

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

# DIPLOMSKI RAD

Zagreb, srpanj 2021.

Marija Moslavac

1425/USH

**UTJECAJ KULTIVARA I  
GEOGRAFSKOG PORIJEKLA NA  
UDJEL I SASTAV STEROLA U  
BUČINOM ULJU**

Rad je izrađen u Laboratoriju za tehnologiju ulja i masti na Zavodu za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom prof. dr. sc. Sandre Balbino, Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu te uz pomoć doc. dr. sc. Marka Obranovića.

Ovaj diplomski rad izrađen je u sklopu projekta „Utjecaj kultivara i sezone uzgoja na kemijske parametre ulja“ financiranog od Hrvatske agencije za poljoprivredu i hranu.

*Prvenstveno se zahvaljujem svojoj mentorici prof. dr. sc. Sandri Balbino na odvojenom vremenu i nesebičnoj pomoći u svakom trenutku prilikom izrade rada te izrazitoj stručnosti i pristupačnosti u komunikaciji.*

*Također, upućujem zahvale doc. dr. sc. Marku Obranoviću i tehničkoj suradnici Melisi Trputec, koji su mi pomogli prilikom izvođenja eksperimentalnog dijela rada.*

*Zahvaljujem se i prijateljima i kolegama sa studija s kojima sam provela lijepo studentske dane.*

*Posebna zahvala i mom malom četveronožnom najboljem prijatelju koji me je svakodnevno uveseljavao tijekom studiranja.*

*Na kraju, najviše se zahvaljujem svojim roditeljima i predivnom dečku na neizmjernoj pomoći, podršci i vjeri u mene tijekom cijelog studija, ali i tijekom moga cjeloživotnog putovanja te ovaj rad posvećujem upravo njima.*

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Zavod za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo  
Laboratorij za tehnologiju masti i ulja

**Znanstveno područje:** Biotehnički znanosti

**Znanstveno polje:** Prehrambena tehnologija

### UTJECAJ KULTIVARA I GEOGRAFSKOG PORIJEKLA NA UDJEL I SASTAV STEROLA U BUČINOM ULJU

*Marija Moslavac, 1425/USH*

**Sažetak:** Cilj ovog rada bio je ispitati razlike u sastavu sterola bučinih ulja različitog geografskog porijekla. Sastav sterola utvrđen je metodom HRN EN ISO 12228:2004. Analizirana su 53 uzorka iz 10 županija kontinentalne Hrvatske pri čemu je bilo zastupljeno 5 kultivara, samostalno ili u kombinaciji. Kod svih uzoraka utvrđeni su udjeli 13 različitih sterola te je određena ukupna količina sterola u mg kg<sup>-1</sup>. Dobiveni podaci statistički su analizirani te je utvrđena statistički značajna razlika kod udjela kampestanola, stigmastadienola i  $\Delta$ 7-avenasterola s obzirom na županiju iz koje dolaze, dok je s obzirom na kultivare razlika utvrđena u udjelu 24-metilenkolesterola, kampestanola,  $\Delta$ 7-kampesterola, stigmastadienola i  $\Delta$ 7-avenasterola. Isto tako, određena je korelacija između sastava sterola te razlike temperature i količine padalina tijekom ljeta 2020. godine u odnosu na normalu, međutim utvrđena je samo pozitivna korelacija između količine padalina i udjela kampesterola. Provedena je usporedba sastava sterola u odnosu na važeći Pravilnik o jestivim uljima i mastima (2019) te su kod određenih sterola utvrđena odstupanja u odnosu na propisane vrijednosti.

**Ključne riječi:** buča, bučino ulje, steroli, kultivari, klima

**Rad sadrži:** 48 stranica, 20 slika, 9 tablica, 56 literaturnih navoda

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf formatu) obliku pohranjen u:** Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

**Mentor:** prof. dr. sc. Sandra Balbino

**Pomoć pri izradi:** doc. dr. sc. Marko Obranović i Melisa Trputec, tehnička suradnica

**Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:**

1. doc. dr. sc. Marko Obranović
2. prof. dr. sc. Sandra Balbino
3. doc. dr. sc. Maja Repajić
4. prof. dr. sc. Dubravka Škevin (zamjena)

**Datum obrane:** 21. srpnja 2021.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate thesis

University of Zagreb  
Faculty of Food Technology and Biotechnology  
Department of Food Engineering  
Laboratory for Oil and Fat Technology

**Scientific area:** Biotechnical Sciences

**Scientific field:** Food Technology

### INFLUENCE OF CULTIVAR AND GEOGRAPHICAL ORIGIN ON THE CONTENT AND COMPOSITION OF STEROLS IN PUMPKIN SEED OIL

*Marija Moslavac, 1425/USH*

**Abstract:** *The aim of this thesis was to investigate the differences in sterol content between pumpkin seed oils with different geographical origin. Sterol content was determined with HRN EN ISO 12228:2004 method. 53 samples from 10 counties in continental Croatia were analysed with 5 cultivars represented, alone or in combination. The proportions of 13 different sterols and the total amount of sterols in mg kg<sup>-1</sup> were determined in all 53 samples. The obtained data were statistically analysed, and a statistically significant difference was found in the content of campestanol, stigmastadienol and  $\Delta$ 7-avenasterol given the county they come from, while difference in the content of 24-methylene cholesterol, campestanol,  $\Delta$ 7-campesterol, stigmastadienol and  $\Delta$ 7-avenasterol was found in the composition of sterols regarding cultivars. Also, the correlation between the composition of sterols and the difference in temperature and in the amount of precipitation during the summer of 2020 in relation to the normal was determined. However, positive correlation was found only between precipitation and campesterol content. A comparison of the composition of sterols in relation to the current Ordinance on edible oils and fats (2019) was performed, and deviations in relation to the prescribed values were determined for certain sterols.*

**Keywords:** *pumpkin, pumpkin seed oil, sterols, cultivars, climate*

**Thesis contains:** 48 pages, 20 figures, 9 tables, 56 references

**Original in:** Croatian

**Graduate Thesis in printed and electronic (pdf format) version is deposited in:** Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb

**Mentor:** PhD. Sandra Balbino, Full professor

**Technical support and assistance:** PhD. Marko Obranović, Assistant professor and Melisa Trputec, Technical Associate

**Reviewers:**

1. PhD. *Marko Obranović*, Assistant professor
2. PhD. *Sandra Balbino*, Full professor
3. PhD. *Maja Repajić*, Assistant professor
4. PhD. *Dubravka Škevin*, Full professor (substitute)

**Thesis defended:** 21 July 2021

## SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	1
<b>2. TEORIJSKI DIO</b> .....	2
2.1. BUČA .....	2
2.1.1. Plod buče.....	3
2.1.2. Koštica buče .....	3
2.2. BUČINO ULJE.....	5
2.2.1. Proizvodnja djevičanskog bučinog ulja .....	6
2.2.2. Pakiranje i skladištenje .....	10
2.2.3. Sastav i karakteristike .....	12
2.3. PATVORENJE BILJNOG ULJA .....	14
2.3.1. Načini patvorenja biljnih ulja .....	14
2.3.2. Metode za detekciju patvorenja .....	15
2.3.3. Patvorenje bučinog ulja .....	16
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO</b> .....	18
3.1. MATERIJAL .....	18
3.2. ODREĐIVANJE UDJELA I SASTAVA STEROLA .....	19
3.2.1. Priprema neosapunjive frakcije .....	19
3.2.2. Priprema kolone za kromatografiju na stupcu .....	20
3.2.3. Ekstrakcija neosapunjive frakcije kromatografijom na stupcu .....	21
3.2.4. Izdvajanje sterolne frakcije tankoslojnom kromatografijom .....	22
3.2.5. Priprema trimetilsililetera.....	23
3.2.6. Analiza sastava sterola plinskom kromatografijom.....	24
3.2.7. Identifikacija i kvantifikacija pikova.....	25
3.3. STATISTIČKA ANALIZA .....	25
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA</b> .....	26
4.1. RAZLIKE U SASTAVU STEROLA S OBZIROM NA KULTIVARE .....	26
4.2. RAZLIKE U SASTAVU STEROLA S OBZIROM NA GEOGRAFSKO PORIJEKLO .....	32
4.2.1. Razlike u udjelima sterola s obzirom na vremenske prilike .....	37
4.3. UDJELI STEROLA S OBZIROM NA PRAVILNIK O JESTIVIM ULJIMA I MASTIMA .....	42
<b>5. ZAKLJUČCI</b> .....	43
<b>6. LITERATURA</b> .....	44



# 1. UVOD

Buča (*Cucurbita pepo* L.), odnosno njezine sjemenke, vrlo je raširena sirovina za dobivanje ulja u kontinentalnoj Hrvatskoj, posebice u njezinom sjeverozapadnom dijelu. Domovinom tikve smatra se Amerika, odakle je u Europu došla zahvaljujući otkrićem Amerike. Ovisno o strukturi i udjelu celuloze u ljusci poznajemo dvije vrste koštice: koštice s ljuskom i koštice bez ljuske (golica). Mesnati dio ploda najčešće se koristi u kulinarstvu za pripremu kolača, dok je koštica namijenjena za grickanje i proizvodnju ulja. Bučino ulje vrlo je cijenjeno i kao takvo postaje sve atraktivnije za patvorenje. Upravo određivanje sastava sterola jedan je od najboljih načina utvrđivanja autentičnosti biljnih ulja, a tako i bučinog.

Cilj ovog istraživanja bio je istražiti razlike u sastavu sterola između uzoraka bučinog ulja iz 10 županija kontinentalne Hrvatske te pokušati utvrditi jesu li utvrđene razlike, ukoliko ih ima, rezultat različitih klimatskih uvjeta u kojima su plodovi dozrijevali. Također, ispitano je postoje li razlike u sastavu sterola kod različitih kultivara te mogu li takve razlike predstavljati potencijalnu prepreku u utvrđivanju autentičnosti ulja.

Određivanje sterola provedeno je HRN EN ISO 12228:2004 metodom. Nakon saponifikacije bučinog ulja neosapunjiva frakcija ekstrahirala se otapalom dietileterom na koloni ispunjenoj aluminijskim oksidom. Zatim se iz neosapunjive frakcije izdvojila sterolna frakcija pomoću tankoslojne kromatografije i na koncu se dobivena frakcija prevodila u trimetilsililestere te analizirala plinskim kromatografom s plameno-ionizacijskim detektorom.

Analizom varijance dobivenih podataka ispitane su razlike između bučinih ulja različitih kultivara i iz različitih županija te je izračunat koeficijent korelacije između sastava sterola i određenih klimatskih uvjeta tijekom ljeta 2020., kada su plodovi buče dozrijevali.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. BUČA

Buča (tikva ili bundeva) je jednogodišnja zeljasta biljka roda *Cucurbita* iz obitelji *Cucurbitaceae*. Iako je njezina povijest tek djelomično poznata, postoje arheološki dokazi o njezinoj prisutnosti u davnoj prošlosti. Najstarije pronađene sjemenke stare su desetke tisuća godina – u Meksiku je pronađena sjemenka koja datira u 9 000. god. pr. Kr., a na Floridi 30 000. god. pr. Kr. (Teppner, 2000). Organizacija za hranu i poljoprivredu (FAO) procjenjuje da se u svijetu u 2011. god. uzgojilo 24,3 milijuna t buče na oko 1,7 milijuna h. Prilagodljivost ovog roda na različite klimatske uvjete pruža mogućnost za još rašireniji uzgoj i veću upotrebu u industriji hrane (Sharma i Ramana Rao, 2013). Tri su botaničke vrste iz roda *Cucurbita* koje se uzgajaju kao povrće: obična buča (*Cucurbita pepo* L.), buča pečenica (*Cucurbita maxima* Duch.) i muškatna buča (*Cucurbita moschata* Poir.). U Hrvatskoj je najrasprostranjenija *Cucurbita pepo* L. var. *styriaca* (Slika 1).



Slika 1. *Cucurbita pepo* L. var. *styriaca* (Kulac, 2006)

### 2.1.1. Plod buče

Korijenje buče je vretenasto i vrlo razvijeno, glavni korijen prodire u dubinu od 1 m, dok se bočno korijenje rasprostranjuje na sve strane i doseže dubinu od čak 4 m. Puzave stabljike nazivaju se vriježe i najčešće se protežu u duljinu od 3 do 4 m, iako postoje vrste u kojima su vriježe kraće, ali i mnogo duže. Listovi su joj različitog oblika (okrugli, potkovičasti, itd.) te su jako veliki i mogu biti obrasli dlakama, ali i bez njih. Cvjetovi su veliki, intenzivno žute do narančaste boje, ljevkastog oblika, a sastoje se od 5 latica koje su međusobno srasle. Biljka dugo cvate, obično od kraja lipnja pa sve do početka rujna. Plodovi buče dolaze u različitim oblicima te mogu biti okrugli, eliptični, cilindrični, jajoliki, spljošteni pa čak i u obliku diska (Pleh i sur., 1998).

Boja ploda također je raznolika, iako je to uglavnom žuta, narančasta i zelena boja. Boja najčešće ovisi o udjelu karotena i luteina. Buče s više karotena imat će izraženiju narančastu boju, dok će one s više luteina imati više žutu boju (Murkovic i sur., 2002). Veličina i težina ploda najviše ovisi o varijetetu kultivara te o stadiju zrelosti. Buče pripadaju biljkama tople klime te im je za rast i razvoj potrebno mnogo topline, otvoreni i osunčani položaj i dovoljno vlage u tlu. Klijanje sjemena buče počinje tek iznad 13,7 °C. Za rast i razvitak vriježa potrebna je temperatura od najmanje 12 do 15 °C, a za razvoj ploda optimalna je temperatura 25 do 27 °C. Buče su vrlo osjetljive na mraz, no tijekom kraćeg razdoblja mogu podnijeti hladno i vlažno vrijeme. Velika otpornost korijenskog sustava prema niskim temperaturama i nepovoljnim promjenama vlage u tlu dozvoljavaju uzgoj buča i u hladnijim područjima. Također, karakteristično je da se nakon nicanja stabljike dosta sporo razvijaju, a nakon 35 do 45 dana počinju vrlo brzo rasti, prolazeći fazu intenzivnog rasta, razvijajući duge vriježe i velike listove. S obzirom na veliki udio vode i samim time laku probavljivost, buča je vrlo prikladna za prehranu osoba koje imaju problema s probavom i crijevima (Pleh i sur., 1998).

### 2.1.2. Koštica buče

Plod buče sadrži sjemenke (Slika 2) za koje je uobičajen naziv koštice, a njihova količina u plodu nije velika te varira ovisno o varijetetu i kultivaru. Pojedinačni plod može sadržavati 100 do 400 sjemenki, a one čine 2 do 3 % mase kod plodova uobičajene težine od 4 do 8 kg. Sjeme bundeve je eliptično, spljoštenog oblika s jasno izraženim rubom. Kod golica (bučina koštica bez ljuske) dugo je 12 do 20 mm, a široko 7 do 10 mm, a kod onih s ljuskom 17 do 30 mm dugo i 11 do 14 mm široko. Debljina koštica je 1 do 3 mm. Masa 1 000 zrna je od 200 do 440 g, a

hektolitarska masa 35 do 42 kg. Boja sjemena je blijedožuta, bijela ili svijetlosmeđa kod sjemenki s ljuskom, a kod golica je zelena, maslinastozelena ili sivkastozelena. Sjeme sadrži 37 do 54 % ulja (Pleh i sur., 1998).

Bučine koštice s ljuskom imaju pet slojeva: epiderm, hipoderm, sklerenhim, erenhim i klorenhim. S obzirom da se ljuska većinom sastoji od celuloze, u prošlosti su znanstvenici pokušavali stvoriti buču koja će imati koštice s tanjom ljuskom, a samim time i koštice iz kojih će dobivati više ulja. Tako su oplemenjivanjem prirodnih mutanata nastale buče koje sadrže sjemenke bez bijele celulozne ljuske - golice (Teppner, 2000). Sjemenke bez ljuske nastale su spontanom mutacijom prije nekih stotinjak godina na području Štajerske, u današnjoj Austriji, po čemu je sorta *Cucurbita pepo* L. var. *Styriaca* dobila ime s obzirom da je latinski naziv za Štajersku *Styria*. Upravo je ta mutacija bila polazište za uzgoj kultivara Gleisdorfer, koji je najrašireniji na području Austrije, Mađarske, Slovenije i Hrvatske (Winkler, 2000). S vremenom, iz kultivara Gleisdorfer razvijeni su hibridi GL Opal, GL Rustikal, GL Diamant i GL Classic kao napoznatiji, te niz drugih hibrida koji će biti korišteni u ovom istraživanju (Adam i sur., 2018). Iako razlog zašto neke koštice ne razvijaju ljusku još uvijek nije u potpunosti jasan, neki istraživači to pripisuju nemogućnosti mutanta da odrveni tijekom razvoja ljuske, dok su analize pokazale da koštice bez ljuske sadrže smanjene količine lignina, strukturnih polisaharida i proteina, a povećane količine tvari topivih u etanolu u odnosu na koštice s ljuskom (Stuart i Loy, 1983).

Između različitih vrsta postoje male razlike u sastavu sjemenki. Tako se recimo vrsta *Cucurbita lanatus* razlikuje od ostalih po izraženoj količini bjelančevina u zrnu, pogotovo kineska i egipatska podvrsta (Al-Khalifa, 1996). Sjemenke biljke *Cucurbita pepo* L. sadrže 4,8-5,8 % vode, 37,1-44,4 % bjelančevina, 34,4-43,6 % masti, 9,9-21,9 % ugljikohidrata i 5,1-6,3 % pepela. Što se tiče masnih kiselina najzastupljenije su redom linolna, oleinska, palmitinska i stearinska. Također, što se tiče minerala golice sadrže najviše kalija, magnezija i kalcija te nešto manje cinka, bakra, željeza i mangana (Idouraine i sur., 1996). Sjeme sadrži i znatne količine vitamina B<sub>1</sub> (0,24 mg kg<sup>-1</sup>), vitamina B<sub>2</sub> (0,19 mg kg<sup>-1</sup>) i niacina (2,4 mg kg<sup>-1</sup>) (Pleh i sur., 1998).

Sjeme buče se najčešće jede pečeno, a rjeđe kuhano. Pržene sjemenke (s ljuskom) su vrlo ukusne i često se upotrebljavaju za grickanje. U domaćinstvu se mogu koristiti umjesto oraha, lješnjaka i badema. Također postoje zapisi da su se koštice bundeve koristile kao sredstvo za čišćenje crijevnih parazita, poput dječjih glista i trakavice (Pleh i sur., 1998).



**Slika 2.** Bučine sjemenke (Anonymous 1, 2021)

## 2.2. BUČINO ULJE

Najčešći način korištenja bučinih koštica je proizvodnja bučinog ulja (Slika 3) koje postaje sve zastupljenije na području kontinentalne Hrvatske.



**Slika 3.** Bučino ulje (Anonymous 2, 2021)

### 2.2.1. Proizvodnja djevičanskog bučinog ulja

Prema međunarodno prihvaćenim propisima „Djevičansko jestivo biljno ulje se proizvodi prešanjem uz prethodno čišćenje (odstranjivanje nečistoća), ljuštenjem i usitnjavanjem mehaničkim putem (kod određenih sirovina). Pri izdvajanju ulja dozvoljeno je zagrijavanje materijala za prešanje – kondicioniranje, odnosno hidrotermička obrada. Djevičansko jestivo biljno ulje može se pročišćavati isključivo pranjem s vodom, taloženjem, filtracijom, i centrifugiranjem (Codex, 2019). Prema Pravilniku o jestivim uljima i mastima (2019) u Hrvatskoj se djevičanska ulja definiraju kao proizvodi koji se dobivaju iz odgovarajućih sirovina, mehaničkim postupcima, primjerice prešanjem, uz primjenu topline. Može se provesti i postupak čišćenja odnosno bistrenja pranjem vodom, dekantiranjem, filtriranjem i centrifugiranjem.

Proizvodnja prehrambenih proizvoda biljnog porijekla započinje žetvom, a njezin se početak definira tehnološkom zrelošću sjemena. Tehnološka zrelost sjemena podrazumijeva udio vode u sjemenu koji omogućuje da kvaliteta sjemena ostane očuvana tijekom svih postupaka koji prethode skladištenju (Škevin, 2016). Kod buče prvi znak zrelosti sjemena je sušenje zelenih dijelova biljke, što se događa u razdoblju od 15. rujna do 20. listopada. Potom slijedi otkidanje plodova i formiranje redova kako bi ih stroj mogao pokupiti, a takvi se plodovi ostavljaju od 7 do 10 dana na zemlji kako bi sjeme dozrijelo. Nakon dozrijevanja sjemena, prilagođeni kombajn kupi plodove iz redova i izdvaja sjemenke (Martinov i sur., 2010). Tijekom ubiranja sjemenki kod spomenutih strojeva javljaju se i sljedeće poteškoće: stavljanje buča u redove, ručno ubacivanje plodova u stroj (veliki fizički napor) i učestali zastoji (zbog kvarova i povremenog čišćenja bubnja). Gubici prilikom strojnog ubiranja kreću se od 4,4 do 7,8 %, ovisno o sorti (Sito i sur., 2009), što je manje od 10 % koliko navode Martinov i sur. (2010).

Nakon toga slijedi transport proizvoda, a kod rasutog tereta kao što su koštice koristi se pneumatski transport. Princip je prijenos materijala strujom zraka koja se postiže usisavanjem (vakuum pumpa na kraju cjevovoda) ili se kompresorom zrak tlači u transportni cjevovod, pri čemu je moguća i kombinacija ove dvije metode. Rasuto sjeme se iz nekog početnog spremnika dozira uređajem za punjenje (pužni transporter, dozator ili sl.) u zračni transporter, koji naizmjenično upuhuje zrak i materijal u sustav i tako se cjevovodom transportira do određeniog spremnika (Škevin, 2016).

Uljarsko sjeme čisti se kod ulaza u skladište, prije sušenja, poslije sušenja te prije prerade. Čišćenje se provodi u svrhu uklanjanja nečistoća koje mogu štetno djelovati na uskladišteno

sjeme, onečistiti ulje, pogaču ili sačmu te time umanjiti njihovu vrijednost. Osim toga, nečistoće mogu oštetiti i uređaje za preradu sjemena. Nečistoće u sjemenu mogu biti strane (strane primjese) i vlastite (dio biljke ili ploda ili sjemena), dok prema porijeklu mogu biti anorganske (zemlja, prašina, kamenčići, komadići metala i metalni predmeti) i organske (strano sjeme, dijelovi stranog bilja i životinja).

Čišćenje je zapravo odvajanje kruto-kruto, a odvija se na nekoliko načina:

- a) na temelju razlike u veličini sjemena i nečistoća (prosijavanje),
- b) na temelju nejednakih aerodinamičkih svojstava sjemenja i nečistoća (provjetravanje),
- c) prema obliku,
- d) na temelju magnetizma,
- e) mehaničko odvajanje sitnih nečistoća s površine pranjem ili četkanjem,
- f) na temelju nejednakosti specifične težine (flotacija) (Škevin, 2016).

Kod sjemenki buče čišćenje se odvija odmah pri žetvi. Prvi stroj koji je ubirao i čistio sjemenke buče bio je modificirani kombajn 1976. god. Po sličnom principu, mada osuvremenjeni, rade i današnji strojevi za izdvajanje sjemenki buče. Kombajn se sastoji od uređaja za drobljenje, bubnjastog separatora koji odvaja sjeme od komada mesa te vakuumskeg separatora koji isisava sluz i sitne ostatke mesa (Martinov i sur., 2010).

Nakon čišćenja slijedi sušenje sjemenki. Sušenje je izuzetno važna tehnološka operacija jer se sadržaj vlage u sjemenki smanjuje do razine na kojoj prestaju biološke i enzimske aktivnosti, što je osnovni preduvjet za sigurno i kvalitetno skladištenje. Smanjenje vlage sprječava povećanje kiselosti ulja, intenzivno razmnožavanje mikroorganizama i djelovanje enzima. Voda se u košticama može nalaziti kao:

- a) slobodna voda, koja se uglavnom zadržava na površini, ali i lako odstranjuje,
- b) higroskopska voda, koja ovisi o relativnoj vlažnosti zraka i teže se odstranjuje i
- c) kristalna voda, koja se može odstraniti jedino primjenom povišene temperature (Rac, 1964).

Kod proizvodnje hladno prešanih ulja sušenje sjemenki provodi se odmah nakon žetve, bez obzira kakvi će biti uvjeti i načini skladištenja. Razlog tomu je što toplinski tretman sjemenki prvenstveno ima za cilj inaktivaciju enzima, kako bi se usporio proces hidrolize, koji uzrokuje povećanje kiselosti sjemenki tijekom čuvanja (Dimić i sur., 2003).

Kod bučinih sjemenki prije sušenja ide pranje sjemenki, koje za cilj ima uklanjanje ostataka mesa, ali i ljepljive sluzi. Voda koja se koristi za pranje na razini je vode za piće uz dodatak do  $0,2 \text{ mg L}^{-1} \text{ ClO}_2$  i do  $0,05 \text{ mg L}^{-1}$  ozona. Ti sastojci kasnije tijekom sušenja ispare iz sjemenki. Za pranje sjemenki najčešće se koriste perlačice s dvostrukom perforiranim bubnjem i dva reda mlaznica. Potrošnja vode je oko  $3000 \text{ L t}^{-1}$  opranog sjemena, a problem predstavlja zbrinjavanje vode nakon ispiranja, posebno ako nema kanalizacije (Martinov i sur., 2010).

Što se tiče temperature sušenja, većina istraživanja ukazuje da je optimalna temperatura sušenja  $60 \text{ }^\circ\text{C}$ , dok brzina agensa za sušenje ne bi trebala biti veća od  $0,2 \text{ m s}^{-1}$ , zato što povećanje brzine agensa dovodi do puno veće potrošnje energije, a brzina sušenja sjemenki nije proporcionalno brža. U industriji se najčešće primjenjuju šaržne sušare, a sjemenke se u njoj miješaju kako bi se spriječilo stvaranje gruda. Unatoč rezultatima istraživanja, najčešće je temperatura agensa  $50 \text{ }^\circ\text{C}$ . Ta temperatura je dovoljna i za smanjenja broja mikroorganizama u sjemenu. Također, istraživanja su pokazala da je najbolji fazni model sušenja pri čemu se prva faza sušenja događa do udjela vlage  $32 \%$ , a potom se povisuje temperatura i model rada se mijenja u otvoreni recirkulacijski dok udio vlage ne padne na ravnotežnih  $7,5 \%$  (Martinov i sur., 2010).

Kod bučinih sjemenki specifičan je postupak poliranja kojim se odstranjuje tanka opna koja pokriva bučino sjeme. Postupak se obavlja u polirki u kojoj se pod pritiskom četki sjeme trlja od sito i na taj način se odvaja opna. Kod bučinih sjemenki specifično je i odvajanje sjemena koje je potpuno ogoljeno, odnosno koje nema zelenu opnu. To se trenutno provodi ručno na inspeksijskim stolovima, što je ujedno i najjednostavniji, ali i najneproduktivniji način. Također, postoje i strojevi koji takve sjemenke odvajaju pomoću foto ćelije ili foto kamera. Međutim, takvi uređaji nisu u širokoj upotrebi, foto ćelije zbog ograničenja u kapacitetu, a foto kamere zbog cijene (Martinov i sur., 2010).

Kako bi se ulje što lakše otpustilo i izdvojilo iz uljarice, sirovinu je potrebno prethodno pripremiti. Eleoplazma ima strukturu gela te se u njoj nalaze bjelančevine i masti koje su povezane unutarjim silama. Za izdvajanje ulja iz tog stabilnog sistema potrebno je narušiti prirodnu ravnotežu, a to se postiže mehaničkim putem (mljevenjem i djelovanjem topline) te kemijskim putem (vlaženjem) (Rac, 1964). Način mljevenja ovisi o daljnjoj preradi. Ukoliko se ulje proizvodi ekstrakcijom organskim otapalima sjeme se melje u formu listića (omogućen je bolji prolaz otapala), a ako je postupak proizvodnje prešanje, sjeme se uglavnom melje u formu krupice (Škevin, 2016). Pri proizvodnji djevičanskog bučinog ulja usitnjavanje koštica je obvezna operacija koja se izvodi neposredno prije termičke obrade. Samljevena jezgra zatim



odlazi u miješalicu gdje joj se dodaje voda i kuhinjska sol. Materijal se miješa i homogenizira dok se ne dobije meka pulpa koja se zove tijesto (Rac, 1964).

Kod proizvodnje djevičanskog ulja zatim slijedi postupak kondicioniranja, kojega nema kod proizvodnje hladno prešanog ulja. U širem smislu kondicioniranje obuhvaća i mljevenje i toplinsku pripremu dok u užem samo toplinsku pripremu. Ono se primjenjuje u svrhu poboljšavanja iskorištenja prešanja (ili ekstrakcije organskim otapalima) jer se tijekom kondicioniranja odvijaju sljedeće promjene:

1. bubrenje i koagulacija bjelančevina eleoplazme – zbog poremećene unutarnje ravnoteže prestaju djelovati međumolekulske sile,
2. pucanje staničnih stijenki – zbog povećanja volumena eleoplazme,
3. razbija se gel struktura eleoplazme stanice,
4. smanjuje se viskoznost ulja i
5. ulje se skuplja u kapljice i lakše cijedi (Škevin, 2016).

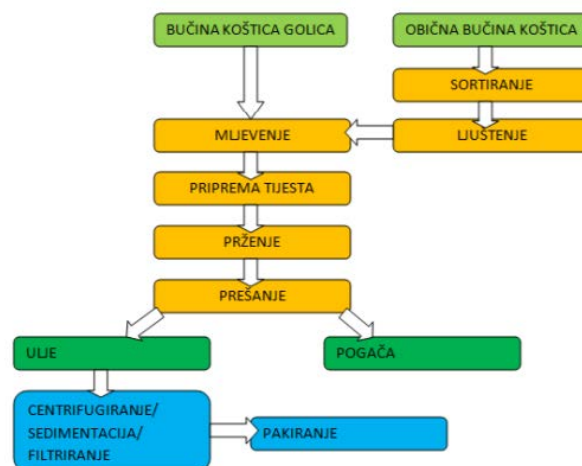
Jedan od načina kondicioniranja je direktno zagrijavanje koštica. Tijesto bučinih sjemenki se zagrijava na temperaturi od 100 do 120 °C. Vrijeme pečenja je obično oko 60 min pri 100 °C ili 30 min pri višim temperaturama. (Murkovic i sur., 2004). Druga metoda je da se osušene samljevene koštice miješaju s vodom i zagrijavaju na minimalno 90 °C (Lankmayr i sur., 2004).

Nakon kondicioniranja slijedi prešanje. Prešanje je najstariji način proizvodnje ulja i namijenjeno je za manji kapacitet sirovine. Primjenjuju se dva tipa preša: hidrauličke preše koje zahtijevaju ručni rad i imaju manju produktivnost, te kontinuirane preše ili pužne automatske preše (Škevin, 2016). Hidrauličke preše omogućile su dobivanje većeg pritiska pomoću malih sila (Fireston, 2005), a uvođenjem pužnih preša omogućen je kontinuirani proces izdvajanja ulja prešanjem (Doosselaere, 2013). Djevičansko ulje dobiva se prešanjem pripremljenog materijala na hidrauličkim prešama.

S obzirom na način na koji se slaže materijal hidrauličke preše mogu biti otvorene i zatvorene, međutim za prešanje bučinih sjemenki koriste se samo zatvorene. Kod zatvorenih preša između dvije glave nalazi se porozni cilindar (koš) u koji se puni materijal za prešanje. Unutar tog cilindra materijal se ravnomjerno raspoređuje na situ u tankom sloju te se na njega stavlja čelična ploča i tako naizmjenično. Pritisak kod svih vrsta hidrauličkih preša ostvaruje se pomoću pumpi. Ovisno o konstrukciji preše pritisak može biti od 300 do 360 bar. Nakon prešanja zaostaje pogača, bez obzira na tip preše. Preradom bučine golice dobiva se pogača visoke nutritivne vrijednosti. Ona sadrži preko 50 % proteina i povoljan aminokiselinski sastav,

te se može koristiti kao dodatak različitim prehrambenim proizvodima: kruhu, tjestenini, mliječnim proizvodima, zatim kao namaz, ali i kao stočna hrana (Rac, 1964).

U svježem prešanom ulju zaostaju neke nečistoće. To su mehaničke, netopljive nečistoće i najčešće je to masna prašina te sitniji ili krupniji dijelovi sjemena, npr. jezgra ili ljuska. Stoga se pristupa odvajanju nečistoća iz ulja. Najjednostavniji način je prirodna sedimentacija ili taloženje, koje se odvija u rezervoarima u kojima ulje odležava određeno vrijeme. Ti rezervoari na različitim visinama imaju odgovarajuće ventile pomoću kojih se ispuštaju bistri slojevi ulja, a mehaničke nečistoće se talože na dnu rezervoara. Ipak, filtriranje je puno efikasniji način odvajanja mehaničkih nečistoća. Filtrirati se može pomoću vibracijskih sita i filtracijske centrifuge, što pripada grubom filtriranju ili filter prešama, kontinuiranim filtrima ili centrifugalnim separatorima, što pripada finijem filtriranju (Rac, 1964). Prema zakonskim propisima sadržaj netopivih nečistoća u djevičanskom ulju ne smije biti veći od 0,05 % (Pravilnik, 2019). Pojednostavljena shema proizvodnje bučinog ulja nalazi se na Slici 4.



**Slika 4.** Shema proizvodnje bučinog ulja (Vitko, 2017)

### 2.2.2. Pakiranje i skladištenje

Pakiranje i skladištenje vrlo je bitan korak u proizvodnji ulja. Neadekvatnim pakiranjem i skladištenjem ulja može doći do njegovog kvarenja, do promjene njegovih senzorskih svojstava i prehrambene vrijednosti te do promjene dijela biološki aktivnih tvari. Kvarenje ulja može biti hidrolitičko i oksidacijsko.

Do hidrolitičkog kvarenja može doći još u košticama, prije i nakon žetve te tijekom procesa prerade, ali i tijekom skladištenja. Ovim kvarenjem nastaju slobodne masne kiseline koje nisu štetne za zdravlje ljudi, ali ipak su nepoželjne zato što mogu uzrokovati koroziju i prelazak iona metala u ulje čime se smanjuje stabilnost ulja. Kod nerafiniranih ulja poput bučinog, posebno je važno obratiti pažnju na hidrolitičko kvarenje (Frega i sur., 1999).

S druge strane, oksidacijom ulja gubi se dio biološki aktivnih spojeva kao što su esencijalne masne kiseline, vitamini i prirodni antioksidansi. Razgradni produkti oksidacije mogu inicirati oksidacijske procese i time pospješiti pojavu različitih oboljenja. Najčešći oblik oksidacijskog kvarenja čistih ulja i masti je autooksidacija. Proces autooksidacije odvija se u prisustvu kisika sami od sebe, ali ih može ubrzati povišena temperatura, svjetlost i tragovi metala. Nisu sva ulja jednako podložna oksidaciji. Ulja sa sličnim udjelom nezasićenih masnih kiselina mogu imati različitu održivost, što ovisi o udjelu i sastavu njihovih negliceridnih spojeva. Mnogi od tih spojeva usporavaju oksidaciju, odnosno djeluju kao antioksidansi. Ulje sjemenki sezama poznato je po svojoj izuzetnoj održivosti, bez obzira na veliki udjel nezasićenih masnih kiselina. To se pripisuje upravo prženju sjemenki, pri čemu nastaju melanoidi koji posjeduju visoki antioksidacijski potencijal (Kamal-Eldin, 2006).

Skladištenje i pakiranje ulja treba provesti pri niskim temperaturama, u odsutnosti svjetlosti i bez mogućnosti ulaska stranih tvari u ulje. Ulja lako upijaju razne mirise, koji mogu negativno utjecati na kvalitetu, kao i vlaga koja pogoduje rastu mikroorganizama. Jestiva ulja se prije punjenja drže u spremnicima koji mogu biti pomični ili fiksni. Ti spremnici najčešće su od inoksa jer nije potrebna posebna unutarnja obrada. Ipak, idealan materijal tih spremnika bio bi nehrđajući čelik. Spremnici bi trebali biti laki za čišćenje zbog taloga koji se skuplja na dnu, trebali bi štiti od svjetlosti i zraka, a temperatura u njima mora biti konstantna između 10 i 15 °C. Na toj temperaturi oksidacija je minimalna i ne dolazi do zamućivanja ulja (Glumbić, 2006).

Bučino ulje prije stavljanja na tržište u pravilu se pakira u obojene staklene boce tamne boje. Kod ambalaže je važno da osim osnovnih uvjeta koje mora ispuniti (zdravstvena ispravnost, fizikalno-mehanička, dimenzijska i barijerna svojstva), ima i oblik i dizajn koji su privlačni na način da utječu na želje potrošača.

### 2.2.3. Sastav i karakteristike

Bučino ulje ima jednostavan sastav masnih kiselina pri čemu više od 98 % otpada na palmitinsku (16:0), stearinsku (18:0), oleinsku (18:1) i linolnu (18:2) (Murkovic i sur., 1996). Općenito udio višestruko nezasićenih masnih kiselina je veći nego udio jednostruko nezasićenih masnih kiselina kao i zasićenih masnih kiselina (Fruhworth i Hermetter, 2008). Također, postoji razlika u udjelu oleinske i linolne kiseline s obzirom na to ima li sjemenka ljusku ili ne. Sjemenke bez ljuske imaju manji udio linolne, a veći udio oleinske kiseline u odnosu na one s ljuskom (Nakić i sur., 2006). Između udjela linolne i oleinske kiseline postoji korelacija, odnosno linolna nastaje direktno desaturacijom oleinske kiseline. Bučine koštice koje sporije dozrijevaju i beru se vrlo kasno tijekom godine imaju veći udio linolne kiseline. Kada se srednje vrijednosti udjela oleinske i linolne kiseline u jednoj godini usporede s prosječnim temperaturama u mjesecu dozrijevanja (srpanj, kolovoz, rujana i listopad) može se primijetiti da hladnija klima tijekom godine doprinosi većem udjelu linolne kiseline (Murkovic i Pfannhauser, 2000). Smatra se da se to događa zato što hladnije temperature u kasnijem dijelu godine podižu udio višestruko nezasićenih masnih kiselina zbog većeg djelovanja fosfatidil-kolina. Općenito s povećanjem temperature zraka tijekom dozrijevanja buče, povećava se udio zasićenih i mononezasićenih masnih kiselina (Nederal i sur., 2014). Osim sastava masnih kiselina, vrlo važan je i njihov raspored te o njemu ovisi većina funkcionalnih svojstava ulja (Wan, 2000).

Ulja i masti sadrže različite udjele negliceridnih sastojaka koji se često nazivaju i neosapunjivim sastojcima jer nisu podložni saponifikaciji. Bučino ulje sadrži između 0,8 i 1,2 % neosapunjivih tvari (Rac, 1964). Neki od negliceridnih sastojaka koje sadrži bučino ulje su klorofili, karotenoidi, skvalen, steroli, tokoferoli, mineralne tvari i tvari arome. Klorofili su tetrapiroli koji sadrže magnezij. Klorofil *a* je sivo-zelene, a klorofil *b* je žuto-zelene boje, dok feofitini *a* i *b* daju maslinasto-smeđu boju. Iako udio klorofila u bučinom ulju nije pretjerano istražen, dostupni podaci govore da je udio ukupnih klorofila u bučinom ulju između 8,4 i 27,3 mg kg<sup>-1</sup>, s time da je taj udjel općenito veći u uljima iz koštice beskorke nego iz obične bučine koštice (Štrucelj, 1981). Osim zelene boje od klorofila, koštice buče imaju žučkasti pigment koji dolazi od karotenoida, najčešće luteina (Fruhworth i Hermetter, 2008). Karotenoidi su polinezasićeni ugljikovodici sastavljeni od izoprenskih jedinica. Sve nijanse boje ulja od žute do crvene, dolaze od prisutnih karotenoida, a intenzitet boje ovisi o njihovoj strukturi i udjelu. Ulja iz golica imala su veći udjel karotenoida od ulja iz obične koštice (8,40-36,31 mg kg<sup>-1</sup> prema

13,89-15,41 mg kg<sup>-1</sup>). Općenito, od ukupnih karotenoida u većini biljnih ulja najznačajniji je udio luteina, a u bučinom ulju ga ima oko 71 % (Štrucelj, 1981).

Skvalen je spoj uljaste konzistencije, bez boje ili svijetlo žute boje, netopljiv u vodi, ugodna mirisa koji je u različitim količinama prisutan u svim životinjama i biljkama. On štiti masne kiseline od oksidacije tako što „hvata“ slobodne radikale (Dessì i sur., 2002). Udio skvalena u bučnim sjemenkama općenito je manji kod vrsti bez ljuske (od 2259 mg kg<sup>-1</sup> kod industrijskih sjemenki do 2962 mg kg<sup>-1</sup> kod laboratorijskih) nego kod vrsti s ljuskom (od 2630 mg kg<sup>-1</sup> kod industrijskih do 3513 mg kg<sup>-1</sup> kod laboratorijskih) (Nakić i sur., 2006).

Biljni steroli ili fitosteroli uključuju više od 250 različitih sterola i sličnih spojeva u biljnim i morskim vrstama. Oni se uglavnom nalaze u plazma membrani, vanjskoj membrani mitohondrija i endoplazmatskom retikulumu te igraju veliku ulogu u određivanju svojstva tih membrana. Naime, steroli reguliraju propusnost membrana i vjerojatno imaju ulogu u prilagodbi membrana na promjene temperature (Piironen i sur., 2000). Najzastupljeniji steroli u biljnim uljima su 4-desmetil steroli koji se prema položaju dvostruke veze u prstenastom sustavu najčešće klasificiraju kao  $\Delta$ 5- i  $\Delta$ 7-steroli te oni čine više od 85 % ukupnih sterola (Breinhölder i sur., 2002). Za razliku od sjemenki ostalih jestivih ulja, bučino ulje sadrži više  $\Delta$ 7-sterola nego  $\Delta$ -5 sterola, dok samo bučino ulje sadrži 2-2,5 puta više sterola nego same bučine sjemenke (Fruhworth i Hermetter, 2008). Općenito, u bučinom ulju najzastupljeniji steroli su  $\beta$ -sitosterol,  $\Delta$ 7-avenasterol, stigmastadienol, stigmastatrienol i spinasterol (Nakić i sur., 2006). Upravo zbog visoke specifičnosti sterola u ulju, oni se često koriste kao identifikatori autentičnosti odnosno kao identifikacijska oznaka ulja. Određivanjem sastava sterola moguće je utvrditi patvorenje bučinog ulja kod dodatka od samo 2 % suncokretovog, repičinog ili sojinog ulja (Mandl i sur., 1999).

Tokoferoli su najvažniji i široko rasprostranjeni prirodni antioksidansi. Zbog svoje važne funkcije u organizmu nazvani su E vitaminom, a danas ih je poznato osam. Biljna ulja sadrže četiri vrste tokoferola ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - i  $\delta$ -) u različitim omjerima i četiri tokotrienola koji su s njima u bliskoj vezi. Udio tokotrienola u uljima obično je puno niži nego udio tokoferola osim u palminom ulju i ulju pšeničnih klica (Kamal-Eldin i Appelqvist, 1996). U bučinom ulju udio  $\alpha$ - i  $\gamma$ -tokoferola izuzetno varira pri čemu je udjel  $\gamma$ -tokoferola 5-10 puta veći (41-620 mg kg<sup>-1</sup>) u odnosu na  $\alpha$ -tokoferol (0-91 mg kg<sup>-1</sup>), dok je udio  $\beta$ - i  $\delta$ -tokoferola vrlo nizak (Murkovic i sur., 1996). Tokoferoli su zastupljeniji u bučnim sjemenkama s ljuskom u odnosu na one bez ljuske pri čemu je udio  $\gamma$ -tokoferola čak 50 puta veći u odnosu na  $\alpha$ -tokoferol (Nakić i sur., 2006). U

istraživanju Stevensona i sur. (2007) udio  $\gamma$ -tokoferola bio je 2-8 veći nego udio  $\alpha$ -tokoferola pri čemu je udjel tokoferola jako ovisio o kultivaru.

Što se tiče mineralnih tvari, u bučinom ulju najviše se može naći magnezija, natrija, vanadija, željeza i bakra. Kroma, kalcija, titanija, cinka, kadmija i molibdena ima manje od 10 mg kg<sup>-1</sup>, dok aluminijska, kobalt, nikla, mangana, fosfora, kalija i olova ima ispod granica detekcije (Juranovic i sur., 2003). U procesu prženja bućinih koštica pri temperaturama od 100 do 130 °C prilikom proizvodnje bućinog ulja, dolazi do formiranja tipične arome koja se opisuje kao orašasta, po prženom, začinima, zelenom i masti. Povećanjem temperature kondicioniranja dolazi do značajne promjene sastava hlapljivih sastojaka. Pri nižim temperaturama kondicioniranja prevladavaju aldehidi i alkoholi koji daju svježju aromu, dok viša temperatura doprinosi nastajanju pirazina koji daje specifičnu aromu po prženome (Potočnik i Košir, 2017).

## 2.3. PATVORENJE BILJNOG ULJA

### 2.3.1. Načini patvorenja biljnih ulja

Patvorenje ili krivotvorenje je proces kojim se dobivaju patvorine, odnosno manje vrijedni proizvodi koji su naizgled slični pravim, punovrijednim proizvodima, a izvor su nezakonite zarade. Termin se najčešće odnosi na patvorine namirnica, kozmetičkih proizvoda i lijekova, ali i odjeće, obuće i tehničke robe. Pod patvorenjem namirnica razumijeva se svako namjerno mijenjanje svojstava i sastava namirnice dodavanjem tvari koje nisu njezini prirodni sastojci, zbog čega namirnica izgleda vrjednije nego što jest, ali je njezina prehrambena vrijednost smanjena, neprikladna, ili čak opasna za zdravlje (Hrvatska enciklopedija, 2021).

Krivotvorenje je četvrta najunosnija djelatnost na svijetu, nakon prodaje oružja, narkotika i prostitucije. Prema nekim procjenama između 5 i 7 % godišnjeg prometa na tržištu odnesu krivotvoreni proizvodi, a više stotina tisuća ljudi u Europi na godišnjoj razini izgubi posao zbog krivotvorenih proizvoda. Krivotvorenje originalnom proizvođaču nanosi štetu četverostruko. Prvo kroz primarnu prodaju, kada kupci kupuju krivotvoreni proizvod i na taj način materijalno oštećuju proizvođača originala. Drugi je posredni gubitak prodaje jer proizvođač originala gubi ugled kod kupaca zbog njihova nezadovoljstva. Treći oblik je gubitak tržišta, koji utječe na investicije, marketing i plaće. Konačno, četvrti, ali ne najmanje važan način je ugroženost zdravlja kupaca, pogotovo kod krivotvorene hrane, kada kupci kupuju proizvode čiji je prehrambeni profil snižen zbog unosa jeftinijih, a samim time i manje kvalitetnih sastojaka.

Krivotvorenje hrane izravno utječe na prehrambeni profil hrane, mijenja ga na lošije, a potrošaču smanjuje mogućnost provođenja pravilne prehrane, posebice kada su prehrambeno vrijedni sastojci zamijenjeni manje vrijednim ili prehrambeno bezvrijednim i opasnim.

S toga gledišta, to postaje i zdravstveni problem, a kod nekih krivotvorenja nedopuštenim tvarima takva hrana sama po sebi je zdravstveno neispravna (Šarkanj i sur., 2010).

Dva najčešća načina patvorenja biljnih ulja su miješanje hladno prešanog ili djevičanskog ulja s rafiniranim uljem ili zamjena skupih ulja i masti s onim rafiniranim. Hladno prešana i djevičanska ulja su skupa, a potražnja za njima sve više raste zbog njihove kvalitete. S obzirom da je prešanje skuplja metoda dobivanja ulja nego rafinacija, poneki proizvođači dolaze u iskušenje da u skupo ulje dobiveno prešanjem dodaju jeftinije rafinirano ulje. Drugi način je potpuna zamjena skupljeg ulja s onim jeftinijim, najčešće zamjena hladno prešanog ili djevičanskog ulja rafiniranim, iako je takva metoda vrlo rijetka. Osim što takva ulja nisu kvalitetna kao originalna, moguće su i ozbiljne zdravstvene posljedice za konzumente patvorenih ulja. Poznat je slučaj iz Španjolske iz 1981. god. kada se među stanovništvom pojavila nepoznata smrtonosna bolest od koje je preminulo preko 600 ljudi. Utvrđeno je da su umrli od sindroma otrovnog ulja kojeg su razvili jer su konzumirali nejestivo ulje uljane repice koje im je prodano kao jestivo ulje uljane repice ili čak kao maslinovo ulje (Azadmard-Damirchi i Torbati, 2015).

### 2.3.2. Metode za detekciju patvorenja ulja

Države i proizvođači kvalitetnog ulja na različite načine bore se protiv patvorenja. Postoje različite metode otkrivanja patvorenja, ali one se razlikuje ovisno o sirovini iz koje se dobiva ulje. Patvorenje djevičanskog maslinovog ulja može se utvrditi pomoću određivanja sastava masnih kiselina. Na taj način može se otkriti patvorenje iako je dodatak rafiniranog ulja (npr. sojino, uljane repice ili kikirikija) manji od 5 %. Maslinovo ulje najčešće se patvori uljem lješnjaka s obzirom na sličan sastav masnih kiselina. Ipak, ako je udio lješnjakovog ulja manji od 20 %, vrlo teško će se otkriti patvorenje na temelju sastava masnih kiselina. Jedan od načina utvrđivanja patvorenja biljnih ulja je analiza količine i sastava sterola. Kod maslinovog ulja kao marker se često koristi lupeol, koji je prisutan u ulju lješnjaka, a nije prisutan u maslinovom ulju. Na taj način, može se otkriti patvorenje uljem lješnjaka od samo 5 %. Također se koriste i masena spektrometrija i analiza hlapljive frakcije, međutim te metode nisu učinkovite kao analiza sterola (Azadmard-Damirchi i Torbati, 2015).

### 2.3.3. Patvorenje bučinog ulja

Bučino ulje definirano je kao ulje dobiveno iz bučinih koštica (*Cucurbita pepo* L.) (Pravilnik, 2019). U Pravilniku o jestivim uljima i mastima navedeni su zahtjevi kvalitete za ulja biljnog porijekla kao i za frakcije ulja biljnog porijekla, između ostalog i za bučino ulje (Tablica 1).

**Tablica 1.** Zahtjevi kvalitete za bučino ulje (Pravilnik, 2019)

<b>Identifikacijski zahtjevi</b>	<b>Bučino ulje</b>
Gustoća	0,916 – 0,923
°C ulja / voda na 20 °C	20 °C / 20 °C
Indeks refrakcije	1,470 – 1,475 (nD <sub>20</sub> °C)
Jodni broj	105 – 125
Broj osapunjenja (mg [KOH] g <sup>-1</sup> [ulja])	187 – 197
Neosapunjivo (%)	≤ 1,2
C14:0 (%)	ND – 0,2
C16:0 (%)	6 – 16
C16:1 (%)	0 – 0,2
C18:0 (%)	3 – 13
C18:1 (%)	16 – 43
C18:2 (%)	38 – 58
C18:3 (%)	ND – 1,0
C20:0 (%)	ND – 1,0
C20:1 (%)	ND – 0,5
C22:0 (%)	ND – 0,3
Ukupni steroli (mg kg <sup>-1</sup> )	2100 – 5600
Kolesterol (%)	< 0,3
Brasikasterol (%)	< 0,1
Kampesterol (%)	0,1 – 0,5
Stigmasterol (%)	0,1 – 3,0
β-sitosterol (%)	1,0 – 0,8
Spinasterol (%)	20 – 40
Stigmastatrienol (%)	16 – 30
Stigmastadienol (%)	17 – 40



Zbog ugodnog okusa i arome te nutritivnih sastojaka bučino ulje izuzetno je cijenjeno, ali i skupo. Kao takvo, meta je patvorenja jer se pokušava smanjiti trošak proizvodnje, a da time cijena proizvoda ostane jednaka. Različiti su načini utvrđivanja patvorenja ulja, a metode su uglavnom utemeljene na plinskoj kromatografiji i tekućinskoj kromatografiji visoke učinkovitosti, ali koristi se i masena spektrometrija.

Kod bučinog ulja, patvorenje se utvrđuje na temelju sastava sterola. Bučino ulje razlikuje se od drugih jestivih ulja po sadržaju  $\Delta 5$ -sterola (stigmasterol, kampesterol ili  $\beta$ -sitosterol), čiji su udjeli u bučinom ulju niski. Većinu udjela čine  $\Delta 7$ -steroli. Mandl i sur. (1999) razvili su metode otkrivanja patvorenja bučinog ulja na temelju sastava sterola. Preko povećanja udjela kampesterola i  $\beta$ -sitosterola te promjena u koncentraciji sterola bilo je moguće identificirati dodatak od samo 2 % suncokretovog, sojinog i ulja uljane repice. Osim toga, dokaz patvorenja je i prisutnost drugih sterola poput brasikasterola ili stigmasterola kojih nema u prirodnom bučinom ulju. Modifikacijom ove metode potvrđena je mogućost detekcije drugog ulja u čistom bučinom ulju analizom udjela i sastava sterola (Wenzl i sur., 2002).

### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.1. MATERIJAL

Analiza je rađena na 53 uzorka bučinog ulja s područja Republike Hrvatske, od čega je 13 uzoraka bilo iz Varaždinske županije (VŽ), 10 iz Zagrebačke županije (ZŽ), po 8 iz Koprivničko-križevačke (KKŽ) i Krapinsko-zagorske županije (KZZ), 5 iz Virovitičko-podravске županije (VPŽ), 4 iz Požeško-slavonske županije (PSŽ), 2 iz Međimurske županije (MŽ) i po 1 iz Brodsko-posavske (BPŽ) i Sisačko-moslavačke županije (SMŽ) te Grada Zagreba (GZ). Što se tiče podjele po kultivarima, 37 uzoraka bilo je kultivara Gleisdorfer, 8 Rustikal, 5 mješavina kultivara Gleisdorfer i Rustikal te po 1 kultivar Retzer Gold, mješavina Rustikala i Inka te Sonne (Tablica 2).

**Tablica 2.** Raspodjela kultivara po županijama

	Gleisdorfer	Rustikal	Gleisdorfer i Rustikal	Retzer Gold	Rustikal i Inka	Sonne	Ukupno
<b>Varaždinska</b>	12	1	/	/	/	/	13
<b>Zagrebačka</b>	7	1	1	1	/	/	10
<b>Koprivničko- križevačka</b>	4	3	/	/	/	1	8
<b>Krapinsko- zagorska</b>	6	1	/	/	1	/	8
<b>Virovitičko- podravska</b>	4	1	/	/	/	/	5
<b>Požeško- slavonska</b>	/	/	4	/	/	/	4
<b>Međimurska</b>	1	1	/	/	/	/	2
<b>Brodsko- posavska</b>	1	/	/	/	/	/	1
<b>Sisačko- moslavačka</b>	1	/	/	/	/	/	1
<b>Grad Zagreb</b>	1	/	/	/	/	/	1
<b>Ukupno</b>	37	8	5	1	1	1	53

Što se tiče podjele kultivara po županijama, u županiji iz koje dolazi najviše uzoraka, Varaždinskoj, najviše je uzoraka kultivara Gleisdorfer, koji je ujedno i najzastupljeniji kultivar među analiziranim uzorcima. Iz Zagrebačke županije imamo najraznolikije uzorke po pitanju kultivara, najviše je Gleisdorfera, dok je po jedan uzorak kultivara Rustikal, Gleisdorfer i Rustikal i Retzer Gold. U Koprivničko-križevačkoj županiji udio kultivara Gleisdorfer je gotovo jednak udjelu Rustikala, dok su u Požeško-slavonskoj županiji sva četiri uzorka kultivara Gleisdorfer i Rustikal. U ostalim županijama prevladava kultivar Gleisdorfer, što je i očekivano s obzirom da je i najzastupljeniji kultivar među 53 uzorka.

### 3.2. ODREĐIVANJE UDJELA I SASTAVA STEROLA

Za određivanje udjela i sastava sterola u uzorcima bučinog ulja korištena je metoda HRN EN ISO 12228:2004. Temelj ove metode je dodatak unutarnjeg standarda  $\alpha$ -kolestenola bučinom ulju te podvrgavanje saponifikaciji s etanolom otopinom KOH ( $c = 0,5 \text{ mol L}^{-1}$ , otopi se 3 g KOH u 5 mL destilirane vode i razrijedi etanolom do 100 mL). Ta neosapunjiva frakcija potom se ekstrahira otapalom dietileterom na koloni ispunjenoj aluminijskim oksidom koji zadržava anione masnih kiselina, a propušta negliceridne komponente. Zatim se iz neosapunjive frakcije izdvaja sterolna frakcija pomoću tankoslojne kromatografije na bazičnom silikagelu. Na koncu se dobivena frakcija prevodi u trimetilsililestere te analizira plinskim kromatografom s plameno-ionizacijskim detektorom.

#### 3.2.1. Priprema neosapunjive frakcije

U eksperimentalnom dijelu rada određivan je udio i sastav sterola na sljedeći način. U okruglu tikvicu s ravnim dnom (100 mL) izvagano je  $0,25 \pm 0,001 \text{ g}$  bučinog ulja, nakon toga dodano je 1 mL prethodno pripremljenog  $\alpha$ -kolestanola ( $c = 1 \text{ mg mL}^{-1}$ , u acetonu), 5 mL KOH ( $c = 0,5 \text{ mol L}^{-1}$ ) te dvije, tri kuglice za vrenje. Tikvica je spojena na povratno zračno hladilo te je zagrijavana na plameniku preko azbestne mrežice do vrenja. Ostavljena je da vrije točno 15 min, a nakon određenog vremena, tikvica je odvojena od zračnog hladila te je dodano 15 mL etanola (Slika 5). Kada se tikvica u potpunosti ohladila, prelazi se na sljedeći korak, kromatografiju na stupcu.



**Slika 5.** Priprema neosapunjive frakcije (Bosotin, 2016)

### 3.2.2. Priprema kolone za kromatografiju na stupcu

Za sam proces kromatografije prvenstveno je potrebno pripremiti kolonu. Koristi se kolona dužine 25 cm sa sinterom na dnu, unutarnjeg promjera 1,5 cm. Kolona je pričvršćena na metalni stalak, a na dno je stavljena vata koju je potrebno malo natopiti u etanolu kako bi što bolje prionula uz sinter. Pomoću staklenog štapića istisnut je mogući preostali zrak u vati. Na vagi je izvagano 10 g aluminijevog oksida koji se pomiješa u staklenoj menzuri s 20 mL etanola i kvantitativno prenese u kolonu za kromatografiju. Punjenje je potrebno odraditi oprezno kako ne bi došlo do nastanka pukotina u stupcu aluminijevog oksida. Preostali višak etanola potrebno je ispustiti toliko da nivo etanola bude pola centimetra iznad nivoa vrha stupca aluminijevog oksida (Slika 6). Kada je pripremljena kolona za kromatografiju na stupcu, započinje proces ekstrakcije neosapunjive frakcije.



**Slika 6.** Kolona za kromatografiju (Bosotin, 2016)

### 3.2.3. Ekstrakcija neosapunjive frakcije kromatografijom na stupcu

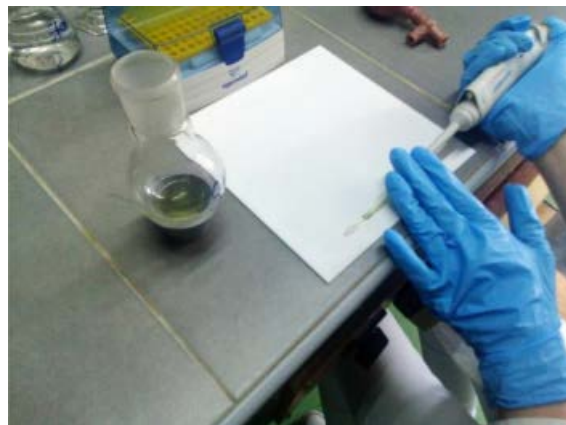
Kod ekstrakcije neosapunjive frakcije kromatografijom na stupcu potrebno je ohlađeni uzorak iz tikvice pipetom prenijeti u pripremljenu kolonu. Eluiranje traje sve dok otopina ne dosegne vrh sloja aluminijevog oksida. Eluat se skuplja u tikvicu okruglog dna od 100 mL. Potom je u kolonu za kromatografiju dodano 5 mL etanola te se nastavio proces eluiranja. Tikvica u kojoj se prethodno nalazio uzorak isprana je s 10 ml dietiletra i prenesena u kolonu. Kada dietileter dosegne vrh aluminijevog oksida u kolonu se dodaje još 2 x 10 mL dietiletra prilikom čega dolazi do završetka eluiranja. Dobiveni eluat se otparava do suhoga pri 40 °C, na rotavaporu (Slika 7).



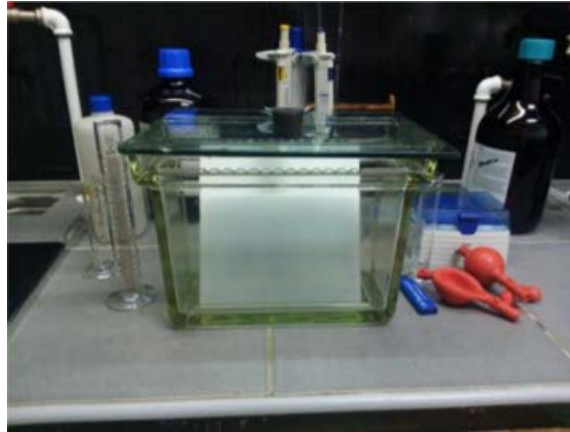
**Slika 7.** Otparavanje na rotavaporu (Bosotin, 2016)

#### 3.2.4. Izdvajanje sterolne frakcije tankoslojnom kromatografijom

Nakon otparavanja slijedi izdvajanje sterolne frakcije tankoslojnom kromatografijom. Uzorak neosapunjive frakcije otopi se u 2 mL dietiletra te nanese mikropipetom na prethodno pripremljenu ploču sa silikagelom (Silikagel F254, veličine 20 x 20 cm, debljine 0,25 mm) u ravnoj liniji 2 cm od donjeg ruba ploče (Slika 8). Na istoj visini ispred linije nanese se 2-3  $\mu\text{L}$  referentne otopine  $\alpha$  kolestanola i kolesterola ( $c = 1 \text{ mg mL}^{-1}$ , u acetonu) kako bi se nakon razvitka kromatograma mogli identificirati steroli. Ploča je stavljena u kadu za razvijanje u kojoj je pripremljena smjesa 100 mL otopine heksan:dietileter (1:1, v/v) te je zatvorena staklenim ili plastičnim poklopcem (Slika 9). Kromatogram se razvija na sobnoj temperaturi, sve dok ne dosegne visinu od 1 cm ispod gornjeg ruba ploče. Nakon toga ploča je stavljena na sušenje u digestor, a nakon sušenja ravnomjerno je poprskana metanolom. Prema referentnoj mrlji određuje se traka sterola. Rubovi mrlje is crtaju se olovkom te se metalnom špatulom sastruže silikagel unutar označenih rubova, prah koji se dobije prebacuje se u lijevak s filter papirom te mu se dodaje 0,5 mL 96 %-tne otopine etanola, a potom se ispiru 3 puta s 5 mL dietiletera. Sterolna frakcija skuplja se u tikvicu s okruglim dnom od 50 mL i kada se skupi stavlja se na rotavapor gdje se otparava pri temperaturi od 40 °C do suhog. Tikvica u kojoj se prethodno skupljala sterolna frakcija ispiru se s 0,5 mL dietiletera, sadržaj se prebaci u epruvetu te se suši pod strujom dušika. Dobiveni suhi ostatak predstavlja sterolnu frakciju.



**Slika 8.** Nanošenje neosapunjive frakcije na silikagel (Bosotin, 2016)



**Slika 9.** Razvijanje kromatograma u kadi (Bosotin, 2016)

### 3.2.5. Priprema trimetilsililetera

U epruvetu koja sadrži sterolnu frakciju doda se 100  $\mu\text{L}$  reagensa za sililiranje, koji sadrži mješavinu piridina, heksametildisilazana i trimetilkolorsilana u omjeru 5:2:1 (v/v/v). Epruveta se začepi, protrese na Vortexu do potpunog otapanja sterola te se stavi u sušionik na temperaturu od 105  $^{\circ}\text{C}$ , 15 min. Nakon sušenja epruveta se hladi u eksikatoru te centrifugira 7 min na 7000 okretaja  $\text{min}^{-1}$ . Bistri supernatant se odvoji od taloga i prenese se u vijalice od 2 mL s insertom 100  $\mu\text{L}$ .

### 3.2.6. Analiza sastava sterola plinskom kromatografijom

Tako pripremljeni uzorak analizira se na plinskom kromatografu Agilent Technologies 6890N Network GC System (Santa Clara, SAD) (Slika 10). Kromatograf je opremljen s injekcijskim sustavom i plameno-ionizacijskim detektorom (FID) koji je preko kanala spojen s računalom na kojemu je instaliran ChemStation softver. Uvjeti analize zadani su nakon što su provedena preliminarna ispitivanja na temelju kojih su odabrani optimalni uvjeti (temperatura kolone, detektora i injektora, protok plina te količina injektiranog uzorka) (Tablica 3).



**Slika 10.** Plinski kromatograf (Anonymous 3, 2021)

**Tablica 3.** Uvjeti rada plinskog kromatografa

Kolona	DB-17 (Agilent) 30 m x 0,32 mm, debljina filma 0,25 $\mu\text{m}$
Stacionarna faza	(50%-fenil)-metilpolisiloksan
Temperaturni program kolone	180 $^{\circ}\text{C}$ do 270 $^{\circ}\text{C}$ uz 6 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$ ; 270 $^{\circ}\text{C}$ 30 min
Trajanje analize	45 min
Plin nositelj	Helij
Protok plina nositelja	1,5 mL $\text{min}^{-1}$
Temperatura injektora	290 $^{\circ}\text{C}$
Split	13,3:1
Temperatura detektora	250 $^{\circ}\text{C}$
Količina injektiranog uzorka	1,0 $\mu\text{L}$



### 3.2.7. Identifikacija i kvantifikacija pikova

Pojedinačni pikovi sterola određuju se na temelju poznatih retencijskih vremena te usporedbom s retencijskim vremenima trimetilsililestera standardnih mješavina sterola analiziranih pod jednakim uvjetima. Udjel ukupnih sterola izražava se u  $\text{mg kg}^{-1}$  i izračunava se po formuli [1]:

$$\text{Ukupni steroli} = \frac{\sum A_s \cdot 1000}{A_a \cdot m} \quad [1]$$

gdje je:

$A_s$  = površina svakog pojedinačnog pika sterola

$A_a$  = površina ispod pika  $\alpha$ -kolestanola

$m$  = masa uzorka bučinog ulja

Udjel pojedinačnih sterola izražava se kao % od ukupnih sterola te se izračunava po formuli [2]:

$$\% \text{ od ukupnih sterola} = \frac{A \cdot 100\%}{\sum A_i} \quad [2]$$

gdje je:

$A$  = površina ispod pika određenog sterola ( $\text{mg kg}^{-1}$ )

$A_i$  = površina ispod pika svakog pojedinog sterola

### 3.3. STATISTIČKA ANALIZA

Statistička obrada rezultata napravljena je u programu XLSTAT (Addinsoft, Pariz, Francuska). Rezultati mjerenja izraženi su kao srednja vrijednost sa standardnom devijacijom, a za usporedbu uzoraka pod utjecajem dva faktora (kultivar i geografsko porijeklo) korištena je analiza varijance (ANOVA) s Tukey post-hoc testom. Kao granica statističke značajnosti postavljena je vrijednost za  $p \leq 0,05$ . Rezultati ANOVA-e prikazani su kao srednja vrijednost dobivene metodom najmanjih kvadrata  $\pm$  standardna pogreška. Također, povezanost klimatskih uvjeta u kojima su dozrijevale sirovine i sastava sterola u bučinom ulju utvrđena je Pearsonovim koeficijentima korelacije. I u ovom slučaju, statistička značajnost je utvrđena na razini  $p \leq 0,05$ .

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

U uzorcima bučinog ulja analizirani su udjeli (%) kampesterola, 24-metilenkolesterola, kampestanola, stigmasterola, klerosterola,  $\Delta 7$ -kampesterola,  $\beta$ -sitosterola, spinasterola,  $\Delta 5$ -avenasterola, stigmastatrienola,  $\Delta 7$ -stigmastenola, stigmastadienola i  $\Delta 7$ -avenasterola te ukupni steroli u  $\text{mg kg}^{-1}$ .

**Tablica 4.** Prosječna vrijednost  $\pm$  standardna devijacija ( $n = 53$ ) udjela sterola i količine ukupnih sterola u uzorcima bučinog ulja

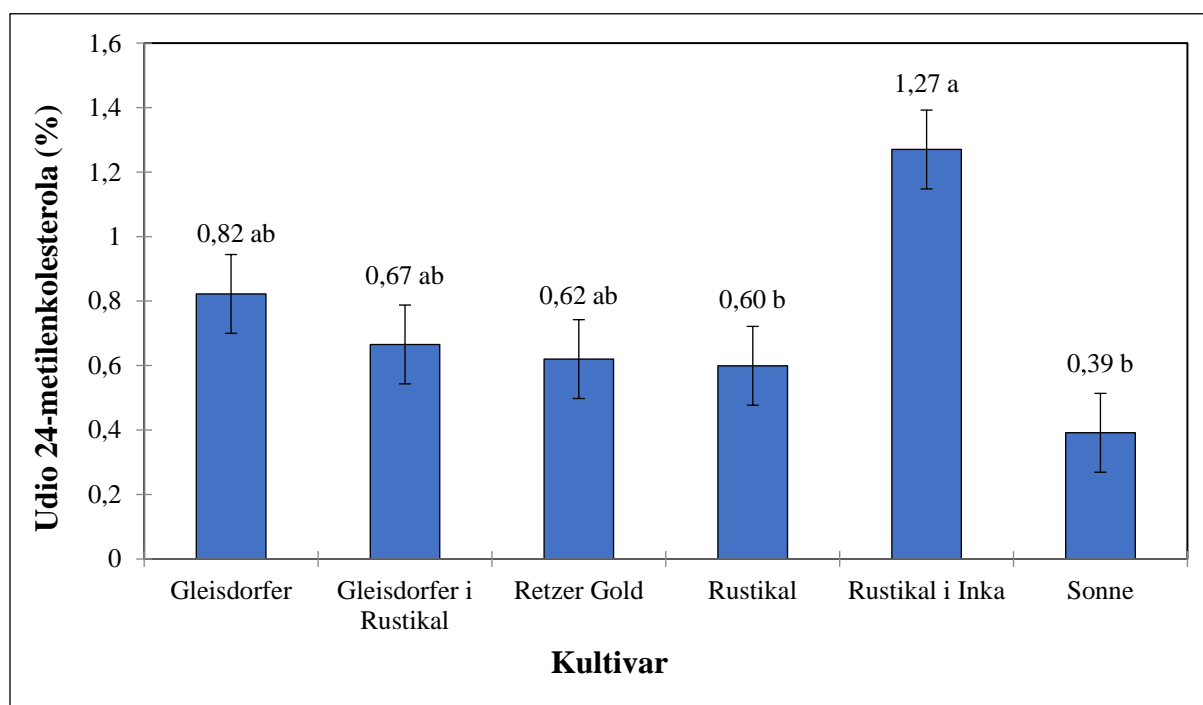
	Kampesterol	24-metilenkolesterol	Kampestanol	Stigmasterol	
<b>Prosječni udio sterola (%)</b>	1,41 $\pm$ 0,03	0,77 $\pm$ 0,03	0,58 $\pm$ 0,01	0,71 $\pm$ 0,03	
	Klerosterol	$\Delta 7$ -kampesterol	$\beta$ -sitosterol	Spinasterol	$\Delta 5$ -avenatserol
<b>Prosječni udio sterola (%)</b>	2,28 $\pm$ 0,22	0,99 $\pm$ 0,02	5,92 $\pm$ 0,13	22,17 $\pm$ 0,29	1,60 $\pm$ 0,05
	Stigmastatrienol	$\Delta 7$ -stigmastenol	Stigmastadienol	$\Delta 7$ -avenasterol	Ukupni steroli ( $\text{mg kg}^{-1}$ )
<b>Prosječni udio sterola (%)</b>	21,71 $\pm$ 0,23	4,16 $\pm$ 0,12	23,22 $\pm$ 0,45	14,50 $\pm$ 0,18	3393,32 $\pm$ 52,59

Dobiveni rezultati (Tablica 4) slični su rezultatima iz istraživanja Nakić i sur. (2006). U tom istraživanju ispitivan je udio osam sterola (kampesterol, stigmasterol,  $\beta$ -sitosterol, spinasterol, stigmastatrienol, stigmastadienol,  $\Delta 7$ -stigmastenol i  $\Delta 7$ -avenasterol) te ukupna količina sterola u  $\text{mg kg}^{-1}$ . Prema rezultatima u ovom istraživanju, najzastupljeniji steroli u bučinom ulju su spinasterol, stigmastatrienol, stigmastadienol i nešto manje  $\Delta 7$ -avenasterol, međutim udjeli najzastupljenijih sterola nešto su manji nego kod Nakić i sur. (2006). Udjeli ostalih sterola usporedivi su s rezultatima istraživanja Nakić i sur. (2006), dok je količina ukupnih sterola određena u ovom radu za  $351 \text{ mg kg}^{-1}$  veća od rezultata Nakić i sur. (2006). Nadalje, dobiveni rezultati su slični rezultatima istraživanja Wenzl i sur. (2002) te Fruhwirtha i Hermettera (2008). Iako u njihovim istraživanjima udjeli sterola nisu prikazani kroz postotke, razvidno je da su upravo spinasterol, stigmastatrienol, stigmastadienol i  $\Delta 7$ -avenasterol najzastupljeniji steroli u bučinom ulju. Uz njih, prisutan je manji udio  $\beta$ -sitosterola i  $\Delta 7$ -stigmastenol (oko 5 %).

#### 4.1. RAZLIKE U SASTAVU STEROLA S OBZIROM NA KULTIVARE

Analizom varijance utvrđene su razlike u sastavu sterola s obzirom na kultivare. Veće razlike u sastavu sterola utvrđene su među kultivarima nego što je to bio slučaj kod različitog geografskog porijekla uzorka.

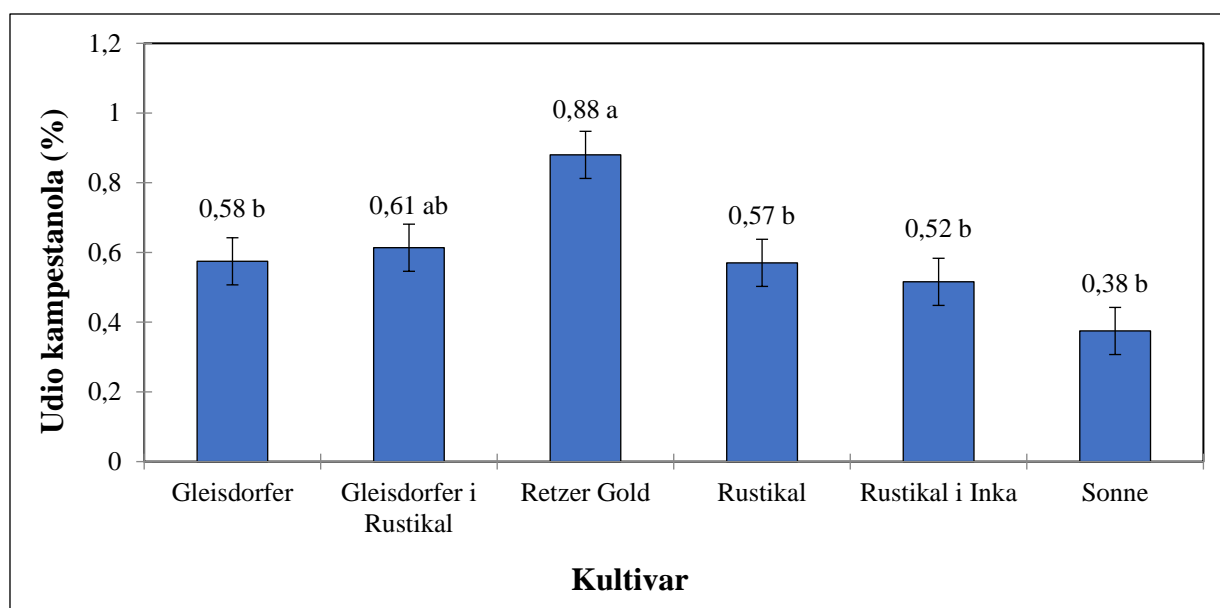
Statistički značajna razlika utvrđena je kod udjela 24-metilenkolesterola (Slika 11) gdje je kod kultivara Rustikal i Inka utvrđen statistički značajno veći udio ovog sterola, dok su kod kultivara Rustikal i Sonne utvrđeni statistički značajno manji udjeli navedenog sterola ( $p$ -vrijednost = 0,05).



Različitim slovima označeni su rezultati koji se međusobno statistički značajno razlikuju ( $p \leq 0,05$ )

**Slika 11.** Srednja vrijednost  $\pm$  standardna pogreška udjela 24-metilenkolesterola po kultivarima

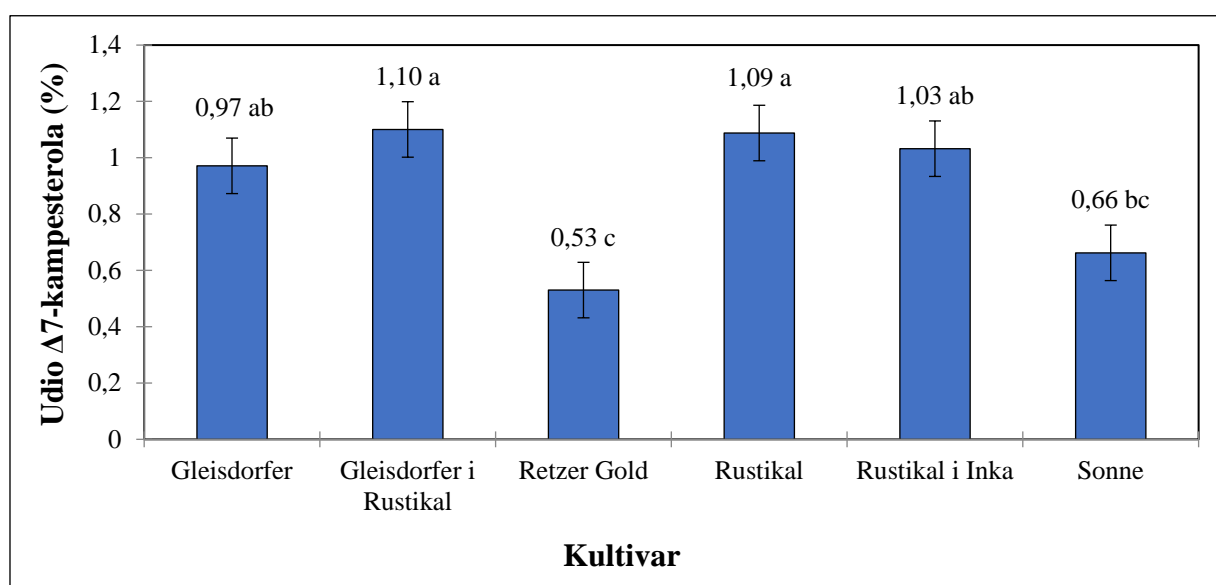
Statistički značajna razlika utvrđena je i u udjelu kampestanola (Slika 12), čiji je utvrđeni udio statistički značajno veći kod kultivara Retzer Gold te Gleisdorfer i Rustikal ( $p$ -vrijednost = 0,01).



Različitim slovima označeni su rezultati koji se međusobno statistički značajno razlikuju ( $p \leq 0,05$ )

**Slika 12.** Srednja vrijednost  $\pm$  standardna pogreška udjela kampestanola po kultivarima

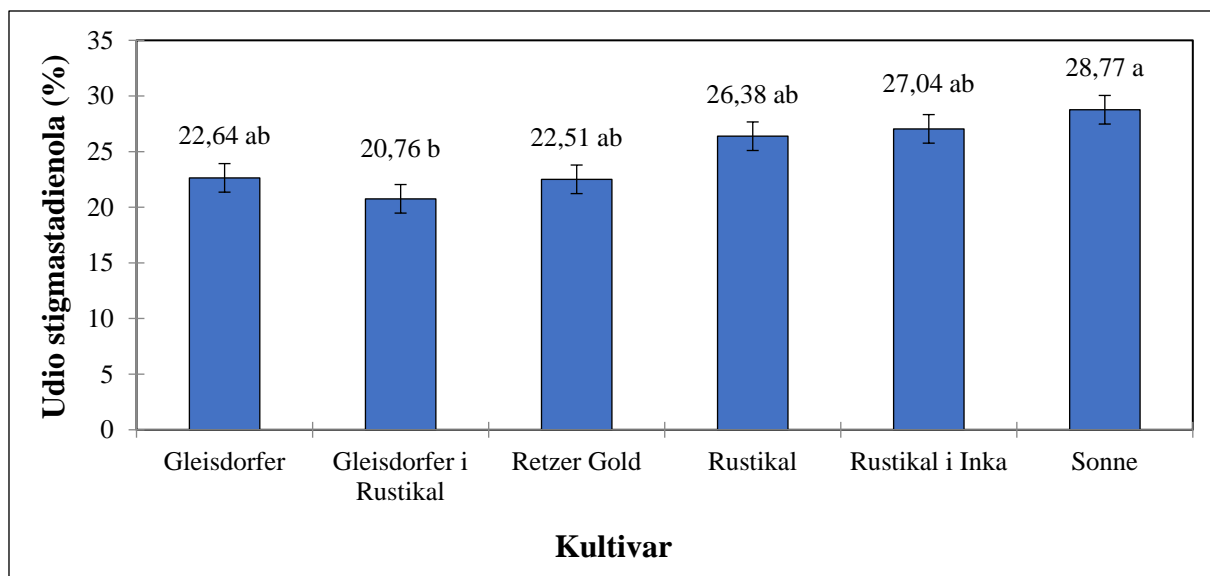
Velika raznolikost utvrđena je i kod udjela  $\Delta 7$ -kampesterola (Slika 13). Kod kultivara Gleisdorfer i Rustikal te Rustikal utvrđeni su statistički značajno veći udjeli  $\Delta 7$ -kampesterola u odnosu na ostale kultivare, dok su kod kultivara Retzer Gold i Sonne utvrđeni statistički značajno manji udjeli navedenog kultivara ( $p$ -vrijednost = 0,01).



Različitim slovima označeni su rezultati koji se međusobno statistički značajno razlikuju ( $p \leq 0,05$ )

**Slika 13.** Srednja vrijednost  $\pm$  standardna pogreška udjela  $\Delta 7$ -kampesterola po kultivarima

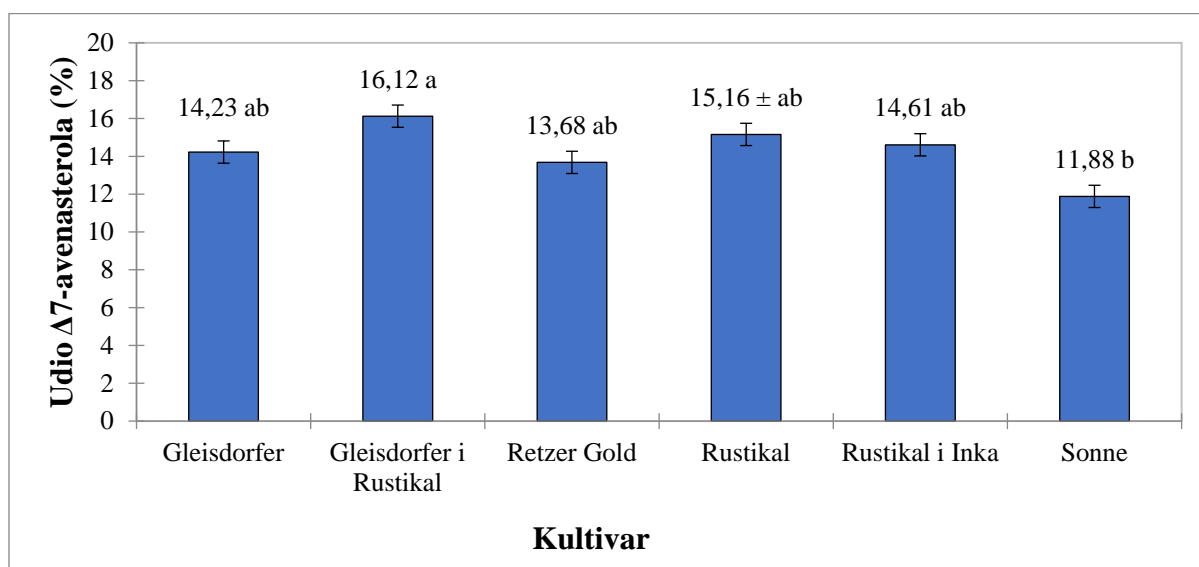
Također, velike razlike utvrđene su i kod udjela stigmastadienola (Slika 14), gdje je kod kultivara Gleisdorfer i Rustikal utvrđen statistički značajno manji udio stigmastadienola, dok je kod kultivara Sonne taj udio statistički značajno veći (p-vrijednost = 0,01).



Različitim slovima označeni su rezultati koji se međusobno statistički značajno razlikuju ( $p \leq 0,05$ )

**Slika 14.** Srednja vrijednost  $\pm$  standardna pogreška udjela stigmastadienola po kultivarima

Suprotna situacija je kod udjela  $\Delta 7$ -avenasterola (Slika 15), gdje je kod kultivara Gleisdorfer i Rustikal utvrđen statistički značajno veći udio  $\Delta 7$ -avenasterola, dok je kod kultivara Sonne utvrđen statistički značajno manji udio navedenog sterola (p-vrijednost = 0,01).



Različitim slovima označeni su rezultati koji se međusobno statistički značajno razlikuju ( $p \leq 0,05$ )

**Slika 15.** Srednja vrijednost  $\pm$  standardna pogreška udjela  $\Delta 7$ -avenasterola po kultivarima

Kod ostalih sterola nije utvrđena statistički značajna razlika među kultivarima, kao što je vidljivo u Tablici 5.

**Tablica 5.** Srednja vrijednost  $\pm$  standardna pogreška udjela ostalih sterola po kultivarima

	Kampe-sterol	Stigma-sterol	Klero-sterol	$\beta$ -sito-sterol	Spina-sterol	$\Delta$ 5-avena-sterol	Stigma-statrienol	$\Delta$ 7-stigma-sterol	Ukupni steroli (mg kg <sup>-1</sup> )
Gleisdorfer	1,44 $\pm$ 0,03 a	0,74 $\pm$ 0,04 a	2,32 $\pm$ 0,27 a	6,01 $\pm$ 0,15 a	22,65 $\pm$ 0,29 a	1,54 $\pm$ 0,05 a	21,88 $\pm$ 0,25 a	4,19 $\pm$ 0,14 a	3352,55 $\pm$ 56,59 a
Gleisdorfer i Rustikal	1,25 $\pm$ 0,09 a	0,65 $\pm$ 0,10 a	2,88 $\pm$ 0,75 a	5,26 $\pm$ 0,42 a	23,31 $\pm$ 0,79 a	1,55 $\pm$ 0,12 a	21,33 $\pm$ 0,68 a	4,51 $\pm$ 0,39 a	3444,30 $\pm$ 153,93 a
Rustikal i Inka	1,27 $\pm$ 0,20 a	0,67 $\pm$ 0,22 a	1,39 $\pm$ 1,67 a	6,19 $\pm$ 0,93 a	19,59 $\pm$ 1,77 a	2,04 $\pm$ 0,28 a	21,11 $\pm$ 1,51 a	3,29 $\pm$ 0,87 a	3790,63 $\pm$ 344,20 a
Rustikal	1,41 $\pm$ 0,07 a	0,67 $\pm$ 0,08 a	2,03 $\pm$ 0,59 a	5,99 $\pm$ 0,33 a	19,80 $\pm$ 0,63 a	1,82 $\pm$ 0,10 a	20,45 $\pm$ 0,54 a	4,05 $\pm$ 0,31 a	3553,47 $\pm$ 121,69 a
Sonne	1,43 $\pm$ 0,20 a	0,58 $\pm$ 0,22 a	1,16 $\pm$ 1,67 a	5,99 $\pm$ 0,93 a	18,46 $\pm$ 1,77 a	1,94 $\pm$ 0,28 a	24,98 $\pm$ 1,51 a	3,38 $\pm$ 0,87 a	3351,07 $\pm$ 344,20 a
Retzer Gold	1,08 $\pm$ 0,20 a	0,58 $\pm$ 0,22 a	1,59 $\pm$ 1,67 a	4,66 $\pm$ 0,93 a	24,01 $\pm$ 1,77 a	1,28 $\pm$ 0,28 a	24,60 $\pm$ 1,51 a	3,98 $\pm$ 0,87 a	3010,45 $\pm$ 344,20 a
p-vrijednost	0,59	0,99	0,80	0,60	0,01	0,01	0,07	0,59	0,06

Različitim slovima označeni su rezultati koji se međusobno statistički značajno razlikuju ( $p \leq 0,05$ )

Uzimajući u obzir ove podatke, može se zaključiti da je najviše razlike u sastavu sterola utvrđeno kod kultivara Sonne i hibrida Gleisdorfera i Rustikala. Kod kultivara Sonne zabilježena je statistički značajna razlika u udjelu sterola pri čemu su udjeli 24-metilenkolesterola,  $\Delta$ 7-kampesterola i  $\Delta$ 7-avenasterola manji, dok je udio stigmastadienola viši od uobičajenog. S druge strane, kod hibrida Gleisdorfera i Rustikala, udjeli kampestanola,  $\Delta$ 7-kampesterola i  $\Delta$ 7-avenasterola bili su viši nego kod ostalih kultivara, dok je udio stigmastadienola bio niži nego kod ostalih kultivara, čime se može potvrditi zaključak da sastav sterola više ovisi o kultivaru nego o mikroklimi područja na kojemu je biljka uzgajana. Kod hibrida Rustikal zabilježeni su niži udjeli 24-metilenkolesterola i stigmastadienola te veći udio  $\Delta$ 7-kampesterola, kod kultivara Retzer Gold veći udio kampestanola i manji udio  $\Delta$ 7-kampesterola, dok je kod hibrida Rustikala i Inke zabilježen veći udio 24-metilenkolesterola.

Istraživanja koja problematiziraju razlike u sastavu sterola s obzirom na različite vrste buče i različite kultivare vrlo su rijetka. Istraživanja koja uspoređuju razlike u sastavu sterola među

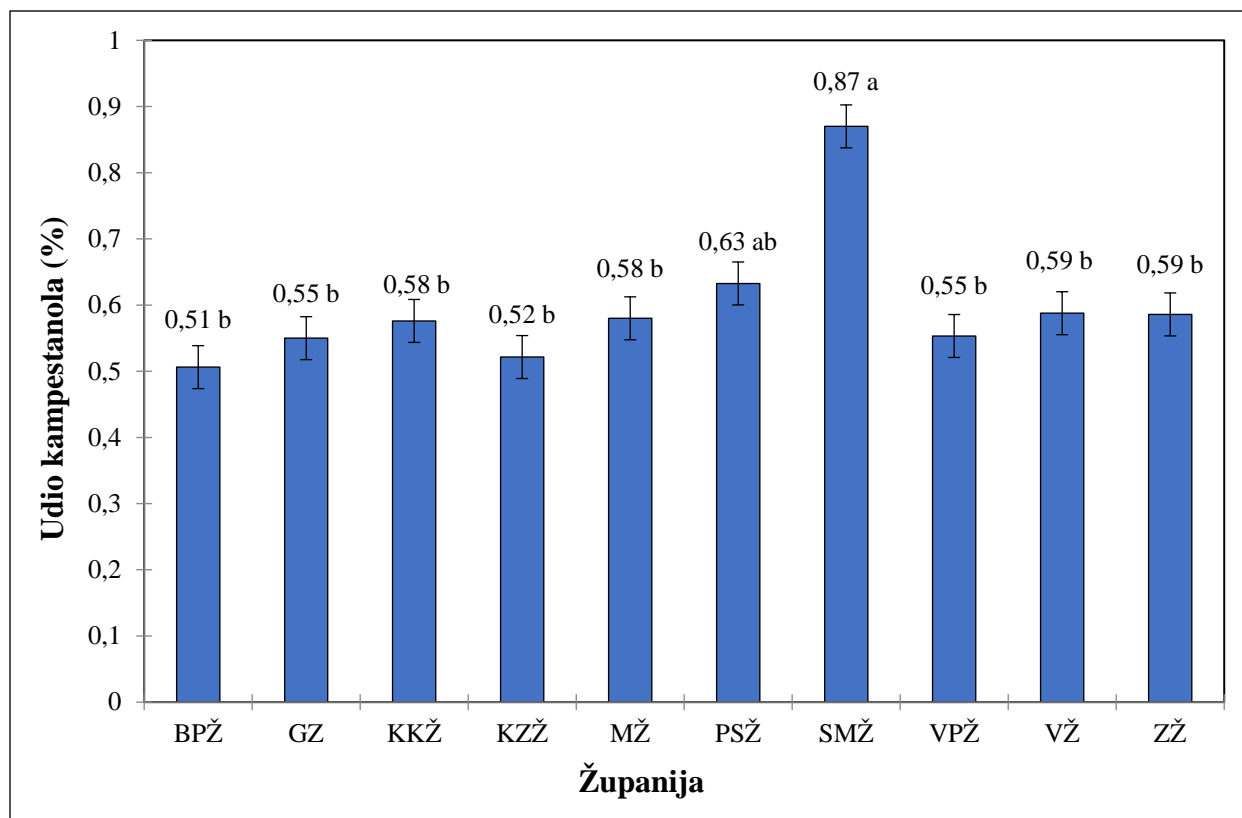
kultivarima korištenima u ovom radu ne postoje. U istraživanju Rabrenović i sur. (2014) ispitivani su udjeli spinasterola +  $\beta$ -sitosterola, stigmastatrienola, stigmastadienola, stigmasterola i  $\Delta$ 7-avenasterola kod hibrida F1 Olinka x G, F1 Olinka x 371B, Gleisdorfer Express i komercijalnog sjemena K2. Rezultati istraživanja Rabrenović i sur. (2014) bitno se razlikuju od rezultata u ovom radu, ali i od nekih drugih istraživanja Nakić i sur. (2006). Količina ukupnih sterola u istraživanju Rabrenović i sur. (2014) gotovo je dvostruko veća nego u ovom radu i kreće se u rasponu od 7181 do 8978 mg kg<sup>-1</sup>. Također, ukupni udjel spinasterola i  $\beta$ -sitosterola kod Rabrenović i sur. (2014) je u rasponu od 41,1 i 52,1 %, dok su dobiveni rezultati u rasponu od 23,12 do 30,20 %. Udjeli stigmastatrienola također su povišeni oko 5 %, dok je velika razlika u udjelu stigmastadienola gdje udjeli variraju od 5,8 do 8,0 % kod Rabrenović i sur. (2014) za razliku od rezultata dobivenih u ovom radu koji se kreću od 20,76 do 28,77 %. Isto tako, velike su razlike u udjelu stigmasterola i  $\Delta$ 7-avenasterola, gdje je kod stigmasterola dobiveni raspon od 0,58 do 0,74% za razliku od raspona od 12,5 do 16,7 % kod Rabrenović i sur. (2014), dok je kod  $\Delta$ 7-avenasterola razlika od 1,6 do 4,4 % kod Rabrenović i sur., a dobiveni rezultati su u rasponu od 11,88 do 16,12 %.

U istraživanju Srbinoske i sur. (2012) ispitivane su razlike u sastavu sterola u ulju dobivenom iz *Cucurbita maxima* (golice i koštice s ljuskom) te *Cucurbita pepo* (golice i koštice s ljuskom). Vidljivo je da je kod svih vrsta ukupna količina sterola (od 2193,57 mg kg<sup>-1</sup> kod golice *Cucurbita pepo* do 3046,77 mg kg<sup>-1</sup> kod koštice s ljuskom *Cucurbita maxima*) manja nego u ovom istraživanju (prosječno 3393,32 mg kg<sup>-1</sup>). Ostali rezultati otprilike su jednaki, najzastupljeniji steroli su spinasterol, stigmastatrienol, stigmastadienol i  $\Delta$ 7-avenasterol. Kod *Cucurbita maxime* veći je udio spinasterol i stigmastadienola i  $\Delta$ 7-stigmastenola u odnosu na *Cucurbita pepo*, dok je obrnuta situacija kod udjela stigmastatrienola i  $\Delta$ 7-avenasterola. Općenito, kod koštice s ljuskom udio  $\beta$ -sitosterola gotovo je dvostruko veći nego kod golica, neovisno o vrsti, a ta se razlika kompenzira većim udjelom  $\Delta$ 7-sterola.

Vanhanen i sur. (2003) istraživali su razlike u sastavu sterola između pet uzoraka *Cucurbita maxime* i *Cucurbita pepo*. Ispitivan je samo dio sterola pri čemu oni najzastupljeniji u bučinom ulju nisu dovoljno razrađeni. Udjeli spinasterola i  $\Delta$ 7-avenasterola su usporedivi s dobivenim rezultatima dok je udio stigmastadienola razmjerno nizak kod *Cucurbita pepo* (13,5 %), a udio stigmastatrienola nije utvrđen već je pripisan ostalim sterolima i drugim neosapunjivim dijelovima, kojih ima 39,2 %. Udjeli sterola između različitih ispitivanih uzoraka u tom radu usporedivi su i nema velikih razlika.

#### 4.2. RAZLIKE U SASTAVU STEROLA S OBZIROM NA GEOGRAFSKO PORIJEKLO

Razlike u sastavu sterola s obzirom na geografsko porijeklo utvrđene su analizom varijance. Uspoređivani su udjeli različitih sterola s obzirom na to iz koje županije potječe uzorak. Statistički značajna razlika utvrđena je kod udjela kampestanola (Slika 16) gdje su uzorci iz Požeško-slavonske i Sisačko-moslavačke županije imali veći udio kampestanola od uzoraka iz ostalih županija (p-vrijednost = 0,01).

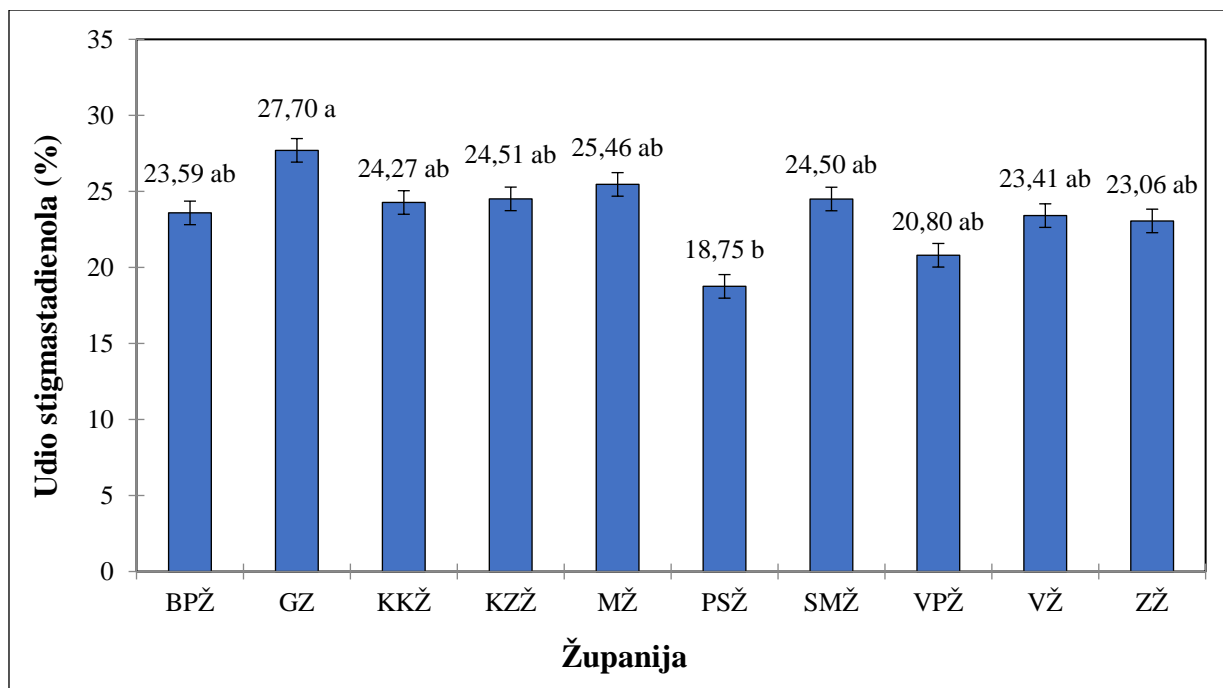


Različitim slovima označeni su rezultati koji se međusobno statistički značajno razlikuju ( $p \leq 0,05$ )

**Slika 16.** Srednja vrijednost  $\pm$  standardna pogreška udjela kampestanola po županijama

Kod stigmastadienola (Slika 17) također je utvrđena statistički značajna razlika gdje se može primijetiti da uzorci iz Požeško-slavonske županije imaju statistički značajno manji udio stigmastadienola u odnosu na uzorak iz Grada Zagreba (p-vrijednost = 0,01).

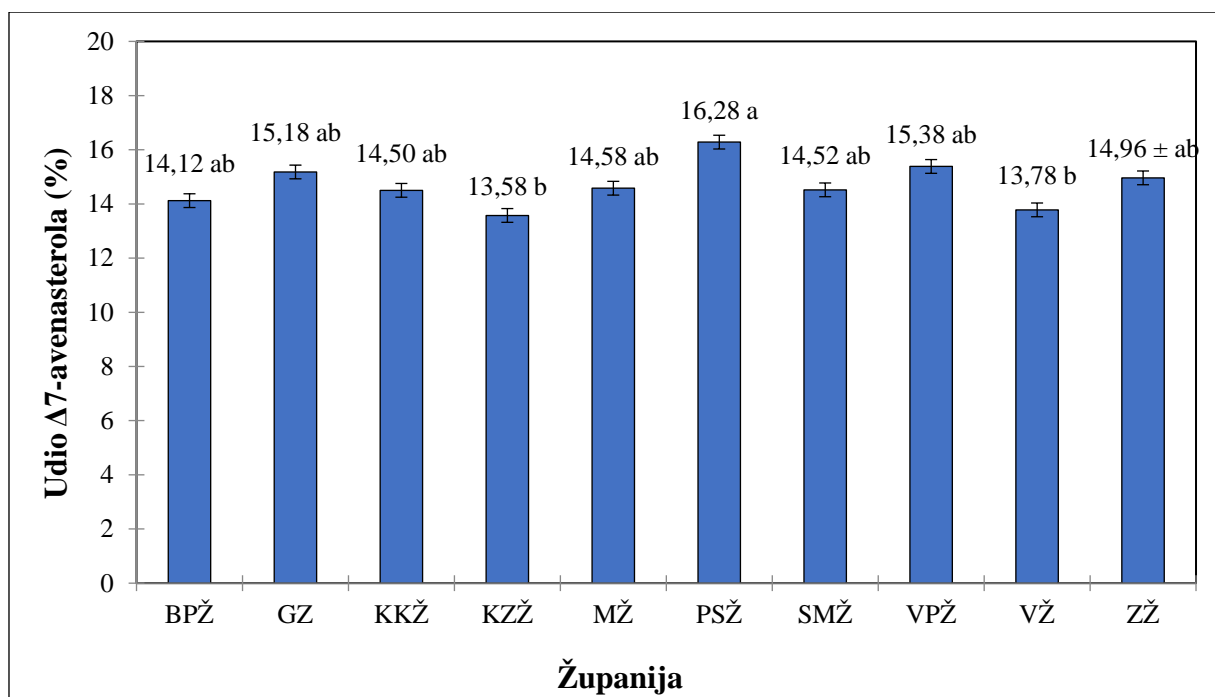




Različitim slovima označeni su rezultati koji se međusobno statistički značajno razlikuju ( $p \leq 0,05$ )

**Slika 17.** Srednja vrijednost  $\pm$  standardne pogreške udjela stigmasteradienola po županijama

Kod  $\Delta 7$ -avenasterola (Slika 18) statistički značajna razlika utvrđena je kod uzoraka iz Varaždinske, Požeško-slavonske i Krapinsko-zagorske županije, pri čemu su uzorci iz Varaždinske i Krapinsko-zagorske županije imali statistički značajno manji, a uzorci iz Požeško-slavonske statistički značajno veći udio  $\Delta 7$ -avenasterola ( $p$ -vrijednost = 0,01).



Različitim slovima označeni su rezultati koji se međusobno statistički značajno razlikuju ( $p \leq 0,05$ )

**Slika 18.** Srednja vrijednost  $\pm$  standardna pogreška udjela  $\Delta 7$ -avenasterola po županijama

Kod ostalih sterola temeljem Tukey testa nije utvrđena statistički značajna razlika među uzorcima iz različitih županija premda je kod  $\Delta 7$ -kampesterola, spinasterola i  $\Delta 5$ -avenasterola ANOVA pokazala postojanje značajnih razlika (Tablica 6).

**Tablica 6.** Srednja vrijednost  $\pm$  standardna pogreška udjela ostalih sterola po županijama

	<b>Kampesterol</b>	<b>24-metilen-kolesterol</b>	<b>Stigmasterol</b>	<b>Klerosterol</b>	<b><math>\Delta 7</math>-kampesterol</b>
<b>Medimurska</b>	1,60 $\pm$ 0,14 a	0,77 $\pm$ 0,15 a	0,69 $\pm$ 0,15 a	1,60 $\pm$ 1,18 a	1,02 $\pm$ 0,09 a
<b>Varaždinska</b>	1,47 $\pm$ 0,06 a	0,80 $\pm$ 0,06 a	0,78 $\pm$ 0,06 a	1,96 $\pm$ 0,46 a	0,90 $\pm$ 0,03 a
<b>Virovitičko-podravka</b>	1,42 $\pm$ 0,09 a	0,76 $\pm$ 0,09 a	0,70 $\pm$ 0,10 a	3,01 $\pm$ 0,75 a	1,01 $\pm$ 0,05 a
<b>Požeško-slavonska</b>	1,27 $\pm$ 0,10 a	0,68 $\pm$ 0,10 a	0,67 $\pm$ 0,11 a	3,43 $\pm$ 0,84 a	1,10 $\pm$ 0,06 a
<b>Koprivničko-križevačka</b>	1,40 $\pm$ 0,07 a	0,71 $\pm$ 0,07 a	0,72 $\pm$ 0,08 a	1,53 $\pm$ 0,59 a	1,03 $\pm$ 0,04 a
<b>Krapinsko-zagorska</b>	1,43 $\pm$ 0,07 a	0,99 $\pm$ 0,07 a	0,69 $\pm$ 0,08 a	2,79 $\pm$ 0,59 a	0,96 $\pm$ 0,04 a
<b>Zagrebačka</b>	1,36 $\pm$ 0,06 a	0,70 $\pm$ 0,07 a	0,71 $\pm$ 0,07 a	2,40 $\pm$ 0,53 a	1,01 $\pm$ 0,04 a
<b>Sisačko-moslavačka</b>	1,26 $\pm$ 0,20 a	0,66 $\pm$ 0,21 a	0,62 $\pm$ 0,22 a	1,79 $\pm$ 1,67 a	1,17 $\pm$ 0,12 a
<b>Brodsko-posavska</b>	1,29 $\pm$ 0,20 a	0,77 $\pm$ 0,21 a	0,57 $\pm$ 0,22 a	1,20 $\pm$ 1,67 a	1,01 $\pm$ 0,12 a
<b>Grad Zagreb</b>	1,26 $\pm$ 0,20 a	0,52 $\pm$ 0,21 a	0,59 $\pm$ 0,22 a	1,64 $\pm$ 1,67 a	1,06 $\pm$ 0,12 a
<b>p-vrijednost</b>	0,59	0,05	0,99	0,80	0,01

	<b><math>\beta</math>-sitosterol</b>	<b>Spinasterol</b>	<b><math>\Delta 5</math>-avenasterol</b>	<b>Stigma-statrienol</b>	<b><math>\Delta 7</math>-stigmastenol</b>	<b>Ukupni steroli (mg kg<sup>-1</sup>)</b>
<b>Medimurska</b>	5,68 $\pm$ 0,66 a	21,22 $\pm$ 1,25 a	1,84 $\pm$ 0,20 a	20,29 $\pm$ 1,07 a	4,71 $\pm$ 0,62 a	3654,09 $\pm$ 243,39 a
<b>Varaždinska</b>	5,80 $\pm$ 0,26 a	22,73 $\pm$ 0,49 a	1,74 $\pm$ 0,18 a	21,81 $\pm$ 0,42 a	4,25 $\pm$ 0,24 a	3035,29 $\pm$ 95,47 a
<b>Virovitičko-podravka</b>	6,28 $\pm$ 0,42 a	22,32 $\pm$ 0,79 a	1,41 $\pm$ 0,13 a	22,32 $\pm$ 0,68 a	4,04 $\pm$ 0,39 a	3501,37 $\pm$ 153,93 a
<b>Požeško-slavonska</b>	5,23 $\pm$ 0,47 a	24,13 $\pm$ 0,88 a	1,44 $\pm$ 0,14 a	21,95 $\pm$ 0,76 a	4,42 $\pm$ 0,44 a	3441,77 $\pm$ 172,10 a
<b>Koprivničko-križevačka</b>	5,82 $\pm$ 0,33 a	21,64 $\pm$ 0,63 a	1,54 $\pm$ 0,10 a	22,02 $\pm$ 0,54 a	4,24 $\pm$ 0,31 a	3563,95 $\pm$ 121,69 a

<b>Krapinsko-zagorska</b>	6,26 ± 0,33 a	21,07 ± 0,63 a	1,61 ± 0,10 a	21,96 ± 0,54 a	3,64 ± 0,31 a	3484,54 ± 121,69 a
<b>Zagrebačka</b>	6,20 ± 0,29 a	22,39 ± 0,56 a	1,55 ± 0,09 a	20,90 ± 0,50 a	4,17 ± 0,28 a	3471,04 ± 108,85 a
<b>Sisačko-moslavačka</b>	5,20 ± 0,93 a	20,35 ± 1,77 a	1,72 ± 0,28 a	21,45 ± 1,51 a	5,88 ± 0,87 a	3173,52 ± 340,22 a
<b>Brodsko-posavska</b>	5,89 ± 0,93 a	22,55 ± 1,77 a	0,90 ± 0,28 a	23,46 ± 1,51 a	4,16 ± 0,87 a	3519,99 ± 340,22 a
<b>Grad Zagreb</b>	4,68 ± 0,93 a	20,50 ± 1,77 a	1,99 ± 0,28 a	21,23 ± 1,51 a	3,10 ± 0,87 a	4013,04 ± 340,22 a
<b>p-vrijednost</b>	0,60	0,01	0,01	0,07	0,59	0,06

Različitim slovima označeni su rezultati koji se međusobno statistički značajno razlikuju ( $p \leq 0,05$ )

Najviše razlike utvrđeno je kod uzoraka iz Požeško-slavonske županije koja ima nešto više udjele kampestenola i  $\Delta 7$ -avenasterola i nešto niži udio stigmastadienola. S obzirom da su sva četiri uzorka iz Požeško-slavonske županije hibrid Gleisdorfera i Rustikala, vjerojatnije je da uzrok razlike upravo u svojstvima ovog hibrida, a ne u uvjetima rasta sjemenki iz kojih je dobiveno ulje.

Kada su županije grupirane u dvije regije u kojima se nalaze – Međimursku, Varaždinsku, Krapinsko-zagorsku, Koprivničko-križevačku, Zagrebačku, Sisačko-moslavačku županiju i Grad Zagreb u Sjeverozapadnu i Središnju Hrvatsku, a Virovitičko-podravsku, Požeško-slavonsku i Brodsko-posavsku županiju u Istočnu Hrvatsku dobiveni su nešto drugačiji rezultati (Tablica 7). Ponovno je statistički značajna razlika utvrđena kod stigmastadienola i  $\Delta 7$ -avenasterola, pri čemu je u uzorcima iz Sjeverozapadne i Središnje Hrvatske utvrđen statistički značajno veći udio stigmastadienola u odnosu na uzorke iz Istočne Hrvatske, dok je udio  $\Delta 7$ -avenasterola bio statistički značajno veći u uzorcima iz Istočne Hrvatske u odnosu na one iz Sjeverozapadne i središnje Hrvatske. Također, utvrđena je i statistički značajna razlika u udjelu  $\Delta 5$ -avenasterola, koji je statistički značajno više bio zastupljen u uzorcima iz Sjeverozapadne i središnje Hrvatske u odnosu na one iz Istočne Hrvatske.

**Tablica 7.** Srednja vrijednost  $\pm$  standardna pogreška udjela sterola po regijama

	<b>Kampesterol</b>	<b>24- metilenkolesterol</b>	<b>Kampestanol</b>	<b>Stigmasterol</b>	
<b>Istočna Hrvatska</b>	1,35 $\pm$ 0,06 a	0,73 $\pm$ 0,07 a	0,58 $\pm$ 0,03 a	0,68 $\pm$ 0,06 a	
<b>Sjeverozapadna i središnja Hrvatska</b>	1,42 $\pm$ 0,03 a	0,78 $\pm$ 0,04 a	0,58 $\pm$ 0,02 a	0,72 $\pm$ 0,03 a	
<b>p-vrijednost</b>	0,29	0,50	0,95	0,52	
	<b>Klerosterol</b>	<b><math>\Delta</math>7- kampesterol</b>	<b><math>\beta</math>-sitosterol</b>	<b>Spinasterol</b>	<b><math>\Delta</math>5- avenasterol</b>
<b>Istočna Hrvatska</b>	2,99 $\pm$ 0,50 a	1,05 $\pm$ 0,05 a	5,82 $\pm$ 0,29 a	23,07 $\pm$ 0,67 a	1,37 $\pm$ 0,10 b
<b>Sjeverozapa- dna i središnja Hrvatska</b>	2,11 $\pm$ 0,24 a	0,97 $\pm$ 0,02 a	5,94 $\pm$ 0,14 a	21,96 $\pm$ 0,32 a	1,65 $\pm$ 0,05 a
<b>p-vrijednost</b>	0,11	0,18	0,73	0,14	0,02*
	<b>Stigmastatrie- nol</b>	<b><math>\Delta</math>7- stigmastenol</b>	<b>Stigmastadie- nol</b>	<b><math>\Delta</math>7- avenasterol</b>	<b>Ukupni steroli (mg kg<sup>-1</sup>)</b>
<b>Istočna Hrvatska</b>	22,29 $\pm$ 0,53 a	4,20 $\pm$ 0,27 a	20,26 $\pm$ 0,94 b	15,62 $\pm$ 0,39 a	3479,39 $\pm$ 121,51 a
<b>Sjeverozapa- dna i središnja Hrvatska</b>	21,57 $\pm$ 0,26 a	4,15 $\pm$ 0,13 a	23,91 $\pm$ 0,45 a	14,24 $\pm$ 0,19 b	3373,30 $\pm$ 58,60 a
<b>p-vrijednost</b>	0,23	0,86	0,01*	0,01*	0,44

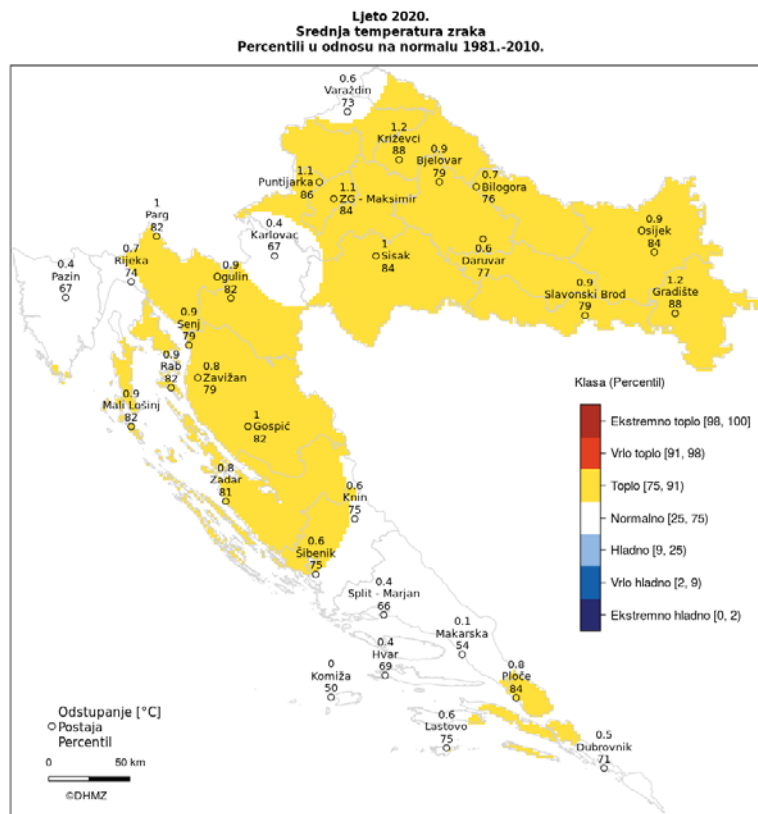
Različitim slovima označeni su rezultati koji se međusobno statistički značajno razlikuju ( $p \leq 0,05$ )

\* Zvezdicom su označene p-vrijednosti koje označavaju statistički značajnu razliku

#### 4.2.1 Razlike u udjelima sterola s obzirom na vremenske prilike

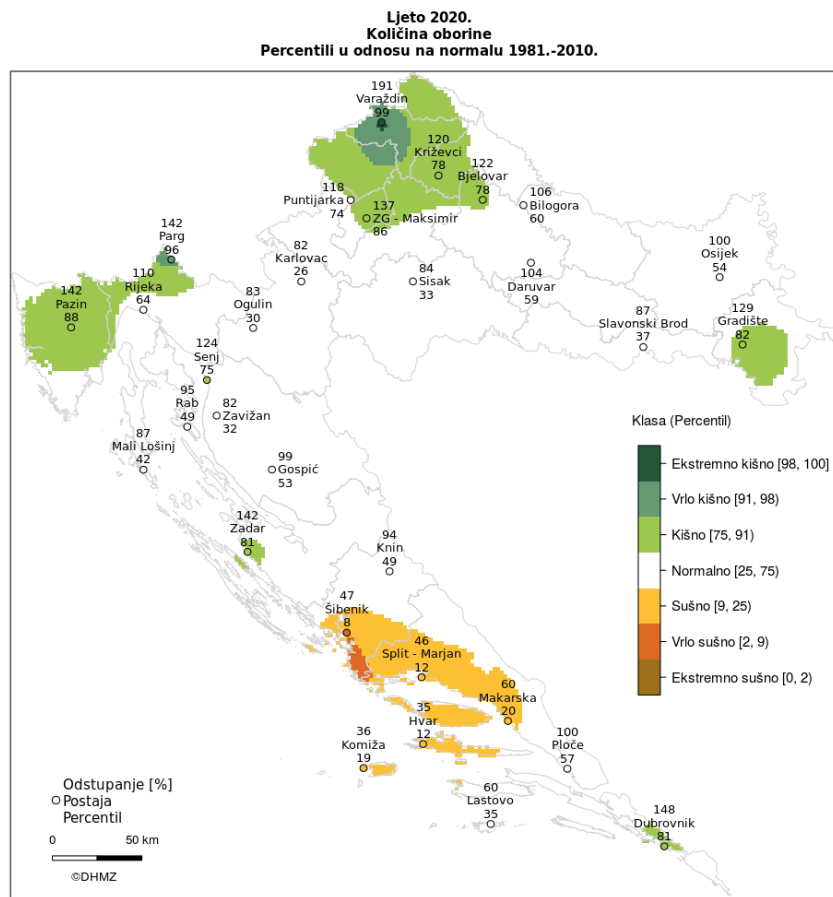
Razlike u sterolima među uzorcima iz različitih županija možda se mogu objasniti različitim klimatološkim uvjetima. O utjecaju vremenskih prilika na sastav sterola u bučinom ulju ne postoje radovi, međutim njihov utjecaj na sastav sterola ispitan je u drugim uljima. Tako je utvrđeno da se ukupna količina sterola u suncokretovom ulju povećava što su vremenski uvjeti ekstremniji, odnosno što je količina vode dostupne biljci manja. To se može objasniti fiziološkom ulogom sterola u regulaciji propusnosti membrane (Roche i sur., 2006). Detaljnije su utjecaj vremenskih uvjeta istražili Noorali i sur. (2014) na uzrocima maslinovog ulja koje je uzgajano u različitim podnebljima, na području Gorgana koji se nalazi u blizini Kaspijskog jezera te na području Qoma, koji ima subpustinjsku klimu. Gorgan se nalazi u nizini na 13 m nadmorske visine, dok je Qoma na preko 900 m nadmorske visine. Temperature zraka su slične, međutim razlike između minimuma i maksimuma veće su na području Qoma. Očekivano, puno je više padalina na području Gorgana te je i puno veća relativna vlažnost zraka, dok Qoma ima puno više sunčanih sati mjesečno od Gorgana. Također, utvrđeno je da se sastav, kao i količina ukupnih sterola razlikuje između dva podneblja. Ukupna količina sterola bila je veća na području Gorgana, gdje su vremenski uvjeti blaži, što je suprotno rezultatima istraživanja Rochea i sur. (2006). Međutim, udio najzastupljenijeg sterola,  $\beta$ -sitosterola, bio je veći u uzorcima iz Qoma.

Načelno, ljeto 2020. godine, kada su dozrijevale buče iz kojih je dobiveno bučino ulje za uzorke, bilo je po pitanju temperature zraka u Republici Hrvatskoj nešto toplije uz iznimku krajnjeg sjeverozapada Hrvatske (okolica Varaždina i zapadni dio Međimurske županije), jugozapada Zagrebačke županije i zapada Sisačko-moslavačke županije, barem što se tiče promatranog područja iz kojeg dolaze uzorci (Slika 19).



**Slika 19.** Srednja temperatura zraka u ljeto 2020. u odnosu na normalnu (DHMZ, 2021)

Što se tiče količine padalina 2020. godine, na većini područja Republike Hrvatske zabilježeno je ljeto s prosječnom količinom padalina (Slika 20). Kada govorimo o području iz kojega dolaze uzorci, iznimka je okolica Varaždina gdje je zabilježeno vrlo kišno i ekstremno kišno ljeto, dok je na području sjeverozapadne Hrvatske (cijela Varaždinska i Krapinsko-zagorska županija, veliki dio Međimurske županije, zapadni dio Koprivničko-križevačke županije, sjeveroistočni dio Zagrebačke županije i sjeverni dio Grada Zagreba) prošlo ljeto bilo kišno.



**Slika 20.** Količina oborina u ljeto 2020. u odnosu na normalu (DHMZ, 2021)

Ipak, nije utvrđena povezanost između klimatskih prilika tijekom perioda dozrijevanja ploda iz kojega je proizvedeno ulje i sastava sterola (Tablica 8). Pozitivna korelacija ( $p$ -vrijednost = 0,01) utvrđena je jedino između količine padalina i udjela kampesterola u ulju, pri čemu je višak padalina u odnosu na normalu pozitivno korelirao s udjelom kampesterola u bučinom ulju, odnosno što je više padalina tijekom razdoblja dozrijevanja ploda iz kojega se dobiva ulje, to je udio kampesterola u ulju bio veći. Ovo zapažanje je u skladu s istraživanjem Noorali i sur. (2014), gdje je udio kampesterola bio veći u maslinovom ulju s područja gdje je bilo više padalina.

**Tablica 8.** Korelacije između temperature i padalina i udjela sterola

		<b>24-</b>				
		<b>Kampesterol</b>	<b>metilenko</b>	<b>Kampestenol</b>	<b>Stigmasterol</b>	
		<b>lesterol</b>				
<b>Temperatura</b>	Korelacija	-0,56	-0,20	0,05	-0,32	
	p-vrijednost	0,10	0,59	0,88	0,37	
<b>Padaline</b>	Korelacija	0,76*	0,12	-0,28	0,55	
	p-vrijednost	0,01	0,75	0,44	0,10	

		<b>Δ7-</b>				<b>Δ5-</b>
		<b>Klerosterol</b>	<b>kampe-</b>	<b>β-sitosterol</b>	<b>Spinasterol</b>	<b>avenasterol</b>
		<b>sterol</b>				
<b>Tempe- ratura</b>	Korelacija	-0,06	0,39	-0,14	-0,31	-0,01
	p-vrijednost	0,87	0,27	0,70	0,39	0,98
<b>Padaline</b>	Korelacija	-0,26	-0,23	0,08	-0,12	0,58
	p-vrijednost	0,47	0,52	0,83	0,75	0,08

		<b>Stigma-</b>	<b>Stigma-</b>	<b>Stigma-</b>	<b>Δ7-</b>	<b>Ukupno</b>
		<b>statrienol</b>	<b>stenol</b>	<b>stadienol</b>	<b>avenasterol</b>	<b>steroli</b>
		<b>(mg kg<sup>-1</sup>)</b>				
<b>Tempe- ratura</b>	Korelacija	0,08	-0,21	0,26	0,02	0,34
	p-vrijednost	0,84	0,55	0,48	0,97	0,34
<b>Padaline</b>	Korelacija	-0,60	-0,18	0,40	-0,33	0,00
	p-vrijednost	0,07	0,62	0,26	0,35	1,00

\* Zvezdicom su označene vrijednosti gdje je koeficijent korelacije statistički značajan

Kada su steroli grupirani u Δ5- (24-metilenkolesterol, β-sitosterol, stigmasterol, kampesterol i Δ5-avenasterol) i Δ7-sterole (spinasterol, stigmastadienol, stigmastatrienol, Δ7-kampesterol i Δ7-avenasterol) nisu utvrđene korelacije između temperature zraka i količine padalina s jedne i udjela Δ5- i Δ7-sterola u bučinom ulju s druge strane (Tablica 9).

**Tablica 9.** Korelacije između temperature, padalina i udjela Δ5- i Δ7-sterola

		<b>Δ7-steroli</b>	<b>Δ5-steroli</b>
<b>Temperatura</b>	Korelacija	0,37	-0,26
	p-vrijednost	0,29	0,46
<b>Padaline</b>	Korelacija	-0,01	0,50
	p-vrijednost	0,97	0,14



Sudeći prema primjerima na drugim uljima, vremenske prilike zasigurno igraju ulogu u sastavu i količini ukupnih sterola u ulju. Međutim, među ispitivanim uzorcima bučinog ulja nije utvrđena statistički značajna razlika. Razlozi za to su višestruki. Ljeto 2020. godine klimatološki je bilo nešto toplije od prosjeka, a količina padalina u sjeverozapadnoj Hrvatskoj bila je viša od prosjeka, dok je u ostatku kontinentalne Hrvatske ona bila na razini normale. S obzirom da prema dostupnim i relevantnim istraživanjima na sastav i količinu sterola utječu ekstremne vremenske prilike u vidu visoke temperature zraka i male količine padalina, koje u Hrvatskoj nisu zabilježene, razumljivo je da nije bilo odstupanja u sastavu sterola. Dodatno, nisu zabilježene razlike u ta dva faktora koja utječu na sastav sterola, osim u količini padalina na sjeverozapadu Hrvatske. Međutim, čini se da te razlike nisu bile toliko velike da bi se odrazile na sastav sterola, s obzirom da je ostatak kontinentalne Hrvatske imao prosječno ljeto što se tiče količine padalina. Temperaturno je kontinentalna Hrvatska bila prilično jednolična s temperaturama zraka nešto većima od prosjeka pa se neke razlike u sastavu sterola uzrokovane temperaturom zraka nisu mogle niti utvrditi. Za utvrđivanje stvarnog utjecaja vremenskih prilika na sastav sterola potrebno je ispitivati uzorke tijekom više godina, pogotovo ako su ljetna razdoblja izrazito sušna i vruća.

#### 4.3. UDJELI STEROLA S OBZIROM NA PRAVILNIK O JESTIVIM ULJIMA I MASTIMA

Kod 12 od 53 uzorka bučinog ulja utvrđen je sastav sterola koji ne odgovara zahtjevima navedenima u Pravilniku o jestivim uljima i mastima (2019). Ako promatramo odstupanja s obzirom na kultivar, 6 uzoraka kultivara Rustikal, 3 uzorka kultivara Gleisdorfer te po 1 uzorak kultivara Sonne, Gleisdorfer i Rustikal te Rustikal i Inka ne zadovoljavaju zahtjeve Pravilnika. Što se tiče podjele po županijama, 4 uzorka su iz Koprivničko-križevačke i Krapinsko-zagorske županije te po jedan uzorak iz Varaždinske, Međimurske, Zagrebačke i Požeško-slavonske županije.

U 10 uzoraka bučinog ulja određena je vrijednost spinasterola koja odstupa od granice određene Pravilnikom o jestivim uljima i mastima (2019) za navedeni spoj koja iznosi od 20 do 40 %. Spinasterol je u uzorcima zabilježen u udjelu od 18,02 do 26,02%. U ovom slučaju moguće je da je uzrok odstupanja veća osjetljivost novih analitičkih metoda koje su u stanju obuhvatiti više kemijskih spojeva (15 sterola) nego što je to bilo moguće kada su rađena istraživanja na temelju kojih su postavljene granice u Pravilniku (8 spojeva). Naime, budući da se sastav sterola izražava u postotcima, pojava većeg broja spojeva može umanjiti relativni udjel pojedinog

spoja. Ukoliko se iz dobivenih rezultata izuzmu spojevi za koje Pravilnikom nije utvrđena granica, a ostali normaliziraju na 100 % dolazi se do rezultata za spinasterol koji zadovoljava granice. Također, budući da je navedeno odstupanje primijećeno većinom kod uzoraka ulja proizvedenih iz kultivara Rustikal, ova odstupanja mogu biti vezana i uz svojstva tog kultivara uljne buče. Odstupanje od definiranog raspona stigmastadienola (od 17 do 40 %) primijećeno je u 1 uzorku (15,88 %), a  $\beta$ -sitosterola koji je Pravilnikom definiran od 1 do 8 % u 2 uzorka (8,69 i 9,40 %).

## 5. ZAKLJUČCI

Ukupna količina sterola u ovom radu nešto je viša od količine u usporedivim istraživanjima (Nakić *i sur.*, 2006). Sastav sterola je usporediv, pri čemu su spinasterol, stigmastatrienol, stigmastadienol i  $\Delta 7$ -avenasterol najzastupljeniji steroli koji čine 80 % ukupnih sterola.

Najviše razlike u sastavu sterola utvrđeno je kod kultivara Sonne i hibrida Gleisdorfera i Rustikala. Kod kultivara Sonne zabilježena je statistički značajna razlika u udjelu sterola pri čemu su udjeli 24-metilenkolesterola,  $\Delta 7$ -kampesterola i  $\Delta 7$ -avenasterola manji, dok je udio stigmastadienola viši od uobičajenog. S druge strane, kod hibrida Gleisdorfera i Rustikala, udjeli kampestanola,  $\Delta 7$ -kampesterola i  $\Delta 7$ -avenasterola bili su viši nego kod ostalih kultivara, dok je udio stigmastadienola bio niži nego kod ostalih kultivara, čime se može potvrditi zaključak da sastav sterola više ovisi o kultivaru nego o mikroklimi područja na kojemu je biljka uzgajana.

Kada uzmemo u obzir geografsko porijeklo, najviše razlike u udjelu sterola zabilježeno je kod bučinog ulja iz Požeško-slavonske županije. Kod tih ulja zabilježena je statistički značajna razlika u udjelu kampestenola, stigmastadienola i  $\Delta 7$ -avenasterola, pri čemu je udio kampestenola i  $\Delta 7$ -avenasterola bio veći, a udio stigmastadienola manji u odnosu na bučina ulja ostalih županija.

Što se tiče utjecaja klime na udio sterola, utvrđena je samo korelacija između udjela kampesterola i količine padalina, pri čemu se udio kampesterola povećava s količinom padalina tijekom ljeta. Udio ostalih sterola i ukupna količina sterola ne koreliraju s količinom padalina tijekom ljeta niti temperaturom zraka tijekom istog razdoblja.

U odnosu na Pravilnik o jestivim uljima i mastima (2019), svi uzorci zadovoljavaju zahtjeve za udjelom kampesterola, stigmasterola, stigmastatrienola kao i za količinom ukupnih sterola, dok samo dva uzorka ne zadovoljavaju zahtjeve Pravilnika o udjelu  $\beta$ -sitosterola, odnosno jedan o udjelu stigmastadienola. Najveća odstupanja zabilježena su kod udjela spinasterola, s obzirom da je ukupno 10 uzoraka imalo manji udio spinasterola od onoga propisanog Pravilnikom. Udjeli 24-metilenkolesterola, kampestanola, klerosterola i  $\Delta 7$ -kampesterola ne spominju se u Pravilniku, dok udjeli  $\Delta 5$ -avenasterola,  $\Delta 7$ -stigmastenola i  $\Delta 7$ -avenasterola nisu definirani u Pravilniku.

## 6. LITERATURA

Adam, E., Bernhart, M., Müller, H., Winkler, J., Berg, G. (2018) The Cucurbita pepo seed microbiome: genotype-specific composition and implications for breeding. *Plant and Soil*. **422** (1–2), 35-49.

Al-Khalifa, A. S. (1996) Physicochemical characteristics, fatty acid composition, and lipoxygenase activity of crude pumpkin and melon seed oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **44** (4), 964-966.

Anonymous 1 (2021) Bučine koštice, <<https://www.greencajg.hr/wp-content/uploads/2018/11/bu%C4%8Dine-ko%C5%A1tice.png>>, pristupljeno 29. lipnja 2021.

Anonymous 2 (2021) Bučino ulje, <<https://alternativa-za-vas.com/images/uploads/bucino-ulje.jpg>>, pristupljeno 29. lipnja 2021.

Anonymous 3 (2021) Plinski kromatogra Agilent Technologies 6890N Network GC System. <<https://conquerscientific.com/wp-content/product-images/agilent-6890n-g1530n-gc-772x538-c-default.webp>>, pristupljeno 29. lipnja 2021.

Azadmard-Damirchi, S., Torbati, M. (2015) Adulterations in some edible oils and fats and their detection methods. *Journal of Food Quality and Hazards Control*. **2** (2), 38-44.

Bosotin, M. (2016) Utjecaj kultivara na sterole sojinog ulja (diplomski rad), Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.

Breinhölder, P., Mosca, L., Lindner, W. (2002) Concept of sequential analysis of free and conjugated phytosterols in different plant matrices. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. **777** (1–2), 67-82.

Codex standards for named vegetable oils (2019) Joint FAO/WHO Food Standards Programme.

Dessì, M. A., Deiana, M., Day, B. W., Rosa, A., Banni, S., Corongiu, F. P. (2002) Oxidative stability of polyunsaturated fatty acids: Effect of squalene. *European Journal of Lipid Science and Technology*. **104** (8), 506-512.

DHMZ (2020) Ljeto 2020. - temperature. DHMZ - Državni hidrometeorološki zavod, <<https://klima.hr/ocjene/2020/ljeto2020temp.png>>. Pristupljeno 29. lipnja 2021.

DHMZ (2020) Ljeto 2020. - oborine. DHMZ - Državni hidrometeorološki zavod, <<https://klima.hr/ocjene/2020/ljeto2020oborina.png>>. Pristupljeno 29. lipnja 2021.

Dimić, E., Dimić, V., Romanić, R. (2003) Essential fatty acids and nutritive value of edible nonrefined linseed oil. 9<sup>th</sup> Symposium: Vitamine und Zusatzstoffe in der Ernährung von Mensch und Tier. Institut für Tierernährung, Jena/Thuringen, 480-483.

Fireston, D. (2005) Olive oil. U: Bailey's Industrial Oil and Fat Products, (Shahidi, F., ured.), John Wiley & Sons, Hoboken, 303-332.

Frega, N., Mozzon, M., Lercker, G. (1999) Effects of Free Fatty Acids on Oxidative Stability of Vegetable Oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. **76** (3), 325-329.

Fruhirth, G. O., Hermetter, A. (2008) Production technology and characteristics of Styrian pumpkin seed oil. *European Journal of Lipid Science and Technology*. **110** (7), 637-644.

Glumbić, S. (2006) Utjecaj uvjeta skladištenja na održivost bučinog i suncokretovog ulja (diplomski rad), Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.

Hrvatska enciklopedija (2021) Patvorina. Leksikografski zavod Miroslav Krleža, <<http://www.enciklopedija.hr/natuknica.aspx?id=2519>>. Pristupljeno 29. lipnja 2021.

Idouraine, A., Kohlhepp, E. A., Weber, C. W., Warid, W. A., Martinez-Tellez, J. J. (1996) Nutrient constituents from eight lines of naked seed squash (*Cucurbita pepo* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **44** (3), 721-724.

Juranovic, I., Breinhoelder, P., Steffan, I. (2003) Determination of trace elements in pumpkin seed oils and pumpkin seeds by ICP-AES. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*. **18** (1), 54-58.

Kamal-Eldin, A. (2006) Effect of fatty acids and tocopherols on the oxidative stability of vegetable oils. *European Journal of Lipid Science and Technology*. **58**, 1051-1061.

Kamal-Eldin, A., Appelqvist, L. Å. (1996) The chemistry and antioxidant properties of tocopherols and tocotrienols. *Lipids*. **31** (7), 671-701.

Kulac, K. (2006) *Cucurbita pepo* L. var. *styriaca*, <[https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Cucurbita\\_pepo\\_var.\\_styriaca05.jpg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Cucurbita_pepo_var._styriaca05.jpg)>, pristupljeno 29. lipnja 2021.

Lankmayr, E., Mocak, J., Serdt, K., Balla, B., Wenzl, T., Bandoniene, D., Gfrerer, M., Wagner, S. (2004) Chemometrical classification of pumpkin seed oils using UV-Vis, NIR and FTIR spectra. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*. **61** (1-2 SPEC. ISS.), 95-106.

- Mandl, A., Reich, G., Lindner, W. (1999) Detection of adulteration of pumpkin seed oil by analysis of content and composition of specific  $\Delta^7$ -phytosterols. *European Food Research and Technology*. **209** (6), 400-406.
- Martinov, M., Bojić, S., Veselinov, B., Golub, M. (2010) Žetva, sušenje i prerada uljane tikve (*Cucurbita pepo* L.) – stanje i perspektive. *Bilten za alternativne biljne vrste*. **42** (83), 1-11.
- Murkovic, M., Hillebrand, A., Winkler, J., Leitner, E., Pfannhauser, W. (1996) Variability of fatty acid content in pumpkin seeds (*Cucurbita pepo* L.). *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung*. **203**, 216-219.
- Murkovic, M., Hillebrand, A., Winkler, J., Pfannhauser, W. (1996) Variability of vitamin E content in pumpkin seeds (*Cucurbita pepo* L.). *Zeitschrift für Lebensmittel -Untersuchung und -Forschung*. **202** (4), 275-278.
- Murkovic, M., Piironen, V., Lampi, A. M., Kraushofer, T., Sontag, G. (2004) Changes in chemical composition of pumpkin seeds during the roasting process for production of pumpkin seed oil (Part 1: Non-volatile compounds). *Food Chemistry*. **84** (3), 359-365.
- Murkovic, M., Müllleder, U., Neunteufl, H. (2002) Carotenoid content in different varieties of pumpkins. *Journal of Food Composition and Analysis*. **15** (6), 633-638.
- Murkovic, M., Pfannhauser, W. (2000) Stability of pumpkin seed oil. *European Journal of Lipid Science and Technology*. **102** (10), 607-611.
- Nakić, S. N., Rade, D., Škevin, D., Štrucelj, D., Mokrovčak, Ž., Bartolić, M. (2006) Chemical characteristics of oils from naked and husk seeds of *Cucurbita pepo* L. *European Journal of Lipid Science and Technology*. **108** (11), 936-943.
- Neđeral, S., Petrović, M., Vincek, D., Pukec, D., Škevin, D., Kraljić, K., Obranović, M. (2014) Variance of quality parameters and fatty acid composition in pumpkin seed oil during three crop seasons. *Industrial Crops and Products*. **60**, 15-21.
- Noorali, M., Barzegar, M., Sahari, M. A. (2014) Sterol and Fatty Acid Compositions of Olive Oil as an Indicator of Cultivar and Growing Area. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. **91**. 1571-1581.
- Piironen, V., Lindsay, D. G., Miettinen, T. A., Toivo, J., Lampi, A. M. (2000) Plant sterols: Biosynthesis, biological function and their importance to human nutrition. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. **80** (7), 939-966

Pleh, M., Kolak, I., Dubravec, K. D., Šatović, Z. (1998) Sjemenarstvo bundeva. *Sjemenarstvo*. **15**, 43-75.

Potočnik, T., Košir, I. J. (2017) Influence of roasting temperature of pumpkin seed on PAH and aroma formation. *European Journal of Lipid Science and Technology*. **119** (3), 1-8.

Pravilnik o jestivim uljima i mastima (2019) *Narodne novine* **11**, Zagreb.

Rabrenović, B. B., Dimić, E. B., Novaković, M. M., Tešević, V. V., Basić, Z. N. (2014) The most important bioactive components of cold pressed oil from different pumpkin (*Cucurbita pepo* L.) seeds. *LWT – Food Science and Technology*. **55** (2), 521-527.

Rac, M. (1964) *Ulje i masti: sirovine, kemija i tehnologija jestivih ulja i masti*, Poslovno udruženje proizvođača biljnih ulja, Beograd.

Roche, J., Bouniols, A., Mouloungui, Z., Barranco, T., Cerny, M. (2006) Management of environmental crop conditions to produce useful sunflower oil components. *European Journal of Lipid Science and Technology*. Technol. **108**, 287-297.

Sharma, S., Ramana Rao, T. V. (2013) Nutritional quality characteristics of pumpkin fruit as revealed by its biochemical analysis. *International Food Research Journal*. **20** (5), 2309-2316.

Sito, S., Ivančan, S., Barković, E., Mucalo, A. (2009) Strojno ubiranje bundevinih sjemenki. *Glasnik zaštite bilja*. **32** (6), 24-29.

Srbinoska, M., Hrabovski, N., Rafajlovska, V., Sinadinović-Fišer, S. (2012) Characterization of the seed and seed extracts of the pumpkins *Cucurbita maxima* D. and *Cucurbita pepo* L. from Macedonia. *Macedonian Journal of Chemistry and Chemical Engineering*. **31** (1), 65-78.

Stevenson, D. G., Eller, F. J., Wang, L., Jane, J. L., Wang, T., Inglett, G. E. (2007) Oil and tocopherol content and composition of pumpkin seed oil in 12 cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **55** (10), 4005-4013.

Stuart, S. G., Loy, J. B. (1983) Comparison of Testa Development in Normal and Hull-Less Seeded Strains of *Cucurbita pepo* L. *Botanical Gazette*. **144** (4), 491-500.

Šarkanj, B., Delaš, F., Klapac, T., Rački, Đ. V. (2010) *Kemijske i fizikalne opasnosti u hrani*, Hrvatska agencija za hranu, Osijek.

Škevin, D. (2016) *Kemija i tehnologija ulja i masti (interna skripta)*, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.

Štrucelj, D. (1981) Prilog poznavanju lipidnih i proteinskih sastojaka bundevinih koštica i promjena nastalih pri preradi (doktorska disertacija), Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.

Teppner, H. (2000) Cucurbita pepo (Cucurbitaceae) - History, seed coat types, thin coated seeds and their genetics. *Phyton - Annales Rei Botanicae*. **40** (1), 1-42.

van Doosselaere, P. (2013) Production of Oils. U: Edible Oil Processing, (Hamm, W., Hamilton, R. J. i Calliauw, G., ured.), John Wiley & Sons, Oxford, str. 55-96.

Vanhanen, L. P. (2014) Fatty acid, tocopherol and phytosterol composition of cucurbita seeds grown in Marlborough, New Zealand, <[https://www.researchgate.net/publication/48333216\\_Fatty\\_acid\\_tocopherol\\_and\\_phytosterol\\_composition\\_of\\_cucurbit\\_seeds\\_grown\\_in\\_Marlborough\\_New\\_Zealand](https://www.researchgate.net/publication/48333216_Fatty_acid_tocopherol_and_phytosterol_composition_of_cucurbit_seeds_grown_in_Marlborough_New_Zealand)>, pristupljeno 4. srpnja 2021.

Vitko, I. (2017) Utjecaj temperature prženja bučinih koštica na iskorištenje procesa proizvodnje nerafiniranog bučinog ulja (završni rad), Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb,

Wan, P. J. (2000) Properties of Fats and Oils. U: Introduction to Fats and Oils Technology, (O'Brain, R. D., Farr, W. E., i Wan, P. J., ured.). AOCS Press, Champaign, 20-48.

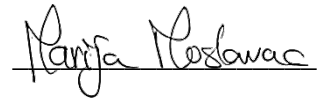
Wenzl, T., Prettnner, E., Schweiger, K., Wagner, F. S. (2002) An improved method to discover adulteration of Styrian pumpkin seed oil. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*. **53** (1-3), 193-202.

Winkler, J. (2000) Breeding of hull-less seeded pumpkins (Cucurbita pepo) for the use of the oil. *Acta Horticulturae*. **510** (20), 123-128.



## IZJAVA O IZVORNOSTI

Izjavljujem da je ovaj diplomski rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristila drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

A handwritten signature in black ink, reading "Marija Moslavac", written over a horizontal line.

Marija Moslavac