

**AT KESTANESİ (*AESCULUS HIPPOCASTANUM* L.) TOHURLARINDAN
ULTRASONİK VE ALKALİ YÖNTEMLER KULLANARAK NIŞASTA
EKSTRAKSİYONU VE OPTİMİZASYONU**

Zeynep İNATÇI, Ali CİNGÖZ*

Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Mühendislik ve Mimarlık Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Tokat,
Türkiye

Geliş / Received 02.01.2025; Kabul / Accepted: 10.04.2025; Online baskı / Published online: 17.04.2025

İnatçı, Z., Cingöz, A. (2025). At kestanesi (*Aesculus hippocastanum* L.) tohumlarından ultrasonik ve alkali yöntemler kullanarak nişasta ekstraksiyonu ve optimizasyonu. GIDA (2025) 50 (3) 317-328 doi: 10.15237/gida.GD25010

İnatçı, Z., Cingöz, A. (2025). Starch extraction from horse chestnut (*Aesculus hippocastanum* L.) seeds using ultrasonic and alkaline methods and optimization. GIDA (2025) 50 (3) 317-328 doi: 10.15237/gida.GD25010

ÖZ

Bu çalışmada alkali ve ultrason destekli yöntemler kullanılarak at kestanesi (*Aesculus hippocastanum* L.) tohumlarından nişasta ekstraksiyonu ve optimizasyonu amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda optimum ekstraksiyon koşulları yanıt yüzey yöntemi (D-optimal tasarımı) kullanılarak belirlenmiş ve en yüksek nişasta veriminin belirlendiği noktalarda ekstraktlar elde edilmiştir. Alkali yöntem için numune/çözücü oranı (1:1, 1:2, 1:3 w/v), ekstraksiyon süresi (3-12 saat), NaOH oranı (0.25-1 N) bağımsız işlem değişkenleri, ultrason destekli yöntem için 37W ultrason gücü sabit olarak numune/çözücü oranı (1:1, 1:2, 1:3 w/v), ekstraksiyon süresi (30-120 dakika), NaOH oranı (0.25-1 N) bağımsız işlem değişkenleri olarak seçilmiş ve uygulanmıştır. Optimum ekstraksiyon süresi, NaOH oranı ve numune/çözücü oranı alkali yöntem için sırasıyla 12 saat, %1 ve 1:3 w/v; ultrason destekli yöntem için ise sırasıyla 2 saat, %0.68 ve 1:3 w/v olarak belirlenmiştir. Ultrason destekli yöntem nişastaların kül içeriğinde ve b* renk değerinde artışa neden olmuştur. Ekstraksiyon süresi ve çözgen miktarının artması nişasta verimini arttırmıştır.

Anahtar kelimeler: At kestanesi, D-Optimal, nişasta, optimizasyon

STARCH EXTRACTION FROM HORSE CHESTNUT (*Aesculus hippocastanum* L.) SEEDS USING ULTRASONIC AND ALKALINE METHODS AND OPTIMIZATION

ABSTRACT

The aim of this study was to extract and optimize starch from horse chestnut (*Aesculus hippocastanum* L.) seeds using alkaline and ultrasound-assisted methods. Optimum extraction conditions were determined using response surface methodology (D-optimal design) and extracts were obtained at the points where the highest starch yield was determined. For the alkaline method, sample/solvent ratio (1:1, 1:2, 1:3 w/v), extraction time (3-12 h), NaOH ratio (0.25-1 N) were selected and applied as independent process variables, while for the ultrasound-assisted method, 37 W ultrasound power was selected and applied as a constant and sample/solvent ratio (1:1, 1:2, 1:3

* Sorumlu Yazar / Corresponding Author:

✉: ali.cingoz@gop.edu.tr

☎: (+90) 356 252 1616

☎: (+90) 356 252 1729

Zeynep İnatçı; ORCID no: 0000-0003-1049-537X

Ali Cingöz; ORCID no: 0000-0003-0958-2679

w/v), extraction time (30-120 min), NaOH ratio (0.25-1 N) as independent process variables. The optimum extraction time, NaOH ratio, and sample/solvent ratio were determined to be 12 h, 1%, and 1:3 w:v for the alkaline method, respectively, and 2 h, 0.68%, and 1:3 w:v for the ultrasonic-assisted method, respectively. The ultrasonic-assisted method caused an increase in the ash content and b* color value of the starches. Increasing the extraction time and the amount of solvent increased the starch yield.

Keywords: Horse chestnut, D-Optimal, starch, optimization

GİRİŞ

Niştasta, α -1,4 glikozidik bağları ile bağlanmış α -D-glikoz monomerlerinden oluşan düz amiloz zincirleri ve α -1,6 glikozidik bağları ile dallanmış amilopektin zincirlerinden oluşan, bitki dokularında yarı kristal granüller halinde bulunan kompleks bir karbonhidrattır (Lemos vd., 2015). Niştasta, tahılların, baklagillerin, yumruların ve köklerin ana bileşenidir (Lu vd., 2012). Gıda maddelerinde jelleştirici, dolgu maddesi, stabilizatör, sorbent polimer ve yapıştırıcı olarak kullanılmaktadır (Vishal Banyal vd., 2023). Yaygın olarak buğday, patates, manyok, pirinç ve mısır gibi endüstriyel ürünlerden üretilen niştastalar farklı yapısal ve teknolojik kalite özelliklerine sahiptir. Bitki türü, hasat zamanı ve çevresel/iklimsel faktörlere bağlı olarak niştastaların özelliklerinde değişimler meydana geldiği bildirilmektedir (Vishal Banyal vd., 2023). 2050 yılına kadar 10 milyarı aşması beklenen nüfusla birlikte, daha fazla gıda ve enerji üretme ihtiyacı ortaya çıkmaktadır. Bu da daha az fosil yakıt, daha düşük gaz emisyonu ve sıfır katı atık için planlama yapılmasını gerektirmektedir (Duque-Acevedo vd., 2020). Gelişmiş ülkeler ürünlerin yaşam döngüsünü uzatmakta ve atıkları üretim süreçlerine dahil ederek daha verimli bir sistem oluşturmaktadırlar (Molina-Moreno vd., 2017).

Aesculus hippocastanum L., yaprak ve çiçeklerinin dekoratif özellikleri ile 16. yüzyılın sonlarından günümüze kadar park, bahçe ve bulvarlarda süs ağacı olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Aynı zamanda tohum kabukları ve çiçekleri geleneksel ve tıbbi tedavilerde kullanılan değerli bir bitkidir (Dudek-Makuch ve Matlawska, 2011). Fakat bu değerli bitkiden yeterince faydalanılamamakta ve her yıl tonlarca parçalanmış ve dökülmüş meyvelerini bertaraf etmek zorunda kalan belediyelerin bu imha işlemini düzgün bir şekilde yapması

gerekmektedir (Gullón vd., 2020). Önemli bir niştasta ve yağ kaynağı olan at kestanesinin ana biyoaktif bileşenleri, triterpen saponinler (escin), flavonoidler, kumarinler ve proantosiyanidinler dahil olmak üzere 190 farklı bileşen tanımlanmıştır (Amiri vd., 2019; Owczarek-Januszkiewicz vd., 2023). Anti-besinsel faktörler olarak bilinen glikozit ve saponin varlığı at kestanesi tohumlarını güvensiz gıda sınıfına sokmaktadır (FDA, 2023). At kestanesi tohumlarındaki mevcut bu toksik faktörlerin ortadan kaldırılmasında veya en aza indirilmesinde ıslatma ve ultrason destekli yöntemler kullanılmaktadır (Kaur vd., 2012).

Niştasta üretiminde genellikle geleneksel yöntemler tercih edilmektedir. Ancak zaman ve kimyasal tüketimi açısından dezavantajları olan geleneksel ekstraksiyon uygulamalarının popülaritesi her geçen gün azalmaktadır. Ayrıca, geleneksel yöntemler ekstraksiyon parametrelerinin sinerjik etkilerinin göz ardı edilmesine neden olmaktadır. Ultrason destekli ekstraksiyon, bileşiklerin yapısal ve moleküler özelliklerini korurken, bitkilerden hedeflenen bir maddenin ekstrakte edilmesi için kullanılan modern yöntemlerden bir tanesidir. Bu yöntem solvent ve enerji tüketimini azaltmakta, ekstraksiyon süresini kısaltmakta ve prosesi basitleştirmektedir (Amiri vd., 2019).

Yapılan literatür taramalarında at kestanesinden antioksidan, glikoz ve lignin gibi katma değeri yüksek ürünlerin üretilmesine yönelik çalışmalar tespit edilmiştir (Gullón vd., 2020). Ayrıca literatürde alkali yöntem kullanılarak kestane ve at kestanesinden niştasta üretimi ve ultrasonik destekli yöntemin niştasta partiküllerinin özellikleri üzerindeki etkisini araştıran çalışmalar bulunmaktadır (Castaño vd., 2014; Correia ve Beirão-da-Costa, 2012; Lemos vd., 2015; Rafiq vd., 2016; Shah vd., 2016; Ahmad vd., 2020).

Literatürde at kestanesinden nişasta ekstraksiyonunun ultrason destekli yöntemle optimize edildiği sınırlı sayıda çalışma tespit edilmiştir. Ayrıca D-optimal yöntemin kullanıldığı bir çalışmaya da rastlanmamıştır. Bu çalışmada at kestanesinden iki farklı yöntem kullanılarak nişasta ekstraksiyonu gerçekleştirilmiş ve ekstraksiyon işlem şartları D-optimal yöntemi kullanılarak optimize edilmiştir.

MATERYAL VE METOT

Materyal

Nişasta ekstraksiyonu için kullanılan at kestaneleri (*Aesculum hippocastanum* L.) İstanbul'daki (Türkiye) park ve bahçelerden toplanmış ve toplanan tohumlar kullanılıncaya kadar -18°C 'de depolanmıştır. Kimyasal analizlerde kullanılan tüm kimyasallar analitik saflıktadır.

Metot

Kimyasal Analizler

At kestanesinin nem ve kül içeriği sırasıyla AACC Standart Yöntem No. 44-01.01 ve 08-01.01'e göre belirlenmiştir (AACC, 2004). Toplam nişasta içeriği Megazyme (Megazyme Ireland Ltd., Co.) K-TSTA kitleri kullanılarak AACC yöntemleri 76.13'e göre belirlenmiştir. Azot içeriğini belirlemek için mikro-Kjeldahl yöntemi kullanılmıştır (AOAC, 2000). Ham yağ, kurutulmuş numunenin petrol eteri ekstraksiyonu ile Ankom XT10 ekstraksiyon sisteminde gravimetrik olarak belirlenmiştir (Ankom Technology Inc., Macedon, NY) (Ankom, 2009). Örneklerin rengi Minolta Chroma Meter (CR-300 Minolta Japan) ile ölçülmüştür. At kestanesi tohumlarının kalınlıkları ve ağırlıkları tespit edilmiştir.

Deneyel Tasarım ve Yanıt Yüzeyi Metodolojisi (YYM) Nişasta üretiminde optimum verim noktasını belirlemek ve elde edilen verilerin regresyon ve grafik analizlerini oluşturmak amacıyla D-optimal deneyel tasarımı kullanılmıştır (Design Expert V.7 Stat-Ease Inc., Minneapolis). Çalışmada seçilen deneyel parametreler literatür göz önünde bulundurularak belirlenmiştir (Correia ve Beirão-da-Costa, 2010; Correia ve Beirão-da-Costa, 2012; Shah vd., 2016; Ahmad vd., 2020). At kestanesinden alkali yöntemle nişasta üretiminde

kullanılan parametreler: Zaman ($X_1=3-12$ saat), NaOH konsantrasyonları ($X_2=0.25, 0.50, 1.00\%$), Numune/çözelti (w/v) oranı ($X_3=1:1, 1:2, 1:3$) olarak seçilmiş, ultrason destekli yöntem parametreleri ise: Zaman ($X_4=30-120$ dk), NaOH konsantrasyonları ($X_5=0.25, 0.50, 1.00\%$), Numune/çözelti (w/v) oranı ($X_6=1:1, 1:2, 1:3$) olarak belirlenmiştir. At kestanesinden nişasta ekstraksiyonu, Çizelge 1'de gösterildiği gibi toplam 22 farklı koşul için yürütülmüştür. Analiz %5 anlamlılık düzeyi ve %95 güven düzeyi ile gerçekleştirilmiştir.

Optimum koşullar, optimum deneyel koşullar altında ekstraksiyonun iki kopya halinde gerçekleştirilmesiyle teyit edilmiştir. Fischer's testi model eşitliğini elde etmek için kullanılmıştır. Student's testi ise regresyon katsayılarının istatistiksel farkını tespit etmek için kullanılmıştır. Elde edilen model denklemleri Eşitlik 1 (alkali yöntem) ve Eşitlik 2'de (ultrason destekli yöntem), katsayılar ise Çizelge 3'de verilmiştir.

$$Y = 22.07 + (1.60 \cdot X_1) + (0.76 \cdot X_2) - (6.59 \cdot X_3) + (1.44 \cdot X_1 X_2) - (3.98 \cdot X_1 X_3) - (0.80 \cdot X_2 X_3) \quad (1)$$

$$Y = 21.60 + (2.31 \cdot X_1) + (1.99 \cdot X_2) - (5.37 \cdot X_3) + (0.63 \cdot X_1 X_2) - (1.47 \cdot X_1 X_3) - (0.18 \cdot X_2 X_3) \quad (2)$$

Nişasta verimi Eşitlik 3 kullanılarak hesaplanmıştır.

Nişasta Verimi (%) =

$$\frac{\text{Ekstraksiyon sonunda elde edilen toplam nişasta (g)}}{\text{Tohumdaki Toplam Nişasta (g)}} \times 100 \quad (3)$$

Örneklerin Hazırlanması

At kestanesi tohumları kabuğundan ayrılmış ve 3-4 mm kalınlığında parçalar halinde doğranmıştır. Dilimlenen at kestaneleri yüzeysel oksidasyonu engellemek ve renkteki kararmayı önlemek amacıyla %0.5 potasyum metabisülfid ve %1 sitrik asit içeren çözeltide 30 dakika bekletilmiş ve ardından 70°C 'de 12 saat hava akımlı etüvde (Memmert 100-800, Almanya) kurutulmuştur (Singh vd., 2008). Kurutma sonrası örnekler dilimler halinde kullanılmıştır.

Çizelge 1. At kestanesinde nişasta ekstraksiyonunun deneysel tasarımı ve sonuçları
 Table 1. Experimental design and results of starch extraction from horse chestnut

A-HSC						U-HSC				
Değişkenler Variables			Sonuçlar Results			Değişkenler Variables			Sonuçlar Results	
X ₁	X ₂	X ₃	Gerçek Verim (%) Actual Yield (%)	Tahmin Edilen Verim (%) Predicted Yield (%)		X ₄	X ₅	X ₆	Gerçek Verim (%) Actual Yield (%)	Tahmin Edilen Verim (%) Predicted Yield (%)
1	7.39	0.63	1:1	13.83±0.14	14.71	30	0.25	1:2	20.33±0.11	18.81
2	7.90	1.00	1:1	14.42±0.12	15.99	82.38	0.25	1:3	28.13±0.23	25.66
3	3	1.00	1:3	23.12±0.18	23.21	68.38	1.00	1:3	27.24±0.18	28.12
4	11.30	0.25	1:1	14.54±0.21	13.10	30	0.57	1:3	23.45±0.14	22.99
5	7.08	0.25	1:1	12.80±0.08	13.72	30	1.00	1:2	22.01±0.09	22.55
6	12	0.25	1:2	22.52±0.32	20.17	75	0.61	1:3	28.52±0.13	26.89
7	12	1.00	1:3	38.13±0.28	37.24	30	1.00	1:1	17.65±0.21	15.03
8	12	1.00	1:2	19.10±0.11	22.33	75	0.94	1:1	10.94±0.18	14.93
9	3	0.66	1:1	11.94±0.16	13.91	68.38	1.00	1:3	27.74±0.26	28.12
10	3	0.25	1:2	26.67±0.17	26.17	75	0.62	1:2	23.66±0.21	24.29
11	7.50	0.43	1:3	27.34±0.22	27.85	120	0.68	1:3	28.27±0.19	31.12
12	3	1.00	1:3	20.53±0.23	23.21	82.38	0.25	1:3	21.86±0.20	25.66
13	7.50	0.62	1:2	22.13±0.30	22.82	30	0.25	1:1	8.38±0.08	13.01
14	7.90	1.00	1:1	17.96±0.16	15.99	120	0.68	1:3	34.47±0.33	31.12
15	3	0.25	1:2	23.01±0.13	26.17	120	0.25	1:2	21.30±0.17	24.77
16	5.25	1.00	1:2	26.11±0.08	22.53	118.59	0.60	1:2	33.00±0.26	27.57
17	3	0.66	1:1	16.55±0.12	13.91	120	1.00	1:1	15.85±0.11	15.34
18	12	0.25	1:3	28.62±0.24	31.25	106.13	0.93	1:2	27.34±0.18	29.18
19	7.50	0.25	1:2	23.82±0.36	23.17	75.00	0.44	1:1	14.88±0.06	12.72
20	3	0.25	1:3	25.98±0.11	22.96	120	0.25	1:1	11.19±0.09	10.79
21	12	0.59	1:1	14.58±0.13	15.27	30	0.25	1:2	18.34±0.15	18.81
22	12	1.00	1:3	39.24±0.27	37.24	30	0.25	1:1	15.93±0.16	13.01

X₁=Zaman (saat), X₂=NaOH (%), X₃=Numune/Çözücü (g/mL), X₄=Zaman (dakika), X₅=NaOH (%), X₆=Numune/Çözücü (g/mL), A-HSC: Alkali yöntemle üretilen at kestanesi nişastası, U-HSC: Ultrason destekli yöntemle üretilen at kestanesi nişastası

X₁=Time (h), X₂=NaOH (%), X₃=Sample/Solvent (g/mL), X₄=Time (min), X₅=NaOH (%), X₆=Sample/Solvent (g/mL), A-HSC: Horse chestnut starch produced by alkaline method, U-HSC: Horse chestnut starch produced by ultrasound assisted method

Alkali Yöntem ile Ekstraksiyon

Rafiq vd., (2015) tarafından önerilen yöntem modifiye edilerek kullanılmıştır. Ekstraksiyon işlemi deneme desenine göre dizayn edilmiştir. 100 g kurutulmuş ve dilimlenmiş numuneler farklı örnek/çözgen oranlarında (1:1, 1:2, 1:3 w/v) ve farklı NaOH oranlarında (0.25, 0.50 ve %1) ayarlanmış bazık su ile karıştırılmış ve +4°C'de farklı sürelerde (3-6-12 saat) ekstrakte edilmiştir. Ekstraksiyon sonunda, karışım 5 dakika boyunca yüksek hızlı bir öğütücüde (Lavion HC1500Y,

İtalya) öğütülmüş ardından 60 mikronluk bir süzgeçten geçirilmiş ve süzgecin üstü 2-3 kez distile su ile yıkanmıştır. Elde edilen süzöntü 3000 rpm'de 15 dakika santrifüj (Boeco U-32R, Almanya) edilmiştir. Santrifüj işlemi dört kez tekrarlanmış ve her tekrardan sonra distile su ile yıkanmıştır. Son santrifüj işleminden sonra elde edilen süpernatant büyük bir cam kaba alınmış, 50°C'de 24 saat boyunca hava akımlı etüvde (Memmert 100-800, Almanya) kurutulmuş ve

ardından öğütülerek kapalı kaplarda depolanmıştır.

Ultrason Destekli Yöntemle Ekstraksiyon

Rafiq vd., (2015) tarafından önerilen yöntem modifiye edilerek kullanılmıştır. Ekstraksiyon işlemi deneme desenine göre dizayn edilmiştir. Dilimlenmiş ve kurutulmuş 100 g numune, farklı örnek/çözgen oranlarında (1:1, 1:2, 1:3) ve farklı NaOH oranlarında (0.25, 0.50 ve %1) ayarlanmış bazık su ile karıştırılmış ve 40°C'de farklı sürelerde (30-60-90 dk) ultrasonik su banyosunda (Elmasonic, E30H, Schmidbauer, Almanya) 37 W'da ekstrakte edilmiştir. Ekstraksiyon sonunda karışım yüksek hızlı öğütücüde (Lavion HC1500Y, İtalya) 5 dk boyunca öğütülmüş, 60 mikronluk bir süzgeçten geçirilmiş ve süzgecin üstü 2-3 kez distile su ile yıkanmıştır. Elde edilen süzöntü 3000 rpm'de 15 dakika santrifüj (Boeco U-32R, Almanya) edilmiştir. Santrifüj işlemi dört kez tekrarlanmış ve her tekrardan sonra distile su ile yıkanmıştır. Son santrifüj işleminden sonra elde edilen süpernatant büyük bir cam kaba alınmış, 50°C'de 24 saat boyunca hava akımlı etüvde (Mettler 100-800, Almanya) kurutulmuş ve ardından öğütülerek kapalı kaplarda depolanmıştır (Rafiq vd., 2015).

Saponin Analizi

0.5 g nişasta örneği üzerine 0.5 mL distile su eklenerek 15 dakika çalkalanmıştır. Süre sonunda yaklaşık 0.25 cm köpük oluşumu gözlenen örnekler saponin potitif olarak işaretlenmiştir. (Janarthanan vd., 2012).

Glikozit Analizi

1 g nişasta örneği üzerine 1.5 mL kloroform ve %10'luk amonyak damla damla eklenmiş ve pembe renk oluşumu gözlenen örnekler glikozit potitif olarak işaretlenmiştir. (Janarthanan vd., 2012).

İstatistiksel Analiz

SPSS istatistik programı (SPSS, Inc., Chicago, IL, ABD) kullanılmış, sonuçların varyans analizi (ANOVA) yapılmış ve gruplar arasındaki farklar Duncan çoklu karşılaştırma testi ile %95 güven aralığında istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

BULGULAR VE TARTIŞMA

Park ve bahçe atıklarından toplanan ve nişasta üretiminde kullanılan at kestanelerinin fiziksel ve kimyasal özellikleri belirlenmiştir. At kestanesi tohumlarının ortalama tohum ağırlığı 16.01 ± 2.09 g ve kalınlığı 2.44 ± 0.25 cm olarak belirlenmiştir. At kestanesi tohumların sırasıyla 78.78 ± 0.16 , 1.92 ± 0.03 , 4.85 ± 0.17 , 2.06 ± 0.17 ve 30.21 ± 0.46 kuru madde, kül, protein, yağ ve toplam nişasta içeriğine sahip olduğu tespit edilmiştir. At kestanesi tohumlarının 0.39 - 7.78 protein, 1.12 - 3.27 yağ, 1.93 - 3.16 kül ve 35.0 - 38.3 nişasta içerdiği bildirilmiştir (Cukanovi'c vd., 2011; Hassan vd., 2021; Rafiq vd., 2015; Rafiq vd., 2021; Shah vd., 2016). Kullanılan at kestanelerinin bileşimi nişasta oranı haricinde literatürle benzerlik göstermektedir. Nişasta içeriği literatüre göre daha düşük bulunmuştur. At kestanelerinin toplanma zamanı, iklim koşulları ve çeşit gibi faktörler bu farklılığa neden olmaktadır.

İstatistiksel Modelleme

Nişasta, alkali ve ultrasonik destekli ekstraksiyon yöntemleri kullanılarak ön işlemlerden geçirilmiş at kestanelerinden üretilmiştir. Nişastanın ekstraksiyon koşullarının optimizasyonu için çok değişkenli yüzey yanıt metodolojisi (YYM) tercih edilmiştir. YYM'nin en önemli avantajı, deneysel çalışma sayısını azaltması, enerji ve hammadde tasarrufu sağlaması ve zamanı kısaltmasıdır. Proses parametreleri, at kestanesinde nişasta üretimini optimize etmek için Çizelge 1'de verilen deneysel tasarıma göre değerlendirilmiştir. Genel belirleme katsayısı (R^2) alkali yöntem için 0.9232 ve ultrason destekli yöntem için 0.8609 olarak bulunmuştur (Çizelge 3). Deneysel sonuçları güvenilir bir şekilde tahmin edebilen indirgenmiş model denklemleri Eşitlik 4 (alkali yöntem) ve Eşitlik 5'de (ultrason destekli yöntem) verilmiştir.

$$Y = 21.460 + (0.951 \cdot X_1) - (8.331 \cdot X_2) + (0.858 \cdot X_1 X_2) - (0.016 \cdot X_1^2) + (4.800 \cdot X_2^2) \quad (4)$$

$$Y = 19.373 + (0.061 \cdot X_1) + (2.042 \cdot X_2) + (0.037 \cdot X_1 X_2) - (1.008 \cdot X_1^2) + (0.645 \cdot X_2^2) \quad (5)$$

Deneysel verilere ve yanıt fonksiyonuna uyum sağlamak için regresyon analizi yapılmıştır. Model

denklemlerine (Eşitlik 1 ve 2) dayanarak, NaOH konsantrasyonuna, zamana ve numune/çözücü oranlarına bağlı olarak nişasta üretim verimliliğini göstermek için bir yüzey grafiği elde edilmiştir (Şekil 1). Nişasta verimi için 2FI modelleri ANOVA ile değerlendirilmiştir (Çizelge 3). Modeller F (16.04 ve 8.25) ve p değerlerine (<0.0001 ve 0.0006) göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Ayrıca, 0.0001 'den küçük p-değerleri model terimlerinin anlamlılığını göstermektedir. Seçilen parametrelerde en yüksek etki numune/çözelti oranında bulunmuş, bunu zaman takip etmiştir. NaOH oranının istatistiksel olarak anlamlı bir etkisi tespit edilememiştir.

ANOVA gerçekleştirildikten sonra at kestanesi tohumlarından nişasta ekstraksiyonu için optimum koşulu belirlemek üzere sayısal optimizasyon yapılmıştır. Tüm kontrol parametreleri için (Süre, NaOH oranı ve örnek/çözgen oranı) bir dizi aralık seçilmiştir. Tahmin edilen modeller, kriterler seçildiğinde

arzu edilebilirlik fonksiyonu 1'e yakın değerler vermektedir. Sayısal optimizasyonda elde edilen tahmini parametreler Çizelge 2'de gösterilmektedir. D-optimal tasarım yoluyla tahmin edilen optimum koşullar alkali yöntem için 12 saat ekstraksiyon süresi, %1 NaOH konsantrasyonu ve 1:3 örnek/çözücü oranı ile ultrason destekli yöntem için 2 saat ekstraksiyon süresi, %0.68 NaOH konsantrasyonu ve 1:3 örnek/çözücü oranı olarak oluşturulmuştur. Çizelge 2'de verildiği gibi tahmin edilen modelin doğruluğunu sağlamak için deneylerin üç tekrarı yapılmıştır. Doğruluk deneyi sonucunda A-HSC için nişasta verimi 38.41 ± 0.18 , U-HSC içinse nişasta verimi 32.21 ± 0.77 olarak tespit edilmiştir. Bu sonuçlar modelden elde edilen verilerle tutarlıdır. Dolayısıyla bu çalışma D-optimal tasarımın at kestanesi tohumundan iki farklı yöntem kullanılarak nişasta ekstrakte etmek için en iyi koşulları değerlendirmede güvenilir, basit ve kullanışlı bir yaklaşım olduğunu doğrulamaktadır.

Çizelge 2. Optimum koşulun doğrulama test sonucu

Table 2. Validation test result of optimum condition

	A-HSC					U-HSC				
	Bağımsız değişkenler <i>Independent variables</i>				Cevaplar <i>Responses</i>	Bağımsız değişkenler <i>Independent variables</i>				Cevaplar <i>Responses</i>
	No	X ₁	X ₂	X ₃	Y ₁ , Nişasta verimi (%) <i>Starch yield (%)</i>	X ₄	X ₅	X ₆	Y ₁ , Nişasta verimi (%) <i>Starch yield (%)</i>	
Gerçek <i>Actual</i>	1	12	1	1:3	38.63	120	0.68	1:3	33.12	
	2	12	1	1:3	38.18	120	0.68	1:3	31.24	
	3	12	1	1:3	38.42	120	0.68	1:3	32.28	
Gerçek ortalama <i>Actual average</i>		12	1	1:3	38.41 ± 0.18	120	0.68	1:3	32.21 ± 0.77	
Tahmin edilen <i>Predicted</i>		12	1	1:3	37.24	120	0.68	1:3	31.12	

X₁=Zaman (saat), X₂=NaOH (%), X₃=Numune/Çözücü (g/mL), X₄=Zaman (dakika), X₅=NaOH (%), X₆=Numune/Çözücü (g/mL), A-HSC: Alkali yöntemle üretilen at kestanesi nişastası, U-HSC: Ultrason destekli yöntemle üretilen at kestanesi nişastası

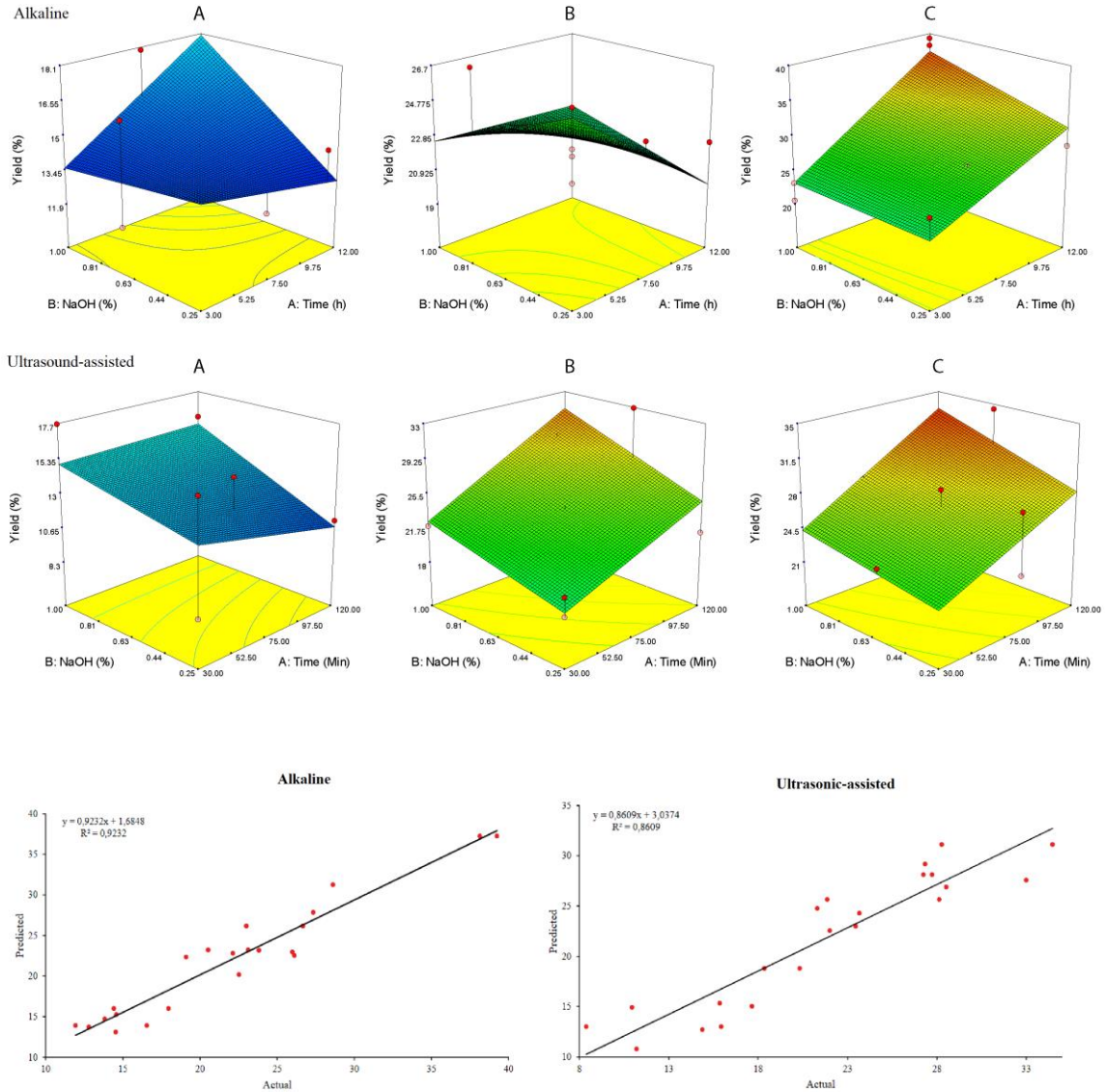
X₁=Time (h), X₂=NaOH (%), X₃=Sample/Solvent (g/mL), X₄=Time (min), X₅=NaOH (%), X₆=Sample/Solvent (g/mL), A-HSC: Horse chestnut starch produced by alkaline method, U-HSC: Horse chestnut starch produced by ultrasound assisted method

Şekil 1'de nişasta veriminin yanıt yüzey grafikleri gösterilmektedir. Deneysel tasarım A (1:1), B (1:2) ve C (1:3) numune/çözücü oranları ile kategorik olarak yapılmıştır. Optimizasyon sonuçlarına göre, en yüksek nişasta verimi alkali yöntem için 12 saat ekstraksiyon süresi, %1 NaOH

konsantrasyonu ve 1:3 örnek/çözücü oranı ile ultrason destekli yöntem için 2 saat ekstraksiyon süresi, %0.68 NaOH konsantrasyonu ve 1:3 örnek/çözücü oranı ile elde edilmiştir. Çalışmada oluşturulan tüm modeller anlamlı ($P < 0.05$), uyum eksikliği değerleri istatistiksel olarak anlamsız

bulunmuştur ($P>0.05$). Oluşturulan modellerin deneysel verileri yuēsek doērulukla aēıklayabilmesi iēin gereken en 6nemli kriterlerden biri de uyum eksikliēi verilerinin istatistiksel olarak anlamsız bulunmasıdır (Türker

ve İřleroēlu, 2023). Bu ēalıřmada, istatistiksel olarak anlamsız uyum eksikliēi deēerleri ($P>0.05$), at keşanesi tohumlarının nişastası iēin oluşturulan modellerin başarısını g6stermiştir.



şekil 1. At keşanesi nişastası verimini tahmin etmek iēin yanıt yuēey grafikleri (A= 1:1 6rnek/ē6z6c6, B=1:2 6rnek/ē6z6c6, C=1:3 6rnek/ē6z6c6)

Figure 1. Response surface plots for estimating horse chestnut starch yield (A=1:1 sample/solvent, B=1:2 sample/solvent, C=1:3 sample/solvent)

Model incelendiğinde ekstraksiyon süresinin ve örnek/çözgen oranının nişasta ekstraksiyonunda istatistiki olarak önemli olduğu ($P<0.05$), NaOH oranının ise ekstraksiyon üzerinde etkisinin olmadığı tespit edilmiştir. Yapılan literatür taramasında at kestanesinden alkali ve ultrasonik yöntemler kullanılarak nişasta üretimi ile ilgili çalışmalar tespit edilmiştir. Rafiq vd. (2015) yaptıkları çalışmada 0.25 N NaOH konsantrasyonunda 1:3 örnek/çözelti oranında 6 saat ekstraksiyon ile nişasta üretimi gerçekleştirmişlerdir. Ayrıca alkali ekstraksiyonda %0.01, 0.1, 0.25 NaOH ve 0.5 N NaOH konsantrasyonlarının kullanıldığı çalışmalar mevcuttur (Correia ve Beirão-da-Costa, 2010; Correia ve Beirão-da-Costa, 2012; Shah vd., 2016). At kestanesinden ultrasonik destekli yağ aside ekstraksiyonunda metanolde 100 W

sonikasyon gücünün kullanıldığı bir çalışma bulunmaktadır (Amiri vd., 2019). Ayrıca Ahmad vd. (2020), alkali ve ultrasonikasyon yöntemlerini kullanarak *A. hippocastanum* tohumları da dahil olmak üzere alternatif kaynaklardan nişasta üretmiştir. Elde edilen nişasta verimi alkali yöntemle (0.5M NaOH, 60 dak., 10°C) %38.14, ultrasonik destekli yöntemde (0.1M NaOH, 30 dak., 40 kHz) ise %34.47 olarak tespit edilmiştir. Yapılan çalışmalar nişasta üretim verimini %25.77 (Wani vd., 2014) olarak rapor etmektedir. Çalışmamızda elde ettiğimiz nişasta verimi literatürden yüksek bulunmuştur. Bu yüksekliğin, bölgesel ve iklimsel koşullar, hasat zamanı ve tür/çeşit farklılıklarından kaynaklandığı öngörülmektedir.

Gizelge 3. Nişasta verimi için varyans analizi
Table 3. Analysis of variance for starch yield

Kaynak Source	Kareler Toplamı Sum of Squares		Serbestlik derecesi Degrees of freedom		Ortalama Kare Mean Square		F Değeri F Value		p-değeri p-value	
	Y ₁	Y ₂	Y ₁	Y ₂	Y ₁	Y ₂	Y ₁	Y ₂	Y ₁	Y ₂
Model	1077.99	925.25	9	9	119.78	102.81	16.04	8.25	< 0.0001	0.0006
X ₁	67.56	55.90	1	1	67.56	55.90	9.05	4.49	0.0109	0.0257
X ₂	12.19	49.67	1	1	12.19	49.67	1.63	3.99	0.2255	0.0690
X ₃	735.85	683.67	2	2	367.93	341.83	49.27	27.44	< 0.0001	< 0.0001
X ₁ X ₂	18.55	3.24	1	1	18.55	3.24	2.48	0.26	0.1410	0.6194
X ₁ X ₃	113.25	51.94	2	2	56.62	25.97	7.58	2.08	0.0074	0.1671
X ₂ X ₃	10.32	1.93	2	2	5.16	0.96	0.69	0.08	0.5199	0.9260
Residual	89.62	149.46	12	12	7.47	12.46				
Lack of Fit	62.02	80.04	7	7	8.86	11.43	1.61	0.82	0.3114	0.6075
Pure Error	27.60	69.43	5	5	5.52	13.89				
Total	1167.61	1074.72	21	21						
R ²	0.92	0.86								
Adjusted R ²	0.87	0.79								
Predicted R ²	0.82	0.75								
PRESS	748.87	548.03								
C.V. (%)	13.51	16.16								

Y₁=Alkali yöntemle üretilen at kestanesi nişastası, Y₂=Ultrason destekli yöntemle üretilen at kestanesi nişastası, X₁=Zaman (saat), X₂=NaOH (%), X₃=Örnek/Çözücü (g/mL), PRESS: Tahmin edilen artık hata kareler toplamı, C.V. (%): Varyasyon katsayısı

Y₁=Horse chestnut starch produced by alkaline method, Y₂=Horse chestnut starch produced by ultrasound assisted method, X₁=Time (h), X₂=NaOH (%), X₃=Sample/Solvent (g/mL), PRESS: Predicted residual error sum of squares, C.V. (%): Coefficient of variation

Kimyasal Özellikler

At kestanesinden alkali (A-HCS) ve ultrason destekli (U-HCS) yöntemlerle üretilen nişastaların kimyasal özellikleri Çizelge 4'te gösterilmiştir. Optimizasyon işlemi sonunda en yüksek verimin elde edildiği noktada üretilen nişastaların kimyasal bileşimleri tespit edilmiştir. A-HCS'nin kimyasal bileşiminde protein, kül ve yağ sırasıyla 0.34 ± 0.07 , 0.37 ± 0.05 ve 0.2 ± 0.08 olarak bulunmuştur. U-HCS'nin kimyasal bileşiminde protein, kül ve yağ miktarları sırasıyla 0.36 ± 0.02 , 0.56 ± 0.01 ve 0.18 ± 0.01 olarak tespit edilmiştir. Bunlar, izole edilen nişastanın saf olduğunu ve izolasyon yönteminin nişastanın izolasyonunda ve saflaştırılmasında etkili olduğunu göstermektedir (Wani vd., 2014). Benzer çalışmalarda at kestanesi nişastasının 0.20 kül (Castaño vd., 2014), 10.97 nem, 0.31 protein, 0 yağ ve 0.29 kül (Rafiq vd., 2015), 11.14 nem, 0.30 protein, 0.32 kül, 0 yağ (Shah vd., 2016), 11.67 nem, 0.31

protein, 0.33 kül, 0 yağ (Wani vd., 2014) içerdiği bildirilmiştir. A-HCS'nin nem içeriği 6.30 ve U-HCS'nin nem içeriği 9.82 olarak tespit edilmiştir. Nem içeriği nişasta kalitesini ve depolama stabilitesini belirlemektedir (Adedokun ve Itiola, 2010). Ekstraksiyon yönteminin protein ve yağ içeriğini değiştirmediği belirlenmiştir. Nişastaların L^* değerleri A-HCS ve U-HCS için sırasıyla 93.61 ve 87.79 olarak tespit edilmiştir. Ultrasonikasyon işleminin örneklerin parlaklık değerlerinde düşüşe neden olduğu belirlenmiştir. Ultrasonikasyon işlemi ile örneklerin a^* ve b^* değerlerinde ise bir artış tespit edilmiştir. Ultrasonikasyon işlemi ile üretilen nişastalarda renk koyulaşmaktadır. Wani ve ark. (2014) yaptıkları çalışmada at kestanesi nişastasının L^* , a^* ve b^* değerlerini sırasıyla 97.53 - 99.09 , 0.9 - 0.56 ve 7.10 - 8.54 aralığında olduğunu bildirmişlerdir. Çalışmamızda elde edilen renk değerleri literatür ile benzerlik göstermektedir.

Çizelge 4. At kestanesi nişastalarının kimyasal özellikleri

Table 4. Chemical properties of horse chestnut starches

Parametreler Parameter	A-HCS	U-HCS
Kuru madde (%) Dry matter (%)	93.70 ± 0.15^a	90.18 ± 0.08^b
Kül (%) Ash (%)	0.37 ± 0.05^b	0.56 ± 0.01^a
Protein (%) Protein (%)	0.34 ± 0.07^a	0.36 ± 0.02^a
Yağ (%) Fat (%)	0.12 ± 0.08^a	0.18 ± 0.01^a
pH pH	9.94 ± 0.07^b	10.44 ± 0.02^a
Saponin Saponin	ND	ND
Glizozit Glycoside	ND	ND
L^*	93.61 ± 0.81^a	87.79 ± 0.71^b
a^*	-1.21 ± 0.11^a	-2.55 ± 0.14^b
b^*	7.86 ± 0.24^b	18.14 ± 0.70^a

a, b, c, ... harfleri aynı satırdaki örneklerin $P < 0.05$ düzeyinde istatistiksel farklılıklarını göstermektedir ND: Tespit edilemedi, A-HSC: Alkali yöntemle üretilen at kestanesi nişastası, U-HSC: Ultrason destekli yöntemle üretilen at kestanesi nişastası

The letters *a, b, c, ... indicate statistical differences at the $P < 0.05$ level of the samples in the same line ND: Not detected. A-HSC: Horse chestnut starch produced by alkaline method, U-HSC: Horse chestnut starch produced by ultrasound assisted method

Alkali yöntemle üretilen nişastaların daha beyaz, ultrason uygulaması ile üretilen nişastaların ise sarımsı bir renge sahip olduğu tespit edilmiştir. Nişasta örneklerindeki artan 'b*' değerleri, ultrason işlemi ile nişastadan ayrılan monosakkaritlerin karamelizasyona uğramasından kaynaklanmaktadır (Maskan, 2001). At kestanesi, otoyol kenarlarında, park ve bahçelerde yaygın olarak ekilen bir bitkidir. Ancak tohumları toksisitesi nedeniyle insan tüketimi için uygun değildir. Bu bitkinin toksisitesi saponinleri ve glikozitlerinden kaynaklanmaktadır (Yi ve Lee, 2021). Her iki yöntemle üretilen nişastalarda saponin ve glikozitlerin varlığı tespit edilememiştir. Nişasta üretiminin gerçekleştirildiği diğer çalışmalarda saponin ve glikozit varlığının araştırılmadığı tespit edilmiştir. Ekstraksiyonda çözücü olarak NaOH kullanılması nedeniyle ürün bazik pH'da elde edilmiştir.

SONUÇ

Bu çalışmada at kestanesi tohumlarından alkali ve ultrasonik destekli yöntemlerle nişasta ekstrakte edilmiş ve en yüksek nişasta içeriğini sağlayan optimum proses koşulları yanıt yüzey metodolojisi ile belirlenmiştir. En iyi ekstraksiyon performansını örnek/çözgen oranının ve ekstraksiyon süresinin yanıtları etkilemiştir. Her iki yöntemle üretilen nişastaların kimyasal özellikleri tespit edilmiştir. Ultrason destekli yöntem ile üretilen nişastaların sarılık değerinin ve kül içeriğinin alkali yöntemle elde edilen nişastaya göre daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Çalışmamız at kestanesi tohumlarından katma değeri yüksek nişasta üretiminin iki farklı yöntemle üretilebileceğini ve optimum koşulları göstermiştir. Doğrulama test sonuçlarına göre alkali yöntemde 38.41 ± 0.18 , ultrason destekli yöntemde ise 32.21 ± 0.77 nişasta ekstraksiyon verimi tespit edilmiş olup alkali yöntemin daha etkili olduğu görülmektedir. Alkali yöntemle üretilen at kestanesi nişastaları başta glutensiz ürünler olmak üzere bazı model gıdalarda kullanıma potansiyeline sahiptir. Fakat gıda sistemlerinde kullanılmadan önce gıdalarda kullanımına izin verilen laktik ya da asetik asit gibi asitlerle nötralize edilmelidir. Ayrıca bu çalışmadan elde edilen bilgilerin alternatif nişasta

kaynakları ile ilgili gelecekteki araştırmalara yol gösterebileceğine inanılmaktadır.

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu araştırma makalesinde herhangi bir kişi ve/veya kurum ile çıkar çatışması olmadığını beyan etmektedir.

YAZARLARIN KATKISI

Ali Cingöz; projenin tasarlanması, metodoloji, bulguların değerlendirilmesi ve makale yazımını gerçekleştirmiştir. Zeynep İnatçı; Metodoloji, bulguların değerlendirilmesi ve makalenin düzenlenmesine katkıda bulunmuştur.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma “Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü” tarafından 2022/27 nolu yüksek lisans tez projesi kapsamında desteklenmiştir.

KAYNAKLAR

AACC. (2004). Approved Methods of the American Association of Cereal Chemists. 11th Edition.

Adedokun, M.O., Itiola, O.A. (2010). Material properties and compaction characteristics of natural and pregelatinized forms of four starches. *Carbohydrate Polymers*, 79(4): 818, <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.10.009>.

Ahmad, M., Gani, A., Hassan, I., Huang, Q., Shabbir, H. (2020). Production and characterization of starch nanoparticles by mild alkali hydrolysis and ultra-sonication process. *Scientific Reports*, 109: 435, <https://doi.org/10.1038/s41598-020-60380-0>.

Amiri, S., Shakeri, A., Sohrabi, M., Khalajzadeh, R., Ghasemi, S.E. (2019). Optimization of ultrasonic assisted extraction of fatty acids from *Aesculus hippocastanum* fruit by response surface methodology. *Food Chemistry*, 271: 762, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.07.144>.

Ankom. (2009). ANKOM Technol Macedon, Rapid determination of oil/fat utilizing high temperature solvent extraction-ANKOM technology method 2 AOCS official procedure

- Am 5-04. New York <https://doi.org/10.1201/9780429104527-4>.
- AOAC. (2000). AOAC Official Method. Association of official agricultural chemists, by the United States Department of Agriculture
- Castaño, J., Rodríguez-Lamazares, S., Contreras, K., Carrasco, C., Pozo, C., Bouza, C., Giraldo, D. (2014). Horse chestnut (*Aesculus hippocastanum* L.) starch: basic physico-chemical characteristics and use as thermoplastic material. *Carbohydrate Polymers*, 112: 677, <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.06.046>.
- Correia, P.R., Beirão-da-Costa, M.L. (2010). Chestnut and acorn starch properties affected by isolation methods. *Starch-Stärke*, 62(8): 421, <https://doi.org/10.1002/star.201000003>.
- Correia, P.R., Beirão-da-Costa, M.L. (2012). Starch isolation from chestnut and acorn flours through alkaline and enzymatic methods. *Food and Bioproducts Processing*, 90(2): 309, <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2011.06.005>.
- Cukanović, J., Ninić-Todorović, J., Ognjanov, V., Mladenović, E., Ljubojević, M., Kur-jakov, A. (2011). Biochemical composition of horse chestnut seed (*Aesculus hippocastanum* L.). *Archives of Biological Sciences Belgrade*, 63(2): 345.
- Dudek-Makuch, M., Matławska, I. (2011). Flavonoids from the flowers of *Aesculus hippocastanum*. *Acta Polonica Pharmaceutica*, 68(3): 403-408.
- Duque-Acevedo, M., Belmonte-Ureña, L.J., Cortés-García, F.J., Camacho-Ferre, F. (2020). Agricultural waste: Review of the evolution, approaches and perspectives on alternative uses. *Global Ecology and Conservation*, 22: e00902, <https://doi.org/10.1016/j.gecco.2020.e00902>
- FDA. (2023). *Aesculus hippocastanum* whole. <https://precision.fda.gov/uniisearch/srs/unii/2331W47PSX> (Accessed: 21 November 2024).
- Gullón, P., Gullón, B., Muñoz-Mouro, A., Lú-Chau, T.A., Eibes, G. (2020). Valorization of horse chestnut burs to produce simultaneously valuable compounds under a green integrated biorefinery approach. *Science of the Total Environment*, 730: 139143, <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.139143>
- Hassan, I., Wani, I.A., Hussain, P.R., Dar, A.H. (2021). Physico-chemical properties of Indian horse chestnut (*aesculus indica*) starch films as affected by γ -irradiation. *Journal of Packaging Technology and Research*, 5(3): 175, <https://doi.org/10.1007/s41783-021-00121-4>.
- Janarthanan, U.K., Varadharajan, V., Krishnamurthy, V. (2012). Physicochemical evaluation, Phytochemical screening and chromatographic fingerprint profile of *Aegle marmelos* (L.) leaf extracts. *World Journal of Pharmaceutical Research*, 1(3): 813-837.
- Kaur, S., Sharma, S., Dar, B.N., Singh, B. (2012). Optimization of process for reduction of antinutritional factors in edible cereal brans. *Food Science and Technology International*, 18(5): 445-454, <http://dx.doi.org/10.1177/1082013211428236>.
- Lemos, A.M., Abraao, A.S., Cruz, B.R., Morgado, M.L., Rebelo, M., Nunes, F.M. (2015). Effect of granular characteristics on the viscoelastic and mechanical properties of native chestnut starch (*Castanea sativa* Mill). *Food Hydrocolloids*, 51: 317, <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.05.021>.
- Lu, Z.H., Donner, E., Yada, R.Y., Liu, Q. (2012). Impact of γ -irradiation, CIPC treatment, and storage conditions on physicochemical and nutritional properties of potato starches. *Food Chemistry*, 133(4): 1195, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.07.028>.
- Maskan, M. (2001). Kinetics of colour change of kiwifruits during hot air and microwave drying. *Journal of Food Engineering*, 48(2): 169, [https://doi.org/10.1016/s0260-8774\(00\)00154-0](https://doi.org/10.1016/s0260-8774(00)00154-0).
- Molina-Moreno, V., Leyva-Díaz, J.C., Llorens-Montes, F.J., Cortés-García, F.J. (2017). Design of indicators of circular economy as instruments for the evaluation of sustainability and efficiency in wastewater from pig farming industry. *Water*, 9(9): 653, <https://doi.org/10.3390/w9090653>.
- Owczarek-Januszkiewicz, A., Kicel, A., Olszewska, M.A. (2023). *Aesculus hippocastanum* in the pharmaceutical industry and beyond–

- Phytochemistry, bioactivity, present application, and future perspectives. *Industrial Crops and Products*, 193: 116187, <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2022.116187>.
- Rafiq, S.I., Jan, K., Singh, S., Saxena, D.C. (2015). Physicochemical, pasting, rheological, thermal and morphological properties of horse chestnut starch. *Journal of Food Science and Technology*, 52(9): 5651–5660, <https://doi.org/10.1007/s13197-014-1692-0>.
- Rafiq, S.I., Muzaffar, K., Rafiq, S.M., Saxena, D.C., Dar, B.N. (2021). Underutilized horse chestnut (*Aesculus indica*) flour and its utilization for the development of gluten-free pasta. *Italian Journal of Food Science*, 33(SP1): 137, <https://doi.org/10.15586/ijfs.v33isp1.2088>.
- Rafiq, S.I., Singh, S., Saxena, D.C. (2016). Effect of heat-moisture and acid treatment on physicochemical, pasting, thermal and morphological properties of Horse Chestnut (*Aesculus indica*) starch. *Food Hydrocolloids*, 57: 103, <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.01.009>.
- Shah, U., Gani, A., Ashwar, B.A., Shah, A., Wani, I.A., Masoodi, F.A. (2016). Effect of infrared and microwave radiations on properties of Indian Horse Chestnut starch. *International Journal of Biological Macromolecules*, 84: 166, <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.12.020>.
- Singh, G.D., Sharma, R., Bawa, A.S., Saxena, D.C. (2008). Drying and rehydration characteristics of water chestnut (*Trapa natans*) as a function of drying air temperature. *Journal of Food Engineering*, 87(2): 213, <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2007.11.027>.
- Türker, İ., & İşleroğlu, H. (2023). Extraction of Bioactive Compounds From Fenugreek Leaves by Maceration with D-Optimal Design. *Gıda*, 48(2): 305-316. <https://doi.org/10.15237/gida.GD22108>
- Vishal Banyal, S., Shukla, A.K., Kumari, A., Kumar, A., Khatak, A., Kumar, M. (2023). Effect of modification on quality parameters of jackfruit (*Artocarpus heterophyllus*) seed starch to valorize its food potential and in-silico investigation of the pharmacological compound against salmonellosis. *Waste and Biomass Valorization*, 14(5): 1610, <https://doi.org/10.1007/s12649-022-01945-0>.
- Wani, I.A., Jabeen, M., Geelani, H., Masoodi, F.A., Saba, I., Muzaffar, S. (2014). Effect of gamma irradiation on physicochemical properties of Indian Horse Chestnut (*Aesculus indica* Colebr.) starch. *Food Hydrocolloids*, 35: 253, <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.06.002>.
- Yi, H.Y., Lee, J.Y. (2021). Poisoning due to consumption of horse chestnut seed. Clinical and experimental emergency medicine. *Clinical and Experimental Emergency Medicine*, 8(4): 333, <https://doi.org/10.15441/ceem.20.004>.