

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Monika PAVLINJEK

**VSEBNOST SKUPNIH FENOLNIH SPOJIN,
MAŠČOBNIH KISLIN IN ANTIOKSIDATIVNA
UČINKOVITOST V VZORCIH MANDLJA Z
RAZLIČNIM GEOGRAFSKIM POREKLOM**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2012

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Monika PAVLINJEK

**VSEBNOST SKUPNIH FENOLNIH SPOJIN, MAŠČOBNIH KISLIN
IN ANTIOKSIDATIVNA UČINKOVITOST V VZORCIH MANDLJA Z
RAZLIČNIM GEOGRAFSKIM POREKLOM**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**CONTENT OF TOTAL PHENOLIC COMPOUNDS, FATTY ACIDS
AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF ALMONDS IN SAMPLES
WITH DIFFERENT ORIGIN**

GRADUATION THESIS
University study

Ljubljana, 2012

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija živilske tehnologije. Opravljeno je bilo na Katedri za biokemijo in kemijo živil Oddelka za živilstvo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Za mentorico diplomskega dela je imenovana prof. dr. Nataša Poklar Ulrih, za somentorico dr. Mihaela Skrt in za recenzenta prof. dr. Rajko Vidrih.

Mentorica: prof. dr. Nataša Poklar Ulrih

Somentorica: dr. Mihaela Skrt

Recenzent: prof. dr. Rajko Vidrih

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:

Član:

Član:

Datum zagovora:

Diplomsko delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela. Podpisana se strinjam z objavo svoje naloge v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddala v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

Monika Pavlinjek

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD** Dn
- DK** UDK 634.55:547.56:543.635(043) = 163.6
mandelj/*Prunus dulcis*/rastlinski ekstrakti/fizikalnokemijske lastnosti/fenolne
- KG** spojine/maščobne kisline/antioksidanti/antioksidativna učinkovitost/geografsko
poreklo
- AV** PAVLINJEK, Monika
- SA** POKLAR ULRIH, Nataša (mentorica)/ SKRT, Mihaela (somentorica)/
VIDRIH, Rajko (recenzent)
- KZ** SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- ZA** Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo
- LI** 2012
- IN** VSEBNOST SKUPNIH FENOLNIH SPOJIN, MAŠČOBNIH KISLIN IN
ANTIOKSIDATIVNA UČINKOVITOST V VZORCIH MANDLJA Z
RAZLIČNIM GEOGRAFSKIM POREKLOM
- TD** Diplomsko delo (univerzitetni študij)
- OP** X, 50 str., 22 pregl., 13 sl., 34 vir.
- IJ** sl
- JI** sl/en
- AI** Namen naloge je bil določiti skupne fenolne spojine, maščobne kisline in antioksidativno učinkovitost v vzorcih mandljev. Za vzorce smo uporabili mandlje iz različnih geografskih območij, in sicer Italije, Hrvaške, Španije, Turčije in Združenih držav Amerike. Analizirali smo različne dele mandlja, neolupljen mandelj, olupljen mandelj in kožo mandlja, ki je ostala kot odpadek pri lupljenju. Ekstrakcijo fenolnih spojin smo izvedli v dveh različnih topilih, in sicer v mešanici etanola in vode (70 : 30, v/v) ter v vodi. Skupne fenolne spojine smo v ekstraktih določali spektrofotometrično s pomočjo Folin-Ciocalteu metode. Antioksidativno učinkovitost smo določili z analizo sposobnosti lovljenja prostih DPPH[•] radikalov. S pomočjo plinske kromatografije smo določili vsebnost maščobnih kislin v jedru mandlja. Med vzorci mandlja z različnim geografskim poreklom ni velike razlike v vsebnosti skupnih fenolnih spojinah, antioksidativni učinkovitosti in vsebnosti maščobnih kislin. V koži mandlja smo določili največjo vsebnost skupnih fenolnih spojin in antioksidativno učinkovitost. Glede maščobnokislinske sestave se tudi vzorci niso bistveno razlikovali; v vseh smo določili palmitinsko kislino, stearinsko kislino, oleinsko kislino in linolno kislino.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn

DC UDC 634.55:547.56:543.635(043) = 163.6

CX almonds/ *Prunus dulcis*/plant extracts/physicochemical properties/phenolics/fatty acids/antioxidants/antioxidative activity/ geographical origin

AU PAVLINJEK, Monika

AA POKLAR ULRIH, Nataša (supervisor)/ SKRT, Mihaela (co-advisor)/ VIDRIH, Rajko (reviewer)

PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva pot 101

PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Food Science and Technology

PY 2012

TI CONTENT OF TOTAL PHENOLIC COMPOUNDS, FATTY ACIDS AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF ALMONDS IN SAMPLES WITH DIFFERENT ORIGIN

DT Graduation thesis (university studies)

NO X, 50 p., 22 tab., 13 fig., 34 ref.

LA sl

AL sl/en

AB The main objective of the thesis is to determine the total phenolic compounds, fatty acids and antioxidant activity in almond samples. The almond samples studied are of different geographic origin – Italy, Croatia, Spain, Turkey and the United States of America. The analyses included different parts of almonds, whole unpeeled almonds, peeled almonds and almond skin obtained after peeling the nut. Extraction was performed in two different solvents – ethanol / water (70:30, v / v) and water. The concentration of total phenolic compounds was determined spectrophotometrically according to the Folin-Ciocalteu method. Antioxidant activity of extracts was determined by scavenging activity of free DPPH[•] radicals. Using gas chromatography we determined the fatty acid content in almond kernels. There is not much difference between samples of the almonds of different geographical origin of total phenolic compounds, antioxidant activity and fatty acid content. As expected, differences emerged after different fractions of almonds had been compared; the maximum amount of total phenolic compounds and antioxidant activity of the skin had also been determined. With regard to the content of fatty acids, no substantial differences were detected; palmitic, stearic, oleic and linoleic acids were determined in all samples.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VII
KAZALO SLIK	IX
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	X
1 UVOD.....	1
1.1 NAMEN NALOGE	2
1.2 DELOVNE HIPOTEZE.....	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 OREŠČKI	3
2.2 MANDLJEVEC.....	3
2.2.1 Poreklo in zgodovina	3
2.2.2 Botanična razvrstitev	3
2.2.3 Morfološke značilnosti in fiziološke značilnosti.....	4
2.2.4 Podnebne in talne zahteve.....	5
2.2.5 Sorte	5
2.3 MANDELJ.....	6
2.3.1 Kemijska sestava in hranilna vrednost.....	7
2.3.2 Pridelava mandlja	8
2.4 ANTIOKSIDANTI	8
2.4.1 Fenolne spojine	9
2.4.2 Biosinteza fenolnih spojin	11
2.5 MAŠČOBNE KISLINE	12
2.5.1 Fizikalne in kemijske lastnosti maščobnih kislin.....	13
3 MATERIALI IN METODE DELO	16
3.1 MATERIALI	16
3.1.1 Vzorci mandljev	16
3.1.2 Reagenti	16
3.1.3 Aparature	16
3.1.4 Pribor	16
3.1.5 Priprava raztopin	17
3.2 METODE.....	18
3.2.1 Priprava vzorca.....	18
3.2.2 Ekstrakcija	18
3.2.3 Določanje skupnih fenolnih spojin.....	20
3.2.4 Umeritvena krivulja za določanje skupnih fenolnih spojin v vodnih ekstraktih.....	20
3.2.5 Priprava umeritvene krivulje za določanje skupnih fenolnih spojin v etanolnih ekstraktih	22

3.2.6	Določevanje antioksidativne učinkovitosti z DPPH• radikalom	24
3.2.7	Določanje vsebnosti višjih maščobnih kislin v jedrih mandlja s plinsko kromatografijo	25
4	REZULTATI.....	27
4.1	VSEBNOST SKUPNIH FENOLNIH SPOJIN V MANDLJU	27
4.2	DOLOČEVANJE ANTIOKSIDATIVNE UČINKOVITOSTI Z DPPH• REAGENTOM	33
4.3	DOLOČANJE VSEBNOSTI VIŠJIH MAŠČOBNIH KISLIN V MANDLJU..	42
5	SKLEPI.....	44
6	POVZETEK	45
7	VIRI	47
ZAHVALA		

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Sorte mandlja (<i>Prunus amygdalus</i>) (Štampar in sod., 2005).	6
Preglednica 2: Kemijska sestava in prehranska vrednost mandlja na 100 g mandljev (Souci in sod., 2000).	7
Preglednica 3: Delež identificiranih flavonoidov in fenolnih kislin v koži in olupljenem jedru mandlja (Milbury in sod., 2006).	11
Preglednica 4: Nasičene maščobne kisline (Kornhauser, 1994; Boyer, 2005).	12
Preglednica 5: Nenasičene maščobne kisline (Kornhauser, 1994; Boyer, 2005).	13
Preglednica 6: Vsebnost in sestava maščobnih kislin, različnih metilnih estrov mandljev različnega geografskega porekla (rezultat v preglednici je podan kot g maščobnih kislin metilnih estrov na 100 g mandljevega olja) (Garcia-Lopez in sod., 1996).	15
Preglednica 7: Volumen raztopine galne kisline s koncentracijo 0,10 mg/mL (V), masna koncentracija galne kisline ($\gamma_{g.k.}$) v reakcijski mešanici in povprečne vrednosti izmerjenih (A_{765}) v reakcijski mešanici (destilirana voda).	21
Preglednica 8: Volumen raztopine galne kisline s koncentracijo 0,10 mg/mL (V); masna koncentracija galne kisline ($\gamma_{g.k.}$) v reakcijski mešanici; povprečne vrednosti izmerjenih absorbanc (A_{765}) v reakcijski mešanici (70 % etanol).	22
Preglednica 9: Eksperimentalne vrednosti: masa vzorca mletih mandljev [g], masa dodanega internega standarda [g] in masa topila [g].	25
Preglednica 10: Vrednost absorbanc A_{765} , vsebnost skupnih fenolnih spojin (γ) (μg galne kisline na mL raztopine ekstrakta) in masa galne kisline v mg na gram vzorca mandlja; geografsko poreklo Italija.	27
Preglednica 11: Vrednost absorbanc A_{765} , vsebnost skupnih fenolnih spojin (γ) (μg galne kisline na mL raztopine ekstrakta) in masa galne kisline v mg na gram vzorca mandlja; geografsko poreklo Hrvaška.	28
Preglednica 12: Vrednost absorbanc A_{765} , vsebnost skupnih fenolnih spojin (γ) (μg galne kisline na mL raztopine ekstrakta) in masa galne kisline v mg na gram vzorca mandlja; geografsko poreklo Španija.	28
Preglednica 13: Vrednost absorbanc A_{765} , vsebnost skupnih fenolnih spojin (γ) (μg galne kisline na mL raztopine ekstrakta) in masa galne kisline v mg na gram vzorca mandlja; geografsko poreklo Turčija.	29

Preglednica 14: Vrednost absorbance A_{765} , vsebnost skupnih fenolnih spojin (γ) (μg galne kisline na mL raztopine ekstrakta) in masa galne kisline v mg na gram vzorca mandlja; geografsko poreklo ZDA.	29
Preglednica 15: Povprečne vrednosti absorbance pri valovni dolžini 517 nm ($\bar{A}_{517}$), koncentracija skupnih fenolnih spojin, γ ($\mu\text{g/mL}$), in % inhibicije radikala DPPH $\bullet$: geografsko poreklo Italija.	34
Preglednica 16: Povprečne vrednosti absorbance pri valovni dolžini 517 nm ($\bar{A}_{517}$), koncentracija skupnih fenolnih spojin, γ ($\mu\text{g/mL}$) in % inhibicije radikala DPPH $\bullet$: geografsko poreklo Hrvaška.	35
Preglednica 17: Povprečne vrednosti absorbance pri valovni dolžini 517 nm ($\bar{A}_{517}$), koncentracija skupnih fenolnih spojin, γ ($\mu\text{g/mL}$) in % inhibicije radikala DPPH $\bullet$: geografsko poreklo Španija.....	36
Preglednica 18: Povprečne vrednosti absorbance pri valovni dolžini 517 nm ($\bar{A}_{517}$), koncentracija skupnih fenolnih spojin, γ ($\mu\text{g/mL}$) in % inhibicije radikala DPPH $\bullet$: geografsko poreklo Turčija.	37
Preglednica 19: Povprečne vrednosti absorbance pri valovni dolžini 517 nm ($\bar{A}_{517}$) , koncentracija skupnih fenolnih spojin, γ ($\mu\text{g/mL}$) in % inhibicije radikala DPPH $\bullet$: geografsko poreklo ZDA.	38
Preglednica 20: Vrednost $\text{ED}_{50} \% \text{ DPPH}\bullet$ za ekstrakte mandlja v topilu destilirana voda.	39
Preglednica 21: Vrednost $\text{ED}_{50} \% \text{ DPPH}\bullet$ za ekstrakte mandlja v topilu etanol.	40
Preglednica 22: Vsebnost maščobnih kislin v jedrih mandlja podana v gramih na kilogram homogeniziranih jeder mandlja.....	42

KAZALO SLIK

Slika 1: Morfološke in fiziološke značilnosti mandlja (Grieve, 1931).....	4
Slika 2: Mandelj v lupini in brez lupine, geografsko poreklo Hrvaška	7
Slika 3: Prikaz osnovne strukture za glavne fenolne spojine (Milbury in sod., 2006)	10
Slika 4: Blanširanje mandljev, olupljeni mandlji po blanširanju in koža mandljev po blanširanju (od leve proti desni)	18
Slika 5: Shema priprave ekstrakta.....	19
Slika 6: Umeritvena krivulja odvisnosti absorbance pri 765 nm v odvisnosti od masne koncentracije galne kisline v destilirani vodi pri 25 °C	21
Slika 7: Umeritvena krivulja odvisnosti absorbance pri 765 nm v odvisnosti od masne koncentracije galne kisline v 70 % etanolu pri 25 °C	23
Slika 8: Vsebnost skupnih fenolnih spojin v vodnih ekstraktih mandlja izražena v mg GAE/g vzorca	30
Slika 9: Vsebnost skupnih fenolnih spojin v etanolnih ekstraktih mandlja izražena v mg GAE/g vzorca	30
Slika 10: Vzorci za analizo DPPH• z geografskim poreklom ZDA, od leve proti desni si sledijo neolupljeno jedro, olupljeno jedro in koža.	33
Slika 11: Vrednost ED ₅₀ % DPPH• (µg/mL) za vodne ekstrakte mandljev z različnih geografskim poreklom.....	39
Slika 12: Vrednost ED ₅₀ % DPPH• (µg/mL) za etanolne ekstrakte mandljev z različnih geografskim poreklom.....	40
Slika 13: Sestava maščobnih kislin glede na geografsko poreklo vzorcev mandlja.....	43

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

A – absorbanca

AO – antioksidant

DPPH[•] - 2,2 difenil – 1 – pikril – hidrazil

ED_{50% DPPH[•]} - koncentracija fenolnih spojin, ki je odgovorna za 50 % zmanjšanje začetne količine prostih radikalov

FC – Folin – Ciocalteu

GAE – ekvivalent galne kisline

IS – interni standard

k – smerni koeficient premice

MEMK – metilni estri maščobnih kislin

RCF - relativna centrifugalna sila

RM – reakcijska mešanica

SFS – skupne fenolne spojine

γ – masna koncentracija

1 UVOD

Mandelj je plod sadnega drevesa mandljevca. Znan in priljubljen je bil že v antičnih časih (Vitjan, 1988). Izvira iz osrednje Azije, od tam pa se je preko Turčije, Sirije in Irana razširil v Evropo. Uspeva na mediteranskem območju (Portugalska, Španija, Italija in Grčija) in v severni Afriki (Tunizija, Maroko). V času španskih osvajanj se je prenesel v Ameriko, kjer so ga začeli resno gojiti v 19. stoletju, od tod naprej pa še v zahodno Avstralijo in južno Afriko (Štampar in sod., 2005).

Mandlje lahko uživamo presne ali pečene, nadvse primerni so tudi v slaščičarstvu. Uporabljajo se predvsem blanširani, torej taki, katerim se s pomočjo vrele vode od jedra odstrani koža (postopek odstranitve kože od jedra). Blanširani mandlji imajo bolj mil okus. Priporočljivo jih je uživati surove, saj se na ta način ohranijo vse zdravju koristne komponente v mandlju.

Fenolne spojine imenujemo vse tiste spojine, ki imajo najmanj en aromatski obroč in najmanj eno ali več $-OH$ skupin, vezanih direktno na aromatski obroč (Abram, 2000). Fenolne spojine delimo glede na število C-atomov. Po tej razvrstitvi najdemo v mandlju enostavne fenolne spojine, flavonole, flavanole, flavanone, antociane in proantocianidine. Največ fenolnih spojin najdemo v koži, in sicer kar 80 % glede na ostale dele mandlja.

Maščobne kisline so poleg triacilglicerolov sestavni del maščob. Vsebujejo dolgo acilno verigo, ki lahko vsebuje enojne ali dvojne vezi. Glede na število dvojnih vezi delimo maščobne kisline na nasičene in nenasičene.

Skupne maščobe v mandlju predstavljajo 50 % teže mandlja. Predstavnici nasičenih maščobnih kislin v mandlju sta palmitinska in stearinska kislina, kar 90 % maščobnih kislin v mandlju pa zastopata oleinska in linolna kislina, ki sta nenasičeni maščobni kislini.

Ugodna maščobnokislinska sestava, vitamini, topni v maščobah in fenolne spojine ugodno vplivajo na človeško zdravje. Mandlji vsebujejo vitamin E, mangan, magnezij, baker, fosfor in druge, zato je priporočljivo njihovo vsakodnevno uživanje. Če bi na dan užili 52 g mandljev, bi se naša krvna slika maščob izboljšala, kar pomeni, da bi se nasičene maščobne kisline znižale za 3 %, trans maščobne kisline pa za 14 % (Sathe in sod., 2008). S tem preventivno vplivamo na bolezni srca in ožilja, zmanjša se tveganje za raka prostate, debelega črevesja in danke. Mandlji imajo nizek glikemičen indeks, zato so priporočljivi za prehrano bolnikov s sladkorno boleznijo tipa 2.

1.1 NAMEN NALOGE

V okviru diplomskega dela želimo v različnih frakcijah mandlja (neolupljeno in olupljeno jedro ter koža) določiti vsebnost skupnih fenolnih spojin. Rezultate dobljene za vodne in etanolne ekstrakte različnih frakcij mandlja bomo primerjali glede na geografsko poreklo (ZDA, Italija, Španija, Turčija, Hrvaška), antioksidativno učinkovitost in sestavo maščobnih kislin.

1.2 DELOVNE HIPOTEZE

- Pričakujemo razlike v vsebnosti fenolnih spojin glede na geografsko poreklo mandlja.
- Pričakujemo razlike v vsebnosti skupnih fenolnih spojin glede na uporabljeno topilo pri ekstrakciji.
- Največjo vsebnost skupnih fenolnih spojin pričakujemo v koži mandlja, najmanjšo v olupljenem jedru.
- Pričakujemo razlike v antioksidativni učinkovitosti glede na uporabljeno topilo pri ekstrakciji, med posameznimi frakcijami mandlja, kot tudi razlike v antioksidativni učinkovitosti glede na geografsko poreklo mandlja.
- Ne pričakujemo večjih razlik v sestavi maščobnih kislin mandlja glede na geografsko poreklo.

2 PREGLED OBJAV

2.1 OREŠČKI

Lupinarji ali oreščki so sadeži, ki se skrivajo v notranjosti olesenele luščine. V luščini najdemo užitno jedro. Vsi lupinarji so energijsko bogata živila. Vsebujejo nasičene in nenasičene maščobne kisline, ki so koristne za človekov organizem. V njih najdemo beljakovine, desetkrat več vlaknin kot v mesu, sladkorje in minerale (kalcij, železo, magnezij, fosfor, kalij, natrij, cink, baker, mangan). Jedra vsebujejo veliko raznolikih vitaminov, npr. vitamin C, tiamin (B1), riboflavin (B2) in vitamine B6, B12, A, E in K ter niacin in pantotensko kislino. Visoko vsebnost antioksidantov najdemo v jedru (Solar in sod., 2006).

Zaradi industrijskega razvoja se je povpraševanje po oreških povečalo, saj so dobra surovina za svetilna olja in maziva, margarino, mila in kozmetične izdelke. Med oreške, ki jim najdemo na naših trgovskih policah, spadajo mandelj (*Prunus dulcis*), oreh (*Juglans regia*), lešnik (*Corylus avellana*), pistacija (*Pistacia vera*), indijski orešček (*Anacardium occidentale*), makadamija (*Macadamia ternifolia*) in brazilski oreh (*Bertholletia excelsa*) (Flowerdew, 1995).

2.2 MANDLJEVEC

2.2.1 Poreklo in zgodovina

Mandljevec izvira iz osrednje Azije, od tam pa se je preko Turčije, Sirije in Irana razširil v Evropo. Uspeva na mediteranskem območju (Portugalska, Španija, Italija in Grčija) in v severni Afriki (Tunizija, Maroko). V času španskih osvajanj se je prenesel v Ameriko, kjer so ga začeli resno gojiti v 19. stoletju, od tod naprej pa še v zahodno Avstralijo in južno Afriko (Štampar in sod., 2005).

2.2.2 Botanična razvrstitev

Za mandljevec se uporablja znanstveno ime *Prunus dulcis*, katerega je prvi uporabil Miller leta 1768. Spada v rod breskev (*Prunus percia* L.) iz družine rožnic; znotraj rodu *Prunus* je v podrod klasificiran *Amygdalus*-mandljevec (Dale in sod., 1991).

2.2.4 Podnebne in talne zahteve

Ugodna klima za mandljevec je sredozemska s kratkimi in milimi zimami ter dolgimi in vročimi poletji. Pozimi se lahko temperature spustijo do $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$, kar pa ni usodno. Škodljivejše so januarske ali februarske temperature pod $0\text{ }^{\circ}\text{C}$, saj lahko ob tem času mandelj že začne cveteti. V tem primeru so nizke temperature krive za pozebo, zato za sajenje izbiramo toplejše lege. Poleti, tam kjer ne pride do ožigov na plodovih, poganjkih ali na brstih, mandljevec preživi z malo dežja in visokimi temperaturami (Štampar in sod., 2005).

Za rast potrebuje dobro osvetljenost, v zasenčenih rastiščih in legah se slabo razvije. Zaradi tega so plodovi manjši ali pa lahko oplojeni cvetovi in plodiči odpadejo že v času cvetenja. Dobro uspeva na suhih tleh z dovolj apna, prenaša pa tudi bolj peščena in kamnita tla, zato se lahko za nasade mandljevec izkoristijo slabše, zapuščene površine (Adamič in sod., 1975).

2.2.5 Sorte

V preteklosti so mandljevec razmnoževali izključno s semeni, zato so v različnih krajih nastale številne sorte, ki imajo med seboj zelo podobne lastnosti in jih težko razločimo. Sorte mandljevec razvrščamo v več skupin, glede na uporabo plodov ločimo:

- namizne sveže sorte,
- namizne suhe sorte,
- sorte za slaščičarsko in konditorsko uporabo.

Glede na okus ločimo:

- sladke, ki so uporabne za takojšnjo uporabo in predelavo,
- grenke, ki so primerne le za farmacevtsko industrijo.

Na podlagi trdote luščine lahko delimo mandlje v:

- koščake (101 g trdote),
- polkoščake (76–100 g trdote),
- srednje luščake (1–7 g trdote),
- polmehkužce (26–50 g trdote),
- mehkužce (25 g trdote) (Sancin, 1988).

Preglednica 1: Sorte mandlja (*Prunus amygdalus*) (Štampar in sod., 2005).

SORTA	FERTILNOST	RODNOST	ZORENJE	PLOD		
				velikost, masa (g)	oblika	delež dvojnih jedrc (%)
tuono	avtofertilna	srednja	I. dekada septembra	velik; 3,8	okroglasto mandljasta	25–35
supernova	avtofertilna	dobra	I. dekada septembra	velik		15
ankaran 28	avtofertilna	srednja	sredi septembra	srednji	smokvasta	
nonpareil	avtofertilna	srednja	sredi septembra	srednji; 2,1	mandljasta, pravilna	0–2
ferragnes	avtosterilna	zelo dobra	2. dekada septembra	velik; 3,5	mandljasta, pravilna	0
texas (mission)	avtosterilna	srednje do dobra	konec septembra	velik; 3,0	okroglasto mandljasta	39
crismorn o	avtosterilna	zelo dobra	sredi septembra	zelo velik; 3,5	mandljasta	20–25
čarski pozni	avtosterilna	dobra	sredi septembra	velik	pravilna	4

Sorte se razlikujejo po obliki, deležu jedra v luščini, bujnosti rasti ter odpornosti proti boleznim in škodljivcem. Sorte z najtršo lupino imajo običajno najmanjša jedra in obratno. V sodobnem žlahtnjenju iščemo avtofertilne sorte, ki morajo biti dobro rodne. Iskane lastnosti so tudi poznejše in obilno cvetenje, redna rodnost, plodovi z enojnim jedrcem ter prevladujoč sladkast okus (Štampar in sod., 2005).

2.3 MANDELJ

Plod mandljevca imenujemo mandelj, velik je 10 – 60 mm. Lupina je sivo-zelene barve (Bulatovič, 1985). Sestavljena iz eksokarpiuma, ta pa iz epikarpa in mezokarpa. Mezokarp se ob zoritvi posuši in razpoči. V endokarpu je trda koščica z jedrom (seme), ki je užitno (Adamič in sod., 1975). Površina je hrapava in izbrazdana, notranja stran je gladka in svetlo čokoladne barve. Jedro je svetlo čokoladne barve, ima ravno ali pa malo nabrano kožo (Bulatovič, 1985). Oblika jedra je odvisna od velikosti in trdote luščine. Teža jedra variira v odvisnosti od bioloških in ekoloških dejavnikov (Adamič in sod., 1975).



Slika 2: Mandelj v lupini in brez lupine, geografsko poreklo Hrvaška

2.3.1 Kemijska sestava in hranilna vrednost

Surovi mandlji na 100 g vsebujejo 5,2 % vode, 21,3 % beljakovin, 50,6 % maščob (so bogato maščobno živilo), 19,7 % ogljikovih hidratov in 11,8 % vlaknin.

Maščobne kisline so predvsem nenasičene, od teh je enkrat nenasičenih 32,2 g/100 g in večkrat nenasičenih 12,2 g/100 g. Mandlji pa vsebujejo tudi malo količino nasičenih maščobnih kislin, in sicer 3,9 g/100 g (Dale in sod., 1991).

Mandlji so dober vir različnih mineralov in vitaminov. V preglednici 2 so zbrane nekatere vrednosti, podane so na porcijo 100 gramov mandljev.

Preglednica 2: Kemijska sestava in prehranska vrednost mandlja na 100 g mandljev (Souci in sod., 2000).

minerali	vsebnost na 100 g mandljev	vitamini	vsebnost na 100 g mandljev
kalcij, Ca	252 mg	vitamin E	26 mg
železo, Fe	4,1 mg	tiamin, B ₁	0,220 mg
magnezij, Mg	170 mg	riboflavin, B ₂	0,620 mg
fosfor, P	454 mg	niacin, B ₃	4,2 mg
kalij, K	735 mg	pantotenska kislina, B ₅	0,580 mg
natrij, Na	2,0 mg	piridoksin, B ₆	0,155mg
baker, Cu	0,850 mg	folna kislina, B ₉	0,045 mg

2.3.2 Pridelava mandlja

Ker mandelj za uspešno rast potrebuje posebne pogoje, še posebej mile in kratke zime, obstajajo omejena področja na svetu, kjer lahko uspeva.

Po podatkih FAO (Food and Agriculture Organization) za leto 2010 je povprečje pridelave mandljev v svetu skupaj z lupino 2.511.722 ton.

Največja pridelovalka mandlja so Združene države Amerike, in sicer Kalifornija, ki pridelava 1.413.800 ton, kar na svetovni ravni znaša 55,84 % letne svetovne pridelave.

Kot druga sledi Španije, ki ima 8,73 % svetovne proizvodnje, to znaša 221.000 ton. Pridelava mandljev v Iranu predstavlja 158.050 ton letno, kar je 6,24 %. Maroko proizvede 4,04 %, to pomeni 102.170 ton.

Mediterranske države tradicionalno sadijo mandljevece. Italija pridelava 3,38 % mandljev (85.500 ton) glede na svetovni trg. V času Rimljanov so bili vodilni v svetu, danes pa so ti nasadi stari s prevladujočimi starimi sortami.

Sledijo manjše pridelovalke, med katere spada Turčija, kjer poleg gojenega raste tudi divji mandelj. Največ ga najdemo v Andaliji, pridelujejo pa ga predvsem za lokalno porabo. Pridelajo 55.398 ton na leto, kar v svetovnem merilu znaša 2,19 %.

Hrvaška je bila na področju Jugoslavije največja pridelovalka mandlja, sedaj pa predstavlja 0,016 % svetovne pridelave, to je 400 ton na leto (Dale in sod.; 1991, Bulatovič, 1985; FAO, 2012).

2.4 ANTIOKSIDANTI

Sadje in vrtnine so bogat vir antioksidantov, le-te pa prav tako vsebujejo tudi vsi predstavniki oreščkov. Vsebnost antioksidantov vpliva na sposobnost skladiščenja določenega živila in stabilnost, pomaga pri ohranjanju prehranske vrednosti in senzorične kakovosti.

V rastlinskih živilih najdemo celo paleto antioksidantov, ki delujejo na različne načine in se med sabo dopolnjujejo. Sadje in vrtnine predstavljajo skoraj idealna živila, ker vsebujejo številne vitamine, mineralne snovi, prehranske vlaknine in aktivne encimske komplekse (Hribar in Simčič, 2000).

Vidrih in Kač (2000) definirata antioksidante kot sestavine oz. dodatke živilom, ki delujejo kot lovilci radikalov, tvorijo kelate s kovinskimi ioni ali pa kot reducenti kako drugače preprečujejo ali zmanjšajo pojav žarkosti živil in druge oksidativne spremembe senzoričnih in prehranskih lastnosti (Vidrih in Kač, 2000).

Mandlji delujejo preventivno na zdravje. Za Chen in sod. (2006) predstavlja mandelj najbogatejši vir vitamina E v obliki RRR- α -tokoferola. V raziskavi biološke uporabnosti vitamina E v krvi je sodelovalo 16 prostovoljcev, ki so izmenično 10 in 20 % dnevnega energijskega vnosa nadomestili z mandlji (kar znaša 28 ali 58 g mandljev dnevno); v tem zaporedju so mandlje uživali 4 tedne. Po pretečenem obdobju se je vrednost α -tokoferola v plazmi zvišala za od 13,7 do 18,7 % (Chen in sod., 2006).

2.4.1 Fenolne spojine

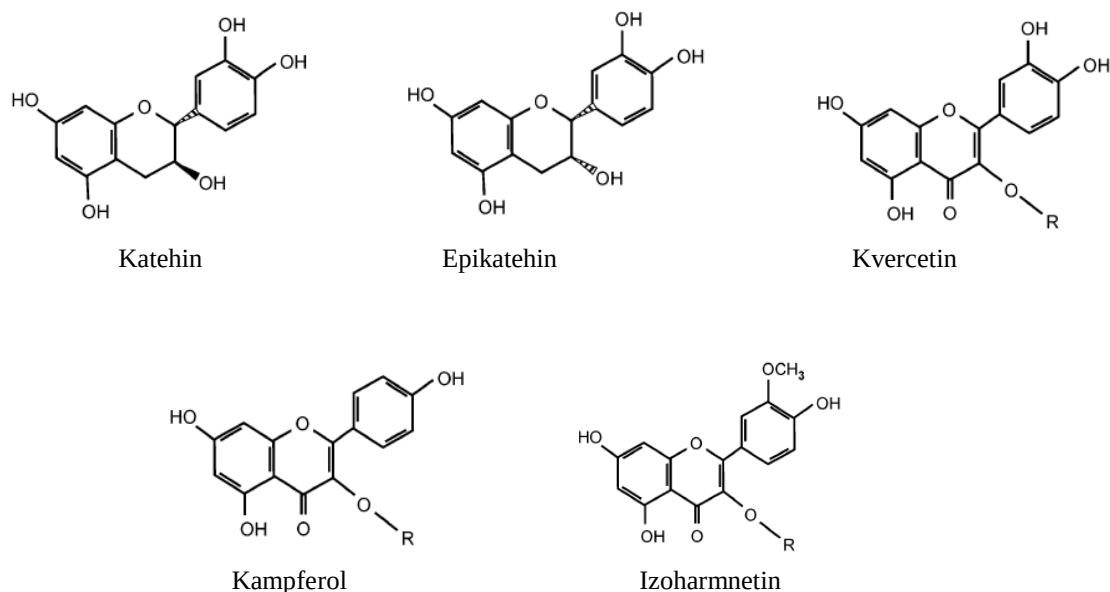
Fenolne spojine imenujemo tudi fenolne snovi, rastlinski fenoli, polifenoli ali polifenolne spojine. Mednje prištevamo vse tiste spojine, ki imajo vsaj en aromatski obroč in eno ali več hidroksilnih (-OH) skupin, vezanih direktno na aromatski obroč. V naravi običajno najdemo spojine z več hidroksilnimi skupinami (Abram in Simčič, 1997).

Spojine, ki jih najdemo v rastlinski celici, lahko razdelimo na dve glavni skupini: primarni in sekundarni metaboliti. K primarnim metabolitom prištevamo tiste, ki so vključeni v primarne metabolne procese. Iz primarnih nastajajo sekundarni metaboliti, med katere spadajo polketidi, fenolne spojine, terpenoidi, cianogeni glikozidi in glukozinolati, alkaloidi, fitoaleksini (izoprenoidi, flavonoidi, stilbeni) (Abram, 2000).

Pomembno vlogo imajo pri rastlinah, in sicer tako s fiziološkega kot morfološkega stališča. Pomembne so pri rasti in reprodukciji (Abram in sod., 2008).

Fenolne spojine največ prispevajo k odpornosti rastline proti mehanskim stresom (UV-svetloba, mikrobi, insekti). V obrambi pred stresom rastline najprej porabijo prisotne fenolne spojine, stres pa po drugi strani povzroči celo nastanek novih fenolnih snovi. Nove fenolne spojine nastanejo zaradi hidrolize in oksidacije. Snovi, ki nastanejo po oksidaciji fenolnih spojin, se lahko polimerizirajo in imajo antimikrobno sposobnost. Ti oksidacijski produkti upočasnijo in celo inhibirajo infekcijo poškodovanega rastlinskega tkiva s patogenimi mikroorganizmi. Neposredno zatem sledi znatno povečanje fenolnih spojin v rastlini (Abram in Simčič, 1997).

Oreščki vsebujejo različne fenolne spojine in flavonoide. Ti so pretežno konjugirani s sladkorjem preko ogljikovega obroča. Sladkorji so lahko glukoza, galaktoza ali rutinoza (Milbury in sod., 2006).



Slika 3: Prikaz osnovne strukture za glavne fenolne spojine (Milbury in sod., 2006)

Fenolne spojine so skoncentrirane v koži, ki se lahko odstrani v procesu blanširanja. Blanširanje mandljev se pogosto uporablja za komercialne potrebe. Flavonoidi in druge fenolne spojine predstavljajo 0,2–0,8 % suhe teže kože mandlja. Vsi avtorji se strinjajo, da na kvaliteto in količino pridelka prispevajo različne geografske in podnebne spremembe, prav tako pa ti dejavniki vplivajo na koncentracijo fenolnih spojin in ostalih komponent v mandlju (Barreira in sod., 2008; Booling in sod., 2010).

Med prvimi so Sang in sod. (2002) določili fenolne spojine v koži mandlja. Določili so različne glikozide kvercetina, kampferola, naringenina, katehina, protokatehejeve kisline, vanilinske kisline, in p-hidroksi benzojske kisline. Vse spojine so pokazale močno antioksidativno učinkovitost. Izmed vseh identificiranih sta največjo antioksidativno sposobnost pokazala protokatehejeva in vanilinska kislina (Sang in sod., 2002).

Milbury in sod. (2006) so določili s HPLC/elektrokemičnim odkrivanjem in UV detekcijo ter tekočinsko kromatografijo/masno spektroskopijo fenolne spojine. Določili so 19 flavonoidov in 3 fenolne spojine. Potrdili so, da se v koži mandlja v povprečju nahaja $94 \pm 7,9$ % vseh flavonoidov, kar pomeni, da jih je od 19 skupnih 8 v koži. Kampferol in kvercetin se nista estrahirala v vodo (Milbury in sod., 2006).

Preglednica 3: Delež identificiranih flavonoidov in fenolnih kislin v koži in olupljenem jedru mandlja (Milbury in sod., 2006).

	koža	jedro
katehin	91,2 ± 6,2	8,8 ± 6,2
protokatehojeva kislina	87,8 ± 3,3	12,2 ± 3,3
epikatehin	96,0 ± 2,9	4,0 ± 2,9
p-hidroksi-benzojska kislina	100	0
vanilinska kislina	90,7 ± 5,1	9,3 ± 5,1
kvercetin-3-O-galaktoza	100	
naringenin-7-O-glukozid	89,5 ± 7,9	10,5 ± 7,9
kvercetin-3-O-rutinoza	100	0
kvercetin-3-O-glukozid	100	0
dihidroksikampferol	100	0
kampferol-3-O-galaktozid	79,9 ± 29,2	20,1 ± 29,2
izoharmnetin-3-O-galaktozid	96,8 ± 2,8	3,2 ± 2,8
kampferol-3-O-glukozid	83,4 ± 9,2	16,6 ± 9,2
kampferol-3-O-rutinozid	93,0 ± 3,0	7,0 ± 3,0
izoharmnetin-3-O-rutinozid (in izoharmnetin-3-O-glukozid)	97,1 ± 2,3	2,9 ± 2,3
eriodiktiol	100	0
kvercetin	100	0
naringenin	71,9 ± 11,5	28,1 ± 11,5
kampferol	100	0
izoharmnetin	97,9 ± 6,1	2,1 ± 6,1

2.4.2 Biosinteza fenolnih spojin

Biosinteza fenolnih spojin se začne na šikiminski poti, ki lahko poteka v rastlinah in mikroorganizmih. Šikiminska kislina se sintetizira iz fosfofenolpiruvata in eritroza – 4 - fosfata. Končni produkt te poti je šikimat, nato pa se sintetizira horizmat. Ko se šikiminska pot konča, se nadaljuje fenilpropanoidna pot. Encim fenilalanin-amino liaza (PAL) katalizira nastanek cimetne kisline, iz katere se sintetizira večina fenolnih spojin (Vermerris in Nicholson, 2008).

Flavonoidi nastanejo kot produkt šikiminske in malonske kisline. Encim PAL katalizira fenilalanin do kumarin-CoA. Malonil-CoA nastane iz acetil-CoA, reakcijo katalizira acetil-CoA karboksilaza (Davies in Schwinn, 2006).

2.5 MAŠČOBNE KISLINE

S prehranskega vidika so maščobe pomembne kot bogata molekula ter kot vir esencialnih maščobnih kislin in vitaminov. Prav tako je maščobno živilo pomembno, saj prispeva k bogatemu okusu (Belitz in Grosch, 1999).

Maščobne kisline vsebujejo dolgo acilno verigo, ki vsebuje od štiri do štiriindvajset ogljikovih atomov. Molekula maščobne kisline vsebuje eno samo polarno skupino, to je karboksilna skupina, in dolgo nepolarno acilno verigo. Zaradi take strukture so maščobne kisline v vodi netopne. Kisline se med sabo ločijo v dolžini acilne skupine in v legi dvojne vezi. Vse naravne maščobne kisline vsebujejo sodo število ogljikovih atomov. V naravi najdemo najpogosteje kisline s šestnajstimi in osemnajstimi ogljikovimi atomi (Klofutar, 1992).

Poznamo nasičene in nenasičene maščobne kisline. Če acilna veriga vsebuje le enojne vezi, je nasičena, če pa vsebuje eno ali več dvojnih vezi, je nenasičena. V splošnem so v rastlinskih maščobah nenasičene kisline dvakrat bolj zastopane kot nasičene.

Neprekinjene, nerazvejane verige z ogljikovimi atomi so prisotne v nasičenih maščobnih kislinah. Maščobne kisline z neparnim številom atomov, kot sta valerinska kislina (5:0) in enantična kislina (7:0), so prisotne le v sledovih, vendar pomembno prispevajo k aromi živila. Najdemo ju v mleku in nekaterih rastlinskih oljih (Belitz in Grosch, 1999).

Pomembne maščobne kisline v naravi so tiste s sodim številom ogljikovih atomov in so prikazane v preglednici 4 in 5.

Preglednica 4: Nasičene maščobne kisline (Kornhauser, 1994; Boyer, 2005).

št. C atomov	zgradba	sistemsko ime	trivialno ime	vir
12	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{COOH}$	n-dodekanojska kislina	lavrinska kislina	palmovo olje
14	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}\text{COOH}$	n-tetradekanojska kislina	miristninska kislina	orehovo olje
16	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COOH}$	n-heksadekanojska kislina	palmitinska kislina	palmovo olje
18	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{COOH}$	n-oktadekanojska kislina	stearinska kislina	loj

Nenasičene maščobne kisline vsebujejo eno, dve ali tri dvojne vezi. Kisline, ki imajo enake metilne konce, so razporejene v iste skupine. V ω -3 skupino spada linolenska kislina, sintetizirajo jo rastline, najdemo pa jo tudi v ribah. Linolna in arahidonska kislina spadata med ω -6 maščobne kisline. Arahidonsko kislino najdemo v mesu, jetrih in kokošjih jajcih. ω -3 in ω -6 so esencialne maščobne kisline, katere človeško telo ne more samo sintetizirati, zato jih moramo zaužiti s primerno hrano (Belitz in Grosch, 1999).

Preglednica 5: Nenasičene maščobne kisline (Kornhauser, 1994; Boyer, 2005).

št. C atomo v	zgradba	sistemsko ime	udomačeno ime	vir
16	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_5\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	n-heksadecenojska kislina	palmitooleinska kislina	maslo
18	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	n-oktadecenojska kislina	oleinska kislina	olivno olje
18	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	9,12- oktadekadienojska kislina	linolna kislina	sojino olje
18	$\text{CH}_3\text{CH}_2(\text{CH}=\text{CHCH}_2)_3(\text{CH}_2)_6\text{COOH}$	9,12,15- oktadekatrienojska kislina	linolenska kislina	laneno olje

2.5.1 Fizikalne in kemijske lastnosti maščobnih kislin

Fizikalne lastnosti maščobnih kislin lahko napovemo iz njihove strukture. Vse so dobro topne v organskih topilih, kot so alkoholi, heksan in dietileter, v vodi pa slabo. Primer je butanojska maščobna kislina z najkrajšo verigo, katere topnost je 0,06 g na gram vode. Topnost maščobnih kislin pada z dolžino verige. Nasičene maščobne kisline z deset ali več ogljiki so pri sobni temperaturi podobne voskom. Vse nasičene maščobne kisline z manj kot deset ogljiki in vse nenasičene maščobne kisline so pri sobni temperaturi oljnate tekočine.

Kemijska reaktivnost ogljikovodikove verige maščobne kisline je odvisna od stopnje nasičenosti. Nasičene maščobne kisline so precej nereaktivne, za nenasičene maščobne kisline pa je značilna običajna reaktivnost molekul, ki imajo dvojne vezi med dvema

ogljikoma. Na to se lahko veže halogen ali vodikov atom. To reakcijo adicije joda uporabljamo za eksperimentalno določanje števila dvojitih vezi v maščobnih kislinah. Proces hidrogeniranja pa uporabljamo pri proizvodnji trdih maščob oz. olj. Dvojno vez v nenasičenih maščobnih kislinah lahko napade tudi kisik. V tem procesu, ki ga imenujemo avtooksidacija, nastanejo kompleksni produkti rumene barve in neprijetnega vonja, kot so krajši aldehidi in ketoni (Boyer, 2005).

Garcia-Lopez in sod. so leta 1996 s pomočjo plinske kromatografije ugotavljali sestavo maščobnih kislin iz semen mandljev. Določili so vsebnost skupnih maščobnih kislin, ki zavzema od 53 % do 62 % v posušenih vzorcih. V mandlju sta zastopani palmitinska in stearinska maščobna kislina, ki sta nasičeni maščobni kislini. Nenasičene pa so pantotenska, oleinska in linolenska.

Vsebnost posameznih maščobnih kislin, različnih kultivarjev, ki so združeni v več skupin, je prikazanih v preglednici 6.

Teža jedra vpliva na višjo vsebnost oleinske, stearinske in palmitinske kisline, zaradi česar je manjša vsebnost linolenske kisline. V turških mandljih so določili težo 0,60 –1,0 g mandlja, v ostalih mediteranski državah znaša teža nad 1 g (Celik in Balta, 2011).

Preglednica 6: Vsebnost in sestava maščobnih kislin, različnih metilnih estrov mandljev različnega geografskega porekla (rezultat v preglednici je podan kot g maščobnih kislin metilnih estrov na 100 g mandljevega olja) (Garcia-Lopez in sod., 1996).

poreklo	vzorec	skupne maščobe (%)	palmitinska kislina C16:0	pantotenska kislina C16:1	stearinska kislina C18:0	oleinska kislina C18:1	linolna kislina C18:2
Italija	Cristomorto	58,62	5,47±0,28	0,524±0,003	1,71±0,11	70,4±4,1	15,1±0,8
	Genco	60,02	4,43±0,32	0,405±0,024	1,62±0,20	63,7±7,0	8,0±1,2
	Tuono	54,8	5,19±0,02	0,275±0,002	1,97±0,05	59,5±1,0	12,5±0,2
Španija	Atocha	56,62	7,33±0,15	0,503±0,010	1,87±1,80	72,6±1,8	18,8±0,5
	Del Cid	56,60	7,08±0,20	0,452±0,011	2,24±0,10	69,0±2,7	18,5±0,7
	Desmayo Largueta	59,02	7,68±0,14	0,477±0,008	1,69±0,05	68,9±0,7	23,5±0,4
	Malaguena	54,89	7,60±0,22	0,420±0,010	2,58±0,16	60,7±2,9	23,6±1,0
	Marcona	58,10	8,12±0,06	0,583±0,005	2,64±0,03	61,5±0,6	24,6±0,2
	Peraleja	56,34	7,03±0,46	0,423±0,029	2,70±0,27	62,4±6,1	21,9±2,0
	Ramillete	60,60	8,09±0,17	0,604±0,011	1,49±0,05	74,2±2,5	18,5±0,6
	Non Pareil	53,10	6,79±0,10	0,436±0,006	2,03±0,03	71,8±1,1	20,9±0,3
	Texas	55,60	5,92±0,14	0,362±0,008	2,60±0,18	56,4±3,6	28,8±1,7
ZDA	Titan	56,10	5,20±0,10	0,319±0,006	1,13±0,03	58,8±2,1	16,8±1,0
	Wawona	55,87	5,14±0,16	0,358±0,011	1,12±0,03	64,0±1,3	15,2±0,3
	Clon Cebas	58,10	6,30±0,13	0,447±0,002	1,51±0,02	64,9±0,8	17,6±0,2
Hibrid							

3 MATERIALI IN METODE DELA

3.1 MATERIALI

3.1.1 Vzorci mandljev

- Italija (DM, trgovska znamka Alnatura), rok uporabe 2011;
- ZDA (Tuš, trgovska znamka), rok uporabe 2012;
- Španija (Interspar, trgovska znamka), rok uporabe 2011;
- Turčija, rok uporabe 2011;
- Hrvaška, leto obiranja 2009.

3.1.2 Reagenti

- Etanol (96 % Merck, Darmstadt, Nemčija),
- DPPH[•] reagent (Sigma, Steinheim, Nemčija),
- Folin-Ciocalteu reagent (Fluka, Buchs, Švica),
- natrijev karbonat (Alkaloid, Hrvaška),
- tekoči dušik (Messer Greisheim, Nemčija).

3.1.3 Aparature

- Analizna tehtnica (Sartorius),
- tehtnica (Mettler Toledo AT201, Švica),
- spektrofotometer (Hewlett-Packard 8453, ZDA),
- magnetno mešalo (IKA® RH basic KT/C, Nemčija),
- rotavapor (Büchi Rotavapor r-114, Švica),
- centrifuga (Eppendorf Centrifuge 5415c, Nemčija),
- vakuumaska centrifuga (GeneVac HT-4 series II, ZDA).

3.1.4 Pribor

- Stekleni inventar: erlenmajerice, čaše, bučke, merilne bučke, pipete, merilne pipete, vijale (GC), epruvete, petrijevke, liji, merilni valji, steklene palčke.
- Ostalo: rokavice (Purple Nitrile Exam Gloves, Kimberly-Clark), zaščitna halja, spatule, kapalke, tehtalne ladjice, avtomatske pipete, parafilm, aluminijasta folija, pincete, filtrirni papir, centrifugirke ...

3.1.5 Priprava raztopin

- 70 % etanol: v 50 mL merilno bučko smo dodali 36,5 mL 96 % etanola in do oznake dopolnili z destilirano vodo.
- Folin-Ciocalteu reagent: v epruveti smo zmešali 3 mL Folin-Ciocalteu reagenta in 6 mL destilirane vode in epruveto zavili v aluminijasto folijo.
- 20 % (m/m) Na_2CO_3 : v merilno bučko smo natehtali 20 g Na_2CO_3 in dodali 80 g destilirane vode.
- 0,1 M DPPH[•] reagent za spektrofotometrično metodo: zatehtali smo 1,97 mg DPPH[•] reagenta na tehtalni ladjici in kvantitativno prenesli v 50 ml merilno bučko ter s 96 % etanolom dopolnili do oznake, zavili v aluminijasto folijo in jo postavili v hladilnik ($T = 4\text{ }^{\circ}\text{C}$).
- Interni standard za določanje višjih maščobnih kislin: natehtali smo 0,0601 g heptadekanojske kisline (C17:0) in dodali 6 mL topila (2 mL *n*-heksana in 4 mL metanola).

3.2 METODE

3.2.1 Priprava vzorca

Vzorke mandljev smo kupili v Sloveniji, na Nizozemskem in Hrvaškem pri različnih trgovskih ponudnikih. Tako smo pridobili mandlje z italijanskim, španskim, turškim in hrvaškim geografskim poreklom. Vsi vzorci so bili do začetka analiz shranjeni v temnem prostoru pri sobni temperaturi. Posebnega režima shranjevanja ni bilo, ker so bili vsi vzorci v zaščitni embalaži, kot jih ponujajo na trgovskih policah. Mandlji s hrvaškega geografskega območja so bili v trdi luščini, ki jih je dodatno ščitila pred zunanjimi dejavniki.

3.2.2 Ekstrakcija

Pred ekstrakcijo smo mandlje blanširali in olupili. Blanširali smo jih tako, da smo jih za 3 minute namočili v vrelo vodo, nato pa olupili. S tem smo dobili 2 vzorca mandlja za ekstrakcijo: olupljeno jedro in kožo jedra, ki je stranski produkt pri procesu blanširanja. Vzorca smo sušili v sušilnici pri 40 °C približno 30 – 40 minut. Tretji vzorec za ekstrakcijo je neolupljen mandelj.

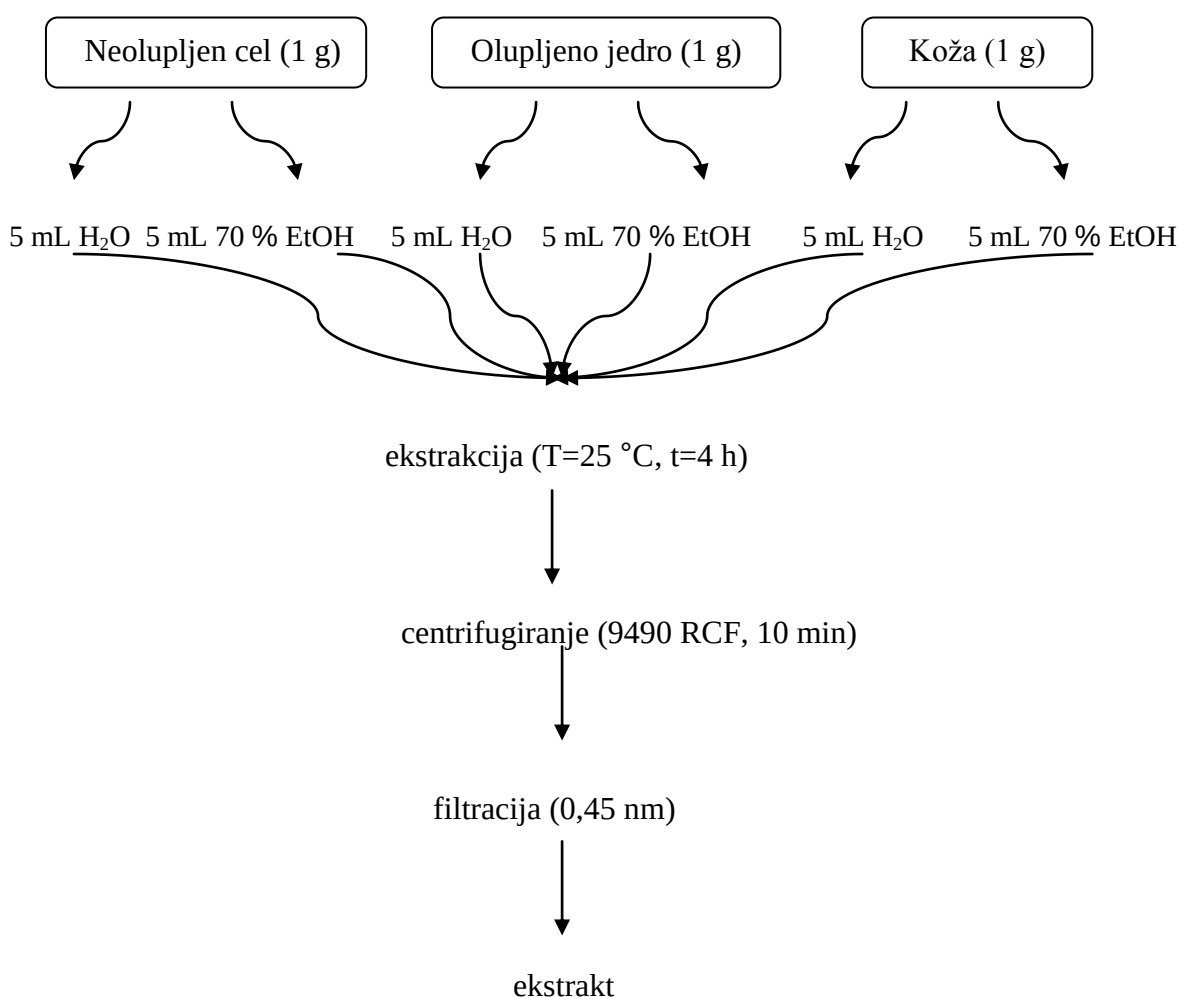


Slika 4: Blanširanje mandljev, olupljeni mandlji po blanširanju in koža mandljev po blanširanju (od leve proti desni)

Neolupljene mandlje, po blanširanju olupljene mandlje ter kožo smo najprej zmleli s kuhinjskim sekljalnikom. Grobo zmleti material smo nato prenesli v terilnico, prelili s tekočim dušikom in s pestilom trli zamrznjen material do izgleda finega prahu. V epruveto smo odtehtali 1 g homogeniziranega vzorca in dodali 5 mL ustreznega topila (70 % etanol

ali voda) in dobljeno suspenzijo stresali 4 ure pri 23 °C na stresalniku. Pri ekstrakciji kože v vodi smo na 1 g materiala dodali 10 mL vode. Po ekstrakciji smo suspenzije centrifugirali 10 min pri 9490 RCF.

Motne supernatante vodnih ekstraktov neolupljenega jedra mandlja, olupljenega jedra in kože smo filtrirali skozi filtrirni papir. Raztopine etanolnih ekstraktov so bile po centrifugiranju bistre. Tako pripravljene vodne in etanolne ekstrakte smo prenesli s pipeto v 15 mL centrifugirke, ovili z aluminijasto folijo ter shranili v hladilniku do začetka analiz.



Slika 5: Shema priprave ekstrakta

Vizualno smo primerjali barvo dobljenih ekstraktov mandljev z različnim geografskim poreklom. Ekstrakti neolupljenega mandlja se razlikujejo glede na dodano topilo. Vodni ekstrakti so rahlo bež barve, etanolni pa skoraj prozorni, po robovih epruvete se vidi

odtenek rahlo rjave barve. Vodni ekstrakti olupljenega jedra mandlja so umazano beli, etanolni so prozorni. Pri ekstraktih kože ni bilo bistvene razlike, saj so večinoma vsi vodni ekstrakti rjavi. Intenzivnejši odtenek rjave zasledimo pri etanolnih ekstraktih, izjema pa je ekstrakt iz ZDA, ki odstopa po intenzivnosti barve, saj je svetlejši, kar pa je bilo pričakovano, saj je bila razlika vidna že pri surovih, nehomogeniziranih vzorcih.

3.2.3 Določanje skupnih fenolnih spojin

Skupne fenolne spojine smo določili s pomočjo Folin-Ciocalteu (FC) reagentom. Postopek smo povzeli po metodi, ki jo je opisal Gutfinger (1981).

Metoda temelji na tvorbi modro obarvanega kompleksa fenolnih spojin s Folin-Ciocalteujevim reagentom. Vsebnost omejenega kompleksa določimo spektrofotometrično (valovna dolžina 765 nm). Izmerjena večja absorbanca pomeni večjo koncentracijo fenolnih spojin v preiskovanem vzorcu (Abram in sod., 2010).

Vzorec smo pripravili v 1,5 mL centrifugirki. Odpipetirali smo 0,20 mL primerno razredčenega vzorca in mu dodali 0,125 mL FC reagenta ($F-C:H_2O=1:2$), mešali 3 minute, dodali 0,125 mL 20 % Na_2CO_3 , mešali in dodali 0,550 mL destilirane vode in premešali. Centrifugirko smo nato centrifugirali 10 minut pri 10000 RCF. Supernatant smo prelili v kiveto in po 40 minutah izmerili absorbanco pri 765 nm. Spektrofotometer smo umerili s slepim vzorcem.

Slepi vzorec smo pripravili na isti način kot vzorec, le da smo namesto 0,20 mL vzorca dodali 0,20 mL ustreznega topila.

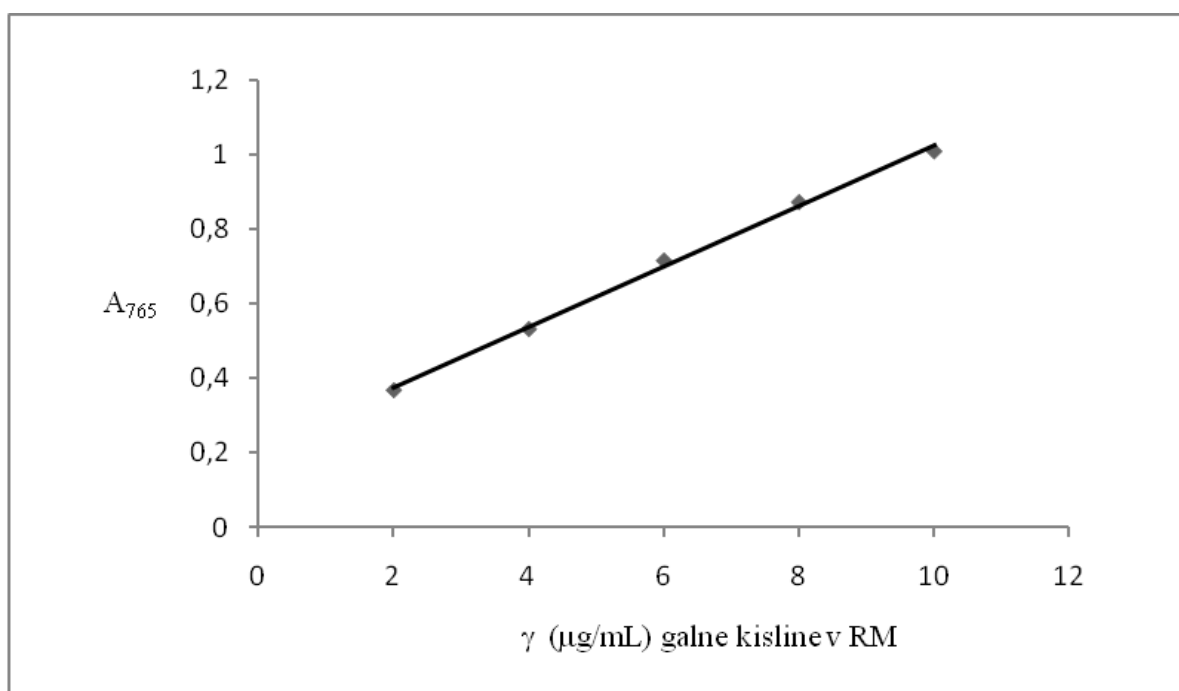
3.2.4 Umeritvena krivulja za določanje skupnih fenolnih spojin v vodnih ekstraktih

Za pripravo umeritvene krivulje smo uporabili galno kislino. V 10 mL merilno bučko smo zatehtali 10 mg galne kisline in bučko do oznake dopolnili z destilirano vodo. Nato smo odpipetirali 1,0 mL tako pripravljene raztopine galne kisline v 10 mL merilno bučko in jo dopolnili z destilirano vodo. Koncentracija raztopine galne kisline je bila 0,10 mg/mL; iz nje smo pripravili raztopine galne kisline s koncentracijami od 2 µg/mL do 10 µg/mL. Postopek priprave reakcijske mešanice za določanje skupnih fenolnih spojin je enak kot v točki 3.2.3. V tem primeru je vzorec 0,20 mL raztopine galne kisline z ustrežno koncentracijo. Analize smo ponovili v treh paralelkah.

Preglednica 7: Volumen raztopine galne kisline s koncentracijo 0,10 mg/mL (V), masna koncentracija galne kisline ($\gamma_{g.k.}$) v reakcijski mešanici in povprečne vrednosti izmerjenih ($\bar{A}_{765}$) v reakcijski mešanici (destilirana voda).

V (vzorca (μL))	$\gamma_{g.k.}$ ($\mu\text{g/mL}$)	$\bar{A}_{765}$
20	2	0,367
40	4	0,531
60	6	0,716
80	8	0,873
100	10	1,009

Iz izmerjenih absorbanc pri 765 nm in ustreznih masnih koncentracij galne kisline smo narisali umeritveno krivuljo. Z linearno regresijo smo določili smerni koeficient premice k , ki je bil $0,081 \pm 0,001$ pri 25 °C.



Slika 6: Umeritvena krivulja odvisnosti absorbance pri 765 nm v odvisnosti od masne koncentracije galne kisline v destilirani vodi pri 25 °C

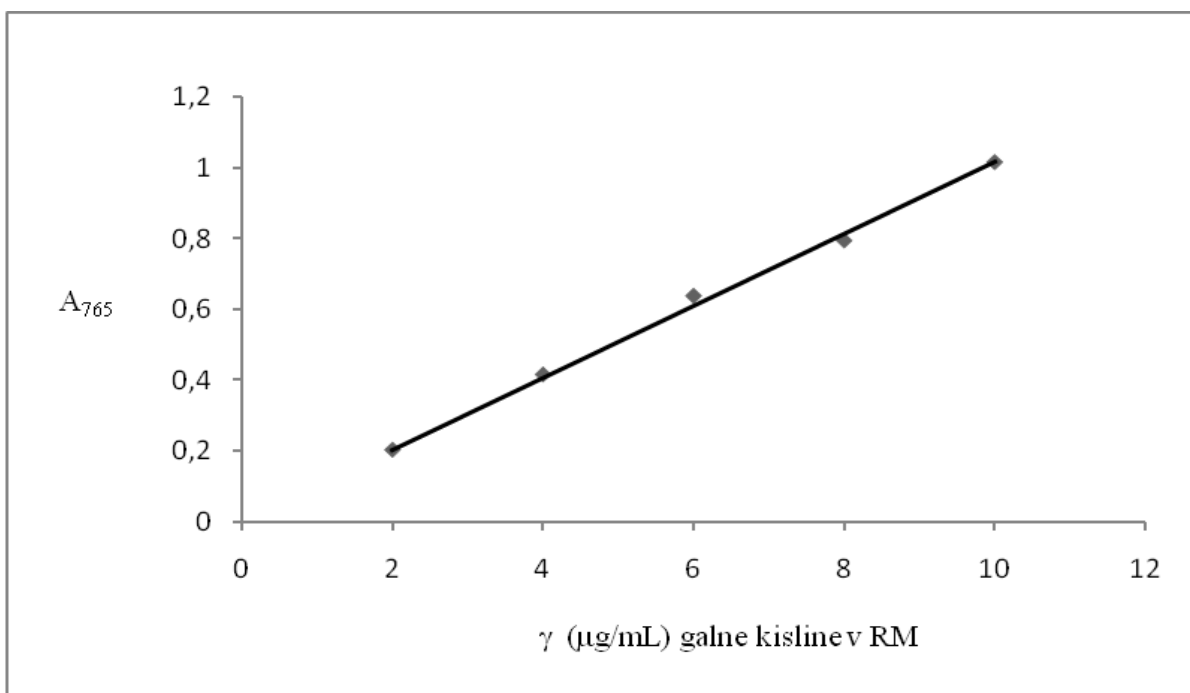
3.2.5 Priprava umeritvene krivulje za določanje skupnih fenolnih spojin v etanolnih ekstraktih

Za pripravo umeritvene krivulje smo uporabili galno kislino. V 10 mL merilno bučko smo zatehtali 10 mg galne kisline in bučko do oznake dopolnili s 70 % etanolom. Nato smo odpipetirali 1,0 mL tako pripravljene raztopine galne kisline v 10 mL merilno bučko in jo dopolnili s 70 % etanolom. Koncentracija tako pripravljene raztopine galne kisline je bila 0,1 mg/mL. Pripravili smo različne raztopine koncentracije galne kisline, in sicer od 20 µg/mL do 100 µg/mL. Postopek priprave reakcijske mešanice za določanje skupnih fenolnih spojin je enak kot v točki 3.2.3. V tem primeru je vzorec 0,20 mL raztopine galne kisline z ustrezno koncentracijo. Analize smo ponovili v treh paralelkah.

Preglednica 8: Volumen raztopine galne kisline s koncentracijo 0,10 mg/mL (V); masna koncentracija galne kisline ($\gamma_{g.k.}$) v reakcijski mešanici; povprečne vrednosti izmerjenih absorbanc (A_{765}) v reakcijski mešanici (70 % etanol).

V (vzorca (µL))	$\gamma_{g.k.}$ (µg/mL)	$\bar{A}_{765}$
20	2	0,205
40	4	0,417
60	6	0,639
80	8	0,795
100	10	1,015

Iz izmerjenih absorbanc pri 765 nm pri ustreznih masnih koncentracijah galne kisline smo narisali umeritveno krivuljo. Z linearno regresijo smo določili smerni koeficient premice k , ki je bil $0,102 \pm 0,001$ pri 25 °C.



Slika 7: Umeritvena krivulja odvisnosti absorbance pri 765 nm v odvisnosti od masne koncentracije galne kisline v 70 % etanolu pri 25 °C

Masno koncentracijo skupnih fenolnih spojin v vzorcih z destilirano vodo smo izračunali po enačbi:

$$\gamma_{g.k.} = (\bar{A}_{765} - n) / k \quad \dots(1)$$

Masno koncentracijo skupnih fenolnih spojin v vzorcih s 70 % etanolom smo izračunali po enačbi:

$$\gamma_{g.k.} = \bar{A}_{765} / k \quad \dots(2)$$

Vsebnost skupnih fenolnih spojin v vzorcih smo izrazili kot maso galne kisline na gram vzorca.

3.2.6 Določevanje antioksidativne učinkovitosti z DPPH[•] radikalom

Metoda temelji na redukciji radikala DPPH[•] s fenolno spojino posameznega antioksidanta (AOH) pri čemer se zmanjša količina radikala DPPH[•]. V reakciji 3 gre za prenos vodikovega atoma, v reakciji 4 pa za prenos elektrona na DPPH[•].



Vrsta reakcije je odvisna od topila in redoks potenciala zvrsti, ki reagirajo v reakciji (Villano in sod., 2007).

V ekstraktih olupljenega in neolupljenega jedra smo določili majhno vsebnost skupnih fenolnih spojin, zato smo pred določevanjem antioksidativne učinkovitosti z DPPH[•] radikalom ekstrakte skoncentrirali na skupni volumen 500 µL.

Pripravili smo raztopino DPPH[•] radikala s koncentracijo 0,1 mmol/L. Zatehtali smo 1,97 mg DPPH[•] reagenta na tehtalni ladjici in kvantitativno prenesli v 50 mL merilno bučko ter s 96 % etanolom dopolnili do oznake. Bučko smo zavili v aluminijasto folijo in jo postavili v hladilnik (T = 4 °C).

V 1,5 mL kiveto smo odmerili 1,45 mL 0,1 mmol/L raztopine DPPH[•] reagenta in dodali 0,050 mL ekstrakta mandlja. Skupni volumen reagenta in ekstrakta mandlja je 1,5 mL.

Kontrolni vzorec smo pripravili na enak način kot vzorec mandlja, le da smo k 1,45 mL 0,1 mmol/L raztopine DPPH[•] radikala dodali 0,050 mL ustreznega topila (70 % etanol ali destilirana voda).

Po 30 minutah, odkar smo k raztopini DPPH[•] dodali ekstrakt vzorca, smo izmerili absorbanco pri valovni dolžini 517 nm in pri 23 °C proti slepemu vzorcu (96 % etanol). Nato smo pri isti valovni dolžini izmerili absorbanco kontrolnega vzorca. Vsako meritev smo opravili v dveh paralelkah.

Sposobnost lovljenja prostih radikalov smo izrazili kot delež inhibicije prostega DPPH[•] radikala (%):

$$\% \text{ inhibicije DPPH}^{\bullet} = [(A_{k517} - A_{517})/A_{k517}] \times 100 \quad \dots(5)$$

A_{k517} = absorbanca kontrolnega vzorca

A_{517} = absorbanca vzorca pri 517 nm

3.2.7 Določanje vsebnosti višjih maščobnih kislin v jedrih mandlja s plinsko kromatografijo

Maščobnokislinsko sestavo vzorcev smo določili s plinsko kromatografijo. Za to analizo je bilo potrebno predhodno pripraviti metilne estre maščobnih kislin (MEMK). Določili smo jih z metodo *in situ* transesterifikacije, kjer ni potrebna predhodna ekstrakcija maščob iz vzorca (Park in Goins, 1994).

Maščobne kisline smo določali le pri celih jedrih, ki smo jih predhodno homogenizirali s kuhinjskim mlinčkom. V 10 mL steklene vialle smo odtehtali približno 0,5 g vzorca in mu dodali 100 μ l internega standarda. Točne vrednosti so zapisane v preglednici 9.

Preglednica 9: Eksperimentalne vrednosti: masa vzorca mletih mandljev [g], masa dodanega internega standarda [g] in masa topila [g].

geografsko poreklo vzorca mandlja	masa vzorca [g]	masa dodane raztopine IS v vzorcu [g]	masa topila (mešanica heksana in metanola) [g]
Italija	0,0513	1,17355	4,3504
	0,0509	1,51314	
	0,0518	1,59168	
ZDA	0,0514	1,77187	4,3504
	0,0532	1,73722	
	0,0534	1,75801	
Španija	0,0525	1,77187	4,3504
	0,0524	1,7326	
	0,0521	1,79728	
Hrvaška	0,0535	1,74646	4,3504
	0,0520	1,77649	
	0,0530	1,79497	
Turčija	0,0536	1,77187	4,3504
	0,0529	1,7326	
	0,0543	1,78573	

Mešanico topil 300 μ L diklormetana in 3 mL 0,5 M natrijevega hidroksida smo dodali k pripravljenemu vzorcu. To zmes smo 1 uro segrevali pri 90 °C v vodni kopeli, jo nato ohladili, dodali 3 mL 14 % borovega triflourida, raztopljenega v metanolu, in 10 minut segrevali v vodni kopeli pri 90 °C. Zmes smo ohladili, dodali 3 mL 10 % natrijevega klorida in 1,5 mL *n*-heksana. Zatam smo zmes stresali na stresalniku 1 minuto, nato pa 10 minut centrifugirali pri 4000 obratih. Po centrifugiranju smo odpipetirali *n*-heksansko plast v 1,5 mL vialo in jih zamrznili do analize na plinskem kromatografu. Delež MEMK smo določili s plinsko kromatografijo z uporabo plinskega kromatografa Agilent Technologies 6890, s plinsko ionizacijskim detektorjem (FID) in kapilarno kolono HP-88 (100 mm $\times$ 0,25 mm $\times$ 0,2 μ m).

Na plinskem kromatografu smo najprej kot referenčni standard analizirali standardno raztopino metilnih estrov višjih maščobnih kislin in določili retenzijske čase. Ločevanje in detekcija sta potekala pri naslednjih pogojih:

- temperaturni program: 150 °C/10 min, 2 °C/min do 180 °C, 3 °C do 240 °C (0 minut),
- temperatura injektorja: 250 °C,
- temperatura detektorja: 280 °C,
- injektor: split: splitless: 1 : 30, volumen 0,5 μ L,
- nosilni plin: He, 2,3 mL/min,
- make-up plin: N₂, 45 mL/min
- plin skozi detektor: H₂, 40 mL/min, sintetični zrak (21 % O₂) 450 mL/min.

Po končani analizi smo s pomočjo internega standarda iz kromatografskih vrhov izračunali koncentracije posamezne maščobne kisline:

$$C \text{ (mg/100 g)} = (A_i \times F_{Ai} \times m_{17} \times 100) / (A_{17} \times F_{Ai17} \times m_{vz}) \quad \dots(6)$$

C = koncentracija posamezne maščobne kisline (mg/100 g)

A_i = površina vrha posamezne maščobne kisline

F_{Ai} = koeficient posamezne maščobne kisline (molska masa maščobne kisline/molska masa metilnega estra maščobne kisline)

m₁₇ = masa internega standarda (C17:0) (mg)

A₁₇ = površina internega standarda

F_{Ai17} = koeficient internega standarda (molska masa C17:0/molska masa metilnega estra heptadekanojske kisline C17)

m_{vz} = masa vzorca (g)

4 REZULTATI

4.1 VSEBNOST SKUPNIH FENOLNIH SPOJIN V MANDLJU

Za določevanje skupnih fenolnih spojin smo uporabili spektrofotometrično analizo, ki temelji na Folin in Ciocalteu protokolu. Z njo lahko določimo topne fenolne spojine, kot so antociani, kompleksne fenolne spojine in tanine (Vermerris in Nicholson, 2008).

Da dosežemo čim večjo vsebnost skupnih fenolnih spojin v preiskovanih vzorcih, moramo zagotoviti optimalne pogoje za ekstrakcijo fenolnih spojin, ustrezno topilo, temperaturo in čas ekstrakcije (Barreira in sod., 2008).

V sledečih preglednicah smo prikazali vrednosti absorbanc A_{765} ter koncentracije skupnih fenolnih spojin (γ) posameznih ekstraktov v različnih topilih in vsebnosti skupnih fenolnih spojin (izražene kot masa galne kisline (mg) na gram vzorca mandlja). Vzorci se razlikujejo glede na geografsko poreklo: Italija (preglednica 10), Hrvaška (preglednica 11), Španija (preglednica 12), Turčija (preglednica 13) in ZDA (preglednica 14).

Preglednica 10: Vrednost absorbanc A_{765} , vsebnost skupnih fenolnih spojin (γ) (μg galne kisline na mL raztopine ekstrakta) in masa galne kisline v mg na gram vzorca mandlja; geografsko poreklo Italija.

	$\bar{A}_{765}$	γ ($\mu\text{g/mL}$)	m(mg/g)
vodni ekstrakt – Italija			
neolupljeno jedro	0,907	85,6 $\pm$ 0,5	0,26 $\pm$ 0,02
olupljeno jedro	0,872	203 $\pm$ 2	0,61 $\pm$ 0,01
koža	0,495	349 $\pm$ 2	0,17 $\pm$ 0,01
70 % etanolni ekstrakt – Italija			
neolupljeno jedro	0,219	107,4 $\pm$ 0,5	0,43 $\pm$ 0,01
olupljeno jedro	0,694	34,1 $\pm$ 0,2	0,14 $\pm$ 0,01
koža	1,016	4985 $\pm$ 33	7,23 $\pm$ 0,05

Preglednica 11: Vrednost absorbanc A_{765} , vsebnost skupnih fenolnih spojin (γ) (μg galne kisline na mL raztopine ekstrakta) in masa galne kisline v mg na gram vzorca mandlja; geografsko poreklo Hrvaška.

	$\bar{A}_{765}$	γ ($\mu\text{g/mL}$)	$m(\text{mg/g})$
vodni ekstrakt – Hrvaška			
neolupljeno jedro	0,824	263,5 $\pm$ 1,9	0,79 $\pm$ 0,01
olupljeno jedro	1,083	160,8 $\pm$ 0,5	0,48 $\pm$ 0,01
koža	1,097	1088,8 $\pm$ 0,6	3,81 $\pm$ 0,01
70 % etanolni ekstrakt – Hrvaška			
neolupljeno jedro	1,147	563,0 $\pm$ 2,4	2,25 $\pm$ 0,01
olupljeno jedro	0,499	24,5 $\pm$ 0,04	0,10 $\pm$ 0,01
koža	0,242	1189,9 $\pm$ 24,6	2,97 $\pm$ 0,06

Preglednica 12: Vrednost absorbanc A_{765} , vsebnost skupnih fenolnih spojin (γ) (μg galne kisline na mL raztopine ekstrakta) in masa galne kisline v mg na gram vzorca mandlja; geografsko poreklo Španija.

	$\bar{A}_{765}$	γ ($\mu\text{g/mL}$)	$m(\text{mg/g})$
vodni ekstrakt – Španija			
neolupljeno jedro	0,858	278,6 $\pm$ 0,1	0,70 $\pm$ 0,01
olupljeno jedro	0,899	126,9 $\pm$ 1,4	0,32 $\pm$ 0,01
koža	0,573	444,6 $\pm$ 1,1	1,33 $\pm$ 0,01
70 % etanolni ekstrakt – Španija			
neolupljeno jedro	0,247	121,1 $\pm$ 2,2	0,48 $\pm$ 0,01
olupljeno jedro	0,865	42,4 $\pm$ 0,3	0,13 $\pm$ 0,01
koža	0,846	4149,9 $\pm$ 36,2	6,22 $\pm$ 0,05

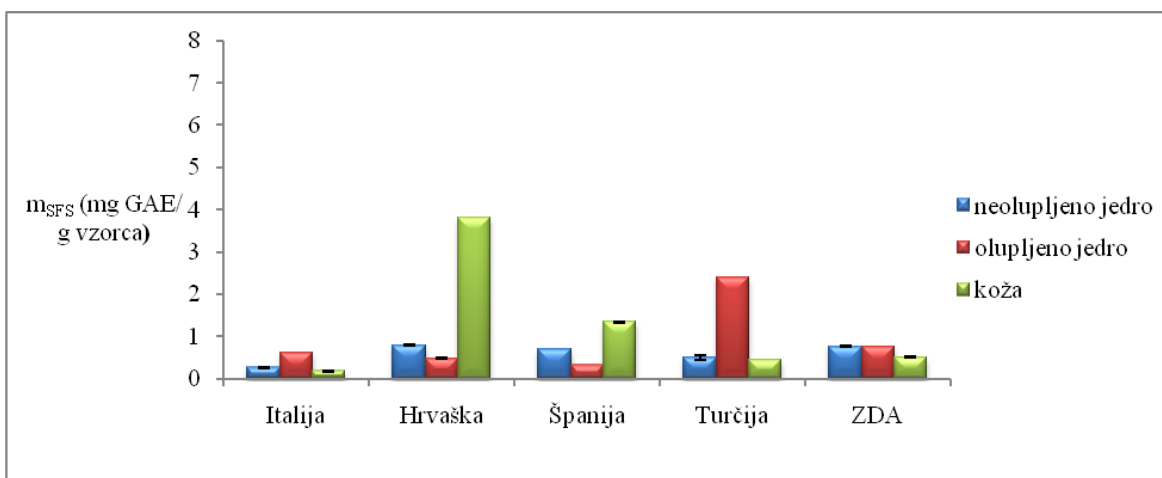
Preglednica 13: Vrednost absorbanc A_{765} , vsebnost skupnih fenolnih spojin (γ) (μg galne kisline na mL raztopine ekstrakta) in masa galne kisline v mg na gram vzorca mandlja; geografsko poreklo Turčija.

	$\bar{A}_{765}$	γ ($\mu\text{g/mL}$)	$m(\text{mg/g})$
vodni ekstrakt – Turčija			
neolupljeno jedro	0,573	155,7 $\pm$ 1,6	0,51 $\pm$ 0,06
olupljeno jedro	1,021	149,4 $\pm$ 1,3	0,45 $\pm$ 0,01
koža	0,698	599,1 $\pm$ 2,2	2,40 $\pm$ 0,01
70 % etanolni ekstrakt – Turčija			
neolupljeno jedro	0,130	64,0 $\pm$ 0,3	0,29 $\pm$ 0,01
olupljeno jedro	0,547	26,8 $\pm$ 0,3	0,07 $\pm$ 0,01
koža	0,410	2012,1 $\pm$ 1,0	6,04 $\pm$ 0,01

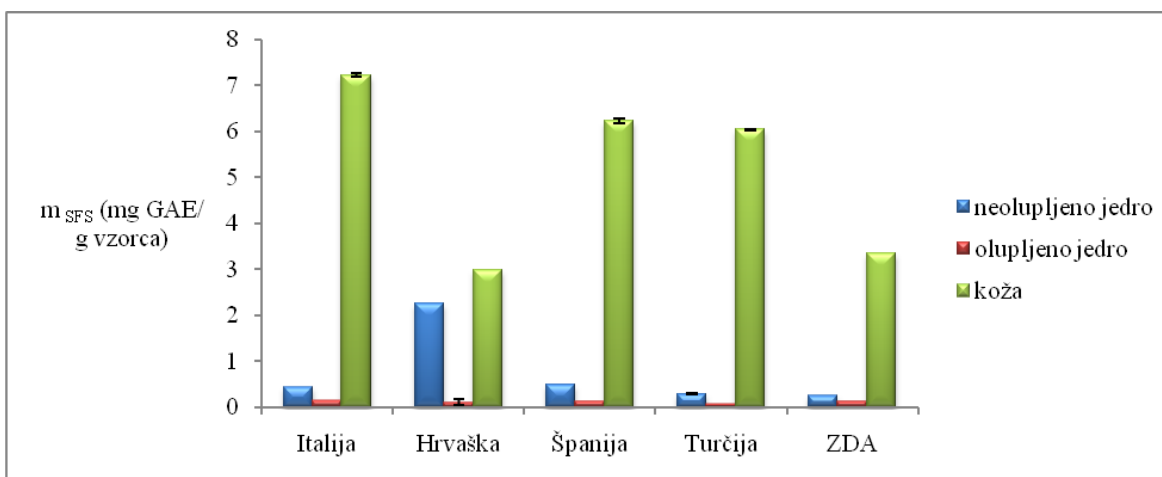
Preglednica 14: Vrednost absorbance A_{765} , vsebnost skupnih fenolnih spojin (γ) (μg galne kisline na mL raztopine ekstrakta) in masa galne kisline v mg na gram vzorca mandlja; geografsko poreklo ZDA.

	$\bar{A}_{765}$	γ ($\mu\text{g/mL}$)	$m(\text{mg/g})$
vodni ekstrakt – ZDA			
neolupljeno jedro	0,916	216,6 $\pm$ 2,6	0,76 $\pm$ 0,01
olupljeno jedro	0,564	92,3 $\pm$ 0,9	0,51 $\pm$ 0,01
koža	0,511	216,7 $\pm$ 0,6	0,76 $\pm$ 0,01
70 % etanolni ekstrakt – ZDA			
neolupljeno jedro	0,649	79,7 $\pm$ 0,5	0,24 $\pm$ 0,01
olupljeno jedro	0,853	29,4 $\pm$ 0,6	0,12 $\pm$ 0,01
koža	0,599	837,3 $\pm$ 1,2	3,35 $\pm$ 0,01

Na vsebnost fenolnih spojin v mandlju vplivajo genetski dejavniki (odvisno od sorte) in okoljski dejavniki (izpostavljenost glivicam in bakterijam, škodljivci, vreme in UV-svetloba). Na vsebnost fenolnih spojin v mandlju lahko vpliva tudi zrelost obiranja mandljev ter primerno skladiščenje in nadaljni postopki obdelave. Če povzamemo, sorta, geografski izvor in obdelovalne metode vplivajo na količino fenolnih spojin, prav tako pa imajo vsi ti pogoji vpliv na količino maščob, mineralov in vitaminov v oreščkih (Milbury in sod., 2006; Bolling in sod., 2010).



Slika 8: Vsebnost skupnih fenolnih spojin v vodnih ekstraktih mandlja izražena v mg GAE/g vzorca



Slika 9: Vsebnost skupnih fenolnih spojin v etanolnih ekstraktih mandlja izražena v mg GAE/g vzorca

S pomočjo analize za določevanje skupnih fenolnih spojin smo ugotovili, da je 70% etanol (v nadaljevanju etanolni ekstrakt) boljše topilo kot destilirana voda (v nadaljevanje vodni ekstrakt).

Barreira in sodelavci (2008) so določili optimalne delovne pogoje za ekstrakcijo fenolnih spojin. Osredotočili so se na vrsto in količino topila za ekstrakcijo, čas ekstrakcije in temperaturo, pri kateri ekstrakcije poteka. Ugotovili so, da sta kot topila najučinkovitejša metanol in voda. Kot najboljšo kombinacijo za ekstrakcijo so določili za topilo 50 ml metanola s 60-minutno ekstrakcijo pri 25 °C (Barreira in sod., 2008) .

Ugotovili smo, da se vrednosti skupnih fenolnih spojin lahko razlikujejo glede na geografsko poreklo. Pri vodnih ekstraktih neolupljenega jedra smo najmanjšo vsebnost določili v ekstraktu iz Italije ($0,26 \pm 0,01$ mg GAE/g vzorca), največjo pa v ekstraktu iz Hrvaške ($0,79 \pm 0,01$ mg GAE/g vzorca). Največ fenolnih spojin smo določili v neolupljenem jedru etanolnega ekstrakta iz Hrvaške ($2,25 \pm 0,01$ mg GAE/g vzorca) in najmanj v etanolnem ekstraktu iz ZDA ($0,24 \pm 0,01$ mg GAE/g vzorca).

Milbury in sod. (2006) so določili vsebnost fenolne spojine v olupljenem jedru mandlja, v koži in vodi, ki je ostala od blanširanja. S seštevkom vseh treh vrednosti skupnih fenolnih spojin olupljenega mandlja (0,64 do 0,71 mg GAE/g) in kože (0,10 do 0,27 mg GAE/g) vrednosti pri različnih kultivarjih se gibljejo od 1,27 do 2,41 mg GAE/g surovega mandlja.

Najvišjo vrednost skupnih fenolnih spojin smo določili v koži etanolnega ekstrakta iz Italije ($7,23 \pm 0,05$ mg GAE/g vzorca), najnižjo pa pri etanolnem ekstraktu kože mandlja iz Hrvaške ($2,97 \pm 0,06$ mg GAE/g vzorca). Prav tako smo določevali skupne fenolne spojine v vodnem ekstraktu, kjer pa je pričakovano prišlo do manjše vsebnosti. Največ fenolnih spojin smo določili v vodnem ekstraktu iz Hrvaške ($3,81 \pm 0,01$ mg GAE/g vzorca) in najmanj v tistem iz Italije ($0,17 \pm 0,01$ mg GAE/g vzorca). Pri mandljih iz Hrvaške smo dobili v etanolnem ekstraktu kože najmanjšo vrednost, pri vodnem ekstraktu kože pa največjo.

Pri olupljenem etanolnem ekstraktu smo dobili vrednosti od $0,07 \pm 0,01$ mg GAE/g vzorca (Turčija) do $0,14 \pm 0,01$ mg GAE/g vzorca (Italija), pri vodnem ekstraktu pa od $0,32 \pm 0,01$ mg GAE/g vzorca (Italija) do $0,67 \pm 0,007$ mg GAE/g vzorca (Španija). Rezultati so primerljivi z Milburyevimi (2006), ki je v olupljenem mandlju določil fenolne spojine v razponu od 0,64 do 0,71 mg GAE/g mandljev (Milbury in sod., 2006).

Če primerjamo rezultate glede na posamezne dele mandlja, smo največ fenolnih spojin določili v rjavi koži mandlja ($7,23 \pm 0,05$ mg/g), kar se ujema z rezultati ostalih avtorjev.

Barreira in sod. (2008) so določili v neolupljenem mandlju od $14,46 \pm 0,53$ do $6,00 \pm 1,68$ mg/g ekstrakta.

Za oreščke velja, da njihova koža vsebuje okrog 80 % vseh fenolnih spojin, Milbury in sodelavci pa so tam v povprečju določili 60 % fenolnih spojin (Milbury in sod., 2006).

4.2 DOLOČEVANJE ANTIOKSIDATIVNE UČINKOVITOSTI Z DPPH[•] REAGENTOM

Metoda DPPH[•] se v zadnjih letih uporablja za ocenjevanje antioksidativnega delovanja. Temelji na vsebnosti reaktivne oblike stabilnega radikala DPPH[•], raztopina je vijolične barve. Če k tej raztopini primešamo vzorec, ki vsebuje vodik, ga lahko odda radikalu. S tem izgubi intenzivnost vijolične barve in preide v rumeno (Molyneux, 2004).



Slika 10: Vzorci za analizo DPPH[•] z geografskim poreklom ZDA, od leve proti desni si sledijo neolupljeno jedro, olupljeno jedro in koža.

V naslenjih preglednicah so podane koncentracije fenolnih spojin, povprečne absorbance in % inhibicije DPPH[•] radikala za vse preiskovane ekstrakte v topilih 70 % etanolu in destilirani vodi.

Preglednica 15: Povprečne vrednosti absorbance pri valovni dolžini 517 nm ($\bar{A}_{517}$), koncentracija skupnih fenolnih spojin, γ ($\mu\text{g/mL}$), in % inhibicije radikala DPPH $^{\bullet}$: geografsko poreklo Italija.

<u>vodna</u> <u>frakcija</u>	$\bar{A}_{517}$	γ v RM ($\mu\text{g/mL}$)	% inhibicije radikala
neolupljeno jedro	0,628	5,20	39 $\pm$ 3
	0,372	10,4	64 $\pm$ 3
	0,129	17,3	87 $\pm$ 1
olupljeno jedro	0,853	13,5	21 $\pm$ 1
	0,625	15,2	43 $\pm$ 1
	0,467	20,3	57 $\pm$ 1
koža	0,258	1,17	25 $\pm$ 1
	0,529	2,92	50 $\pm$ 1
	0,749	4,67	73 $\pm$ 1
<u>etanolna</u> <u>frakcija</u>			
neolupljeno jedro	0,646	4,29	39 $\pm$ 1
	0,495	8,59	54 $\pm$ 1
	0,115	21,5	89 $\pm$ 1
olupljeno jedro	0,628	3,98	41 $\pm$ 1
	0,441	5,97	59 $\pm$ 1
	0,431	7,96	61 $\pm$ 1
koža	0,831	5,54	21 $\pm$ 1
	0,483	11,1	55 $\pm$ 1
	0,191	16,6	81 $\pm$ 1

Preglednica 16: Povprečne vrednosti absorbance pri valovni dolžini 517 nm ($\bar{A}_{517}$), koncentracija skupnih fenolnih spojin, γ ($\mu\text{g/mL}$) in % inhibicije radikala DPPH $^{\bullet}$: geografsko poreklo Hrvaška.

<u>vodna frakcija</u>	$\bar{A}_{517}$	γ v RM ($\mu\text{g/mL}$)	% inhibicije radikala
neolupljeno jedro	0,690	15,7	33 $\pm$ 5
	0,511	31,4	52 $\pm$ 4
	0,170	52,4	84 $\pm$ 1
olupljeno jedro	0,819	26,9	23 $\pm$ 4
	0,737	37,7	31 $\pm$ 4
	0,565	53,8	47 $\pm$ 3
koža	0,648	3,62	40 $\pm$ 1
	0,527	5,17	49 $\pm$ 2
	0,186	12,1	82 $\pm$ 01
<u>etanolna frakcija</u>			
neolupljeno jedro	0,756	15,2	27 $\pm$ 2
	0,474	30,4	54 $\pm$ 3
	0,113	60,1	89 $\pm$ 1
olupljeno jedro	0,897	3,43	16 $\pm$ 1
	0,734	3,87	31 $\pm$ 1
	0,488	5,15	55 $\pm$ 1
koža	0,739	1,52	30 $\pm$ 1
	0,548	2,54	50 $\pm$ 1
	0,357	3,80	66 $\pm$ 1

Preglednica 17: Povprečne vrednosti absorbance pri valovni dolžini 517 nm ($\bar{A}_{517}$), koncentracija skupnih fenolnih spojin, γ ($\mu\text{g/mL}$) in % inhibicije radikala DPPH $^{\bullet}$: geografsko poreklo Španija.

<u>vodna frakcija</u>	$\bar{A}_{517}$	γ v RM ($\mu\text{g/mL}$)	% inhibicije radikala
neolupljeno jedro	0,730	30,9	32 $\pm$ 2
	0,499	34,8	54 $\pm$ 1
	0,398	46,4	63 $\pm$ 1
olupljeno jedro	0,744	13,1	30 $\pm$ 1
	0,558	20,9	48 $\pm$ 1
	0,233	52,2	78 $\pm$ 3
koža	0,738	1,38	25 $\pm$ 1
	0,431	3,45	56 $\pm$ 1
	0,275	4,59	72 $\pm$ 3
<u>etanolna frakcija</u>			
neolupljeno jedro	0,803	3,69	22 $\pm$ 1
	0,590	7,39	43 $\pm$ 2
	0,124	22,2	88 $\pm$ 2
olupljeno jedro	0,635	5,71	40 $\pm$ 1
	0,516	8,56	52 $\pm$ 1
	0,416	11,4	63 $\pm$ 1
koža	0,833	2,80	22 $\pm$ 1
	0,655	5,60	38 $\pm$ 1
	0,151	14,0	86 $\pm$ 1

Preglednica 18: Povprečne vrednosti absorbance pri valovni dolžini 517 nm ($\bar{A}_{517}$), koncentracija skupnih fenolnih spojin, γ ($\mu\text{g/mL}$) in % inhibicije radikala DPPH*: geografsko poreklo Turčija.

vodna frakcija	$\bar{A}_{517}$	γ v RM ($\mu\text{g/mL}$)	% inhibicije radikala
neolupljeno jedro	0,619	6,44	43 $\pm$ 1
	0,339	17,2	66 $\pm$ 1
	0,151	25,8	85 $\pm$ 1
olupljeno jedro	0,868	7,6	19 $\pm$ 1
	0,661	20,4	38 $\pm$ 2
	0,456	30,6	57 $\pm$ 1
koža	0,744	13,4	27 $\pm$ 1
	0,712	15,1	30 $\pm$ 1
	0,446	80,6	58 $\pm$ 2
etanolna frakcija			
neolupljeno jedro	0,694	1,72	33 $\pm$ 4
	0,399	2,45	61 $\pm$ 1
	0,309	3,43	70 $\pm$ 3
olupljeno jedro	0,735	1,33	30 $\pm$ 1
	0,621	1,99	39 $\pm$ 2
	0,493	2,65	52 $\pm$ 1
koža		2,25	
	0,779	6,74	32 $\pm$ 1
	0,498	13,5	55 $\pm$ 1
	0,151		87 $\pm$ 1

Preglednica 19: Povprečne vrednosti absorbance pri valovni dolžini 517 nm ($\bar{A}_{517}$), koncentracija skupnih fenolnih spojin, γ ($\mu\text{g/mL}$) in % inhibicije radikala DPPH $^{\bullet}$: geografsko poreklo ZDA.

vodna frakcija	$\bar{A}_{517}$	γ v RM ($\mu\text{g/mL}$)	% inhibicije radikala
neolupljeno jedro	0,791	28,9	27 $\pm$ 1
	0,594	32,5	45 $\pm$ 1
	0,504	57,5	53 $\pm$ 1
olupljeno jedro	0,768	15,4	28 $\pm$ 6
	0,639	21,5	40 $\pm$ 2
	0,417	30,8	61 $\pm$ 2
koža	0,761	4,82	29 $\pm$ 1
	0,719	5,42	33 $\pm$ 1
	0,276	43,4	74 $\pm$ 1
etanolna frakcija			
neolupljeno jedro	0,754	4,78	27 $\pm$ 1
	0,395	7,97	62 $\pm$ 3
	0,114	11,2	89 $\pm$ 2
olupljeno jedro	0,791	8,58	26 $\pm$ 2
	0,718	12,0	32 $\pm$ 4
	0,599	17,2	44 $\pm$ 2
koža	0,789	6,11	23 $\pm$ 1
	0,445	15,3	58 $\pm$ 1
	0,337	20,4	69 $\pm$ 2

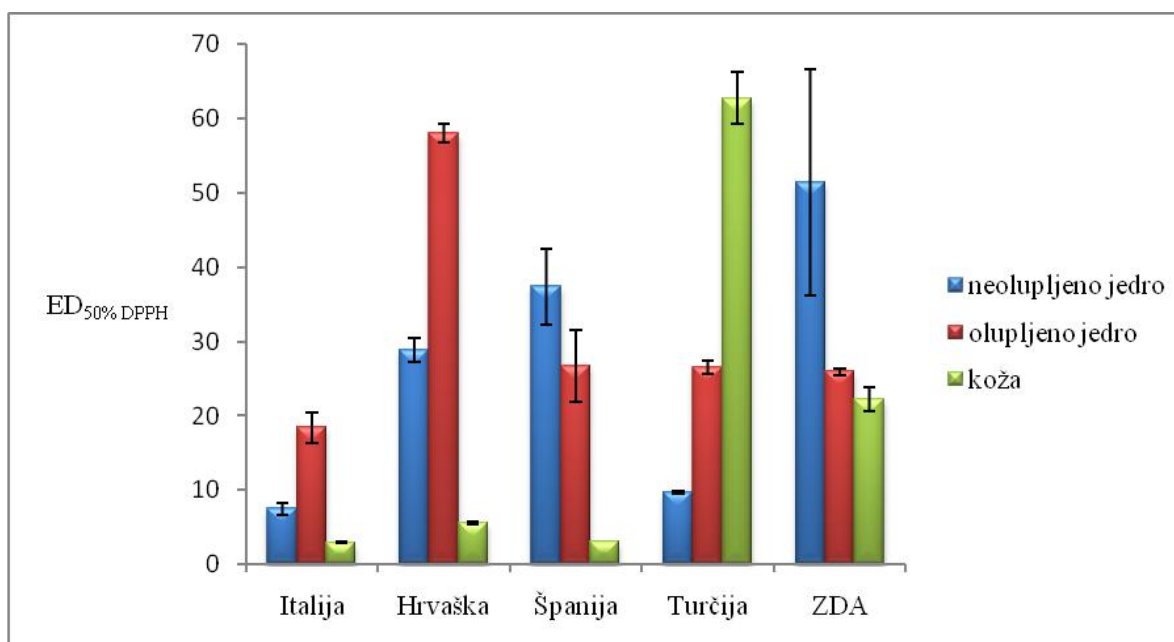
Rezultate smo interpretirali kot koncentracijo fenolnih spojin v reakcijski mešanici, ki povzroči 50 % inhibicijo radikala DPPH $^{\bullet}$ ($\text{ED}_{50\% \text{ DPPH}^{\bullet}}$). Le-to smo izračunali po enačbi:

$$\text{ED}_{50\% \text{ DPPH}^{\bullet}} = (50\%) / k \quad \dots (7)$$

V enačbi k predstavlja smerni koeficient premice, ki pokaže odvisnost % inhibicije radikala DPPH $^{\bullet}$ od koncentracije fenolnih spojin. Naklon premice (smerni koeficient) smo določili z metodo linearne regresije. Večji naklon premice pomeni nižjo vrednost $\text{ED}_{50\%}$ in posledično boljšo sposobnost lovljenja prostih radikalov.

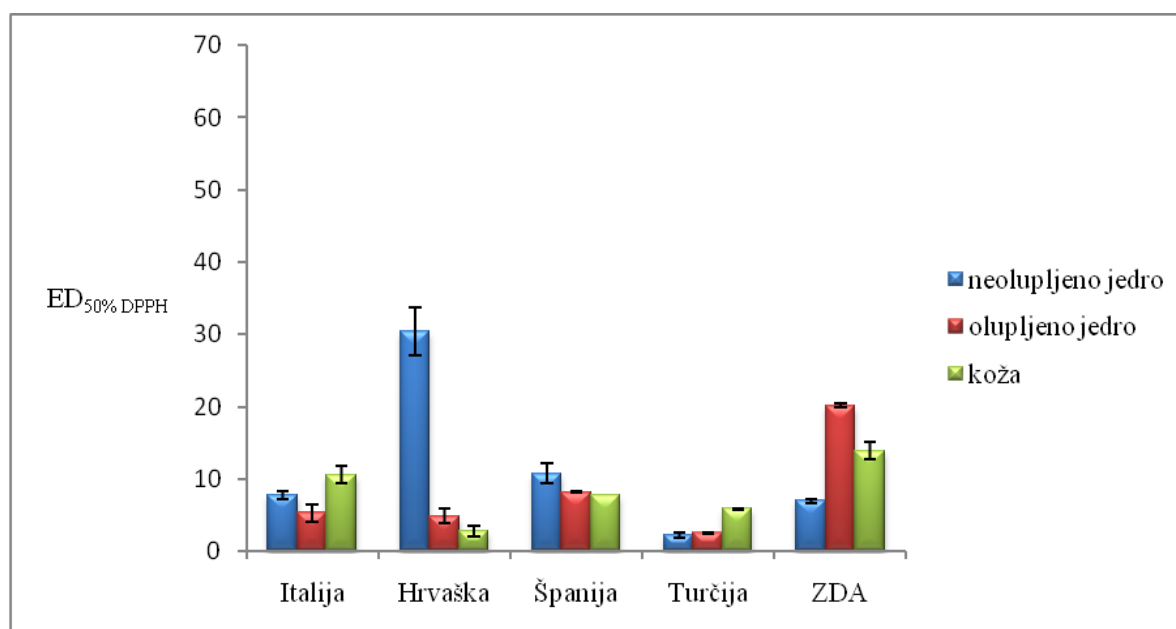
Preglednica 20: Vrednost $ED_{50} \% DPPH^\bullet$ za ekstrakte mandlja v topilu destilirana voda.

frakcija	$ED_{50} \% DPPH^\bullet (\mu g/mL)$				
	Italija	Hrvaška	Španija	Turčija	ZDA
neolupljeno jedro	7,5±0,8	28,8±1,6	37,4±5,1	9,7±0,2	51,4±15,2
olupljeno jedro	18,4±2,0	58,0±1,3	26,7±4,9	26,6±0,9	25,9±0,4
koža	2,9±0,1	5,6±0,2	3,1±0,1	62,7±3,5	22,2±1,6

Slika 11: Vrednost $ED_{50} \% DPPH^\bullet$ ($\mu g/mL$) za vodne ekstrakte mandlja z različnih geografskim poreklom

Preglednica 21: Vrednost $ED_{50} \% DPPH^\bullet$ za ekstrakte mandlja v topilu etanol.

frakcija	$ED_{50} \% DPPH^\bullet (\mu g/mL)$				
neolupljeno jedro	Italija	Hrvaška	Španija	Turčija	ZDA
	7,8±0,5	30,5±3,3	10,8±1,4	2,3±0,4	7,0±0,3
olupljeno jedro	5,3±1,2	4,9±1,0	8,2±0,1	2,5±0,1	20,2±0,2
koža	10,6±1,2	2,8±0,8	7,8±0,1	5,9±0,1	13,9±1,2

Slika 12: Vrednost $ED_{50} \% DPPH^\bullet (\mu g/mL)$ za etanolne ekstrakte mandlja z različnih geografskim poreklom

Iz slik 11 in 12 je razvidno, da se ekstrakti mandlja razlikujejo glede na posamezno frakcijo mandlja v lovljenju prostih radikalov.

Najboljšo sposobnost lovljenja prostih radikalov je pokazal etanolni ekstrakt neolupljenega jedra mandlja iz Turčije ($2,3 \pm 0,4 \mu g/mL$), vodni ekstrakt neolupljenega jedra z najboljšo sposobnostjo lovljenja prostih radikalov pa je tisti iz Italije ($7,5 \pm 0,8 \mu g/mL$).

Etanolni ekstrakt kože iz Hrvaške ima prav tako dobro sposobnost lovljenja prostih radikalov ($2,8 \pm 0,8 \mu g/mL$), le-to pa smo ravno tako dokazali tudi v vodnem ekstraktu kože, najboljši je ekstrakt iz Italije ($2,94 \pm 0,04 \mu g/mL$). Vodni ekstrakt kože iz Turčije se izkaže kot najslabši, saj ima visoko vrednost $ED_{50} \% DPPH^\bullet$ ($62,7 \pm 3,5 \mu g/mL$).

Pri olupljenih jedrih ima najnižjo vrednost $ED_{50} \% DPPH^{\bullet}$ etanolni ekstrakt iz Turčije ($2,54 \pm 0,09 \mu\text{g/mL}$), najvišjo pa smo določili pri vodnem ekstraktu iz Hrvaške ($58,0 \pm 1,3 \mu\text{g/mL}$).

Naši rezultati potrjujejo teorijo, da sposobnost ekstraktov za lovljenje prostega radikala $DPPH^{\bullet}$ ni v povezavi s koncentracijo skupnih fenolnih spojin. Vsebnost SFS je v koži največja, v olupljenem jedru mandlja pa zelo majhna, a ima ekstrakt kože v nekaterih primerih slabšo sposobnost lovljenja prostih radikalov kot olupljeno jedro. Iz vsega tega torej sledi, da je poleg vsebnosti SFS pomembno tudi, katera fenolna spojina se nahaja v ekstraktu.

V raziskavi, ki so jo izvajali Barreira in sod. (2008), so se za učinkovito topilo izkazali metanolni in vodni ekstrakti (določevali so neolupljena jedra). Ti dve topili sta pokazali kar 90 % antioksidativno dejavnost pri koncentraciji 5 mg/mL. Vodni ekstrakti, ki so bili estrahirani v vreli vodi, se količina fenolnih spojin zmanjša in zaradi tega so lahko prisotni drugi antioksidanti, ki prispevajo k antioksidativnem delovanju. Predvidevamo lahko, da se je to zgodilo tudi v našem primeru, saj smo jedro od lupine ločevali v vreli vodi.

4.3 DOLOČANJE VSEBNOSTI VIŠJIH MAŠČOBNIH KISLIN V MANDLJU

Vsebnost višjih maščobnih kislin smo določali le v semenih mandljev. S pomočjo začetnih podatkov (mase natehtanih semen, internega standarda in topila), ki smo jih že predstavili v preglednici 9, stran 22 smo izračunali vsebnosti maščobnih kislin. Po enačbi 8 smo izračunali koncentracijo maščobnih kislin v mg/100 g vzorca, dobljene vrednosti smo pretvorili v g/kg vzorca, preglednica 22.

$$C \text{ (mg/100 g)} = (A_i \times F_{Ai} \times m_{17} \times 100) / (A_{17} \times F_{Ai17} \times m_{vz}) \quad \dots(8)$$

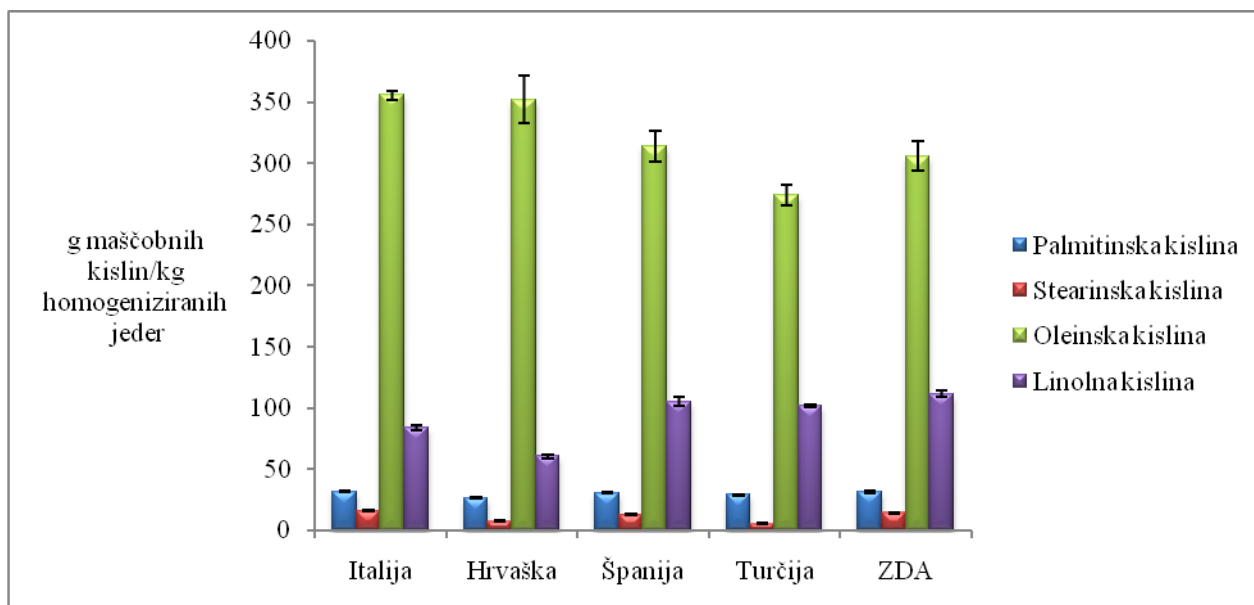
Preglednica 22: Vsebnost maščobnih kislin v jedrih mandlja podana v gramih na kilogram homogeniziranih jeder mandlja.

Maščobna kislina	Koncentracija MK v jedru Italija	Koncentracija MK v jedru Hrvaška	Koncentracija MK v jedru Španija	Koncentracija MK v jedru Turčija	Koncentracija MK v jedru ZDA
Palmitinska kislina (16:0)	31,8±0,3	26,5±0,7	30,6±0,3	30,0±0,3	31,4±1,2
Stearinska kislina (18:0)	16,2±0,6	7,5±0,5	12,9±0,5	5,6±0,4	14,2±0,6
Oleinska kislina (18:1)	355,6±3,5	351,8±19,4	313,8±12,2	274,3±0,4	305,5±12,1
Linolna kislina (18:2)	84,2±2,2	60,6±1,4	105,0±3,7	102,2±1,2	111,5±2,5
Skupna vsebnost maščobnih kislin	514,9±6,6	479,3±22	495,4±16,7	443,2±1,6	495,3±16,4

Iz preglednice 22 je razvidna maščobnokislinska sestava mandljev različnih geografskih porekel. Povprečna vsebnost skupnih maščobnih kislin je 485,7 g/kg. Različni avtorji, ki so prav tako določevali vsebnost maščobnih kislin, so dobili večji odstotek le-teh v jedru kot mi, kar pa je seveda zopet odvisno od letine, torej podnebnih in genetskih dejavnikov. Garcia-Lopez in sod. (1996) so določili vsebnost maščobnih kislin v 19 kultivarjih, razpon

je med 53 % in 62 % na suho težo posušenih mandljev, Celik in Balta (2011) sta določila razpon med 25, 19 % do 60,77 % v turških mandljih.

Naši rezultati so pod spodnjo mejo glede na rezultate drugih avtorjev. Največ skupnih maščob ima vzorec iz Italije (514,9 g /kg), najmanj pa mandelj iz Turčije (443,2 g/kg).



Slika 13: Sestava maščobnih kislin glede na geografsko poreklo vzorcev mandlja

V mandljih smo določili palmitinsko kislino, stearinsko kislino, oleinsko kislino in linolno kislino. Največ palmitinske, stearinske in oleinske kisline smo določili v hrvaškem mandlju, linolne pa v mandljih iz ZDA.

Santhe in sod. (2008) so določili palmitinsko kislino v razponu med 5,15 % in 6,65 %, oleinsko kislino od 59,52 % do 73,80 % in linolno kislino od 19,49 % do 33,29 %.

Oleinska in linolna predstavljata več kot 90 % vseh maščob v mandlju (Santhe in sod., 2008).

5 SKLEPI

Na podlagi opravljenih analiz v okviru diplomskega dela lahko zaključimo:

- mandlji vsebujejo fenolne spojine,
- razlike v vsebnosti fenolnih spojin so lahko posledica različnega geografskega porekla vzorca,
- dokazali smo, da je 70 % etanol boljše topilo za ekstrakcijo skupnih fenolnih spojin kot destilirana voda,
- največ fenolnih spojin je v koži mandlja, najmanj pa v olupljenem jedru,
- koncentracija SFS v ekstraktih ni v povezavi z njihovo antioksidativno učinkovitostjo,
- 70 % etanol je primernejše topilo za ekstrakcijo fenolnih spojin z višjo antioksidativno učinkovitostjo,
- koža mandlja ima največjo sposobnost lovljenja prostih radikalov,
- v mandljih smo določili palmitinsko kislino, stearinsko kislino, oleinsko kislino in linolno kislino,
- vsebnost maščobnih kislin v vzorcih mandlja se bistveno ne razlikujejo glede na geografsko poreklo,
- oleinska kislina je najbolj zastopana maščobna kislina v mandljih.

6 POVZETEK

V diplomski nalogi smo v mandljevih različnih frakcijah (neolupljeno jedro, olupljeno jedro in koža) z različnim geografskim poreklom, določevali skupne fenolne spojine, antioksidativno učinkovitost in vsebnosti maščobnih kislin.

S Folin-Ciocalteu reagentom smo določili vsebnost skupnih fenolnih spojin. Različno geografsko poreklo vzorcev mandlja pomeni tudi razlike v skupnih fenolnih spojinah, prav tako pa se vsebnost skupnih fenolnih spojin razlikuje glede na del mandlja – največ jih vsebuje koža, najmanj pa olupljen mandelj.

Največ fenolnih spojin vsebuje etanolni ekstrakt kože mandlja iz Italije ($7,23 \pm 0,05$ mg GAE/g vzorca), najmanj pa vodni ekstrakt olupljenega jedra mandlja iz Turčije ($0,067 \pm 0,001$ mg GAE/g vzorca). Za ekstrakcijo se je kot boljše topilo izkazal 70 % etanol, kar se vidi predvsem pri ekstraktih kože, saj etanolni ekstrakti vsebujejo 30 % več skupnih fenolnih spojin od vodnih ekstraktov iz kože.

V koži mandlja smo v etanolnih ekstraktih določili skupne fenolne spojine v razponu od $7,23 \pm 0,05$ (Italija) do $2,98 \pm 0,06$ mg GAE/g vzorca (Hrvaška). Pri vodnih ekstraktih so vrednosti od $3,81 \pm 0,01$ (Hrvaška) do $0,17 \pm 0,01$ mg GAE/g vzorca (Italija).

Neolupljeno jedro mandlja ima v nekaterih primerih visoke vrednosti, najvišja v etanolnem ekstraktu znaša $2,25 \pm 0,01$ (Hrvaška), najnižja pa $0,24 \pm 0,02$ mg GAE/g vzorca (ZDA). V vodnem ekstraktu je razpon od $0,79 \pm 0,01$ (Hrvaška) do $0,26 \pm 0,01$ mg GAE/g vzorca (Italija).

Najmanjše vrednosti smo določili v olupljenem mandlju. Pri etanolnem ekstraktu smo dobili vrednosti od $0,08 \pm 0,01$ mg/g (Turčija) do $0,14 \pm 0,01$ mg galne kisline/g (Italija), pri vodnem pa od $0,32 \pm 0,01$ mg galne kisline/g (Italija) do $0,61 \pm 0,01$ mg galne kisline/g (Španija).

Antioksidativno učinkovitost ekstraktov smo dokazali z metodo lovljenja DPPH• radikala. Sposobnost lovljenja prostega radikala smo izrazili kot koncentracijo fenolnih spojin v ekstraktu, ki povzroči 50 % inhibicijo prostega DPPH• ($ED_{50\%DPPH\bullet}$) radikala. Boljša kot je sposobnost lovljenja prostih radikalov, nižja je vrednost $ED_{50\%}$.

V našem primeru so boljši ekstrakti neolupljenega jedra mandlja, slabši pa ekstrakti olupljenega jedra. Glede topila za ekstrakcijo pa ni nobeno izstopalo, saj je pri nekaterih delih mandlja boljša uporaba etanola, spet pri drugih pa destilirane vode.

V vodnih ekstraktih kože mandlja smo določili najmanjšo vrednost $ED_{50\%}$, to je od $2,9 \pm 0,1$ (Italija) do $62,7 \pm 3,5$ $\mu\text{g/mL}$ (Turčija). Pri etanolnih ekstraktih je sposobnost lovljenja radikala podobna, in sicer od $2,8 \pm 0,8$ (Hrvaška) do $13,9 \pm 1,2$ $\mu\text{g/mL}$ (ZDA).

Olupljeno jedro v vodnem ekstraktu ima vrednosti od $18,4 \pm 2,0$ (Italija) do $58,0 \pm 1,3$ $\mu\text{g/mL}$ (Hrvaška). Inhibicija prostega radikala pri etanolnem ekstraktu olupljenega mandlja je boljša kot v vodnem ekstraktu, in sicer v razponu od $2,5 \pm 0,1$ (Turčija) do $20,2 \pm 0,2$ $\mu\text{g/mL}$ (ZDA).

Neolupljeno jedro v vodnem ekstraktu ima vrednosti od $7,5 \pm 0,8$ (Italija) do $51,4 \pm 15,2$ $\mu\text{g/mL}$ (ZDA), v etanolnem pa od $2,3 \pm 0,4$ (Turčija) do $30,5 \pm 3,3$ $\mu\text{g/mL}$ (Hrvaška).

Glede na naše rezultate lahko trdimo, da skupno število fenolnih spojin ne vpliva na sposobnost lovljenja prostega radikala.

V mandlju smo določili sestavo maščobnih kislin s plinsko kromatografijo. Povprečna vsebnost skupnih maščobnih kislin je $485,7$ g/kg. Določili smo palmitinsko kislino, stearinsko kislino, oleinsko kislino in linolno kislino. V vseh vzorcih smo določili največ oleinske kisline. Naši rezultati so pod spodnjo mejo glede na rezultate drugih avtorjev. Največ maščob ima vzorec iz Italije ($514,9 \pm 6,6$ g/kg), najmanj pa mandelj iz Turčije ($443,2 \pm 1,6$ g/kg).

7 VIRI

- Abram V. 2000. Antioksidativno delovanje flavonoidov. V: Antioksidanti v živilstvu. 20. Bitenčevi živilski dnevi, Portorož, 26. in 27. oktober 2000. Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 23-32
- Abram V., Abramovič H., Skrt M., Kač M., Poklar Ulrih N. 2010. Antioksidacijska učinkovitost fenolnih spojin. Kemija v šoli in družbi, 22, 2: 14-19
- Abram V., Simčič M. 1997. Fenolne spojine kot antioksidanti. Farmacevtski vestnik, 48: 573-589
- Abram V., Abramovič H., Smole Možina S. 2008. Fenolne spojine iz stranskih proizvodov rastlinske predelave-funkcionalni dodatki živilom. V: Stranski proizvodi in odpadki v živilstvu-uporabnost in ekologija. 25. Bitenčevi dnevi, Ljubljana, 17. in 18. april 2008. Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 177-188
- Adamič F., Bernot D., Cegnar F., Črnko J., Grum A., Hlišč T., Honzak D., Lekšan M., Maček J., Modic D., Oblak M., Smole J., Strhgar A. 1975. Naše sadje. Ljubljana, ČZP Kmečki glas: 31-33
- Barreira J.C.M., Ferreira I.C.F.R., Oliveira M.B.P.P., Pereira J.A. 2008. Effects of different phenols extraction conditions on antioxidant activity of almond (*Prunus dulcis*) fruits. Journal of Food Biochemistry, 33: 763-776
- Brand-Williams W., Cuvelier M. E., Berset C. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie, 29: 25-30
- Belitz H. -D., Grosch W. 1999. Food chemistry. 2nd ed. Berlin, Springer:153-157
- Bolling B. W., Dolnikowaki G., Blumberg J. B., Chen O. C.Y. 2010. Polyphenol content and antioxidant activity of California almonds depend on cultivar and harvest year. Food Chemistry, 122: 819-825
- Boyer R. 2005. Temelji biokemije. Ljubljana, Študentska založba: 208-211

- Bulatovič S. 1985. Orah, lešnik i badem. Beograd, Nolit: 291-293
- Celik F., Balta M. F. 2011. Kernel fatty acid composition of Turkish almond (*Prunus dulcis*) genotypes: a regional comparison. Journal of Food Agriculture & Environment, 9: 171-174
- Chen C.-Y., Lapsley K., Blumberg J. 2006. A nutrition and health perspective on almonds. Journal of the Science of Food and Agriculture, 86: 2245–2250
- Dale E. K., Gradziel T. M., Grasselly C. 1991. Almonds. V: Genetic resources of temperate fruit and nut crops 2. Moore J. N., Ballington J. R. (eds.). Wageningen, International Society for Horticultural Science: 701 - 729
- FAO. 2012. Faostat. Rome, Food and Agriculture Organization: 7 str.
<http://faostat.fao.org/site/636/default.aspx#ancor> (december, 2011)
- Flowerdew B. 1995. Sadje in drugi sadeži. Ljubljana, DZS: 190-193
- Garcia-Lopez C., Grane-Teruel N., Berenguer-Navarro V., Garcia-Garcia J.E., Martin-Carratala M.L. 1996. Major fatty acid composition of 19 almond cultivars of different origins: A chemometric approach. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 44: 1751-1755
- Grieve M. 1931. A modern herbal: Almond. Greenwood E. (ed.). Arcata, Botanical.com: 8 str.
<http://botanical.com/botanical/mgmh/a/almon026.html> (december, 2011)
- Gutfinger T. 1981. Polyphenols in olive oils. Journal of the American Oil Chemists Society, 58: 966-968
- Hribar J., Simčič M. 2000. Antioksidanti v sadju in vrtninah. V: Antioksidanti v živilstvu. 20. Bitenčevi živilski dnevi, Portorož, 26. in 27. oktober 2000. Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 151-158
- Davies K. M., Schwinn K. E. 2006. Molecular biology and biotechnology of flavonoid biosynthesis. V: Flavonoids: chemistry, biochemistry and applications. Andersen Q. M., Markham K.R. (eds.). New York, CRC Press: 144-172

- Klofutar C. 1992. Fizikalno kemijske lastnosti triacilglicerolov. V: Lipidi. 30 let študija živilske tehnologije. Ljubljana 4. - 5. junij 1992. Klofutar C. Žlender B., Hribar J., Plestenjak A. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilsko tehnologijo: 11-15
- Kornhauser A. 1994. Organska kemija 2. Ljubljana, DZS: 125-126
- Milbury P.E., Chen C-Y., Dolnikowaki G.G., Blumberg J.B. 2006. Determination of flavonoids and phenolics and their distribution in almonds. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 54: 5027-5033
- Molyneux P. 2004. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. Songklanakarin Journal of Science and Technology, 26: 211-219
- Souci S.W., Fachmann W., Kraut H. 2000. Food composition and nutrition tables. 6th rev. and completed ed. Stuttgart, Medpharm Scientific Publishers: 1022 - 1023
- Sancin V. 1988. Sadje z našega vrta. Trst, Založništvo tržaškega tiska: 253-263
- Sang S., Lapsley K., Jeong W.-S., Lachance P.A., Ho C.-T., Rosen R.T. 2002. Antioxidative phenolic compounds isolated from almond skins (*Prunus amygdalus* Batsch). Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50: 2459-2463
- Sathe S.K., Seeram N.P., Kshirsagar H.H., Heber D., Lapsley K.A. 2008. Fatty acid composition of California grown almonds. Journal of Food Science, 73: 607-614
- Solar A., Korbar U., Sušnik-Klemenčič M. 2006. V luščini skrito bogastvo. Rože in vrt, priloga: List in plod, 5, 10: 36-45
- Štampar F., Lešnik M., Veberič R., Solar A., Koron D., Usenik V., Hudina M., Osterc G. 2005. Sadjarstvo. Ljubljana, Kmečki glas: 284-285
- Vermerris W., Nicholson R. 2008. Phenolic compound biochemistry. Dordrecht, Springer: 81-86, 52-154
- Vidrih R., Kač M. 2000. Analitika antioksidantov. V: Antioksidanti v živilstvu. 20. Bitenčevi živilski dnevi, Portorož, 26. in 27. oktober 2000. Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 101-114

Villano D., Fernandez-Pachon M.S., Moya M.L., Troncoso A.M., Garcia Parrilla M.C.
2007. Radical scavenging ability of polyphenolic compounds towards DPPH free
radical. *Talanta*, 71: 230-235

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorici prof. dr. Nataši Poklar Ulrih in somentorici dr. Mihaeli Skrt za čas, vodenje, vsestransko pomoč in temeljit pregled diplomske naloge.

Zahvaljujem se tudi recenzentu dr. Rajku Vidrihu za podroben pregled diplomske naloge.

Zahvaljujem se Lini Burkan za vso pomoč pri urejanju in oblikovanju diplomske naloge.

Iskreno se zahvaljujem moji družini, ki me je podpirala in mi bila v pomoč skozi študijska leta. Še posebej očetu in mami.

Posebna zahvala gre tudi fantu Sandiju in vsem prijateljem, sošolcem, kateri so me spremljali in bodrili na poti do cilja.

Vsem skupaj še enkrat hvala!