

## KRİTİK ALTI SU İLE FINDIK ATIKLARINDAN ANTİOKSİDAN BİLEŞİKLERİN EKSTRAKSİYONU

**Ece Sürek, Ali Oğuz Büyükkileci\***

İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, İzmir, Türkiye

Geliş / *Received*: 23.11.2017; Kabul / *Accepted*: 20.01.2018; Online baskı / *Published online*: 20.02.2018

Sürek, E., Büyükkileci, A.O. (2018). Kritik altı su ile fındık atıklarından antioksidan bileşiklerin ekstraksiyonu. *GIDA* (2018) 43 (2): 211-221 doi: 10.15237/gida.GD17104

### ÖZ

Türkiye fındık üretim ve ihracatında dünya lideridir. Fındığın tarımı ve işlenmesi sırasında büyük miktarda kabuk, zuruf ve dal gibi atıklar açığa çıkmaktadır. Bu atıkların çevre dostu bir teknoloji ile işlenmesi ve önemli ürünlerin üretilmesi katma değer sağlayabilir. Bu çalışmada, fındık atıklarının farklı sıcaklık (150-200°C) ve sürelerde (0-45 dk) kritik altı su ekstraksiyonu ile elde edilen likörlerinin toplam fenolik madde içeriği (TFİ) ve toplam antioksidan aktiviteleri (TAA) incelenmiştir. Genel olarak, kritik altı su ekstraksiyonu ile aseton ve metanol ekstraksiyonuna göre daha yüksek verim elde edilmiştir. Sıcaklık arttıkça fındık kabuğundan elde edilen TFİ ve TAA artmıştır. Süre artışı 180°C'de istatistiksel olarak önemli bir fark yaratmazken, 190°C'de TFİ süre arttıkça yükselmiştir ( $P < 0.05$ ). Bu iki koşulun fındık kabuğu üzerine etkisi şiddet faktörünün logaritmik değeri ( $\log R_0$ ) hesaplanarak tek bir parametrede de incelenmiştir.  $\log R_0$  arttıkça TFİ (905.3-2115.7 mg GAE/100 g kabuk) ve TAA (8163.9-12261.5 mg TE/100 g kabuk) değerleri yükselmiştir.

**Anahtar kelimeler:** Fındık, atık, antioksidan aktivite, fenolik madde, kritik altı su ekstraksiyonu

## EXTRACTION OF ANTIOXIDANT COMPOUNDS FROM HAZELNUT WASTES USING SUBCRITICAL WATER

### ABSTRACT

Turkey is the world leader in hazelnut production and export. Large amount of wastes such as shell, husk and prunings are produced during the agriculture and processing of hazelnuts. Treatment of hazelnut wastes using an eco-friendly technology and production of valuable products can add value to those. In this study, total phenolic content (TPC) and total antioxidant activity (TAA) in the liquors of hazelnut wastes from subcritical water extraction at different temperature (150-200°C) and time (0-45 min.) values were analyzed. Generally, higher yields were obtained by subcritical water extraction compared to solvent extraction. As temperature increased, TPC and TAA obtained from shells increased. Increase in time did not have a statistically significant effect at 180°C; however, TPC increased significantly with time at 190°C ( $P < 0.05$ ). The combined effect of temperature and time on hazelnut shells was examined in a single variable by calculating logarithmic value of severity factor ( $\log R_0$ ). TPC (905.3-2115.7 mg GAE/100 g shell) and TAA (8163.9-12261.5 mg TE/100 g shell) increased with  $\log R_0$ .

**Keywords:** Hazelnut, wastes, antioxidant activity, phenolics, subcritical water extraction

\* Yazışmalardan sorumlu yazar / *Corresponding author*;

✉ oguzbuyukkileci@iyte.edu.tr

☎ (+90) 232 750 6293

☎ (+90) 232 750 6296

## GİRİŞ

Türkiye fındık (*Corylus avellana* L.) üretim ve ihracatında dünyada birinci sıradadır. 2009-2014 yılları arası ortalama yıllık kabuklu fındık üretim miktarı 0.53 milyon tondur ve bu miktar dünya üretiminin %65'idir (FAOSTAT, 2017). Fındığın hasadı ve işlenmesi sırasında kabuk, zuruf ve budama sonrası dallar atık olarak açığa çıkmaktadır. Yıllık zuruf miktarının 0.20 milyon ton olduğu tahmin edilirken (Güney, 2013); 2003 verilerine göre, 0.65 milyon ton fındık üretimi sonucunda elde edilen kabuk ve budama atık miktarları sırasıyla 0.45 ve 1.7 milyon tondur (Alkaya vd., 2010). Bu atıklar genellikle evlerde yakıt olarak kullanılmakta veya tarlalarda yakılmaktadır (Çöpür vd., 2013; Güney, 2013). Tarımsal atıklardan çeşitli fitokimyasalların geri kazanılması veya bunların önemli biyo-ürünlere dönüştürülmesi ile bu atıklara katma değer kazandırılabilir. Fındıktan (Xu vd., 2012) ve fındığın kabuk, zar, zuruf ve ağaç yaprakları gibi bazı atıklarından (Shahidi vd., 2007) antioksidan özellik taşıyan çeşitli fenolik maddelerin elde edilebileceğini gösteren çalışmalar bulunmaktadır.

Bitkilerden çeşitli biyoaktif bileşenlerin ekstraksiyonu genellikle organik çözücüler kullanılarak katı-sıvı ekstraksiyonu ve buhar distilasyonu gibi geleneksel işlemlerle gerçekleştirilmektedir (Zakaria ve Kamal, 2016). Kullanılan bazı çözücülerin toksik olması veya büyük miktarlarda ve yüksek saflıkta tüketilmesi, geleneksel metotların zaman alması, pahalılığı, düşük seçiciliği ve yüksek sıcaklıkta bazı bileşenlerin bozunma riski taşıması gibi sebepler, son zamanlarda yüksek kalite ve aktivitede ekstrakt elde edebilmek için kritik altı su ekstraksiyonu (basınçlı sıcak su ekstraksiyonu) ve süper ısıtılmış su ekstraksiyonu gibi çevre dostu teknolojilerin kullanımına olan ilgiyi arttırmıştır (Kim vd., 2009; Rodríguez-Meizoso vd., 2006; Zakaria ve Kamal, 2016).

Kritik altı su ekstraksiyonu sadece suyun kullanıldığı hidrotermal bir işlemdir. Yüksek basınç altında ve 100-374°C de su kullanılarak gerçekleştirilmektedir (Kim vd., 2009). Kritik altı fazda suyun polaritesi ve dielektrik sabiti değiştiğinden farklı çözen özellikleri kazanır (Zakaria ve Kamal, 2016). Bu teknik, kütle iletim

oranını geliştirebilir ve ekstraktların biyolojik potansiyelini koruyabilir (Zakaria ve Kamal, 2016). Kritik altı su ekstraksiyonu ile sıcaklığa bağlı olarak farklı sınıftaki bileşenler ekstrakte edilebilir. Daha fazla polar olan bileşenler, düşük sıcaklıklarda, daha az polar olanlar daha yüksek sıcaklıklarda elde edilir (Ibañez vd., 2003). Kritik altı su ekstraksiyonu kullanılarak pirinç kepeği (Wataniyakul vd., 2012), patates kabuğu (Singh ve Saldana, 2011), tarçın (Khuwijitjaru vd., 2012), kekik (Rodríguez-Meizoso vd., 2006), turunçgiller (Kim vd., 2009), istiridye mantarı (Jo vd., 2013) gibi ürünlerden/maddelerden fenolik bileşenlerin ekstraksiyonu ile ilgili bazı çalışmalar bulunmaktadır. Soğan kabuğu ve yeşil kahve çekirdeklerinin kritik altı su ekstraksiyonu ile ekstrakte edilen bileşenlerinin antioksidan aktivitelerinin diğer ekstraksiyon metotlarıyla karşılaştırıldığında daha yüksek olduğu görülmüştür (Zakaria ve Kamal, 2016).

Kritik altı su aynı zamanda bitki biyokütlesini oluşturan selüloz-hemiselüloz-lignin yapısını bozmak için de kullanılır. Yüksek sıcaklık suyun otoiyonizasyonunu, hemiselüloz zincirindeki asetil gruplarının asetik asit olarak suya geçmesini, hemiselülozun lignin ve selülozdan ayrılmasını ve parçalanmasını (otohidroliz) sağlar. Geriye kalan katıdaki selüloz, selülozik enzimlerle hidroliz edilebilir hale gelir (Alvira vd., 2010; Hendriks ve Zeeman, 2009). Bu sebeple biyoetanol gibi biyo temelli kimyasalların üretimi öncesi uygulanabilecek ön işlemler arasındadır. Otohidroliz, prebiyotik özellik gösteren hemiselülozik oligosakkarit üretimi için de kullanılan bir yöntemdir. Örneğin, sıcaklık ve sürenin hassas olarak ayarlanması sayesinde bitkisel biyokütledeki ksilan, ksilooligosakkarit olarak elde edilebilmektedir (Carvalho vd., 2013). Bu sebeple lignoselülozik tarımsal atıklar prebiyotik elde etmek için çok uygun bir hammadde olarak görülebilir. Otohidroliz likörü, oligosakkaritler dışında monomerik ve polimerik karbonhidratlar; asetik asit, formik asit, furfural ve HMF gibi şeker bozunma ürünleri; fenolik bileşenler ve diğer ekstraktifleri içerir (Carvalho vd., 2004). Prebiyotik oligosakkarit üretimi sırasında yan ürün olarak açığa çıkan fenolik bileşenlerin geri kazanılarak değerlendirilmesi ile

aynı anda iki değerli ürün elde etmek mümkün hale gelebilir. Literatürde üzüm sapı (Amendola vd., 2012) ve zeytin budama atıklarından (Conde vd., 2009) otohıdroliz yöntemi ile ayrılan likörün toplam fenolik madde içeriğini araştıran çalışmalar bulunmaktadır.

Önceki bir çalışmamızda fındık kabuğu, zurufu ve budama atığı dallar kritik altı su ile muamele edilerek prebiyotik özellik gösterme potansiyeli olan ksilooligosakkarit üretimi hedeflenmiş ve fındık kabuğundan yüksek verimde ürün elde edilmiştir (Surek ve Buyukkileci, 2017). O çalışmada fındık atıkları çeşitli sıcaklık ve süre koşullarında otohıdrolize tabi tutulmuştur. Fındık atıklarının fenolik madde içerikleri (Shahidi vd., 2007) ve kritik altı suyun fenolik maddelerin geri kazanılmasındaki potansiyeli göz önüne alınarak, şimdiki çalışmamızda otohıdroliz likörlerinin toplam fenolik madde ve antioksidan aktiviteleri incelenmiştir. Uygulamada kullanılan sıcaklık ve sürenin fenolik maddelerin kazanılmasındaki etkisi incelenmiş, metanol ve aseton ekstraktları ile elde edilen sonuçlarla karşılaştırılmıştır.

### MATERYAL VE YÖNTEM

#### Materyal

Fındık zurufu, sert kabukları ve fındık ağacının dalları, hasat ve işleme döneminde Gürsoy Tarımsal Ürünler Gıda Sanayi ve Ticaret A.Ş. (Ordu, Türkiye) firmasından temin edilmiştir. Fındık atıkları etüvde (Termal, Türkiye) 60°C'de 24 saat kurutulduktan sonra tanecik boyutu 2 mm'den küçük olacak şekilde bitki öğütme değirmeninde öğütülmüş ve hava geçirmeyen paketlerde oda sıcaklığında saklanmıştır. Deneylerde kullanılan kimyasallar Sigma-Aldrich (Steinheim, Almanya) ve Merck (Darmstadt, Almanya) firmalarından temin edilmiştir.

#### Yağın uzaklaştırılması

Öğütülmüş fındık atıklarının yağı Soxhlet ekstraksiyon metodu kullanılarak ayrılmıştır. Soxhlet düzeneği sırasıyla en altta 350 mL hekzan ile dolu 500 mL'lik cam balon, ortada filtre kağıdına sarılı 25 g fındık atığının bulunduğu 250 mL'lik ekstraktör ve en üstte geri soğutucu olacak şekilde yerleştirilmiştir. Yağın uzaklaştırılması işlemi 6 saatlik süre sonunda tamamlanmıştır.

Yağdan arınmış katılar 60°C'de bir gece boyunca etüvde kurutulmuştur.

#### Nem tayini

Öğütülmüş kuru fındık atıklarının ve Soxhlet ekstraksiyonu sonrası elde edilen yağı uzaklaştırılmış kuru fındık atıklarının nem içeriği NREL/TP-510-42621 (Sluiter vd., 2008) metoduna göre belirlenmiştir. Tek kullanımlık alüminyum kaplar 105°C'de 1 saat kurutulduktan sonra desikatörde soğuması için bekletilmiş ve içine 1 g öğütülmüş örnek koyulmuştur. 105°C'de en az 4.5 saat bekletildikten sonra desikatörde soğutulmuş ve tartılmıştır. Sabit tartıma gelinceye kadar bu işleme devam edilmiştir.

#### Çözücü ekstraksiyonu

Ekstraksiyon işlemi Xu vd. (2012) tarafından anlatıldığı gibi yapılmıştır. Fındık atıklarından fenolik maddelerin ekstraksiyonu amacıyla, %80 metanol-su ve %80 aseton-su olarak iki farklı çözücü kullanılmıştır. Fındık atığı örneğinin (0.4 g) üzerine 5 mL ekstraksiyon çözültisi ilave edilmiştir. Örnekler 15 dakika ultrasonik banyoda (Transsonic 780/H, Elma, Almanya) bekletildikten sonra 5000 rpm 4°C'de santrifüjlenmiştir (Universal 320R, Hettich, Almanya). Sıvı kısım (ekstrakt) ayrıldıktan sonra katı kısım üç defa daha aynı işleme tabi tutularak toplam 20 mL ekstrakt elde edilmiştir. Elde edilen ekstraktlar analizler için kullanılabilece kadar -20°C'de saklanmıştır.

#### Kritik altı su ekstraksiyonu

Kritik altı su ekstraksiyonu, 600 mL'lik paslanmaz çelik yüksek basınç reaktörde (Berghof, Almanya) iki paralel halinde yapılmıştır. 35 g fındık atığı (kabuk, zuruf veya dal) 350 mL distile su ile karıştırılmış (Xiao vd., 2013) ve bu karışım 300 devir/dk karıştırma hızında 190°C'ye ısıtılmış ve bu sıcaklıkta 15 dk bekletilmiştir (Surek ve Buyukkileci, 2017). Bu şartlarda reaktördeki basınç yaklaşık 1.0 MPa olmuştur. İşlem sonunda, reaktör soğutma serpantininde dolaşacak çeşme suyu yardımıyla 60°C'ye soğutulmuş ve kapağı açılmıştır. Elde edilen karışım önce tülbent yardımıyla sonra da vakum altında filtre kağıdından süzülükten sonra sıvı kısım -20°C'de analizler için saklanmıştır. Kritik altı su

ekstraksiyonunun fındık atıklarının toplam fenolik içeriği ve antioksidan aktivitesine etkisi belirlenmiş ve ayrıca fındık kabuğu için farklı sıcaklık (150-200°C) ve reaksiyon sürelerinin (0-45 dk., reaktörün ısıtılması ve soğutulması için geçen süre hariç) etkisi de araştırılmıştır. Bu iki koşulun etkisini tek bir parametrede incelemek amacıyla her bir işlem için aşağıda gösterildiği gibi (1) şiddet faktörünün logaritmik değeri ( $\log R_o$ ) hesaplanmıştır (Overend vd., 1987).

$$R_o = \int_0^t \exp \left[ \frac{T(t) - 100}{14.75} \right] dt \quad (1)$$

Burada t: zamanı (dk), T: sıcaklığı (°C) ifade ederken, 100°C referans sıcaklık, 14.75 deneysel bir sabittir.

#### **Toplam fenolik madde içeriği analizi**

Toplam fenolik madde (TFİ) içeriği Singleton ve Rossi (1965) tarafından kullanılan metotta bazı değişiklikler yapılarak belirlenmiştir. Bu analizde, 500 µL fındık kabuğu ekstraktı, otohizoliz likörü veya standart çözeltisine sırasıyla deiyonize su ile 10 kat seyreltilmiş 0.2 N Folin Ciocalteu reaktifi çözeltisinden 2500 µL ve %7.5'lik (ağırlık/hacim) sodyum karbonat (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) çözeltisinden 2000 µL ilave edilmiş ve elde edilen karışım vorteks karıştırıcıda karıştırılmıştır. Karışımlar iki saat oda sıcaklığında karanlıkta bekletildikten sonra absorbans değerleri 765 nm dalga boyundaki spektrofotometrede (T80+, PG Instruments Ltd., Leicestershire, İngiltere) ilgili çözgenlerle hazırlanan körlere karşı okunmuştur. Standart kalibrasyon eğrisi, su, %80 metanol-su ve %80 aseton-su için 0.01-0.40 mg/mL aralığında gallik asit kullanılarak hazırlanmıştır. Toplam fenolik madde içeriği değerleri mg gallik asit eşdeğeri (GAE)/100 g kuru fındık atığı olarak ifade edilmiştir. Tüm analizler üç paralel halinde gerçekleştirilmiştir.

#### **Toplam antioksidan aktivite analizi**

Toplam antioksidan aktivite (TAA) Miller ve Rice-Evans (1997) tarafından anlatıldığı gibi 2,2'-azino- bis 3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonik asit (ABTS) metodu ile belirlenmiştir. ABTS reaktifi çözeltisi 200 mg ABTS'nin 200 mL suda çözünmesi ile hazırlanmıştır. Potasyum persülfat

(K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>) çözeltisi için 38 mg potasyum persülfat 2 mL suda çözülmüştür. Hazırlanan bu çözeltiler karıştırılmış ve bir gece boyunca radikal oluşumu için karanlıkta bekletilmiştir. 0.05 M potasyum dihidrojen fosfat (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) ve 0.05 M dipotasyum hidrojen fosfat (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) çözeltileri pH'sı 8 olacak şekilde karıştırılmış ve potasyum tampon çözeltisi (KPi) hazırlanmıştır. Tampon çözeltisi analiz için kullanılacak kadar ayrılmış ve bir gece bekletilen ABTS reaktif çözeltisinden son absorbans 0.9 ± 0.2 olacak şekilde damlatılarak ABTS reaktif karışımı elde edilmiştir. Fındık kabuğu ekstraktı, otohizoliz likörü veya standart çözeltisinin 100 µL'sine hazırlanan ABTS reaktif karışımından 1 mL ilave edilmiş ve 15 saniye vorteks karıştırıcıda karıştırılmıştır. 45 s bekledikten sonra 734 nm dalga boyundaki spektrofotometrede (Carry 100 BIO, Varian, CA, ABD) suya karşı absorbans değerleri ölçülmüştür. Standart kalibrasyon eğrisi, %80 metanol-su ve %80 aseton-su için 0.01-0.10 mg/mL ve su için 0.04-0.40 mg/mL aralığında 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilik asit (Troloks) kullanılarak hazırlanmıştır. Toplam antioksidan aktivite değerleri mg Troloks eşdeğeri (TE)/100 g kuru fındık atığı olarak ifade edilmiştir. Tüm analizler üç paralel halinde gerçekleştirilmiştir.

#### **İstatistiksel analiz**

İstatistiksel değerlendirmeler, SPSS 16.0 istatistik paketi yardımı ile tek yönlü varyans analizi (ANOVA) sonrasında Tukey Testi ile 0.05 önem derecesinde yapılmıştır.

#### **BULGULAR VE TARTIŞMA**

Fındık atıkları ilk önce çok kullanılan çözgenlerle (metanol ve aseton) ekstrakte edilmiştir. Böylece hem çalışmada kullanılan biyokütlerin önceki çalışmalardakilerle karşılaştırılması sağlanmış hem de bu sonuçlar kritik altı su ekstraksiyonunun verimliliğinin değerlendirilmesinde kullanılmıştır. Çözgen ekstraksiyonu ile elde edilen ekstraktlarının TFİ ve TAA sonuçları Çizelge 1'de verilmiştir. Tüm atıklarda TFİ ve TAA'ya rastlanmış olsa da fındık zürufu ekstraktlarında değerler genellikle diğerlerine göre daha yüksektir. Aseton fındık atıklarının ekstraksiyonu için metanolden daha etkili olmuştur. Bu çalışmada fındık atıklarının çözücü ekstraktlarının TFİ

değerleri 407.8 ve 1683.7 mg GAE/100 g kuru fındık atığı, TAA değerleri ise 1148 ve 5622 mg TE/100 g kuru fındık atığı arasında değişmektedir. Alasalvar vd. (2009) fındık içi fenoliklerinin TAA'sını araştırdıkları bir çalışmada %80 metanol-su ve %80 aseton-su karışımlarının fındığın fenolik bileşenlerin ekstrakte edilmesinde etkili çözücüler olduğunu bildirmişlerdir. Xu vd. (2012) %80 aseton-su ile ekstrakte edilmiş fındık kabuğu ekstraktlarının TFİ ve TAA değerlerini bu çalışmadaki değerlerle uyumlu olarak sırasıyla, 450-1450 mg tannik asit eşdeğeri/100 g fındık kabuğu ve 893.5-4247.4 mg TE/100 g fındık kabuğu bulmuşlardır. Shahidi vd. (2007) fındık kabuğu ve zurufunun %80 etanol-su ile ekstrakte edilmiş ekstraktlarının TFİ değerlerini sırasıyla 541.7 ve 457.0 mg kateşin/100 g yağı uzaklaştırılmış fındık kabuğu olarak tespit

etmişlerdir. Bu çalışmada, fındık kabuğunun metanollü ekstraktının TFİ değeri Shahidi vd. (2007)'e daha yakın iken, fındık zurufu ekstraktında o çalışmada elde edilenden daha fazla TFİ'ye rastlanmıştır (1208 mg GAE/100 g fındık kabuğu). Fındık kabuğu ve zurufunun ekstraktlarının TAA değerleri ise yine aynı çalışmada elde edilene kıyasla daha yüksek bulunmuştur. Del Rio vd. (2011) ve Agourram vd. (2012) fındığın diğer bir atığı olan fındık zarının TFİ içeriğini bu çalışmada bulunan değerlerden daha yüksek olarak sırasıyla 4100-12700 mg polifenol/100 g fındık zarı ve 12460-16630 mg GAE/100 g fındık zarı olarak belirlemişlerdir. Bu çalışma ve literatürdeki diğer çalışmalar fındık atıklarının TFİ ve TAA değerlerinin, fındık atığının türüne, yetiştiği bölgeye ve ekstraksiyon metoduna göre değişebileceğini göstermektedir.

Çizelge 1. Farklı çözücülerle ekstrakte edilmiş fındık atıklarının toplam fenolik içeriği (TFİ) ve toplam antioksidan aktivitesi (TAA)

Table 1. Total phenolic content (TPC) and total antioxidant activity (TAA) of hazelnut wastes extracted with different solvents

Çözücü Solvent	TFİ TPC (mg GAE*/100 g kuru fındık atığı) (mg GAE*/100 g dry hazelnut waste)		
	Kabuk Shell	Zuruf Husk	Dal Prunings
80% Metanol-su Methanol-water	407.8 ± 32.9	1208 ± 24.9	950.6 ± 15.1
80% Aseton-su Acetone-water	666.6 ± 26.6	1683.7 ± 41.2	1354.9 ± 50.3
Çözücü Solvent	TAA TAA (mg TE**/100 g kuru fındık atığı) (mg TE**/100 g dry hazelnut waste)		
	Kabuk Shell	Zuruf Husk	Dal Prunings
80% Metanol-su Methanol-water	1148 ± 97.7	3305.8 ± 88.3	3467.7 ± 103.8
80% Aseton-su Acetone-water	2674.3 ± 7.2	5622 ± 164.2	5167.7 ± 191.5

(\*GAE: Gallik asit eşdeğeri, \*\*TE: Troloks eşdeğeri)  
(\*GAE: Gallic acid equivalent, \*\*TE: Trolox equivalent)

Ksilooligosakkarit üretmek amacıyla fındık atıklarına otohroliz işlemini uyguladığımız önceki çalışmamızda, kabuk, zuruf ve dallar 190°C'de 15 dk muamele edilmiştir (Surek ve Buyukkileci, 2017). Daha sonra uygulamanın

fındık kabukları üzerine etkisi geniş sıcaklık (150-200°C) ve süre (0-45 dk) aralığındaki çeşitli kombinasyonlarda incelenmiştir. Otohroliz uygulamasında su, kritik altı koşullarda olduğundan fındık atıklarından fenolik

maddelerin ekstraksiyonunu sağlama potansiyeli taşır. Bu sebepten, otohizoliz uygulamasından elde edilen likör bu çalışmada değerlendirilmiş ve TFİ ve TAA miktarları belirlenmiştir. Uygulamanın antioksidan kapasitesi yüksek fenolik maddelerin kazanımında etkili olduğu görülmüştür (Çizelge 2). Fındık atıklarının aynı koşuldaki (190°C'de 15 dk) muamelesi ile elde edilen likörleri arasında en yüksek TFİ değeri fındık kabuğu için görülürken (1697.4 mg GAE/100 g kuru fındık atığı), fındık zuruğu diğerlerine göre daha yüksek TAA değeri

göstermiştir (13455.3 mg TE/100 g kuru fındık atığı). Metanol ve aseton ekstraktları ile karşılaştırıldığında uygulamanın özellikle fındık kabuğu üzerinde önemli bir etkisi göze çarpmaktadır. Kritik altı su, fındık kabuğundan metanol ve asetona göre sırasıyla 4.2 ve 2.5 kat TFİ; ve 10 ve 4.3 kat TAA sağlamıştır. Benzer şekilde, tarçın kabuğuna 200°C'de kritik altı su ekstraksiyonu uygulandığında da elde edilen fenolik bileşenlerin miktarının metanol ile elde edilene göre daha yüksek olduğu görülmüştür (Khuwijitjaru vd., 2012).

Çizelge 2. Fındık atıklarının otohizoliz likörünün toplam fenolik içeriği (TFİ) ve toplam antioksidan aktivitesi (TAA)

Table 2. Total phenolic content (TPC) and total antioxidant activity (TAA) of autohydrolysis liquors of hazelnut wastes

Fındık Atığı <i>Hazelnut Waste</i>	İşlem Koşulları <i>Treatment Conditions</i>			TFİ TPC	TAA TAA
	Sıcaklık (°C) <i>Temperature (°C)</i>	Zaman (dk) <i>Time (min)</i>	log R <sub>o</sub>	(mg GAE*/100 g kuru fındık atığı) <i>(mg GAE*/100 g dry hazelnut waste)</i>	(mg TE**/100 g kuru fındık atığı) <i>(mg TE**/100 g dry hazelnut waste)</i>
Zuruf <i>Husk</i>	190	15	4.02	1364.6 ± 267.0	13455.3 ± 1916.1
Dal <i>Prunings</i>	190	15	4.02	1394.4 ± 461.1	10310.5 ± 3449.1
	150	15	2.73	905.3 ± 67.6 <sup>d</sup>	8163.9 ± 28.0 <sup>c</sup>
	160	15	3.09	991.2 ± 106.5 <sup>d</sup>	8276.6 ± 98.8 <sup>bc</sup>
	170	15	3.36	1219 ± 42.1 <sup>cd</sup>	9179.7 ± 964.7 <sup>abc</sup>
	180	5	3.53	1277.7 ± 163.5 <sup>cd</sup>	10382.7 ± 1155.1 <sup>abc</sup>
	180	15	3.63	1280.4 ± 80.8 <sup>cd</sup>	10077.9 ± 440.1 <sup>abc</sup>
Kabuk <i>Shell</i>	180	30	3.91	1492 ± 83.3 <sup>c</sup>	10945.9 ± 553.9 <sup>abc</sup>
	180	45	4.03	1582.5 ± 75.6 <sup>bc</sup>	11220.3 ± 888.0 <sup>abc</sup>
	190	0	3.64	1278.6 ± 139.7 <sup>cd</sup>	9135.9 ± 1142.5 <sup>abc</sup>
	190	5	3.92	1365.2 ± 62.9 <sup>cd</sup>	10404.4 ± 243.2 <sup>abc</sup>
	190	15	4.02	1697.4 ± 220.2 <sup>abc</sup>	11472.0 ± 225.4 <sup>ab</sup>
	190	30	4.15	2022.7 ± 82.0 <sup>ab</sup>	12005.7 ± 1188.0 <sup>a</sup>
	200	0	3.93	1601.7 ± 15.2 <sup>bc</sup>	10700.9 ± 340.4 <sup>abc</sup>
	200	15	4.29	2115.7 ± 228.6 <sup>a</sup>	12261.5 ± 1453.9 <sup>a</sup>

(\*GAE: Gallik asit eşdeğeri, \*\*TE: Troloks eş değeri)

(\*GAE: *Galic acid equivalent*, \*\*TE: *Trolox equivalent*)

(Aynı sütundaki farklı harfler istatistiksel farklılıkları göstermektedir ( $P < 0.05$ .)

(*Different letters on the same row represent statistical differences ( $P < 0.05$ )*)

Kritik altı su ekstraksiyonunda hem uygulama sıcaklığı hem de uygulama süresi önemlidir. Bu iki faktörün etkisini “şiddet faktörü” kavramı ile birleştirmek mümkündür. Bu çalışmada da bu yöntem izlenerek şiddet faktörleri hesaplanmış ve bunun ekstraktların fenolik madde ve antioksidan

aktivitelerinin üzerine etkisi incelenmiştir (Çizelge 2). Fındık kabuğuna farklı sıcaklık ve sürede işlem uygulanarak elde edilen likörler için, sıcaklık ve sürenin likörlerin TFİ ve TAA değerleri üzerinde etkili olduğu, şiddet faktörü arttıkça bu değerlerin arttığı görülmüştür. Şiddet faktörü 2.73'den 4.29'e

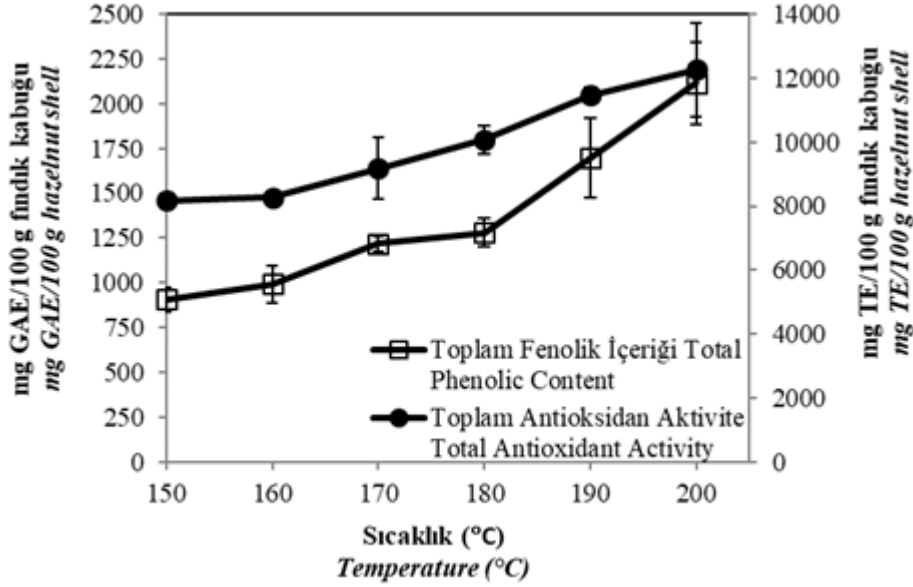
arttırıldıkça TFİ 0.82'den 1.91 mg GAE/mL'ye (905.3-2115.7 mg GAE/100 g fındık kabuğu) ve TAA 7.38'den 11.07 mg TE/mL'ye (8163.9-12261.5 mg TE/100 g fındık kabuğu) yükselmiştir. Otohizoliz, asitte çözünen ligninden türemiş bileşenleri ve ekstraktiflerden türemiş fraksiyonları içeren likörün elde edilmesini sağlayan bir teknolojidir (Conde vd., 2009). Dolayısıyla, TFİ'nin yüksek çıkmasının nedeni bu bileşenlerin açığa çıkışındaki artış olabilir. Farklı atıklardan elde edilen otohizoliz likörlerinin TFİ değerlerinin incelendiği diğer çalışmalarda da şiddet faktörünün etkili olduğu görülmüştür (Carvalho vd., 2009; Ho vd., 2014).

Kim vd. (2009) turunçgil meyve ezmesindeki fenoliklerin 25, 100, 150, 200 ve 250°C sıcaklıklarında 10, 30 ve 60 dk kritik altı su ile ekstraksiyonunu incelemişlerdir. Ekstraktların TFİ ve TAA değeri sıcaklık ve zaman arttıkça artmış ve bu çalışmaya benzer şekilde en yüksek değerlere en yüksek sıcaklık (200°C) ve en uzun sürede (60 dk) ulaşmıştır. Amendola vd. (2012) üzüm sapının 180°C'de 30 dk otohizolizi ile elde edilen likörünün TFİ değerini 2.54 g GAE/L olarak belirlemişlerdir. Bu çalışmada, aynı koşullar altında fındık kabuğu için bu değer 1.35 g GAE/L olarak bulunmuştur. Conde vd. (2009), 170, 190, 210 ve 230°C'de 10 dk işlemi ile elde edilen likörlerin TFİ değerlerini sırasıyla 1460, 1760, 2030 ve 2290 mg GAE/100 g budama atıkları olarak belirlemişlerdir. Conde vd. (2009)'e benzer şekilde bu çalışmada fındık kabuğundan 170, 190 ve 200°C'de 15 dk işlemi sonrası elde edilen likörlerin TFİ'si sırasıyla 1219, 1697 ve 2115 mg GAE/100 g fındık kabuğu olarak bulunmuştur. Bu nedenle, ekstraksiyon sonucu elde edilen ekstraktların TFİ ve TAA değerlerinin kullanılan ham maddenin türüne ve fenolik madde içeriğine bağlı olarak değiştiği söylenebilir.

Yukarıda sıcaklık ve sürenin birlikte etkisi şiddet faktörü kullanılarak ortaya konmuş olsa da bu iki faktörün etkisini ayrı ayrı incelemek de mümkündür. Sıcaklığın fındık kabuğundan fenolik maddelerin ekstraksiyonuna etkisini incelemek amacıyla aynı uygulama süresinde (15

dk) ancak farklı sıcaklıklarda (150, 160, 170, 180 ve 190°C) gerçekleştirilmiş işlemler karşılaştırılmıştır (Şekil 1). Uygulama sıcaklığı arttıkça likörün TFİ ve TAA'sı artış göstermiştir. Bu iki değişken, sıcaklık 150°C'den 160°C'e arttırıldığında pek değişmezken; 180°C'den 200°C'ye arttırıldığında TFİ için önemli artış sağlamıştır ( $P < 0.05$ ). Rodríguez-Meizoso vd. (2006) kekik yapraklarından antioksidanların ekstraksiyonu için farklı sıcaklıklarda (25, 50, 100, 150 ve 200°C) aynı süre için (30 dk) kritik altı su ekstraksiyonu uygulamış ve benzer şekilde, en yüksek sıcaklıkta (200°C) elde edilen ekstraktın en yüksek TAA değerine sahip olduğunu bildirmişlerdir. Conde vd. (2009) de zeytin budama atıklarının yüksek sıcaklıklardaki (210 ve 230°C) hidrotermal işleminin likördeki fenolik bileşenlerin açığa çıkışını arttırdığını belirtmişlerdir. Khuwijiitjaru vd. (2012), 200°C'nin 150°C'ye göre daha verimli ekstraksiyon sağlamanın nedenini yüksek sıcaklıklarda suyun dielektrik sabitinin metanol ve etanolüne yakın bir değere ulaşması ve suyun bu sıcaklıkta organik çözücülere benzer şekilde birçok bileşeni çözebilmesi olarak açıklamışlardır.

Uygulama süresinin fenolik maddelerin ekstraksiyonuna etkisini incelemek amacıyla 180°C'de 5, 15, 30 ve 45 dk ve 190°C'de 0, 5, 15 ve 30 dk sonrası elde edilen likörler karşılaştırılmıştır (Şekil 2a ve Şekil 2b). 180°C için süreyi 5 'den 45 dk'ya arttırmak TFİ ve TAA için önemli bir fark yaratmamıştır ( $P > 0.05$ ) (Şekil 2a). Bu nedenle 180°C için kritik altı su ekstraksiyonunu 5 dk gerçekleştirmek fenoliklerin ekstrakte edilmesi için yeterli olacak ve enerji verimliliği sağlayacaktır. 190°C'de elde edilen değerler 180°C'ye göre daha yüksektir (Şekil 2b). TFİ analiz sonuçlarına göre 190°C için işlem süresi 0'dan 30 dk'ya arttırıldığında önemli bir artış sağlanırken ( $P < 0.05$ ); TAA için süre 0'dan 30 dk'ya arttırıldığında artış görülmemiştir. Khuwijiitjaru vd. (2012), hem 150 °C hem de 200°C'de zamanın 30 dk'dan fazla olmasının TAA değerinde ek bir artış sağlamadığını görmüşlerdir.



Şekil 1. Fındık kabuğunun otohidroliz likörünün toplam fenolik madde içeriği ve toplam antioksidan aktivitesinin farklı sıcaklık koşullarındaki değişimi (uygulama süresi:15 dk)

(GAE: Gallik asit eşdeğeri, TE: Troloks eşdeğeri)

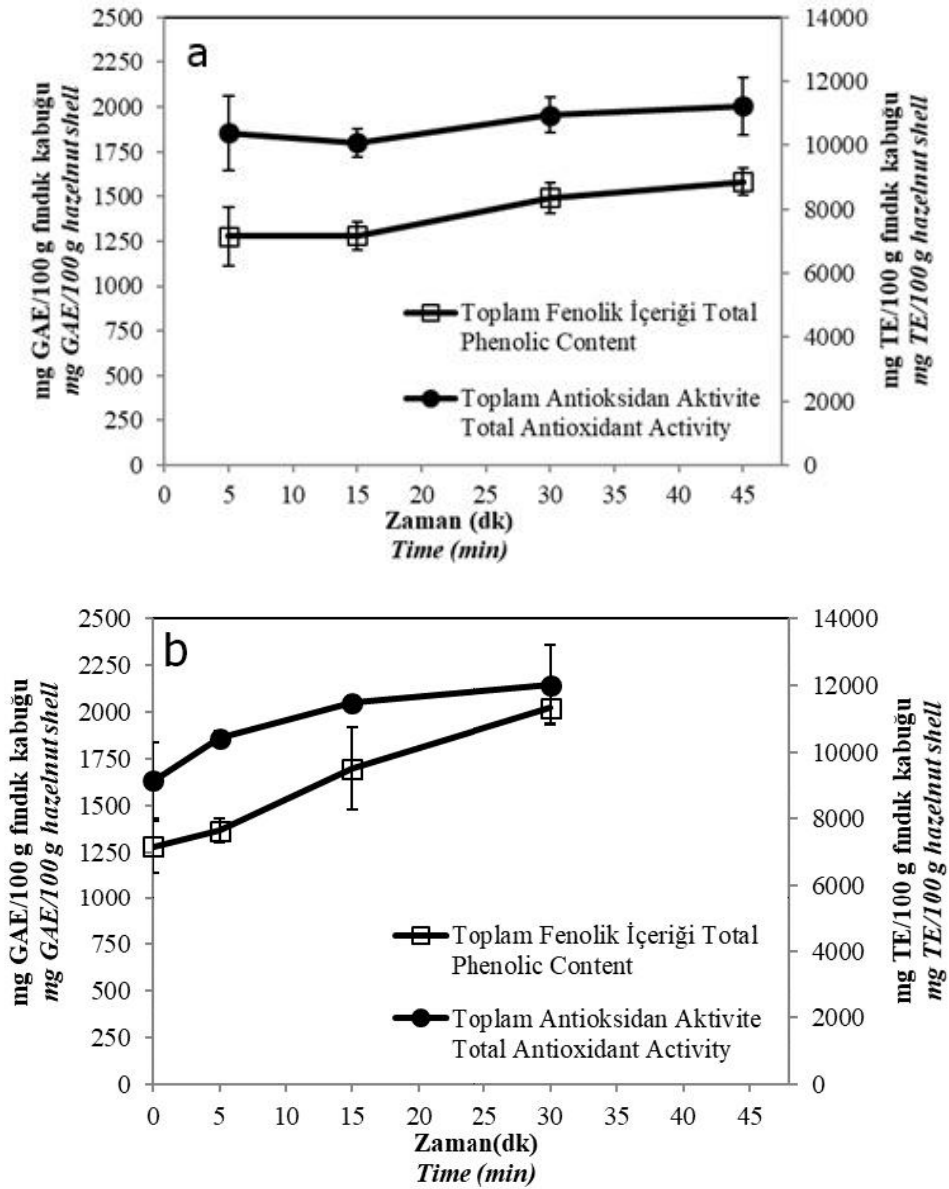
Figure 1. The change of total phenolic content and total antioxidant activity of autohydrolysis liquor of hazelnut shell under different temperature conditions (treatment time: 15 min)

(GAE: Gallic acid equivalent, TE: Trolox equivalent)

Yaptığımız çalışmalar göstermiştir ki, fındık kabuğunun kritik altı su ile muamelesi sonucu hem fenolik maddeler geri kazanılabilmekte hem de ksilooligosakkarit üretilebilmektedir. Bu iki değerli ürün grubunun ortak olarak üretimini en yüksek seviyeye çıkaracak koşulların tespit edilmesi gerekir. Bunun için, uygulama koşullarının fenolliklere ve oligosakkaritlere etkisi karşılaştırılmıştır. Farklı sıcaklıklarda 15 dk uygulama süresi sonucu elde edilen likörlerin oligosakkarit konsantrasyonundaki değişim fenoliklerin ekstraksiyonundan daha farklı olmuştur (Sürek ve Büyükkileci, 2017). 150'den 180°C'ye çıkıldığında oligosakkarit konsantrasyonu artmış, en yüksek değerler 180 ve 190°C için elde edilmiş, 190'dan 200°C'e çıkıldığında ise azalma görülmüştür. Fenoliklerin konsantrasyonu genel olarak bir artış gösterirken, en yüksek artış 180'den 200°C'e çıkıldığında görülmüştür. Şiddet faktörü arttıkça oligosakkarit konsantrasyonu artmış, en yüksek değere 190°C 'de 5 dk ( $\log R_c$ : 3.92) ile ulaşmış ve sonra azalma göstermiştir. Bu

likörlerin TFI ve TAA değerleri ise oligosakkarit konsantrasyonundan farklı olarak genel olarak bir artış göstermiştir. 180°C'de işlem süresinin arttırılması oligosakkarit konsantrasyonu ve TFI için önemli bir artışa sebep olmazken, 190°C için sürenin 5'den 30 dk'ya arttırılması oligosakkaritlerde azalmaya neden olmuştur. Buna göre 180°C'de işlem süresinin etkili olmaması nedeniyle, oligosakkarit ve fenolik maddelerce zengin bir likör elde edebilmek için 5 dk yeterli olacaktır. 190°C için 30 dk'da en yüksek TFI ve TAA değerleri elde edilirken, en yüksek oligosakkarit konsantrasyonu 5 dk ile elde edilmiştir. Dolayısıyla, oligosakkarit ve fenolik konsantrasyonu yüksek bir likör elde etmek için 180 ve 190°C'nin uygulanması yeterli olacaktır. Aynı süre için 190°C daha yüksek TFI ve TAA değerleri gösterdiğinden tercih edilebilir; fakat 190°C'de sürenin arttırılması ile fenoliklerin ekstraksiyonu artacağı halde işlem süresinin 5 dk'dan fazla olması oligosakkarit konsantrasyonunu azaltacaktır.





Şekil 2. Fındık kabuğunun otohidroлиз likörünün toplam fenolik madde içeriği ve toplam antioksidan aktivitesinin a) 180 ve b) 190°C için farklı işlem süresi koşullarındaki değişimi (GAE: Gallik asit eşdeğeri, TEAK: Trolox eşdeğeri)

Figure 2. The change of total phenolic content and total antioxidant activity of antihydrolysis liquor of hazelnut shell for a) 180 and b) 190°C at different time conditions (GAE: Gallic acid equivalent, TE: Trolox equivalent)

Otohidroлиз uygulaması sonrasında açığa çıkan ve katma değeri yüksek ürünler olan fenolik bileşenler ve lignin uygulanacak ilave ayırma işlemi ile otohidroлиз liköründen geri kazanılabilir (Amendola vd., 2012). Örneğin, likörün etil asetat ile ekstraksiyonu ile yapay antioksidanlarla karşılaştırılabilir aktivitede ekstraktlar elde edilebilmektedir (Conde vd., 2009).

## SONUÇ

Fındık atıklarından oligosakkarit üretmek amacıyla farklı sıcaklık ve sürelerde kritik altı su ekstraksiyonu ile elde edilen likörlerinin TFİ ve TAA analizi yapılmıştır. Kritik altı su ekstraksiyonunun fındık kabuğundan fenoliklerin kazanılmasında etkili bir yöntem olduğu görülmüştür. Üstelik çözücü (aseton ve metanol)

ile ekstraksiyona göre verimliliği daha yüksektir. Uygulamanın sıcaklığı ve süresi arttıkça verim artsa da orta şiddetlerde de yüksek miktarlarda TFİ ve TAA değerleri elde edilebilmektedir. Orta şiddette (180-190°C) fındık kabuğundan ksilooligosakkarit de elde edilebildiğinden bu koşullarda kritik altı su ile fındık kabuğundan yüksek oranda faydalanılacağı söylenebilir. Ülkemizde her yıl fazla miktarda açığa çıkan fındık atıklarının kritik altı su ekstraksiyonu gibi çevre dostu bir teknoloji ile yararlı bileşenlerin üretilmesi için değerlendirilmesi ekonomiye katma değer sağlayacaktır.

### TEŞEKKÜR

Bu çalışma İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü Bilimsel Araştırma Projesi (Proje No: 2015IYTE13) ve Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (Proje No: 213O126) tarafından desteklenmiştir.

### KAYNAKLAR

Agourram, A., Ghirardello, D., Rantsiou, K., Zeppa, G., Belviso, S., Romane, A., Oufdou, K., Giordano, M. (2012). Phenolic content, antioxidant potential and antimicrobial activities of fruit and vegetable by-product extracts. *Int J Food Prop*, 16(5): 1092-1104. doi:10.1080/10942912.2011.576446

Alasalvar, C., Karamac, M., Kosinska, A., Rybarczyk, A., Shahidi, F., Amarowicz, R. (2009). Antioxidant activity of hazelnut skin phenolics. *J Agric Food Chem*, 57(11), 4645-4650. doi:10.1021/jf900489d

Alkaya, E., Altay, T., Ata, A., Çakar, S. O., Durtas, P. (2010). Tarımsal atıklardan yüksek katma değerli biyoürün üretimi. *İleri Teknoloji Projeleri Destek Programı Raporu*, Türkiye Teknoloji Geliştirme Vakfı, Ankara, Türkiye, s. 35.

Alvira, P., Tomás-Pejoj, E., Ballesteros, M., Negro, M. J. (2010). Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. *Bioresour Technol*, 101(13), 4851-4861. doi:10.1016/j.biortech.2009.11.093

Amendola, D., De Faveri, D. M., Egües, I., Serrano, L., Labidi, J., Spigno, G. (2012). Autohydrolysis and organosolv process for

recovery of hemicelluloses, phenolic compounds and lignin from grape stalks. *Bioresour Technol*, 107, 267-274. doi:10.1016/j.biortech.2011.12.108

Carvalho, F., Esteves, M. P., Parajó, J. C., Pereira, H., Gírio, F. M. (2004). Production of oligosaccharides by autohydrolysis of brewery's spent grain. *Bioresour Technol*, 91(1), 93-100. doi:10.1016/S0960-8524(03)00148-2

Carvalho, F., Silva-Fernandes, T., Duarte, L. C., Gírio, F. M. (2009). Wheat straw autohydrolysis: Process optimization and products characterization. *Appl Biochem Biotechnol*, 153(1-3), 84-93. doi:10.1007/s12010-008-8448-0

Carvalho, A. F. A., Neto, P. D. O., da Silva, D. F., Pastore, G. M. (2013). Xylo-oligosaccharides from lignocellulosic materials: Chemical structure, health benefits and production by chemical and enzymatic hydrolysis. *Food Res Int*, 51(1), 75-85. doi:10.1016/j.foodres.2012.11.021

Conde, E., Cara, C., Moure, A., Ruiz, E., Castro, E., Domínguez, H. (2009). Antioxidant activity of the phenolic compounds released by hydrothermal treatments of olive tree pruning. *Food Chem*, 114(3), 806-812. doi:10.1016/j.foodchem.2008.10.017

Çöpür, Y., Tozluoglu, A., Özkan, M. (2013). Evaluating pretreatment techniques for converting hazelnut husks to bioethanol. *Bioresour Technol*, 129, 182-190. doi:10.1016/j.biortech.2012.11.058

Del Rio, D., Calani, L., Dall'Asta, M., Brighenti, F. (2011). Polyphenolic composition of hazelnut skin. *J Agric Food Chem*, 59(18), 9935-9941. doi:10.1021/jf202449z

FAOSTAT (2017). Production of hazelnuts with shell. <http://faostat3.fao.org/faostat-gateway/go/to/download/Q/QC/E> (Erişim tarihi: 01.06.2017)

Guney, M. S. (2013). Utilization of hazelnut husk as biomass. *Sustainable Energy Technol Assess*, 4, 72-77. doi:10.1016/j.seta.2013.09.004

Hendriks, A. T. W. M., Zeeman, G. (2009). Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. *Bioresour Technol*, 100(1), 10-18. doi:10.1016/j.biortech.2008.05.027

- Ho, A. L., Carvalheiro, F., Duarte, L. C., Roseiro, L. B., Charalampopoulos, D., Rastall, R. A. (2014). Production and purification of xylooligosaccharides from oil palm empty fruit bunch fibre by a non-isothermal process. *Bioresour Technol*, 152, 526–529. doi:10.1016/j.biortech.2013.10.114
- Ibañez, E., Kubátová, A., Señoráns, F. J., Cavero, S., Reglero, G., Hawthorne, S. B. (2003). Subcritical water extraction of antioxidant compounds from rosemary plants. *J Agric Food Chem*, 51(2), 375–382. doi:10.1021/jf025878j
- Jo, E.-K., Heo, D.-J., Kim, J.-H., Lee, Y.-H., Ju, Y.-C., Lee, S.-C. (2013). The effects of subcritical water treatment on antioxidant activity of golden oyster mushroom. *Food Bioprocess Technol*, 6(9), 2555–2561. doi:10.1007/s11947-012-0793-x
- Khuwijitjaru, P., Sayputikasikorn, N., Samuhasaneetoo, S., Penroj, P., Siriwongwilaichat, P., Adachi, S. (2012). Subcritical water extraction of flavoring and phenolic compounds from cinnamon bark (*Cinnamomum zeylanicum*). *J Oleo Sci*, 61(6), 349–355. doi:10.5650/jos.61.349
- Kim, J. W., Nagaoka, T., Ishida, Y., Hasegawa, T., Kitagawa, K., Lee, S. C. (2009). Subcritical water extraction of nutraceutical compounds from citrus pomaces. *Sep Sci Technol*, 44(11), 2598–2608. doi:10.1080/01496390903014375
- Miller, N. J., Rice-Evans, C. A. (1997). Factors influencing the antioxidant activity determined by the ABTS<sup>+</sup> radical cation assay. *Free Radical Res*, 26(3), 195–199. doi:10.3109/10715769709097799
- Overend, R. P., Chornet, E., Gascoigne, J. A. (1987). Fractionation of lignocellulosics by steam-aqueous pretreatments. *Phil Trans R Soc A*, 321(1561): 523-536.
- Rodríguez-Meizoso, I., Marin, F. R., Herrero, M., Señoráns, F. J., Reglero, G., Cifuentes, A., Ibañez, E. (2006). Subcritical water extraction of nutraceuticals with antioxidant activity from oregano. Chemical and functional characterization. *J Pharm Biomed Anal*, 41(5), 1560–1565. doi:10.1016/j.jpba.2006.01.018
- Shahidi, F., Alasalvar, C., Liyana-Pathirana, C. M. (2007). Antioxidant phytochemicals in hazelnut kernel (*Corylus avellana* L.) and hazelnut byproducts. *J Agric Food Chem*, 55, 1212–1220. doi:10.1021/jf062472o
- Singh, P. P., Saldana, M. D. A. (2011). Subcritical water extraction of phenolic compounds from potato peel. *Food Res Int*, 44(8), 2452–2458. doi:10.1016/j.foodres.2011.02.006
- Singleton, V. L., Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am J Enol Vitic*, 16(3), 144-158.
- Sluiter, A., Hames, B., Hyman, D., Payne, C., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., Templeton, D., Wolfe, J. (2008). Determination of total solids in biomass and total dissolved solids in liquid process samples. *National Renewable Energy Laboratory, Golden, CO, NREL Technical Report No. NREL/TP-510-42621*, 1-6.
- Surek, E., Buyukkileci, A. O. (2017). Production of xylooligosaccharides by autohydrolysis of hazelnut (*Corylus avellana* L.) shell. *Carbohydr Polym*, 174, 565–571. doi:10.1016/j.carbpol.2017.06.109
- Wataniyakul, P., Pavasant, P., Goto, M., Shotipruk, A. (2012). Microwave pretreatment of defatted rice bran for enhanced recovery of total phenolic compounds extracted by subcritical water. *Bioresour Technol*, 124, 18–22. doi:10.1016/j.biortech.2012.08.053
- Xiao, X., Bian, J., Peng, X. P., Xu, H., Xiao, B., Sun, R. C. (2013). Autohydrolysis of bamboo (*Dendrocalamus giganteus* Munro) culm for the production of xylo-oligosaccharides. *Bioresour Technol*, 138, 63-70. doi: 10.1016/j.biortech.2013.03.160
- Xu, Y., Sismour, E. N., Parry, J., Hanna, M. A., Li, H. (2012). Nutritional composition and antioxidant activity in hazelnut shells from US-grown cultivars. *Int J Food Sci Technol*, 47(5), 940–946. doi:10.1111/j.1365-2621.2011.02925.x
- Zakaria, S. M., Kamal, S. M. M. (2016). Subcritical water extraction of bioactive compounds from plants and algae: Applications in pharmaceutical and food ingredients. *Food Eng Rev*, 8(1), 23–34. doi:10.1007/s12393-015-9119-x