

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Jurij BIZJAK

**MAŠČOBNOKISLINSKA SESTAVA IN
ANTIOKSIDATIVNI POTENCIAL OREHOVEGA
OLJA**

MAGISTRSKO DELO

Magistrski študij - 2. stopnja Prehrana

Ljubljana, 2015

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Jurij BIZJAK

**MAŠČOBNOKISLINSKA SESTAVA IN ANTIOKSIDATIVNI
POTENCIAL OREHOVEGA OLJA**

MAGISTRSKO DELO
Magistrski študij - 2. stopnja Prehrana

**FATTY ACID COMPOSITION AND ANTIOXIDANT POTENTIAL
OF WALNUT OIL**

M. SC. THESIS
Master Study Programmes: Field Nutrition

Ljubljana, 2015

Magistrsko delo je zaključek magistrskega študijskega programa druge stopnje Prehrana. Delo je bilo opravljeno na Biotehniški fakulteti, Oddelka za živilstvo, na Katedri za tehnologije, prehrano in vino in Katedri za biokemijo in kemijo živil.

Komisija za študij 1. in 2. stopnje je za mentorico magistrskega dela imenovala prof. dr. Heleno Abramovič, za somentorja prof. dr. Rajka Vidriha in za recenzenta doc. dr. Tomaža Polaka.

Mentorica: prof. dr. Helena Abramovič

Somentor: prof. dr. Rajko Vidrih

Recenzent: doc. dr. Tomaž Polak

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:

Član:

Član:

Datum zagovora:

Podpisan izjavljam, da je naloga rezultat lastnega raziskovalnega dela. Izjavljam, da je elektronski izvod identičen tiskanemu. Na univerzo neodplačno, neizključno, prostorsko in časovno neomejeno prenašam pravici shranitve avtorskega dela v elektronski obliki in reproduciranja ter pravico omogočanja javnega dostopa do avtorskega dela na svetovnem spletu preko Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete.

Jurij Bizjak

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Du2
DK	UDK 664.3:634.51:664.8.03:543.635(043)=163.6
KG	oreh/orehovo olje/obstojnost/skladiščenje/omega 3 maščobne kisline/maščobnokislinska sestava/proste maščobne kisline/ <i>p</i> -anizidinska vrednost/peroksidno število/antioksidativni potencial/DPPH/Totox vrednost/konjugirani dieni/konjugirani trieni
AV	BIZJAK, Jurij, dipl. inž. živ. in preh. (UN)
SA	ABRAMOVIČ, Helena (mentorica)/ VIDRIH, Rajko (somentor)/ POLAK, Tomaž (recenzent)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo
LI	2015
IN	MAŠČOBNOKISLINSKA SESTAVA IN ANTIOKSIDATIVNI POTENCIAL OREHOVEGA OLJA
TD	Magistrsko delo (Magistrski študij - 2. stopnja Prehrana)
OP	X, 60 str., 16 pregl., 24 sl., 37 vir.
IJ	sl
JJ	sl/en
AI	V okviru magistrske naloge smo izvedli raziskavo olja, ki je bilo pridobljeno iz različnih sort orehov in stiskano pri različnih temperaturah (30 °C, 40 °C in 50 °C). Dvanajstim vzorcem svežega olja smo določili sestavo maščobnih kislin (MK), vsebnost prostih MK, antioksidativni potencial (AOP) s pomočjo DPPH radikala in vsebnost primarnih produktov oksidacije, ki smo jih izrazili kot peroksidno število (PŠ). Določili smo tudi vsebnost sekundarnih produktov oksidacije, ki smo jih izrazili kot <i>p</i> -anizidinska vrednost in vsebnost konjugiranih dienov ter konjugiranih trienov. Proste MK in PŠ v svežih oljih nista presegla z zakonom dovoljenih vrednosti za nerafinirana olja. Vse vzorce smo tudi skladiščili pri temperaturi 50 °C in jim po času 10 dni, 15 dni in 20 dni določili AOP ter vsebnost konjugiranih dienov in trienov. Vsebnost konjugiranih dienov je v oljih po koncu skladiščenja narasla za 250 % - 400 %. Med vsebnostjo konjugiranih dienov in PŠ v svežih vzorcih olja smo našli tesno pozitivno povezavo. Iz vsebnosti konjugiranih dienov po koncu skladiščenja smo izračunali tudi teoretično vrednost PŠ, ki je v vseh vzorcih olja po koncu skladiščenja presegla dovoljeno vrednost 20 mekv/kg. V dveh vzorcih orehovega olja smo določili MK sestavo po 20 dnevnem skladiščenju. Vsebnost nenasičenih MK se je po skladiščenju zmanjšala. Največjo spremembo smo opazili pri C18:3, katere vsebnost se je zmanjšala za 18 % oz. 33 %.

KEY WORDS DOCUMENTATION

ND Du2
DC UDC 664.3:634.51:664.8.03:543.635(043)=163.6
CX walnuts/walnut oil/stability/storage/omega 3 fatty acid/fatty acids composition/free fatty acids/*p*-anisidine value/peroxide value/antioxidant potential/DPPH/Totox value/conjugated dienes/conjugated trienes
AU BIZJAK, Jurij, dipl. inž. živ. in preh. (UN)
AA ABRAMOVIČ, Helena (supervisor)/ VIDRIH, Rajko (co-advisor)/ POLAK, Tomaž (reviewer)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB Universiti of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Food Science and Technology
PY 2015
TI FATTY ACID COMPOSITION AND ANTIOXIDANT POTENTIAL OF WALNUT OIL
DT M. Sc. Thesis (Master Study Programmes: Field Nutrition)
NO X, 60 p., 16 tab., 24 fig., 37 ref.
LA sl
AL sl/en
AB In MSc thesis an investigation of walnut oils processed from four cultivars at different temperatures (30 °C, 40 °C and 50 °C) was carried out. Fatty acid composition, free fatty acid content, antioxidative potential (DPPH method) and content of primary oxidation products expressed as peroxide value (PV) were determined in 12 walnut oils. Analyses of secondary oxidation products expressed as *p*-anisidine value and content of conjugated dienes and trienes were also carried out. Free fatty acids and PV in fresh oils did not exceed the upper limit for unrefined oils. All oil samples were stored at 50 °C and analysed on antioxidative potential and conjugated dienes and trienes after 10, 15 and 20 days. Content of conjugated dienes increased for 250 – 400 %. Significant correlation was found between conjugated dienes and PV of fresh oils. Theoretical PV for oils stored for 20 days was calculated from the content of conjugated dienes; after storage it exceeded 20 meq/kg. After 20 days of storage, the content of polyunsaturated fatty acids decreased. The greatest change was found for alpha-linolenic acid, its content decreased for 18 – 33 %.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VII
KAZALO SLIK	VIII
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	X
1 UVOD	1
1.1 NAMEN MAGISTRSKE NALOGE	1
1.2 DELOVNE HIPOTEZE.....	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 MAŠČOBE V PREHRANI	3
2.2 OMEGA 3 MAŠČOBNE KISLINE	5
2.2.1 Orehi kot vir omega 3 maščobnih kislin.....	7
2.3 OBSTOJNOST OREHOVEGA OLJA.....	8
2.4 ANTIOKSIDATIVNI POTENCIAL	12
2.5 OPTIMIZACIJA STISKANJA OREHOVEGA OLJA	13
3 MATERIAL IN METODE	16
3.1 MAŠČOBNOKISLINSKA SESTAVA.....	17
3.2 PROSTE MAŠOBNE KISLINE.....	19
3.3 PEROKSIDNO ŠTEVILO	20
3.4 <i>p</i> -ANIZIDINSKA VREDNOST	21
3.5 SHEMA POSKUSA SKLADIŠČENJA OLJA	22
3.6 DOLOČANJE KONJUGIRANIH DIENOV IN TRIENOV	22

3.7	DOLOČANJE ANTIOKSIDATIVNEGA POTENCIALA Z DPPH RADIKALOM	24
3.8	STATISTIČNA OBDELAVA	25
4	REZULTATI Z RAZPRAVO	27
4.1	MAŠČOBNOKISLINSKA SESTAVA	27
4.2	PROSTE MAŠČOBNE KISLINE.....	33
4.3	PEROKSIDNO ŠTEVILO	34
4.4	<i>p</i> -ANIZIDINSKA VREDNOST.....	35
4.5	TOTOX VREDNOST	36
4.6	KONJUGIRANI DIENI IN TRIENI.....	40
4.6.1	Konjugirani dieni in trieni v svežem olju.....	40
4.6.2	Konjugirani dieni in trieni v orehovem olju po skladiščenju 20 dni	44
4.6.3	Teoretična vrednost peroksidnega števila v olju po skladiščenju 20 dni	48
4.7	ANTIOKSIDATIVNI POTENCIAL OREHOVIH OLJ.....	50
5	SKLEPI	54
6	POVZETEK.....	56
7	VIRI.....	58
ZAHVALA		

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Pomembne maščobne kisline v živilih ter njihov fiziološki učinek in vloga (Salobir, 2001).	3
Preglednica 2: Orientacijske vrednosti maščob v prehrani odraslih ljudi (Salobir, 2001). ...	5
Preglednica 3: Obstočnost različnih vrst olj (Kochhar in Henry, 2009).	8
Preglednica 4: Vsebnost nasičenih, enkrat nenasičenih in večkrat nenasičenih maščobnih kislin v oljih (Kochhar in Henry, 2009).	9
Preglednica 5: Fizikalno-kemijske lastnosti svežega orehovega olja (Jokić in sod., 2014).14	
Preglednica 6: Molske mase maščobnih kislin in metilnega estra.	18
Preglednica 7: Povprečne vrednosti vsebnosti maščobnih kislin od C16:0 do C 18:1 v vzorcih svežega orehovega olja.	27
Preglednica 8: Povprečne vrednosti vsebnosti maščobnih kislin od C18:2 do C 20:1 v vzorcih svežega orehovega olja.	27
Preglednica 9: Primerjava maščobnokislinske sestave svežega orehovega olja Adams in Lara in olja, ki smo ga skladiščili 20 dni v temi pri 50 °C.	29
Preglednica 10: Vsebnost prostih maščobnih kislin, podana kot % oleinske kisline, v vzorcih svežega orehovega olja.	33
Preglednica 11: Peroksidno število v vzorcih svežega orehovega olja.	34
Preglednica 12: <i>p</i> -anizidinska vrednost v vzorcih svežega orehovega olja.	35
Preglednica 13: Totox vrednost v vzorcih svežega orehovega olja.	36
Preglednica 14: Konjugirani dieni, ki smo jih določili pri valovni dolžini 232 nm in konjugirani trieni, ki smo jih določili pri valovni dolžini 258 nm, 268 nm in 279 nm v svežem orehovem olju.	40
Preglednica 15: Konjugirani dieni, ki smo jih določili pri valovni dolžini 232 nm in konjugirani trieni, ki smo jih določili pri valovni dolžini 258 nm, 268 nm in 279 nm v orehovem olju po skladiščenju 20 dni pri 50 °C.	45
Preglednica 16: Antioksidativni potencial svežih orehovit olj in orehovit olj, ki smo jih skladiščili 20 dni pri 50 °C.	50

KAZALO SLIK

Slika 1: Vsebnost polutantov v prehrani, ki zagotavlja vir dolgoveržnih omega 3 maščobnih kislin v vrednosti 0,3 % energijskih potreb (Antonijevic in sod., 2007).	6
Slika 2: Reakcija med aldehidom in <i>p</i> – anizidinom (Shahidi in Wanasundara, 2008).	10
Slika 3: Linearna povezava med peroksidnim številom in konjugiranimi dieni v repičnem in sojinem olju (Shahidi in Wanasundara, 2008).	12
Slika 4: Odvisnost izkoristka pri pridobivanju olja iz orehove pogače s CO ₂ ekstrakcijo od časa (Jokić in sod., 2014).	15
Slika 5: Razmerje med večkrat nenasičenimi omega 6 in večkrat nenasičenimi omega 3 maščobnimi kislinami v vzorcih svežega orehovega olja.	29
Slika 6: Sprememba maščobnokislinske sestave v orehovem olju Adams in Lara, ki smo ga skladiščili 20 dni pri 50 °C glede na vrednosti v svežem olju.	31
Slika 7: Razmerje med večkrat nenasičenimi omega 6 in večkrat nenasičenimi omega 3 maščobnimi kislinami v vzorcih Adams in Lara svežega orehovega olja in orehovega olja, ki smo ga skladiščili 20 dni pri 50 °C.	32
Slika 8: Primerjava peroksidnega števila in Totox vrednosti v vzorcih svežega orehovega olja.	37
Slika 9: Primerjava <i>p</i> –anizidinske vrednosti in Totox vrednosti v vzorcih svežega orehovega olja.	38
Slika 10: Zveza med Totox vrednostjo in peroksidnim številom v orehovem olju.	38
Slika 11: Zveza med Totox vrednostjo in <i>p</i> -anizidinsko vrednostjo v svežem orehovem olju.	39
Slika 12: Primerjava vrednosti konjugiranih dienov in peroksidnega števila v vzorcih svežega orehovega olja.	41
Slika 13: Zveza med peroksidnim številom in konjugiranimi dieni v svežem orehovem olju.	42
Slika 14: Zveza med <i>p</i> -anizidinsko vrednostjo in konjugiranimi trieni, ki smo jih določili pri valovni dolžini 258 nm v svežem orehovem olju.	43
Slika 15: Zveza med <i>p</i> -anizidinsko vrednostjo in konjugiranimi trieni, ki smo jih določili pri valovni dolžini 268 nm v svežem orehovem olju.	43

Slika 16: Zveza med <i>p</i> -anizidinsko vrednostjo in konjugiranimi trieni, ki smo jih določili pri valovni dolžini 279 nm v svežem orehovem olju.	44
Slika 17: Sprememba vsebnosti konjugiranih dienov v orehovitih oljih po skladiščenju 20 dni pri 50 °C glede na vrednost v svežem orehovem olju.	45
Slika 18: Odvisnost vsebnosti konjugiranih dienov po skladiščenju 20 dni in vsebnostjo PUFA v svežih oljih	46
Slika 19: Primerjava vsebnosti konjugiranih trienov v svežih orehovitih oljih in orehovitih oljih, ki smo jih skladiščili 20 dni pri 50 °C.....	47
Slika 20: Sprememba vsebnosti konjugiranih trienov v orehovitih oljih po skladiščenju 20 dni pri 50 °C glede na vrednost v svežem orehovem olju.	47
Slika 21: Teoretična vrednost peroksidnega števila v orehovitih oljih, ki smo jih skladiščili 20 dni pri 50 °C.	49
Slika 22: Antioksidativni potencial orehovitih olj glede na prvotno vrednost za posamezno časovno obdobje skladiščenja pri 50 °C	52
Slika 23: Sprememba antioksidativnega potenciala orehovitih olj med posameznimi časovnimi obdobji skladiščenja pri 50 °C glede na prejšnjo vrednost.	53
Slika 24: Odvisnost AOP po 20 dnevnem skladiščenju od Totox vrednosti svežih orehovitih olj.....	53

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

AOP	antioksidativni potencial
DHA	dokozaheksaenojska kislina
EPA	eikozapentaenojska kislina
MK	maščobna kislina
MUFA	enkrat nenasičene maščobne kisline
<i>p</i> -AV	<i>p</i> -anizidinsko število
PS	polistiren
PŠ	peroksidno število
PUFA	večkrat nenasičene maščobne kisline
RSD	relativni standardni odmik
SD	standardna deviacija
TT	telesna teža

1 UVOD

Rastlinska olja in jedi, ki vsebujejo rastlinska olja, so občutljiva na oksidacijo. Oksidiranost se v oljih odraža v poslabšanju senzoričnih lastnosti, kar zaznamo z neprijetnim okusom in vonjem (Shahidi in Wanasundara, 2008). Tako na primer produkti sekundarne oksidacije že v majhni prisotnosti (manj kot 1 ppm) vplivajo na okus (Kochhar, 1996). Med oksidacijo olja izgubijo svoj značilen, zaželen okus, poleg tega spremenijo barvo in, kar je najpomembnejše, s tem ko se zniža vsebnost vitaminov in esencialnih maščobnih kislin (MK), se zmanjša tudi hranilna vrednost (Kochhar in Henry, 2009).

Oksidativna stabilnost je odvisna od stopnje nenasičenosti MK, vsebnosti antioksidantov, prisotnosti prooksidantov in pogojev skladiščenja. Večje kot je število dvojnih vezi (pri večkrat nenasičenih MK (PUFA)), bolj je olje občutljivo na oksidacijo. Orehovo olje ima veliko PUFA in je zato zelo občutljivo na oksidacijo. Za ohranjanje arome in dolge obstojnosti morajo imeti olja dobro oksidativno stabilnost (Frankel, 2005; Shahidi in Wanasundara, 2008).

Orehova jedrca so dober vir beljakovin, predvsem pa esencialnih MK. Jedrca vsebujejo med 52 % in 70 % olja, s prehransko ustrezno MK sestavo, kjer prevladujejo PUFA in enkrat nenasičene maščobne kisline (MUFA) (Crews in sod., 2005). Orehi so tudi dober vir antioksidantov, zlasti tokoferolov in polifenolov (Martinez in sod., 2006).

1.1 NAMEN MAGISTRSKE NALOGE

Namen magistrske naloge je okarakterizirati orehovo olje iz različnih sort orehov s stališča maščobnokislinske (MK) sestave, vsebnosti primarnih in sekundarnih produktov oksidacije in vsebnosti prostih MK. V magistrski nalogi želimo poiskati olje z najboljšim razmerjem med omega 3 : omega 6 MK in poiskati stopnjo povezave med antioksidativnim potencialom (AOP) in nenasičenimi MK. Poleg tega želimo prikazati povezavo med temperaturo stiskanja in AOP.

1.2 DELOVNE HIPOTEZE

- Temperatura stiskanja olja vpliva na parametre kakovosti olja (peroksidno število (PŠ), *p*-anizidinsko število (*p*-AN), vsebnost prostih MK).
- V orehovem olju je razmerje med omega 3 in omega 6 MK ustrezno.
- Vsebnost nenasičenih MK v olju je v povezavi z AOP.
- Temperatura stiskanja vpliva na AOP.

2 PREGLED OBJAV

2.1 MAŠČOBE V PREHRANI

Prehranske maščobe so pomemben vir energije (1 g maščob da 39 kJ energije), predvsem pri večjih energijskih potrebah, npr. pri ljudeh, ki opravljajo težka fizična dela. Energijska vrednost maščob je skoraj dvakrat večja v primerjavi z ogljikovimi hidrati in beljakovinami (Referenčne vrednosti za vnos hranil, 2004).

Maščobe so v prehrani ljudi nujne kot vir določenih esencialnih MK in za povečanje energijske gostote obroka. Z njimi zagotavljamo od 15 % do 30 % dnevnih potreb po energiji. Iz dnevne prehrane, ki vsebuje izredno malo maščob, se iz črevesja v kri in limfo ne morejo absorbirati v maščobah topni vitamini (A, D, E in K). Prehrana z malo maščobami (pod 20 %) je s senzoričnega stališča slabša in zelo neokusna (Pokorn, 2005).

Preglednica 1: Pomembne maščobne kisline v živilih ter njihov fiziološki učinek in vloga (Salobir, 2001).

Vsakdanje ime	Kratka oznaka	Učinek, vloga
NASIČENE KISLINE		
lavrinska	12:0	↑ ravan holesterola v krvi (aterogena)
miristinska	14:0	najbolj aterogena
palmitinska	16:0	aterogena
stearinska	18:0	pospešuje strjevanje krvi (trombogena)
ENKRAT NENASIČENE		
palmitooleinska	16:1	↓ ravan holesterola, manj podvržena peroksidaciji
oleinska	18:1	↓ ravan holesterola, manj podvržena peroksidaciji
VEČRAT NENASIČENE		
linolna	18:2, omega 3	esencialna MK, predstopnja arahidonske
α-linolenska	18:3, omega 3	esencialna MK, predstopnja EPA in DHA
γ-linolenska	18:3, omega 6	funkcionalna pri multipli sklerozi
dihomo γ-linolenska	20:3, omega 6	predstopnja tkivnih hormonov omega 6 vrste
arahidonska	20:4, omega 6	predstopnja tkivnih hormonov omega 6 vrste
EPA	20:5, omega 3	predstopnja tkivnih hormonov omega 3 vrste
DHA	22:6, omega 3	gradnik možganov, živčevja, očesne mrežnice, pomembna za razvoj možganov, mrežnice

Maščobe so velika skupina strukturno različnih spojin. Triacilgliceroli, to so estri glicerola in MK, so spojine, ki jih uvrščamo med maščobe in so prevladujoče sestavine olj in masti. MK so lahko nasičene, MUFA in PUFA (Referenčne vrednosti za vnos hranil, 2004). Prehranske maščobe, ki obstajajo v naravi, so skoraj izključno sestavljene iz mešanih triacilglicerolov. Zdravi ljudje jih absorbirajo povprečno 98 %.

Zaradi razmeroma nizkih potreb po energiji v današnjem času človek pri uživanju hrane z večjim deležem maščob hitro preseže energijsko bilanco. Strokovnjaki menijo, da je prevelika vsebnost maščob v dnevni prehrani sodobnega človeka tudi kriva, da je debelost tako razširjena. V razvitih državah dajejo maščobe do 45 % energije od celokupnih dnevnih potreb po energiji. V vseh tistih populacijah ljudi, ki v dnevni prehrani zaužijejo več kot 35 % maščob glede na dnevno zaužito energijo, je dokazana znatno večja umrljivost zaradi koronarnih bolezni kot pa v tistih populacijah, ki zaužijejo manj kot 30 % maščob (Pokorn, 2005).

Prehrana, ki vsebuje veliko maščob, bogatih z nasičenimi MK in veliko holesterola, zvišuje raven holesterola in beta-lipoproteine v krvi, kar povečuje pogostost ateroskleroznih obolenj. Raven holesterola zvišujejo, poleg živalskih maščob, tudi nekatere rastlinske maščobe: kokosova mast, kakavovo maslo, olje palmovih koščic in hidrogenirana rastlinska olja. Rastlinska olja, ki so bogata z nenasičenimi MK, npr. koruzno olje, sončnično olje, sojino olje, laneno olje in oljčno olje, znižujejo raven holesterola v krvi (Pokorn, 2005).

Nasičene MK večinoma vnašamo s hrano, vendar se lahko tvorijo tudi v telesu z lipogenezo iz glukoze. MUFA in PUFA se prav tako vnašajo s hrano, lahko pa se tudi sintetizirajo iz nasičenih MK. Izjema so nekatere PUFA s *cis* konfiguracijo in točno določenimi mesti dvojnih vezi. Te so esencialne, kar pomeni, da jih človek ne more sam sintetizirati, vendar so za obstoj organizma neobhodno potrebne (Referenčne vrednosti za vnos hranil, 2004).

Čeprav so maščobe za življenje in zdravje človeka pomembna in nepogrešljiva hranila, se o maščobah, vsaj v javnosti, največ govori in razmišlja kot o zdravju škodljivih sestavinah

hrane (Salobir, 2001). Splošno priporočilo je, da naj se uživanje maščob zmanjša in upošteva epidemiološke in klinične ugotovitve o tesni povezavi med prevelikim uživanjem maščob, zlasti nasičenih maščob, in dislipoproteinemijo ter boleznimi srca in ožilja, rakom na debelem črevesu in prekomerno telesno težo (Referenčne vrednosti za vnos hranil, 2004).

Preglednica 2: Orientacijske vrednosti maščob v prehrani odraslih ljudi (Salobir, 2001).

Parametri priporočil	Meje zaupanja
Skupne maščobe (% skupne energije)	25 – 30
Nasičene maščobe (% skupne energije)	< 10
Večkrat nenasičene maščobe (% skupne energije)	7 – 10
-Večkrat nenasičene omega 6	5,8
-Večkrat nenasičene omega 3	1,2
-Razmerje omega 6 : omega 3	vsaj 5:1, boljše ožje
EPA + DHA	250 mg/dan
Enkrat nenasičene maščobe (% skupne energije)	18 – 23
<i>Trans</i> MK (% skupne energije)	< 1
Holesterol (mg/dan)	< 300

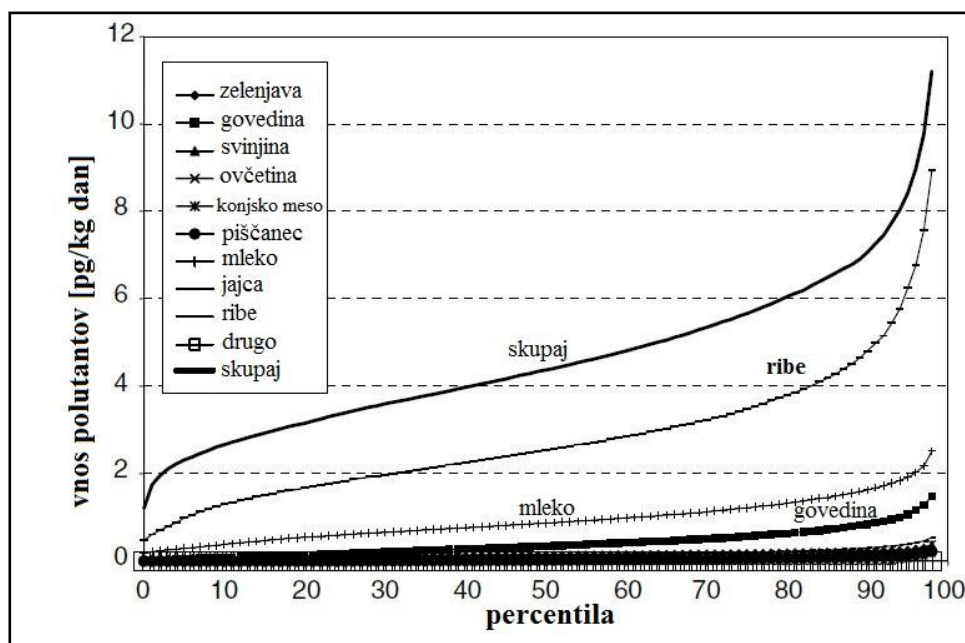
2.2 OMEGA 3 MAŠČOBNE KISLINE

Z ustreznim dnevnim vnosom dolgoveržnih večkrat nenasičenih omega 3 MK (LC omega 3 PUFA) povezujejo kar nekaj zdravstvenih koristi, kot so: primarna in sekundarna preventiva bolezni srca in ožilja, zmanjšani vnetni procesi, zmanjšani simptomi depresije, pomoč pri artritisu ter izboljšano zdravje in inteligenca dojenčkov, katerih matere so imele povečan vnos omega 3 MK med nosečnostjo (Innis in Friesen, 2008). LC omega 3 PUFA naj bi tudi preprečevale maligna obolenja (Antonijevic in sod., 2007).

V času mladosti naših staršev so piščanci veljali za dober vir omega 3 MK, vendar danes temu ni več tako. Zaradi intenzivne vzreje in ciljane selekcije današnji piščanci ne morejo v takšnih količinah sintetizirati omega 3 MK. Razlog tiči predvsem v današnji krmi, ki ne vsebuje takšne MK sestave, kot jo je včasih. Če je v 70. letih prejšnjega stoletja 100 g porcija vsebovala 170 mg omega 3 MK, je ta vrednost danes padla na le 25 mg. Pri

ekološki vzreji piščancev je situacija malenkost boljša, saj 100 g porcija vsebuje približno 65 mg omega 3 MK. Po jajcih obogatenih z omega 3 MK pa se naj ne bi posegalo, saj vsebujejo velike količine holesterola (Wang in sod., 2010).

Ribe in vsa morska hrana so za človeka posebej pomembna zaradi velike količine omega 3 MK, ki jih dobimo z uživanjem le teh. Vendar je človek ta pomemben vir onesnažil z organskimi onesnaževalci, kot so dioksin, poliklorirani bifenil, polikloriran dibenzofuran, polikloriran dibenzo-p-dioksin itd. Te ksenobiotike povezujejo z rakotvornostjo, motnjo razmnoževanja itd. Za dioksin in dioksinu podobne molekule je WHO postavila toleriran dnevni vnos, ki znaša 1 pg/kg telesne teže (TT). To mejo presežemo že, če ribe uživamo dvakrat na teden. Torej tolikokrat, kot naj bi jih uživali predvsem nosečnice, doječe ženske in otroci. Slika 1 prikazuje, da kar 80 % populacije preseže mejo 1 pg/kg TT/dan za več kot 4-krat, če želi dobiti 0,3 % energije iz PUFA omega 3 MK in za vir omega 3 MK izbere ribe. Mleko, govedina in predvsem ribe so naš največji vir industrijskih polutantov v prehrani in iz tega stališča ne morejo biti zdrav vir omega 3 MK (Cannon, 2009).



Slika 1: Vsebnost polutantov v prehrani, ki zagotavlja vir dolgoverzičnih omega 3 maščobnih kislin v vrednosti 0,3 % energijskih potreb (Antonijević in sod., 2007).

Dober vir omega 3 MK predstavljajo lanena semena, ki imajo razmerje omega 3 : omega 6 MK 2 : 1 (Morais in sod., 2011). Dobro razmerje med omega 3 in omega 6 MK imajo tudi orehi (*Juglans regia*) (Antonijevic in sod., 2007).

2.2.1 Orehi kot vir omega 3 maščobnih kislin

Oreh vsebuje najvišje koncentracije omega 3 MK med vsemi oreščki. Veliko večino oreščkov, ne samo oreh, štejemo kot zdrav vir maščob, predvsem nenasičenih MK. Oreščki vsebujejo tudi v maščobi topne vitamine (A, D, E in K) in so bogat vir prehranske vlaknine, fitonutrientov in drugih mikrohranil. Zaradi maščob in velike energijske (kalorične) vrednosti oreščke ob rednem in stalnem uživanju povezujejo z debelostjo in pridobivanjem telesne teže. Drži ravno obratno – oreščki, ki so bili dodani k prehrani, kljub zgoraj naštetim lastnostim, ne vplivajo na povišanje telesne teže. Prehranjevanje z oreščki je celo pokazalo na statistično značilno znižanje indeksa telesne mase. Oreščki naj bi varovali našo DNA pred poškodbami, zavirali naj bi rast rakavih celic, preprečevali vnetne procese, zmanjševali holesterol in tveganje za nastanek anevrizme aorte, zmanjševali tveganje za bolezni srca in veliko drugih bolezni (Hollis in Mattes, 2007; Kent in sod., 2010; Casas-Agustench in sod., 2011).

2.3 OBSTOJNOST OREHOVEGA OLJA

V zadnjih letih se na tržišču pojavlja vedno več t. i. zdravju koristnih olj, med katera spada tudi orehovo olje. Obstojnost je pri takih oljih večkrat kar na slepo določena. Preglednica 3 nam podaja primerjavo med obstojnostjo olja, ki jo proizvajalec odtisne na embalažo (če imamo olje shranjeno pri 20 °C v temnem prostoru), in obstojnostjo, ki so jo določili s pomočjo metode Rancimat (Kochhar in Henry, 2009).

Preglednica 3: Obstojnost različnih vrst olj (Kochhar in Henry, 2009).

vrsta olja	obstojnost, odtisnjena na embalaži [mesec]	obstojnost – ekstrapolacija Rancimat [mesec]
mandljevo olje	14	3,1
avokadovo olje	13	7,0
lešnikovo olje	5	7,5
makadamijevo olje	5	15,4
olje grozdnih pešk	6	3,2
olje riževih otrobov	7	6,5
praženo sezamovo olje	15	6,0
orehovo olje	12	0,6

Najboljši rezultat pri raziskavi, kjer so določili obstojnost na osnovi ekstrapolacije pri Rancimat metodi, je doseglo olje, ki je bilo pridobljeno iz oreščkov makadamije. Le ta je znašala nekaj več kot 15 mesecev, kar je preseglo obstojnost odtisnjeno na embalaži za več kot 10 mesecev. Olje makadamije vsebuje približno 22 % palmitooleinske MK (C16:1), ki je bolj odporna na oksidacijo kot PUFA, količina slednje je v olju makadamije zelo nizka – le 2,5 % (Preglednica 4). Daljšo obstojnost, ali vsaj podobno od navedene, sta dosegla še lešnikovo olje in olje riževih otrobov. Večina olj, ki spadajo v skupino PUFA olj (olje grozdnih pešk, praženo sezamovo olje in orehovo olje), je doseglo krajšo obstojnost od navedene.

Glede na rezultat, ki so ga pridobili z Rancimat metodo, je najmanj stabilno orehovo olje. Obstojnost, kot so jo določili z Rancimat metodo, znaša le 0,6 meseca, kar je približno 20 dni in je od 15- do 20-krat krajša od tiste, ki je navedena na embalaži. Orehovo olje ima enako vsebnost nasičenih, MUFA in PUFA kot olje grozdnih pešk. Kljub temu ima olje grozdnih pešk obstojnost ocenjeno na 3,2 meseca, torej 2,6 meseca več kot orehovo olje.

Razlika je posledica tega, da ima orehovo olje velik delež α – linolenske kisline (18:3), med 11 % – 16 % (Savage in sod., 1999), med tem ko imajo ostala PUFA olja (olje grozdnih pešk, olje riževih otrobov in praženo sezamovo olje) α – linolenske kisline manj kot 1,5 %. Prav zaradi slabe stabilnosti orehovega olja je tega najboljše porabiti čim prej po odprtju (Kochhar in Henry, 2009).

Preglednica 4: Vsebnost nasičenih, enkrat nenasičenih in večkrat nenasičenih maščobnih kislin v oljih (Kochhar in Henry, 2009).

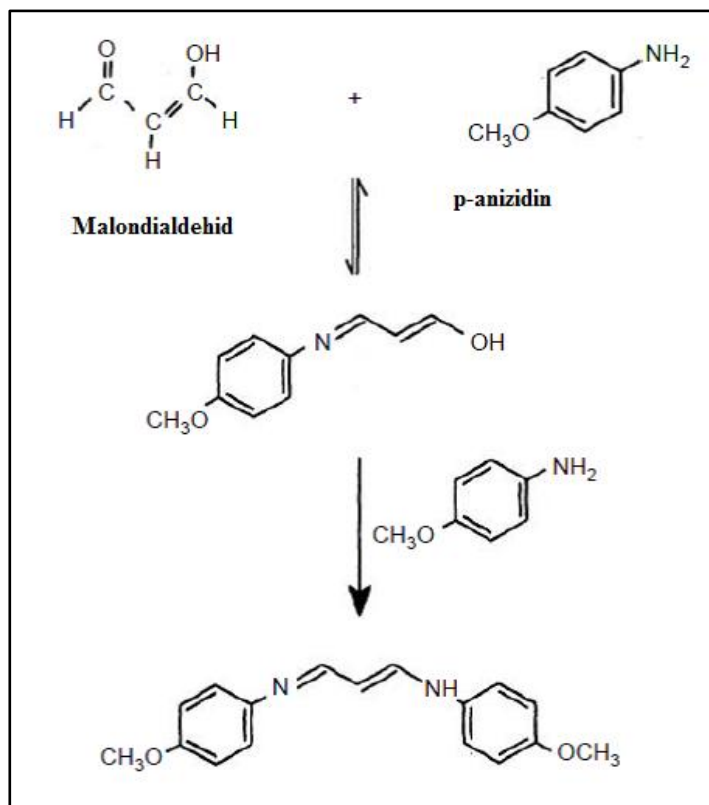
vrsta olja	nasičene MK [%]	MUFA [%]	PUFA [%]
mandljevo olje	7	72	21
avokadovo olje	14	76	10
lešnikovo olje	9	79	12
makadamijevo olje	18,5	79	2,5
olje grozdnih pešk	9	15	76
olje riževih otrobov	24	43	33
praženo sezamovo olje	15	42	43
orehovo olje	9	15	76

Vsa jedilna olja, ki jih kupimo v trgovini, so označena z rokom uporabnosti. Olje, ki ima daljši rok uporabe, je bolj oksidativno stabilno, kar pomeni, da bo avtooksidacija potekala počasneje (Kochhar in Henry, 2009). Oksidativna stabilnost je poleg sestave MK odvisna tudi od vsebnosti prooksidantov in antioksidantov v olju. Olja, ki vsebujejo večjo količino PUFA, bodo veliko bolj dovzetna za oksidacijo, saj se npr. linolna kislina (C 18:2), oksidira kar 12-krat hitreje kot oleinska (C 18:1), alfa linolenska kislina (C 18:3) pa kar 25-krat hitreje.

Oksidacija lipidov poteka v treh stopnjah. Začetno stopnjo ali iniciacijo spodbujajo visoke temperature, svetloba v vidnem in UV spektru, kovinski ioni in prosti radikali. V začetni stopnji nastane prosti radikal (alkilni radikal) tako, da se vodikov atom odcepi iz nenasičene maščobne kisline. Alkilni radikal v drugi fazi oksidacije (propagaciji) hitro reagira s kisikom (triplet kisikom) in iz njega nastane alkilperoksilni radikal. Slednji radikal, ki je eden izmed ključnih intermediatov oksidativnih procesov, hitro odcepi vodik iz maščobne kisline, pri čemer nastane hidroperoksid (primarni produkt oksidacije) in nov

alkilni radikal. Reakcija oksidacije tako poteka verižno. Konča se le, če med sabo reagirata dva radikala, ki bi tvorila bolj stabilno oziroma nereaktivno obliko. Tej fazi rečemo terminacija. Iz primarnih produktov oksidacije nastanejo sekundarni produkti oksidacije, kot so npr. aldehidi, alkoholi, ketoni, karboksilne kisline, laktoni, estri in ogljikovodiki (Abramovič, 2011).

Za določitev primarnih produktov oksidacije v olju tj. hidroperoksidov obstajajo različne metode. Lahko jih določimo spektrofotometrično v infrardečem območju z vrhom pri frekvenci 3500 cm^{-1} , s pomočjo kromatografije ali z jodometrično titracijo, kjer rezultat podamo kot PŠ (Shahidi in Wanasundara, 2008). Sekundarne produkte oksidacije (karbonilne spojine) lahko, poleg postopka z določitvijo *p*-AV, določamo tudi z drugimi postopki, kot npr. spektrofotometrično v infra rdečem območju, s plinsko kromatografijo ali s TBA testom (Shahidi in Wanasundara, 2008). Pri postopku določitve *p*-AV reagirajo aldehidi v kislem okolju z reagentom *p*-anizidin-om, kar se pokaže s tvorbo rumene barve (Shahidi in Wanasundara, 2008).

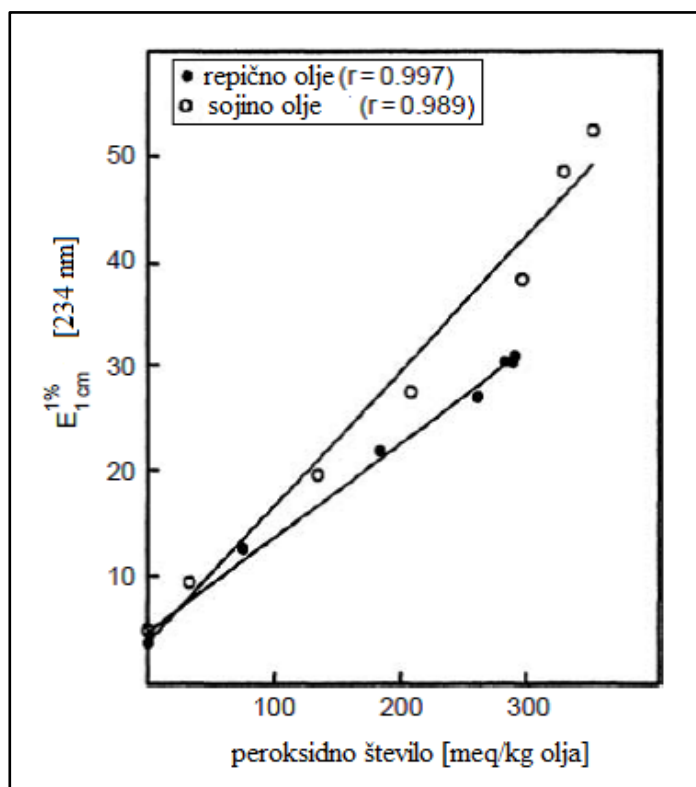


Slika 2: Reakcija med alhidom in p – anizidinom (Shahidi in Wanasundara, 2008).

Oksidirano PUFA lahko zaznamo s povečano absorbanco v ultravijoličnem območju, kjer se tvorijo dieni in polieni. Konjugirani dieni imajo absorpcijski vrh med 230 nm in 240 nm in jih običajno določamo pri 232 nm ali 234 nm. Konjugirani trieni pa imajo svoj vrh v območju med 255 nm in 280 nm in jih običajno določamo pri 268 nm. Pri merjenju moramo biti pozorni na to, da imajo v absorpcijskem območju dienov svoj absorpcijski vrh (234 nm – 236 nm) tudi karotenoidi, ki so pogosto prisotni v različnih koncentracijah v nekaterih oljih.

Konjugirani dieni so znak primarne oksidacije olja. Konjugiran dien ima dve dvojni vezi, ki sta med seboj ločeni z eno enojno vezjo ($-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}-$), za razliko od diena, ki ima dve dvojni vezi ločeni z dvema enojnima vezema oz. metilensko skupino ($-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-$) (Boyer, 2005). Konjugirani trieni spadajo med sekundarne produkte oksidacije in imajo tri dvojne vezi, ki so med seboj ločene z enojno vezjo (Wanasundara in Shahidi, 2008; Filip, 2010).

Metoda za določanje konjugiranih dienov je hitrejša, preprostejša od metode za določanje PŠ, pri kateri potrebujemo tudi večjo količino vzorca. Zato večkrat služi kot nadomestna metoda za določitev PŠ (Shahidi in Wanasundara, 2008). Ugotovili so, da obstaja dobra linearna povezava med PŠ in konjugiranimi dieni, kot prikazuje Slika 3.



Slika 3: Linearna povezava med peroksidnim številom in konjugiranimi dieni v repičnem in sojinem olju (Shahidi in Wanasundara, 2008).

2.4 ANTIOKSIDATIVNI POTENCIAL

Antioksidanti so snovi, ki nevtralizirajo škodljive učinke prostih radikalov na celične strukture tako, da prostim radikalom oddajo manjkajoči elektron in jih s tem naredijo manj reaktivne (Evans in Halliwell, 2001). Antioksidante delimo na primarne in sekundarne. Primarni antioksidanti spreminjajo proste radikale v bolj stabilno obliko in na tak način prekinjajo oksidacijo. Takšni antioksidanti so npr. fenolne spojine in tokoferoli (vitamin E). Sekundarne antioksidante imenujemo tudi sinergisti, ker zmanjšujejo učinek prooksidantov in povečajo sposobnost primarnih antioksidantov. Učinek prooksidantov zmanjšujejo tako, da npr. vežejo kovinske ione v komplekse, absorbirajo UV svetlobo, deaktivirajo singletni kisik ali ga ujamejo (lovilci prostega kisika). Lovilci prostega kisika so npr. askorbinska kislina, beta karoteni ... (Abramovič, 2011).

AOP olja nam pove v kolikšni meri so antioksidanti v olju sposobni onеспособiti proste radikale. AOP lahko določimo na dva načina. Pri prvem načinu spremljamo učinek

dodanega antioksidanta na napredovanje oksidacije, v drugem načinu pa v modelnem sistemu merimo, kako je antioksidant sposoben uloviti oz. onеспособiti prosti radikal, ki ga dodamo med meritvami. Ta prosti radikal je lahko:

- 1,1'-difenil-2-pikrilhidrazil, poznan kot DPPH[•],
- kationski radikal 2,2'-azinobis-(3-etil-benzotiazolin-6-sulfonske kisline), poznan kot ABTS^{•+},
- superoksidni anionski radikal (O₂^{•-}) ...

V magistrski nalogi smo AOP določali z radikalom DPPH[•]. Antioksidanti, ki so prisotni v olju ob stiku z DPPH[•] radikalom oddajo vodikov atom, ki se veže na DPPH[•], pri čemer nastane nereaktivna oblika 1,1'-difenil-2-pikrilhidrazin (DPPH-H). Pri tem se radikal spremenijo barva iz vijolične v rumeno, kar lahko izmerimo kot znižanje absorbance pri 517 nm (Abramovič, 2011).

Oreški na splošno, še posebej oreh, imajo veliko antioksidantov (vitamin E) in s tem velik AOP glede na preostalo sadje. Orehi imajo AOP, ki so ga izrazili kot kapaciteto absorbance kisikovega radikala (ORAC), 13541 µmol/100 g. Večji AOP med oreški imajo le ameriški orehi znani tudi kot pekan orehi, ki imajo ORAC vrednost 17940 µmol/100 g, kar je 10-krat toliko, kot jo ima mandarina (1627 µmol/100 g). Seveda obstajajo tudi boljši viri antioksidantov od oreščkov, kot npr. začimbe, ki imajo tudi do 20-krat več antioksidantov kot pekan oreh (USDA, 2010; Bizjak, 2012).

2.5 OPTIMIZACIJA STISKANJA OREHOVEGA OLJA

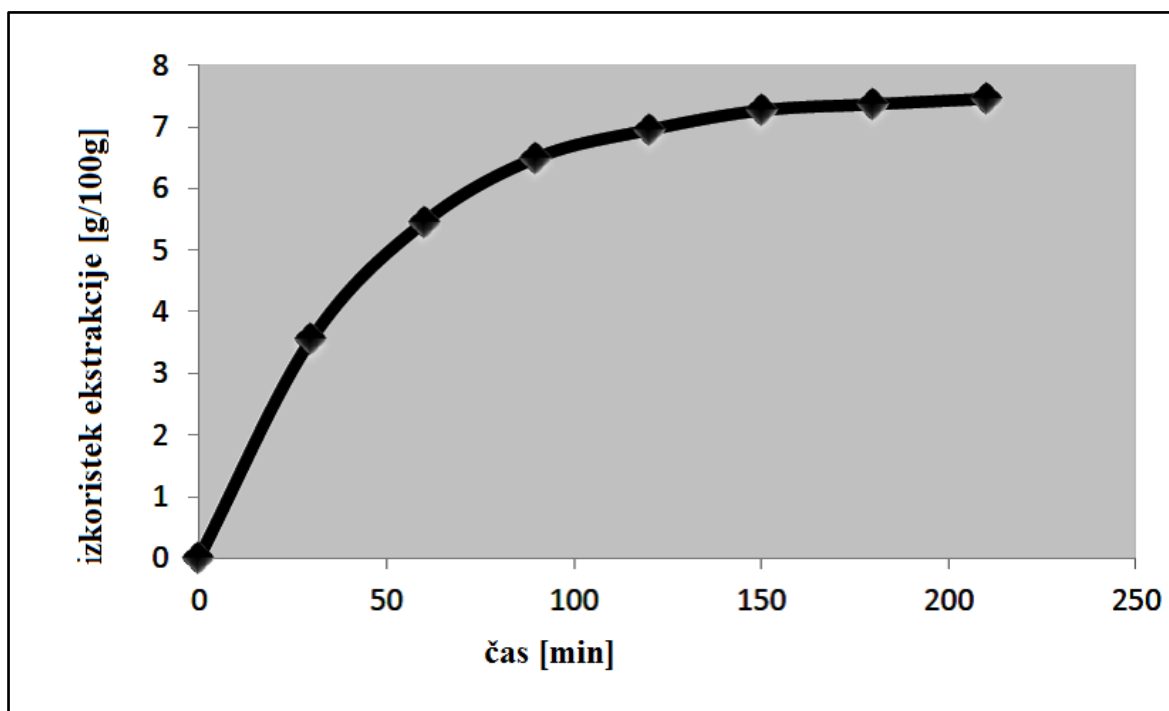
Količina in kvaliteta orehovega olja, ki ga je mogoče pridobiti iz jedrc, sta ključnega pomena za začetek komercialne proizvodnje stiskanja. V proizvodnji, predvsem rafiniranih olj, se uporablja proces ekstrakcije s topili, saj s topili dosežemo velik izkoristek stiskanja. Tehnika ekstrakcije s topili ni primerna za olja višje kakovosti, saj je potrebno olje zaradi ostankov topila očistiti, pri čemer lahko izgubimo biološko pomembne molekule, kot so fenoli, tokoferoli in esencialne MK. Olje, ki ga pridobimo samo s stiskanjem, ohrani veliko prehransko pomembnih hranil. Izkoristek stiskanja lahko izboljšamo s spreminjanjem nekaterih parametrov kot so: temperatura, frekvenca in širina šob na stiskalnici. Ugotovili

so, da so optimalni pogoji stiskanja pri temperaturi stiskalnice 70 °C, pri frekvenci 20 Hz in premerom šob 8 mm. Pri takšnih pogojih iz 0,5 kg orehov dobimo 288,9 mL olja, s temperaturo 42,7 °C (Cojocar u in sod., 2009). Okoli 8 % olja ostane v preostanku po stiskanju, ti. pogači. Olje pod takimi pogoji stiskanja dosega naslednje fizikalno-kemijske lastnosti, ki so bile izmerjene takoj po stiskanju, kot prikazuje Preglednica 5 (Jokić in sod., 2014).

Preglednica 5: Fizikalno-kemijske lastnosti svežega orehovega olja (Jokić in sod., 2014).

Lastnosti	vrednost
jodno število [g I ₂ /100 g olja]	161,79
število umiljenja [mg KOH/g olja]	193,00
PŠ [mmol O ₂ /kg olja]	0,46
proste MK [%]	0,23
netopne snovi [%]	0,34
vsebnost vode [%]	0,11
<i>p</i> -AV	0,08
Totox vrednost	1,02

Ostanek olja, ki ostane v pogači po stiskanju, lahko pridobimo s superkritično ekstrakcijo s CO₂. Superkritična ekstrakcija lahko nadomesti postopke stiskanja s pomočjo organskih topil. Po ekstrakciji s CO₂ v olju ne ostane nobenih sledi topil poleg tega pa vsebuje olje pridobljeno s CO₂ ekstrakcijo več aromatičnih komponent (Salgin in Salgin, 2006). V orehovi pogači, ki je vsebovala 7,81 % prostega olja, so s superkritično CO₂ ekstrakcijo v 200 min uspeli pridobiti skoraj celotno količino olja, kar prikazuje Slika 4 (Jokić in sod., 2014).



Slika 4: Odvisnost izkoristka pri pridobivanju olja iz orehove pogače s CO₂ ekstrakcijo od časa (Jokić in sod., 2014).

Koncentracija tokoferolov je bila v obeh primerih stiskanja olja podobna. V olju pridobljenem iz pogače je koncentracija tokoferolov znašala 498,05 mg/L (γ tokoferol 309,32 mg/L in α tokoferol 188,73 mg/L), v olju pridobljenem iz jedrc pa malo manj 463,71 mg/L (γ tokoferol 322,83 mg/L in α tokoferol 140,88 mg/L). Preostalih dveh izomer (β - in δ -tokoferola) v orehovem olju niso zaznali (Jokić in sod., 2014).

3 MATERIAL IN METODE

Material, na katerem smo opravili raziskavo, je bilo olje pridobljeno iz različnih sort orehov (*Juglans regia*). Imeli smo 12 različnih vzorcev orehovega olja, ki smo jih dobili od istega proizvajalca v temnih 100 mL stekleničkah. Vse vzorce smo dobili zmrznjene. Vzorce smo označili na sledeči način: Oreh 30, Oreh 40, Oreh 50, Adams, Fernor, Lara, Fernette, Franquet, Mulina 0, Mulina II, Mulina IV in Mešan oreh. Temperatura, pri kateri so se olja stiskala, naj bi bila povsod 30 °C, razen pri dveh vzorcih, kjer je to drugače navedeno. Vzorec olja Oreh 40 so stiskali pri 40 °C, olje Oreh 50 pa pri 50 °C.

Za večino vzorcev je znana sorta oreha, iz katerega je bilo olje pridobljeno. Za vzorce olja Oreh 30, Oreh 40, Oreh 50 ne vemo, kateri sorti oreha naj bi pripadali, oziroma, če gre za mešanico, kakšna je (iz katerih sort orehov in v kakšnem deležu). Prav tako ni znano iz katerih sort orehov je sestavljeno olje z oznako Mešan oreh.

Čas, ki je bil potreben za stiskanje olja, ni bil naveden. Ni podatkov o temperaturi, pri kateri so se sušili orehi in koliko orehov je bilo poškodovanih, obolelih. Zaradi omenjenih neznank, smo predpostavili, da so vsa olja imela enake pogoje stiskanja in da so prišla iz zdravih plodov, ki so bili pravilo sušeni.

3.1 MAŠČOBNOKISLINSKA SESTAVA

MK sestavo smo določili z metodo določanja MK kot metilnih estrov v oljih. Metoda temelji na plinski kromatografiji.

Postopek:

MK sestavo smo določili v vseh vzorcih svežega olja in v dveh vzorcih olja (olje iz sort Adams in Lara) po 20 dnevnem hranjenju pri 50 °C. Približno 20 mg olja smo odtehtali v vialo. Natehtanemu olju smo s pipeto dodali 100 µL internega standarda raztopine heptadekanojske kisline C:17 in si zabeležili maso. Heptadekanojsko MK pogosto uporabljamo kot interni standard, saj je v naravi le redko prisotna. Natehtani količini internega standarda (vrednosti se gibljejo okrog 70 mg) in olja v viali, smo dodali mešanico metanola, benzena, 2,2 dimetoksi propana in H₂SO₄, v razmerju 37 : 20 : 5 : 2, ter 1,8 mL heptana. Vialo smo nepredušno zaprli in jih segrevali na vodni kopeli 60 minut pri 80 °C. Po segrevanju smo vialo ohladili. V vialah se je zmes razplastila na 2 dela. Nas je zanimala samo zgornja, heptanska plast, v kateri so bili metilni estri MK orehovega olja in internega standarda. Iz heptanske plasti smo odpipetirali 1 mL raztopine, ki smo jo prenesli v novo manjšo vialo, le to smo namestili v ustrezen nosilec na aparaturi. Za vsak vzorec orehovega olja smo zgoraj opisani postopek priprave metilnih estrov izvedli v vsaj treh paralelkah. Kromatograf nam je podal površine posameznih MK. Vsebnost posamezne MK v vzorcu olja smo izračunali z naslednjo relacijo:

$$C = \frac{A_i * F_{ai} * m_{17} * 100}{a_{17} * F_{ai17} * m_{vz}} \quad (1)$$

$$F_{ai} = \frac{\text{molska masa MK}}{\text{molska masa metilnega estra}} \quad (2)$$

C = koncentracija posamezne MK [g/100g vzorca]

A_i = površina posamezne MK

F_{ai} = koeficient posamezne MK

m₁₇ = masa internega standarda [mg]

A₁₇ = površina internega standarda

F_{ai17} = koeficient internega standarda = 0,95068194

m_{vz} = masa vzorca [mg]

Preglednica 6: Molske mase maščobnih kislin in metilnega estra.

MK	Splošno ime	M _{MK} [g/ mol]	M _{metilnega estra} [g/ mol]	F _{ai}
C 16: 0	palmitinska kislina	256,42	284,48	0,90136
C 16: 1	palmitoleinska kislina	254	268,43	0,94624
C 18: 0	stearinska kislina	284,48	312,53	0,91025
C 18: 1	oleinska kislina	282,46	310,51	0,90966
C 18: 2	linolna kislina	280,45	308,5	0,90908
C 18: 3	alfa linolenska kislina	278,43	306,48	0,90848
C 20: 0	arašidna kislina	312,53	326,56	0,95704
C 20: 1	gadoleinska kislina	310,51	324,54	0,95677
C 17 : 0		270,45	284,48	0,95068

Pribor, aparature in reagenti:

- Analizo smo izvedli na plinskem kromatografu Agilent Technologies 6890N pri naslednjih nastavitvah:
kolona: SUPELCO - SPB PUFA; 30 m X 0,25 mm X 0,2 µm,
detektor: FID,
temperatura kolone: 210 °C,
temperatura detektorja: 260 °C,
temperatura injektorja: 250 °C,
pritisk v injektorju: 31,6 psi,
volumen injeciranja: 1,0 µL,
nosilni plini: He (pretočnost 1 mL/min), N₂ (pretočnost 45 mL/min), H₂ (pretočnost 40 mL/min),
- avtomatske pipete proizvajalca Eppendorf (Nemčija),
- plinski kromatograf,
- steklene vialne s pokrovčkom na navoj,
- steklene vialne za plinski kromatograf,
- tehnica,
- vodna kopel,
- metanol,
- heptan,
- benzen,

- 2,2 dimetoksipropan in
- žveplova(VI)kislina (H_2SO_4) (98 %).

3.2 PROSTE MAŠOBNE KISLINE

Proste MK v vzorcih lahko izrazimo na več načinov. Vse podatke pridobimo po enakem postopku, razlikujejo se v končnem izračunu. Prvi način je kislinsko število, ki je definirano kot število mg kalijevega hidroksida, ki je potrebno za nevtralizacijo prostih MK v enem gramu olja. Drugi način je kislinska stopnja, ki pomeni število mL raztopine kalijevega hidroksida, ki je potreben za nevtralizacijo prostih MK v 100 g preiskovanega olja. Tretji način, s katerim izrazimo proste MK, je odstotek oleinske kisline, le ta se zadnje čase največkrat uporablja, zato smo se za tak način podajanja rezultatov odločili tudi mi. Metoda določanja prostih MK je povzeta po ISO metodi (ISO 660).

Postopek:

V 200 mL erlenmajerico smo natehtali med 2,5 g in 3,5 g olja. Olju smo dolili 30 mL zmesi etiletra in 96 % etanola (1:1), nato smo dodali nekaj kapljic indikatorja fenolftaleina. Dobro smo premešali in titrirali z 0,1 M raztopino kalijevega hidroksida (KOH) do barvnega preskoka. Pozorni smo bili, da je bila količina zmesi etiletra in etanola zmeraj večja vsaj za 20 % od količine porabljenega titranta. Proste MK (kot odstotek oleinske kisline) smo izračunali z naslednjo relacijo:

$$\% \text{ oleinske kisline} = \frac{V * c_{\text{KOH}}}{10 * m} * 282 \quad (3)$$

V = poraba KOH [mL]

m = masa olja [g]

c_{KOH} = koncentracija KOH [mol / L]

282 = molska masa oleinske kisline [g / mol]

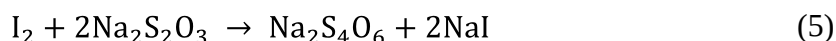
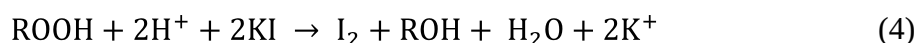
Pribor, aparature in reagenti:

- erlenmajerica 200 mL,
- tehtnica,

- bireta,
- 0,1 M raztopina KOH,
- zmes etiletra in 96 % etanola v razmerju 1:1 in
- fenolftalein.

3.3 PEROKSIDNO ŠTEVILO

Peroksidno število smo določili po Wheelerjevi metodi (AOAC Official Method 965.33. Peroxide value of oils and fats., 1999). Pri tem postopku jodidni ion reducira hidroperoksidno skupino. Količina nastalega joda je sorazmerna koncentraciji peroksida. Količino joda določimo s titracijo s standardno raztopino natrijevega tiosulfata, ob katerem uporabimo škrobavico kot indikator. Celotno reakcijo lahko zapišemo tako:



Postopek :

V 100 mL erlenmajerico smo stehtali 2,5 g vzorca olja. Nato smo dodali 30 mL zmesi ledocetne kisline in kloroforma v razmerju 3:2 (v:v). Vse smo dobro premešali, da se je olje raztopilo, in dodali 0,2 mL nasičene raztopine kalijevega jodida. Po dodatku raztopine kalijevega jodida smo erlenmajerico stresali eno minuto in dodali 20 mL destilirane vode in 0,5 mL 1 % raztopine škroba. Po dodani škrobavici smo takoj titrirali z 0,01 M raztopino natrijevega tiosulfata do končne točke. Vzoredno s tem poskusom opravimo še slepi poskus, v katerem ravnamo enako, le da v tem primeru ne uporabimo vzorca olja. PŠ smo izračunali z naslednjo relacijo:

$$\text{PŠ} = \frac{V_{\text{vz}} - V_{\text{sl}} * c * 10^3}{2 * m} \quad (6)$$

PŠ = peroksidno število $\frac{\text{mmol O}_2}{\text{kg olja}}$

Vvz = volumen raztopine 0,01 M Na₂S₂O₃ pri titraciji vzorca [mL]

Vsl = volumen raztopine 0,01 M Na₂S₂O₃ pri titraciji slepega vzorca [mL]

m = masa vzorca [g]

c = koncentracija Na₂S₂O₃

PŠ lahko izrazimo tudi v $\frac{\text{mekv}}{\text{kg olja}}$ s tem da rezultate v $\frac{\text{mmol O}_2}{\text{kg olja}}$ množimo z 2

Pribor, aparature in reagenti:

- 100 mL erlenmajerica,
- tehtnica,
- bireta,
- pipete,
- zmes ledocetne kisline in kloroforma v razmerju 3 : 2 (v:v),
- nasičena raztopina kalijevega jodida (KI),
- 0,01 M raztopina natrijevega tiosulfata (Na₂S₂O₃) in
- škrobovica.

3.4 *p*-ANIZIDINSKA VREDNOST

Za določitev *p*-AV smo modificirali po metodi vpisani v članku Direct olive oil anisidine value determination by flow injection (Labrinea in sod., 2001).

Postopek:

V 25 mL merilno bučko smo natehtali 2 g olja na 0,1 g natančno. Merilno bučko smo do oznake napolnili z n-heksanom. Vzorce smo prelili v kvarčne kivete dimenzije 1 cm. Nato smo izmerili absorbanco s spektrofotometrom, pri valovni dolžini 350 nm. Za slepi vzorec smo uporabili n-heksan. Nato smo iz iste raztopine n-heksana in olja odpipetirali 5 mL v 50 mL erlenmajerico in dodali 1 mL raztopine *p*-anizidina, vse smo dobro premešali. Po 10 min smo izmerili absorbanco pri isti valovni dolžini, v treh ponovitvah. Za slepi vzorec smo v tem primeru uporabili raztopino iz 5 mL n-heksana in 1 mL raztopine *p*-anizidina. Raztopino *p*-anizidina smo pripravili tako, da smo 0,25 g *p*-anizidina raztopili v 100 mL ledocetne kisline.

p-AV smo izračunali z naslednjo formulo:

$$p - AV = \frac{25 * (1,2 * As - Ab)}{m} \quad (7)$$

Ab = izmerjena absorbanca mešanice olja in n-heksana

As = izmerjena absorbanca mešanice olja, n-heksana in *p*-anizidina po desetih minutah

m = masa vzorca (g)

Pribor, aparature in reagenti:

- spektrofotometer,
- kvarčne kivete,
- pipete,
- merilna bučka,
- erlenmajerica,
- tehtnica,
- n-heksan,
- ledocetna kislina in
- *p*-anizidin.

3.5 SHEMA POSKUSA SKLADIŠČENJA OLJA

5 mL vsakega vzorca olja smo odmerili v steklene vialle in jih namestili v inkubator pri 50 °C. Olje smo skladiščili 20 dni. Vzorce olja smo odvzemali iz inkubatorja po 10, 15 in 20 dneh skladiščenja in spremljali, kako se med skladiščenjem olja spreminja vsebnost konjugiranih dienov in konjugiranih trienov, MK sestava olj ter vrednost AOP.

3.6 DOLOČANJE KONJUGIRANIH DIENOV IN TRIENOV

Določili smo konjugirane diene in triene v svežih oljih in oljih, ki smo jih skladiščili 20 dni pri 50 °C.

Postopek:

Približno 15 mg olja smo zatehtali v 2 mL epruveto in dodali 1,5 mL 2-propanola. Vse smo dobro premešali na vrtničniku. Razredčen vzorec (10-krat) smo spet prenesli v kvarčne kivete dimenzije 1 cm in določili absorbanco. Absorbanco smo določili pri 232 nm za konjugirane diene in pri 258, 268 in 279 nm za konjugirane triene. Spektrofotometer smo umerili z 2-krat destilirano vodo. Za slepi vzorec smo vzeli 2-propanol.

Vzorci olja, ki smo jih skladiščili pri 50 °C, smo najprej ohladili na sobno temperaturo in postopali po enakem postopku kot je naveden za sveža olja, s to razliko, da smo pripravljen vzorec razredčili 20-krat.

Rezultate smo predstavili kot specifično ekstinkcijo pri merjenih valovnih dolžinah.

$$E_{1\text{ cm}}^{1\%} 232 = \frac{A_{232}}{\gamma * d} \quad (8)$$

$$E_{1\text{ cm}}^{1\%} 258 = \frac{A_{258}}{\gamma * d} \quad (9)$$

$$E_{1\text{ cm}}^{1\%} 268 = \frac{A_{268}}{\gamma * d} \quad (10)$$

$$E_{1\text{ cm}}^{1\%} 279 = \frac{A_{279}}{\gamma * d} \quad (11)$$

A = absorbanca pri merjeni valovni dolžini

γ = masna koncentracija olja v topilu 2-propanol [g / 100 mL]

d = dolžina kivete (1 cm)

Pribor, aparature in reagenti:

- tehnica,
- pipeta,
- epruveta,
- vrtnični mešalnik,
- kvarčna kiveta dimenzije 1 cm,
- spektrofotometer,

- 2- propanol in
- dvakrat destilirana H₂O.

3.7 DOLOČANJE ANTIOKSIDATIVNEGA POTENCIALA Z DPPH RADIKALOM

Postopali smo po modificirani metodi (Prevc in sod., 2013).

Postopek:

Približno 15 mg olja smo stekali v 2 mL centrifugirko in dodali 1,5 mL raztopine DPPH v 2-propanul. Nato smo vzorce dobro premešali na vrtničnem mešalniku in jih shranili v temnem prostoru. Po 20 min smo vzorcem določili absorbanco pri 517 nm na spektrofotometru, ki smo ga umerili z dvakrat destilirano vodo. Pri tej valovni dolžini ima DPPH svoj absorpcijski maksimum. Poleg teh vzorcev smo pripravili še slepi vzorec tako, da smo 15 mg olja v centrifugirkah dodali še 1,5 mL 2-propanola. Referenčni vzorec je bila raztopina DPPH v 2-propanolu. Tudi tem vzorcem smo določili absorbanco pri 517 nm. Absorbanco vseh vzorcev smo izmerili v polistirenskih kivetah (PS) za enkratno uporabo s premerom 0,4 cm. Raztopino DPPH pripravimo tako, da DPPH raztopimo v 2-propanolu in ima pripravljena raztopina absorbanco pri 517 nm nekoliko nad 1. DPPH se v 2-propanolu topi težje, zato smo si pomagali tako, da smo raztopino za 10 min dali v ultrazvočno kopel. DPPH raztopino smo vsak dan pripravili svežo in jo shranjevali v 100 mL bučki oviti v aluminijasto folijo.

AOP smo predstavili kot število mmol ulovljenega radikala DPPH na 1 L olja. Večja vrednost za množino ulovljenega radikala DPPH na 1 L olja pomeni večji AOP.

Pri izračunu smo uporabili naslednje relacije:

$$n_{\text{DPPH ulovljeni}} / \text{L olja} = \frac{n_{\text{DPPH ulovljeni}} * 10^3}{V_o * 10^{-6}} \quad (12)$$

$$n_{\text{DPPH ulovljeni}} = \frac{\Delta A * V_r}{\epsilon * L} \quad (13)$$

$$\Delta A = A_{\text{RF}} - A_{\text{vz}} + A_{\text{sl}} \quad (14)$$

$n_{\text{DPPH ulovljeni}} / L \text{ olja} = \text{množina ulovljenega radikala DPPH na 1 L olja [mmol/L]}$

$n_{\text{DPPH ulovljeni}} = \text{množina ulovljenega radikala DPPH [mol]}$

$V_o = \text{volumen olja [\mu L]}$

$V_r = \text{volumen olja + 2-propanola [L]}$

$\varepsilon = \text{molarni ekstinkcijski koeficient DPPH} = 12000 \text{ [L/(mol cm)]}$

$L = \text{dolžina kivete} = 0,4 \text{ cm}$

$A_{\text{RF}} = \text{absorbanca referenčnega vzorca pri 517 nm}$

$A_{\text{vz}} = \text{absorbanca vzorca pri 517 nm}$

$A_{\text{sl}} = \text{absorbanca slepega vzorca pri 517 nm}$

Pribor, aparature in reagenti:

- tehnica,
- pipeta,
- 2 mL ependorferjeva centrifugirka,
- vrtnični mešalnik,
- PS kiveta s premerom 0,4 cm,
- spektrofotometer,
- ultrazvočna kopel,
- 100 mL bučka,
- 2-propanol,
- DPPH in
- dvakrat destilirana H_2O .

3.8 STATISTIČNA OBDELAVA

Pri določitvi prostih MK, PŠ, AOP in meritvah konjugiranih dienov in trienov smo vse analize delali v dveh paralelkah. V treh paralelkah pa smo opravljali določitev MK sestave in *p*-AV.

Rezultate smo podali kot povprečne vrednosti posameznega parametra. Pri vsakem rezultatu smo podali tudi standardno deviacijo (SD), ki smo jo izračunali s sledečo formulo:

$$SD = \frac{\sqrt{\sum (x - M)^2}}{N} \quad (15)$$

M = aritmetična sredina

X = posamezne meritve

N = število meritev

Poleg SD smo podali tudi relativni standardni odmik (RSD) in sicer skupnega za vse vzorce pri določitvi posameznega parametra. Izračunali smo ga s sledečo formulo:

$$RSD = \frac{SD}{x_{pov}} * 100 \quad (16)$$

x_{pov} = povprečna vrednost meritev

S pomočjo linearne regresijske analize smo z metodo najmanjših kvadratov preverili, ali obstaja linearna zveza med nekaterimi parametri.

Pri vseh meritvah smo izvedli Duncenov test. Rezultate smo primerjali v dveh skupinah. Prva skupina je zajemala 3 vzorce stiskane pri različnih temperaturah (Oreh 30, Oreh 40 in Oreh 50). Te rezultate smo opremili z velikimi tiskanimi črkami (^{A,B,C}). Druga skupina so bili vsi preostali vzorci stiskani pri 30 °C. Te rezultate smo opremili z malimi tiskanimi črkami (^{a,b,c...}). Tisti rezultati, ki se med seboj statistično ne razlikujejo, imajo poleg vrednosti zapisane enake črke.

4 REZULTATI Z RAZPRAVO

4.1 MAŠČOBNOKISLINSKA SESTAVA

Večina maščob je v naši prehrani sestavljena iz 4 do 6 različnih MK. Orehovo olje je po svoji MK sestavi drugačno od večine rastlinskih olj. Največjo vsebnost MK predstavlja linolna MK (C18:2), ki jo uvrščamo med omega 6 MK. Te je približno 45 g/100 g olja; v nekaterih oljih se vrednost približa k 50 g/100 g olja (olje , olje Oreh 40 in olje Oreh 50). Linolni kislini sledi oleinska kislina (C18:1), katere vrednost se giblje med 21 g/100 g olja v olju Adams in 13 g/100 g v olju Lara. Na tretjem mestu je α -linolenska kislina (C18:3), s približno 10 g/100 g olja, ki jo uvrščamo med omega 3 MK. Preglednica 7 in

Preglednica 8 prikazujeta, da olja z več oleinske kisline vsebujejo manj α -linolenske. Tako npr. olje Adams, ki ima največ oleinske kisline, vsebuje najmanj α -linolenska. Povprečni RSD pri določitvi MK sestave je znašal 2,2 %.

Preglednica 7: Povprečne vrednosti vsebnosti maščobnih kislin od C16:0 do C 18:1 v vzorcih svežega orehovega olja.

vzorec:	Vsebnost MK [g/100 g olja]							
	C16:0	SD	C16:1	SD	C18:0	SD	C18:1	SD
Oreh 30	5,88 ^{Aa}	0,11	0,122 ^{Bc}	0,003	2,02 ^{Abc}	0,05	17,03 ^{Ac}	0,37
Oreh 40	5,71 ^A	0,06	0,118 ^B	0,003	2,03 ^A	0,04	15,12 ^B	0,17
Oreh 50	5,75 ^A	0,07	0,135 ^A	0,003	2,12 ^A	0,05	17,44 ^A	0,23
Adams	5,27 ^d	0,15	0,000 ^d	0,000	2,02 ^{bc}	0,05	21,10 ^a	0,57
Mešan oreh	5,62 ^{ab}	0,16	0,000 ^d	0,000	1,93 ^c	0,06	16,50 ^{cd}	0,42
Fernor	5,59 ^{abc}	0,16	0,127 ^{bc}	0,004	2,13 ^{ab}	0,06	16,47 ^{cd}	0,42
Lara	5,44 ^{bcd}	0,16	0,000 ^d	0,000	2,22 ^a	0,08	13,26 ^f	0,37
Fernette	5,43 ^{bcd}	0,17	0,000 ^d	0,000	2,18 ^a	0,11	15,87 ^{de}	0,55
Franquet	5,79 ^a	0,05	0,150 ^a	0,000	2,15 ^{ab}	0,02	18,24 ^b	0,13
Mulina 0	5,29 ^{cd}	0,18	0,131 ^b	0,007	2,01 ^{bc}	0,08	16,12 ^{cde}	0,57
Mulina II	5,22 ^d	0,12	0,000 ^d	0,000	1,79 ^d	0,02	15,33 ^e	0,32
Mulina IV	5,45 ^{bcd}	0,07	0,000 ^d	0,000	1,89 ^{cd}	0,03	16,16 ^{cde}	0,27
povprečje	5,54	0,22	0,065	0,069	2,04	0,13	16,55	1,90

Vrednosti z nadpisano malo črko (^{a,b,c,...}) znotraj istega stolpca se med seboj statistično značilno razlikujejo ($p \leq 0,05$; značilnost razlik med različnimi sortami olja), vrednosti z različno nadpisano veliko črko (^{A,B,C}) znotraj istega stolpca se med seboj statistično značilno razlikujejo ($p \leq 0,05$; značilnost razlik med različnimi temperaturami olja).

Preglednica 8: Povprečne vrednosti vsebnosti maščobnih kislin od C18:2 do C 20:1 v vzorcih svežega orehovega olja.

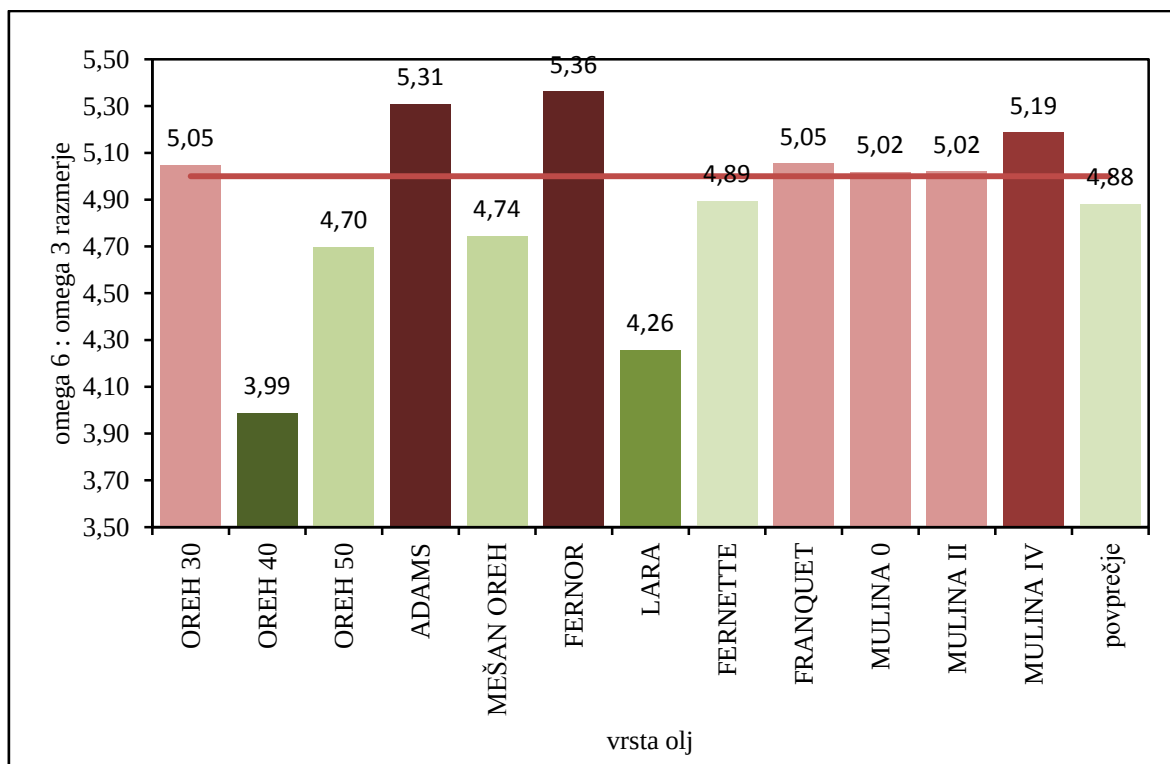
vzorec	Vsebnost MK [g/100 g olja]							
	C18:2	SD	C18:3	SD	C20:0	SD	C20:1	SD

Oreh 30	49,0 ^{Aa}	1,0	9,71 ^{Ab}	0,18	0,083 ^{Aab}	0,001	0,203 ^{Aa}	0,005
Oreh 40	49,0 ^A	0,5	12,28 ^B	0,19	0,083 ^A	0,001	0,195 ^A	0,004
Oreh 50	49,1 ^A	0,3	10,46 ^C	0,08	0,083 ^A	0,003	0,204 ^A	0,005
Adams	45,5 ^{bcd}	1,3	8,56 ^d	0,30	0,081 ^b	0,002	0,206 ^a	0,006
Mešan oreh	46,0 ^{bc}	1,3	9,70 ^b	0,26	0,079 ^{bc}	0,002	0,190 ^{bcd}	0,005
Fernor	46,1 ^{bc}	1,1	8,59 ^{cd}	0,19	0,078 ^{bcd}	0,002	0,187 ^{bcd}	0,004
Lara	47,5 ^{ab}	1,3	11,16 ^a	0,34	0,087 ^a	0,003	0,179 ^{de}	0,005
Fernette	44,7 ^{cd}	1,0	9,14 ^c	0,09	0,075 ^{cd}	0,004	0,172 ^e	0,008
Franquet	44,1 ^{cd}	0,2	8,73 ^{cd}	0,07	0,080 ^b	0,001	0,195 ^{ab}	0,002
Mulina 0	44,9 ^{cd}	1,4	8,95 ^{cd}	0,23	0,075 ^{cd}	0,003	0,190 ^{bcd}	0,007
Mulina II	43,2 ^d	1,2	8,60 ^{cd}	0,37	0,069 ^e	0,001	0,182 ^{cde}	0,003
Mulina IV	44,8 ^{cd}	0,9	8,63 ^{cd}	0,26	0,074 ^d	0,001	0,192 ^{bc}	0,003
povprečje	46,2	2,0	9,54	1,20	0,079	0,005	0,191	0,010

Vrednosti z različno nadpisano malo črko (^{a,b,c,...}) znotraj istega stolpca se med seboj statistično značilno razlikujejo ($p \leq 0,05$; značilnost razlik med različnimi sortami olja), vrednosti z različno nadpisano veliko črko (^{A,B,C}) znotraj istega stolpca se med seboj statistično značilno razlikujejo ($p \leq 0,05$; značilnost razlik med različnimi temperaturami olja).

Orehovo olje ima enega ustrežnejših razmerji med večkrat nenasičenimi omega 6 in večkrat nenasičenimi omega 3 MK (oreh vsebuje največ omega 3 MK med vsemi oreščki). To razmerje znaša približno 5 : 1. Takšno razmerje je takšno, kot ga v zadnjih časih priporočajo strokovnjaki (Referenčne vrednosti za vnos hranil, 2004). Najboljše razmerje dosega olje z oznako Oreh 40, ki ima razmerje pod 4 : 1. Zanimivo je, da razmerje pri olju Oreh 30 in olju Oreh 50 ni tako dobro. To lahko nakazuje na to, da v teh treh oljih niso bile uporabljene enake sorte orehov. Poleg olja Oreh 30 ima ustrezno razmerje še olje Lara, kot prikazuje Slika 5, kjer so podana razmerja omega 6 : omega 3 MK v vseh vzorcih naših olj. Boljše razmerje je prikazano s temnejšo zeleno barvo, slabše razmerje pa s temnejšo rdečo barvo. Najslabše razmerje so dosegli olje Adams (5,31 : 1), olje Fernor (5,36 : 1) in olje Mulina IV (5,19).

Med nasičenimi MK smo v svežem olju določili palmitinsko kislino (C16:0) in stearinsko kislino (C18: 0). Največ palmitinske kisline (5,88 g/100 g olja) smo določili olju Oreh 30, najmanj pa olju Mulina II (5,22 g/100 g olja), kateremu smo določili tudi najmanjšo vsebnost stearinske kisline (1,79 g/100 g olja). V sledovih smo v vseh vzorcih olj zaznali še arašidno kislino (C:20:0), ki je nasičena kislina in dve MUFA, gadoleinsko (C20:1) in palmitoleinsko kislino (C16:1).



Slika 5: Razmerje med večkrat nenasičenimi omega 6 in večkrat nenasičenimi omega 3 maščobnimi kislinami v vzorcih svežega orehovega olja.

Odločili smo se, da bomo preverili, kako skladiščenje olja pri 50 °C 20 dni v temi vpliva na MK sestavo. Izbrali smo olje z najmanjšo in največjo vsebnostjo α -linolenske kisline. Najmanj α -linolenske kisline smo določili v olju Adams (8,56 g/100g). Največjo vsebnost C18:3 smo določili v olju Oreh 40 (12,28 g/100g), vendar smo se odločili za olje Lara, z vsebnostjo C18:3 11,16 g/100g, ker za Olje 30, Olje 40 in Olje 50 ne vemo, iz katerih sort orehov so bila pridobljena oz. za kakšno mešanico orehov gre. Olje Adams ima poleg najmanjše vsebnosti C18:3 MK tudi enega najslabših AOP med vsemi olji, kar opisujemo v enem izmed poglavij (glej poglavje 4.7). Nasprotno kot olje Adams, ima olje Lara daleč najboljši AOP med vsemi analiziranimi orehovimi olji.

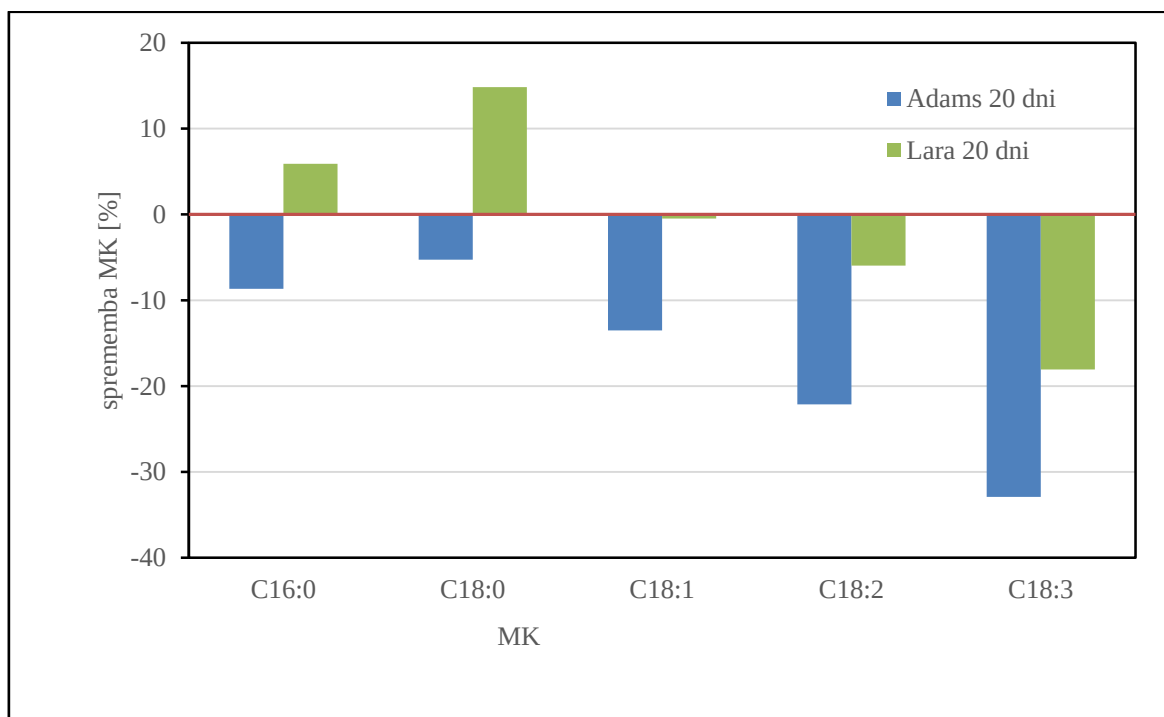
Preglednica 9: Primerjava maščobnokislinske sestave svežega orehovega olja Adams in Lara in olja, ki smo ga skladiščili 20 dni v temi pri 50 °C.

	Vsebnost MK [g/100g olja]									
	C16:0	SD	C18:0	SD	C18:1	SD	C18:2	SD	C18:3	SD
Adams sveže	5,27	0,15	2,02	0,05	21,1	0,57	45,47	1,3	8,56	0,3

Adams 20 dni	4,81	0,02	1,92	0,01	18,25	0,08	35,41	0,15	5,75	0,04
Lara sveže	5,44	0,16	2,22	0,08	13,26	0,37	47,52	1,3	11,16	0,34
Lara 20 dni	5,76	0,9	2,55	0,04	13,19	0,16	44,69	0,5	9,15	0,11

Preglednica 9 prikazuje MK, ki so najbolj zastopane v orehovem olju. Opazimo lahko, da so v obeh staranih oljih signifikantno nižje vsebnosti nenasičenih MK. To smo pričakovali, saj so nenasičene MK veliko bolj občutljive na oksidacijo od nasičenih. Kot prikazuje Slika 6, se je vsebnost C18:3 MK zmanjšala za 33 % pri olju Adams in za 18 % pri olju Lara. Manj je nenasičenih MK, nižje izgube beležimo. MK 18:2 se je v olju Adams zmanjšala za 22 %, to je manj kot v primeru C18:3. Še manjša je izguba oleinske kisline (18:1) pri olju Adams. Pri olju Lara lahko opazimo, da je vrednost oleinske kisline v okviru eksperimentalne napake določitve ostala nespremenjena. Razmerje sprememb med C18:1, C18:2 in C18:3 je 1 : 12,5 : 38, kar je podobno razmerju tvorbe peroksidov iz teh MK, ki je 1 : 12 : 25 (Hsieh in Kinsella, 1989).

Pri olju Lara je po 20 dnevnem skladiščenju zanimivo povečanje nasičenih MK, ki je pri C:16 sicer manjše od eksperimentalne napake določitve in znaša 6 %, pri C:18 pa znaša 15 % in je večje od eksperimentalne napake določitve. Tega ne opazimo pri olju Adams, kjer se, tako kot za nenasičene MK, pojavi signifikantno zmanjšanje vsebnosti teh MK.

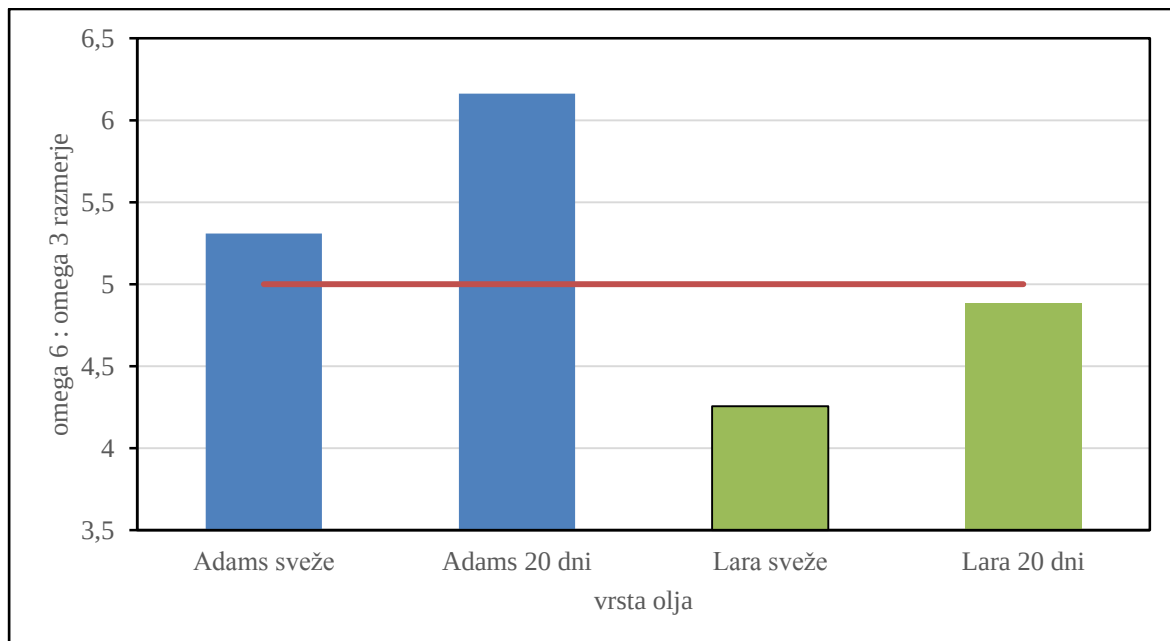


Slika 6: Sprememba maščobnokislinske sestave v orehovem olju Adams in Lara, ki smo ga skladiščili 20 dni pri 50 °C glede na vrednosti v svežem olju.

Zaradi različne hitrosti razgradnje MK se s tem spremeni tudi pomembno razmerje med omega 6 in omega 3 MK. Slika 7 prikazuje razmerja med omega 6 in omega 3 MK v svežem olju in v staranem olju. Olje Lara, ki je imelo enega najboljših razmerji v naši množici vzorcev (boljše razmerje smo določili le v olju Oreh 40), je po 20 dneh ohranilo razmerje pod priporočeno vrednostjo 5 (Referenčne vrednosti za vnos hranil, 2004). Razmerje po 20 dneh (4,88) je v olju Lara celo boljše kot razmerje v sedmih svežih oljih (Slika 5). V olju Adams se je slabo razmerje še poslabšalo in doseglo vrednost 6,16.

V referenčnih vrednostih za vnos hranil je, poleg razmerja med omega 6 in omega 3, podano, da naj bi omega 3 MK zagotovile vsaj 0,5 % energijskih potreb. To pri porabi 2400 kcal znaša približno 1,3 g. Te potrebe zadovoljimo z 12 g svežega Lara olja ali 15 g svežega Adams olja.

Orehova jedrca imajo med 67 % in 70 % maščobe (Gunstone, 2001), če želimo zadostiti potrebam po omega 3 MK, moramo zaužiti 17 gramov orehov, če gre za tako kvalitetno olje kot smo ga določili pri Lara svežem olju.



Slika 7: Razmerje med večkrat nenasičenimi omega 6 in večkrat nenasičenimi omega 3 maščobnimi kislinami v vzorcih Adams in Lara svežega orehovega olja in orehovega olja, ki smo ga skladiščili 20 dni pri 50 °C.

4.2 PROSTE MAŠČOBNE KISLINE

V vseh vzorcih svežega orehovega olja smo določili malo prostih MK, kar kaže na to, da smo imeli ustrezno olje. Proste MK hitreje oksidirajo kot zaestrene MK, delujejo tudi kot katalizatorji oksidacije zato stremimo k temu, da jih je v olju čim manj (Shahidi in Wanasundara, 2008). Najmanj prostih MK smo določili v olju Fernette, največ, za 81 % več kot pri Fernette, pa v olju Mešan oreh. Med različnimi sortami oreha Mulina nismo opazili večjih razlik, so pa razlike statistično značilne, kar prikazuje Preglednica 10. Povprečni RSD pri določitvi prostih maščobnih kislin je 0,8 %.

Preglednica 10: Vsebnost prostih maščobnih kislin, podana kot % oleinske kisline, v vzorcih svežega orehovega olja.

vzorec	% oleinske kisline [%]	SD
Oreh 30	0,1233 ^{Ac}	0,0011
Oreh 40	0,1157 ^B	0,0015
Oreh 50	0,1400 ^C	0,0014
Adams	0,1041 ^f	0,0000
Mešan oreh	0,1724 ^a	0,0016
Fernor	0,1032 ^f	0,0007
Lara	0,1128 ^e	0,0000
Fernette	0,0946 ^g	0,0008
Franquet	0,0971 ^g	0,0015
Mulina 0	0,0971 ^d	0,0017
Mulina II	0,1213 ^c	0,0017
Mulina IV	0,1305 ^b	0,0005

Vrednosti z različno nadpisano malo črko (^{a,b,c...}) se med seboj statistično značilno razlikujejo ($p \leq 0,05$; značilnost razlik med različnimi sortami olja), vrednosti z različno nadpisano veliko črko (^{A,B,C}) se med seboj statistično značilno razlikujejo ($p \leq 0,05$; značilnost razlik med različnimi temperaturami olja).

Majhne razlike, vendar statistično značilne, smo opazili tudi pri oljih, ki so bila stiskana pri različni temperaturi. Vsebnost prostih MK smo izrazili v odstotkih podanih kot oleinska kislina zaradi lažje primerjave z vrednostmi, katere določa zakon (Pravilnik o kakovosti jedilnih rastlinskih olj jedilnih rastlinskih masteh in majonezi, 2009). Pravilnik (15. člen) navaja, da sme jedilno nerafinirano olje vsebovati največ 3 % prostih MK. Zanimivo je to, da je ta meja postavljena tako visoko, čeprav v literaturi lahko zasledimo, da se sme olje tolikokrat uporabiti za cvrtje, dokler proste MK ne presežejo meje 1 % (Shahidi in Wanasundara, 2008). Vsa naša analizirana olja se uvrščajo pod to mejo. Tudi v kategoriji

rafiniranih rastlinskih olj (14. člen) naša preiskovana olja ne presegajo meje, ki je postavljena pri 0,3 % prostih MK podanih kot oleinska kislina.

4.3 PEROKSIDNO ŠTEVILO

Peroksidno število nam pove, kolikšen je obseg nastalih primarnih produktov oksidacije v olju. V 15. členu pravilnika (Pravilnik o kakovosti jedilnih rastlinskih olj jedilnih rastlinskih masteh in majonezi, 2009) sme jedilno nerafinirano olje vsebovati največ 10 mmol O₂/kg olja, oz. 20 mekv/kg olja. Pod to mejo se uvrstijo vsa naša olja, kar prikazuje Preglednica 11.

Preglednica 11: Peroksidno število v vzorcih svežega orehovega olja.

vzorec	PŠ [mekv /kg olja]	SD	PŠ [mmol O ₂ /kg olja]
Oreh 30	2,03 ^A	0,01	1,01
Oreh 40	2,88 ^B	0,07	1,44
Oreh 50	1,63 ^C	0,01	0,82
Adams	8,70 ^b	0,09	4,35
Mešan oreh	6,06 ^d	0,03	3,03
Fernor	8,08 ^c	0,13	4,04
Lara	5,13 ^e	0,01	2,57
Fernette	7,90 ^c	0,02	3,95
Franquet	11,97 ^a	0,20	5,99
Mulina 0	3,47 ^f	0,07	1,74
Mulina II	1,88 ⁱ	0,03	0,94
Mulina IV	1,49 ^h	0,01	0,75

Vrednosti z različno nadpisano malo črko (^{a,b,c,...}) se med seboj statistično značilno razlikujejo ($p \leq 0,05$; značilnost razlik med različnimi sortami olja), vrednosti z različno nadpisano veliko črko (^{A,B,C}) se med seboj statistično značilno razlikujejo ($p \leq 0,05$; značilnost razlik med različnimi temperaturami olja).

Dobre rezultate smo dobili pri oljih Mulina 0, Mulina II, Mulina IV, Oreh 30, Oreh 40 in Oreh 50, v katerih je PŠ manjše od 4 mekv O₂/kg. Vsa analizirana olja imajo celo tako nizko PŠ, da dosegajo standarde za rafinirana in hladno stiskana nerafinirana rastlinska olja, ki postavljajo PŠ na največ 14 mekv O₂/kg olja. Najslabše rezultate smo dobili pri

oljih Adams, Fernor, Fernette in Franquet. Pri slednjem smo določili kar 8-krat več peroksidov kot pri olju Mulina IV. Povprečni RSD pri določitvi PŠ je znašal 1,1 %.

4.4 *p*-ANIZIDINSKA VREDNOST

Z sveža olja smo določili tudi *p*-AV, ki nam pove, kolikšna vsebnost sekundarnih produktov oksidacije, aldehydov je v olju, oziroma, v kolikšni meri je v tem olju napredovala oksidacija MK.

Preglednica 12: *p*-anizidinska vrednost v vzorcih svežega orehovega olja.

vzorec	<i>p</i> -AV [/]	SD
Oreh 30	2,085 ^{Aa}	0,052
Oreh 40	1,825 ^B	0,009
Oreh 50	2,256 ^A	0,112
Adams	0,896 ^f	0,035
Mešan oreh	1,352 ^d	0,034
Fernor	1,893 ^b	0,026
Lara	1,551 ^c	0,062
Fernette	0,332 ^h	0,011
Franquet	0,750 ^g	0,018
Mulina 0	1,245 ^e	0,062
Mulina II	1,277 ^{de}	0,000
Mulina IV	1,511 ^c	0,017

Vrednosti z različno nadpisano malo črko (a,b,c...) se med seboj statistično značilno razlikujejo ($p \leq 0,05$; značilnost razlik med različnimi sortami olja), vrednosti z različno nadpisano veliko črko (A,B,C...) se med seboj statistično značilno razlikujejo ($p \leq 0,05$; značilnost razlik med različnimi temperaturami olja).

Povprečni RSD pri določitvi *p*-AV je znašal 2,6 %. V kvalitetnih oljih naj bi *p*-AV znašala manj kot 2 (Jokić in sod., 2014). Tej vrednosti se približajo olja Oreh 40 in Fernor. Oreh 30 in Oreh 50 sta to vrednost tudi presegla. Najboljše rezultate je doseglo olje Fernette, vendar tudi v tem olju nismo določili tako nizke vrednosti, kot so jo določili Jokić in sodelavci. *p*-AV, ki so jo določili takoj po stiskanju njihovega olja, je znašala 0,08 (Jokić in sod., 2014). *p*-AV našega olja nam torej lahko kažejo na to, da nismo delali s tako

svežimi vzorci olja in da to olje vsebuje veliko aldehydov, ki so razgradni produkti primarnih produktov oksidacije olja.

Največ aldehydov v naših vzorcih nastane verjetno z razgradnjo linolne kisline, saj je te MK v naših vzorcih največ, kar 45 %. Aldehydi, ki so najverjetneje v največji količini prisotni v naših oljih so: pentanal, heksanal, 2-oktanal, 2-nonanal in 2,4-dekadienal, ki nastanejo iz linolne kisline (Vidrih in sod., 2012).

4.5 TOTOX VREDNOST

Totox vrednost je indeks skupne primarne in sekundarne oksidacije olja, ki upošteva PŠ in *p*-AV. Kljub temu, da se Totox vrednost pogosto uporablja zlasti v industriji, nima dobre znanstvene podlage, saj v svojem izračunu upošteva več spremenljivk z različnimi dimenzijami. *p*-AV kaže dolgotrajno oksidirano olja, PŠ pa primarno oksidacijo. PŠ na začetku oksidativnega procesa narašča, kasneje pa s časom pada. Hidroperoksidi se namreč na začetku oksidativnega procesa tvorijo veliko hitreje kot razpadejo. Spremljanje hidroperoksidov skozi časovno obdobje nam pokaže, ali so hidroperoksidi v naraščajoči fazi ali padajoči fazi nastajanja. Totox vrednost izračunamo s formulo (Shahidi in Wanasundara, 2008):

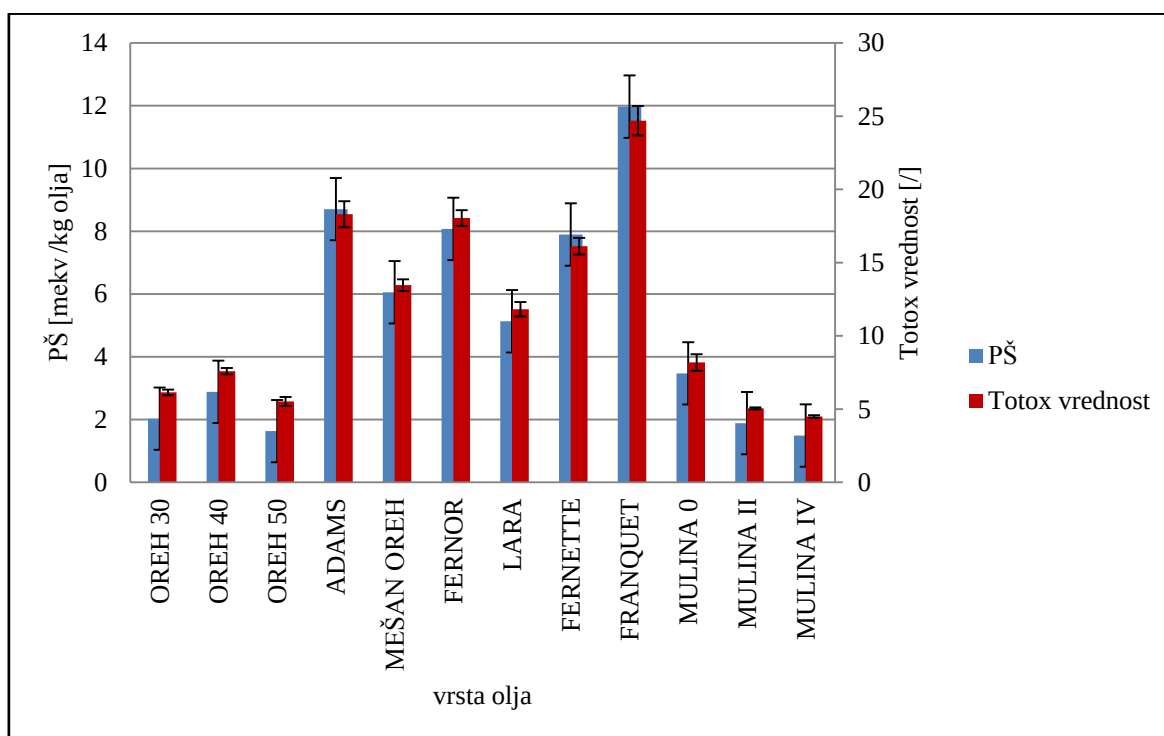
$$\text{Totox vrednost} = 2 * \text{PŠ} + p - \text{AV} \quad (17)$$

Preglednica 13: Totox vrednost v vzorcih svežega orehovega olja.

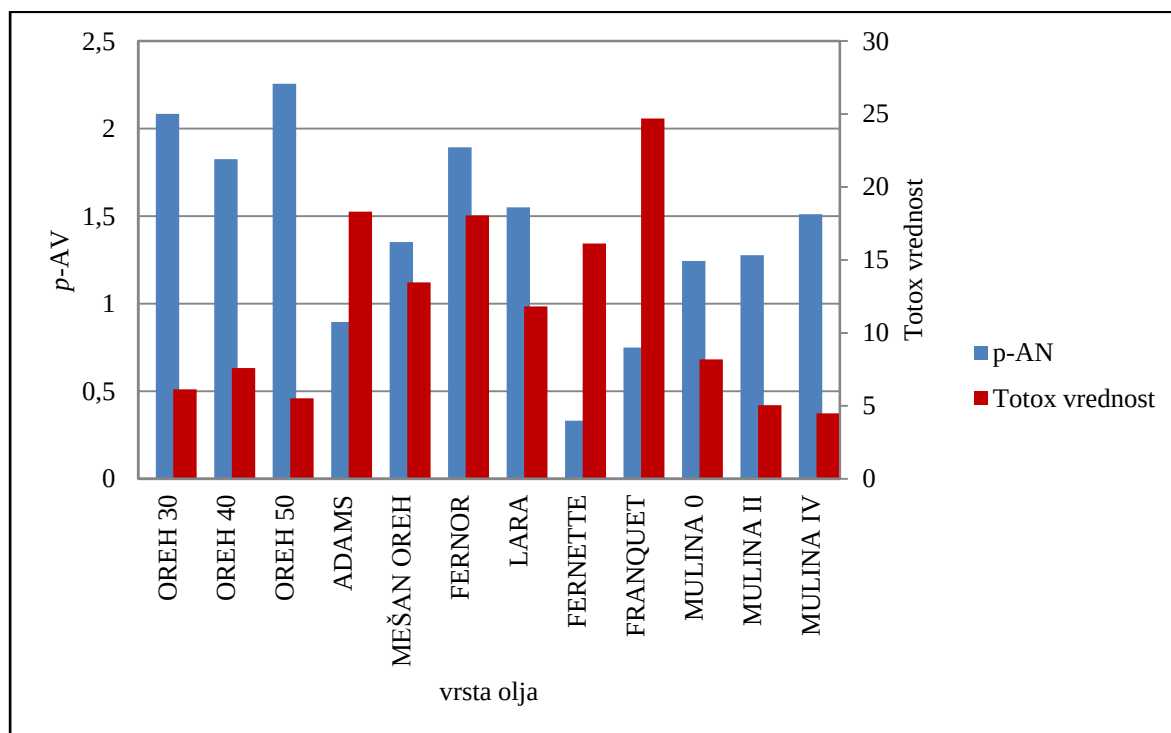
vzorec	Totox vrednost [°]	SD
Oreh 30	6,14	0,19
Oreh 40	7,59	0,22
Oreh 50	5,52	0,30
Adams	18,31	0,89
Mešan oreh	13,46	0,40
Fernor	18,04	0,54
Lara	11,81	0,49
Fernette	16,12	0,57
Franquet	24,69	1,00
Mulina 0	8,19	0,56
Mulina II	5,05	0,07
Mulina IV	4,49	0,09

Preglednica 13 prikazuje Totox vrednosti. Visoke vrednosti dosega olja z visokim PŠ, to so olja Adams, Mešan Oreh, Fernor, Lara, Fernette in Franquet z najvišjo Totox vrednostjo (Slika 8). Nižje Totox vrednosti dosega tista olja, ki imajo nižje PŠ, kot npr. Oreh 30, Oreh 40, Oreh 50, Mulina 0, Mulina II in mulina IV, ki ima najnižjo Totox vrednost.

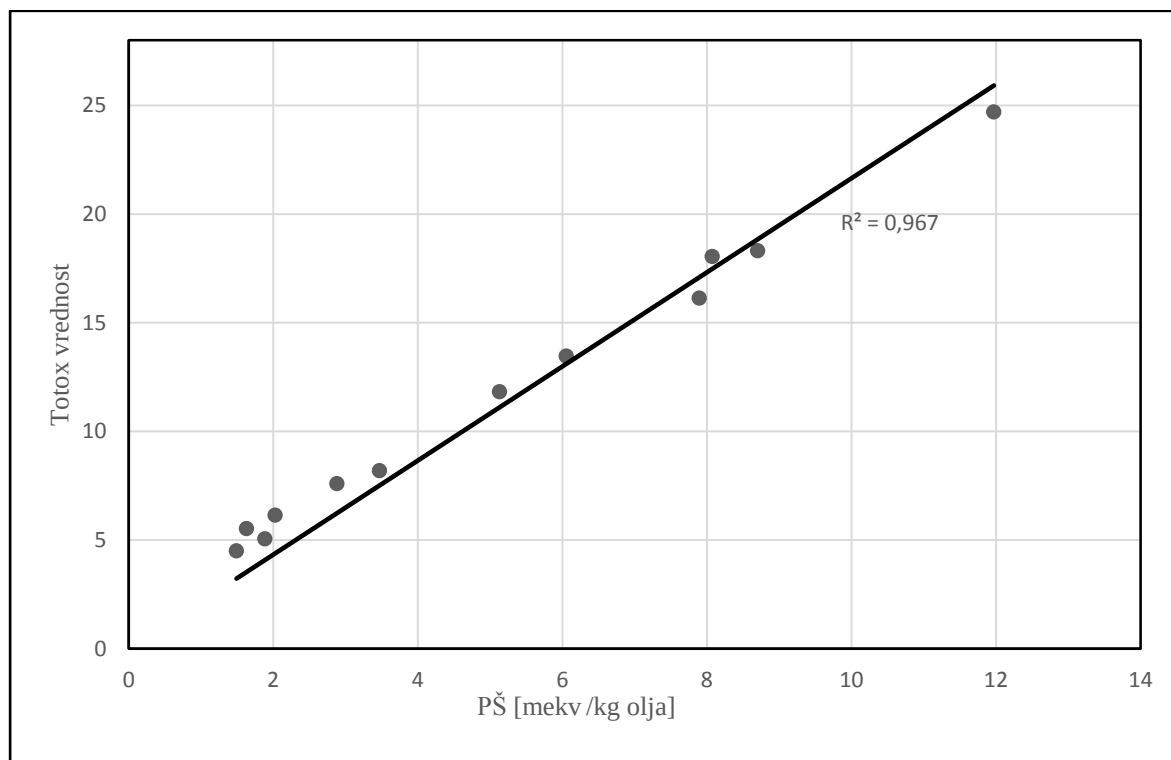
Med *p*-AV in Totox vrednostjo ne opazimo takšne povezave kot med Totox vrednostjo s PŠ (Slika 9). Tako lahko vidimo, da kljub visoki *p*-AV dosega nizko Totox vrednost olja Oreh 30, Oreh 40, Oreh 50 in Mulina IV. Dobro pozitivno linearno zvezo, med Totox vrednostjo in PŠ za katero znaša koeficient determinacije, $R^2 = 0,967$, nam podaja Slika 10. Slika 11 prikazuje odsotnost linearne zveze med *p*-AV in Totox vrednostjo, kjer je R^2 le 0,0525.



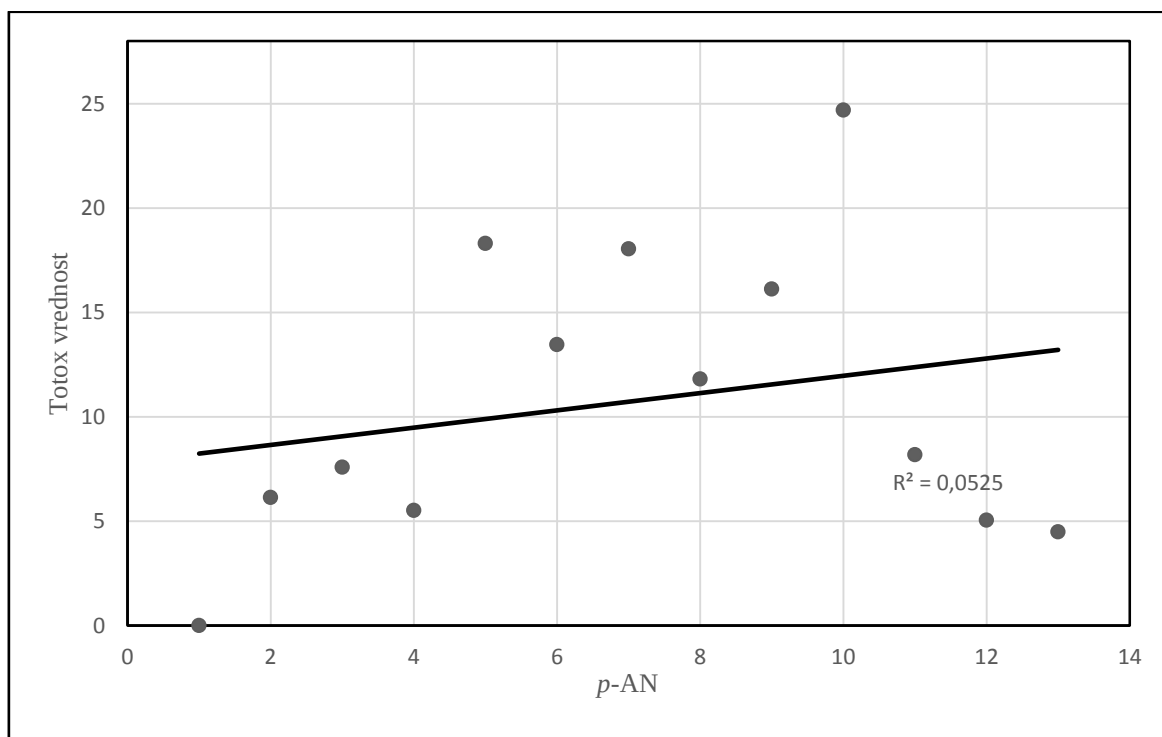
Slika 8: Primerjava peroksidnega števila in Totox vrednosti v vzorcih svežega orehovega olja.



Slika 9: Primerjava *p*-anizidinske vrednosti in Totox vrednosti v vzorcih svežega orehovega olja.



Slika 10: Zveza med Totox vrednostjo in peroksidnim številom v orehovem olju.



Slika 11: Zveza med Totox vrednostjo in p -anizidinsko vrednostjo v svežem orehovem olju.

4.6 KONJUGIRANI DIENI IN TRIENI

4.6.1 Konjugirani dieni in trieni v svežem olju

Preglednica 14: Konjugirani dieni, ki smo jih določili pri valovni dolžini 232 nm in konjugirani trieni, ki smo jih določili pri valovni dolžini 258 nm, 268 nm in 279 nm v svežem orehovem olju.

vzorec	$E_{1cm}^{1\%} 232$	SD	$E_{1cm}^{1\%} 258$	SD	$E_{1cm}^{1\%} 268$	SD	$E_{1cm}^{1\%} 279$	SD
Oreh 30	5,66 ^{ABcd}	0,25	1,41 ^{Ae}	0,13	1,35 ^{Ae}	0,14	1,22 ^{Ad}	0,12
Oreh 40	6,60 ^A	0,49	1,56 ^A	0,15	1,44 ^A	0,15	1,29 ^A	0,14
Oreh 50	5,47 ^B	0,23	1,49 ^A	0,12	1,43 ^A	0,12	1,28 ^A	0,11
Adams	8,88 ^a	0,80	1,79 ^{bc}	0,05	1,60 ^{bcd}	0,08	1,42 ^{abcd}	0,08
Mešan oreh	7,14 ^b	0,17	1,86 ^{abc}	0,09	1,74 ^{abc}	0,10	1,57 ^{ab}	0,08
Fernor	9,08 ^a	0,05	1,97 ^{ab}	0,09	1,80 ^{ab}	0,10	1,62 ^{ab}	0,08
Lara	9,06 ^a	0,14	2,06 ^a	0,14	1,89 ^a	0,15	1,72 ^a	0,12
Fernette	8,76 ^a	0,73	1,72 ^{cd}	0,08	1,52 ^{cde}	0,12	1,36 ^{cd}	0,11
Franquet	8,78 ^a	1,11	1,97 ^{ab}	0,14	1,75 ^{abc}	0,07	1,57 ^{ab}	0,05
Mulina 0	6,10 ^{bc}	0,29	1,53 ^{de}	0,03	1,43 ^{de}	0,04	1,29 ^d	0,03
Mulina II	4,90 ^d	0,02	1,69 ^{cd}	0,03	1,66 ^{abcd}	0,04	1,50 ^{bc}	0,03
Mulina IV	4,66 ^d	0,14	1,47 ^e	0,06	1,43 ^{de}	0,06	1,30 ^d	0,05

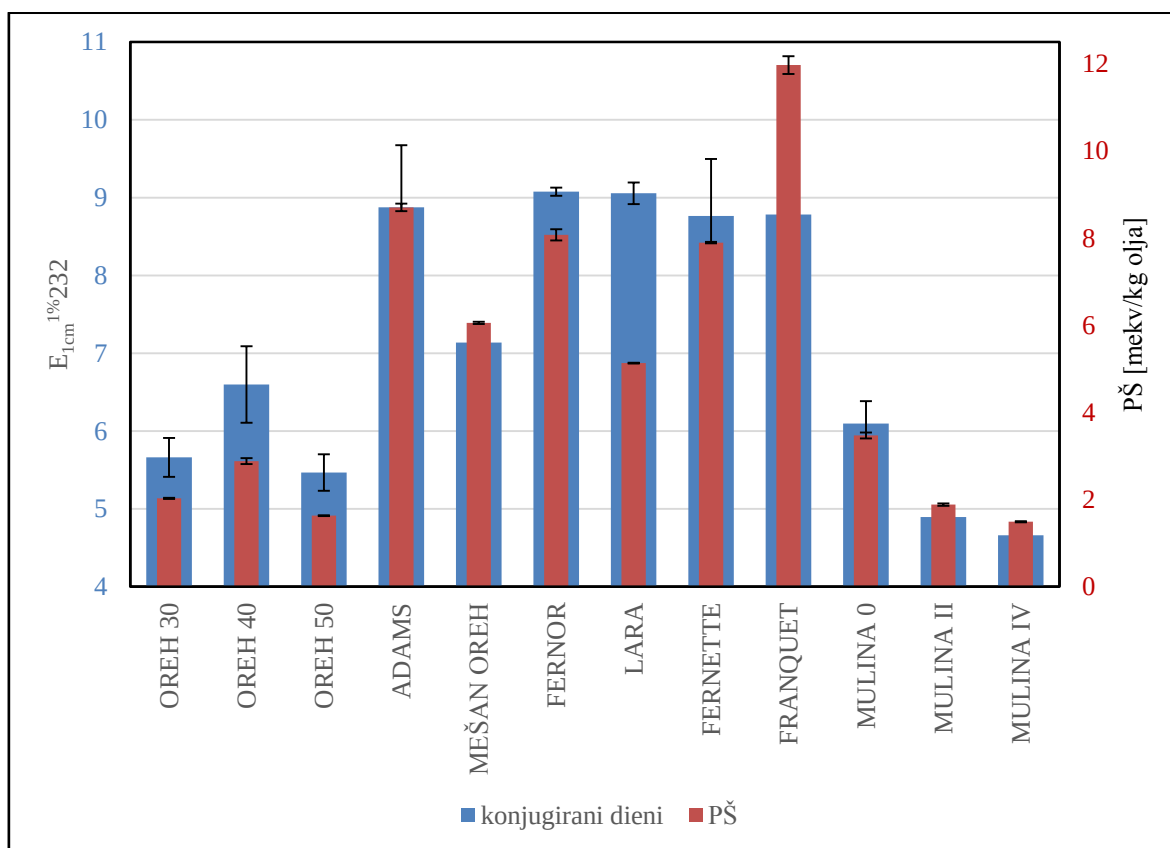
Vrednosti z različno nadpisano malo črko (^{a,b,c...}) znotraj istega stolpca se med seboj statistično značilno razlikujejo ($p \leq 0,05$; značilnost razlik med različnimi sortami olja), vrednosti z različno nadpisano veliko črko (^{A,B,C}) znotraj istega stolpca se med seboj statistično značilno razlikujejo ($p \leq 0,05$; značilnost razlik med različnimi temperaturami olja).

Povprečni RSD pri meritvi konjugiranih dienov in trienov je znašal 5,6 %. Zaradi velike koncentracije PUFA v naših vzorcih orehovega olja smo pričakovali večjo vsebnost konjugiranih dienov in konjugiranih trienov. Preglednica 14 prikazuje, da smo najmanjšo vsebnost konjugiranih dienov v svežih vzorcih olja določili v olju Mulina IV, kjer je vrednost $E_{1cm}^{1\%}$ znašala $4,66 \pm 0,14$. Mulini IV sledita Mulina II, Oreh 50 in Oreh 30.

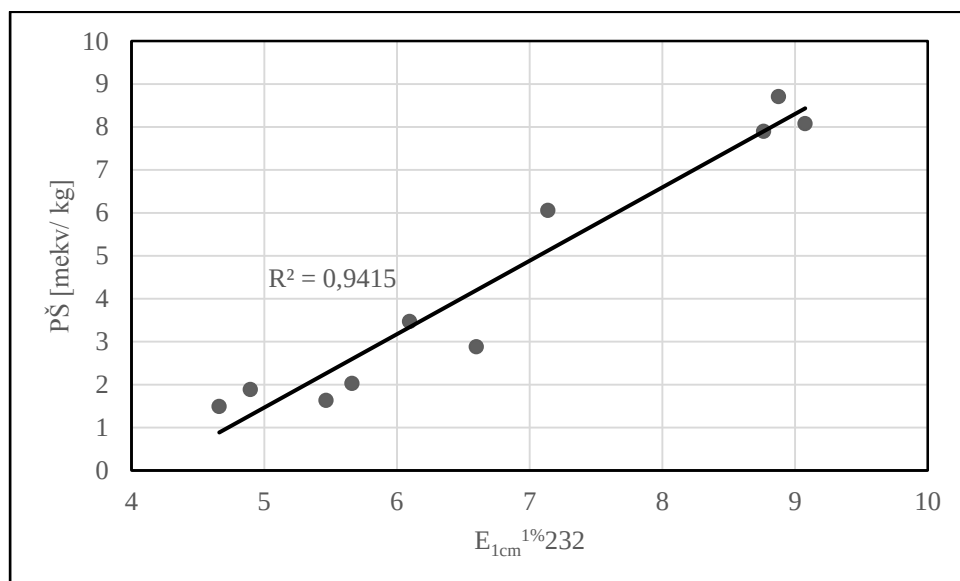
Največjo vsebnost konjugiranih dienov smo določili pri vzorcih Fernor ($E_{1cm}^{1\%} = 9,08 \pm 0,05$), Lara ($E_{1cm}^{1\%} = 9,06 \pm 0,14$), tesno jima sledijo še Adams, Franquet in Fernette.

Ker konjugirani dieni predstavljajo primarne oksidacijske produkte PUFA, lahko iz podatka o $E_{1cm}^{1\%}$ pri 232 nm sklepamo o višini PŠ olja. Med konjugiranimi dieni in PŠ naj bi obstajala linearna pozitivna povezava (Shahidi in Wanasundara, 2008). To povezavo smo opazili tudi v našem primeru, kot prikazuje Slika 12. Na sliki so z modro barvo označene

vrednosti za konjugirane dene podane kot $E_{1cm}^{1\%232}$ in z rdečo barvo vrednosti PŠ. Na sliki lahko opazimo, da odstopata dve olji. Eno je olje Lara, ki ima manjše PŠ, kot bi ga lahko pričakovali glede na vrednost konjugiranih dienov in drugo je olje Franquet, ki ima večje PŠ kot Fernette olje, čeprav imata olji v okviru eksperimentalne napake določitve enako vsebnost konjugiranih dienov.



Slika 12: Primerjava vrednosti konjugiranih dienov in peroksidnega števila v vzorcih svežega orehovega olja.



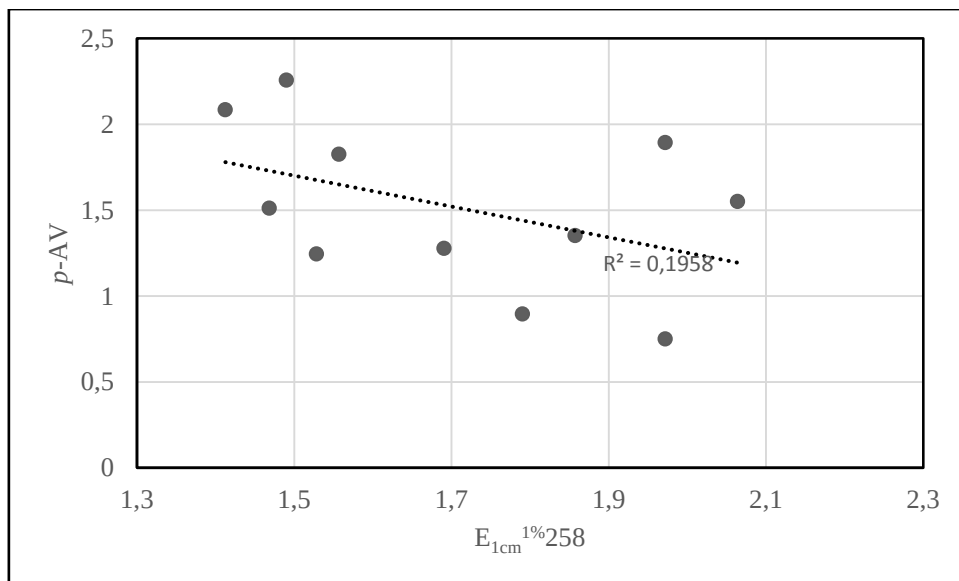
Slika 13: Zveza med peroksidnim številom in konjugiranimi dieni v svežem orehovem olju.

Slika 13 nam kaže, da je linearna povezava med konjugiranimi dieni in PŠ dobra (koeficient determinacije, $R^2 = 0,9515$). Pri tem je potrebno poudariti, da ne gre za isto olje, temveč za več različnih sort orehovitih olj, ki se med seboj razlikujejo po različnih parametrih, kar gotovo vpliva na vrednost izmerjene absorbanke. Z linearno regresijsko analizo smo določili parametre premice, ki jo prikazuje Slika 13. V analizo nista vključeni prej omenjeni olji Fernette in Fernor. S pomočjo parametrov premice lahko podamo sledečo formulo, ki jo lahko uporabimo za izračun teoretične vrednosti PŠ v orehovitih oljih, kar pomeni, da si z metodo za določitev konjugiranih dienov lahko pomagamo tudi pri določitvi hidroperoksidov v olju.

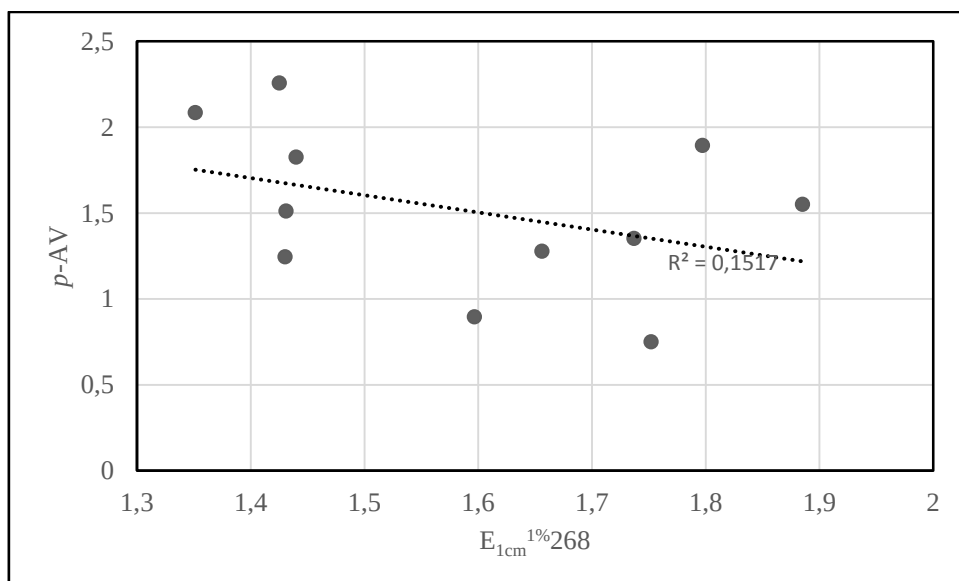
$$\text{PŠ teoret} = 1,7095 * E_{1cm}^{1\%} 232 - 7,0826 \quad (18)$$

Vsebnost konjugiranih trienov, ki smo jih določili v vzorcih svežega olja z merjenjem absorbanke pri valovnih dolžinah 258 nm, 268 nm in 279 nm, so bile v povprečju za 4- do 5-krat manjše, kot vsebnost konjugiranih dienov. To je razvidno iz Preglednica 14. Povprečje vrednosti $E_{1cm}^{1\%}$ določenih pri 258 nm v vseh vzorcih olja znaša 1,7 (standardni odklon je 0,2), pri 268 nm znaša $E_{1cm}^{1\%}$ 1,6 (standardni odklon je 0,2) in pri 279 nm znaša $E_{1cm}^{1\%}$ 1,4 (standardni odklon je 0,2). Najnižje vrednosti pri vseh treh valovnih dolžinah smo določili pri olju Oreh 30, največje vrednosti pa je doseglo, prav tako pri vseh treh valovnih dolžinah, olje Lara.

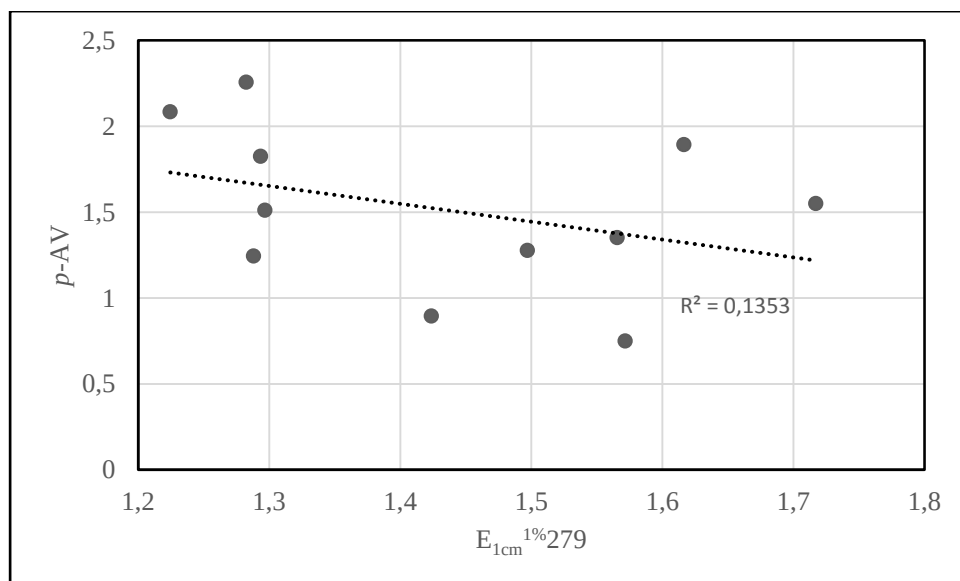
Konjugirani trieni predstavljajo sekundarne produkte oksidacije, zato smo preverili ali obstaja povezava med konjugiranimi trieni in p -AV. Z preiskovane vzorce svežega orehovega olja nismo ugotovili povezave med konjugiranimi trieni in p -AV, saj se koeficient determinacije giblje med 0,1353 in 0,1958, kot nam prikazujejo Slika 14, Slika 15 in Slika 16.



Slika 14: Zveza med p -anizidinsko vrednostjo in konjugiranimi trieni, ki smo jih določili pri valovni dolžini 258 nm v svežem orehovem olju.



Slika 15: Zveza med p -anizidinsko vrednostjo in konjugiranimi trieni, ki smo jih določili pri valovni dolžini 268 nm v svežem orehovem olju.



Slika 16: Zveza med *p*-anizidinsko vrednostjo in konjugiranimi trieni, ki smo jih določili pri valovni dolžini 279 nm v svežem orehovem olju.

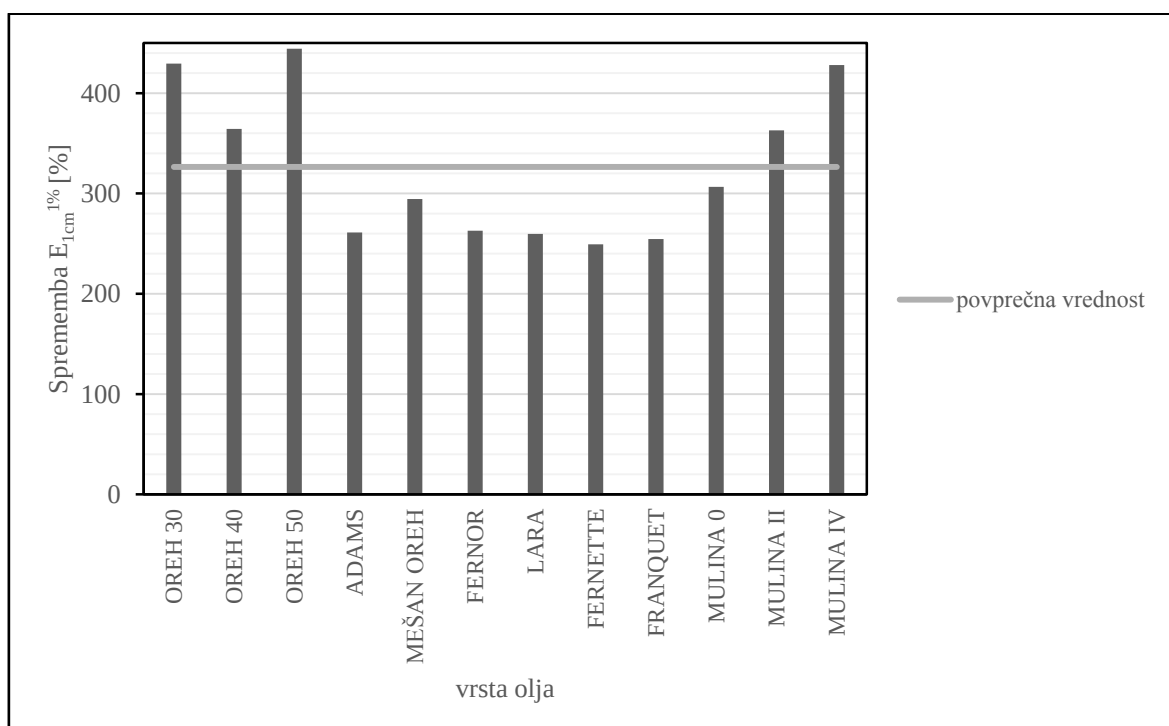
4.6.2 Konjugirani dieni in trieni v orehovem olju po skladiščenju 20 dni

Vsebnost konjugiranih dienov in konjugiranih trienov smo določili tudi v oljih po skladiščenju 20 dni pri temperaturi 50 °C v temi. Rezultate podaja Preglednica 15. Največ konjugiranih dienov smo določili pri olju Oreh 30 ($E_{1cm}^{1\%} = 24,3$). Najmanjšo vsebnost konjugiranih dienov smo določili pri olju Mulina II ($E_{1cm}^{1\%} = 17,8$). Povprečna vrednost za $E_{1cm}^{1\%}$ v vseh oljih znaša 22 (standardni odklon znaša 2). Poleg Mulina II so se pod povprečno vrednostjo uvrstili še: olji sorte Mulina (0 in IV), olje Fernette in olje Mešan oreh. Vse tri sorte Mulina olja so tudi edini vzorci, katerih $E_{1cm}^{1\%}$ ni presegla vrednosti 20. Povprečno se je vsebnost konjugiranih dienov v vseh vzorcih povečala za 325 %, kot prikazuje Slika 17. Vsebnost se je najbolj povečala pri tistih vzorcih, kjer so sveža olja imela najmanjšo vsebnost konjugiranih dienov, čez 400 % povečanje lahko tako opazimo v oljih Mulina IV (428 %), Oreh 50 (444 %) in Oreh 30 (429 %). Najmanj (za dobrih 250 %) se je vsebnost povečala pri oljih Fernette (249 %), Franquet (255 %), Lara (260 %), Adams (261 %) in Fernor (263 %). Pri vseh teh oljih smo v svežih vzorcih določili največje vsebnosti konjugiranih dienov.

Preglednica 15: Konjugirani dieni, ki smo jih določili pri valovni dolžini 232 nm in konjugirani trieni, ki smo jih določili pri valovni dolžini 258 nm, 268 nm in 279 nm v orehovem olju po skladiščenju 20 dni pri 50 °C.

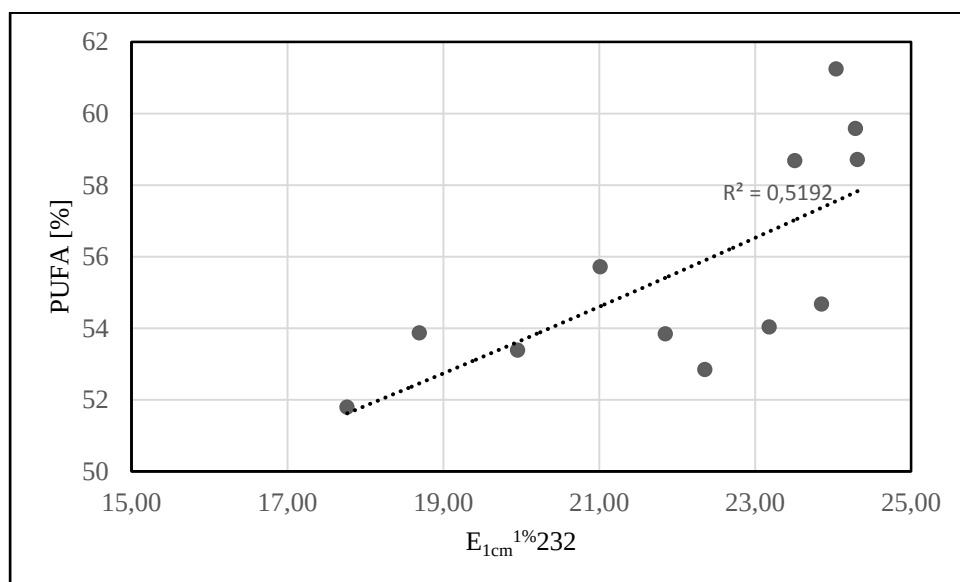
vzorec	$E_{1cm}^{1\%} 232$	SD	$E_{1cm}^{1\%} 258$	SD	$E_{1cm}^{1\%} 268$	SD	$E_{1cm}^{1\%} 279$	SD
Oreh 30	24,31 ^{Aa}	0,12	3,47 ^{Aa}	0,21	3,20 ^{Aa}	0,21	2,86 ^{Aa}	0,19
Oreh 40	24,04 ^A	1,14	3,40 ^A	0,18	3,11 ^A	0,17	2,81 ^A	0,15
Oreh 50	24,29 ^A	0,34	3,22 ^A	0,04	2,93 ^A	0,04	2,64 ^A	0,04
Adams	23,18 ^{ab}	1,69	3,02 ^b	0,09	2,75 ^b	0,06	2,49 ^b	0,06
Mešan orih	21,01 ^{abcd}	0,29	1,62 ^{cd}	0,00	1,26 ^{cd}	0,01	1,13 ^{cd}	0,01
Fernor	23,85 ^a	1,87	1,76 ^{cd}	0,17	1,36 ^{cd}	0,14	1,23 ^{cd}	0,13
Lara	23,51 ^{ab}	0,82	1,90 ^c	0,12	1,50 ^c	0,10	1,36 ^c	0,10
Fernette	21,85 ^{abc}	1,35	1,69 ^{cd}	0,11	1,32 ^{cd}	0,09	1,17 ^{cd}	0,08
Franquet	22,36 ^{ab}	0,83	1,74 ^{cd}	0,06	1,35 ^{cd}	0,05	1,23 ^{cd}	0,04
Mulina 0	18,69 ^{dc}	0,04	1,33 ^d	0,02	1,00 ^d	0,02	0,88 ^d	0,03
Mulina II	17,77 ^d	0,99	2,88 ^b	0,36	2,69 ^b	0,39	2,38 ^b	0,34
Mulina IV	19,95 ^{bdc}	3,43	2,78 ^b	0,32	2,54 ^b	0,25	2,27 ^b	0,23

Vrednosti z različno nadpisano malo črko (^{a,b,c,...}) znotraj istega stolpca se med seboj statistično značilno razlikujejo ($p \leq 0,05$; značilnost razlik med različnimi sortami olja), vrednosti z različno nadpisano veliko črko (^{A,B,C}) znotraj istega stolpca se med seboj statistično značilno razlikujejo ($p \leq 0,05$; značilnost razlik med različnimi temperaturami olja).



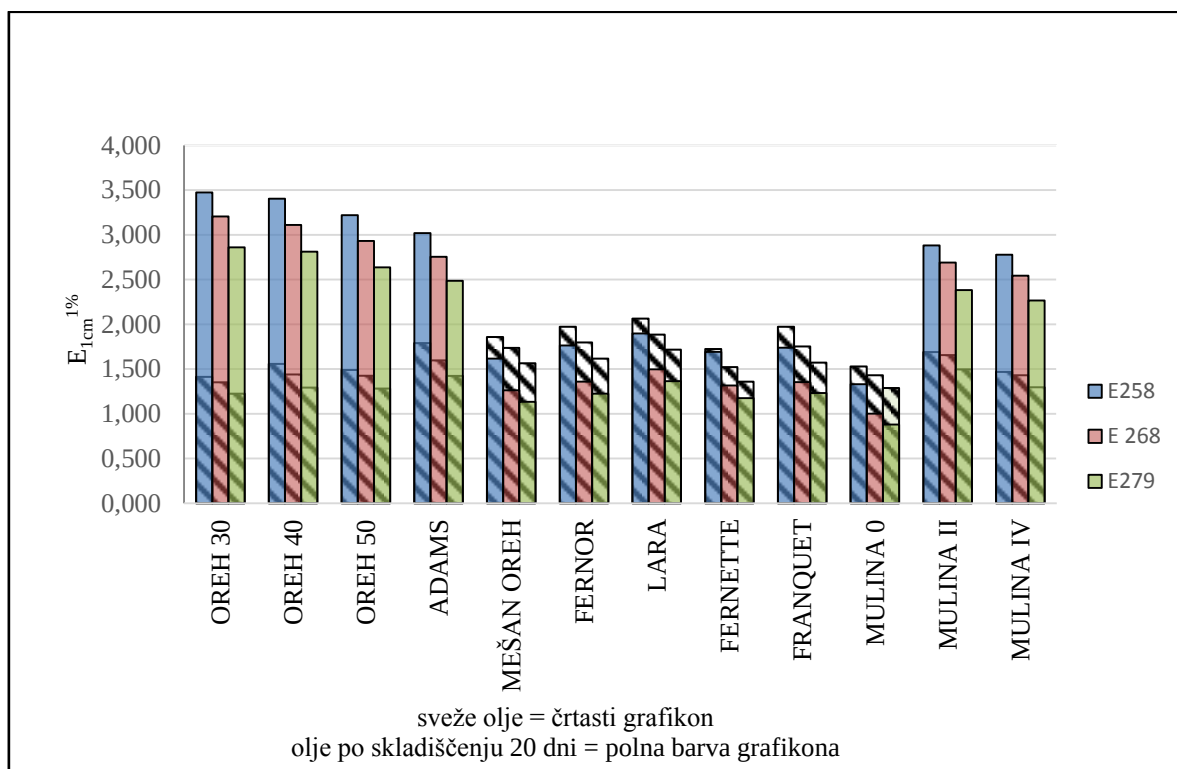
Slika 17: Sprememba vsebnosti konjugiranih dienov v orehovitih oljih po skladiščenju 20 dni pri 50 °C glede na vrednost v svežem orehovem olju.

Med vsebnostjo konjugiranih dienov po skladiščenju 20 dni in vsebnostjo PUFA v svežih oljih smo zasledili pozitivno zvezo ($R^2 = 0,519$), kar nam kaže Slika 18. Slabša je povezava med vsebnostjo konjugiranih trienov in vsebnostjo PUFA ($R^2 = 0,218$).

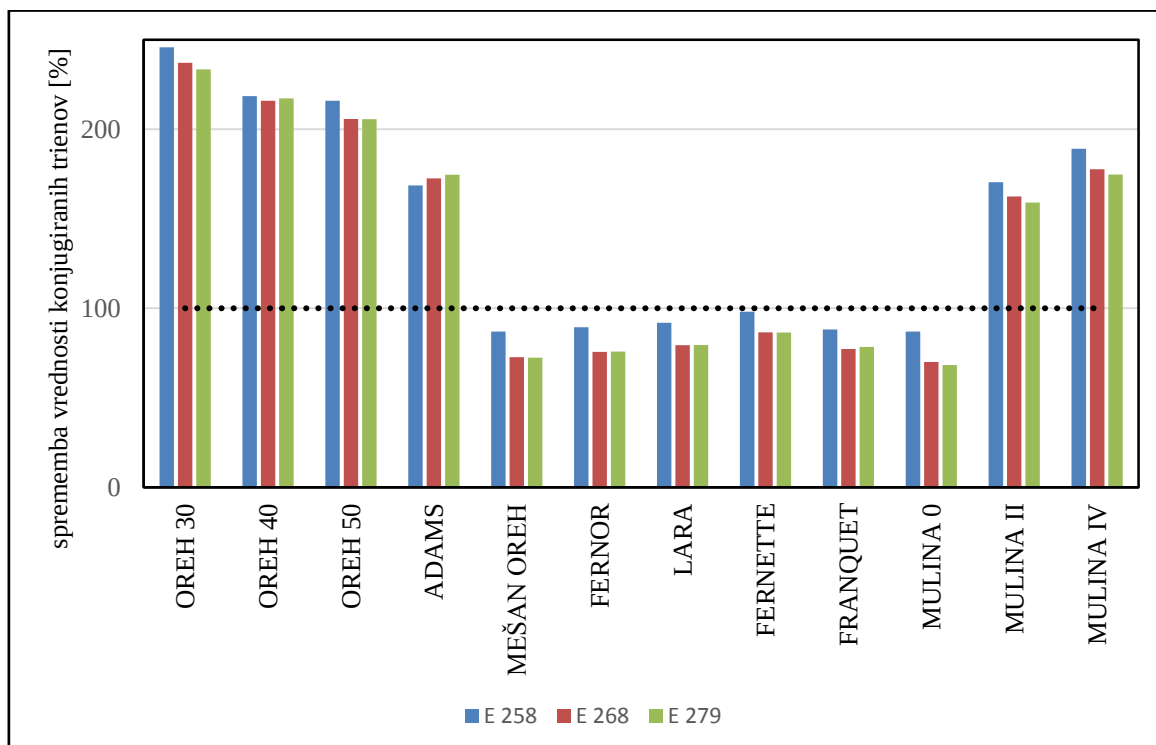


Slika 18: Odvisnost vsebnosti konjugiranih dienov po skladiščenju 20 dni in vsebnostjo PUFA v svežih oljih

Največjo vsebnost konjugiranih trienov smo določili v olju Oreh 30, pri vseh valovnih dolžinah. Najmanjšo vsebnost konjugiranih trienov pri vseh treh valovnih dolžinah pa je imelo olje Mulina 0. Povprečje vrednosti $E_{1cm}^{1\%}$ vseh olj, ki smo jih določili pri valovni dolžini 258 nm, znaša 2,4 (standardni odklon 0,8), pri valovni dolžini 268 nm znaša 2,1 (standardni odklon 0,8) in pri valovni dolžini 297 nm znaša 1,9 (standardni odklon 0,8). Slika 19 prikazuje $E_{1cm}^{1\%}$ v svežih in skladiščenih oljih. S črnim polnilom so označene vrednosti $E_{1cm}^{1\%}$ za sveža olja, z barvnim polnilom pa vrednosti za starana olja. Slika 19 nam kaže, da smo v nekaterih oljih določili večje vrednosti $E_{1cm}^{1\%}$ v svežih vzorcih olja kot po skladiščenju 20 dni pri 50 °C. Ta olja so Mešan oreh, Fernor, Lara, Fernette, Franquet in Mulina 0.



Slika 19: Primerjava vsebnosti konjugiranih trienov v svežih orehovitih oljih in orehovitih oljih, ki smo jih skladiščili 20 dni pri 50 °C.



Slika 20: Sprememba vsebnosti konjugiranih trienov v orehovitih oljih po skladiščenju 20 dni pri 50 °C glede na vrednost v svežem orehovem olju.

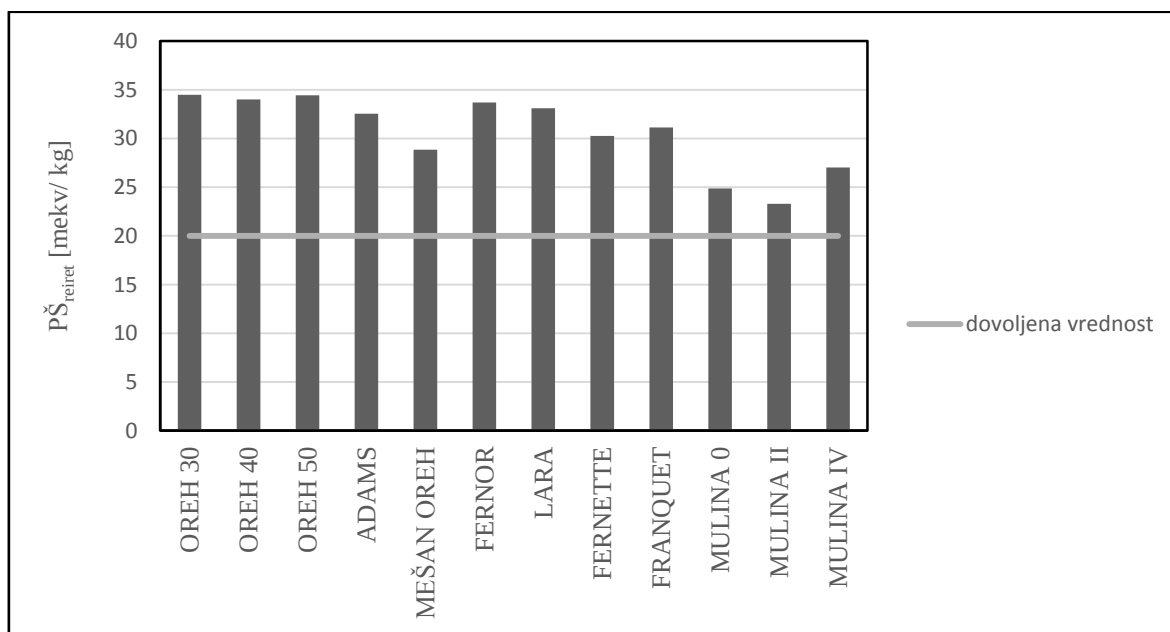
V povprečju se je vsebnost konjugiranih trienov povečala za 139 % prvotne vrednosti. V vseh oljih (razen v olju Adams) se je $E_{1cm}^{1\%}$ določena pri valovni dolžini 258 nm povečala v večji meri kot $E_{1cm}^{1\%}$, ki smo jo določili pri 268 nm in 279 nm.

Produkti sekundarne oksidacije (konjugirani trieni) med staranjem nastajajo več kot 2-krat počasneje kot produkti primarne oksidacije (dieni), ki so se, kot smo že omenili, v 20-dnevnem skladiščenju pri 50 °C povečali za 325 %.

Ob primerjavi vrednosti, ki jih podaja Preglednica 15, lahko razberemo, da različna temperatura pri stiskanju olja (30, 40 ali 50 °C) nima vpliva na tvorbo produktov primerne (konjugirani dien) in sekundarne oksidacije (konjugirani trieni), saj se $E_{1cm}^{1\%}$ vrednosti za olja Oreh 30, Oreh 40 in Oreh 50 med seboj signifikantno ne razlikujejo.

4.6.3 Teoretična vrednost peroksidnega števila v olju po skladiščenju 20 dni

S pomočjo parametrov premice, ki opiše linearno zvezo med PŠ in vsebnostjo konjugiranih dienov v olju (Enačba 15), lahko iz vrednosti za konjugirane diene v olju, ki smo ga skladiščili 20 dni pri 50 °C (glej poglavje 4.6.2), izračunamo teoretično vrednost PŠ v teh vzorcih. Za izračun vrednosti $P\check{S}_{teoret}$ iz konjugiranih dienov smo se odločili, ker nismo imeli dovolj vzorca za analizo PŠ v olju, ki smo ga skladiščili. Slika 21 prikazuje vrednosti $P\check{S}_{teoret}$. V 15. členu pravilnika (Pravilnik o kakovosti jedilnih rastlinskih olj jedilnih rastlinskih masteh in majonezi, 2009) sme jedilno nerafinirano olje vsebovati največ 10 mmol O₂/kg olja, oziroma 20 mekv O₂/kg olja. Prav vsa naša starana olja so presegla z zakonom dovoljeno mejo (na sliki označena z rdečo barvo) in zaradi tega niso primerna za prodajo ali uživanje. Ti rezultati nakazujejo na to, da orehovo olje ni primerno za daljše skladiščenje. V najmanjši meri so presegla mejno vrednost 20 mekv/kg vsa olja sorte Mulina (Mulina II, $P\check{S}_{teoret}$ = 23 mekv/kg, mulina IV, $P\check{S}_{teoret}$ = 27 mekv/kg in Mulina 0, $P\check{S}_{teoret}$ = 25 mekv/kg).



Slika 21: Teoretična vrednost peroksidnega števila v orehovitih oljih, ki smo jih skladiščili 20 dni pri 50 °C.

4.7 ANTIOKSIDATIVNI POTENCIAL OREHOVIH OLJ

Antioksidanti so pomembna sestavina olj, saj vplivajo tako na prehransko vrednost, kot tudi na oksidativno stabilnost olj. AOP smo določili vsem vzorcem svežega orehovega olja. Poleg tega smo želeli ugotoviti, kako se AOP olja spreminja med skladiščenjem. Zato smo določili AOP po 10, 15 in 20 dneh skladiščenja pri 50 °C. AOP smo določili z metodo lovljenja DPPH radikala in izrazili kot mmol ulovljenega radikala DPPH na 1 L olja. Večjo množino DPPH radikala zmorejo antioksidanti v 1 L olja onesposobiti oz. uloviti, večji je AOP olja.

Preglednica 16: Antioksidativni potencial svežih orehovitih olj in orehovitih olj, ki smo jih skladiščili 20 dni pri 50 °C.

Vzorec	AOP [mmol DPPH/L]							
Čas skladiščenja (dan)	0	SD	10	SD	15	SD	20	SD
Oreh 30	0,506 ^{Ade}	0,013	0,208 ^{Ac}	0,029	0,177 ^{Abcdef}	0,033	0,156 ^{Ba}	0,030
Oreh 40	0,466 ^A	0,025	0,171 ^B	0,001	0,132 ^B	0,003	0,117 ^A	0,006
Oreh 50	0,501 ^A	0,001	0,243 ^A	0,026	0,157 ^A	0,019	0,111 ^A	0,007
Adams	0,531 ^{cde}	0,002	0,130 ^b	0,008	0,117 ^{abcde}	0,015	0,089 ^{ab}	0,009
Mešan oreh	0,814 ^b	0,010	0,135 ^b	0,004	0,128 ^{abcdef}	0,037	0,117 ^{ce}	0,008
Fernor	0,632 ^c	0,029	0,138 ^b	0,017	0,105 ^{bcd}	0,006	0,086 ^b	0,006
Lara	1,130 ^a	0,083	0,180 ^{bc}	0,036	0,132 ^{abef}	0,015	0,109 ^{acde}	0,009
Fernette	0,474 ^e	0,088	0,166 ^b	0,010	0,102 ^{bc}	0,004	0,083 ^b	0,001
Franquet	0,610 ^{cd}	0,009	0,182 ^{bc}	0,025	0,134 ^{ab}	0,005	0,118 ^{abcde}	0,026
Mulina 0	0,455 ^e	0,021	0,156 ^b	0,013	0,143 ^{abef}	0,026	0,132 ^{ad}	0,005
Mulina II	0,491 ^e	0,055	0,286 ^a	0,029	0,156 ^{aef}	0,009	0,143 ^{ac}	0,024
Mulina IV	0,498 ^{de}	0,052	0,197 ^{bc}	0,027	0,145 ^a	0,005	0,121 ^{ac}	0,001

Vrednosti z različno nadpisano malo črko (^{a,b,c...}) znotraj istega stolpca se med seboj statistično značilno razlikujejo ($p \leq 0,05$; značilnost razlik med različnimi sortami olja), vrednosti z različno nadpisano veliko črko (^{A,B,C}) znotraj istega stolpca se med seboj statistično značilno razlikujejo ($p \leq 0,05$; značilnost razlik med različnimi temperaturami olja).

Povprečni RSD pri meritvi AOP je znašal 8,8 %. Med svežimi olji ima največji AOP olje Lara (1,130 mmol DPPH/L), ki ima skoraj 2-krat večji AOP kot povprečje vseh olj, ki znaša 0,59 mmol DPPH/L (Preglednica 16). Najmanjši AOP smo določili olju Mulina 0 (0,455 mmol DPPH/L), ki ima kar za 2,5- krat manjši AOP kot olje Lara. Po desetih dneh skladiščenja pri 50 °C se je vsem oljem, ki so imela AOP v svežem olju višji od povprečja (0,59 mmol DPPH/L), le ta zmanjšal pod povprečno vrednostjo, ki znaša 0,183 mmol/L.

Največji AOP smo po desetih dneh določili olju Mulina II (0,286 mmol DPPH/L), najnižji pa olju Adams (0,130 mmol DPPH/L). Po 15 dneh skladiščenja olja se je povprečna vrednost AOP znižala na 0,14 mmol DPPH/L. Pri 20 dneh skladiščenja je povprečni AOP vseh olj znašal 0,115 mmol DPPH/L, kar je več kot petkrat manj kot v svežih vzorcih olja. Najvišji AOP smo, prav tako kot pri času 15 dni, določili v olju Oreh 30 (0,156 mmol DPPH/L). Najnižjo vrednost smo ponovno določili v olju Fernette (0,083 mmol DPPH/L).

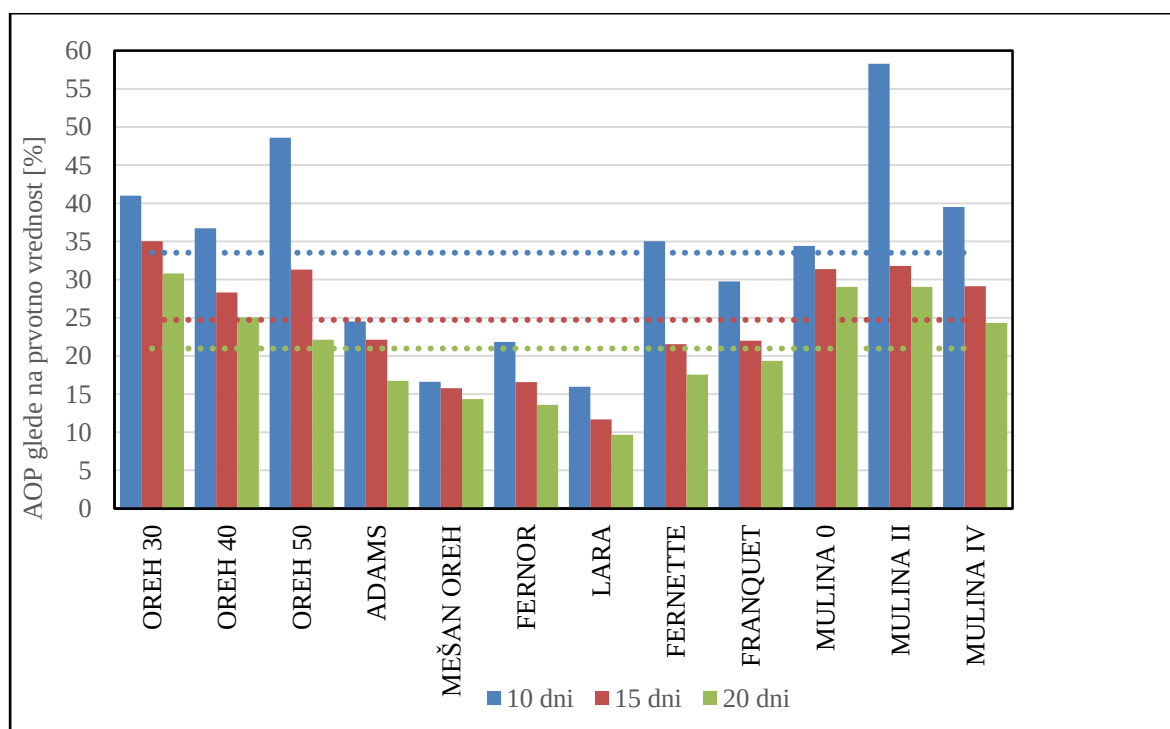
Pri svežih oljih znaša razmerje med najvišjim in najnižjim AOP 2,5, pri oljih po 10 dneh skladiščenja je razmerja 2,2, pri oljih po 15 dneh znaša 1,7 in pri oljih po 20 dneh je 1,9. V celotnem obdobju skladiščenja lahko opazimo, da se to razmerje giblje okoli vrednosti 2. Olje, ki se je vsakokrat najbolj približalo povprečnim vrednostim, je bilo olje Franquet. Pri nekaterih oljih lahko opazimo, da se njihova vrednost glede na povprečno vrednost povečuje. To so olje Oreh 30, ki ima zadnje tri meritve krepko nad povprečnimi, olje Oreh 40 in olje Mulina 0. Adams olje in Fernette olje sta edini med olji, ki sta pri vseh meritvah imela svoj AOP bistveno nižji od povprečnega.

Po prvih 10 dneh skladiščenja pri 50 °C so olja v povprečju izgubila dve tretjini svoje vrednosti AOP, kot nam kaže Slika 22 in imela le 35,5 % prvotne vrednosti AOP. Povprečna vrednost AOP se v nadaljnjih 5 dneh zniža za 10 % prvotne vrednosti in v zadnjih 5 dneh skladiščenju še za 5 % prvotne vrednosti. Po 20 dneh dosegajo olja v povprečju le 21 % prvotne AOP vrednosti. Pri oljih Oreh 30, Mulina 0 in Mulina II se je po dvajset dnevnem skladiščenju ohranilo največ AOP (približno 30 %) prvotne vrednosti.

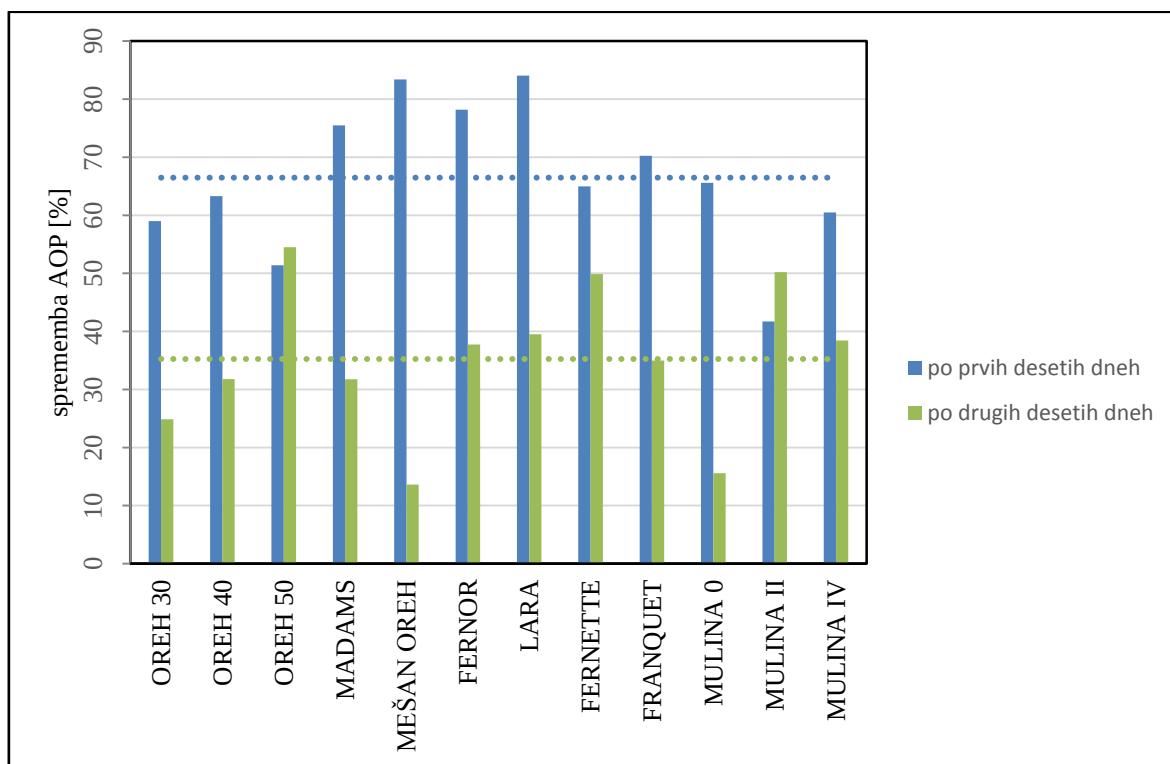
Najmanj se je po 10 dneh znižal AOP tistim oljem, ki so imele izmerjen AOP v svežem olju nižji od povprečja. To so olja Mulina II, ki mu je AOP padel na 58% prvotne vrednosti, olje Oreh 50, s padcem AOP na 48 % prvotne vrednosti, olji Oreh 30 in Mulina IV, katerih vrednost je padla na približno 40 %. Pri vseh teh oljih se je AOP ohranil v največji meri pri čisto vseh meritvah. Najbolj se je AOP znižal, torej najmanj glede na prvotno vrednost ohranil, pri tistih oljih, ki so na začetku imela velik AOP. To so olja Mešan oreh, Fernor in Lara. Po 20 dneh AOP pri olju Mešan oreh znaša 14 %, pri olju Lara pa le 9 % prvotne vrednosti.

Kot rečeno, pade AOP med skladiščenjem prvih 10 dni v povprečju za 66 %, glede na začetno vrednost. V naslednjih 10 dneh (od 10. do 20. dne skladiščenja) pade vrednost AOP glede na meritev pri 10. dnevu skladiščenja še za 30 %, kot prikazuje Slika 23 . Tem povprečnim vrednostim se najboljše približna olje Franquet.

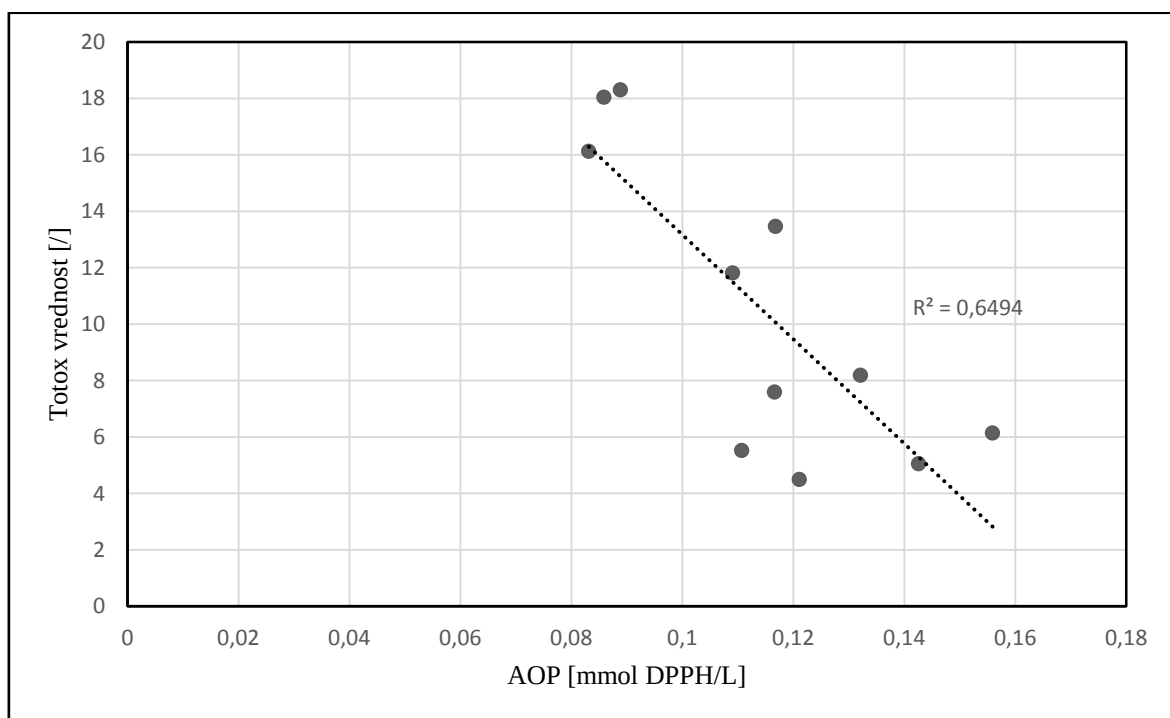
Med AOP vseh svežih vzorcev in vrednostmi *p*-AV, Totox in PŠ nismo našli nobene povezave. Prav tako nismo našli nobene povezave med AOP v olju skladiščenem po 10, 15 in 20 dneh in PUFA vsebnostjo ali *p*-AV v svežih oljih. Najboljše, vendar kljub temu slabo negativno zvezo, smo zasledili med AOP po 20 dnevnem skladiščenju in PŠ ($R^2 = 0,647$) oziroma Totox vrednostjo ($R^2 = 0,649$) za sveža olja, kot prikazuje Slika 24.



Slika 22: Antioksidativni potencial orehovit olj glede na prvotno vrednost za posamezno časovno obdobje skladiščenja pri 50 °C .



Slika 23: Sprememba antioksidativnega potenciala orehovitih olj med posameznimi časovnimi obdobji skladiščenja pri 50 °C glede na prejšnjo vrednost.



Slika 24: Odvisnost AOP po 20 dnevnem skladiščenju od TOTOX vrednosti svežih orehovitih olj

5 SKLEPI

Na podlagi rezultatov smo prišli do naslednjih sklepov:

- Vzorci orehovega olja imajo v svoji MK sestavi največ linolne kisline (povprečno 46 g/100 g olja), oleinske kisline (povprečno 16,6 g/100 g olja) in α -linolenske kisline (9,5 g/100 g olja); za zadovoljitev potreb po omega 3 MK je potrebno zaužiti med 17 g in 33 g orehov na dan; razmerje med omega 6 in omega 3 MK znaša od 4,0 do 5,4, ki se po skladiščenju 20 dni pri 50 °C v temi poslabša in znaša od 5 do 6.
- Vsa analizirana olja imajo dovolj nizko kislinsko stopnjo, katere najvišja vrednost je za nerafinirana olja določena kot 3 % prostih MK, podanih kot oleinska kislina. Olja ne presežejo niti meje 0,3 %, ki je določena za rafinirana olja.
- Največja dovoljena vrednost za PŠ za hladno stiskana nerafinirana olja (14 mekv/kg) ni bila presežena v nobenem vzorcu svežega olja; med našimi vzorci orehovega olja smo določili največjo vrednost za PŠ 12 mekv/kg.
- *p*-AV, ki je pokazatelj prisotnih aldehydov (sekundarnih produktov oksidacije), se je v nekaterih oljih nad vrednostjo 2, kar je meja med kvalitetnimi in nekvalitetnimi olji.
- K indeksu skupne oksidacije olja (Totox vrednost) je največ prispevalo PŠ. Med PŠ in Totox vrednostjo smo opazili dobro pozitivno linearno zvezo, česar ne moremo reči za zvezo med Totox vrednostjo in *p*-AV.
- Med PŠ in konjugiranimi dieni obstaja pozitivna linearna povezava; med konjugiranimi trieni in *p*-AV ni povezave; po skladiščenju 20 dni pri 50 °C v temi je teoretična vrednost PŠ v vseh vzorcih olja presegla dovoljeno mejo 20 mekv/kg (nerafinirana rastlinska olja), oziroma 14 mekv/kg (hladno stiskana nerafinirana olja in rafinirana rastlinska olja).
- Povprečno smo v oljih določili štiri do petkrat več konjugiranih dienov, kot konjugiranih trienov. Vsebnost konjugiranih dienov je po skladiščenju 20 dni pri 50 °C v temi narasla za 250 % do 400 %. Vsebnost konjugiranih trienov je po skladiščenju v nekaterih oljih padla, pri nekateri pa narasla; vsebnost konjugiranih

dienov po 20 dnevnem skladiščenju je v splošnem večja v oljih z več PUFA; med PUFA in konjugiranimi trieni v oljih po skladiščenju je povezava precej slabša.

- Vsi vzorci svežega olja so pokazali AOP, ki pa se je med vzorci razlikoval tudi za faktor 2,5. Po skladiščenju 10 dni pri 50 °C v temi izgubijo olja 2/3 svojega AOP. Po skladiščenju 20 dni pri 50 °C v temi ohranijo olja 1/5 svojega prvotnega AOP. Najmanj AOP je ohranilo olje Lara (le 9 % prvotne vrednosti), največ pa se ga je ohranilo pri oljih Oreh 30, Mulina 0 in Mulina II (približno 30 % prvotne vrednosti). Med zmanjšanjem AOP po skladiščenju in PŠ oziroma Totox vrednostjo svežih olj je povezava. Med zmanjšanjem AOP in PUFA oz. *p*-AV svežih olj ni povezave.

6 POVZETEK

V magistrski nalogi smo analizirali 12 vzorcev orehovega olja. Vsi vzorci olja so bili stiskani pri 30 °C, razen dveh vzorcev, katerih temperatura stiskanja je bila 40 °C in 50 °C. Vsem vzorcem smo določili maščobnokislinsko (MK) sestavo na plinskem kromatografu. Vzorcem smo določili tudi vsebnost primarnih in sekundarnih produktov oksidacije ter antioksidativni potencial (AOP). Pri vseh vzorcih olja smo izvedli poskus skladiščenja olja, tako, da smo vzorce olja hranili v inkubatorju pri 50 °C 20 dni. Med skladiščenjem smo določali spremembo AOP, na koncu skladiščenja pa še vsebnost konjugiranih dienov in konjugiranih trienov.

V okviru magistrske naloge smo želeli, poleg nekaterih zgoraj navedenih kemijskih lastnosti orehovega olja, določiti tudi vpliv sorte na omenjene lastnosti olja. Predvsem smo želeli najti povezave med parametri oksidacije olj, njihovo MK sestavo in AOP olja. MK sestava olj se glede na sorto bistveno ni razlikovala. Največjo vsebnost predstavlja C18:2 MK, ki jo uvrščamo med omega 6 MK, te je v povprečju v naših vzorcih 46,2 g/100 g olja. Razmerje med omega 6 in omega 3 MK je v večini vzorcev dobro (pod priporočenih 5:1). Nad to mejo so se uvrstili trije vzorci olja (Adams, Fernor, in Mulina IV). Po 20 dneh inkubacije smo MK sestavo določili vzorcema Lara, ki je imel eno največjih vsebnosti C18:3 omega 3 MK in Adams z najmanj C18:3 MK. V obeh vzorcih se je MK sestava spremenila, največ v primeru PUFA. Pri olju Lara je prišlo do pretvorbe MK C18:1, C18:2 in C18:3 v skoraj v razmerju (1:12,5:38), ki je blizu tistemu, ki ga navaja teorija (1:12:25) (Hsieh in Kinsella, 1989).

Proste MK in PŠ, kot pokazatelja primarnih produktov oksidacije, v svežih vzorcih nista presegla z zakonom dovoljenih vrednosti. *p*-AV, s katerim določamo sekundarne produkte oksidacije, naj bi v kvalitetnih oljih znašal pod 2 (Jokić in sod., 2014). Nad to mejo sta se uvrstila dva vzorca olja Oreh 30 in Oreh 50, vendar sta kljub temu oba vzorca imela nizko Totox vrednost, zaradi zelo nizkega PŠ. Za sveža olja smo med Totox vrednostjo in PŠ našli dobro linearno pozitivno zvezo. Prav tako za sveža olja smo dobro povezavo določili tudi med parametroma primarne oksidacije, to je med PŠ in konjugiranimi dieni.

Nasprotno, pa je bila zveza med parametroma sekundarne oksidacije, to je med *p*-AV in konjugiranimi trieni, slaba.

Poskus skladiščenja olj pri 50 °C je pokazal, da so vzorci olja največ AOP izgubili med prvimi desetimi dnevi skladiščenja, AOP je v povprečju padel za več kot 65 %, v drugi polovici skladiščenja (naslednjih 10 dni) pa še za dodatnih 30 %. Rezultati kažejo, da je padec AOP po 20 dneh skladiščenja v povezavi s PŠ oziroma Totox vrednostjo svežega olja, ni pa padec AOP, kljub nasprotnemu predvidevanju, v nobeni povezavi z vsebnostjo PUFA. Tudi med temperaturo stiskanja in AOP nismo našli nobene zveze, kot smo predvidevali v eni izmed hipotez.

Med 20 dnevnim skladiščenjem je vsebnost konjugiranih dienov narasla od 250 % do 400 %. Glede na izračunano teoretično vrednost PŠ so taka olja neprimerna za prehrano, saj je teoretična vrednost PŠ v vseh vzorcih presegla mejno dovoljeno vrednost (20 mekv/kg za nerafinirana olja). Pri tem je potrebno poudariti, da smo olja skladiščili pri temperaturi, ki je znatno višja od temperature, ki se običajno uporablja za skladiščenje, zaradi česa je oksidacija nenasičenih MK potekala znatno hitreje. Na splošno je bila vsebnost konjugiranih dienov po 20 dnevnem skladiščenju večja v oljih z več PUFA.

Da je orehovo olje zelo hitro pokvarljivo so dokazali že z Rancimat metodo, kjer so določili obstojnost orehovega olja le 20 dni (Kochhar in Henry, 2009). Najboljša oblika uživanja orehovega olja je, da zaužijemo sveže orehe, če želimo ohraniti čim več omega 3 PUFA in antioksidantov. Orehovo olje pa je potrebno skladiščiti pri čim nižji temperaturi v ustrezni embalaži, ki prepreči dostop svetlobe in v atmosferi brez kisika.

7 VIRI

- Abramovič H. 2011. Antioksidanti in metodologija določanja antioksidativne učinkovitosti: učbenik za izbirni predmet na interdisciplinarnem doktorskem študijskem programu Bioznanosti. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 112 str.
- Antonijevic B., Matthys C., Sioen I., Bilau M., Van Camp J., Willems J.L., De Henauw S. 2007. Simulated impact of a fish based shift in the population n-3 fatty acids intake on exposure to dioxins and dioxin-like compounds. *Food and Chemical Toxicology*, 45, 11: 2279-2286
- AOAC Official Method 965.33. Peroxide value of oils and fats. 1999. V: Official methods of analysis of AOAC international. Cunniff P. (ed.). Vol. 2. 16th ed. Gaithersburg, AOAC International, Chapter 41: 9B-9B
- Bizjak J. 2012. Metode za določanje antioksidativnega potenciala urina. Diplomski seminar. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 22 str.
- Boyer R.F. 2005. Temelji biokemije. Ljubljana, Študentska založba: 634 str.
- Cannon D. 2009. From fish oil to microalgae oil ... A win-win shift for humans and our habitat. *Explore (New York, N.Y.)*, 5, 5: 299-303
- Casas-Agustench P., Bullo M., Ros E., Basora J., Salas-Salvado J. 2011. Cross-sectional association of nut intake with adiposity in a Mediterranean population. *Nutrition, Metabolism, and Cardiovascular Diseases*, 21, 7: 518-525
- Cojocar C., Khayet M., Zakrzewska-Trznadel G., Jaworska A. 2009. Modeling and multi-response optimization of pervaporation of organic aqueous solutions using desirability function approach. *Journal of Hazardous Materials*, 167, 1-3: 52-63
- Crews C., Hough P., Godward J., Brereton P., Lees M., Guiet S., Winkelmann W. 2005. Study of the main constituents of some authentic walnut oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 12: 4853-4860
- Evans P., Halliwell B. 2001. Micronutrients: oxidant/antioxidant status. *British Journal of Nutrition*, 85, 2: 67-74
- Filip S. 2010. Nastanek trans izomerov maščobnih kislin med toplotno obdelavo živil. Doktorska disertacija. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 157 str.
- Frankel E.N. 2005. Lipid oxidation. 2nd ed. Philadelphia, Woodhead Publishing: 488 str.
- Gunstone F.D. 2001. Minor oils, specialty oils, and superrefined oils. V: Structured and modified lipids. Gunstone F.D. (ed.). New York, Taylor & Francis: 185-208
- Hollis J., Mattes R. 2007. Effect of chronic consumption of almonds on body weight in healthy humans. *British Journal of Nutrition*, 98, 3: 651-656

- Hsieh R.J., Kinsella J.E. 1989. Oxidation of polyunsaturated fatty acids: mechanisms, products, and inhibition with emphasis on fish. *Advances in Food and Nutrition Research*, 33, 2: 233-341
- Innis S.M., Friesen R.W. 2008. Essential n-3 fatty acids in pregnant women and early visual acuity maturation in term infants. *American Journal of Clinical Nutrition*, 87, 3: 548-557
- ISO 660. Animal and vegetable fats and oils. Determination of acid value and acidity. 3rd ed. 2009: 9 str.
- Jokić S., Moslavac T., Bošnjak A., Aladić K., Rajić M., Bilić M. 2014. Optimization of walnut oil production. *Croatian Journal of Food Science and Technology*, 6, 1: 27-35
- Kent K.C., Zwolak R.M., Egorova N.N., Riles T.S., Manganaro A., Moskowitz A.J., Gelijns A.C., Greco G. 2010. Analysis of risk factors for abdominal aortic aneurysm in a cohort of more than 3 million individuals. *Journal of Vascular Surgery*, 52, 3: 539-548
- Kochhar S.P., Henry C.J.K. 2009. Oxidative stability and shelf-life evaluation of selected culinary oils. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 60, 7: 289-296
- Kochhar S.P. 1996. Oxidative pathways to the formation of off-flavours. V: Food taints and off-flavours. 2nd ed. Saxby M. J. (ed.). Glasgow, Blackie Academic & Professional: 169-225
- Labrinea E.P., Thomaidis N.S., Georgiou C.A. 2001. Direct olive oil anisidine value determination by flow injection. *Analytica Chimica Acta*, 448: 201-206
- Martinez M.L., Mattea M.A., Maestri D.M. 2006. Varietal and crop year effects on lipid composition of walnut (*Juglans regia*) genotypes. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 83, 9: 791-796
- Morais D., Moraes É., Dantas M., Carraro J., Silva C., Cecon P., Martino D., Ribeiro S. 2011. Heat treatment and thirty-day storage period do not affect the stability of omega-3 fatty acid in brown flaxseed. *Food and Nutrition Sciences*, 2, 4: 281-286
- Pokorn D. 2005. Prehrana. V: Interna medicina. Kocjančič A., Mrevlje F., Štajer D. (ur.). Ljubljana, Littera picta: 646-680
- Pravilnik o kakovosti jedilnih rastlinskih olj jedilnih rastlinskih masteh in majonezi. 2009. Uradni list Republike Slovenije, 19, 79: 10635-10641
- Prevc T., Segatin N., Ulrih N.P., Cigic B. 2013. DPPH assay of vegetable oils and model antioxidants in protic and aprotic solvents. *Talanta*, 109: 13-19
- Referenčne vrednosti za vnos hranil. 2004. Ljubljana, Ministrstvo za zdravje: 215 str.
- Salgin S., Salgin U. 2006. Supercritical fluid extraction of walnut kernel oil. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 108, 7: 577-582

- Salobir K. 2001. Prehransko fiziološka funkcionalnost maščob. V: Funkcionalna hrana: 50 let živilstva. 21. Bitenčevi živilski dnevi, Portorož, 8. in 9. november 2001. Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 121-135
- Savage G.P., Dutta P.C., McNeil D.L. 1999. Fatty acid and tocopherol contents and oxidative stability of walnut oils. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 76, 9: 1059-1063
- Shahidi F., Wanasundara U.N. 2008. Methods for measuring oxidative rancidity in fats and oils. V: *Food lipids: chemistry, nutrition, and biotechnology*. 3rd ed. Akoh C.C., Min D.B. (eds.). Boca Raton, CRC Press: 387-409
- USDA. 2010. ORAC Values, the best antioxidants & superfoods. Miles City, USDA: baza podatkov
<http://www.oracvalues.com/> (Julij 2012)
- Vidrih R., Hribar J., Solar A., Zlatić E. 2012. The influence of atmosphere on the oxidation of ground walnut during storage at 20 °C. *Food Technology and Biotechnology*, 50, 4: 454-460
- Wanasundara P., Shahidi F. 2008. Extraction and analysis of lipids. V: *Food lipids: chemistry, nutrition, and biotechnology*. 3rd ed. Akoh C.C., Min D.B. (eds.). Boca Raton, CRC Press: 125-157
- Wang Y., Lehane C., Ghebremeskel K., Crawford M.A. 2010. Modern organic and broiler chickens sold for human consumption provide more energy from fat than protein. *Public Health Nutrition*, 13, 03: 400-408

ZAHVALA

Za strokovno vodenje, pomoč in veliko mero potrpljenja se zahvaljujem mentorici prof. dr. Heleni Abramovič in somentorja prof. dr. Rajku Vidrihu. Recenzentu doc. dr. Tomažu Polaku za dobre predloge in rešitve.

Hvala Tjaši Prevc za vse “insajderske” nasvete in rešitve med praktičnim delom magistrske naloge.

Hvala gospem Katji Černe, Mariji Pintar in Danici Gašpić za veliko človeških nasvetov, najrazličnejših zgodbic in prijaznih nasmehov, ki so mi jih namenile v vseh letih študija.

Hvala staršema Martini in Igorju, ki sta me med študijem finančno in moralno podpirala.

In navsezadnje hvala puncu Anji, ki me je s trdim delom, trdom in veliko ljubezni spremenila v takšnega človeka kot sem danes.