

Karolina Stanicka¹, *Magdalena Woźniak¹, Katarzyna Sosnowska²,
Lucyna Mrówczyńska², Anna Sip³, Agnieszka Waśkiewicz¹, Izabela Ratajczak¹

Aktywność biologiczna i profil fenolowy ekstraktu z łupiny orzecha włoskiego

Biological activity and phenolic profile of walnut shell extract

¹Katedra Chemii, Wydział Leśny i Technologii Drewna, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu
Kierownik Katedry: dr hab. inż. Izabela Ratajczak, prof. UPP

²Zakład Biologii Komórki, Wydział Biologii, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu
Kierownik Zakładu: dr hab. Andrzej Lesicki, prof. UAM

³Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności, Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu,
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu
Kierownik Katedry: dr hab. Wojciech Białas, prof. UPP

SUMMARY

Introduction. Walnut products are widely used. Green fruits, shells, leaves and bark have a high phenolic content and are used in the pharmaceutical and cosmetic industries. Seeds rich in unsaturated fatty acids are used in the food industry. Walnut wood is also valuable.

Aim. The aim of the study was to determine the microbiological, antioxidant activity and concentration of phenolic acids of walnut shell extract.

Material and methods. The methanol extract of walnut shells from trees growing in Greater Poland was used for the research. The antibacterial activity was determined by the point diffusion method against 7 strains of gram-positive bacteria and 6 strains of gram-negative bacteria. The method with the DPPH radical and the ability to chelate Fe²⁺ ions were used to determine the antioxidant activity. The content of phenolic compounds in the tested extract was also determined using the chromatographic method.

Results. The tested walnut shell extract showed moderate antibacterial activity against gram-positive and gram-negative bacteria and high antioxidant activity in the radical cation test and lower chelating activity in the ferrozine test. Moreover, in the tested walnut shell extract, a higher concentration of phenolic acids, mainly caffeic acid, was determined as compared to the concentration of flavonoids.

Conclusions. The tested walnut shell extract showed antiradical activity; therefore, it can be an alternative to synthetic antioxidants. The fact that shells are a by-product of the food industry is an added advantage when used in other industries as well.

Keywords: walnut, antibacterial activity, antioxidant properties, phenolic compounds

STRESZCZENIE

Wstęp. Produkty pochodzące z orzecha włoskiego mają szerokie zastosowanie. Zielone owoce, łupiny, liście oraz kora cechują się dużą zawartością związków fenolowych i są wykorzystywane w przemyśle farmaceutycznym oraz kosmetycznym. Nasiona bogate w nienasycone kwasy tłuszczowe są stosowane w przemyśle spożywczym. Cenne jest również drewno orzecha włoskiego.

Cel pracy. Celem pracy było określenie aktywności mikrobiologicznej, przeciwutleniającej oraz oznaczenie zawartości związków fenolowych ekstraktu z łupin orzecha włoskiego.

Material i metody. Do badań wykorzystano ekstrakt metanolowy z łupin orzecha włoskiego z drzew rosnących na terenie Wielkopolski. Aktywność przeciwbakteryjną badano metodą punktowo-dyfuzyjną wobec 7 szczepów bakterii Gram-dodatnich oraz 6 szczepów bakterii Gram-ujemnych. Do oznaczenia aktywności przeciwutleniającej wykorzystano metodę z rodnikiem DPPH oraz zdolność chelatowania jonów Fe²⁺. W badanym ekstrakcie oznaczono również zawartość związków fenolowych metodą chromatograficzną.

Wyniki. Badany ekstrakt z łupin orzecha włoskiego wykazywał umiarkowaną aktywność przeciwbakteryjną wobec bakterii Gram-dodatnich oraz bakterii Gram-ujemnych oraz wysoką aktywność przeciwutleniającą w teście z kationorodnikiem i niższą aktywność chelatującą w teście z ferrozyną. Ponadto, w badanym ekstrakcie z łupin orzecha włoskiego oznaczono wyższe stężenie kwasów fenolowych, w tym głównie kwasu kawowego, w porównaniu ze stężeniem flawonoidów.

Wnioski. Badany ekstrakt z łupin orzecha włoskiego wykazuje aktywność przeciwrodnikową, dlatego może stanowić alternatywę dla syntetycznych antyoksydantów. Fakt, że łupiny owoców orzecha włoskiego są produktem ubocznym przemysłu spożywczego, stanowi dodatkową zaletę przy wykorzystaniu ich również w innych gałęziach przemysłu.

Słowa kluczowe: orzech włoski, aktywność przeciwbakteryjna, właściwości przeciwutleniające, związki fenolowe

Wprowadzenie

Rodzina orzechowatych (*Juglandaceae*) obejmująca kilka gatunków drzew i krzewów jest szeroko rozpowszechniona na całym świecie, a jednym z najpopularniejszych jej przedstawicieli jest orzech włoski (*Juglans regia* L.). Orzech włoski jest uprawiany komercyjnie w całej Europie Południowej, Afryce Północnej, Azji Wschodniej, Stanach Zjednoczonych i zachodniej Ameryce Południowej. Jego nasiona są bogate w białko (do 24%), węglowodany (12-16%), tłuszcze (60-67%), błonnik (1,5-2,0%) oraz minerały (1,7-2%). Cechuje je również wysoka wartość energetyczna wynosząca 630 kcal/100 g (1-4). Ze względu na właściwości odżywcze i prozdrowotne orzechy są chętnie spożywane na całym świecie, dlatego stanowią wartościowy surowiec dla przemysłu spożywczego (1-3, 5). Cenionymi surowcami są także drewno i owoce orzecha włoskiego.

Produkty pochodzące z *Juglans regia* L. znajdują zastosowanie w wielu dziedzinach. Od wieków zielone orzechy włoskie, łupiny, liście oraz kora drzew były wykorzystywane w przemyśle farmaceutycznym oraz kosmetycznym. Liście orzecha włoskiego są uważane za bogate źródło związków aktywnych i dlatego w medycynie ludowej były wykorzystywane w leczeniu m.in. niewydolności żylnej, stanów zapalnych skóry, nadmiernej potliwości i owrzodzeń. Wykazują one ponadto właściwości przeciwbiegunkowe, przeciwdrobnoustrojowe, antyseptyczne oraz ściągające (3, 5). Wysuszone liście orzecha włoskiego służą do przygotowania naparów, stosowanych głównie zewnętrznie. Łupiny orzechów włoskich są natomiast powszechnie używane jako materiał ścierny, m.in. do polerowania miękkich metali, kamieni, włókna szklanego, tworzyw sztucznych czy drewna, a także jako dobre medium filtracyjne, wykorzystywane do oddzielania ropy naftowej, materiałów niebezpiecznych oraz metali ciężkich od wody (5, 6).

Liście i owoce orzecha włoskiego są bogate w związki fenolowe zdolne do redukcji stresu oksydacyjnego oraz hamowania utleniania makrocząsteczkowego. Do głównych grup związków fenolowych obecnych w liściach należą naftochinony i flawonoidy (3, 7). Owoce orzechów włoskich są natomiast bogate w polifenole (przede wszystkim kwas elagowy i kwas galusowy), elagotaniny (garbniki) oraz związki o silnym działaniu przeciwutleniającym, takie jak melatonina (4). Nasiona orzecha włoskiego są cennym źródłem nienasyconych kwasów tłuszczowych i tokoferoli, a ich spożywanie zmniejsza ryzyko wystąpienia nowotworów i choroby wieńcowej serca.

Obecnie wśród konsumentów obserwuje się rosnącą tendencję do ograniczania spożycia produktów z dodatkiem syntetycznych konserwantów chemicznych. Sprzyja to poszukiwaniu nowych substancji konserwujących. Dobrą alternatywą dla konserwantów chemicznych wydają się być substancje pochodzenia roślinnego. Wiele roślin jest bowiem źródłem związków o działaniu przeciwdrobnoustrojowym. Przykładem może być juglon – związek fenolowy występujący we wszystkich częściach orzecha włoskiego. Roślinne produkty uboczne, np. łupiny orzecha włoskiego, stanowią zatem potencjalne źródło nie tylko naturalnych przeciwutleniaczy, ale i substancji przeciwdrobnoustrojowych (5, 8).

Cel pracy

Celem pracy było określenie aktywności mikrobiologicznej oraz przeciwutleniającej oraz składu związków fenolowych ekstraktu z łupin orzecha włoskiego *Juglans regia* L.

Materiał i metody

Ekstrakt z łupin orzecha włoskiego

Do badań wykorzystano łupiny orzechów włoskich pozyskanych z drzew rosnących na terenie Wielkopolski. Łupiny orzecha włoskiego zmielono za pomocą młynka laboratoryjnego i ekstrahowano metanolem (Avantor Performance Materials) (1:10, m/v) z wykorzystaniem wytrząsarki laboratoryjnej (Biosan). Ekstrakcję prowadzono przez 24 godz. w temperaturze pokojowej. Następnie, otrzymany roztwór przesączono i zatężono do stałej masy z wykorzystaniem wyparki próżniowej (Buchi Labortechnik AG). Pozostałość po odparowaniu rozpuszczalnika, ponownie rozpuszczono w alkoholu metylowym. Otrzymany ekstrakt wykorzystano do określenia jego aktywności biologicznej oraz zawartości związków fenolowych.

Aktywność przeciwutleniająca

Zdolność zmiatania kationorodnika DPPH

Aktywność przeciwutleniającą ekstraktu zbadano poprzez określenie jego zdolności do zmiatania kationorodnika DPPH (1,1-difenylo-2-pikrylohydrazyl) (Sigma-Aldrich). Do próby ekstraktu o objętości 0,2 ml i stężeniu 0,1 mg/ml dodano 0,2 ml etanolewego roztworu 0,1 mM DPPH (2,2-difenylo-1-pikrylohydrazyl) (Sigma-Aldrich) i inkubowano przez 30 min w temperaturze pokojowej, bez dostępu światła. Następnie zmierzono absorbancję roztworów z wykorzystaniem spektrofotometru GENESYS 10UV (Thermo

Scientific) przy długości fali $\lambda = 517$ nm. Jako związek referencyjny zastosowano Trolox (Sigma-Aldrich). Na podstawie uzyskanych wartości absorbancji obliczono aktywność przeciwrodnikową (AP) badanych produktów, stosując następujące równanie:

$$AP (\%) = [(A_0 - A_1) / A_0] \times 100\%,$$

gdzie: A_0 – absorbancja próbki kontrolnej,
 A_1 – absorbancja próby zawierającej ekstrakt z łupin orzecha włoskiego.

Analiza aktywności przeciwrodnikowej ekstraktu z łupin orzecha włoskiego w teście z kationorodnikiem DPPH została przeprowadzona trzykrotnie, a przedstawione wyniki są wartością średnią z tych oznaczeń.

Ocena zdolności ekstraktu do chelatowania jonów żelaza (Fe^{2+}) w reakcji z ferrozyną

Zdolność ekstraktu z łupin orzecha włoskiego do chelatowania jonów żelaza (Fe^{2+}) oznaczono spektrofotometrycznie na podstawie oceny hamowania formowania kompleksu Fe^{2+} z ferrozyną. Do 0,2 ml ekstraktu o stężeniu 0,1 mg/ml dodano 0,05 ml roztworu $FeCl_2$ (Sigma-Aldrich) o stężeniu 0,6 mM. Następnie wprowadzono 0,05 ml roztworu ferrozyny (Sigma-Aldrich) o stężeniu 5 mM, wytrząsano i mierzono absorbancję przy $\lambda = 562$ nm z wykorzystaniem spektrofotometru GENESYS 10UV (Thermo Scientific). Jako związek referencyjny zastosowano EDTA (kwas etylenodiaminotetraoctowy, Sigma-Aldrich). Zdolność badanego ekstraktu do chelatowania jonów żelaza (II) wyrażono w %, stosując następujące równanie:

$$\text{Zdolność chelatowania } Fe^{2+} (\%) = [1 - (Abs_1 / Abs_0)] \times 100\%,$$

gdzie: Abs_0 – wartość absorbancji próby bez ekstraktu z łupin orzecha włoskiego,
 Abs_1 – wartość absorbancji w obecności ekstraktu z łupin orzecha włoskiego.

Analizę aktywności chelatującej ekstraktów z łupin orzecha włoskiego w teście z ferrozyną przeprowadzono dwukrotnie, a przedstawione wyniki są wartością średnią z tych pomiarów.

Aktywność przeciwbakteryjna

Aktywność przeciwbakteryjną ekstraktu z łupin orzecha włoskiego oznaczono metodą punktowo-dyfuzyjną wobec bakterii Gram-dodatnich: *Listeria* (*L. innocua*, *L. monocytogenes*), *Enterococcus* (*E. faecium*, *E. faecalis*), *Staphylococcus aureus*, *Bacillus* (*B. cereus*, *B. megaterium*) oraz bakterii Gram-ujemnych: *Escherichia*

coli, *Salmonella* (*S. enteritidis*, *S. Typhimurium*, *S. paratyphi*), *Yersinia enterocolitica* i *Pseudomonas aeruginosa*. Szczepy użyte w badaniach jako wskaźniki pochodziły z kolekcji czystych kultur Katedry Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu. Ich hodowle prowadzono w bulionie BHI (Oxoid) w temperaturze 37°C w warunkach tlenowych. Kulturami w fazie logarytmicznego wzrostu o stężeniu 10^6 jtk/ml inokulowano płytki Periego z podłożem Müller-Hinton Agar (Oxoid). Na zaszczerpione płytki nanoszono następnie 10 μ l próbek metanolowych roztworów badanych produktów o stężeniu 100 mg/ml. Kontrole stanowiły roztwory samego rozpuszczalnika (metanol). Płytki inkubowano w temperaturze 37°C przez 18-24 godz. Po inkubacji mierzono w mm średnicę powstałych stref przejaśnień. Pomiarów tych dokonywano za pomocą Computer Scanning System (MultiScanBase v14.02). Uzyskane wielkości, po uwzględnieniu aktywności rozcieńczalnika, traktowano jako wyznacznik aktywności przeciwbakteryjnej badanego ekstraktu.

Analiza związków fenolowych

W ekstrakcie z łupin orzecha włoskiego oznaczono stężenie wybranych związków fenolowych: kwasu synapowego, kwasu hydroksycynamonowego, rutozydu, mirycetyny, pinobanksyny, naringeniny, kwercetyny, CAPE, pinocembryny, apigeniny, kemferolu, pinostrobinu, galanginy, chryzyny, katechiny, kwasu wanilinowego, kwasu syringowego, epikatechiny, kwasu kawowego, kwasu kumarowego, kwasu ferulowego oraz kwasu cynamonowego. Suchą pozostałość uzyskaną po odparowaniu rozpuszczalnika z ekstraktu rozpuszczono w alkoholu metylowym o czystości HPLC (Sigma-Aldrich) i wykorzystano do oznaczeń wymienionych związków przy użyciu ultrasprawniej chromatografii cieczowej z detekcją fotodiodową (Aquity PDA e λ Detector, $\lambda = 280$ oraz 309 nm) oraz masową (UPLC/PDA/TQD) z zastosowaniem aparatu Waters Aquity™ (Waters Company). Identyfikację jakościową i ilościową związków fenolowych przeprowadzono z użyciem kolumny chromatograficznej ACQUITY UPLC HSS T3 firmy Waters, 1,8 μ m, 2,1 x 150 mm, stosując jako fazę nośną roztwory: linia A – 0,1% wodny roztwór HCOOH; linia B – 0,1% roztwór HCOOH w acetonitrylu (Sigma-Aldrich) w trybie gradientowym. Identyfikacji jonów macierzystych dokonywano w trybie jonów dodatnich, stosując jonizację typu elektro spray. Przedstawione wyniki są wartością średnią z trzech pomiarów i przedstawiają zawartość analizowanego związku na gram suchej pozostałości po odparowaniu rozpuszczalnika.

Wyniki i ich omówienie

W badaniach oceniono aktywność metanolowego ekstraktu z łupin owoców orzecha włoskiego wobec bakterii Gram-dodatnich oraz bakterii Gram-ujemnych. Wyniki tych oznaczeń zostały przedstawione na rycinie 1.

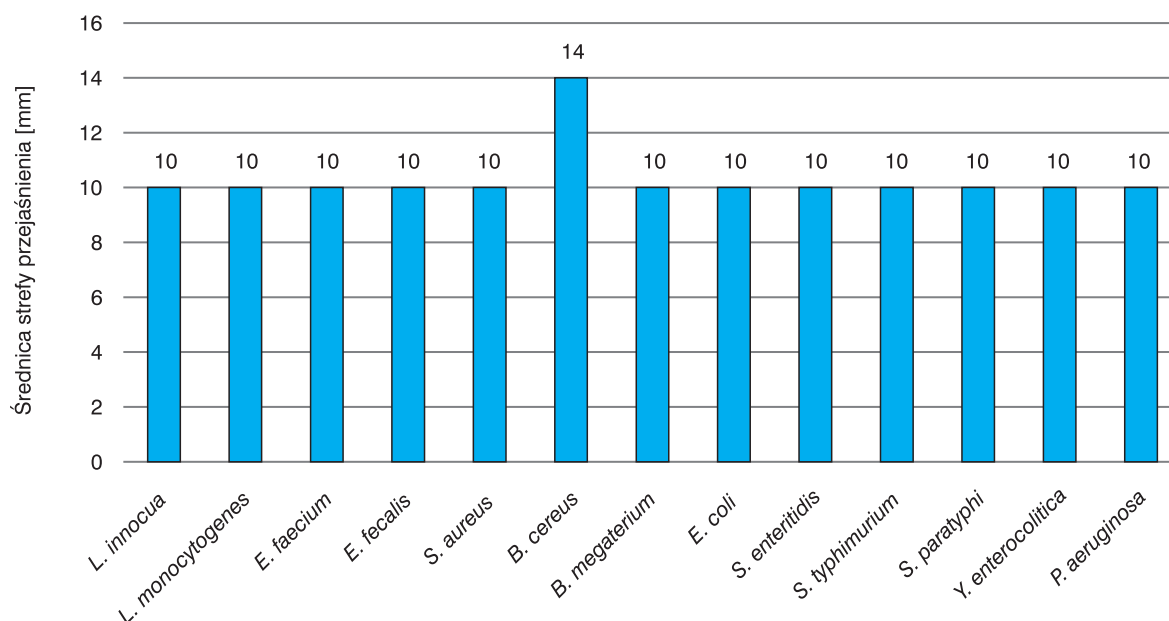
Metanolowy ekstrakt z łupin owoców orzecha włoskiego najsilniej ograniczał wzrost bakterii Gram-dodatnich *B. cereus*. Względem innych bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych ekstrakt wykazywał mniejszą aktywność, która kształtowała się na poziomie 10 mm średniej strefy inhibicji.

Wyniki badań przeprowadzone przez Moghaddam i wsp. (9) dotyczące aktywności biologicznej metanolowego ekstraktu z łupin orzecha włoskiego wobec szczepów bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych wykazały, że ekstrakt ten charakteryzował się różną aktywnością wobec różnych badanych szczepów drobnoustrojów. Zaobserwowane strefy inhibicji wahały się od 6 do 21 mm. Metanolowy ekstrakt z łupin wykazywał największą aktywność wobec *S. aureus* – średnica strefy inhibicji jego wzrostu wyniosła 21 mm. Z kolei Fernández-Agulló wraz z zespołem (5) badali właściwości przeciwbakteryjne wodnego ekstraktu z zielonej okrywy owoców orzecha włoskiego. Badania wykazały jego aktywność przeciwdrobnoustrojową wobec bakterii Gram-dodatnich, a największą w stosunku do *B. cereus*. Ekstrakt ten, w odróżnieniu od badanego w pracy ekstraktu, nie wykazał jednak aktywności w stosunku do bakterii Gram-ujemnych. Brak aktywności

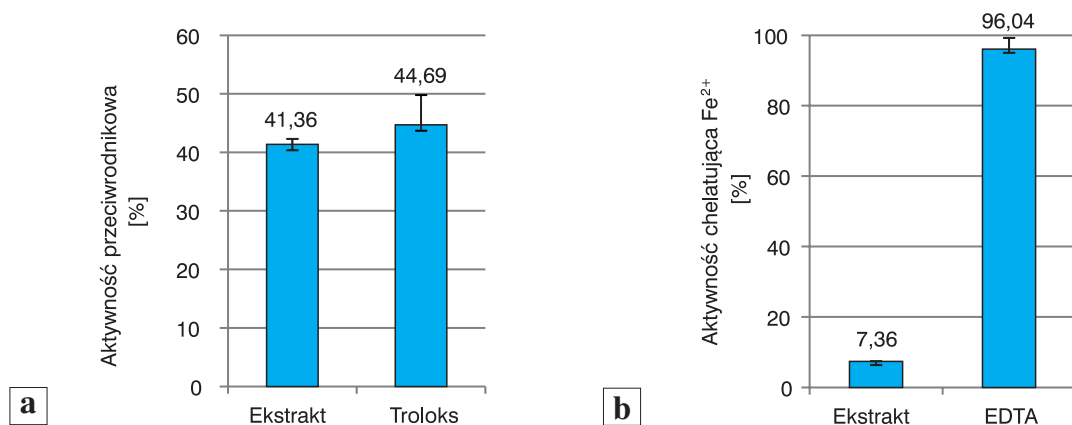
przeciwbakteryjnej ekstraktu wodnego z łupin owoców orzecha włoskiego wobec szczepów bakterii Gram-ujemnych odnotowali w swoich badaniach również Moghaddam i wsp. (9). Różnice w aktywności przeciwbakteryjnej badanych ekstraktów wynikają z różnych rozpuszczalników zastosowanych do ekstrakcji, tj. wody i metanolu. Działanie przeciwdrobnoustrojowe ekstraktów jest związane ze zdolnością związków bioaktywnych do penetracji błony zewnętrznej i dotarcia do miejsca ich działania. Wpływ na tę zdolność ma ich wielkość oraz kształt. Związki obecne w wodnym ekstrakcie z zielonej okrywy owoców orzecha włoskiego prawdopodobnie nie mogły przejść przez błonę komórkową, a tym samym wykazywały niższą aktywność biologiczną w porównaniu do ekstraktu alkoholowego (9). Przyczyną zróżnicowanych aktywności mogą być również różnice w składzie badanych ekstraktów.

Aktywność przeciwutleniającą ekstraktu z łupin określono poprzez wyznaczenie jego aktywności przeciwrodnikowej, którą przedstawiono na rycinie 2a, oraz zdolności do chelatowania jonów Fe^{2+} , która została przedstawiona na rycinie 2b.

Badany ekstrakt z łupin wykazywał wysoką aktywność przeciwrodnikową ($41,36\% \pm 0,94$), co stanowi ponad 90% aktywności Troloksu ($44,69\% \pm 5,1$), zastosowanego jako standardowy antyoksydant. Zdolność chelatowania jonów Fe^{2+} ekstraktu ($7,36\% \pm 0,11$) jest znacząco niższa w porównaniu z aktywnością EDTA ($96,04\% \pm 3,21$), użytego jako związek referencyjny.



Ryc. 1. Aktywność przeciwbakteryjna ekstraktu z łupin orzecha włoskiego

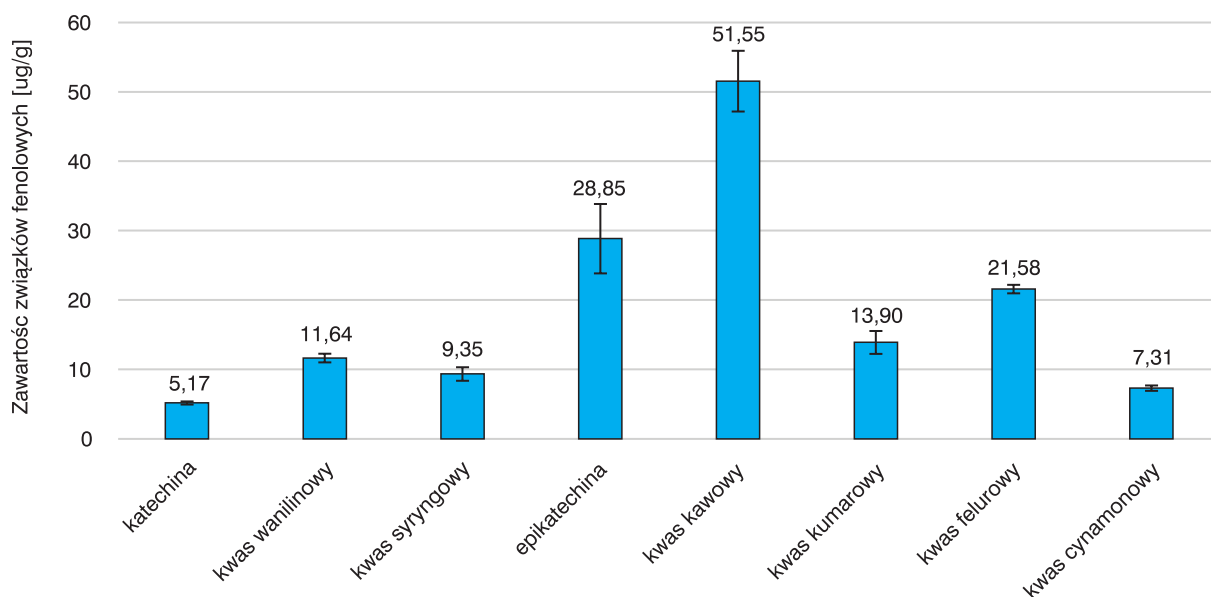


Ryc. 2a, 2b. Aktywność przeciwrodnikowa (a) oraz zdolność do chelatowania jonów Fe²⁺ (b) ekstraktu z łupin

Dostępne dane literaturowe wskazują, że aktywność przeciwutleniająca ekstraktów z łupin orzecha włoskiego może być różna w zależności od metod ekstrakcji oraz użytego rozpuszczalnika (7). Wysoką aktywność antyoksydacyjną metanolowego ekstraktu z łupin orzecha włoskiego potwierdzili w swoich badaniach Ghasemi i wsp. (8). Również dane uzyskane przez Moghaddam i wsp. (9) wskazują, że ekstrakt metanolowy z łupin *Juglans regia* L. jest bogaty w kwasy fenolowe i flawonoidy oraz wykazuje znaczną zdolność zmiatania wolnych rodników, którą można porównywać do syntetycznego związku przeciwutleniającego BHT. Potwierdzają to również badania przeprowadzone przez Cosmulescu i wsp. (10). Na podstawie uzyskanych wyników Moghaddam i wsp. (9) stwierdzili,

że ekstrakt metanolowy z łupin orzecha włoskiego może okazać się skuteczny w leczeniu chorób wywołanych przez wolne rodniki, powstające w organizmie w nadmiarze i w efekcie generujące stres oksydacyjny, dlatego może być alternatywnym źródłem dla syntetycznych antyoksydantów, w tym BHT.

W badanym ekstrakcie z łupin orzecha włoskiego oznaczono stężenie związków fenolowych metodą chromatograficzną. Spośród 22 analizowanych związków, stężenie 15 (kwas synapowy, kwas hydroksycynamonowy, rutozyd, mirycetyna, pinobanksyna, naringenina, kwercetyna, CAPE, pinocembryna, apigenina, kemferol, pinostorbina, galangina, kamferol, chryzyna) znajdowało się poniżej progu wykrywalności stosowanej techniki analitycznej. Stężenie katechiny,



Ryc. 3. Zawartość związków fenolowych w ekstrakcie z łupin owoców orzecha włoskiego

kwasu wanilinowego, kwasu syringowego, epikatechiny, kwasu kawowego, kwasu kumarowego, kwasu ferulowego oraz kwasu cynamonowego oznaczone w badanym ekstrakcie zostało przedstawione na rysunku 3.

Analiza profilu fenolowego ekstraktu z łupin wykazała, że charakteryzuje się on wyższą zawartością kwasów fenolowych niż flawonoidów. Najwyższe stężenie spośród analizowanych fenoli oznaczono dla kwasu kawowego (55,55 µg/g). Zawartość epikatechiny w badanym ekstrakcie z łupin orzecha była również wysoka i wynosiła 28,85 µg/g. Obecność związków fenolowych w ekstraktach z owoców orzechów włoskich została stwierdzona przez Trandafir i wsp. (11), którzy do ekstrakcji użyli jednak innych rozpuszczalników. W związku z tym w analizowanych przez nich próbkach przeważały flawonoidy, głównie mircetyna, katechina i epikatechina. Badania ww. zespołu wykazały ponadto, że zawartość analizowanych związków fenolowych w poszczególnych warstwach orzecha różniła się. Dodatkowo zależała ona od metody ekstrakcji, a także użytego rozpuszczalnika. Badania przeprowadzone przez Moghaddam i wsp. (9) wskazały, że najwyższa zawartość polifenoli występowała

w endokarpie, a następnie w egzokarpie i mezokarpie orzecha włoskiego. Na efektywność ekstrakcji związków fenolowych wpływa rodzaj użytego rozpuszczalnika. Ze względu na polarność związków fenolowych oraz ich dobrą rozpuszczalność w alkoholach stanowią one skuteczny i często wykorzystywany rozpuszczalnik ekstrakcyjny. Wyniki badań uzyskane przez Trandafir i wsp. (11) wykazały, że spośród badanych rozpuszczalników najbardziej efektywny był metanol.

Wnioski

1. Metanolewy ekstrakt z łupin owoców orzecha włoskiego wykazywał umiarkowaną aktywność wobec badanych szczepów bakterii, zarówno Gram-dodatnich, jak i Gram-ujemnych. Najwyższą aktywność wykazywał on wobec bakterii Gram-dodatnich *B. cereus*.
2. Badany ekstrakt wykazywał wysoką aktywność przeciwrodnikową w teście z DPPH oraz niższą zdolność chelatowania jonów Fe²⁺.
3. Zawartość związków fenolowych w analizowanym ekstrakcie z łupin była zróżnicowana, a ekstrakt charakteryzował się wyższą zawartością kwasów fenolowych niż flawonoidów.

Piśmiennictwo

1. Czerniewicz P, Kopczyńska A, Chrzanowski G. Biological activity of phenolic acids extracts against the grain aphid (*Sitobion avenae* F.). *Prog Plant Prot* 2018; 58:256-63.
2. Kryczyk A, Piotrowska J, Opoka W i wsp. Surowce i substancje pochodzenia naturalnego stosowane w fotoprotekcji. *Pol J Cosmetol* 2018; 21:25-32.
3. Pereira J, Oliveira I, Sousa A i wsp. Walnut (*Juglans regia* L.) leaves: Phenolic compounds, antibacterial activity, and antioxidant potential of different cultivars. *Food Chem Toxicol* 2007; 45:2287-95.
4. Syed A, Adil G, Mudasir A i wsp. Antioxidant and antiproliferative activity of walnut extract (*Juglans regia* L.) processed by different methods and identification of compounds using GC/MS and LC/MS technique. *J Food Process Pres* 2016; 41(1):1-9.
5. Fernández-Agulló A, Pereira E, Freire MS i wsp. Influence of solvent on the antioxidant and antimicrobial properties of walnut (*Juglans regia* L.) green husk extracts. *Ind Crop Prod* 2013; 42:126-32.
6. Jahanban-Esfahlan A, Ostadrahimi A, Tabibiazar M i wsp. A comparative review on the extraction, antioxidant content and antioxidant potential of different parts of walnut (*Juglans regia* L.) fruit and tree. *Molecules* 2019; 24:1-40.
7. Castro-López C, Ventura-Sobrevilla J, González-Hernández M i wsp. Impact of extraction techniques on antioxidant capacities and phytochemical composition of polyphenol-rich extracts. *Food Chem* 2017; 237:1139-48.
8. Ghasemi K, Ghasemi Y, Ehteshamnia A i wsp. Influence of environmental factors on antioxidant activity, phenol and flavonoids contents of walnut (*Juglans regia* L.) green husks. *J Med Plant Res* 2011; 5:1128-33.
9. Moghaddam P, Mohammadi A, Feyzi P i wsp. *In vitro* antioxidant and antibacterial activity of various extracts from exocarps and endocarps of walnut. *Pak J Pharm Sci* 2017; 30:1725-31.
10. Cosmulescu S, Trandafir I, Nour V i wsp. Phenolics content, antioxidant activity and color of green walnut extracts for preparing walnut liquor. *Not Bot Horti Agrobo* 2014; 42:551-5.
11. Trandafir I, Cosmulescu S, Nour V. Phenolic profile and antioxidant capacity of walnut extract as influenced by the extraction method and solvent. *Int J Food Eng* 2017; 13(1):1-8.

Konflikt interesów

Conflict of interest

Brak konfliktu interesów

None

otrzymano/received: 11.02.2022

zaakceptowano/accepted: 17.02.2022

Adres/address:

*dr n. leśn. Magdalena Woźniak

Katedra Chemii

Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

ul. Wojska Polskiego 75, 60-625 Poznań

tel.: +48 (61) 848-78-38

e-mail: magdalena.wozniak@up.poznan.pl