Türkyılmaz, M. and Özkan, M., 2022, Increase in thermal stability of strawberry anthocyanins with amino acid copigmentation, *Food Chemistry*, 384, 132518.
- Bloor, S. and Falshaw, R., 2000, Covalently linked anthocyanin–flavonol pigments from blue *Agapanthus* flowers, *Phytochemistry*, 53(5), 575-579.
- Bolder, S. G., Vasbinder, A. J., Sagis, L. M. and van der Linden, E., 2007, Heat-induced whey protein isolate fibrils: Conversion, hydrolysis, and disulphide bond formation, *International dairy journal*, 17(7), 846-853.
- Borrás-Linares, I., Fernández-Arroyo, S., Arráez-Roman, D., Palmeros-Suárez, P., Del Val-Díaz, R., Andrade-González, I., Fernández-Gutiérrez, A., Gómez-Leyva, J. and Segura-Carretero, A., 2015, Characterization of phenolic compounds, anthocyanidin, antioxidant and antimicrobial activity of 25 varieties of Mexican Roselle (*Hibiscus sabdariffa*), *Industrial Crops and Products*, 69, 385-394.
- Borzova, V. A., Markossian, K. A., Chebotareva, N. A., Kleymenov, S. Y., Poliansky, N. B., Muranov, K. O., Stein-Margolina, V. A., Shubin, V. V., Markov, D. I. and Kurganov, B. I., 2016, Kinetics of thermal denaturation and aggregation of bovine serum albumin, *PLoS one*, 11(4), e0153495.
- Boulton, R., 2001, The copigmentation of anthocyanins and its role in the color of red wine: A critical review, *American journal of enology and viticulture*, 52(2), 67-87.
- Brar, A. S., 2018. *Optimization of Foam-mat Drying process for Peaches* University of Guelph].

- Brownmiller, C., Howard, L. R. and Prior, R. L., 2008, Processing and storage effects on monomeric anthocyanins, percent polymeric color, and antioxidant capacity of processed blueberry products, *Journal of food science*, 73(5), H72-H79.
- Bryła, A., Lewandowicz, G. and Juzwa, W., 2015, Encapsulation of elderberry extract into phospholipid nanoparticles, *Journal of Food Engineering*, 167, 189-195.
- Buckow, R., Kastell, A., Terefe, N. S. and Versteeg, C., 2010, Pressure and temperature effects on degradation kinetics and storage stability of total anthocyanins in blueberry juice, *Journal of agricultural and food chemistry*, 58(18), 10076-10084.
- Burtch, C. E., Mansfield, A. K. and Manns, D. C., 2017, Reaction kinetics of monomeric anthocyanin conversion to polymeric pigments and their significance to color in interspecific hybrid wines, *Journal of agricultural and food chemistry*, 65(31), 6379-6386.
- Buvé, C., Kebede, B. T., De Batselier, C., Carrillo, C., Pham, H. T., Hendrickx, M., Grauwet, T. and Van Loey, A., 2018, Kinetics of colour changes in pasteurised strawberry juice during storage, *Journal of Food Engineering*, 216, 42-51.
- Byamukama, R., Andima, M., Mbabazi, A. and Kiremire, B. T., 2014, Anthocyanins from mulberry (*Morus rubra*) fruits as potential natural colour additives in yoghurt, *African Journal of Pure and Applied Chemistry*, 8(12), 182-190.
- Cai, D., Li, X., Chen, J., Jiang, X., Ma, X., Sun, J., Tian, L., Vidyarthi, S. K., Xu, J. and Pan, Z., 2022, A comprehensive review on innovative and advanced stabilization approaches of anthocyanin by modifying structure and controlling environmental factors, *Food chemistry*, 366, 130611. .
- Cao, Y., Xia, Q., Chen, J. and Jin, Z., 2023, Copigmentation effect of flavonols on anthocyanins in black mulberry juice and their interaction mechanism investigation, *Food chemistry*, 399, 133927.
- Cao, Y. and Mezzenga, R., 2019, Food protein amyloid fibrils: Origin, structure, formation, characterization, applications and health implications, *Advances in Colloid and Interface Science*, 269, 334-356.
- Cappa, C., Lavelli, V. and Mariotti, M., 2015, Fruit candies enriched with grape skin powders: physicochemical properties, *LWT-Food science and technology*, 62(1), 569-575.
- Carrasco-Sandoval, J., Aranda-Bustos, M., Henríquez-Aedo, K., López-Rubio, A. and Fabra, M. J., 2021, Bioaccessibility of different types of phenolic compounds co-encapsulated in alginate/chitosan-coated zein nanoparticles, *LWT*, 149, 112024.
- Carvalho, C., Pagani, A., Teles, A., Santos, J., Pacheco, T., Junior, R. C. and Pozza, M., 2020, Jamelao capsules containing bioactive compounds and its application in yoghurt, *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*, 19(1), 47-56.

- Cassidy, A., Rogers, G., Peterson, J. J., Dwyer, J. T., Lin, H. and Jacques, P. F. J. T. A. J. o. c. n., 2015, Higher dietary anthocyanin and flavonol intakes are associated with anti-inflammatory effects in a population of US adults, *102*(1), 172-181.
- Castañeda-Ovando, A., de Lourdes Pacheco-Hernández, M., Páez-Hernández, M. E., Rodríguez, J. A. and Galán-Vidal, C. A., 2009, Chemical studies of anthocyanins: A review, *Food chemistry*, *113*(4), 859-871.
- Cavalcanti, R. N., Santos, D. T. and Meireles, M. A. A., 2011, Non-thermal stabilization mechanisms of anthocyanins in model and food systems—An overview, *Food research international*, *44*(2), 499-509.
- Celli, G. B., Khattab, R., Ghanem, A. and Brooks, M. S. L., 2016, Refractance Window™ drying of haskap berry—preliminary results on anthocyanin retention and physicochemical properties, *Food Chemistry*, *194*, 218-221.
- Chatterjee, N. S., Dara, P. K., Perumcherry Raman, S., Vijayan, D. K., Sadasivam, J., Mathew, S., Ravishankar, C. N. and Anandan, R., 2021, Nanoencapsulation in low-molecular-weight chitosan improves in vivo antioxidant potential of black carrot anthocyanin, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *101*(12), 5264-5271.
- Chen, X., Yi, J., Wen, Z. and Fan, Y., 2024, Ultrasonic pretreatment and epigallocatechin gallate incorporation enhance the formation, apparent viscosity, and antioxidant activity of pea protein amyloid-like fibrils, *Food Hydrocolloids*, *149*, 109630.
- Chen, X., Gao, Q., Liao, S., Zou, Y., Yan, J. and Li, Q., 2022, Co-Pigmentation Mechanism and Thermal Reaction Kinetics of Mulberry Anthocyanins with Different Phenolic Acids, *Foods*, *11*(23), 3806.
- Chen, X., Guan, Y., Zeng, M., Wang, Z., Qin, F., Chen, J. and He, Z., 2022, Effect of whey protein isolate and phenolic copigments in the thermal stability of mulberry anthocyanin extract at an acidic pH, *Food chemistry*, *377*, 132005.
- Chen, Z., Wang, C., Gao, X., Chen, Y., Santhanam, R. K., Wang, C., Xu, L. and Chen, H., 2019, Interaction characterization of preheated soy protein isolate with cyanidin-3-O-glucoside and their effects on the stability of black soybean seed coat anthocyanins extracts, *Food Chemistry*, *271*, 266-273.
- Chen, Y., Wang, Z., Zhang, H., Liu, Y., Zhang, S., Meng, Q. and Liu, W., 2018, Isolation of high purity anthocyanin monomers from red cabbage with recycling preparative liquid chromatography and their photostability, *Molecules*, *23*(5), 991.
- Chikhoune, A., Gagaoua, M., Nanema, K. D., Souleymane, A. S., Hafid, K., Aliane, K., Hadjal, S., Madani, K., Sentandreu, E. and Sentandreu, M. Á., 2017, Antioxidant activity of Hibiscus sabdariffa extracts incorporated in an emulsion system containing whey proteins: Oxidative stability and polyphenol–whey proteins interactions, *Arabian Journal for Science and Engineering*, *42*, 2247-2260.
- Chitgar, M. F., Aalami, M., Kadkhodae, R., Maghsoudlou, Y. and Milani, E., 2018, Effect of thermosonication and thermal treatments on phytochemical stability of

- barberry juice copigmented with ferulic acid and licorice extract, *Innovative food science & emerging technologies*, 50, 102-111.
- Choi, H. M., Kim, J. Y., Li, Z. P., Jenis, J., Ban, Y. J., Baiseitova, A. and Park, K. H., 2019, Effectiveness of prenyl group on flavonoids from *Epimedium koreanum* Nakai on bacterial neuraminidase inhibition, *Molecules*, 24(2), 317.
- Chung, C., Rojanasasithara, T., Mutilangi, W. and McClements, D. J., 2017, Stability improvement of natural food colors: Impact of amino acid and peptide addition on anthocyanin stability in model beverages, *Food Chemistry*, 218, 277-284.
- Chung, C., Rojanasasithara, T., Mutilangi, W. and McClements, D. J., 2016, Stabilization of natural colors and nutraceuticals: Inhibition of anthocyanin degradation in model beverages using polyphenols, *Food chemistry*, 212, 596-603.
- Chung, C., Rojanasasithara, T., Mutilangi, W. and McClements, D. J., 2015, Enhanced stability of anthocyanin-based color in model beverage systems through whey protein isolate complexation, *Food Research International*, 76, 761-768.
- Combeau, S., Chatelut, M. and Vittori, O., 2002, Identification and simultaneous determination of Azorubin, Allura red and Ponceau 4R by differential pulse polarography: application to soft drinks, *Talanta*, 56(1), 115-122.
- Condurache, N. N., Aprodu, I., Grigore-Gurgu, L., Petre, B. A., Enachi, E., Râpeanu, G., Bahrim, G. E. and Stănciuc, N., 2020, Fluorescence spectroscopy and molecular modeling of anthocyanins binding to bovine lactoferrin peptides, *Food Chemistry*, 318, 126508.
- Corrêa-Filho, L. C., Moldão-Martins, M. and Alves, V. D., 2019, Advances in the application of microcapsules as carriers of functional compounds for food products, *Applied Sciences*, 9(3), 571.
- Cortez, R., Luna-Vital, D. A., Margulis, D. and 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.
- Costa, H. C., Silva, D. O. and Vieira, L. G. M., 2018, Physical properties of açai-berry pulp and kinetics study of its anthocyanin thermal degradation, *Journal of Food Engineering*, 239, 104-113.
- Crews, P., Rodriguez, J., Jaspars, M. and Crews, R. J., 1998, Organic structure analysis.
- Cunningham, O. D. and Edwards, R., 2008, Modifying the acylation of flavonols in *Petunia hybrida*, *Phytochemistry*, 69(10), 2016-2021.
- Da-Costa-Rocha, I., Bonnlaender, B., Sievers, H., Pischel, I. and Heinrich, M., 2014, *Hibiscus sabdariffa* L.—A phytochemical and pharmacological review, *Food Chemistry*, 165, 424-443.
- da Silva, L. B., Annetta, F. E., Alves, A. B., Queiroz, M. B., Fadini, A. L., da Silva, M. G. and Efraim, P., 2016, Effect of differently processed açai (*Euterpe oleracea*

- Mart.) on the retention of phenolics and anthocyanins in chewy candies, *International Journal of Food Science & Technology*, 51(12), 2603-2612.
- Dachmann, E., Hengst, C., Ozcelik, M., Kulozik, U. and Dombrowski, J., 2018, Impact of hydrocolloids and homogenization treatment on the foaming properties of raspberry fruit puree, *Food and Bioprocess Technology*, 11, 2253-2264.
- Dai, Q., Zhu, X., Yu, J., Karangwa, E., Xia, S., Zhang, X. and Jia, C., 2016, Mechanism of formation and stabilization of nanoparticles produced by heating electrostatic complexes of WPI–dextran conjugate and chondroitin sulfate, *Journal of agricultural and food chemistry*, 64(27), 5539-5548.
- de Almeida Paula, D., Mota Ramos, A., Basílio de Oliveira, E., Maurício Furtado Martins, E., Augusto Ribeiro de Barros, F., Cristina Teixeira Ribeiro Vidigal, M., de Almeida Costa, N. and Tatagiba da Rocha, C., 2018, Increased thermal stability of anthocyanins at pH 4.0 by guar gum in aqueous dispersions and in double emulsions W/O/W, *International Journal of Biological Macromolecules*, 117, 665-672.
- de Carvalho Tavares, I. M., Sumere, B. R., Gómez-Alonso, S., Gomes, E., Hermosín-Gutiérrez, I., Da-Silva, R. and Lago-Vanzela, E. S., 2020, Storage stability of the phenolic compounds, color and antioxidant activity of jambolan juice powder obtained by foam mat drying, *Food Research International*, 128, 108750.
- de Moura, S. C., Berling, C. L., Garcia, A. O., Queiroz, M. B., Alvim, I. D. and Hubinger, M. D., 2019, Release of anthocyanins from the hibiscus extract encapsulated by ionic gelation and application of microparticles in jelly candy, *Food Research International*, 121, 542-552.
- De Rosso, V. V. and Mercadante, A. Z., 2007, The high ascorbic acid content is the main cause of the low stability of anthocyanin extracts from acerola, *Food chemistry*, 103(3), 935-943.
- Delgado-Vargas, F. and Paredes-Lopez, O., 2002, *Natural colorants for food and nutraceutical uses*. CRC press.
- Demirci, Ş. N., Metin, B. and Demirci, M., 2022, Antosiyanin Stabilite Artırma Metotları: Fenolik Kopigmentasyonu, *Avrupa Bilim ve Teknoloji Dergisi*, (38), 276-281.
- Deng, K., Ouyang, J., Hu, N., Dong, Q., Chen, C. and Wang, H., 2022a, Improved Stability of Blue Colour of Anthocyanins from *Lycium ruthenicum* Murr. Based on Copigmentation, 27(18), 6089.
- Deng, K., Ouyang, J., Hu, N., Dong, Q., Chen, C. and Wang, H., 2022b, Improved Stability of Blue Colour of Anthocyanins from *Lycium ruthenicum* Murr. Based on Copigmentation, *Molecules*, 27(18), 6089.
- Desai, K. G. H. and Jin Park, H., 2005, Recent Developments in Microencapsulation of Food Ingredients, *Drying Technology*, 23(7), 1361-1394.
- Díaz, F., Santos, E., Filardo, S., Villagómez, R. and Scheinvar, L., 2006, Colorant extraction from red prickly pear (*Opuntia lasiacantha*) for food application,

*Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry*, 5(2), 1330-1337.

- Djaeni, M., Kumoro, A. C., Sasongko, S. B. and Utari, F. D., 2018, Drying rate and product quality evaluation of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) calyces extract dried with foaming agent under different temperatures, *International Journal of Food Science*, 2018.
- do Carmo Brito, B. d. N., da Silva Pena, R., Santos Lopes, A. and Campos Chisté, R., 2017, Anthocyanins of jambolão (*Syzygium cumini*): Extraction and pH-dependent color changes, *Journal of food science*, 82(10), 2286-2290.
- Do, D. T., Harbourne, N. and Ellis, A., 2023, Anthocyanins: Anthocyanidins, Berries, Colorants, and Copigmentation. In *Handbook of Food Bioactive Ingredients: Properties and Applications* (pp. 341-364). Springer.
- dos Santos, F. N., de Souza, E. J. D., de Souza, J. F., Pires, J. B., Siebeneichler, T. J., Kringel, D. H., Fajardo, A. R., Rombaldi, C. V., Dias, A. R. G. and da Rosa Zavareze, E., 2022, Encapsulation of anthocyanic extract of jambolan (*Syzygium cumini* (L.)) in zein ultrafine fibers produced by electrospinning.
- Du, H., Yang, H., Wang, X., Zhu, F., Tang, D., Cheng, J. and Liu, X., 2021, Effects of mulberry pomace on physicochemical and textural properties of stirred-type flavored yogurt, *Journal of Dairy Science*, 104(12), 12403-12414.
- Eiro, M. J. and Heinonen, M., 2002, Anthocyanin color behavior and stability during storage: Effect of intermolecular copigmentation, *Journal of agricultural and food chemistry*, 50(25), 7461-7466.
- Eisenberg, D. S. and Sawaya, M. R., 2017, Structural studies of amyloid proteins at the molecular level, *Annual review of biochemistry*, 86, 69-95.
- Eker, M. E., Aaby, K., Budic-Leto, I., Rimac Brnčić, S., El, S. N., Karakaya, S., Simsek, S., Manach, C., Wiczowski, W. and de Pascual-Teresa, S., 2019, A review of factors affecting anthocyanin bioavailability: Possible implications for the inter-individual variability, *Foods*, 9(1), 2.
- El-Messiry, D. M., El Desoky, S. M., El-Razek, A. and Rabab, H., 2021, Characteristics of children Marshmallow Candy Colored by Natural Anthocyanin Extract from Jamun (*Syzygium cumini*) during cold Storage, *Journal of Food and Dairy Sciences*, 12(8), 189-194.
- Enaru, B., Dreţcanu, G., Pop, T. D., Stănilă, A. and Diaconeasa, Z., 2021, Anthocyanins: Factors affecting their stability and degradation, *Antioxidants*, 10(12), 1967.
- Escobar-Ortiz, A., Castaño-Tostado, E., Rocha-Guzmán, N. E., Gallegos-Infante, J. A. and Reynoso-Camacho, R., 2021, Anthocyanins extraction from *Hibiscus sabdariffa* and identification of phenolic compounds associated with their stability, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 101(1), 110-119.
- Fan, L., Wang, Y., Xie, P., Zhang, L., Li, Y. and Zhou, J., 2019, Copigmentation effects of phenolics on color enhancement and stability of blackberry wine residue

- anthocyanins: Chromaticity, kinetics and structural simulation, *Food Chemistry*, 275, 299-308.
- Fang, Z. and Bhandari, B., 2010, Encapsulation of polyphenols—a review, *Trends in Food Science & Technology*, 21(10), 510-523.
- Farr, J. E., Sigurdson, G. T. and Giusti, M. M., 2018, Influence of cyanidin glycosylation patterns on carboxypyrananthocyanin formation, *Food chemistry*, 259, 261-269.
- Fávaro-Trindade, C. S., Pinho, S. C. d. and Rocha, G. A., 2008, Revisão: Microencapsulação de ingredientes alimentícios, *Brazilian Journal of Food Technology*, 11(2), 103-112.
- Feng, Z., Wu, G., Liu, C., Li, D., Jiang, B. and Zhang, X., 2018, Edible coating based on whey protein isolate nanofibrils for antioxidation and inhibition of product browning, *Food Hydrocolloids*, 79, 179-188.
- Fernandes, A., Rocha, M. A. A., Santos, L. M., Brás, J., Oliveira, J., Mateus, N. and de Freitas, V., 2018, Blackberry anthocyanins:  $\beta$ -Cyclodextrin fortification for thermal and gastrointestinal stabilization, *Food chemistry*, 245, 426-431.
- Ferreira da Silva, P., Lima, J. C., Freitas, A. A., Shimizu, K., Maçanita, A. L. and Quina, F. H., 2005, Charge-transfer complexation as a general phenomenon in the copigmentation of anthocyanins, *The Journal of Physical Chemistry A*, 109(32), 7329-7338.
- Figuroa-González, J. J., Lobato-Calleros, C., Vernon-Carter, E. J., Aguirre-Mandujano, E., Alvarez-Ramirez, J. and Martínez-Velasco, A., 2022, Modifying the structure, physicochemical properties, and foaming ability of amaranth protein by dual pH-shifting and ultrasound treatments, *LWT*, 153, 112561.
- Francis, F., 1998. Colour analyses, *Food Analysis* (SS Nielson, ed.). In: Chapman and Hall, New York, NY.
- Gallo, M., Vinci, G., Graziani, G., De Simone, C. and Ferranti, P., 2013, The interaction of cocoa polyphenols with milk proteins studied by proteomic techniques, *Food Research International*, 54(1), 406-415.
- Gao, T., Ci, Y., Jian, H. and An, C., 2000, FTIR investigation of the interaction of tumor cells treated with caffeic acid and chlorogenic acid, *Vibrational spectroscopy*, 24(2), 225-231.
- García-Viguera, C. and Bridle, P., 1999, Influence of structure on colour stability of anthocyanins and flavylum salts with ascorbic acid, *Food Chemistry*, 64(1), 21-26.
- Gautam, R., 2004, Sorrel—A lesser-known source of medicinal soft drink and food in India.

- Ge, J., Yue, P., Chi, J., Liang, J. and Gao, X., 2018, Formation and stability of anthocyanins-loaded nanocomplexes prepared with chitosan hydrochloride and carboxymethyl chitosan, *Food Hydrocolloids*, 74, 23-31.
- Gençdağ, E., Özdemir, E. E., Demirci, K., Görgüç, A. and Yılmaz, F. M., 2022, Copigmentation and stabilization of anthocyanins using organic molecules and encapsulation techniques, *Current Plant Biology*, 29, 100238.
- Ghareaghajlou, N., Hallaj-Nezhadi, S. and Ghasempour, Z., 2022, Nano-liposomal system based on lyophilization of monophasic solution technique for encapsulating anthocyanin-rich extract from red cabbage, *Dyes and Pigments*, 202, 110263.
- Ghareaghajlou, N., Hallaj-Nezhadi, S. and Ghasempour, Z., 2021, Red cabbage anthocyanins: Stability, extraction, biological activities and applications in food systems, *Food chemistry*, 365, 130482.
- Ghasemi, S., Jafari, S. M., Assadpour, E. and Khomeiri, M., 2017, Production of pectin-whey protein nano-complexes as carriers of orange peel oil, *Carbohydrate polymers*, 177, 369-377.
- Ghosh, D. and Konishi, T. J. A. P. j. o. c. n., 2007, Anthocyanins and anthocyanin-rich extracts: role in diabetes and eye function, *16*(2).
- Giusti, M. M. and Wrolstad, R. E., 2003, Acylated anthocyanins from edible sources and their applications in food systems, *Biochemical engineering journal*, 14(3), 217-225.
- Giusti, M. and Wrolstad, R., 2001, Anthocyanins. Characterization and measurement with UV-visible spectroscopy, *Current protocols in food analytical chemistry*, 1, 1-13.
- Gomes, J., Serrano, C., Oliveira, C., Dias, A. and Moldao-Martins, M., 2021, Thermal and light stability of anthocyanins from strawberry by-products non-encapsulated and encapsulated with inulin, *Acta Scientiarum Polonorum*.
- Gong, W., Li, D., Wu, Y., Manickam, S., Sun, X., Han, Y., Tao, Y. and Liu, X., 2021a, Sequential phenolic acid co-pigmentation pretreatment and contact ultrasound-assisted air drying to intensify blackberry drying and enhance anthocyanin retention: A study on mass transfer and phenolic distribution, *Ultrasonics sonochemistry*, 80, 105788.
- Gong, S., Yang, C., Zhang, J., Yu, Y., Gu, X., Li, W. and Wang, Z., 2021b, Study on the interaction mechanism of purple potato anthocyanins with casein and whey protein, *Food Hydrocolloids*, 111, 106223.
- Gong, K. J., Shi, A. M., Liu, H. Z., Liu, L., Hu, H., Adhikari, B. and Wang, Q., 2016, Emulsifying properties and structure changes of spray and freeze-dried peanut protein isolate, *Journal of Food Engineering*, 170, 33-40.
- Gordillo, B. n., Rodríguez-Pulido, F. J., González-Miret, M. L., Quijada-Morín, N., Rivas-Gonzalo, J. n. C., García-Estévez, I., Heredia, F. J. and Escribano-Bailón,

- M. T., 2015, Application of differential colorimetry to evaluate anthocyanin–flavonol–flavanol ternary copigmentation interactions in model solutions, *Journal of agricultural and food chemistry*, 63(35), 7645-7653.
- Gowd, V., Jia, Z. and Chen, W., 2017, Anthocyanins as promising molecules and dietary bioactive components against diabetes—A review of recent advances, *Trends in Food Science & Technology*, 68, 1-13.
- Grace, M. H., Yousef, G. G., Gustafson, S. J., Truong, V.-D., Yencho, G. C. and Lila, M. A., 2014, Phytochemical changes in phenolics, anthocyanins, ascorbic acid, and carotenoids associated with sweetpotato storage and impacts on bioactive properties, *Food chemistry*, 145, 717-724.
- Gradinaru, G., Biliaderis, C., Kallithraka, S., Kefalas, P. and Garcia-Viguera, C., 2003, Thermal stability of Hibiscus sabdariffa L. anthocyanins in solution and in solid state: effects of copigmentation and glass transition, *Food Chemistry*, 83(3), 423-436.
- Graf, D., Seifert, S., Jaudszus, A., Bub, A. and Watzl, B., 2013, Anthocyanin-rich juice lowers serum cholesterol, leptin, and resistin and improves plasma fatty acid composition in fischer rats, *PloS one*, 8(6), e66690.
- Gris, E., Ferreira, E., Falcão, L. and Bordignon-Luiz, M., 2007, Caffeic acid copigmentation of anthocyanins from Cabernet Sauvignon grape extracts in model systems, *Food Chemistry*, 100(3), 1289-1296.
- Guan, Y. and Zhong, Q., 2015, The improved thermal stability of anthocyanins at pH 5.0 by gum arabic, *LWT-Food science and technology*, 64(2), 706-712.
- Guo, J., Giusti, M. M. and Kaletunç, G., 2018, Encapsulation of purple corn and blueberry extracts in alginate-pectin hydrogel particles: Impact of processing and storage parameters on encapsulation efficiency, *Food Research International*, 107, 414-422.
- Gümüş, T., Altan Kamer, D. D. and Kaynarca, G. B., 2023, Investigating the potential of wine lees as a natural colorant and functional ingredient in jelly production, *Journal of the Science of Food and Agriculture*.
- Hardy, Z. and Jideani, V. A., 2017, Foam-mat drying technology: A review, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(12), 2560-2572.
- Hasan, Z., Zeshan, B., Hassan, A., Daud, N. H. A., Sadaf, A. and Ahmed, N., 2023, Preparation and characterization of edible whey protein nanofibrils and efficacy studies on the quality and shelf-life of chilled food products, *Journal of Food Safety*, 43(3), e13034.
- He, W., Guo, F., Jiang, Y., Liu, X., Chen, J., Zeng, M., Wang, Z., Qin, F., Li, W. and He, Z., 2022, Enzymatic hydrolysates of soy protein promote the physicochemical stability of mulberry anthocyanin extracts in food processing, *Food Chemistry*, 386, 132811.

- He, W., Mu, H., Liu, Z., Lu, M., Hang, F., Chen, J., Zeng, M., Qin, F. and He, Z., 2018, Effect of preheat treatment of milk proteins on their interactions with cyanidin-3-O-glucoside, *Food Research International*, 107, 394-405.
- He, Z., Xu, M., Zeng, M., Qin, F. and Chen, J., 2016a, Interactions of milk  $\alpha$ - and  $\beta$ -casein with malvidin-3-O-glucoside and their effects on the stability of grape skin anthocyanin extracts, *Food Chemistry*, 199, 314-322.
- He, Z., Xu, M., Zeng, M., Qin, F. and Chen, J., 2016b, Preheated milk proteins improve the stability of grape skin anthocyanins extracts, *Food Chemistry*, 210, 221-227.
- He, Z., Zhu, H., Xu, M., Zeng, M., Qin, F. and Chen, J., 2016, Complexation of bovine  $\beta$ -lactoglobulin with malvidin-3-O-glucoside and its effect on the stability of grape skin anthocyanin extracts, *Food Chemistry*, 209, 234-240.
- He, F., Liang, N.-N., Mu, L., Pan, Q.-H., Wang, J., Reeves, M. J. and Duan, C.-Q., 2012, Anthocyanins and their variation in red wines I. Monomeric anthocyanins and their color expression, *Molecules*, 17(2), 1571-1601.
- He, J., 2008, Isolation of anthocyanin mixtures from fruits and vegetables and evaluation of their stability, availability and biotransformation in the gastrointestinal tract.
- Heinonen, M., Rein, D., Satué-Gracia, M. T., Huang, S. W., German, J. B. and Frankel, E. N., 1998, Effect of protein on the antioxidant activity of phenolic compounds in a lecithin– liposome oxidation system, *Journal of agricultural and food chemistry*, 46(3), 917-922.
- Heldman, D., 2011, Kinetic of food quality attribute retention, *Food preservation process design. Academic Press, London*, 87, 108.
- Hendry, G. A. F. and Houghton, J. D., 1996, *Natural food colorants*. Springer Science & Business Media.
- Heras-Roger, J., Alonso-Alonso, O., Gallo-Montesdeoca, A., Díaz-Romero, C. and Darias-Martín, J., 2016, Influence of copigmentation and phenolic composition on wine color, *Journal of Food Science and Technology*, 53, 2540-2547.
- Hernández-Herrero, J. A. and Frutos, M. J., 2014, Effect of concentrated plum juice on physicochemical and sensory properties of yoghurt made at bench top scale, *International Journal of Dairy Technology*, 67(1), 123-128.
- Hocine, R., Farid, D., Yasmine, S., Khodir, M., Kapranov, V. N. and Kiselev, E. F., 2018, Recent advances on stability of anthocyanins, *Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Агрономия и животноводство*, 13(4), 257-286.
- Houghton, A., Appelhagen, I. and Martin, C., 2021, Natural blues: Structure meets function in anthocyanins, *Plants*, 10(4), 726.
- Hu, A. and Li, L., 2021, Effect mechanism of ultrasound pretreatment on fibrillation kinetics, physicochemical properties and structure characteristics of soy protein isolate nanofibrils, *Ultrasonics sonochemistry*, 78, 105741.

- Hu, Y., He, C., Woo, M. W., Xiong, H., Hu, J. and Zhao, Q., 2019, Formation of fibrils derived from whey protein isolate: Structural characteristics and protease resistance, *Food & function*, 10(12), 8106-8115.
- Huang, Y., Zhou, S., Zhao, G. and Ye, F., 2021, Destabilisation and stabilisation of anthocyanins in purple-fleshed sweet potatoes: A review, *Trends in Food Science & Technology*, 116, 1141-1154.
- Huang, L., Zhang, Y. and Li, H., 2014, Self-assembly of rice bran globulin fibrils in electrostatic screening: Nanostructure and gels, *Journal of Nanomaterials*, 2014(1), 951240.
- Hubbermann, E. M., Heins, A., Stöckmann, H. and Schwarz, K., 2006, Influence of acids, salt, sugars and hydrocolloids on the colour stability of anthocyanin rich black currant and elderberry concentrates, *European Food Research and Technology*, 223(1), 83-90.
- Huo, X. Z., Wang, X., Yang, R., Qu, L. B. and Zeng, H. J., 2020, Studies on the effect of a Fupenzi glycoprotein on the fibrillation of bovine serum albumin and its antioxidant activity, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 237, 118387.
- Huyst, A. M., Deleu, L. J., Luyckx, T., Lambrecht, M. A., Van Camp, J., Delcour, J. A. and Van der Meeren, P., 2021, Influence of hydrophobic interfaces and shear on ovalbumin amyloid-like fibril formation in oil-in-water emulsions, *Food Hydrocolloids*, 111, 106327.
- Idham, Z., Muhamad, I. I. and Sarmidi, M. R., 2012, Degradation kinetics and color stability of spray-dried encapsulated anthocyanins from *Hibiscus Sabdariffa* L, *Journal of Food Process Engineering*, 35(4), 522-542.
- Indrawati, L., Wang, Z., Narsimhan, G. and Gonzalez, J., 2008, Effect of processing parameters on foam formation using a continuous system with a mechanical whipper, *Journal of Food Engineering*, 88(1), 65-74.
- Jadhav, R. V. and Bhujbal, S. S., 2019, Effect of Copigmentation on Thermal Stability of *Hibiscus sabdariffa* anthocyanins, *Research Journal of Pharmacy and Technology*, 12(6), 2949-2954.
- Jafari, S.-M., Mahdavi-Khazaei, K. and Hemmati-Kakhki, A., 2016, Microencapsulation of saffron petal anthocyanins with cress seed gum compared with Arabic gum through freeze drying, *Carbohydrate polymers*, 140, 20-25.
- Jakaphan, R., 2017, The effects of selected metal ions on the stability of red cabbage anthocyanins and total phenolic compounds subjected to encapsulation process, *Journal of food processing and preservation*, v. 41(no. 6), pp. --2017 v.2041 no.2016.
- Jansens, K. J., Rombouts, I., Grootaert, C., Brijs, K., Van Camp, J., Van der Meeren, P., Rousseau, F., Schymkowitz, J. and Delcour, J. A., 2019, Rational design of amyloid-like fibrillary structures for tailoring food protein techno-functionality

and their potential health implications, *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 18(1), 84-105.

- Jayawardena, N., Kaur, M., Nair, S., Malmstrom, J., Goldstone, D., Negron, L., Gerrard, J. A. and Domigan, L. J., 2017, Amyloid fibrils from hemoglobin, *Biomolecules*, 7(2), 37.
- Jiang, T., Mao, Y., Sui, L., Yang, N., Li, S., Zhu, Z., Wang, C., Yin, S., He, J. and He, Y., 2019a, Degradation of anthocyanins and polymeric color formation during heat treatment of purple sweet potato extract at different pH, *Food Chemistry*, 274, 460-470.
- Jiang, L., Liu, Y., Li, L., Qi, B., Ju, M., Xu, Y., Zhang, Y. and Sui, X., 2019b, Covalent conjugates of anthocyanins to soy protein: Unravelling their structure features and in vitro gastrointestinal digestion fate, *Food Research International*, 120, 603-609.
- Jimenez-Gonzalez, O., Ruiz-Espinosa, H., Luna-Guevara, J. J., Ochoa-Velasco, C. E., Vital, D. L. and Luna-Guevara, M. L., 2018, A potential natural coloring agent with antioxidant properties: Microencapsulates of *Renealmia alpinia* (Rottb.) Maas fruit pericarp, *NFS journal*, 13, 1-9.
- Jing, P., Zhao, S. J., Ruan, S. Y., Xie, Z. H., Dong, Y. and Yu, L. L., 2012, Anthocyanin and glucosinolate occurrences in the roots of Chinese red radish (*Raphanus sativus* L.), and their stability to heat and pH, *Food Chemistry*, 133(4), 1569-1576.
- Jing, P. and Giusti, M. M., 2005, Characterization of anthocyanin-rich waste from purple corncobs (*Zea mays* L.) and its application to color milk, *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(22), 8775-8781.
- Jo, Y.-J., Huang, W. and Chen, L., 2020, Fabrication and characterization of lentil protein gels from fibrillar aggregates and the gelling mechanism study, *Food & function*, 11(11), 10114-10125.
- Josefsson, L., Cronhamn, M., Ekman, M., Widehammar, H., Emmer, Å. and Lendel, C., 2019, Structural basis for the formation of soy protein nanofibrils, *RSC advances*, 9(11), 6310-6319.
- Jung, J., Lin, C. Y. and Zhao, Y., 2022, Enhancing anthocyanin-phenolic copigmentation through epicarp layer treatment and edible coatings to retain anthocyanins in thermally processed whole blueberries, *Journal of food science*, 87(9), 3809-3821.
- Jung, J., Cavender, G., Simonsen, J. and Zhao, Y., 2015, Investigation of the mechanisms of using metal complexation and cellulose nanofiber/sodium alginate layer-by-layer coating for retaining anthocyanin pigments in thermally processed blueberries in aqueous media, *Journal of agricultural and food chemistry*, 63(11), 3031-3038.

- Kadam, D. M., Wilson, R. A., Kaur, S. and Manisha. 2012, Influence of foam mat drying on quality of tomato powder, *International Journal of Food Properties*, 15(1), 211-220.
- Kader, F., Irmouli, M., Zitouni, N., Nicolas, J.-P. and Metche, M., 1999, Degradation of cyanidin 3-glucoside by caffeic acid o-quinone. Determination of the stoichiometry and characterization of the degradation products, *Journal of agricultural and food chemistry*, 47(11), 4625-4630.
- Kalantari, S., Roufegarinejad, L., Pirsá, S., Gharekhani, M. and Tabibiazar, M., 2021,  $\beta$ -Cyclodextrin-assisted extraction of phenolic compounds from pomegranate (*Punica granatum* L.) peel: A new strategy for anthocyanin copigmentation, *LWT*, 151, 112136.
- Kammerer, D., 2016. Handbook on natural pigments in food and beverages. In: Elsevier, Amsterdam.
- Kanatt, S. R., 2020, Development of active/intelligent food packaging film containing *Amaranthus* leaf extract for shelf life extension of chicken/fish during chilled storage, *Food Packaging and Shelf Life*, 24, 100506.
- Kanha, N., Regenstein, J. M. and Laokuldilok, T., 2022, Optimization of process parameters for foam mat drying of black rice bran anthocyanin and comparison with spray-and freeze-dried powders, *Drying technology*, 40(3), 581-594.
- Kanha, N., Surawang, S., Pitchakarn, P. and Laokuldilok, T., 2020, Microencapsulation of copigmented anthocyanins using double emulsion followed by complex coacervation: Preparation, characterization and stability, *LWT*, 133, 110154.
- Kanha, N., Surawang, S., Pitchakarn, P., Regenstein, J. M. and Laokuldilok, T., 2019, Copigmentation of cyanidin 3-O-glucoside with phenolics: Thermodynamic data and thermal stability, *Food Bioscience*, 30, 100419.
- Karaaslan, M., Ozden, M., Vardin, H. and Turkoglu, H., 2011, Phenolic fortification of yogurt using grape and callus extracts, *LWT-Food science and technology*, 44(4), 1065-1072.
- Kavanagh, G. M., Clark, A. H. and Ross-Murphy, S. B., 2000, Heat-induced gelation of globular proteins: part 3. Molecular studies on low pH  $\beta$ -lactoglobulin gels, *International journal of biological macromolecules*, 28(1), 41-50.
- Kay, C. D., Mazza, G., Holub, B. J. and Wang, J., 2004, Anthocyanin metabolites in human urine and serum, *British Journal of Nutrition*, 91(6), 933-942.
- Kechinski, C. P., Guimarães, P. V. R., Noreña, C. P. Z., Tessaro, I. C. and Marczak, L. D. F., 2010, Degradation kinetics of anthocyanin in blueberry juice during thermal treatment, *Journal of food science*, 75(2), C173-C176.
- Khalifa, I., Zhu, W., Nawaz, A., Li, K. and Li, C., 2021, Microencapsulated mulberry anthocyanins promote the in vitro-digestibility of whey proteins in glycosylated energy-ball models, *Food chemistry*, 345, 128805.

- Khalifa, I., Nie, R., Ge, Z., Li, K. and Li, C., 2018, Understanding the shielding effects of whey protein on mulberry anthocyanins: Insights from multispectral and molecular modelling investigations, *International journal of biological macromolecules*, 119, 116-124.
- Kirby, C. W., Wu, T., Tsao, R. and McCallum, J. L., 2013, Isolation and structural characterization of unusual pyranoanthocyanins and related anthocyanins from Staghorn sumac (*Rhus typhina* L.) via UPLC–ESI-MS, 1H, 13C, and 2D NMR spectroscopy, *Phytochemistry*, 94, 284-293.
- Klitzing, R. v. and Müller, H.-J., 2002, Film stability control, *Current opinion in colloid & interface science*, 7(1-2), 42-49.
- Koide, T., Kamei, H., Hashimoto, Y., Kojima, T. and Hasegawa, M., 1996, Antitumor effect of hydrolyzed anthocyanin from grape rinds and red rice, *Cancer biotherapy & radiopharmaceuticals*, 11(4), 273-277.
- Kong, Z., Li, Z., Zhang, L., Dai, L., Wang, Y., Sun, Q., McClements, D. J., Cheng, Y., Zhang, Z. and Wang, C., 2024, Development of pea protein nanoparticle/hydrolyzed rice glutelin fibril emulsion gels for encapsulation of curcumin, *International journal of biological macromolecules*, 133640.
- Kong, J.-M., Chia, L.-S., Goh, N.-K., Chia, T.-F. and Brouillard, R., 2003, Analysis and biological activities of anthocyanins, *Phytochemistry*, 64(5), 923-933.
- Kopjar, M. and Piližota, V., 2011, Prevention of thermal degradation of anthocyanins in blackberry juice with addition of different sugars Prevención de degradación termal de antocianinas en zumo de mora con adición de diferentes azúcares, *CyTA-Journal of Food*, 9(3), 237-242.
- Kristo, E., Hazizaj, A. and Corredig, M., 2012, Structural changes imposed on whey proteins by UV irradiation in a continuous UV light reactor, *Journal of agricultural and food chemistry*, 60(24), 6204-6209.
- Kroes-Nijboer, A., Venema, P., Bouman, J. and van der Linden, E., 2011, Influence of protein hydrolysis on the growth kinetics of  $\beta$ -lg fibrils, *Langmuir*, 27(10), 5753-5761.
- Kucharska, M. and Grabka, J., 2010, A review of chromatographic methods for determination of synthetic food dyes, *Talanta*, 80(3), 1045-1051.
- Kumar, B. and Cumbal, L., 2016, UV-Vis, FTIR and antioxidant study of *Persea americana* (Avocado) leaf and fruit: a comparison, *Revista de La Facultad de Ciencias Químicas*, (14), 13-20.
- Lang, Y., Li, E., Meng, X., Tian, J., Ran, X., Zhang, Y., Zang, Z., Wang, W. and Li, B., 2019, Protective effects of bovine serum albumin on blueberry anthocyanins under illumination conditions and their mechanism analysis, *Food Research International*, 122, 487-495.

- Lee, J., Lee, J.-H., Paik, S. R., Yeom, B. and Char, K., 2019, Thermally triggered self-assembly of  $\kappa$ -casein amyloid nanofibrils and their nanomechanical properties, *Polymer*, *179*, 121626.
- Lee, J., Durst, R. W., Wrolstad, R. E., 2005, Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines by the pH differential method: collaborative study. *Journal of AOAC international*, *88*(5), 1269-1278.
- Lendel, C. and Solin, N., 2021, Protein nanofibrils and their use as building blocks of sustainable materials, *RSC advances*, *11*(62), 39188-39215.
- Levy, R., Okun, Z. and Shpigelman, A., 2019, The influence of chemical structure and the presence of ascorbic acid on anthocyanins stability and spectral properties in purified model systems, *Foods*, *8*(6), 207.
- Li, T., Wang, L., Zhang, X., Geng, H., Xue, W. and Chen, Z., 2021a, Assembly behavior, structural characterization and rheological properties of legume proteins based amyloid fibrils, *Food Hydrocolloids*, *111*, 106396.
- Li, T., Wang, L., Zhang, X., Yu, P. and Chen, Z., 2021b, Complexation of rice glutelin fibrils with cyanidin-3-O-glucoside at acidic condition: Thermal stability, binding mechanism and structural characterization, *Food Chemistry*, *363*, 130367.
- Li, T., Wang, L., Geng, H., Zhang, X. and Chen, Z., 2021c, Formation, structural characteristics, foaming and emulsifying properties of rice glutelin fibrils, *Food Chemistry*, *354*, 129554.
- Li, J., Wang, B., He, Y., Wen, L., Nan, H., Zheng, F., Liu, H., Lu, S., Wu, M. and Zhang, H., 2021d, A review of the interaction between anthocyanins and proteins, *Food Science and Technology International*, *27*(5), 470-482.
- Li, S., Jiang, Z., Wang, F., Wu, J., Liu, Y. and Li, X., 2020a, Characterization of rice glutelin fibrils and their effect on in vitro rice starch digestibility, *Food Hydrocolloids*, *106*, 105918.
- Li, W., Pang, X., Xiao, J., Wang, X., He, R. and Zhao, X., 2020b, Degradation kinetics of pelargonidin-3-(p-coumaroyl) diglucoside-5-(malonyl) glucoside and pelargonidin-3-(feruloyl) diglucoside-5-(malonyl) glucoside in red radish during air-impingement jet drying, *LWT*, *127*, 109390.
- Li, A., Xiao, R., He, S., An, X., He, Y., Wang, C., Yin, S., Wang, B., Shi, X. and He, J., 2019, Research advances of purple sweet potato anthocyanins: extraction, identification, stability, bioactivity, application, and biotransformation, *Molecules*, *24*(21), 3816.
- Li, X. D., Li, J., Wang, M. and Jiang, H., 2016, Copigmentation effects and thermal degradation kinetics of purple sweet potato anthocyanins with metal ions and sugars, *Applied Biological Chemistry*, *59*(1), 15-24.

- Li, J., Song, H., Dong, N. and Zhao, G., 2014, Degradation kinetics of anthocyanins from purple sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) as affected by ascorbic acid, *Food Science and Biotechnology*, 23(1), 89-96.
- Li, J., Li, X. d., Zhang, Y., Zheng, Z. d., Qu, Z. y., Liu, M., Zhu, S. h., Liu, S., Wang, M. and Qu, L., 2013, Identification and thermal stability of purple-fleshed sweet potato anthocyanins in aqueous solutions with various pH values and fruit juices, *Food chemistry*, 136(3-4), 1429-1434.
- Li, H., Deng, Z., Zhu, H., Hu, C., Liu, R., Young, J. C. and Tsao, R., 2012, Highly pigmented vegetables: Anthocyanin compositions and their role in antioxidant activities, *Food research international*, 46(1), 250-259.
- Liang, T., Zhang, Z. and Jing, P., 2019, Black rice anthocyanins embedded in self-assembled chitosan/chondroitin sulfate nanoparticles enhance apoptosis in HCT-116 cells, *Food chemistry*, 301, 125280.
- Lin, C. Y., Wang, T. H., How, S. C., Bednarikova, Z., Fedunova, D., Gazova, Z., Wu, J. W. and Wang, S. S. S., 2020, Investigating the effect of sugar-terminated nanoparticles on amyloid fibrillogenesis of  $\beta$ -lactoglobulin, *International journal of biological macromolecules*, 165, 291-307.
- Lin, Y. C. and Chou, C. C., 2009, Effect of heat treatment on total phenolic and anthocyanin contents as well as antioxidant activity of the extract from *Aspergillus awamori*-fermented black soybeans, a healthy food ingredient, *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 60(7), 627-636.
- Liu, C., Wu, D., Wang, P., McClements, D. J., Cui, S., Liu, H., Leng, F., Sun, Q. and Dai, L., 2024, Study on the formation mechanism of pea protein nanofibrils and the changes of structural properties of fibril under different pH and temperature, *Food Hydrocolloids*, 150, 109735.
- Liu, L., Yang, S., Chen, C., Fang, Y., Li, L. and Ban, Z., 2023, High-performance films fabricated by food protein nanofibrils loaded with vanillin: Mechanism, characterization and bacteriostatic effect, *Food Packaging and Shelf Life*, 37, 101080.
- Liu, Y., Liu, Y., Tao, C., Liu, M., Pan, Y. and Lv, Z., 2018, Effect of temperature and pH on stability of anthocyanin obtained from blueberry, *Journal of Food Measurement and Characterization*, 12, 1744-1753.
- Liu, J. and Tang, C. H., 2013, Heat-induced fibril assembly of vicilin at pH 2.0: Reaction kinetics, influence of ionic strength and protein concentration, and molecular mechanism, *Food Research International*, 51(2), 621-632.
- Lobo, F. A., Nascimento, M. A., Domingues, J. R., Falcão, D. Q., Hernanz, D., Heredia, F. J. and de Lima Araujo, K. G., 2017, Foam mat drying of Tommy Atkins mango: Effects of air temperature and concentrations of soy lecithin and carboxymethylcellulose on phenolic composition, mangiferin, and antioxidant capacity, *Food Chemistry*, 221, 258-266.

- Loveday, S. M., Su, J., Rao, M. A., Anema, S. G. and Singh, H., 2012, Whey protein nanofibrils: The environment–morphology–functionality relationship in lyophilization, rehydration, and seeding, *Journal of agricultural and food chemistry*, 60(20), 5229-5236.
- Loveday, S., Wang, X., Rao, M., Anema, S., Creamer, L. and Singh, H., 2010, Tuning the properties of  $\beta$ -lactoglobulin nanofibrils with pH, NaCl and CaCl<sub>2</sub>, *International dairy journal*, 20(9), 571-579.
- Lu, Z., He, J., Zhang, Y. and Bing, D., 2020, Composition, physicochemical properties of pea protein and its application in functional foods, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 60(15), 2593-2605.
- Lu, X. r., Lu, J. l., Wu, Y. w., Ouyang, J. and Sun, S. q., 2010, Study on esterified modification of anthocyanins by FTIR, *Spectroscopy and Spectral Analysis*, 30(1), 38-41.
- Luo, X. e., Wang, R., Wang, J., Li, Y., Luo, H., Chen, S., Zeng, X. a. and Han, Z., 2022, Acylation of Anthocyanins and Their Applications in the Food Industry: Mechanisms and Recent Research Advances, *Foods*, 11(14), 2166.
- Luo, C. L., Zhou, Q., Yang, Z.-W., Wang, R.-D. and Zhang, J. L., 2018, Evaluation of structure and bioprotective activity of key high molecular weight acylated anthocyanin compounds isolated from the purple sweet potato (*Ipomoea batatas* L. cultivar Eshu No. 8), *Food Chemistry*, 241, 23-31.
- Lv, X., Li, L., Lu, X., Wang, W., Sun, J., Liu, Y., Mu, J., Ma, Q. and Wang, J., 2022, Effects of organic acids on color intensification, thermodynamics, and copigmentation interactions with anthocyanins, *Food chemistry*, 396, 133691.
- Ma, Z. and Jing, P., 2020, Stabilization of black rice anthocyanins by self-assembled silk fibroin nanofibrils: Morphology, spectroscopy and thermal protection, *International journal of biological macromolecules*, 146, 1030-1039.
- Maccarone, E., Ferrigno, V., Longo, M. L. and Rapisarda, P., 1987, Effects of light on anthocyanins-kinetics and photodegradation products in acidic aqueous-solutions, *Annali di Chimica*, 77(5-6), 499-508.
- MacDougall, D., 2002, *Colour in food: improving quality*. Woodhead Publishing.
- Machado, A. P. D., Rezende, C. A., Rodrigues, R. A., Barbero, G. F., Rosa, P. and Martínez, J., 2018, Encapsulation of anthocyanin-rich extract from blackberry residues by spray-drying, freeze-drying and supercritical antisolvent, *Powder Technology*, 340, 553-562.
- Maciel, L. G., do Carmo, M. A. V., Azevedo, L., Dagher, H., Molognoni, L., de Almeida, M. M., Granato, D. and Rosso, N. D., 2018, Hibiscus sabdariffa anthocyanins-rich extract: Chemical stability, in vitro antioxidant and antiproliferative activities, *Food and Chemical Toxicology*, 113, 187-197.

- Mackintosh, S. H., Meade, S. J., Healy, J. P., Sutton, K. H., Larsen, N. G., Squires, A. M. and Gerrard, J. A., 2009, Wheat glutenin proteins assemble into a nanostructure with unusual structural features, *Journal of Cereal Science*, 49(1), 157-162.
- Mahdavi, S. A., Jafari, S. M., Assadpour, E. and Dehnad, D., 2016a, Microencapsulation optimization of natural anthocyanins with maltodextrin, gum Arabic and gelatin, *International journal of biological macromolecules*, 85, 379-385.
- Mahdavi, S. A., Jafari, S. M., Assadpour, E. and Ghorbani, M., 2016b, Storage stability of encapsulated barberry's anthocyanin and its application in jelly formulation, *Journal of Food Engineering*, 181, 59-66.
- Maier, T., Fromm, M., Schieber, A., Kammerer, D. R. and Carle, R., 2009, Process and storage stability of anthocyanins and non-anthocyanin phenolics in pectin and gelatin gels enriched with grape pomace extracts, *European Food Research and Technology*, 229, 949-960.
- Malaj, N., De Simone, B. C., Quartarolo, A. D. and Russo, N., 2013, Spectrophotometric study of the copigmentation of malvidin 3-O-glucoside with p-coumaric, vanillic and syringic acids, *Food Chemistry*, 141(4), 3614-3620.
- Malien-Aubert, C., Dangles, O. and Amiot, M. J., 2001, Color stability of commercial anthocyanin-based extracts in relation to the phenolic composition. Protective effects by intra-and intermolecular copigmentation, *Journal of agricultural and food chemistry*, 49(1), 170-176.
- Margesi, S., Kagashe, G. and Dhokia, D., 2013, Determination of iron contents in Hibiscus sabdariffa calyces and Kigelia Africana fruit, *Sch. Acad. J. Biosci*, 1, 108-111.
- Marszałek, K., Woźniak, Ł., Kruszewski, B. and Skąpska, S., 2017. The Effect of High Pressure Techniques on the Stability of Anthocyanins in Fruit and Vegetables. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(2).
- Martinsen, B. K., Aaby, K. and Skrede, G., 2020, Effect of temperature on stability of anthocyanins, ascorbic acid and color in strawberry and raspberry jams, *Food chemistry*, 316, 126297.
- Martinus, A. and Bookel, V., 2008, Kinetic modeling of food quality: A critical review, *Food Sci. Food Saf*, 7, 144-158.
- Martynenko, A. and Chen, Y., 2016, Degradation kinetics of total anthocyanins and formation of polymeric color in blueberry hydrothermodynamic (HTD) processing, *Journal of Food Engineering*, 171, 44-51.
- Maryam, M., 2021, Spray-drying microencapsulation of anthocyanins of black seedless barberry (*Berberis vulgaris*), *Journal of food processing and preservation*, v. 45(no. 10), pp. e15858--12021 v.15845 no.15810.
- Matalanis, A., Jones, O. G. and McClements, D. J., 2011, Structured biopolymer-based delivery systems for encapsulation, protection, and release of lipophilic compounds, *Food Hydrocolloids*, 25(8), 1865-1880.

- Matsufuji, H., Kido, H., Misawa, H., Yaguchi, J., Otsuki, T., Chino, M., Takeda, M. and Yamagata, K., 2007, Stability to Light, Heat, and Hydrogen Peroxide at Different pH Values and DPPH Radical Scavenging Activity of Acylated Anthocyanins from Red Radish Extract, *Journal of agricultural and food chemistry*, 55(9), 3692-3701.
- Maylinda, E. V., Rinadi, A., Putri, E., Fadillah, G. and Wayuningsih, S. 2019, Color stability of anthocyanins copigmentation from red rice (*Oryza sativa* L.) bran by spectrophotometry UV-Vis. IOP Conference Series: Materials Science and Engineering,
- Mazhitova, A. T., Kasymakunova, A. M. and Turker, N., 2022, Thermal stability enhancement of berry anthocyanins by co-pigmentation with extracts from natural sources, *International Journal of Food Engineering*, 18(7), 537-545.
- Mazza, G., Cacace, J. E. and Kay, C. D., 2004, Methods of analysis for anthocyanins in plants and biological fluids, *Journal of AOAC international*, 87(1), 129-145.
- Mehrad, B., Ravanfar, R., Licker, J., Regenstein, J. M. and Abbaspourrad, A., 2018, Enhancing the physicochemical stability of  $\beta$ -carotene solid lipid nanoparticle (SLNP) using whey protein isolate, *Food Research International*, 105, 962-969.
- Milošević, J., Petrić, J., Jovčić, B., Janković, B. and Polović, N., 2020, Exploring the potential of infrared spectroscopy in qualitative and quantitative monitoring of ovalbumin amyloid fibrillation, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 229, 117882.
- Miyagusuku-Cruzado, G., Jiménez-Flores, R. and Giusti, M., 2021, Whey protein addition and its increased light absorption and tinctorial strength of model solutions colored with anthocyanins, *Journal of Dairy Science*, 104(6), 6449-6462.
- Moayedzadeh, S. and Madadlou, A., 2015, Formation mechanisms, handling and digestibility of food protein nanofibrils, *Trends in food science & technology*, 45(1), 50-59.
- Mohammadlinejhad, S. and Kurek, M. A., 2021. Microencapsulation of Anthocyanins—Critical Review of Techniques and Wall Materials. *Applied Sciences*, 11(9).
- Mohammadi Pour, P., Fakhri, S., Asgary, S., Farzaei, M. H. and Echeverría, J., 2019, The Signaling Pathways, and Therapeutic Targets of Antiviral Agents: Focusing on the Antiviral Approaches and Clinical Perspectives of Anthocyanins in the Management of Viral Diseases, 10.
- Mohammadian, M. and Madadlou, A., 2016, Characterization of fibrillated antioxidant whey protein hydrolysate and comparison with fibrillated protein solution, *Food Hydrocolloids*, 52, 221-230.
- Mohammadian, M. and Madadlou, A., 2018, Technological functionality and biological properties of food protein nanofibrils formed by heating at acidic condition, *Trends in food science & technology*, 75, 115-128.

- Mohammadian, M., Salami, M., Momen, S., Alavi, F., Emam-Djomeh, Z. and Moosavi-Movahedi, A. A., 2019, Enhancing the aqueous solubility of curcumin at acidic condition through the complexation with whey protein nanofibrils, *Food Hydrocolloids*, 87, 902-914.
- Mojica, L., Berhow, M. and Gonzalez de Mejia, E., 2017, Black bean anthocyanin-rich extracts as food colorants: Physicochemical stability and antidiabetes potential, *Food chemistry*, 229, 628-639.
- Monge-Morera, M., Lambrecht, M. A., Deleu, L. J., Louros, N. N., Rousseau, F., Schymkowitz, J. and Delcour, J. A., 2021, Heating wheat gluten promotes the formation of amyloid-like fibrils, *ACS omega*, 6(3), 1823-1833.
- Mordor, Ī., 2024, Available on <https://www.mordorintelligence.com/industry-reports/global-natural-food-colorants-market>.
- Morel, B., Varela, L., Azuaga, A. I. and Conejero-Lara, F., 2010, Environmental conditions affect the kinetics of nucleation of amyloid fibrils and determine their morphology, *Biophysical journal*, 99(11), 3801-3810.
- Morsy, M. K., Morsy, O. M., Abdelmonem, M. A. and Elsabagh, R., 2022, Anthocyanin-Colored Microencapsulation Effects on Survival Rate of *Lactobacillus rhamnosus* GG, Color Stability, and Sensory Parameters in Strawberry Nectar Model, *Food and Bioprocess Technology*, 15(2), 352-367.
- Moses, J., Norton, T., Alagusundaram, K. and Tiwari, B., 2014, Novel drying techniques for the food industry, *Food Engineering Reviews*, 6, 43-55.
- Moskovitz, J., Yim, M. B. and Chock, P. B., 2002, Free Radicals and Disease, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 397(2), 354-359.
- Mukherjee, J. and Gupta, M. N., 2017, Protein aggregates: forms, functions and applications, *International journal of biological macromolecules*, 97, 778-789.
- Mulinacci, N., Ieri, F., Giaccherini, C., Innocenti, M., Andrenelli, L., Canova, G., Saracchi, M. and Casiraghi, M. C., 2008, Effect of Cooking on the Anthocyanins, Phenolic Acids, Glycoalkaloids, and Resistant Starch Content in Two Pigmented Cultivars of *Solanum tuberosum* L., *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(24), 11830-11837.
- Nawirska-Olszańska, A., Stępień, B., Biesiada, A., Kolniak-Ostek, J. and Oziembłowski, M., 2017, Rheological, chemical and physical characteristics of golden berry (*Physalis peruviana* L.) after convective and microwave drying, *Foods*, 6(8), 60.
- Nayak, B., Berrios, J. D. J., Powers, J. R. and Tang, J., 2011, Thermal degradation of anthocyanins from purple potato (Cv. Purple Majesty) and impact on antioxidant capacity, *Journal of agricultural and food chemistry*, 59(20), 11040-11049.
- Nguyen, Q.-D., Dang, T.-T., Nguyen, T.-V.-L., Nguyen, T.-T.-D. and Nguyen, N.-N., 2022, Microencapsulation of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) anthocyanins: Effects of different carriers on selected physicochemical properties and

- antioxidant activities of spray-dried and freeze-dried powder, *International Journal of Food Properties*, 25(1), 359-374.
- Nguyen, Q. D., Dang, T. T., Nguyen, T. V. L., Nguyen, T. T. D. and Nguyen, N. N., 2022, Microencapsulation of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) anthocyanins: effects of drying conditions on some physicochemical properties and antioxidant activities of spray-dried powder, *Food science & nutrition*, 10(1), 191-203.
- Nichenametla, S. N., Taruscio, T. G., Barney, D. L. and Exon, J. H., 2006, A Review of the Effects and Mechanisms of Polyphenolics in Cancer, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 46(2), 161-183.
- Nicolai, T. and Durand, D., 2013, Controlled food protein aggregation for new functionality, *Current opinion in colloid & interface science*, 18(4), 249-256.
- Nindo, C. and Tang, J., 2007, Refractance window dehydration technology: a novel contact drying method, *Drying technology*, 25(1), 37-48.
- Nontasan, S., Moongngarm, A. and Deeseenthum, S., 2012, Application of functional colorant prepared from black rice bran in yogurt, *Apchee Procedia*, 2, 62-67.
- Nunes, L. and Tavares, G. M., 2019, Thermal treatments and emerging technologies: Impacts on the structure and techno-functional properties of milk proteins, *Trends in food science & technology*, 90, 88-99.
- Oliveira, A., Alexandre, E. M., Coelho, M., Lopes, C., Almeida, D. P. and Pintado, M., 2015, Incorporation of strawberries preparation in yoghurt: Impact on phytochemicals and milk proteins, *Food Chemistry*, 171, 370-378.
- Oliveira, H., Correia, P., Pereira, A. R., Araújo, P., Mateus, N., de Freitas, V., Oliveira, J. and Fernandes, I., 2020, Exploring the Applications of the Photoprotective Properties of Anthocyanins in Biological Systems, 21(20), 7464.
- Onyilagha, J. C. and Grotewold, E., 2004, The biology and structural distribution of surface flavonoids, *Recent research developments in plant science. Vol. 2*, 53-71.
- Pan, L.-H., Chen, L.-P., Wu, C.-L., Wang, J.-F., Luo, S.-Z., Luo, J.-P. and Zheng, Z., 2022, Microencapsulation of blueberry anthocyanins by spray drying with soy protein isolates/high methyl pectin combination: Physicochemical properties, release behavior in vitro and storage stability, *Food chemistry*, 395, 133626.
- Pangestu, N. P., Miyagusuku-Cruzado, G. and Giusti, M. M., 2020, Copigmentation with chlorogenic and ferulic acid affected color and anthocyanin stability in model beverages colored with *Sambucus peruviana*, *Sambucus nigra*, and *Daucus carota* during storage, *Foods*, 9(10), 1476.
- Patras, A., Brunton, N. P., O'Donnell, C. and Tiwari, B. K., 2010, Effect of thermal processing on anthocyanin stability in foods; mechanisms and kinetics of degradation, *Trends in food science & technology*, 21(1), 3-11.

- Patsanguan, S., Hisaranusorn, N., Phongthai, S. and Rawdkuen, S., 2014, Rice bran protein isolates: Preparation and their physico-chemical and functional properties, *Food and Applied bioscience journal*, 2(3), 169-182.
- Pham, C. L., de Francisco, B. R., Valsecchi, I., Dazzoni, R., Pille, A., Lo, V., Ball, S. R., Cappai, R., Wien, F. and Kwan, A. H., 2018, Probing structural changes during self-assembly of surface-active hydrophobin proteins that form functional amyloids in fungi, *Journal of molecular biology*, 430(20), 3784-3801.
- Pina, F., Melo, M. J., Laia, C. A. T., Parola, A. J. and Lima, J. C., 2012, Chemistry and applications of flavylium compounds: a handful of colours, *Chemical Society Reviews*, 41(2), 869-908.
- Pinheiro, C. P., Moreira, L. M., Alves, S. S., Cadaval Jr, T. R. and Pinto, L. A., 2021, Anthocyanins concentration by adsorption onto chitosan and alginate beads: Isotherms, kinetics and thermodynamics parameters, *International journal of biological macromolecules*, 166, 934-939.
- Pinto, K. R. D., Tulini, F. L., Guimarães, J. d. G. L., Moraes, I. C. F., Ditchfield, C., Lima, C. G. d., Silva, V. L. d. S. and Favaro-Trindade, C. S., 2023, Production and Evaluation of Yogurt Colored with Anthocyanin-Rich Pigment Prepared from Jaboticaba (*Myrciaria cauliflora* Mart.) Skin, *Processes*, 11(2), 526.
- Pires, T. C., Dias, M. I., Barros, L., Barreira, J. C., Santos-Buelga, C. and Ferreira, I. C., 2018, Incorporation of natural colorants obtained from edible flowers in yogurts, *LWT*, 97, 668-675.
- Pires, T. C., Dias, M. I., Carochó, M., Barreira, J. C., Santos-Buelga, C., Barros, L. and Ferreira, I. C., 2020, Extracts from *Vaccinium myrtillus* L. fruits as a source of natural colorants: Chemical characterization and incorporation in yogurts, *Food & function*, 11(4), 3227-3234.
- Pohndorf, R. S., Meneghetti, V. L., Paiva, F. F., de Oliveira, M. and Elias, M. C., 2018, Kinetic evaluation of oxidative stability and physical degradation of soybean grains stored at different conditions, *Journal of Food Processing and Preservation*, 42(10).
- Pojer, E., Mattivi, F., Johnson, D. and Stockley, C. S., 2013, The case for anthocyanin consumption to promote human health: a review, *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 12(5), 483-508.
- Prakash, N. and Priya, S., 2016, Development of novel functional confectionery using low reduced sugar, *Indian Journal of Drugs*, 4(4), 141-148.
- Prior, R. L. and Wu, X., 2006, Anthocyanins: structural characteristics that result in unique metabolic patterns and biological activities, *Free radical research*, 40(10), 1014-1028.
- Qadir, N. and Wani, I. A., 2023, Protein concentrates from plain, aromatic and pigmented rice cultivars: Functional, thermal and morphological characterization, *Food Chemistry Advances*, 3, 100499.

- Qadri, O. S., Srivastava, A. K. and Yousuf, B., 2020, Trends in foam mat drying of foods: Special emphasis on hybrid foam mat drying technology, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 60(10), 1667-1676.
- Qi, X., Li, Y., Li, J., Rong, L., Pan, W., Shen, M. and Xie, J., 2023, Fibrillation modification to improve the viscosity, emulsifying, and foaming properties of rice protein, *Food Research International*, 166, 112609.
- Qian, B.-J., Liu, J.-H., Zhao, S.-J., Cai, J.-X. and Jing, P., 2017, The effects of gallic/ferulic/caffeic acids on colour intensification and anthocyanin stability, *Food Chemistry*, 228, 526-532.
- Quadrado, R. F. N. and Fajardo, A. R., 2020, Microparticles based on carboxymethyl starch/chitosan polyelectrolyte complex as vehicles for drug delivery systems, *Arabian Journal of Chemistry*, 13(1), 2183-2194.
- Quan, W., He, W., Qie, X., Chen, Y., Zeng, M., Qin, F., Chen, J. and He, Z., 2020, Effects of  $\beta$ -cyclodextrin, whey protein, and soy protein on the thermal and storage stability of anthocyanins obtained from purple-fleshed sweet potatoes, *Food Chemistry*, 320, 126655.
- Rawel, H. M., Kroll, J. and Hohl, U., 2001, Model studies on reactions of plant phenols with whey proteins, *Food/Nahrung*, 45(2), 72-81.
- Rawel, H. M. and Rohn, S., 2010, Nature of hydroxycinnamate-protein interactions, *Phytochemistry Reviews*, 9, 93-109.
- Rein, M., 2005, Copigmentation reactions and color stability of berry anthocyanins.
- Ren, S. and Giusti, M. M., 2021, Monitoring the interaction between thermally induced whey protein and anthocyanin by fluorescence quenching spectroscopy, *Foods*, 10(2), 310.
- Ren, S., Rodriguez-Saona, L. and Giusti, M. M., 2022, Analyzing the interaction between anthocyanins and native or heat-treated whey proteins using infrared spectroscopy, *Molecules*, 27(5), 1538.
- Renard, D. and Lefebvre, J., 1992, Gelation of globular proteins: Effect of pH and ionic strength on the critical concentration for gel formation. A simple model and its application to  $\beta$ -lactoglobulin heat-induced gelation, *International journal of biological macromolecules*, 14(5), 287-291.
- Reyes, L. F. and Cisneros-Zevallos, L., 2007, Degradation kinetics and colour of anthocyanins in aqueous extracts of purple-and red-flesh potatoes (*Solanum tuberosum* L.), *Food Chemistry*, 100(3), 885-894.
- Riaz, M., Zia-Ul-Haq, M. and Saad, B., 2016, *Anthocyanins and human health: biomolecular and therapeutic aspects* (Vol. 10). Springer.
- Riedel, R., Böhme, B. and Rohm, H., 2015, Development of formulations for reduced-sugar and sugar-free agar-based fruit jellies, *International Journal of Food Science & Technology*, 50(6), 1338-1344.

- Robert, J. V., de Gois, J. S., Rocha, R. B. and Luna, A. S., 2022, Direct solid sample analysis using synchronous fluorescence spectroscopy coupled with chemometric tools for the geographical discrimination of coffee samples, *Food Chemistry*, 371, 131063.
- Rodriguez-Amaya, D. B., 2019, Update on natural food pigments - A mini-review on carotenoids, anthocyanins, and betalains, *Food Research International*, 124, 200-205.
- Rosales, T. K. O. and Fabi, J. P., 2022, Nanoencapsulated anthocyanin as a functional ingredient: Technological application and future perspectives, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 218, 112707.
- Sadilova, E., Stintzing, F. C. and Carle, R., 2006, Anthocyanins, Colour and Antioxidant Properties of Eggplant (*Solanum melongena* L.) and Violet Pepper (*Capsicum annum* L.) Peel Extracts, 61(7-8), 527-535.
- Sagar, V. and Suresh Kumar, P., 2010, Recent advances in drying and dehydration of fruits and vegetables: a review, *Journal of Food Science and Technology*, 47, 15-26.
- Saha, D., Nanda, S. K. and Yadav, D. N., 2019, Optimization of spray drying process parameters for production of groundnut milk powder, *Powder Technology*, 355, 417-424.
- Saidji, N., Malki, F., Boukerche, H. and Mokrane, H., 2023, Insight into stability and degradation kinetics of Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) flowers anthocyanin, effect of pH, heating, storage conditions, and co-pigment treatment, *Biomass Conversion and Biorefinery*, 1-13.
- Samadi, S. and Fard, F. R., 2020, Phytochemical properties, antioxidant activity and mineral content (Fe, Zn and Cu) in Iranian produced black tea, green tea and roselle calyces, *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 23, 101472.
- Sangamithra, A., Sivakumar, V., John, S. G. and Kannan, K., 2015, Foam mat drying of food materials: A review, *Journal of Food Processing and Preservation*, 39(6), 3165-3174.
- Šarić, A., Michaels, T. C., Zacccone, A., Knowles, T. P. and Frenkel, D., 2016, Kinetics of spontaneous filament nucleation via oligomers: Insights from theory and simulation, *The Journal of chemical physics*, 145(21).
- Schwartz, S. J., Cooperstone, J. L., Cichon, M. J., Joachim, H. and Giusti, M. M., 2017. Colorants. In *Fennema's food chemistry* (pp. 681-752). CRC press.
- Ścibisz, I., Ziarno, M. and Mitek, M., 2019, Color stability of fruit yogurt during storage, *Journal of Food Science and Technology*, 56, 1997-2009.
- Ścibisz, I., Ziarno, M., Mitek, M. and Zaręba, D., 2012, Effect of probiotic cultures on the stability of anthocyanins in blueberry yoghurts, *LWT-Food science and technology*, 49(2), 208-212.

- Seeram, N. P., Bourquin, L. D. and Nair, M. G., 2001, Degradation Products of Cyanidin Glycosides from Tart Cherries and Their Bioactivities, *Journal of agricultural and food chemistry*, 49(10), 4924-4929.
- Sekhon, B. S., 2010, Food nanotechnology - an overview, *Nanotechnol Sci Appl*, 3, 1-15.
- Sharara, M. S., 2017, Copigmentation effect of some phenolic acids on stabilization of roselle (*Hibiscus sabdariffa*) anthocyanin extract, *Am J Food Sci Technol*, 5(2), 45.
- Sharif, N., Khoshnoudi-Nia, S. and Jafari, S. M., 2020, Nano/microencapsulation of anthocyanins; a systematic review and meta-analysis, *Food Research International*, 132, 109077.
- Shi, L., 2023. *Characterizing the assembly kinetics, seeding, and gelation of lentil protein nanofibrils* [University of British Columbia].
- Shih, P. H., Wu, C. H., Yeh, C. T. and Yen, G. C., 2011, Protective effects of anthocyanins against amyloid  $\beta$ -peptide-induced damage in neuro-2A cells, *Journal of agricultural and food chemistry*, 59(5), 1683-1689.
- Shruthi, V., Ramachandra, C., Nidoni, U., Hiregoudar, S., Naik, N. and Kurubar, A., 2016, Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) as a source of natural colour: A review, *Plant Archives*, 16(2), 515-522.
- Sigurdson, G. T., Tang, P. and Giusti, M. M., 2017, Natural colorants: Food colorants from natural sources, *Annual review of food science and technology*, 8, 261-280.
- Simonin, J. P., 2016, On the comparison of pseudo-first order and pseudo-second order rate laws in the modeling of adsorption kinetics, *Chemical Engineering Journal*, 300, 254-263.
- Sindi, H. A., Marshall, L. J. and Morgan, M. R., 2014, Comparative chemical and biochemical analysis of extracts of *Hibiscus sabdariffa*, *Food Chemistry*, 164, 23-29.
- Sinela, A., Rawat, N., Mertz, C., Achir, N., Fulcrand, H. and Dornier, M., 2017, Anthocyanins degradation during storage of *Hibiscus sabdariffa* extract and evolution of its degradation products, *Food Chemistry*, 214, 234-241.
- Skrede, G., Larsen, V. B., Aaby, K., Jørgensen, A. S. and Birkeland, S. E., 2004, Antioxidative properties of commercial fruit preparations and stability of bilberry and black currant extracts in milk products, *Journal of food science*, 69(9), S351-S356.
- Sojka, M., Guyot, S., Kołodziejczyk, K., Król, B. and Baron, A., 2009, Composition and properties of purified phenolics preparations obtained from an extract of industrial blackcurrant (*Ribes nigrum* L.) pomace, *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 84(6), 100-106.

- Song, Y., Li, T., Zhang, X. and Wang, L., 2023, Investigating the effects of ion strength on amyloid fibril formation of rice proteins, *Food Bioscience*, 51, 102068.
- Stintzing, F. C. and Carle, R., 2004, Functional properties of anthocyanins and betalains in plants, food, and in human nutrition, *Trends in Food Science & Technology*, 15(1), 19-38.
- Stojadinovic, M., Radosavljevic, J., Ognjenovic, J., Vesic, J., Prodic, I., Stanic-Vucinic, D. and Velickovic, T. C., 2013, Binding affinity between dietary polyphenols and  $\beta$ -lactoglobulin negatively correlates with the protein susceptibility to digestion and total antioxidant activity of complexes formed, *Food Chemistry*, 136(3-4), 1263-1271.
- Sui, X., Sun, H., Qi, B., Zhang, M., Li, Y. and Jiang, L., 2018, Functional and conformational changes to soy proteins accompanying anthocyanins: Focus on covalent and non-covalent interactions, *Food Chemistry*, 245, 871-878.
- Sui, X., Bary, S. and Zhou, W., 2016, Changes in the color, chemical stability and antioxidant capacity of thermally treated anthocyanin aqueous solution over storage, *Food Chemistry*, 192, 516-524.
- Sun, Y., Zhang, Y., Xu, W. and Zheng, X., 2020, Analysis of the anthocyanin degradation in blue honeysuckle berry under microwave assisted foam-mat drying, *Foods*, 9(4), 397.
- Sunil, L. and Shetty, N. P., 2022, Biosynthesis and regulation of anthocyanin pathway genes, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 106(5), 1783-1798.
- Szoltysik, M., Kucharska, A. Z., Dąbrowska, A., Zięba, T., Bobak, Ł. and Chrzanowska, J., 2021, Effect of two combined functional additives on yoghurt properties, *Foods*, 10(6), 1159.
- Tahir, H. E., Xiaobo, Z., Jiyong, S., Mariod, A. A. and Wiliam, T., 2016, Rapid determination of antioxidant compounds and antioxidant activity of Sudanese Karkade (Hibiscus sabdariffa L.) using near infrared spectroscopy, *Food Analytical Methods*, 9, 1228-1236.
- Talcott, S. T., Brenes, C. H., Pires, D. M. and Del Pozo-Insfran, D., 2003, Phytochemical Stability and Color Retention of Copigmented and Processed Muscadine Grape Juice, *Journal of agricultural and food chemistry*, 51(4), 957-963.
- Talebpour, F. and Ghahghaei, A., 2020, Effect of green synthesis of gold nanoparticles (AuNPs) from Hibiscus sabdariffa on the aggregation of  $\alpha$ -lactalbumin, *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 26, 2297-2306.
- Tan, C., Sun, Y., Yao, X., Zhu, Y., Jafari, S. M., Sun, B. and Wang, J., 2023, Stabilization of anthocyanins by simultaneous encapsulation-copigmentation via protein-polysaccharide polyelectrolyte complexes, *Food Chemistry*, 416, 135732.
- Tan, C., Dadmohammadi, Y., Lee, M. C. and Abbaspourrad, A., 2021, Combination of copigmentation and encapsulation strategies for the synergistic stabilization of

- anthocyanins, *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 20(4), 3164-3191.
- Tan, C., Selig, M. J. and Abbaspourrad, A., 2018, Anthocyanin stabilization by chitosan-chondroitin sulfate polyelectrolyte complexation integrating catechin copigmentation, *Carbohydrate Polymers*, 181, 124-131.
- Tang, Y., Zhang, X., Li, X., Ma, C., Chu, X., Wang, L. and Xu, W., 2022, A review on recent advances of Protein-Polymer hydrogels, *European Polymer Journal*, 162, 110881.
- Tang, P. and Giusti, M. M., 2020, Metal Chelates of Petunidin Derivatives Exhibit Enhanced Color and Stability, 9(10), 1426.
- Tensiska, T., Marta, H., Cahyana, Y. and Amirah, N. S., 2017, Application of encapsulated anthocyanin pigments from purple sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) in jelly drink, *KnE Life Sciences*, 482-493.
- Terahara, N., Matsui, T., Minoda, K., Nasu, K., Kikuchi, R., Fukui, K., Ono, H. and Matsumoto, K., 2009, Functional New Acylated Sophoroses and Deglycosylated Anthocyanins in a Fermented Red Vinegar, *Journal of agricultural and food chemistry*, 57(18), 8331-8338.
- Tiwari, B. K., O'Donnell, C. P. and Cullen, P. J., 2009, Effect of non thermal processing technologies on the anthocyanin content of fruit juices, *Trends in Food Science & Technology*, 20(3-4), 137-145.
- Tontul, I., Eroğlu, E. and Topuz, A., 2018, Convective and refractance window drying of cornelian cherry pulp: Effect on physicochemical properties, *Journal of Food Process Engineering*, 41(8), e12917.
- Tontul, I. and Topuz, A., 2017, Effects of different drying methods on the physicochemical properties of pomegranate leather (pestil), *LWT*, 80, 294-303.
- Trigueros, L., Wojdyło, A. and Sendra, E., 2014, Antioxidant activity and protein-polyphenol interactions in a pomegranate (*Punica granatum* L.) yogurt, *Journal of agricultural and food chemistry*, 62(27), 6417-6425.
- Trouillas, P., Sancho-García, J. C., De Freitas, V., Gierschner, J., Otyepka, M. and Dangles, O., 2016, Stabilizing and modulating color by copigmentation: Insights from theory and experiment, *Chemical reviews*, 116(9), 4937-4982.
- Tsai, P. J. and Huang, H. P., 2004, Effect of polymerization on the antioxidant capacity of anthocyanins in Roselle, *Food Research International*, 37(4), 313-318.
- Tsai, P. and Ou, A., 1996, Colour degradation of dried roselle during storage, *Food Sci*, 23, 629-640.
- Tseng, T. H., Wang, C. J. and Kao, E. S., 1996, Hibiscus protocatechuic acid protects against oxidative damage induced by tert-butylhydroperoxide in rat primary hepatocytes, *Chemico-Biological Interactions*, 101(2), 137-148.

- Türkyılmaz, M., Özkan, M., 2012. Kinetics of anthocyanin degradation and polymeric colour formation in black carrot juice concentrates during storage. *International journal of food science & technology*, 47(11), 2273-2281.
- Türkyılmaz, M., Hamzaoğlu, F., Ünal, H. and Özkan, M., 2022, Influence of amino acid addition on the thermal stability of anthocyanins in pomegranate (*Punica granatum* L., cv. Hicaznar) and orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck, cv. Valencia) juice blend, *Food chemistry*, 370, 131061.
- Venancio, V. P., Cipriano, P. A., Kim, H., Antunes, L. M. G., Talcott, S. T. and Mertens-Talcott, S. U., 2017, Cocoplum (*Chrysobalanus icaco* L.) anthocyanins exert anti-inflammatory activity in human colon cancer and non-malignant colon cells, *Food & function*, 8(1), 307-314.
- Vildan, E. and Tontul, İ., 2020, Farklı demleme yöntemlerinin soğuk hibiskus çayının bazı fiziksel ve kimyasal özellikleri üzerine etkisi, *Erzincan University Journal of Science and Technology*, 13(2), 779-787.
- Vimercati, W. C., Macedo, L. L., Araújo, C. d. S., Teixeira, L. J. Q. and Saraiva, S. H., 2019, Efeito da temperatura na cinética de secagem em leite de espuma e na degradação de antocianina em morango, *Brazilian Journal of food technology*, 22.
- Wallace, T. C. and Giusti, M. M., 2008, Determination of color, pigment, and phenolic stability in yogurt systems colored with nonacylated anthocyanins from *Berberis boliviana* L. as compared to other natural/synthetic colorants, *Journal of food science*, 73(4), C241-C248.
- Walsh, D. J., Russell, K. and FitzGerald, R. J., 2008, Stabilisation of sodium caseinate hydrolysate foams, *Food Research International*, 41(1), 43-52.
- Wang, J., Zhu, H., Gan, H., Meng, Q., Du, G., An, Y. and Liu, J., 2020, The effect of heparan sulfate on promoting amyloid fibril formation by  $\beta$ -casein and their binding research with multi-spectroscopic approaches, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 202, 111671.
- Wang, C. and Xie, Y., 2019, Interaction of protein isolate with anthocyanin extracted from black soybean and its effect on the anthocyanin stability, *Journal of food science*, 84(11), 3140-3146.
- Wang, Q., Zhu, J., Gleisner, R., Kuster, T., Baxa, U. and McNeil, S., 2012, Morphological development of cellulose fibrils of a bleached eucalyptus pulp by mechanical fibrillation, *Cellulose*, 19, 1631-1643.
- Wawer, J., Szociński, M., Olszewski, M., Piątek, R., Naczka, M. and Krakowiak, J., 2019, Influence of the ionic strength on the amyloid fibrillogenesis of hen egg white lysozyme, *International journal of biological macromolecules*, 121, 63-70.
- Weber, F., Boch, K. and Schieber, A., 2017, Influence of copigmentation on the stability of spray dried anthocyanins from blackberry, *LWT*, 75, 72-77.

- Wei, Z. and Huang, Q., 2019, Modulation of formation, physicochemical properties, and digestion of ovotransferrin nanofibrils with covalent or non-covalent bound gallic acid, *Journal of agricultural and food chemistry*, 67(35), 9907-9915.
- Wei, Z., Yang, W., Fan, R., Yuan, F. and Gao, Y., 2015, Evaluation of structural and functional properties of protein–EGCG complexes and their ability of stabilizing a model  $\beta$ -carotene emulsion, *Food Hydrocolloids*, 45, 337-350.
- West, M. E. and Mauer, L. J., 2013, Color and Chemical Stability of a Variety of Anthocyanins and Ascorbic Acid in Solution and Powder Forms, *Journal of agricultural and food chemistry*, 61(17), 4169-4179.
- Wilson, R. A., Kadam, D. M., Chadha, S. and Sharma, M., 2012, Foam mat drying characteristics of mango pulp, *International Journal of Food Science and Nutrition Engineering*, 2(4), 63-69.
- Wrolstad, R. E., Durst, R. W. and Lee, J., 2005, Tracking color and pigment changes in anthocyanin products, *Trends in food science & technology*, 16(9), 423-428.
- Wu, S., Zhang, Y., Ren, F., Qin, Y., Liu, J., Liu, J., Wang, Q. and Zhang, H., 2018, Structure–affinity relationship of the interaction between phenolic acids and their derivatives and  $\beta$ -lactoglobulin and effect on antioxidant activity, *Food Chemistry*, 245, 613-619.
- Xia, W., Zhang, H., Chen, J., Hu, H., Rasulov, F., Bi, D., Huang, X. and Pan, S., 2017, Formation of amyloid fibrils from soy protein hydrolysate: Effects of selective proteolysis on  $\beta$ -conglycinin, *Food Research International*, 100, 268-276.
- Xie, Y., Zhu, X., Li, Y. and Wang, C., 2018, Analysis of the pH-dependent Fe(III) ion chelating activity of anthocyanin extracted from black soybean [glycine max (L.) Merr.] coats, *Journal of agricultural and food chemistry*, 66(5), 1131-1139.
- Xu, J., Su, X., Lim, S., Griffin, J., Carey, E., Katz, B., Tomich, J., Smith, J. S. and Wang, W., 2015, Characterisation and stability of anthocyanins in purple-fleshed sweet potato P40, *Food chemistry*, 186, 90-96.
- Yang, H., Yang, S., Kong, J., Dong, A. and Yu, S., 2015, Obtaining information about protein secondary structures in aqueous solution using Fourier transform IR spectroscopy, *Nature protocols*, 10(3), 382-396.
- Yi, J., He, Q., Peng, G. and Fan, Y., 2022, Improved water solubility, chemical stability, antioxidant and anticancer activity of resveratrol via nanoencapsulation with pea protein nanofibrils, *Food Chemistry*, 377, 131942.
- Yildirim-Elikoglu, S. and Erdem, Y. K., 2018, Interactions between milk proteins and polyphenols: Binding mechanisms, related changes, and the future trends in the dairy industry, *Food reviews international*, 34(7), 665-697.
- Yoshida, K., Mori, M. and Kondo, T., 2009, Blue flower color development by anthocyanins: from chemical structure to cell physiology, *Natural product reports*, 26(7), 884-915.

- Yunilawati, R., Cahyaningtyas, A. and Saputro, A. 2019. Co-pigmentation of purple sweet potatoes (*Ipomoea batatas* L.) anthocyanin extract using green tea extract. *Journal of Physics: Conference Series*,
- Zainul, R. and Isara, L. 2019. Preparation of Dye Sensitized Solar Cell (DSSC) using anthocyanin color dyes from jengkol shell (*Pithecellobium lobatum* Benth.) by the gallate acid copigmentation. *Journal of Physics: Conference Series*,
- Zhang, H., Kang, L., Bhutto, R. A., Fan, Y. and Yi, J., 2024, Formation of pea protein amyloid-like nanofibrils-derived hydrogels mediated by epigallocatechin gallate, *Food Chemistry*, 140381.
- Zhang, Y. and Dee, D. R., 2023, Morphology, formation kinetics and core composition of pea and soy 7S and 11S globulin amyloid fibrils, *Journal of agricultural and food chemistry*, 71(11), 4755-4765.
- Zhang, C., Fu, Y., Li, Z., Li, T., Shi, Y., Xie, H., Li, Y., Su, H. and Li, Z., 2021, Application of whey protein isolate fibrils in encapsulation and protection of  $\beta$ -carotene, *Food Chemistry*, 346, 128963.
- Zhang, B., Wang, Q., Zhou, P. P., Li, N. N. and Han, S. Y., 2020a, Copigmentation evidence of oenin with phenolic compounds: A comparative study of spectrographic, thermodynamic and theoretical data, *Food Chemistry*, 313, 126163.
- Zhang, Y., Deng, Z., Li, H., Zheng, L., Liu, R. and Zhang, B., 2020b, Degradation kinetics of anthocyanins from purple eggplant in a fortified food model system during microwave and frying treatments, *Journal of agricultural and food chemistry*, 68(42), 11817-11828.
- Zhang, Y., Chen, S., Qi, B., Sui, X. and Jiang, L., 2018, Complexation of thermally-denatured soybean protein isolate with anthocyanins and its effect on the protein structure and in vitro digestibility, *Food Research International*, 106, 619-625.
- Zhang, B., He, F., Zhou, P. P., Liu, Y. and Duan, C. Q., 2015, Copigmentation between malvidin-3-O-glucoside and hydroxycinnamic acids in red wine model solutions: Investigations with experimental and theoretical methods, *Food Research International*, 78, 313-320.
- Zhang, Y. H., Huang, L. H. and Wei, Z. C., 2014, Effects of additional fibrils on structural and rheological properties of rice bran albumin solution and gel, *European Food Research and Technology*, 239(6), 971-978.
- Zhang, Y. and Cremer, P. S., 2006, Interactions between macromolecules and ions: the Hofmeister series, *Current opinion in chemical biology*, 10(6), 658-663.
- Zhao, X., Zhang, N., Wu, G. F., He, F., Lan, Y. B. and Duan, C. Q., 2022, Intermolecular copigmentation between anthocyanidin-3,5-O-diglucosides and three phenolic compounds: Insights from experimental and theoretical studies, *Food Chemistry Advances*, 1, 100111.

- Zhao, H. S., Ma, Z. and Jing, P., 2020a, Interaction of soy protein isolate fibrils with betalain from red beetroots: Morphology, spectroscopic characteristics and thermal stability, *Food Research International*, *135*, 109289.
- Zhao, M., Xiong, W., Chen, B., Zhu, J. and Wang, L., 2020b, Enhancing the solubility and foam ability of rice glutelin by heat treatment at pH12: Insight into protein structure, *Food Hydrocolloids*, *103*, 105626.
- Zhao, X., Ding, B. W., Qin, J.W., He, F. and Duan, C. Q., 2020c, Intermolecular copigmentation between five common 3-O-monoglucosidic anthocyanins and three phenolics in red wine model solutions: The influence of substituent pattern of anthocyanin B ring, *Food Chemistry*, *326*, 126960.
- Zhao, J. G., Yan, Q. Q., Xue, R. Y., Zhang, J. and Zhang, Y. Q., 2014, Isolation and identification of colourless caffeoyl compounds in purple sweet potato by HPLC-DAD-ESI/MS and their antioxidant activities, *Food chemistry*, *161*, 22-26.
- Zhou, M., Chen, Q., Bi, J., Wang, Y. and Wu, X., 2017, Degradation kinetics of cyanidin 3-O-glucoside and cyanidin 3-O-rutinoside during hot air and vacuum drying in mulberry (*Morus alba* L.) fruit: A comparative study based on solid food system, *Food Chemistry*, *229*, 574-579.
- Ziabakhsh Deylami, M., Abdul Rahman, R., Tan, C. P., Bakar, J. and Olusegun, L., 2016, Effect of blanching on enzyme activity, color changes, anthocyanin stability and extractability of mangosteen pericarp: A kinetic study, *Journal of Food Engineering*, *178*, 12-19.
- Zou, Y. C., Wu, C. L., Ma, C. F., He, S., Brennan, C. S. and Yuan, Y., 2019, Interactions of grape seed procyanidins with soy protein isolate: Contributing antioxidant and stability properties, *LWT*, *115*, 108465.