KESTANE KABUĞU PİGMENTLERİNİN EKSTRAKSİYONU, ENKAPSÜLASYONU VE BAZI ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ

Serhat KOÇER

T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KESTANE KABUĞU PİGMENTLERİNİN EKSTRAKSİYONU, ENKAPSÜLASYONU VE BAZI ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ

Serhat KOÇER
0000-0003-1926-5167

Prof. Dr. Ö. Utku ÇOPUR
(Danışman)

DOKTORA TEZİ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

BURSA – 2023
Her Hakkı Saklıdır

TEZ ONAYI

Serhat KOÇER tarafından hazırlanan "KESTANE KABUĞU PİGMENTLERİNİN EKSTRAKSİYONU, ENKAPSÜLASYONU VE BAZI ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ" adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Bursa Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı'nda **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Prof. Dr. Ö. Utku ÇOPUR

Başkan	**:**	Prof. Dr. Ömer Utku ÇOPUR 0000-0002-1951-7937 Bursa Uludağ Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı	İmza
Üye	**:**	Prof.Dr. Canan Ece TAMER 0000-0003-0441-1707 Bursa Uludağ Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı	İmza
Üye	**:**	Doç. Dr. Aycan YİĞİT ÇINAR 0000-0003-2038-725X Bursa Teknik Üniversitesi, Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesi Fakültesi, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı	İmza
Üye	**:**	Doç. Dr. Gülşah ÖZCAN SİNİR 0000-0003-3954-0058 Bursa Uludağ Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı	İmza
Üye	**:**	Dr.Öğr.Üyesi Elif SAVAŞ 0000-0002-4878-0013 Balıkesir Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı	İmza

Yukarıdaki sonucu onaylarım

Prof. Dr. Hüseyin Aksel EREN
Enstitü Müdürü
../../….

B.U.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmasında;

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim.

…/…/……

Serhat KOÇER

TEZ YAYINLANMA
FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezin/raporun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kâğıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma izni Bursa Uludağ Üniversitesi'ne aittir. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet hakları ile tezin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları tarafımıza ait olacaktır. Tezde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanılması zorunlu metinlerin yazılı izin alınarak kullandığını ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederiz.

Yükseköğretim Kurulu tarafından yayınlanan "**Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge**" kapsamında, yönerge tarafından belirtilen kısıtlamalar olmadığı takdirde tezin YÖK Ulusal Tez Merkezi / B.U.Ü. Kütüphanesi Açık Erişim Sistemi ve üye olunan diğer veri tabanlarının (Proquest veri tabanı gibi) erişimine açılması uygundur.

Prof.Dr. Ömer Utku ÇOPUR	Serhat KOÇER
Tarih	Tarih
İmza	İmza
Bu bölüme kişinin kendi el yazısı ile okudum anladım yazmalı ve imzalanmalıdır.	Bu bölüme kişinin kendi el yazısı ile okudum anladım yazmalı ve imzalanmalıdır.

ÖZET

Doktora Tezi

KESTANE KABUĞU PİGMENTLERİNİN EKSTRAKSİYONU, ENKAPSÜLASYONU VE BAZI ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ

Serhat KOÇER

Bursa Uludağ Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Ö. Utku ÇOPUR

Dünyada her yıl 1,3 milyar tondan fazla gıda, atık ve yan ürün olarak ortaya çıkmaktadır. TUİK verilerine göre ise Türkiye'de 2022 yılında 80200 ton kestane üretimi gerçekleşmiştir. Son yıllarda gıda, kozmetik ve tekstil sanayilerinde zararlı etkilerinden dolayı sentetik boyalar yerine doğal kaynaklı renk maddelerine ilgi artmıştır. Üretim esnasında yan ürün olarak ortaya çıkan kestane kabuğu antioksidan, renk maddeleri ve vitaminler gibi birçok değerli maddeyi içermektedir. Bu tez çalışmasında kestane kabukları özel sektörden sağlanarak bu ürünler üzerine mikrodalga destekli ekstraksiyon(MDE), ultrasonik destekli ekstraksiyon(UDE) ve alkali çözücülü klasik ekstraksiyon(KE) yöntemleri kullanılarak elde edilen kahverengi renk pigmentleri, toplam fenolik madde(TFM) içeriği ve toplam antioksidan kapasite (TAK)(DPPH ve CUPRAC) içeriği bağımlı değişken olarak seçilerek merkezi kompozit deneme tasarımı yanıt yüzey yöntemiyle optimizasyonlar gerçekleştirilmiştir. Ekstraktlar çeşitli analizlerle karakterize edilmiş ve ekstraktlar arasında farklılıklar istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. En yüksek sonuçları veren MDE ile elde edilen ekstrakt, maltodekstrin ve arabik gam ağırlıkça %10-15-20 oranında karıştırılarak sprey kurutulmuş toz elde edilmiştir. Bunun sonucunda kahverengi renkte, suda yüksek çözünürlüğe sahip hem pigment hem de biyoaktif bileşenler içeren sprey kurutulmuş kestane kabuğu tozu elde edilmiştir. Elde edilen kestane kabuğu tozunun yapay renklendirici yerine doğal bir gıda katkı maddesi olarak kullanılabileceği belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Kestane kabuğu, doğal gıda renklendiricisi, ekstraksiyon, mikroenkapsülasyon
2023, xvii + 157 sayfa.

ABSTRACT

PhD Thesis

EXTRACTION, ENCAPSULATION AND DETERMINATION OF SOME PROPERTIES OF CHESTNUT SHELLS PIGMENTS

Serhat KOÇER

Bursa Uludag University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Food Engineering

Supervisor: Prof. Dr. Ö. Utku ÇOPUR

Every year, more than 1,3 billion tons of food emerges as waste and by-products in the world. According to TUIK, 80200 tons of chestnut production was realized in 2022 in Turkiye. In recent years, the interest in natural coloring materials has increased instead of synthetic dyes due to their harmful effects in the food, cosmetics and textile industries. Chestnut shell, which occurs as a by-product during production, contains many valuable substances such as antioxidants, coloring pigments and vitamins. In this thesis, chestnut shells were obtained from the private sector and microwave assisted extraction (MDE), ultrasonic assisted extraction (UDE) and alkaline solvent classical extraction (KE) were performed on these products. Brown color pigment, total phenolic substance (TFM) content and total antioxidant capacity (TAK)(DPPH and CUPRAC) were chosen as the dependent variables and optimizations were carried out with a central composite trial design through response surface methodology. The extracts were characterized by various analyzes and the differences between the extracts were evaluated statistically. Spray-dried powder was obtained by mixing MDE which was the highest results, with maltodextrin and arabic gum at concentrations 10-15-20% by weight, As a result, spray-dried chestnut shell powder containing both pigment and bioactive components with high water solubility and brown color was obtained. It has been determined that this obtained chestnut shell powder can be used as a natural food additive instead of artificial brown colors.

Key words: Chestnut shell, natural food colorant, extraction, microencapsulation
2023, xvii + 157 pages.

ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR

Doktora tezimin başlangıcından sonuçlanıncaya kadar her zaman beni tecrübesi ve bilgi birikimiyle yönlendiren, motive eden, sorunlarımı çözen ve gerek akademik tecrübelerinden gerekse insanlığından çok şey öğrendiğim çok değerli danışman hocam sayın Prof. Dr. Ömer Utku ÇOPUR'a

Hem yüksek lisans danışman hocam hem de emekli olana kadar doktora tez izleme komitesi üyem, çok değerli, duayen, pozitif bakış açısı ile her zaman bizlerin yanında olan değerli hocam sayın Prof. Dr. Nevzat ARTIK'a,

Gerek doktora tez izleme komitem esnasında gerekse gerçekleştirdiğim tez esnasında her zaman yanımda olan engin ve çok değerli bilgi birikimiyle beni yönlendiren değerli hocam sayın Prof. Dr. Canan Ece TAMER'e,

Tez izleme kuruluna katılan değerli hocalarım sayın Doç. Dr. Aycan ÇINAR'a, sayın Doç. Dr. Gülşah ÖZCAN SİNİR'e ve sayın Dr. Öğretim Üyesi Elif SAVAŞ'a,

Üniversite yıllarından başlayan tanışıklığımız ve akademik anlamda birçok paylaşımımız olan ve bu tezin çeşitli aşamalarında desteğini esirgemeyen değerli hocam, arkadaşım sayın Doç Dr. Senem SUNA'ya,

Tezimle ilgili her zaman desteğini esirgemeyen Bursa Uludağ Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölüm Sekreteri sayın Meryem TÜRKÖZ'e,

Bu tezin, gerçekleşmesine maddi olarak katkı sağlayan(Proje No: TAGEM/HSGYAD/U/20/A3/P4/1876) Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü'ne, tezimin büyük bölümünü gerçekleştirdiğim Bursa Gıda ve Yem Kontrol Merkez Araştırma Müdürlüğü idaresi ve çalışma arkadaşlarıma, yine altyapısı ile tezime destekte bulunan Yalova Atatürk Bahçe Kültürleri Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü'ne, kestane kabuğu temininde bulunan İlka Şekerleme'ye,

Tezimle ilgili her zaman kendisiyle fikir alışverişinde bulunduğum, desteklerini esirgemeyen değerli arkadaşım sayın Dr. Seda KAYAHAN'a,

Tezimin analiz kısımlarında katkıları olan değerli arkadaşlarım Dr. Burcu KADIOĞLU'na, Semra ÇAVUŞ'a, Gönül AKYILDIZ'a, Özgür AKMAN'a ve Dr. Erdinç UYSAL'a,

Bizleri her zaman emekleriyle büyüten yetiştiren annem Semahat KOÇER'e ve babam Mustafa KOÇER'e

Ve tüm tez sürecim boyunca beni her zaman destekleyen, stresli anlarıma katlanan canım eşim Özlem KOÇER'e, bu süreçte onlara çok vakit ayıramadığım canım kızlarım Alara Duru KOÇER'e ve Alya Deniz KOÇER'e teşekkürlerimi sunarım.

Serhat KOÇER
…/…/…….

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET……	vi
ABSTRACT…….....	vii
ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR…….....	viii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ……	xii
ŞEKİLLER DİZİNİ……...	xiv
ÇİZELGELER DİZİNİ……..	xvi
1. GİRİŞ…….	1
2. KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAK ARAŞTIRMASI…….	4
2.1. Kestane……	4
2.2. Kestane Şekeri Üretimi…….....	6
2.3. Kestane Kabuğu Fizikokimyasal Özellikleri……...	7
2.4. Melanin Pigmentinin Kimyasal Yapısı, Kullanım Alanları, Elde Edilme Kaynakları……	8
2.5. Melanin ve Kestane Kabuğu İle İlgili Yapılmış Çalışmalar…….....	11
2.6. Biyoaktif Bileşenlerin ve Pigmentlerin Ekstraksiyon Yöntemleri……...	14
2.6.1. Klasik ekstraksiyon (katı-sıvı ekstraksiyonu)……...	15
2.6.2. Ultrasonik destekli ekstraksiyon……..	16
2.6.3. Mikrodalga destekli ekstraksiyon…….	18
2.6.4. Süper kritik akışkan ekstraksiyon (SAE)……..	20
2.7. Sprey Kurutucu ile Kurutma Yöntemi…….	22
2.8. Kestane Kabuğu Pigmentleri ve Biyoaktivitesi Üzerine Yapılan Çalışmalar……..	23
3. MATERYAL VE YÖNTEM…….	26
3.1. Sıcaklık ve Gramaj Ön Denemelerinin Yapılması……...	26
3.2. Ekstraksiyonların Bağımlı ve Bağımsız Değişkenlerinin Belirlenmesi…...	29
3.3. Klasik Ekstraksiyonun Optimizasyonu……...	30
3.3.1. Klasik yöntemle numune hazırlama işlemleri……..	30
3.3.2. Klasik ekstraksiyon için merkezi kompozit deney tasarımının modellenmesi…….	32
3.4. Ultrasonik Destekli Ekstraksiyonun Optimizasyonu……...	33
3.4.1.Ultrasonik destekli ekstraksiyon için numune hazırlama işlemleri……	33
3.4.2.Ultrasonik destekli ekstraksiyon için merkezi kompozit deney tasarımının modellenmesi……..	33
3.5. Mikrodalga Destekli Ekstraksiyonun Optimizasyonu…….	34
3.5.1. Mikrodalga destekli ekstraksiyon ön denemeleri……..……..	34
3.5.2. Mikrodalga destekli ekstraksiyon için numune hazırlama işlemleri……	35
3.5.3. Mikrodalga destekli ekstraksiyon için merkezi kompozit deney tasarımının modellenmesi……..	36
3.6. Sprey Kurutma Optimizasyonu……..	37
3.6.1. Sprey kurutma işlemi için optimum seviyedeki mikrodalga ekstraktının elde edilmesi……..	37

3.6.2. Sprey kurutma için Box-Behnken deney tasarımının modellenmesi…… 38
3.7. Analizler……. 38
3.7.1. Renk analizi…….. 38
3.7.2. Toplam fenolik madde (TFM) analizi…….. 39
3.7.3. Toplam antioksidan kapasite (TAK) belirlenmesi analizi……..……. 39
3.7.4. Ekstraksiyon verimi hesaplanması……... 41
3.7.5. Melanin pigmenti analizi……...……... 41
3.7.6. Kuru madde analizi……...……... 43
3.7.7. Kül analizi…… 43
3.7.8. HCl'de çözünmeyen kül analizi……... 44
3.7.9. Selüloz analizi……..... 44
3.7.10. Toplam şeker analizi……...……,,,,,.. 44
3.7.11. Protein analizi……. 45
3.7.12. Renk (L, a, b) analizi……...……... 46
3.7.13. HPLC'de fenolik maddelerin analizi…….. 47
3.7.14. Mineral madde içeriği analizi……. 48
3.7.15. Nişasta analizi……..….. 49
3.7.16. Antibakteriyel aktivite analizi…… 49
3.7.17. Toksisite testleri……. 50
3.7.18. Lignin analizi…… 54
3.7.19. Şelatlama aktivitesi testi analizi……. 54
3.7.20. Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FT-IR) analizi……. 55
3.7.21. Taramalı elektron mikroskobu (SEM) görüntülerinin alınması...……... 55
3.7.22. Diferansiyel taramalı kalorimetre (DSC) ile analizi……...…… 56
3.8. İstatistiksel Analiz……... 56
4. BULGULAR ve TARTIŞMA……...……. 57
4.1. Kestane Kabuğu Tozunun Fizikokimyasal Özellikleri…… 57
4.2. Optimizasyon Sonuçları…….. 58
4.2.1. Klasik ekstraksiyon sonuçları……... 58
4.2.2. Ultrasonik destekli ekstraksiyon sonuçları……... 66
4.2.3. Mikrodalga destekli ekstraksiyon sonuçları……. 76
4.2.4. Sprey kurutma sonuçları……... 84
4.3. Optimum Koşullar ve Bağımlı Değişkenlerin Deneysel Sonuçları…….. 90
4.4. Optimize Koşullarda Elde Edilen Sonuçlar……. 91
4.5. Ekstraksiyon Uygulamalarının Kestane Kabuğunun Bazı Özellikleri Üzerine Etkisi……..... 92
4.5.1. Ekstraksiyon yönteminin toplam fenolik madde üzerine etkisi…… 92
4.5.2. Ekstraksiyon yönteminin renk değeri üzerine etkisi……. 95
4.5.3. Ekstraksiyon yönteminin toplam antioksidan kapasitesi üzerine etkisi… 96
4.5.4. Ekstraksiyon yönteminin fenolik maddeler ve flavonoidler üzerine etkisi……... 98
4.5.5. Ekstraksiyon yönteminin mineral madde üzerine etkisi……... 103

4.5.6. Ekstraksiyon yönteminin melanin pigmenti konsantrasyonu üzerine etkisi……... 104
4.5.7. Ekstraksiyon yönteminin fizikokimyasal özellikler üzerine etkisi……. 105
4.5.8. Ekstraksiyon yönteminin antibakteriyel aktivite üzerine etkisi…… 108
4.5.9. Ekstraksiyonların FT-IR spektrumları…….. 109
4.6. Sprey Kurutulmuş Kestane Kabuğu (SKK) Tozuna Ait Sonuçlar…….. 112
4.6.1. SKK tozunun fizikokimyasal özellikleri…….. 112
4.6.2. SKK tozunun HPLC ile biyoaktif özellikleri…… 115
4.6.3. SKK tozunun FT-IR spektrumu……... 115
4.6.4. SKK tozunun DSC sonuçları…… 116
4.6.5. SKK tozunun SEM mikroskobik görüntüleri…….. 117
4.6.6. SKK tozunun antibakteriyel aktivite sonuçları…… 120
4.6.7. SKK tozunun toksisite sonuçları……. 121
5. SONUÇ…….. 129
KAYNAKLAR…….. 133
EKLER…….. 143
EK 1 Gallik asit bileşenine ait kalibrasyon grafiği…… 144
EK 2 Ellagik asit bileşenine ait kalibrasyon grafiği…… 144
EK 3 Protokateşuik asit bileşenine ait kalibrasyon grafiği…….. 145
EK 4 Epikateşin bileşenine ait kalibrasyon grafiği……..... 145
EK 5 Kateşin hidrat bileşenine ait kalibrasyon grafiği…… 146
EK 6 Miricetin-3-O glucoside bileşenine ait kalibrasyon grafiği……... 146
EK 7 Siringatin- 3-O glukozit bileşenine ait kalibrasyon grafiği…….. 147
EK 8 Potasyum (K) mineraline ait kalibrasyon grafiği……. 147
EK 9 Fosfor (P) mineraline ait kalibrasyon grafiği…… 148
EK 10 Magnezyum (Mg) mineraline ait kalibrasyon grafiği…….. 148
EK 11 Demir (Fe) mineraline ait kalibrasyon grafiği……. 149
EK 12 Sodyum (Na) mineraline ait kalibrasyon grafiği…….. 149
EK 13 Kalsiyum (Ca) mineraline ait kalibrasyon grafiği…… 150
EK 14 Bakır (Cu) mineraline ait kalibrasyon grafiği……..... 151
EK 15 Çinko (Zn) mineraline ait kalibrasyon grafiği……..... 151
EK 16 Arsenik (As) mineraline ait kalibrasyon grafiği……...……... 152
EK 17 Kadmiyum (Cd) mineraline ait kalibrasyon grafiği……. 152
EK 18 Civa (Hg) mineraline ait kalibrasyon grafiği…… 153
EK 19 Kurşun (Pb) mineraline ait kalibrasyon grafiği…… 153
EK 20 Alüminyum (Al) mineraline ait kalibrasyon grafiği…… 154
EK 21 KE fenolik bileşenler HPLC kromatogramı…… 155
EK 22 UDE fenolik bileşenler HPLC kromatogramı……..…… 155
EK 23 MDE fenolik bileşenler HPLC kromatogramı……. 156
EK 24 SKK tozu fenolik bileşenler HPLC kromatogramı…….. 156
ÖZGEÇMİŞ……..…... 157

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler	Açıklama
%	Yüzde
/	Bölü
ºC	Santigrat derece
w/w	Ağırlık bölü ağırlık
<	Küçüktür
>	Büyüktür
µ	Mikro
γ	Gama

Kısaltmalar	Açıklama
MDE	Mikrodalga Destekli Ekstraksiyon
UDE	Ultrasonik Destekli Ekstraksiyon
KE	Klasik Ekstraksiyon
TFM	Toplam Fenolik Madde
TAK	Toplam Antioksidan Kapasite
DPPH	2,2-difenil-1-pikrilhidrazil
CUPRAC	Bakır iyonu indirgenme antioksidan kapasitesi
OECD	Ekonomik Kalkınma ve İşbirliği Örgütü
FAO	Birleşmiş milletler Gıda ve Tarım Örgütü
TURKSTAT	Türkiye İstatistik Enstitüsü
CCD	Merkezi Kopozit Deneme Tasarımı
RSM	Yanıt Yüzey Yöntemi
FAOSTAT	Gıda ve Tarım Örgütü istatistik verikaynağı
GAE	Gallik asit eşdeğeri
TE	Troloks eşdeğeri
EC50	%50 yarılanma
pH	Potansiyel hidrojenin
Hz	Hertz
SAE	Superkritik akışkan ekstraksiyon
Psi	Bir inç karelik alana uygulanan kuvvetin libre cinsinden basınç birimi
Atm	Atmosfer basıncı kısaltması
HCL	Hidroklorik asit
NaOH	Sodyum hidroksit
mol	Molarite
km	Kilometre
dk	Dakika
L	Litre
FT-IR	Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi
MHZ	Mega hertz
DE	Dekstroz eşdeğeri
vd	Ve diğerleri
ha	Hektar
m	Metre

cm	Santimetre
mm	Milimetre
g	Gram
ppm	Milyonda bir
ke	Kuru ekstrakt
W	Watt
SEM	Taramalı elektron mikroskobu
DSC	Diferansiyel taramalı kalorimetre
SKK	Sprey kurutulmuş kestane kabuğu
USD	Amerikan Doları
3D	3 boyutlu
kob	Koloni oluşturan birim
ml	Mililitre
MHB	Muller-Hinton Broth
MHA	Muller-Hinton Agar
XTT	2,3-bis[2-metoksi-4-nitro-5-sulfofenil]-2H-tetrazolyum-5-karboksianilit iç tuzu

ŞEKİLLER DİZİNİ

		Sayfa
Şekil 2.1.	Dünya'da kestane üretiminin harita üzerinde gösterimi (FAOSTAT, 2023)……..	4
Şekil 2.2.	Kestane ağacı, meyvesi ve kabuğunun görünümü (Pinto vd., 2021c)……..	5
Şekil 2.3.	Dünya'da kestane üretimi yapan ilk 10 ülke (FAOSTAT, 2023)..	6
Şekil 2.4.	Geleneksel kestane şekeri üretimi (BAKKA, 2020)……..	6
Şekil 2.5.	Melaninle ilişkili yapılar ve bazı özellikleri (A) Temel Yapı (indolik halka) (B) Renk oluşumuna etkili resonans yapı (C) Melanin oluşumunda indolik polimerizasyonun bazı formları (Delgado-Vargas vd., 2000)…….	9
Şekil 2.6.	Klasik ekstraksiyonun (katı-sıvı) ekstraksiyon mekanizması…..	16
Şekil 2.7.	Ultrasonik uygulama türleri (Chemat vd., 2017)……..	18
Şekil 2.8.	Mikrodalga destekli ekstraksiyon sistemi (Y. Li vd., 2013)…….	20
Şekil 2.9.	Süperkritik bir akışkanın basınç-sıcaklık faz diyagramı (Knez vd., 2014)…….	21
Şekil 2.10	Sprey kurutma mekanizması (Anonim, 2023)……	23
Şekil 3.1.	Kestane kabuğu ön hazırlık fotoğrafları……..	26
Şekil 3.2.	Ekstraksiyonların akış şeması……..	29
Şekil 3.3.	Kestane kabuğu tozu elde edilme ve karakterizasyon diyagramı	30
Şekil 3.4.	Klasik ekstraksiyon uygulaması……..	32
Şekil 3.5.	Ultrasonik destekli ekstraksiyon için kullanılan ultrasonik banyo……	33
Şekil 3.6.	Mikrodalga ekstraksiyonda kullanılan ekstraksiyon cihazı…….	35
Şekil 3.7.	Sprey kurutma işlemlerinde kullanılan sprey kurutucu……	37
Şekil 3.8.	Toplam fenolik madde analizi kalibrasyon eğrisi……	39
Şekil 3.9.	CUPRAC yöntemi kalibrasyon eğrisi……..	40
Şekil 3.10.	DPPH yöntemi kalibrasyon eğrisi……	41
Şekil 3.11.	Klasik ekstraksiyon melanin pigmenti kalibrasyon eğrisi……	42
Şekil 3.12.	Ultrasonik destekli ekstraksiyon melanin pigmenti kalibrasyon eğrisi…….	42
Şekil 3.13.	Mikrodalga destekli ekstraksiyon melanin pigmenti kalibrasyon eğrisi…….	43
Şekil 3.14.	Yüksek basınçlı sıvı kromatografi cihazı…….	48
Şekil 3.15.	Beas-2B (ATCC® CRL-9609™) insan sağlıklı bronşiyal epitel hücre hattı mikroskobik görünümü ("İnsan sağlıklı bronşial epitel hücre", 2022)……..	51
Şekil 3.16.	Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi……	55
Şekil 3.17.	Taramalı elektron mikroskobu…….	56
Şekil 4.1.	Klasik ekstraksiyonda renk üzerine sıcaklık- NaOH etkileşimi...	64
Şekil 4.2.	Klasik ekstraksiyonda TFM içeriği üzerine süre-NaOH etkileşimi……..	64

Şekil 4.3.	Klasik ekstraksiyonda TAK içeriği(CUPRAC) üzerine etkileşimler……..	65
Şekil 4.4.	Klasik ekstraksiyonda TAK içeriği(DPPH) üzerine etkileşimler.	66
Şekil 4.5.	Ultrasonik destekli ekstraksiyonda renk üzerine sıcaklık- NaOH etkileşimi……..	71
Şekil 4.6.	Ultrasonik destekli ekstraksiyonda TFM üzerine sıcaklık- süre ve sıcaklık-NaOH konsantrasyonu etkileşimi…….	72
Şekil 4.7.	Ultrasonik destekli ekstraksiyonda TAK-CUPRAC üzerine etkileşimler…….	73
Şekil 4.8.	Ultrasonik destekli ekstraksiyonda TAK-DPPH üzerine etkileşimler…….	75
Şekil 4.9.	Mikrodalga destekli ekstraksiyon renk değeri yanıt yüzey güç-çözücü konsantrasyonu etkileşimi……..	80
Şekil 4.10.	Mikrodalga destekli ekstraksiyon TFM içeriği yanıt yüzey güç-süre etkileşimi…….	81
Şekil 4.11.	Mikrodalga destekli ekstraksiyon TAK (CUPRAC Metodu) etkileşimleri…….	82
Şekil 4.12.	Mikrodalga destekli ekstraksiyon TAK (DPPH Metodu) etkileşimleri……..	84
Şekil 4.13.	SKK renk değeri etkileşimleri……..	88
Şekil 4.14.	Sprey kurutulmuş toz örneğin TFM içeriği etkileşimleri…….	89
Şekil 4.15.	Sprey kurutulmuş toz örneğin biyoaktif toz boyar maddesi….....	89
Şekil 4.16.	Ekstraksiyonlara göre TFM içeriği değişimi……	94
Şekil 4.17.	Ekstraksiyonlara göre renk değeri değişimi……..	96
Şekil 4.18.	Ekstraksiyonlara göre TAK (CUPRAC ve DPPH) sonuçları değişimi……	97
Şekil 4.19.	Biyoaktif bileşenlerin miktarının ekstraksiyon yöntemine göre değişimi (A-E)…….	102
Şekil 4.20.	Ekstraktların antibakteriyel aktivite test görüntüleri……	109
Şekil 4.21.	Ekstraksiyonlara ait FT-IR spektrumları…….	111
Şekil 4.22.	Sprey kurutulmuş kestane kabuğu toz fotoğrafları…….	114
Şekil 4.23.	SKK tozunun ve melanin pigmenti standartının FT-IR spektrumları…….	116
Şekil 4.24.	SKK tozunun DSC ile camsı geçiş sıcaklıklarının tespiti……	117
Şekil 4.25.	SKK tozunun SEM mikroskobu ile yüzey morfolojik özelliklerinin görüntüleri…….	120
Şekil 4.26.	SKK tozlarının antibakteriyel aktivite etkinliği…….....	121
Şekil 4.27.	Kestane kabuğu tozlarının komet sonuçları…….	122
Şekil 4.28.	SKK tozlarının komet sonuçlarına ait örnek fotoğraflar……..	123
Şekil 4.29.	Kestane kabuğu ekstraktı uygulanan γ H2AX proteinlerinin büyüme yüzdeleri……	124
Şekil 4.30.	Kestane kabuğu ekstraktının γ H2AX sonuçları……...	126
Şekil 4.31.	Kestane kabuğu ekstraktının XTT sonuçları……	127

ÇİZELGELER DİZİNİ

		Sayfa
Çizelge 2.1.	Kestane kabuğu, fındık kabuğu ve antepfıstığı kabuğu polifenolik içerikleri……	7
Çizelge 2.2.	Melanin elde edilmesine yönelik çalışmalar……	12
Çizelge 2.3.	Kestane kabuğu ile ilgili çalışmalar…….	13
Çizelge 2.4.	Süper kritik akışkan ekstraksiyonunda kullanılan bazı çözücülerin kritik özellikleri (Herrero vd., 2006)……	21
Çizelge 3.1.	Kestane kabuğu ön denemeleri……	28
Çizelge 3.2.	Klasik ekstraksiyonda bağımsız değişkenlerin merkezi kompozit deneme tasarımına göre kodlanması……	32
Çizelge 3.3.	Ultrasonik destekli ekstraksiyonda bağımsız değişkenlerin merkezi kompozit deneme tasarımına göre kodlanması……..	34
Çizelge 3.4.	Mikrodalga destekli ekstraksiyon ön denemeleri…….	35
Çizelge 3.5.	Mikrodalga destekli ekstraksiyon için merkezi kompozit deney tasarımının kod seviyeleri……..	36
Çizelge 3.6.	Sprey kurutma uygulamasında Box Behnken deneme deseni bağımsız değişkenler için kod seviyeleri……	38
Çizelge 4.1.	Kestane kabuk tozu fizikokimyasal özellikleri(% km)……	57
Çizelge 4.2.	Kestane kabuk tozu biyoaktif özellikleri…….	57
Çizelge 4.3.	Kestane kabuk tozu mineral madde içeriği (mg/kg km)…….	58
Çizelge 4.4.	Klasik ekstraksiyon optimizasyon deneysel sonuçları…….	59
Çizelge 4.5.	Klasik ekstraksiyonda bağımlı değişkenler için uygun regresyon modelleri…….	61
Çizelge 4.6.	Her bir bağımsız değişken için ANOVA sonuçları……	62
Çizelge 4.7.	Ultrasonik destekli ekstraksiyon optimizasyon deneysel sonuçları…….	67
Çizelge 4.8.	Ultrasonik destekli kestane kabuğu karışımının regresyon modelleri……	68
Çizelge 4.9.	Her bir bağımsız değişken için ANOVA sonuçları……..	69
Çizelge 4.10.	Mikrodalga destekli ekstraksiyon optimizasyon deneysel sonuçları…….	76
Çizelge 4.11.	Mikrodalga destekli regresyon modelleri……..	77
Çizelge 4.12.	Her bir bağımlı değişken için ANOVA sonuçları……..	78
Çizelge 4.13.	Sprey kurutma optimizasyonu deneysel sonuçları……..	85
Çizelge 4.14.	Sprey kurutma regresyon modelleri……	85
Çizelge 4.15.	Sprey kurutmada bağımlı değişkenler için ANOVA sonuçları……..	86
Çizelge 4.16.	Ekstraksiyonlar için elde edilen optimum koşullar…….	90
Çizelge 4.17.	Optimum şartlarda bağımlı değişkenlerden elde edilen veriler (km)…….	92
Çizelge 4.18.	Ekstraksiyon metotlarının renk ve biyoaktif özelliklerine etkisi…….	92
Çizelge 4.19.	Ekstraksiyon yöntemlerinin fenolik bileşenler üzerine etkisi..	100
Çizelge 4.20.	Ekstraksiyon yöntemlerinin mineral ve ağır metallar üzerine etkisi…….	103

Çizelge 4.21. Ekstraksiyon yöntemlerinin fizikokimyasal ve antibakteriyel özelliklere etkisi…….. 106
Çizelge 4.22. SKK tozunun fizikokimyasal özellikleri…….. 113
Çizelge 4.23. SKK tozunun ICP-MS ile mineral ve ağır metal özellikleri… 114
Çizelge 4.24. SKK tozunun fenolik bileşenleri…….. 115

1. GİRİŞ

Tarım, %8,53 gayrisafi yurt içi hasıla katkısıyla Türkiye ekonomisinde önemli bir sektördür. 2016 verilerine göre 2014'te tarım sektörü toplam işgücünün %24' ünden sorumludur. 2014 yılı verilerine göre Türkiye'nin tarım alanı 38 423 000 ha' dır. Türkiye, meyve, sebze ve fındık üretiminde önemli üretici ve ihracatçı bir ülkedir (OECD, 2016). Nüfus için yeterli protein sağlanması gıdaya ulaşmak açısından bir indikatör olarak kabul edilmektedir (FAO, 2015). Türkiye, Dünya'da yeterli protein sağlama konusunda ilk 20'de yer alan ülkelerden biri olup protein sağlama konusunda diğer gelişmekte olan ülkelerden daha ileri durumdadır.

Türkiye, 2017 istatistiklerine göre 80 milyonu aşkın nüfusu ile büyük bir ülkedir (TURKSTAT, 2018). Tarım ürünlerinin üretimi ve gıda endüstrisi Türkiye ekonomisinde önemli bir rol oynamaktadır. Türkiye'de gıdaya ulaşım önemli bir problem olmamasına karşın, yerel yönetimlerce toplanan katı atık miktarı oldukça fazladır. Gıda atık ve kaybı ile ilgili birçok dolaylı yasal düzenleme varken gıda atık ve kaybı ile ilgili doğrudan bir düzenleme yoktur.

Tarımsal üretimin başlangıcından tüketime kadarki süreçte gıda zinciri boyunca gıda kaybedilir ya da atılır (FAO, 2013). Yönetimsel amaçlar için gıda zinciri boyunca her adımda kayıp ve atıkları hesaplamak ve ayırt etmek önemlidir. Gıda tedarik zinciri genellikle
1)Tarımsal üretim,
2)Hasat sonrası toplama ve depolama,
3)İşleme ve paketleme,
4)Dağıtım,
5)Tüketim
aşamalarından oluşmaktadır (Salihoglu vd., 2018).

FAO'ya göre gıda atığı gıda tedarik zinciri boyunca oluşan kayıplardır. Gıda atığı, nereden kaynaklandığı fark etmeksizin tüketim seviyesindeyken bozulmaya bırakılan veya atılan insan tüketimine uygun gıda olarak tanımlanır (HLPE, 2014). Gıda kaybı terimi gıda atıklarını kapsamasına rağmen aynı zamanda üretim, hasat sonrası ve gıda

tedarik zincirindeki proses işlemlerinde meydana gelen kayıplarını da belirtir (Parfitt vd., 2010).

Gıda atıkları sadece gıda kıtlığı açısından değil aynı zamanda çevreye etkileri açısından da bir problemdir. Gıda atıkları içerisinde özellikle gıda kaynaklarının sınırlı olduğu bölgelerde gıdaya ulaşmayı içerir ve gereksiz sera gazı salımına, su kaynaklarının gereksiz kullanımına, dünya çapında tarım arazilerinin gereksiz kullanımı gibi negatif çevresel etkilere neden olur. FAO üretilen tüm gıdanın 3'te 1 inin kaybedildiği veya atıldığı tahmin ederek problemin öneminin altını çizmektedir (FAO, 2011).

Çevre, ekonomi ve toplum üzerindeki olumsuz etkileri nedeniyle; bitki kaynaklı atıklar tüm dünyada önemli bir sorun haline gelmektedir. Gıda israfı, tedarikçiler, perakendeciler, tüketiciler vb. açılardan gıda miktarı ve kalitesinde bir kayıp olarak kabul edilir. Gıda endüstrisi, hasattan pazarlamaya kadar büyük miktarda gıda atığı ve yan ürün üretir. Bu öğeler, daha fazla işlenebilecek değerli bileşikler içerir. Hanelerin %42'sine varan oranda 931 milyon ton gıda atığı ortaya çıkarken; Bunların %38'i tarımsal üretim kaybından bağımsız olarak gıda işleme sırasında meydana gelmektedir (Capanoglu vd., 2022). Gıda atıkları ve yan ürünleri, çevre kirliliğinin nedenlerinden biridir ve atıkların çevreye etkileri nedeniyle sera gazı emisyonlarını önemli sıkı bir şekilde etkiler (Melikoglu vd., 2013).

Global olarak insan tüketimi için üretilen tüm gıdaların yaklaşık 1/3'ü yaklaşık 1,3 milyar ton kaybedilmekte ya da atılmaktadır. Gıda kaybı ve atığı ekonomik olarak değeri, gelişmiş ülkeler için yaklaşık 680 milyar USD, gelişmekte olan ülkeler içinse 310 milyar USD'dir. Endüstrileşmiş ve gelişen ülkelerde aynı miktarda gıda boşa harcanır. Meyve-sebze kökleri ve yumruları tüm gıda tiplerinde çeşitlerinde en yüksek atık oranına sahiptir. Global olarak ürün gruplarında tahılların yaklaşık %30'u, kök bitkilerin ve meyve sebzelerin %40-50'si, et ve süt ürünleri ve yağlık tohumların %20'si, balıkların ise %30'u gıda kaybı ve atıkları olarak yüzdesel olarak ifade edilmektedir. Her yıl gelişmiş ülkelerdeki tüketiciler neredeyse (222 milyon ton) sahara altı Afrika ülkelerinin toplam net gıda üretimi kadar (230milyon ton) gıdayı atmaktadır. Her yıl atılan veya kaybedilen

gıdanın miktarı Dünya'nın toplam tahıl ürünleri üretiminin yarısından fazlasına eşittir (Ötles vd., 2015).

Avrupa ve Kuzey Amerika'da kişi başına atık miktarı yıllık olarak 95-115 kg arasındayken Sahara altı, Güney ve Güneydoğu Asya tüketicileri her biri yıllık 6-11 kg gıda atmaktadır. Türkiye'de gıda tedarik zinciri boyunca kayıplarda en fazla pay, tarımsal üretim aşamalarındaki kayıplardan gelmektedir. Bu oran üretilen gıdanın %11,9' u kadardır. Yaklaşık 9,48 milyon ton meyve ve sebze tarımsal üretim aşamalarında kaybedilmektedir. Avrupa, Latin Amerika ve Kuzey Amerika'da bu oran %20 civarlarındadır (Tatlıdil vd., 2013).

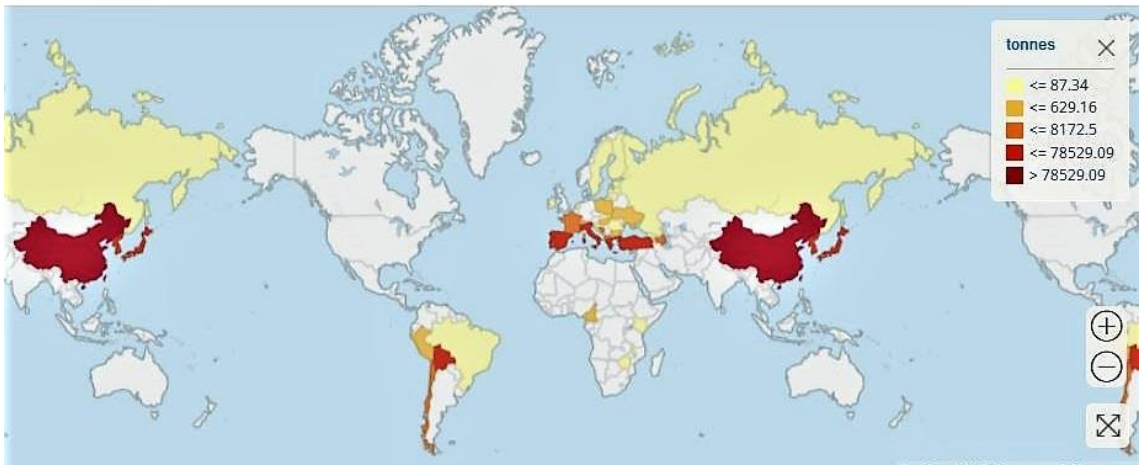
Bu çalışmanın amacı öncelikle kestane kabuğunun biyoaktif bileşiklerini renklendirici pigmentlerle birlikte değerlendirmek için mikrodalga destekli ekstraksiyon (MDE), ultrasonik destekli ekstraksiyon (UDE) ve klasik ekstraksiyon (KE) ile optimum koşulları tespit etmektir. Pigment ekstraksiyonu için en iyi renk değerini ve biyoaktif bileşenleri birlikte elde ettiğimiz ekstraktı belirledikten sonra bu ekstraktı maltodesktrin ve arabik gam karışımı ile sprey kurutma yöntemi ile kapsül toz haline getirip gıda sektörü açısından doğal bir katkı maddesi olarak kullanılabilirliğinin karakterize edilip araştırılmasıdır. Bu amaçlarla ekstraksiyonların optimizasyonu için bağımsız değişkenlerin 5 seviye olarak belirlendiği merkezi kompozit tasarımı (CCD) yanıt yüzey metodolojisi (RSM) kullanılmıştır. Sprey kurutma esnasında ise bağımsız değişkenlerin 3 seviye olarak belirlendiği Box Behnken deney tasarımı kullanılması hedeflenmiştir. Devamında ise tüm optimize örneklerin çeşitli yönleriyle karakterize edilmesi amaçlanmıştır.

2. KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Kestane

Kestane ağacı (*Castanea sativa* Mill.), *Fagaceae* familyasına ait olup ülkemizde doğuda Gürcistan sınırından başlayarak Karadeniz kıyısı boyunca Belgrat Ormanına kadar uzanan bir yayılış gösterir. Marmara çevresinde ve Batı Anadolu'dan Antalya kıyılarına kadar bulunur. Kestanenin ülkemizdeki yayılış alanlarında yükselti 800 – 1000 m' ye kadar çıkmaktadır (Yazıcı, 1998).

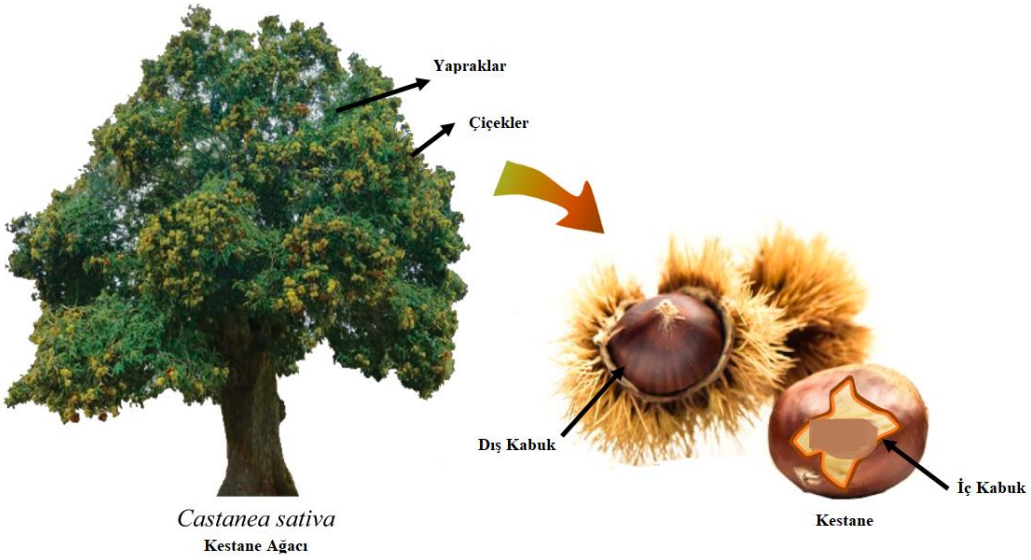
Kestanenin 13 türü kuzey yarım kürede doğal yayılım gösterir;bunlarda beşi Çin, Kore, Japonya, bir diğeri Avrupa ve kalan diğerleri Kuzey Amerika kıtasında bulunmaktadır. Son yıllarda Şili, Arjantin, Avustralya ve Yeni Zelanda gibi güney yarım kürede bulunan ülkelerde de kestane yetiştiriciliği yapıldığı bildirilmiştir. Kestanenin en bilinen üretim yapılan türleri; *Castanea crenata* Sieb. ve Zucc. (Japon kestanesi), Castanea mollissima (Çin kestanesi), *Castanea sativa Mill.* (Avrupa kestanesi), *Castanea dentata Borkh.* (Amerikan kestanesi)'dır (Eser, 2019).



Şekil 2.1. Dünya'da kestane üretiminin harita üzerinde gösterimi (FAOSTAT, 2023)

Kestane ağacı, 20 – 25 m boylara ulaşabilen, dolgun gövdeli, geniş tepeli, kışın yaprağını döken bir türdür. Yaprakları 3 – 6 cm genişliğinde ve 8 – 18 cm uzunluğunda olup, mızrak gibi sivri uçlu, kenarları keskin kaba dişlidir. Kestane, sıcaklığın daha yüksek olduğu ılıman iklimlerde 6 ay boyunca ortalama sıcaklık 10 ºC'nin üzerinde seyreden bölgelerde

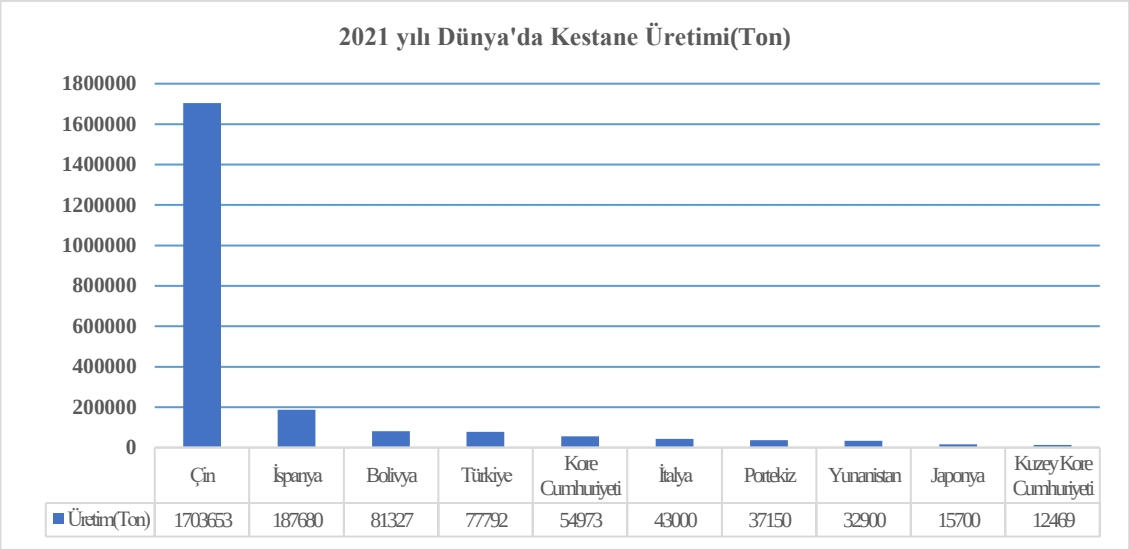
yetiştirilir. Yağış ihtiyaçları türlerine göre farklılık göstermekle birlikte 600 ile 800 mm arasındadır (Yüksel vd., 2020). Doğu'da, Çin bölgesinde doğmuştur ve Batı'ya doğru genişleyerek Akdeniz bölgesine ulaşmıştır.



Şekil 2.2. Kestane ağacı, meyvesi ve kabuğunun görünümü (Pinto vd., 2021c)

TUİK verilerine göre ise ülkemizde 2022 yılında 2 520 000 ağaçta 80200 ton kestane üretimi gerçekleşmiştir (TURKSTAT, 2023). Meyve kabuğu sert, parlak ve yarım küre şeklinde olup kızıl kahve renktedir (Yaltırık, 1982). Kestane meyvesi taze olarak tüketilebildiği gibi farklı şekillerde işlenerek kestane püresi, konserve ve kestane şekeri olarak da tüketilebilmektedir (Oral, 2006). Ayrıca meyve kabukları tanen üretiminde, yaprak ve çiçekleri ilaç ve kozmetik sanayinde kullanılmaktadır (Dönmez vd., 2016).

2021 yılı verilerine göre kestane üretiminde, Çin, İspanya, Bolivya'dan sonra Türkiye Dünya'da 4.sırayı almıştır.



Şekil 2.3. Dünya'da kestane üretimi yapan ilk 10 ülke (FAOSTAT, 2023).

2.2. Kestane Şekeri Üretimi

Kestane meyveleri günümüzde farklı amaçlar için kullanılmaktadır (Squillaci vd., 2018). Türkiye'de kestanenin büyük bir bölümü kestane şekeri üretiminde kullanılmaktadır. Kestane şekeri üretimi TSE, (2015a) standartına uygun olarak üretilmeli ve ürünler elde edilmelidir. Buna göre geleneksel kestane şekeri üretimi Şekil 2.4.'te olduğu gibi, Hammaddenin kabulü, kabuk soyma, fırçalama, seçme-ayıklama, pişirme kazanlarına kestanelerin alınması ve haşlanması, dinlendirme, şerbetlendirme, ambalajlama ve depolama olarak genel olarak tanımlanabilir.



Şekil 2.4. Geleneksel kestane şekeri üretimi (BAKKA, 2020)

2.3. Kestane Kabuğu Fizikokimyasal Özellikleri

Bitkiler, gıda uygulamalarında kullanılabilen doğal pigmentler veya renklendiriciler içerir. Bu pigmentler safran, kırmızıbiber, zerdeçal ve çeşitli çiçeklerden ekstrakte edilebilir (Sharma vd., 2021). Pigmentler ayrıca meyve ve sebzelerde yeşil, sarı, turuncu vb. gibi farklı renk türlerinin karakteristik özelliklerinden sorumlu olan biyoaktif özelliklere de sahiptir (Choo & Saik, 2021).

Kestane şekeri üretimi sırasında kestane taze meyvesinin ağırlıkça %20-30'u (w/w) oranında kestane kabukları atık olarak işletmelerde oluşur. Kestane kabukları son zamanlarda Avrupa Yeşil Mutabakatı ve Sürdürülebilirlik politikaları nedeniyle geri kazanılabilir bir yan ürün olarak önem kazanmıştır (Sharma vd., 2021).

Önceki çalışmalarda kestane kabuğunun toplam fenolik madde içeriği (TFM) 36,32 g gallik asit eşdeğeri (GAE) /100 g ekstrakt ve antioksidan aktivitesi (DPPH, EC50) 0,346 mg/mL sahip olduğu bildirilmiştir (Vázquez vd., 2012). Ayrıca kabuklarda proteinler (2,77 - 3,13 g/100 g), karbonhidratlar (56,51 - 74,06 g/100 g) gibi makro bileşikler ile selüloz (%28,4 g/100 g) ve klason lignin (41,6 g/100 g) gibi diyet liflerine sahip olduklarını rapor edilmiştir (Hu vd., 2021). Kestane kabuğunun biyoaktif bileşiklerinin geri kazanımı ve melanin izolasyonu üzerine bazı çalışmalar mevcuttur (Vázquez vd., 2009; Fernández-agulló vd., 2014; Squillaci vd., 2018; Pinto, Silva, vd., 2021; You vd., 2014; Yao ve Qi, 2016; Sava vd., 2001).

Dönmez vd. (2016) tarafından kestane kabuğu, fındık kabuğu ve antepfıstığı kabuğunun bileşimi üzerine yapılan bir araştırmada toplam polifenolik içerikleri Çizelge 2.1.'deki gibidir.

Çizelge 2.1. Kestane kabuğu, fındık kabuğu ve antepfıstığı kabuğu polifenolik içerikleri

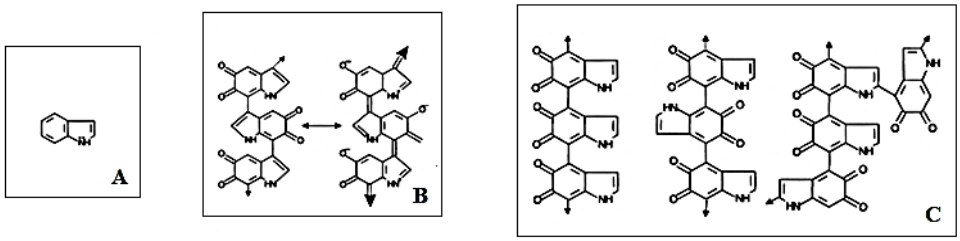
Kestane kabuğu	Fındık Kabuğu	Antep Fıstığı Kabuğu
%8,42	%3,57	%2,61

Kestane kabuğu biyoaktif özelliklerin yanısıra yoğun olarak kahverengi kızıla dönük pigmentleri de içermektedir. Bu pigmentler genel olarak melanin olarak adlandırılmaktadır ve tüm canlı organizmalarda bulunan doğal bir pigment türüdür. Antioksidan, radyoaktif koruma, bağışıklık desteği ve antienflamatuvar etkilere sahip melaninler, çok işlevli pigmentler olarak ortaya çıkmaktadır. Melanin yapısı karmaşık, geniş, dağınık, amorf, düzensiz, heterojen, yüksek oranda çapraz bağlı ve su bağlayıcıdır. Bu pigmentler nişasta, protein, yağ ve diğer pigmentlere kolayca bağlanır. Bu pigmentlerin yapısı sadece farklı monomerik birimlere değil aynı zamanda polimerizasyon sırasındaki çevresel koşullara da bağlıdır. Bu pigment yapay renklendiriciler yerine doğal renklendirici ajan olarak kullanılabilir (Yao vd., 2012).

2.4. Melanin Pigmentinin Kimyasal Yapısı, Kullanım Alanları, Elde Edilme Kaynakları

Son yıllarda gıda, kozmetik ve farmakoloji endüstrisinde doğal olan boyaların kullanımına artan bir ilgi vardır. Renklendiriciler, gıdaların estetik değerini arttırmak amacıyla çok çeşitli gıda ürünlerinde uzun süredir kullanılmaktadır. Artan pazar talebi, petrokimya kökenli sentezlenen yapay renklendirici ve boyaları hayatımıza daha fazla sokmuş, bu da doğal renklendirici ve boyaların kullanımında hızlı bir düşüşe neden olmuştur. Bununla birlikte, bazı teknik sorunlar (özütleme konusundaki bilgi eksikliği, bitki toplama zorluğu vb.) doğal renklerin ticari olarak başarılı olmasını engellemiş olsa da, insanlar sağlık, güvenlik ve çevre dostu özelliklerinden dolayı doğal renkleri kullanmaya eğilimlidirler.

Melaninler, hayvanlara ve bitkilere kahverengi, gri ve siyah tonlar veren proteinler veya karbonhidratlarla kompleks oluşturabilen Şekil 2.5.'te de görüldüğü fenolik veya indolik monomerler tarafından yapılan polimerlerdir (Brudzyńska vd., 2021). Melaninler tüm yaşayan organizmalarda bulunan bir tür doğal pigmenttir (Senesi ve Miano TM, 1987; Butler ve Day, 1998). Melanin pigmentinin molekül formülü $C_{18}H_{10}N_2O_4$·tür. Molekül ağırlığı 318,218 g/mol 'dür (Anonim, 2022).



Şekil 2.5. Melaninle ilişkili yapılar ve bazı özellikleri.
(A) Temel yapı (indolik halka) (B) Renk oluşumuna etkili rezonans yapı (C) Melanin oluşumunda indolik polimerizasyonun bazı formları (Delgado-Vargas vd., 2000).

Melaninler aynı zamanda bakteriler ve mantarlar tarafından da üretilen doğal pigmentlerdir. Melaninler, polifenollerin polimerizasyonu ve oksidasyonu sonucu üretilen kahverengi ve siyah renkte yüksek molekül ağırlıklı bir grubu temsil ederler. Melaninler aynı zamanda yaşayan organizmalar için radyasyon, enzim, lizis, oksidanlar, kuraklık gibi zararlı ekolojik faktörlere karşı eşsiz bir dayanıklılık sağlarlar.

Melaninler dayanaklı ve en stabil biyokimyasal materyaller arasındadır bu yüzden belli bir çevrede yaşayan organizmaların hayatta kalma ve rekabet şansını artırırlar. Ancak gelişme ve büyüme için esansiyel değildirler. Melaninler aynı zamanda optik biyolojik, kozmetik, UV-korumalı lensler, gıda sanayinde renklendirici olarak, anti melanoma terapi ve metallerin nanopartikül hazırlanması için ticari olarak kullanılırlar (Łopusiewicz L., 2017).

Melaninler, bitkilerde, hayvanlarda, ve mikroorganizmalarda yaygın olarak bulunan ve doğası gereği eşsiz biyopolimerler olarak bilinirler ve belirgin bir şekilde canlılarda fizyolojik rol oynarlar (Solano, 2014). Melaninler biyosistem içinde ışık koruması, antioksidan, termoregulatör, metal bağlayıcı, sinir sistemi katkıları gibi birçok fonksiyona sahiptirler (Hong & Simon, 2007). Genellikle melaninler koruyucu bir rol oynarlar. İnsanlarda ve diğer canlılarda, güneş koruyucu ve kamuflaj olarak fonksiyonları vardır.

Bitki metabolizması, nitrojen alışverişi ilkesiyle karakterize edilir, çünkü bu element bitki büyümesi için önemli bir sınırlayıcı faktördür. Buna göre L-tirozin amino asidi, bitki melaninin sentezi için kullanılmaz. Bu organizmaların hemen hepsi ve bazı mikroorganizmalar, ikincil metabolizmalarının bu bölümünü yürütmek için kateşoller, dihidroksinaftalenler veya diğer dihidroksibenzen türleri gibi bazı nitrojensiz fenol

öncüleri kullanır. Genel olarak, elde edilen melanin nitrojen içermeyen bir polimerdir ve jenerik olarak allomelanin (diğer melaninler) olarak adlandırılır. Bitkilerde en yaygın öncü sadece kateşoldür, bu nedenle oluşan melanin kateşol-melanin olarak da adlandırılır (Solano, 2014).

Allomelaninin rengi, genellikle koyu kahverengiden siyaha değişir ve rengi oksitlenmiş ana birimin yapısına bağlıdır. Bazı sebzeler sadece normal kateşol kullanır, ancak diğerleri farklı kateşolik asitler kullanır (kafeik, klorojenik, protokateşuik veya gallik asitler gibi). Buna göre melanin pigmenti, bu kateşollerden ve bunlara karşılık gelen kateşol oksidazların etkisiyle oluşan kinonlardan türetilen bir polimerdir. Bu bitki melaninlerinin yapısı son yıllarda yeterince çalışılmamıştır ve çabalar çoğunlukla oluşumunu engellemeye yöneliktir. Bu bağlamda, kateşol oksidazların inhibisyonu ve melanin oluşumunun doğal inhibitörlerinin izolasyonu araştırma konusu olmuştur.

Melaninler diğer taraftan mantarları düşük sıcaklığa, düşük su içeriğine, açlığa ve radyoaktif ışınlara karşı korurlar. Melaninler yapısal olarak hala tam olarak açıklanmış değildir. Orijin, renk ve fonksiyonlarının geniş bir dağılımda olması nedeniyle tam bir tanımı yoktur. Ancak genel olarak ve basit tanımı, kinonlar vasıtasıyla fenolik maddelerin polimerizasyonu ile formlanan biyopolimerlerdir. Daha detaylı olarak yapısı 3 gruba ayrılırlar; Kahverengi siyah melaninler, Eu melanin; Sarı-kırmızı olanlar feomelaninler, heterojenik olanlar ise allomelaninlerdir. Eu, İyi anlamında, Feo Bulanık anlamındadır (Huang vd., 2018).

Melaninler, antioksidan (Hung vd., 2002; Tu vd., 2009), radyoaktif koruma (Hill vd. 1987), antitümör (Kamei vd. 1997) anti-HIV (Montefiori & Zhou, 1991) immun tetikleyici (Sava vd., 2001) ve antienflamatuvar (Mimura vd. 1987) içeren çok fonksiyonlu bir pigmenttir. Bu özelliklerinden dolayı melanin yüksek potansiyeli olan doğal bir renklendiricidir (Yao vd., 2012). Melanin yapısı kompleks, büyük, yaygın, amorf, düzensiz, heterojen, yüksek olarak çapraz bağlı, su tutucudur (Enochs vd. 1993). Bu pigmentler, nişasta, protein, yağ ve diğer pigmentlere kolayca bağlanırlar. Bu pigmentlerin yapısı sadece farklı monomerik ünitelere değil aynı zamanda polimerizasyon boyunca çevresel şartlara bağlı olarak değişir (Henson vd. 2001).

Çin'de yapılan bir çalışmada melanin pigmentlerinin kestane kabuklarının yapısında bulunduğu belirtilmiştir. Buna göre, *C. mollisima* tür kestanelerin kabukları kestane üretimi esnasında ana yan ürün olarak elde edilir ve yakıt kaynağı olarak kullanılır. Kestane kabukları potansiyel uygulaması gıda endüstrisinde doğal pigment olarak kullanımını içerir. Bazı bilimsel çalışmalarda ekstraksiyon, fizikokimyasal özellikler ve özellikle suda çözünebilen pigmentlerin boyama karakteristikleri üzerine odaklanılmıştır. Bununla beraber *C.mollisima* kabukları üzerine kapsamlı ve sistematik bir çalışma çok fazla yoktur. Kestane kabuklarının yeniden değerlendirilmesi hem ekonomik olarak hem de çevresel olarak endüstriyel prosesi geliştirecektir (You vd., 2014).

2.5. Melanin ve Kestane Kabuğu İle İlgili Yapılmış Çalışmalar

Literatür incelendiğinde melanin pigmenti bitkisel, hayvansal, mikrobiyolojik ve fungal kaynaklardan elde edilebilmektedir. Diğer taraftan kestane kabukları hem biyoaktif içerikleri hem de melanin pigmenti de içerecek şekilde renk özellikleri üzerine araştırmalara konu olmuştur. Melanin pigmenti elde edilmesi ve kestane kabuğu ile ilgili literatür çalışmalarının bir kısmı sırasıyla Çizelge 2.2 ve Çizelge 2.3.'te verilmiştir.

Çizelge 2.2. Melanin elde edilmesine yönelik çalışmalar

Bitkisel Kaynak	**Elde Edilme Yöntemi**	**Yazar**
Şarap atıkları	İzolasyon ve Saflaştırma	Aghajanyan vd.,2022
Siyah Sarımsak ve Mürekkep balığı	İzolasyon ve Saflaştırma	Wang & Rhim, 2019
Auricularia auricula	İzolasyon ve Saflaştırma	Wu vd., 2018
Ayçekirdeği	Geleneksel Ekstraksiyon	Keles & Özdemir, 2018
Ceviz kabuğu	İzolasyon ve Saflaştırma	Zhu vd., 2017
Auricularia auricula	İzolasyon ve Saflaştırma	Sun vd., 2016
Siyah yulaf	İzolasyon	Varga vd., 2016
Kayısı çekirdeği	İzolasyon ve Saflaştırma	Li vd., 2016
Clostridium tertium	İzolasyon ve Saflaştırma	Deshmukh & Pethe, 2015
Siyah çay	İzolasyon ve Saflaştırma	Zou & Jiang, 2015
Lachnum singerianum	Mikrodalga Ekstraksiyon	Lu vd., 2014
Kadife fasulye	İzolasyon ve Saflaştırma (Mikrodalga ekstraksiyon)	Hue-gun & Yue-hua, 2012
Kümes hayvanları tüyler	İzolasyon ve Saflaştırma	Tu vd., 2009
Siyah çay	İzolasyon ve Saflaştırma	Hung vd., 2002

Çizelge 2.3. Kestane kabuğu ile ilgili çalışmalar

Özütleme Yöntemi	Hedef Bileşenler	Yazar
Kritik altı su ekstraksiyonu	Fenolik bileşenler	Pinto vd., 2021a
Mikrodalga destekli ekstraksiyon (su ve Etanol)	Fenolik bileşenler ve antioksidan aktivite	Pinto vd., 2021b
Ultrasonik destekli ekstraksiyon	Ellagik Asit	An vd., 2021
Ultrasonik destekli ekstraksiyon (su)	Fenolik bileşenler ve antioksidan aktivite	Lameirão vd., 2020
Ultrasonik destekli ekstraksiyon	Antioksidan ve antimikrobiyal aktivite	Silva vd., 2020
Süperkritik akışkan ekstraksiyon	Fenolik bileşenler ve antioksidan aktivite	Pinto vd., 2020
Ohmik ön işlemle geleneksel ekstraksiyon	Polifenolik bileşenler	Erol vd., 2022
Geleneksel, ultrasonik ve mikrodalga destekli ekstraksiyon	Fenolik Bileşenler, Antikanserojen özellikleri	Cacciola vd., 2019
Hidrotermal ekstraksiyon	Oligosakkaritler ve antioksidan aktivite	Gullón vd., 2018
Geleneksel ekstraksiyon (su)	Fenolik bileşenler ve antioksidan aktivite	Squillaci vd., 2018
Geleneksel ekstraksiyon (Etanol/su)	Renk içeriği	Chen vd., 2018
Geleneksel ekstraksiyon (NaOH)	Melanin pigmenti fraksiyonlar ve antioksidan aktivite	Yao & Qi, 2016
Geleneksel ve mikrodalga destekli ekstraksiyon(Etanol/Su,Metanol/Su)	Biyoaktif bileşenler	Fernández-agulló vd., 2014
Mikrodalga ekstraksiyon Etanol Su/	Kestane Kabuğu Pigmentleri, biyoaktif bileşenler	You vd., 2014
Geleneksel ekstraksiyon fraksiyonlama (NaOH, HCl)	Melanin pigmenti	Yao vd., 2012
Geleneksel ekstraksiyon (su, etanol/su, metanol/su)	Tokoferol, pigment, polifenoller	Vasconcelos vd., 2010
Soxhlet ve geleneksel ekstraksiyon	Fenolik bileşenler ve antioksidan aktivite	Vázquez vd., 2008

2.6. Biyoaktif Bileşenlerin ve Pigmentlerin Ekstraksiyon Yöntemleri

Doğal pigmentler bitkilerde, hayvanlarda ve mikroorganizmalarda oluşan kimyasal bileşiklerdir ve ışığı 400-800 nm arası dalga boyunda emerler. Son yıllarda gıda güvenliği ile ilgili artan tüketici taleplerini yerine getirmek için bu doğal tarz pigmentlere araştırmacıların ilgisi artmıştır. Sentetik boyalarla karşılaştırıldığında doğal pigmentler gerçekten daha sağlıklı, antioksidan ve antimikrobiyal gibi pozitif biyolojik etkilere sahiptirler. Doğal pigmentlerin biyolojik etkileri prosiyanidin ve quercetin-3-0 glikozid gibi benzeri biyoaktif bileşenlerin varlığı sonucudur (Vázquez vd., 2012). Ayrıca doğal pigmentlerin özellikleri ve kimyasal yapıları ham maddeye ve ekstraksiyon işlemlerine bağlıdır. Genellikle suda çözünebilir tetrapiroller, flavonoidler suda veya düşük alkollerde ekstrakte edilebilirler. Suda çözünemeyen pigmentler ise alkali çözücülerle ekstrakte edilebilirler (Mortensen, 2006; Rostagno vd., 2007). Bu yüzden düzensiz ve kompleks pigmentler araştırılmasına rağmen farklı hammaddeden elde edilen pigmentlerin özellikleri ve bileşenleri hakkında bilgiyi arttırmak gerekmektedir.

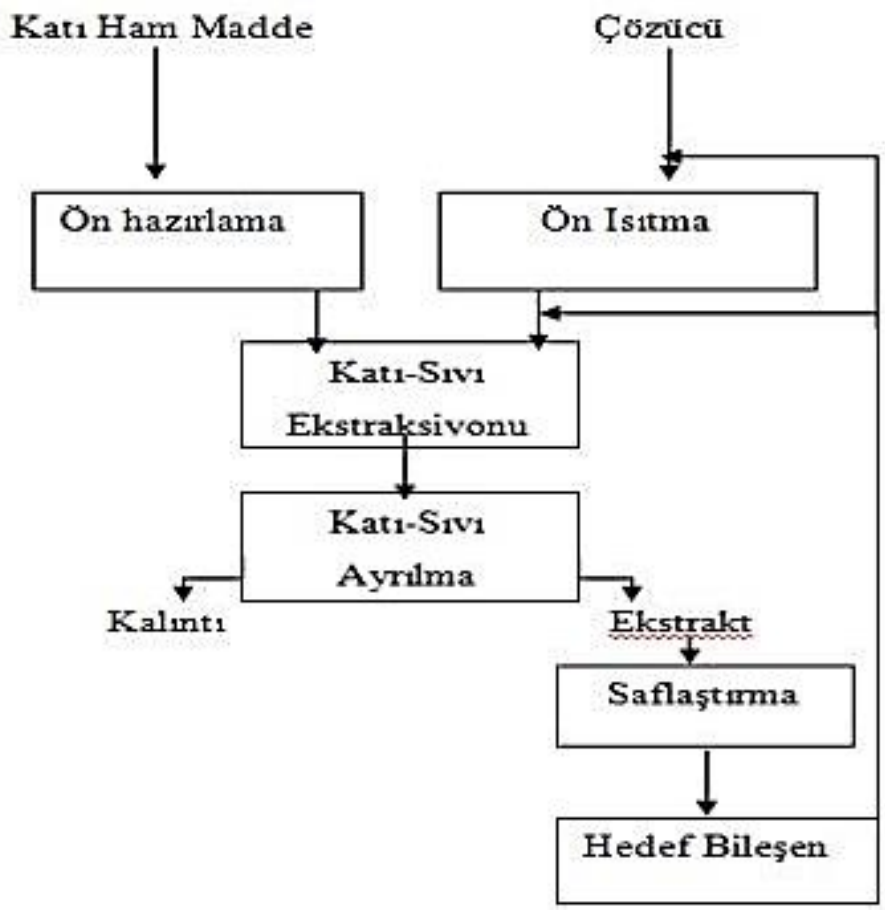
Ultrasonik destekli ekstraksiyon (UDE), basınçlı sıvı ekstraksiyonu (BSE), mikrodalga destekli ekstraksiyon (MDE), kritik altı sıvı ekstraksiyonu (KSE), süperkritik sıvı ekstraksiyonu (SSE), enzim destekli ekstraksiyon gibi "daha çevreci" yenilikçi ekstraksiyon tekniklerinin tercih edilmesi, daha yüksek verim ve kolay otomasyon ile gerçekleştirilebilmesi sebebiyle biyoaktif bileşiklerin ve pigmentlerin ekstraksiyonu için gelecek vadetmektedir (Manzoor vd., 2021).

Gıda sektöründe oluşan gıda atıklarından değerli veya faydalı bileşenlerin geri kazanılması için çabalar artmaktadır. Bu nedenle gıda prosesleri, atık değerlemesi ile daha ekonomik bir şekilde tasarlanabilir (Zin vd., 2020). Soxhlet ekstraksiyonu, katı-sıvı ekstraksiyonu ve sıvı-sıvı ekstraksiyonu gibi geleneksel ekstraksiyon yöntemleri, yeşil tekniklerin aksine daha fazla enerji ve büyük miktarda solvent gerektirir (Angiolillo vd., 2015). Çevre dostu yöntemlerle yapılan sağlıklı gıdalara yönelik artan müşteri talebi nedeniyle, geleneksel ekstraksiyon yöntemlerinin yanı sıra mikrodalga, darbeli elektrik alan, ultrasonik ve yüksek basınç destekli ekstraksiyon gibi yenilikçi ekstraksiyon teknolojileri son yıllarda daha önemli hale gelmiştir. Bitki ürünlerinden doğal pigmentleri

çıkarmak için yenilikçi ve güncel teknolojileri kullanmanın, gelişmiş izolasyon, artan seçicilik, daha düşük enerji kullanımı ve minimum çevresel etki dahil olmak üzere çeşitli faydaları vardır (Putnik vd., 2018). Bu tez çalışmasında yenilikçi ekstraksiyon yöntemlerinden olan ultrasonik destekli ve mikrodalga destekli ekstraksiyonlar, klasik ekstraksiyonla birlikte doğal renklendiricileri çıkarmak için kullanılmıştır. Doğal matrikslerden maddelerin ekstraksiyonu amacıyla, UDE ve MDE'nin geleneksel katı-sıvı ekstraksiyonunun potansiyel bir ikamesi olduğu düşünülmüştür. Daha kısa ekstraksiyon süreleri, daha az sıvı tüketimi ve daha yüksek ekstraksiyon verimleri için bu ekstraksiyon yöntemleri kullanılmaya başlanmıştır (Y. Li vd., 2013).

2.6.1. Klasik ekstraksiyon (katı-sıvı ekstraksiyonu)

Klasik ekstraksiyon, ekstraksiyonda bulunan iki faz arasında gerçekleşir. Bunlardan biyolojik olarak aktif bileşenleri içeren kısım katı kısımda bulunurken bu maddeleri ayırma yetisine sahip çözücüler sıvı fazdadır ve bu işlem ekstraksiyon olarak isimlendirilmektedir (İlbay, 2016). Seçici çözücüler kullanılarak bitki veya hayvan dokularındaki biyoaktif bileşenlerin inert veya inaktif kısımlardan ayrılmasını içeren işlemler bütünü ‘ekstraksiyon’ olarak tanımlanmaktadır (Handa vd., 2008). Bitkisel ekstraktlar ise; bitkilerin yaprak, çiçek, tohum, kök veya kabuk kısımlarından bir ekstraksiyon prosedürü uygulanarak elde edilmiş aktif bileşenler veya bileşenlerin karışımı olarak tanımlanabilmektedir. İdeal bir ekstraksiyon yöntemi basit, ucuz, hızlı ve çevreci olmanın yanı sıra istenen bileşenin yüksek verimde elde edilmesini sağlamalıdır (Chemat vd., 2011). Ekstraksiyonda elde edilen biyoaktif bileşenler kayıp ve bozulmaya uğramadan ve ayrıca ilave saflaştırma gerektirmeden elde edilmelidir (Demir vd., 2016). Şekil 2.6.’da da belirtildiği üzere katı bir maddenin bileşenlerinden birinin veya bir bölümünün uygun bir çözücü kullanarak elde edilmesi prensibine dayanan katı-sıvı ekstraksiyonda verim; çözücü türü, pH, katı-sıvı oranları, partikül boyutu, sıcaklık ve süre gibi faktörlerden etkilenmektedir (İlbay, 2016). Bitkisel materyallerden biyoaktif bileşenlerin ekstraksiyonu özellikle kozmetik, bitkisel kaynaklı ilaç ve gıda endüstrilerini ilgilendirmektedir (Vinatoru vd., 2017).



Şekil 2.6. Klasik ekstraksiyonun (katı-sıvı) ekstraksiyon mekanizması (İlbay, 2016)

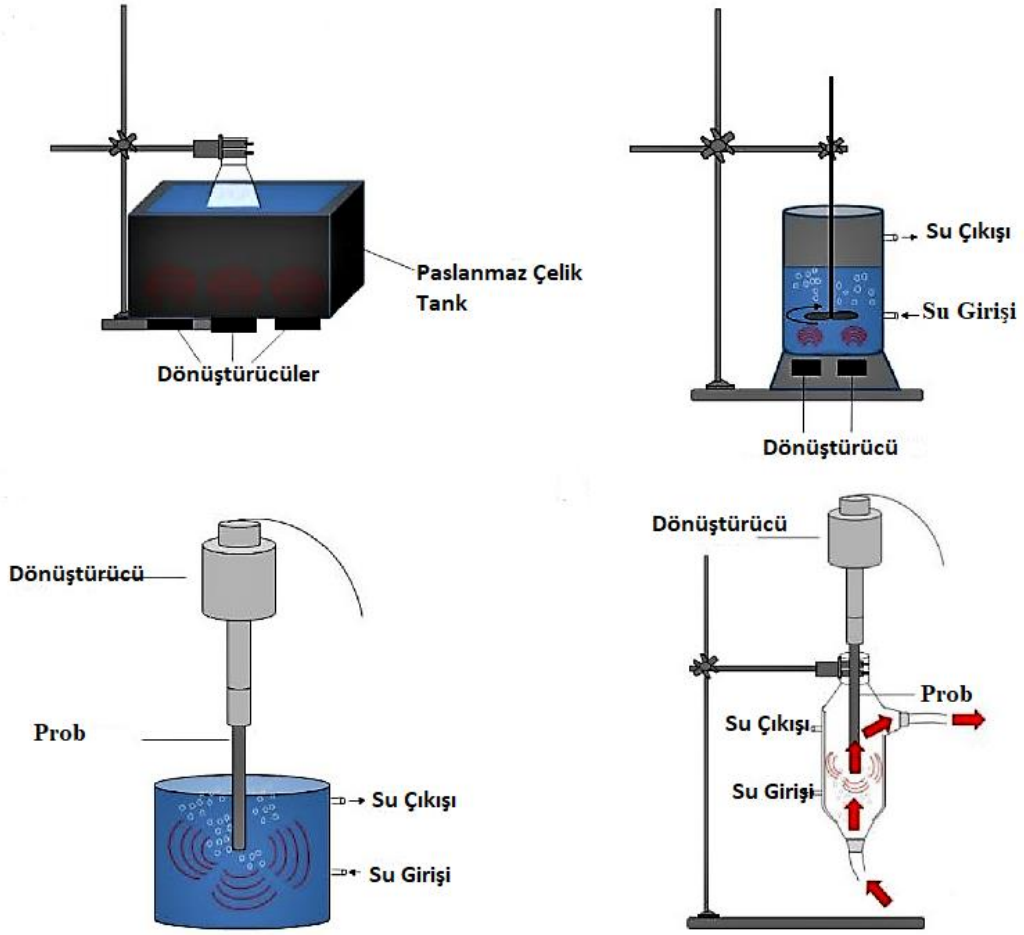
Doğal pigmentlerin ekstraksiyonu genellikle katı-sıvı ekstraksiyonu ile yapılmaktadır. Bitki dokuları parçalanarak, ezilerek veya öğütülerek pigmentlerin difüzyonu kolaylaştırılır. Dokuların ve hücre duvarının parçalanması pigmentlerin ve değerli bileşenlerin ayrılması ile ilgilidir. Teknoloji ve prosesler ekstraksiyonu kolaylaştıracak şekilde dizayn edilmelidir (Vella vd., 2018).

2.6.2. Ultrasonik destekli ekstraksiyon

Ultrasonik ekstraksiyon, frekansı 20000 Hz veya daha fazla olan ses dalgalarının baskısıyla gerçekleştirilen bir işlemdir. Ses dalgası, mekanik dalgalardan biridir ve dalga yayılımı maddesel bir ortamda gerçekleştirilir. Genellikle dalgalar, referans olarak insanın işitilebilir frekansı kullanılarak sınıflandırılır. Öte yandan, düşük enerjili ultrasonlar, 1 W/cm^2'nin altındaki yoğunluklarda 100000 Hz'den daha yüksek frekanslarla tanımlanır. Yüksek enerjili ultrason, 20000 Hz ile 500000 Hz arasındaki

frekanslarda 1 W/cm^2'den daha yüksek yoğunluklarla tanımlanır. Ultrasonik dalgaları, bir ortam nedeniyle yayılma sırasında özelliklerinde (hız, azalma, frekans spektrumu) çeşitli değişiklikler gösterir. Ultrasonik uygulama, gıda sektöründe işleme süresinin kısaltılması, kalitenin korunması ve gıda güvenliğinin sağlanması için kullanılabilecek yeni bir tekniktir. Ayrıca taze meyve ve sebze kalite uygulamaları, peynir olgunlaşması, yemeklik yağlar, ekmek ve tahıl ürünleri üretimi, dökme ve emülsifiye yağ bazlı gıda ürünleri, gıda jelleri ve dondurulmuş gıdaların kontrolünde ultrasonik uygulama tercih edilebilir. Ayrıca, ultrasonik uygulama, gıda üretiminin hijyen standartlarını iyileştirmektedir. Ultrasonik uygulama sırasında oluşan kavitasyon, uygulama sürelerini kısaltabilir ve kimyasal madde kullanımını sınırlayabilir, bu sayede ekstraksiyon işlemlerini iyileştirebilir (Karabacak vd., 2019).

Gıda endüstrisi, son zamanlarda geleneksel ekstraksiyon süreçlerine alternatif, daha çevreci ve daha ucuz tekniklere artan bir ilgi göstermektedir. Birçok sağlık gerekçeleri ve çevresel nedenlerden dolayı kimyasal ekstraksiyon süreçleri engellenmektedir (Koubaa vd., 2018). Bitki matrislerinden değerli bileşiklerin elde edilmesinde en umut verici teknikler arasında, ultrasonik destekli ekstraksiyon büyük ilgi görmüştür (Vuong vd., 2015). Ultrasonik ekstraksiyon geleneksel ekstraksiyon yöntemleriyle karşılaştırıldığında daha düşük ekstraksiyon süreleri ve daha yüksek verimlilik sağlar (Vilkhu vd., 2008). Fenolik bileşiklerin geri kazanımı solvent tipi, ekstraksiyon süresi, ekstraksiyon sıcaklığı, numunenin partikül boyutu, ultrasonik güç ve frekans gibi parametrelerden etkilenebilir (Chemat vd., 2017). Şekil 2.7'de ultrasonik ekstraksiyon yapılan örnek sistemler gösterilmiştir. Burada ultrasonik banyo ve prob vasıtasıyla gerçekleştirilen ekstraksiyonu, ve ultrasonik güç yayan bir probun varlığında gerçekleştirilen sistemlere örneklerdir.



Şekil 2.7. Ultrasonik uygulama türleri (Chemat vd., 2017).

2.6.3. Mikrodalga destekli ekstraksiyon

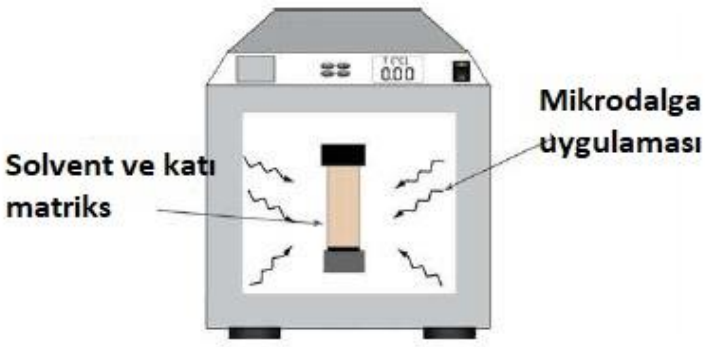
Meyve ve sebzelerin işlenmesi muazzam miktarda atık üretir ve bu atıklar sıklıkla yüksek ticari talebi olan biyoaktif pigmentler içerdiğinden, bu atıkların biyoaktif pigmentler için değerlendirilmesi gelir getirecek ve biyoaktif pigmentlerin üretilmesi için sürdürülebilir bir yöntem sunacaktır. Bitki kaynaklarından biyoaktif pigmentlerin geri kazanımında ekstraksiyon işlemi çok önemlidir ve biyoaktif pigment üretimlerinde kilit faktörlerdir (Prado vd., 2014). MDE, ister kuru ister ıslak olsun, numuneyle temas halinde olan bir organik özetleyiciyi işlemek için mikrodalga radyasyonu kullanmayı içerir. Çözücünün sıcaklığı ve polaritesi, analitlerin numuneden özetleyiciye nasıl geçiş yaptığını etkiler (Y. Li vd., 2013).

MDE sırasında, mikrodalga radyasyon ekstraksiyon çözeltisi vasıtasıyla örnek üzerinden geçer, ardından enerji absorbe edilir ve termal enerjiye dönüştürülür. Böylece mikrodalga enerjisi solvent karışımını hızla ısıtır, mikrodalga enerjisinin serbest su ile doğrudan bir etkileşimi vardır (Sonar & Rathod, 2020). Mikrodalga radyasyon, polar ve polarize olabilen dipollerle etkileşime girer. Elektrik ve manyetik bileşenlerin birleşik kuvvetleri hızla yön değiştirir. Polar moleküller yön bulmaya çalışırlar. Alan yönünü değiştirerek ısınırlar. Polarize gruplara sahip olmayan polarize olmayan gruplarda ısıtma zayıftır. Bu termal etki pratik olarak anlıktır. Bu etki moleküler düzeyde küçük bir alandaki malzemenin yüzeyine yakın olarak etkileşim meydana gelir. Malzemenin geri kalanı iletimle ısıtılır. Bu nedenle, büyük parçacıklar ve küçük parçacıkların topakları homojen bir şekilde ısınmazlar, bu da mikrodalga ısıtmanın önemli bir dezavantajıdır. Penetrasyon etkinliğini arttırmak için yüksek güç kaynakları kullanmak mümkün olabilir. Bununla birlikte, mikrodalga radyasyonu, mikrodalgaya maruz kalan katı üzerinde bozulmaya sebebiyet verebilir (Handa vd., 2008).

Diğer taraftan MDE, hücrelerin zarı ve duvarı üzerinde bir "stres" etkisi yaratır, böylece hücre duvarı yırtılır ve pigment hızla açığa çıkabilir (Chuyen vd., 2018). MDE, basit, hızlı ve karotenoid ekstraksiyonu için yaygın olarak kullanılan ekonomik bir yöntemdir (Hiranvarachat & Devahastin, 2014; Ho vd., 2015). Diğer ekstraksiyon yöntemlerine göre MDE'ın avantajlarından biri toksik çözücülere ihtiyaç duymadan yeşil kimya çözeltileri kullanılarak pigmentleri çıkarma yeteneğidir (Sonar & Rathod, 2020). Bu yöntem, antosiyaninleri ve diğer hedef bileşenleri çıkarmak için şimdiye kadar kullanılmıştır. Teorik olarak, polar hücresel bileşenlerin aşırı ısınması likopen gibi bazı pigmentlerin migrasyonunu sağlar ve ekstraksiyon solventi etkilidir (Ho vd., 2015). Kapalı sistem MDE, değerli bitkisel bileşenleri özütleme yapmak için yenilikçi ve yeni bir teknoloji olarak ortaya çıkmıştır.

Kapalı kap sistemleri genellikle yüksek ekstraksiyon sıcaklığı gibi sert koşullar altındaki ekstraksiyonlar için tavsiye edilir. Mevcut çoğu kapalı kap sistemi, çok modlu mikrodalgalara dayalıdır; bununla birlikte, odaklanmış ısıtma ile birleştirilmiş yüksek basınçlı kapların avantajları, her iki yaklaşımı birleştiren ve çok yüksek basınç ve sıcaklıkta çalışan sistemlerin geliştirilmesine yol açmıştır. Solvent, atmosferik basınçta

kaynama noktasının üzerinde ısıtılabilir, böylece numune matriksinden hedef bileşiklerin kütle transferini hızlandırmaktadır (Eskilsson ve Björklund, 2000). MDE sistemi Şekil 2.8.'de şematize edilmiştir.



Şekil 2.8. Mikrodalga destekli ekstraksiyon sistemi (Y. Li vd., 2013).

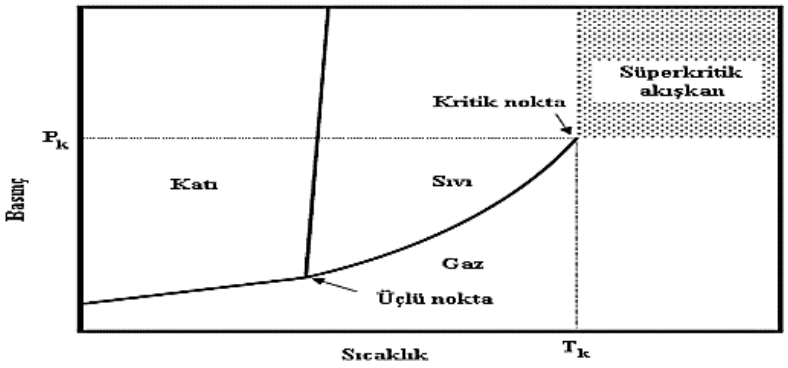
2.6.4. Süper kritik akışkan ekstraksiyon (SAE)

Besinleri ve biyoaktif bileşikleri elde etmeye yönelik olarak farklı çalışmalar yapılmış ve bu çalışmalar içinde SAE teknolojisinin kullanımının basit olması, düşük ekstraksiyon sıcaklığına sahip olması ve çevreyi kirletmemesi yeşil teknolojiler arasında önemli bir yer edindiğini göstermiştir (Zhou vd., 2021). SAE, yüksek seçicilik, güvenlik ve tekrarlanabilirlik gibi birçok avantajı olan çevre dostu bir ekstraksiyon metodolojisidir (Knez vd., 2013). Süper kritik bir akışkan, faz değişimine neden olan kritik noktanın üzerinde bir sıcaklıkta ve basınçta olan herhangi bir maddedir. Bu maddeler bir gaz gibi katılardan geçebilir ve bir sıvı gibi malzemeleri çözebilir. Karbon dioksit (CO_2) ve su, kafeinsizleştirme ve enerji üretimi için kullanılan en yaygın kullanılan süper kritik sıvılardır. CO_2, bitkiler için ekstraksiyon solvent türüdür. Arkasında toksik kalıntı bırakmaz. Ekstraksiyon özellikleri, basınç ve sıcaklıktaki ince değişikliklerle geniş çapta ve hassas bir şekilde manipüle edilebilir. CO_2 ile süper kritik ekstraksiyon CO_2'yi 466°C'nin üzerine ısıtmayı ve 1100 psi'nin üzerine pompalamayı içerir. Genellikle, bu 6000-10000 psi arasındadır. Süperkritik akışkan CO_2, yoğun bir sıvı halde kullanıldığında en iyi şekilde yoğun bir sis olarak tanımlanabilir. Düşük basınçlı CO_2, genellikle yüksek kaliteli botanik özler üretmek için kullanılan en iyi yöntemdir. Bu durumdaki CO_2 yükleme hızı, ektrakte edilecek hacme bağlı olarak CO_2 pompalanması gerektiği

anlamına gelir. Bu nedenle çok daha hızlı yükleme hızına sahip 2-10 hacim ve geniş bir kullanım alanına sahip olan pompalanmış CO_2'ye sahip olmak önemlidir (Sapkale vd., 2010). Şekil 2.9.'da bir süperkritik akışkanın basınç ve sıcaklık etkisiyle kritik noktanın üzerinde hem gaz hem sıvı özellik gösterdiği faz ayrımını göstermektedir. Bazı süperkritik akışkan sıvıların kritik sıcaklık ve basınç değerleri Çizelge 2.4.'te gösterilmiştir.

Çizelge 2.4. Süper kritik akışkan ekstraksiyonunda kullanılan bazı çözücülerin kritik özellikleri (Herrero vd., 2006).

	Kritik Özellikler			
Çözücü	Sıcaklık (°C)	Basınç (atm)	Yoğunluk (g/mL)	Çözünebilirlik ($cal^{-1/2}cm^{-3/2}$)
Etanol	10,1	50,5	0,200	5,8
Su	101,1	217,6	0,322	13,5
Metanol	34,4	79,9	0,272	8,9
Karbondioksit	31,2	72,9	0,470	7,5
Ethan	32,4	48,2	0,200	5,8
Azot Oksit	36,7	71,7	0,460	7,2
Sülfür hexafloride	45,8	37,7	0,730	5,5
n-Buten	139,9	36,0	0,221	5,2
n-Pentan	76,5	33,3	0,237	5,1

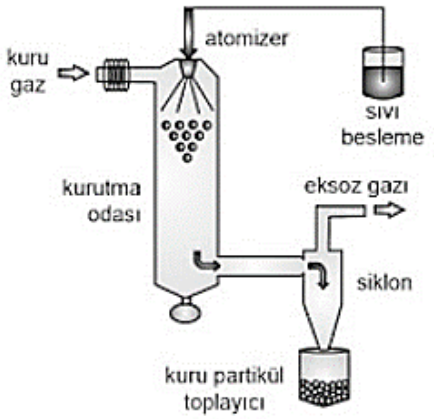


Şekil 2.9. Süperkritik bir akışkanın basınç-sıcaklık faz diyagramı (Knez vd., 2014)

2.7. Sprey Kurutma Yöntemi

Sprey kurutma, sıvı bir beslemeyi bir toz ürüne dönüştürmek, tozun genel olarak ağırlığını ve boyutunu azaltır. Diğer taraftan bakteriyel bozulma için gerekli olan su aktivitesini azaltarak ürünü korumak için tek adımlı bir işleme operasyonudur (Chiou ve Langrish, 2007). Sprey kurutma yöntemi düşük maliyetleri nedeniyle en çok tercih edilen kurutma yöntemlerinden biridir (Shishir ve Chen, 2017). Hammami ve René, (1997)'ne göre endüstriyel boyutta sprey kurutma ve dondurarak kurutma karşılaştırıldığında sprey kurutuma daha az elektrik tüketimi ve kısa sürede kurutma yapması nedeniyle 4-5 kat daha ekonomiktir. Ayrıca püskürterek kurutma, ürünün nispeten temas süresinin daha kısa (5-100 saniye) olmasından dolayı sıcaktan etkilenen moleküller üzerinde örneğin besinler, renkler ve aroma bileşenleri gibi hassas bileşenleri koruyarak daha kaliteli ürün elde edilme imkanı vardır (Rodríguez-Hernández vd., 2005). Sprey kurutulmuş ürün, düşük su aktivitesi ve nem içeriğinden dolayı yüksek oranda stabil ve kararlıdır. Sprey kurutulmuş meyve ve sebze ürünlerinin nem içeriği ve su aktivitesi sırasıyla %2-5 ve 0,2-0,6 aralığındadır. Bu koşullar altında sprey kurutulmuş ürün, mikrobiyolojik, esmerleşme gibi oksidatif reaksiyonlar, yağ oksidasyonu, otooksidasyon ve diğer enzimatik aktivitelere karşı çok daha dayanıklı hale gelmiştir (Shishir ve Chen, 2017).

Şekil 2.10.'da sprey kurutuma mekanizması ve sprey kurutmada elde edilen ürün kalitesini etkileyen proses koşulları belirtilmiştir. Buna göre sıvı akışkan ekstrakt atomizere bir pompa yardımıyla çekilir ve atomizerin gözenek çaplarına göre kurutma odasına püskürtülür ve aynı anda kurutuma odasına 150-250 °C sıcak hava üflenir. Ekstraktın toz hale gelmesi sağlanır. Burada oluşan toz siklon şeklindeki toplama ünitesinde biriktirilir ve son ürün elde edilir. Burada ürün kalitesi 3 ana etkenden etkilenir. Buna göre besleme yapılan ekstraktın karakteristiği, kompozisyonu, taşıyıcı ajanların türü, taşıyıcı ajanların ekstrakt içindeki konsantrasyonu, ekstraktın yoğunluk ve viskozitesi etkilidir. Diğer taraftan proses koşulları olarak giriş ve çıkış sıcaklıkları, besleme akış oranı, kurutucu hava akış oranı, besleme sıcaklığı ve atomizer hızı son ürün kalitesini etkileyen faktörlerdir. Yine sprey kurutucuda bulunan hava akışı ve atomizer tipi sprey kurutmayı etkileyen faktörlerdendir.



Şekil 2.10. Sprey kurutma mekanizması (Anonim, 2023)

2.8. Kestane Kabuğu Pigmentleri ve Biyoaktivitesi Üzerine Yapılan Çalışmalar

You vd. (2014) tarafından yapılan araştırmada, *C. Mollissima* türü kestanelerin kabuklarından suda çözünebilir pigmentleri %50 etanol mikrodalga destekli ekstraksiyon ile ekstrakte edilmiş ve ekstraktlar iki aşamalı çöktürme metoduyla saflaştırılmıştır. Kapsamlı ve sistematik bir çalışma ile bu pigmentlerin kimyasal kompozisyonu ve karakteristik özellikleriyle bağlı olarak değerli sonuçlar sağlamıştır. Böylece flavonoidlerin (özellikle prosiyanidin B3) ve küçük miktar steroidal sapogeninleri oluşumuyla beraber oluşan ether ilişkili şekerlerin üstünlüğünü kanıtlamışlardır. Bu çalışma sonucunda kestane kabuğu pigmentlerini suda çözünebilir, pratik olarak toksik olmayan, mükemmel DPPH radikal süpürme etkisi ve antibakteriyel aktivite göstermişlerdir. Bununla beraber kestane kabuğu pigmentlerinin sıcaklığa, ışığa ve metal iyonlarına karşı stabil olarak kalmış olduğu görülmüştür. Bu çalışmada deneme grubu 200 mg/kg pigment süspansiyonu ile beslenirken kontrol grubu su ile beslenmiştir. Bu deney sonucunda fareler için maksimum doz 5,0 g /kg (vücut ağırlığı) olarak belirlenmiştir. Ölümle ilgili herhangi bir rapor, farelerin vücut ağırlıklarında azalma, saç dökülmesi, deride kabuklanma, yumuşak veya mukuslu dışkı, dışkılamada azalma veya normalden küçük dışkı, ürogenital bölgede ıslak sarı materyal veya süreç sonrası şikayetler kestane kabuğu pigmenti alımının takiben 14 gün boyunca izlenmiş ve 14.günden sonra nekropsi tetkiki yapılan makroskopik ve toplam patoloji gözlemlerde gözle görülür bir lezyon gözlenmediği bildirilmiştir. Kontrol örnekleri ve deney

hayvanlarının iç organlarının nispi ağırlıkları arasında nispi bir farklılık gözlenmediği belirtilmiştir. Bu durum deney farelerinin 5,0 g/kg vücut ağırlıklarına uygulanan kestane kabuğu pigmentleri dozlarını tolere ettiklerini göstermiştir. Gıda ve gıda takviyelerinde kullanılacak olan botanik ve botanik preparatların güvenlik değerlemesi için hazırlanan rehbere göre hem erkek hem dişi farelerde LD_{50} değeri 5,0g/kg (vücut ağırlığı)'ndan çok daha iyi olacağı raporlanmıştır (Schilter vd., 2003).

Chen vd., (2018) tarafından yapılan çalışmada kestane kabukları %20-30 ve 40 oranlarında etanol, 70-80 ve 90 °C sıcaklıklarda ve 2,0-2,5 ve 3,0 saat sürelerde optimizasyonu yapılmış bağımlı değişken olarak renk değeri seçilmiştir. Buna göre pH'nın 13 olarak ayarlandığı çözücülerde optimum koşullar %28 etanol konsantrasyonu, 83 °C ve ekstraksiyon zamanı 2.3 saat olarak tespit edilmiştir. Buna göre renk değeri 31,25 ± 0.50 olarak bildirilmiştir.

Yao vd., (2012) farklı pH'larda 3 farklı fraksiyon (Fr) gerçekleştirerek kestane kabuğu pigmentlerinin değerlenmesini de incelemiştir. Fr.1, Fr. 2 ve Fr.3. için sırasıyla renk sonuçları 68,5; 41,8 ve 27,0 mg/g olarak belirtmiştir. Fr.1'in nötr pH'de elde edildiği ve suda çözünmediği bildirilmiştir.

Squillaci vd., (2018) ekstraksiyon amacıyla kaynayan su kullanmıştır. İç ve dış kestane kabuğu kuru ekstrakt karışımının TFM içeriğini 205,99 mg GAE/g olduğunu bulmuşlardır. Bununla birlikte, Pinto vd., (2021a) 40 bar basınçta su kullanarak kritik altı su ekstraksiyonu ile 315,21 mg GAE/g km ila 496,80 mg GA/g km olarak TFM sonuçları elde ettiklerini bildirmişlerdir. Pinto vd., (2021b) tarafından yapılan bir başka çalışmada farklı konsantrasyonlarda etanol ve 300 W mikrodalga gücü kullanılarak 110,96 ile 173,89 mg/g GAE arasında TFM sonuçları elde etmişlerdir.

Fernández-agulló vd., (2014) tarafından yapılan bir çalışmada, MDE ile su, etanol ve metanolden oluşan farklı solventler ve konsantrasyonlar kullanılarak yapılan ekstraksiyonda TFM sonuçları 33,90 – 49,86 g GAE/100 g km arasında değişmiştir. Ayrıca, Vázquez vd., (2009) kestane kabuğu ekstrelerinde TFM sonuçlarını 23,54 – 41,84 g GAE/100 g km olarak bildirmişlerdir.

Cacciola vd., (2019) tarafından kestane kabuklarının antikanserojen etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada ekstraksiyon işlemi için çözücü su kullanıldığında ve 1000 W mikrodalga gücü uygulandığında bizim sonuçlarımızla uyumlu olarak TFM 247,63 mg GAE/g km raporlamışlardır.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

Bursa bölgesinde kestane şekeri üretimi yapan İlka Şekerleme (Kardelen) firması tarafından üretim esnasında açığa çıkan kestane kabukları 2020 Aralık-2021 Ocak döneminde temin edilmiştir. Şekil 3.1.'de görüldüğü gibi ilk olarak Fritsch marka kaba öğütücü vasıtasıyla toz haline getirilmiştir. Toz halinde pamuksu yapılar da içeren kestane kabuk tozları öncelikle 1 mm sonradan da 0,45 mm gözenek çaplı elekten (Retsch marka) elenmiştir. Elek altına geçen tozlar kuru madde analizi gerçekleştirilmek üzere Heraus marka vakumlu etüvde 70˚C'de sabit tartıma gelinceye kadar kurutulmuştur. Elde edilen kestane kabuğu tozlarının ilk olarak fizikokimyasal özellikleri belirlenmiştir.



Şekil 3.1. Kestane kabuğu ön hazırlık fotoğrafları

3.1. Sıcaklık ve Gramaj Ön Denemelerinin Yapılması

Ekstraksiyon amacıyla 4 g kestane kabuğu tozu 100 mL'lik balon jojeye alınmış üzerine 0,3 mol NaOH ilave edilmiş devamında ise 2M HCl ve 6M HCl ile sırasıyla pH ayarlaması, çöktürme ve kaynatma yapılmıştır. 6M HCl kullanıldıktan sonra ekstrakt

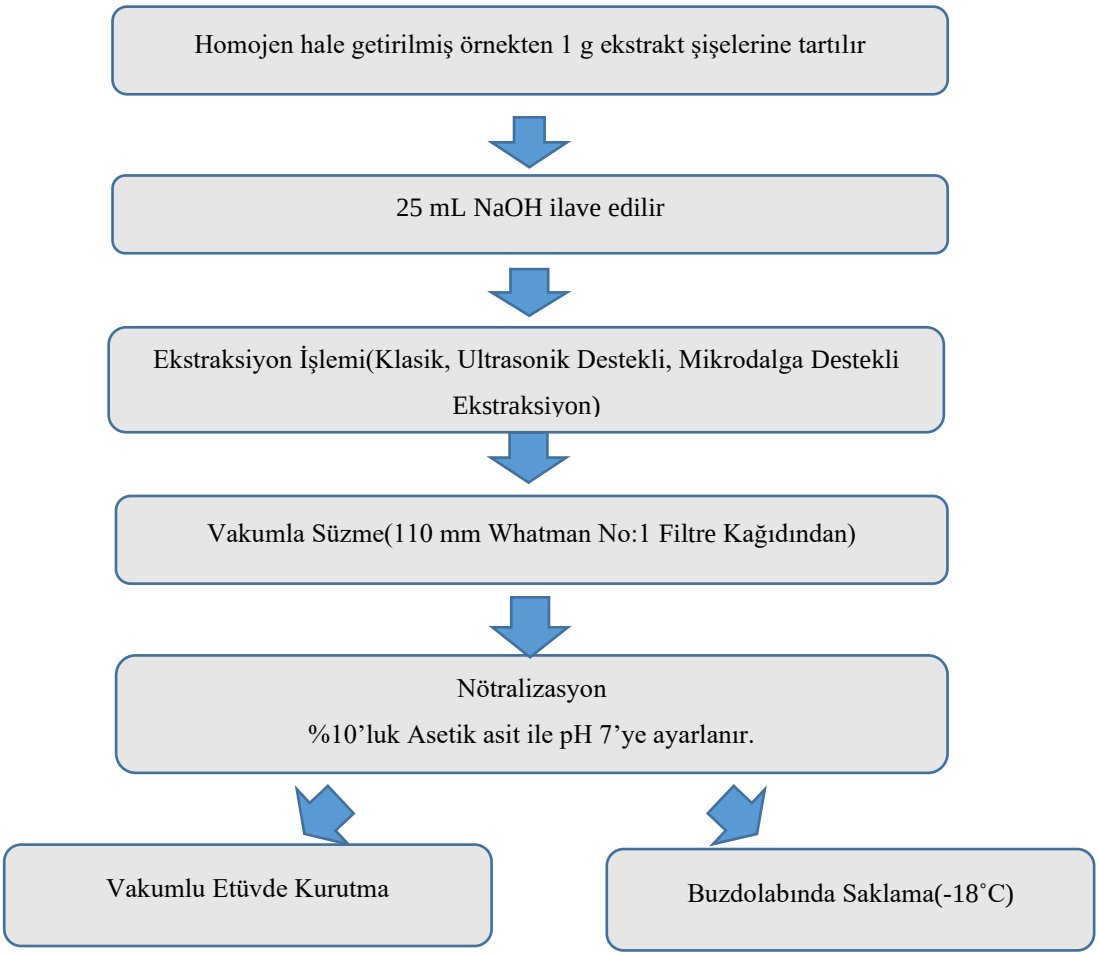
içinde yoğun miktarda çökelti oluşmuş çok az ekstrakt kalmış, kahverengi renk kaynama neticesinde canlılığını kaybetmiştir. Bunun neticesinde kestane kabuklarının renk bozulumuna neden olduğu ve topaklaşma nedeniyle ekstrakt veriminin düşük olacağı ve neticede de elde edilen ekstraktın püskürterek kurutma için sorun olacağı düşüncesiyle Design-Expert (Deneme Sürümü, Stat-Ease, Inc., Minneapolis, MN) programı ile bağımsız ve bağımlı değişkenler belirlenerek optimizasyon yapılması planlanmıştır.

Bu amaçla sıcaklık ve gramaj ön denemeleri yapılmış bunun için örneklerden 1g tartılmıştır. Ön denemeler için 1 mol NaOH ile %0,2-0,4-0,6-0,8 ve 1,0 kestane kabuğu ekstraktları hazırlanmış ancak 1mol NaOH'tan hazırlanan ekstraktın pH değerinin 13 olarak geldiği tespit edilmiş, toplam fenolik madde içeriği ve toplam antioksidan kapasite analizi (CUPRAC) için sıkıntı oluşturmadığı ancak DPPH analizi için Trolox standartlarının (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl ile reaksiyon vermediği) standartların farklı konsantrasyonlarda olmasına karşın hepsinin aynı absorbansı verdiği bu nedenle metoda cevap vermediği görülmüştür. Bu nedenle pH etkisini azaltmak için tüm ekstraktlarda pH 7 olacak şekilde nispeten zayıf bir asit olan asetik asit(%10) ile ayarlanmıştır (Blackwell vd., 2012; Ham vd., 2015). Diğer taraftan Gao vd., (2019) kestane kabuğu pigmentlerinin pH 7'de kahverengi renk verdiğini belirtmişler, yüksek pH'larda ise farklı renk verdiği belirtilmiştir. Bu aşamadan sonra düşük konsantrasyonda solvent (NaOH) konstrasyonu (0,1mol/L) seçilerek hem solvent konsantrasyonu düşürülmüş hem de pH 7'ye ayarlanmıştır. Diğer taraftan buradan sonra ön denemelerde 0,25; 0,5; 0,75; 1 ve 2 g örnekler tartılmış 25 mL 0,10 (mol/L) NaOH ile 24 saat bekletilerek ekstrakte edilmiştir. Renk değeri (%1), toplam fenolik madde ve toplam antioksidan sonuçları gözlenmiştir. 1 g ve daha düşük gramajlarda vakumla filtre kağıdından süzme işlemi problem olmazken, 2 g örnekte süzülmeme ve filtre kağıdının patlaması gibi problemler görülmüştür. Bu nedenlerle gramaj ön denemeleri sonrasında örnek miktarının 1g olarak alınmasının uygun olacağı anlaşılmıştır. Sıcaklık ön denemesi için 1 g örnek tartılmış 25 mL 0,1M NaOH ilave edilmiştir. Bu şekilde ekstraktlar, 30-50 ve 70 ˚C sıcaklıkta su banyosunda 1'er saat muamele edilmiş bu denemelerin sonuçları renk değeri, toplam fenolik madde içeriği ve toplam antioksidan kapasite sonuçları gözlenmiştir. Ön denemeler sonucunda elde edilen veriler, Çizelge 3.1.'de görülmektedir.

Tüm ekstraksiyon uygulamaları için Şekil 3.2.'deki gibi bir ekstraksiyon prosesi uygulanması uygun görülmüştür.

Çizelge 3.1. Kestane kabuğu ön denemeleri

	Örnek Miktarı	Renk	Toplam Fenolik Madde İçeriği [mg GAE/g (km)]	CUPRAC [mg TE/g (km)]	DPPH [mg TE/g (km)]
Örnek Miktarı Denemesi	0,25 g	9,7	79,5	651,3	45
	0,5 g	11,5	137,4	743,2	133,3
	0,75g	15,3	163,5	802,7	224
	1,0 g	17,4	192,9	902,6	287,4
Sıcaklık Denemesi	**Sıcaklık**				
	30 ˚C	11,8	155,8	521,9	130,5
	50 ˚C	12,7	159,3	559,5	161,3
	75 ˚C	15,2	175	593,7	181,4

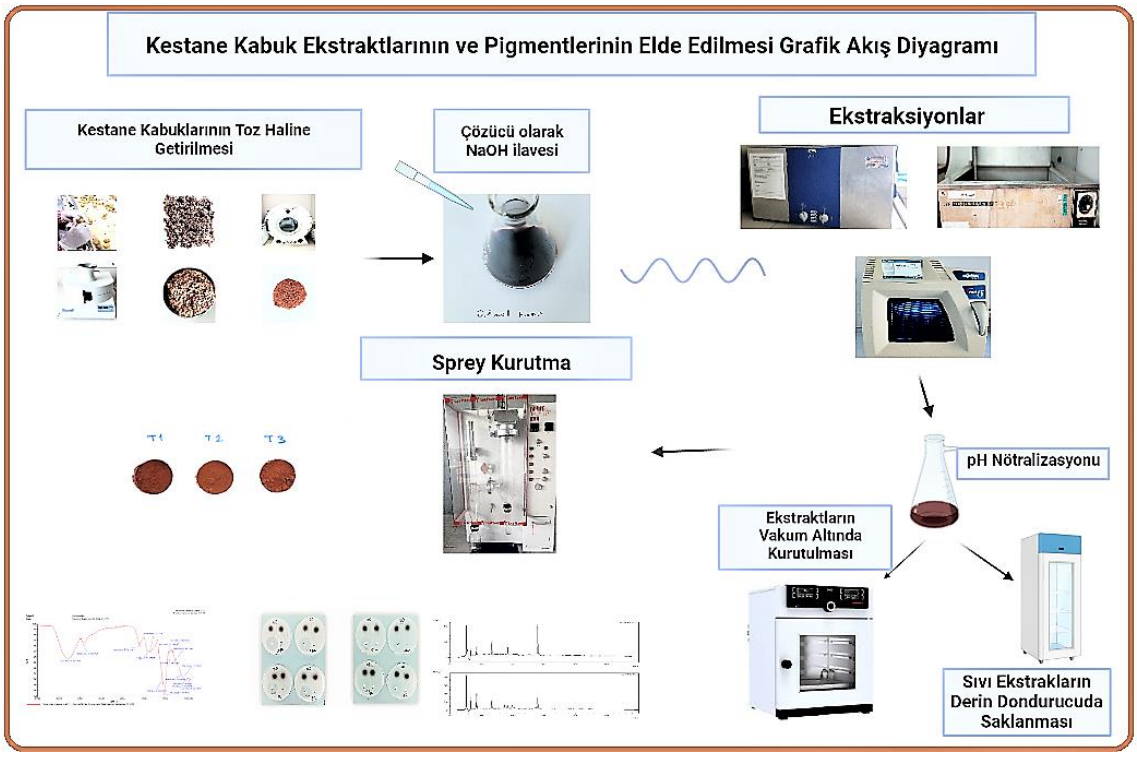


Şekil 3.2. Ekstraksiyonların akış şeması

3.2. Ekstraksiyonların Bağımlı ve Bağımsız Değişkenlerinin Belirlenmesi

Doktora tezinin amacının sanayi için bir atık olan kestane kabuklarının boyar özellikleri ile birlikte biyoaktif bileşenleri de elde etmek ve biyoaktif içerikli bir doğal kahverengi renklendirici elde etmektir. Bu nedenle ekstraksiyonların optimizasyon çalışmalarında bağımsız değişkenler her bir ekstraksiyon karakteristiğine bağlı olarak farklılık gösterirken bağımlı değişkenler tüm ekstraksiyonlarda renk özelliğini ve biyoaktif içeriği elde edecek şekilde aynı seçilmiştir. Buna göre, klasik ekstraksiyonda bağımsız değişkenler; sıcaklık, süre, çözücü konsantrasyonu; ultrasonik destekli ekstraksiyonda bağımsız değişkenler, sıcaklık, süre, çözücü konsantrasyonu; mikrodalga destekli ekstraksiyonda bağımsız değişkenler, mikrodalga gücü, süre, çözücü konsantrasyonu, bağımlı değişkenler ise, renk değeri, toplam fenolik madde içeriği, toplam antioksidan

kapasitesi (CUPRAC ve DPPH yöntemleri) şeklinde belirlenmiştir. Şekil 3.3.'te başlangıçtan sprey kurutulmuş toz elde edilinceye kadar uygulanan işlemler ve bazı karakterizasyon işlemleri görülmektedir.



Şekil 3.3. Kestane kabuğu tozu elde edilme ve karakterizasyon diyagramı

3.3. Klasik Ekstraksiyonun Optimizasyonu

3.3.1. Klasik yöntemle numune hazırlama işlemleri

Kestane Kabuğunun renk pigmentlerini ekstrakte etmek ve bu ekstraksiyonu optimizasyonu için Design-Expert 7.0 (deneme versiyonu) programı kullanılmıştır. Bu programda, 3 Bağımsız değişken sıcaklık (°C), süre (dk) ve çözücü (NaOH) konsantrasyonu (mol/L) için 5 farklı seviye kodları belirlenmiştir. Burada sıcaklık aralığı ultrasonik destekli ekstraksiyonla uyumlu olarak 30-90 °C aralığında, ekstraksiyon süresi 15-75 dakika aralığında ve NaOH çözeltisi konsantrasyon aralığı 0-0,2 mol/L olarak 5 seviye olarak kodlanmıştır. Buradaki bağımsız değişkenlere karşılık olarak renk değeri (%1 konsantrasyon için), toplam fenolik madde içeriği(mg GAE/g km, toplam

antioksidan kapasitesi (CUPRAC mg TE/g km ve DPPH mg TE/g km) analiz edilerek sonuçları Design-Expert programında deneme desenine yerleştirilmiştir.

Şekil 3.1.'deki akış şemasına uygun olarak ön işlemler gerçekleştirilmiştir. Buna göre elenmiş olan kestane kabuğu tozunun kuru madde içerikleri de belirlenerek 1g olarak amber renkteki şişelere tartılmıştır. Üzerlerine optimizasyon deneme desenlerine uygun olarak 0; 0,05; 0,1; 0,15 ve 0,2 mol/L konsantrasyonlarda NaOH çözeltisi ilave edilmiş 30, 45, 60, 75 ve 90 ˚C sıcaklıklarda su banyosunda ekstraksiyon şişeleri bekletilmiştir. Sonrasında elde edilen ekstraktlar 110 mm gözenekteli filtre kağıtlarından vakum yardımıyla süzülerek ekstraktlar elde edilmiştir. Bu ekstraktlar çeşitli analizler için kullanılmak üzere vakumlu etüvde 70 °C'de sabit tartıma gelene kadar (yaklaşık 6 saat) bekletilmiştir. Kurutulmuş olarak vakumlu etüvden alınan ekstrakt tozları amber renkli şişelere konularak ağızları hava almayacak şekilde kapatılmıştır. Bu tozlar HPLC ile fenolik bileşen analizi, FTIR spektrumları, ekstraksiyon verimi çalışmaları, gibi analizlerde kullanılmak üzere derin dondurucu da -18 °C'de saklanmıştır. Diğer taraftan optimum koşullarda elde edilmiş sıvı halde olan ekstraktlardan da 3 tekerrürlü olarak buzdolabında 2-5 °C'de melanin pigmenti analizi, antibakteriyel aktivite analizi, mineral madde analizi gibi analizlerde kullanılmak üzere saklanmıştır. Şekil 3.4.'te belirtilen su banyosunda (Kotterman marka) klasik ekstraksiyon süreçleri gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.4. Klasik ekstraksiyon uygulaması

3.3.2. Klasik ekstraksiyon için merkezi kompozit deney tasarımının modellenmesi

Design expert programında merkezi kompozit deneme tasarımına göre 3 farklı bağımsız değişken 5 farklı seviyede uygulama yapılmıştır. Çizelge 3.2.'de deneme tasarımına ait bağımsız değişkenlerin kod seviyeleri görülmektedir.

Çizelge 3.2. Klasik ekstraksiyonda bağımsız değişkenlerin merkezi kompozit deneme tasarımına göre kodlanması

Bağımsız Değişkenler	**Kod**	**Değişim**	**Değişkenlerin seviyesi**				
			-2	-1	0	+1	+2
Sıcaklık (°C)	*X1*	30-90	30	45	60	75	90
Ekstraksiyon süresi (dk.)	*X2*	15-75	15	30	45	60	75
NaOH Konsantrasyonu (mol/L)	*X3*	0-0,2	0	0,05	0,1	0,15	0,2

Optimizasyon gerçekleştirildikten sonra program tarafından verilen tatmin (desirability) seviyesi en yüksek çıkan bağımsız değişkenler optimum koşullar olarak alınmıştır.

3.4. Ultrasonik Destekli Ekstraksiyonun Optimizasyonu

3.4.1. Ultrasonik destekli ekstraksiyon için numune hazırlama işlemleri

Kestane kabuklarının ekstraksiyonun verimliliğinin arttırılması ve ekstraksiyon sürecinin kısaltılması amacıyla ultrasonik destekli ekstraksiyon uygulanmıştı. Şekil 3.1.'de bahsedilen ön işlemler gerçekleştirilmiştir. Ön denemeler neticesinde bu tozlardan 1g örnek alınıp üzerlerine 25 mL Çizelge 3.3.'te belirtilen konsantrasyonlarda NaOH ilave edilmiştir. Daha sonra Şekil 3.5.'te gösterilen ultrasonik banyo (Elma S 300H) vasıtasıyla ultrasonik destekli ekstraksiyon gerçekleştirilmiştir. Bu cihaz, 37 khz frekansta 1500 W güçte çalışmıştır. Sıcaklık 30-70 ˚C, Süre 15-75 dakika, Çözücü (NaOH) Konsantrasyonu 0-0,2 M aralığında çalışılması uygun görülmüştür.



Şekil 3.5. Ultrasonik destekli ekstraksiyon için kullanılan ultrasonik banyo

3.4.2. Ultrasonik destekli ekstraksiyon için merkezi kompozit deney tasarımının modellenmesi

Kestane kabuğunun renk pigmentlerini ekstrakte etmek ve bu ekstrakiyonu optimizasyonu için Design-Expert programı kullanılarak belirlenen bağımsız değişkenler ve kod seviyeleri Çizelge 3.3.'te verilmiştir. Burada, 3 Bağımsız değişkenler sıcaklık (˚C), süre (dakika) ve çözücü (NaOH) konsantrasyonu (mol/L) için 5 farklı seviye kodları belirlenmiş bunlara karşılık olarak renk değeri (%1), toplam fenolik madde içeriği (mg GAE/g km, toplam antioksidan kapasitesi (CUPRAC mg Trolox Eş Değeri (TE)/g km ve DPPH metotları mg (TE)/g km bağımlı değişken sonuçları elde edilerek optimize edilmiştir.

Çizelge 3.3. Ultrasonik destekli ekstraksiyonda bağımsız değişkenlerin merkezi kompozit deneme tasarımına göre kodlanması

Bağımsız Değişkenler	Kod	Değişim	Değişkenlerin seviyesi				
			-2	-1	0	+1	+2
Sıcaklık °C	*X1*	30-70	30	40	50	60	70
Ekstraksiyon süresi (dk.)	*X2*	15-75	15	30	45	60	75
NaOH Konsantrasyonu (mol/L)	*X3*	0-0,2	0	0,05	0,1	0,15	0,2

3.5. Mikrodalga Destekli Ekstraksiyonun Optimizasyonu

3.5.1. Mikrodalga destekli ekstraksiyon ön denemeleri

Bağımsız değişkenler tasarlanırken klasik ekstraksiyonda, ultrasonik destekli ekstraksiyonda ve mikrodalga destekli ekstraksiyonda çözücü (NaOH) konsantrasyonu, sıcaklık ve süre değişkenleri düşünülmüştü. Ancak mikrodalga destekli ekstraksiyonda yapılan ön denemelerde 300W sabit güçte 60 ve 90 ˚C'de 5 dakika 0,2 mol/L NaOH konsantrasyonda renk değerleri için gösterge olan spektrofotometrede 400 nm absorbans değerleri sırasıyla 0,493 ve 0,541 nm olarak görülmüştür. Mikrodalga destekli ekstraksiyon işlemi esnasında, ekstrakta sıcaklık uygulaması, sabit tutulan mikrodalga gücünün denemedeki sıcaklığa ulaştığı anda mikrodalga gücün kesilmesi ve dolayısıyla belli bir süre herhangi bir işlemin uygulanmaması şeklinde gerçekleşmiştir. Neticede mikrodalga ekstraksiyon işleminde cihaz, 300W güç ile 60 ˚C'ye 2 dakikada 90 ˚C'ye ise 3,30 dakika da ulaşılmış, ön deneme süresi olan 5 dakikanın kalan süreleri ise cihaz mikrodalga gücünü keserek sıcaklığı sabit tutmaya çalışmıştır. Bunun neticesinde bağımsız değişken olarak farklı sıcaklığa karşılık gelen değerler hem düşük kalmış hem de uygulamalar arasındaki farka rağmen spektrofotometredeki absorbans değerleri yakın çıkmıştır. Bunun neticesinde bağımsız değişken olarak sıcaklık yerine mikrodalga gücünün 200, 600 ve 1000W seviyeleri uygulanmış ve spektrofotometrede elde edilen absorbanslar Çizelge 3.4.'te gösterilmiştir.

Çizelge 3.4. Mikrodalga destekli ekstraksiyon ön denemeleri

Mikrodalga Gücü (W)	Süre (dakika)	Çözücü Konsantrasyonu (mol/L)	400 nm Dalga Boyundaki Absorbans
200	9	0,1	0,437
600	9	0	0,162
600	9	0,2	1,502
1000	9	0,1	1,528

Ön denemeler ve ekstraksiyon işlemleri Şekil 3.6.'da gösterilen 2455 MHz 1800W MARS 6 (CEM, Matthews, NC) cihazında mikrodalga destekli ekstraksiyon gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.6. Mikrodalga ekstraksiyonda kullanılan ekstraksiyon cihazı

3.5.2. Mikrodalga destekli ekstraksiyon için numune hazırlama işlemleri

Mikrodalga destekli ekstraksiyonda kestane kabuklarının mikrodalga gücü vasıtasıyla ekstraksiyonun verimliliğinin arttırılması, renk ve biyoaktif özellikler gösteren bileşenlerin daha yüksek seviyelerde elde edilmesi ve ekstraksiyon sürecinin kısaltılması amacıyla uygulanmıştır. Kestane kabuklarına Şekil 3.1.'de gösterilen ön işlemler uygulanmıştır. Ön denemelerden hareketle 200 ve 1000 Watt (W) arasındaki güç uygulamalarının yüksek verim elde ederek optimum seviyelerde yüksek ve tutarlı

değerler alınmasına neden olacağı düşünülmüş ve deneme deseninde bağımsız değişken olarak mikrodalga gücü 200-400-600-800 ve 1000 W olarak ramping modda uygulanması uygun görülmüştür.

3.5.3. Mikrodalga destekli ekstraksiyon için merkezi kompozit deney tasarımının modellenmesi

Kestane Kabuğunun renk pigmentlerini ve biyoaktif bileşenleri birlikte ekstrakte etmek ve bu ekstraksiyonun optimizasyonu için Design-Expert programı kullanılmıştır. Bu programda, 3 Bağımsız değişken mikrodalga gücü (Watt), süre (dk) ve çözücü (NaOH) konsantrasyonu (mol/L) için 5 farklı seviye kodları belirlenmiş bunlara karşılık olarak renk değeri (%1 konsantrasyon için), toplam fenolik madde içeriği (mg GA/g km, Toplam Antioksidan Kapasitesi (CUPRAC ve DPPH Metotları mg (TE)/g km) belirlenerek optimize edilmiştir. Kod seviyeleri Çizelge 3.5.'te görülmektedir.

Çizelge 3.5. Mikrodalga destekli ekstraksiyon için merkezi kompozit deney tasarımının kod seviyeleri

Bağımsız Değişkenler	**Kod**	**Değişim**	**Değişkenlerin seviyesi**				
			-2	-1	0	+1	+2
Mikrodalga Gücü (W)	*X1*	200-1000	200	400	600	800	1000
Ekstraksiyon süresi (dk.)	*X2*	3-15	3	6	9	12	15
NaOH Konsantrasyonu (mol/L)	*X3*	0-0,2	0	0,05	0,1	0,15	0,2

3.6. Sprey Kurutma Optimizasyonu

Sprey kurutma işlemleri Şekil 3.7.'te görülen Lab-Plant marka SD-04 model sprey kurutucuda gerçekleştirilmiştir. Ekstraktların içine % ağırlıkça maltodekstrin(Sigma Aldrich, DE 16,5-19,5) ve arabik gam (Fisher Scientific) karışımları deneme deseninde belirtildiği şekilde ilave edilmiştir.



Şekil 3.7. Sprey kurutma işlemlerinde kullanılan sprey kurutucu

3.6.1. Sprey kurutma işlemi için optimum seviyedeki mikrodalga ekstraktının elde edilmesi

Optimizasyonu gerçekleştirilmiş olan klasik ekstraksiyon, ultrasonik destekli ekstraksiyon ve mikrodalga destekli ekstraksiyon içinde en yüksek renk ve biyoaktiviteye sahip olan mikrodalga destekli ekstraksiyonda optimizasyon sunucu elde edilen optimum şartlar olan 800W, 12 dk ve 0,115 mol/L NaOH çözücü konsantrasyonu şartlarında ekstraksiyon işlemleri gerçekleştirilmiştir. Mikrodalga destekli ekstraksiyon işlemleri, Şekil 3.6.'da belirtilen 2455 MHz 1800W MARS 6 (CEM, Matthews, NC) mikrodalga ekstraksiyon cihazıyla gerçekleştirilmiştir.

3.6.2. Sprey kurutma için Box-Behnken deney tasarımının modellenmesi

Optimum Seviye elde edilmiş olan Mikrodalga Destekli Kestane Kabuğu Ekstraktlarına Çizelge 3.6.'da görüldüğü gibi Box Behnken deneme deseni tasarlanarak bağımsız değişkenler sprey kurutma inlet (giriş) sıcaklığı, kaplama materyalinin ekstrakta ağırlıkça % oranı ve maltodekstrinin arabik gama ağırlıkça % oranı olarak 3 seviyede kodlanmıştır. Burada literatürle uyumlu olarak giriş sıcaklığı 140-150-160 °C, ekstrakt içindeki kaplama materyalininin ağırlıkça % oranı %10-15-20, kaplama materyali olarak kullanılan ekstrakt içindeki maltodekstrin-arabik gam karışımında maltodekstrinin arabik gama ağırlıkça % oranı 50-75-100 olarak belirlenmiştir. Örneğin 100 mL ekstrakt içinde %10 kaplama materyali olarak hesaplanmışsa 10 g kaplama materyali ektrakta eklenmiştir. Bu kaplama materyali miktarı için maltodekstrin/arabik gam oranı %50 ise 5 g maltodekstrin, 5g arabik gam ilave edilmiştir. 3 seviye olarak kodlanmış bağımsız değişkenlere karşılık renk değeri ve toplam fenolik madde içeriği bağımlı değişken olarak belirlenmiş ve analizleri gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3.6. Sprey kurutma uygulamasında Box Behnken deneme deseni bağımsız değişkenler için kod seviyeleri

Bağımsız Değişkenler	**Kod**	**Değişim**	**Değişkenlerin seviyesi**		
			-1	0	+1
Giriş Sıcaklığı (°C)	*X1*	140-160	140	150	160
Kaplama Materyalinin Ekstrakta Oranı (%)	*X2*	10-20	10	15	20
Maltodekstrinin/Arabik Gama Oranı	*X3*	50-100	50/50	75/25	100/0

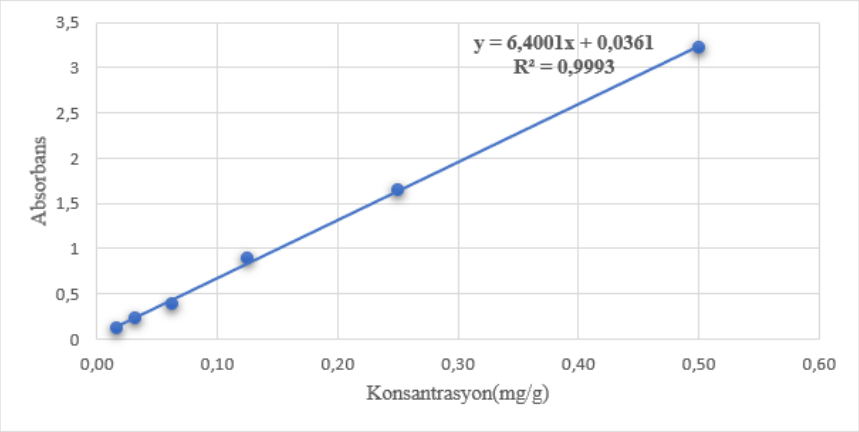
3.7. Analizler

3.7.1. Renk analizi

Chen vd., (2018) tarafından yapıldığı şekli esas alınarak optimizasyonda kullanılan klasik, ultrasonik destekli ekstraktlar ve sprey kurutulmuş kestane kabuğu (SKK) tozu için 2500, mikrodalga destekli ekstraksiyon için 5000 kat NaOH ile seyreltilmiş, nötralize edilmiş ve 400nm dalga boyunda spektrofomotrede (Thermo Scientific Genesis 10S UV) saf suya karşı okunmuş, elde edilen absorbanslar ekstraksiyonun son konsantrasyonu %1 olacak şekilde seyreltme faktörüyle çarpılarak hesaplanmıştır.

3.7.2. Toplam fenolik madde (TFM) analizi

Toplam fenolik madde içeriği Folin-Ciocalteu yöntemi'ne göre yapılmıştır (Singleton vd., 1999). Özet olarak 200 µl ekstrakt alınıp 15 mL'lik santrifüj tüpüne yerleştirildikten sonra 1,5 mL 1/10 seyreltilmiş Folin-Ciocalteu reaktifi ilave edilerek 5 dakika bekletilmiştir. Daha sonra 1,2 mL sodyum karbonat çözeltisi ilave edildi ve oda sıcaklığında (24 °C) 90 dakika karanlıkta tutulmuştur. Bu sürenin sonunda, UV-VIS spektrofotometre (Thermo Scientific Genesis 10S) ile 765 nm'de tanık numuneye karşı absorbans ölçülmüştür. Şekil 3.8.'de gösterilen kalibrasyon eğrisinin doğrusallığı, 0,02 ila 0,5 mg/g gallik asit konsantrasyonunda R^2=0,9993 olarak bulunmuştur.



Şekil 3.8. Toplam fenolik madde analizi kalibrasyon eğrisi

3.7.3. Toplam antioksidan kapasite (TAK) belirlenmesi analizi

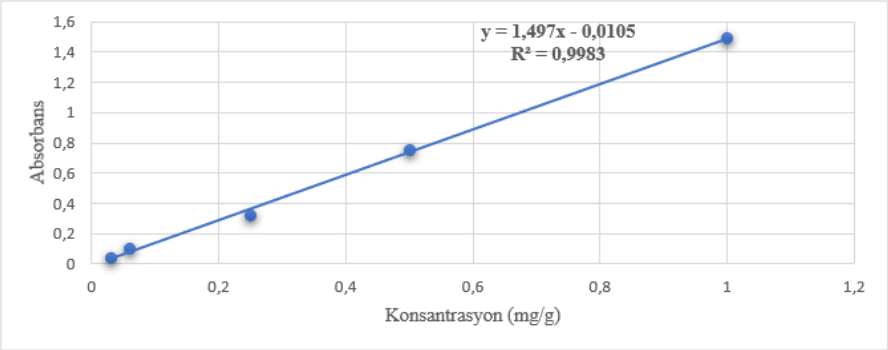
Kestane kabuğunun ekstraktlarının ve SKK tozunun toplam antioksidan kapasitesi 2 yöntemle belirlenmiştir. Bunlar,

CUPRAC Analizi

Bir cam tüp içerisine bakır (II) çözeltisi, neokuproin çözeltisi ve amonyum asetat tamponundan sırasıyla 1'er mL eklenmiştir. Üzerine 0,5 mL antioksidan çözeltisi ve distile su ilave edilip tüpler iyice çalkalanmıştır. Toplam hacim 4.1 mL olacak şekilde hazırlanan çözeltiler oda koşullarında ağzı kapalı olarak 30 dakika boyunca bekletilmiştir. Bu süre sonunda içinde örnek bulunmayan referans çözeltiye karşı 450 nm'de absorbans

değerleri ölçülmüştür. Şekil 3.9.'da gösterilen kalibrasyon eğrisi 0,3-1,0 mg/g TE (R^2= 0,9983) arasında hazırlanmıştır (Apak vd., 2005).

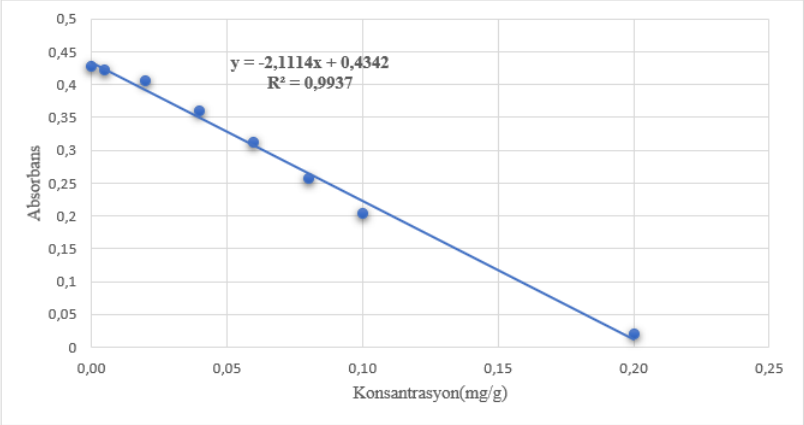
Referans Çözelti: 1 mL Cu (II) + 1 mL Nc + 1 mL NH4Ac + 1,1 mL H2O
Örnek Çözelti: 1 mL Cu (II) + 1 mL Nc + 1 mL NH_4Ac + x mL antioksidan + (1,1-x) mL



Şekil 3.9. CUPRAC yöntemi kalibrasyon eğrisi

DPPH Analizi

1*10^{-3}mol/L DPPH stok çözeltisi metanol içinde 100 mL'ye tamamlanarak hazırlanmıştır. Bundan 6 mL alınıp ve tekrar metanolle 100 mL'ye tamamlanarak çalışma çözeltisi elde edilmiştir. Ekstrakttan 150 µL alınıp ve üzerine 2,85 mL DPPH çalışma çözeltisi ilave edilmiştir. 30 dakika oda sıcaklığında karanlıkta bekletilmiştir. 515 nm dalga boyunda saf suya karşı spektrofomotrede (Thermo Scientific Genesis 10S UV) absorbans okutulmuştur. Kantitatif sonuçlar 0 ila 0,2 mg/g konsantrasyonlar arasında TE olarak ve R^2=0,9937 korelasyon katsayısından hesaplanan ve Şekil 3.10'da gösterilen kalibrasyon eğrisinden elde edilmiştir (Brand-Williams vd., 1995).



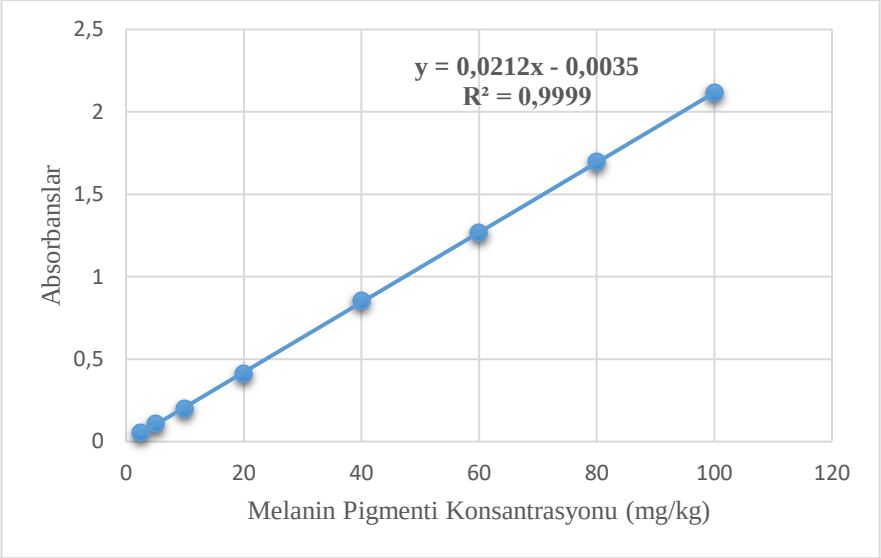
Şekil 3.10. DPPH yöntemi kalibrasyon eğrisi

3.7.4. Ekstraksiyon verimi hesaplanması

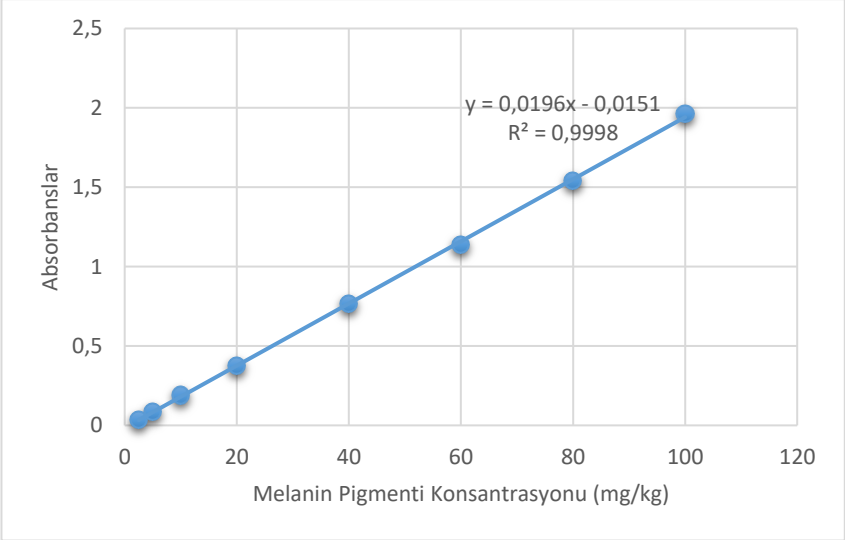
Uygulanan 3 ekstraksiyon yönteminin de ekstraksiyon verimi hesaplamalarında Aires vd., (2016) tarafından kestane kabuklarında yapılan ekstraksiyon verimi yöntemi kullanılmıştır. Buna göre başlangıçtaki kestane kabuğu tozları ekstraksiyon uygulandıktan sonra elde edilen ekstraktın vakumlu etüvde sabit tartıma gelince (6 saat) kurutulmasıyla elde edilen kuru ekstraktların ağırlıkları hesaplanmış ve yüzde olarak verilmiştir.

3.7.5. Melanin pigmenti analizi

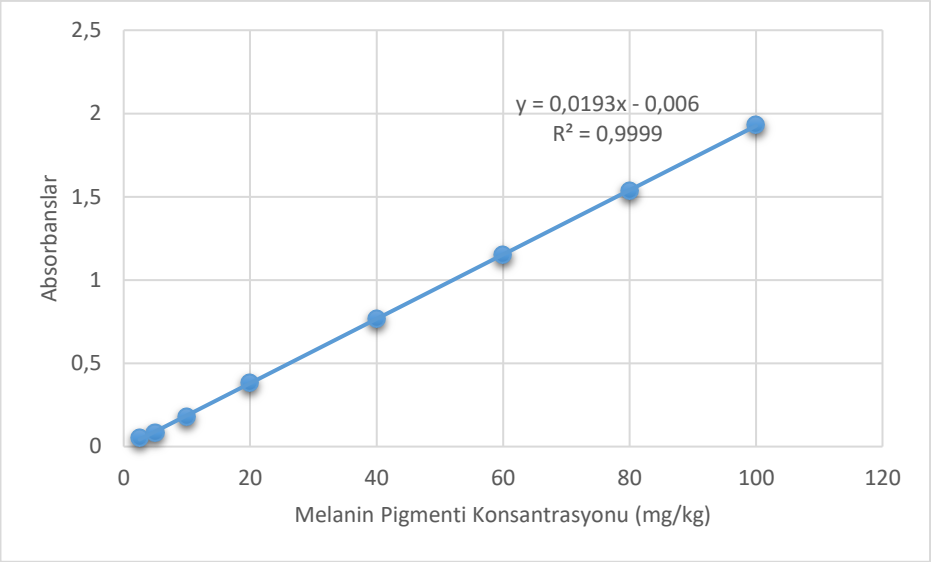
Melanin pigment içeriğinin belirlenmesi için Keles ve Özdemir (2018) tarafından geliştirilen yöntemde bazı değişiklikler yapılarak analiz gerçekleştirilmiştir. Farklı ekstraksiyon uygulamalarından elde edilen optimum koşullar, merkezi kompozit deney tasarımı ve yüzey yanıt yöntemine göre maksimum tatmin seviyesi düzeyleri her optimizasyon için belirlenmiştir. Bu koşullarda elde edilen ekstraktların ardından sentetik melanin standardı (Sigma Aldrich, Cas No: 8049-97-6) klasik ekstraksiyon için 0,138 mol/L, ultrasonik destekli ekstraksiyon için 0,15 mol/L; mikrodalga destekli ekstraksiyon ve SKK tozu 0,115 mol/L NaOH içinde çözülerek UV-VIS spektrofotometre (Thermo Scientific Genesis 10S) ile tanık çözeltiye karşı 400 nm'de absorbans ölçülmüştür. Şekil 3.11.'de klasik ekstraksiyon için R^2=0,9999, Şekil 3.12'de ultrasonik destekli ekstraksiyon için R^2=0,9998 ve Şekil 3.13'te mikrodalga destekli ekstraksiyon için R^2=0,9999 olarak kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur.



Şekil 3.11. Klasik ekstraksiyon melanin pigmenti kalibrasyon eğrisi



Şekil 3.12. Ultrasonik destekli ekstraksiyon melanin pigmenti kalibrasyon eğrisi



Şekil 3.13. Mikrodalga destekli ekstraksiyon melanin pigmenti kalibrasyon eğrisi

3.7.6. Kuru madde analizi

Kuru madde analizi, optimum şartlardaki sıvı ekstraktlar tartılarak, Heraus marka vakumlu etüvde 70 °C'de sabit tartıma gelinceye kadar (6 saat) bekletilmiştir. Ekstraksiyon verimi aşağıdaki formülle hesaplanmıştır.

Kuru madde (%)= [(İlk tartım- Son Tartım)÷İlk Tartım]*100

3.7.7. Kül analizi

Kül analizleri TS EN ISO 2171 Tahıllar, baklagiller ve yan ürünleri - Yakılarak kül muhtevasının tayini metoduna göre yapılmıştır. Buna göre, kül etme işlemine kalıntıdaki karbon parçacıkları dahil bütün madde yanana kadar yani 900 °C'ta en az 1saat ve 550 °C'ta en az 4 saat yakılarak yapılmıştır (TSE, 2010).

Kül miktarı (K) yüzde ağırlık olarak aşağıdaki formülle hesaplanmıştır.

$\% K = (m_1-m_0)\div m \times 100$ (3.1)

Burada:

K : Kül miktarı, %

m_0 : Kül krozesinin ağırlığı , g

m : Küllendirmeden önce deney numunesinin ağırlığı , g

m_1 : Küllendirmeden sonra deney numunesinin ve kül krozesinin ağırlığı

3.7.8. HCl'de çözünmeyen kül analizi

Hidroklorik asitte çözünmeyen kül analizleri (TSE, 2015b) Meyve ve sebze mamulleri-hidroklorik asitte çözünmeyen kül tayini yöntemine göre toplam kül analizi sonucu elde edilen kül, deney numunesi olarak kullanılmıştır. Porselen krozedeki deney numunesine 25mL %10'luk hidroklorik asit çözeltisi katılmıştır. Filtre kağıdı içindekilerle birlikte aynı krozeye aktarılmış ve 600 °C'daki fırında belirgin karbon parçacıklarından arınıncaya kadar fırında bekletilmiştir. Süre sonunda krozeler desikatörde soğutulup ve tartılmıştır. HCl' de çözünmeyen kül miktarı (K), ağırlık yüzdesi olarak aşağıdaki formül ile hesaplanmıştır.

$$\mathbf{K} = (100\ m_1 - m)/m_2$$

K = HCl' de çözünmeyen kül miktarı (%)

m = Kapsülün ağırlığı (g)

$\mathbf{m_1}$ =HCl' de çözünmeyen kül ile birlikte kapsülün ağırlığı (g)

$\mathbf{m_2}$ =Numune ağırlığı (g)

3.7.9. Selüloz analizi

Kestane kabuğunda ve SKK tozunda selüloz analizleri AOAC Official Method 962.09, (1998) metoduna göre yapılmıştır. Örnekten yaklaşık 1g kurutulmuş cam krozelerin içerisine tartılmış üzerine filtrasyonu kolaylaştırmak amacıyla 1g Selite tartılarak ilave edilmiştir. Metotta belirttiği şekilde sıcak ekstraksiyonlar Fibertec 2010 cihazı ve soğuk ekstraksiyon ise Fibertec 1021 Cold Extractor cihazıyla gerçekleştirilmiş ve etüvde 105 °C'de 5 saat ve 130 °C'de 2 saat kurutulmuş sonra da 525 °C'de en az 3 saat yakmaya bırakılmış ve tartımlar not alınarak selüloz içeriği aşağıdaki formülle hesaplanmıştır.

W_1: Kroze + kalıntı, g

W_2: Kroze + kül kalıntısı, g

W_3: Numune miktarı, g

$$\text{Ham Selüloz (\%)} = (W_1 - W_2) \div W_3 * 100 \qquad (3.2)$$

3.7.10. Toplam şeker analizi

Toplam şeker analizleri için yaklaşık 10 g numune (örnek) alınmıştır. 250 mL'lik cam balona joje içerisine bir miktar saf su konulup çalkalanmıştır. Üzerine 10 mL Carrez I ve

10 mL Carrez II çözeltileri ilave edilip balon çizgisine kadar saf su ile tamamlanıp, iyice çalkalandıktan sonra kaba filtre kağıdı ile süzülmüştür. Hazırlanan bu süzüntüden 50 mL alınıp,100 mL'lik balon jojeye konulmuştur. Üzerine 5 mL HCI balon jojeye eklenmiştir. Balon joje su banyosunda 67 ºC' da 5 dakika tutularak inversiyon gerçekleştirilmiştir. Sonrasında hızlıca soğutulduktan sonra 5 N NaOH ile nötrlenmiştir.

Soğuyan balon joje çizgisine saf su ile tamamlanmıştır. Bir erlene 5 mL Fehling A ve 5 mL Fehling B ve kaynama taşı konulup kaynatılmıştır. Kaynama başladıktan 1,5-2 dakika sonra 6-7 damla metilen mavisi damlatılıp, önceden nötürlenen süzüntü ile kaba titrasyona gerçekleştirilmiştir. Harcanan miktar kaydedilmiştir. Sonuç aşağıdaki formülden hesaplanmıştır (AOAC, 2000a).

Toplam Şeker % = (200*100*F*100)÷N*50*V*1000 (3.3.)

N: Alınan numune miktarı

F : Fehling çözeltilerinin faktörü

V: Titrasyon sarfiyatı (mL)

3.7.11. Protein analizi

Örnekten yaklaşık olarak 1,5 g azotsuz kağıda tartılıp ve tüplere aktarılmıştır. 2 adet kjeldahl tableti 25 mL derişik sülfirik asit tüplere ilave edilmiştir. Tanık numune ayrıca hazırlanmıştır. Yakma işlemi Buchi infrared yakma ünitesinde gerçekleştirilmiştir.

Buchi cihazının sıcaklığı 30 dak. 4.seviyede, 90-120 dak. 5'te bekletilmiş, yaklaşık son sıcaklık 490-550 °C'ye ulaşmıştır. Tüpler içerisindeki çözeltinin rengi çimen yeşili ya da duru bir renk aldığında analiz tamamlanmıştır.

İçerisinde yanmış halde örnekler bulunan tüpler, Buchi protein cihazına takılmıştır. Analiz sonunda harcanan 0.1N ayarlı asitten sarf edilen miktar kaydedilmiştir. Aşağıdaki formüle göre protein içeriği hesaplanmış azot çevirme faktörü 6.25 olarak alınmıştır (AOAC, 2000b).

Protein Miktarı (%) = [(V_1-V_0)* F_1*F_2* 0,014007*N* 100]÷M (3.4.)

Burada;

V_1 = Harcanan 0.1 M HCI hacmi (mL)

V_0 = Kör Harcanan 0.1 M HCI hacmi (mL)

F_1 = Azotun proteine çevirme faktörü

F_2 = HCl veya H2SO4'ün faktörü

N = HCl veya H2SO4'ün Normalitesi

M = Numune ağırlığı (g)'dır.

3.7.12. Renk (L, a, b) analizi

Ekstraktlarda ve kurutulmuş toz üründe renk analizleri (Anonim, 2013)'e göre yapılmıştır. Tüm ekstrakt ve tozlar başlangıca göre konsantrasyon %1 olacak şekilde ayarlanmıştır. Çünkü seyreltme yapıldığında ekstraktlar arasındaki farklar ortaya çıkmaktadır. Buna göre, Minolta CM 5 (Minolta, Japan) spektrofotometre cihazı kullanılmıştır. L* (lightness) aydınlık derecesini ölçmektedir. Ölçülen bu değerler 0-100 arasında değişmektedir. 0 siyahlığı 100 ise tam beyazlığı gösterirken, Minolta +a*kırmızılığı, Minolta –a* yeşilliği, Minolta +b* sarılığı ve Minolta –b* maviliği göstermektedir. Cihazın kalibrasyonu siyah blok ile karanlık kalibrasyonu ve hiçbir şey yokken aydınlık kalibrasyonu yapılmıştır. Analizler 10° açı ayarında ve D65 modunda gerçekleştirilmiştir. Ekstraktlar ve sprey kurutulmuş örnekler rengi koyu siyah olduğu ve konsantre halde siyah renkte olduğu için ekstraktlar arasındaki farkların gözlenebilmesi için son konsantrasyon saf su ile %1'e ayarlanarak cihazda okutulmuş ve sonuçlar elde edilmiştir.

3.7.13. HPLC’de fenolik maddelerin analizi

Kantitatif analizler optimizasyon işlemleri tamamlandıktan sonra optimum koşullarda ekstraktlar üretilmiş ve vakumlu etüv altında 70˚C’de kurutularak elde edilen kurutulmuş kestane kabuğu ekstraktları ve tozları %100 metanol içinde çözülerek cihaza verilmiş hem baseline hem de piklerin düzgün geldiği görülmüştür. Ön çalışmalarda kalibrasyon eğrisi yapılmadan sadece metanolle standartları hazırlanıp cihaza verilmiş ve kromatogram incelemesi yapıldığında fenolik asitlerin daha yüksek ve büyük alanlarda pik verdiği görülmüştür. Bu nedenle tüm kuru ekstrakt ve tozlar, metanol ile çözülmüş ve cihazı verilmiştir. Buna göre Yöntem, Otles ve Selek, (2012) tarafından hazırlanan yöntem ile Kayahan ve Saloglu (2021) tarafından yapılan HPLC yöntemindeki gradiyent oranları kullanılarak uygulanmıştır. Sonucunda fenolik bileşiklerin tayini için, kestane kabuğu ekstraktları (KKE) 70˚C'de vakumlu bir etüvde kurutulmuş ve daha sonra ekstrakte etmek için saf metanol kullanılmıştır. Analiz için PDA detektörü ve ACE C18 kolonu (300 x 3.9 mm) ile donatılmış ve Şekil 3.14.’te gösterilen HPLC cihazı (Shimadzu LC-20A) kullanılmıştır. Tüm standartlar, HPLC saflığında metanol (J.T. Baker VWR Chemicals saflık: %99.9 Cas No: 67-56-1) içinde çözülmüştür. Örnek içerisinde tespit edilen biyoaktif bileşenler için kalibrasyon eğrisi çizilmiştir. Gallik asit (Cas No:149-91-7, R^2-0,9998), Ellagik asit (Cas No:476-66-4, R^2-0,9997) ve Naringin (Cas No: 10236-47-2) Acros Organics'ten satın alınmıştır, Protokateşuik (Cas No:99-50-3, R^2-0,9997), Miricetin-3-O glucosit (Cas No:19833-12-6, R^2-0,9997), Siringetin- 3-O glukozit (Cas No:40039-49-4, R^2-0,9998) ve (-)- Epicateşin (Cas No:490-46-0, R^2-0,9998) Extrasynthese'den, Vescalagin (Cas No) :36001-47-5), Castalagin (Cas No:24312-00-3), Klorojenik asit (Cas No:327-97-9), Kafeik asit (Cas No:331-39-5), (+)- Kateşin hidrat (Cas No:225937-10-0,R^2-0,9999), Rutin hidrat (Cas No:207671-50-9), t- Ferulik asit (Cas No:537-98-4), p-Kumarik Asit (Cas No:501-98-4) ve Vanilik asit (Cas No:121-34-6) Sigma Aldrich'ten temin edilmiştir. Kalibrasyonu yapılan bileşenlerin kalibrasyon eğrileri EK1-7’de verilmiştir.

HPLC şartları

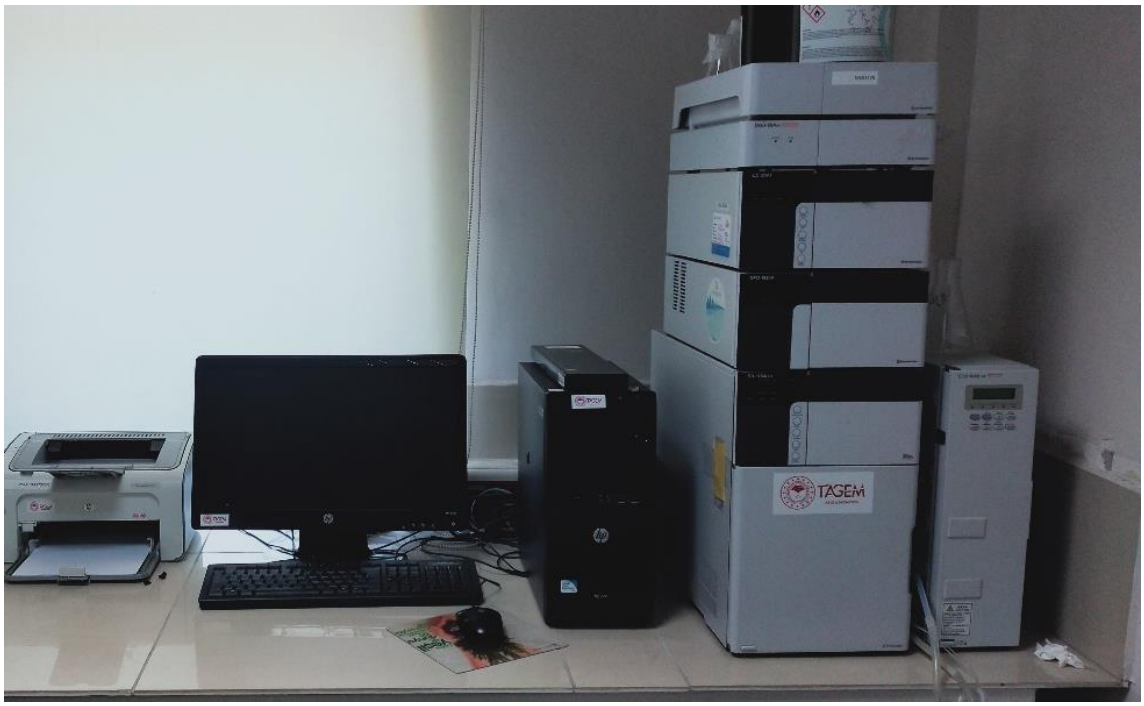
Mobil Faz A: %2 asetik asit

Mobil Faz B : Asetonitril

Akış Hızı: 0,5 mL/dk

Süre: 45 dakika

Akış: Gradient (B konsantrasyonu: 0-10. dakika :%6; 10-15. dakika: %15; 15-20. dakika: %17; 20-30. dakika: %20; 30-35. dakika:%23; 35-40.dakika :%25; 40-45. dakika: %6.).



Şekil 3.14. Yüksek basınçlı sıvı kromatografi

3.7.14. Mineral madde içeriği analizi

Kestane kabuk tozunda Mineral Maddeler Potasyum (K), Fosfor (P), Magnezyum (Mg), Demir (Fe), Sodyum (Na) ve Kalsiyum (Ca), Bakır (Cu), Çinko (Zn), Arsenik (As), Kadmiyum(Cd), Civa(Hg), Kurşun(Pb), Alüminyum(Al) ve Bor(B) analizleri NMKL 186'ya göre yapılmıştır. Bu amaçla mineral madde tayininde ise örnekler kapalı sistem yaş yakma (mikrodalga fırın) yöntemi ile yakılmıştır. Ölçümler ICP-MS (Agilent) ile yapılmıştır (NMKL, 2014). Mineral maddelere ait kalibrasyon eğrileri EK 8-20'de verilmiştir.

3.7.15. Nişasta analizi

Örnekler yaklaşık 2,5 g (mL) tartılmış ve ölçülü balona (100 mL) aktarılmıştır. 25 mL seyreltik asit çözeltisi (HCl) ilave edilmiştir. Tekrar 25 mL daha seyreltik HCl ilave edilmiştir. Balon joje, 15 dakika kaynamakta olan su banyosunda tutulmuştur. Soğutulduktan sonra 5 mL Carrez Çözeltisi I ve 5 mL Carrez Çözeltisi II ilave edilmiş ve çalkalanmıştır. Ölçü çizgisine kadar saf su ile tamamlanmıştır. Süzgeç kağıdından süzülmüştür. Çözeltinin optik çevirmesi ($\propto_1$1), polarimetrede 200 mm'lik tüpte ölçülmüştür.

$$W=\frac{2000}{\propto_{D20}} \times \left(\frac{2{,}5\propto_1}{m_1} - \frac{5\propto_2}{m_2} \right) \times \frac{100}{w_1} \qquad (3.5)$$

Burada;

W=Numunenin kuru maddesinde nişasta muhtevası (%)

$\propto_1$: Numunenin tamamına ait optik çevirmenin tayini (1. Aşama polarimetrede okunan değer)

$\propto_2$: Etanol çözeltisinde (%40'lık) çözünen maddelerin optik çevirmesinin tayini (2. Aşama polarimetrede okunan değer)

m_1 : Numunenin tamamına ait optik çevirmenin tayini aşamasındaki deney numunesinden alınan kısmın kütlesi, g.

m_2 : Etenol çözeltisinde (%40'lık) çözünen maddelerin optik çevirmesinin tayini aşamasındaki deney numunesinden alınan kısmın kütlesi, g.

W1 : Deney numunesinin kuru madde muhtevası , kütlece yüzde olarak,

$\propto_D^{20}$: Saf nişastanın 589,3 nm'de ölçülen spesifik optik çevirme değeri,

Formülde kestane ekstrakları ve tozu için diğer tip nişastalar için $\propto_D^{20}$ değeri=184,00 dikkate alınmıştır (TSE, 2000).

3.7.16. Antibakteriyel aktivite analizi

Antibakteriyel duyarlılık testlerinde iki gram negatif bakteri (*Escherichia coli* ATCC 25922 ve *Salmonella typhimurium* ATCC 14028) ile iki gram pozitif bakteri (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ve *Bacillus cereus* ATCC 10876) kullanılmıştır.

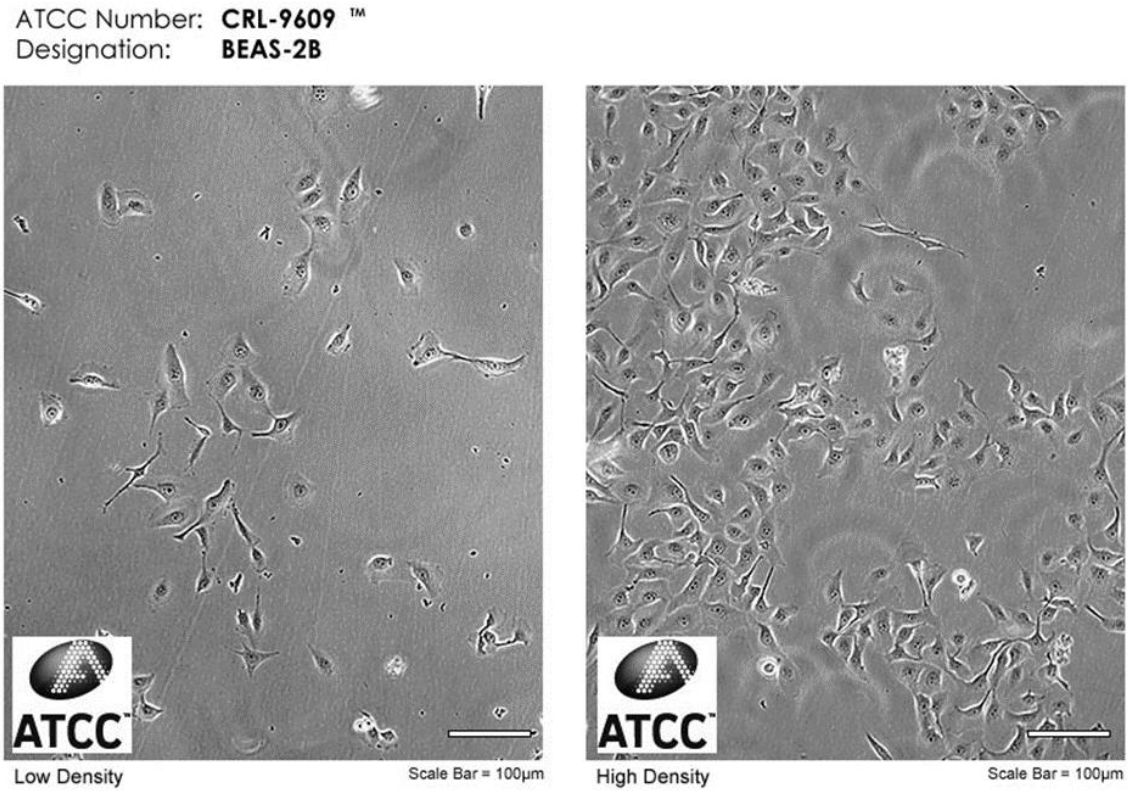
Hazırlanan ekstraktların antibakteriyel etkileri, disk difüzyon yöntemi ile CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) metoduna göre belirlenmiştir. Bu amaçla Mueller-Hinton Broth (MHB, Oxoid CM0405, United Kingdom) ve Mueller-Hinton Agar (MHA, Neogen NCM0036A, United Kingdom) besiyerleri kullanılmıştır.

Çalışma öncesinde test bakterileri sıvı besiyerinde 35 ± 2 °C' de 24 saat geliştirilip buradan katı besiyerine aktarılmış daha sonra bakteri süspansiyonları hazırlanmıştır. Bu amaçla bakteriler yine MHB ile 0,5 McFarland bulanıklığına (1-2x108 kob/mL) ayarlanmıştır. Bulanıklık ayarı yapılarak hazırlanan süspansiyonlar, steril bir eküvyonla MHA yüzeyine homojen bir şekilde yayılmış ve besiyeri kurumaya bırakılmıştır. Besiyeri kuruduktan sonra 6 mm çapında steril diskler, alkolle yakılarak steril edilen bir pens yardımıyla besiyerine yerleştirilmiş ve daha öncesinde 25 kat olacak şekilde saf su ile seyreltik hale hazırlanan kestane kabuğu ekstraktları 20 µL olacak şekilde disklerin üzerine eklenmiştir. Daha sonra bakteriler 35 ± 2 °C' de 16-18 saat inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda disk çevresinde oluşan temiz zon çapları, siyah ve yansıma yapmayan bir yüzeyde tutularak mm olarak ölçülmüştür (CLSI, 2012).

3.7.17. Toksisite testleri

SKK tozunun sitotoksik etkinliği XTT (2,3-bis[2-metoksi- 4-nitro- 5-sulfofenil]- 2H-tetrazolyum- 5-karboksianilit iç tuzu) yöntemi kullanılarak, genotoksik etkinliği ise Komet ve γ H2AX yöntemi kullanılarak araştırılmıştır.

Kestane kabuğu tozunun sitotoksik ve genotoksik etkinliği Şekil 3.15.'te görülen Beas-2B (ATCC® CRL-9609™) insan sağlıklı bronşiyal epitel hücre hatlarında *in vitro* olarak araştırılmıştır.



Şekil 3.15. Beas-2B (ATCC® CRL-9609™) insan sağlıklı bronşiyal epitel hücre hattı mikroskobik görünümü ("İnsan sağlıklı bronşial epitel hücre", 2022)

Hücre kültürü

Beas-2B hücreleri (ATCC® CRL-9609™) 37 °C ve %5 CO_2 içeren ortama sahip inkübatörlerde havalandırmalı T75 flasklar içerisinde kültüre edilmiştir. Kültür ortamı olarak kullanılan besiyeri içeriği; RPMI 1640 medyum (PAN Biotech, Aidenbach, Germany), %10 Fetal Calf serum (PAN Biotech, Aidenbach, Germany) 1mM SodyumPürivat (PAN Biotech, Aidenbach, Germany).1 mM L-Glutamin (Sigma Aldrich, Darmstadt, Germany), 100U/mL Penisilin- 100 µg/mL Streptomisin (Bioch-rom AG, Berlin, Germany) ile oluşturulmuştur.

XTT sitotoksisite testi

Kültüre edilen hücreler T75 flaskların %80'ini kapladıktan sonra tripsinize edilerek süspanse hale getirilmiştir. Trypan Blue (Sigma Aldrich, Darmstadt, Germany) solüsyonu ile canlılıkları belirlenen hücrelerden 96 kuyucuklu plaklara 8000 canlı hücre / kuyucuk

şeklinde ekim yapılmış ve 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda hücreler deney setlerini oluşturacak şekilde ekstraktının farklı konsantrasyonlarına (10, 20, 40, 80 160, 300, 600, 1250, 2000, 2500 ppm km) 24 saat süre ile maruz bırakılmıştır. Süre sonunda hücrelerin canlılıkları XTT Cell proliferation Kit (BI; Biological Industries, Kibbutz Beit Haemek, Israel) kullanılarak belirlenmiştir. Yöntem sarı renkli bir tetrazolium tuzu olan XTT'nin canlı hücrelerin mitokondrial suksinat dehidrogenaz enzim aktiviesi ile elektron eşleştirici reaktif varlığında portakal renkli formazan kristallerine dönüşmesi esasına dayanmaktadır(Roehm vd. 1991). XTT uygulaması muamele süreleri sonrasında üreticinin önerdiği şekilde gerçekleştirilmiştir. Ardından her bir kuyucuktaki 450 nm'de absorbans değerleri mikroplaka okuyucu (Biotek ELx800, Biotek Instruments Inc. VT. USA) kullanılarak belirlenmiştir. Absorbans değerlerinden aşağıdaki formül kullanılarak hücrelerin % canlılık değerleri belirlenmiştir.

Absorbans muamele grubu / Absorbans kontrol grubu X 100

XTT yöntemi bağımsız üç tekrar olarak uygulanmış ve sonuçlarının ortalamaları verilmiştir. Yöntemde pozitif kontrol olarak H_2O_2 kullanılmıştır.

Komet genotoksisite testi

Yöntemin temel prensibi, tek hücre DNA'sının agaroz jel içerisinde elektroforetik alanda göç etmesi esasına dayanmaktadır. Bu nedenle ilk önceleri, tek hücre jel elektroforezi (Single Cell Gel Electrophoresis SCGE) olarak isimlendiriliyordu. Daha sonra, sonuçta elde edilen görüntü kuyruklu yıldızı andırdığı için komet (comet; kuyruklu yıldız) ismini almıştır. Mikroskoptaki görüntü tıpkı bir kuyruklu yıldıza benzemektedir, nükleusu içeren geniş bir baş kısmı ve DNA fragmentlerini içeren bir kuyruk kısmı bulunmaktadır. Sonuç olarak yöntem fragmente olmuş DNA'nın non fragmente DNA'dan ayrılmasına izin vermektedir. Bu sayede yöntem ile birçok çeşit DNA hasar ürününü belirlenebilmektedir.

Dhawan vd., (2009) metodu çeşitli modifikasyonlar ile uygulanmıştır. Kültüre edilmiş hücreler T25 lik flasklarda farklı konsantrasyonlarda (375, 750, 1500, 3000 ve 4000 ppm km) ekstrakt ile 24 saat boyunca muamele edilmiştir. Süre sonunda hücreler PBS ile yıkanmış ve sonrasında PBS içerisinde süspanse edilmiştir. Ardından bu hücreler düşük

erime sıcaklıklı agaroz (LMA) ile süspanse edilmiştir. Bu süspansiyondan hücreler alınarak önceden agaroz ile kaplanmış lamlara yayılmıştır. LMA nın donması beklendikten sonra Lamlar, lizis buffer solüsyonu (100 mM EDTA, 2.5 M NaCl, %1 Triton X-100 ve %10 DMSO) ile muamele edilmiş ve +4°C'de 1 gece bekletilmiştir. Süre sonunda lamlar elektroforez tankına dizilmiş ve Running Buffer solüsyonu (0.3 M NaOH, 1mM EDTA, pH:13) lamların üzerini kaplayacak şekilde tanka doldurulmuş ve 20 dk bekletilmiştir. Güç kaynağı, 25 V 300 mA olarak ayarlanarak 25 dakika yürüme yaptırılmış ve karanlıkta, +4 °C nötralizasyon tamponunda (400 nm Tris, pH 7.5) 5dk bekletilmiştir. Süre sonunda lamlar yıkanmış ve havada kurumaya bırakılmıştır. Lamlar soğuk etanolde 5dk fiske edilerek tekrar kurumaya bırakılmıştır. Daha sonra lamlar Etidyum Bromür ile 1 dk süreyle boyanmış ve floresan mikroskopta 40X büyütmede komet fotoğrafları çekilmiştir. Deneyler üç tekrarlı olarak yapılmış olup, her tekrarda deney grupları için iki preparat hazırlanmış ve her preparattan 50 komet görüntüsü incelenmiştir. Kometlerin değerlendirilmesi Kameram21 yazılımı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Değerlendirmede 2001 yılında Almanya'da gerçekleştirilen uluslararası komet çalıştayında kabul gören ve komet çalışmalarında değerlendirilmesi önerilen üç parametre olan; Olive Tail Moment (OTM), Tail DNA (Kuyruk % DNA) ve Tail length (Kuyruk uzunluğu (μm)) parametreleri değerlendirilmiştir (Browne, 2016). Ortalama değerler sonuç olarak bildirilmiştir. Pozitif kontrol olarak H_2O_2 kullanılmıştır.

γ H2AX genotoksisite testi

H2AX, histon H2A ailesinin bir üyesidir. H2AX'in (γH2AX) spesifik fosforilasyonu, özellikle çift sarmal kopmaları dahil olmak üzere DNA hasarının önemli bir göstergesidir (Tanaka vd., 2007). Yöntem, DNA çift iplik kırılmalarını saptamak için kullanılmaktadır. Yöntem Muse® H2A.X Activation Dual Detection Kit and Guava® Muse® Cell Analyser (Luminex Texas, ABD) cihazı kullanılarak, üretici firmanın talimatlarına uygun şekilde gerçekleştirilmiştir. Kısaca hücreler, 5X 104 hücre/flask yoğunluğunda T25 flasklara ekildi ve 48 saat büyümeye bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra hücreler, 24 saat boyunca ekstraktın farklı konsantrasyonlarına maruz bırakılmıştır (375, 750, 1500, 3000 ve 4000 ppm km). Tripsinizasyondan sonra, hücreler fiksasyon tamponunda sabitlenmiş ve daha sonra geçirgenleştirme tamponunda geçirgenleştirilmiştir. Hücre süspansiyonları (200.000 hücre) antikor kokteylleri ile karıştırılmış ve 30 dakika oda sıcaklığında

(karanlık) inkübe edilmiştir. Hücreler yöntem tamponunda yeniden süspanse edilmiştir ve Muse® Cell Analyser cihazında analiz edilmiştir. Tüm analizler üç kopya halinde gerçekleştirilmiş ve sonuçlar γH2AX kit parametrelerinin ortalama değerleri ± standart sapma (SD) olarak gösterilmiştir.

3.7.18. Lignin analizi

SKK tozu örneklerinde lignin analizi (AOAC, 1977) metoduna göre yapılmıştır. Buna göre, SKK tozu örneğinden yaklaşık 1g kurutulmuş cam krozelere tartılmıştır (W_1). Üzerine filtrasyonu kolaylaştırmak amacıyla 1g selit tartılmıştır. Analiz, Fibertec 2010 Hot Extractor cihazı ve Fibertec 1021 Cold Extractor cihazlarında gerçekleştirilmiştir. Analiz soğuk ekstraksiyon ve sıcak ekstraksiyon gerçekleştirildikten sonra krozeler 105°C'de 4 saat, 130 °C'de 2 saat etüvde kurutulmuştur. Bu süre sonunda krozeler desikatöre alınmış, oda sıcaklığına geldikten sonra ve tartımı yapılmıştır (W_2). Daha sonra tartımı yapılan krozeler kül fırınına yerleştirilmiş ve 500°C'de 2 saat yakmaya bırakılmıştır. Bu süre sonunda krozeler desikatöre alınmış, oda sıcaklığına gelene kadar beklenip ve tartımı yapılmıştır (W_3). Aşağıdaki formülden asitte çözünmeyen lignin miktarı % olarak hesaplanmıştır.

W_1: Numune miktarı, g

W_2: Kroze + kalıntı, g

W_3: Kroze + kül kalıntısı, g

$$\text{Lignin miktarı (\%)} = [(W_2 - W_3) \div W_1] * 100 \quad (3.6)$$

3.7.19. Şelatlama aktivitesi testi analizi

SKK tozunda metal tutma kapasitesi Dinis vd., (1994) tarafından yapılan metotta küçük modifikasyonlar uygulanarak gerçekleştirilmiştir. Buna göre sprey kurutulmuş toz örneklerin 200-2000 mg/L konsantrasyonda sulu çözeltileri hazırlanmıştır. Bu çözeltilerden santrifüj tüpüne 1 mL alınmış üzerine 50 µL 2 mmol/L $FeCl_2$ eklenmiş 5 dakika reaksiyon için bekletilmiş ve sonrasında 200 µL 5 mmol/L ferrozin eklenmiş oda sıcaklığında 10 dakika bekletildikten sonra 562 nm dalga boyunda spektrofotometrede okutulmuştur. Tanık için su kullanılmış elde edilen absorbans formülde yerine

konulmuştur. SKK tozunun şelatlama aktivitesi % olarak aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır.

% Şelatlama Aktivitesi= $[(A_0-A_1)\div A_0]*100$ (3.7)

A_0: Tanık numunenin absorbansı (nm)

A_1: Örnek absorbansı (nm)

3.7.20. Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FT-IR) analizi

Absorpsiyon spektrumları, Şekil 3.16.'da belirtilen azaltılmış toplam yansıtma (ATR) hücresi bulunan Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FT-IR) (Spectrum Two, Perkin Elmer, ABD) ile belirlenmiştir. Örneklerdeki ana fonksiyonel bağların karakterizasyonu 10 tarama ortalaması alınarak 400-4000 cm^{-1} aralığında elde edilmiştir.



Şekil 3.16. Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi

3.7.21. Taramalı elektron mikroskobu (SEM) görüntülerinin alınması

Sprey kurulmuş kestane kabuğu tozlarının SEM mikroskobu altında parçacık boyutları 1000-2000-3000-4000 ve 5000 µm yakınlıkta Şekil 3.17'de görülen Carl Zeis marka Gemini SEM 300 model cihazla elde edilmiştir. Örnekler altınla yüzey kaplaması yapılarak 5kV'da taranmış tozların morfolojisi hakkında bilgi edinilmiş, mikroenkapsülasyona uygun olup olmadığı gözlenmiş ve tozların görüntüleri alınmıştır.



Şekil 3.17. Taramalı elektron mikroskobu

3.7.22. Diferansiyel taramalı kalorimetre (DSC) ile analizi

SKK toz örneklerine ait camsı geçiş sıcaklıklarının tespiti DSC 4000 (Perkin Elmer, USA) cihazı ile 20°C'den 260°C'ye kadar 10°C/dk ısıtma hızında nitrojen atmosferi altında gerçekleştirilmiştir.

3.8. İstatistiksel Analiz

Ekstraksiyonların optimizasyon işlemleri Design Expert (deneme version 7) (Stat-Ease Inc. Minneapolis, MN, USA) ile merkezi kompozit deneme tasarımına göre yapılmış, metotların uyumluluğu "lack of fit" değerleri ile kontrol edilmiş, ekstraksiyonlara uygulanan bağımsız değişkenler arasındaki etkileşimler ANOVA testi yapılarak %95 güven aralığı içinde istatistiksel olarak önemliliği (p<0.05) gözlenmiştir. Diğer taraftan ekstraksiyonlar arasında bağımlı değişkenler ve karakterize edilen sonuçlar arasındaki farklar istatistiki olarak önemliliği JMP (version 7) programı kullanılarak normal dağılım, varyans analizi ve gruplandırma işlemleri yapılmış ekstrakisyonlar arasındaki farklar olasılık düzeyleri p<0.05 olarak istatistiki değerlendirmeleri Fisher's LSD testi kullanılmıştır.

4. BULGULAR ve TARTIŞMA

4.1. Kestane Kabuğu Tozunun Fizikokimyasal Özellikleri

Kestane şekeri üretiminde atık olarak ortaya çıktıktan sonra 10 kg kestane kabuğu laboratuvara getirilmiş Materyal ve Yöntem bölümünde belirtildiği şekilde ön işlemler uygulanarak 0,45 µm elek altına geçen tozlar kullanılmıştır. Bu elek altına geçen tozlarda herhangi bir ekstraksiyon işlemi uygulanmadan ürünün kendisinde Çizelge 4.1.; Çizelge 4.2 ve Çizelge 4.3'te görüldüğü şekilde fizikokimyasal özellikler belirlenmiştir. Burada kestane kabuğunun fizikokimyasal olarak selüloz ve nişasta yönünden diğer taraftan Mg, K ve Ca yönünden de oldukça zengin içeriğe sahip olduğu görülmüştür. Yine kestane kabuğunun toplam fenolik madde içeriği ve toplam antioksidan kapasitesi açısından birçok gıdaya göre oldukça zengin olduğu gözlenmiştir. Literatürde farklı ekstraktör ve çözgenlerle yapılan araştırmalara göre, ön deneme uygulamalarında kestane kabuğunun biyoaktif özelliği ile ilgili sonuçların düşük kaldığı gözlenmiştir. Örneğin Cacciola vd., (2019) tarafından yapılan bir çalışmada kestane kabuğunun antikanserojen özellikleri araştırılmış ve bu amaçla su ile yapılan 3 farklı ekstraksiyonda toplam fenolik madde içeriği (km) katı/sıvı ekstraksiyonda 312,44 mg GAE/g ; ultrasonik destekli ekstraksiyonda 190,12 mg GAE/g, mikrodalga ekstraksiyonda 247,63 mg GAE/g bulunmuştur. Bizim yaptığımız herhangi bir optimizasyon ve ekstraksiyon verimini arttırıcı bir işlem uygulanmadan yapılan ön denemelerdeki çalışmalarda toplam fenolik madde içeriği sonucu 65,41 mg GAE/g (km) elde edilmiştir. Bunun nedeni olarak optimizasyon çalışmalarının henüz gerçekleştirmemiş olduğumuz düşünülmüştür. Buradan anlaşılacağı üzere ön denemeler sonrasında ekstraksiyonlar için optimizasyon çalışmaları yapılması gerektiği görülmüştür.

Çizelge 4.1. Kestane kabuk tozu fizikokimyasal özellikleri (% km)

Kuru Madde	Kül (%)	HCL'de Çözünmeyen Kül (%)	Selüloz (%)	Nişasta (%)	Fruktoz (%)	Glukoz (%)	Protein (%)	Topalm Asitlik (Sitrik Asit c.) (%)
92,8 ±0,25	1,94 ±0,40	0,56 ±0,43	15,3 ±0,01	11,9 ±0,62	0,60 ±0,11	0,60 ±0,13	2,61 ±0,11	0,50 ±0,10

Çizelge 4.2. Kestane kabuk tozu biyoaktif özellikleri

Toplam Fenolik Madde mg GAE/g km	Toplam Antioksidan Kapasite mg TE/g km	
	DPPH Yöntemi	CUPRAC Yöntemi
65,41±2,69	119,37±1,80	113,74±1,34

Çizelge 4.3. Kestane kabuk tozu mineral madde içeriği (mg/kg km)

Sodyum	Magnezyum	Fosfor	Potasyum	Kalsiyum	Demir
60,3±1,90	851,3±29,29	213,1±9,20	3091,7±96,48	2356,6±26,83	141,1±4,65

4.2. Optimizasyon Sonuçları

4.2.1. Klasik ekstraksiyon sonuçları

Klasik ekstraksiyonda optimum koşullarda elde edilen bağımlı değişken sonuçları

Bağımsız değişkenlerin bağımlı değişkenlerin sonuçları üzerinden birbiri ile etkileşimleri yanıt-yüzey yöntemi merkezi kompozit deneme tasarımıyla belirlenmiştir. Buna göre merkezi kompozit tasarıma göre (Design Expert Programı Tarafından Önerilen), doğrusal, iki faktörlü etkileşimli (2FI), kuadratik ve kübik modellerin uyumluluğu Çizelge 4.4.'te açıklanmıştır. Modeller kestane kabuğu tozuna uygulanan mikrodalga destekli ekstraksiyon deneylerinin renk değeri, toplam fenolik madde, toplam antioksidan kapasite (DPPH ve CUPRAC) analizlerinin sonuçlarına göre quadratik modellerini belirlemek için uyarlanmıştır. Çizelge 4.4.'e göre yanıtların maksimum olarak seçildiğinde 0,852 tatmin etme seviyesinde (desirability) 1 numaralı deneme ünitesine yakın tahminlenmiş sonuçlar elde edilmiştir. Klasik ekstraksiyon için optimum seviyeler 75°C sıcaklık, 60 dakika ve 0,138 mol/L NaOH konsantrasyonu olarak tespit edilmiştir. En yüksek neticeler genelde 10. deneme ünitesinde elde edilmiştir.

Çizelge 4.4. Klasik ekstraksiyon optimizasyon deneysel sonuçları

Run	*x1* Sıcaklık	*x2* Süre	*x3* Çözücü Konsantrasyonu (NaOH)	Yanıt 1 Renk Değeri	Yanıt 2 Toplam Fenolik Madde İçeriği	Yanıt 3-4 Toplam Antioksidan Kapasite	
	(°C)	(dk)	(mol/L)	(km)	(mg GAE/g) km	CUPRAC (mg TE/g) km	DPPH (mg TE/g) km
1	75	60	0,15	21,72±0,80	184,28±0,98	679,09±7,19	270,20±8,88
2	30	45	0,1	4,46±0,23	122,77±3,71	472,45±13,36	200,94±9,47
3	60	45	0,1	12,46±0,31	163,12±7,56	570,76±1,67	276,41±10,34
4	45	60	0,15	8,89±0,22	152,21±2,54	493,74±17,54	256,65±8,88
5	75	30	0,15	20,90±1,44	191,75±5,52	603,95±1,67	279,07±16,64
6	45	30	0,05	3,13±0,31	63,23±1,45	362,87±12,47	132,12±7,10
7	60	45	0,1	12,63±0,33	168,10±6,20	556,98±6,25	298,61±11,41
8	45	30	0,15	7,15±1,08	148,03±5,86	553,22±11,69	267,98±21,57
9	60	45	0,2	21,25±0,70	111,56±2,56	494,99±1,67	177,85±7,10
10	90	45	0,1	18,66±0,35	205,59±4,17	684,10±12,37	287,95±4,43
11	60	45	0,1	11,45±0,19	168,46±1,73	551,35±6,10	270,20±4,14
12	60	75	0,1	16,06±2,47	193,29±2,45	628,37±15,13	323,92±2,96
13	60	45	0,1	13,49±0,36	154,62±3,33	495,93±5,85	252,88±4,74
14	60	45	0,1	12,86±1,01	162,09±2,73	529,43±5,15	265,31±5,61
15	60	15	0,1	11,02±0,25	151,40±1,87	539,45±8,33	269,31±4,74
16	75	60	0,05	7,56±0,84	152,86±2,03	547,59±4,55	272,42±5,33
17	45	60	0,05	3,39±0,32	106,00±1,95	392,92±9,19	196,05±8,95
18	60	45	0	0,95±0,08	11,82±0,96	137,45±8,35	16,25±1,23
19	60	45	0,1	13,27±0,37	165,17±2,36	555,10±8,91	287,51±2,37
20	75	30	0,05	6,93±1,18	103,21±1,65	398,56±5,85	212,92±3,29

Çizelge 4.4.' teki deneme ünitesine göre 5 seviye olarak kodlanan her bir bağımsız değişken 3 tekerrürlü uygulamalar şeklinde gerçekleştirilmiştir. Buna göre 3 tekerrürlü olarak (20*3) 60 adet deneme ünitesine sıcaklık (°C) 30, 45, 60, 75 ve 90 olarak; süre 15, 30, 45, 60 ve 75 dakika; çözücü (NaOH) konsantrasyonu (mol/L) 0; 0,05; 0,1; 0,15 ve 0,2 olacak şekilde muameleler gerçekleştirilmiştir. Paralel olarak renk değeri (%1), toplam fenolik madde içeriği, toplam antioksidan aktivitesi (CUPRAC ve DPPH) analizleri gerçekleştirildikten sonra bu deneysel sonuçlar programda yerlerine konulmuştur.

Klasik ekstraksiyon regresyon modelleri

Klasik ekstraksiyonda deneme üniteleri hazırlanıp her bir bağımlı değişken olan renk değeri (%1) , toplam fenolik madde içeriği, toplam antioksidan kapasitesi (CUPRAC, DPPH) için Design Expert programı tarafından Çizelge 4.5.'teki veriler elde edilmiştir. Buna göre; renk değeri (%1) için 2 faktörün etkileşim halinde olduğu 2FI modeli önerilmiştir. Burada tahmin edilmiş R^2 =0,8126; Ayarlanmış R^2=0,9253 arasında fark 0,2'den küçük olduğu için uyumlu olduğu, lack of fit (modelin uyumluluk eksikliği) değerinin *p*=0,0628 olduğu için önemsiz olduğu bu nedenle metodun uyum içinde olduğu, sıralı *p* değeri 0,05'ten küçük olduğu için modelin renk değeri yanıtı için uygun olduğu görülmüştür.

TFM içeriği için 2'den çok faktörün doğrusal olmayacak şekilde etkileşim halinde olduğu 2. dereceden kuadratik model önerilmiştir. Burada tahmin edilmiş R^2 =0,9637; ayarlanmış R^2=0,9870 arasında fark 0,2'den küçük olduğu için uyumlu olduğu, lack of fit (modelin uyumluluk eksikliği) değerinin *p*>0,05 olduğu için önemsiz olduğu bu nedenle metodun uyum içinde olduğu, sıralı *p* değeri 0,05'ten küçük olduğu için modelin toplam fenolik madde içeriği yanıtı için uygun olduğu görülmüştür.

TAK (DPPH) için 2'den çok faktörün doğrusal olmayacak şekilde etkileşim halinde olduğu 2.dereceden Kuadratik model önerilmiştir. Burada tahmin edilmiş R^2 =0,9018; ayarlanmış R^2=0,9560 arasındaki fark 0,2'den küçük olduğu için uyumlu olduğu, lack of fit (modelin uyumluluk eksikliği) değerinin *p*=0,6357 olduğu için önemsiz olduğu bu nedenle metodun uyum içinde olduğu, sıralı *p* değeri 0,05'ten küçük olduğu için modelin toplam antioksidan kapasite (CUPRAC) yanıtı için uygun olduğu görülmüştür.

Toplam antioksidan kapasite (CUPRAC) için 2'den çok faktörün doğrusal olmayacak şekilde etkileşim halinde olduğu 2.dereceden Kuadratik model önerilmiştir. Burada Tahmin edilmiş R^2 =0,9664; Ayarlanmış R^2=0,9869 arasında fark 0,2'den küçük olduğu için uyumlu olduğu, lack of fit (modelin uyumluluk eksikliği) değerinin *p*=0,4494 olduğu için önemsiz olduğu bu nedenle metodun uyum içinde olduğu, sıralı *p* değeri 0,05'ten

küçük olduğu için modelin toplam antioksidan kapasite (DPPH) yanıtı için uygun olduğu görülmüştür.

Çizelge 4.5. Klasik ekstraksiyonda bağımlı değişkenler için uygun regresyon modelleri

Kaynak	Sıralı p-değeri	Lack of fit *p*-değeri	Ayarlanmış R^2	Tahmin edilmiş R^2	
Renk Değeri					
Doğrusal	< 0,0001	0,0220	0,8739	0,8199	
Etkileşimli (2FI)	**0,0199**	**0,0628**	**0,9253**	**0,8126**	***Önerildi***
İkinci dereceden	0,3772	0,0540	0,9278	0,7401	
Kübik	0,8408	0,0074	0,9020	-40.325	
TFM					
Doğrusal	0,0079	< 0,0001	0,4224	0,0733	
Etkileşimli (2FI)	0,8497	< 0,0001	0,3300	0,0758	
İkinci dereceden	**< 0,0001**	**0,3377**	**0,9870**	**0,9637**	***Önerildi***
Kübik	0,2805	0,3768	0,9896	0,8898	
DPPH					
Doğrusal	0,0751	0,0016	0,2190	-0,2440	
Etkileşimli (2FI)	0,7997	0,0010	0,1080	-0,1833	
İkinci dereceden	**< 0,0001**	**0,6357**	**0,9560**	**0,9018**	***Önerildi***
Kübik	0,7431	0,2782	0,9448	0,1643	
CUPRAC					
Doğrusal	0,0015	0,0002	0,5344	0,2330	
Etkileşimli (2FI)	0,8697	0,0001	0,4566	0,2518	
İkinci dereceden	**< 0,0001**	**0,4494**	**0,9869**	**0,9664**	***Önerildi***
Kübik	0,3377	0,5137	0,9887	0,9297	

Klasik ekstraksiyon bağımlı değişkenler için ANOVA testi

Çizelge 4.6. Her bir bağımsız değişken için ANOVA sonuçları

Kaynak	df	Renk Değeri			Toplam Fenolik Madde İçeriği		
		Karelerin Toplamı	f-değeri	p-değeri	Karelerin Toplamı	f-değeri	p-değeri
Model	9	705,75	40,24	< 0,0001	42384,3	161,33	< 0,0001
x1	1	272,25	93,14	< 0,0001	6765,06	231,76	< 0,0001
x2	1	45992	43556	0,0614	1870,56	64,08	< 0,0001
x3	1	380,25	130,09	< 0,0001	13282,56	455,03	< 0,0001
x1x2	1	0	0	10000	41334	0,1071	0,7503
x1x3	1	40,5	13,86	**0,0026**	45275	0,5182	0,4881
x2x3	1	0,5	0,1711	0,6859	1176,12	40,29	**< 0,0001**
x1²	1				0,0519	0,0018	0,9672
x2²	1				92,73	43160	0,105
x3²	1				17265,05	591,46	< 0,0001
Residual	10	38			291,9		
Lack of Fit	5	33,17	47209	**0,0628**	174,4	17533	**0,3377**
Kaynak	df	**CUPRAC**			**DPPH**		
		Karelerin Toplamı	f-değeri	p-değeri	Karelerin Toplamı	f-değeri	p-değeri
Model	9	284600000	160,07	< 0,0001	98455,9	46,91	< 0,0001
x1	1	38809	196,43	< 0,0001	7876,56	33,78	0,0002
x2	1	11881	60,13	< 0,0001	2835,56	42705	0,0059
x3	1	123600000	625,34	< 0,0001	23793,06	102,03	< 0,0001
x1x2	1	**4512,5**	**22,84**	**0,0007**	41275	0,0048	0,946
x1x3	1	40,5	0,205	0,6604	**2211,13**	**17777**	**0,0117**
x2x3	1	**1250**	**12206**	**0,0306**	**2556,13**	**35339**	**0,0079**
x1²	1	1188,39	44932	0,0341	1161,05	35886	0,0497
x2²	1	1711,29	24320	0,0147	967,91	42095	0,069
x3²	1	86413,25	437,37	< 0,0001	52442,73	224,89	< 0,0001
Residual	10	1975,75			2331,9		
Lack of Fit	5	1046,92	41275	**0,4494**	977,07	0,7212	**0,6357**

Çizelge 4.6.'da her bir bağımlı değişken için ANOVA testi gösterilmiştir. Renk değeri için sıcaklık(*x1*) ve NaOH(*x3*) konsantrasyonu uygulamaları arasında p=0,0026(<0.05) olduğu için bir etkileşim olduğu, toplam fenolik madde içeriği için süre(*x*2) ile NaOH konsantrasyonu (*x*3) arasında p<0.05 olduğu için etkileşim olduğu görülmüştür. Toplam antioksidan kapasite CUPRAC için sıcaklık(*x1*) ve süre(*x2*) arasında p<0.05 ve süre(B) ile NaOH konsantrasyonu (C) arasında p<0,05 olduğu için etkileşim olduğu görülmüştür. Yine DPPH yanıtları için sıcaklık(*x1*) ve NaOH konsantrasyonu *(x3*) arasında p<0,05 ve

süre(*x2*) ile NaOH konsantrasyonu (*x3*) arasında $p<0,05$ olduğu için etkileşim olduğu ve uygulamaların etkileşimlerinin istatistikçe önemli olduğu görülmüştür.

Klasik ekstraksiyonda polinomiyal denklemlerinin oluşturulması

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^{3} \beta_i X_i + \sum_{i=1}^{3} \beta_{ii} X_{ii}^2 + \sum_{\substack{i=1 \\ i<j}}^{3} \sum_{j=1}^{3} \beta_{ij} X_i X_j \quad (4.1)$$

Y'nin öngörülen yanıt olduğu durumlarda, X_i and X_j bağımsız değişkenler, β_0 sabit katsayısı, βi doğrusal terimlerin regresyon katsayısı, βii: kuadratik terimlerin regresyon katsayısı, i i ve j değişkenlerinin etkileşim katsayısıdır. Design Expert yazılımı, bu ikinci dereceden modeli yanıt yüzeyini oluşturmak için kullanır.

Modelin doğruluğu yazılım tarafından elde edilen varyans analizinden (ANOVA) elde edilen uyum eksikliği, Fisher test değeri (F değeri) ve belirleme katsayısı (R^2) incelenerek belirlenmiştir. Üç boyutlu tepki yüzey grafiği, bir tepki değişkenini optimal düzeyde tutarak ve bunu iki faktöre (bağımsız değişkenler) göre çizerek kontur grafikleri belirlenmiştir. Polinomiyal denklemler her bir bağımsız değişkenin yanıtlar üzerinde negatif veya pozitif yönde etkileşimini göstermektedir.

Renk Değeri= $+11,25+4,13x_1+0,8755x_2+4,88x_3+0,0000x_1x_2+2,25x_1x_3+0,25x_2x_3$ (4.2)

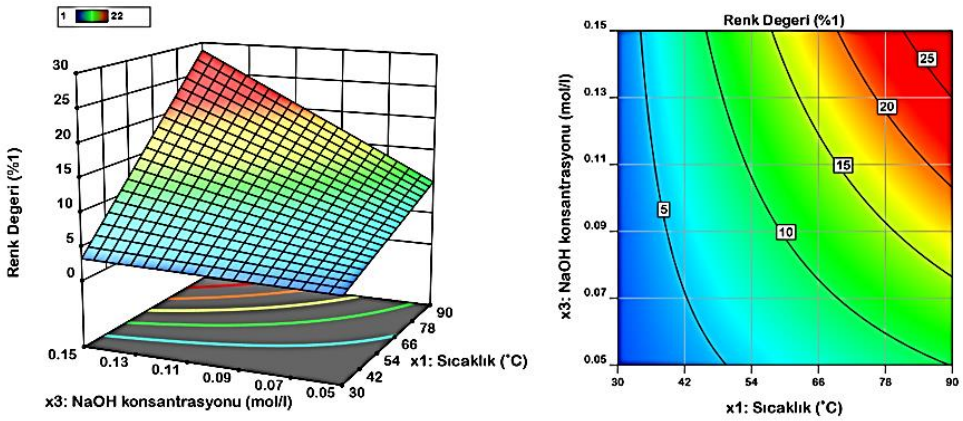
TFM İçeriği= $+163,09+20,56x_1+10,81x_2+28,81x_3-0,6250x_1x_2-1,37x_1x_3-12,12 x_2x_3+0.0455x_1^2+1.92x_2^2-26.205x_3^2$ (4.3)

DPPH= $+ 276,91 + 22,19x_1 + 13,31x_2+38,56x_3-0,3750x_1x_2-16,63\ x_1x_3-17,88\ x_2x_3-6.80x_1^2+6.20x_2^2-45.67x_3^2$ (4.4)

CUPRAC= $+553,00 + 49,25x_1 + 27,25x_2 + 87,88x_3 + 23,75x_1x_2-2,25x_1x_3-12,5x_2x_3-6.87x_1^2+8.25x_2^2-58.63x_3^2$ (4.5)

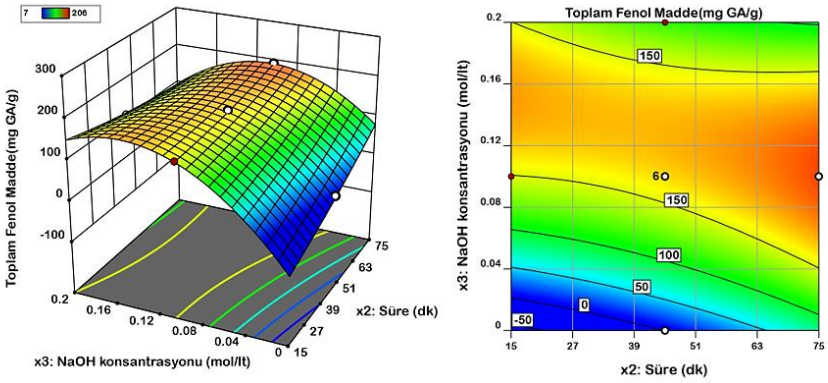
Klasik ekstraksiyonda uygulamalar arası etkileşimlerin üç boyutlu etkileşim yanıt yüzey ve kontuar grafikleri

Renk değeri üzerine sıcaklık ve NaOH konsantrasyonu etkileşimde bulunmuş olup önemli bulunmuştur (p=0,003). Şekil 4.1.'de Kontuar grafiğinden izohips eğrileri incelendiğinde NaOH konsantrasyonu 0'dan 0,2 mol/L 'ye doğru arttıkça sıcaklık ise 60 °C'den sonra en yüksek değerlere ulaşmaya başlamış 90 °C'de en yüksek değeri almıştır.



Şekil 4.1. Klasik ekstraksiyonda renk üzerine sıcaklık- NaOH etkileşimi

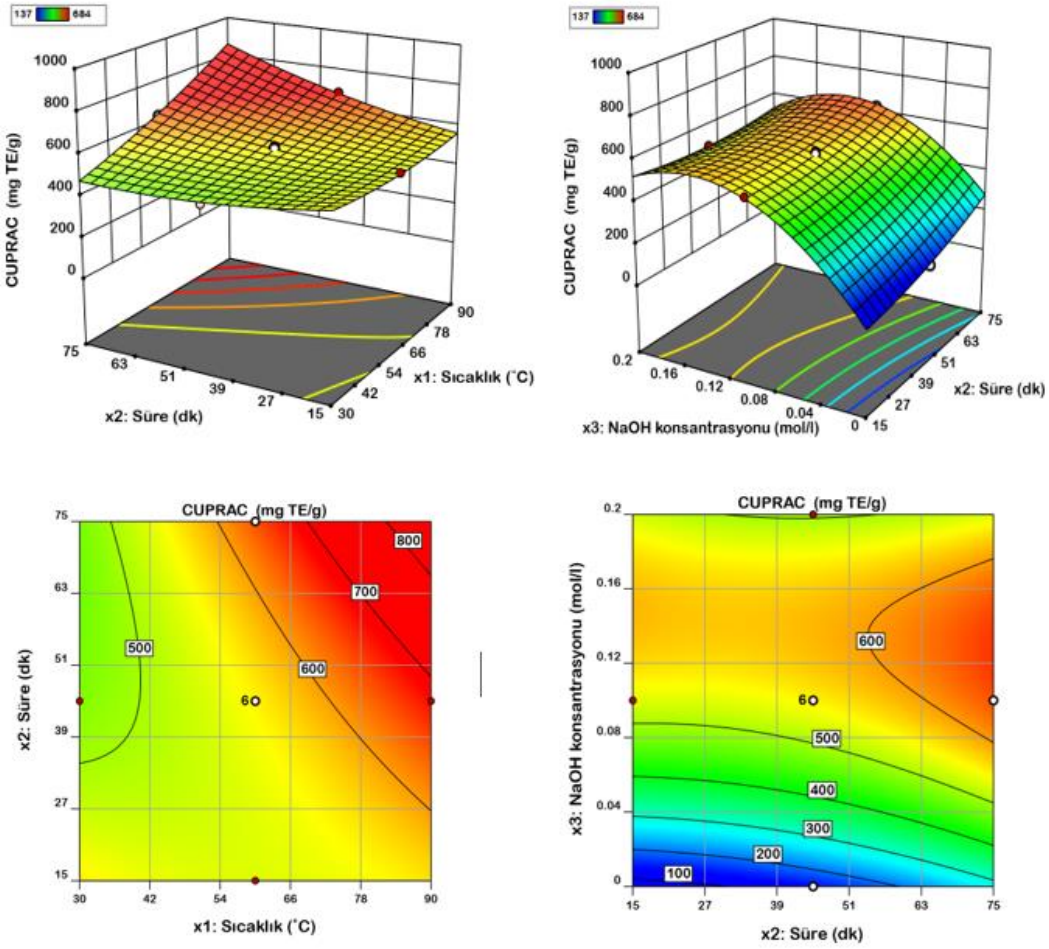
Toplam fenolik madde içeriği incelendiğinde süre ve NaOH konsantrasyonu arasında etkileşim olduğu görülmüştür (p=0,001). Şekil 4.2.'de İzohips eğrilerinin kesişim noktaları incelendiğinde toplam fenolik madde içeriğinin 75. dakikaya doğru ve NaOH konsantrasyonu 0,11-0,13 mol/L'ye doğru artış gösterdiği görülmüştür.



Şekil 4.2. Klasik ekstraksiyonda TFM içeriği üzerine süre-NaOH etkileşimi

Toplam antioksidan kapasite içeriği (CUPRAC) için sıcaklık-süre önemli bulunduğu (p=0,001) ve süre- NaOH konsantrasyonu da istatistiksel olarak önemli olduğu (p=0,03) ve bahsedilen uygulamalar arasında etkileşim olduğu görülmüştür. Buna göre Şekil 4.3'te sürenin yaklaşık 75. Dakika ile sıcaklığın ise 90°C seviyesinde toplam antioksidan kapasite (CUPRAC) içeriğinde en yüksek sonuçların alındığı kontuar grafiğinde ve yanıt yüzey diyagramından anlaşılmaktadır. Diğer taraftan süre ve NaOH konsantrasyonu

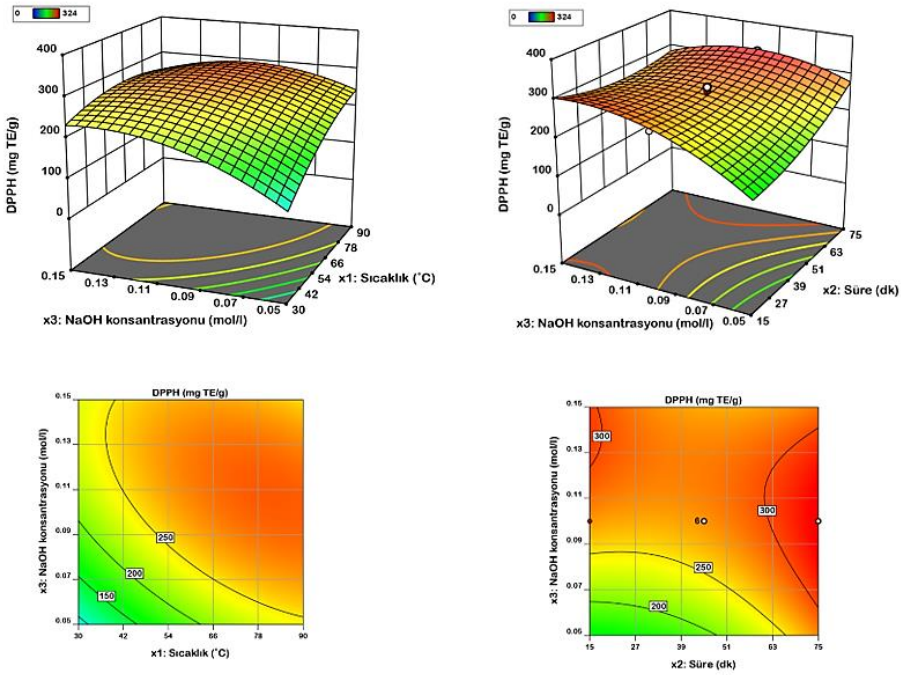
izohips eğrilerinin kesişim noktaları incelendiğinde toplam antioksidan kapasite (CUPRAC) içeriğinde 50. Dakikadan itibaren etkileşimin başladığı 75. dakikaya doğru ve NaOH konsantrasyonu 0,11-0,13 mol/L'ye doğru en fazla değerlerin alındığı ve optimum seviyelerin elde edildiği görülmüştür.



Şekil 4.3. Klasik ekstraksiyonda TAK içeriği (CUPRAC) üzerine etkileşimler

Toplam antioksidan kapasite içeriği (DPPH) için sıcaklık-NaOH konsantrasyonu *p*= 0,01 ve süre-NaOH konsantrasyonu *p*=0,01 olduğu ve uygulamalar arasında etkileşimin istatistiksel olarak önemli olduğu görülmüştür. Buna göre Şekil 4.4.'te sürenin yaklaşık 75. dakika ile NaOH konsantrasyonu 0,09-0,11 mol/L aralığında toplam antioksidan kapasite (DPPH) içeriğinde en yüksek sonuçların alındığı kontuar grafiğinde ve yanıt yüzey diyagramından anlaşılmaktadır. Diğer taraftan sıcaklık ve NaOH konsantrasyonu izohips eğrilerinin kesişim noktaları incelendiğinde toplam antioksidan kapasite (DPPH)

içeriğinde yaklaşık 75°C ve NaOH konsantrasyonu 0,09-0,11 mol/L aralığında en fazla yanıt değerlerin alındığı ve optimum seviyelerin elde edildiği görülmüştür. Sıcaklığın 90 °C'de ve NaOH konsantrasyonunun 0,13 mol/L konsantrasyondan sonra yanıtlarda düşüşler elde edildiği görülmüştür.



Şekil 4.4. Klasik ekstraksiyonda TAK içeriği (DPPH) üzerine etkileşimler

4.2.2. Ultrasonik destekli ekstraksiyon sonuçları

Merkezi kompozit tasarıma göre (Design Expert programı tarafından önerilen), doğrusal, iki faktörlü etkileşimli (2FI), kuadratik ve kübik modellerin uyumluluğu Çizelge 4.8.'de açıklanmıştır. Modeller kestane kabuğu tozuna uygulanan ultrasonik destekli ekstraksiyon deneylerinin renk değeri, toplam fenolik madde, toplam antioksidan kapasite (DPPH ve CUPRAC) analizlerinin sonuçlarına göre quadratik modellerini belirlemek için uyarlanmıştır. Çizelge 4.7.'ye göre yanıtların maksimum olarak seçildiğinde 0,891 tatmin etme seviyesinde 17 numaralı deneme ünitesine yakın tahminlenmiş sonuçlar elde edilmiştir. Optimum seviyeler 60 °C, 30 dakika ve 0,15 mol/L NaOH konsantrasyonu olarak tespit edilmiştir. En yüksek neticeler ise genel olarak 15. deneme ünitesinde elde edilmiştir.

Çizelge 4.7. Ultrasonik destekli ekstraksiyon optimizasyon deneysel sonuçları

Run	*x1* Sıcaklık	*x2* Süre	*x3* Çözücü Konsantrasyonu (NaOH)	Yanıt 1 Renk Değeri	Yanıt 2 Toplam Fenolik Madde İçeriği	Yanıt 3-4 Toplam Antioksidan Kapasite	
	(°C)	(dk)	(mol/L)	1% (km)	(mg GAE/g) (km)	CUPRAC (mg TE/g) (km)	DPPH (mg TE/g) (km)
1	50	45	0,2	17,69±0,16	140,43±1,37	578,58 ±9,19	104,82±0,59
2	50	45	0,1	7,93±0,13	165,67±3,12	549,47±6,68	135,15±3,55
3	50	75	0,1	10,91±0,16	175,93±3,71	649,97±14,22	153,43±13,02
4	40	60	0,05	3,54±0,03	103,65±1,95	420,22±12,53	53,54±2,37
5	50	45	0,1	8,24±0,12	170,44±0,97	604,99±18,17	129,46±5,11
6	30	45	0,1	7,45±0,16	143,86±2,15	525,05±13,40	80,18±3,55
7	40	60	0,15	10,31±0,15	165,61±0,78	607,70±13,36	109,48±10,79
8	50	45	0	0,7±0,05	23,46±0,39	179,40±17,11	0±0
9	50	45	0,1	8,76±0,01	171,76±0,39	601,13±5,85	147,44±2,96
10	50	45	0,1	9,14±0,17	172,86±1,76	586,43±5,85	144,11±1,18
11	50	15	0,1	7,80±0,18	165,83±2,15	583,28±23,38	170,75±4,69
12	60	60	0,05	5,46±0,13	141,88±1,95	548,53±15,87	151,14±3,24
13	60	30	0,05	5,12±0,13	132,87±0,59	478,08±11,69	120,51±11,97
14	60	60	0,15	15,84±0,14	187,00±0,78	634,94±14,20	190,13±2,37
15	70	45	0,1	11,33±0,24	206,28±0,20	702,57±4,18	220,32±6,51
16	50	45	0,1	8,97±0,14	170,00±3,76	575,77±21,71	144,11±17,23
17	60	30	0,15	16,67±0,19	180,33±3,70	706,32±27,60	174,78±10,06
18	40	30	0,15	10,04±0,21	169,07±0,20	590,02±2,02	170,42±18,42
19	50	45	0,1	9,49±0,22	168,28±6,84	582,34±7,52	139,73±3,06
20	40	30	0,05	3,63±0,05	107,17±1,72	296,81±8,67	33,56±1,74

Merkezi kompozit tasarıma göre (Design Expert Tarafından Önerilen), doğrusal, iki faktörlü etkileşimli (2FI), kuadratik ve kübik modellerin uyumluluğu Çizelge 4.8.'te açıklanmıştır. Modeller kestane kabuğu tozuna uygulanan ultrasonik ekstraksiyon deneylerinin renk değeri, toplam fenolik madde, DPPH antioksidan aktivite ve CUPRAC antioksidan aktivitenin analizlerinin sonuçlarına göre istatistik modellerini belirlemek için uyarlanmıştır.

Çizelge 4.8. Ultrasonik destekli kestane kabuğu karışımının regresyon modelleri

Kaynak	Sıralı p-değeri	Lack of fit p-değeri	Ayarlanmış R^2	Tahmin edilmiş R^2	
Renk Değeri					
Doğrusal	< 0,0001	0,0431	0,9239	0,8902	
Etkileşimli (2FI)	**0,0098**	**0,1508**	**0,9598**	**0,9026**	***Önerildi***
İkinci dereceden	0,7637	0,0902	0,9532	0,8325	
Kübik	0,0382	0,6307	0,9824	0,9357	
TFM					
Doğrusal	0,0061	< 0,0001	0,4409	0,0972	
Etkileşimli (2FI)	0,9802	< 0,0001	0,3212	0,0737	
İkinci dereceden	**< 0,0001**	**0,1786**	**0,9929**	**0,9762**	***Önerildi***
Kübik	0,1001	0,5271	0,9962	0,9775	
DPPH					
Doğrusal	0,0009	0,0003	0,5621	0,2884	
Etkileşimli (2FI)	0,4895	0,0002	0,5498	0,3184	
İkinci dereceden	**< 0,0001**	**0,0563**	**0,9585**	**0,8568**	***Önerildi***
Kübik	0,0189	0,8272	0,9878	0,9864	
CUPRAC					
Doğrusal	0,0004	0,0014	0,6097	0,3723	
Etkileşimli (2FI)	0,5818	0,001	0,5845	0,4127	
İkinci dereceden	**< 0,0001**	**0,6163**	**0,9786**	**0,9523**	***Önerildi***
Kübik	0,7942	0,2279	0,9721	0,4942	

Buna göre bağımsız değişkenler arasındaki etkileşimler ANOVA Testi sonucunda *p* değeri 0,05'ten düşük olan sonuçlar uygulamaların önemli ve birbiriyle etkileşimi olduğunu göstermektedir. Bu değerler Çizelge 4.9.'da gösterilmiştir.

Çizelge 4.9. Her bir bağımsız değişken için ANOVA sonuçları

Kaynak	df	**Renk Değeri**			**Toplam Fenolik Madde**		
		Karelerin Toplamı	f-değeri	p-değeri	Karelerin Toplamı	f-değeri	p-değeri
Model	9	345,37	76,63	< 0,0001	29625,94	294,27	< 0,0001
x1	1	36	47,92	< 0,0001	3025	270,42	< 0,0001
x2	1	45689	3	0,1072	56,25	44990	0,0488
x3	1	294,12	391,54	< 0,0001	12656,25	1131,4	< 0,0001
x1x2	1	0	0	10000	60,5	15097	0,0424
x1x3	1	18598	16,64	0,0013	128	16377	0,007
x2x3	1	0,5	0,6656	0,4293	0,5	0,0447	0,8368
x1²	1				37,17	11749	0,0983
x2²	1				42736	0,1048	0,7528
x3²	1				12345,78	1103,65	< 0,0001
Residual	10	28369			111,86		
Lack of Fit	5	32690	23043	**0,1508**	79,03	15008	**0,1786**
Kaynak	df	**CUPRAC**			**DPPH**		
		Karelerin Toplamı	f-değeri	p-değeri	Karelerin Toplamı	f-değeri	p-değeri
Model	9	301500000	97,6	< 0,0001	53202,61	49,75	< 0,0001
x1	1	40804	118,89	< 0,0001	18837,56	158,52	< 0,0001
x2	1	4692,25	13,67	0,0041	60,06	0,5054	0,4934
x3	1	159200000	463,84	< 0,0001	15438,06	129,91	< 0,0001
x1x2	1	2520,5	12601	0,0219	946,13	35247	0,0181
x1x3	1	3444,5	45026	0,01	1225,13	11597	0,0093
x2x3	1	7564,5	45038	0,0008	1128,13	18142	0,0116
x1²	1	1043,8	45019	0,1118	154,3	10959	0,2811
x2²	1	1256,12	24167	0,0848	754,3	12936	0,0304
x3²	1	68790,94	200,43	< 0,0001	12056,26	101,46	< 0,0001
Residual	10	3432,2			1188,34		
Lack of Fit	5	1478,7	0,757	**0,6163**	981,5	27485	**0,0563**

Optimizasyon denklemleri

Y'nin öngörülen yanıt olduğu durumlarda, X_i and X_j bağımsız değişkenler, β_0 sabit katsayısı, βi doğrusal terimlerin regresyon katsayısı, βii: kuadratik terimlerin regresyon katsayısı, i i ve j değişkenlerinin etkileşim katsayısı. Yazılım, bu ikinci dereceden modeli yanıt yüzeyini oluşturmak için kullanır.

Modelin doğruluğu yazılım tarafından elde edilen varyans analizinden (ANOVA) elde edilen uyum eksikliği, Fisher test değeri (F değeri) ve belirleme katsayısı (R^2) incelenerek belirlenmiştir. Üç boyutlu tepki yüzey grafiği, bir tepki değişkenini optimal düzeyde tutarak ve bunu iki faktöre (bağımsız değişkenler) göre çizerek kontur grafikleri belirlenmiştir. Ultrasonik destekli ekstraksiyon için yapılan Design Expert programı üzerindeki merkezi kompozit deneme tasarımına göre deneysel sonuçlar programda yerlerine yerleştirilmiştir. Bunun sonucunda eşitlik her bir bağımlı değişken için 4.6.;4.7.;4.8 ve 4.9. elde edilmiştir. Burada her bir bağımsız değişken bağımlı değişkeni hangi yönde etkilediği formüllerden görülmektedir.

Renk Değeri =+9,01+1,5$x1$+0,375$x2$+4,29$x3$+1,25$x1x3$-0,25$x2x3$ (4.6.)

TFM=169,68+13,75x_1+1,87x_2+28,13x_3+2,75x_1x_2-4x_1x_3-0,25x_2x_3+1.22x_1^2+.02159x_2^2-22.16x_3^2 (4.7.)

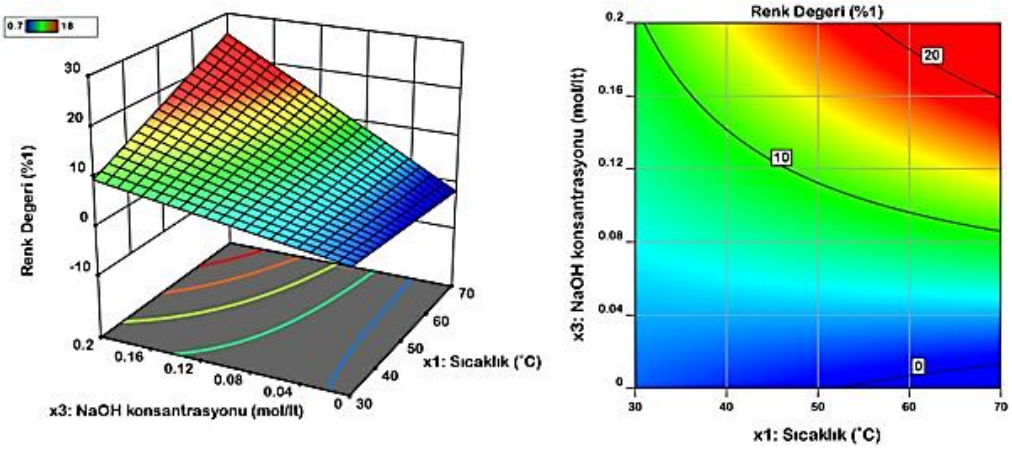
DPPH=139,7+34,31x_1-1,94x_2+31,06x_3+10,88x_1x_2-12,37x_1x_3-11,87x_2x_3+2.48x_1^2 +5.48x_2^2 - 21.90x_3^2 (4.8.)

CUPRAC=581,14+50,50$x1$+17,12$x2$+99,75$x3$-17,75$x1x2$-20,75$x1x3$-30,75$x2x3$+ $6.44x_1^2$+$7.07x_2^2$-$52.31x_3^2$ (4.9.)

Ultrasonik destekli ekstraksiyonda uygulamalar arası etkileşimlerin üç boyutlu etkileşim yanıt yüzey ve kontuar grafikleri

Renk değeri etkileşimleri

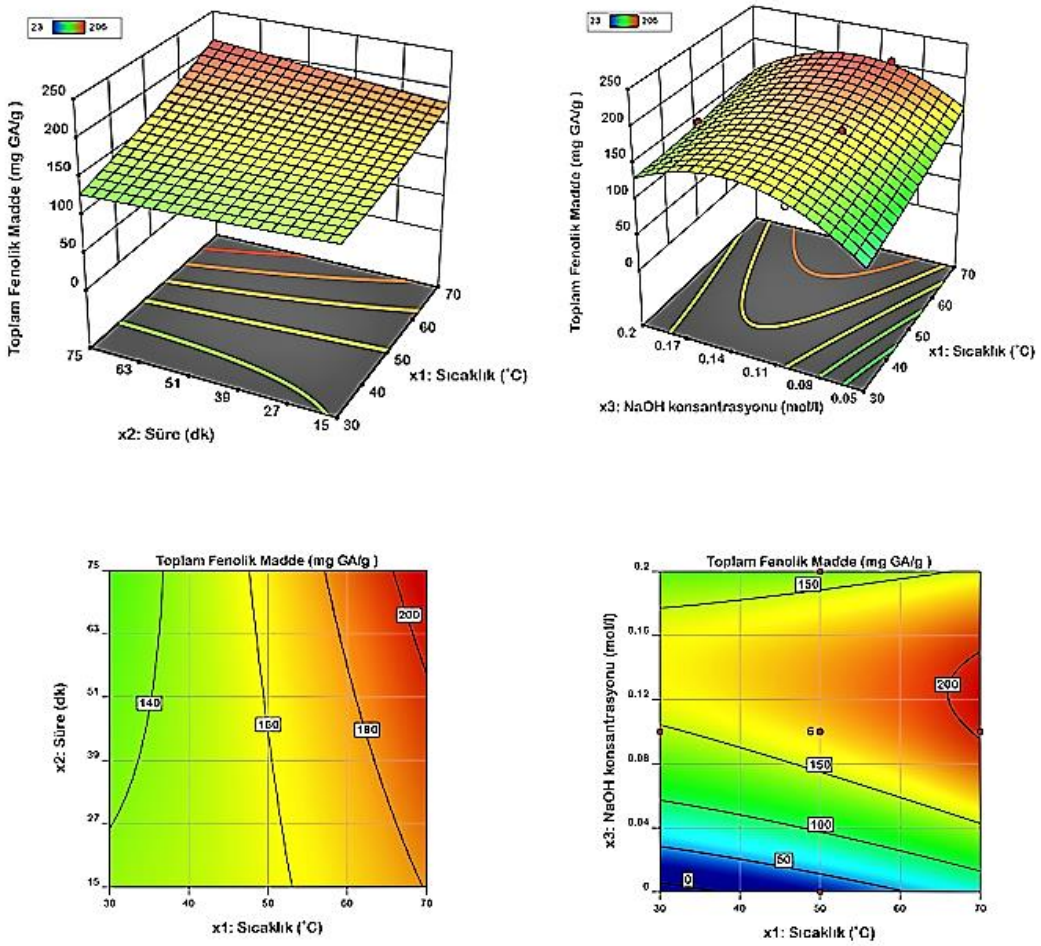
Sıcaklık ve çözücü konsantrasyonu arasında bir etkileşim vardır. Modelden de görüldüğü üzere 0,2 mol'e ve 70 ˚C'ye doğru gidildikçe renk değeri artmıştır. 60 ˚C 30 dakika 0,15 mol/L NaOH uygulanan ekstrakt için Renk Değeri 16,67; 70 ˚C 45 dakika 0,1 mol/L NaOH uygulanan ekstrakt için Renk Değeri 11,33; 50 ˚C 45 dakika 0,2 mol/L için bu değer yaklaşık 17,69 olmuştur (Şekil 4.5.).



Şekil 4.5. Ultrasonik destekli ekstraksiyonda renk üzerine sıcaklık- NaOH etkileşimi

Toplam fenolik madde sonucuna etki eden etkileşimler

Sıcaklık-süre ve sıcaklık-NaOH konsantrasyonu etkileşimi vardır. Buna göre sıcaklık 70 ˚C'ye süre 60 dakikaya doğru çıktıkça artmakta, TFM 50 ˚C'de 45 dk uygulama 168,28 mg GAE/g km, 60 ˚C'de 60 dakika 0,15 mol/L NaOH konsantrasyonunda 187,00 mg GAE/g km 70 ˚C 45 dakika 206,28 mg GA/g km olarak sonuçlar bulunmuştur. Sıcaklık 40 ˚C'de 0,05 mol/L NaOH uygulaması 30 dk süre sonucunda 107,17 mg GAE/g km, 60 ˚C'de 0,15 mol/L NaOH uygulaması 30 dk süre sonucunda 180,33 mg GA/g km, olarak bulunmuştur.



Şekil 4.6. Ultrasonik destekli ekstraksiyonda TFM üzerine sıcaklık- süre ve sıcaklık-NaOH konsantrasyonu etkileşimi

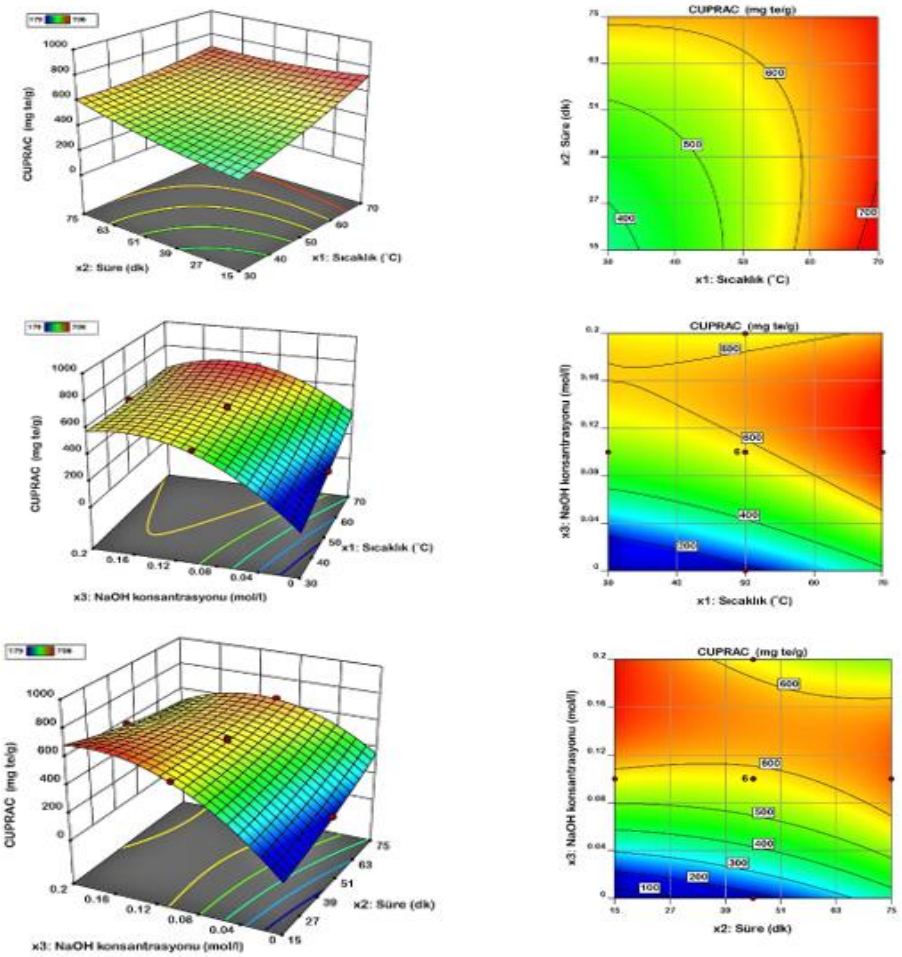
Toplam antioksidan kapasitesi (CUPRAC metodu) sonucuna etki eden etkileşimler

Sıcaklık-süre, sıcaklık- çözücü konsantrasyonu (NaOH) ve süre-çözücü konsantrasyonu (NaOH) arasında *p* değerleri 0,05'ten düşük olduğu için etkileşim olduğu gözlenmiştir. Sıcaklık-süre arasında değerler arttıkça TAK (CUPRAC) değerleri açısından artış olduğu hem kontur grafiğinden hem de yanıt yüzey 3D diyagramından görülmektedir (Şekil 4.7.).

Sıcaklık 40 ˚C'de 30 dakika uygulaması sonucunda CUPRAC analizi sonucu 296,81 mg TE/g km iken 60 ˚C'de 60 dk 0,05mol/L NaOH konsantrasyonu uygulaması sonucunda CUPRAC analizi sonucu 548,53 mg TE/g km olarak bulunmuştur.

Sıcaklık-çözücü konsantrasyonu (NaOH) Sıcaklık 40 ˚C'de 0,05 mol/L NaOH uygulaması sonucunda CUPRAC analizi sonucu 296,81 mg TE/g km iken 60 ˚C'de 0,15 mol/L NaOH uygulaması sonucunda CUPRAC analizi sonucu 634,94 mg TE/g Kuru Madde, olarak bulunmuştur.

Süre-çözücü konsantrasyonu (NaOH) 15dk 0,1 mol/L NaOH uygulaması sonucunda CUPRAC analizi sonucu 583,28 mg TE/g km iken 60 dk 0,15 mol/L NaOH uygulaması sonucunda CUPRAC analizi sonucu 607,70 mg TE/g km olarak bulunmuştur.



Şekil 4.7. Ultrasonik destekli ekstraksiyonda TAK-CUPRAC üzerine etkileşimler

Toplam antioksidan kapasitesi (DPPH Metodu) sonucuna etki eden etkileşimler

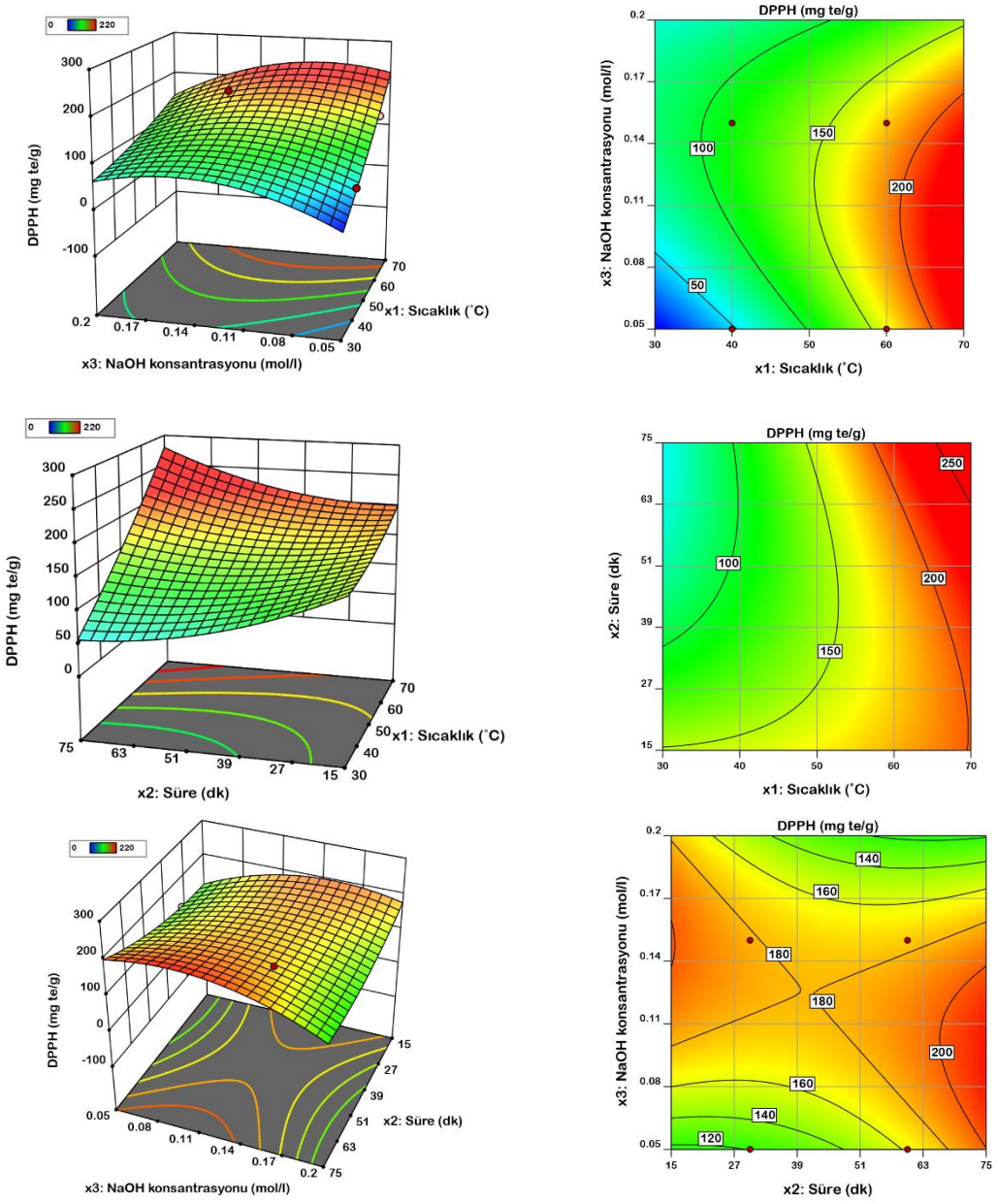
Merkezi Kompozit Modellemesine göre yapılan deneme deseni neticesinde istatistiki olarak modelin uygunluğu R^2 değerinin 0,9'dan yüksek olması, lack of fit değerinin her bir bağımlı değişken için 0,05'ten yukarı olması ve önemsiz olması modelin başarılı olduğunu göstermektedir. Diğer taraftan uygulamalar arasındaki etkileşimleri tespit etmek için *p* değerlerinin 0,05'ten düşük olması gerekmektedir.

Şekil 4.8.'ye göre sıcaklık-süre, sıcaklık-çözücü konsantrasyonu (NaOH) ve süre-çözücü konsantrasyonu (NaOH) arasında *p* değerleri 0,05'ten düşük olduğu için etkileşim olduğu gözlenmiştir. Bu uygulama değerleri arttıkça toplam antioksidan kapasite değerleri (DPPH) açısından artış olduğu hem kontur grafiğinden hem de yanıt yüzey 3D diyagramından görülmektedir.

Sıcaklık 40 ˚C'de 30 dakika uygulaması sonucunda DPPH analizi sonucu 33,56 mg TE/g km iken 60 ˚C 60 dakika uygulaması sonucunda DPPH analizi sonucu 151,14 mg TE/g km, olarak bulunmuştur.

Sıcaklık-çözücü konsantrasyonu (NaOH) Sıcaklık 40 ˚C'de 0,05 mol/L NaOH uygulaması sonucunda DPPH analizi sonucu 33,56 mg TE/g km iken 60 ˚C'de 0,05 mol/L NaOH uygulaması sonucunda DPPH analizi sonucu 120,51 mg TE/g km olarak bulunmuştur.

Süre-çözücü konsantrasyonu (NaOH) 15 dakika 0,1 mol/L NaOH uygulaması sonucunda DPPH analizi sonucu 170,75 mg TE/g km iken 60 ˚C'de 0,15 mol/L NaOH uygulaması sonucunda DPPH analizi sonucu 190,13 mg TE/g km olarak bulunmuştur.



Şekil 4.8. Ultrasonik destekli ekstraksiyonda TAK-DPPH üzerine etkileşimler

4.2.3. Mikrodalga destekli ekstraksiyon sonuçları

Bağımsız değişkenlerin bağımlı değişkenler sonuçları üzerinden birbiri ile etkileşimleri Yanıt-Yüzey Yöntemiyle belirlenmiştir. Buna göre deneme desenine uygun olarak yapılan çalışmalar sonucunda bağımlı değişkenlere ait deneysel sonuçlar Çizelge 4.10'da belirtilmiştir.

Çizelge 4.10. Mikrodalga destekli ekstraksiyon optimizasyon deneysel sonuçları

Run	*x1* Güç	*x2* Süre	*x3* Çözücü Konsantrasyonu (NaOH)	Yanıt 1 Renk Değeri	Yanıt 2 Toplam Fenolik Madde İçeriği	Yanıt 3-4 Toplam Antioksidan Kapasite	
	(W)	(dk)	(mol/L)	(km)	(mg GAE/g) (km)	CUPRAC (mg TE/g) (km)	DPPH (mg TE/g) (km)
1	400	6	0,05	8,04±0,08	112,10±3,27	615,53±18,16	200,32±14,60
2	1000	9	0,10	32,71±5,89	308,36±4,60	1068,88±30,00	655,82±15,47
3	400	6	0,15	24,92±1,60	151,65±4,83	710,71±13,36	323,74±7,32
4	600	9	0,10	27,77±0,88	226,35±5,93	929,87±16,70	523,52±12,87
5	600	9	0,10	27,33±2,06	233,08±4,87	922,35±11,69	487,12±16,10
6	400	12	0,05	14,12±2,00	203,79±3,88	721,35±21,71	422,30±18,78
7	800	6	0,15	34,01±0,21	227,81±5,50	877,27±26,86	440,06±12,07
8	600	9	0,20	39,54±2,44	182,99±1,84	794,62±35,77	265,13±4,87
9	800	6	0,05	15,67±0,74	216,39±3,51	799,62±11,69	455,15±10,65
10	600	9	0,10	28,74±1,10	250,37±12,90	923,61±16,70	527,96±16,86
11	600	15	0,10	35,75±1,58	268,82±10,27	936,13±8,35	511,98±8,43
12	400	12	0,15	30,26±2,78	203,79±7,02	863,49±18,37	369,91±12,43
13	600	9	0	3,60±0,69	114,74±5,57	575,45±21,87	244,71±6,79
14	800	12	0,05	22,08±2,66	244,80±3,27	919,85±19,15	573,24±21,79
15	600	3	0,10	14,90±0,44	144,03±4,82	650,60±20,47	260,25±10,66
16	600	9	0,10	28,29±0,42	238,65±9,23	923,61±24,59	497,33±8,29
17	200	9	0,10	11,27±0,46	156,34±1,69	705,07±17,05	296,21±5,92
18	800	12	0,15	44,17±1,65	256,81±5,79	1055,10±32,99	448,05±9,47
19	600	9	0,10	26,66±0,66	238,65±5,75	927,36±8,77	503,99±7,73
20	600	9	0,10	28,20±0,58	241,58±5,85	922,35±11,89	511,09±8,05

Merkezi kompozit tasarıma göre (Design Expert Tarafından Önerilen), doğrusal, iki faktörlü etkileşimli (2FI), kuadratik ve kübik modellerin uyumluluğu Çizelge 4.11'de açıklanmıştır. Modeller kestane kabuğu tozuna uygulanan mikrodalga destekli

ekstraksiyon deneylerinin renk değeri, toplam fenolik madde, DPPH antioksidan aktivite ve CUPRAC antioksidan aktivitenin analizlerinin sonuçlarına göre istatistik modellerini belirlemek için uyarlanmıştır.

Çizelge 4.11. Mikrodalga destekli regresyon modelleri

Kaynak	Sıralı p-değeri	Lack of fit p-değeri	Ayarlanmış R^2	Tahmin edilmiş R^2	
Renk Değeri					
Doğrusal	< 0,0001	0,0030	0,9310	0,9066	
Etkileşimli (2FI)	0,6512	0,0021	0,9248	0,8944	
İkinci dereceden	**0,0001**	**0,0888**	**0,9863**	**0,9509**	***Önerildi***
Kübik	0,0327	0,9193	0,9951	0,9971	
TFM					
Doğrusal	0,0002	0,0017	0,6378	0,4762	
Etkileşimli (2FI)	0,7963	0,0010	0,5868	0,4111	
İkinci dereceden	**< 0,0001**	**0,1773**	**0,9587**	**0,8685**	***Önerildi***
Kübik	0,1358	0,3335	0,9752	0,6918	
DPPH					
Doğrusal	0,0048	0,0002	0,4588	0,2300	
Etkileşimli (2FI)	0,5763	0,0002	0,4249	0,2438	
İkinci dereceden	**< 0,0001**	**0,1865**	**0,9729**	**0,9130**	***Önerildi***
Kübik	0,0883	0,7586	0,9862	0,9755	
CUPRAC					
Doğrusal	0,0001	< 0,0001	0,6647	0,5325	
Etkileşimli (2FI)	0,9788	< 0,0001	0,5931	0,4905	
İkinci dereceden	**< 0,0001**	**0,5526**	**0,9995**	**0,9989**	***Önerildi***
Kübik	0,4524	0,5014	0,9995	0,9970	

Buna Göre Bağımsız değişkenler arasındaki etkileşimler ANOVA Testi Sonucunda p değeri 0,05'ten düşük olan uygulamaların önemli olduğunu Çizelge 4.12'de *p* değeri 0,05'ten düşük olan sonuçlardaki uygulamaların birbiriyle etkileşimi olduğunu göstermektedir.

Çizelge 4.12. Her bir bağımlı değişken için ANOVA sonuçları

Kaynak	df	**Renk Değeri**			**Toplam Fenol İçeriği**		
		Karelerin Toplamı	f-değeri	p-değeri	Karelerin Toplamı	f-değeri	p-değeri
Model	9	2149,3	152,56	< 0,0001	50880,96	49,99	< 0,0001
x1	1	410,06	261,96	< 0,0001	20880,25	184,64	< 0,0001
x2	1	315,06	201,27	< 0,0001	12769	112,92	< 0,0001
x3	1	1314,06	839,47	< 0,0001	2500	45252	0,0008
x1x2	1	41334	2	0,188	924,5	43313	**0,017**
x1x3	1	41548	17319	**0,0292**	32	0,283	0,6064
x2x3	1	41275	0,7187	0,4164	200	28126	0,2131
$x1^2$	1	53,19	33,98	0,0002	92,73	0,82	0,3865
$x2^2$	1	43586	11749	0,0985	1730,19	15,3	0,0029
$x3^2$	1	62,73	40,07	< 0,0001	12922,16	114,27	< 0,0001
Residual	10	15,65			1130,84		
Lack of Fit	5	12024	25628	**0,0888**	800,01	15373	**0,1773**
Kaynak	df	**CUPRAC**			**DPPH**		
		Karelerin Toplamı	f-değeri	p-değeri	Karelerin Toplamı	f-değeri	p-değeri
Model	9	368400000	4451,48	< 0,0001	289100000	76,93	< 0,0001
x1	1	135800000	14767,32	< 0,0001	109100000	261,17	< 0,0001
x2	1	79806,25	8678,88	< 0,0001	50512,56	120,96	< 0,0001
x3	1	48841	5311,43	< 0,0001	52,56	0,1259	0,7301
x1x2	1	162	17,62	**0,0018**	2556,13	45266	**0,0329**
x1x3	1	60,5	21337	**0,0281**	5565,13	13,33	**0,0045**
x2x3	1	1250	135,94	**< 0,0001**	10153,13	24,31	**0,0006**
$x1^2$	1	2606,55	283,46	< 0,0001	1734,94	42095	0,0688
$x2^2$	1	27474,94	2987,88	< 0,0001	23862,08	57,14	< 0,0001
$x3^2$	1	90685,8	9862,02	< 0,0001	101600000	243,21	< 0,0001
Residual	10	91,95			4176,02		
Lack of Fit	5	43,12	0,883	**0,5526**	2924,68	12451	**0,1865**

df: Serbestlik derecesi

Optimizasyon denklemleri

Deneysel Bağımlı Sonuçların Çoklu Regresyon Analizi ile Gösterilmesi, Y'nin öngörülen yanıt olduğu durumlarda, X_i and X_j bağımsız değişkenler, β_0 sabit katsayısı, βi doğrusal terimlerin regresyon katsayısı, βii: kuadratik terimlerin regresyon katsayısı, i i ve j değişkenlerinin etkileşim katsayısı. Yazılım, bu ikinci dereceden modeli yanıt yüzeyini oluşturmak için kullanır.

Modelin doğruluğu yazılım tarafından elde edilen varyans analizinden (ANOVA) elde edilen uyum eksikliği, Fisher test değeri (F değeri) ve belirleme katsayısı (R^2) incelenerek belirlenmiştir. Üç boyutlu tepki yüzey grafiği, bir tepki değişkenini optimal düzeyde tutarak ve bunu iki faktöre (bağımsız değişkenler) göre çizerek kontur grafikleri belirlenmiştir.

Renk Değeri= +27,3409 + 5,0625x_1 + 4,4375x_2 + 9,0625x_3 + 0,625x_1x_2+ 1,125x_1x_3+ 0,375x_2x_3-1.45455x_1^2-0.454545x_2^2-1.57955x_3^2 (4.10.)

Toplam Fenolik Madde İçeriği= +237,409 + 36,125x_1 + 28,25x_2 + 12,5x_3-10,75x_1x_2-2x_1x_3-5$x2x3$-1.92045x_1^2-8.29545x_2^2-22.6705x_3^2 (4.11.)

DPPH= + 507,886 + 82,5625x_1 + 56,1875x_2-1,8125$x3$-17,875$x1x2$-26,375$x1x3$-35,625 x_2x_3-8.30682x_1^2-30.8068x_2^2-63.5568x_3^2 (4.12.)

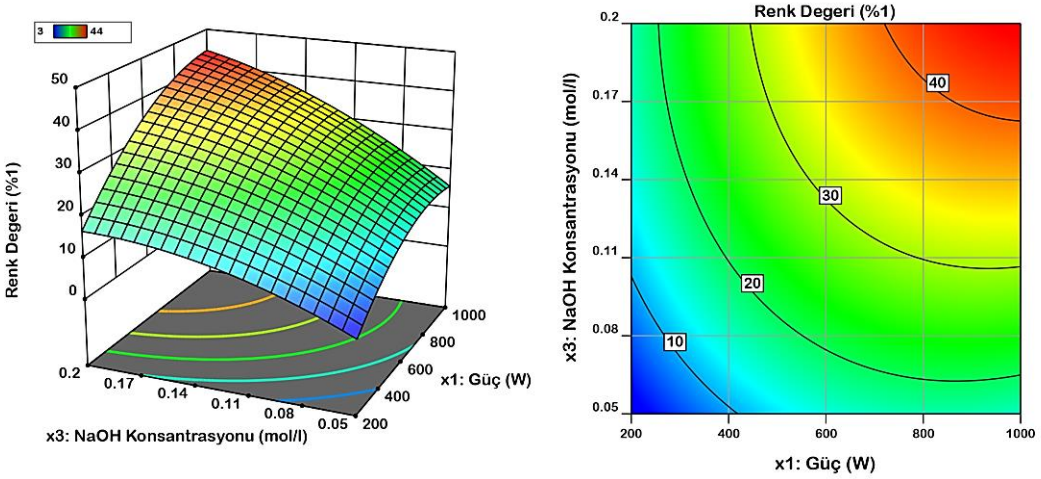
CUPRAC= +924,636 + 92,125x_1 + 70,625x_2 + 55,25x_3 + 4,5x_1x_2-2,75$x1x3$ + 12,5$x2x3$-10.1818x_1-33.0568x_2-60.0568x_3 (4.13.)

Renk değeri etkileşimleri

Renk değeri için regresyon analizleri, neticesinde modelin ve önerilmesi ve uyumluluğu, 3 değişkenli ANOVA ile varyans analizi, önerilen metoda karşılık gelen denklemler, varyans analizi neticesinde her bir bağımlı değişken için uygulamalar arası etkileşimler incelenmiştir. 2. Dereceden regresyon modeli önerilmiştir. Model, renk değeri için p değeri <0,0001 olarak bulunmuş ve 0,05'ten küçük olduğu için önemli bulunmuştur. Renk değeri için F değeri 152,56 olarak önemli olarak bulunmuştur. *x1x3* arasında $p<0,05$ olduğu için önemli olarak bulunmuştur. Modelin tahminlenmiş R^2 değeri 0,9509 ile

ayarlanmış R^2 değeri 0,9863 arasındaki fark 0,2 den az olduğu için istatistiki olarak kabul edilebilir bulunmuştur.

Burada, Şekil 4.9.'den görüleceği üzere mikrodalga gücü 200W'tan 1000 W 'a doğru ve çözücü konsantrasyonu 0'dan 0,2 mol/L NaOH'e doğru arttıkça renk değerinin de artmış olduğu gözlenmiştir. Ancak uygulamalar esnasında 800W 'tan sonra 1000W güç uygulandığında ekstraktlarda patlamalar ve yanmalar görülmüştür. Dolayısıyla sonuç olarak alınan ekstrakt miktarları da azalmıştır. Renk değeri için optimum seviye 1000W güç 0,2 mol/L NaOH çözücü konsantrasyonu yakınlarında olduğu tahmin edilmiştir.

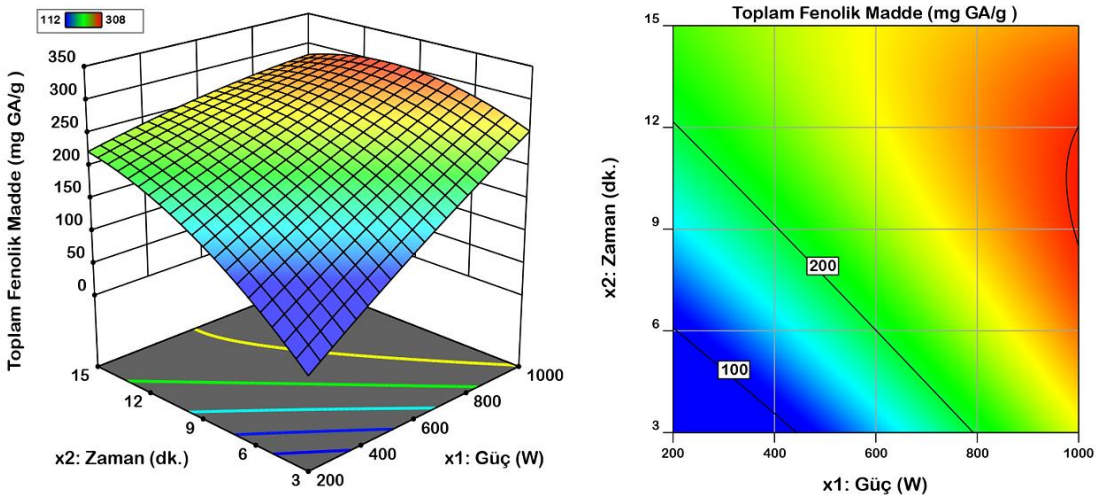


Şekil 4.9. Mikrodalga destekli ekstraksiyon renk değeri yanıt yüzey güç-çözücü konsantrasyonu etkileşimi

Toplam fenolik madde içeriği sonucuna etki eden etkileşimler

Toplam fenolik madde içeriği için regresyon analizleri, neticesinde modelin ve önerilmesi ve uyumluluğu, ANOVA ile varyans analizi, önerilen metoda karşılık gelen denklemler, varyans analizi neticesinde her bir bağımlı değişken için uygulamalar arası etkileşimler incelenmiştir. 2. Dereceden regresyon modeli önerilmiştir. Model, toplam fenolik madde içeriği için *p* değeri <0,0001 olarak bulunmuş ve 0,05'ten küçük olduğu için önemli bulunmuştur. Toplam fenolik madde içeriği modeli için F değeri 49,99 olarak önemli olarak bulunmuştur. *x1x2* etkileşimi için *p* değeri <0,05 olduğu için istatistiksel olarak önemli olarak bulunmuştur. Modelin tahminlenmiş R^2 değeri 0,8685 ile ayarlanmış R^2 değeri 0,9587 arasındaki fark 0,2'den az olduğu için istatistiki olarak kabul edilebilir bulunmuştur.

Şekil 4.10.'a göre, toplam fenolik madde içeriği, güç 200W'tan 1000 W 'a doğru artış gösterirken ve süre, 0'dan 11. dakikaya kadar artış gösterdiğinde TFM de artmış sonra da azalma eğilimine girmiş olduğu görülmüştür. toplam fenolik madde İçeriği için optimum seviye A-B etkileşiminde yaklaşık 1000W güç 11 dakika ekstraksiyon süresi olarak tespit edilmiştir.

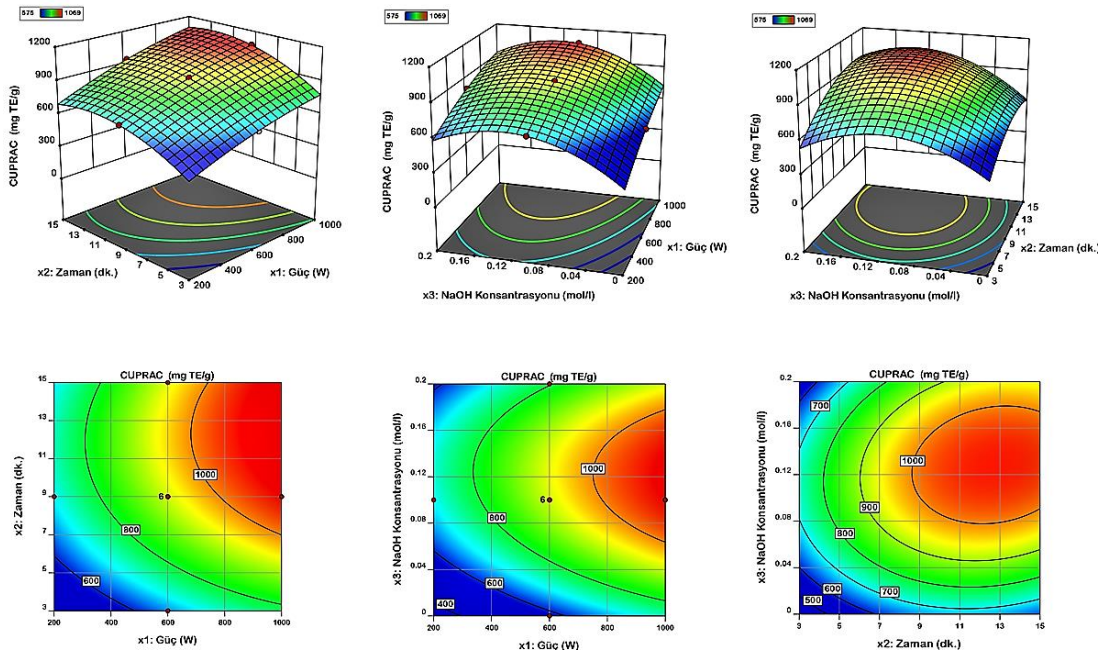


Şekil 4.10. Mikrodalga destekli ekstraksiyon TFM içeriği yanıt yüzey güç-süre etkileşimi

Toplam antioksidan kapasitesi (CUPRAC Metodu) sonucuna etki eden etkileşimler

CUPRAC yöntemiyle yapılan Toplam Antioksidan Kapasite Tayini için regresyon analizleri, neticesinde modelin önerilmesi ve uyumluluğu, ANOVA ile varyans analizi, önerilen metoda karşılık gelen denklemler, varyans analizi neticesinde her bir bağımlı değişken için uygulamalar arası etkileşimler incelenmiştir. 2. Dereceden regresyon modeli önerilmiştir. Model, Toplam Antioksidan Kapasite Tayini (CUPRAC) Yöntemi için *p* değeri <0,0001 olarak bulunmuş ve 0,05'ten küçük olduğu için önemli bulunmuştur. Toplam antioksidan kapasite tayini (CUPRAC) modeli için F değeri 4451,48 olarak önemli olarak bulunmuştur. *x1x2,x1x3ve x2x3* etkileşimleri için *p*<0,05 olduğu için önemli olarak bulunmuştur. Modelin tahminlenmiş R^2 değeri 0,9989 ile ayarlanmış R^2 değeri olan 0,9995 arasındaki fark 0,2'den az olduğu için istatistiki olarak kabul edilebilir bulunmuştur.

Şekil 4.11.'a göre toplam antioksidan kapasite tayini (CUPRAC) Yöntemi sonuçları, güç 200W'tan 1000 W'a doğru artış gösterirken ve süre, 0'dan 13. dakikaya kadar artış göstermiş sonra da azalma eğilimine girmiş olduğu görülmüştür. Toplam antioksidan kapasite tayini (CUPRAC) için optimum seviye *x1-x2* etkileşiminde yaklaşık 1000W güç 12. dakika ekstraksiyon süresi olarak tespit edilmiştir. Güç-çözücü konsantrasyonu (*x1-x3*) etkileşiminde çözücü konsantrasyonu 0,6 ile 0,16 mol/L arasında artış göstermiş optimum seviye olarak 0,12 mol/l güç ise 800-1000W arası olarak tespit edilmiştir. Süre-çözücü konsantrasyonu (*x2-x3*) etkileşiminde 9 ile 15.dakikalar arası en yüksek değerler elde edilirken çözücü konsantrasyonu 0,08 ile 0,16 mol/L NaOH konsantrasyonunda en iyi seviyeler alınmıştır. Yaklaşık olarak 12. Dakika 0,12 mol/L uygulamalar en iyi optimum toplam antioksidan kapasite tayini için yanıtlar elde edilmiştir.



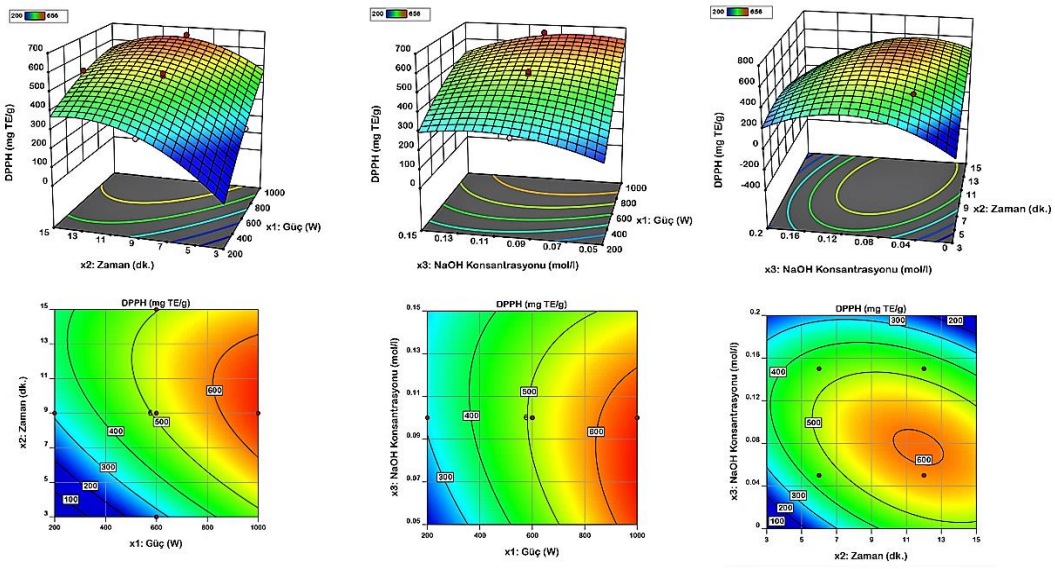
Şekil 4.11. Mikrodalga destekli ekstraksiyon TAK (CUPRAC Metodu) etkileşimleri

Toplam antioksidan kapasitesi (DPPH metodu) sonucuna etki eden etkileşimler

DPPH yöntemiyle yapılan toplam antioksidan kapasite tayini için regresyon analizleri, neticesinde modelin önerilmesi ve uyumluluğu, ANOVA ile varyans analizi, önerilen metoda karşılık gelen denklemler, varyans analizi neticesinde her bir bağımlı değişken için uygulamalar arası etkileşimler incelenmiştir. 2. Dereceden regresyon modeli

önerilmiştir. Model, Toplam Antioksidan Kapasite Tayini (DPPH) Yöntemi için *p* değeri <0,0001 olarak bulunmuş ve 0,05'ten küçük olduğu için önemli bulunmuştur. Toplam antioksidan kapasite tayini (DPPH) modeli için F değeri 76,93 olarak önemli olarak bulunmuştur. *x1x2,x1x3ve x2x3 p*<0,05 olduğu için istatistiki olarak önemli olarak bulunmuştur. Modelin tahminlenmiş R^2 değeri 0,9130 ile ayarlanmış R^2 değeri olan 0,9729 arasındaki fark 0,2'den az olduğu için istatistiki olarak kabul edilebilir bulunmuştur.

Şekil 4.12.'ye göre toplam antioksidan kapasite tayini (DPPH) Yöntemi, güç 200W'tan 1000 W 'a doğru artış gösterirken, ekstraksiyon süresi, 0'dan 11. dakikaya kadar artış göstermiş sonra da 12. Dakikalardan itibaren azalma eğilimine girmiş olduğu görülmüştür. Toplam Antioksidan Kapasite Tayini (DPPH) için optimum seviye *x1x2* etkileşiminde yaklaşık 800-1000W güç 11. dakika ekstraksiyon süresi olarak tespit edilmiştir. Güç-çözücü konsantrasyonu (*x1-x3*) etkileşiminde çözücü konsantrasyonu 0,9 mol/l konsantrasyonda artış göstermiş optimum seviye olarak güç ise 900-1000W arası olarak tespit edilmiştir. Süre-çözücü konsantrasyonu (*x2-x3*) etkileşiminde 9 ile 15.dakikalar arası en yüksek değerler elde edilirken çözücü konsantrasyonu 0,07 ile 0,11 mol/L NaOH konsantrasyonunda en iyi seviyeler alınmıştır. Yaklaşık olarak 12. Dakika 0,08 mol/L uygulamalar toplam antioksidan kapasite tayini (DPPH) için optimuma yakın yanıtlar elde edilmiştir.



Şekil 4.12. Mikrodalga destekli ekstraksiyon TAK (DPPH Metodu) etkileşimleri

4.2.4. Sprey kurutma sonuçları

Sprey kurutma uygulamasında optimum koşullarda elde edilen bağımlı değişken sonuçları

15 farklı uygulama 3 tekerrür ve 2 paralel olarak gerçekleştirilmiş elde edilen %1 Renk Değeri ve Toplam Fenolik Madde İçeriği sonuçları deneme ünitesine yerleştirilmiştir. Yazılımdaki sonuçlar ve deneme ünitesi Çizelge 4.13'teki gibidir. Burada yanıtların maksimum olarak seçildiğinde optimum nokta olarak (En yüksek desirability seviyesi 1) 160 °C, Kaplama Materyalinin Ekstrakta Oranı (%) %10; Maltodekstrinin/Arabik Gama Oranı (%) %80 olarak belirlenmiştir.

Çizelge 4.13. Sprey kurutma optimizasyonu deneysel sonuçları

Deneme Sayısı	*x1*: Giriş Sıcaklığı	x2: Kaplama Materyalinin Ekstrakta Oranı	x3: Maltodekstrinin Arabik Gama Oranı	Yanıt 1	Yanıt 2
	°C	(%)	(%)	Renk Değeri	Toplam Fenolik Madde İçeriği (mg GAE/g km)
1	150	20	100	7,88±0,34	44,49±4,58
2	150	15	75	9,80±0,90	54,20±3,57
3	140	15	100	10,54±0,30	51,16±1,47
4	140	15	50	8,16±0,02	39,82±1,17
5	150	10	50	10,70±0,31	69,86±1,68
6	140	10	75	11,46±1,89	60,25±0,99
7	160	20	75	6,98±0,03	37,12±1,18
8	150	15	75	9,30±0,61	53,68±5,41
9	160	10	75	13,75±0,56	76,51±3,17
10	150	15	75	10,07±0,03	50,93±1,07
11	160	15	50	9,60±0,17	52,62±1,34
12	150	10	100	13,80±0,63	72,44±4,55
13	160	15	100	10,78±1,04	53,92±3,49
14	140	20	75	7,57±0,63	38,52±1,56
15	150	20	50	6,85±6,85	35,23±1,90

Sprey kurutma uygulaması regresyon modelleri

Çizelge 4.14. Sprey kurutma regresyon modelleri

Kaynak	Sıralı p-değeri	Lack of fit p-değeri	Ayarlanmış R^2	Tahmin edilmişR^2	
Renk Değeri					
Doğrusal	< 0,0001	0,1911	0,8848	0,8116	
Etkileşimli (2FI)	**< 0,0001**	**0,9631**	**0,9891**	**0,9895**	***Önerildi***
İkinci dereceden	0,6222	0,9784	0,9874	0,9850	
Kübik	0,9784		0,9708		
TFM					
Doğrusal	< 0,0001	0,1265	0,8884	0,8148	
Etkileşimli (2FI)	0,0390	0,2208	0,9431	0,8380	
İkinci dereceden	**0,0048**	**0,9630**	**0,9918**	**0,9890**	***Önerildi***
Kübik	0,9630		0,9818		

Sprey kurutma uygulamasında deneme üniteleri hazırlanıp her bir bağımlı değişken olan renk değeri ve toplam fenolik madde içeriği için Design Expert programı tarafından

Çizelge 4.14.'teki veriler elde edilmiştir. Buna göre; renk değeri için 2 faktörün etkileşim halinde olduğu 2FI modeli önerilmiştir. Burada tahmin edilmiş R^2 =0.9895; Ayarlanmış R^2=0.9891 arasında fark 0,2'den küçük olduğu için uyumlu olduğu, Lack of fit (modelin uyumluluk eksikliği) değerinin 0,9631 p>0,05 olduğu için önemsiz olduğu bu nedenle metodun uyum içinde olduğu, sıralı p değeri 0,05'ten küçük olduğu için modelin renk değeri yanıtı için uygun olduğu görülmüştür.

Toplam fenolik madde içeriği için 2'den çok faktörün doğrusal olmayacak şekilde etkileşim halinde olduğu 2.dereceden Kuadratik model önerilmiştir. Burada Tahmin edilmiş R^2 =0,9890; Ayarlanmış R^2=0,9918 arasında fark 0,2'den küçük olduğu için uyumlu olduğu, Lack of fit (modelin uyumluluk eksikliği) değerinin 0,9630 p>0,05 olduğu için önemsiz olduğu bu nedenle metodun uyum içinde olduğu, sıralı p değeri 0.05'ten küçük olduğu için modelin toplam fenolik madde içeriği yanıtı için uygun olduğu görülmüştür.

Çizelge 4.15. Sprey kurutmada bağımlı değişkenler için ANOVA sonuçları

Kaynak	df	Renk Değeri			Toplam Fenolik Madde İçeriği		
		Karelerin Toplamı	f-değeri	p-değeri	Karelerin Toplamı	f-değeri	p-değeri
Model	9	62,01	212,10	< 0,0001	2304,18	189,64	< 0,0001
x1	1	1,40	28,79	0,0007	120,12	88,98	0,0002
x2	1	46,32	950,57	< 0,0001	1922,00	1423,70	< 0,0001
x3	1	9,03	185,34	< 0,0001	66,13	48,98	0,0009
x1x2	1	3,52	72,15	< 0,0001	90,25	66,85	0,0004
x1x3	1	0,6400	13,13	0,0067	25,00	18,52	0,0077
x2x3	1	1,10	22,63	0,0014	12,25	9,07	0,0297
$x1^2$	1				27,92	20,68	0,0061
$x2^2$	1				33,23	24,62	0,0042
$x3^2$	1				2,08	1,54	0,2699
Residual	10	0,3898			6,75		
Lack of Fit	5	0,1298	0,1665	0,9631	0,7500	0,0833	0,9630

Renk Değeri için inlet sıcaklığı (*x1*) ve kaplama materyalinin ekstrakta oranı (*x2*) p<0,05; inlet sıcaklık (*x1*) ile maltodekstrinin/arabik gama oranı (*x3*) p=0,0067; kaplama materyalinin ekstrakta oranı (*x2*) ile maltodekstrinin/arabik gama oranı (*x3*) arasında

p=0,0014 olduğu için etkileşimlerin istatistiksel olarak önemli olduğu ve dolayısıyla uygulamalar arasında etkileşimlerin olduğu görülmüştür. Toplam fenolik madde içeriği için inlet sıcaklık (*x1*) ve Kaplama Materyalinin Ekstrakta Oranı (*x2*) $p<0,05$; inlet sıcaklık (*x1*) ile maltodekstrinin/arabik gama oranı (*x3*) $p<0,05$; kaplama materyalinin ekstrakta oranı (*x2*) ile maltodekstrinin/arabik gama oranı (*x3*) arasında $p<0,05$ olduğu için etkileşimlerin istatistiksel olarak önemli olduğu ve uygulamalar arasında bir etkileşim olduğu görülmüştür.

Sprey kurutmada polinomiyal denklemlerinin oluşturulması

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^{3} \beta_i X_i + \sum_{i=1}^{3} \beta_{ii} X_{ii}^2 + \sum_{\substack{i=1 \\ i<j}}^{3} \sum_{j=1}^{3} \beta_{ij} X_i X_j \quad (4.14.)$$

Sprey kurutuma sonucunda elde edilen polinomiyal denklemler denklem 4.15 ve 4.16'da verilmiştir.

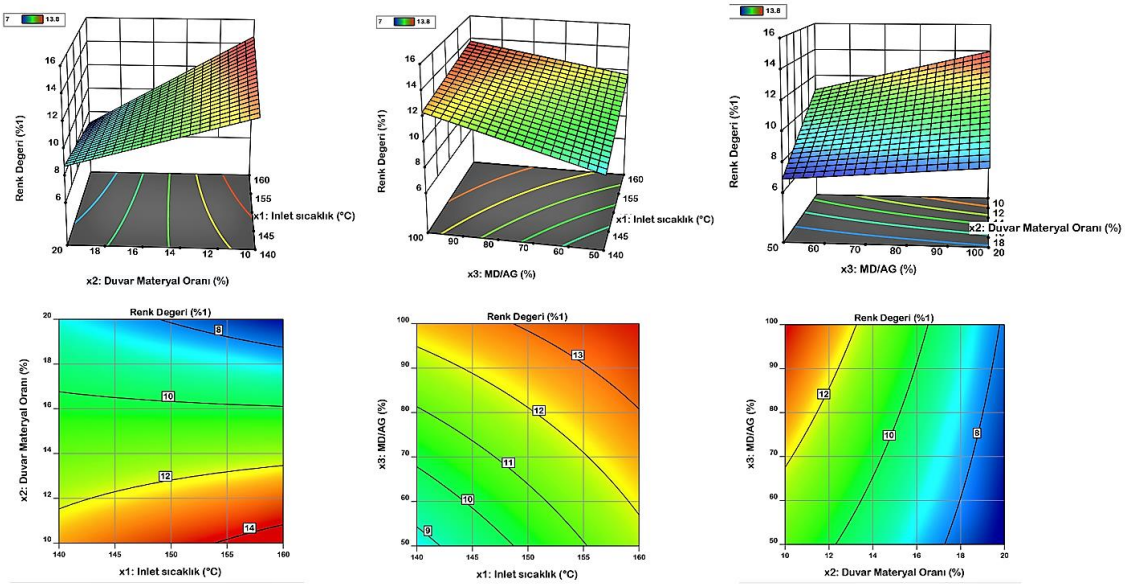
Renk Değeri= $+9,86 + 0,4187x_1 - 2,41x_2 + 1,06x_3 - 0,9375x_1x_2 - 0,4000x_1x_3 - 0,5250x_2x_3$ (4.15.)

Toplam Fenolik Madde İçeriği= $+53,00 + 3,87x1 - 15,50x2 + 2,88x3 - 4,75x1x2 - 2,50x1x3 + 1,75x2x3 - 2.75x_1^2 + 3x_2^2 - 0.7500x_3^2$ (4.16.)

Modelin doğruluğu yazılım tarafından elde edilen varyans analizinden (ANOVA) elde edilen uyum eksikliği, Fisher test değeri (F değeri) ve belirleme katsayısı (R^2) incelenerek belirlenmiştir. Üç boyutlu tepki yüzey grafiği, bir tepki değişkenini optimal düzeyde tutarak ve bunu iki faktöre (bağımsız değişkenler) göre çizerek kontuar grafikleri belirlenmiştir.

Sprey kurutma gerçekleştirilen uygulamalar arası etkileşimler

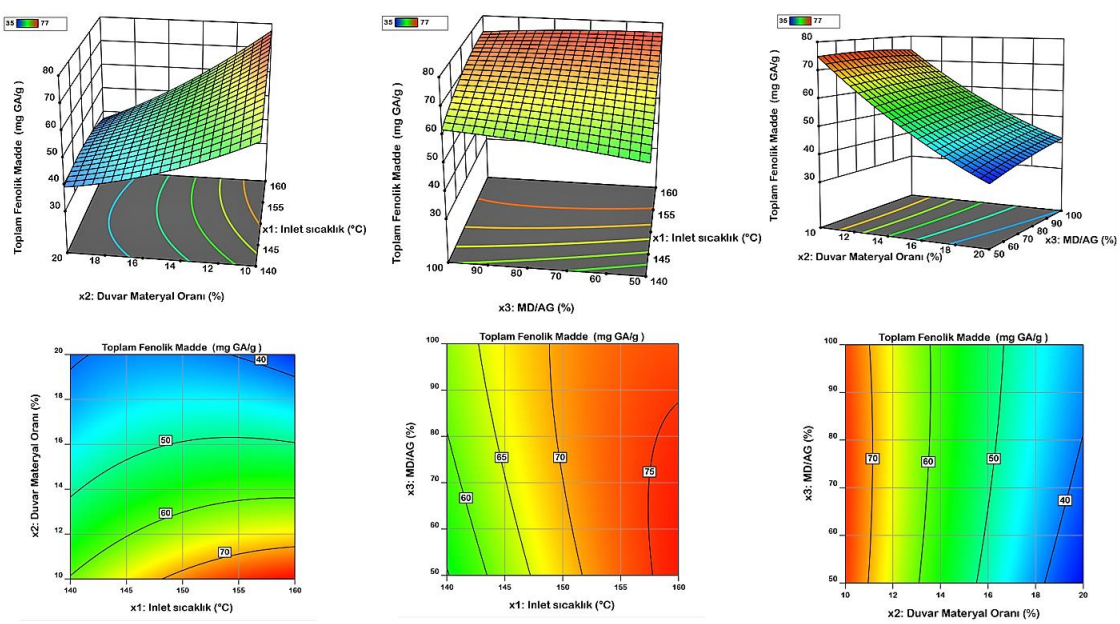
Çizelge 4.15'te hem renk değeri hem de toplam fenolik madde içeriği üzerine giriş sıcaklığı (*x1*) ve kaplama materyalinin ekstrakta oranı (*x2*), ile maltodekstrinin/arabik gama oranı (*x3*) ve giriş sıcaklığı (*x1*) ile maltodekstrinin/arabik gama oranı (*x3*) arasında etkileşimlerin olduğu belirtilmiştir. Buna göre Şekil 4.13. incelendiğinde renk değerinin 160 °C 'de ve kaplama materyalinin ekstrakta oranının yaklaşık %10 seviyelerinde olduğunda en yüksek değerleri verdiği görülmüştür. Ayrıca, renk değerinin kaplama materyalinin ekstrakta oranının %10 seviyelerinde maltodekstrinin/arabik gama oranının ise %100'e yakın olduğu seviyelerde en yüksek değerlere ulaştığı görülmüştür. Yine Şekil 4.13.'de giriş sıcaklığının 160 °C'ye ulaştığı maltodekstrinin-arabik gama oranının ise %100 olduğu uygulamalarda en yüksek seviyelere ulaştığı görülmüştür.



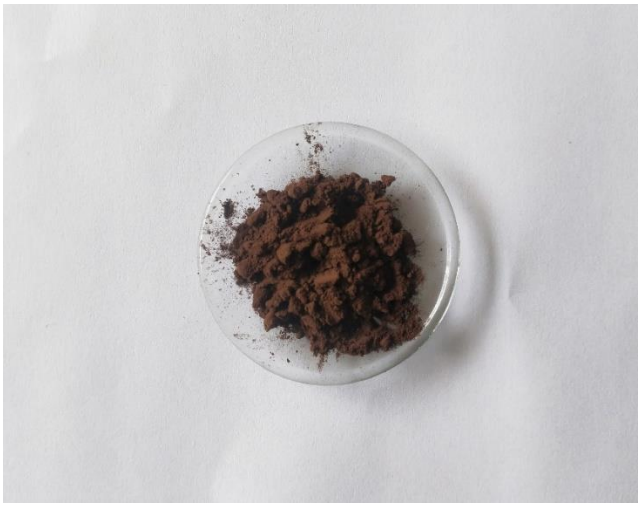
Şekil 4.13. SKK renk değeri etkileşimleri

Şekil 4.13. incelendiğinde toplam fenolik madde içeriğinin 150-160 °C aralığında ve kaplama materyalinin ekstrakta oranının yaklaşık %10 seviyelerinde olduğunda en yüksek değerleri verdiği görülmüştür. Toplam fenolik madde içeriğinin kaplama materyalinin ekstrakta oranının %10 seviyelerinde maltodekstrinin/arabik gama oranının ise %50-100 aralığında en yüksek değerlere ulaştığı görülmüştür. Benzer şekilde TFM içeriğinin giriş sıcaklığının 160 °C'ye ulaştığı maltodekstrinin/arabik gama oranının

sırasıyla 50/50-100/0 aralığında en yüksek değerlere ulaştığı görülmüştür. Sonuçta optimum şartlar altında 160 °C giriş sıcaklığı, %10 Kaplama materyalinin ekstrakta oranı; 80/20 maltodekstrinin/arabik gama oranı olarak Şekil 4.15.'te de görüldüğü üzere pigment ve biyoaktif maddeleri içeren kestane kabuğu pigmentlerinin tozu elde edilmiştir.



Şekil 4.14. Sprey kurutulmuş toz örneğin TFM içeriği etkileşimleri



Şekil 4.15. Sprey kurutulmuş biyoaktif toz boyar maddesi

4.3. Optimum Koşullar ve Bağımlı Değişkenlerin Deneysel Sonuçları

Çizelge 4.16. Ekstraksiyonlar için elde edilen optimum koşullar

Klasik Ekstraksiyonda Optimum Şartlar		
Sıcaklık (˚C)	Süre (dk)	Çözücü Konsantrasyonu (mol/L)
75	60	0.138

Ultrasonik Destekli Ekstraksiyonda Optimum Şartlar		
Sıcaklık (˚C)	Süre (dk)	Çözücü Konsantrasyonu (mol/L)
60	30	0.15

Mikrodalga Destekli Ekstraksiyonda Optimum Şartlar		
Güç (W)	Süre(dk)	Çözücü Konsantrasyonu (mol/L)
800	12	0.115

Sprey Kurutma Optimum Şartlar		
İnlet Sıcaklık (˚C)	Duvar/Materyal Oranı (%)	MD/AG oranı
160	10	80/20

Çizelge 4.16'da belirtildiği gibi 3 ana ekstraksiyon yöntemi olan klasik ekstraksiyon, ultrasonik destekli ekstraksiyon ve mikrodalga destekli ekstraksiyon için Design Expert programı vasıtasıyla yanıt yüzey yöntemi merkezi kompozit deneme tasarımına göre optimizasyon işlemleri gerçekleştirilmiştir. Buna göre klasik ekstraksiyonda 75 °C'de 60 dakika ve 0,138 mol/L çözücü (NaOH) konsantrasyonu olarak gerçekleştirilmiştir. Ultrasonik destekli ekstraksiyonda ise 60 °C'de 30 dakika ve 0,15 mol/L çözücü konsantrasyonu olarak optimum koşullar seçilmiştir. Mikrodalga destekli ekstraksiyonda ise sabit sıcaklık seçildiğinde sıcaklık belirtilen sıcaklığa ulaştığında mikrodalga güç otomatik olarak devre dışı kaldığı için sonuçlarda dalgalanma görülmüştür. Bu nedenle ramping mod olarak isimlendirilen, girilen mikrodalga gücüne enstrümanın yavaş yavaş ulaşması neticesinde çok daha yüksek sonuçlar alınmış elde edilen sonuçlar literatürle benzer hale gelmiştir. Mikrodalga destekli ekstraksiyonda optimum koşullar 800 W mikrodalga gücü, 12 dakika ve 0,115 mol/L olarak elde edilmiştir. Diğer taraftan

ekstraksiyon optimizasyonları gerçekleştikten sonra en yüksek yanıtlar MDE ile gerçekleşmiş ve bu ekstrakt sprey kurutma işlemine tabi tutulmuştur. Burada da Box-Behnken deneme tasarımı kullanılmıştır. Optimum koşullar ise giriş sıcaklığı 160 °C, kaplama materyalinin ektrakta oranı %10 (ağırlık/hacim) ve kaplama materyalleri olan maltodekstrinin arabik gama oranı ağırlıkça 80/20 olarak bulunmuştur.

4.4. Optimize Koşullarda Elde Edilen Sonuçlar

Kestane kabuğu ekstraktında optimum şartlarda bağımlı değişkenlerden elde edilen deneysel veriler

Çizelge 4.17. incelendiğinde kestane kabuğuna herhangi bir işlem uygulanmadan sadece ilk elde edildiği haliyle özellikleri belirlenmiş TFM İçeriği 65,41 (mg GAE/g km), TAK, DPPH yöntemi ile 119,37 mg TE/g km ve CUPRAC Yöntemi 113,74 mg TE/g km olarak bulunmuştur. Ultrasonik destekli ekstraksiyon sonucunda optimum koşullarda renk değeri %17,52; TFM içeriği 190,50 (mg GAE/g km), toplam antioksidan kapasitesi DPPH Yöntemi ile 211,15 mg TE/g km ve CUPRAC Yöntemi 700,38 mg TE/g km ve melanin pigmenti konsantrasyonu %9,15 olarak bulunmuştur. Mikrodalga destekli ekstraksiyon ile optimum koşullarda renk değeri 41,48 TFM içeriği 274,09 mg GAE/g km, toplam antioksidan içeriği DPPH için 543,94 ve CUPRAC 1073,13 mg TE/g km, melanin pigmenti analizi %24,5 olarak bulunmuş ve %95 güven aralığında sonuçlar istatistiki olarak güvenilir bulunmuştur. Mikrodalga destekli ekstraksiyonla ultrasonik destekli ekstraksiyona göre kısa sürede daha yüksek bağımlı değişkenler elde edilmiştir, UDE ile optimum koşullarda renk değeri 17,52 TFM içeriği 190,50 mg GAE/g km, toplam antioksidan içeriği DPPH için 211,15 ve CUPRAC 700,38 mg TE/g km, melanin pigmenti analizi %8,70 olarak bulunmuş ve %95 güven aralığında sonuçlar istatistiki olarak güvenilir bulunmuştur. KE ile optimum koşullarda renk değeri 23,05 TFM içeriği 190,65 mg GAE/g km, toplam antioksidan içeriği DPPH için 315,92 ve CUPRAC 710,39 mg TE/g km, melanin pigmenti analizi %9,12) olarak bulunmuş ve %95 güven aralığında sonuçlar istatistiki olarak güvenilir bulunmuştur.

Çizelge 4.17. Optimum şartlarda bağımlı değişkenlerden elde edilen veriler

Ekstraksiyon Yöntemi	%1 Renk Değeri	Toplam Fenolik Madde İçeriği	Toplam Antioksidan Kapasitesi		Melanin Pigmenti Konsantrasyonu	Ekstraksiyon Verimi
		Folin yöntemi (mg GAE/g km)	DPPH Yöntemi (mg TE /g km)	CUPRAC Yöntemi (mg TE/g km)	km (%)	(%)
Kestane Kabuğu Başlangıç Özellikleri	-	65,41	119,37	113,74		
Klasik Ekstraksiyon	23.05	190,65	315,92	710,39	9,12	69,81
Ultrasonik Destekli Ekstraksiyon	17.52	190,50	211,15	700,38	8,70	64,08
Mikrodalga Destekli Ekstraksiyon	41.50	274,09	543,94	1070,13	24,50	65,29
Sprey Kurutma	14.10	77.10	130,48	288,98	8,10	

4.5. Ekstraksiyon Uygulamalarının Kestane Kabuğunun Bazı Özellikleri Üzerine Etkisi

Kestane kabuğu ekstrelerinin renk değeri, TFM ve TAK üzerine etkileri Çizelge 4.18.'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.18. Ekstraksiyon metotlarının renk ve biyoaktif özelliklerine etkisi

Kestane Kabuğu Ekstraktlarının Renk ve Biyoaktif Özellikleri					
	Ekstraksiyon Yöntemi		**Ort**	**std. Sapma**	**Hata (CV)**
Renk Değeri	Klasik Ekstraksiyon	b	23,05	0,48	*0,016*
	Ultrasonik Destekli Ekstraksiyon	c	17,52	0,51	
	Mikrodalga Destekli Ekstraksiyon	a	41,50	0,06	
Toplam Fenolik Madde İçeriği	Klasik Ekstraksiyon	b	190,65	28,33	*0,082*
	Ultrasonik Destekli Ekstraksiyon	b	190,50	9,83	
	Mikrodalga Destekli Ekstraksiyon	a	274,09	6,63	
Toplam Antioksidan Kapasite(CUPRAC)	Klasik Ekstraksiyon	b	710,39	35,36	*0,0318*
	Ultrasonik Destekli Ekstraksiyon	b	700,38	3,91	
	Mikrodalga Destekli Ekstraksiyon	a	1070,13	28,45	
Toplam Antioksidan Kapasite(DPPH)	Klasik Ekstraksiyon	b	315,92	15,36	*0,0369*
	Ultrasonik Destekli Ekstraksiyon	c	211,15	2,77	
	Mikrodalga Destekli Ekstraksiyon	a	543,94	16,63	

Her bir sonuç için aynı sütundaki farklı harfler istatistiksel olarak anlamlılığı ifade eder (p<0.05)

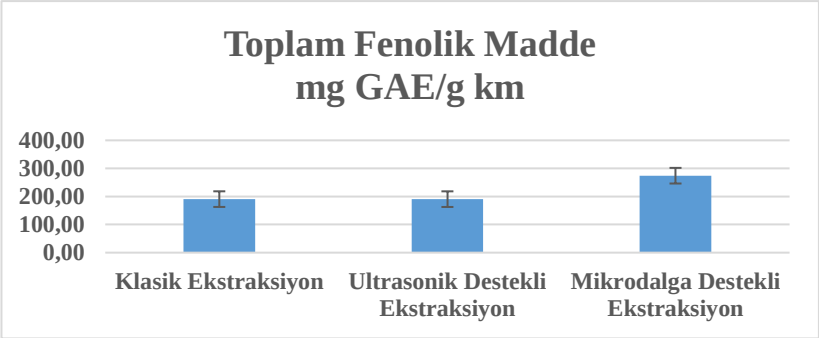
4.5.1. Ekstraksiyon yönteminin toplam fenolik madde üzerine etkisi

Kestane perikarp (dış kabuk; kabuk) ve deri (iç kabuk; zar) yan ürünlerinin kullanımı, biyolojik aktiviteye sahip potansiyel olarak zengin bir bileşik kaynağı olduklarından, yüksek ekonomik ve besinsel değere sahip olabilir. Son birkaç yılda polifenollerinin insan sağlığı üzerindeki etkilerine ilişkin yoğun araştırmalar vardır ve bunlar polifenollerin özellikle kardiyovasküler hastalıklar ve kanserler olmak üzere dejeneratif hastalıkların önlenmesindeki rolünü güçlü bir şekilde desteklemektedir (Scalbert vd., 2005). Kestane kabuğu, doğal bir kahverengi pigmentin çıkarılabileceği kestane işleme sürecinde bir atıktır ve bu kahverengi pigment, yüksek içeriğe, güçlü boyama gücüne ve belirli antioksidan ve bakteriyostazise sahiptir (Gao vd., 2019).

Mevcut çalışmamızda Çizelge 4.18.'de verildiği gibi TFM üzerine ekstraksiyon yöntemlerinin etkisi istatistiksel olarak anlamlı olduğu mikrodalga ekstraksiyonun ultrasonik ve klasik ekstraksiyondan hem yüksek sonuçlar verdiği hem de istatistikçe önemli olduğu yapılan Fisher's t testi sonucu %95 güven aralığında görülmüştür. Diğer taraftan ultrasonik destekli ekstraksiyon ile klasik ekstraksiyon aynı harfle temsil edildiği için aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır. Ancak benzer TFM değerlerine klasik ekstraksiyonda 60 dakikada ulaşılırken ultrasonik destekli ekstraksiyonla 30 dakikada ulaştığı yani daha kısa sürede benzer sonuçların elde edildiği görülmüştür.

TFM'yi optimize etmek için bazı çalışmalar olmasına rağmen, bu çalışma ilk kez bir alkali çözücü MAE kullanılarak yapılmıştır. Squillaci vd., (2018), kaynar su kullanarak. TFM'nin iç ve dış kestane kabuğunun karışımını ekstrakte etmişler ve TFM'yi 205.99 mg GAE/g kuru ekstrakt olarak bulmuşlardır. Bununla birlikte, Pinto vd., (2021a) 40 bar basınçta su kullanarak kritik altı su ekstraksiyonu ile 315,21 mg GAE/g dw ila 496,80 mg GA/g DW olarak daha yüksek TFM sonuçları elde etmiştir. Pinto vd.,(2021b) tarafından farklı konsantrasyonlarda etanol ve 300 W MDE kullanılarak tarafından yapılan bir başka çalışmada 110,96 ile 173,89 mg/g GAE arasında daha düşük TFM sonuçları elde etmişlerdir. Fernández-agulló vd., (2014) tarafından yapılan başka bir çalışmada, MDE vasıtasıyla su, etanol ve metanolden oluşan farklı bir solvent konsantrasyonu ile elde edilen TFM sonuçları 33,90- 49,86 g GAE/100 g km arasında değişmiştir. Ayrıca,

Vázquez vd., (2009) TFM için benzer sonuçları 23,54 – 41,84 g GAE/100 g km olarak elde etmiştir. Cacciola vd., (2019), tarafından yapılan bir çalışmada çözücü olarak su kullanıldığında ve 1000 W mikrodalga gücü uygulandığında TFM 247,63 mg GAE/g km olarak bulunmuş olup gerçekleştirdiğimiz MDE sonuçları ile uyumlu olduğu görülmüştür. Devamında Cacciola vd., (2019), ultrasonik destekli ekstraksiyon ve klasik destekli ekstraksiyon için sırasıyla 190,12 ve 312,44 mg GAE /g olarak sonuçlar raporlamışlardır. Bu sonuçlardan ultrasonik ve mikrodalga destekli ekstraksiyon sonuçları bizim çalışmamızla uyumlu iken klasik ekstraksiyonda daha düşük sonuçlar elde ettiğimiz gözlenmiştir. Klasik ekstraksiyonla farklı sonuç elde etmemizin nedeni olarak Cacciola vd., (2019) kaynayan su banyosunda 1 saat süreyle ekstraksiyon gerçekleştirmelerinden kaynaklanmış olabileceği düşünülmüştür. Yine Lameirão vd., (2020) tarafından yapılan bir çalışmada kestane kabuğu ultrasonik güç uygulayan cihazla sulu ekstrakt hazırlamışlar ve TFM miktarı optimizasyon sırasında 255,8 mg GAE/g km (55 °C, 4 dk) ile 418,0 mg GAE / g km (34 °C, 25 dk) arasında değiştiği belirtilmiştir. Bu sonuçların bizim ultrasonik destekli ekstraksiyon sonuçlarımıza göre daha yüksek olduğu görülmektedir. Bunun nedeni olarak kullanılan kestane çeşitleri olabileceği gibi, ultrasonik destekli ekstraksiyonda bizim ultrasonik banyo kullanmamız Lameirão vd., (2020)'nin doğrudan ultrasonik prob kullanması olabileceği düşünülmüştür. Başka bir çalışmada Silva vd., (2020) tarafından yapılan bir çalışmada kestanenin iç ve dış kabukları etanolle 2 saat karıştırılıp 5 dakikada ses dalgaları uygulanarak oda sıcaklığında ekstraksiyon gerçekleştirilmiştir. Bunun sonucunda kestanenin iç kabuğunun 321 µg of epikateşin eşdeğeri/mg, dış kabuğunun 240 µg of epikateşin eşdeğeri/mg olarak genelde raporlanan gallik asit eşdeğeri sonuçlarından farklı sonuçlar raporladıkları görülmüştür.



Şekil 4.16. Ekstraksiyonlara göre TFM içeriği değişimi

4.5.2. Ekstraksiyon yönteminin renk değeri üzerine etkisi

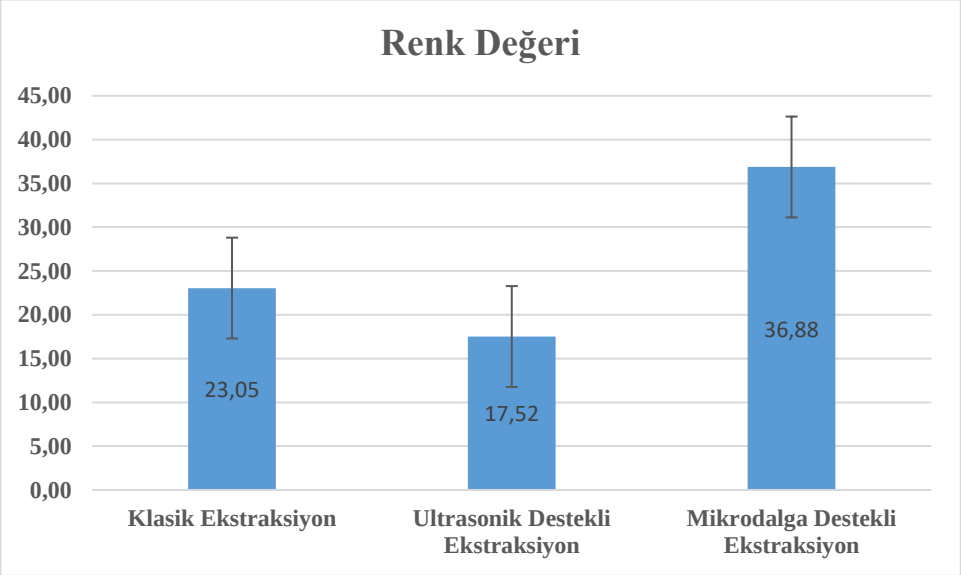
Meyve ve sebze işleme endüstrileri çok büyük miktarda atık ürettiğinden ve bu atıklar genellikle ticari değeri yüksek biyoaktif pigmentler içerdiğinden, bu atıkların biyoaktif pigmentler için değerlendirilmesi gelir getirecek ve biyoaktif pigmentler için sürdürülebilir bir üretim yöntemi sağlayacaktır. Meyve ve sebzeler gibi bitki kaynaklarından biyoaktif pigmentlerin üretimi mevcudiyet ve daha da önemlisi ekstraksiyon prosedürü ile belirlenir. Ekstraksiyon, seçilen bir bileşik veya bileşik gruplarının katı veya sıvı formda kimyasal, fiziksel veya mekanik işlemlerle bir matristen ayrılmak üzere kütle transferini içeren bir birim işlemdir (Prado vd., 2014).

Bu tez konusunun odak konularından biri kestane kabuğu ekstraktının renk değerleridir. Optimum koşullarda elde edilen ekstraktların yanıt olarak bağımlı değişkenlerin deneysel değerlerine bakıldığında nötr pH'ta renk değerleri klasik ekstraksiyon, ultrasonik destekli ekstraksiyon ve mikrodalga destekli ekstraksiyon uygulamalarında ekstraktın %1 konsantrasyonunda sırasıyla 23,05; 17,52 ve 41,48 olarak değişmiştir. Çizelge 4.17.'de istatistiksel olarak ekstraktlar arasında fark olduğu en yüksek renk değerinin mikrodalga destekli ekstraksiyonda gerçekleştiği ultrasonik ve klasik ekstraksiyonlar arasında da istatistiksel olarak fark olduğu görülmüştür (p<0.05).

Ekstrakt olarak kestane kabuğunun renk değeri de Chen vd., (2018) tarafından araştırılmıştır. Renk değerlerini etanolde (%28 v/v) 31,25; 83 °C ekstraksiyon sıcaklığı ve pH 13 koşullarında 2,3 saat ekstraksiyon süresi olarak bulmuşlardır. Bu çalışmada daha uzun ekstraksiyon süresi uygulanmış ve bizim çalışmamıza göre daha düşük bir renk değeri belirlenmiştir. Öte yandan, daha yüksek pH değerlerine sahip olmaları analizde dalgalanmalara neden olabilir. You vd., (2014) tarafından yapılan araştırmada kestane kabuğu pigmentlerinin renk sonuçları kantitatif değerlerle ifade edilmemiştir.

Yao vd., (2012), farklı pH'larda 3 farklı fraksiyon elde ederek kestane kabuğu pigmentlerinin değerlenmesini incelediği görülmüştür. Fraksiyon 1, Fraksiyon 2 ve Fraksiyon 3 için sırasıyla renk sonuçları 68,5; 41,8 ve 27,0 mg/g olarak bulunmuştur. Ayrıca Fraksiyon 1'in nötr pH'ta elde edildiği ve suda çözünmediği bildirilmiştir. Kestane kabuğunun renk özellikleri ile ilgili sınırlı sayıda çalışma olmasına rağmen, çalışmamız

mikrodalga destekli ekstraksiyon açısından yapılan önceki araştırmalara göre daha kısa sürede daha yüksek renk değerleri elde edildiğini ortaya koymuştur.



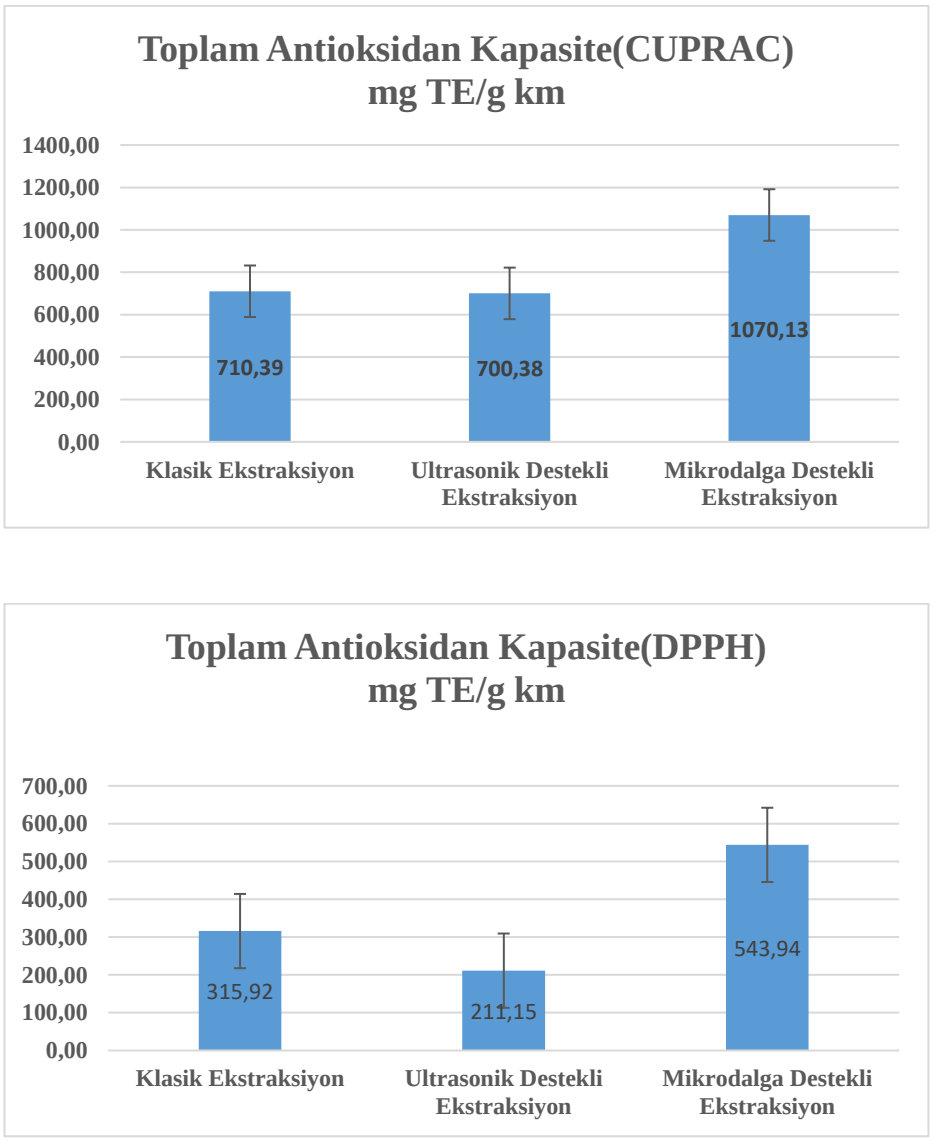
Şekil 4.17. Ekstraksiyonlara göre renk değeri değişimi

4.5.3. Ekstraksiyon yönteminin toplam antioksidan kapasitesi üzerine etkisi

Kestane kabuklarından biyoaktif bileşiklerin geri kazanımı ile ilgili bazı çalışmalar olmasına rağmen, DPPH sonuçları açısından aynı birimi gösteren sınırlı sayıda araştırma vardır. Çizelge 4.18.'de belirtildiği üzere klasik ekstraksiyon, ultrasonik destekli ekstraksiyon ve mikrodalga destekli ekstraksiyon için DPPH sonuçları sırasıyla 315,92; 211,15 ve 543,94 olarak tespit edilirken CUPRAC sonuçları 710,39; 700,38 ve 1070,13 mg TE/g km olarak tespit edilmiştir. DPPH sonuçları için 3 ekstraksiyon için de istatistiki olarak anlamlı bir fark olduğu görülmüştür (p<0,05). CUPRAC sonuçları üzerine ekstraksiyon yöntemlerinin MDE için diğer ekstraksiyonlara göre istatistiki olarak anlamlı bir fark olduğu (p<0,05) ancak klasik ekstraksiyon ile UDE arasında anlamlı bir fark olmadığı görülmüştür (p>0,05).

Gulsunoglu vd. (2019) tarafından kestanenin iç ve dış kabukları çıkarılmış ve TAK cinsinden karakterize edilmiştir. Metanolik ve alkali ekstraksiyonla serbest ve bağlı antioksidanlar dahil sırasıyla CUPRAC ve DPPH'de yaklaşık 350 mg TE/g km ve 110 mg TE/g km tespit edilmiş olup daha düşük sonuçlar bildirdikleri görülmüştür. Pinto vd.,

(2021a) kestane kabuklarına uyguladıkları kritik altı su ekstraksiyonla 549,23 ila 1125,68 mg (TE)/g km olarak daha yüksek DPPH sonuçları elde ettiği raporlanmıştır. Yapılan bu çalışmalarının sonuçları, yüksek TFM elde ettiklerinden dolayı yüksek TAK sonuçları göstermiştir. Fernández-agulló vd. (2014) kestane kabuklarıyla ilgili yaptıkları çalışmada hem maserasyon hem de mikrodalga destekli ekstraksiyon gerçekleştirmişler bunun sonucunda TFM'nin yanı sıra DPPH sonuçlarını da bildirmişlerdir. DPPH sonuçları 4,80-5,85 mmol (TE)/g ekstrakt arasında rapor edilmiştir. Sonuçlar bizim çalışmamıza göre daha yüksek TFM sonuçları (33,39- 49,86 g GAE/100 g) görülmüştür.



Şekil 4.18. Ekstraksiyonlara göre TAK (CUPRAC ve DPPH) sonuçları değişimi

4.5.4. Ekstraksiyon yönteminin fenolik maddeler ve flavonoidler üzerine etkisi

Pigment içeren kestane kabuğu ekstraktları, yüksek miktarda fenolik bileşik ve antioksidan kapasiteye sahiptir. Biyoaktif bileşenlerin tespiti HPLC cihazı ile gradyan hareketli faz koşulları ile gerçekleştirilmiştir. Kurutulmuş kestane kabuğu ekstreleri, metabolik ekstraksiyonunun ardından, 0,45 µm filtreden süzülerek numuneler otomatik numune alıcı (otosampler) ile HPLC'ye enjekte edilmiştir. Bu ekstraktların kromatogramlarında 17 analit taranmasına rağmen, bunlardan 7'si biyoaktif bileşenlerin standartlarının alıkonma süresini, spektrumları ve kalibrasyon eğrileri eşleştirilerek tanımlanmıştır. Tüm ekstraktlarda çoğunlukla gallik asit, ellagik asit, protokateşuik asit, kateşin ve epikateşin olmak üzere majör fenolikler ve mirisetin-3-glikozit ve şıringatin-3-glikozit gibi flavonoidler tespit edilmiştir. Çizelge 4.19.'a göre klasik, ultrasonik ve mikrodalga destekli ekstraksiyonlarda gallik asit kurutulmuş ekstraktta sırasıyla 32,16; 93,45 ve 531,32 mg/kg şeklinde olduğu belirlnemiş ve 3 ekstraksiyon arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu görülmüştür (p<0,05) bulunduğu; ellagik asit 84,80, 62,8 ve 479,17 mg/kg ke şeklinde bulunduğu istatistiksel olarak MDE ile UDE ve KE arasında istatistiksel olarak anlamlı sonuç bulunduğu (p<0,05) fakat UDE ile KE arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmadığı (p>0,05); protokateşuik asit sonuçlarının sırasıyla 13,68; 56,85 ve 459,38 mg/kg ke olduğu ve 3 ekstraksiyon yöntemi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu; kateşin sonuçlarının 10,52; 16,53 ve 455,19 mg/kg ke MDE ile UDE, KE arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu (p<0,05) fakat UDE ile KE sonuçları arasında anlamlı bir fark olmadığı (p>0,05); epikateşin sonuçlarının ekstraksiyonlar sonucunda sırasıyla 8,22; 11,53 ve 139,28 mg/kg ke olarak bulunduğu ve 3 ekstraksiyon arasında da istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olduğu görülmüştür (p<0,05). Diğer flavonoidler olan mirisetin-3-glucozit ve şıringatin-3-glucozit KE ve UDE ekstraksiyonlarda tespit edilemediği bu nedenle ekstraksiyonlar arasında karşılaştırma yapılamamıştır. Sadece MDE'de 66,03 ve 9,80 mg/kg ke sonuç elde edilmiştir. Her bir fenolik bileşen için ekstraksiyon yönteminin değişimi Şekil 4.19. (A-E)'da görülmektedir. Buradan da anlaşılacağı üzere tüm ekstraksiyonlar arasında mikrodalga destekli ekstraksiyonun fenolik bileşenler özütlemesini arttırıcı etkisi görünmektedir.

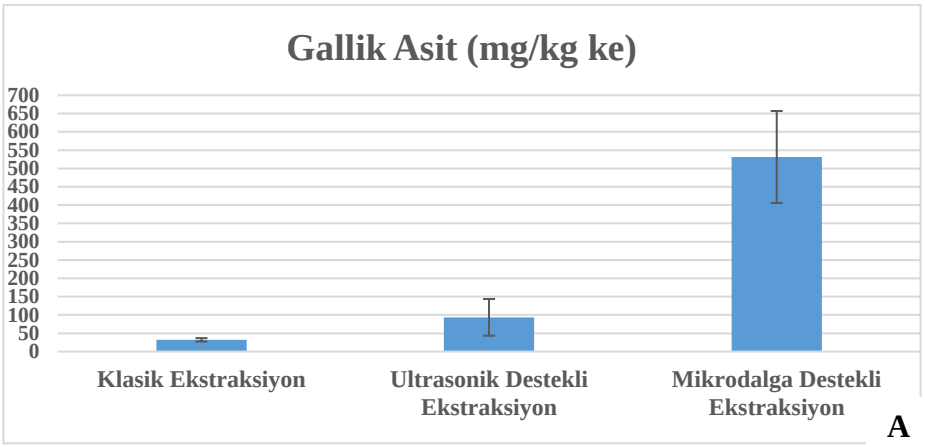
Squillaci vd. (2018), kestane kabuğunun biyoaktif bileşikleri geri kazanmak için kaynayan su kullanmış ve fenolikleri HPLC-RP ile karakterize etmiştir. Gallik asit (29,62 mg/g km), ellagik asit (0,63 mg/g km), protokateşuik asit (3,43 mg/g km), kateşin (0,32 mg/g km) ve epikateşin (0,32 mg/g km) bildirilmiştir. Bu çalışmada bizim çalışmamıza göre tüm ekstrakt sonuçları için daha yüksek gallik asit ve protokateşuik asit konsantrasyonları belirlemişler, diğer biyoaktif bileşenlerin miktarı ise bizim çalışmamızla benzerlik taşıdığı görülmüştür. Sonuçlar arasındaki farklılığın nedeni olarak, mikrodalga destekli ekstrakta uygulanan daha yüksek sıcaklık, kullanılan farklı NaOH çözgeninin olması veya Türkiye'ye özgü farklı kestane çeşidi kullanımından kaynaklanabileceği düşünülmüştür. Pinto vd., (2021a), ekstraksiyon sıcaklığını 80°C'den 220°C'ye yükseltilmesiyle gallik asit miktarında azalma (1,36'dan 0,54 mg/g km) bildirmişlerdir. Bu sonuç mevcut çalışmamızdaki özellikle mikrodalga destekli ekstraksiyonla daha uyumlu olduğu görülmüştür. Ekstraktlara yüksek sıcaklık uygulanmasının gallik asit ve protokateşuik asit yapısının bozulmasına neden olabileceği düşünülmüştür. Aires vd., (2016) kestane kabuğunun H_2O, Na_2SO_3 ve NaOH ile 30, 60, 120, 240, 480 ve 960 dakika 85 °C'de geleneksel ekstraksiyon uygulamışlardır, HPLC ile fenolikler açısından rapor edilen ekstraktları ve benzer sonuçları, gallik asit (7,9 ve 584,9 µg/g km), ellagik asit (47,6 ve 3542,6 µg/g km), epigallocateşin (13,6 ve 213,4 µg/g km), kateşin (151,1 ve 295,9 µg/g km) ve epikateşin (9,0 ve 66,8 µg/g km) olduğunu belirterek karakterize etmişlerdir, Lameirão vd. (2020), tarafından yapılan bir çalışmada 70 °C'de ve 40 dk süreyle ultrasonik koşullarla elde edilen kestane kabuğu ekstraktında kateşin (7,4 µg/mg km), ellagik asit (40,4 µg/mg km) ve epigallokateşin (15,3 µg/mg km) olarak belirlenmiştir. Ellagik asit ve kateşin sonuçları mevcut çalışmamızın ultrasonik ekstraktraksiyon sonucu elde edilen sonuçlarımızla benzer olduğu görülmüştür. Başka bir çalışmada gallik asit (1,36 mg/g km), ellagik asit (1,19 mg/g km), kateşin (0,56 mg/g km), epikateşin (0,05 mg/g km) ve mirisetin-3-glikozit (0,05 mg/g km) süperkritik su ekstraksiyonu yoluyla 80 °C ve 10 dakikada elde edilen ekstraktta beyan edilmiştir. Ancak aynı çalışmada farklı koşullarda (220 °C 30 dk.) kritik altı su ekstraksiyon yöntemi ile 220 °C'de 30 dk boyunca gallik asit 0,54; protokateşuik asit 2,83 ve ellagik asit 2,86 mg/g km olarak rapor edilmiştir (Pinto vd., 2021a). Bu sonuçlar bizim çalışmamızdan genel olarak biyoaktif bileşenler açısından daha yüksek olduğu görülmüştür. Bunun olası nedeni, kritik altı su ekstraksiyonunun daha uzun süre (30 dakika) ve daha yüksek basınç

(40 bar) uygulanmasıdır. Her bir ekstraksiyon yöntemine ait HPLC kromatogramları EK 21-22 ve 23'te verilmiştir

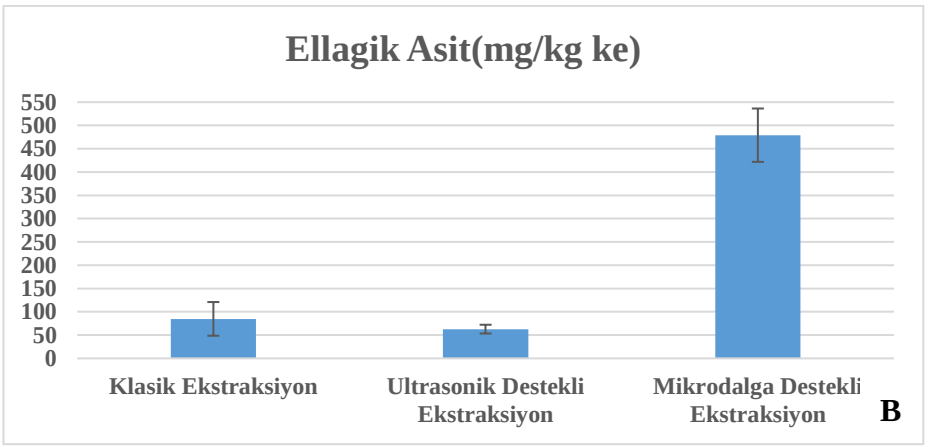
Çizelge 4.19. Ekstraksiyon yöntemlerinin fenolik bileşenler üzerine etkisi

Fenolik Bileşenler Flavonoidler (mg/kg kuru ekstrakt)	**Ekstraksiyon Yöntemi**		**Ort**	**Std. Sapma**	**Hata (CV)**
Gallik Asit	Klasik Ekstraksiyon	c	32,16	4,61	*0,064*
	Ultrasonik Destekli Ekstraksiyon	b	93,45	50,11	
	Mikrodalga Destekli Ekstraksiyon	a	531,32	125,62	
	Ort		218,98		
Ellagik Asit	Klasik Ekstraksiyon	b	84,8	36,17	*0,222*
	Ultrasonik Destekli Ekstraksiyon	b	62,81	9,4	
	Mikrodalga Destekli Ekstraksiyon	a	479,17	57,26	
	Ort		208,93		
Protokateşuik Asit	Klasik Ekstraksiyon	c	13,68	3,12	*0,028*
	Ultrasonik Destekli Ekstraksiyon	b	56,85	27,85	
	Mikrodalga Destekli Ekstraksiyon	a	459,38	29,54	
	Ort		176,64		
Kateşin	Klasik Ekstraksiyon	b	10,52	6,08	*0,059*
	Ultrasonik Destekli Ekstraksiyon	b	16,53	2,13	
	Mikrodalga Destekli Ekstraksiyon	a	455,19	24,02	
	Ort		160,75		
Epikateşin	Klasik Ekstraksiyon	c	8,22	1,24	*0,039*
	Ultrasonik Destekli Ekstraksiyon	b	11,53	0,92	
	Mikrodalga Destekli Ekstraksiyon	a	139,28	17,58	
	Ort		53,01		
Miricetin-3-glukosit	Klasik Ekstraksiyon		TE		
	Ultrasonik Destekli Ekstraksiyon		TE		
	Mikrodalga Destekli Ekstraksiyon		66,03	4,31	
	Ort		66,03	4,31	
Şırıngatin-3-glukosit	Klasik Ekstraksiyon		TE		
	Ultrasonik Destekli Ekstraksiyon		TE		
	Mikrodalga Destekli Ekstraksiyon		9,80	2,55	
	Ort		9,80	2,55	

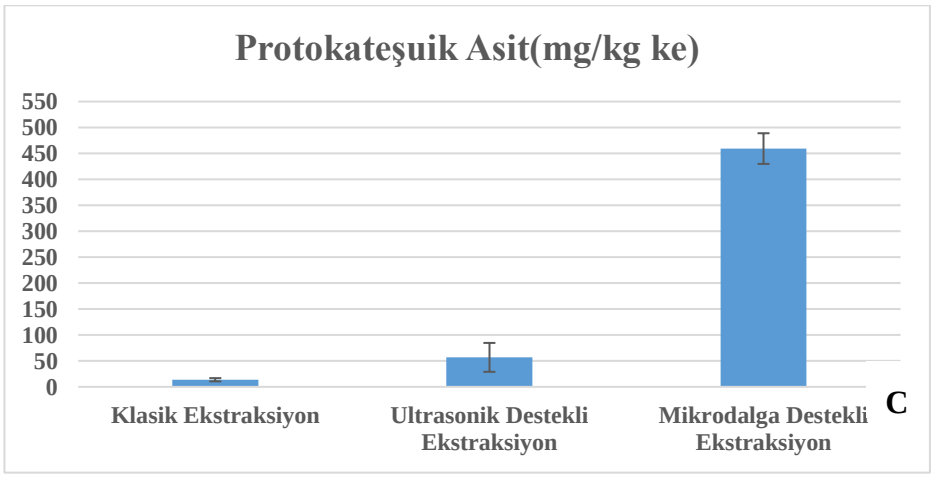
TE: Tespit Edilemedi Her bir bileşen için aynı sütundaki farklı harfler istatistiksel olarak anlamlılığı ifade eder (p<0,05)


Gallik Asit (mg/kg ke)
700
650
600
550
500
450
400
350
300
250
200
150
100
50
0
Klasik Ekstraksiyon
Ultrasonik Destekli Ekstraksiyon
Mikrodalga Destekli Ekstraksiyon

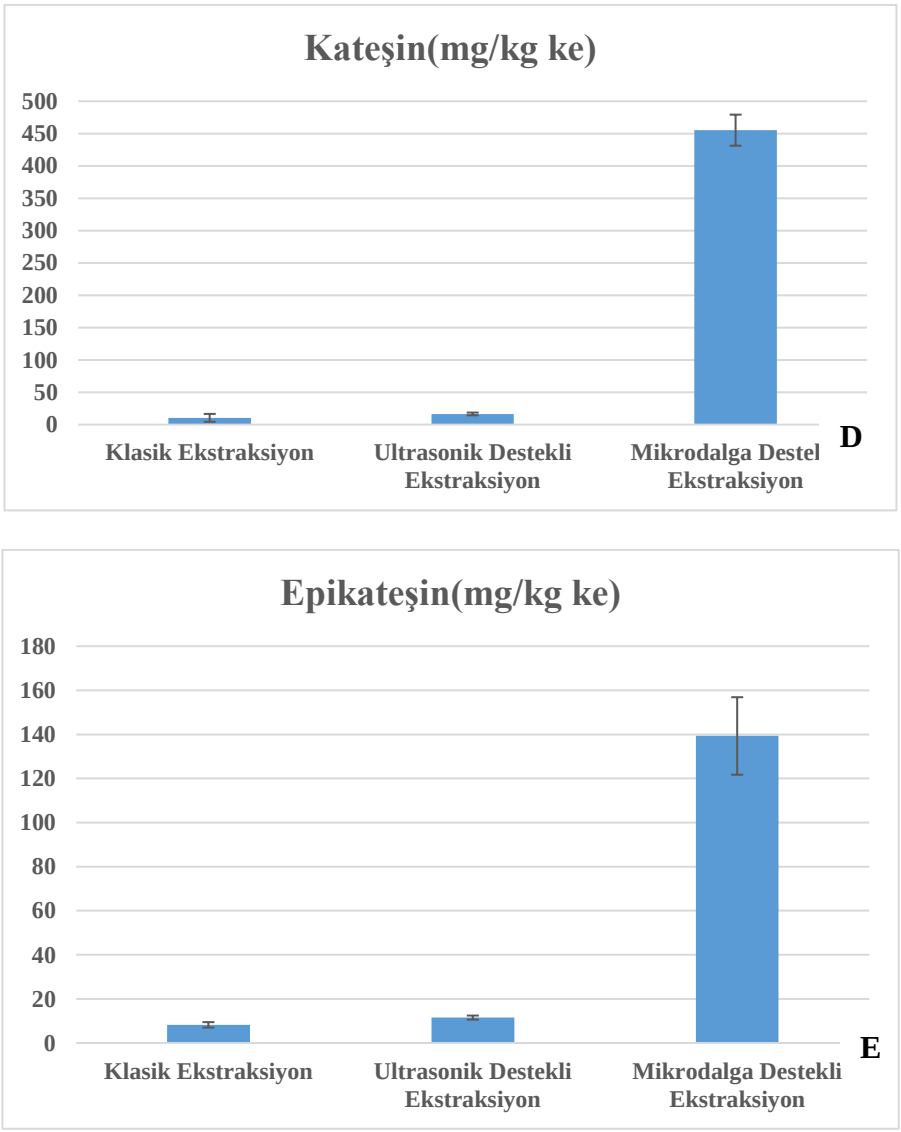
A


Ellagik Asit(mg/kg ke)
550
500
450
400
350
300
250
200
150
100
50
0
Klasik Ekstraksiyon
Ultrasonik Destekli Ekstraksiyon
Mikrodalga Destekli Ekstraksiyon

B


Protokateşuik Asit(mg/kg ke)
550
500
450
400
350
300
250
200
150
100
50
0
Klasik Ekstraksiyon
Ultrasonik Destekli Ekstraksiyon
Mikrodalga Destekli Ekstraksiyon

C



Şekil 4.19. Biyoaktif bileşenlerin miktarının ekstraksiyon yöntemine göre değişimi **A)** Gallik asit **B)** Ellagik asit **C)** Protokateşuik asit **D)** Kateşin **E)** Epikateşin

4.5.5. Ekstraksiyon yönteminin mineral madde üzerine etkisi

Çizelge 4.20. Ekstraksiyon yöntemlerinin mineral ve ağır metallar üzerine etkisi

Kestane Kabuğu Ekstraktlarının Mineral İçeriği (mg/kg kuru ekstrakt)					
	Ekstraksiyon Yöntemi		**Ort**	**std. Sapma**	**Hata (CV)**
Sodyum (Na)	Klasik Ekstraksiyon	a	2625,33	61,45	*p>0,05 olduğu için hesaplanmadı*
	Ultrasonik Destekli Ekstraksiyon	a	2588,50	201,53	
	Mikrodalga Destekli Ekstraksiyon	a	2378,67	72,14	
Magnezyum (Mg)	Klasik Ekstraksiyon	ab	33,63	0,75	0,6117
	Ultrasonik Destekli Ekstraksiyon	b	29,47	1,59	
	Mikrodalga Destekli Ekstraksiyon	a	39,97	0,65	
Fosfor (P)	Klasik Ekstraksiyon	a	19,60	3,85	*p>0,05 olduğu için hesaplanmadı*
	Ultrasonik Destekli Ekstraksiyon	a	17,97	0,31	
	Mikrodalga Destekli Ekstraksiyon	a	18,70	1,15	
Potasyum (K)	Klasik Ekstraksiyon	a	150,07	11,97	*p>0,05 olduğu için hesaplanmadı*
	Ultrasonik Destekli Ekstraksiyon	a	136,77	5,45	
	Mikrodalga Destekli Ekstraksiyon	a	160,23	1,57	
Kalsiyum (Ca)	Klasik Ekstraksiyon	a	90,57	2,68	*p>0,05 olduğu için hesaplanmadı*
	Ultrasonik Destekli Ekstraksiyon	a	86,13	6,77	
	Mikrodalga Destekli Ekstraksiyon	a	102,50	7,78	
Demir (Fe)	Klasik Ekstraksiyon	a	7,07	0,48	*p>0,05 olduğu için hesaplanmadı*
	Ultrasonik Destekli Ekstraksiyon	a	6,03	0,52	
	Mikrodalga Destekli Ekstraksiyon	a	5,76	0,45	
Bakır (Cu)	Klasik Ekstraksiyon		T.E.		*p>0,05 olduğu için hesaplanmadı*
	Ultrasonik Destekli Ekstraksiyon		T.E.		
	Mikrodalga Destekli Ekstraksiyon		T.E.		
Çinko (Zn)	Klasik Ekstraksiyon	a	3,02	1,86	*p>0,05 olduğu için hesaplanmadı*
	Ultrasonik Destekli Ekstraksiyon	a	0,77	0,09	
	Mikrodalga Destekli Ekstraksiyon	a	2,88	1,50	
Arsenik (As)	Klasik Ekstraksiyon		T.E		*p>0,05 olduğu için hesaplanmadı*
	Ultrasonik Destekli Ekstraksiyon		T.E		
	Mikrodalga Destekli Ekstraksiyon		T.E		
Kadmiyum (Cd)	Klasik Ekstraksiyon		T.E		*p>0,05 olduğu için hesaplanmadı*
	Ultrasonik Destekli Ekstraksiyon		T.E		
	Mikrodalga Destekli Ekstraksiyon		T.E		
Civa (Hg)	Klasik Ekstraksiyon		T.E		*p>0,05 olduğu için hesaplanmadı*
	Ultrasonik Destekli Ekstraksiyon		T.E		
	Mikrodalga Destekli Ekstraksiyon		T.E		
Kurşun (Pb)	Klasik Ekstraksiyon		0,14	0,06	*p>0,05 olduğu için hesaplanmadı*
	Ultrasonik Destekli Ekstraksiyon		T.E.		
	Mikrodalga Destekli Ekstraksiyon		0,10	0,03	
Alüminyum (Al)	Klasik Ekstraksiyon	ab	7,14	0,80	0,079
	Ultrasonik Destekli Ekstraksiyon	a	9,85	2,69	
	Mikrodalga Destekli Ekstraksiyon	b	5,45	0,35	

Kestane kabuğu ekstraktları mineral maddeler yönünden incelendiğinde (Çizelge 4.20.) ekstraksiyon çözeltisinin NaOH olması nedeniyle Na mineralinin ekstraktlarda yüksek miktarda olduğu, diğer taraftan genel olarak ekstraksiyon yöntemleri arasında mineral maddeler ve ağır metaller yönünden istatistiki olarak fark olmadığı ancak potasyum ve kalsiyum mineralinin diğer minerallere göre yüksek olduğu, ağır metaller yönünden bakır, arsenik, kadmiyum ve civa tespit edilmezken çinko ve alüminyum tespit edildiği görülmüştür. Ağır metaller açısından kurşun, civa kadmiyum miktarlarının Türk Gıda Kodeksi Bulaşanlar Yönetmeliği'ne uygun olduğu diğer ağır metallerle ilgili tebliğde bir sınır olmadığı gözlenmiştir (Tarım ve Orman Bakanlığı 2011).

4.5.6. Ekstraksiyon yönteminin melanin pigmenti konsantrasyonu üzerine etkisi

Kestane kabuğu ekstraktlarının melanin pigmenti miktarları ekstraksiyonlara göre istatistiksel olarak farklılık göstermiş (p<0,05) mikrodalga destekli ekstraksiyonun ultrasonik destekli ekstraksiyon ve klasik ekstraksiyon arasında istatistiksel olarak farklılık (p<0,05) olduğu görülmüş ancak ultrasonik destekli ekstraksiyon ile klasik ekstraksiyon arasında melanin konsantrasyonu açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir (p>0,05). MDE yöntemiyle ilk kestane kabuğu tozuna göre seyreltme dikkate alındığında melanin pigmenti konsantrasyonu %24,49±0,27; UDE için %8,70±0,81 ve KE için %9,10±0,16 kuru madde olarak bulunmuştur. Melanin pigmenti kalibrasyon eğrisi, 2,5 ila 100 mg/kg (R^2=0,9999) olarak hazırlanmış ve lineer doğrusal aralıkta sonuçlar elde edilmiştir. Yao ve Qi, (2016), kestane kabuklarının %15 oranında kahverengi melanin pigmentlerine sahip olduğunu belirtmiştir. Bu çalışmada bildirilen sonuçlar, ekstraksiyonların mikrodalga desteği ile yapıldığı bizim araştırmamızdan daha düşük olduğu görülmüştür. Öte yandan Yao vd. (2012) kestane kabuğu kahverengi pigmentlerini araştırmış ve ekstraktları üç farklı fraksiyona ayırmış ve melanin sonuçlarını 1, 2 ve 3 fraksiyonları için sırasıyla 68,5; 41,8 ve 27,0 mg/g olarak bildirmişlerdir. Bu sonuçlar da bizim çalışmamızdan daha düşük sonuçlar içerdiği görülmüştür. Çünkü saflaştırma uygulamalarının daha düşük ekstraksiyon sonuçlarının nedeni olabileceğini düşünülmüştür. Bazı çalışmalarda kestane kabuğu melanin pigmentleri karakterize edilmiş ancak melanin konsantrasyonunu rapor edilmemiştir (You vd., 2014). Zou ve Jiang (2015), siyah çay yapraklarının ekstraktını incelemiş ve 271,40 mg/100 g melanin miktarı bularak bizim çalışmamıza göre daha düşük sonuçlar

bildirmişlerdir. Keles ve Özdemir (2018) tarafından yapılan başka bir çalışmada ise melanin pigmentini elde etmek için ayçekirdeği kabukları kullanılmıştır. Ayçekirdeği kabuklarında %1,95 (w/w) oranında fitomelanin bulmuşlardır.

4.5.7. Ekstraksiyon yönteminin fizikokimyasal ve antibakteriyel özellikler üzerine etkisi

Çizelge 4.21. incelendiğinde kestane kabuğu ekstraktlarının ekstraksiyon verimi ağırlık üzerinden hesaplanmış sonuçlar KE, UDE ve MDE için sırasıyla %69,81±4,56; 64,08±5,07; 65,30±8,21 olarak bulunmuş ancak ekstraktlar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir (p>0,05). Aires vd., (2016), farklı ekstraksiyon solventleri (H_2O, Na_2SO_3 ve NaOH) farklı konsantrasyonlarda (%0, %1, %2, %4 ve %8) kullanmış 85 °C'de ekstraksiyon işlemleri 30, 60, 120, 240, 480 ve 960 dk. olarak farklı sürelerde gerçekleştirmişlerdir. Mevcut çalışmamızda tüm ekstraksiyon uygulamalarında ekstraksiyon verimi %60-70 aralığında çıkmış dolayısıyla Aires vd., (2016)'den daha yüksek ekstraksiyon verimi elde edilmiş ancak onların uyguladığı %4 ve üzeri NaOH konsantrasyonlarında benzer ekstraksiyon verimleri elde edilmiştir, Cacciola vd., (2019) kestane kabuğu ile yaptıkları çalışmada ekstraksiyon için su kullanmışlar KE, UDE ve MDE uygulamışlardır, Ekstraksiyon verimi sırasıyla ağırlıkça %5,2; 2,2 ve 3,8 olarak mevcut çalışmaya göre çok daha düşük ekstraksiyon verimi elde etmişlerdir, Rodrigues vd., (2015), kestane kabuklarının %50 etanolik karışımları ile ektraksiyon hazırlamışlar ve %12,57±0,01 ve 13,67±0,02 sonuç raporlamışlardır, Burada mevcut çalışmamızdaki ağırlıkça % ekstraksiyon veriminin genelde yüksek olmasının nedeni bazik bir solvent kullanılmasından olabileceği düşünülmüştür, Vázquez vd., (2009) %10 NaOH ile yapılan ekstraksiyonla sıcaklığın artmasıyla ve pH artışına paralel olarak ekstraksiyon veriminin %49,4 olarak raporlarken, Vázquez vd., (2012), metanolik ve etanolik çözücülerle yaptıkları ekstraksiyonlarda sırasıyla %10,52–19,70; %11,82–18,93 olarak raporlamışlardır.

Çizelge 4.21. Ekstraksiyon yöntemlerinin fizikokimyasal ve antibakteriyel özelliklere etkisi

Kestane Kabuğu Ekstraktlarının Fizikokimyasal ve Antibakteriyel Özellikleri					
	Ekstraksiyon Yöntemi		**Ort**	**std. Sapma**	**Hata CV)**
Ekstraksiyon Verimi (%)	Klasik Ekstraksiyon	a	69,81	4,56	*p>0,05 olduğu için hesaplanmadı*
	Ultrasonik Destekli Ekstraksiyon	a	64,08	5,07	
	Mikrodalga Destekli Ekstraksiyon	a	65,30	8,21	
	Ort				
Antibakteriyel Aktivite (*S.aureus*)(e)	Klasik Ekstraksiyon	b	11,87	0,76	0,067
	Ultrasonik Destekli Ekstraksiyon	a	17,27	1,54	
	Mikrodalga Destekli Ekstraksiyon	a	19,28	1,07	
	Ort				
Kül (%e)	Klasik Ekstraksiyon	a	0,65	0,10	*p>0,05 olduğu için hesaplanmadı*
	Ultrasonik Destekli Ekstraksiyon	a	0,70	0,09	
	Mikrodalga Destekli Ekstraksiyon	a	0,68	0,02	
	Ort				
HCl'de Çözünmeyen Kül (e)	Klasik Ekstraksiyon	a	0,05	0,03	*p>0,05 olduğu için hesaplanmadı*
	Ultrasonik Destekli Ekstraksiyon	a	0,06	0,05	
	Mikrodalga Destekli Ekstraksiyon	a	0,04	0,01	
	Ort				
Melanin Pigmenti Konsantrasyonu (mg/kg km)	Klasik Ekstraksiyon	b	90989,15	15706,57	*0,092*
	Ultrasonik Destekli Ekstraksiyon	b	86960,81	8138,38	
	Mikrodalga Destekli Ekstraksiyon	a	244926,95	2704,96	
	Ort				
Nişasta (%e)	Klasik Ekstraksiyon	b	0,69	0,17	*0,1421*
	Ultrasonik Destekli Ekstraksiyon	a	1,44	0,11	
	Mikrodalga Destekli Ekstraksiyon	b	0,38	0,03	
	Ort				
L*(%1 kons.)	Klasik Ekstraksiyon	b	2,12	0,48	*0,4715*
	Ultrasonik Destekli Ekstraksiyon	a	6,46	2,02	
	Mikrodalga Destekli Ekstraksiyon	b	0,02	0,01	
	Ort				
a*(%1 kons.)	Klasik Ekstraksiyon	b	12,50	2,74	*0,2095*
	Ultrasonik Destekli Ekstraksiyon	a	29,22	3,08	
	Mikrodalga Destekli Ekstraksiyon	c	0,01	0,01	
	Ort				
b*(%1 kons.)	Klasik Ekstraksiyon	b	3,47	0,82	*0,4722*
	Ultrasonik Destekli Ekstraksiyon	a	10,99	3,51	
	Mikrodalga Destekli Ekstraksiyon	b	0,02	0,02	
	Ort				
Toplam Şeker (%e)	Klasik Ekstraksiyon	a	0,31	0,01	*p>0,05 olduğu için hesaplanmadı*
	Ultrasonik Destekli Ekstraksiyon	a	0,40	0,19	
	Mikrodalga Destekli Ekstraksiyon	a	0,29	0,04	
	Ort				
Protein (%e)	Klasik Ekstraksiyon	b	0,09	0,01	*0,1837*
	Ultrasonik Destekli Ekstraksiyon	b	0,08	0,01	
	Mikrodalga Destekli Ekstraksiyon	a	0,18	0,03	
	Ort				
Briks(%e)	Klasik Ekstraksiyon	a	3,93	0,15	*p>0,05 olduğu için hesaplanmadı*
	Ultrasonik Destekli Ekstraksiyon	a	3,80	0,35	
	Mikrodalga Destekli Ekstraksiyon	a	4,50	0,15	
	Ort.				

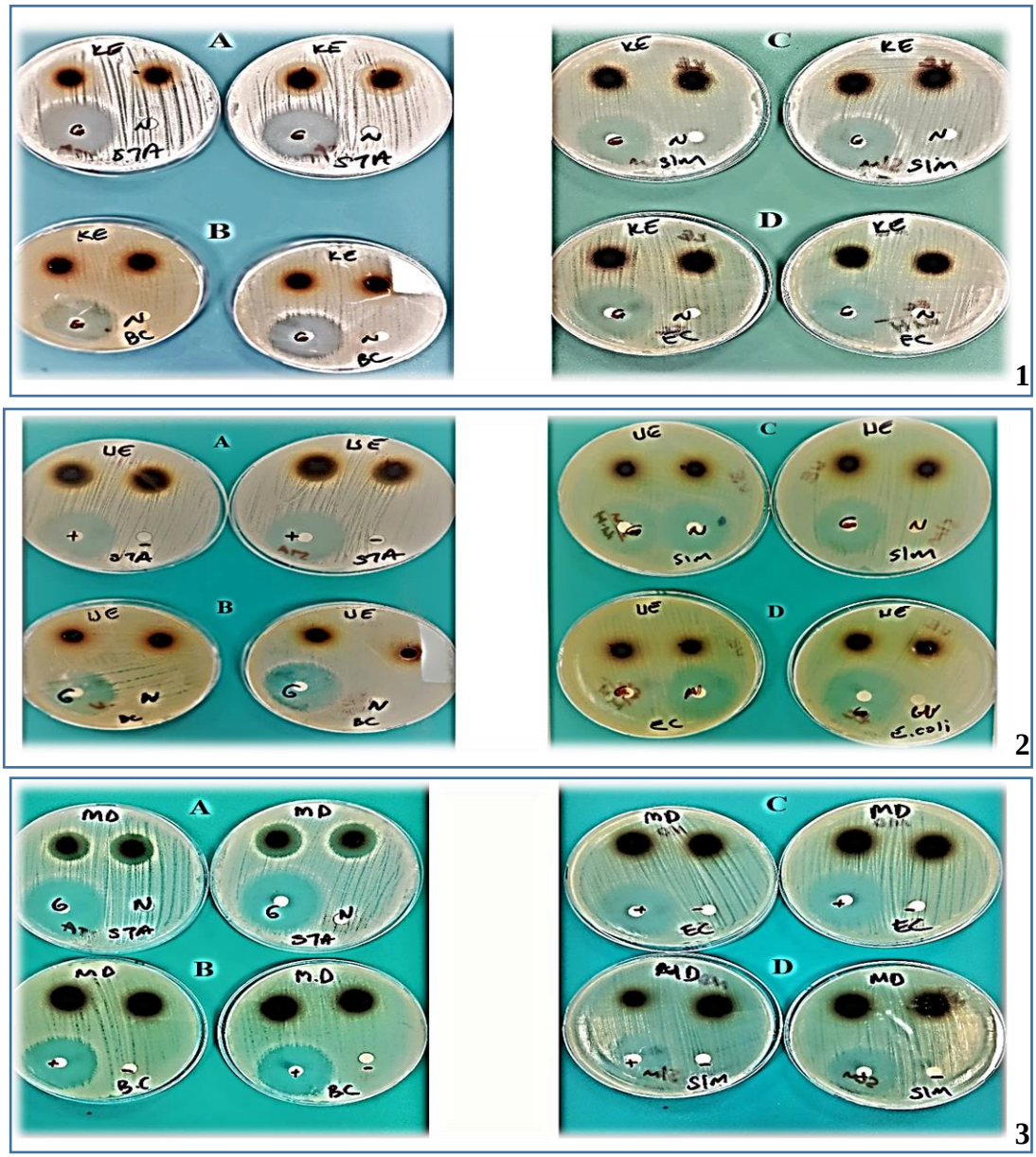
e: ekstrakt; Her bir sonuç için aynı sütunda yer alan farklı harfler istatistiki olarak anlamlılığı ifade eder

Kestane kabuğu ekstraktlarının kül içerikleri KE, UDE ve MDE için sırasıyla %0.65±0,10; 0,70±0,09 ve 0,68±0,02 ağırlık üzerinden ekstraktta hesaplanmış ancak ekstraktlar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir (p>0,05). Konca & Beyzi, (2020), tarafından at kestanelerinde yapılan çalışmada kestane kabuklarının ham kül miktarları %2,22 olarak bildirilmiş, bizim çalışmamıza göre yüksek olduğu görülmüş bunun nedeni bizim sonuçlarımızın sıvı ekstrakt üzerinden olması bu sonucun ise kestane kabuğunun kendinde olmasından kaynaklı olabileceği düşünülmüştür. Diğer taraftan mevcut haliyle ilk alındığında herhangi bir ekstraksiyon yöntemi uygulanamadan yaptığımız ve kestane kabuğunun kül miktarının Çizelge 4.1.'de %1,94±0,40 km olarak benzer sonuç verdiğimiz görülmüştür. Bir diğer çalışmada kestane kabuğunun kül miktarı ağırlıkça %1,25 olarak benzer sonuç beyan edildiği görülmüştür (Demiral & Çemrek Kul, 2015). Kestane kabuğu ekstraktlarının HCl'de çözünmeyen kül sonuçları KE, UDE ve MDE için sırasıyla %0,05; 0,06 ve 0,04 olarak bulunmuş ve ekstraktlar arasında istatistiki olarak bir fark bulunmamıştır (p>0,05). Ekstraktların nişasta içeriği açısından KE, UDE ve MDE sonuçları %0,69; 1,44 ve 0,38 UDE'de en yüksek sonuç elde edilirken istatistiki olarak anlamlı olduğu ancak MDE ve KE arasında nişasta sonuçları açısında anlamlı bir fark görülmemiştir (p>0,05). L*, a* ve b* değerleri arasında esasen hedefimiz en koyu rengi elde etmek olduğu için istatistiki olarak L*, a* ve b* değeri en düşük olarak görünen MDE, %1 ekstrakt konsantrasyonunda sırasıyla 0,02; 0,01 ve 0,02 olarak bulunmuş en koyu siyaha yakın kahverengi renkler elde edilmiştir. En açık kahverengi renkler ise UDE ile elde edilmiş L*, a* ve b* değerleri sırasıyla 6,46; 29,22 ve 10,99 bulunmuş bu da UDE'nin hem renk değerinde düşük olduğu hem de biyoaktif bileşenler açısından diğer ekstraksiyonlara göre daha düşük sonuç verdiği gözlenmiştir. Ekstraktların toplam şeker (%e) içerikleri KE, UDE ve MDE için sırasıyla %0,31; 0,40 ve 0,29 olarak bulunmuş istatistiki olarak ekstraktlar arasında toplam şeker içerikleri açısından anlamlı bir fark gözlenmemiştir (p>0,05). Ekstraktların protein (%e) içerikleri KE, UDE ve MDE için sırasıyla %0,09; 0,08 ve 0,18 olarak bulunmuş MDE sonucu istatistiki olarak anlamlı bulunurken KE ve UDE arasında ekstraktlar arasında protein içerikleri açısından anlamlı bir fark gözlenmemiştir (p>0,05).

Ekstraktların briks içerikleri KE, UDE ve MDE için sırasıyla 3,93; 3,80 ve 4,50 olarak bulunmuş istatistiki olarak ekstraktlar arasında briks içerikleri açısından anlamlı bir fark gözlenmemiştir (p>0,05).

4.5.8. Ekstraksiyon yönteminin antibakteriyel aktivite üzerine etkisi

Elde edilen kestane kabuğu ekstrelerinin antibakteriyel aktivitesi 2 adet gram negatif (*Escherichia coli* ATCC 25922 ve *Salmonella typhimurium* ATCC 14028) ve 2 adet gram pozitif (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ve *Bacillus cereus* ATCC 10876) bakteriye karşı araştırılmıştır. Sırasıyla pozitif ve negatif kontroller için gentamisin (antibiyotik) ve steril ultra saf su kullanılmıştır. Tüm ekstraksiyon yöntemlerinde kestane kabuğu ekstreleri yalnızca *Staphylococcus aureus* ATCC 25923'e karşı inhibisyon göstermiştir. İnhibisyon bölgesi, paralel olarak ölçülmüştür. İnhibisyon bölgesi kumpas (Tronic marka) ile ölçülmüştür. KE, UDE ve MDE için sırasıyla 11,87±0,76 17,27±1,54 ve 19.50± 1.06 mm olarak ölçülmüştür. You vd., (2014), metanolik kestane (C. mollissima) kabuğu ekstresi elde ederek *S. somaliensis, B. subtilis, E. coli* ve *S. aureus* suşlarının inhibisyonunu test etmiş ve raporlamıştır. *E. coli* inhibisyonunu 6,12 − 7,50 mm ve *S. aureus* açısından inhibisyon zonunu 6,57−7,59 mm olarak bildirmişlerdir. Silva vd., (2020), tarafından yapılan başka bir çalışmada etanolik ekstrakt farklı bir yaklaşımla hazırlanmış ve karakterize edilmiştir. Kestane kabuğu ekstresinin iç ve dış kabuk olarak 12 mm ve 10 mm'de *S. aureus*'a duyarlılık gösterdiğini, çalışmamızla benzer sonuçlarla *B. cereus'*a duyarlı olmadığını bildirmişlerdir. Ekstraktlarının *E. coli'*ye karşı herhangi bir duyarlılık göstermemesi bakımından benzer sonuçlara sahiptiler. Genel olarak kestane kabuğu ekstreleri, gram (-) bakteri suşlarına karşı inhibisyon göstermediği görülmüştür. Bunun nedeni lipopolisakkaritlerin, hücre çekirdeğine yönelik antibakteriyel etki gösteren fenolik bileşikleri bloke etmesi olabilir. Başka bir çalışmada, paketleme filmleri Esposito vd., (2020) tarafından kestane burunun hidroalkolik ekstraktı hazırlanmıştır. Antibakteriyel özellikler incelenmiş ve bu ekstrelerin filmlerinin *S. aureus* üzerinde inhibitör etki gösterdiğini bildirmişlerdir.

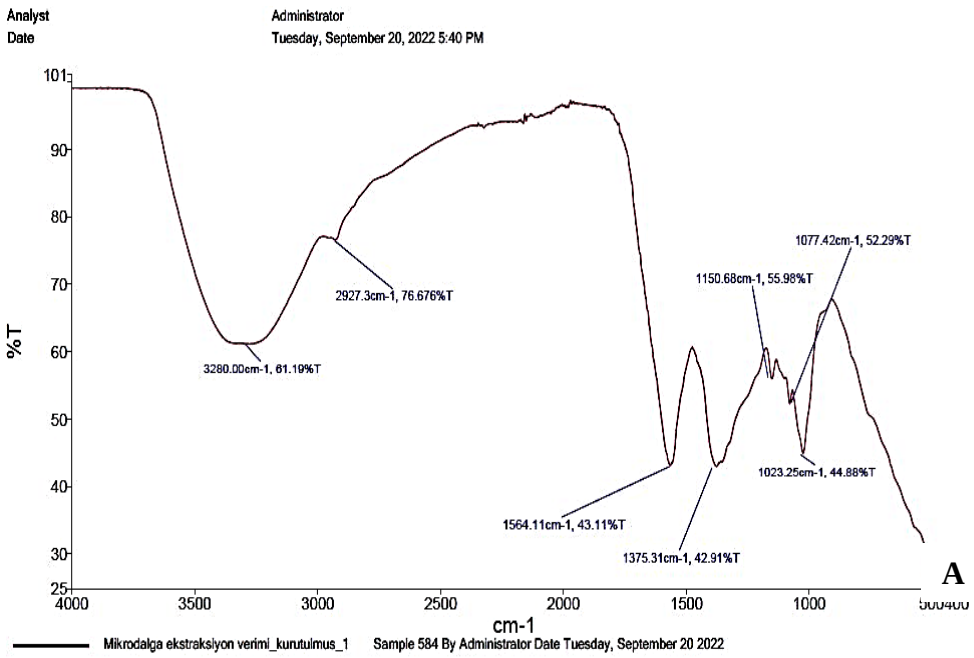


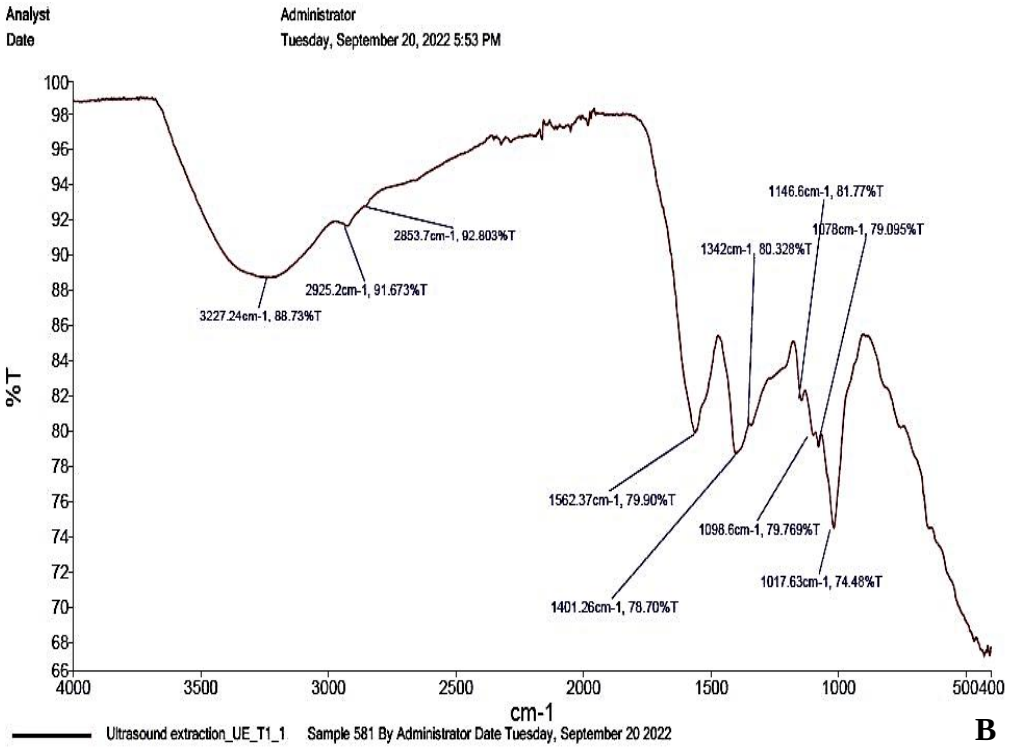
Şekil 4.20. Ekstraktların antibakteriyel aktivite test görüntüleri
1) Klasik ekstraksiyon **2)** Ultrasonik destekli ekstraksiyon **3)** Mikrodalga destekli ekstraksiyon **A)** *Staphylococcus aureus* **B)** *Bacillus cereus* **C)** *Salmonella typhimurium* **D)** *Escherichia coli*

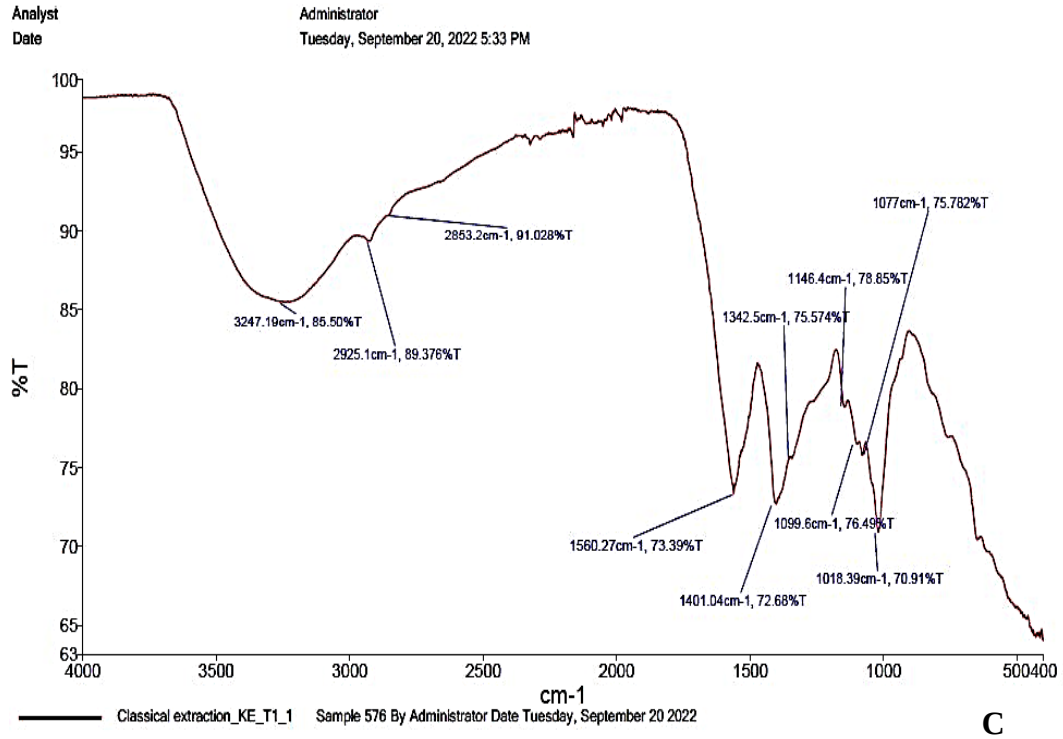
4.5.9. Ekstraksiyonların FT-IR spektrumları

MDE, UDE ve KE'nin ve melanin pigment standardının yapısal karakterizasyonu, FT-IR-ATR ile 400-4000 cm^{-1} aralığında incelenmiş ve Şekil 4.21'de gösterilmiştir. MDE, UDE ve KE'nin spektrumu, absorpsiyon bantları ile karakterize edilmiştir. Geniş bant olarak 3300 cm^{-1}'de (fenollerin O-H gerilmesi), 2923 cm^{-1} (CH ve CH_2 gerilmesi), 1564 cm^{-1} (aromatik halkanın C=C gerilmesi), 1374 cm^{-1} (C–O gerilmesi) pigmentlerin

karakteristiği olan fenolik OH gruplarının ve COO– gruplarının simetrik gerilmesi) ve 1019 cm^{-1} (fenollerin C-O gerilmesi) gözlenmiştir. Bu FT-IR spektrumları, suda çözünür kahverengi kestane kabuğu pigmentlerinin FT-IR spektrumlarına uygundur (You vd., 2014). Esposito vd., (2020) kestane kabuğunun etanolik ekstraktlarını elde etmiş ve bu kurutulmuş ekstraktları biyofilm üretmek üzere karakterize etmişlerdir. Kestane kabuğu ekstraktlarının FT-IR spektrumlarını bildirmişler ve fenolik bağlar ve karakteristik glikozidik bağlara işaret eden 3300-3600 ve 1000-1300 cm^{-1} elde edilen titreşimler açısından tüm sonuçlar, FT-IR sonuçlarımızla büyük ölçüde uyumlu olduğu görülmüştür. Ekstraktların absorbans yoğunluklarının melanin pigment standardı ile karşılaştırıldığında, fenolik bileşiklerin C=O gerilmesi için 1706 cm^{-1}'deki bant dışında benzer absorpsiyon bantları mevcut olduğu görülmüştür. Yao vd., (2016) yaptıkları çalışmada kestane kabuklarının mikrodalga uygulaması sonucunda ısıtmaya maruz kaldıktan sonra fonksiyonel grupların kaybedebileceği bildirmişlerdir. Yao vd., (2012) ayrıca kestane kabuğu pigmentinin izolasyonun yapmış ve pigmentleri fraksiyonlarına ayırmıştır. Bu fraksiyonların FT-IR spektrumlarını göstermişlerdir. Elde ettikleri spektrumlardaki bu titreşimler bizim çalışmalarımızla benzerlik göstermektedir. Pigmentlerin fenolik bağlarını ve karakteristik glikozidik bağlarını gösteren 3300-3600 ve 1000-1300 cm-1 elde edilen titreşimler açısından tüm sonuçlar, FT-IR sonuçlarımızla büyük ölçüde uyumlu olduğu görülmüştür.







Şekil 4.21. Ekstraksiyonlara ait FT-IR spektrumları
A) Mikrodalga destekli ekstrakt **B**) Ultrasonik destekli ekstrakt **C**) Klasik ekstrat

4.6. Sprey Kurutulmuş Kestane Kabuğu (SKK) Tozuna Ait Sonuçlar

4.6.1. SKK tozunun fizikokimyasal özellikleri

Kestane kabuğu ekstreleri mikrodalga destekli olarak ekstrakte edildikten sonra sprey kurutucuda optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. Buna göre optimum koşullar olan 160 °C kurutucu giriş sıcaklığı, kaplama materyalinin ekstrakta oranı %10; maltodekstrinin/arabik gama oranı %80 olacak şekilde pigment ve biyoaktif maddeleri içeren kestane kabuğu ekstreleri toz haline getirilmiştir. Bu tozların fizikokimyasal, antibakteriyel ve mineral özellikleri Çizelge 4.21.'de gösterilmiştir. Buna göre kestane kabuğu boyar tozları, mikrodalga ekstreden elde edilmiş olmasına rağmen biyoaktif ve renk özellikleri mikrodalga destekli ekstraksiyona göre azalmıştır. Mikrodalga destekli ekstraksiyon ile optimum koşullarda renk değeri 41,48 toplam fenolik madde içeriği 274,09 mg GAE/g km, toplam antioksidan içeriği DPPH için 543,94; CUPRAC 1073,13 mg TE/g km, melanin pigmenti analizi 245000 mg/kg (%24,5) (km) olarak bulunmuş ancak sprey kurutma işlemi gerçekleştikten sonra renk değeri 14,12 toplam fenolik madde içeriği 77,60 mg GAE/g km, toplam antioksidan içeriği DPPH için 130,49 CUPRAC 288,98 mg TE/g km, melanin pigmenti analizi 80984,59 mg/kg (%8,1) olarak azaldığı görülmüştür. Diğer taraftan melanin pigmenti suda çözünürlüğü çok azken sprey kurutulmuş melanin pigmenti içeren kestane kabuğu tozunun suda çözünürlüğü %98,71 olarak bulunmuş yüksek çözünürlükte kahverengi renkte biyoaktif özellikleri olan doğal kestane kabuğu boyası elde edilmiştir. Selüloz özellikleri bakımından sade kestane kabuğu tozu %15,28 km olarak tespit edilmesine rağmen SKK tozunda %1,39 km olarak tespit edilmiştir. Ekstreleri toz haline getirmek için maltodekstrin ve arabik gam bulunduğu ve maltodekstrin ve arabik gam polisakkarit olduğu için sprey toz haline getirilmiş kestane kabuklarının şeker içeriği %55,62 km olarak bulunmuştur. Yao & Qi (2016)'da yaptıkları çalışmada kestane kabuğu ekstrelerini 3 fraksiyona ayırmış demir bağlama özelliklerini araştırmışlar %100 demir bağlama kapasitesine 200 mg/L konsantrasyonda ulaştıklarını belirtmişlerdir. Sprey kurutulmuş olarak elde ettiğimiz kestane kabuğu tozuna göre çok daha yüksek şelatlama özellikleri olduğu görülmüştür. Bunun nedeni olarak sprey kurutulmuş örneğin içerisinde büyük oranda kaplama malzemelerinin olması şelatlama aktivitesini azalttığı düşünülmüştür.

Kasımoglu vd. (2016), kestane iç ve dış kabuğunu su ile ekstrakte etmişlerdir. Ekstrakiyon koşullarını optimize ettikten sonra sprey kurutucu ile maltodekstrin ve arabik gam kullanarak ekstraktı toz haline getirmişler ve enkapsüle etmişlerdir. Buna göre elde ettikleri optimum koşullar giriş sıcaklığı 164 °C, kaplama materyalinin ekstrakta oranı %12.5 ve maltodekstrinin arabik gama oranı %75 olarak bizim çalışmamıza benzer optimum koşullar elde etmişlerdir. Diğer taraftan TFM içeriğini 272,52 mg/g GA olarak daha yüksek sonuç beyan etmişlerdir.

Çizelge 4.22. SKK tozunun fizikokimyasal ve antibakteriyel özellikleri

Analizler	**Ortalama**	**Standart sapma**
TFM (mg GA/G km)	77,6	±3,11
DPPH (mg TE/G km)	130,49	±1,68
CUPRAC (mg TE/G km)	288,98	±17,46
Renk Değeri (%1)	14,12	±0,56
Melanin Pigmenti Analizi (mg/kg km)	80984,59	±4551,33
L* (%1 konsantrasyon)	33,77	±0,66
a* (%1 konsantrasyon)	29,05	±0,17
b* (%1 konsantrasyon)	50,44	±0,55
Çözünebilirlik (%)	98,71	±1,39
Su Aktivitesi (%)	0,49	±0,01
Selüloz İçeriği (% km)	1,39	±0,59
Lignin İçeriği (% km)	1,54	±0,32
Kuru Madde (%)	95,16	±0,47
Çözünebilirlik (%)	98,71	±1,39
Kül (% km)	4,89	±0,13
HCL'DE Çözünmeyen Kül (% km)	0,5	±0,28
Toplam Şeker (% km)	55,62	±2,67
Protein (% km)	1,82	±0,47
Nişasta (% km)	9,56	±2,56
Şelatlama Aktivitesi (1000 mg/kg konsantrasyon) %İnhibisyon	19,64	±1,39
S.aureus (zone çapı cm)	14,13	±0,60
B.cereus	T.E.	-
Escherichia coli	T.E.	-
Salmonella typhimurium	T.E.	-

T.E. Tespit edilemedi



Şekil 4.22. Sprey kurutulmuş kestane kabuğu toz fotoğrafları

Çizelge 4.23. SKK tozunun ICP-MS ile mineral ve ağır metal özellikleri

Analizler	Ortalama(mg/kg km)	Standart sapma
Sodyum (Na)	18943,00	±393,86
Magnezyum (Mg)	673,67	±85,78
Fosfor (P)	156,90	±17,23
Potasyum (K)	2432,67	±106,07
Kalsiyum (Ca)	1856,33	±84,85
Demir (Fe)	52,50	±13,91
Bakır (Cu)	1,03	±0,07
Çinko (Zn)	8,32	±3,73
Arsenik (As)	T.E.	-
Kadmiyum (Cd)	0,03	±0,01
Civa (Hg)	T.E.	-
Kurşun (Pb)	0,22	±0,11
Alüminyum (Al)	46,97	±9,24

Sprey kurutularak mikroenkapsüle edilmiş kestane kabuğu tozlarının mineral madde içeriği Çizelge 4.22.'de gösterilmiştir. Buna göre SKK tozları MDE'de elde edildiği için MDE'ye göre son ürün kuru olduğu için sonuçlar doğal olarak artmıştır. Bunun neticesinde mineral maddelerde ciddi bir artış olurken Na, K ve Ca açısından SKK tozunun oldukça zengin olarak elde edildiği görülmüştür. Diğer taraftan son ürünün gıda güvenliği açısından değerlendirildiğinde ağır metallerin Türk Gıda Kodeksi Bulaşanlar Yönetmeliği incelendiğinde Pb ve Cd açısından en yüksek değer olan 3 mg/kg yaş ağırlıktan düşük olduğu için uygun olarak değerlendirilmiştir Diğer taraftan Pb miktarı 46,97 mg/kg km olarak bulunmuş yine aynı yönetmelikte Pb için bir sınır değerlendirme verilmediği için herhangi bir değerlendirme yapılmamıştır.

4.6.2. SKK tozunun HPLC ile biyoaktif özellikleri

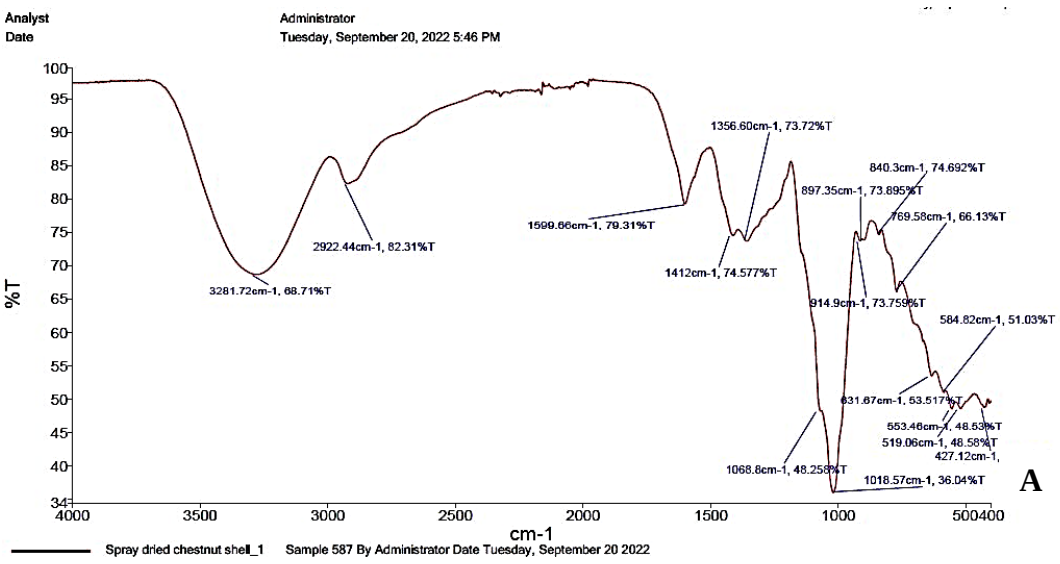
Sprey kurutulmuş kestane kabuğunun biyoaktif bileşenleri Çizelge 4.23'te gösterilmiştir. Burada SKK tozunda gallik ve ellagik asit miktarı ekstraksiyonlara göre artarken, protokateşuik, kateşin, epikateşin miktarlarının sprey kurutma işlemi neticesinde azaldığı gözlenmiştir. SKK tozunun HPLC kromatogramı Ek-24'te verilmiştir.

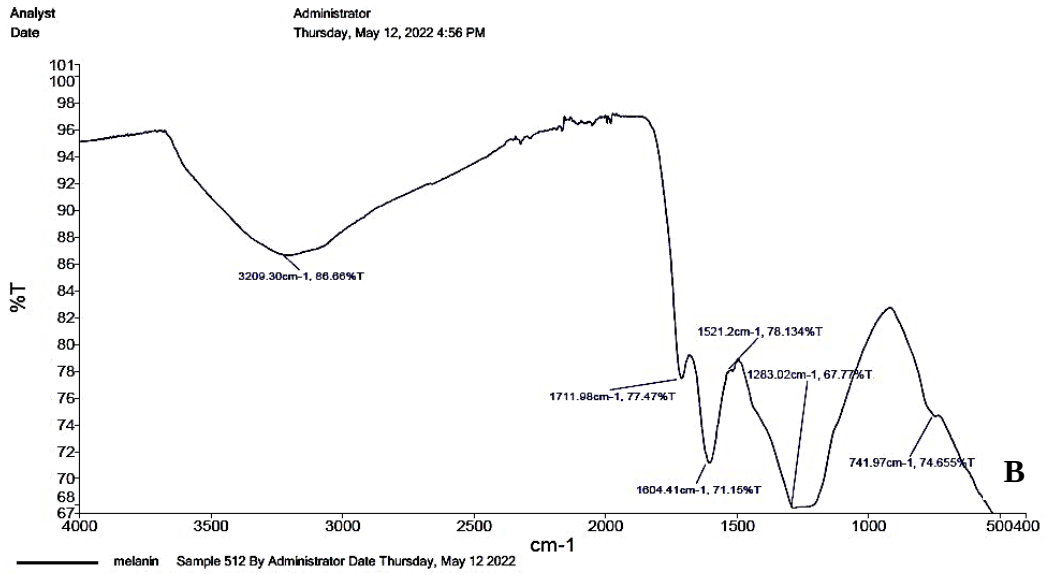
Çizelge 4.24. SKK tozunun fenolik bileşenleri

Analizler	Ortalama(mg/kg km)	Standart sapma
Gallik Asit	808,95	±40,31
Ellagik Asit	713,99	±53,24
Protokateşuik acid	219,33	±14,91
Miricetin-3-glukozit	66,03	±4,31
Sirincetin-3- glukozit	9,80	±2,55
Kateşin	100,36	±2,83
Epikateşin	90,02	±9,67

4.6.3. SKK tozunun FT-IR spektrumu

Şekil 4.23'te görüldüğü gibi elde edilen ekstraktlarla benzer olarak geniş bant olarak 3281cm^{-1}'de (fenollerin O-H gerilmesi), 2923 cm^{-1} (CH ve CH_2 gerilmesi), 1599 cm^{-1} (aromatik halkanın C=C gerilmesi), 1356 cm^{-1} (C–O gerilmesi pigmentlerin karakteristiği olan fenolik OH gruplarının ve COO– gruplarının simetrik gerilmesi) ve 1019 cm^{-1} (fenollerin C-O gerilmesi) gözlenmiştir.

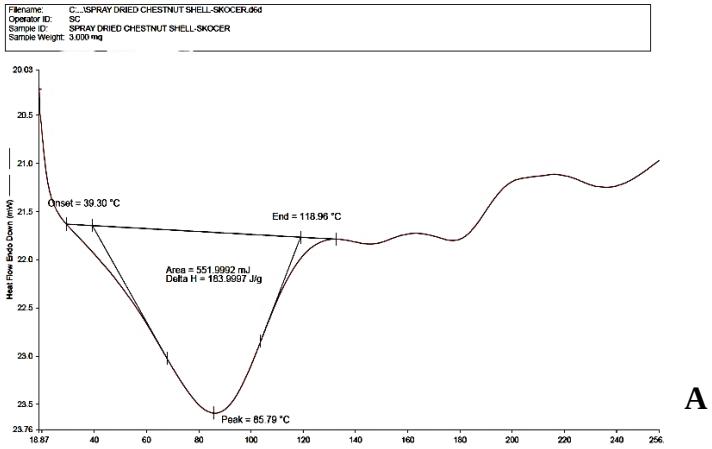


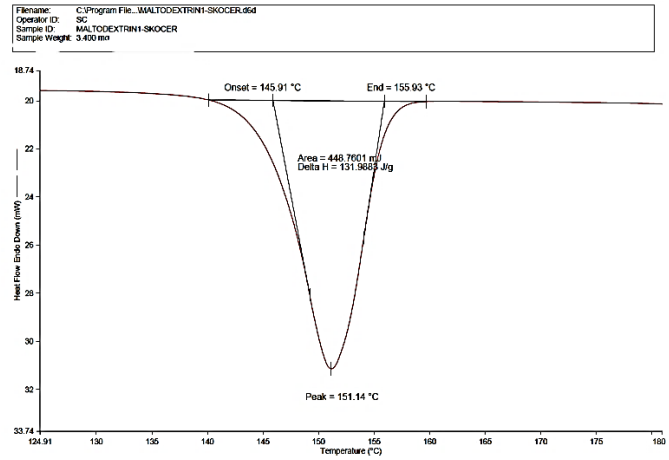


Şekil 4.23. SKK tozunun ve melanin pigmenti standartının FT-IR spektrumları
A) Sprey kurutulmuş kestane kabuğu tozu **B)** Melanin standartı

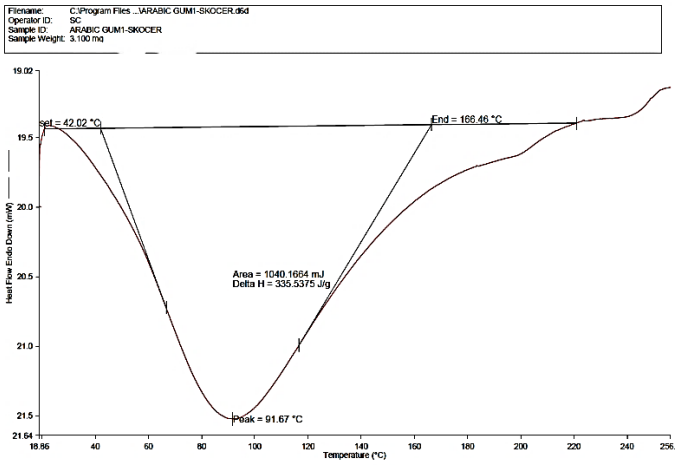
4.6.4. SKK tozunun DSC sonuçları

SKK tozunun camsı geçiş sıcaklığının 85,79 °C olduğu Şekil 4.24'ten görülmektedir. Maltodekstrin ve arabik gam kullanılarak elde edilmiş sprey kurutulmuş bitki ekstraktları ile ilgili literatürle uyumlu olduğu görülmüştür (Fazaeli vd., 2012).





B

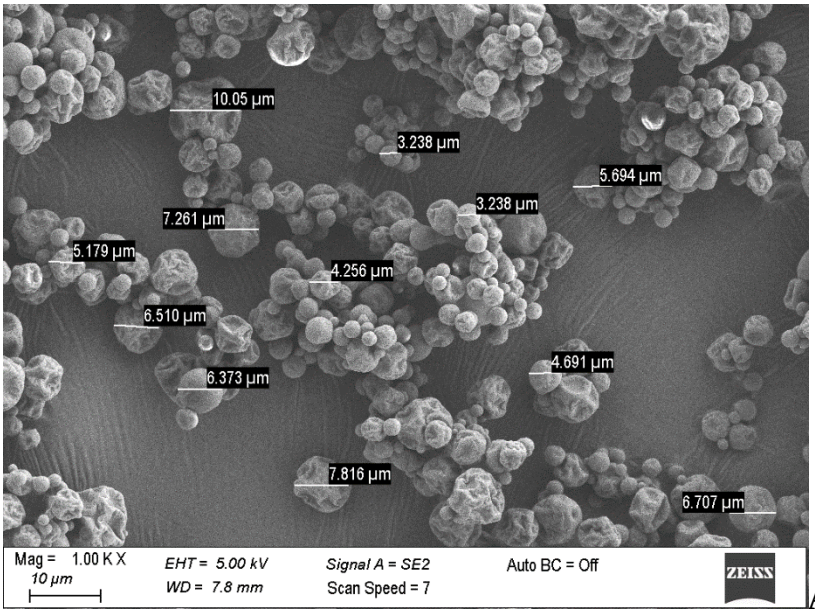


C

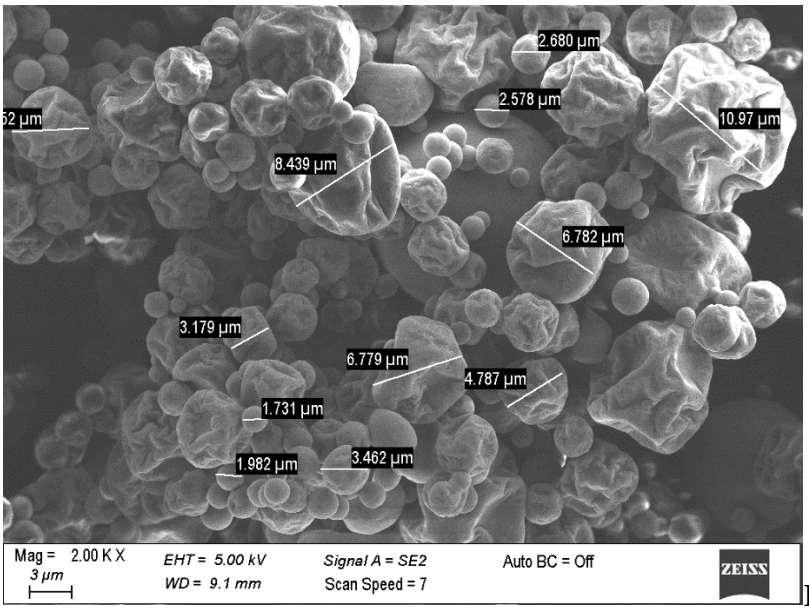
Şekil 4.24. SKK tozunun DSC ile camsı geçiş sıcaklıklarının tespiti
A) Sprey kurutulmuş kestane kabuğu tozu **B)** Maltodekstrin **C)** Arabik gam

4.6.5. SKK tozunun SEM mikroskobik görüntüleri

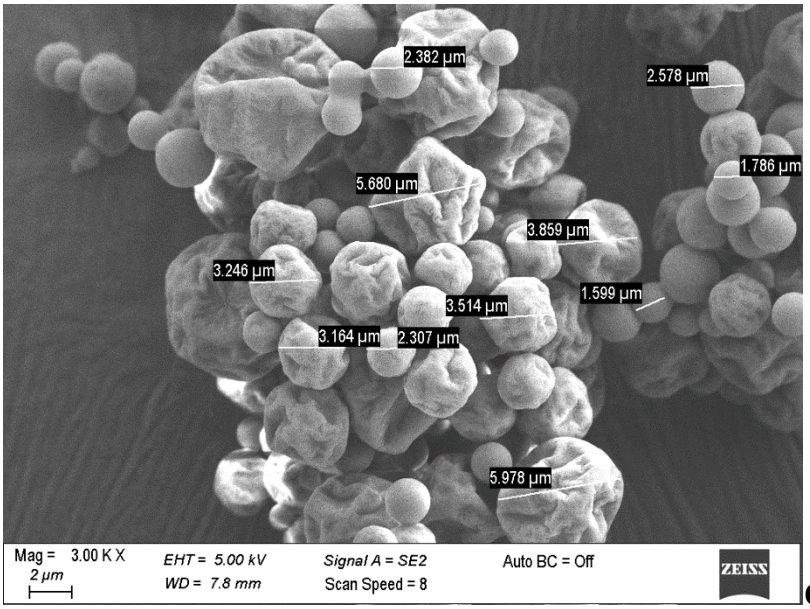
SKK tozlarının SEM mikroskobu altında parçacık boyutları 1000-2000-3000-4000 ve 5000 µm yakınlıkta incelenmiştir ve mikroskobik görüntüleri Şekil 4.25. görüntüleri elde edilmiştir. Buna göre elde edilen sprey kurutularak mikro enkapsüle edilmiş kestane kabuğu tozlarının 1,340 µm ile 10,97 µm aralığında kapsül boyutunda olduğu görülmüştür. Genel olarak mikroenkapsülasyona uygun olarak kapsül boyutları 1-6 µm arasında değişmektedir. Diğer taraftan bazı kapsüllerde büzüşme gözlemiştir. Bunun nedeni olarak da sıcaklık etkisiyle kapsüllerde meydana gelen yüzey gerilimi sonrasında kapsüllerde çöküntü büzüşme olabileceği öngörülmüştür.


10.05 µm
3.238 µm
5.694 µm
3.238 µm
7.261 µm
5.179 µm
4.256 µm
6.510 µm
4.691 µm
6.373 µm
7.816 µm
6.707 µm
Mag = 1.00 K X
10 µm
EHT = 5.00 kV
WD = 7.8 mm
Signal A = SE2
Scan Speed = 7
Auto BC = Off
ZEISS

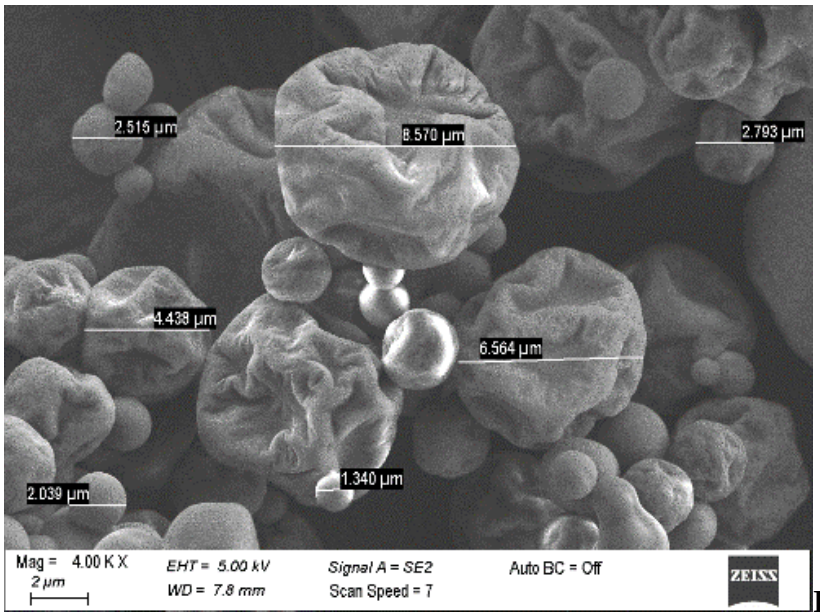
A


2.680 µm
2.578 µm
10.97 µm
8.439 µm
6.782 µm
3.179 µm
6.779 µm
4.787 µm
1.731 µm
1.982 µm
3.462 µm
Mag = 2.00 K X
3 µm
EHT = 5.00 kV
WD = 9.1 mm
Signal A = SE2
Scan Speed = 7
Auto BC = Off
ZEISS

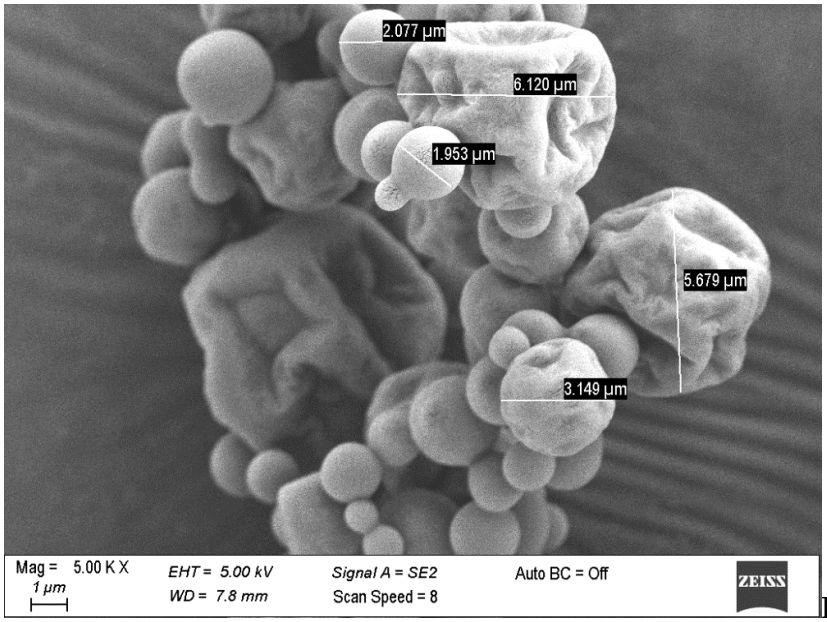
B


2.382 µm
2.578 µm
1.786 µm
5.680 µm
3.859 µm
3.246 µm
1.599 µm
3.514 µm
3.164 µm
2.307 µm
5.978 µm
Mag = 3.00 K X
2 µm
EHT = 5.00 kV
WD = 7.8 mm
Signal A = SE2
Scan Speed = 8
Auto BC = Off
ZEISS

C


2.515 µm
8.570 µm
2.793 µm
4.438 µm
6.564 µm
1.340 µm
2.039 µm
Mag = 4.00 K X
2 µm
EHT = 5.00 kV
WD = 7.8 mm
Signal A = SE2
Scan Speed = 7
Auto BC = Off
ZEISS

D



E

Şekil 4.25. SKK tozunun SEM mikroskobu ile yüzey morfolojik özelliklerinin görüntüleri
A) 1000kat yakınlaştırılmış SEM görüntüsü **B)** 2000kat yakınlaştırılmış SEM görüntüsü **C)** 3000kat yakınlaştırılmış SEM görüntüsü **D)** 4000kat yakınlaştırılmış SEM görüntüsü **E)** 5000kat yakınlaştırılmış SEM görüntüsü

4.6.6. SKK tozunun antibakteriyel aktivite sonuçları

Mikrodalga ekstrakt kullanılarak optimum şartlarda elde edilen SKK tozları suda çözündürülmüş ve disk difüzyon yöntemi ile analiz edilmiş Gr (+) olarak *Staphyloccus aureus* ve *Bacillus cereus* Gr (-) olarak ise *Escherichia coli* ve *Salmonella typhimurium'*e karşı antibakteriyel aktivite testleri gerçekleştirilmiştir. SKK tozları ekstraktlar gibi 25 kat olacak şekilde saf su içinde çözülerek elde edilen sıvı içerikler üzerinden gerçekleştirilmiştir. Analiz sonucunda Şekil 4.26.'te görüldüğü üzere *Staphyloccus aureus* 'a karşı kestane kabuğu tozlarının inhibe edici özelliği olduğu ve zon çapının 14,13 mm ±0,60 olduğu görülmüştür. Pozitif kontrol olarak bir antibiyotik olan Gentamisin ve negatif kontrol olarak steril ultra saf su kullanılmıştır.

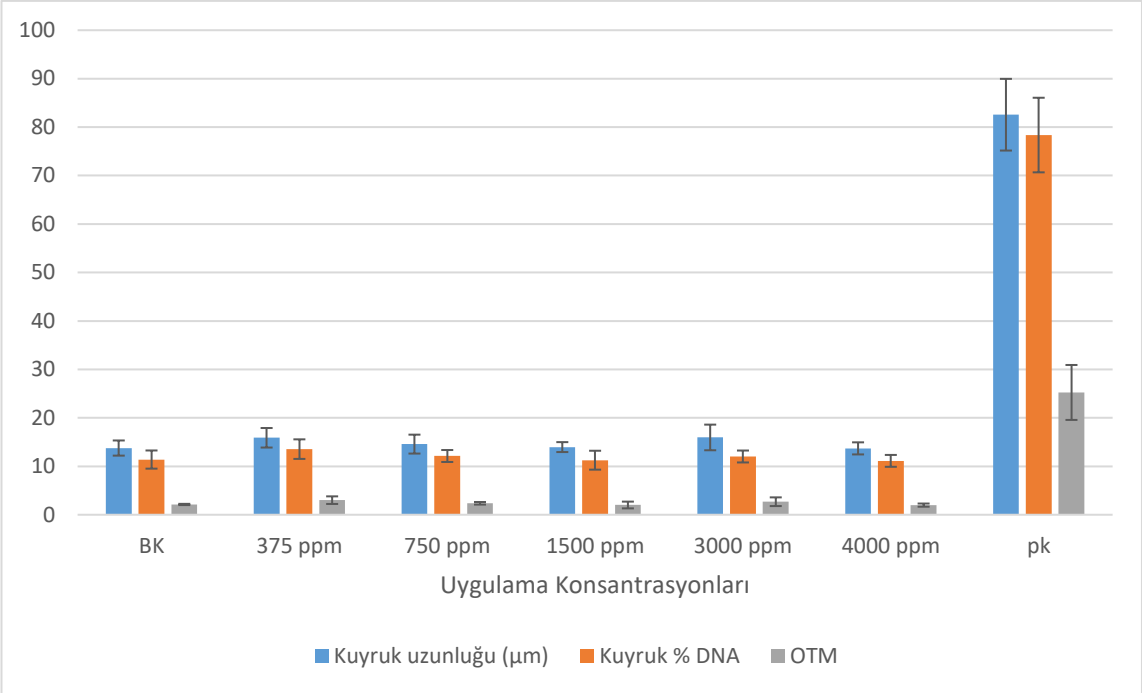


Şekil 4.26. SKK tozlarının antibakteriyel aktivite etkinliği
A) *Staphylococcus aureus* **B)** *Bacillus cereus* **C)** *Salmonella typhimurium* **D)** *Escherichia coli*

4.6.7. SKK tozunun toksisite sonuçları

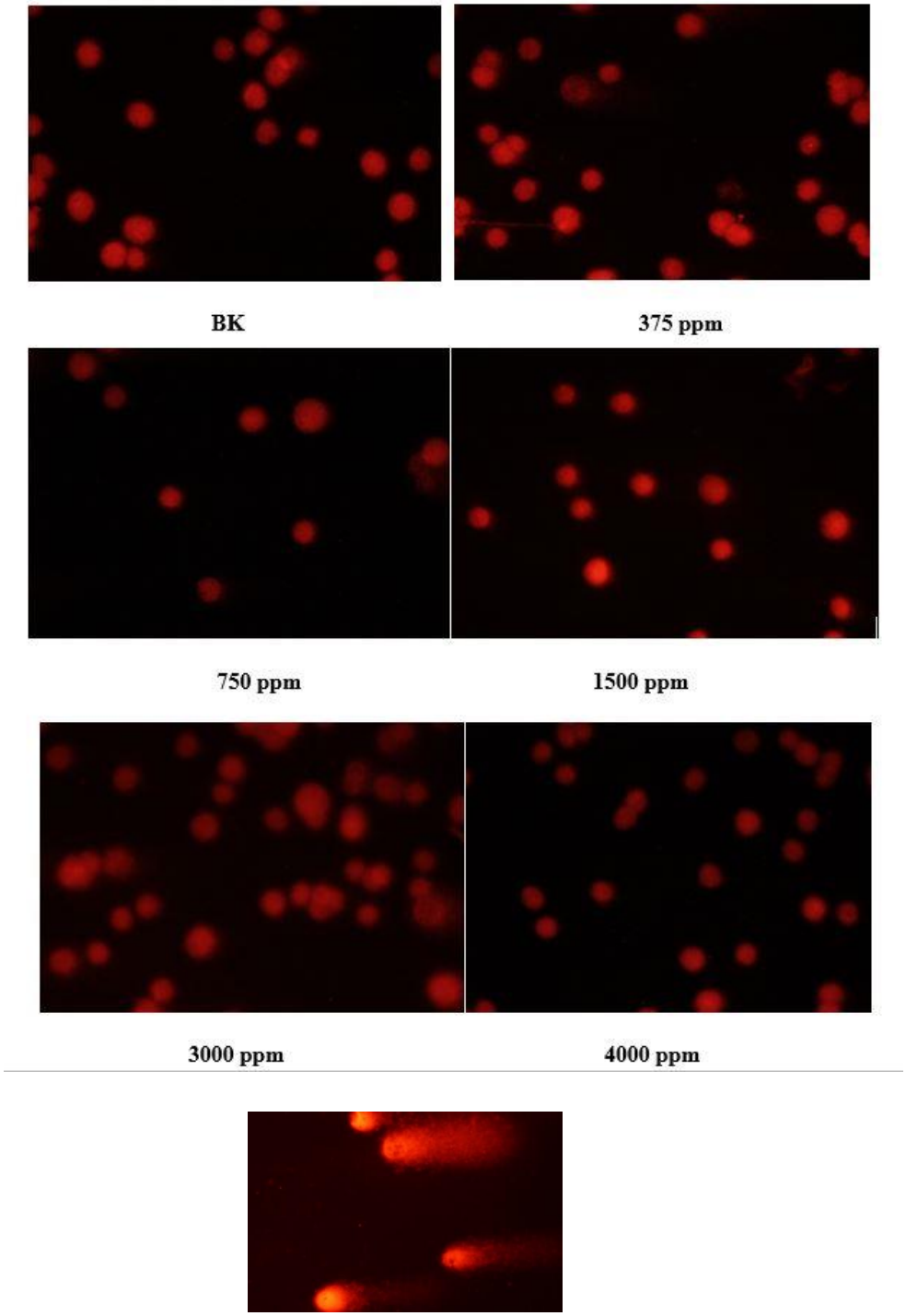
Komet testi

Komet testi sonucunda elde edilen veriler ve örnek fotoğraflar sırasıyla Şekil 4.27. ve Şekil. 4.28.'te gösterilmiştir. Değerlendirilen her üç komet parametresi açısından kestane kabuğu ekstraktlarının uygulanan 4000 ppm konsantrasyonlarına kadar büyüme kontrol grubundan istatistiksel olarak anlamlı bir fark belirlenmemiştir (p>0,05). Elde edilen bu sonuçlar kestane ekstraktlarının uygulanan konsantrasyonlarının belirtilen şartlar altında Beas-2B hücrelerinde genotoksik etkinliğinin bulunmadığını göstermektedir.



BK; büyüme kontrol, pk: Pozitif Kontrol (H_2O_2 300 µM), OTM: kuyruk momenti

Şekil 4.27. Kestane kabuğu tozlarının komet sonuçları.

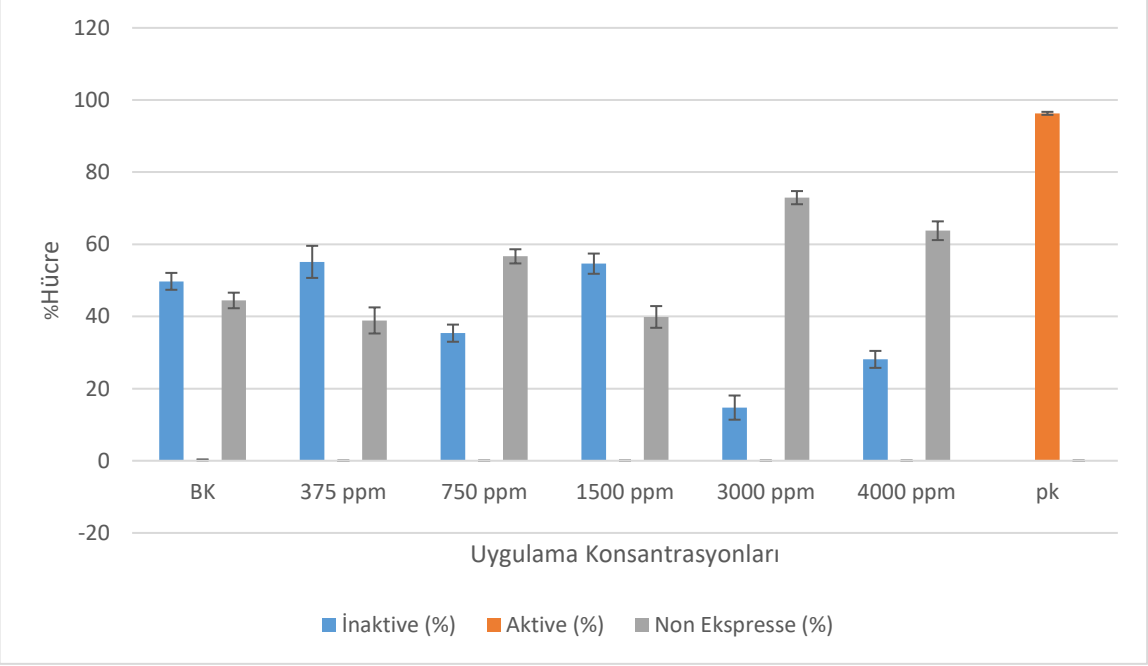


BK; büyüme kontrol, PK: Pozitif Kontrol (H_2O_2 300 µM)

Şekil 4.28. SKK tozlarının komet sonuçlarına ait örnek fotoğraflar

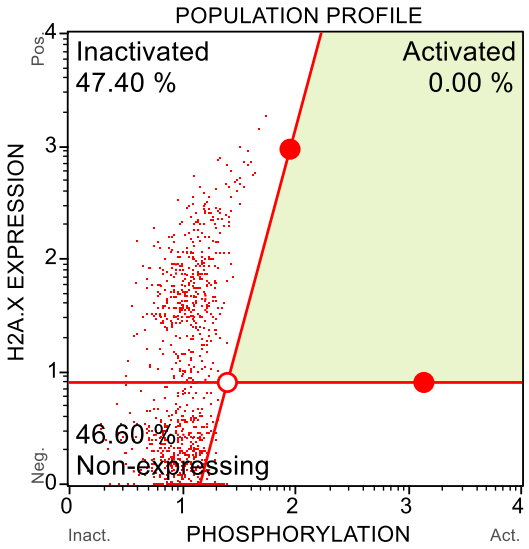
γ H2AX yöntemi

Komet yöntemi genelde DNA da meydana gelen tek zincir kırıklarını yansıtırken γ H2AX yöntemi ise özellikle çift zincir kırıklarını yansıtmaktadır. Yöntemde γ H2AX proteini açısından aktive inaktive non-eksperse hücrelerin yüzdeleri çift zincir kırıklarını yansıtmaktadır. DNA çift zincir kırığı bulunaduran hücrelerde γ H2AX proteini aktive olacaktır, bu hücrelerin yüzdesi kullanılan ekstraktın DNA da çift zincir kırığı oluşturma potansiyelini yansıtacaktır. İçerdikleri γ H2AX proteini açısından hücre yüzdeleri Şekil 4.29. verilmiştir. Şekil 4.30.'da ise Muse® Cell Analyser cihazından elde edilen, her uygulama grubuna ait birer adet akış sitometrik değer grafikleri verilmiş ve 4000 ppm'e kadar spreye kurutulmuş kestane kabuğu ekstreleri uygulanmış aktive olan γ H2AX proteini gözlenmemiştir. Bu nedenle SKK tozlarının genotoksik etkilerinin belirtilen dozlarda bulunmadığı tespit edilmiştir.

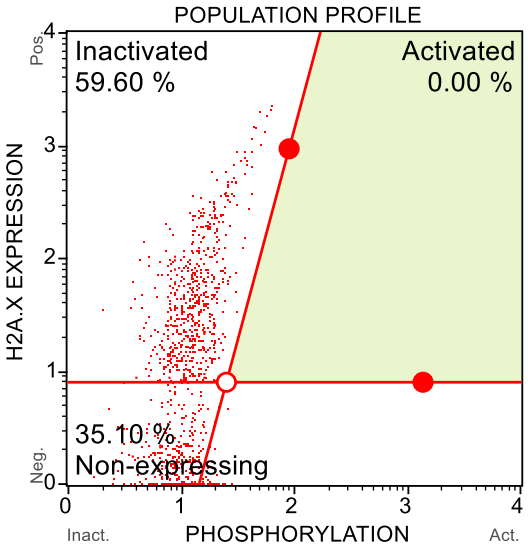


BK; büyüme kontrol, PK: Pozitif Kontrol (Etoposit 500 µM)

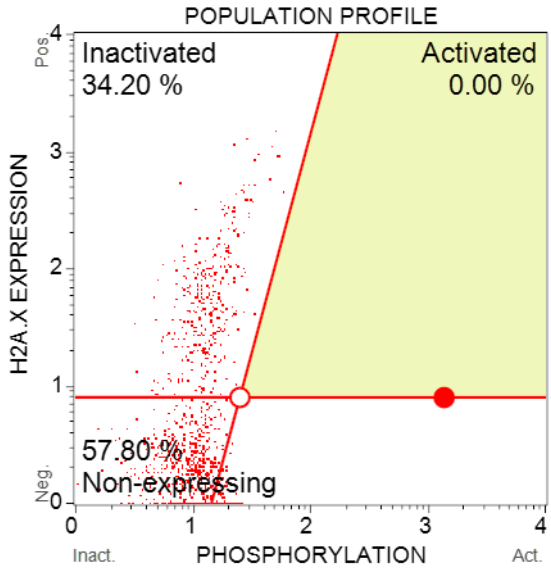
Şekil 4.29. Kestane kabuğu ekstraktı uygulanan γ H2AX proteinlerinin büyüme yüzdeleri



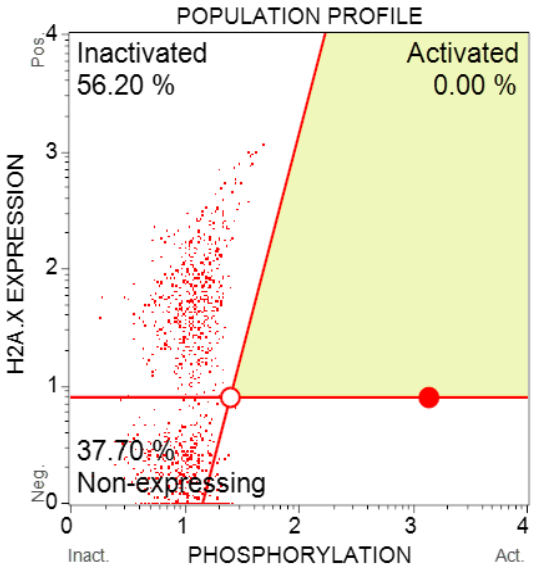
BK



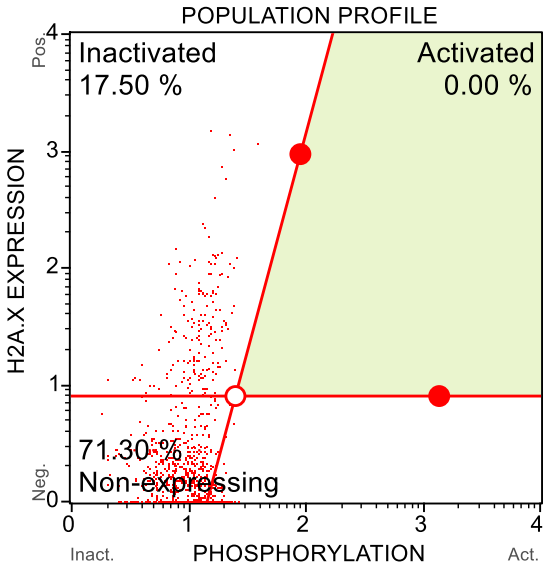
375ppm



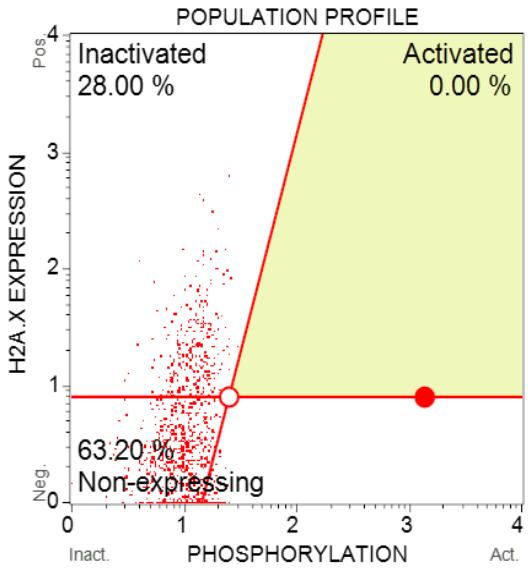
750 ppm



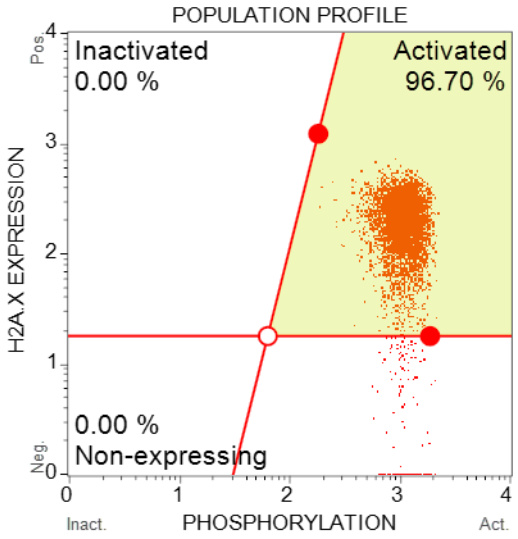
1500ppm



3000 ppm



4000 ppm



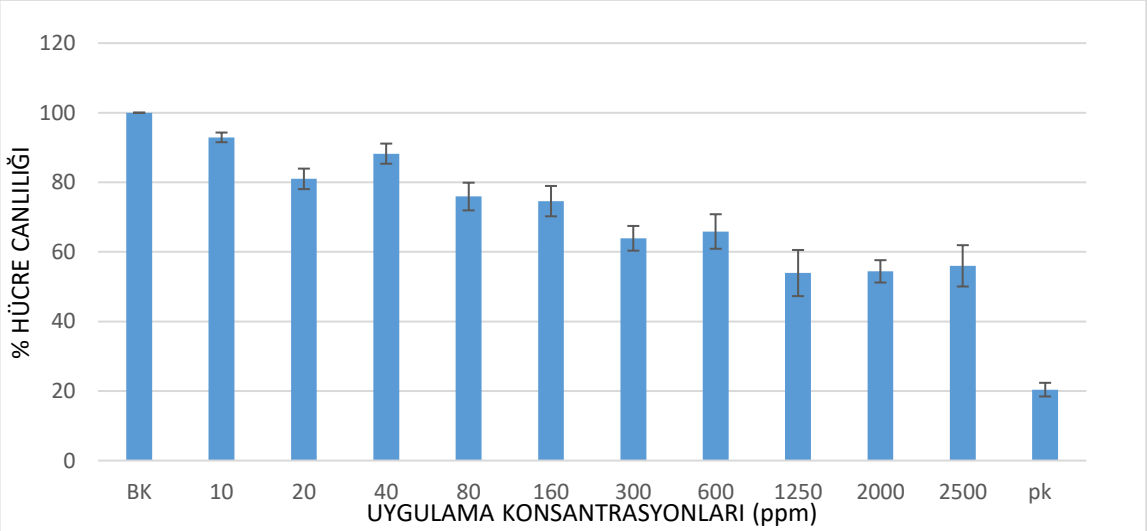
BK; büyüme kontrol, pk: Pozitif Kontrol (Etoposit 500 µM)

Şekil 4.30. Kestane kabuğu ekstraktının γ H2AX sonuçları

XTT testi

Kültüre edilen hücreler T75 flaskların %80'ini kapladıktan sonra tripsinize edilerek süspanse hale getirilmiştir. Trypan Blue (Sigma Aldrich, Darmstadt, Germany) solüsyonu ile canlılıkları belirlenen hücrelerden 96 kuyucuklu plaklara 8000 canlı hücre / kuyucuk şeklinde ekim yapılmış ve 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda hücreler deney setlerini oluşturacak şekilde ekstraktının farklı konsantrasyonlarına (10, 20, 40, 80 160, 300, 600, 1250, 2000, 2500 ppm) 24 saat süre ile maruz bırakılmıştır. Süre sonunda hücrelerin canlılıkları XTT Cell proliferation Kit (BI; Biological Industries, Kibbutz Beit Haemek, Israel) kullanılarak belirlenmiştir.

XTT yönteminden elde edilen sonuçlar Şekil 4.31.'de özetlenmiştir. Yöntem uygulanırken, hücrelerin besiyerinde pH ve osmolarite gibi değerlerde değişikliğe sebep olarak gerçek sitotoksik etkinliği değiştirecek olan 2500 ppm den daha yüksek konsantrasyonlar çalışmaya dahil edilmemiştir. Elde edilen sonuçlarda kestane kabuğu ekstraktlarının çok yüksek konsantrasyonlarda hücre canlılığını azalttığı görülse de IC50 değerine kadar hücre canlılığını azaltmamıştır. Bu nedenle IC50 > 2500 ppm şeklindedir. Tüm bunlar ekstraktın kullanılan konsantrasyonlarının, belirtilen şartlar altında Beas-2B hücrelerinde sitotoksik etkinliğe sahip olmadığını göstermektedir.



BK; büyüme kontrol, pk: Pozitif Kontrol (H_2O_2 2,5 mM)
Şekil 4.31. Kestane kabuğu ekstraktının XTT sonuçları.

Kestane kabuğu tozu ekstraktları ile ilgili toksisite çalışmaları incelendiğinde Pinto vd., (2021b) tarafından yapılan çalışmada Caco-2 ve HT29-MTX yöntemleri toksisite analizi için kullanılmış 0,1µg/mL konsantrasyondaki kestane kabuğu ekstraktları kullanıldığında hücre canlılığı yaklaşık %60 olarak gözlenmiş, 1000 µg/mL konsantrasyondaki kestane kabuğu ekstraktı kullanıldığında ise %6,29'a düştüğü belirtilmiştir. Bu çalışmaya göre mevcut çalışmamızda 2500 ve 4000 ppm kestane kabuğu ekstraktlarında hücre canlılığının %50'nin altına düşmediği görülmüştür. Bunun başlıca nedeni olarak toksisite testi yaptığımız örneğin maltodekstrin ve arabik gam ile çoğunlukla kaplanması ve saf ekstrakt olmamasından dolayı mevcut çalışmamızın SKK tozlarının toksisite değerleri %50'nin altına düşmemiştir. Bu da mevcutta ürünü başka ürünler içinde kullanmak için avantajlı bir durum ortaya koymaktadır. Şimdiye kadar yaptığımız çalışmalarda sprey kurutulmuş kestane kabuğu tozu ile ilgili literatürde çok fazla veri olmadığından bu çalışmanın sprey kurutulmuş kestane kabuğu ile ilgili gelecek çalışmalar için yol gösterici olacağı düşünülmektedir.

5. SONUÇ

Çevresel atıklar, yaşadığımız dünyamız açısından kendimizi ve gelecek nesilleri doğrudan ve dolaylı olarak etkilemektedir. Çevresel atıklardan biri olan gıda atıkları da çok yönlü olarak ele alınması gereken bir konudur. Bu noktada gıda atıklarının çevreye olumsuz etkileri, o gıdayı elde etmek için verilen emek, harcanan zaman ve para ve en önemlisi açlıkla mücadele açısından da gıda atıkları büyük önem arz etmektedir. Bu nedenle gıda atıklarının sürdürülebilir bir ekosistem içinde yeniden geri kazanılması, dünyadaki kıt kaynakların daha dikkatli ve verimli kullanılması açısından önemlidir. Bu tez çalışmasında kestane şekeri üretimi esnasında üreticilerin kabuklu kestaneye ton başına ücret ödemeleri ancak esasen ödenen ücretin kabuklar ayrıldıktan sonra kalan kestaneler için olduğu ve bunun da maliyet açısından her zaman öngörülemediği diğer taraftan da atık kabukların ekonomik olarak gelir getirmediği ve çevresel etkileri açısından da değerlendirilmesi gereken gereken bir konu olduğu düşünülmüştür. Bu nedenle kestane şekeri üretimi sonucunda ortaya çıkan ağırlıkça yaklaşık %20-30 civarındaki kestane kabuklarının değerlendirilmesi bu tezin çıkış noktasını oluşturmuştur. Bu tez çalışmasında kestane kabuklarının renk verme özelliği gösteren ve biyoaktif özelliklere sahip melanin pigmentinin farklı ekstraksiyon yöntemleri kullanılarak maksimum seviyede eldesi hedeflenmiştir. Bu süreçte kestane kabuğu ekstraksiyonunu güçlendirmek için klasik ekstraksiyonun yanısıra ultrasonik ve mikrodalga destekli ekstraksiyon uygulamaları gerçekleştirilmiştir. Genel olarak hem renk hem de biyoaktif bileşenler açısından en yüksek sonuçları veren mikrodalga destekli ekstraksiyon, optimum koşullarda hazırlanarak maltodekstrin ve arabik gam ile kaplanarak sonraki uygulamalarda toz bir ürün elde edilmesi ve daha dayanıklı hale getirilmesi amaçlanmıştır. Tüm bu uygulamalar neticesinde özetle şu sonuçlar elde edilmiştir.

- ✓ Merkezi kompozit deneme tasarımına göre optimizasyonu yapılan ekstraksiyonlar için optimum koşullar;
- ✓ Klasik ekstraksiyonda 75 °C'de 60 dakika ve 0,138 mol/l çözücü (NaOH) konsantrasyonu olarak gerçekleştirilmiştir.
- ✓ Ultrasonik destekli ekstraksiyonda ise 60 °C'de 30dakika ve 0,15 mol/l çözücü konsantrasyonu olarak optimum koşullar seçilmiştir.

- ✓ Mikrodalga destekli ekstraksiyonda optimum koşullar 800 W mikrodalga gücü, 12 dakika ve 0,115 mol/l olarak elde edilmiştir.
- ✓ Hem renk hem de biyoaktif bileşenler açısından en yüksek değerler mikrodalga destekli ekstraksiyonla alınmış ve sonuçlar, renk değeri 41,48 TFM 274,09 mg GAE/g km, toplam antioksidan içeriği DPPH için 543,94 ve CUPRAC 1073,13 mg TE/g km, melanin pigmenti sonucu %24,5 olarak bulunmuştur.
- ✓ Bu ekstrakt sprey kurutma işlemine tabi tutulmuştur. Burada da Box-Behnken deneme tasarımı kullanılmıştır. Sprey kurutmada optimum koşullar, giriş sıcaklığı 160 °C, ektraktın kaplama materyaline oranı %10 ve kaplama materyalleri olan maltodekstrinin arabik gama oranı 80/20 olarak bulunmuştur.
- ✓ Renk değeri üzerine en yüksek değerin MDE ile elde edildiği ekstraksiyonlar arasında istatistiksel olarak anlamlı var olduğu (p<0,05) gözlenmiştir.
- ✓ TFM üzerine en yüksek değerin MDE ile elde edildiği, istatistiksel olarak MDE ile UDE ve KE arasında istatistiksel fark olduğu (p<0,05) ancak UDE ile KE arasında istatistiksel olarak fark olmadığı (p>0,05) belirlenmiştir.
- ✓ TAK CUPRAC sonucu üzerine en yüksek değerin MDE ile elde edildiği, istatistiksel olarak MDE ile UDE ve KE arasında istatistiksel fark olduğu (p<0,05) ancak UDE ile KE arasında istatistiksel olarak fark olmadığı (p>0,05) gözlenmiştir.
- ✓ TAK DPPH sonucu üzerine tüm ekstraksiyonlar arasında istatistiksel fark olduğu (p<0,05) gözlenmiştir.
- ✓ En yüksek Gallik Asit, Ellagik Asit, Protokateşuik Asit, Kateşin ve Epikateşin sonuçları mikrodalga destekli ekstraksiyonla alınmıştır.
- ✓ Mineral maddeler yönünden ekstraksiyon çözeltisinin NaOH olması nedeniyle Na mineralinin yüksek miktarda olduğu, diğer taraftan genel olarak ekstraksiyon yöntemleri arasında mineral maddeler ve ağır metaller yönünden istatistiki olarak fark olmadığı (p>0,05) ancak potasyum ve kalsiyum mineralinin diğer minerallere göre yüksek olduğu, ağır metaller yönünden bakır, arsenik, kadmiyum ve civa tespit edilemezken çinko ve alüminyum tespit edildiği görülmüştür.
- ✓ Melanin pigmenti yönünden en yüksek değeri mikrodalga destekli ekstraksiyonla elde edildiği, ultrasonik destekli ve klasik ekstraksiyonla benzer sonuçların elde edildiği gözlenmiştir.

- ✓ Ektraktların tümünün antibakteriyel aktivite açısından *Stapyloccus aureus*'a karşı inhibisyon özelliği olduğu diğer incelenen *Escherichia coli, Salmonella typhimurium* ve *Bacillus cereus'*a karşı inhibe edici özellikte olmadıkları ancak en yüksek inhibisyon aktivitesini mikrodalga destekli ekstraksiyonun sağladığı görülmüştür.
- ✓ Sprey kurutulmuş kestane kabuğu tozu mikrodalga destekli ekstraksiyon ile üretildiği için mikrodalga destekli ekstraksiyonda optimum koşullarda renk değeri 41,48 toplam fenolik madde içeriği 274,09 mg GAE/g km, toplam antioksidan içeriği DPPH için 543,94; CUPRAC 1073,13 mg TE/g km, melanin pigmenti sonucu yaklaşık 244000 mg/kg (%24,5) km toz ürün, ekstraktta ise yaklaşık 9797,08 mg/kg (yaklaşık %1) olarak bulunmuş ancak sprey kurutma işlemi gerçekleştikten sonra renk değeri 14,12 toplam fenolik madde içeriği 77,60 mg GAE/g km, toplam antioksidan içeriği DPPH için 130,49; CUPRAC 288,98 mg TE/g km, melanin pigmenti sonucu 80984,59 mg/kg (%0,81) olarak azaldığı görülmüştür.
- ✓ Yao vd., (2016) melanin pigmentinin suda çözünürlüğünün çok az veya kısmen olduğunu bildirirken, yaptığımız çalışmada sprey kurutulmuş melanin pigmenti içeren kestane kabuğu tozu suda çözünürlüğü %98,71 olarak bulunmuş, yüksek çözünürlükte kahverengi renkte biyoaktif özellikleri olan doğal kestane kabuğu boyası elde edilmiştir.
- ✓ Kestane kabuğu tozunun başlangıçtaki kestane kabuğu selüloz içeriği %15,3 iken sprey kurutulmuş tozlarda selüloz içeriği %1,39 olduğu ve azaldığı görülmüştür.
- ✓ Kullanılan maltodekstrin ve arabik gamdan dolayı sprey kurutulmuş kestane kabuğu tozunun toplam şeker içeriği %55,62 olarak bulunmuştur.
- ✓ Şelatlama aktivitesi 1000 mg/kg konsantrasyonda % inhibisyon 19,52 olarak bulunmuştur.
- ✓ Sprey kurutulmuş kestane kabuğu tozunda gallik ve ellagik asit miktarı ekstraksiyonlara göre artarken, protokateşuik asit, kateşin, epikateşin miktarlarının sprey kurutma işlemi neticesinde azaldığı gözlenmiştir.
- ✓ Sprey kurutulmuş kestane kabuğu tozunun camsı geçiş sıcaklığının 85,79 °C olduğu maltodekstrin ve arabik gam kullanılan sprey kurutulmuş bitki ekstraktları ile ilgili literatürle uyumlu olduğu görülmüştür (Fazaeli vd., 2012).

- ✓ Sprey kurutulmuş kestane kabuğu tozunun taramalı elektron mikroskobu (SEM) görüntüleri incelendiğinde enkapsüle kapsül çaplarının 1340 ile 8439 μm arasında değiştiği ve literatürle uyumlu olduğu (Ersus & Yurdagel, 2007) gözlenmiştir.
- ✓ Ekstraktlarla benzer olarak sprey kurutulmuş kestane kabuğu tozlarının *Stapyloccus aureus'a* karşı inhibisyon özelliği olduğu diğer incelenen *Escherichia coli, Salmonella typhimurium* ve *Bacillus cereus*'a karşı inhibe edici özellikte olmadıkları tozların elde edildiği mikrodalga ekstraktlara göre inhibisyon zonlarının 19,50 mm'den 14,13 mm'ye düştüğü gözlenmiştir.
- ✓ Ağır metaller açısından kurşun, civa kadmiyum miktarlarının Türk Gıda Kodeksi Bulaşanlar Yönetmeliği'ne uygun olduğu diğer ağır metallerle ilgili tebliğde bir sınır olmadığı gözlenmiştir (Tarım ve Orman Bakanlığı 2011).
- ✓ Sprey kurutulmuş kestane kabuğu tozlarında *in-vitro* olarak gerçekleştirilen XTT sitotoksisite testleri bu tozların 2500 ppm'e kadar konsantrasyonları toksik özellik göstermezken genotoksisite testleri olan γ H2AX ve Komet testlerinde, 4000 ppm kestane kabuğu konsantrasyonları ile çalışılmış, hücrelerde ve protein miktarlarında % olarak azalma görülse de toksik alanda bir sonuç vermemişlerdir. Bu nedenle 2500 ve 4000 ppm konsantrasyonlardaki sprey kurutulmuş kestane kabuğu tozlarının sitotoksik ve genotoksik etkilerinin olmadığı gözlenmiştir.

Tüm bu uygulama ve sonuçlar neticesinde bir atık olarak ortaya çıkan kestane kabukları mikrodalga destekli ekstraksiyonla yüksek pigment ve biyoaktif bileşenler içerecek şekilde elde edilmiş ve suda çözünebilirliği yüksek 4000 ppm'e kadar toksik olmayan gıdalarda kullanımına izin verilen kahverengi renkteki E155 Brown HT ve E150 a-d karamel boylarının ikamesi olarak içeceklerde, et ürünlerinde, salamura içindeki meyve-sebzelerde, şekerlemelerde ve malt ekmeği gibi tahıl ürünlerinde kullanılabileceği düşünülmekte ve önerilmektedir.

KAYNAKLAR

Aghajanyan, A. E., Hambardzumyan, A. A., Minasyan, E. V., Tsaturyan, A. H., Paloyan, A. M., Avetisyan, S. V., Hovsepyan, A. S., & Saghyan, A. S. (2022). Development of the technology for producing water-soluble melanin from waste of vinary production and the study of its physicochemical properties. *European Food Research and Technology*, *248*(2), 485–495. https://doi.org/10.1007/s00217-021-03894-9

Aires, A., Carvalho, R., & Saavedra, M. J. (2016). Valorization of solid wastes from chestnut industry processing: Extraction and optimization of polyphenols, tannins and ellagitannins and its potential for adhesives, cosmetic and pharmaceutical industry. *Waste Management*, *48*, 457–464. https://doi.org/10.1016/j.wasman.2015.11.019

An, J. Y., Wang, L. T., Lv, M. J., Wang, J. D., Cai, Z. H., Wang, Y. Q., Zhang, S., Yang, Q., & Fu, Y. J. (2021). An efficiency strategy for extraction and recovery of ellagic acid from waste chestnut shell and its biological activity evaluation. *Microchemical Journal*, *160*(PA), 105616. https://doi.org/10.1016/j.microc.2020.105616

Angiolillo, L., Del Nobile, M. A., & Conte, A. (2015). The extraction of bioactive compounds from food residues using microwaves. *Current Opinion in Food Science*, *5*, 93–98. https://doi.org/10.1016/j.cofs.2015.10.001

Anonim. (2013). Minolta, Precise Colour Communication. Colour Control From Feelig To Instrumentation. *Hand Book. Printed by Minolta Camera Co.*

Anonim. (2022). Melanin. Erişim adresi: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Melanin adresinden erişilmiştir.

Anonim. (2023). *Tipik Sprey Kurutuma Sistemleri*. Erişim adresi: http://bilsenbesergil.blogspot.com/p/sprey-kurutma-spray-drying.html

AOAC. (1977). Fiber (acid detergent) and lignin (H2SO4) in animal feed. *Official Method 973.18*.

AOAC. (1998). Fiber (Crude) in Animal Feed and Pet Food. *Official Method 962.09*

AOAC. (2000a). Total sugars in molasses as invert sugar. *Official Method 968.28*

AOAC. (2000b). Protein (Crude) in Animal Feed. Combustion Method. *Official Method 990.03*

Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., Esın Karademir, S., & Altun, M. (2005). Total antioxidant capacity assay of human serum using copper(II)-neocuproine as chromogenic oxidant: The CUPRAC method. *Free Radical Research*, *39*(9), 949–961. https://doi.org/10.1080/10715760500210145

BAKKA, (T.C. Batı Karadeniz Kalkınma Ajansı). (2020). *Kestane İşleme ve Paketleme Tesisi Ön Fizibilite Raporu*. Erişim adresi: https://bakkakutuphane.org/search?q=kestane

Blackwell, D. L., Herald, T. J., Bean, S. R., & Gadgil, P. (2012). Alkaline extraction of phenolic compounds from intact sorghum kernels. *International Journal of Food Science and Technology*, *47*(12), 2671–2675. https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2012.03138.x

Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*, *28*(1), 25–30. https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5

Browne, M. (2016). Imaging and image analysis in the comet assay. (pp. 515-550). *In The comet assay in toxicology, 515–550*.

Brudzyńska, P., Sionkowska, A., & Grisel, M. (2021). Plant-derived colorants for food, cosmetic and textile industries: A review. *Materials*, *14*(13), 1–18. https://doi.org/10.3390/ma14133484

Butler, M. J.,ve Day, A. W. (1998). Fungal melanins: a review. *Canadian Journal of Microbiology*, *44(12)*, 1115-1136.

Cacciola, N. A., Squillaci, G., D'Apolito, M., Petillo, O., Veraldi, F., Cara, F. La, Peluso, G., Margarucci, S., & Morana, A. (2019). Castanea sativa Mill. Shells aqueous extract exhibits anticancer properties inducing cytotoxic and pro-apoptotic effects. *Molecules*, *24*(18), 1–12. https://doi.org/10.3390/molecules24183401

Capanoglu, E., Nemli, E., & Tomas-Barberan, F. (2022). Novel Approaches in the Valorization of Agricultural Wastes and Their Applications. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. https://doi.org/10.1021/acs.jafc.1c07104

Chemat, F., Rombaut, N., Sicaire, A. G., Meullemiestre, A., Fabiano-Tixier, A. S., & Abert-Vian, M. (2017). Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review. *Ultrasonics Sonochemistry*, *34*, 540–560. https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2016.06.035

Chemat, F., Zill-E-Huma, & Khan, M. K. (2011). Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction. *Ultrasonics Sonochemistry*, *18*(4), 813–835. https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2010.11.023

Chen, S., Qi, J., Pang, M., & Wang, F. (2018). Optimization of extraction of pigment from chestnut shell using response surface methodology. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, *199*(4). https://doi.org/10.1088/1755-1315/199/4/042009

Chiou, D., & Langrish, T. A. G. (2007). Development and characterisation of novel nutraceuticals with spray drying technology. *Journal of Food Engineering*, *82*(1), 84–91. https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2007.01.021

Choo, W. S., & Saik, A. Y. H. (2021). Valorization of fruit and vegetable waste for bioactive pigments: Extraction and utilization. *Valorization of Agri-Food Wastes and By-Products: Recent Trends, Innovations and Sustainability Challenges*, 61–81. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-824044-1.00048-9

Chuyen, H. V., Nguyen, M. H., Roach, P. D., Golding, J. B., & Parks, S. E. (2018). Microwave-assisted extraction and ultrasound-assisted extraction for recovering carotenoids from Gac peel and their effects on antioxidant capacity of the extracts. *Food Science and Nutrition*, *6*(1), 189–196. https://doi.org/10.1002/fsn3.546

CLSI. (2012). Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests. *Approved Standard, 7th ed., CLSI document M02-A11*.

de Vasconcelos, M. C. B. M., Bennett, R. N., Rosa, E. A. S., & Ferreira-Cardoso, J. V. (2010). Composition of European chestnut (Castanea sativa Mill.) and association with health effects: Fresh and processed products. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *90*(10), 1578–1589. https://doi.org/10.1002/jsfa.4016

Delgado-Vargas, F., Jiménez, A. R., Paredes-López, O., & Francis, F. J. (2000). Natural pigments: Carotenoids, anthocyanins, and betalains - Characteristics, biosynthesis, processing, and stability. Içinde *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* (C. 40, Sayı 3). https://doi.org/10.1080/10408690091189257

Demir, E., Serdar, G., & Sökmen, M. (2016). Comparison of Some Extraction Methods for Isolation of Catechins and Caffeine from Turkish Green Tea. *International Journal of Secondary Metabolite*, *2*(2), 16–25. https://doi.org/10.21448/ijsm.240702

Demiral, I., & Çemrek Kul, Ş. (2015). Kestane Kabuğun Pirolizi Ve Elde Edilen Ürünlerin Karakterizasyonu. *Anadolu University Journal of Science and Technology-A Applied Sciences and Engineering*, *16*(2), 125. https://doi.org/10.18038/btd-a.73799

Deshmukh, K. R., & Pethe, A. S. (2015). Extraction and Analysis of Melanin Pigment Produced by Clostridium tertium Isolated from Water Sample of Saline Belt in West Vidardha Region. *International Journal of Science and Research*, *5*(8), 2015–2017.

Dhawan, A., Bajpayee, M., & Parmar, D. (2009). Comet assay: A reliable tool for the assessment of DNA damage in different models. *Cell Biology and Toxicology*, *25*(1), 5–32. https://doi.org/10.1007/s10565-008-9072-z

Dinis, T. C., Madeira, V. M., & Almeida, L. M. (1994). Action of phenolic derivatives (acetaminophen, salicylate, and 5-aminosalicylate) as inhibitors of membrane lipid peroxidation and as peroxyl radical scavengers. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *315*(1), 161-169.

Dönmez, İ. E., Selçuk, S., Sargın, S., & Özdeveci, H. (2016). Kestane, fındık ve antepfıstığı meyve kabuklarının kimyasal yapısı. *Turkish Journal of Forestry | Türkiye Ormancılık Dergisi*, *17*(2), 174. https://doi.org/10.18182/tjf.09817

Enochs, W. S., Nilges, M. J., & Swartz, H. M. (1993). A standardized test for the identification and characterization of melanins using electron paramagnetic resonance (EPR) spectroscopy. *Pigment cell research, 6(2)*, 91–99.

Erol, N. T., Incedayi, B., Sari, F., & Copur, O. U. (2022). Valorization of agricultural by-product: Optimization of alcohol-based extraction of polyphenols from chestnut peel using Box-Behnken Design. *International Food Research Journal*, *29*(1), 86–97. https://doi.org/10.47836/ifrj.29.1.10

Ersus, S., & Yurdagel, U. (2007). Microencapsulation of anthocyanin pigments of black carrot (Daucus carota L.) by spray drier. *Journal of Food Engineering*, *80*(3), 805–812. https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2006.07.009

Eser, H. (2019). Bursa ekolojik koşullarında yetiştirilen kestane çeşit ve genotiplerin meyvelerinde morfolojik karakterizasyon ve kimyasal içeriğin belirlenmesi(Yüksek Lisans Tezi). https://tez.yok.gov.tr/UlusalTezMerkezi/tezSorguSonucYeni.jsp adresinden erişildi.

Eskilsson, C. S., ve Björklund, E. (2000). Analytical-scale microwave-assisted extraction. *Journal of Chromatography A*, *902(1)*, 227-250.

Esposito, T., Silva, N. H. C. S., Almeida, A., Silvestre, A. J. D., Piccinelli, A., Aquino, R. P., Sansone, F., Mencherini, T., Vilela, C., & Freire, C. S. R. (2020). Valorisation of chestnut spiny burs and roasted hazelnut skins extracts as bioactive additives for packaging films. *Industrial Crops and Products*, *151*(November 2019). https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112491

FAO. (2015). Fao Statistical Pocketbook. Içinde *Metadata for Information Management and Retrieval*.

FAO 2011. (2013). The methodology of the FAO study : " Global Food Losses and Food Waste - extent , causes and prevention ". *SIK report No. 857: C. SIK report* (Sayı 857). Erişim adresi: https://www.diva-portal.org/smash/get/diva2:944159/FULLTEXT01.pdf

FAO, G. (2011). Global food losses and food waste–Extent, causes and prevention. SAVE FOOD: An initiative on food loss and waste reduction. *Food Loss and Food Waste: Causes and Solutions*. https://doi.org/10.4337/9781788975391

FAOSTAT. (2023). Production of Chestnuts,. Erişim adresi:

https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL/visualize adresinden erişildi.
Fazaeli, M., Emam-Djomeh, Z., Kalbasi Ashtari, A., & Omid, M. (2012). Effect of spray drying conditions and feed composition on the physical properties of black mulberry juice powder. *Food and Bioproducts Processing*, *90*(4), 667–675. https://doi.org/10.1016/j.fbp.2012.04.006
Fernández-agulló, A., Freire, M. S., Antorrena, G., Alberto, J., González-álvarez, J., Freire, M. S., Antorrena, G., Alberto, J., Castanea, C., Freire, M. S., Antorrena, G., Pereira, A., & Gonza, J. (2014). Effect of the Extraction Technique and Operational Conditions on the Recovery of Bioactive Compounds from Chestnut (Castanea sativa) Bur and Shell. *Separation Science and Technology*. https://doi.org/10.1080/01496395.2013.838264
Gao, X., Han, M. M., Zhang, X. Y., Cai, Z. Y., Wang, F., Pang, M. X., & Qi, J. H. (2019). Study on chemical properties of chestnut shell pigment. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, *371*(4). https://doi.org/10.1088/1755-1315/371/4/042049
Gullón, B., Eibes, G., Dávila, I., Moreira, M. T., Labidi, J., & Gullón, P. (2018). Hydrothermal treatment of chestnut shells (Castanea sativa) to produce oligosaccharides and antioxidant compounds. *Carbohydrate Polymers*, *192*(November 2017), 75–83. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.03.051
Gulsunoglu, Z., Karbancioglu-Guler, F., Raes, K., & Kilic-Akyilmaz, M. (2019). Soluble and insoluble-bound phenolics and antioxidant activity of various industrial plant wastes. *International Journal of Food Properties*, *22*(1), 1501–1510. https://doi.org/10.1080/10942912.2019.1656233
Ham, J. S., Kim, H. Y., & Lim, S. T. (2015). Antioxidant and deodorizing activities of phenolic components in chestnut inner shell extracts. *Industrial Crops and Products*, *73*, 99–105. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.04.017
Hammami, C., & René, F. (1997). Determination of Freeze-drying Process Variables for Strawberries. *Journal of Food Engineering*, *32*(2), 133–154. https://doi.org/10.1016/S0260-8774(97)00023-X
Handa, S. S., Khanuja, S. P. S., Longo, G., & Rakesh, D. D. (2008). Extraction technologies for medicinal and aromatic plants (United Nations Industrial Development Organisation and the International Centre for Science and High Technology). , 99,. *International Centre for Science and High Technology-United Nations Industrial Development Organization, area Science Park Padriciano*, 266.
Henson JM. Hofrichter M, Steinbuechel A. (2001). Melanin. *Biopolymers*, *1*, 229–246.
Herrero, M., Cifuentes, A., & Ibañez, E. (2006). Sub- and supercritical fluid extraction of functional ingredients from different natural sources: Plants, food-by-products, algae and microalgae - A review. *Food Chemistry*, *98*(1), 136–148. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.05.058
Hill, H. Z., Huselton, C., Pilas, B., & Hill, G. J. (1987). Ability of melanins to protect against the radiolysis of thymine and thymidine. *Pigment cell research, 1(2),* 81-86.
Hiranvarachat, B., & Devahastin, S. (2014). Enhancement of microwave-assisted extraction via intermittent radiation: Extraction of carotenoids from carrot peels. *Journal of Food Engineering*, *126*, 17–26. https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.10.024
HLPE. (2014). Food Losses and Waste in the Context of Sustainable Food Systems. *High Level Panel of Experts on Food Security and Nutrition of the Committee on World Food Security of Sustainable Food Systems*, *June*, 1–117. www.fao.org/cfs/cfs-

hlpe%0Ahttp://www.fao.org/3/a-i3901e.pdf
Ho, K. K. H. Y., Ferruzzi, M. G., Liceaga, A. M., & San Martín-González, M. F. (2015). Microwave-assisted extraction of lycopene in tomato peels: Effect of extraction conditions on all-trans and cis-isomer yields. *LWT*, *62*(1), 160–168. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.12.061
Hong, L., & Simon, J. D. (2007). Current understanding of the binding sites, capacity, affinity, and biological significance of metals in melanin. *The Journal of Physical Chemistry B, 111(28)*, 7938–7947.
Hu, M., Yang, X., & Chang, X. (2021). Bioactive phenolic components and potential health effects of chestnut shell: A review. *Journal of Food Biochemistry*, *45*(4), 1–16. https://doi.org/10.1111/jfbc.13696
Huang, L., Liu, M., Huang, H., Wen, Y., Zhang, X., & Wei, Y. (2018). Recent Advances and Progress on Melanin-like Materials and Their Biomedical Applications [Review-article]. *Biomacromolecules*, *19*, 1858–1868. https://doi.org/10.1021/acs.biomac.8b00437
Hue-gun, D., & Yue-hua, W. (2012). Microwave-assisted Extraction of Melanin from the Seed Coat of Mucuna prurients. *Medicinal Plant*. *3*(2), 65–67.
Hung, Y., Sava, V. M., Yu, S., Chen, T. J., Hong, M., & Steven, G. (2002). Antioxidant activity of melanins derived from tea : comparison between different oxidative states. *Food Chemistry*, *78*, 233–240.
İlbay, Z. (2016). Turunçgil Meyve ve Yapraklarının Farklı Ekstraksiyon Yöntemleriyle Ekstraksiyonu ve Matematik Modellemesi. *İstanbul Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı, Temel İşlemler ve Termodinamik Bilim Dalı. Doktora Tezi, 168 s.*
İnsan sağlıklı bronşial epitel hücre. (2022). Beas-2B (ATCC® CRL-9609™). Erişim adresi: http://www.biofeng.com/ATCC/xibao/BEAS-2B.html
Kamei, H., Koide, T., Kojima, T., Hasegawa, M., & Umeda, T. (1997). Suppression of growth of cultured malignant cells by allomelanins, plant-produced melanins. *Cancer biotherapy & radiopharmaceuticals*, *12(1)*, 47-49.
Karabacak, A. Ö., Tamer, C. E., Çopur, Ö. U., & Yagcıları, M. (2019). Ultrasound applications in fruit and vegetable processing. *Bursa Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, *33*(2), 375–393. http://193.140.245.211/handle/11452/7014
Kasımoglu, Z., Yıldırım, A., Alkan, S., Topuz, A., & Nadeem, H. Ş. (2016). Seedcoat 's Water Extract By Spray. *Journal of ongoing Chemical Research*, *2*(2), 34-44.
Kayahan, S., & Saloglu, D. (2021). *C*omparison of Phenolic Compounds and Antioxidant Activities of Raw and Cooked Turkish Artichoke Cultivars. *Frontiers in Sustainable Food Systems, 5, 761145*. https://doi.org/10.3389/fsufs.2021.761145
Keles, Y., & Özdemir, Ö. (2018). Extraction, purification, antioxidant properties and stability conditions of phytomelanin pigment on the sunflower seeds. *International Journal of Secondary Metabolite*, *5*(2), 140–148. https://doi.org/10.21448/ijsm.377470
Knez, Ž., Škerget, M., & KnezHrnčič, M. (2013). (2013). Principles of supercritical fluid extraction and applications in the food, beverage and nutraceutical industries. *In Separation, extraction and concentration processes in the food, beverage and nutraceutical industries* (s. (pp. 3-38).). Woodhead publishing.
Knez, Markočič, E., Leitgeb, M., Primožič, M., Knez Hrnčič, M., & Škerget, M. (2014). *Industrial applications of supercritical fluids*: A review. *Energy*, *77*, 235–243. https://doi.org/10.1016/j.energy.2014.07.044

Konca, Y., & Beyzi, S. B. (2020). Konca, Y., & Beyzi, S. B. (2020). The Effects of Soaking and Autoclaving on Chemical and Nutritional Composition of the Horse Chestnut (Aesculus hippocastanum) Seed. *Avrupa Bilim ve Teknoloji Dergisi*, (19), 757-762. https://doi.org/10.31590/ejosat.747017

Koubaa, M., Mhemdi, H., & Fages, J. (2018). Recovery of valuable components and inactivating microorganisms in the agro-food industry with ultrasound-assisted supercritical fluid technology. *Journal of Supercritical Fluids*, *134*(December 2017), 71–79. https://doi.org/10.1016/j.supflu.2017.12.012

Lameirão, F., Pinto, D., Vieira, E. F., Peixoto, A. F., Freire, C., Sut, S., Dall'acqua, S., Costa, P., Delerue-Matos, C., & Rodrigues, F. (2020). Green-sustainable recovery of phenolic and antioxidant compounds from industrial chestnut shells using ultrasound-assisted extraction: Optimization and evaluation of biological activities in vitro. *Antioxidants*, *9*(3), 1–19. https://doi.org/10.3390/antiox9030267

Li, H. J., Li, J. X., & Zhao, Z. (2016). Characterization of melanin extracted from apricot (Armeniaca sibirica) and its effect on hydrazine-induced rat hepatic injury. *ScienceAsia*, *42*(6), 382–391. https://doi.org/10.2306/scienceasia1513-1874.2016.42.382

Li, Y., Fabiano-Tixier, A. S., Abert-Vian, M., & Chemat, F. (2013). Microwave-assisted extraction of antioxidants and food colors. *Food Engineering Series*, *June 2015*, 103–125. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-4830-3_5

Łopusiewicz, Ł. (2017). Natural sources of melanin. *In II International Conference Human Ecology*, 127–177.

Lu, Y., Ye, M., Song, S., Li, L., Shaikh, F., & Li, J. (2014). Isolation, purification, and anti-aging activity of melanin from Lachnum singerianum. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, *174*(2), 762–771. https://doi.org/10.1007/s12010-014-1110-0

M Prado, J., C Veggi, P., & Meireles, A. A. (2014). Extraction methods for obtaining carotenoids from vegetables-review. *Current Analytical Chemistry*, *10(1)*, 29-66.

Manzoor, M., Singh, J., Gani, A., & Noor, N. (2021). Valorization of natural colors as health-promoting bioactive compounds: Phytochemical profile, extraction techniques, and pharmacological perspectives. *Food Chemistry*, *362*(May). https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130141

Melikoglu, M., Lin, C. S. K., & Webb, C. (2013). Analysing global food waste problem: Pinpointing the facts and estimating the energy content. *Central European Journal of Engineering*, *3*(2), 157–164. https://doi.org/10.2478/s13531-012-0058-5

Mimura, T., Itoh, S., Tsujikawa, K., Nakajima, H., Satake, M., Kohama, Y., & Okabe, M. (1987). Studies on biological activities of melanin from marine animals. V. Anti-inflammatory activity of low-molecular-weight melanoprotein from squid (Fr. SM II). *Chemical and pharmaceutical bulletin*, *35(3)*, 1144-1150.

Montefiori, D. C., & Zhou, J. (1991). Selective antiviral activity of synthetic soluble L-tyrosine and L-dopa melanins against human immunodeficiency virus in vitro. *Antiviral research*, *15(1)*, 11-25.

Mortensen, A. (2006). Carotenoids and other pigments as natural colorants. *Pure and Applied chemistry*, *78(8)*, 1477–1491.

NMKL. (2014). As, Cd, Hg, Pb and other elements. Determination by ICP-MS after pressure digestion. *Method 186-Trace elements*

OECD. (2016). Agricultural Policy Monitoring and Evaluation 2016. *OECD*. https://doi.org/10.1787/agr_pol-2016-en

Oral, M. A. (2006). Anadolu kestanesinin (Castanea sativa Mill.) Sağlıklı ve hastalıklı

odunlarının bazı anatomik ve fiziksel özellikleri(Yüksek Lisans Tezi). https://tez.yok.gov.tr/UlusalTezMerkezi/tezSorguSonucYeni.jsp adresinden erişildi.

Otles, S., Despoudi, S., Bucatariu, C., & Kartal, C. (2015). Food waste management, valorization, and sustainability in the food industry. Içinde *Food Waste Recovery: Processing Technologies and Industrial Techniques*. Elsevier Inc. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800351-0.00001-8

Otles, S., & Selek, I. (2012). Phenolic compounds and antioxidant activities of chestnut (Castanea sativa Mill.) fruits. *Quality Assurance and Safety of Crops and Foods*, *4*(4), 199–205. https://doi.org/10.1111/j.1757-837X.2012.00180.x

Parfitt, J., Barthel, M., & MacNaughton, S. (2010). Food waste within food supply chains: Quantification and potential for change to 2050. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, *365*(1554), 3065–3081. https://doi.org/10.1098/rstb.2010.0126

Pinto, D., Cádiz-Gurrea, M. de la L., Vallverdú-Queralt, A., Delerue-Matos, C., & Rodrigues, F. (2021). Castanea sativa shells: A review on phytochemical composition, bioactivity and waste management approaches for industrial valorization. *Food Research International*, *144*(December 2020). https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110364

Pinto, D., De La Luz Cádiz-Gurrea, M., Sut, S., Ferreira, A. S., Leyva-Jimenez, F. J., Dall'acqua, S., Segura-Carretero, A., Delerue-Matos, C., & Rodrigues, F. (2020). Valorisation of underexploited Castanea sativa shells bioactive compounds recovered by supercritical fluid extraction with CO2: A response surface methodology approach. *Journal of CO2 Utilization*, *40*(February). https://doi.org/10.1016/j.jcou.2020.101194

Pinto, D., Silva, A. M., Freitas, V., Vallverdú-Queralt, A., Delerue-Matos, C., & Rodrigues, F. (2021). Microwave-Assisted Extraction as a Green Technology Approach to Recover Polyphenols from Castanea sativa Shells. *ACS Food Science & Technology*, *1*(2), 229–241. https://doi.org/10.1021/acsfoodscitech.0c00055

Pinto, D., Vieira, E. F., Peixoto, A. F., Freire, C., Freitas, V., Costa, P., Delerue-Matos, C., & Rodrigues, F. (2021). Optimizing the extraction of phenolic antioxidants from chestnut shells by subcritical water extraction using response surface methodology. *Food Chemistry*, *334*(November 2019), 127521. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127521

Putnik, P., Lorenzo, J. M., Barba, F. J., Roohinejad, S., Jambrak, A. R., Granato, D., Montesano, D., & Kovačević, D. B. (2018). Novel food processing and extraction technologies of high-added value compounds from plant materials. *Foods*, *7*(7), 1–16. https://doi.org/10.3390/foods7070106

Rodrigues, F., Santos, J., Pimentel, F. B., Braga, N., Palmeira-de-Oliveira, A., & Oliveira, M. B. P. P. (2015). Promising new applications of Castanea sativa shell: Nutritional composition, antioxidant activity, amino acids and vitamin e profile. *Food and Function*, *6*(8), 2854–2860. https://doi.org/10.1039/c5fo00571j

Rodríguez-Hernández, G. R., González-García, R., Grajales-Lagunes, A., & Ruiz-Cabrera, M. A. (2005). Spray-Drying of Cactus Pear Juice (Opuntia. *Drying Technology*, *23*(4), 955–973.

Roehm, N. W., Rodgers, G. H., Hatfield, S. M., & Glasebrook, A. L. (1991). An improved colorimetric assay for cell proliferation and viability utilizing the tetrazolium salt XTT. *Journal of immunological methods*, *142*(2), 257–265.

Rostagno, M. A., Palma, M., & Barroso, C. G. (2007). Microwave assisted extraction of soy isoflavones. *Analytica Chimica Acta*, *588*(2), 274–282. https://doi.org/10.1016/j.aca.2007.02.010

Salihoglu, G., Salihoglu, N. K., Ucaroglu, S., & Banar, M. (2018). Food loss and waste management in Turkey. *Bioresource Technology*, *248*, 88–99. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.06.083

Sapkale, G. N., Patil, S. M., Surwase, U. S., & Bhatbhage, P. K. (2010). Supercritical Fluid Extraction. *Supercritical fluid extraction. Int. J. Chem. Sci*, *8*(2), 729–743. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384947-2.00675-9

Sava, V. M., Yang, S. M., Hong, M. Y., Yang, P. C., & Huang, G. S. (2001). Isolation and characterization of melanic pigments derived from tea and tea polyphenols. *Food Chemistry*, *73*(2), 177–184. https://doi.org/10.1016/S0308-8146(00)00258-2

Scalbert, A., Johnson, I. T., & Saltmarsh, M. (2005). Polyphenols: antioxidants and beyond. *The American journal of clinical nutrition*, *81*(1 Suppl), 215–217. https://doi.org/10.1093/ajcn/81.1.215s

Schilter, B., Andersson, C., Anton, R., Constable, A., Kleiner, J., O'Brien, J., Renwick, A. G., Korver, O., Smit, F., & Walker, R. (2003). Guidance for the safety assessment of botanicals and botanical preparations for use in food and food supplements. *Food and Chemical Toxicology*, *41*(12), 1625–1649. https://doi.org/10.1016/S0278-6915(03)00221-7

Senesi N, Miano TM, M. J. (1987). Elemental, functional infrared and free-radical characterization of humic acid-type fungal polymers (melanins). *Biol Fertility Soils*, *5*(120), 5.

Sharma, M., Usmani, Z., Gupta, V. K., & Bhat, R. (2021). Valorization of fruits and vegetable wastes and by-products to produce natural pigments. *Critical Reviews in Biotechnology*, *41*(4), 535–563. https://doi.org/10.1080/07388551.2021.1873240

Shishir, M. R. I., & Chen, W. (2017). Trends of spray drying: A critical review on drying of fruit and vegetable juices. *Trends in Food Science and Technology*, *65*, 49–67. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.05.006

Silva, V., Falco, V., Dias, M. I., Barros, L., Silva, A., Capita, R., Alonso-Calleja, C., Amaral, J. S., Igrejas, G., Ferreira, I. C. F. R., & Poeta, P. (2020). Evaluation of the phenolic profile of Castanea sativa mill. By-products and their antioxidant and antimicrobial activity against multiresistant bacteria. *Antioxidants*, *9*(1). https://doi.org/10.3390/antiox9010087

Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventós, R. M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *In Methods in enzymology*, *299*, 152–178.

Solano, F. (2014). *Melanins : Skin Pigments and Much More — Types , Structural Models , Biological Functions , and Formation Routes*. *2014*.

Sonar, M. P., & Rathod, V. K. (2020). Microwave assisted extraction (MAE) used as a tool for rapid extraction of Marmelosin from Aegle marmelos and evaluations of total phenolic and flavonoids content, antioxidant and anti-inflammatory activity. *Chemical Data Collections*, *30*. https://doi.org/10.1016/j.cdc.2020.100545

Squillaci, G., Apone, F., Sena, L. M., Carola, A., Tito, A., Bimonte, M., Lucia, A. De, Colucci, G., Cara, F. La, & Morana, A. (2018). Chestnut (Castanea sativa Mill.) industrial wastes as a valued bioresource for the production of active ingredients. *Process Biochemistry*, *64*(June 2017), 228–236. https://doi.org/10.1016/j.procbio.2017.09.017

Sun, S., Zhang, X., Chen, W., Zhang, L., & Zhu, H. (2016). Production of natural edible melanin by Auricularia auricula and its physicochemical properties. *Food Chemistry*, *196*, 486–492. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.09.069

Tanaka, T., Huang, X., Halicka, H. D., Zhao, H., Traganos, F., Albino, A. P., Dai, W., & Darzynkiewicz, Z. (2007). Cytometry of ATM activation and histone H2AX phosphorylation to estimate extent of DNA damage induced by exogenous agents. *Cytometry Part A*, *71*(9), 648–661. https://doi.org/10.1002/cyto.a.20426

Tatlıdil, F. F., Dellal, I., & Bayramoğlu, Z. (2013). *Food Losses and Waste in Turkey - Country Report*. 1–48.

TSE. (2000). Doğal Nişasta-Nişasta Muhtevası Tayini. *TS EN ISO 10520*

TSE. (2010). Tahıllar, baklagiller ve yan ürünleri - Yakılarak kül muhtevasının tayini-*TS EN ISO 2171*.

TSE. (2015a). Kestane şekeri-*TS 9400*.

TSE. (2015b). Meyve ve sebze mamulleri- Hidroklorik asitte çözünmeyen kül tayini-*TSE ISO 763*.

Tu, Y., Sun, Y., Tian, Y., Xie, M., & Chen, J. (2009). Physicochemical characterisation and antioxidant activity of melanin from the muscles of Taihe Black-bone silky fowl (Gallus gallus domesticus Brisson). *Food Chemistry*, *114*(4), 1345–1350. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.11.015

Tarım ve Orman Bakanlığı (2011). *Türk Gıda Kodeksi Bulaşanlar Yönetmeliği*. Erişim adresi: https://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2011/12/20111229M3-8.htm

TURKSTAT. (2018). *Turkey in Statistics*. Türkiye İstatistik Kurumu. Erişim adresi: http://www.turkstat.gov.tr adresinden erişildi.

TURKSTAT. (2023). *Sert Kabuklu Meyveler*. Türkiye İstatistik Kurumu. Erişim adresi: https://data.tuik.gov.tr/Kategori/GetKategori?p=tarim-111&dil=1

Varga, M., Berkesi, O., Darula, Z., May, N. V., & Palágyi, A. (2016). Structural characterization of allomelanin from black oat. *Phytochemistry*, *130*, 313–320. https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2016.07.002

Vázquez, G., Fernández-Agulló, A., Gómez-Castro, C., Freire, M. S., Antorrena, G., & González-Álvarez, J. (2012). Response surface optimization of antioxidants extraction from chestnut (Castanea sativa) bur. *Industrial Crops and Products*, *35*(1), 126–134. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2011.06.022

Vázquez, G., Fontenla, E., Santos, J., Freire, M. S., González-Álvarez, J., & Antorrena, G. (2008). Antioxidant activity and phenolic content of chestnut (Castanea sativa) shell and eucalyptus (Eucalyptus globulus) bark extracts. *Industrial Crops and Products*, *28*(3), 279–285. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2008.03.003

Vázquez, G., González-Alvarez, J., Santos, J., Freire, M. S., & Antorrena, G. (2009). Evaluation of potential applications for chestnut (Castanea sativa) shell and eucalyptus (Eucalyptus globulus) bark extracts. *Industrial Crops and Products*, *29*(2–3), 364–370. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2008.07.004

Vella, F. M., Laratta, B., & Cara, F. La. (2018). Recovery of bioactive molecules from chestnut (Castanea sativa Mill .) by-products through extraction by different solvents. *Natural Product Research*, *6419*, 1–11. https://doi.org/10.1080/14786419.2017.1378199

Vilkhu, K., Mawson, R., Simons, L., & Bates, D. (2008). Applications and opportunities for ultrasound assisted extraction in the food industry - A review. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, *9*(2), 161–169. https://doi.org/10.1016/j.ifset.2007.04.014

Vinatoru, M., Mason, T. J., & Calinescu, I. (2017). Ultrasonically assisted extraction (UAE) and microwave assisted extraction (MAE) of functional compounds from plant materials. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, *97*, 159–178. https://doi.org/10.1016/j.trac.2017.09.002

Vuong, Q. V., Nguyen, V. T., Thanh, D. T., Bhuyan, D. J., Goldsmith, C. D., Sadeqzadeh, E., Scarlett, C. J., & Bowyer, M. C. (2015). Optimization of ultrasound-assisted extraction conditions for euphol from the medicinal plant, Euphorbia tirucalli, using response surface methodology. *Industrial Crops and Products*, *63*, 197–202. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.09.057

Wang, L. F., & Rhim, J. W. (2019). Isolation and characterization of melanin from black garlic and sepia ink. LWT, https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.09.033

Wu, Z., Zhang, M., Yang, H., Zhou, H., & Yang, H. (2018). Production, physico-chemical characterization and antioxidant activity of natural melanin from submerged cultures of the mushroom Auricularia auricula. *Food Bioscience*, *26*(September), 49–56. https://doi.org/10.1016/j.fbio.2018.09.008

Yaltırık, F. (1982). (1982). Castanea Miller In: Flora of Turkey and the East Aegean Islands. *Ed. Davis, PH, Edmondson, JR, Mill, RR, Tan, K,*.

Yao, Z., Qi, J., & Wang, L. (2012). Isolation, Fractionation and Characterization of Melanin-like Pigments from Chestnut (Castanea mollissima) Shells. *Journal of Food Science*, *77*(6), 671–676. https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2012.02714.x

Yao, Z. Y., & Qi, J. H. (2016). Comparison of antioxidant activities of melanin fractions from chestnut shell. *Molecules*, *21*(4). https://doi.org/10.3390/molecules21040487

Yao, Z. Y., Qi, J. H., Hu, Y., & Wang, Y. (2016). Insolubilization of Chestnut Shell Pigment for Cu(II) Adsorption from Water. *Molecules*, *21*(4), 1–11. https://doi.org/10.3390/molecules21040405

Yazıcı H. (1998). Ahsap Tekne Yapımında Kullanılan ve Doğal Olarak Egribükülmüş Kestane (Castanea Sativa mill.) Ağaçlarının Bazı Fiziksel Mekaniksel Özellikleri(Yüksek Lisans Tezi).

You, T. T., Zhou, S. K., Wen, J. L., Ma, C., & Xu, F. (2014). Chemical composition, properties, and antimicrobial activity of the water-soluble pigments from Castanea mollissima shells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *62*(8), 1936–1944. https://doi.org/10.1021/jf4045414

Yüksel, N., Ülkeryidiz Balçık, E., Deniz Şirinyıldız, D., Binat, Z., & Boyacıoğlu, O. (2020). Aydın'ın Değerlerinden Biri Olan Kestane Meyvesinin Önemi. *Türk Doğa ve Fen Dergisi*, *9*(1), 162–166. https://doi.org/10.46810/tdfd.713592

Zhou, J., Gullón, B., Wang, M., Gullón, P., Lorenzo, J. M., & Barba, F. J. (2021). The application of supercritical fluids technology to recover healthy valuable compounds from marine and agricultural food processing by-products: A review. *Processes*, *9*(2), 1–23. https://doi.org/10.3390/pr9020357

Zhu, X., Wang, Y., Liu, W., Hu, Z., & Chen, J. (2017). Optimization of Conditions for the Extraction of Melanin from Walnut Husk. *Agricultural Science & Technology*, *18*((5)), 818-826.

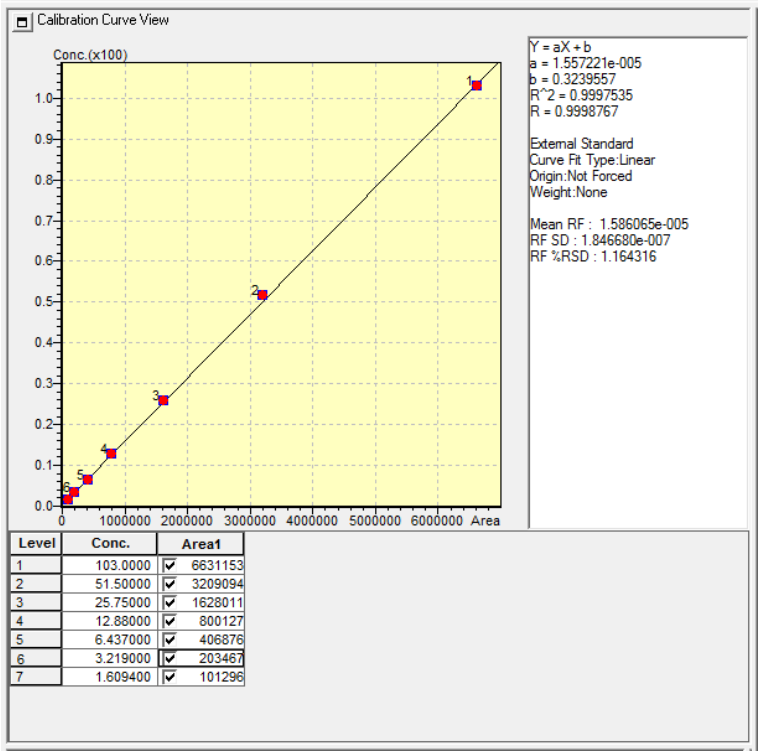
Zin, M. M., Anucha, C. B., & Bánvölgyi, S. (2020). Recovery of phytochemicals via electromagnetic irradiation (Microwave-Assisted-Extraction): Betalain and phenolic compounds in perspective. *Foods*, *9*(7). https://doi.org/10.3390/foods9070918

Zou, Y., & Jiang, A. (2015). Optimizing conditions for melanin extraction from black tea leaf. *The Annals of the University Dunarea de Jos of Galati. Fascicle VI-Food Technology*, *39*(2), 30-37.

EKLER

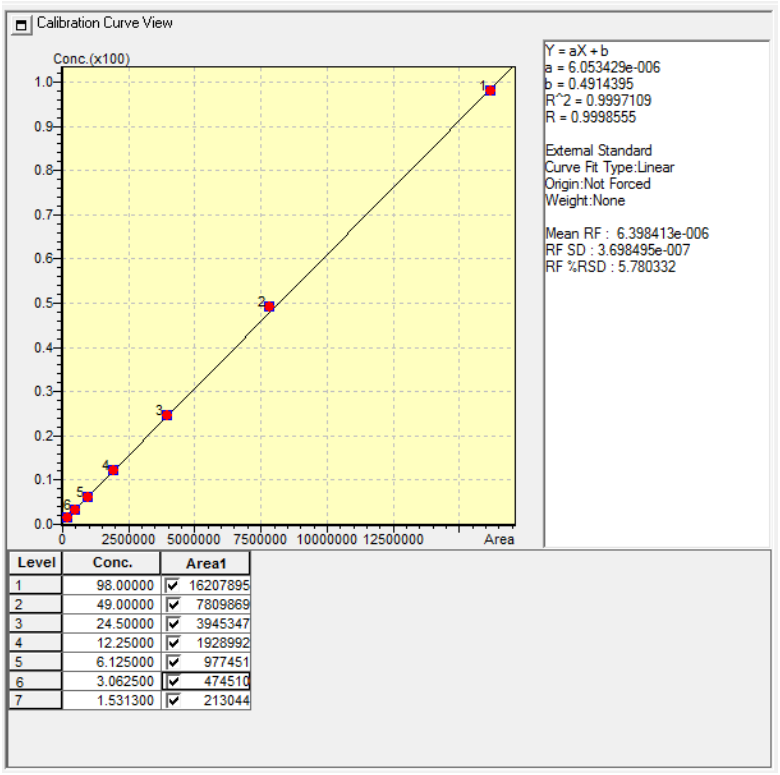
EK 1 Gallik asit bileşenine ait kalibrasyon grafiği
EK 2 Ellagik asit bileşenine ait kalibrasyon grafiği
EK 3 Protokateşuik asit bileşenine ait kalibrasyon grafiği
EK 4 Epikateşin bileşenine ait kalibrasyon grafiği
EK 5 Kateşin hidrat bileşenine ait kalibrasyon grafiği
EK 6 Miricetin-3-O glucozit bileşenine ait kalibrasyon grafiği
EK 7 Siringetin- 3-O glukozit bileşenine ait kalibrasyon grafiği
EK 8 Potasyum (K) mineraline ait kalibrasyon grafiği
EK 9 Fosfor (P) mineraline ait kalibrasyon grafiği
EK 10 Magnezyum (Mg) mineraline ait kalibrasyon grafiği
EK 11 Demir (Fe) mineraline ait kalibrasyon grafiği
EK 12 Sodyum (Na) mineraline ait kalibrasyon grafiği
EK 13 Kalsiyum (Ca) mineraline ait kalibrasyon grafiği
EK 14 Bakır (Cu) mineraline ait kalibrasyon grafiği
EK 15 Çinko (Zn) mineraline ait kalibrasyon grafiği
EK 16 Arsenik (As) mineraline ait kalibrasyon grafiği
EK 17 Kadmiyum (Cd) mineraline ait kalibrasyon grafiği
EK 18 Civa (Hg) mineraline ait kalibrasyon grafiği
EK 19 Kurşun (Pb) mineraline ait kalibrasyon grafiği
EK 20 Alüminyum (Al) mineraline ait kalibrasyon grafiği
EK 21 Klasik ekstraksiyon fenolik bileşenler HPLC kromatogramı
EK 22 Ultrasonik destekli ekstraksiyon fenolik bileşenler HPLC kromatogramı
EK 23 Mikrodalga destekli ekstraksiyon fenolik bileşenler HPLC kromatogramı
EK 24 SKK tozu fenolik bileşenler HPLC kromatogramı

EK 1 Gallik asit bileşenine ait kalibrasyon grafiği



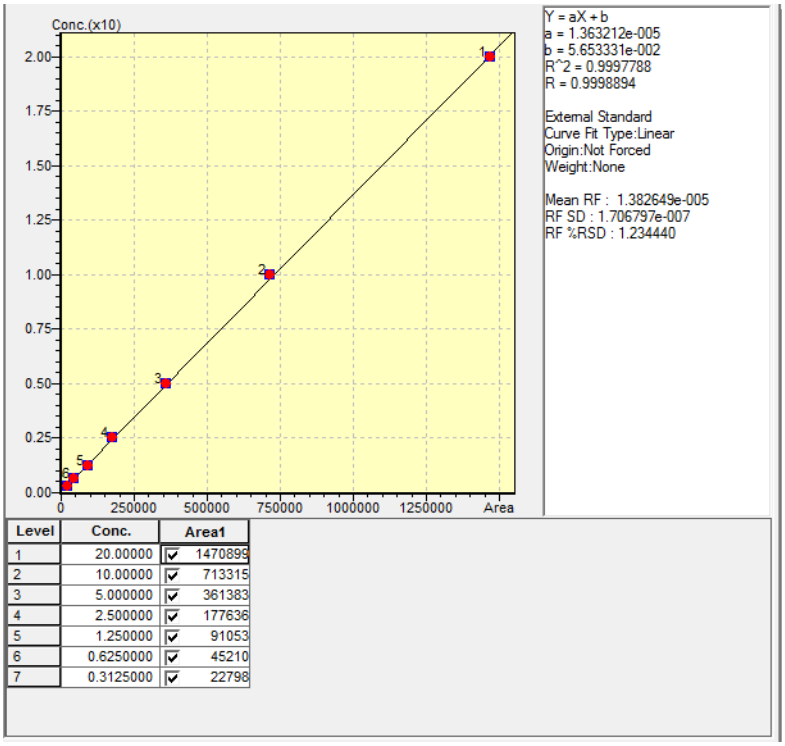
Level	Conc.	Area1
1	103.0000	6631153
2	51.50000	3209094
3	25.75000	1628011
4	12.88000	800127
5	6.437000	406876
6	3.219000	203467
7	1.609400	101296

EK 2 Ellagik asit bileşenine ait kalibrasyon grafiği



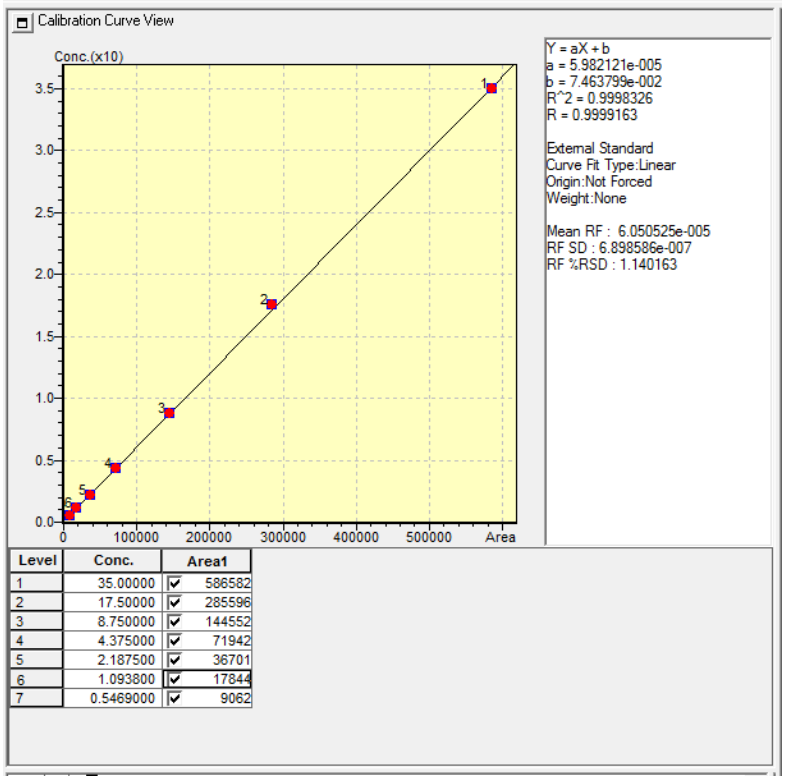
Level	Conc.	Area1
1	98.00000	16207895
2	49.00000	7809869
3	24.50000	3945347
4	12.25000	1928992
5	6.125000	977451
6	3.062500	474510
7	1.531300	213044

EK 3 Protokateşuik asit bileşenine ait kalibrasyon grafiği



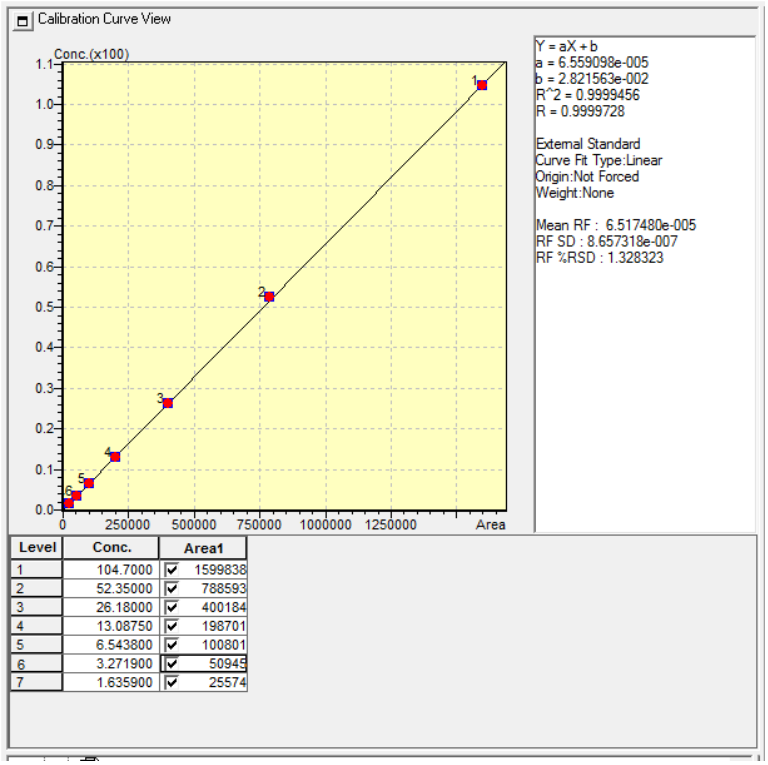
Level	Conc.	Area1
1	20.00000	1470899
2	10.00000	713315
3	5.000000	361383
4	2.500000	177636
5	1.250000	91053
6	0.6250000	45210
7	0.3125000	22798

EK 4 Epikateşin bileşenine ait kalibrasyon grafiği



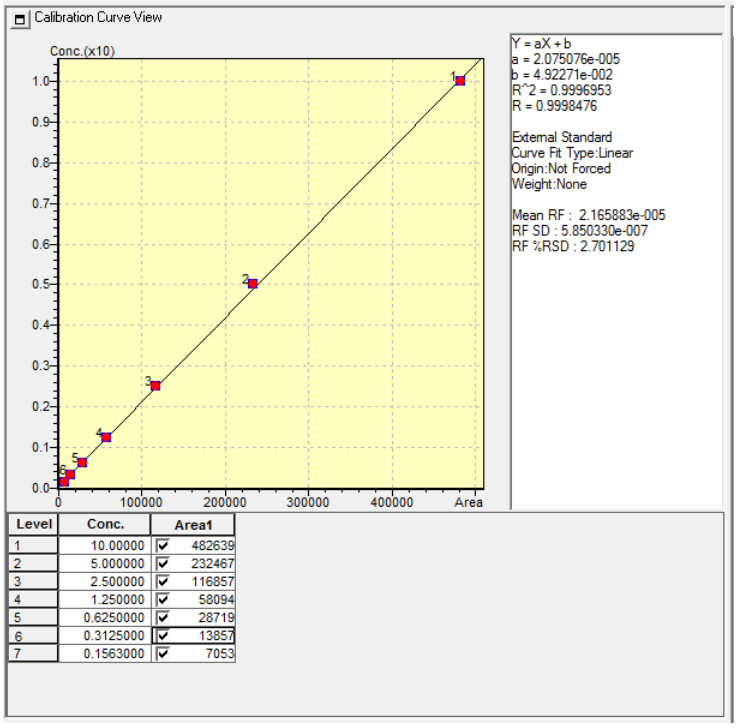
Level	Conc.	Area1
1	35.00000	586582
2	17.50000	285596
3	8.750000	144552
4	4.375000	71942
5	2.187500	36701
6	1.093800	17844
7	0.5469000	9062

EK 5 Kateşin hidrat bileşenine ait kalibrasyon grafiği



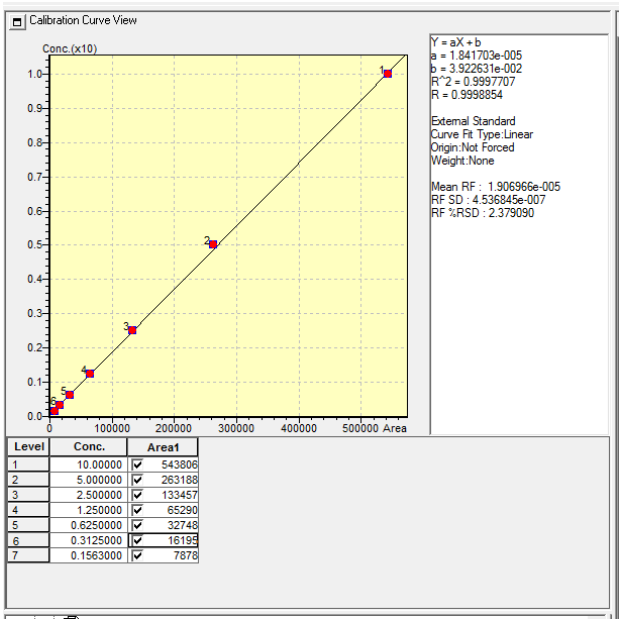
Level	Conc.	Area1
1	104.7000	1599838
2	52.35000	788593
3	26.18000	400184
4	13.08750	198701
5	6.543800	100801
6	3.271900	50945
7	1.635900	25574

EK 6 Miricetin-3-O glucosit bileşenine ait kalibrasyon grafiği

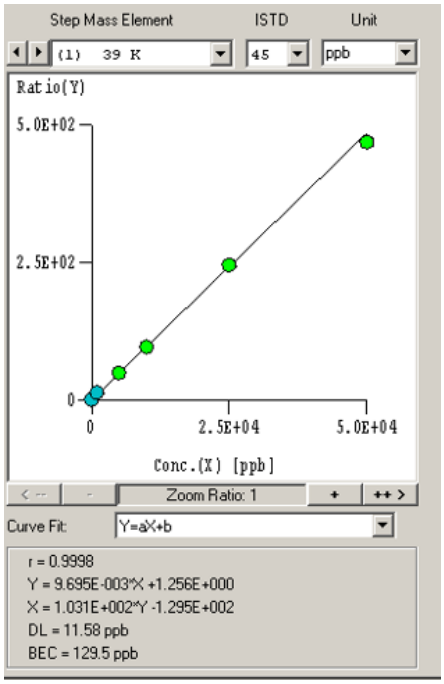


Level	Conc.	Area1
1	10.00000	482639
2	5.000000	232467
3	2.500000	116857
4	1.250000	58094
5	0.6250000	28719
6	0.3125000	13857
7	0.1563000	7053

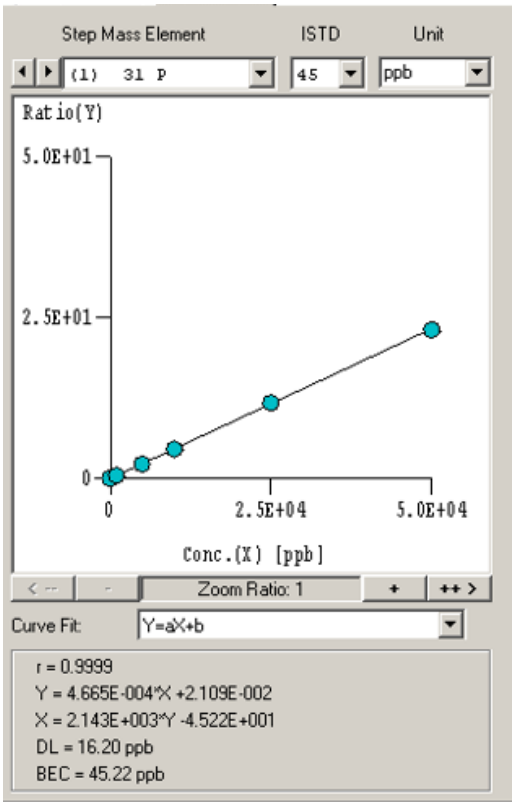
EK 7 Şiringatin- 3-O glukozit bileşenine ait kalibrasyon grafiği



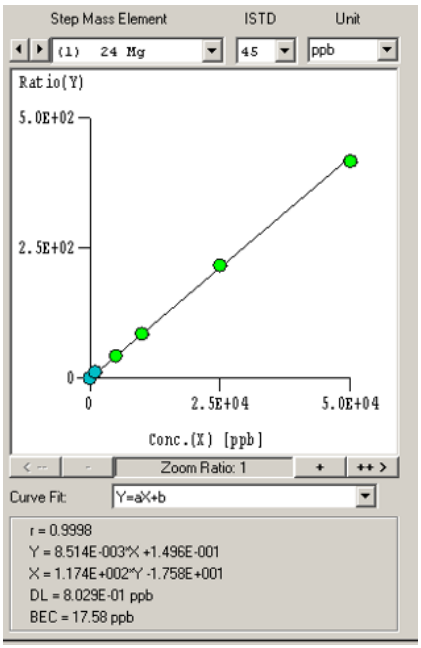
EK 8 Potasyum (K) mineraline ait kalibrasyon grafiği



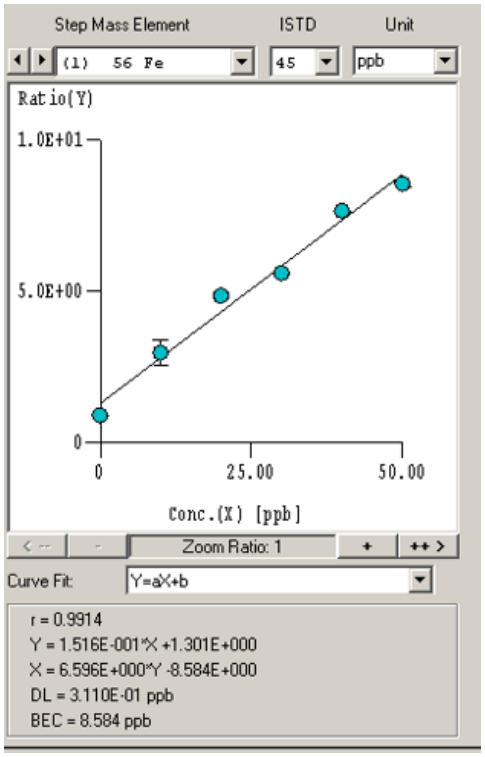
EK 9 Fosfor (P) mineraline ait kalibrasyon grafiği



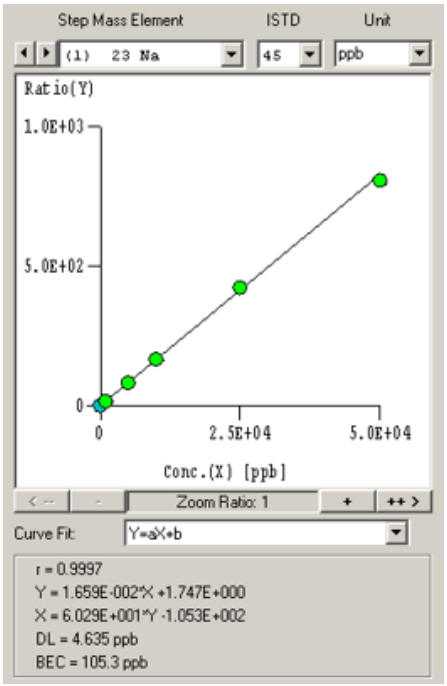
EK 10 Magnezyum (Mg) mineraline ait kalibrasyon grafiği



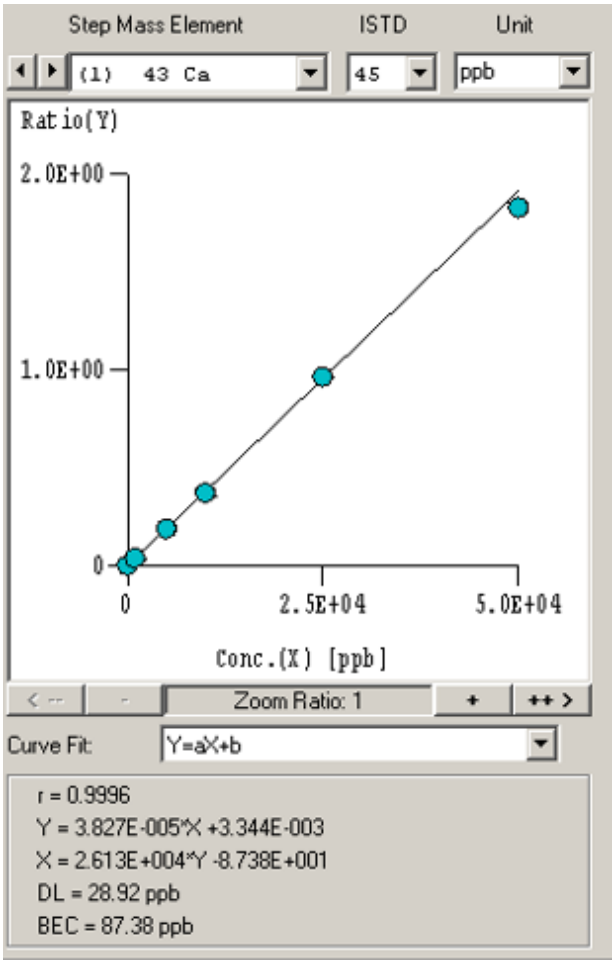
EK 11 Demir (Fe) mineraline ait kalibrasyon grafiği



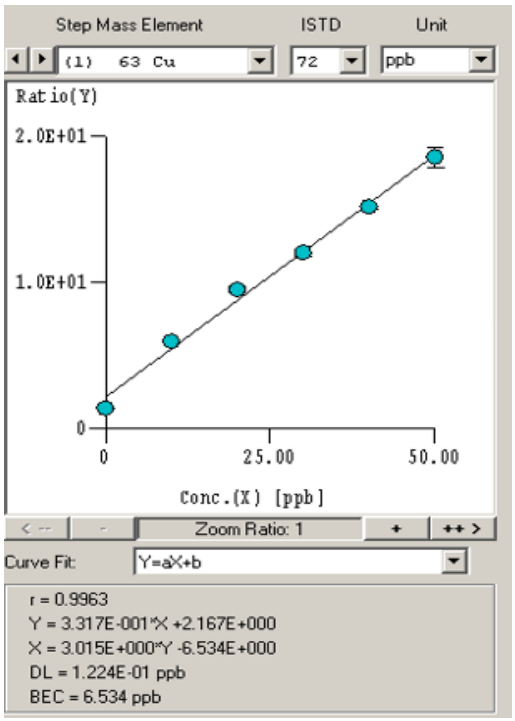
EK 12 Sodyum (Na) mineraline ait kalibrasyon grafiği



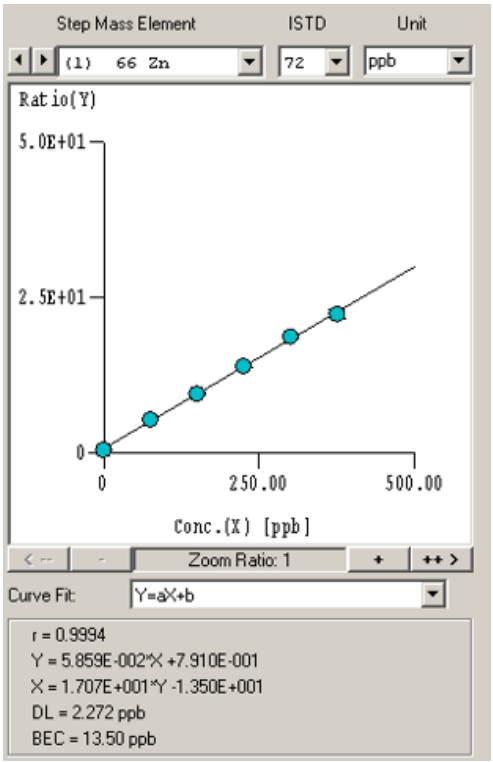
EK 13 Kalsiyum (Ca) mineraline ait kalibrasyon grafiği



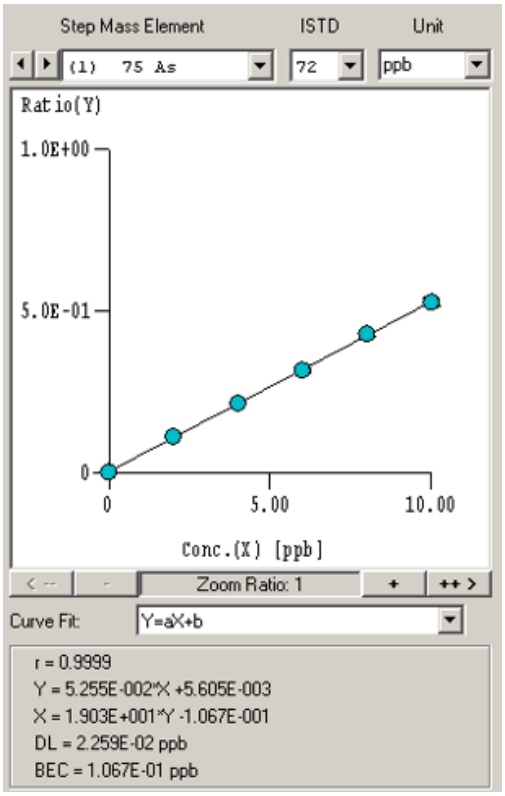
EK 14 Bakır (Cu) mineraline ait kalibrasyon grafiği



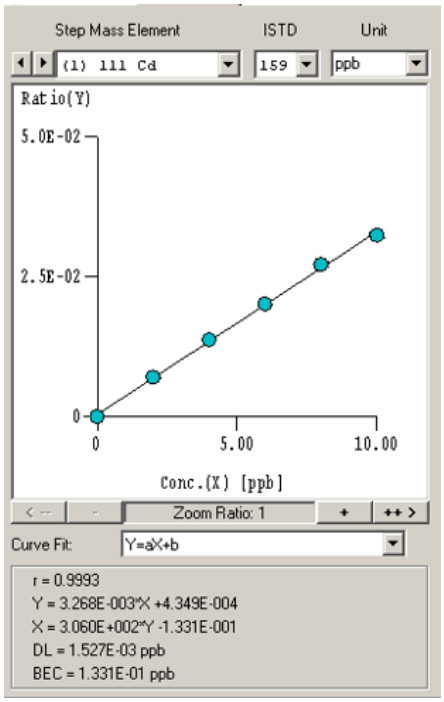
EK 15 Çinko (Zn) mineraline ait kalibrasyon grafiği



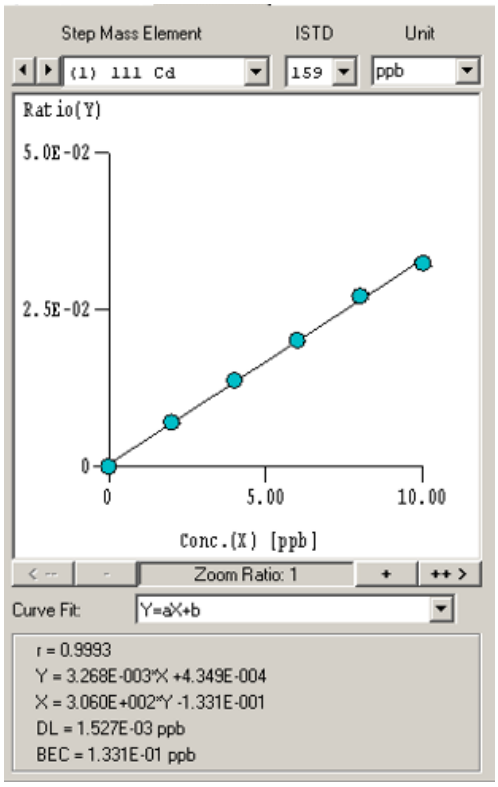
EK 16 Arsenik (As) mineraline ait kalibrasyon grafiği



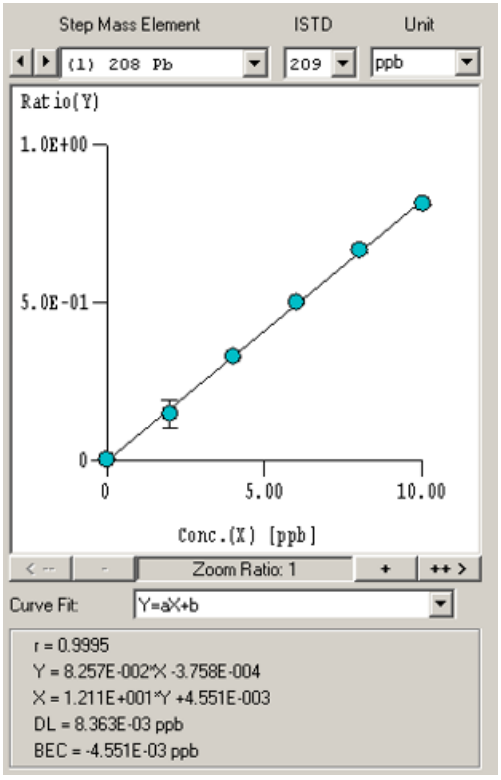
EK 17 Kadmiyum (Cd) mineraline ait kalibrasyon grafiği



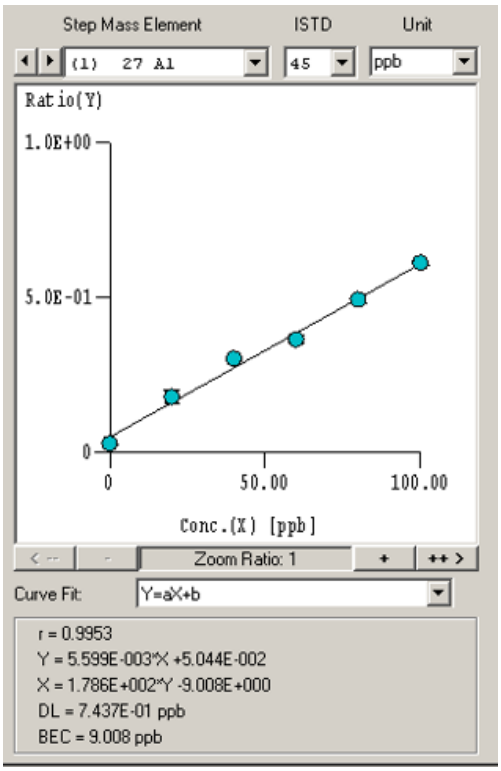
EK 18 Civa (Hg) mineraline ait kalibrasyon grafiği



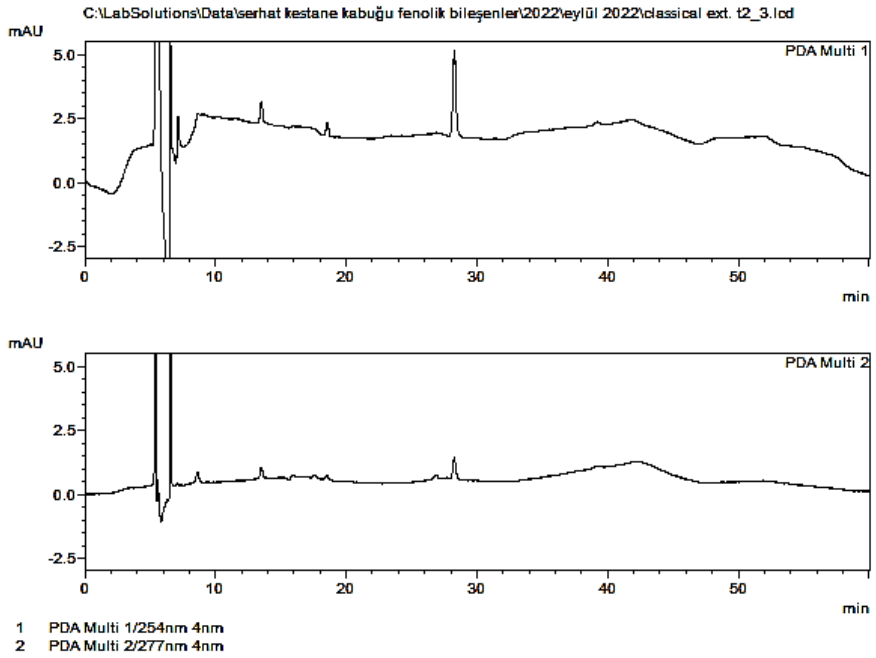
EK 19 Kurşun (Pb) mineraline ait kalibrasyon grafiği



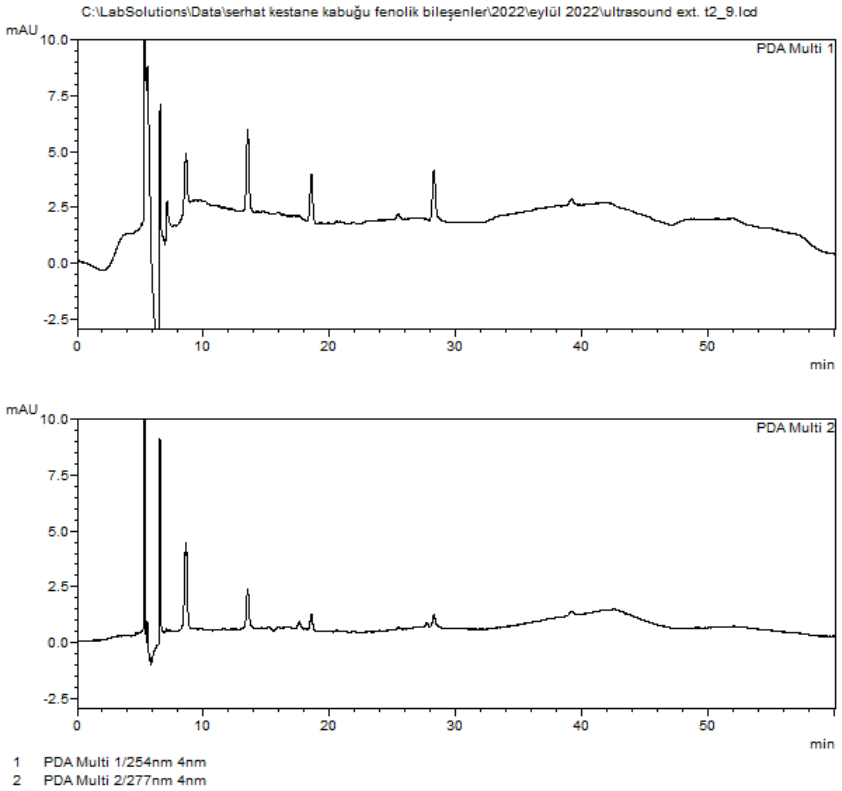
EK 20 Alüminyum (Al) mineraline ait kalibrasyon grafiği



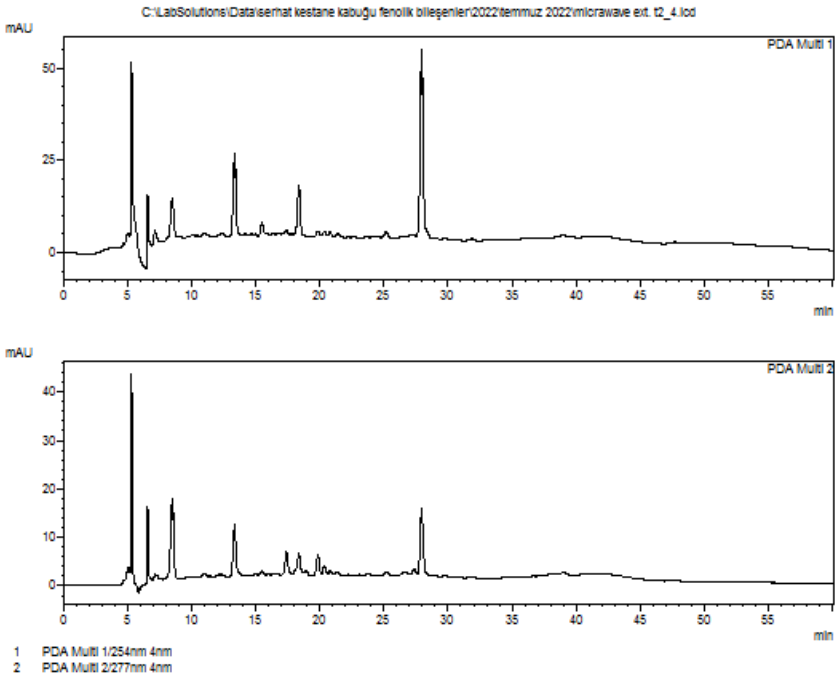
EK 21 KE fenolik bileşenler HPLC kromatogramı



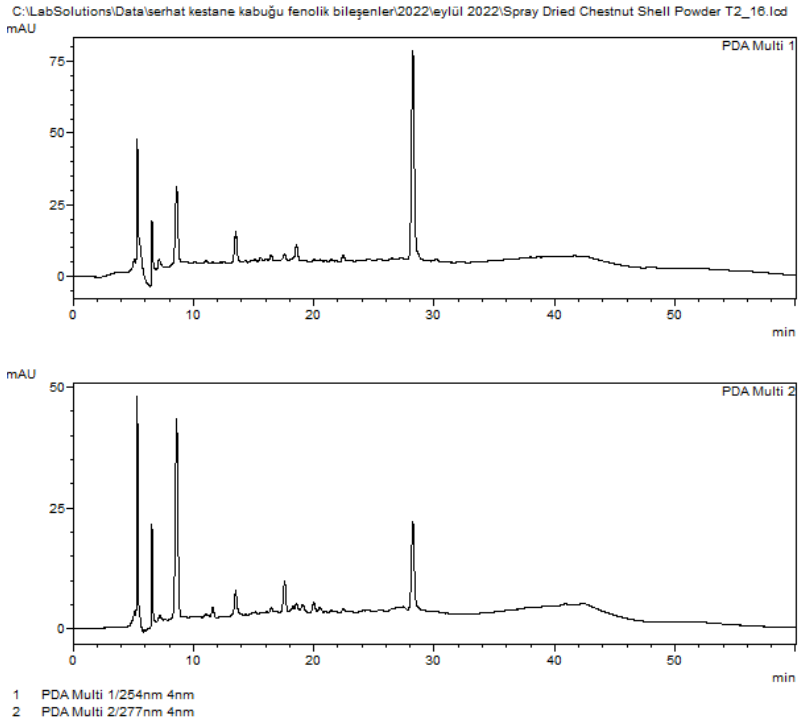
EK 22 UDE fenolik bileşenler HPLC kromatogramı



EK 23 MDE fenolik bileşenler HPLC kromatogramı



EK 24 SKK tozu fenolik bileşenler HPLC kromatogramı



ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Serhat KOÇER

Doğum Yeri ve Tarihi : Ankara-1981

Yabancı Dil : İngilizce

Eğitim Durumu

Lise : Ankara Güdül Çok Programlı Lisesi

Lisans : Selçuk Üniversitesi Gıda Mühendisliği

Yüksek Lisans : Ankara Üniversitesi Gıda Mühendisliği

Çalıştığı Kurum/Kurumlar :

Tarım ve Orman Bakanlığı Bursa Gıda ve Yem Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü

İletişim (e-posta) : skocer1981@gmail.com

Yayınları :

Suna, S., Avşar, B., Koçer, S., & Çopur, Ö. U. (2021). Effects of different pretreatments on the physicochemical characteristics and quality criteria of chestnut (Castanea sativa Mill.) pickle: A new value-added product. *Journal of Food Processing and Preservation, 45*(7), e15669.

Kocer, S., Copur, O. U., Tamer, C. E., Suna, S., & Kadioglu, B. (2020). Kestane Kabuğu Tozunun Bazı Fizikokimyasal Özelliklerinin Araştırılması. Türkiye 13. Gıda Kongresi.

Kocer, S., & Akbal, A. (2020). Meyve ve Sebzelerde Enzimatik Esmerleşmeyi Etkileyen Faktörler. Türkiye 13. Gıda Kongresi.