

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ŞALGAM SUYU TESİSİ ATIĞINDAN DEĞERLİ BİLEŞENLERİN GERİ
KAZANIMI VE DEĞERLENDİRİLMESİ

Pelin TOPRAK

KİMYA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

ANKARA
2024

Her hakkı saklıdır

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

ŞALGAM SUYU TESİSİ ATIĞINDAN DEĞERLİ BİLEŞENLERİN GERİ KAZANIMI VE DEĞERLENDİRİLMESİ

Pelin TOPRAK

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. A. Ezgi ÜNLÜ BÜYÜKTOPCU

Çalışmada, şalgam suyu üretim tesisi atığı olan fermente siyah havuçtan yeşil çözücüler sınıfındaki doğal derin ötektik çözücüler (Natural Deep Eutectic Solvents, NADES) kullanılarak ultrasonik dalga ekstraksiyonu ile katma değeri yüksek değerli bileşenlerin geri kazanılması ve bu bileşenlerin yenilebilir film sentezinde kullanılması amaçlanmıştır. Asidik, şeker, poliol ve kolin klorür-şeker bazlı olmak üzere toplam 11 adet çözücü hazırlanmış ve NADES türü ve miktarı, katı-sıvı (KS) oranı ve ekstraksiyon süresi (t) parametrelerinin toplam fenol (TP), toplam flavonoid (TF), toplam monomerik antosiyanin (TMA) miktarı ve antioksidan aktivite (AA) üzerine etkileri incelenmiştir. En yüksek TF, TP, TMA ve AA değerleri sırasıyla CG (1:2) ile 16.04 ± 0.87 mg/g, FSW ile 16.49 ± 0.52 mg/g, CSW (4:1:4) ile 1680.51 ± 22.21 mg/kg ve CG (1:2) ile %86.88 olarak elde edilmiştir. Deneysel tasarım ve optimizasyon için çözücü olarak TMA ekstraksiyonunda en etkili çözücü olan CSW (4:1:4) seçilmiştir. Bağımsız değişkenlerin t, KS oranı ve NADES miktarı, yanıtın ise TMA miktarı olarak belirlendiği merkezi kompozit tasarımda cevabın üçüncü dereceden polinom ile ifade edildiği ($R^2=0.9939$) belirlenmiştir. Optimum koşullar %59.07 NADES, $t=60.25$ dk, $KS=0.02$ g/mL olarak belirlenmiş ve bu koşullar altında TMA miktarı 1776.76 ± 8.65 mg/kg bulunmuştur. Optimum koşullardaki ekstre yenilebilir filmlere hem katkı maddesi hem de plastikleştirici olarak eklenmiş ve özelliklerindeki değişimler incelenmiştir. Kontrol filmine göre, antioksidan aktivite değerinin arttığı, mekanik özelliklerin geliştiği, nem oranı, geçirgenlik ve şeffaflık değerlerinin azaldığı ve kaplanan domatesin raf ömrünü uzatan film türü %10 ekstrenin katkı maddesi olarak kullanıldığı yenilebilir film olarak belirlenmiştir.

Mayıs 2024, 95 sayfa

Anahtar kelimeler: Şalgam suyu, ultrasonik dalga ekstraksiyonu, atık değerlendirme yeşil çözücüler, yenilebilir film

ABSTRACT

Master Thesis

RECOVERY AND EVALUATION OF VALUABLE COMPONENTS FROM SHALGAM JUICE PLANT WASTE

Pelin TOPRAK

Ankara University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Chemical Engineering

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. A. Ezgi ÜNLÜ BÜYÜKTOPCU

This study aims to recover high value components from fermented black carrot which is waste of shalgam juice facility, using ultrasound-assisted extraction with Natural Deep Eutectic Solvents (NADES) and to use these components in the synthesis of edible films, which are one of the bio-based sustainable packaging materials. Eleven different NADESs were prepared in four different groups based on acidic, sugar, polyol and choline chloride-sugar and the effects of the type and amount of solvents, solid-to-liquid (SL) ratio and extraction time (t) on total phenol (TP), flavonoid (TF) monomeric anthocyanin (TMA) content and antioxidant activity (AA) were investigated. The highest TF, TP, TMA and AA were obtained as 16.04 ± 0.87 mg/g with CG (1:2) 16.49 ± 0.52 mg/g with FSW (1:1:11), 1680.51 ± 22.21 mg/kg with CSW (4:1:4), and 86.88% with CG (1:2), respectively. Experimental design and optimization were conducted using CSW (4:1:4) which was identified as the most prominent solvent among NADESs for the recovery of the TMA. The response was found to be expressed by cubic model ($R^2=0.9939$) using central composite design in which independent variables were time, SL and NADES amount while TMA was the response. The optimal extraction conditions were found to be 59.07% NADES, $t=60.25$ min, $SL=0.02$ g/mL. Under the optimal conditions, TMA was found as 1776.76 ± 8.65 mg/kg. The extract obtained under optimal conditions was examined both as an additive and as a plastisizer into the structure and the properties were examined. It was found that when 10% extract is used as an additive, the moisture content, transmittance and transparency values of the film decreased, while antioxidant activity and mechanical resistance increased. Additionally, it was determined that film extended the shelf life of tomato fruit.

May 2024, 95 pages

Key Words: Shalgam juice, ultrasonic extraction, waste valorization, green solvents, edible film

TEŞEKKÜR

Yalnızca tez çalışması sürecinde değil yüksek lisans eğitimimin her aşamasında desteğini, ilgisini ve bilgisini benden esirgemeyen, güler yüzünü eksik etmeyen, karamsarlığa kapıldığımda pozitif enerjisi ile moralimi yükselten çok değerli danışman hocam Doç. Dr. Ayşe Ezgi ÜNLÜ BÜYÜKTOPCU'ya (Ankara Üniversitesi Kimya Mühendisliği Bölümü) sonsuz teşekkür ediyorum sizin rehberliğinizde tez çalışmamı yürütmek benim için çok kıymetliydi.

Bilgi ve tecrübeleriyle desteğini esirgemeyen saygıdeğer hocam Prof. Dr. Zekiye Serpil TAKAÇ'a (Ankara Üniversitesi Kimya Mühendisliği Bölümü) içtenliği ve ilgisi için çok teşekkür ediyorum.

FTIR ve mekanik analizlerini gerçekleştiren Ankara Üniversitesi Biyomedikal Mühendisliği Bölümü'ne ve antimikrobiyal aktivite analizini gerçekleştiren Ankara Üniversitesi Biyoloji Bölümü'ne teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuvara adım attığım ilk günden son güne kadar benimle bilgi ve deneyimlerini paylaşan her ihtiyacım olduğunda yardımına koşan Melis FIRAT ve Abdulkadir KESKİN'e çok teşekkür ediyorum gösterdiğiniz samimiyet ve güler yüzünüz bu süreci daha keyifli geçirmemi sağladı.

Hayatımın her anında yanımda olan tüm sevincimi üzüntümü paylaştığım biricik kardeşim Selin TOPRAK sana ne kadar teşekkür etsem az iyi ki bu yolculuğa beraber çıkmışız bana sağladığın destek ve motivasyon olmasaydı bu süreçte karşılaştığım zorlukların üstesinden gelmek benim için çok daha zor olurdu.

Aldığım her kararda arkamda duran desteklerini ve sevgilerini her zaman hissettiğim varlıklarıyla her daim bana güç veren en büyük destekçilerim canım annem Melek TOPRAK'a ve canım babam Mustafa TOPRAK'a sonsuz teşekkür ediyorum eğitime verdiğiniz önem ve katkılarınız benim için çok değerli.

Pelin TOPRAK
Ankara, Mayıs 2024

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAY SAYFASI

ETİK.....	i
ÖZET.....	ii
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	iv
SİMGELER DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ÖZETLERİ	5
2.1 Şalgam Suyu	5
2.2 Siyah Havuç	6
2.3 Yeşil Çözücüler	8
2.4 Ultrasonik Dalga Ekstraksiyonu.....	10
2.5 Yenilebilir Film ve Kaplamalar	11
2.6 Yenilebilir Filmlerin Avantajları.....	14
2.7 Yenilebilir Film ve Kaplamaların Sentezi	15
2.8 Kaynak Özetleri	16
3. MATERYAL VE YÖNTEM	20
3.1 Materyal	20
3.2 Şalgam Suyu Tesisi Atığının Hazırlanması	20
3.3 Çözücülerin Hazırlanması.....	20
3.4 Elektriksel İletkenlik Ölçümü.....	21
3.5 Ultrasonik Dalga Destekli Ekstraksiyon	21
3.6 Toplam Fenol Analizi	22
3.7 Toplam Flavonoid Analizi.....	23
3.8 Antioksidan Aktivite Tayini.....	23
3.9 Toplam Monomerik Antosiyanin Tayini	23
3.10 Antosiyanin Parçalanma Ölçütlerinin Belirlenmesi	24
3.11 DeneySEL Tasarım ve Optimizasyon	25
3.12 Antosiyaninlerin HPLC ile Analizi	26

3.13 Yenilebilir Film Sentezi	27
3.14 Yenilebilir Film Analizleri.....	28
3.14.1 Antioksidan aktivite tayini	28
3.14.2 Kalınlık ölçümü	29
3.14.3 Geçirgenlik ve şeffaflık ölçümü	29
3.14.4 Nem içeriği tayini	29
3.14.5 Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi analizi.....	29
3.14.6 Taramalı elektron mikroskobu analizi	30
3.14.7 Mekanik analizler.....	30
3.14.8 Antimikrobiyal aktivite.....	31
3.15 Yenilebilir Filmin Gıda Ürününe Uygulanması.....	32
3.16 İstatiksel Analiz	32
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	33
4.1 Şalgam Suyu Tesisi Atığından Değerli Bileşenlerin Ekstraksiyonu.....	33
4.1.1 Yeşil çözücü türünün etkisi.....	33
4.1.2 Yeşil çözücü miktarının etkisi.....	38
4.1.3 Katı-sıvı oranı etkisi.....	41
4.1.4 Ekstraksiyon süresinin etkisi	45
4.1.5 Deneysel tasarım ve optimizasyon	49
4.1.6 Antosiyaninlerin HPLC analizi.....	55
4.2 Yenilebilir Filmlerin Özellikleri	57
4.2.1 Kalınlık, nem içeriği.....	58
4.2.2 Geçirgenlik ve şeffaflık	59
4.2.3 Yenilebilir filmlerin antioksidan aktivite değerleri	61
4.2.4 Mekanik özellikler.....	62
4.2.5 Yenilebilir filmlerde Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi.....	63
4.2.6 Yenilebilir filmlerde taramalı elektron mikroskobu analizi.....	64
4.2.7 Antimikrobiyal aktivite.....	65
4.3 Meyve Kaplama Sonuçları	67
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	69
KAYNAKLAR.....	80
EKLER.....	90
EK 1 Çalışmada Kullanılan Kimyasal ve Biyokimyasal Maddeler.....	91
EK 2 Çalışmada Kullanılan Cihazlar.....	92

EK 3 Toplam Fenol Derişimi Kalibrasyon Doğrusu	93
EK 4 Toplam Flavonoid Derişimi Kalibrasyon Doğrusu	94
ÖZGEÇMİş.....	95



SİMGELER DİZİNİ

kHz	Kilohertz
mg	Miligram
MHz	Megahertz
MPa	Megapascal
T	Sıcaklık, °C
t	Süre, dk, st
rpm	Dakikadaki devir sayısı
κ ,	Kappa
ι	Iota
λ	Lambda

Kısaltmalar

ANOVA	Varyans analizi (Analysis of Variance)
AA	Antioksidan aktivite
C	Kolin klorür
DES	Deep eutectic solvents (Derin ötektik çözücüler)
EG	Etilen glikol
F	Fruktoz
FTIR	Fourier dönüşümlü kızılötesi spektrometresi
G	Glukoz
GAE	Gallik asit eşdeğeri
GD	Gerilme direnci
HBA	Hidrojen bağ alıcısı
HBD	Hidrojen bağ donörü
HPLC	High performance liquid chromatography (Yüksek performanslı sıvı kromatografisi)
KS	Katı-sıvı oranı
KU	Kopma uzaması
La	Laktik asit
MKT	Merkezi kompozit tasarımı
NADES	Natural deep eutectic solvents (Doğal derin ötektik çözücüler)
PVDF	Poliviniliden florür
S	Sukroz
SEM	Scanning electron microscopy (Taramalı elektron mikroskobu)
TF	Toplam flavonoid
TMA	Toplam monomerik antosiyanin
TP	Toplam fenol
YM	Young modülü
YYY	Yanıt yüzey yöntemi
W	Su
σ	Mühendislik gerilmesi
ε	Mühendislik gerinmesi

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 Siyah havuç a) bütün b) dilimlenmiş	6
Şekil 2.2 Siyah havuçta bulunan antosiyaninler	8
Şekil 2.3 NADES hazırlama yöntemleri	10
Şekil 2.4 Filmlerin hazırlanma yöntemleri a) ıslak ve b) kuru	16
Şekil 3.1 Öğütülmüş ve liyofilize edilmiş fermente siyah havuç.....	20
Şekil 4.1 Çözücü türlerinin TP miktarına etkisi	34
Şekil 4.2 Çözücü türlerinin TF miktarına etkisi.....	35
Şekil 4.3 Çözücü türlerinin TMA miktarına etkisi	36
Şekil 4.4 Çözücü türlerinin AA üzerine etkisi.....	36
Şekil 4.5 Seçilen NADES türleri ile elde edilen TP miktarı üzerine çözücü yüzdesinin etkisi.....	38
Şekil 4.6 Seçilen NADES türleri ile elde edilen TF miktarı üzerine çözücü yüzdesinin etkisi.....	39
Şekil 4.7 Seçilen NADES türleri ile elde edilen TMA miktarı üzerine çözücü yüzdesinin etkisi.....	39
Şekil 4.8 Seçilen NADES türleri ile elde edilen AA değeri üzerine çözücü yüzdesinin etkisi.....	40
Şekil 4.9 KS oranının farklı çözücüler ile elde edilen TP miktarına etkisi	42
Şekil 4.10 KS oranının farklı çözücüler ile elde edilen TF miktarına etkisi.....	42
Şekil 4.11 KS oranının farklı çözücüler ile elde edilen TMA miktarı üzerine etkisi	43
Şekil 4.12 KS oranının farklı çözücüler ile elde edilen AA değeri üzerine etkisi.....	43
Şekil 4.13 Ekstraksiyon süresinin farklı çözücülerle elde edilen TP miktarı üzerine etkisi	45
Şekil 4.14 Ekstraksiyon süresinin farklı çözücülerle elde edilen TF miktarı üzerine etkisi	46
Şekil 4.15 Ekstraksiyon süresinin farklı çözücülerle elde edilen TMA miktarı üzerine etkisi	47
Şekil 4.16 Ekstraksiyon süresinin farklı çözücülerle elde edilen AA üzerine etkisi.....	47
Şekil 4.17 Eklenen su miktarı ile CSW (4:1:4)'nin elektriksel iletkenlik değişimi.....	50
Şekil 4.18 Deneysel tasarım sonucu elde edilen YY grafikleri ve eşyükselti eğrileri(a) ve (b) KS ve %NADES miktarı ile değişimi (t=60 dk) (c) ve (d) KS ve t ile değişimi (%NADES= 58.50) (e) ve (f) t ve %NADES ile değişimi (KS oranı=0.03 g/mL).....	53
Şekil 4.19 Siyanidin-3 glikozit standardının HPLC kromatogramı	55

Şekil 4.20 Ekstrelerin HPLC kromatogramları FSW (1:1:11) (a), CSW (4:1:4) (b), CLa (1:1) (c), CG (1:2) (d)	56
Şekil 4.21 Hazırlanan yenilebilir filmlerin görüntüleri K (a), E3 (b), E6 (c), E10 (d), YK5 (e), YK10 (f), YK20 (g), YE5 (h), YE10 (i), YE20 (j)	58
Şekil 4.22 Ekstrenin katkı maddesi olarak kullanıldığı filmlerin AA değerleri (%).	61
Şekil 4.23 Ekstrenin yapıya katıldığı filmlerin AA değerleri (%).	61
Şekil 4.24 Ekstrenin katkı maddesi olarak kullanıldığı film (E10) ve kontrolünün (K) FTIR spektrumu.....	64
Şekil 4.25 Ekstrenin yapıya katıldığı filmin (YE20) ve kontrolünün (YK20) FTIR spektrumu	64
Şekil 4.26 Filmlerin SEM analizleri A) K B) E10 C) YK20 D) YE20 filmlerin SEM görüntüleri.....	65
Şekil 4.27 Ekstre (01) ve çözücüsünün (02) <i>S. infantis</i> (A), <i>E. coli</i> (B), <i>S.typhimurium</i> (C), <i>L monocytogenes</i> ATCC 13932 (D), <i>L.monocytogenes</i> ATCC 7644 (E)' e karşı antimikrobiyal aktiveleri	66
Şekil 4.28 Filmler ile kaplanan domateslerin zamanla değişimlerinin izlenmesi a: kaplanmamış, kaplamada kullanılan filmler; b: K c: E10, d: YK20, e: YE20	68

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1 Çalışmada kullanılan NADES'ler.....	21
Çizelge 3.2 Deneysel tasarımın bağımsız değişkenleri ve seviyeleri	25
Çizelge 3.3 MKT ile oluşturulan deney setleri	25
Çizelge 3.4 Ekstreler için uygulanan gradyen programı	26
Çizelge 3.5 Siyanidin 3-glukozit için uygulanan izokratik program	26
Çizelge 3.6 Çalışmada hazırlanan yenilebilir filmler.....	28
Çizelge 4.1 Çözücü türünün ekstrelerin renk yoğunluğu, polimerik renk ve % polimerik renk değerlerine etkisi	37
Çizelge 4.2 Seçilen NADES türleri ile elde edilen renk yoğunluğu, polimerik renk ve %polimerik renk değerleri üzerine çözücü yüzdesinin etkisi	41
Çizelge 4.3 KS oranının farklı çözücüler ile elde edilen renk yoğunluğu, polimerik renk ve %polimerik renk değerlerine etkisi.	44
Çizelge 4.4 Ekstraksiyon süresinin farklı çözücülerle elde edilen renk yoğunluğu, polimerik renk ve % polimerik renk değerleri üzerine etkisi.....	48
Çizelge 4.5 Deneysel tasarımda kullanılan faktör seviyeleri ve yanıtları.....	50
Çizelge 4.6 MKT ile elde edilen üçüncü dereceden polinom modelinin varyans analiz sonuçları	51
Çizelge 4.7 Ekstrenin katkı maddesi olarak kullanıldığı filmlerin kalınlık ve nem içeriği değerleri	59
Çizelge 4.8 Ekstrenin yapıya katıldığı filmlerin kalınlık ve nem içeriği değerleri	59
Çizelge 4.9 Ekstrenin katkı maddesi olarak kullanıldığı filmlerin geçirgenlik ve şeffaflık değerleri	60
Çizelge 4.10 Ekstrenin yapıya katıldığı filmlerin geçirgenlik ve şeffaflık değerleri	60
Çizelge 4.11 Filmlerin young modülü, kopma uzaması, gerilme direnci değerleri	63
Çizelge 4.12 Örneklerin farklı patojen bakterilere karşı ölçülen inhibisyon zon çapları.....	67

1. GİRİŞ

Dünyadaki nüfus artışı ile birlikte gıdaya olan talebin artması sonucu, küresel çapta en hızlı gelişen sektörlerden biri gıda sektörü olmuştur. Artan gıda üretimine paralel olarak atık ve yan ürün miktarlarında da artış meydana gelmektedir. Araştırmalara göre her yıl 1.6 milyar ton gıda atığı oluşmaktadır. Gıda atığının karbon ayak izinin ise 3.3 milyar ton karbondioksit eşdeğeri olduğu bildirilmiştir (Nirmal vd. 2023).

Atıkların büyük bir kısmı gıdaların işlenmesi sırasında ortaya çıkmaktadır. Gıda işleme atıklarının en büyük payı meyve ve sebze endüstrilerine aittir (Rifna vd. 2023). Meyve veya sebzelerin işlenmesi sırasında ortaya çıkan yüksek miktarlarda ve farklı türdeki atıklar işletmeler tarafından hayvan yemi olarak kullanılmak üzere çiftliklere verilmekte veya olduğu gibi atılarak çevre kirliliğine yol açmaktadır (Jabbar vd. 2015). Ancak yapılan bilimsel çalışmalar, bu atık ve artıkların yüksek miktarda yararlı biyoaktif bileşenler içerdiğini ortaya koymuştur (Ağçam ve Akyıldız, 2015). Bu biyoaktif bileşenlerin atıklardan geri kazanımı ile katma değeri yüksek bileşenlerin sıfır maliyetli bir kaynaktan üretimi ve atıkların yeniden değerlendirilmesi ile çevre kirliliğinin azaltılma potansiyelleri bulunmaktadır.

Ülkemizde sevilerek tüketilen içeceklerden biri şalgam suyudur. Şalgam suyu fermantasyonunda laktik asit bakterileri (*Lactobacillus plantarum*) ve mayaların (*Saccharomyces cerevisiae*) etkili olduğu kırmızımsı/mor renkli bulanık ve ekşi bir lezzete sahip bir içecektir (Erten vd 2008; Tangüler vd 2021). Şalgam suyu üretiminde kullanılan siyah havucun içerdiği antosiyaninlerin tümör önleyici, iltihap giderici özelliklerinin yanı sıra, kanser, felç, kalp krizi ve koroner kalp hastalıklarının risk faktörlerini azaltıcı etkileri bulunmaktadır (Clifford 2000, Netzel vd. 2007, Sevimli-Gur vd. 2013, Khandere vd. 2011, Cao vd. 1996, Wang vd. 1997, Wrolstad 2004).

Ülkemizde şalgam suyu üretimi yıllık 60 milyon litreye ulaşmıştır (Dünya şalgam suyunu keşfetti, 2020). Bu üretim sonucu yıllık yaklaşık 12 milyon kg fermente siyah havuç katı atık olarak ortaya çıkmaktadır (Tanrıseven vd. 2018). Ortaya çıkan atık miktarının yüksekliği ve fermente siyah havucun antosiyanin başta olmak üzere çok çeşitli değerli

bileşenleri içirme potansiyeli nedeniyle şalgam suyu tesisi atığının değerlendirilmesi çevresel ve ekonomik açıdan büyük önem taşımaktadır.

Biyoaktif bileşenlerin doğal kaynaklardan geri kazanımında maserasyon, perkolasyon ve Soxhlet ekstraksiyonu gibi geleneksel teknikler yaygın olarak kullanılmaktadır, ancak bu tekniklerin yüksek miktarda organik çözücü kullanımı, düşük ekstraksiyon verimi ve yüksek enerji tüketimi gibi dezavantajları bulunmaktadır. Ayrıca ekstraksiyon sürelerinin uzun olması oksidasyon, hidroliz ve iyonizasyon gibi istenmeyen tepkimeleri tetikleyerek ısıya duyarlı bazı değerli bileşenlerin bozulmalarına neden olmaktadır. Bunların yanı sıra geleneksel ekstraksiyon proseslerindeki düşük seçicilik, elde edilen ekstraktelerde istenmeyen bileşenlerin varlığına yol açarak ciddi bir dezavantaj oluşturmaktadır (Cvetanović 2019, Rasul 2018, Usman vd. 2022).

Alkoller, etil asetat ve kloroform gibi geleneksel organik çözücüler, bitki materyalinden biyoaktif bileşenlerin ekstraksiyonunda yaygın olarak kullanılmaktadır (Duan vd. 2016). Organik çözücüler toksik ve kanserojen olmaları ve biyolojik olarak parçalanamamaları nedeniyle doğaya ve çevreye zarar vermektedirler (Fuad ve 2021). Ayrıca ekstraksiyon sonrası gerekli olan saflaştırma adımı yüksek maliyete ve enerji tüketimine sebep olmaktadır (Cvetanović 2019).

Literatürde geleneksel olmayan ekstraksiyon yöntemleri kullanılarak geleneksel yöntemlere kıyasla verimin artırılması ve maliyetin azaltılması amaçlanmaktadır. Bu yöntemlerden biri olan ultrasonik dalga destekli ekstraksiyon, çözücü tüketimini ve enerji gereksinimini azaltan basit, ucuz, etkili ve çevre dostu bir ekstraksiyon yöntemi olarak tanımlanmaktadır (Huang vd. 2009, Chemat vd. 2017). Ultrasonik dalga, kavitasyonu artırarak etkin bir kütle aktarımı sağlamak ve oluşan gaz kabarcıkları noktasal basınç yaratarak bitki dokusunun kolayca parçalanmasına neden olmaktadır (Knorr vd. 2002).

Yeşil çözücüler, sürdürülebilirliği olumsuz etkileyen geleneksel çözücülere yeşil alternatifler olarak geliştirilmiştir. Toksikliği oldukça düşük olan ve yüksek ekstraksiyon kapasitesine sahip ekonomik çözücülerdir. Yeşil çözücü sınıfında yer alan Derin Ötektik Çözücüler (Deep Eutectic Solvents, DES) düşük toksisite, düşük maliyet, kolay kullanım,

biyolojik olarak parçalanabilirlik, biyoyumluluk ve yeniden kullanılabilirlik gibi çeşitli avantajlarıyla birçok farklı proste kullanılmaktadır Bunlar arasında kükürt giderme, CO₂ yakalama, organik reaksiyonlarda sürdürülebilir ortam, enzimatik biyodizel üretimi ve ekstraksiyon sayılabilir (Castro-Muñoz vd. 2022). DES'lerin polarite ve viskozite gibi fizikokimyasal özelliklerinin ayarlanabilir olması ekstraksiyon prosesinde önemli olmaktadır. Buna ek olarak DES'lerin hedef moleküle karşı seçici olması biyomoleküllerin yüksek verimle geri kazanılmasını sağlamaktadır (Hamdi Zainal-Abidin vd. 2017). Ayrıca DES'ler, son dönemlerde gıda işleme atıklarından biyoaktif bileşenlerin geri kazanımında ultrasonik dalga destekli ekstraksiyon ve mikrodalga destekli ekstraksiyon yöntemleriyle birlikte kullanılmaktadır (Bubalo vd. 2016, Chemat vd. 2019).

Ambalaj, temel olarak gıda güvenliğini sağlamak, gıdayı mikrobiyal kontaminasyona karşı korumak, gıda israfını veya kaybını önlemek, gıda raf ömrünü artırmak ve tüketicilere ürün hakkında bilgi vermek için kağıt, cam, metal, plastik gibi malzemelerden yapılmış materyaldir (Han 2013). Ambalaj materyali olarak genellikle düşük maliyetli, kolayca elde edilebilir ve mekanik direnci yüksek olan petrol bazlı polimerler kullanılmaktadır. Günümüzde çevre bilincinin artmasıyla beraber, petrol bazlı ürünlere alternatif olarak doğa dostu bileşenlerin kullanımına yönelik çalışmalar hız kazanmıştır. Bu alandaki önemli gelişmelerden biri olan yenilebilir film ve kaplamalar gıdalara ince bir tabaka halinde uygulanan, gıda ile birlikte tüketilebilen, tüketilmeseler bile doğal kaynaklardan elde edildiklerinden dolayı doğada çözünebilen ambalajlardır (Debeaufort vd. 1998, Dhanapal vd. 2012). Gıda ürününün renk, parlaklık ve pürüzlülük gibi duysal özelliklerini iyileştirmenin yanı sıra oksidasyon, mikrobiyal bozunma ve nem kaybı gibi gıda bozulmalarına yol açan durumları azaltmaktadırlar (Otoni vd. 2017).

Bu tez çalışmasında ülkemizde yıllık 12 milyon kg atığa sebep olan şalgam suyu üretim tesisi atığı olan fermente siyah havuç posasından değerli bileşenlerin çevre dostu yeşil bir yöntemle geri kazanılması ve biyoaktif bileşenler açısından zengin olan ekstrenin bir uygulama alanı olarak yenilebilir film sentezinde kullanılması amaçlanmıştır. Bu amaçla fermente siyah havuç posasından biyoaktif bileşenlerin ekstraksiyonunda yeni nesil yöntemlerden biri olan ultrasonik dalga ekstraksiyonu seçilmiş ve çözücü olarak yeşil

Çözücüler sınıfında olan Doğal Derin  tektik  z c ler (Natural Deep Eutectic Solvents, NADES) kullanılmıştır. Ekstraksiyonda NADES türü, NADES içeriği, katı-sıvı (KS) oranı ve süre gibi farklı ekstraksiyon parametrelerinin etkisi incelenmiştir. Toplam monomerik antosiyanin (TMA) miktarının optimizasyonu deneysel tasarım yöntemi kullanılarak merkezi kompozit tasarımı (MKT) ile belirlenmiş ve yanıt grafikleri yanıt yüzey yöntemi (YYY) ile elde edilmiştir. Optimum koşullarda elde edilen ekstre ise yenilebilir film sentezinde kullanılmış ve film yapısına katılan ekstrenin yenilebilir filmlerin antioksidan, antimikrobiyal, kalınlık, UV-geçirgenlik gibi farklı özellikleri üzerine etkisi incelenmiştir.



2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ÖZETLERİ

2.1 Şalgam Suyu

Fermente gıdalar “kontrollü mikrobiyal büyüme ve gıda bileşenlerinin enzimatik etki yoluyla dönüştürülmesi ile üretilen yiyecek veya içecekler” olarak tanımlanmaktadır (Marco vd. 2017). Fermentasyon, organik asitler, etanol ve bakteriyosinler gibi antimikrobiyal metabolitlerin üretimini sağlayarak patojenik mikroorganizmalarla kontaminasyon riskini azalttığı için bir koruma yöntemi olarak yüzyıllardan beri uygulanmaktadır. Fermentasyon aynı zamanda organoleptik özellikleri (örneğin tat ve doku) geliştirmek için de kullanılmaktadır (Dimidi vd. 2019).

Fermente içeceklerden biri olan şalgam suyu ülkemizde yüksek miktarda tüketilmektedir. Şalgam suyu, kırmızımsı/mor renkli bulanık ve ekşi bir lezzete sahip, yüksek oranda vitamin, mineral, antioksidan ve fenolik bileşik içermesi nedeniyle besleyicilik değeri yüksek bir içecektir (Erten vd. 2008). Mersin, Adana, Hatay ve Kahramanmaraş gibi ülkemizin güney illerinde oldukça yaygın olarak tüketilmekle birlikte İstanbul, Ankara, İzmir gibi illerde de rağbet görmektedir (Erten vd. 2008, Tangüler ve Erten 2013). Üretiminde genel olarak siyah havuç (*Daucus carota*), kaya tuzu, şalgam, ekşi maya, bulgur unu ve su kullanılmakta bazı proseslerde ise şalgam bitkisi de eklenmektedir. Şalgam suyu üretiminde kullanılan siyah havuç, şeker fermentasyonu sırasında laktik asit oluşumunu sağlaması ve şalgama kırmızı rengini vermesi amacıyla ana hammadde olarak kullanılmaktadır (Erten vd. 2008, Tangüler vd. 2014). Fermentasyonunda laktik asit bakterileri (*Lactobacillus plantarum* vb.) ve mayalar (*Saccharomyces cerevisiae*) etkilidir. Laktik asit bakterileri, laktik asit, etanol, asetik asit ve diğer organik bileşikleri üreterek şalgam suyuna tipik tat ve lezzetini vermektedir (Tangüler ve Erten 2013).

Şalgam suyunun, geleneksel üretim ve doğrudan üretim olmak üzere iki şekilde üretim yöntemi bulunmaktadır (Erten vd. 2008). Geleneksel şalgam suyu üretimi iki aşamada gerçekleşmektedir. Birinci aşama mayaların ve laktik asit bakterilerinin geliştiği hamur fermentasyonudur. Bu aşamada bulgur unu, tuz, ekşi maya ve yeteri kadar su karıştırılmakta ve oda sıcaklığında 3-5 gün fermentasyona bırakılmaktadır. Fermentasyon

sonunda hamur 3-5 kez su ile yıkanmaktadır. Hamur fermantasyonundan elde edilen sıvı, fermantasyon tankına alınarak siyah havuç, tuz, şalgam turbu, su ile karıştırılmakta ve fermantasyona bırakılmaktadır (Tangüler vd. 2008). Doğrudan üretim yönteminde ise yalnızca havuç fermantasyonu uygulanmaktadır. Doğranmış siyah havuç, dilimlenmiş şalgam, su, tuz ve ekşi maya bir tankta karıştırılarak 10–35 °C'de 3–10 gün mayalanmaya bırakılmaktadır (Erten vd. 2008, Tangüler ve Erten 2012).

2.2 Siyah Havuç

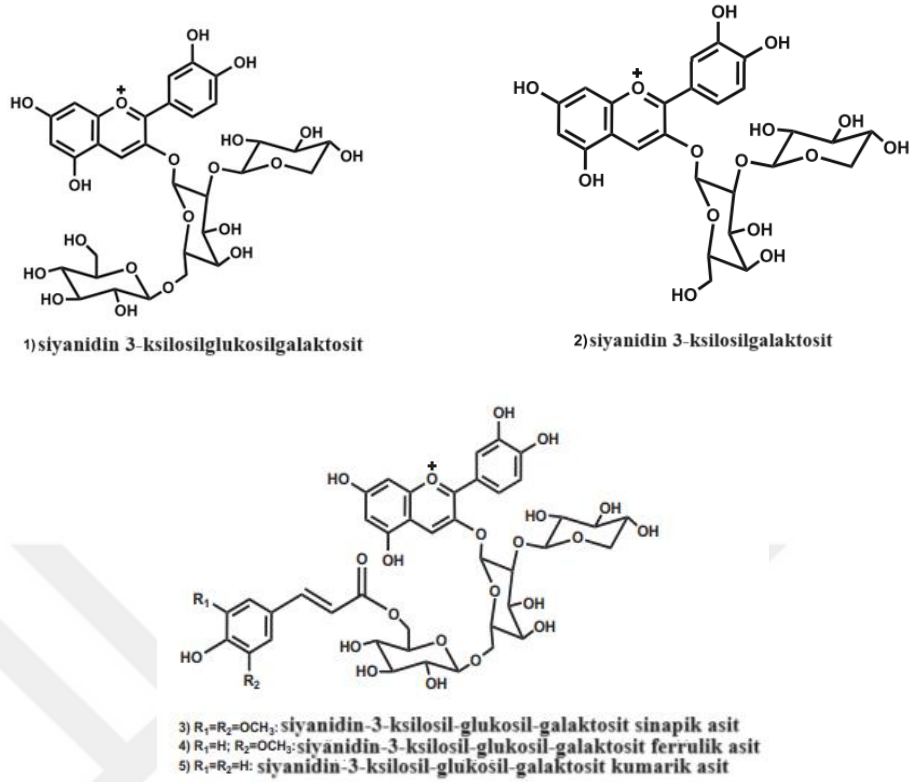
Siyah havuç (*Daucus carota ssp. sativus var. atrorubens* Alef.) Türkiye, Afganistan, Mısır, Pakistan, Hindistan ve Uzak Doğu ülkelerinde oldukça ilgi çeken bir sebzedir (**Şekil 2.1**) (D. Kammerer vd. 2004a, Türkyılmaz vd. 2012). C ve E vitamini gibi bilinen antioksidanların yanı sıra fenolik bileşik içeriği nedeniyle bilimsel açıdan da ilgi görmektedir (Alasalvar vd. 2001, Kirca vd. 2006, Singh vd. 2012).



Şekil 2.1 Siyah havuç a) bütün b) dilimlenmiş

Siyah havuca karakteristik rengini veren polifenolik yapıdaki antosiyaninlerdir (Wrolstad 2006). Antosiyaninler suda çözünür pigmentler arasında en büyük grubu oluşturan fenolik maddelerdir (Kammerer vd. 2004b, 2004a). Taze siyah havucun antosiyanin içeriği literatürde 1750 mg/kg ağırlık olarak bildirilmiştir (Mazza ve Miniati, 1993). **Şekil 2.2**'de siyah havuçta bulunan açillenmiş ve açillenmemiş antosiyaninlerin kimyasal yapıları verilmiştir. Siyah havuçta iki tanesi açillenmemiş, üç tanesi ise açillenmiş olmak

üzere 5 adet temel antosiyanin maddesi bulunmaktadır. Açillenmemiş antosiyaninler siyanidin-3-ksilosil-galaktosit (C3XG) ve siyanidin-3-ksilosil-glukosil-galaktosit (C3XGG)'tir. Açillenmiş antosiyaninler ise siyanidin-3-ksilosil-glukosil-galaktosit sinapik asit (C3XGGS), siyanidin-3-ksilosil-glukosil-galaktosit ferrulik asit (C3XGGF) ve siyanidin-3-ksilosil-glukosil-galaktosit kumarik asittir (C3XGGC) (Algarra vd. 2014, Gizir vd. 2008, Kammerer vd. 2004b, Türkyılmaz vd. 2012). Antosiyaninler yaygın olarak kullanılan doğal renklendirici maddelerdir (Türker ve Erdoğan, 2006) ve meyve suyu, şeker, dondurma, reçel, alkollü-alkolsüz içecekler ve diğer fermente içeceklerde renklendirme amaçlı kullanılmaktadır (D. Kammerer vd. 2007, Kirca vd. 2006, Turker vd. 2004). Renklendirici özelliğinin yanı sıra, antosiyaninlerin sağlık açısından büyük yararları bulunmaktadır. Koroner kalp hastalıklarını ve kalp krizi riskini azaltma, tümör önleyici, iltihap giderici, kanser ve felç gibi hastalıkların risk faktörünü azaltma etkisi mevcuttur (Clifford 2000, Netzel vd. 2007, Sevimli-Gur vd. 2013, Khandere vd. 2011, Cao vd. 1996, Wang vd. 1997, Wrolstad 2004). Bunların yanı sıra hipertansiyon, obezite, diyabet, gibi hastalıkların önlenmesinde önemli rol oynamaktadır (Tsuda vd. 2012, Olejnik vd. 2016). Siyah havuçta antosiyaninlerin yanı sıra önemli miktarda fenolik asitler de bulunmaktadır ve çoğunluğu hidroksisinamik asit türevleridir (Kamiloglu vd. 2016). Bunlar *p*-kumarik asit, hidroksisinamik asit, kafeik asit, ferrulik asit, klorojenik asit, kuersetin glukosid gibi bileşiklerdir (Kammerer vd. 2004a). Fenolik asitler hidroksil radikali, süperoksit radikal anyonu, organik radikaller ve peroksil radikale karşı koruyucu özellik göstermektedirler (Chandrasekara 2019).



Şekil 2.2 Siyah havuçta bulunan antosiyaninler

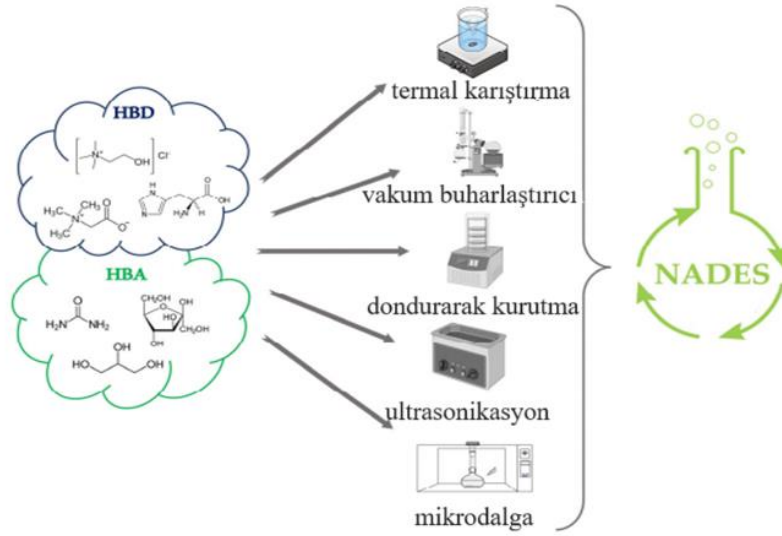
2.3 Yeşil Çözücüler

“Yeşil kimyanın” temel prensipleri, enerji tüketimini azaltmayı amaçlayan proseslerin tasarlanması, süreçle ilgili risklerin ve tehlikelerin çevre ve insan sağlığı üzerindeki etkisinin en aza indirilmesini sağlayacak çevre dostu çözücülerin kullanılmasına dayanmaktadır.

2003 yılında Abbott ve arkadaşları tarafından, farklı alanlarda çok yönlü kullanım, kolay sentezlenme, biyolojik olarak parçalanma, düşük toksisite sunan çevre dostu yeni bir çözücü sınıfı olan DES’ler keşfedilmiştir (Abbott vd. 2003, Fuad vd. 2021). DES’ler iki veya daha fazla bileşenden oluşan, bu bileşenlerden en az iki tanesinin hidrojen bağı yapabilme kapasitesinin olduğu, bir tanesinin H-bağı verici bir tanesinin de H-bağı alıcısı olduğu çözücüler olarak tanımlanmaktadır.

2011 yılında DES'lerin özel bir grubu olan Doğal Derin Ötektik Çözücüler'in (Natural Deep Eutectic Solvents, NADES) tanımı yapılmıştır (Choi vd. 2011). DES'lerden tek farkı doğal olan bileşiklerden sentezleniyor olmalarıdır. Bu bileşikler arasında toksik olmayan kuaterner amonyum tuzları (kolin klorür gibi), şekerler (glikoz, fruktoz, sukroz, trehaloz), organik asitler (malik asit, sitrik asit, maleik asit, akonitik asit), alkoller, amino asit (prolin) ve aminler gibi birincil metabolitler yer almaktadır. NADES'lerin, bileşenlerinin doğal olması ekstrelerin gıda, ilaç ve kozmetik endüstrilerinde güvenle kullanımlarını mümkün kılmaktadır (Shishov vd. 2017).

NADES'ler termal karıştırma, vakumlu buharlaştırma, dondurarak kurutma, ultrasonikasyon ve mikrodalga olmak üzere beş farklı yöntemle hazırlanabilmektedir (**Şekil 2.3**). Termal karıştırma yöntemi bileşenlerin 50-80°C sıcaklıkta berrak bir sıvı elde edilinceye kadar karıştırılması ile gerçekleştirilir. Vakum buharlaştırma yönteminde bileşenler suda çözündükten sonra döner evaporatör ile yaklaşık 50°C'de buharlaştırılır ve elde edilen sıvı, sabit bir ağırlığa ulaşana kadar silika jel bulunan bir desikatörde kurutulur. Dondurarak kurutma yönteminde yine bileşenler çözündükten sonra çözelti dondurarak kurutulur. Ultrasonik dalga yönteminde ses dalgaları kaviteasyona sebep olarak çok yüksek ısı ve basıncı açığa çıkarır ve bu enerji hidrojen bağı alıcısı (HBA) ile hidrojen bağı vericisi (HBD) arasındaki etkileşimi teşvik eder. Bu yöntemin avantajı, NADES sentezini birkaç saatten saniyelere kadar azaltabilmesidir. Ultrason dalga yöntemi, ses dalgalarının yayılabileceği yarı akışkan bir ortam gerektirmekte ve karışımın yaklaşık 50°C'de ısıtılmasıyla gerçekleştirilmektedir. Bu nedenle, bileşenlerden en az birinin sıvı olması gerekmektedir. Mikrodalga yönteminde ise dipol rotasyonu, moleküller arasında ve HBD ile HBA bileşenleri arasında çarpışmalara yol açar ve sentez süresini kısaltan dielektrik ısınmaya neden olur. Ultrason dalgada olduğu gibi mikrodalga destekli sentez, geleneksel ısıtmayla karşılaştırıldığında daha hızlı ve daha verimlidir (Cannavacciuolo vd. 2023, Długosz 2023).



Şekil 2.3 NADES hazırlama yöntemleri

2.4 Ultrasonik Dalga Ekstraksiyonu

Ultrasonik dalga, insan kulağının işitemeyeceği kadar yüksek frekanstaki (>20 kHz) ses olarak tanımlanmaktadır. Genellikle dalga boyu, frekans ve yoğunluk açısından karakterize edilmektedir. Gıda endüstrisindeki uygulaması düşük yoğunluklu yüksek frekanslı ($f > 100$ kHz) ve yüksek yoğunluklu düşük frekanslı ($20 \text{ kHz} \leq f \leq 100 \text{ kHz}$) olmak üzere iki farklı kategoriye ayrılmaktadır

Ultrasonik dalga ekstraksiyonu altı temel mekanizma ile ilişkilidir (Chemat vd. 2016, Cvetanović 2019). Bunlar parçalanma, erozyon, sonokapiller, detekstürasyon, sonoporasyon ve yerel kayma gerilimidir.

Parçalanma: Bu olay, katı parçacıklar arasındaki çarpışma ve sıvıdaki kaviteasyon kabarcıklarının çökmesiyle oluşan şok dalgalarından kaynaklanmaktadır. Ultrasonik etki ile parçacık boyutunun azalması, katı yüzey alanının artmasına ve buna bağlı olarak kütle transferinin ve ekstraksiyon hızının artmasına neden olur. Böylece ekstraksiyon verimi artmaktadır.

Erozyon: Kavitasyon kabarcıklarının çökmesi sonucu katı yapıların matristen ekstraktif çözücüye geçmesine dayanmaktadır.

Sonokapiller: Ultrasonik kapiller etkisi, çözücünün matrisin gözeneklerine daha iyi nüfuz etmesini sağlar, böylece ekstraksiyon hızını artırmaktadır.

Detektürasyon: Ultrasonların neden olduğu katı matris tahribatını içermektedir.

Sonoporasyon: Bu mekanizma, membran gözenekleri oluşturarak hücre zarının geçirgenliğinin artmasına neden olmakta ve böylece hücre içi ürünlerin ekstraktif ortama geçmesini sağlamaktadır.

Yerel kayma gerilimi: Ultrasonik dalgaların sıvı ortama uygulanması, matris yüzeyinde kayma kuvvetlerinin oluşmasına sebep olur, bu da matris yapılarının yırtılmasına ve çözücü içindeki bileşiklerin ekstraksiyonuna neden olmaktadır.

2.5 Yenilebilir Film ve Kaplamalar

Tanımı ve tarihçesi: Yenilebilir film (YF) ve kaplamalar (YK) gıdalara ince bir tabaka halinde uygulanan, gıda ile birlikte tüketilebilen sentetik olmayan polisakkarit, protein, lipid gibi doğal kaynaklardan elde edilen materyallerdir (Suhag vd. 2020). YK, direkt gıda üzerine ince bir tabaka halinde uygulanmaktadır. YF ise yine yenilebilir malzemeden hazırlanan ancak önceden film haline getirilen ve daha sonra gıda üzerine veya arasına yerleştirilen malzemedir. Kaplama ve film arasındaki temel fark, YK'nın sıvı çözeltisi içine gıda maddesinin daldırılmasıyla oluşturulması, YF'nin ise katlanabilir yapraklar halinde oluşturulması ve daha sonra gıdanın kaplanmasıdır (Han vd. 2013).

Bu ve benzeri malzemeler insanlar tarafından çeşitli meyvelerin nem kaybını önlemek ve parlaklığını korumak gibi amaçlarla yüzyıllardır kullanılmaktadır. 12. ve 13. yüzyıllarda turuncgillere balmumundan kaplamalar yapıldığı, 15. yüzyılın sonlarında ise Asya ülkelerinde soya sütünden elde edilen ve Yuba adı verilen yenilebilir filmlerin kullanıldığı

bilinmektedir. Bunun yanı sıra orta çağlarda et ve peynirin korunması amacıyla lipit bazlı kaplamalar da kullanılmıştır (Pavlath ve Orts 2009).

YF ve YK gıda ürünlerini nem geçişinden, ışığın neden olduğu kimyasal değişimlerden, oksidasyondan ve mikrobiyolojik bozulmalardan koruyarak kalitenin sürekliliğini sağlamaktadır. Ayrıca fiziksel bütünlüğü korumakta ve duyuşal özelliklerini geliştirmektedir. Bunların yanı sıra lipit, gaz ve buhara karşı bariyer özelliğı gösterirken antioksidanlar, antimikrobiyaller, renklendiriciler ve aromalar gibi aktif maddelerin taşıyıcıları olarak işlev görmektedirler (Gennadios vd. 1997, Guilbert vd. 1997).

Yenilebilir film ve kaplamaların üretiminde kullanılan malzemeler: Yenilebilir film ve kaplamalar proteinler, polisakkaritler veya lipitler gibi yenilebilir biyopolimerlerden ve gıdaya uygun katkı maddelerinden üretilmektedirler. Biyopolimerler disülfid bağları ve çapraz bağlama gibi moleküller arası kovalent bağlar ve elektrostatik, hidrofobik veya iyonik etkileşimler gibi çoklu film oluşturma mekanizmalarına sahiptirler. Biyopolimerler tek başlarına veya karışım halinde film oluşturuu malzeme olarak kullanılabilirler (Gennadios vd. 1997). Yenilebilir filmlerin fiziksel özelliklerini geliştirmek için biyopolimerlerin içine plastikleştirici veya ek maddeler de katılmaktadır. Film ve kaplamaların yenilebilir özellikte olabilmeleri için üretim sırasındaki film oluşturma mekanizmalarının da gıda işlenmesine uygun olması gerekmektedir (Guilbert vd. 1997).

Protein bazlı yenilebilir filmler: Biyopolimer olarak tahıllar, yağlı tohumlar, kazein, yumurta akı, kolajen, jelatin gibi bitki ve hayvanlardan elde edilen proteinler kullanılabilir (Krochta 2002). Protein bazlı filmler nem absorpsiyonuna duyarlı olmalarından dolayı nem ve sıcaklıktan çok fazla etkilenmektedir. Ancak hidrofobik bileşiklere, oksijene ve karbondioksit karşı mükemmel bariyer özelliğı göstermektedirler. Ayrıca protein bazlı filmler, kaplandıkları gıdalara antimikrobiyal ve antioksidan özellik kazandırılabilir (Dursun ve Erkan 2009).

Lipit bazlı yenilebilir filmler: Lipit bazlı yenilebilir filmlerde mumlar, (balmumu, karnauba mumu, mum) reçineler (şelak reçinesi, kumarin reçinesi, terebentin) mineral ve bitkisel yağlar gibi hidrofobik yapılar kullanılmaktadır. Lipitler neme karşı iyi bir bariyer özelliği sergilemekte ve hidrofobik yapılarından dolayı gıda ürünlerinin bozulmasını geciktirmektedirler. Ayrıca gıda ürünlerinin görsel çekiciliğini arttırmakta ve gıdalara parlaklık kazandırmaktadır (Debeaufort vd. 2009). Ancak lipitlerin hidrofobik özelliği daha kalın ve daha kırılğan filmlerin oluşmasına neden olmaktadır. Bu nedenle protein ya da polisakkaritler gibi diğer film-yapıcı malzemelerle birleştirilerek lipit bazlı filmlerin esnekliği artırılabilir (Gennadios vd. 1997).

Polisakkarit bazlı yenilebilir filmler: Polisakkarit bazlı yenilebilir filmlerin sentezinde nişasta, aljinat, selüloz ve türevleri, kitosan, karragenan, pektin kullanılmaktadır. Polisakkaritler filmlere sertlik, kompaktlık, viskozite, yapışkanlık ve jel oluşturma özelliği kazandırmaktadır (Dhanapal vd. 2012). Yapılarında bulunan hidroksil gruplarının birbirleriyle hidrojen bağları oluşturabilmesi film oluşumunda ve özelliklerinde önemli rol oynamaktadır. Polisakkarit bazlı yenilebilir filmler iyi oksijen bariyeridirler böylece meyve ve sebzelerin solunumunu yavaşlatarak olgunlaşmalarını geciktirirler. Ancak hidrofilik yapılarından dolayı zayıf nem bariyeridirler (Pavlath vd. 2009).

Karragenan kırmızı deniz yosunlarının ekstraksiyonu ile elde edilen doğrusal zincirli, sülfat grubu içeren, suda çözünen bir polisakkarittir. Yapısal özelliklerine bağlı olarak iota-(ι), kappa-(κ), ve lambda-(λ) olmak üzere üç temel çeşit bulunmaktadır. κ -karragenan yaklaşık %25-30 oranında sülfat grupları ve %28-35 oranında 3,6-anhidrogalaktoz içermesi sebebiyle iota-(ι) ve lambda-(λ)'a göre daha güçlü jelleşme özelliğine sahiptir dolayısıyla gerilme direnci daha yüksek filmler sentezlenebilir (Sedayu vd. 2019).

Kompozit filmler: Farklı biyopolimerlerin bir arada kullanılmasıyla oluşturulan filmlere kompozitler filmler denilmektedir. Bu şekilde film özellikleri modifiye edilebilmekte ve özel uygulamalara yönelik olarak istenilen özellikte film yapıları oluşturabilmektedirler. Çok tabakalı kompozit plastik filmlere benzer şekilde biyopolimer filmler de katman katman çoklu kompozitler halinde hazırlanmaktadır. Polisakkarit filmler üzerine protein veya protein/polisakkarit filmler üzerine lipit katmanları uygulanabilmektedir. Ayrıca iki

veya daha fazla biyopolimer karıştırılarak homojen bir film tabakası da oluşturulabilmektedir. Bu şekilde her bir film oluşturu malzemenin istenilen özelliğinin filmin yapısına katılması mümkün olmaktadır (Debeaufort vd. 1998).

Plastikleştiriciler: Plastikleştiriciler polimerik film oluşturma malzemelerinin içine eklenen düşük moleküler ağırlığa sahip bileşiklerdir. Yenilebilir film ve kaplamalarda yaygın olarak kullanılan plastikleştiriciler gliserol, propilen glikol, polipropilen glikol, sorbitol ve sükroz gibi poliollerdir. Polisakkarit ve protein bazlı filmlerde polimer molekülleri arasındaki güçlü bağlar filmlerin elastikiyetlerinin azalmasına ve kırılma bir yapıya sebep olmaktadır (Krochta 2002). Plastikleştiriciler biyopolimer filmlerde polimer moleküllerinin aralarına girerek moleküller arası kuvveti azaltır ve polimer zincirlerinin hareketliliğini artırır. Böylece filmlerin mekanik, bariyer ve fiziksel özelliklerini iyileştirir (Guilbert vd. 1995, Krochta 2002).

Katkı Maddeleri: Yenilebilir film ve kaplamalara antioksidan, antimikrobiyal ajanlar, emülsüfyerler, aroma ve renk vericiler, esmerleşmeyi önleyiciler gibi katkı maddeleri eklenerek gıdaların mekanik, fiziksel özellikleri geliştirilmekte ve böylece gıdaların kalitesi ve güvenliği artırılabilir (Guilbert vd. 1997, Han 1997). Filmlerin yapısına katılan katkı maddelerinden biri olan emülgatörler, su-lipit arayüzünün veya su-hava yüzeyinin yüzey gerilimini azaltan hem hidrofilik hem de hidrofobik yapıya sahip yüzey aktif maddelerdir (Krochta 2002). Birçok biyopolimer belirli seviyelerde emülsiyonlaştırma kapasitesine sahip olsa da lipit emülsiyon filmleri üretmek için emülgatörlerin film oluşturu çözeltilere dahil edilmesi gerekmektedir. Emülgatörlerin yanı sıra antioksidan ve antimikrobiyal ajanlar da çözeltilere eklenerek enzimatik kararmayı, oksidasyonu, mikrobiyal bozulmayı engelleyerek yenilebilir film ve kaplamaların işlevselliğini artırmaktadırlar (Han 1997).

2.6 Yenilebilir Filmlerin Avantajları

Yenilebilir film ve kaplamaların en önemli avantajları yenilebilir ve biyobozunur olmalarıdır (Guilbert vd. 1997; Krochta 2002). Bu materyallerin yenilebilir özelliklerini

korumak amacıyla tüm film bileşenleri (biyopolimerler, plastikleştiriciler ve diğer katkı maddeleri) gıda sınıfı bileşenleri olmalıdır.

Filmler gıdalarda lipit oksidasyonunu, aroma kaybını, enzimatik kararmayı engellemekte ve gıdaların transferi ve depolanması sırasında su kaybını azaltmaktadır (Gennadios vd. 1997). Ayrıca antioksidanları, antimikrobiyal maddeleri, pigmentleri, esmerleşme reaksiyonlarını durduran iyonları ve vitaminleri ürünün içerisinde tutarak gıdaların kalitesini ve raf ömrünü artırmaktadır (Franssen ve Krochta 2003). Gıda ürünlerini fiziksel etki, basınç ve diğer mekanik faktörlerin neden olduğu fiziksel hasarlardan korumaktadırlar.

Film ve kaplama tabakalarının oksijen bariyer özelliği kuruyemişler, şekerleme ürünleri, kızarmış ürünler ve renkli ürünler gibi gıda ürünlerinde, renklendirici, tat ve lipit bileşenlerinin oksidasyonunu önlemekte ve taze ürünlerin solunum hızını yavaşlatmaktadır (Baldwin vd. 1999). Çok yağlı et ve balık ürünleri yenilebilir film ile kaplandığında lipit oksidasyonu engellenebilmektedir.

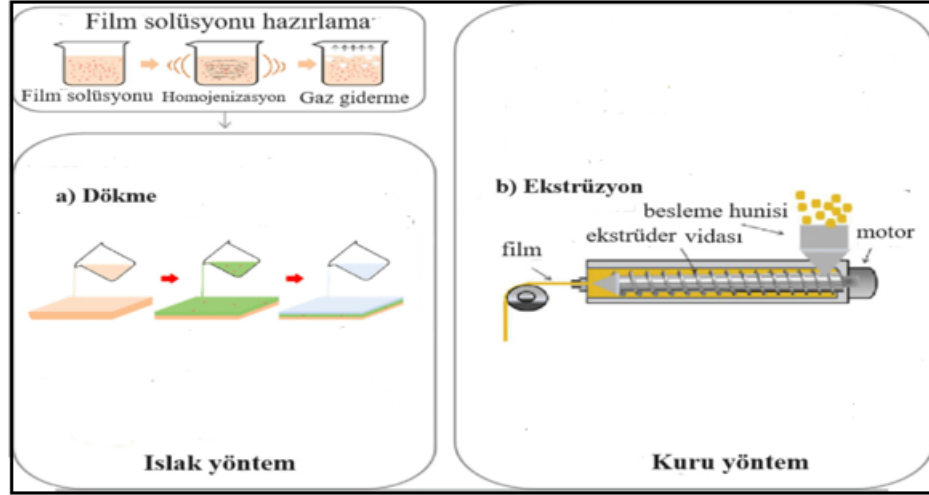
2.7 Yenilebilir Film ve Kaplamaların Sentezi

Filmler kuru ve ıslak olmak üzere iki şekilde üretilmektedir (**Şekil 2.4**). Kuru işlem erimiş döküm, ekstrüzyon ve ısıyla presleme ile olabilmektedir. Kuru işlemde sıcaklığı film oluşturucu malzemelerin erime noktasının üzerine çıkarmak için ısı uygulanmakta ve böylece materyaller akışkan hale getirilmektedir (Dhanapal 2012).

Islak film üretiminde, film oluşturan malzemelerin dağılımı için çözücüler kullanılmakta ardından çözücüyü uzaklaştırmak ve film yapısı oluşturmak için kurutma yapılmaktadır. Islak film prosesi için çözücü seçimi en önemli faktörlerden biridir. Filmlerin oluşması için film oluşturan materyallerinin tamamı çözücüler içinde çözünmeli veya homojen olarak dağılmalıdır.

Yenilebilir kaplamalar ise gıda maddesinin yüzeyine direkt temas ederek ince tabaka oluşturacak şekilde daldırma, boyama, püskürtme gibi yöntemlerle uygulanmaktadır.

Kaplama yönteminin seçimi gıda ürünün tipine bağlı olarak değişmektedir (Cerqueira vd. 2017).



Şekil 2.4 Filmlerin hazırlanma yöntemleri a) ıslak ve b) kuru

2.8 Kaynak Özetleri

Literatürde şalgam suyu ana hammaddesi olan siyah havuçtan biyoaktif bileşenlerin ekstraksiyonuna yönelik birçok çalışma bulunmasına karşın, atık siyah havucun değerlendirildiği çalışmaların çok kısıtlı olduğu belirlenmiştir. Aşağıda atık olmayan taze siyah havuçla gerçekleştirilen çalışmalar özetlenmiştir.

Gizir vd. (2008) çalışmalarında marketten temin edilen siyah havucu öğütüp 60°C'lik fırında kurutmuşlardır. Antosiyanin ekstraksiyonu için basınçlı sistemde asitlendirilmiş su kullanmışlardır. Bu amaçla sülfürik (%0.01), sitrik (0.1M) ve laktik asit (0.2M) ile asitlendirilmiş su ile 50, 75, 100°C sıcaklıklarda 50 bar basınç altında ekstraksiyonlar gerçekleştirmişlerdir. Laktik asit ile asitlendirilmiş suyun, sülfürik ve sitrik asit ile asitlendirilmiş suya kıyasla 100°C sıcaklıkta daha yüksek ekstraksiyon verimi gösterdiğini tespit etmişler ve en yüksek TMA içeriğini 7.63 mg/g olarak bildirmişlerdir.

Jabbar vd. (2015) çalışmalarında marketten temin edilen taze siyah havucu ev tipi bir parçalayıcıda öğüterek etanol ile ultrasonik dalga ekstraksiyonu gerçekleştirmişlerdir.

Deneysel tasarımın yapıldığı çalışmada parametreler ekstraksiyon süresi (3-37 dk), sıcaklık (10-60°C) ve etanol miktarı (%3-97) olarak belirlenmiş ve toplam fenol (TP) miktarı ve antioksidan kapasitesi yanıt olarak belirlenmiştir. TP miktarı için en uygun ekstraksiyon koşulları belirlenmiş (T=34°C, t=17 dk, %48 etanol) ve bu koşullar altında 316.74 µg/g toplam fenol elde edilmiştir. Antioksidan kapasitesi ise en uygun ekstraksiyon koşulları (T=29°C, t=17 dk, %54 etanol) altında 447.62 µg/g olarak bulunmuştur.

Türker ve Doğan (2021) taze siyah havuçtan antosiyanin ekstraksiyonu için, yeşil çözücü olan DES'leri kullanarak karıştırma yöntemiyle ekstraksiyon ve ayrıca ultrasonik dalga destekli ekstraksiyon gerçekleştirmişlerdir. Farklı hidrojen bağı donörleriyle (gliserol, sitrik asit, tartarik asit, malik asit ve fruktoz) kolin klorür bazlı DES'ler hazırlanmıştır. Çalışmada en etkili yöntemin ultrasonik dalga ekstraksiyon olduğu ve DES'ler arasında en yüksek TMA miktarının kolin klorür-sitrik asit (1:1) ile 6 mg/g olarak elde edildiği bildirilmiştir.

Ekstraksiyonda atık olan siyah havucun kullanıldığı çalışmalar ise aşağıda özetlenmiştir.

Ağçam ve Akyıldız (2015) siyah havucun bir tesiste işlenmesinin ardından ortaya çıkan posayı kullanmışlardır. Çözücü olarak metanol, etanol, saf su, metanol ve etanolün %37 HCl ile asitlendirilmiş ve ayrıca saf suyun sitrik asit ile asitlendirilmiş halleri kullanılmıştır. 5 g posa üzerine 20 mL çözücü eklenmiş, 5 dakika bekletildikten sonra 30 saniye vortekslenerek santrifüjlenmiştir. HPLC ile bileşenler belirlenmiş ve sonuçlara göre siyah havuç posasında baskın olarak siyanidin-3-ksilozil-glukozil-galaktozit-ferulik asidin C3XGGF (298.3- 398.8 mg/kg) ve siyanidin-3- ksilozil-galaktozidin C3XG (217.7-330.4 mg/kg) bulunduğunu tespit etmişlerdir. Ayrıca TMA miktarının 656.2-1191.9 mg/kg arasında değiştiği bildirilmiştir.

Ağçam vd. (2021) meyve suyu endüstrisi atığı olan siyah havuç posasından biyoaktif bileşenlerin ekstraksiyonunu yüksek hidrostatik basınç yöntemi kullanarak gerçekleştirmişlerdir. Atık 1:3 oranında saf su ile seyreltilmiş ve bu şekilde siyah havuç posası karışımı elde edilerek deneysel tasarım yöntemi ile TMA ve TP değerleri optimize

edilmiştir. Bu amaçla basınç, sıcaklık ve ekstraksiyon süresi parametre olarak belirlenmiştir. Optimum koşullarda (266.6 MPa, 13.6 dk, 78.3°C) en yüksek TMA miktarı 105.7 mg/L, en yüksek TP ise 333.9 mg/L olarak bildirilmiştir.

Kumar vd. (2019) siyah havuç posasından fenolik madde ekstraksiyonu üzerine mikrodalga, ultrasonik dalga ve geleneksel ekstraksiyon yöntemlerinin etkisini incelemeyi amaçlamışlardır. En yüksek verim mikrodalga destekli ekstraksiyon ile 348.07 W mikrodalga gücünde 9.8 dk ekstraksiyon süresinde 19.3 mL/g sıvı-katı oranında ve %19.8 etanol kullanılarak elde edilmiştir. Bu koşullar altında TP 264.9 ± 10.02 mg GAE/100 mL, antioksidan kapasitesi 13.14 ± 1.05 µmol Troloks eşdeğeri/mL ve renk yoğunluğu 68.63 ± 5.40 ünite olarak bulunmuştur.

Literatürdeki çeşitli aktif bileşiklerin karragenan bazlı yenilebilir film ve kaplamalara eklenerek özelliklerinin geliştirilmesine yönelik gerçekleştirilen çalışmalar aşağıda özetlenmiştir.

Liu vd. (2020) çalışmalarında nar suyu ve nar kabuğu ekstresi kullanarak κ-karragenan bazlı film üretmeyi amaçlamışlardır. HCl (%1) ile asitlendirilmiş etanol ile 4°C sıcaklıkta 24 st ekstraksiyon sonucu elde edilen ekstreler farklı oranlarda (%1, 2 ve 4) film çözeltisine ilave edilmiştir. Sentezlenen filmlerin antioksidan aktivitesi (AA) %5-90 aralığında değişmiş ve en yüksek AA, en fazla ekstre içeren filmlerde elde edilmiştir. Filmlerin mekanik özellikleri incelendiğinde ekstre oranı arttıkça nem içeriği ve su buharı geçirgenliği azalmış ancak gerilme direnci artmıştır. Ayrıca sentezlenen filmlerin patojenlerin (*Escherichia coli*, *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*) gelişimini inhibe etmede etkili olduğunu bildirmişlerdir.

Jancikova vd. (2020) κ- ve ι-karragenan kullanarak hazırladıkları yenilebilir filmlere lapacho çayı ekstresini ekleyerek filmlerin antioksidan özelliklerini geliştirmeyi amaçlamışlardır. Bunun için filmlere farklı oranlarda (%5, 10, 20) lapacho ekstresi eklemişler ve filmlerin TP miktarını ve AA değerlerini belirlemişlerdir. En yüksek TP ve AA değerleri %20 lapacho ekstresi eklenmiş κ-karragenan filminde sırasıyla 233.75 mg/g ve %87.6 olarak elde edilmiştir. Çalışma sonucunda sentezlenen filmlerin meyve

sebzelerde raf ömrünü arttırmak için kullanılabileceğini ve iyi bir antioksidan kaynağı olduğunu bildirmişlerdir.

Velásquez vd. (2021) kolin klorür, laktik asit, gliserol, tartarik asit, glukoz, sitrik asit bileşenleri ile hazırlanan NADES'leri kullanarak Chilean *Luma chequen* (Molina) meyvesinden ultrasonik dalga destekli ekstraksiyon yöntemi ile antosiyanin ekstraksiyonu gerçekleştirmişler ve elde edilen ekstreyi κ -karragenan bazlı yenilebilir filme ilave etmişlerdir. En yüksek TMA değerine kolin klorür:gliserol (4:6) kullanılarak ulaşıldığı bildirilmiştir. Elde edilen ekstreler κ -karragenan bazlı yenilebilir film matrisine eklendiğinde filmlerin antioksidan aktivitelerinin %7.26-10.81 civarına arttığı ve *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, and *Salmonella typhi*'ye karşı antibakteriyel özellik gösterdikleri tespit edilmiştir.

Literatürde yer alan çalışmalar incelendiğinde ekstraksiyon için genellikle saf ya da asitlendirilmiş organik çözücülerin kullanıldığı görülmektedir. Ayrıca çalışmalarda atık olarak değerlendirilen siyah havuç ya direkt presleme sonucu elde edilmiş ya da meyve sebze suyu işleme tesisinden temin edilmiştir. Şalgam suyu tesisi atığı olan fermente siyah havuç atığının kullanımına yönelik yalnızca bir adet çalışmaya rastlanmış ve çalışmada herhangi bir ekstraksiyon işlemi gerçekleştirilmeden atık direkt olarak bisküvi formülasyonuna ilave edilerek fonksiyonel özelliklerinin geliştirilmesi üzerine yoğunlaşmıştır (Baltacıoğlu vd. 2019). Dolayısıyla şalgam suyu üretim tesisi atığının değerlendirilmesi konusunda yeterli çalışma olmadığı belirlenmiştir.

Bu tez çalışması fermente siyah havuç atığından yeşil çözücüler olan NADES'ler ile etkin bir yöntem olan ultrasonik dalga ekstraksiyonu kullanılarak katma değeri yüksek değerli bileşenlerin çevre dostu yöntemlerle geri kazanılması ve elde edilen ekstrenin yenilebilir filmlerin mekanik ve kimyasal özelliklerini geliştirmek üzere kullanılması açısından özgün bir çalışmadır.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Materyal

Çalışmada kullanılan atık fermente siyah havuç Kavaklıdere Gıda A.Ş.'nin Ankara'da bulunan şalgam suyu üretim tesisinden temin edilmiştir. Deneysel çalışmada kullanılan kimyasal maddeler ve cihazlar sırasıyla **EK 1** ve **EK 2**'de verilmiştir.

3.2 Şalgam Suyu Tesisi Atığının Hazırlanması

Şalgam suyu tesisi atığı olan fermente siyah havuç, parçalayıcıda öğütülüp (Braun MQ9078X) 0.04 mbar ve -50°C'de liyofilize edilmiş (Hetosicc, CD 52-1, Heto Lab) elek cihazında (Endecotts, Octagon 200, England) elenerek 1 mm-425 µm aralığındaki partiküller (**Şekil 3.1**) deneylerde kullanılmak üzere ayrılmış ve kullanılmadığı durumlarda -30°C'de saklanmıştır.



Şekil 3.1 Öğütülmüş ve liyofilize edilmiş fermente siyah havuç

3.3 Çözücülerin Hazırlanması

NADES'ler uygun mol oranındaki bileşenler tartılarak uygun sıcaklıkta berrak bir sıvı oluşana kadar, manyetik karıştırıcıda karıştırılarak hazırlanmıştır (Dai vd. 2013). NADES'ler asidik, şeker bazlı, poliol bazlı ve kolin klorür-şeker bazlı olmak üzere 4

farklı grupta hazırlanmış olup isimleri, kısaltmaları ve sentez sıcaklıkları **çizelge 3.1’de** verilmiştir. Kolin klorür, kullanımdan önce en az 24 st boyunca desikatörde bekletilmiştir.

Çizelge 3.1 Çalışmada kullanılan NADES’ler

NADES grubu	NADES	Kısaltma	Sentez sıcaklığı	Referans
Asidik	Kolin klorür-laktik asit	CLa (1:1)	60 °C	Jablonsky vd. 2015
		CLa (1:6)	60 °C	Jablonsky vd. 2015
		CLa (1:9)	60 °C	Jablonsky vd. 2015
Şeker bazlı	Glukoz-fruktoz-sukroz-su	GFSW (1:1:1:11)	50 °C	Mohammadpour vd. 2018
		GFW (1:1:11)	50 °C	Mohammadpour vd. 2018
	Glukoz-sukroz-su	GSW (1:1:11)	50 °C	Mohammadpour vd. 2018
	Fruktoz-sukroz-su	FSW (1:1:11)		Mohammadpour vd. 2018
Kolin klorür-şeker bazlı	Kolin klorür-fruktoz-su	CFW (5:2:5)	80 °C	Elgharbawy vd. 2018
	Kolin klorür-sukroz-su	CSW (4:1:4)	80 °C	Elgharbawy vd. 2018
Poliol bazlı	Kolin klorür-etilen glikol	CEG (1:2)	80 °C	Zhang vd. 2012
	Kolin klorür-gliserol	CG (1:2)	80 °C	Dai vd. 2013

3.4 Elektriksel İletkenlik Ölçümü

Çalışmada en yüksek TMA değerini veren NADES olan CSW (4:1:4)’nin ötektik yapısının bozulmadan üzerine eklenebilecek en yüksek su miktarının belirlenebilmesi için farklı oranlarda CSW (4:1:4)-su karışımları hazırlanarak elektriksel iletkenlik değerleri ölçülmüştür (Radiometer, IONcheck65).

3.5 Ultrasonik Dalga Destekli Ekstraksiyon

Fermente siyah havuç atığından ultrasonik dalga ile ekstraksiyonda NADES türü, NADES miktarı, KS oranı ve süre gibi farklı parametrelerin etkisinin incelenmesi

amacıyla ultrasonik banyo kullanılmıştır (37 kHz, 140 W) (Elma S30H, Singer, Almanya).

NADES türünün (asidik, şeker, kolin klorür-şeker ve poliol bazlı) etkisinin incelendiği deneylerde çizelge 3.1’de verilen 11 adet NADES kullanılmıştır. Bu parametrenin etkisi incelenirken NADES miktarı %50, KS oranı 0.06 g/mL, sıcaklık 50°C ve süre 30 dk olarak ayarlanmıştır. Kontrol grubu çözücülerini olarak ise etanol ve su kullanılmıştır.

NADES türü etkisinin incelenmesinin ardından her bir gruptan en yüksek TMA değerini veren NADES belirlenmiş ve sonraki parametre incelemelerine dört farklı gruptan seçilen birer adet NADES ile devam edilmiştir (CLa (1:1), FSW (1:1:11), CSW (4:1:4), CG (1:2)).

NADES miktarının etkisinin incelenmesi amacıyla %50, 65 ve 80 oranlarında NADES içeren sulu çözeltiler hazırlanarak ekstraksiyonlarda kullanılmıştır (KS oranı=0.06 g/mL, T=50°C, t= 30 dk). KS oranının etkisinin incelenmesi amacıyla 0.04, 0.06 ve 0.08 g/mL değerlerinde atık/çözücü oranlarında ekstraksiyonlar gerçekleştirilmiştir (%50 NADES, T=50°C, t= 30 dk). Bu deney setinin ardından farklı NADES türleri için öne çıkan KS oranları belirlenmiş ve diğer parametre incelenirken her biri için en yüksek TMA değerlerini veren KS oranları kullanılmıştır. Sürenin etkisinin incelendiği deneylerde 15, 30 ve 60 dk boyunca ekstraksiyonlar gerçekleştirilmiştir (NADES miktarı %50, KS oranı CG (1:2), CSW (4:1:4) ve FSW (1:1:11) için 0.06 g/mL, CLa (1:1) için 0.04 g/mL, T=50°C, t= 30 dk). Ekstraksiyon işlemlerinin sonunda ekstratlar süzülerek ayrılmış ve 0.45 µm PVDF şırınga filtreden geçirilmiş ve -30°C’de saklanmıştır.

3.6 Toplam Fenol Analizi

Örneklerin TP miktarı Folin-Ciocalteu yöntemi ile belirlenmiştir (Arnous vd. 2001). Belirli oranda seyreltilmiş ekstreden 20 µL alınmış, 1580 µL distile su ile karıştırılmış ve 100 µL Folin-Ciocalteu reaktifi eklenmiştir. 1 dk’lık inkübasyon süresi sonunda 300 µL %20’lik Na₂CO₃ eklenmiş ve vortekslenmiştir. Karışım oda sıcaklığında karanlıkta 2 st

inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda 750 nm dalga boyunda absorbans okunmuştur (Shimadzu, UV-1601). TP derişimi, gallik asit eşdeğeri olarak bulunmuştur. Buna göre gallik asit kullanılarak hazırlanan kalibrasyon eğrisi **EK 3**'te verilmiştir.

3.7 Toplam Flavonoid Analizi

Ekstrelerin toplam flavonoid (TF) miktarı Choi vd. (2011)'nin uyguladığı yöntemle göre belirlenmiştir (2011). Belirli oranda seyreltilmiş ekstrelerden 100 µL deney tüpüne alınmış, üzerine 1000 µL dietilen glikol ve 100 µL NaOH eklenmiştir. Vortekslendikten sonra 37°C'de 60 dk sıcak suda inkübe edilmiştir. 420 nm dalga boyunda absorbans okunmuştur. TF derişimi, kuersetin cinsinden verilmiştir. Buna göre kuersetin kullanılarak hazırlanan kalibrasyon eğrisi **EK 4**'te verilmiştir.

3.8 Antioksidan Aktivite Tayini

Toplam antioksidan aktivite, 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) radikal yakalama yöntemiyle belirlenmiştir (Fernando ve Soysa 2015). 60 µL ekstre, 1140 µL DPPH (100 µM) ile karıştırılmıştır. Karışım oda sıcaklığında ve karanlıkta 30 dk bekletildikten sonra 517 nm'de absorbans okunmuştur. Aynı prosedür numune olmadan kontrol ($A_{kontrol}$) için de gerçekleştirilmiştir. DPPH giderimi (% inhibisyon) **eşitlik 3.1**'den hesaplanmıştır.

$$İnhibisyon (\%) = \frac{A_{kontrol} - A_{örnek}}{A_{kontrol}} \times 100 \quad (3.1)$$

3.9 Toplam Monomerik Antosiyanin Tayini

TMA tayini, pH diferansiyel yöntemi kullanılarak belirlenmiştir (Giusti ve Wrolstad, 2001). Numuneler, 0.025 M potasyum klorür tamponu (KCl, pH=1) ve 0.4 M sodyum asetat tamponu ($CH_3COONa \cdot 3H_2O$, pH=4.5) ile seyreltilmiştir. 15 dk sonra 527 nm ve 700 nm dalga boylarında absorbans okumaları yapılmıştır. TMA miktarı, **eşitlik 3.2** ve **eşitlik 3.3** kullanılarak siyanidin-3-glukozit eşdeğeri olarak hesaplanmıştır.

$$TMA \left(\frac{mg}{L} \right) = \frac{A \times MW \times SF \times 1000}{\epsilon \times l} \quad (3.2)$$

$$A = (A_{527nm} - A_{700nm})_{pH1} - (A_{527nm} - A_{700nm})_{pH4.5} \quad (3.3)$$

Siyanidin-3-glukozit için MW (moleküler ağırlık) = 449.2 g/mol

SF= Seyreltme faktörü

l= küvetin ışın yolu (1 cm)

ϵ = siyanidin-3-glukozit için molar absorpsiyon katsayısı (26900)

10^3 = g'den mg'a dönüştürme faktörü.

3.10 Antosiyanin Parçalanma Ölçütlerinin Belirlenmesi

Polimerik renk, polimerik renk oranı, renk yoğunluğu hesaplanarak antosiyaninlerin parçalanma ölçütleri belirlenmiştir (Giusti ve Wrolstad (2001)). Çözeltiye bisülfite eklendiğinde örnekteki monomerik antosiyaninleri renksiz kompleks oluştururken polimerik antosiyanin-tanen kompleksleri ve melanoidin pigmentleri ise, bisülfite karşı direnç göstererek renklerini korumaktadırlar. Her iki deney tüpüne belirli oranlarda seyreltilmiş örneklerden 1120 μ l alınmış ve deney tüplerinden birine 80 μ l bisülfite çözeltisi, diğerine ise 80 μ l su eklenip vortekslenmiş ardından beklenmiş, absorbans değerleri okunmuş ve polimerik renk **eşitlik 3.4**, renk yoğunluğu **eşitlik 3.5** ve polimerik renk oranı **eşitlik 3.6** kullanılarak hesaplanmıştır.

$$Polimerik\ renk = [(A_{\lambda_{vis-max}} - A_{700\ nm}) + (A_{420\ nm} - A_{700\ nm})] \times Sf \quad (3.4)$$

$$Renk\ yoğunluğu = [(A_{\lambda_{vis-max}} - A_{700\ nm}) + (A_{420\ nm} - A_{700\ nm})] \times Sf \quad (3.5)$$

$$Polimerik\ renk\ oranı\ (\%) = \frac{Polimerik\ renk}{Renk\ yoğunluğu} \times 100 \quad (3.6)$$

$A_{\lambda_{vis-max}}$: Ekstrenin en yüksek absorbans verdiği dalga boyu (527 nm)

3.11 Deneysel Tasarım ve Optimizasyon

TMA'nın optimizasyonunda bağımsız değişkenler ile yanıtlar arasındaki ilişkinin belirlenebilmesi için yapılması gereken deneyler MKT ile belirlenmiş ve aralarındaki ilişkiler YYY grafikleri ile görselleştirilmiştir (Design-Expert® 9.0. Stat-Ease, Inc., USA). Çözücü olarak en yüksek TMA ekstraksiyonunu sağlayan NADES olan CSW (4:1:4) seçilmiştir. Ekstraksiyon süresi, KS oranı ve NADES miktarı, bağımsız değişkenler olarak seçilmiş, TMA miktarı ise yanıt olarak belirlenmiştir. MKT ile elde edilen faktör seviyeleri **çizelge 3.2**'de verilmiştir. Buna göre, merkezi noktada altı tekrarlı olmak üzere toplam 20 adet deney gerçekleştirilmiştir. (**Çizelge 3.3**).

Çizelge 3.2 Deneysel tasarımın bağımsız değişkenleri ve seviyeleri

Bağımsız Değişkenler	Faktör Seviyeleri				
	- α	-1	0	1	+ α
A- NADES oranı (%)	39.77	50	65	80	90.23
B- KS oranı (g/mL)	0.01	0.03	0.05	0.08	0.1
C- Süre (dk)	13.07	25	42.5	60	71.93

Çizelge 3.3 MKT ile oluşturulan deney setleri

Deney	Faktör 1 A: NADES (%)	Faktör 2 B: KS (g/mL)	Faktör 3 C: Süre (dk)
1	80.00	0.03	25.00
2	65.00	0.05	42.50
3	80.00	0.03	60.00
4	80.00	0.08	25.00
5	65.00	0.05	42.50
6	65.00	0.05	13.07
7	65.00	0.10	42.50
8	50.00	0.08	25.00
9	90.23	0.05	42.50
10	65.00	0.05	42.50
11	65.00	0.05	42.50
12	65.00	0.05	42.50
13	39.77	0.05	42.50
14	65.00	0.01	42.50

Çizelge 3.3 MKT ile oluşturulan deney setleri (devam)

15	65.00	0.05	42.50
16	50.00	0.03	60.00
17	80.00	0.08	60.00
18	50.00	0.03	25.00
19	65.00	0.05	71.93
20	50.00	0.08	60.00

3.12 Antosiyaninlerin HPLC ile Analizi

Şalgam suyu atığı ekstralarının antosiyanin profili HPLC kullanılarak Durst ve Wrolstad (2001) tarafından açıklanan yöntem modifiye edilerek belirlenmiştir. Belirli oranda seyreltilen ekstralar 0.45 µm'lik PVDF filtrelerden geçirilerek analize hazırlanmıştır. HPLC analizleri C18 kolon (4.6 mm x 150 mm x 5 µm) kullanılarak, 1 mL/dk akış hızında 520 nm dalga boyunda (Waters 2487 UV-VIS dedektör), 30°C sıcaklıkta, enjeksiyon hacmi 30 µL olacak şekilde, taşıyıcı fazların asetonitril (A) ve %4 fosforik asit (B) olduğu koşullarda gerçekleştirilmiştir. Ekstre analizi için kullanılan gradyen program ve standart olarak kullanılan siyanidin-3-glukozit için kullanılan izokratik program ayrıntıları **çizelge 3.4** ve **çizelge 3.5**'de verilmiştir.

Çizelge 3.4 Ekstreler için uygulanan gradyen programı

Süre (dk)	Taşıyıcı fazlar	
	A (%)	B (%)
0	6	94
15	20	80
20	50	50

Çizelge 3.5 Siyanidin 3-glukozit için uygulanan izokratik program

Taşıyıcı faz A	%100 Asetonitril
Taşıyıcı faz B	%4 Fosforik asit
Mobil faz bileşimi	50:50 (A:B)

3.13 Yenilebilir Film Sentezi

Yenilebilir film yapısında kullanılmak üzere deneysel tasarım sonucu optimize edilen koşullarda elde edilmiş ekstre kullanılmıştır (NADES= %59,07 CSW (4:1:4), t=60.25 dk, KS oranı=0.02 g/mL). Yenilebilir film sentezinde polimer olarak κ -karragenan (%1, a/h) ve plastikleştirici olarak gliserol kullanılmıştır ve ekstre film yapısına iki farklı yöntemle eklenmiştir. Ekstrenin katkı maddesi olarak kullanıldığı birinci yöntemde film çözeltisi hazırlandıktan sonra, kurutma aşamasına geçilmeden hemen önce farklı miktarlarda ekstreler film çözeltilerine eklenmiştir. Ekstrenin yapıya katıldığı ikinci yöntemde ise filmlerde plastikleştirici olarak görev yapan gliserol içine farklı miktarlarda ekstreler eklenmiştir. Yöntemler aşağıda ayrıntılı olarak sunulmuştur.

Ekstrenin katkı maddesi olarak kullanımı: Polimer olarak kullanılan κ -karragenanın %1'lik, (a/h) çözeltisi üzerine %30 gliserol ilave edilerek 80°C ve 400 rpm'de 60 dk boyunca karıştırılmıştır. Toplam 6 mL olarak hazırlanan çözelti 60°C'ye soğutulurken üzerine farklı oranlarda ekstre eklenmiştir (%3, 6, 10, 16 ve 25). Hazırlanan çözeltiler 9.6 cm çapındaki cam petriye aktarılmış ve etüvde 30°C'de 24 st boyunca kurutulmuştur. Kontrol olarak ekstrenin eklenmediği film kullanılmıştır. Ekstrenin katkı maddesi olarak kullanıldığı filmlerdeki % ifadesi ekstre hacminin toplam hacim içindeki miktarını ifade etmektedir.

Ekstrenin yapıya katılması: Ekstrenin yapıya katıldığı filmlerde ise, gliserol miktarının %5, 10, 20 ve 30'u kadar ekstre çözeltiye ilave edildikten sonra yukarıda verilen prosedürle filmler hazırlanmıştır. Kontrol filmlerinde ekstre yerine, çözücüsü olan %59.07 CSW (4:1:4) kullanılmıştır. Ekstrenin yapıya katıldığı filmlerdeki % ifadesi ekstre hacminin gliserol hacmi içindeki miktarını ifade etmektedir. **Çizelge 3.6**'da hazırlanan yenilebilir filmler, özellikleri ve kısaltmaları verilmiştir.

Çizelge 3.6 Çalışmada hazırlanan yenilebilir filmler

Ekstrenin kullanım türü		Film ismi	Kısaltma	Ekstre miktarı (% v/v)	Çözücü miktarı (% v/v)
Katkı	Yapı				
√		Kontrol	K	-	-
√		%3 Ekstre	E3	3	-
√		%6 Ekstre	E6	6	-
√		%10 Ekstre	E10	10	-
√		%16 Ekstre	E16	16	-
√		%25 Ekstre	E25	25	-
	√	%5 Yapı-Kontrol	YK5	-	5
	√	%5 Yapı-Ekstre	YE5	5	-
	√	%10 Yapı-Kontrol	YK10	-	10
	√	%10 Yapı-Ekstre	YE10	10	-
	√	%20 Yapı-Kontrol	YK20	-	20
	√	%20 Yapı-Ekstre	YE20	20	-
	√	%30 Yapı-Kontrol	YK30	-	30
	√	%30 Yapı-Ekstre	YE30	30	-

3.14 Yenilebilir Film Analizleri

3.14.1 Antioksidan aktivite tayini

Filmlerin AA değerleri, 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) radikal giderme yöntemiyle Bölüm 3.8’de verilen yöntemle ölçülmüştür. Örnek çözeltisi için 25 mg yenilebilir film 4 mL suda çözünmüştür.

3.14.2 Kalınlık ölçümü

Filmlerin kalınlıkları, mikrometre ile 3 farklı bölgeden alınan ölçümlerin ortalama değerleri olarak verilmiştir (Simona vd. 2021).

3.14.3 Geçirgenlik ve şeffaflık ölçümü

Geçirgenlik ve şeffaflık değerlerinin ölçümü için 3 cm x 3 cm boyutlarında kesilerek UV spektrofotometre haznesine yerleştirilmiş ve 356 nm ve 600 nm dalga boylarında geçirgenlik değerleri okunmuştur. Şeffaflık değeri **eşitlik 3.7** kullanılarak hesaplanmıştır (Simona vd. 2021).

$$\text{Şeffaflık değeri} = \frac{\log T_{600}}{x} \quad (3.7)$$

T_{600} : 600 nm'deki geçirgenlik değeri (%)

x : film numunelerinin kalınlığı (mm).

3.14.4 Nem içeriği tayini

Filmlerden 2 cm×2 cm kesilerek tartılmış (W_1), ardından etüvde 105°C'de 2 saat kurutma sonrasında tekrar tartılmıştır (W_2). Nem içeriği **eşitlik 3.8** ile hesaplanmıştır (Jancikova vd. 2020).

$$\text{Nem içeriği (\%)} = \frac{W_1 - W_2}{W_1} \times 100 \quad (3.8)$$

3.14.5 Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi analizi

Yenilebilir filmlerin FTIR analizleri 4000-400 cm^{-1} aralığında Attenuated Reflectance (ATR) FTIR ile (Jasco (FT/IR-4600)) Ankara Üniversitesi Biyomedikal Mühendisliği Bölümü'nde gerçekleştirilmiştir.

3.14.6 Taramalı elektron mikroskobu analizi

Yenilebilir filmlerin SEM analizleri, 15 kV'luk voltaj ve x1000 büyütme oranı kullanılarak Ankara Üniversitesi Nükleer Bilimler Enstitüsü'nde gerçekleştirilmiştir (ZEISS, Evo 40).

3.14.7 Mekanik analizler

Hazırlanan yenilebilir filmlere çekme testi uygulanmıştır (50N yük, 5 mm/dk hız) (Shimadzu, AGS-X). Örneklerle uygulanan çekme yükü ve örneklerde meydana gelen uzama miktarı zamana bağlı olarak kaydedilmiştir. Mühendislik gerilmesi (σ) ve mühendislik gerinmesi (ε) **eşitlik 3.9** ve **eşitlik 3.10** ile hesaplanmıştır.

$$\sigma \text{ (MPa)} = F/A \quad (3.9)$$

F: kopma anında uygulanan maksimum kuvvet (N)

A : kesit alanı (mm²)

$$\varepsilon = (l_i - l_0)/l_0 \quad (3.10)$$

l_i : ilk uzunluk (mm)

l_0 : son uzunluk (mm)

Kopma uzaması (KU%) ise **eşitlik 3.11** ile hesaplanmıştır.

$$KU \text{ (\%)} = \left(\frac{l_i - l_0}{l_0} \right) \times 100 \quad (3.11)$$

Bu değerler yardımıyla elde edilen mühendislik gerilmesi (σ) - mühendislik gerinmesi (ε) eğrisinin eğiminden Young modülü (YM) ve maksimum gerilme olduğu noktadan gerilme direnci (GD) hesaplanmıştır. Ölçümler Ankara Üniversitesi Biyomedikal Mühendisliği Bölümü'nde gerçekleştirilmiştir.

3.14.8 Antimikrobiyal aktivite

Filmlerin ve ekstrelerin antimikrobiyal aktivitesi, Ankara Üniversitesi Biyoloji Bölümü'nde gerçekleştirilmiştir. Filmlerin antimikrobiyal aktiviteleri, ekstrenin katkı maddesi olarak kullanıldığı E10 ve kontrolü (K) ayrıca ekstrenin yapıya katıldığı YE20 ve kontrolü (YK20) için ölçülmüştür. Bu amaçla gıda kaynaklı enfeksiyonlara ve gıda bozulmalarına neden olan üç farklı gram negatif bakteri (*Escherichia coli* ATCC 43888, *Salmonella infantis* ATCC 51741 ve *Salmonella typhimurium* SL 1344) ve iki farklı gram pozitif bakteriye (*Listeria monocytogenes* ATCC 13932 ve *Listeria monocytogenes* ATCC 7644) karşı disk difüzyon yöntemi kullanılarak belirlenmiştir (Shen vd. 2010, Simona vd. 2021). Yenilebilir filmler 6 mm çapında disk şeklinde kesilmiş ve fiziksel dezenfeksiyon için 1 saat süreyle UV ışığına (dalga boyu 260 nm) maruz bırakılmıştır. Gliserol içerisinde stok kültür halinde -20°C'de saklanan patojen bakteriler Brain Heart Infusion (BHI, Merck, Almanya) sıvı besiyerinde 37°C'de 24 st süreyle inkübe edilerek aktifleştirilmiştir. 0.5 Mc Farland standardına göre hazırlanan her bir patojen bakteri kültürü BHI yarı katı besiyerine (%0.75 gr agar içeren) inoküle edilmiş ve ardından petri içerisinde hazırlanan BHI katı (%1.5 gr agar içeren) yüzeyine yayılmıştır. Besiyerinin katılaşmasını takiben hazırlanan diskler belirli aralıklarla yüzeye yerleştirilmiştir. Pozitif kontrol olarak antibiyotik içeren diskler kullanılmıştır. 37°C'de 24 saat inkübasyonu takiben diskler etrafında oluşan inhibisyon zonları bir cetvel yardımıyla ölçülmüştür.

Ekstre ve kontrolü olan çözücüsü için antimikrobiyal aktivite ölçümleri agar kuyu difüzyonu yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Disk difüzyon yöntemine benzer şekilde agar üzerine bakteri kültürü inoküle edilmiş ve yayılmıştır. Katılaşan agarlar üzerinde steril bir uç ile aseptik olarak kuyucuklar açılmıştır. Açılan kuyucuk içerisine gözenek boyutu 0.22 µm olan filtreden geçirilerek steril edilen örneklerden 100 µL konulmuş ve 37°C'de 24 st inkübe edilmiş ardından diskler etrafında oluşan inhibisyon zonları bir cetvel yardımıyla ölçülmüştür.

3.15 Yenilebilir Filmin Gıda Ürününe Uygulanması

Yenilebilir filmler arasında en düşük nem içeriği, en düşük şeffaflık ve en yüksek AA değeri gösteren filmler ile domatesler kaplanarak filmlerin gıdaları koruması incelenmiştir. Bu amaçla ekstrenin katkı maddesi olarak kullanıldığı E10 ve kontrolü (K) ayrıca ekstrenin yapıya katıldığı YE20 ve kontrolü (YK20) seçilmiştir. Kaplamada kullanılan domatesler yerel bir marketten temin edilmiş, temizlenmiş ve ardından filmler ile kaplanarak 30 gün boyunca oda sıcaklığında fiziksel değişimleri gözlenmiştir.

3.16 İstatistiksel Analiz

Tüm ekstraksiyonlar ve analizler üç tekrarlı gerçekleştirilmiş ve elde edilen deneysel sonuçlar ortalama $\pm$ standart sapma olarak ifade edilmiştir. İstatistiksel analiz tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile GraphPad Prism Version 10.0.2 kullanılarak yapılmış ortalama değerler $p < 0.05$ olduğunda anlamlı olarak kabul edilmiştir. Veri analizinde varyans ve yanıt yüzeylerinin analizi, regresyon denklemleri ve optimum parametrelerin belirlenmesi amacıyla Design-Expert® 9.0 (Stat-Ease, Inc., ABD) yazılımı kullanılmıştır.

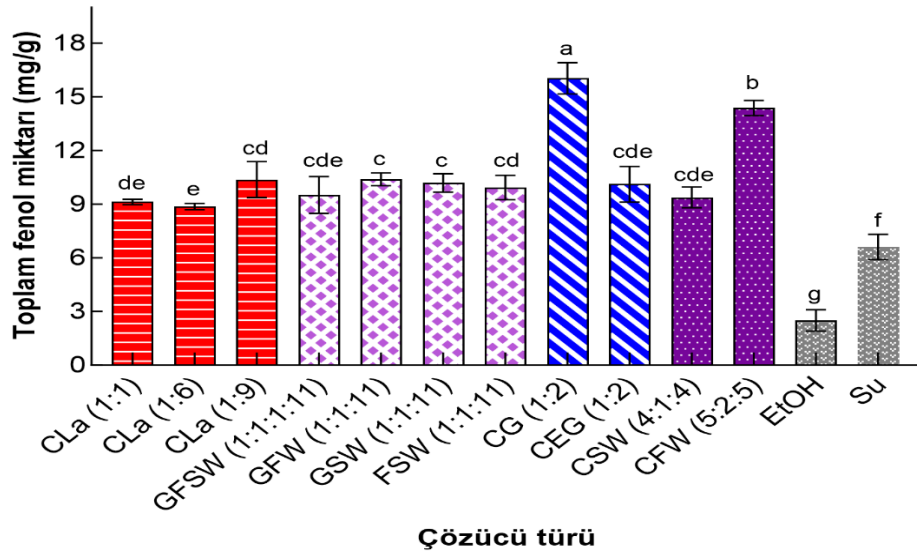
4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1 Şalgam Suyu Tesisi Atığından Değerli Bileşenlerin Ekstraksiyonu

4.1.1 Yeşil çözücü türünün etkisi

NADES türünün etkisinin incelenmesi amacıyla asidik gruptan CLa (1:1), CLa (1:6), CLa (1:9) şeker grubundan GFSW (1:1:1:11), GFW (1:1:11), GSW (1:1:11), FSW (1:1:11), kolin klorür-şeker grubundan CFW (5:2:5), CSW (4:1:4) ve poliol grubundan CEG (1:2), CG (1:2) çözücülerini kullanılmıştır.

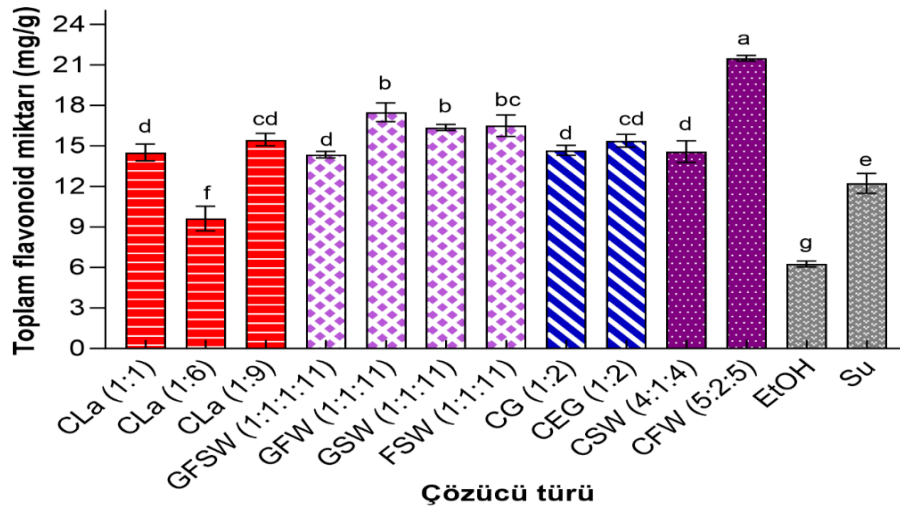
NADES türlerinin şalgam suyu atığından ekstrakte edilen TP miktarına etkisi **şekil 4.1**'de verilmiştir. Sonuçlara göre en yüksek TP miktarı CG (1:2) ile 16.04 ± 0.87 mg/g olarak, ikinci yüksek değer ise CFW (5:2:5) ile 14.23 ± 0.42 mg/g olarak elde edilmiştir. GFW (1:1:11), CLa (1:9), GSW (1:1:11), CEG (1:2) çözücülerini elde edilen TP miktarları ise 10 mg/g civarında bulunmuştur ($p > 0.05$). Farklı NADES grupları göz önüne alındığında, poliol grubunda CG (1:2)'nin asidik grupta CLa (1:9)'nin, şeker grubunda GFW (1:1:11)'nin ve kolin klorür-şeker grubunda ise CFW (5:2:5)'nin öne çıktığı belirlenmiştir. Şeker grubu dışındaki tüm NADES gruplarında çözücü türlerinin TP miktarı üzerine etkisi istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0.05$). Kontrol grupları ile NADES'ler kıyaslandığında ise su ve etanol ile daha düşük miktarda fenolik maddenin ekstrakte edilebildiği belirlenmiştir (Su: 6.9 ± 0.34 mg/g, EtOH: 2.50 ± 0.66 mg/g).



Şekil 4.1 Çözücü türlerinin TP miktarına etkisi

(Kırmızı yatay çizgi: asidik grup, mor dörtgen: şeker grubu, mavi-beyaz eğik çizgili: poliol grubu, mor: kolin klorür şeker grubu gri desen: kontrol grupları) Farklı harfle belirtilen değerler istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0.05$)

NADES türlerinin TF miktarına etkisi ise **şekil 4.2**'de verilmiştir. En yüksek TF miktarı 21.45 ± 0.10 mg/g olarak kolin klorür-şeker bazlı grupta olan CFW (5:2:5) ile elde edilmiş ve bunu 17.38 ± 0.75 mg/g değeri ile şeker bazlı olan GFW (1:1:11) takip etmiştir. Her gruptan en yüksek flavonoid miktarını sağlayan NADES'ler; CFW (5:2:5), GFW (1:1:11), CLa (1:9), CEG (1:2) olarak belirlenmiştir. Asidik grupta 1:9 mol oranı en yüksek sonucu vermiş, ancak laktik asit mol oranı ile ekstrakte edilen flavonoid miktarı arasında doğrusal bir ilişki olmadığı belirlenmiştir. Şeker bazlı ve poliol bazlı NADES'ler ekstrakte ettikleri flavonoid içeriği bakımından karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı belirlenmiştir ($p > 0.05$). Kontrol grubu çözücülerinden suyun CLa (1:6)'dan daha yüksek flavonoid ekstrakte ettiği gözlenirken, etanol ile en düşük değer elde edilmiştir.

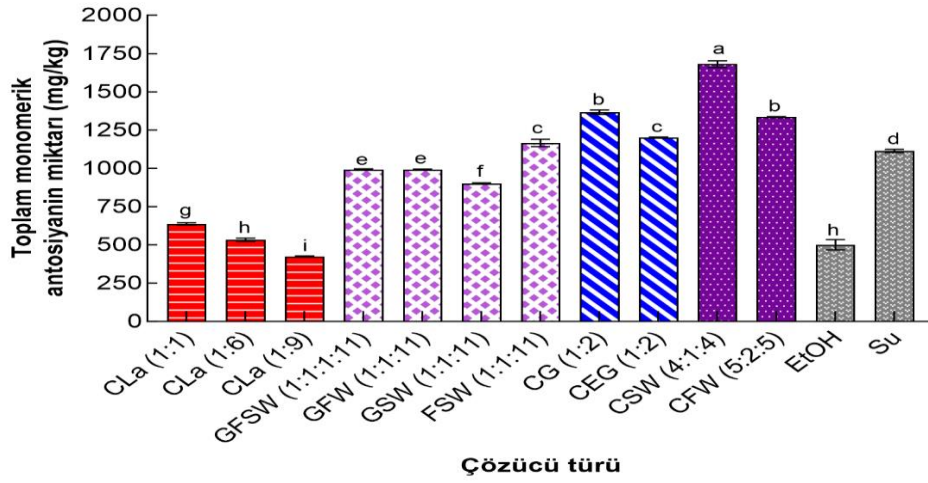


Şekil 4.2 Çözücü türlerinin TF miktarına etkisi

(Kırmızı yatay çizgi: asidik grup, mor dörtgen: şeker grubu, mavi-beyaz eğik çizgili: poliol grubu, mor: kolin klorür şeker grubu, gri desen: kontrol grupları) Farklı harfle belirtilen değerler istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0.05$)

NADES türlerinin TMA miktarına etkisi ise **şekil 4.3**'te verilmiştir. Buna göre TMA ekstraksiyonunda yüksek değerleri sağlayan çözücü grubunun kolin klorür şeker bazlı NADES'ler olduğu belirlenmiştir. CSW (4:1:4) ile elde edilen ekstrede 1680.51 ± 22.21 mg/kg ile en yüksek TMA miktarına ulaşılmıştır ($p < 0.05$).

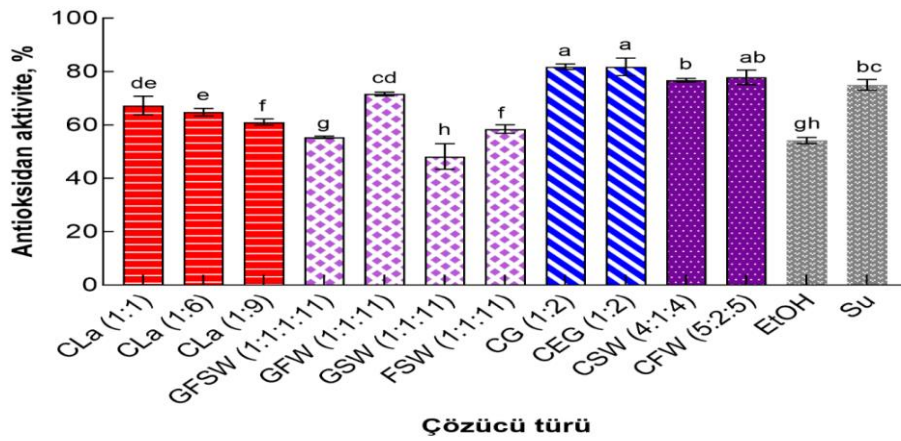
TMA içeriğinin poliol ve şeker içeren NADES'ler kullanıldığında daha yüksek miktarlarda ekstrakte edilebildiği, asidik NADES'ler kullanıldığında ise ekstraksiyonun yeterli olmadığı belirlenmiştir. Ayrıca asidik gruptaki NADES'ler incelendiğinde ise laktik asit mol oranının artmasıyla TMA miktarının azaldığı görülmüştür. Bunun yanı sıra kontrol grubunda bulunan suyun 1114.04 ± 10.14 mg/kg değeri ile antosiyaninleri altıncı sırada ekstrakte ettiği, EtOH'un ise son sırada yer aldığı belirlenmiştir.



Şekil 4.3 Çözücü türlerinin TMA miktarına etkisi

(Kırmızı yatay çizgi: asidik grup, mor dörtgen: şeker grubu, mavi-beyaz eğik çizgili: poliol grubu, mor: kolin klorür şeker grubu, gri desen: kontrol grupları) Farklı harfle belirtilen değerler istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0.05$)

NADES türlerinin AA değerleri üzerine etkisi **şekil 4.4**'te verilmiştir. En yüksek AA değerlerine CG (1:2) ve CEG (1:2) ile sırasıyla $\%81.77 \pm 1.01$ ve $\%81.22 \pm 0.99$ ile ulaşılmıştır ($p > 0.05$). TMA sonuçlarına benzer şekilde asidik grup NADES'lerde laktik asit mol oranının artmasıyla ekstraktlerdeki AA değerlerinin azaldığı belirlenmiştir.



Şekil 4.4 Çözücü türlerinin AA üzerine etkisi

(Kırmızı yatay çizgi: asidik grup, mor dörtgen: şeker grubu, mavi-beyaz eğik çizgili: poliol grubu, mor: kolin klorür şeker grubu, gri desen: kontrol grupları) Farklı harfle belirtilen değerler istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0.05$)

Çizelge 4.1'de ekstrelerin renk yoğunluğu, polimerik renk ve % polimerik renk değerleri verilmiştir. En yüksek renk yoğunluğu değeri asidik gruptan CLa (1:9) kullanıldığında elde edilmiştir. En düşük renk yoğunluğu değerine ise kolin klorür şeker bazlı gruptan CSW (4:1:4) ile ulaşılmıştır. Polimerik renk ve % polimerik renk değerleri incelendiğinde ise en yüksek değer CLa (1:6) ve CLa (1:9) ekstrelerinde elde edilirken en düşük polimerik renk ve polimerik renk oranına kolin klorür şeker bazlı gruptan CFW (5:2:5) ile ulaşılmıştır. Bu durum CFW (5:2:5) ekstresindeki rengin diğer ekstrelere kıyasla daha iyi korunduğunu göstermiştir.

Çizelge 4.1 Çözücü türünün ekstrelerin renk yoğunluğu, polimerik renk ve % polimerik renk değerlerine etkisi

Çözücü	Renk yoğunluğu	Polimerik renk	% Polimerik renk
CLa (1:1)	17.94±0.19 ^c	2.70±0.22 ^b	14.56±0.38 ^{cd}
CLa (1:6)	21.0±0.14 ^b	8.87±0.26 ^a	42.93±0.18 ^a
CLa (1:9)	21.92±0.25 ^a	8.86±0.27 ^a	40.82±0.33 ^b
GFSW (1:1:1:11)	13.93±0.15 ^{ef}	1.85±0.99 ^c	13.79±0.36 ^d
GFW (1:1:11)	14.0±0.24 ^{ef}	0.77±0.05 ^e	5.76±0.72 ^{gh}
GSW (1:1:11)	14.06±0.35 ^{ef}	1.86±0.07 ^c	13.91±0.28 ^d
FSW (1:1:11)	14.49±0.37 ^{de}	1.08±0.11 ^d	7.77±0.19 ^e
CG (1:2)	13.94±0.19 ^{ef}	0.81±0.05 ^e	5.92±0.14 ^g
CEG (1:2)	14.45±0.38 ^{de}	1.03±0.12 ^d	7.05±0.15 ^f
CSW (4:1:4)	7.58±0.37 ^g	1.15±0.07 ^d	15.43±0.4 ^c
CFW (5:2:5)	14.97±0.27 ^d	0.74±0.07 ^e	5.10±0.18 ^h
Su	17.54±0.29 ^c	2.61±0.37 ^b	14.72±0.31 ^{cd}
% 50 EtOH	13.70±0.23 ^f	1.07±0.07 ^d	7.77±0.24 ^e

Aynı sütundaki farklı harfle belirtilen değerler istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0.05$)

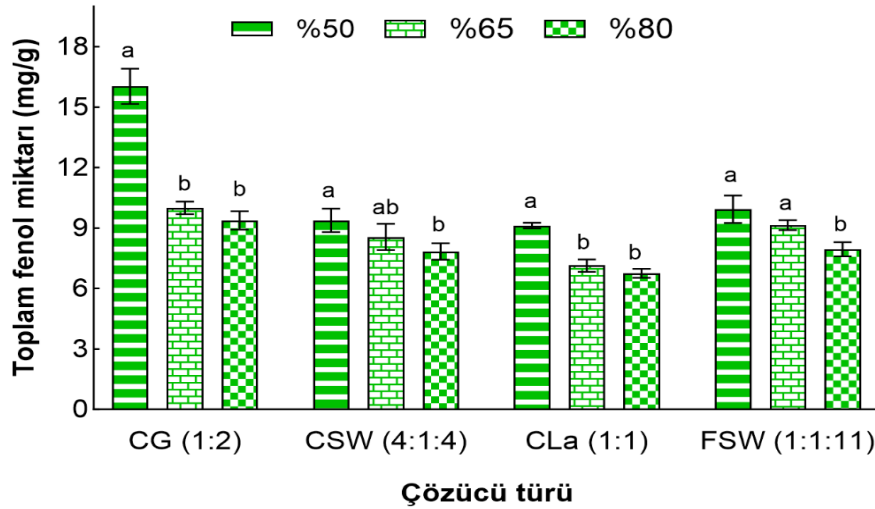
Çalışmada incelenen NADES türlerinin TF, TP, TMA ve AA değerleri üzerine etkileri incelendiğinde her biri için en yüksek değeri sağlayan NADES'in farklı olduğu belirlenmiştir. Ancak siyah havucun antosiyanin içeriği ile öne çıkması sebebi ile NADES seçiminde kriter olarak her bir grup içinde en yüksek TMA miktarını sağlayan NADES seçilmiştir. Buna göre, asidik grubundan CLa (1:1), şeker grubundan FSW (1:1:11), kolin

klorür şeker grubundan CSW (4:1:4) ve poliol grubundan CG (1:2) sonraki deneylerde kullanılmak üzere seçilmiştir.

4.1.2 Yeşil çözücü miktarının etkisi

Her bir gruptan seçilen NADES'lerin TP, TF, TMA ve AA değerleri üzerine etkilerinin incelenmesi için %50, 65 ve 80 NADES içeren çözeltiler hazırlanarak ekstraksiyonlarda kullanılmıştır.

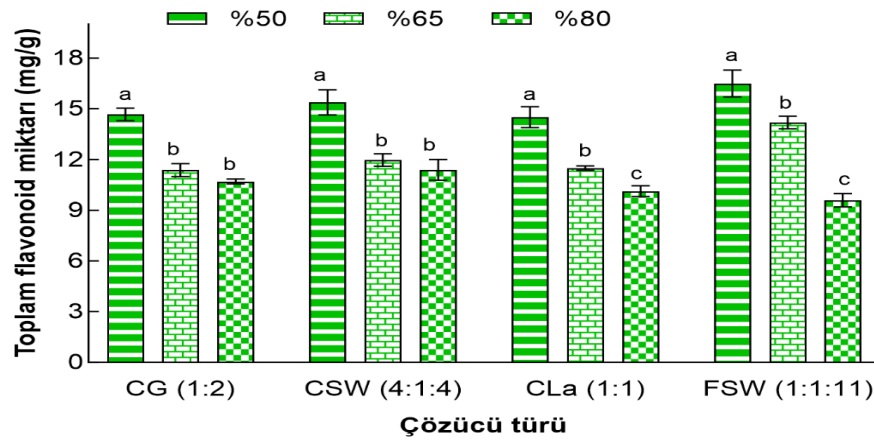
Şekil 4.5'te TP miktarı üzerine çözücü yüzdesinin etkisi verilmiştir. Buna göre, her bir tür için en yüksek TP değerine %50 NADES ortamında ulaşılmış ve NADES miktarı arttıkça TP azalmıştır. CG (1:2) ile elde edilen ekstrede 16.04±0.87 mg/g ile en yüksek TP miktarına ulaşılmıştır ($p<0.05$).



Şekil 4.5 Seçilen NADES türleri ile elde edilen TP miktarı üzerine çözücü yüzdesinin etkisi

Aynı grup içindeki farklı harfle belirtilen değerler istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0.05$)

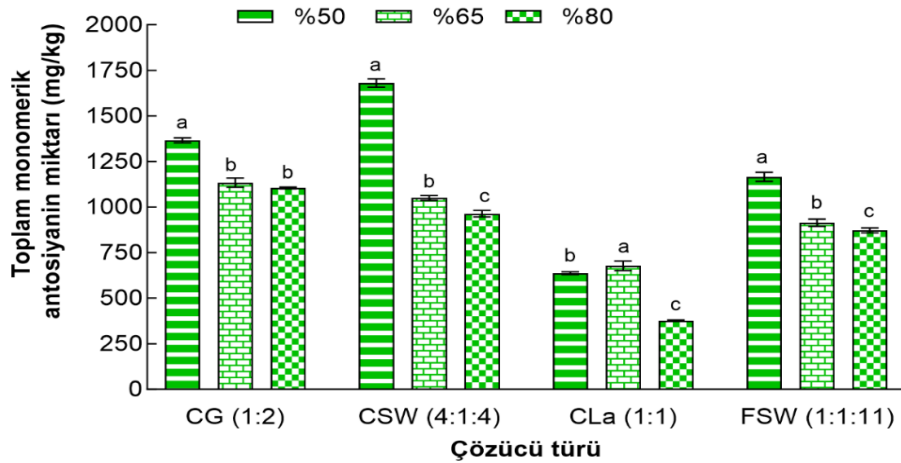
Şekil 4.6'da seçilen NADES türleri ile elde edilen TF miktarı üzerine çözücü yüzdesinin etkisi verilmiştir. Buna göre en yüksek flavonoid içeriğine %50 NADES ortamında 16.49±0.52 mg/g ile FSW (1:1:11) kullanılarak ulaşılmıştır. Her bir NADES grubu için ortamdaki NADES yüzdesi arttıkça flavonoid içeriğinin azaldığı görülmüştür.



Şekil 4.6 Seçilen NADES türleri ile elde edilen TF miktarı üzerine çözücü yüzdesinin etkisi

Aynı grup içindeki farklı harfle belirtilen değerler istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0.05$)

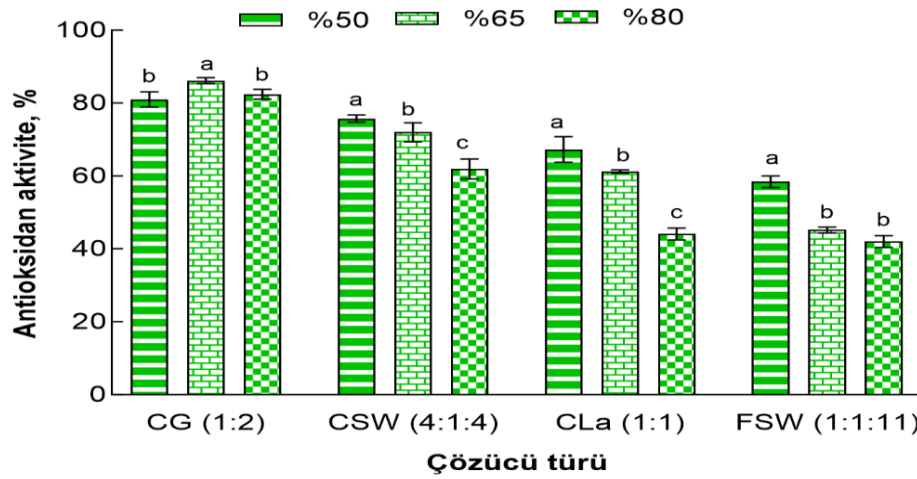
Şekil 4.7’de TMA miktarı üzerine çözücü yüzdesinin etkisi verilmiştir. Buna göre, CLa (1:1) için en yüksek TMA ekstraksiyonunu sağlayan NADES miktarı farklı bulunmuştur. Poliol bazlı CG (1:2), kolin klorür-şeker bazlı CSW (4:1:4) ve şeker bazlı FSW (1:1:11) ile en yüksek TMA değerine %50 NADES ortamında ulaşılırken asidik olan CLa (1:1) ile %65 NADES ortamında ulaşılmıştır.



Şekil 4.7 Seçilen NADES türleri ile elde edilen TMA miktarı üzerine çözücü yüzdesinin etkisi

Aynı grup içindeki farklı harfle belirtilen değerler istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0.05$)

Şekil 4.8'de seçilen NADES türleri ile elde edilen AA değerleri üzerine çözücü yüzdesinin etkisi verilmiştir. Buna göre asidik, şeker bazlı grup ve kolin klorür-şeker grubu ile en yüksek AA değerler, %50 NADES ortamında elde edilirken, poliol grubu ile %65 NADES ortamında elde edilmiştir. En yüksek AA değerleri ise CLa (1:1) ile %67.84±3.50, FSW (1:1:11) ile %58.46±1.59, CG (1:2) ile %86.16±0.79 ve CSW (4:1:4) ile %75.76±1.02 olarak elde edilmiştir.



Şekil 4.8 Seçilen NADES türleri ile elde edilen AA değeri üzerine çözücü yüzdesinin etkisi

Aynı grup içindeki farklı harfle belirtilen değerler istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0.05$)

Çizelge 4.2'de seçilen NADES türleri ile elde edilen renk yoğunluğu, polimerik renk ve % polimerik renk değerleri üzerine çözücü yüzdesinin etkisi verilmiştir. NADES miktarının artması ile renk yoğunluğu değerinin FSW (1:1:11) için azaldığı, CG (1:2) ve CSW (4:1:4) için önce artıp sonra azaldığı, CLa (1:1) için ise önce azalıp sonra arttığı tespit edilmiştir. En yüksek renk yoğunluğuna %50 CLa (1:1) ile en düşük renk yoğunluğuna ise %50 CSW (4:1:4) ile ulaşılmıştır. Ekstrelerin polimerik renk değerleri incelendiğinde NADES miktarının artması ile polimerik rengin CLa ve CG için arttığı, CSW ve FSW için önce arttığı sonra azaldığı saptanmıştır. % Polimerik rengin ise NADES yüzdesi arttıkça CG (1:2), CSW (4:1:4) ve FSW (1:1:11) için önce arttığı sonra azaldığı CLa (1:1) için arttığı belirlenmiştir. En düşük polimerik renk ve % polimerik renk değerine %80 CSW (4:1:4) ve %50 CG (1:2) ile ulaşılırken en yüksek polimerik renk ve % polimerik renk değeri %80 CLa (1:1) ekstrlerinde gözlenmiştir.

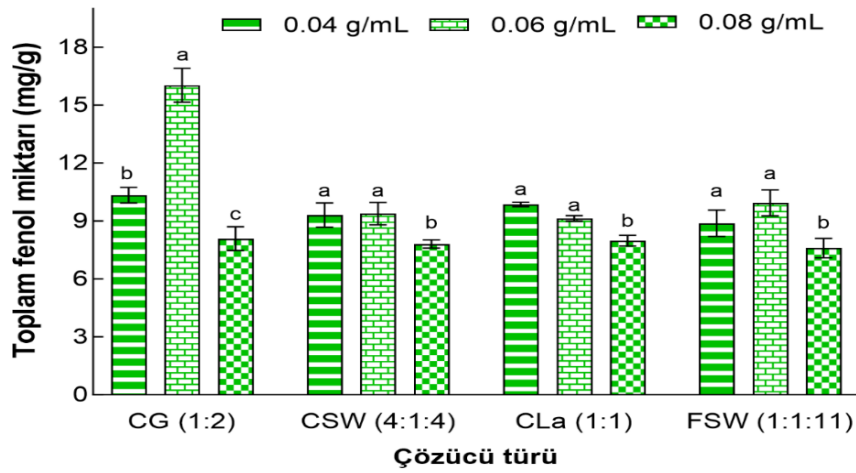
Çizelge 4.2 Seçilen NADES türleri ile elde edilen renk yoğunluğu, polimerik renk ve % polimerik renk değerleri üzerine çözücü yüzdesinin etkisi

NADES Miktarı (%)	Çözücü	Renk yoğunluğu	Polimerik renk	% Polimerik renk
50	CG (1:2)	13.94±0.19 ^d	0.81±0.05 ^g	5.92±0.65 ^h
	CLa (1:1)	17.94±0.19 ^a	2.70±0.22 ^b	14.56±0.58 ^d
	CSW (4:1:4)	7.58 ±0.37 ^f	1.15±0.07 ^{ef}	15.43±0.40 ^d
	FSW (1:1:11)	14.49±0.36 ^{cd}	1.08±0.11 ^{ef}	7.77±0.19 ^g
65	CG (1:2)	14.39±0.30 ^{cd}	1.29±0.12 ^e	12.29±0.38 ^e
	CLa (1:1)	16.73±0.64 ^b	2.91±0.10 ^b	17.44±0.28 ^c
	CSW (4:1:4)	15.29±0.54 ^c	2.98±0.41 ^b	18.21±0.38 ^b
	FSW (1:1:11)	14.10±0.20 ^d	1.65±0.12 ^c	11.90±0.60 ^d
80	CG (1:2)	12.79±0.34 ^e	1.44±0.10 ^d	10.43±0.40 ^f
	CLa (1:1)	18.19±0.38 ^a	3.77±0.40 ^a	20.20±0.31 ^a
	CSW (4:1:4)	7.74±0.12 ^f	0.41±0.13 ^h	6.65±0.45 ^h
	FSW (1:1:11)	12.36±0.50 ^e	1.17±0.14 ^{ef}	8.27±0.61 ^g

Aynı sütundaki farklı harfle belirtilen değerler istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0.05$)

4.1.3 Katı-sıvı oranı etkisi

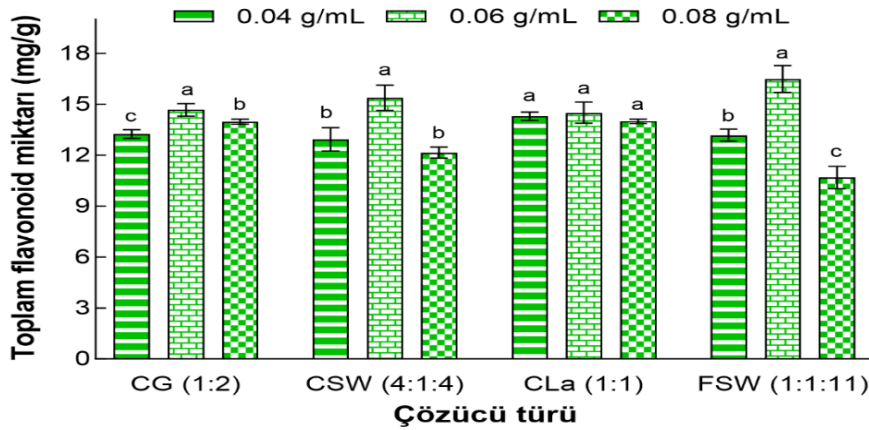
KS oranının ekstraksiyon üzerine etkisi 0.04, 0.06 ve 0.08 g/mL olmak üzere üç farklı değerde (%50 NADES, T=50°C ve t=30 dk) incelenmiştir. KS oranının TP miktarı üzerine etkisi **şekil 4.9**'da verilmiştir. Buna göre en yüksek TP miktarı CG (1:2), CSW (4:1:4) ve FSW (1:1:11) ile 0.06 g/mL KS oranında CLa (1:1) ile ise 0.04 g/mL KS oranında elde edilmiştir. En yüksek TP miktarı 16.04±0.87 mg/g olarak CG ile elde edilmiş ve sonraki yüksek değerlere sırasıyla CLa (1:1), FSW (1:1:11), CSW (4:1:4) kullanılarak ulaşılmıştır.



Şekil 4.9 KS oranının farklı çözücüler ile elde edilen TP miktarına etkisi

Aynı grup içindeki farklı harfle belirtilen değerler istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0.05$)

KS oranının TF miktarı üzerine etkisi **şekil 4.10**'da verilmiştir. Her bir NADES türü için 0.06 g/mL KS oranının en iyi sonucu verdiği belirlenmiştir. En yüksek TF değeri FSW (1:1:11) ile 16.49 ± 0.80 mg/g olarak elde edilmiştir.

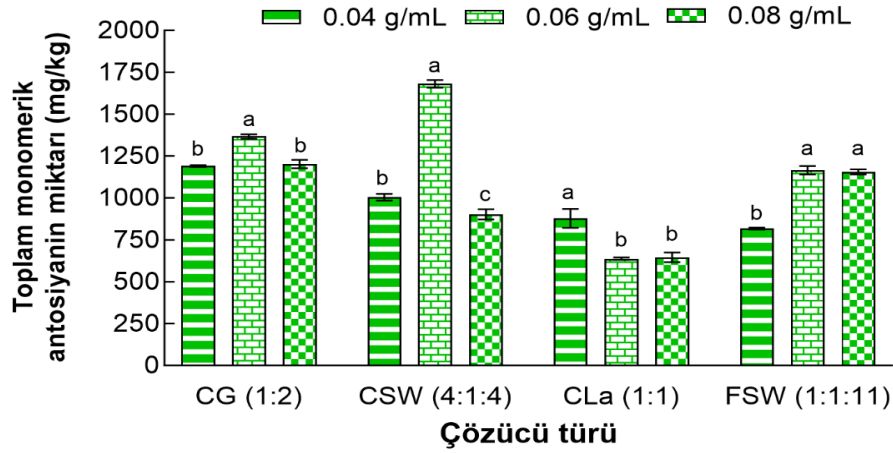


Şekil 4.10 KS oranının farklı çözücüler ile elde edilen TF miktarına etkisi

Aynı grup içindeki farklı harfle belirtilen değerler istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0.05$)

KS oranının TMA miktarı üzerine etkisi **şekil 4.11**'de verilmiştir. En iyi sonucu veren KS oranı CG (1:2), CSW (4:1:4) ve FSW (1:1:11) için 0.06 g/mL, CLa (1:1) için ise 0.04 g/mL olarak bulunmuştur. Bu oranlarda elde edilen TMA değerleri sırasıyla

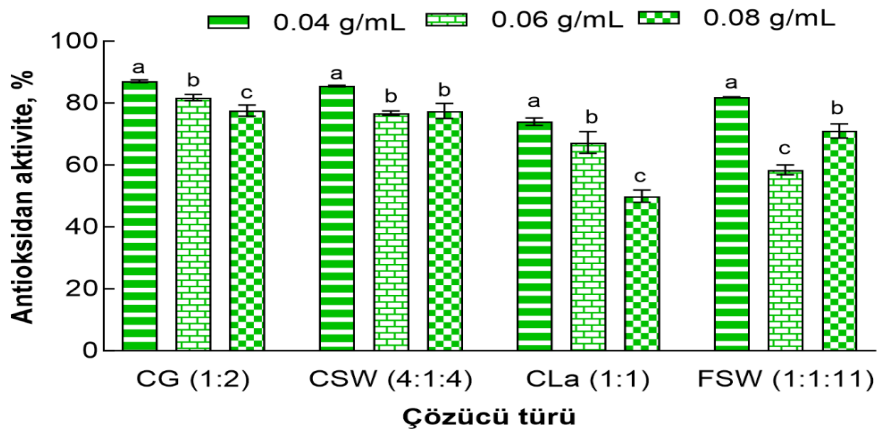
1366.26±14.16 mg/kg, 1680.51±22.21 mg/kg, 1166±24.76 mg/kg, ve 877.69±56.68 mg/kg olarak elde edilmiştir.



Şekil 4.11 KS oranının farklı çözücüler ile elde edilen TMA miktarı üzerine etkisi

Aynı grup içindeki farklı harfle belirtilen değerler istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0.05$)

KS oranının AA değeri üzerine etkisi **şekil 4.12**'de verilmiştir. Buna göre her bir NADES için en yüksek AA değerine 0.04 g/mL KS oranında ulaşılmış ve CG (1:2), CSW (4:1:4), FSW (1:1:11) ve CLa (1:1) çözücüler ile sırasıyla %87.09±0.48, %85.57±0.25, %81.85±0.16 ve %74.01±1.19 AA değerleri elde edilmiştir.



Şekil 4.12 KS oranının farklı çözücüler ile elde edilen AA değeri üzerine etkisi

Aynı grup içindeki farklı harfle belirtilen değerler istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0.05$)

Çizelge 4.3'te KS oranının renk yoğunluğu, polimerik renk ve % polimerik renk değerleri üzerine etkisi verilmiştir. Buna göre FSW (1:1:11), CG (1:2) ve CLa (1:1) için KS oranının artması ile renk yoğunluğunun önce arttığı sonra azaldığı, CSW (4:1:4) için ise önce azaldığı sonra arttığı tespit edilmiştir. En yüksek renk yoğunluğu değeri CLa (1:1) ile KS oranının 0.08 g/mL olduğu koşulda elde edilirken en düşük renk yoğunluğu değerine ise CSW (4:1:4) ile KS oranının 0.06 g/mL olduğu koşulda ulaşılmıştır. Ekstrelerin polimerik renk değerleri incelendiğinde ise NADES miktarının artması ile polimerik rengin CLa (1:1), CG (1:2) ve FSW (1:1:11) çözücüler için önce artıp sonra azaldığı, CSW (4:1:4) için ise önce azalıp sonra arttığı saptanmıştır. % Polimerik rengin ise CG için KS oranının artmasıyla arttığı CLa (1:1), CSW (4:1:4) ve FSW (1:1:11) için ise önce arttığı sonra azaldığı belirlenmiştir. En düşük polimerik renk ve % polimerik renk değeri CLa (1:1) ile KS oranının 0.04 g/mL ve 0.08 g/mL olduğu koşulda elde edilirken en yüksek polimerik renk ve % polimerik renk değeri CLa (1:1) ve CSW (4:1:4) ekstrlerinde 0.06 g/mL olduğu koşulda elde edilmiştir.

Çizelge 4.3 KS oranının farklı çözücüler ile elde edilen renk yoğunluğu, polimerik renk ve %polimerik renk değerlerine etkisi

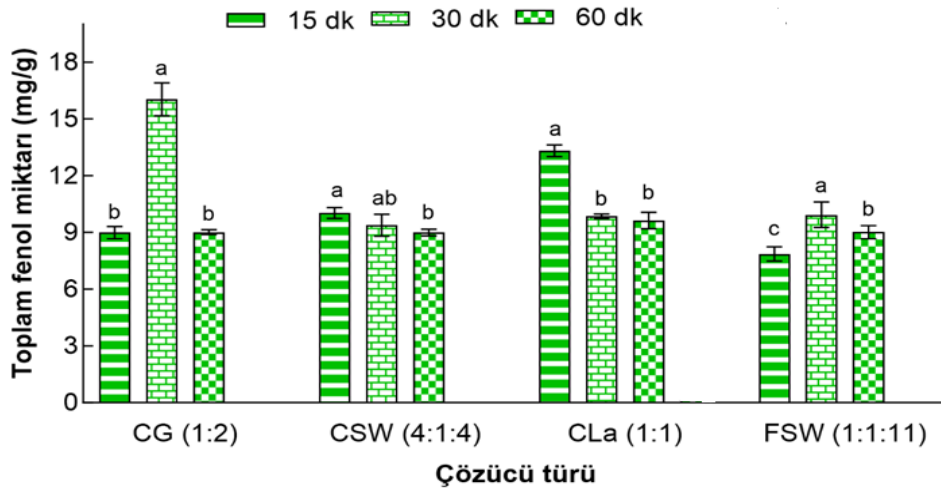
KS oranı (g/mL)	Çözücü	Renk yoğunluğu	Polimerik renk	% Polimerik renk
0.04	CG (1:2)	10.42±0.22 ^h	0.64±0.15 ^{ef}	6.45±0.26 ^d
	CLa (1:1)	12.65±0.48 ^g	0.45±0.14 ^f	4.81±0.54 ^e
	CSW (4:1:4)	9.57±0.22 ⁱ	1.87±0.13 ^b	14.37±0.68 ^a
	FSW (1:1:11)	8.58±0.35 ^j	0.47±0.12 ^f	5.24±0.29 ^e
0.06	CG (1:2)	13.94±0.19 ^f	0.81±0.05 ^{de}	5.92±0.14 ^d
	CLa (1:1)	17.94±0.19 ^c	2.70±0.22 ^a	14.56±0.38 ^a
	CSW (4:1:4)	7.58±0.37 ^k	1.15±0.07 ^c	15.43±0.40 ^a
	FSW (1:1:11)	14.49±0.36 ^f	1.08±0.11 ^{cd}	7.77±0.19 ^c
0.08	CG (1:2)	18.62±0.46 ^b	0.77±0.17 ^{def}	4.56±0.57 ^e
	CLa (1:1)	22.44±0.50 ^a	0.62±0.11 ^e	4.03±1.01 ^e
	CSW (4:1:4)	16.38±0.39 ^d	2.60±0.21 ^a	11.68±0.69 ^b
	FSW (1:1:11)	15.36±0.31 ^e	0.89±0.07 ^d	6.52±0.62 ^d

Aynı sütundaki farklı harfle belirtilen değerler istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0.05$)

Her bir NADES için en yüksek TMA değerini sağlayan KS oranları CG, CSW ve FSW için 0.06 g/mL ve CLa için 0.04 g/mL olarak seçilmiş ve sonraki deneylerde bu oranlar sabit tutulmuştur.

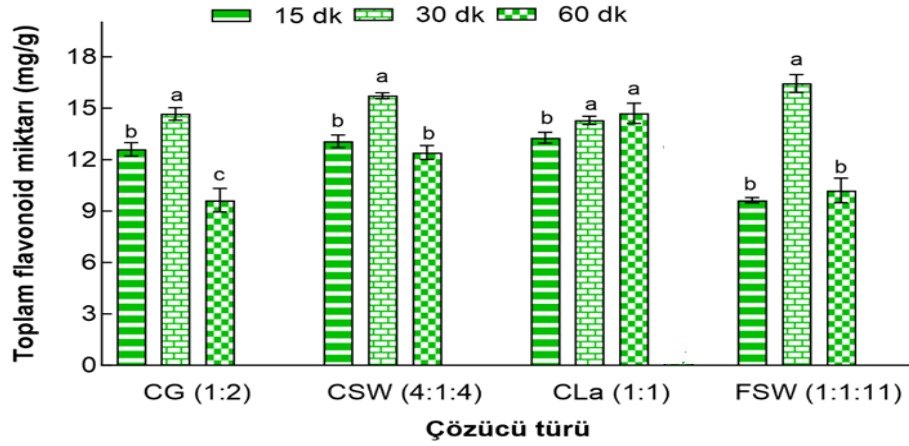
4.1.4 Ekstraksiyon süresinin etkisi

Ekstraksiyon süresinin etkisinin incelenmesi için 15, 30 ve 60 dk boyunca ultrasonik dalga ekstraksiyonu gerçekleştirilmiştir (%50 NADES, T=50°C, KS oranı: CG (1:2), CSW (4:1:4) ve FSW (1:1:11) için 0.06 g/mL, CLa (1:1) için 0.04 g/mL). **Şekil 4.13**'te ekstraksiyon süresinin TP miktarı üzerine etkisi verilmiştir. Buna göre her bir NADES türü için farklı sürelerde en yüksek fenol değerlerinin elde edildiği belirlenmiştir. En yüksek TP miktarı CLa (1:1) ve CSW (4:1:4) ile 15 dk ekstraksiyon süresinde 13.31 ± 0.31 mg/g ve 10.03 ± 0.29 mg/g olarak elde edilirken CG (1:2) ve FSW (1:1:11) ile 30 dk ekstraksiyon süresinde 16.03 ± 0.88 mg/g ve 9.94 ± 0.68 mg/g olarak elde edilmiştir.



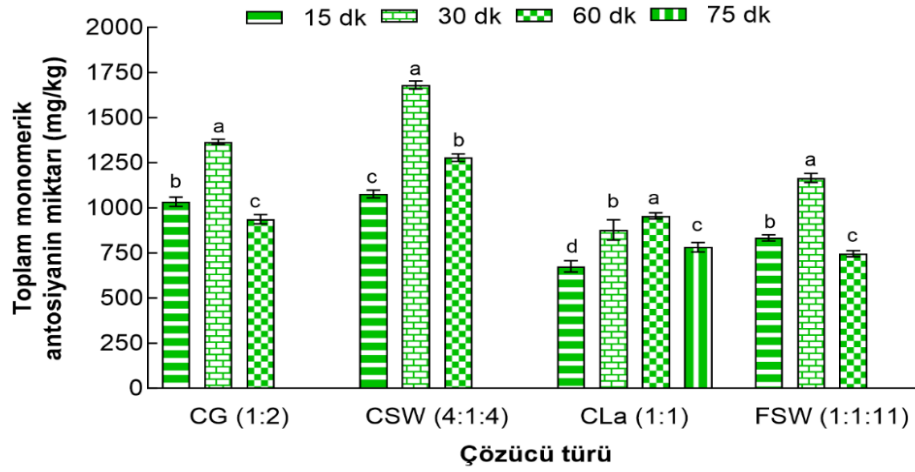
Şekil 4.13 Ekstraksiyon süresinin farklı çözücülerle elde edilen TP miktarı üzerine etkisi
Aynı grup içindeki farklı harfle belirtilen değerler istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0.05$)

Şekil 4.14'te ekstraksiyon süresinin TF miktarı üzerine etkisi verilmiştir. Buna göre tüm çözücüler için en yüksek TF miktarına 30 dk ekstraksiyon süresinde ulaşılmıştır. Bu değerler FSW (1:1:11) için 16.49 ± 0.80 mg/g, CG (1:2) için 14.67 ± 0.36 mg/g, CSW (4:1:4) için 15.73 ± 0.17 mg/g, CLa (1:1) için ise 14.70 ± 0.59 mg/g olarak elde edilmiştir.



Şekil 4.14 Ekstraksiyon süresinin farklı çözücülerle elde edilen TF miktarı üzerine etkisi
Aynı grup içindeki farklı harfle belirtilen değerler istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0.05$)

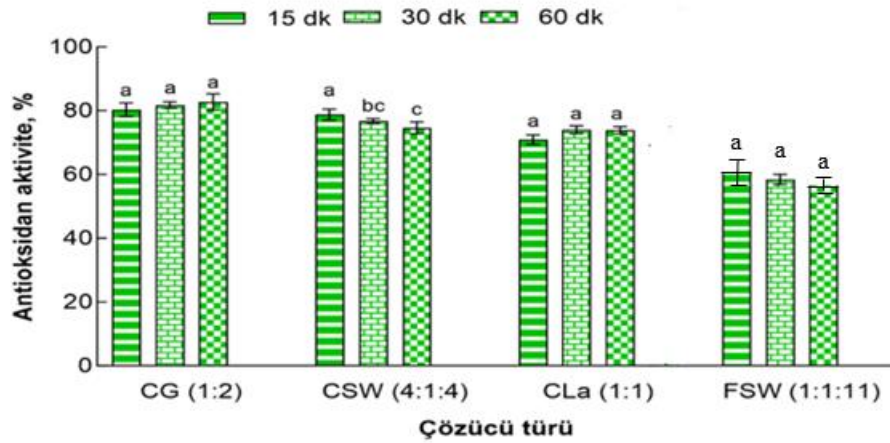
Ekstraksiyon süresinin TMA miktarı üzerine etkisi **şekil 4.15**'te verilmiştir. Bu deney setinde CLa (1:1) için süre arttıkça ekstrakte edilen TMA miktarının artmaya devam ettiği belirlendiği için ek olarak 75 dk boyunca ekstraksiyon gerçekleştirilmiştir. En yüksek TMA değerlerine CLa (1:1) haricindeki NADES'lerle 30 dk ekstraksiyon süresinde CLa (1:1) ile ise 60 dk ekstraksiyon süresinde ulaşılmıştır. Çözücüler arasında en yüksek değer 1680.51 ± 22.21 mg/kg olarak CSW (4:1:4) ile elde edilmiştir.



Şekil 4.15 Ekstraksiyon süresinin farklı çözücülerle elde edilen TMA miktarı üzerine etkisi

Aynı grup içindeki farklı harfle belirtilen değerler istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0.05$)

Ekstraksiyon süresinin AA üzerine etkisi Şekil 4.16’da verilmiştir. Buna göre CG (1:2) CLa (1:1) ve FSW (1:1:11) için ekstraksiyon süresinin AA üzerine önemli bir etkisi olmadığı belirlenmiştir ($p > 0.05$). CSW (4:1:4) için ise ekstraksiyon süresi arttıkça AA değerinin azaldığı belirlenmiştir. NADES’ler arasında en yüksek antioksidan aktivite 82.74 ± 2.56 ile CG (1:2) kullanılarak elde edilmiştir.



Şekil 4.16 Ekstraksiyon süresinin farklı çözücülerle elde edilen AA üzerine etkisi

Aynı grup içindeki farklı harfle belirtilen değerler istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0.05$)

Çizelge 4.4'te ekstraksiyon süresinin renk yoğunluğu, polimerik renk ve % polimerik renk değerleri üzerine etkisi verilmiştir. Buna göre CLa (1:1) ve FSW (1:1:11) ekstrelerinde benzer davranış görülmüş olup ekstraksiyon süresinin artması ile renk yoğunluğu değerinin arttığı saptanmıştır. CSW (4:1:4) için ekstraksiyon süresinin artması ile renk yoğunluğu değeri önce azalmış sonra artmıştır. CG (1:2) için ise renk yoğunluğu değeri üzerinde ekstraksiyon süresinin belirgin bir etkisi görülmemiştir. En yüksek renk yoğunluğu 60 dk ekstraksiyon süresi ile CLa (1:1) ekstresinde, en düşük değer ise 30 dk ile CSW (4:1:4) ekstresinde saptanmıştır. Ekstrelerin polimerik renk ve % polimerik renk değerleri incelendiğinde ekstraksiyon süresinin artması ile değerlerin CG (1:2), CSW (4:1:4) ve FSW (1:1:11) için önce azalıp sonra arttığı CLa (1:1) için ise önce artıp sonra azaldığı gözlenmiştir. En düşük polimerik renk ve % polimerik renk değerine 15 dk ekstraksiyon süresinde CLa (1:1) ile ulaşılmış en yüksek polimerik renk ve % polimerik renk değeri 60 dk ile CSW (4:1:4) ekstresinde belirlenmiştir.

Çizelge 4.4 Ekstraksiyon süresinin farklı çözücülerle elde edilen renk yoğunluğu, polimerik renk ve %polimerik renk değerleri üzerine etkisi

Ekstraksiyon süresi (dk)	Çözücü	Renk yoğunluğu	Polimerik renk	% Polimerik renk
15	CG (1:2)	13.96±0.92 ^c	1.36±0.15 ^{cde}	9.40±0.09 ^{fg}
	CLa (1:1)	14.71±1.08 ^{bc}	0.99±0.12 ^{fg}	6.90±0.12 ⁱ
	CSW (4:1:4)	12.58±0.64 ^d	2.07±0.17 ^b	16.41±0.52 ^b
	FSW (1:1:11)	11.94±0.92 ^d	1.20±0.17 ^{def}	9.71±0.16 ^{ef}
30	CG (1:2)	13.94±0.19 ^c	0.81±0.05 ^g	5.92±0.14 ^j
	CLa (1:1)	17.94±0.19 ^a	2.70±0.22 ^a	15.43±0.40 ^d
	CSW (4:1:4)	7.58±0.37 ^e	1.15±0.07 ^{ef}	14.56±0.38 ^c
	FSW (1:1:11)	14.49±0.36 ^c	1.08±0.11 ^e	7.77±0.19 ^h
60	CG (1:2)	13.03±0.89 ^{cd}	1.20±0.10 ^{def}	9.22±0.18 ^{fg}
	CLa (1:1)	16.06±0.74 ^b	1.63±0.14 ^c	10.48±0.58 ^e
	CSW (4:1:4)	14.15±0.73 ^c	2.39±0.10 ^a	17.58±0.57 ^a
	FSW (1:1:11)	16.57±1.06 ^{ab}	1.42±0.13 ^{cd}	8.65±0.59 ^g

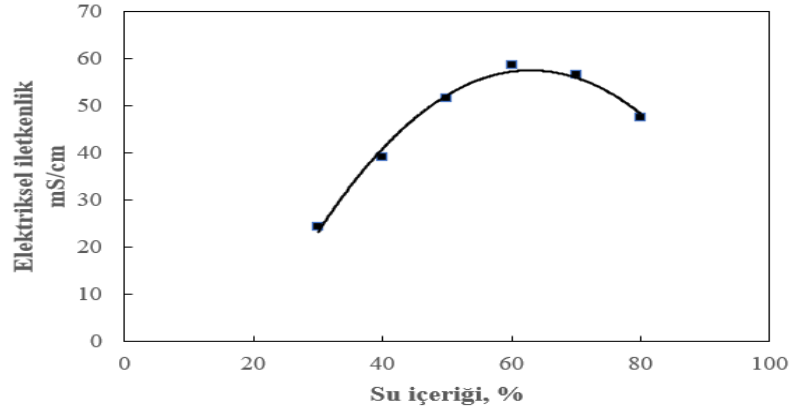
Aynı sütundaki farklı harfle belirtilen değerler istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0.05$)

4.1.5 Deneysel tasarım ve optimizasyon

Şalgam suyu tesisi atığı olan fermente siyah havuçtan farklı NADES türleri kullanılarak gerçekleştirilen ekstraksiyonlarda NADES miktarı, KS oranı ve süre parametrelerinin etkileri tek seferde tek parametre stratejisi ile belirlenmiştir. Ancak incelenen parametrelerin ikili ve üçlü etkileşimleri de oldukça önemlidir ve tek seferde inceleme sonuçlarından daha farklı sonuçlar elde edilebilmektedir. Bu çalışmada şalgam suyunda en çok bulunan biyoaktif bileşen türü olması nedeniyle optimizasyon için cevap olarak TMA miktarı seçilmiş ve ekstraksiyon çözücüsü olarak TMA için en yüksek değeri sağlayan CSW (4:1:4) kullanılmıştır. Bağımsız değişkenler % NADES miktarı, KS oranı ve ekstraksiyon süresi olarak seçilmiştir.

Deneysel tasarımda yer alan bağımsız değişkenlerden %NADES, en düşük seviye değeri açısından kritik bir öneme sahiptir. Çözücü miktarı azaldıkça ötektik bağların bozulma riski ortaya çıkmaktadır. Bu bozulmanın gerçekleştiği spesifik değer farklı su içeriklerindeki karışımların elektriksel iletkenlik değerlerinin ölçülmesi ile belirlenebilmektedir. Eklenen su içeriğiyle elektriksel iletkenlik artmakta, ancak bir noktadan sonra azalma görülmektedir. Bu değişimin başladığı nokta ötektik yapının bozulduğu noktadır ve su içeriğinin en fazla bu değere kadar artırılması gerekmektedir (Ünlü vd. 2019).

Bu nedenle optimizasyonda kullanılacak NADES olan CSW (4:1:4)'ye farklı miktarlarda saf su ilave edilerek elektriksel iletkenliğinin değişimi incelenmiş ve **şekil 4.17**'de sunulmuştur. Buna göre %62.95 su içeriği değerine kadar elektriksel iletkenliğin artmaya devam ettiği, bu noktadan sonra azalmaya başladığı görülmüştür. Dolayısıyla MKT'de yer alan %NADES miktarının en küçük değeri bu kritik nokta aşılmayacak şekilde belirlenmiştir.



Şekil 4.17 Eklenen su miktarı ile CSW (4:1:4)'nin elektriksel iletkenlik değişimi

Deneysel tasarım ile optimizasyon için MKT kullanılarak elde edilen 20 farklı deney seti ve bu koşullarda elde edilen TMA miktarları **çizelge 4.5**'te verilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre TMA değerleri 822.92 ile 1736.68 mg/kg arasında değişmiştir.

Çizelge 4.5 Deneysel tasarımda kullanılan faktör seviyeleri ve yanıtları

Deney	Faktör 1 A:NADES (%)	Faktör 2 B: KS (g/mL)	Faktör 3 C:Süre (dk)	Yanıt TMA (mg/kg)
1	80.00	0.03	25.00	1237.94
2	65.00	0.05	42.50	1245.07
3	80.00	0.03	60.00	899.51
4	80.00	0.08	25.00	1435.27
5	65.00	0.05	42.50	1282.47
6	65.00	0.05	13.07	1148.88
7	65.00	0.10	42.50	1295.50
8	50.00	0.08	25.00	1292.49
9	90.23	0.05	42.50	822.92
10	65.00	0.05	42.50	1341.25
11	65.00	0.05	42.50	1613.78
12	65.00	0.05	42.50	1522.94
13	39.77	0.05	42.50	1378.66
14	65.00	0.01	42.50	1736.68
15	65.00	0.05	42.50	1592.41
16	50.00	0.03	60.00	1496.22
17	80.00	0.08	60.00	911.76
18	50.00	0.03	25.00	1514.03
19	65.00	0.05	71.93	1416.07
20	50.00	0.08	60.00	1282.47

Elde edilen veriler ile oluşturulan model ve model parametrelerinin varyans analizi (ANOVA) sonuçları **çizelge 4.6**'da verilmiştir. Buna göre en uygun modelin indirgenmiş kübik model olduğu belirlenmiştir. Model F değerinin (94.46) oldukça büyük ve model p değerinin 0.001'den küçük olması önerilen modelin anlamlı olduğunu göstermektedir. Modelin tahmini regresyon katsayısı (R_{tah}^2) ve düzeltilmiş regresyon katsayısı ($R_{düz}^2$) değerleri 0.8661 ve 0.9833 olarak bulunmuştur. Bu değerlerin birbirine ve de 1'e yakın olması tahmini ve deneysel değerlerin arasında yüksek bir uyumun olduğunu göstermektedir. Yeterli kesinlik (YK) değeri 36.641 olarak bu lunmuş ve bu değerin 4'ten büyük olması, TMA değerinin tahmin edilmesi için modelin kullanılabileceğini doğrulamaktadır. Ayrıca düşük varyasyon katsayısı (%2.27) deneysel sonuçların güvenilirliğini ve kesinliğini göstermektedir.

Modelde yer alan tüm lineer (A, B ve C) ve ikinci dereceden parametrelerin (A^2 , C^2) istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir ($p < 0.05$). Bunun yanı sıra terimlerin etkileşimleri de (AB, AC, BC, A^2B , A^2C) önemli bulunmuştur ($p < 0.05$).

Çizelge 4.6 MKT ile elde edilen üçüncü dereceden polinom modelinin varyans analiz sonuçları

Kaynak	KT	SD	KTO	F-değeri	p-değeri	
Model	1.047E+006	12	87225.23	94.46	<0.0001	Önemli
A-DES%	3.308E+005	1	3.308E+0.05	358.28	<0.0001	
B-KS	97326.07	1	97326.07	105.40	<0.0001	
C-t	35691.77	1	35691.77	38.65	0.0004	
AB	51961.32	1	51961.32	56.27	0.0001	
AC	86734.19	1	86734.19	93.93	<0.0001	
BC	8942.48	1	8942.48	9.68	0.0170	
A^2	2.664E+0.05	1	2.664E+0.05	288.48	<0.0001	
B^2	1704.65	1	1704.65	1.85	0.2164	
C^2	74127.41	1	74127.41	80.28	<0.0001	
ABC	1344.14	1	1344.14	1.46	0.2668	
A^2B	35219.23	1	35219.23	38.14	0.0005	
A^2C	1.205E+0.05	1	1.205E+0.05	130.47	<0.0001	
Kalıntı	6463.55	7	923.36			

Çizelge 4.6 MKT ile elde edilen üçüncü dereceden polinom modelinin varyans analiz sonuçları (devam)

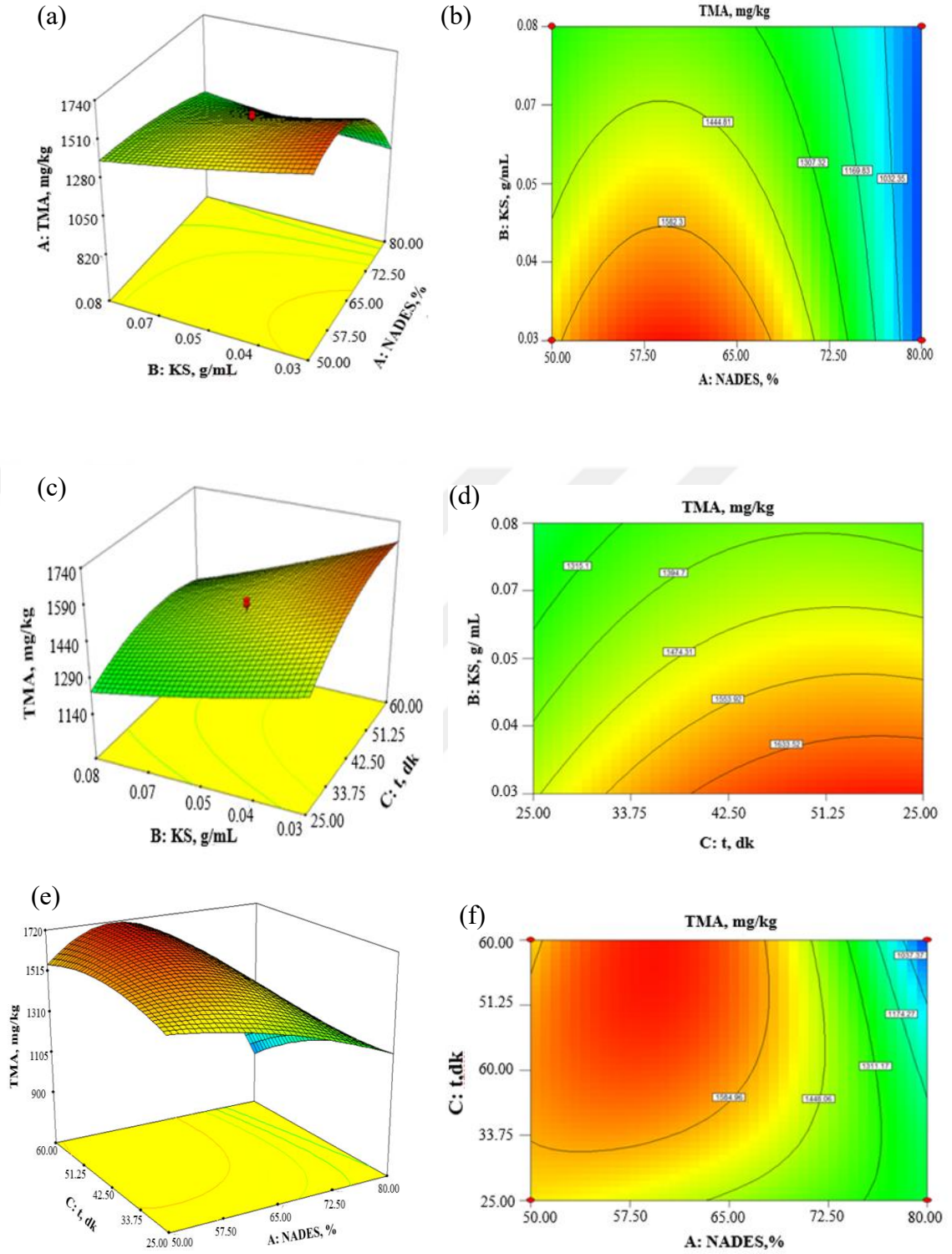
Uyum eksikliği	2084.97	2	1042.48	1.19	0.3777	Önemsiz
Saf hata	4378.58	5	875.72			
Toplam	1.053E+006	19				
Std sapma=30.39						
C.V%=2.27						
$R^2=0.9939$						
$R_{düz}^2=0.9833$						
$R_{tah}^2=0.8661$						
YK= 36.641						
KT: Kareler toplamı, SD: Serbestlik derecesi, KTO: Kareler toplamının ortalaması						

TMA miktarı için yapılan tasarım sonucu oluşturulan üçüncü dereceden polinom denklem kodlanmış değişkenler (**Eşitlik 4.1**) ve gerçek değişkenler (**Eşitlik 4.2**) cinsinden aşağıda verilmiştir.

$$TMA = 1474.39 - 155.64 * A - 131.17 * B + 79.43 * C + 80.59 * A * B - 104.12 * A * C - 33.43 * B * C - 135.95 * A^2 + 10.88 * B^2 - 71.72 * C^2 - 12.96 * A * B * C + 103.09 * A^2 * B - 190.67 * A^2 * C \quad (4.1)$$

$$TMA = +3945.70553 - 83.05483 * DES\% + 49408.34526 * R - 156.84167 * t - 1894.32217 * DES\% * R + 5.99266 * DES\% * t + 47.24303 * R * t + 0.57903 * DES\%^2 + 14381.39702 * R^2 - 0.23419 * t^2 - 1.79562 * DES\% * R * t + 16.66163 * DES\%^2 * R - 0.048424 * DES\%^2 * t \quad (4.2)$$

Şalgam suyu tesisi atığından ekstrakte edilen TMA miktarının % NADES, KS oranı ve ekstraksiyon süresine göre değişimini gösteren üç boyutlu yanıt yüzey grafikleri ve eşyükselti eğrileri **şekil 4.18**'de gösterilmiştir.



Şekil 4.18 Deneysel tasarım sonucu elde edilen YY grafikleri ve eşyüksekti eğrileri(a) ve (b) KS ve %NADES miktarı ile değişimi ($t=60$ dk) (c) ve (d) KS ve t ile değişimi (%NADES= 58.50) (e) ve (f) t ve %NADES ile değişimi (KS oranı=0.03 g/mL)

Şekil 4.18.a, b'de %NADES ve KS oranının TMA miktarı üzerine etkisi görülmektedir. Buna göre KS oranının büyük değerlerinde (0.07-0.08 g/mL arası) %NADES arttıkça TMA'da hafif bir azalma görülmüştür. KS oranının küçük değerlerinde ise (0.03-0.04 g/mL arası) NADES miktarı arttıkça TMA önce artmış, sonra azalmıştır. %NADES miktarının düşük olduğu aralıkta (%50-55) TMA değeri KS oranı arttıkça azalmış, %NADES miktarının yüksek olduğu aralıkta ise (%75-80) tam tersi bir değişim olduğu belirlenmiştir. En yüksek TMA değerlerine düşük %NADES ve düşük KS oranı değerlerinde ulaşıldığı belirlenmiştir.

Şekil 4.18.c, d'de verilen grafiklerde süre ve KS oranının TMA miktarı üzerine etkisi incelendiğinde düşük ekstraksiyon sürelerinde (25-40 dk) KS oranı azaldıkça TMA'da hafif bir artış gözlenirken daha uzun ekstraksiyon sürelerinde (40-60 dk) TMA'nın oldukça yüksek bir eğimle arttığı gözlenmiştir. KS oranının yüksek değerlerinde TMA miktarının ekstraksiyon süresiyle hafif bir artma ve azalma sergilediği, düşük değerlerinde ise ekstraksiyon süresiyle artış gösterdiği belirlenmiştir.

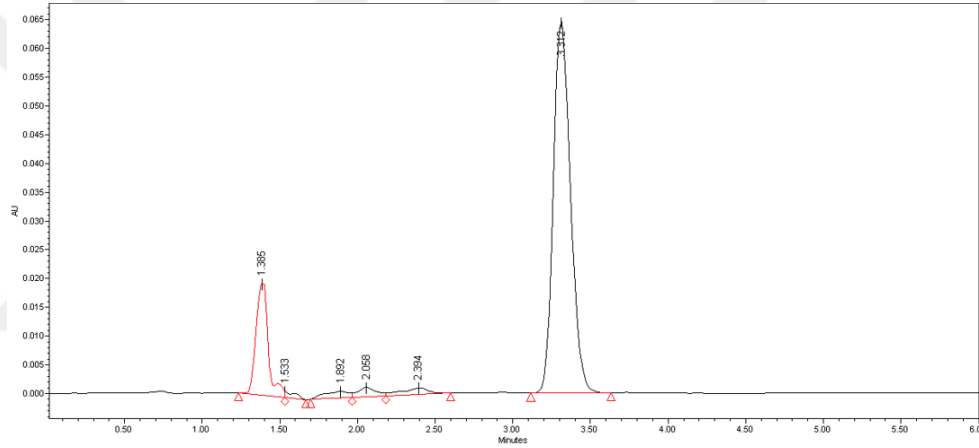
Şekil 4.18.e, f'de ise NADES miktarı ve sürenin TMA miktarı üzerine etkisi verilmiştir. Buna göre % NADES miktarının düşük olduğu aralıkta (%50-55) süre arttıkça TMA artmış ve son noktada artışta hafif bir azalma olmuştur. %NADES'in yüksek değerlerinde ise (%70-80) süre arttıkça TMA miktarında şiddetli bir azalma olduğu görülmüştür. Ekstraksiyon süresi 60 dk civarında NADES miktarı azaldıkça TMA'da yüksek artış ve sonra azalma olduğu belirlenmiştir. Daha kısa ekstraksiyon sürelerinde (25-30 dk) önemli bir değişim gözlenmemiştir.

YYY grafiklerinin incelenmesinin ardından TMA değerinin optimize edilmesi amaçlanmıştır. Buna göre cevabın maksimize edilmesi için program tarafından optimum koşullar ekstraksiyon süresi 60.25 dk KS oranı 0.02 g/mL ve NADES miktarı %59.07 olarak belirlenmiş ve bu koşullar altında TMA miktarı 1788.99 mg/kg olarak öngörülmüştür. Deneyler optimum koşullar altında 4 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiş ve TMA değeri 1776.76 ± 8.65 mg/kg olarak bulunmuştur. Buna göre, öngörülen ve bulunan TMA miktarı birbirine oldukça yakın bulunmuştur (%0.683). Bu koşullar altında ekstrenin TP değeri 10 mg/g, TF değeri 16.30 mg/g, AA değeri %69, renk yoğunluğu

4.38, polimerik renk 0.70 ve % polimerik renk 17.99 olarak bulunmuştur. Buna göre TP ve TF'nin arttığı, AA'nın sabit kaldığı, renk yoğunluğunun azaldığı, polimerik renk ve % polimerik renk değerlerinin arttığı belirlenmiştir.

4.1.6 Antosiyaninlerin HPLC analizi

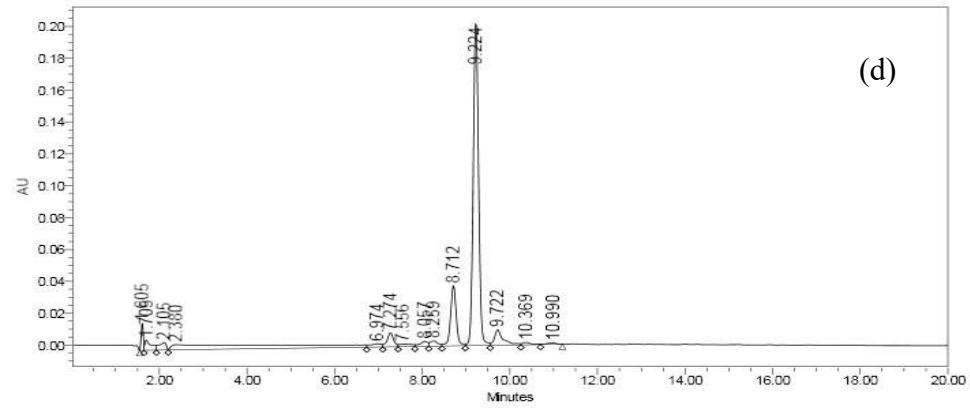
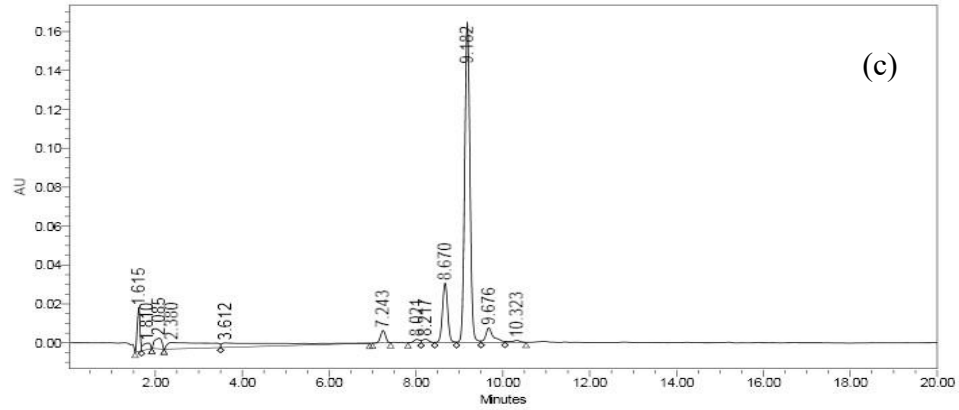
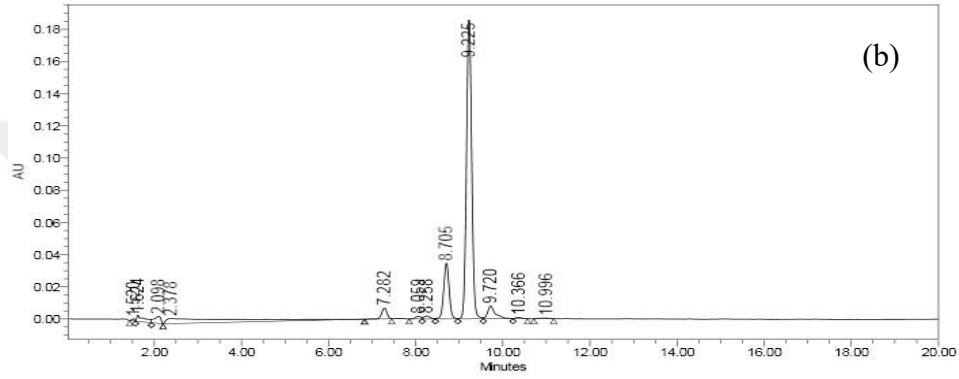
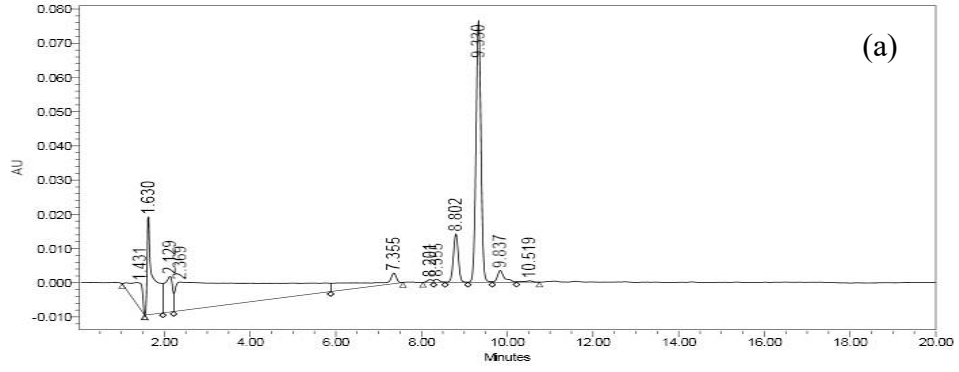
Şalgam suyu atığı ekstresinin monomerik antosiyaninlerinin HPLC analizi için standart olarak siyanidin-3-glukozit kullanılmış ve örnek bir kromatogramı **şekil 4.19**'da verilmiştir. Kalibrasyon için farklı derişimler kullanılarak hazırlanan çözeltilerin de kromatogramları elde edilmiştir.



Şekil 4.19 Siyanidin-3 glükozit standardına ait örnek HPLC kromatogramı

Ekstre analizinde standart için kullanılan elüsyon programı ile herhangi bir pik gözlenememiştir. Bu nedenle literatürde yer alan farklı çözücü ve bileşimleri içeren gradyen programlar denenerek en iyi kromatogramın elde edildiği elüsyon programının kullanılmasına karar verilmiştir.

Optimum koşullarda elde edilen CSW (4:1:4) ekstresi ve ayrıca monomerik antosiyanin içeriği bakımından en iyi olarak belirlenen FSW (1:1:11), CG (1:2), CLa (1:1) ekstrelerinin kromatogramları **şekil 4.20**'de verilmiştir. Her bir ekstrenin antosiyanin profili benzerlik göstermesine rağmen çözücü türüne göre piklerin absorbans değerlerinin büyük ölçüde farklılık gösterdiği belirlenmiştir.



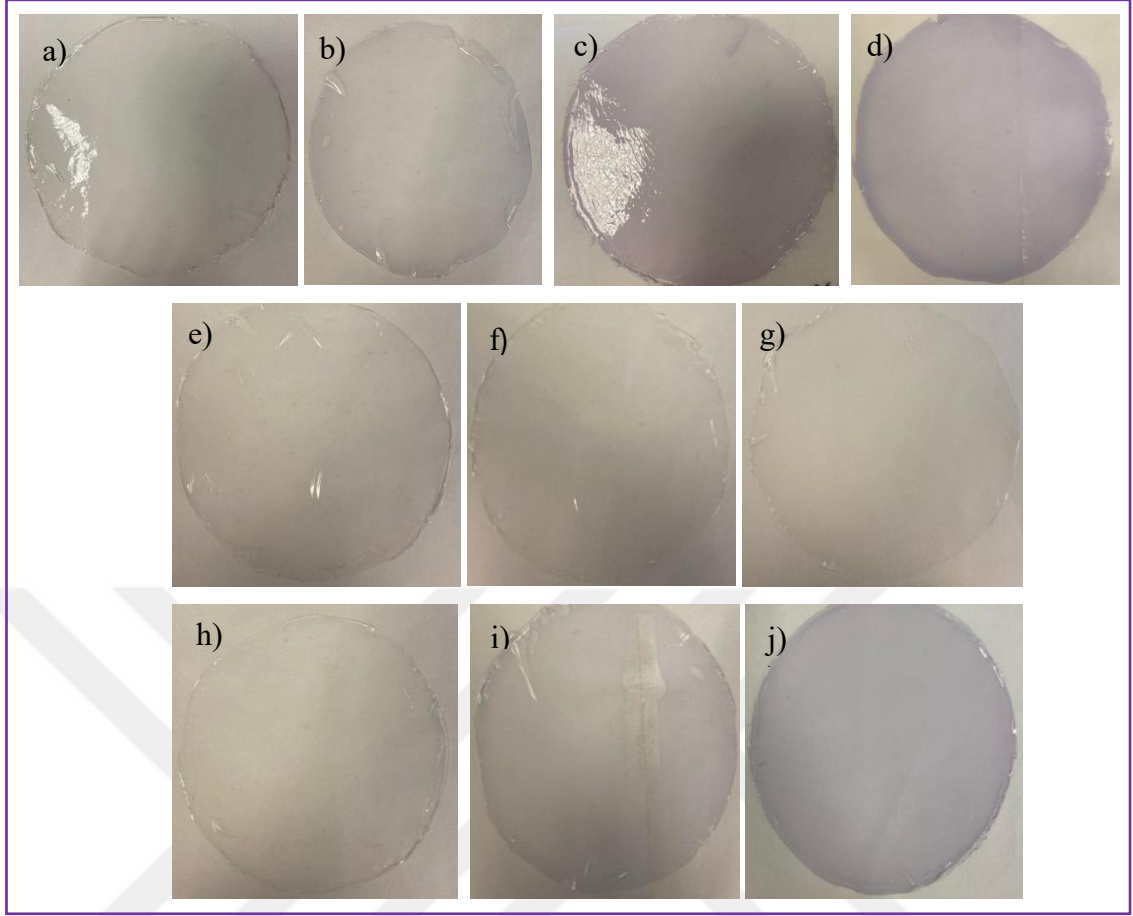
Şekil 4.20 Ekstrelerin HPLC kromatogramları FSW (1:1:11) (a), CSW (4:1:4) (b), CLa (1:1) (c), CG (1:2) (d)

Ancak seçilen elüsyon programı kullanıldığında siyanidin-3-glukozitin kromatogramda pik vermediği belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, ekstredeki antosiyanine ait pikler yalnızca gradyen programda belirlenirken standarda ait pikler ise yalnızca izokratik koşulda belirlenebilmiştir. Bu nedenle ekstre ve standarta ait pikler aynı koşulda tanımlanamadığından antosiyanin miktarı HPLC analizi ile tespit edilememiştir.

4.2 Yenilebilir Filmlerin Özellikleri

Şalgam suyu atığından TMA içeriği açısından optimize edilmiş koşullar altında elde edilen ekstrenin bir uygulamada kullanılması amacıyla yenilebilir film sentezleri gerçekleştirilmiş ve ekstrelerin film özellikleri üzerine etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla ekstre iki farklı strateji ile film yapısına katılmıştır. Uygulanan iki farklı stratejinin birinde ekstre film yapısına son basamakta katkı maddesi olarak eklenmiş, diğerinde ise sentez aşamasında plastikleştirici olarak gliserol içine eklenerek yapıya katılmıştır.

Ekstrenin katkı maddesi olarak kullanıldığı deneylerde ekstre %3, 6, 10, 16 ve 25 oranlarında filme eklenmiş ve kontrol olarak ekstre eklenmeyen film kullanılmıştır. Ekstrenin yapıya katıldığı filmlerde ise gliserolün %5, 10, 20 ve 30'u oranında ekstre filme eklenmiş ve kontrol olarak her bir ekstrenin çözücüsü aynı oranda filme eklenmiştir. Hazırlanan filmlerin ayrıntılı içerikleri **çizelge 3.6**'da fotoğrafları ise **şekil 4.21**'de verilmiştir. Görüntüler incelendiğinde filmlerde ekstre miktarının artması ile film rengin koyulaştığı ve ayrıca kontrol filmlerine göre ekstre eklenmiş olan filmlerin daha koyu renkte olduğu belirlenmiştir (**Şekil 4.21, a-d, h-j**). Ancak hazırlanan filmler arasında E16, E25 ve YK30 isimli filmler bütünlüğü bozulmadan petriden çıkartılamadığından analizleri gerçekleştirilememiştir.



Şekil 4.21 Hazırlanan yenilebilir filmlerin görüntüleri K (a), E3 (b), E6 (c), E10 (d), YK5 (e), YK10 (f), YK20 (g), YE5 (h), YE10 (i), YE20 (j)

4.2.1 Kalınlık, nem içeriği

Ekstrenin katkı maddesi olarak kullanıldığı filmlerde kalınlık değerlerinin 0.17 mm ile 0.24 mm arasında değişiklik gösterdiği belirlenmiştir (**Çizelge 4.7**). Ekstre toplam hacim üzerine eklendiğinden filmlerin kalınlığında artışa neden olmuştur. Ekstrenin eklenmesiyle film çözeltinin hacmindeki artışa bağlı olarak kalınlığın artması beklenen bir sonuçtur. Ekstrenin yapıya katıldığı filmler toplam hacim değişmeyecek şekilde hazırlandığından tüm filmlerin kalınlık değeri 0.17 ± 0.01 mm olarak bulunmuştur (**Çizelge 4.8**).

Ekstrenin katkı maddesi olarak kullanıldığı ve ekstrenin yapıya katıldığı filmlerin nem içerikleri sırasıyla **çizelge 4.7**'de ve **çizelge 4.8**'de verilmiştir. Ekstrenin katkı maddesi olarak ilave edildiği filmlerde nem içeriği %21.82-28.35 aralığında değişmiş ve kontrol

filmine kıyasla E3, E6 ve E10 filmlerin nem içeriğinin azaldığı görülmüştür ($p<0.05$). Ayrıca ekstre miktarının artması ile nem içeriği değerlerinin azaldığı belirlenmiştir. Ekstrenin yapıya katıldığı filmlerin nem içeriği değerleri ise %21.67-26.63 arasında değişmiştir. YE5, YE10 ve YE20 filmlerin nem içerikleri kıyaslandığında ekstre miktarı arttıkça filmlerin nem içeriklerinin azaldığı belirlenmiştir ($p<0.05$). Kontrol filmlerinin nem içeriklerindeki değişimin istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlenmiştir ($p>0.05$).

Çizelge 4.7 Ekstrenin katkı maddesi olarak kullanıldığı filmlerin kalınlık ve nem içeriği değerleri

Örnek	Kalınlık (mm)	Nem içeriği (%)
K	0.17 ± 0.01^c	28.35 ± 1.23^a
E3	0.18 ± 0.01^c	25.56 ± 1.07^{ab}
E6	0.21 ± 0.01^b	23.77 ± 1.95^b
E10	0.24 ± 0.01^a	21.83 ± 2.21^b

Aynı sütundaki farklı harfle belirtilen değerler istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0.05$)

Çizelge 4.8 Ekstrenin yapıya katıldığı filmlerin kalınlık ve nem içeriği değerleri

Örnek	Kalınlık (mm)	Nem içeriği (%)
YK5	0.17 ± 0.01^a	26.67 ± 1.53^a
YE5	0.17 ± 0.01^a	25.97 ± 0.71^a
YK10	0.17 ± 0.01^a	26.27 ± 1.25^{ab}
YE10	0.17 ± 0.01^a	24.30 ± 0.62^b
YK20	0.17 ± 0.01^a	24.13 ± 0.90^{abc}
YE20	0.17 ± 0.01^a	21.63 ± 1.60^c

Aynı sütundaki farklı harfle belirtilen değerler istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0.05$)

4.2.2 Geçirgenlik ve şeffaflık

Hazırlanan yenilebilir filmlerin UV (356 nm) ve görünür (600 nm) bölgelerdeki geçirgenlik ve şeffaflık değerleri sırasıyla **çizelge 4.9** ve **çizelge 4.10**'da verilmiştir. Buna göre ekstrenin katkı maddesi olarak kullanıldığı filmlerde en yüksek geçirgenlik 356 nm ve 600 nm'de 91.7 ± 0.3 ve 93.3 ± 0.5 değerleri ile kontrol filminde görülmüştür. Filmlere eklenen ekstre miktarı ile geçirgenlik değeri azalmıştır ($p<0.05$). En düşük

geçirgenlik değerine E10 filminde ulaşılmış, 356 ve 600 nm’de sırasıyla %85.0±0.3 ve %87.0±0.3 olarak bulunmuştur ($p<0.05$). Ekstrenin yapıya katıldığı filmlerde de benzer şekilde ekstre miktarı arttıkça filmlerin 356 ve 600 nm’deki geçirgenlik değerlerinin azaldığı tespit edilmiştir ($p<0.05$). En düşük geçirgenlik değeri YE20 filminde saptanmış, 356 ve 600 nm’de sırasıyla 87.1±0.32 ve 88.6±0.36 olarak bulunmuştur.

Şeffaflık değerleri incelendiğinde ekstrenin katkı maddesi olarak eklendiği filmlerde kontrol filminin daha yüksek şeffaflığa sahip olduğu ve ekstre miktarının artmasıyla filmlerin şeffaflık değerlerinde önemli bir azalma olduğu görülmüştür ($p<0.05$). En düşük şeffaflık değerine (8.2±0.2) E10 filmi ile ulaşılmıştır. Ekstre, yapıya katıldığında ise derişimin artması şeffaflık değerinde önemli bir değişikliğe neden olmamıştır ($p>0.05$).

Çizelge 4.9 Ekstrenin katkı maddesi olarak kullanıldığı filmlerin geçirgenlik ve şeffaflık değerleri

Örnek	T356 (%)	T600 (%)	Şeffaflık
K	91.7 ± 0.3 ^a	93.3 ± 0.5 ^a	11.8 ± 0.2 ^a
E3	89.2 ± 0.3 ^b	91.5 ± 0.1 ^b	10.8 ± 0.1 ^b
E6	87.5 ± 0.3 ^c	89.0 ± 0.4 ^c	9.1 ± 0.2 ^c
E10	85.0 ± 0.3 ^d	87.0 ± 0.3 ^d	8.2 ± 0.2 ^d

Aynı sütundaki farklı harfle belirtilen değerler istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0.05$)

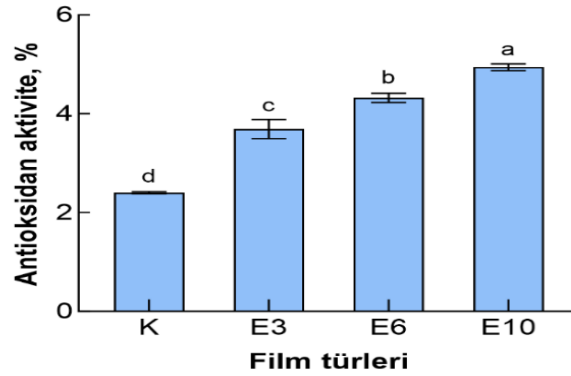
Çizelge 4.10 Ekstrenin yapıya katıldığı filmlerin geçirgenlik ve şeffaflık değerleri

Örnek	T356 (%)	T600 (%)	Şeffaflık
YK5	90.4 ± 0.3 ^a	92.1 ± 0.3 ^a	11.9 ± 0.2 ^a
YE5	89.4 ± 0.4 ^b	90.1 ± 0.2 ^b	11.3 ± 0.2 ^b
YK10	90.9 ± 0.2 ^a	92.4 ± 0.5 ^a	11.8 ± 0.5 ^{ab}
YE10	87.4 ± 0.4 ^c	89.4 ± 0.3 ^{bc}	11.1 ± 0.4 ^b
YK20	90.6 ± 0.3 ^a	91.4 ± 0.5 ^a	11.5 ± 0.1 ^b
YE20	87.1 ± 0.3 ^c	88.6 ± 0.3 ^c	11.1 ± 0.4 ^b

Aynı sütundaki farklı harfle belirtilen değerler istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0.05$)

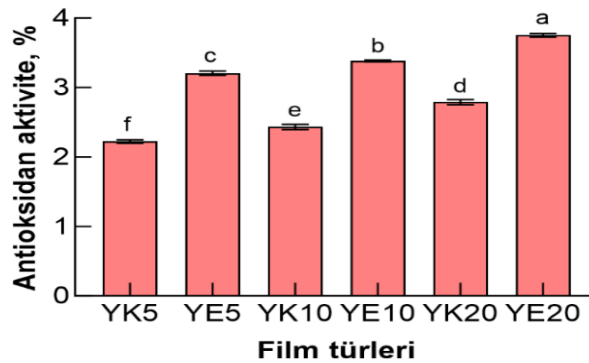
4.2.3 Yenilebilir filmlerin antioksidan aktivite değerleri

Yenilebilir filmlerin AA değerine ilişkin sonuçlar şekil 4.22 ve şekil 4.23'te verilmiştir. Ekstre eklenen filmlerin AA değerleri kontrole göre daha yüksek bulunmuştur (şekil 4.22). En yüksek AA değerine E10 filmiyle ulaşılmıştır (4.94 ± 0.07). Ekstrenin yapıya katıldığı filmlerde ise her bir filmin kontrolüne göre daha yüksek AA değerine sahip olduğu belirlenmiştir. Kontrol filmlerinde de NADES içeriği arttı AA değerinin arttığı gözlenmiştir. Dolayısıyla CSW (4:1:4)'nin AA değerine katkı sağladığı gözlenmiştir. En yüksek AA değeri olan 3.75 ± 0.025 değerine YE20 ile ulaşılmıştır.



şekil 4.22 Ekstrenin katkı maddesi olarak kullanıldığı filmlerin AA değerleri (%)

Farklı harfle belirtilen değerler istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0.05$)



şekil 4.23 Ekstrenin yapıya katıldığı filmlerin AA değerleri (%)

Farklı harfle belirtilen değerler istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0.05$)

Çalışmada hazırlanan yenilebilir filmler arasında en düşük nem içeriği, en düşük şeffaflık ve en yüksek AA değeri gösteren filmler olan; ekstrenin katkı maddesi olarak kullanıldığı E10 ve ekstrenin yapıya katıldığı YE20 filmleri seçilmiştir. Seçilen bu filmlerin mekanik özellikleri, FTIR analizi, SEM analizi ve antimikrobiyal aktivite özellikleri belirlenmiştir.

4.2.4 Mekanik özellikler

Yenilebilir filmlerin kimyasal yapısıyla ilişkili olan GD, %KU ve YM filmlerin mekanik özelliklerini değerlendirmek için en yaygın kullanılan parametrelerdir. GD, filmin çekme gerilimine dayanma kabiliyeti ya da filmin kırılmadan önce gerilirken veya çekilirken dayanabileceği maksimum stres olarak ifade edilmektedir ve filmin mekanik hasara karşı direncini göstermektedir. Film ne kadar yüksek bir GD değerine sahipse o kadar dayanıklı olarak kabul edilmektedir. %KU değeri, filmlerin esnekliğini ve uzama kapasitesini göstermektedir. Yüksek %KU değeri filmin gıdayı sarma ve paketlenme kapasitesini artırmaktadır. YM ise filmin sertliği hakkında bilgi vermektedir. Yüksek YM değerine sahip filmler daha sert olmaktadır (Kong vd. 2022).

Bu çalışmada hazırlanan filmlerin mekanik özellikleri YM, %KU ve GD değerleri ile belirlenmiş ve sonuçlar **çizelge 4.11**'de sunulmuştur. Buna göre, E10 ve kontrolü olan K filmi kıyaslandığında ekstrenin GD, YM ve %KU değerlerini geliştirdiği belirlenmiştir. YE20 filminin kontrolü olan YK20'ye göre YM ve %KU değerlerinin azaldığı GD değerlerinin ise değişmediği tespit edilmiştir ($p < 0.05$). K filminin YM değerinin yüksek, %KU ve GD değerlerinin ise diğer filmlere göre düşük olması mekanik özelliklerinin zayıf olduğunu göstermektedir. K filminin diğer filmlere göre farkı NADES (CSW (4:1:4)) ve ekstre içermemesidir. Dolayısıyla film yapısına katılan CSW (4:1:4)'nin filmlerin mekanik özelliklerini geliştirdiği söylenebilir.

Çizelge 4.11 Filmlerin young modülü, kopma uzaması, gerilme direnci değerleri

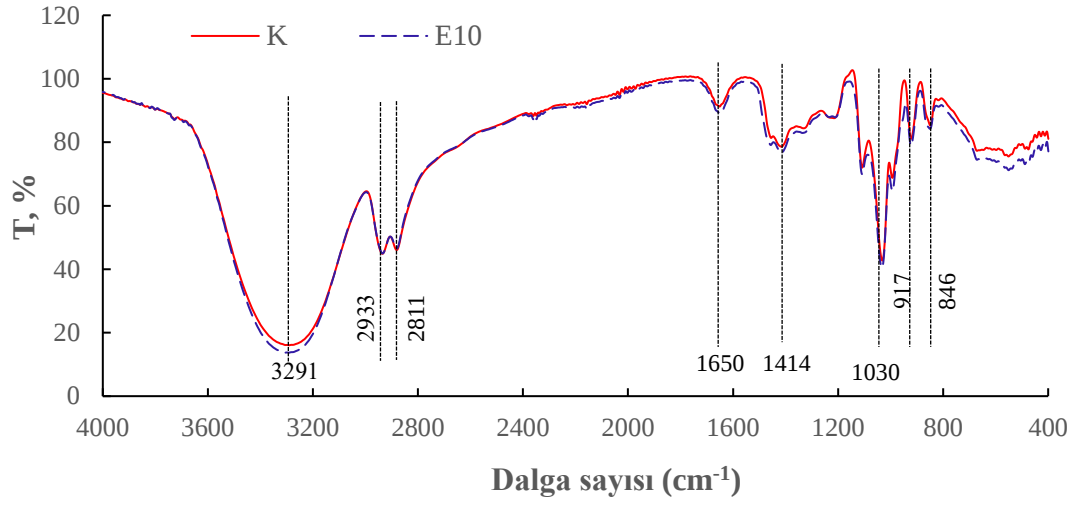
Örnek	Young modülü (MPa)	Kopma uzaması (%)	Gerilme direnci (MPa)
K	0.54 ± 0.02^a	9.43 ± 1.74^c	0.03 ± 0.00^c
E10	0.50 ± 0.01^b	18.42 ± 2.62^a	0.04 ± 0.00^b
YK20	0.43 ± 0.02^c	20.94 ± 1.57^a	0.05 ± 0.00^a
YE20	0.37 ± 0.01^d	13.32 ± 1.83^b	0.05 ± 0.00^a

Aynı sütundaki farklı harfle belirtilen değerler istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0.05$)

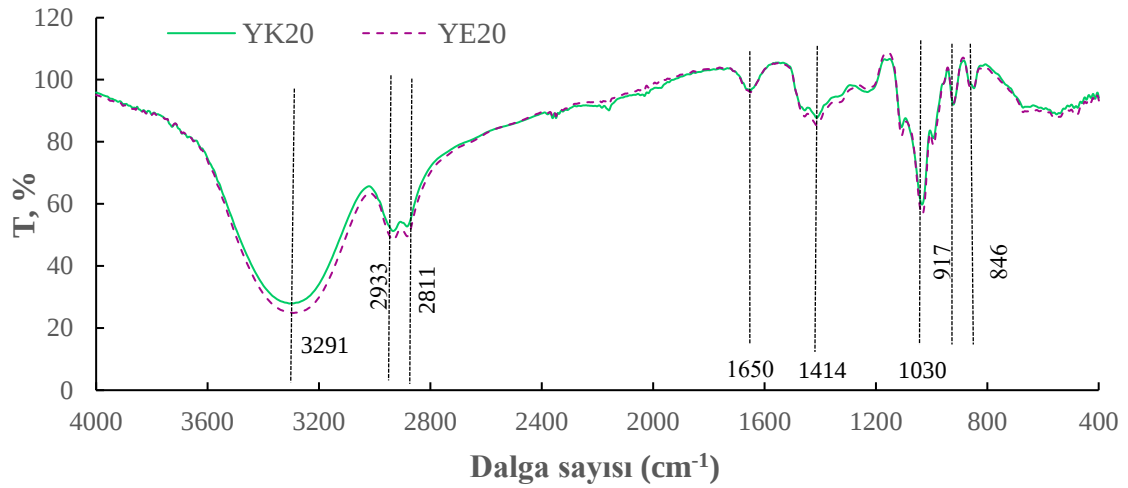
4.2.5 Yenilebilir filmlerde Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi

K, E10, YK20 ve YE20 yenilebilir filmlerinin FTIR spektrumları **şekil 4.24** ve **şekil 4.25**'te verilmiştir. Buna göre spektrumda 3291 cm^{-1} civarında gözlemlenen pik κ -karragenan ve gliserol yapısında bulunan hidroksil grubunun O–H gerilme titreşiminden kaynaklanmaktadır. 2933 cm^{-1} ve 2811 cm^{-1} 'de görülen pikler κ -karragenandaki metilen gruplarının C-H bandının asimetrik ve simetrik gerilmesini ifade etmektedir. 1650 cm^{-1} dalga sayısında görülen pik absorplanmış suyun O–H bükülmesine karşılık gelmektedir. 900-1200 aralığındaki pikler κ -karregenanda bulunan oksijen gruplarının titreşimlerini göstermektedir. 1030 cm^{-1} absorpsiyon bandı C-O ve C-OH gerilmesine, 917 cm^{-1} 'deki pik 3,6-anhidro-D-galaktozda C-O-C gerilmesine, κ -karragenanın sülfatla ilişkili titreşimleri spektrumda 846 cm^{-1} 'deki pik D-galaktoz-4-sülfat gerilmesine karşılık gelmektedir (Şen ve Erboz, 2010; Oun ve Rhim, 2017; Liu vd. 2019; Simona vd. 2021b).

Şekil 4.24 ve **şekil 4.25** incelendiğinde filmlere ekstre veya NADES eklenmesi ile yeni bir pikin oluşmadığı ancak pik yoğunluklarında farklılıklar olduğu tespit edilmiştir. Ekstre eklendiğinde 3291 cm^{-1} 'de bulunan pikin (OH) yüksekliğinin arttığı görülmüştür. OH bant yoğunluğu değişikliğinin, ekstrede bulunan antosiyanin ve κ -karragenan film matrisi-gliserol arasında oluşan hidrojen bağlarından kaynaklandığı düşünülmektedir (Liu vd. 2019). Ekstre ilavesi ile E10 filminin spektrumundaki bağlı su bant yoğunluğunun artması, ekstre içerisinde bulunan suya işaret etmektedir. Ayrıca E10 ve YE20 filmlerinin spektrumunda 1414 cm^{-1} ve 846 cm^{-1} 'deki bantların yoğunluğunun arttığı görülmüştür bu pikler, antosiyaninlerin C-C gerilme titreşimi ve C-H düzlem dışı bükülme titreşimine karşılık gelmektedir (Chi vd. 2020).



Şekil 4.24 Ekstrenin katkı maddesi olarak kullanıldığı film (E10) ve kontrolünün (K) FTIR spektrumu

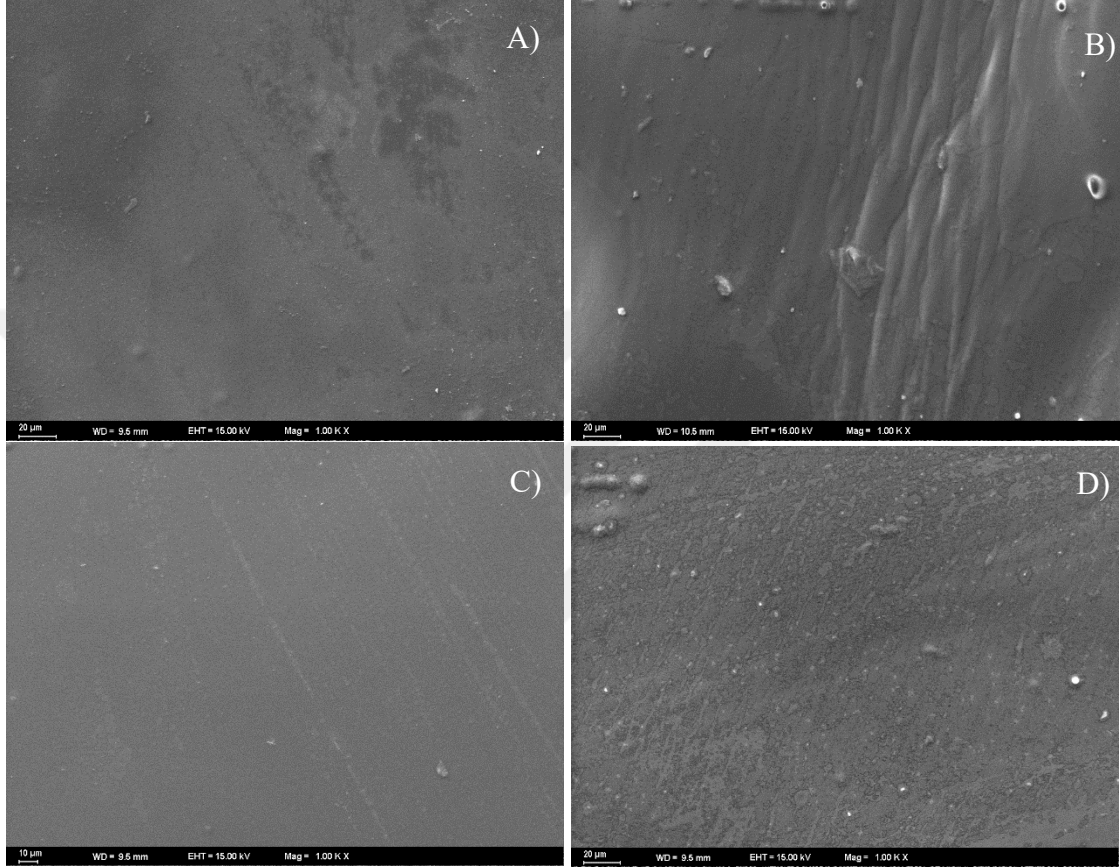


Şekil 4.25 Ekstrenin yapıya katıldığı filmin (YE20) ve kontrolünün (YK20) FTIR spektrumu

4.2.6 Yenilebilir filmlerde taramalı elektron mikroskobu analizi

K, E10, YK20 ve YE20 yenilebilir filmlerinin SEM analizleri **şekil 4.26**'da verilmiştir. Görüntüler incelendiğinde kontrol filmleri olan K ve YK20'nin E10 ve YE20'ye göre daha homojen ve pürüzsüz bir yüzey sergiledikleri belirlenmiştir. Ancak antosiyaninlerin eklenmesiyle film ağındaki bazı çözünmeyen polifenol parçacıkları nedeniyle yüzey

pürüzlülüğünün arttığı görülmüştür. Ekstre içeren filmlerde bazı küçük beyaz noktaların varlığı, antosiyanin açısından zengin ekstrenin safsızlığından ve çözünmeyen parçacıkların topaklanmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

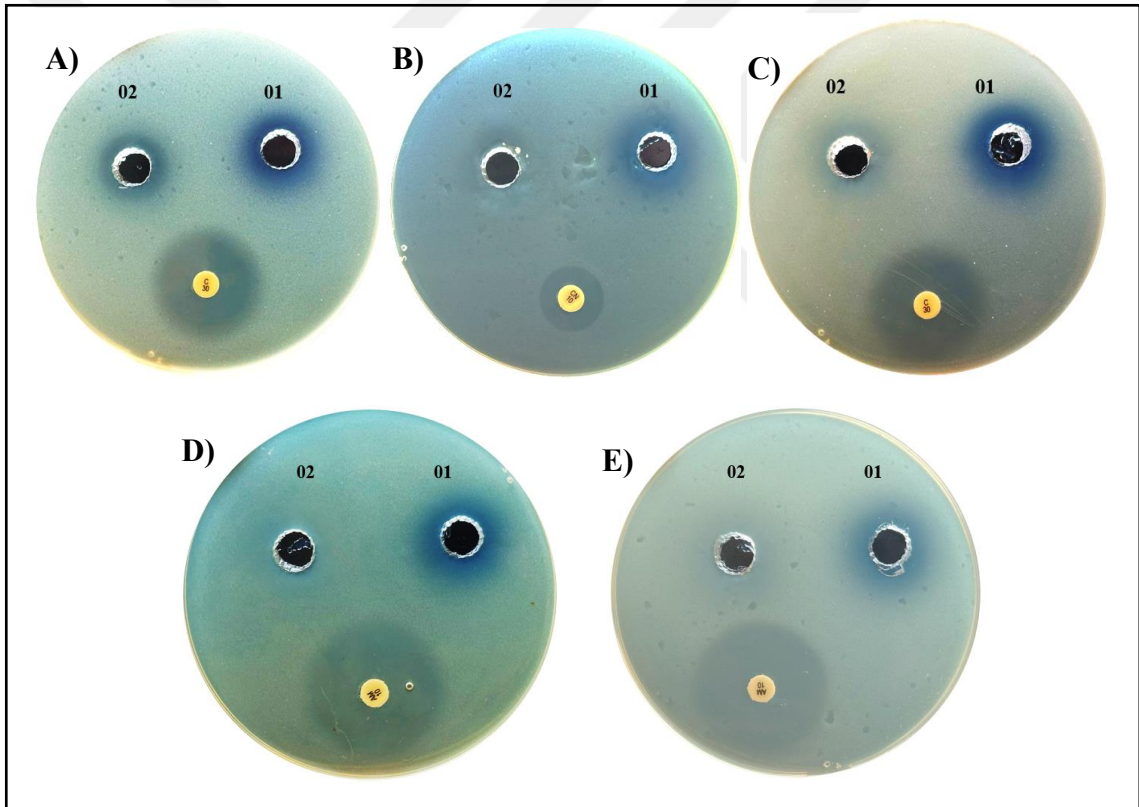


Şekil 4.26 Filmlerin SEM analizleri A) K B) E10 C) YK20 D) YE20 filmlerin SEM görüntüleri

4.2.7 Antimikrobiyal aktivite

Antimikrobiyal aktivite analizlerinde üç farklı gram negatif bakteri (*Escherichia coli* ATCC 43888, *Salmonella infantis* ATCC 51741 ve *Salmonella typhimurium* SL 1344) ve iki farklı gram pozitif bakteri (*Listeria monocytogenes* ATCC 13932 ve *Listeria monocytogenes* ATCC 7644) kullanılmıştır. Yenilebilir filmler arasından K, E10, YK20 ve YE20 ile gerçekleştirilen deneylerde filmlerin patojenlere karşı antimikrobiyal aktivite göstermediği belirlenmiştir. Bu nedenle saf ekstrenin antimikrobiyal aktivitesi incelenmiştir ve kontrol olarak çözücüsü kullanılmıştır (%59.07 CSW (4:1:4)). Sonuçlara

göre şalgam suyu ekstresinin ve çözücüsünün incelenen tüm bakteri türlerine karşı antimikrobiyal aktivite gösterdiği belirlenmiştir (şekil 4.27). İnhibisyon zon çapları ise çizelge 4.12’de verilmiştir. Buna göre NADES olan CSW (4:1:4)’nin tek başına da antimikrobiyal aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Ancak ekstrenin varlığı her durumda antimikrobiyal aktiviteyi artırmıştır. Buna göre ekstre en fazla *L. Monocytogenes* 13932’i inhibe etmiş, ikinci sırada aynı mikroorganizmanın farklı suşu olan *L. Monocytogenes* 7644’ü inhibe etmiştir. Ekstrenin, gram negatif bakterilerle (*E. coli*, *S. infantis* ve *S. typhimurium*) karşılaştırıldığında gram pozitif bakterilere (*L. Monocytogenes* ATCC 13932 ve *L. Monocytogenes* ATCC 7644) karşı daha fazla antimikrobiyal aktivite gösterdiği belirlenmiştir.



Şekil 4.27 Ekstre (01) ve çözücüsünün (02) *S. infantis* (A), *E. coli* (B), *S. typhimurium* (C), *L. monocytogenes* ATCC 13932 (D), *L. monocytogenes* ATCC 7644 (E)’ e karşı antimikrobiyal aktiveleri

Çizelge 4.12 Örneklerin farklı patojen bakterilere karşı ölçülen inhibisyon zon çapları

Örnek	İnhibisyon çapı, mm				
	<i>L.monocytogenes</i> 13932	<i>L.monocytogenes</i> 7644	<i>S.infantis</i>	<i>E.coli</i>	<i>S. thphimurium</i>
Ekstre	27	25	22	20	16
Çözücü (CSW (4:1:4))	18	17	16	14	14
Fark	9	7	6	6	2

4.3 Meyve Kaplama Sonuçları

Gıda kaplama için domates seçilmiştir. E10, YE20, YK20, K filmleriyle kaplanmış ve kaplanmamış domateslerin oda sıcaklığında 30 günlük depolama süresi boyunca gösterdikleri değişimler **şekil 4.28**'de sunulmuştur. İlk 10 gün boyunca kaplanan domateslerin kaplanmayan domatese göre daha iyi korunduğu tespit edilmiştir. E10 filmi ile kontrolü kıyaslandığında filmde bulunan ekstrenin domatesin buruşmasını engellediği belirlenmiştir (şekil 4.28 b ve c). YK20 ve YE20 kıyaslandığında (şekil 4.28 d ve e) yine ekstre içeren film ile kaplanmış domatesin daha iyi durumda olduğu görülmektedir. Otuz gün sonunda ise kaplanmamış olan domatesin iyice kuruduğu ve çürüdüğü, kaplanmış olanların ise nispeten daha iyi durumda olduğu, yani daha uzun raf ömrüne sahip olduğu belirlenmiştir. Filmler arasında en iyi koruma sağlayan filmin E10 olduğu saptanmıştır. Buna göre şalgam suyu tesis atığından geri kazanılmış olan ekstrenin filmin özelliklerini geliştirdiği belirlenmiştir.

	Başlangıç	5.gün	10.gün	15.gün	20.gün	30.gün
a)						
b)						
c)						
d)						
e)						

Şekil 4.28 Filmler ile kaplanan domateslerin zamanla değişimlerinin izlenmesi a: kaplanmamış, kaplamada kullanılan filmler; b: K c: E10, d: YK20, e: YE20

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu tez çalışmasında şalgam suyu tesisi atığından biyoaktif bileşenlerin ekstraksiyonunda çözücü türünün etkisinin incelenmesi amacıyla farklı gruplardan toplam 11 adet NADES'in TP, TF, TMA ve AA üzerine etkisi incelenmiştir. Buna göre ölçülen her grup nicelik için farklı NADES türlerinin ön plana çıktığı belirlenmiştir. Bunun nedeni NADES molekülleri arasındaki farklı yapısal bağlar ve bu bağların fenolik bileşiklerle olan farklı etkileşimleri olarak yorumlanabilir. Ayrıca ham maddenin bileşimi, hedef bileşiklerin çözücü içindeki difüzyon hızı, yüzey gerilimi ve çözücünün viskozitesi gibi faktörler de önem taşımaktadır (Guo vd. 2019).

NADES grupları arasında TP miktarı için poliol grubu (CG (1:2)), kolin klorür-şeker grubu (CFW (5:2:5)) ve şeker grubu (GFW (1:1:11)) öne çıkmıştır. TF miktarı için ise yine kolin klorür-şeker bazlı (CFW (5:2:5)) ve şeker bazlı (GFW (1:1:11)) NADES'ler en iyi sonucu vermiştir. Literatürde şalgam suyu üretim tesisi atığından NADES'ler ile herhangi bir ekstraksiyon çalışması yer almamaktadır. Dolayısıyla sonuçlar farklı bitkisel kaynaklardan DES ile gerçekleştirilen ekstraksiyon çalışmaları ile kıyaslanmıştır. *Cajanus Cajan* yapraklarından fenolik bileşen ekstraksiyonu gerçekleştirilen çalışmada kolin klorür şeker bazlı NADES'ler ile daha yüksek TP miktarına ulaşıldığı rapor edilmiştir (Wei vd. 2015). Başka bir çalışmada zeytin yaprağından şeker, kolin klorür-şeker, asit ve poliol bazlı olmak üzere farklı NADES türleri ile ekstraksiyon gerçekleştirilmiş ve TP, TF için en yüksek değerlerin şeker bazlı CFW (5:2:5) ile elde edildiği bildirilmiştir (Ünlü 2021). Yer iğdesi yaprağından flavonoid ekstraksiyonunun kolin klorür bazlı DES ile gerçekleştirildiği diğer bir çalışmada poliol bazlı olan kolin klorür- 1,4 butanediol ve şeker bazlı olan kolin klorür glukoz DES'lerin organik bazlı DES'lerden daha yüksek sonuçlar verdiği bildirilmiştir. Bu çalışmalar değerlendirildiğinde bu tez çalışmasındaki sonuçlara benzer şekilde, fenol ve flavonoid ekstraksiyonunda kolin klorür-şeker ve şeker bazlı DES'lerin ön plana çıktığı görülmektedir. Bu çözücü türlerinin ön plana çıkma nedeninin hedef bileşenlerin zayıf ve orta polaritede olmaları dolayısıyla kullanılan çözücülerle uyumlu olmaları olarak değerlendirilmiştir (Cui vd. 2018).

TMA sonuçları değerlendirildiğinde de yine poliol ve şeker içeren NADES'ler kullanıldığında daha yüksek miktarlarda ekstrakte edilebildiği, asidik NADES'ler kullanıldığında ise düşük TMA elde edildiği belirlenmiştir. Literatürde de benzer bir bulguya rastlanmıştır. Jovanović vd. (2022) yaban mersini meyvesinden kolin klorür şeker bazlı, poliol bazlı, asidik bazlı NADES'ler ile ultrasonik dalga destekli ekstraksiyon yöntemi kullanarak antosiyanin ekstraksiyonu gerçekleştirdikleri çalışmada şeker bazlı ((kolin klorür:glukoz:su (2:1:1)) ve poliol bazlı DES'lerin (kolin klorür:sorbitol (1:1)) toplam monomerik antosiyaninin ve siyanidin-3 glikozit ekstraksiyonunda daha etkili olduğunu bildirmişlerdir.

NADES türlerinin AA üzerine etkisi incelendiğinde en yüksek değerlere poliol grubu CG (1:2) ve CEG (1:2) ile ve şeker grubundan CFW (5:2:5) ile ulaşıldığı belirlenmiştir. Literatürde zeytin yaprağından poliol ve şeker grubuyla ekstrakte edilen bileşenlerin daha yüksek AA sergilediği belirtilmiştir (Ünlü 2021). Dolayısıyla bu tez çalışmasında elde edilen sonuçların literatür ile uyumlu olduğu belirlenmiştir.

Polimerik renk yüzdesi, polimerik renk ile renk yoğunluğu arasındaki oran olarak tanımlanmakta ve polimerize olmuş antosiyaninlerin ürünün rengine yüzde olarak katkısını belirlemek için kullanılmaktadır. NADES türlerinin renk yoğunluğu, polimerik renk ve %polimerik renk üzerine etkisinin incelendiği deneylerde en düşük renk yoğunluğu değerine kolin klorür şeker bazlı gruptan CSW (4:1:4) ile en yüksek renk yoğunluğu değeri ise asidik gruptan CLa (1:9) kullanıldığında elde edilmiştir. Bu değer artması antosiyaninlerin parçalandığını ve esmer renkli pigment miktarlarının arttığını göstermektedir. Ekstredeki düşük renk yoğunluğu değeri ise ekstrenin renk sağlayan daha fazla monomerik antosiyanin miktarına ve daha az polimerize olan antosiyaninlere sahip olduğunu göstermektedir. Polimerik renk ve % polimerik renk değerleri incelendiğinde ise en yüksek değer CLa (1:6) ve CLa (1:9) ekstrelerinde elde edilirken en düşük polimerik renk ve polimerik renk oranına kolin klorür şeker bazlı gruptan CFW (5:2:5) ile ulaşılmıştır. Bu durum CFW (5:2:5) ekstresindeki rengin diğer ekstrelerle kıyasla daha iyi korunduğunu göstermiştir (Velásquez vd. 2021). NADES kullanılarak Chilean *Luma chequen* (Molina) meyvesinden ultrasonik dalga destekli ekstraksiyon yöntemi ile antosiyanin ekstraksiyonunun gerçekleştirildiği bir çalışmada düşük renk yoğunluğu

değeri kolin klorür: gliserol (4:6) ile düşük polimerik renk ve polimerik renk oranı değerleri ise laktik asit-gliserol (1:2) ile elde edildiği rapor edilmiştir.

DES ve NADES'lerin polarite ve viskoziteleri su içeriği ile ayarlanabilmektedir. Böylece daha iyi kütle aktarımı sağlanmakta ve ekstraksiyon verimi artmaktadır. Ancak yüksek miktarda eklenen suyun (>%50) HBD ve HBA arasında hidrojen bağına parçalama riski bulunmaktadır. Bu nedenle NADES miktarının incelendiği deneylerde en düşük NADES içeriği %50 olarak belirlenmiştir. Buna göre, her bir NADES grubu için en yüksek TF, TP ve TMA miktarına %50 NADES ortamında ulaşılmış ve NADES miktarı arttıkça değerlerin azaldığı belirlenmiştir. Burada tek istisnanın TMA içeriğinde %65 ile en iyi sonucu veren CLa (1:1) olduğu belirlenmiştir. NADES üzerine eklenen suyun NADES'lerin polaritesinin artırması nedeniyle biyoaktif bileşenlerin ekstraksiyonunda daha iyi sonuçlar elde edildiği düşünülmektedir. Literatürdeki çalışmalar incelendiğinde, bu tez çalışmasına benzer şekilde; zeytin yaprağından (Ünlü 2021) ve şarap tortusundan (Bosiljkov vd. 2017) biyoaktif bileşenlerin ekstraksiyonunda NADES miktarının %50 civarında olduğunda verimin maksimum olduğu belirtilmiştir.

Bosiljkov vd. (2017) monomerik antosiyaninlerin ekstraksiyonunda optimum ekstraksiyon verimine alkol ve şeker bazlı NADES'lerde %50 NADES içeriğinde, organik bazlı NADES'lerde %75 NADES ortamında ulaşmışlardır. Su ilavesinin daha az polar olan DES türlerinde polariteyi artırdığı polaritesi sudan daha fazla olan NADES'lerde polariteyi düşürdüğü bildirilmiştir. Ancak daha az miktarda su kullanıldığında yüksek viskoziteden dolayı verimin düştüğünü gözlemlemişlerdir (Bosiljkov vd. 2017). NADES miktarının incelendiği bir diğer çalışma olan zeytin yaprağından biyoaktif bileşenlerin ekstraksiyonunda NADES miktarının %50 civarında verimin maksimum olduğu tespit edilmiştir (Ünlü 2021).

KS oranı ekstraksiyon verimini doğrudan etkilemektedir. Bu tez kapsamında incelenen üç farklı KS oranı (0.04, 0.06, 0.08 g/mL) değerlendirildiğinde CLa (1:1) dışındaki tüm NADES'ler için en yüksek fenol, flavonoid, monomerik antosiyanin 0.06 g/mL oranında elde edilmiştir. Antioksidan aktivite değerleri için en yüksek sonucu veren KS oranı ise 0.04 g/mL olarak elde edilmiştir. Dolayısıyla KS oranının orta ve düşük değerleri en iyi

sonuçları vermiştir. Literatürde yer alan bilgilere göre, yüksek miktarda çözücü kullanımı, bitki hücre matrisi ile ekstraksiyon ortamı arasında önemli derişim farkına sebep olarak kütle transferini kolaylaştırmakta böylece hücre matrisinden bileşenlerin salımını hızlandırmaktadır. Aksine, düşük miktarda çözücü kullanımı ekstraksiyon için gereken süreyi artırabilmekte ve kavitasyon enerjisini azaltarak ekstraksiyon verimini düşürebilmektedir (Bajkacz ve Adamek 2017, Liu vd. 2023).

Ekstraksiyon süresi prosesin uygulanabilirliği açısından önemli bir parametredir. Genel olarak ekstraksiyon süresinin uzatılması, biyoaktif bileşenlerin çözücülerde yeterli çözünmesini teşvik edebilmektedir. Literatüre göre, aktif bileşenlerin artan ekstraksiyon süresi ile çözünürlükleri artmakta, ozmotik dengenin sağlanmasının ardından fazla bir değişiklik olmamaktadır (Xia vd. 2021). Ancak ultrasonik dalgaya uzun süre maruz bırakılmak, ekstrelerdeki hedef bileşenlerin parçalanmasına yol açabilmekte, dolayısıyla uzun süreli ekstraksiyon özellikle kararsız fenolik bileşenler için uygun olmamaktadır. Bunun yanı sıra enerji tüketimini artıracığından yüksek maliyete ve çevresel sorunlara sebep olabilmektedir (Liu vd. 2023). Bu çalışma kapsamında da en fazla 60 dk süre denenmiş ve TP, TF ve TMA için en uygun olan süre 30 dk olarak belirlenmiştir. AA için ise farklı NADES türleri için farklı süreler elde edilmiştir. Buna göre CG (1:2) ve FSW (1:1:11) ile 60 dk, CSW (4:1:4) ile 15 dk, CLa (1:1) ile 30 dk en uygun süreler olarak elde edilmiştir.

Literatür incelendiğinde, *Polygonatum odoratum* bitkisinden DES ile flavonoid ekstraksiyonunda ekstraksiyon süresi 10-40 dk arasında incelenmiş ve 20 dk'nın üzerinde flavonoid miktarında azalma gözlemişlerdir. Araştırmacılar, bu durumun denatüre olan bazı maddelerin çökmesi, flavonoidlerle tepkimeye girmesi veya zamanla flavonoidlerin kararlılığının azalmasından kaynaklanabileceğini bildirmişlerdir (Xia vd. 2021). Benzer bir sonuç Zhou vd. (2018) tarafından yürütülen çalışmada da rapor edilmiştir. UAE ve DES kullanılarak *Morus alba* L. yapraklarından fenolik bileşiklerin ekstraksiyonunda 10-50 dk çalışmışlar ve 30 dk'dan sonra verimin düştüğünü bildirmişlerdir (Zhou vd. 2018).

Bu tez çalışmasında tek seferde tek parametre stratejisi ile yürütülen deneylerin ardından TMA için en yüksek ekstraksiyonu sağlayan CSW çözücüsü kullanılarak, KS oranı, NADES miktarı ve sürenin parametre olarak incelendiği deneysel tasarım gerçekleştirilmiştir. Bunun sonucunda TMA değerini üçüncü dereceden polinomun ile parametrelere bağlayan denklem yüksek R^2 değerleri ile ($R^2=0.9939$ ve $R^2_{düz}=0.9833$) ortaya konulmuş ve yanıt yüzeyleri belirlenmiştir. Dolayısıyla elde edilen denklem cevap ve parametreler arasındaki ilişkiyi başarılı biçimde ifade etmektedir.

Literatürde şalgam suyu üretim tesisi atığından ekstraksiyon çalışması yer almamaktadır, ancak meyve suyu üretimi sonucunda atık olarak ortaya çıkan siyah havuç posasının ekstraksiyonuna yönelik çalışmalar bulunmaktadır. Kaynak özetleri bölümünde de özetlenmiş olan bu çalışmada siyah havuç posasından biyoaktif bileşenlerin ekstraksiyonu sonucunda TMA miktarını 105.7 mg/L olarak TP değerini ise 333.9 mg/L olarak rapor etmişlerdir (Ağçam vd. 2021). Gerçekleştirilen bu tez çalışmasında ise CG (1:2) ile 3 kat daha fazla TP miktarına (16 mg/g, 1067 mg/L) ulaşıldığı görülmüştür. Diğer bir çalışmada atık olarak temin edilen ve dondurularak kurutulan siyah havuç posasının metanol-su karışımı ile ekstraksiyonu sonucunda TP miktarı 81.6 mg/kg, TMA miktarı 101.8 mg/100 g olarak tespit edilmiştir (Polat vd. 2022). Tez çalışmasında elde edilen bulgular bu çalışma ile karşılaştırıldığında çok daha yüksek TP (1067 mg/L, 16000 mg/kg) ve TMA (177.6 mg/100g, 1776.76 mg/kg) değerlerine ulaşıldığı belirlenmiştir.

Bu tez çalışmasında atıktan geri kazanım yapılmış olmasına rağmen, literatürde yer alan taze siyah havuçtan gerçekleştirilen ekstraksiyona göre daha yüksek biyoaktif bileşen miktarı elde edildiği belirlenmiştir. Jabbar vd. (2015), organik çözücüler ile ultrasonik dalga yöntemi kullanarak optimize edilmiş koşullarda taze siyah havuçtan 316.74 µg/g TP elde etmişlerdir.

Bu sonuçlara göre atıktan geri kazanılan ekstrenin kıyaslanabilir ölçüde yüksek biyoaktif içerikte olduğu görülmektedir.

TMA değerinin optimizasyonunun ardından bir uygulama alanı olarak yenilebilir film sentezi gerçekleştirilmiştir. Ekstrenin katkı maddesi olarak kullanıldığı filmlerde kalınlık

değerlerinin 0.17 mm ile 0.24 mm arasında değişiklik gösterdiği belirlenmiş, ekstrenin yapıya katıldığı filmlerde ise tüm filmlerin kalınlık değeri 0.17 ± 0.01 mm olarak bulunmuştur. Yenilebilir film ve kaplamaların ideal kalınlığı 0.25 mm'den az olmalıdır dolayısıyla bu tez çalışmasında üretilen filmlerin kalınlığı ideal kalınlığa uygundur (Skurtys vd. 2011).

Sentezlenen filmler nem içeriği açısından değerlendirildiğinde ise ekstrenin yapıya katıldığı filmlerin nem içeriği değerleri %21.6-26.6 arasında ekstrenin katkı maddesi olarak ilave edildiği filmlerde ise nem içeriği % 21.82-28.35 aralığında değiştiği ve tüm filmlerde ekstre miktarı arttıkça nem miktarının azaldığı belirlenmiştir. Benzer bir sonuç Liu vd. (2019) çalışmasında da bulunmuştur. Araştırmacılar, filmlere polifenolik ekstresinin eklenmesi ile su içeriğinin azaldığını bildirmişlerdir. Ekstrelerin eklenmesiyle su içeriğinin azalması, ekstrelerdeki fenolik hidroksil gruplarının karragenandaki hidroksil gruplarıyla reaksiyonu ile açıklanabilmekte ve bu molekül içi etkileşimlerin (örneğin hidrojen bağları), karragenan ve su arasındaki etkileşimi etkileyebildiği bildirilmektedir (Liu vd. 2019).

Filmlerin geçirgenlik ve şeffaflık değerleri incelendiğinde ekstrenin eklenmesi ile UV ve görünür dalga boyundaki geçirgenliğin ve şeffaflığın azaldığı belirlenmiştir. Bunun sebebinin antosiyanin açısından zengin ekstrenin içerdiği yüksek miktardaki aromatik halkalar olduğu düşünülmektedir. Literatürde yapıdaki aromatik halkaların UV-VIS ışınlarını absorbe etme potansiyellerinin yüksek olduğu bildirilmiştir (Qin vd. 2019). Filmlerde geçirgenlik değerlerinin azalması istenen bir durumdur çünkü bazı gıda bileşenlerinin ışığa maruz kalması lipid oksidasyonuna ve besin değerlerinde kayıplara neden olabilmektedir. Yenilebilir filmlerde düşük şeffaflık seviyeleri, UV ve görünür ışığın ürüne nüfuz etmesini engellemekte ve ürünün kalitesinin korunmasını sağlamaktadır (Thakur vd. 2022). Benzer şekilde literatürde de filmlere ekstre ilavesi ile şeffaflık değerinde azalmanın gözlemlendiği çalışmalar yer almaktadır (Adilah vd. 2018; Riaz vd. 2018; Qin vd. 2019; Thakur vd. 2022).

Oksidatif reaksiyonlar, gıda maddelerinin görünümünü, besin değerini ve kalitesini olumsuz yönde etkileyen ekşime ve tat bozukluklarına neden olmaktadır (Liu vd. 2019).

Uygun antioksidan maddeler içeren ambalaj filmleri, gıda sırasında açığa çıkan radikal oksidatif türler gibi istenmeyen bileşikleri nötralize edebilmekte ve paketlenmiş ürünlerin raf ömrünün uzatılmasına yardımcı olabilmektedir (Khan vd. 2024). Ekstre eklenmiş olan filmlerin AA değerleri film matrisinden açığa çıkan aktif bileşiklere (fenolik bileşikler, uçucu yağlar, vitaminler gibi) atfedilmektedir (Zhang vd. 2021). Ekstrede bulunan fenolik hidroksil grupları, fenoksi grupları oluşturarak serbest radikalleri ortadan kaldırmaktadır. Literatürde yer alan çalışmalar, fenolik hidroksil içeriğindeki artışın antioksidan aktiviteyi iyileştirmede kritik öneme sahip olduğunu göstermektedir (Cheng vd. 2022; Zhang vd. 2021). Tez çalışmasında sentezlenen filmlerin AA değerlerinin ekstre eklendikçe kontrollere göre arttığı belirlenmiştir. Dolayısıyla sentezlenen filmler AA sergilemekte ve gıdayı koruma potansiyeli bulunmaktadır. Ancak, ekstrenin filme eklenmeden önceki aktivitesine göre oldukça düşük değerler elde edildiği belirlenmiştir. Benzer sonuçlar literatürde de yer almaktadır. Nogueria vd. (2019) nişasta bazlı hazırladıkları filmlere böğürtlen posası ilave etmişler ancak filmlerin böğürtlen posasına kıyasla %32 daha düşük antioksidan aktiviteye sahip olduğunu rapor etmişlerdir (Nogueira vd. 2019). Bunun sebebinin antosiyaninlerin, film üretimi sırasında maruz kaldıkları sıcaklık, ışık, pH ve oksijen gibi faktörler nedeniyle bozunması olduğu düşünülmektedir. AA değerinin artırılması amacıyla ekstre miktarı artırıldığında film yapısının bozulduğu belirlenmiştir.

Sentezlenen filmlerin mekanik analiz sonuçları değerlendirildiğinde YM değeri 0.37-0.54 MPa, %KU değeri 9.43-20.94 GD ise 0.03-0.05 MPa aralığında bulunmuştur. Çalışmamızda elde edilen yenilebilir filmlerin GD değeri oldukça düşük bulunmuştur. Bu sonuç Dordevic vd.'nin (2023) sonuçları ile uyumlu bulunmuştur. İlgili çalışmada karregen bazlı filme kahve atığından elde edilen lipit eklediklerinde GD değerlerinin 0.03-0.06 MPa aralığında bulunduğunu bildirmişlerdir. Bu tez çalışmasında ayrıca plastikleştirici olarak kullanılan gliserol yerine ekstre veya çözücüsü olan %59.07 CSW ilave edilen filmlerin düşük YM, yüksek GD ve yüksek %KU gösterdiği belirlenmiştir. Dolayısıyla filmler kontrole göre daha esnek ve daha yüksek dirençli hale gelmiştir.

Literatürdeki çalışmalar incelendiğinde farklı sonuçlar elde edildiği görülmektedir. Liu vd. (2019) κ -karragenan bazlı filmlere *Lycium ruthenicum* Murr ekstre ilavesi ile YM ve

GD değerinin azaldığını tespit etmişlerdir. Ekstrenin eklenmesi ile polimerler arasındaki moleküler etkileşimin zayıfladığını ve böylece filmin kompakt yapısının zayıflamasına bağlı olarak YM ve GD değerin azalmış olabileceğini bildirmişlerdir. Thakur vd. (2022) NADES'leri kullanarak siyah pirinçten antosiyaninlerin ekstraksiyonunu gerçekleştirmişler ve elde edilen NADES-antosiyanin çözeltisini yenilebilir filme ilave etmişlerdir. Filme NADES-antosiyanin ilavesinin %KU'yu artırırken, YM ve GD'yi azalttığını tespit etmişlerdir. Braham vd. (2022) metilselüloz bazlı filmlere plastikleştirici olarak DES veya DES *Moringa oleifera* ekstresi eklemişlerdir. Çalışma sonunda formülasyona DES veya ekstre eklendiğinde metilselüloz zincirleri arasındaki moleküller arası bağların azaldığını ve bunun da daha az dirençli bir filme neden olduğu bildirilmiştir (Braham vd. 2022). YM değerlerine ilişkin olarak, herhangi bir plastikleştirici ilavesinin metilselüloz ağının kararlı yapısını bozduğu ve YM değerlerinde düşüşe neden olduğu, daha esnek filmlerin elde edildiğini rapor etmişlerdir. Bu tez çalışmasında elde edilen ekstrenin, filmin gerilme direncini artırdığının tespit edilmesi önemli bir sonuçtur.

Film yapılarında ekstre eklenmesiyle olan değişikliklerin incelenmesi amacıyla gerçekleştirilen FTIR analizinde, kovalent bağlarda ve kimyasal etkileşimlerde önemli bir değişikliğin meydana gelmediği belirlenmiştir. Literatürde de filmlere katkı maddelerinin eklenmesi ile film örneklerinin FTIR spektrumunda önemli farklılıklar olmadığı rapor edilmiştir (Ferreira vd. 2014, Dordevic vd. 2021). Dordevic vd. (2021) doğal yaban mersini, kırmızı üzüm ve maydanoz ekstrelerini yenilebilir film yapısına ilave ettiklerinde yeni absorpsiyon bantlarının oluşmadığını tespit etmişlerdir.

Ekstrelerin karragenan bazlı filmlerin morfolojisi üzerine etkisini belirlemek amacıyla SEM analizleri gerçekleştirilmiştir. Buna göre kontrol filmlerinin ekstre içeren filmlere göre daha homojen ve pürüzsüz bir yüzey sergiledikleri ve antosiyanin içeren filmlerin ise yüzeyinde herhangi bir kırılma veya faz ayrımının olmadığı gözlenmiştir. Ayrıca antosiyaninlerin eklenmesiyle film ağındaki bazı çözünmeyen polifenol parçacıkları nedeniyle yüzey pürüzlülüğünün arttığı görülmüştür. Ekstre içeren filmlerde bazı küçük beyaz noktaların varlığı, antosiyanin açısından zengin ekstrenin safsızlığından ve çözünmeyen parçacıkların topaklanmasından kaynaklanmıştır. Benzer bir durum *Echium amoenum* bitki ekstresi ile protein bazlı yenilebilir film hazırlamış olan Moghadam vd.

(2021) tarafından da ortaya konulmuştur. Ayrıca literatürde nar ve nar kabuğu ekstresi içeren karregen film (Y. Liu vd. 2020), *Lycium ruthenicum* Murr meyve ekstresi içeren karregen film (J. Liu vd. 2019) ve greyfurt çekirdeği ekstresi içeren kitosan filmlerde (Tan vd. 2015) ekstrelerin polimer matrislerine eklenmesi ile heterojen ve/veya pürüzlü yüzeyler gösterdiği bildirilmiştir.

Gıdaların bozunmalarının önlenmesi ve depolama stabilitesini artırabilmek amacıyla endüstriyel işlemlerde sentetik antimikrobiyaller gıdaya doğrudan dahil edilmektedir (Espitia vd. 2014). Ancak bu durumda gıdalarda bulunan farklı bileşenler eklenen aktif maddelerin antimikrobiyal etkinliğini azaltabilmektedir. Ayrıca doğrudan ilave, bakteri popülasyonlarında anında ancak kısa vadeli bir azalmaya neden olmaktadır. Bu nedenle kullanılan filmlerin antimikrobiyal özellik taşıması önemlidir. Antimikrobiyal özellikteki filmler sayesinde antimikrobiyal maddeler gıdaya yavaşça geçerek aktivitelerini uzun bir süre boyunca koruyabilmekte, dolayısıyla gıdayı bozunmaktan korumaktadır (Benbettaieb vd. 2019). Bu tez çalışması kapsamında elde edilen filmlerde gıda kaynaklı patojenlere karşı antimikrobiyal aktivite elde edilememiştir. Literatür incelendiğinde antimikrobiyal filmlerin etkinliği aktif maddelerin film içindeki difüzyonuna dayandığı, dolayısıyla film sentezi aşaması ve sonrasında ekstrede bulunan aktif madde moleküllerinin boyutu şekli, ayrıca filmi oluşturan polimer yapısı (gözenek boyutu, polimerik zincir esnekliği) ve çevresel koşulların (pH, su aktivitesi ve sıcaklık) difüzyonu etkileyerek ekstre film içinde antimikrobiyal aktivite gösterememesine sebep olabileceği belirtilmiştir (Zactiti ve Kieckbusch 2009).

Dolayısıyla film içindeyken herhangi bir inhibisyon yaratmayan ekstre kendisi direkt olarak antimikrobiyal aktivite deneylerinde kullanılmıştır. Sonuçlara göre şalgam suyu tesisi atığından CSW (4:1:4) ile optimum koşullar altında elde edilen ekstre incelenen tüm gıda patojenlerine karşı inhibisyon etki gösterdiği belirlenmiştir. Çözücü olan NADES de antimikrobiyal aktivite göstermiş ancak ekstre çözücüsüne göre daha fazla inhibisyon yaratmıştır.

Ekstre ve çözücüsünün gram pozitif bakterilere karşı daha fazla antimikrobiyal aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. Bunun nedeni gram-negatif ve gram-pozitif bakterilerinin

hücre duvarı yapılarının farklılığıdır. Bu durum bu bakterilerin antimikrobiyal bileşiklerle etkileşimini etkilemektedir. Gram-pozitif bakterilerin hücre duvarları bir peptidoglikan tabakasından oluşmaktadır. Buna karşılık gram-negatif bakteriler, dış zar adı verilen ek bir lipopolisakkarit tabakasına sahiptir. Bu dış zar peptidoglikan katmanını çevreleyerek antimikrobiyal maddelerin girişini kısıtlamaktadır. Bu nedenle gram-negatif bakterileri antimikrobiyallere karşı daha dirençli iken gram pozitif bakterileri daha duyarlı olmaktadır (Biswas vd. 2013).

Bu tez çalışmasında ekstrenin gösterdiği antimikrobiyal aktivitenin filmlere yansıtılabilmesi için kullanılan ekstre miktarı artırıldığında film yapısının bozulduğu belirlenmiştir.

Hasat sonrasında olgunlaşmaya devam eden domates, özellikle nakliye ve pazarlama sırasında hızla bozulmaya uğramakta bu da büyük ekonomik kayıplara yol açmaktadır. Özellikle sıcaklığın yüksek olduğu tropik bölgelerde domatesin hasat sonrası raf ömrüyle ilgili en önemli faktör solunum hızının artmasıdır. Bu olay meyvenin daha hızlı olgunlaşmasına ve meyve kalitesinin bozulmasına neden olmaktadır (Ali vd. 2010). Bu nedenle biyolojik olarak parçalanabilen filmler nem kaybını, oksijeni ve diğer gazların geçişini azaltarak domatesin raf ömrünü uzatmak için bir alternatif olabilmektedir. Bu tez çalışmasında hazırlanmış olan filmler benzer şekil ve boyutlardaki domateslerin kaplanması kullanılmış ve otuz gün boyunca kaplanmış ve kaplanmamış domateslerdeki fiziksel değişiklikler takip edilmiştir. Otuz günün sonunda kaplanmamış olan domatesin tamamen kuruduğu ve çürüdüğü, kaplanmış olanların ise nispeten daha iyi durumda olduğu belirlenmiş yani daha uzun raf ömrüne sahip olduğu belirlenmiştir. Ekstre içeren filmlerin kontrollerine göre daha iyi koruma sağladığı gözlenmiştir. Benzer sonuçlar literatürde de sunulmuştur. Abdullah ve Charles (2021) ararot nişastası içeren karragenan bazlı yenilebilir filmler ile domates kaplamışlar ve 10 günlük depolama süresi boyunca kontrol gruplarına kıyasla kaplanan domateslerin görünümünü daha iyi korunduklarını bildirmişlerdir. Sganzerla vd. (2021) ise böğürtlen ekstresi içeren polisakkarit bazlı filmleri domatesleri kapladıklarında 15 günlük depolama süresince meyvelerin korunduğunu ve yumuşamalarının engellendiğini belirtmişlerdir (Sganzerla vd. 2021).

Bu tez çalışması kapsamında literatürde ilk kez;

- i) şalgam suyu tesisi atığından ultrasonik dalga ekstraksiyonu ile yeşil çözücüler olan NADES'ler kullanılarak biyoaktif bileşenlerin geri kazanımı incelenmiş
- ii) seçilen NADES ile TMA optimizasyonu gerçekleştirilmiş,
- iii) elde edilen ekstre farklı stratejiler ile yenilebilir film sentezinde kullanılmıştır.

Yenilebilir filmlere ekstre eklenmesi ile elde edilmesi beklenen avantajlardan olan antioksidan aktivite değerlerinin artması, geçirgenlik değerlerinin azalması, mekanik özelliklerinin artması ve meyvenin raf ömrünün uzaması bu çalışmada sentezlenen filmler ile sağlanabilmiştir. Dolayısıyla sıfır maliyeti olan bir atıktan geri kazanılan katma değeri yüksek bileşenler yenilebilir film sentezinde kullanılarak sürdürülebilir, çevre dostu yeşil bir süreç ortaya konulmuştur.

İleriki çalışmalarda filmlerin ekstreye yakın düzeyde antioksidan ve antimikrobiyal aktivite gösterebilmeleri için, yüksek miktarda ekstre içeriğine dayanıklı olan farklı polimerler kullanılarak yenilebilir filmler sentezlenmesi önerilmektedir.

KAYNAKLAR

- Abbott, A. P., Boothby, D., Capper, G., Davies, D. L., & Rasheed, R. K. 2004. Deep Eutectic Solvents formed between choline chloride and carboxylic acids: Versatile alternatives to ionic liquids. *Journal of the American Chemical Society*, 126(29), 9142–9147.
- Abdillah, A.A., Charles, A.L. 2021. Characterization of a natural biodegradable edible film obtained from arrowroot starch and iota-carrageenan and application in food packaging. *Int. J. Biol. Macromol.* 191, 618–626.
- Adilah, A. N., Jamilah, B., Noranizan, M. A., & Hanani, Z. A. N. 2018. Utilization of mango peel extracts on the biodegradable films for active packaging. *Food Packaging and Shelf Life*, 16, 1–7.
- Agcam, E, Akyıldız, A, Kamat, S, Balasubramaniam, VM. 2021. Bioactive Compounds Extraction from the Black Carrot Pomace with Assistance of High Pressure Processing: An Optimization Study. *Waste and Biomass Valorization*, 12: 5959–5977.
- Ağcam, E, Akyıldız, A. 2015. Effects of different solvents and acid concentrations on extraction of anthocyanins from black carrot pomace 40: 149–156.
- Alasalvar, C.; Grigor, J.M.; Zhang, D.L.; Quantick, P.C.; Shahidi, F. 2001. Comparison of volatiles, phenolics, sugars, antioxidant vitamins, and sensory quality of different colored carrot varieties. *J. Agric. Food Chem.* 49, 1410–1416.
- Algarra, M., Fernandes, A., Mateus, N., de Freitas, V., Esteves da Silva, J. C. G., Casado, J. 2014. "Anthocyanin profile and antioxidant capacity of black carrots (*Daucus carota* L. ssp. *sativus* var. *atrorubens* Alef.) from Cuevas Bajas, Spain". *Journal of Food Composition and Analysis*, 33(1), 71–76.
- Ali, A., Maqbool, M., Ramachandran, S., & Alderson, P. G. 2010. Gum arabic as a novel edible coating for enhancing shelf-life and improving postharvest quality of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 58(1), 42–47.
- Arnous, A., Makris, D. P., & Kefalas, P. 2001. Effect of principal polyphenolic components in relation to antioxidant characteristics of aged red wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(12), 5736–5742.
- Bajkacz, S., & Adamek, J. 2017. Evaluation of new natural deep eutectic solvents for the extraction of isoflavones from soy products. *Talanta*, 168, 329–335.
- Baldwin, E.A., J.K. Burns, W. Kazokas, J.K. Brecht, R.D. Hagenmaier, R.J. Bender, and E. Pesis. 1999. Effect of two edible coatings with different permeability characteristics on mango (*Mangifera indica* L.) ripening during storage. *Postharvest Biol. Technol.* 17:215–226.

- Benbettaieb, N., Debeaufort, F., & Karbowiak, T. 2019. Bioactive edible films for food applications: mechanisms of antimicrobial and antioxidant activity. In *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 59 (21), 3431–3455.
- Biao, Y., Yuxuan, C., Qi, T., Ziqi, Y., Yourong, Z., McClements, D. J., & Chongjiang, C. 2019. Enhanced performance and functionality of active edible films by incorporating tea polyphenols into thin calcium alginate hydrogels. *Food Hydrocolloids*, 97.
- Biswas, B., Rogers, K., McLaughlin, F., Daniels, D., & Yadav, A. 2013. Antimicrobial activities of leaf extracts of guava (*psidium guajava* L.) on two gram-negative and gram-positive bacteria. *International Journal of Microbiology*.
- Bosiljkov, T., Dujmić, F., Cvjetko Bubalo, M., Hribar, J., Vidrih, R., Brnčić, M., Zlatić, E., Radojčić Redovniković, I., & Jokić, S. 2017. Natural deep eutectic solvents and ultrasound-assisted extraction: Green approaches for extraction of wine lees anthocyanins. *Food and Bioproducts Processing*, 102, 195–203.
- Braham, F., Amaral, L. M. P. F., Biernacki, K., Carvalho, D. O., Guido, L. F., Magalhães, J. M. C. S., Zaidi, F., Souza, H. K. S., & Gonçalves, M. P. 2022. Phenolic Extraction of *Moringa oleifera* Leaves in DES: Characterization of the Extracts and Their Application in Methylcellulose Films for Food Packaging. *Foods*, 11(17).
- Bubalo, M.C., Urko, N. C. ', Tomašević', M., Tomašević', T., Kovačević, K., Kovačević'ganic, K., Kovačević'ganic', K., Radojčić, I., Radojčić'redovnikovic, R., & Radojčić'redovnikovic', R. 2016. Green extraction of grape skin phenolics by using deep eutectic solvents. *Food Chem.* 200, 159-166.
- Cannavacciuolo, C., Pagliari, S., Frigerio, J., Giustra, C. M., Labra, M., & Campone, L. 2023. Natural Deep Eutectic Solvents (NADESs) Combined with Sustainable Extraction Techniques: A Review of the Green Chemistry Approach in Food Analysis. In *Foods*, 12 (1) MDPI.
- Cao, G., Emin, S., Prior, R., L. 1996. Antioxidant Capacity of Tea and Common Vegetables *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44, 3426-3431.
- Castro-Muñoz, R., Msahel, A., Galiano, F., Serocki, M., Ryl, J., Hamouda, B., Hafiane, A., Boczkaj, G., & Figoli, A. 2022. Towards azeotropic MeOH-MTBE separation using pervaporation chitosan-based deep eutectic solvent membranes. *Separation and Purification Technology*, 281, 1383–5866.
- Cerqueira M.A.P.R, Pereira R.N.C, da Silva Ramos O.L, Teixeira J.A.C, Vicente A.A. 2017. Edible food packaging: materials and processing technologies.
- Chandrasekara, A. 2019. "Phenolic Acids". *Encyclopedia of Food Chemistry*, 535–545.
- Chemat, F., Rombaut, N., Sicaire, A.-G., Meullemiestre, A., Fabiano-Tixier, A.-S., & Abert-Vian, M. 2016. Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review. *Ultrasonic Sonochemistry*, 34, 540–560.

- Chemat, F., Vian, M. A., Ravi, H. K., Khadhraoui, B., Hilali, S., Perino, S., & Tixier, A. S. F. 2019. Review of alternative solvents for green extraction of food and natural products: Panorama, principles, applications and prospects. In *Molecules* 24 (16). MDPI AG.
- Cheng, M., Yan, X., Cui, Y., Han, M., Wang, Y., Wang, J., Zhang, R., & Wang, X. 2022. Characterization and Release Kinetics Study of Active Packaging Films Based on Modified Starch and Red Cabbage Anthocyanin Extract. *Polymers*, 14(6).
- Chi, W., Cao, L., Sun, G., Meng, F., Zhang, C., Li, J., & Wang, L. 2020. Developing a highly pH-sensitive κ -carrageenan-based intelligent film incorporating grape skin powder via a cleaner process. *Journal of Cleaner Production*, 244.
- Choi, SY, Kim, YC, 2011. Whitening effect of black tea water extract on brown guinea pig skin. *Toxicological Research*, 27: 153–160.
- Choi, Y.H.; van Spronsen, J.; Dai, Y.; Verberne, M.; Hollmann, F.; Arends, I.W.C.E.; Witkamp, G.-J.; Verpoorte, R. Are Natural Deep Eutectic Solvents the Missing Link in Understanding Cellular Metabolism and Physiology? *Plant Physiol.* 2011, 156, 1701–1705.
- Clifford, M. N. 2000. "Anthocyanins - Nature, occurrence and dietary burden". *Journal of the Science of Food and Agriculture. J. Sci. Food Agric.* 80, 1063–1072.
- Cui, Q., Liu, J. Z., Wang, L. T., Kang, Y. F., Meng, Y., Jiao, J., & Fu, Y. J. (2018). Sustainable deep eutectic solvents preparation and their efficiency in extraction and enrichment of main bioactive flavonoids from sea buckthorn leaves. *Journal of Cleaner Production*, 184, 826–835.
- Cvetanović, A. (2019). Extractions Without Organic Solvents: Advantages and Disadvantages. *Chemistry Africa*, 2(3), 343–349.
- Debeaufort, F., Quezada-Gallo, J. A., & Voilley, A. 1998. Edible films and coatings: Tomorrow's packagings: A review. In *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 38 (4), 299–313. Taylor and Francis Inc.
- Dhanapal, A., Rajamani, L., & Banu, Ms. 2012. Edible films from Polysaccharides. *Food Sci. Qual.* 3, 9–18.
- Dimidi, E., Cox, S. R., Rossi, M., & Whelan, K. 2019. Fermented foods: Definitions and characteristics, impact on the gut microbiota and effects on gastrointestinal health and disease. In *Nutrients* 11, 8.
- Długosz, O. 2023. Natural Deep Eutectic Solvents in the Synthesis of Inorganic Nanoparticles. In *Materials* 16(2). MDPI.
- Dordevic, S., Dordevic, D., Sedlacek, P., Kalina, M., Tesikova, K., Antonic, B., Tremlova, B., Tremel, J., Nejezchlebova, M., Vapenka, L., Rajchl, A., & Bulakova, M. (2021). Incorporation of natural blueberry, red grapes and parsley extract by-products into the production of chitosan edible films. *Polymers*, 13(19).

- Duan, L., Dou, L. L., Guo, L., Li, P., & Liu, E. H. (2016). Comprehensive Evaluation of Deep Eutectic Solvents in Extraction of Bioactive Natural Products. *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*, 4(4), 2405–2411.
- Dursun, S., Erkan, N. 2009. Yenilebilir protein filmler ve su ürünlerinde kullanımı. *J Fish Sci.*, 3(4): 352-373.
- Dünya şalgam suyunu keşfetti, 2020. Hürriyet. Erişim Tarihi: 28.02.2024.
- Erten H, Tangüler H, Canbaş A. 2008. A traditional Turkish lactic acid fermented beverage : Shalgam (Salgam). *Food Rev. Int.*, 24 (3): 352-359.
- Espitia, P. J. P., Avena-Bustillos, R. J., Du, W. X., Chiou, B. Sen, Williams, T. G., Wood, D., Mchugh, T. H., & Soares, N. F. F. (2014). Physical and antibacterial properties of açai edible films formulated with thyme essential oil and apple skin polyphenols. *Journal of Food Science*, 79(5).
- Fernando, CD, Soysa, P, 2015. Extraction kinetics of phytochemicals and antioxidant activity during black tea (*Camellia sinensis* L.) brewingitle. *Nutrition Journal*, 14: 74– 80.
- Ferreira, A. S., Nunes, C., Castro, A., Ferreira, P., & Coimbra, M. A. 2014. Influence of grape pomace extract incorporation on chitosan films properties. *Carbohydrate Polymers*, 113, 490–499.
- Franssen, L. R., Krochta, J. M. 2003. Edible coatings containing natural antimicrobials for processed foods. In *Natural antimicrobials for minimal processing of foods*. Ed. S. Roller, CRC Press, Boca Raton, pp.250-262.
- Fuad, F.M.; Nadzir, M.M.; Harun, A. 2021. Hydrophilic natural deep eutectic solvent: A review on physicochemical properties and extractability of bioactive compounds. *J. Mol. Liq.* 339, 116923.
- Gennadios, A.; Hanna, M.A.; Kurth, L.B. 1997. Application of edible coatings on meats, poultry and seafoods: A review. *LWT Food Sci. Technol.* 30, 337–350.
- Giusti, MM, Wrolstad, R., 2001. Characterization and Measurement of Anthocyanins by UV-Visible Spectroscopy. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*. 683-695.
- Gizir, A. M., Turker, N., & Artuvan, E. 2008. Pressurized acidified water extraction of black carrot [*Daucus carota* ssp. *sativus* var. *atrorubens* Alef.] anthocyanins. *European Food Research and Technology*, 226(3), 363–370.
- Guilbert, S.; Gontard, N.; Cuq, B. Technology and applications of edible protective films. *Packag. Technol. Sci.* 1995, 8, 339–346.
- Guo, N., Ping-Kou, Jiang, Y. W., Wang, L. T., Niu, L. J., Liu, Z. M., & Fu, Y. J. 2019. Natural deep eutectic solvents couple with integrative extraction technique as an effective approach for mulberry anthocyanin extraction. *Food Chemistry*, 296, 78–85.

- Hamdi Zainal-Abidin, M., Hayyan, M., Hayyan, A., & Subramanian Jayakumar, N. 2017. *New horizons in the extraction of bioactive compounds using deep eutectic solvents: A review*.
- Han, J. H. 2013. Edible Films and Coatings: A Review. In *Innovations in Food Packaging: Second Edition* 213–255. Elsevier Ltd.
- Huang, W., Xue, A., Niu, H., Jia, Z., Wang, J. 2009. "Optimised ultrasonic-assisted extraction of flavonoids from Folium eucommiae and evaluation of antioxidant activity in multi-test systems in vitro". *Food Chemistry*.
- Jabbar, S., Abid, M., Wu, T., Hashim, M. M., Saeeduddin, M., Hu, B., Lei, S., & Zeng, X. 2015. Ultrasound-Assisted Extraction of Bioactive Compounds and Antioxidants from Carrot Pomace: A Response Surface Approach. *Journal of Food Processing and Preservation*, 39(6), 1878–1888.
- Jancikova, S., Dordevic, D., Jamroz, E., Behalova, H., & Tremlova, B. 2020. Chemical and physical characteristics of edible films, based on κ - And ι -carrageenans with the addition of lapacho tea extract. *Foods*, 9(3).
- Jovanović, M.S.; Krgović, N.; Živković, J.; Stević, T.; Zdunić, G.; Bigović, D.; Šavikin, K. 2022. Ultrasound Assisted Natural Deep Eutectic Solvents Extraction of Bilberry Anthocyanins: Optimization, Bioactivities, and Storage Stability. *Plants* 11, 2680.
- Kammerer, D. R., Schillmöller, S., Maier, O., Schieber, A., Carle, R., Kammerer, D. R., Schillmöller, S., Schieber, A., Carle, R., Maier, O., & Acylated anthocyanins CIE, colourants L. 2007. Colour stability of canned strawberries using black carrot and elderberry juice concentrates as natural colourants. *Eur Food Res Technol*, 224, 667–679.
- Kammerer, D., Carle, R., & Schieber, A. (2004a). Characterization of phenolic acids in black carrots (*Daucus carota* ssp. *sativus* var. *atrorubens* Alef.) by high-performance liquid chromatography/ electrospray ionization mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 18(12), 1331–1340.
- Kammerer, D., Carle, R., & Schieber, A. (2004b). Quantification of anthocyanins in black carrot extracts (*Daucus carota* ssp. *sativus* var. *atrorubens* Alef.) and evaluation of their color properties. *European Food Research and Technology*, 219(5), 479–486.
- Khan, A., Riahi, Z., Tae Kim, J., & Rhim, J. W. 2024. Carrageenan-based multifunctional packaging films containing Zn-carbon dots/anthocyanin derived from Kohlrabi peel for monitoring quality and extending the shelf life of shrimps. *Food Chemistry*, 432.
- Khandere, V., W., S., Singh, M., Kaur, C. 2011. Black carrot juice: Processing effects on antioxidant composition and color. *Food and Bioproducts Processing* 89, 482–486.
- Kırca, A., Özkan, M., Cemeroğlu, B. 2006. Stability of black carrot anthocyanins in various fruit juices and nectars 97, 598–605.

- Knorr, D., Ade-Omowaye, B. I. O., & Heinz, V. 2002. Nutritional improvement of plant foods by non-thermal processing. *Proceedings of the Nutrition Society*, 61(2), 311–318.
- Kong, I., Degraeve, P., & Pui, L. P. 2022. Polysaccharide-Based Edible Films Incorporated with Essential Oil Nanoemulsions: Physico-Chemical, Mechanical Properties and Its Application in Food Preservation—A Review. In *Foods* (Vol. 11, Issue 4). MDPI.
- Krochta, J.M. 2002. Proteins as raw materials for films and coatings: definitions, current status and opportunities. In *Protein-based films and coatings*. Ed. A. Genadinos, CRC Press, Boca Raton, 1-41.
- Kumar, M, Dahuja, A, Sachdev, A, Kaur, C, Varghese, E, Saha, S, Sairam, KVSS, 2019. Valorisation of black carrot pomace: microwave assisted extraction of bioactive phytochemicals and antioxidant activity using Box–Behnken design. *Journal of Food Science and Technology*, 56: 995–1007.
- Liu, J., Wang, H., Guo, M., Li, L., Chen, M., Jiang, S., Li, X., & Jiang, S. 2019. Extract from *Lycium ruthenicum* Murr. Incorporating κ -carrageenan colorimetric film with a wide pH–sensing range for food freshness monitoring. *Food Hydrocolloids*, 94, 1–10.
- Liu, X. Y., Ou, H., Gregersen, H., & Zuo, J. 2023. Deep eutectic solvent-based ultrasound-assisted extraction of polyphenols from *Cosmos sulphureus*. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 32.
- Liu, Y., Qin, Y., Bai, R., Zhang, X., Yuan, L., & Liu, J. 2019. Preparation of pH-sensitive and antioxidant packaging films based on κ -carrageenan and mulberry polyphenolic extract. *International Journal of Biological Macromolecules*, 134, 993–1001.
- Liu, Y., Zhang, X., Li, C., Qin, Y., Xiao, L., & Liu, J. 2020. Comparison of the structural, physical and functional properties of κ -carrageenan films incorporated with pomegranate flesh and peel extracts. *International Journal of Biological Macromolecules*, 147, 1076–1088.
- Marco, M. L., Heeney, D., Binda, S., Cifelli, C. J., Cotter, P. D., Foligné, B., Gänzle, M., Kort, R., Pasin, G., Pihlanto, A., Smid, E. J., & Hutkins, R. 2017. Health benefits of fermented foods: microbiota and beyond. In *Current Opinion in Biotechnology* 44, 94–102. Elsevier Ltd.
- Mazza, G., Miniati, E., 1993. Anthocyanins in Fruits, Vegetables and Grains. CRC Press, London.
- Netzel, M., Netzel, G., Kammerer, D. R., Schieber, A., Carle, R., Simons, L., Konczak, I. 2007. "Cancer cell antiproliferation activity and metabolism of black carrot anthocyanins". *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 8, 365–372.

- Nirmal, N. P., Khanashyam, A. C., Mundanat, A. S., Shah, K., Babu, K. S., Thorakkattu, P., Al-Asmari, F., & Pandiselvam, R. 2023. Valorization of Fruit Waste for Bioactive Compounds and Their Applications in the Food Industry. In *Foods* 12, 3.
- Nogueira, G. F., Soares, C. T., Cavasini, R., Fakhouri, F. M., & de Oliveira, R. A. 2019. Bioactive films of arrowroot starch and blackberry pulp: Physical, mechanical and barrier properties and stability to pH and sterilization. *Food Chemistry*, 275, 417–425.
- Otoni, C. G., Avena-Bustillos, R. J., Azeredo, H. M. C., Lorevice, M. V., Moura, M. R., Mattoso, L. H. C., & McHugh, T. H. 2017. Recent Advances on Edible Films Based on Fruits and Vegetables—A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 16(5), 1151–1169.
- Oun, A. A., & Rhim, J. W. 2017. Carrageenan-based hydrogels and films: Effect of ZnO and CuO nanoparticles on the physical, mechanical, and antimicrobial properties. *Food Hydrocolloids*, 67, 45–53.
- Pavlat, A.E.; Orts, W. Edible films and coatings: Why, what, and how? 2009. In *Edible Films and Coatings for Food Applications*; Huber, K.C., Embuscado, M.E., Eds.; Springer New York: New York, NY, USA,. 1–23.
- Polat, S., Guclu, G., Kelebek, H., Keskin, M., Selli, S. 2022. Comparative elucidation of colour, volatile and phenolic profiles of black carrot (*Daucus carota* L.) pomace and powders prepared by five different drying methods. *Food Chemistry*, 369, 130941.
- Qin, Y., Liu, Y., Yong, H., Liu, J., Zhang, X., Liu, J. 2019. Preparation and characterization of active and intelligent packaging films based on cassava starch and anthocyanins from *Lycium ruthenicum* Murr. *International Journal of Biological Macromolecules*, 134, 80–90.
- Rasul, M. G. (2018). Conventional Extraction Methods Use in Medicinal Plants, their Advantages and Disadvantages. In *International Journal of Basic Sciences and Applied Computing*. 2, 10–14.
- Riaz, A., Lei, S., Akhtar, H. M. S., Wan, P., Chen, D., Jabbar, S., Abid, M., Hashim, M. M., & Zeng, X. 2018. Preparation and characterization of chitosan-based antimicrobial active food packaging film incorporated with apple peel polyphenols. *International Journal of Biological Macromolecules*, 114, 547–555.
- Rifna, E. J., Misra, N. N., & Dwivedi, M. 2023. Recent advances in extraction technologies for recovery of bioactive compounds derived from fruit and vegetable waste peels: A review. In *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 63(6), 719–752. Taylor and Francis Ltd.
- Sedayu, B.B, Cran, M.J., Bigger, S.W. 2019. A review of property enhancement techniques for carrageenan-based films and coatings, *Carbohydr. Polym.* 216, 287–302.

- Sevimli-Gur, C., Cetin, B., Akay, S., Gulce-Iz, S., Yesil-Celiktas, O. 2013. "Extracts from Black Carrot Tissue Culture as Potent Anticancer Agents". *Plant Foods for Human Nutrition*. 68, 293–298.
- Sganzerla, W. G., Pereira Ribeiro, C. P., Uliana, N. R., Cassetari Rodrigues, M. B., da Rosa, C. G., Ferrareze, J. P., Veeck, A. P. de L., Nunes, M. R. 2021. Bioactive and pH-sensitive films based on carboxymethyl cellulose and blackberry (*Morus nigra* L.) anthocyanin-rich extract: A perspective coating material to improve the shelf life of cherry tomato (*Solanum lycopersicum* L. var. *cerasiforme*). *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 33.
- Shishov, A., Bulatov, A., Locatelli, M., Carradori, S., & Andruch, V. 2017. Application of deep eutectic solvents in analytical chemistry. A review. In *Microchemical Journal* 135, 33–38.
- Silva, D. T. da, Pauletto, R., Cavaleiro, S. da S., Bochi, V. C., Rodrigues, E., Weber, J., Silva, C. de B. da, Morisso, F. D. P., Barcia, M. T., & Emanuelli, T. 2020. Natural deep eutectic solvents as a biocompatible tool for the extraction of blueberry anthocyanins. *Journal of Food Composition and Analysis*, 89.
- Simona, J., Dani, D., Petr, S., Marcela, N., Jakub, T., & Bohuslava, T. 2021a. Edible films from carrageenan/orange essential oil/trehalose—structure, optical properties, and antimicrobial activity. *Polymers*, 13(3), 1–19.
- Simona, J., Dani, D., Petr, S., Marcela, N., Jakub, T., & Bohuslava, T. 2021b. Edible films from carrageenan/orange essential oil/trehalose—structure, optical properties, and antimicrobial activity. *Polymers*, 13(3), 1–19.
- Singh, D. P., Beloy, J., McInerney, J. K., Day, L. 2012. "Impact of boron, calcium and genetic factors on vitamin C, carotenoids, phenolic acids, anthocyanins and antioxidant capacity of carrots (*Daucus carota*)". *Food Chemistry*.
- Skurtys, O., Acevedo, C., Pedreschi, F., Enronoe, J., Osorio, F., & Aguilera, J. M. 2011. Food hydrocolloid edible films and coatings. *Food Hydrocolloid Edible Films and Coatings*, 1–66.
- Şen, M., & Erboz, E. N. 2010. Determination of critical gelation conditions of κ -carrageenan by viscosimetric and FT-IR analyses. *Food Research International*, 43(5), 1361–1364.
- Tan, Y. M., Lim, S. H., Tay, B. Y., Lee, M. W., & Thian, E. S. 2015. Functional chitosan-based grapefruit seed extract composite films for applications in food packaging technology. *Materials Research Bulletin*, 69, 142–146.
- Tangüler, H., Erten, H. 2013. Selection of potential autochthonous starter cultures from shalgam, a traditional Turkish lactic acid-fermented beverage. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 37(2), 212–220.

- Tangüler, H., Erten, H., Bozdogan, A., Aksay, S., Kelebek, H. 2021. Comparison of anthocyanin profiles in şalgams (shalgams) produced with different production procedures. *Journal of Food Processing and Preservation*, 1–11.
- Tangüler, H., Utus, D., Erten, H. 2014. Effect of black carrot size usage on the quality of shalgam (şalgam): A traditional Turkish lactic acid fermented beverage. *Indian Journal of Traditional Knowledge*, 13(4), 647–653.
- Tanrıseven, D., Dıblan, S., Selli, S. 2018. Şalgam suyunun üretim yöntemleri ve biyoaktif bileşenleri. *Artıbilim Adana Bilim ve Teknol. Üniversitesi Fen Bilim. Derg.* 1, 38-45.
- Thakur, R., Gupta, V., Ghosh, T., & Das, A. B. 2022. Effect of anthocyanin-natural deep eutectic solvent (lactic acid/fructose) on mechanical, thermal, barrier, and pH-sensitive properties of polyvinyl alcohol based edible films. *Food Packaging and Shelf Life*, 33.
- Turker, N., Aksay, S., Ekiz, H. I. 2004. Effect of storage temperature on the stability of anthocyanins of a fermented black carrot (*Daucus carota* var. L.) beverage: Shalgam. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(12), 3807–3813.
- Türker, D.A., Doğan, M., 2021. Application of deep eutectic solvents as a green and biodegradable media for extraction of anthocyanin from black carrots. 138, 110775.
- Türker, N., Erdogdu, F. 2006. Effects of pH and temperature of extraction medium on effective diffusion coefficient of anthocyanin pigments of black carrot (*Daucus carota* var. L.). *Journal of Food Engineering*, 76, 579-583.
- Türkyılmaz, M., Yemis, O., Özkan, M. 2012. *Clarification and pasteurisation effects on monomeric anthocyanins and percent polymeric colour of black carrot (Daucus carota L.) juice*. 134, 1052-1058.
- Usman, I., Hussain, M., Imran, A., Afzaal, M., Saeed, F., Javed, M., Afzal, A., Ashfaq, I., Al Jbawi, E., & A. Saewan, S. 2022. Traditional and innovative approaches for the extraction of bioactive compounds. In *International Journal of Food Properties* 25 (1), 1215–1233. Taylor and Francis Ltd.
- Ünlü, A. E. 2021. Green and Non-conventional Extraction of Bioactive Compounds from Olive Leaves: Screening of Novel Natural Deep Eutectic Solvents and Investigation of Process Parameters. *Waste and Biomass Valorization*, 12(10), 5329–5346.
- Ünlü, A. E., Arıkaya, A., Takaç, S. 2019. Use of deep eutectic solvents as catalyst: A mini-review. *Green Processing and Synthesis*, 8(1), 355–372.
- Velásquez, P., Bustos, D., Montenegro, G., & Giordano, A. 2021. Ultrasound-assisted extraction of anthocyanins using natural deep eutectic solvents and their incorporation in edible films. *Molecules*, 26(4).
- Wang, H., Cao, G., Prior, R.L., 1997. Oxygen radical absorbance capacity of anthocyanin. *J. Agric. Food Chem.*, 45(2):304-309.

- Wang, X., Kong, D., Ma, Z., Zhao, R. 2015. Effect of carrot puree edible films on quality preservation of fresh cut carrots. *Irish Journal of Agricultural and Food Research*. 54, 64-71.
- Wrolstad, R.E. 2004. Anthocyanin pigments—Bioactivity and coloring properties. *Journal of Food Science*, 69 , 419-425.
- Wei, Z., Qi, X., Li, T., Luo, M., Wang, W., Zu, Y., & Fu, Y. 2015. Application of natural deep eutectic solvents for extraction and determination of phenolics in *Cajanus cajan* leaves by ultra performance liquid chromatography. *Separation and Purification Technology*, 149, 237–244.
- Xia, G. H., Li, X. H., & Jiang, Y. hang. 2021. Deep eutectic solvents as green media for flavonoids extraction from the rhizomes of *Polygonatum odoratum*. *Alexandria Engineering Journal*, 60(2), 1991–2000.
- Zactiti, E. M., & Kieckbusch, T. G. 2009. Release of potassium sorbate from active films of sodium alginate crosslinked with calcium chloride. *Packaging Technology and Science*, 22(6), 349–358.
- Zhang, X., Zhao, Y., Shi, Q., Zhang, Y., Liu, J., Wu, X., & Fang, Z. 2021. Development and characterization of active and pH-sensitive films based on psyllium seed gum incorporated with free and microencapsulated mulberry pomace extracts. *Food Chemistry*, 352.
- Zhou, P., Wang, X., Liu, P., Huang, J., Wang, C., Pan, M., & Kuang, Z. 2018. Enhanced phenolic compounds extraction from *Morus alba* L. leaves by deep eutectic solvents combined with ultrasonic-assisted extraction. *Industrial Crops and Products*, 120, 147–154.

EKLER

EK 1 Çalışmada Kullanılan Kimyasal ve Biyokimyasal Maddeler

EK 2 Çalışmada Kullanılan Cihazlar

EK 3 Toplam Fenol Derişimi Kalibrasyon Doğrusu

EK 4 Toplam Flavonoid Derişimi Kalibrasyon Doğrusu

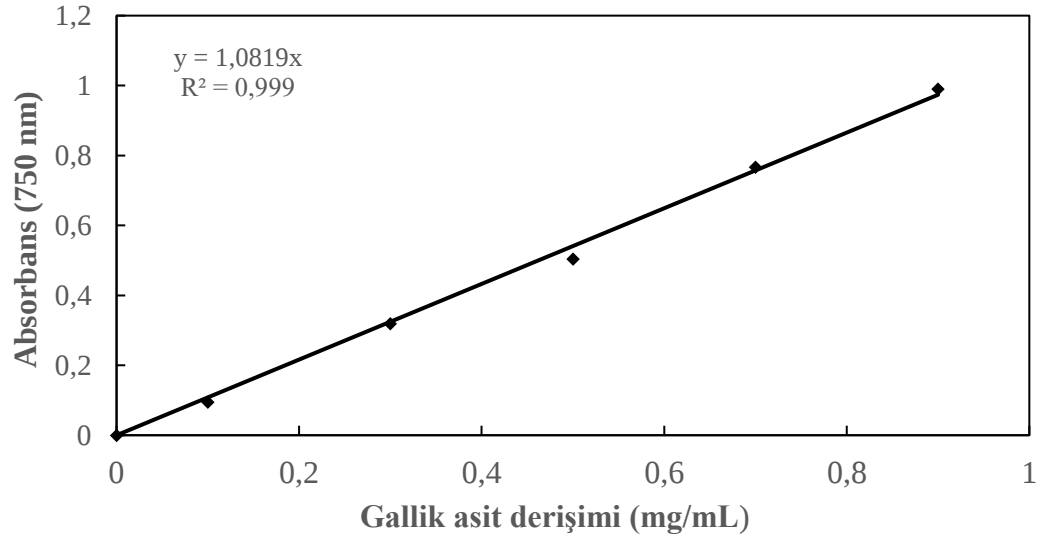
EK 1 Çalışmada Kullanılan Kimyasal ve Biyokimyasal Maddeler

Kimyasal	Firma	Katalog No
Kolin klorür	Sigma	C1879
L-laktik asit	Sigma Aldrich	27714
Etilen glikol	Merck	1.009.492.500
Gliserol	Sigma Aldrich	G5516
D-(+)-sukroz	Applchem	A2211
D-(-)-fruktoz	Merck	104.007
D-(+)-glukoz	Applchem	A3666
Folin-Ciocalteu reaktifi	Sigma Aldrich	F9252
Sodyum karbonat	Isolab	969.023.1000
Etanol	Isolab	9.200.262.500
Metanol	Sigma Aldrich	24229
DPPH	Sigma Aldrich	D9132
Gallik asit	Sigma Aldrich	G7384
Hidroklorik asit	Merck	1.00314.2500
Kuersetin	Sigma	Q4951
Potasyum klorür	Applchem	A2939
Sodyum asetat	Merck	106268
Potasyum disülfid	Merck	105057
κ -karragenan	Fluka	22048

EK 2 Çalışmada Kullanılan Cihazlar

Cihaz	Model
Ultrasonik banyo	Elma, Elmasonic S 30 H
Terazi	Mettler AB54-S; Scaltec
UV-VIS spektrofotometre	Shimadzu UV-1601
Ph metre	Sartorius PP25
Liyofilizatör	Hetosicc, CD 52-1, Heto Lab
Elek sarsma cihazı	Endecotts, Octagon 200
Saf su cihazı	Millipore
HPLC	Waters Aliance
Etüv	Zhichang-ZRD 5110
Manyetik karıştırıcı	Isolab Laborgerate GmbH
Ev tipi blender	Braun MQ9078X

EK 3 Toplam Fenol Derişimi Kalibrasyon Doğrusu



EK 4 Toplam Flavonoid Derişimi Kalibrasyon Doğrusu

