Utjecaj kultivara na udjel i sastav tokoferola sirovog sojinog ulja

Grgat, Antonija

Master's thesis / Diplomski rad

2016

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:875489

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-19**

prehrambeno biotehnološki fakultet

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology

zir.nsk.hr

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO - BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2016. Antonija Grgat, 734/N

UTJECAJ KULTIVARA NA UDJEL I SASTAV TOKOFEROLA SIROVOG SOJINOG ULJA

Rad je izrađen u Laboratoriju za tehnologiju ulja i masti Zavoda za prehrambeno – tehnološko inženjerstvo, Prehrambeno – biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod stručnim vodstvom izv. prof. dr. sc. Dubravke Škevin i uz pomoć dr. sc. Marka Obranovića.

ZAHVALE

Zahvaljujem svojoj mentorici izv. prof. dr. sc Dubravki Škevin na svoj pomoći, podršci i susretljivosti prilikom izrade ovog rada.

Veliko hvala dr. sc Klari Kraljić na pomoći u izvedbi pojednih dijelova eksperimentalnog dijela ovoga rada i na svim skuhanim kavama zbog kojih je bilo lakše izdržati sate provedene u laboratoriju.

Posebno hvala dipl. ing. Marku Obranoviću koji je najviše zaslužan za realizaciju ovog rada. Marko, hvala za veselu atmosferu, smijeh i uvijek dobru glazbu u laboratoriju. Veliko hvala što si me uvijek saslušao i dao dobre savijete kako pri izradi rada tako i za životne situacije.

Zahvaljujem se mojoj obitelji, posebno roditeljima što su mi omogućili školovanje i bili velika podrška tijekom svih ovih godina. Također se zahvaljujem svim prijateljima i kolegama na pruženoj pomoći i potpori.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

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

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Nutricionizam

UTJECAJ KULTIVARA NA UDJEL I SASTAV TOKOFEROLA SIROVOG SOJINOG ULJA

Antonija Grgat, 734/N

Sažetak: Soja, latinskog naziva *Glycine max* (L.) Merrill**,** jedna je od vodećih svjetskih poljoprivrednih kultura, čije se sjeme koristi kao izvor jestivih ulja, proteina i fitokemikalija. Cilj ovog rada je bio utvrditi utjecaj kultivara soje dobivenih procesom oplemenjivanja na udjel i sastav tokoferola sirovog sojinog ulja. U radu su provedena ispitivanja na uzorcima sojinog sjemena i sirovog sojinog ulja dobivenog postupkom ekstrakcije po Soxhletu. Rezultati su pokazali da kultivar značajno utječe na osnovne parametre kvalitete sjemena soje, na udjel pojedinačnih i ukupnih tokoferola i na udjel linolne, oleinske, palmitinske, α-linolenske, stearinske, arahidonske, eikosenske i behenske masne kiseline. Najzastupljenija masna kiselina u svim uzorcima je bila esencijalna omega-6 linolna sa najvećom vrijednosti u uzorku S8. Među tokoferolima, γ–tokoferol je bio nazastupljeniji u svim uzorcima, gdje uzorak S10 sadrži najviše ukupnih tokoferola. Najveći udjel ulja je pronađen kod uzoraka S1 i S3, a uzorak S8 sadrži najveću količinu proteina. Najveću vrijednost esencijalne omega-3 masne kiseline ima uzorak S3.

Ključne riječi: kultivari, sojino ulje, sojino sjeme, masne kiseline, tokoferoli

Rad sadrži: 46 stranica, 2 slike, 7 tablica, 76 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

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

Mentor: Izv. prof. dr. sc. Dubravka Škevin,

Pomoć pri izradi: Dr.sc. Marko Obranović, viši asistent

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:
1. Izv. prof. dr. sc. Ksenija Marković
2. Izv. prof. dr. sc. Dubravka Škevin
3. Doc.dr.sc. Klara Kraljić
4. Izv. prof. dr. sc. Sandra Balbino (zamjena)

Datum obrane: rujan 2016.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

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

S**cientific area:** Biotechnical Sciences
Scientific field: Nutrition

INFLUENCE OF CULTIVARS ON YIELD AND CONTENT OF TOCOPHEROLS IN CRUDE SOYBEAN OIL

Antonija Grgat, 734/N

Abstract: Soybean, Latin *Glycine max* (L.) Merrill, is one of the leading cultures which seed is used as a source of edible oil, protein and phytochemicals. The aim of this study was to determine the influence of new cultivars developed by breeding on the composition and content of tocopherols of crude soybean oil. Analysis were performed on soybean seed and crude soybean oil samples. Cultivar had a significant impact on the main parameters of seed quality, tocopherol content and composition of their isomers, fatty acids such as palmitic, stearic, oleic, linoleic, α-linolenic, arachidic, eicosenic and behenic. The dominant fatty acid in all samples was linoleic and sample S8 has the highest value. The dominant tocopherol of all analyzed oils was γ-tocopherol, where sample S10 contains the highest value of total tocopherols. The largest share of oil was found in samples S1 and S3. Sample S8 contains the highest amount of protein and sample S3 had the highest amount of esential omega-3 fatty acid.

Keywords: cultivar, soybean oil, soybean seed, fatty acids, tocopherols

Thesis contains: 46 pages, 2 figures, 7 tables, 76 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. Dubravka Škevin, Associate professor

Technical support and assistance: PhD. Marko Obranović, Scientific Assistant

Reviewers:
1. PhD.*Ksenija Marković*, Associate professor
2. PhD. *Dubravka Škevin,* Associate professor
3. PhD.*Klara Kraljić*, Assistant professor
4. PhD. *Sanda Balbino*, Full professor (substitute)

Thesis defended: September 2016.

Sadržaj

1. UVOD 1

2. TEORIJSKI DIO 2

2.1 SOJA 2

2.1.1 Crna soja 5

2.2. SASTAV SIROVOG SOJINOG ULJA 6

2.2.1. Gliceridni dio 7

2.2.2. Negliceridni dio 9

2.3. PROIZVODNJA SOJINOG ULJA 14

2.4. UPOTREBA SOJINOG ULJA 16

2.5. OPLEMENJIVANJE SOJE 17

3. EKSPERIMENTALNI DIO 18

3.1. MATERIJALI 18

3.1.1. Sojino sjeme i ulje 18

3.1.2. Reagensi 19

3.2. METODE RADA 20

3.2.1. Analize sjemena 20

3.2.2. Proizvodnja sirovog sojinog ulja 24

3.2.3. Statistička obrada 27

4. REZULTATI I RASPRAVA 28

5. ZAKLJUČCI 37

6. LITERATURA 38

1. UVOD

Soja je mahunarka podrijetlom iz Kine gdje se smatra jednom od najstarijih agrikultura. Sjeme soje bogato je proteinima i uljem te se soja nalazi na drugom mjestu svjetske proizvodnje uljarica. Poznate su mnogobrojne funkcije proteina u organizmu: služe kao građevni elementi stanica, citoskelet, strukturni proteini koji grade vezivna tkiva, mišićni sustav aktina i miozina, enzimi koji kataliziraju kemijske reakcije, kao transportne molekule, sudjeluju u replikaciji, reparaciji i transkripciji DNA, staničnoj signalizaciji, imunološkom odgovoru organizma. Ulja i masti osiguravaju potrebnu energiju organizmu i služe kao energetska rezerva, sudjeluju u izgradnji bioloških membrana te su izvor esencijalnih nutrijenata koji su neophodni u biokemijskim reakcijama u organizmu. Neki od nutrijenata karakterističnih za biljna ulja su linolna i α-linolenska masna kiselina, fitosteroli, pigmenti i vitamini A, D, E, K. Sojino ulje posebno je zanimljivo jer je bogato polinezasićenim masnim kiselinama (visok udjel linolne kiseline) i tokoferolima. Tokoferoli su izomeri vitamina E te su stoga lipofilne organske molekule, koje u prirodi dolaze u 4 oblika (α, ß, γ, δ). Poznati su po svom antioksidativnom djelovanju. Općenito biljna ulja sadrže najviše α- i γ- tokoferola, dok su u sojinom ulju najzastupljeniji γ- i δ- tokoferol. Osim proizvodnje sojinog ulja te sačme i pogače, značajna je proizvodnja brašna, koncentrata bjelančevina i lecitina.

U ovom diplomskom radu nastavit će se treća godina istraživanja kemijskog sastava sojinog sjemena iz 11 kultivara soje uzgojenih na eksperimentalnom polju Agronomskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i sirovog sojinog ulja koje će se proizvesti tijekom istraživanja u Laboratoriju za tehnologiju ulja i masti Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Cilj rada je analizirati dobivene rezultate i usporediti ih s prethodnim istraživanjima provedenim u ovom Laboratoriju te utvrditi utjecaj kultivara na sastav sojinog ulja s naglaskom na tokoferole.

2. TEORIJSKI DIO

2.1 SOJA

Soja, latinskog naziva *Glycine max* (L.) Merrill, jedna je od najstarijih kultiviranih biljaka, a potječe iz istočne Azije. Soja je jednogodišnja biljka iz porodice *Leguminosae* (lepirnjače). Uzgoj se iz Kine proširio diljem svijeta, a zadnjih su godina najveći proizvođači soje bili SAD, iza kojeg slijede Brazil, Argentina i Kina (USDA, 2013). U Hrvatskoj se pojavljuje početkom 19. stoljeća za vrijeme pokusa koji je predvodio austrijski biokemičar Friedrich Haberlandt. Stjepan Čmelik je iz Kine i Mandžurije nabavio razne sorte soje i započeo njihov uzgoj na imanju pored Virovitice. Kasnije se proširila po Podunavlju i Posavlju (Vratarić i Sudarić, 2000). Danas je u Hrvatskoj soja zasijana na 54109 ha s prosječnim urodom od 1,8 t/ha (Državni zavod za statistiku, 2014).

Mahuna soje može biti okruglog, srpastog ili spljoštenog oblika s jednom do pet sjemenki. Boja mahune varira od svijetložute do crne što ovisi o kultivaru, ali veliki utjecaj imaju i klimatski uvjeti. Prve mahune pojavljuju se oko 14 dana nakon prvih cvjetova. Sjeme se sastoji od embrija obavijenog sjemenskom ljuskom koja završava sjemenskim pupkom iz kojeg kasnije izbija klicin korjenčić. Veličina sjemena soje varira i uglavnom ovisi o kultivaru i načinu uzgoja tako da se masa tisuću sjemenki kreće od 20 do 500 grama, a oblik varira od okruglog do spljoštenog. Boja zrna može biti žuta, zelena, smeđa, crna ili kombinacija ovih boja, dok je za preradu najpoželjnija žuta boja (Vratarić i Sudarić, 2000). Soja je biljka kratkog dana, pri čemu većina kultivara zahtijeva 10 i više sati mraka dnevno. Klije pri minimalnoj temperaturi 6 – 7 °C, niče pri temperaturi 8 – 10 °C, a cvate pri temperaturi 17 – 18 °C. Optimalne temperature za njezin rast i razvoj su od 20 do 25 °C. Sojino sjeme u vrijeme klijanja apsorbira više od 50 % od svoje mase vode.

Slika 1. Stabljika i sjeme soje (Anonymous, 2016)

Selekcija kultivara važan je korak za maksimalno iskorištenje procesa proizvodnje i trebala bi se provesti na individualnom polju. Važni aspekti kultivara uključuju mogućnosti i potencijale prinosa u području adaptacije, njihovu rezistenciju na bolesti, nematode i insekte, toleranciju na različite abiotičke stresove (pH tla, suša, sol), razine proteina i ulja te toleranciju na herbicide (Lawrence i sur., 2008).

Općenito sjeme soje sadrži približno 8 % ljuske, 90 % kotiledona, od čega najviše otpada na proteine i lipide, te 2 % hipokotiledona. Kemijski sastav i strukturna svojstva sjemena soje variraju ovisno o kultivaru, sezoni rasta, geografskoj lokaciji i okolišnom stresu (Ciabotti i sur., 2006). Sjeme soje sadrži sve makronutrijente potrebne za pravilnu prehranu: kompletne proteine, ugljikohidrate i masti, kao i vitamine i minerale zajedno s kalcijem, folnom kiselinom i željezom (Sauvant i sur., 2004).

Glavni sastojci sjemena soje su: proteini (30 - 50 g /100 g), ugljikohidrati (20 – 35 g /100 g) i lipidi (15 – 25 g/100 g) (Esteves i sur., 2010). Postoji obrnuta veza između udjela proteina te udjela lipida i ugljikohidrata, čime kultivari s većim udjelom proteina imaju manji udio lipida i ugljikohidrata kao što je prikazano u tablici 1.

Tablica 1. Kemijski sastav konvencionalnog i genetički poboljšanog sjemena soje (g/1000).

SASTOJCI	**BRS 133a**	**BRS 258b**	**OCEPAR1 9c**	**UFV-116d**	**UFVTN 105Ape**	**USDA f**
Proteini	37,4	42,3	41,1	39,4	46,2	39,9
Lipidi	21,4	22,7	24,6	20,8	19,9	21,4
Pepeo	4,9	4,8	4,7	6,6	5,3	5,2
Netopljiva vlakna	23,2	23,0	0,7	0,8	9,1	Nd
Topljiva vlakna	2,8	2,8	1,7	1,3	1.5	Nd
Ugljikohidrati	26,0	25,8	2,3	2,1	10,5	9,9
Linolna masna kiselina (18:2)	5,6	5,6	5,5	5,5	5,8	9,9
α-linolenska (18:3)	0,9	0,7	0,8	0,8	0,7	1,3

Nd- neodređeno; a - sojino sjeme s niskim udjelom proteina i s ljuskom; b - sojino sjeme s visokim udjelom proteina i s ljuskom (Pucar-Menacho i sur, 2010); c - konvencionalno tretirano sjeme na 80 °C tijekom 20 min sa ljuskom; d - sjeme soje bez ljuske i lipooksigenaza 2 i 3 tretirano na 80 °C tijekom 20 min (Esteves i sur, 2010); e-sjeme s visokim udjelom proteina, bez ljuske i LOXs tretirano na 150 °C tijekom 30 min (Andrade i sur, 2010); f - konvencionalno sojino sjeme (U.S Ministarstvo Agrikulture, 2009).

Iz tablice 1. vidimo da sjeme sadrži visok udjel lipida i esencijalnih masnih kiselina. U nekim kultivarima uočeno je da sjeme sadrži 63 % polinezasićenih masnih kiselina, 55 % linolne i 8 % linolenske kiseline (esencijalne masne kiseline), 11 % palmitinske i 4 % stearinske masne kiseline te 21,5 % mononezasićenih masnih kiselina (Esteves i sur, 2010). Lipidna frakcija sadrži vitamin E izomere, α-tokoferol (42.0 do 291.0 mg/100 g), γ-tokoferol (79.0 do 252.0 mg/100 g) i δ-tokoferol (27.0 do 89.0 mg/100 g) (Andrade, 2010; Baumgartner i sur., 2010) i malu količinu vitamina K (47 mg/100 g) i vitamina A (1.0 mg/100 g). Protein soje se prema US Food and Drug Administration smatra kompletnim jer ima značajan udjel esencijalnih aminokiselina te je stoga soja dobra zamjena za vegetarijance i vegane. Ipak, sadržajno je značajan nedostatak esencijalne aminokiseline metionina, dok druge esencijalne aminokiseline, lizina, u odnosu na pšenicu ima više no u odnosu na mliječni kazein ima značajno manje (Fridman i Brandol, 2001).

2.1.1 Crna soja

Ovisno o pigmentima u ljusci, soja može biti žuta, zelena, smeđa ili crna. Pigmenti, nosioci te boje, su antocijanini i klorofili ili njihove kombinacije (Todd i Vodkin, 1993). Crni pigment se javlja zbog nakupljanja antocijanina u epidermi ljuske. Prema Manabeu i suradnicima (1965) najzastupljeniji antocijanin u crnoj soji je cijanidin-3-glukozid, a prema Leeju i suradnicima (2008) delfinidin-3-glukozid. Crna soja sadrži puno antioksidanasa (fenolne komponente i antocijana u svojoj ljusci) što govori o njezinoj biološkoj funkciji (Astadi i sur., 2008). Ima antioksidativni, antiinflamantorni i antiproliferativni učinak (Kim i sur., 2008). Najvažnija upotreba crne soje je u medicini kao medicinska hrana, a u orijentalnim državama i kao začin. Modernija istraživanja, osim antioksidacijske aktivnosti, govore i o hipolipidemijskim svojstvima koja se mogu upotrijebiti za njegu kože (Xu i sur., 2009). Prema *The Supplement to Compendium of Materia Medica* crna soja ima koristan učinak na kvalitetu sperme i produkciju koštane srži, doprinosi mišićnoj snazi, rastu kose i imunosnom sustavu. Sigurnosni testovi su pokazali da ekstrakti iz crne soje mogu biti sigurni i neiritirajući za ljudsku kožu, ukazujući na potencijal upotrebe kao aditiva u kozmetičkim proizvodima (Lai i sur., 2012).

Slika 2: Crna soja (Anonymous 2, 2016)

Soja je namirnica visoke nutritivne vrijednosti. Sjeme soje bogato je proteinima i mastima, dobar je izvor energije, vitamina i minerala. Prepoznata je kao „žitarica" koja zadovoljava potrebe za proteinima i energijom. Konzumacija hrane koja sadrži soju povezana je s redukcijom faktora rizika bolesti srca, redukcijom osteoporoze, smanjenjem simptoma menopauze, smanjenjem rizika raka i redukcijom dijabetesa (Fabiyi, 2006). S obzirom na to da sadrži i mali udio ugljikohidrata, soja ima nizak glikemijski indeks čime postaje praktična

za osobe s dijabetesom. Djeluje prevenirajuće kontrolirajući kolesterol, krvni tlak (veliki udio magnezija uzrokuje ekspanziju krvnih žila), vaskularne funkcije i ima direktan učinak na stanice arterija (Aha, 2000). Desroches i suradnici (2004) smatraju da može smanjiti ukupan kolesterol za 30 %. Postoje evidencije da soja može reducirati gubitak koštane mase, posebno nakon menopauze (Fabiyi, 2006). Važna je tijekom godina postmenopauze zbog prevencije fraktura kuka (izoflavoni iz soje) i razvoja masnih stanica (Anderson, 2003). Poznato je da reducira rizik nastanka raka, što je drugi najveći uzrok smrti ljudi. Visoki udjeli vlakana smanjuju rizik od nastanka raka crijeva (Symolon i sur., 2004). Djelotvorna je kod kvašiorkora (proteinsko-energetska malnutricija) smanjujući prevalenciju među velikim brojem djece diljem svijeta (Grewal, 2000).

2.2. SASTAV SIROVOG SOJINOG ULJA

Općenito, biljna se ulja sastoje od trigliceridnih spojeva (94 – 99 %) i brojnih netrigliceridnih spojeva (1 – 6 %) kao što su tokoferoli, steroli, fosfolipidi, pigmenti i vitamini. Udjeli pojedinih komponenti ovise o vrsti sjemena, agronomskim uvjetima, klimi, kvaliteti sjemena, načinu proizvodnje ulja, uvjetima rafinacije i ostalim parametrima (Cert i sur., 2000). Sojino ulje dobiveno ekstrakcijom otapalom ili prešanjem sirovo je sojino ulje i sadrži nekoliko vrsta lipida. Prvenstveno sadrži neutralne lipide, koji mogu biti tri-, di- i monoacilgliceroli, slobodne masne kiseline i polarne lipide kao što su fosfolipidi. Također sadrži negliceridni dio koji uključuje fitosterole, tokoferole, i ugljikovodike kao što su skvaleni. Elementi u tragovima, nađeni u sojinom ulju, dolaze u malim koncentracijama (ppm). Nakon rafinacije, koncentracija svih sastojaka malog udjela reducirana je (Gunstone, 2002).

U Tablici 2. prikazan je sastav sirovog i rafiniranog sojinog ulja (Erickson, 1995).

Tablica 2 . Uobičajeni sastav sirovog i rafiniranog sojinog ulja (Erickson, 1995).

	SIROVO SOJINO ULJE	RAFINIRANO SOJINO ULJE
Trigliceridi (%)	95-97	>99
Fosfatidi (%)	1,5-2,5	0,003-0,045
Steroli (%)	0,33	0,13
Tokoferoli (%)	0,15-0,21	0,11-0,18
Skvaleni (%)	0,014	0,01
Slobodne masne kiseline (%)	0,3-0,7	<0,05
Željezo (ppm)	1-3	0,1-0,3
Bakar (ppm)	0,03-0,05	0,02-0,06

2.2.1. Gliceridni dio

2.2.1.1. Triacilgliceroli i slobodne masne kiseline

Masti i ulja najvažniji su lipidi u prirodi. Osiguravaju energiju živim organizmima, odjeljuju organe u tijelu i transportiraju vitamine topljive u mastima kroz krvotok. Masti i ulja nazivaju se trigliceridima (tracilglicerolima) zato što su to esteri u kojima su tri masne kiseline vezane na glicerol (trihidroksi alkohol). Jednostavni gliceridi esterificirani su s tri identične masne kiseline, ali se rijetko pojavljuju u prirodi. Najčešće se trigliceridi koji se pojavljuju u prirodi nazivaju „miješani“ jer sadrže tri različite masne kiseline. Mast je smjesa triglicerida koja se pri temperaturi od 25 °C nalazi u čvrstom stanju, a ulje u tekućem. Razliku u točki topljenja stvara razlike u stupnju zasićenosti i broju ugljikovih atoma u sastavu masnih kiselina. Trigliceridi životinjskog podrijetla obično su krute tvari, dok su trigliceridi biljnog podrijetla uglavnom ulja (Ball i sur., 2011).

Masne kiseline su karboksilne kiseline i strukturne su komponente masti, ulja i drugih kategorija lipida (osim steroida). Obično sadrže paran broj ugljikovih atoma (općenito 12 - 20), nerazgranati lanac i razvrstavaju se prema prisutnosti i broju dvostrukih veza. Dijele se na zasićene (bez dvostrukih veza), mononezasićene (jedna dvostruka veza) i polinezasićene

(dvije i više dvostrukih veza). U prirodi se većinom pojavljuju u *cis* konfiguraciji. (Ball i sur., 2011).

Sojino ulje sastoji se od palmitinske (11 %), stearinske (4 %), oleinske (24 %), linolne (54 %) i linolenske (7 %) masne kiseline (Ball i sur., 2011). Sastav masnih kiselina u sojinom ulju značajno se mijenja dozrijevanjem i skladištenjem ulja iz sjemena. Udio palmitata i linoleata smanjuje se dozrijevanjem, dok oleata raste. Udio oleata obično dosegne maksimum, a kasnije počinje lagano opadati. Sastav masnih kiselina značajno utječe na fizikalna svojstva, nutritivnu vrijednost te oksidacijsku stabilnost ulja (Hammond i sur., 2005).

Škevin i suradnici (2012) su u svom istraživanju na temu kemijskog sastava sirovog sojinog ulja proizvedenog iz novih kultivara dobili sljedeće rezultate vezano za masne kiseline: linolna masna kiselina bila je najzastupljenija u svim uzorcima ulja, slijede je oleinska, palmitinska, α-linolenska i stearinska. U analiziranim uzorcima sirovih sojinih ulja detektirane su i miristinska, palmitoleinska, heptadekanska, arahinska, gadoleinska i behenska masna kiselina u udjelima manjim od 0,4 %. Zaključili su da je utjecaj kultivara od velikog značaja na sastav masnih kiselina. U drugom istraživanju koje su proveli Matthaus i Özcan 2014. godine, vezano za sastav masnih kiselina i tokoferola u različitim sojinim uljima, uočavamo slične rezultate. Najzastupljenije masne kiseline su palmitinska, stearinska, oleinska, linolna i linolenska masna kiselina. Najveći postotak zauzimala je linolna masna kiselina (49,0 - 53,5 %) među analiziranim uzorcima. Slijedi oleinska (21.4 - 26,7 %) te palmitinska masna kiselina (9,2 - 11,2 %).

Uspoređujući ova istraživanja možemo zaključiti da je sojino ulje bogat izvor polinezasićenih masnih kiselina (više od 50 %), a najzastupljenija je linolna (C18:2) koja se svrstava u esencijalne omega-6 masne kiseline (Hammond i sur., 2005). Dvije polinezasićene masne kiseline, linolna i linolenska masna kiselina, smatraju se esencijalnim masnim kiselinama jer ih ljudsko tijelo ne može sintetizirati i moraju se unijeti hranom. Obje masne kiseline potrebne su za normalan rast i razvoj ljudskog organizma te efikasan transport i metabolizam kolesterola.

2.2.2. Negliceridni dio

Negliceridni dio sojina ulja dijeli se na osapunjivi i neosapunjivi. Neosapunjivi dio čine steroli, tokoferoli, skvalen, pigmenti i dr. (50 % neosapunjivog dijela neidentificirano je), a osapunjivi dio čine fosfolipidi (Hammond i sur., 2005).

2.2.2.1. Steroli

Steroli su visokomolekularni ciklički alkoholi s ciklofenantrenskom skupinom, a u procesu biosinteze nastaju iz skvalena (Phillips i sur., 2001). Prema porijeklu dijele se na zoosterole iz životinjskih masti i fitosterole iz biljnih masti (Rac i sur., 1964). Biljni fitosteroli su triterpeni i važna strukturna komponenta biljnih membrana, dok slobodni fitosteroli služe za stabilizaciju lipidnog dvosloja u biljkama. Pronađeno je više od 200 različitih vrsta fitosterola u biljnim tkivima. Većina fitosterola sadrži 28 ili 29 ugljikovih atoma i jednu do dvije dvostruke veze, jednu u jezgri i drugu u alkilnom lancu (Moreau i sur., 2002). U svim biljnim tkivima fitosteroli se pojavljuju u 5 zajedničkih formi: kao slobodni alkoholi, esteri masnih kiselina, steril glikozidi, acilirani steril glikozidi i sterilni esteri hidroksicinaminske kiseline. Zadnje 4 forme nazivaju se konjugatima fitosterola (Pascal i sur., 2006). Negliceridni dio sojinog ulja sadrži oko 16 % sterola. Najzastupljeniji su β-sitosterol (52 %), kampesterol (25 %) i stigmasterol (23 %). Postoje značajne razlike u udjelu i svojstvima sterola među biljnim vrstama. Temerature rasta uzrokuje promjenu u sastavu sterola. S višim temperaturama dolazi do povećavanja udjela sterola (najviše kampesterola i β-sitosterola) i smanjenja udjela ukupnih tokoferola (Hammond i sur., 2005). Steroli imaju klinički značaj jer posjeduju antikancerogenu, antiinflamantornu i antioksidativnu aktivnost. U esterificiranoj ili slobodnoj formi važna su komponenta prehrane jer snižavaju LDL kolesterol i održavaju zdravlje srca (Berger i sur., 2004).

2.2.2.2.Fosfolipidi

Fosfolipidi su grupa složenih lipida koji sadrže digliceride, fosfornu grupu te neku jednostavnu organsku molekulu. Sastavne su komponente svih staničnih membrana u ljudskom organizmu. Imaju jedinstvenu kemijsku strukturu koja se sastoji od lipofilne i

hidrofilne skupine. Najzastupljeniji fosfolipidi u sojinom ulju su fosfatidilkolin (općenito prevladava), fosfatidiletanolamin, fosfatidilserin i fosfatidilinozitol. U uljima za prehranu mogu izazvati pjenjenje i tamnjenje tijekom termičke obrade pa se uklanjaju u procesu rafinacije, u fazi degumiranja. Nakon rafinacije, koncentracija fosfolipida u ulju ovisi o vrstama uljarica i metodama prerade (O'Brien, 2008). Od ukupnih fosfolipida u ulju udio fosfatidilkolina iznosi 55,3 % fosfatidiletanolamina 26,3 %, a fosfatidilinozitola 18,4 % (Wang i sur., 1999). Imaju veliku primjenu u farmaceutskoj industriji (regulacija stanične osmoze i membranskih enzima, prijenos lipida i sterola, metabolizam folne kiseline i metionina, značajan učinak kod neuroloških bolesti), prehrambenoj industriji (margarini, šorteninzi, instant hrana, pekarski proizvodi), u agrikulturi i drugim kemijskim industrijama (kozmetički proizvodi, boje, lakovi, premazi).

2.2.2.3. Tokoferoli

U obitelj vitamina E spadaju tokoferoli i tokotrienoli (lipofilne organske molekule), antioksidansi sintetizirani od biljaka i drugih fotosintetskih organizama. Navedene forme razlikuju se po biološkoj raspoloživosti te fiziološkim i kemijskim aktivnostima. Sadrže kromanolnu glavu vezanu na hidrofobni rep. Četiri različite forme tokoferola i tokotrienola koje se pojavljuju u prirodi razlikuju se broju i poziciji metilnih grupa na aromatskom prstenu kromanolne glave. Tri metilne grupe sadrži α-izomer, dok ß- i γ- izomeri sadrže dvije i δ-izomer jednu metilnu grupu na aromatskom prstenu (Hunter i Cahoon, 2007). Soja posjeduje sve četiri vrste tokoferola (α-, ß-, γ- i δ-) koji se razlikuju u njihovoj sposobnosti hvatanja slobodnih radikala s obzirom na varijacije u broju i poziciji metilnih substituenata na kromanolnom prstenu. Najveću antioksidativnu aktivnost posjeduje γ- tokoferol (najslabije biološko djelovanje), dok ß-, γ-, δ- izomeri pokazuju svega 50, 10 i 30 % antioksidativne aktivnosti γ-tokoferola (Kumar i sur., 2009). U sojinom ulju nalaze se u udjelima oko 7,6 % α-tokferola; 1,5 % β-tokoferola; 67,8 % γ–tokoferola i 23,6 % δ-tokoferola (Hammond i sur., 2005). Ukupna koncentracija tokoferola u komercijalnim uljima ovisi o koracima proizvodnje i uvjetima rafinacije (Evans i sur., 2002).

Utjecaj temperature i suše na sastav tokoferola

Britz i suradnici (2002) ispitali su utjecaj temperature i suše tijekom sazrijevanja sjemena soje na povećanje udjela tokoferola. Njihovi rezultati pokazali su da vrijeme i klima mogu značajno utjecati na udio tokoferola u sjemenu što pri uzgoju može utjecati na odabir kultivara s različitim odgovorom na temperaturne intervale. Proveli su istraživanje na tri različita kultivara soje: Williams, Forrest i Essex. Udio ukupnih tokoferola bio je najveći kod kultivara Williams i kod njega utjecaj temperature i suše nije imao velik značaj. Kod ostala dva kultivara udio ukupnih tokoferola bio je niži za 10 - 15 %, s osvrtom na značajan utjecaj suše (malo povećanje od 8 – 10 %). Sva tri kultivara pokazala su značajno povećanje udjela α-tokoferola (128, 142 i 198 % za kultivare Forrest, Essex i Williams) te smanjenje δ-tokoferola (53, 52 i 65 % za kultivare Forrest, Essex i Williams) i γ-tokoferola (7, 17 i 30 % za kultivare Forrest, Essex i Williams). Iz rezultata je vidljivo da temperatura zraka i vlaga u tlu imaju utjecaj na sva tri izomera tokoferola. Kod kultivara Williams umjereno povećanje temperature u kombinaciji s ekstremnom sušom uzrokovalo je veliko povećanje udjela α-tokoferola s gotovo podudarnim smanjenjem udjela ostala dva izomera tokoferola. Mogući razlog u svojoj diskusiji navode kako povišena temperatura i suša usmjeravaju metabolizam γ- i δ-tokoferala prema α-tokoferolu. Ovi rezultati imaju veliku važnost za biljke (ako sjeme ili sadnice mogu bolje tolerirati stres), međutim, nutritivna vrijednost nije zanemariva budući da α-izomer ima najveću aktivnost vitamina E, a općenito ga ima malo u ulju sjemena.

U drugom istraživanju koje su također proveli Britz i suradnici (2008) godine dobiveni su slični rezultati. U istraživanju se ispitivao utjecaj genetičkih varijacija i okolišnih uvjeta na tokoferole u sojinom sjemenu. Analizom sjemena soje na nekoliko različitih lokacija u vremenskom periodu od tri godine (1999. – 2002.) autori su htjeli utvrditi utjecaj prirodnih varijacija u vremenu i klimi na sastav tokoferola. Uspoređujući 18 linija soje, pokazala se mala, ali značajna razlika kod ukupnih tokoferola kao i 2 do 3 puta veću razliku u udjelu α-tokoferola u periodu od 1999. do 2001. godine. Također su uočene i lokacijske razlike s obzirom na udjel tokoferola. Usjevi u toplijim djelovima zemlje tijekom cijele godine imali su više apsolutne i relativne razine tokoferola od onih u hladnijoj unutrašnjosti zemlje i usjeva koji su posađeni kasnije. Tijekom 2002. godine temperature su bile značajno više što se odrazilo na povećanje udjela α-tokoferola kod pojedinih analiziranih sjemena soje. Zaključak autora je da su vrijeme i klima značajni faktori koji utječu na sastav tokoferola u sojinom sjemenu.

Utjecaj različitih faza u reprodukciji na sastav tokoferola u sojinom sjemenu

Kumar i suradnici (2009) proveli su istraživanje vezano za promjene u tokoferolima, izoflavonima, sadržaju fenola i antioksidativnoj aktivnosti sjemena soje kod različitih faza razvoja. Cilj istraživanja bio je odrediti razlikuje li se nezrelo sjeme prikupljeno u različitim fazama reprodukcije u sadržaju tokoferola, izoflavona i fenola te u antioksidativnom kapacitetu. Rezultati za tokoferole prikazani su u tablici 3.

Tablica 3. Koncentracija (μg g^{-1}) tokoferol izomera u različitim reproduktivnim fazama kultivara

Reproduktivna faza	**α-tokoferol**	**ß-tokoferol**	**γ-tokoferol**	**δ-tokoferol**
R5	3,42±0,2(6,0)c	1,10±0,09(1,9)b	12,06±0,94(21,4)d	39,60±1,31(70,7)b
R6	3,70±0,09(4,3)c	1,43±0,16(1,6)b	35,33±2,71(41,4)c	44,83±1,62(52,6)b
R7	7,31±0,14(7,7)b	2,12±0,17(2,2)b	46,01±2,14(47,7)b	41,01±1,80(42,5)b
Zrelost	53,34±1,85(19,6)a	11,20±0,96(4,1)a	156,80±4,83(57,6)a	51,20±2,07(18,7)a

Brojevi označavaju srednju vrijednost tri različita ponavljanja. Slova označavaju statistički značajnu razliku ($p<0,05$) za svaki izomer tokoferola.

Iz tablice 3. Vidljivo je da u prvoj fazi R5 δ - tokoferol dominantan i sadrži 70 % od ukupne koncentracije tokoferola. U drugoj R6 fazi udio δ - tokoferola iznosi 52,6 % od ukupnih tokoferola, udio γ-tokoferola povećao se tri puta, a druga dva izomera ostala su nepromijenjena u usporedbi s R5 fazom. Autori smatraju da se objašnjenje nalazi u povećanoj aktivnosti MPBO tokoferol ciklaze u ranim reproduktivnim fazama i smanjenoj aktivnosti jednog ili više enzima koji sudjeluju u putovima biosinteze izomera tokoferola. Povećanje koncentracije α-, ß- i γ- izomera vidljivo je u tablici između treće R7 faze i faze potpune zrelosti. Navedeni razlog je povećanje koncentracije ovih izomera kao odgovor na smanjenje intenziteta slobodnih radikala nastalih tijekom tog razdoblja. Kao zaključak autori navode da nezrelo sjeme prikupljeno u ranim reproduktivnim fazama ima niske koncentracije tokoferola i izoflavona, ali ima visoku sposobnost hvatanja slobodnih radikala i ukupnu antioksidativnu moć.

Utjecaj oplemenjivanja soje na sastav tokoferola

Rani i suradnici (2007) uvidjeli su važnost poboljšanja sastava i udjela tokoferola kroz programe oplemenjivanja sojinog sjemena zbog nutritivne vrijednosti i važnosti stabilnosti ulja. Genetska raznolikost, što je osnova svakog programa oplemenjivanja, slabo je istražena za sadržaj i profil tokoferola u sojinom sjemenu. Kod sva četiri izomera tokoferola dolazi do smanjenja udjela tijekom rafinacije (posebno tijekom dezodorizacije), stoga je postalo važno istraživati genetičku varijabilnost za tokoferole različitih genotipova soje kako bi se identificirali genotipovi s najvišim udjelom tokoferola. Proveli su istraživanje vezano za sadržaj i profil tokoferola kod različitih sorti soje koje se konzumiraju u Indiji uzimajući u obzir genetičke razlike. Svoje su rezultate također usporedili s ranijim studijama. U svojim rezultatima uočili su genetičke varijacije kod sva četiri izomera tokoferola, ukupnih tokoferola i kompozicije tokoferola. Uspoređujući svoje rezultate sa studijom koju su proveli McCord i suradnici (2004) vezano za udjel tokoferola na brazilskim sortama soje, uočili su razlike u omjerima najviših i najnižih α-, ß-, γ-, δ- vrijednosti te ukupnih tokoferola. Indijski genotipovi pokazuju veću raznolikost za γ- i δ- te ukupne tokoferole, dok brazilski genotipovi pokazuju veću varijabilnost kod α-tokoferola. Rezultati također pokazuju veće srednje vrijednosti za α-tokoforel i manje srednje vrijednosti za δ- i γ- tokoferol uspoređujući s drugom studijom (razlog navode genetičke varijacije). Rezultati također pokazuju značajnu korelaciju ($p<0,001$) između pojedinih izomera i udjela ukupnih tokoferola, što ih navodi na zaključak da će bilo koji program oplemenjivanja fokusiran na poboljšanje jednog tipa tokoferola rezultirati poboljšanjem i ostala tri izomera. Zaključili su da je, osim transgenskog pristupa, tradicionalnim i molekularnim oplemenjivanjem moguće poboljšati razine specifičnog tokoferola, međutim, važno je i identificirati molekulske markere za tokoferole kako bi se olakšala selekcija boljih genotipova.

Transgenski pristup u modificiranju sadržaja tokoferola kod soje postaje sve popularniji. Ključni je korak tog pristupa konverzija γ-tokoferola u α-tokoferol (zbog visoke nutritivne vrijednosti) čime sadržaj α-tokoferola doseže 95 % od ukupnih tokoferola u sojinom sjemenu. Pokušaji povećanja udjela ukupnih tokoferola samo su djelomično uspješni i baziraju se na regulaciji homogentisatefitil transferazne aktivnosti (HTP, katalizira prvi korak u sintezi tokoferola), međutim, rezultati pokazuju samo malo povećanje ukupnih tokoferola transgenskog sjemena soje. Bolji rezultati postižu se ekspresijom pripadajućeg HTP gena iz Arabidopsis i Synechocystis sa specifičnim promotorom (1,5 puta) i ekspresijom TYRA gena

s nekoliko drugih enzima pod kontrolom specifičnog promotora (više od 10 puta). Direktiniji pristup za dobivanje linija soje s povećanim sadržajem tokoferola bazira se na ekspresiji homogentisategeranilgeranil transferaze (HGGT), enzima uključenog u biosintezu tokoferola u monosupnici. Takva transgenska soja ima veće razine antioksidacijske aktivnosti i povišene koncentracije vitamina E sa sve 4 forme tokoferola. Međutim, sa stajališta inženjeringa povećanje koncentracije α-tokoferola puno je jednostavnije. Bazira se na ekspresiji gena za dva enzima uključena u metilaciju grupa na tokoferolima (VTE3 i VTE4) iz Arabidopsis, gdje ekspresija ta dva gena gerenerira biljke sa sadržajem α-tokoferola većim od 90 % ukupnih tokoferola. Ukupna razina tokoferola ostala je ista u tom sjemenu ukazujući na promjenu tokoferola uglavnom u α - oblik (5 puta povećanje aktivnosti vitamina E). Ovo istraživanje može dovesti do sojinog ulja s povećanom koncentracijom vitamina E te većom hranjivom vrijednosti za potrošače (Hudson i sur., 2013).

2.3. PROIZVODNJA SOJINOG ULJA

Ulja se razvrstavaju prema kategorijama na rafinirana, hladno prešana i nerafinirana, ovisno o tehnološkom postupku proizvodnje. Sirovo ulje nerafinirano je ulje dobiveno prešanjem ili ekstrakcijom organskim otapalima. Nerafinirana ulja dobivena su mehaničkim postupcima, kao što je prešanje, uz upotrebu topline. Hladno prešana ulja dobivena su iz sirovina prešanjem na temperaturi do 50 °C. Provodi se i postupak čišćenja, odnosno bistrenja pranjem vodom, dekantiranjem, filtriranjem i centrifugiranjem. Rafinirana ulja dobivena su postupkom rafinacije jedne ili više vrsta sirovih biljnih ulja i na tržište se stavljaju kao jestivo biljno ulje i jestiva ulja s navođenjem sirovine iz koje su proizvedena. Ta ulja moraju udovoljiti sljedećim kriterijima: na 20 °C su tekuća, bistra, karakteristične boje; neutralnog do karakterističnog okusa i mirisa bez stranog ili užeglog okusa i mirisa; da ne sadrže više od 0,3 % slobodnih masnih kiselina (izraženih kao oleinska kiselina); da im peroksidni broj nije veći od 5 mmola O_2kg^{-1}; sadrže 0,2 % vode i tvari hlapljivih na temperaturi od 105 °C. Hladno prešana i nerafinirana jestiva ulja pak ne smiju sadržavati više od 2 % slobodnih masnih kiselina (oleinska kiselina); peroksidni broj ne smije biti veći od 7 mmol $O2kg^{-1}$; maksimalno trebaju sadržavati 0,4 % vode i tvari hlapljivih na temperaturi od 105 °C, maksimalno 0,1 % netopljivih nečistoća te ne smiju sadržavati više od 0,15 $mgkg^{-1}$ stigmastadiena (Pravilnik o jestivim uljima i mastima, 2012).

Proizvodnja sojinog ulja sastoji se od dva dijela: prvi korak obuhvaća postupke obrade sjemena za dobivanje ulja, a drugi korak je sam proces proizvodnje ulja. Nakon prijema, istovara i vaganja slijedi postupak čišćenja (odvajanje kruto-krutog) da bi se odstranile sve nečistoće stranog ili vlastitog podrijetla koje mogu štetno djelovati na uskladišteno sjeme. Nečistoće treba odstraniti jer ne sadrže ulje, vežu vodu i postaju centri kvarenja te oštećuju strojeve (Škevin, 2013). Nakon usitnjavanja, slijedi sušenje (odvajanje kruto-tekućeg) gdje se prolaskom kroz sušaru smanjuje udio vlage na oko 10 % (sušenje u struji zraka do temperature od 70°C) i skladištenje kroz 12 sati radi izjednačavanja vlage difuzijom kroz cjelokupnu masu zrna. Na mlinu se vrši usitnjavanje zrna na manje dijelove i uklanjanje ljuske (vibracijska sita služe za odvajanje ljuske). Kondicioniranjem se povećava plastičnost jezgre za provedbu listićenja. Vrši se zagrijavanjem na 65 - 70 °C direktnom ili indirektnom parom pri čemu udio vlage iznosi 9,5 - 10,5 %. Zadnji korak u obradi sjemena je listićenje zbog povećavanja kontaktne površine jezgre s otapalom i skraćivanja puta u procesu ekstrakcije. Ovim postupkom povećava se pristupačnost ulja zbog pucanja stanica jezgre (Romac i sur., 2012).

Najčešći načini proizvodnje ulja su mehanička ekstrakcija (prešanje) te ekstrakcija otapalima. Ekstrakcija otapalima koristi se za proizvodnju ulja iz sirovina koje u svom sastavu sadrže malo ulja. Gotovo se sve sojino ulje zbog sadržaja sjemena (do 20 % ulja u svom sjemenu) proizvodi ekstrakcijom organskim otapalima zbog boljeg iskorištenja u odnosu na proces prešanja (Hui, 1996).

Ekstrakcija ulja provodi se uz primjenu nepolarnog otapala n-heksana (kruto - tekuća ekstrakcija). Prijelaz ulja iz krutih listića u miscelu (mješavina ulja i otapala) sastoji se od tri koraka: difuzija otapala u listiće, otpuštanje ulja u otapalu i difuzija ulja iz krutih listića u otapalo. Brzinu ekstrakcije određuje više parametara kao što su veličina stanice, debljina stijenke, udjel razorenih stanica, kemijski sastav sjemena, udjel vode i odvođenje difundirane otopine s površine ekstrakcije (Škevin, 2013). Difuzija ulja u otapalu zaustavlja se kod postizanja jednake koncentracije ulja u misceli i listićima, što je ograničavajući faktor. Zbog toga se ekstrakcija provodi po principu protustrujne višefazne ekstrakcije čime se postiže najbolji faktor difuzije i maksimalna ekstrakcija ulja iz listića. Ekstrakcija se najčešće provodi kontinuirano u rotirajućem ekstraktoru - rotacelu. Ekstrakcijom se dobiju dva polugotova proizvoda, miscela i ekstrahirani listići iz kojih je potrebno ukloniti otapalo. Uklanjanje otapala provodi se destilacijom miscele (evaporacija, vakuum destilacija i propuhivanje vodenom parom i uklanjanjem otapala iz ekstrahiranih listića zagrijavanjem s indirektnom i direktnom vodenom parom u cilindričnoj posudi s više etaža (Romac i sur., 2012).

Nakon proizvodnje sirovog sojinog ulja, slijedi proces rafinacije. Zadatak rafinacije je iz ulja ukloniti nepoželjne komponente, nepoželjan okus i miris, povećati stabilnost ulja, a istovremeno isključiti izomerizaciju, elaidinizaciju i pomerizaciju (formiranje kancerogenih produkata pri povišenoj temperaturi). Prvi je korak neutralizacija kojoj je cilj ukloniti slobodne masne kiseline nastale hidrolizom triacilglicerola još u samom sjemenu. Slijedi bijeljenje u kojem se iz ulja uklanjaju prvenstveno pigmenti, ali i fosfolipidi, tragovi metala, hidroperksidi, sapuni i drugi nepoželjni spojevi. Uspješnost bijeljenja ovisi o vrsti i količini adsorbensa, vremenu kontakta i temperaturi. Vinterizacija ulja provodi se na način da se ulje prvo ohladi pri čemu se stvaraju kristali voska i trigliceridi višeg tališta. Vinterizacijom ulja izbjegnuto je zamućivanje jestivog ulja pri niskim temperaturama. Zadnji korak je proces dezodorizacije. Destilacijom vodenom parom uklanjanju se hlapljivi sastojci (slobodne masne kiseline, aldehidi, ketoni, peroksidi...) koji uzrokuju neugodan okus i miris ulja (Škevin, 2013).

2.4. UPOTREBA SOJINOG ULJA

Upotreba sojinog ulja u prehrani slična je drugim uljima. Najviše se upotrebljava za kuhanje i prženje, kao ulje za salate, majonezu, šorteninge i značajna je upotreba kod margarina. Male količine sojinog ulja upotrebljavaju se kod mliječnih i konditorskih proizvoda (Hammond i sur., 2005).

U zadnje vrijeme sastav sojinog ulja i njegova kvaliteta privukli su veliku pozornost u genetičkom modificiranju i uzgojnim programima. Razlog je povećana potražnja za biljnim uljima i povećana svijest potrošača o zdravstvenim problemima vezanim za prehrambene masnoće. U tom smislu, značajni napori su usmjereni na povećanje oksidacijske stabilnosti sojinog ulja i povećanim udjelom esencijalnih omega-3 i omega-6 masnih kiselina u hrani i hrani za životinje (Clemente i Cahoon, 2009).

Korisna industrijska aplikacija sojinog ulja je u proizvodnji biodizelskih mješavina. Ostvaren je velik broj pozitivnih atributa u upotrebi sojinog ulja za proizvodnju biodizela uključujući poboljšanu biorazgradnju, višu točku zapaljenja, smanjenje toksičnosti i emisija te poboljšanje podmazivanja. Dva negativna parametra su oksidativna nestabilnost i hladno strujanje u sjevernim podnebljima (Kinney i Clemente, 2005).

2.5. OPLEMENJIVANJE SOJE

Oplemenjivanje i selekcija soje važni su za stvaranje novih, boljih sorti, odnosno genetski napredak o kojem značajno ovisi proizvodnja svakog uzgojnog područja. Temelji se na primjeni suvremenih oplemenjivačkih metoda kao što su kombinacija klasičnih oplemenjivačkih metoda sa suvremenim kemijskim, biokemijskim, fitopatološkim i molekularnim analizama. Uspješnost oplemenjivačkog rada procjenjuje se prema količini i genetičkoj raznolikosti raspoloživog oplemenjivačkog materijala, opremi i sredstvima za rad, obučenosti kadrova i polivalentnosti oplemenjivačkog tima. Oplemenjivanje soje integralan je sustav koji uključuje održavanje i skupljanje izvora genetske varijabilnosti, selekciju roditeljskih komponenata, hibridizaciju, uzgoj oplemenjivačkih populacija, fenotipsku selekciju, testiranje oplemenjivačkih linija te identifikaciju superiornih rekombinacija. Svaki od tih ciklusa traje više godina. Uspješni oplemenjivački rad sastoji se od nekoliko faza. Prva faza je održavanje postojeće gen-kolekcije i skupljanje novog oplemenjivačkog materijala. Cilj je stvaranje izvora genetičke varijabilnosti za određena kvantitativna svojstva. Druga faza uključuje izbor roditelja i najpogodnijih metoda križanja te se provodi križanje. Treća faza je selekcija poželjnih genotipova iz stvorenih hibridnih populacija. Zadnja faza uključuje testiranje izabranih superiornih linija kroz poljske pokuse i daljnju selekciju linija. Uz urod zrna i povećanje tolerantnosti genotipova na različite stresne uvjete i uzročnike bolesti, cilj oplemenjivanja soje je i stalno poboljšanje kakvoće sjemena soje (važno s aspekta nutritivne vrijednosti). Cijeli je postupak stoga usmjeren na povećanje udjela i stabilnosti bjelančevina i ulja u sjemenu te na poboljšanje kakvoće ulja u zrnu (Sudarić i Vratarić, 2008).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Sojino sjeme i ulje

Materijali korišteni za izradu ovog radu su sjeme soje i ulje dobiveno iz njega. Sjeme soje je uzgojeno 2015. godine na polju Agronomskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. U radu je analizirano 11 uzoraka sjemena soje iz različitih kultivara. U laboratoriju smo ekstrakcijom po Soxhletu iz svakog od 11 uzoraka proizveli sirovo ulje na kojem smo poslije obavljali daljnje analize (sastav masnih kiselina, tokoferola i sterola). Od tih kultivara, na Sortnoj listi Republike Hrvatske svrstani su kultivari Ana, Sanja i Zagrepčanka. U tablici 4. prikazani su uzorci sjemena soje i ulja soje.

Tablica 4. Uzorci sjemena soje i sojinog ulja

Uzorak	Oznaka uzorka sjemena soje	Oznaka uzorka sojinog ulja
Br 1 u III/'12	S1	SU1
Br 4 u I/'11	S2	SU2
Br 4 u II/'12	S3	SU3
Br 4 u IV/'12	S4	SU4
Br 7 u I/'10	S5	SU5
Br 8 u I/'11	S6	SU6
UO 1+2/05	S7	SU7
ANA*	S8	SU8
SANJA*	S9	SU9
ZAGREPČANKA*	S10	SU10
CRNA SOJA	S11	SU11

*kultivar se nalazi na sortnoj listi Republike Hrvatske

3.1.2. Reagensi

Svi reagensi i otapala koje smo koristili u ovom istraživanju najmanje su p.a. stupnja čistoće. Standardi koje smo upotrebljavali bili su *pro chromatography* stupnja čistoće.

Pri izradi ovog diplomskog rada korišteni su sljedeći reagensi i otapala:

- dietileter
- etil acetat
- izooktan
- n-heksan (HPLC čistoće)
- natrijev hidrogen sulfat monohidrat
- petroleter
- etanol
- metanol (HPLC čistoće)
- izopropanol (HPLC čistoće)
- Kjeldah tablete (bez žive i selena)
- borna kiselina
- klorovodična kiselina
- sumporna kiselina
- natrijeva lužina
- dušik
- helij

- bromkrezol zeleno

- metil red

Standardi:

- F.A.M.E* (Supelcoa, Bellefonte, SAD)
* smjesa od 18 estera masnih kiselina poznatog sastava
- α – tokoferol (Merck KgaAa, Damstadt, Njemačka)
- ß – tokoferol (Merck KgaAa, Damstadt, Njemačka)
- γ – tokoferol (Merck KgaAa, Damstadt, Njemačka)
- δ – tokoferol (Merck KgaAa, Damstadt, Njemačka)

3.2. METODE RADA

3.2.1. Analize sjemena

3.2.1.1. Određivanje mase 1000 sjemenki

Određivanje mase 1000 sjemenki koristi se za grubu procjenu kakvoće sjemena, a ona ovisi o masi i punoći sjemena. Sjeme je kvalitetnije što je masa veća jer su prazna zrna lakša. Ulogu u masi ima i voda te se uvijek navodi i vlažnost sjemena. Brojanje sjemenki može se određivati ručno ili fotoelektričnim brojačem (Rade i sur, 2001). U ovom radu masu 1000 sjemenki je određena ručno prema modificiranoj metodi HRN EN ISO 502:2012. Prilikom određivanja izbroji se 500 zrna od prosječnog uzorka, bez odabiranja, koja su potom izvagana, a masa 1000 zrna izračunata prema formuli [1]:

$$\text{masa 1000 sjemenki} = \frac{m \cdot 1000}{n} \text{ (g)} \qquad [1]$$

gdje je:

m = masa izbrojenih sjemenki (g)

n = broj sjemenki

3.2.1.2. Određivanje hektolitarske mase sjemena

Hektolitarska masa je mjera gustoće (zbijenosti) sjemena, a određuje se vaganjem određenog volumena sjemena. Ovisi o veličini i obliku sjemena te se izražava kao masa sjemena u L ili dm^3 (kg dm^{-3}). Ova mjera bitna je kod projektiranja transportnih uređaja, silosa i sl. (Rade i sur., 2001). Uređaj na kojem se vrši mjerenje je vaga poznata kao Schopperova vaga (po imenu njemačke tvrtke 'Shopper'), a korištena metoda je modificirana metoda HRN EN ISO 7971-1:2010.

Poznati volumen sjemena stavi se i izvaže u cilindar Schopperove vage od 0,25 L, a hektolitarska masa se izračuna prema formuli [2]:

$$\text{hektolitarska masa} = \frac{m}{V}\ (\text{kg L}^{-1}) \qquad [2]$$

gdje je:

m = izmjerena masa (kg)

V = volumen cilindra za mjerenje (0,25 L).

3.2.1.3. Određivanje udjela vode u sjemenu

Prilikom procjene kvalitete sjemena kao mjera kvalitete gleda se udio vode te ulja i nečistoća. Udjel vode ovisi o brojnim parametrima: stupanj zrelosti sjemena, vremenske prilike tijekom sazrijevanja i uvjeti tijekom žetve, relativna vlažnost zraka prilikom skladištenja (Rade i sur., 2001). U ovom radu korištena je standardna metoda za određivanje vode u sjemenu uljarica HRN EN ISO 665:2004.

Neposredno prije početka ove analize, sjeme soje samelje se na mlinu s rotirajućim diskovima. Analiza započinje vaganjem 5 g samljevenog sjemena s točnošću 0,001 g. Potom se izvagano samljeveno sjeme prebaci u posudicu s podignutim poklopcem i stavi u sušionik prethodno zagrijan na 103 ± 2 °C. Nakon dvosatnog sušenja, hlađenje uzorka provodi se u eksikatoru. Ohlađeni uzorak ponovno se važe i vraća u sušionik na jednosatno sušenje, nakon

čega se opet hladi i važe. Postupak sušenja ponavlja se po 1 sat dok razlika između dva uzastopna mjerenja ne bude najviše 0,005 g. Za svaki uzorak provode se dva paralelna određivanja, među kojima razlika ne smije biti veća od 0,5 %. Rezultat se izražava kao srednja vrijednost dva paralelna mjerenja.

Udjel vode izražava se u postocima prema formuli [3]:

$$\% \text{ vode} = \frac{m_1 - m_2}{m_1 - m_0} \cdot 100 \qquad [3]$$

gdje je:

m_0 = masa prazne posudice (g)

m_1 = masa posudice s uzorkom prije sušenja (g)

m_2 = masa posudice s uzorkom nakon sušenja (g).

3.2.1.4. Određivanje udjela ulja u sjemenu metodom po Soxhletu

Za određivanje udjela ulja u sjemenu koristi se standardna metoda HRN EN ISO659:2010. Sjeme se prvo samelje u mlinu s diskovima, od čega se u celuloznoj čahuri za ekstrakciju izvaže 5 - 10 g i zatvori vatom. Čahura s uzorkom stavi se u ekstraktor i doda se otapalo (petroleter). Ekstrakcija se odvija kontinuirano kroz 8 sati u aparaturi po Soxhletu, prilikom čega se skuplja u izvaganu tikvicu u koju se prethodno stave kuglice za vrenje. Nakon završetka postupka ekstrakcije, slijedi otparavanje otapala iz ekstrakta na rotacionom otparivaču. Zatim se ostatak ekstrakta (ulje) suši kroz 1 sat pri 103 ± 2 °C, hladi u eksikatoru i važe. Sušenje se ponavlja po 30 minuta do postizanja konstantne mase. Rezultati se prikazuju kao srednja vrijednost dva paralelna mjerenja prilikom čega razlika ne smije prelaziti 0,5 % (Rade i sur., 2001). Maseni udio ulja izračuna se prema formuli [4]:

$$\% \text{ ulja} = \frac{m_1}{m_0} \cdot 100 \qquad [4]$$

gdje je:

m_0 = masa uzorka (g)

m_1 = ukupna masa ekstrahiranog uzorka (g)

3.2.1.5. Određivanje udjela proteina u sjemenu

Određivanje udjela proteina odvija se u tri stupnja. Prvi je digestija (mokro spaljivanje), slijede destilacija i titracija prema metodi ASN 3105 opisanoj u propisu proizvođača opreme (FOSS Analytical AB, 2003).

Mokro spaljivanje

Postupak se vrši na način da se 0,5 g samljevenog sjemena soje izvaganog s točnošću ± 0,001 g stavi u kivete za digestiju. U kivetu se dodaju dvije Kjeldahl tablete i 15 ml koncentrirane sumporne kiseline. Reakcija se odvija u digestoru u kojem su kivete posložene u blok za spaljivanje i spojene na vakuum sisaljku. Spaljivanje se provodi postupnim početnim zagrijavanjem, slijedi višesatno zagrijavanje na maksimalnoj temperaturi sve dok se ne postigne potpuno bistra otopina. Kada je uzorak potpuno spaljen, ostavi se hladiti. Paralelno s uzorcima priprema se i slijepa proba.

Destilacija

U ohlađeni uzorak doda se 80 mL destilirane vode i kiveta se spoji s gumenim adapterom na Kjeltec 2100 destilacijsku jedinicu. Erlenmayerova tikvica sa 25 mL borne kiseline (4 %-tna otopina borne kiseline s indikatorima, bromkrezol zeleno i metil red) stavi se na platformu za prihvatnu tikvicu destilacijske jedinice. Automatski u kivetu se dozira 50 mL 40 %-tne natrijeve lužine. Destilacija traje 4 minute. Nastali amonijak u sustavu skupi se u Erlemayerovu tikvicu s bornom kiselinom.

Titracija

Dobiveni destilat potom se titrira s 0,1 M otopinom klorovodične kiseline, a udio dušika u uzorku izračunava se prema formuli [5]:

$$\%\, dušika(N) = \frac{(A-B)*C*14{,}007*100}{m\ (mg)} \qquad [5]$$

gdje je:

A = volumen (mL) klorovodične kiselina utrošen za titraciju uzorka

B = volumen (mL) klorovodične kiseline utrošen za titraciju slijepe probe

c = koncentracija klorovodične kiseline,

m = masa uzorka uzetog za analizu u mg

Postotak dušika preračunava se u postotak proteina tako što se množi s faktorom 6,25.

3.2.2. Proizvodnja sirovog sojinog ulja

Ulje je proizvedeno iz samljevenog sjemena ekstrakcijom s petroleterom metodom po Soxhletu. U čahuru od filter papira stavi se približno 10 g samljevenog sjemena soje te se započne ekstrakcija. Nakon 8 sati ekstrakcije dobiveno se ulje filtrira preko filter papira i otparava na rotacijskom otparivaču (Heidolph) na temperaturi od 40 °C da bi se ostatci korištenog otapala izdvojili iz ulja.

3.2.2.1. Određivanje sastava masnih kiselina

Sastav masnih kiselina u uzorcima sojinog ulja odredi se plinskom kromatografijom. Prvi korak u postupku određivanja sastava masnih kiselina je pretvorba masnih kiselina u njihove metilne estere. Metilni esteri pripremljeni su metodom po Bannonu, HRN EN ISO 5509:2004.

Priprema metilnih estera masnih kiselina

U kivetu od 10 mL se odvaže 60 mg uzorka sojinog ulja i doda 4 mL izooktana kako bi se ulje otopilo. Protrese se na Vortexu 10 sekundi i doda 200 µL metanolne otopine KOH ($c = 2$ mol L^{-1}) te se ponovno protrese na Vortexu 30 sekundi. Ostavi se na sobnoj temperaturi dok se smjesa ne izbistri, odnosno dok se ne odvoji glicerol na dnu epruvete. Zatim se doda 1 g natrijeva hidrogensulfata monohidrata za neutralizaciju smjese. Dobivena bistra otopina prebaci se u vijalicu.

Analiza metilnih estera masnih kiselina plinskom kromatografijom

Metilni esteri masnih kiselina analizirani su metodom HRN EN ISO 5508:1999. Za ovu metodu korišten je plinski kromatograf ATI Unicam 610 (Cambridge, Engleska) s injekcijskim sustavom, pećnicom i plameno-ionizacijskim detektorom (FID) spojenim na

računalo s instaliranim 4880 softverom (Unicam 4880 Chromatography Data System). Pomoću računalnog sustava odabire se metoda s optimalnim uvjetima za analizu metilnih estera masnih kiselina koji su određeni na osnovi provedenih preliminarnih ispitivanja (temperatura kolone, detektora i injektora, količina injektiranog uzorka te protok plina).

Razdvajanje metilnih estera masnih kiselina izvedeno je pomoću TR-FAME (ThermoScientific, Waltham, SAD), 30 m × 0,22 mm kapilarne kolone debljine filma 0,25 µm sa 70 % cijanopropil-polisilfenilen siloksanom kao stacionarnom fazom. Početna temperatura pećnice je 120 °C. Temperaturni program namješten je da temperatura raste od početne temperature do 160 °C brzinom od 4 °C min^{-1}, a potom do 190 °C brzinom od 10 °C min^{-1} tijekom 10 minuta. Plin nosioc bio je helij s brzinom protoka od 0,8 mL min^{-1}. Uzorak od 1 µL injektiran je u split načinu rada (1:30) pri temperaturi injektora od 250 °C, dok je temperatura detektora 280 °C.

Identifikacija i kvantifikacija pikova

Identifikacija pojedinih masnih kiselina provedena je usporedbom vremena zadržavanja metilnih estera pojedine masne kiseline s vremenima zadržavanja metilnih estera standardne smjese F.A.M.E. (smjesa metilnih estera 18 masnih kiselina poznatog sastava).

Za izračunavanje kvantitativnog sastava masnih kiselina korištena je metoda normalizacije površina koja je također računalno odabrana, stoga je na kromatogramu uz vrijeme zadržavanja i površinu ispod pikova zabilježen i udjel pojedine masne kiseline izražen kao % od ukupnih masnih kiselina.

3.2.2.2. Određivanje udjela i sastava tokoferola

Određivanje tokoferola provedeno je prema standardnoj metodi (HRN EN ISO 9936:2007) primjenom tekućinske kromatografije visoke učinkovitosti (HPLC).

Priprema uzorka ulja za analizu

Kao što je opisano u poglavlju 3.2.3., za pripremu ulja koristi se metoda ekstrakcije po Soxhletu tako da se 8 g uzorka sjemena soje samelje, prebaci u čahuru od filter papira i zatvori s vatom. Nakon toga se započne ekstrakcija za određivanje tokoferola u aparaturi po Soxhletu uz dodatak 120 mL heksana. Razlika u odnosu ekstrakcije za dobivanje ulja: trajanje ekstrakcije 6 sati umjesto 8 sati, dobivena miscela (ulje i heksan) prebaci se u odmjernu tikvicu od 100 mL i nakon što se heksan ohladi, odmjerka se nadopuni do oznake. Uzorak (10 mL) otparava se na rotacijskom otparivaču do suhog. Važno je da otopina uzorka bude zaštićena od svjetla i da se analiza provede na dan pripreme uzorka.

Prije samog početka određivanja udjela tokoferola u uzorcima sojinog ulja izrađene su kalibracijske krivulje pojedinačnih tokoferola koje se koriste za njihovu kvalifikaciju i kvantifikaciju. Standardi koji su bili injektirani u koncentracijama od 0,2 do 10 $\mu g\ mL^{-1}$ bili su: α -, β -, γ-, δ - tokoferol. Valna duljina ekstinkcije detektora je 295 nm, a valna duljina emisije detektora je 330 nm, dok je osjetljivost detektora medium. Razdvajanje tokoferola provedeno je na koloni LiChroCART, Silica 60, (250 x 4,6 mm, 5 µm, Merck) pri sobnoj temperaturi. Količina injektiranog uzorka je 20 µL. Kao mobilna faza izokratski je korišten heksan/izopropanol (99,3/0,7) uz protok od 0,9 $mL\ min^{-1}$ 100% A i u vremenskom trajanju analize od 25 minuta.

Metodom linearne regresije dobivene su iz baždarnih krivulja matematičke formule [8] – [11] koje se koriste za izračunavanje udjela pojedinačnih tokoferola u otopini ulja za analizu izražene u $\mu g\ mL^{-1}$. Za određivanje udjela pojedinačnih tokoferola u ulju ($mg\ kg^{-1}$) koristi se formula [12].

Udio α - tokoferola ($\mu g\ mL^{-1}$) računa se prema jednadžbi dobivenoj iz baždarne krivulje [8]:

$$y = 1930222{,}29x + 91448{,}31 \qquad [8]$$

gdje je:

y = površina ispod pika

x = koncentracija α – tokoferola ($\mu g\ mL^{-1}$).

Udio β - tokoferola ($\mu g\ mL^{-1}$) računa se prema jednadžbi dobivenoj iz baždarne krivulje [9]:

$$y = 2099486{,}35x + 50715{,}47 \qquad [9]$$

gdje je:

y = površina ispod pika

x = koncentracija β –tokoferola (μg mL^{-1}).

Udio γ - tokoferola (μg mL^{-1}) računa se prema jednadžbi dobivenoj iz baždarne krivulje [10]:

$$y = 2608249{,}70x + 170610{,}88 \qquad [10]$$

gdje je:

y = površina ispod pika

x = koncentracija γ –tokoferola (μg mL^{-1}).

Udio δ - tokoferola (μg mL^{-1}) računa se prema jednadžbi dobivenoj iz baždarne krivulje [11]:

$$y = 3816372{,}43x + 143769{,}40 \qquad [11]$$

gdjeje:

y = površina ispod pika

x = koncentracija δ -tokoferola(μg mL^{-1}).

Udio pojedinačnih tokoferola u ulju (mg kg^{-1}) [12]:

$$c(tokoferol_i) = \frac{x_i \times 10}{m} \qquad [12]$$

gdje je:

x_i = koncentracija (α -, β -, γ-, δ -)tokoferola (μg mL^{-1})

m = masa uzorka uzetog za analizu (g)

3.2.3. Statistička obrada

Statistička obrada podataka korištena je kako bi se utvrdio utjecaj kultivara na kvalitetu sjemena i sastav ulja. Provedena je analiza varijance (ANOVA) (Microsoft Inc. 2013).

4. REZULTATI I RASPRAVA

Cilj ovog diplomskog rada bio je utvrditi utjecaj kultivara na sastav i udjel tokoferola sirovog sojinog ulja. U laboratoriju Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta u Zagrebu provedene su analize kultivara soje dobivene procesom oplemenjivanja na Agronomskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Analize su provedene na 11 uzoraka sjemena soje i na sirovom ulju dobivenom ekstrakcijom po Soxhletu iz pripadajućeg sjemena. Rezultati su prikazani u tablicama kao srednja vrijednost minimalno dva paralelna određivanja. Za utvrđivanje kvalitete sjemena soje provedene su analize osnovnih parametara kvalitete sjemena kao što su masa 1000 sjemenki, hektolitarska masa, udjel vode, udjel ulja te udjel proteina u sjemenu. Analizama sirovog sojinog ulja određen je sastav masnih kiselina te sastav i udjel tokoferola kod kojih je praćen utjecaj kultivara soje što je najvažniji cilj ovog diplomskog rada . U ovom dijelu rada fokus će biti na opisivanju i uspoređivanjudobivenih rezultata s rezultatima iz diplomskih radova izrađenih također u Laboratoriju Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta u Zagrebu 2013. i 2014. godine te s pripadajućom znanstvenom literaturom.

Tablica 5. Osnovni parametri kvalitete sjemena soje

Uzorak	m_{1000} sjemenki* (g)	Hektolitarska masa*(kg dm^{-3})	Udjel vode (%)	Udjel ulja*(%)	Udjel proteina* (%)
S1	177,55	0,714	7,10	14,35	37,05
S2	212,06	0,716	7,20	13,78	35,68
S3	220,54	0,684	6,94	14,65	36,08
S4	222,42	0,670	6,98	13,23	35,75
S5	234,00	0,716	6,77	13,54	36,15
S6	195,92	0,716	7,0	12,58	35,56
S7	192,54	0,712	6,91	12,64	33,87
S8	201,46	0,704	7,15	12,33	38,93
S9	201,32	0,700	7,04	12,58	36,48
S10	229,00	0,714	7,01	13,01	35,60
S11	228,00	0,698	7,18	13,10	34,57

***** izraženo na suhu tvar sjemena

U tablici 5. Prikazani su rezultati analize osnovnih parametara kvalitete sjemena soje za svih 11 kultivara. Masa 1000 sjemenki služi za grublju procjenu kakvoće sjemena pri čemu kvalitetnije sjeme ima veću masu, dok je prazno sjeme puno lakše (Rade i sur., 2001). Masa 1000 sjemenki i hektolitarska masa ovise i o udjelu vode u sjemenu, zbog čega su rezultati prikazani u odnosu na suhu tvar sjemena.

Raspon mase 1000 sjemenki ispitivanog sjemena soje iznosi 177,55 - 229,00 g. Uspoređujući dobivene rezultate s rezultatima dobivenim u ovom laboratoriju iz 2014. godine (Knezović) (raspon mase 1000 sjemenki se kreće od 137,28 do 163,26 g) i iz 2013. godine (Smoković) (raspon mase 1000 sjemenki se kreće od 122,45 do 160,78 g) uočavamo veće mase kod svakog od 11 analiziranih uzoraka soje. U priručniku autora Rade i suradnika (2001) raspon mase 1000 sjemenki iznosi 143 – 163 g, dok kod autora Vratarić i Sudarić (2002) raspon tih vrijednosti kreće se od 170,9 do 180,8 g. Vrijednosti u navedenim literaturnim izvorima odgovaraju samo za uzorak S1 (177,55 g) iz ovog rada, dok su za ostale uzorke niske. Prema Basiću i suradnicima (2006) raspon mase 1000 sjemenki iznosi 106,90 - 293,98 g, dok prema Pauliću i suradnicima (2006) taj raspon varira od 44,5 do 269,88 g što

odgovara rasponu vrijednosti u ovom radu. Iako ovaj način daje grubu procjenu, iz rezultata se može vidjeti da su sjemena kultivara analizirani u ovom radu bolje kvalitete (zbog veće mase sjemena) od kultivara analiziranih u prijašnjim diplomskim radovima u istom laboratoriju. Najkvalitetnije sjeme prema masi 1000 sjemenki je uzorak S10 (229 g).

Hektolitarska ili volumska masa ovisi o veličini i obliku sjemena, a njena vrijednost ima veliku ulogu prilikom projektiranja transportnih uređaja, silosa i sl. (Rade i sur., 2001). Prema rezultatima iz tablice 5 za analizirane uzorke hektolitarska masa iznosi 0,684 - 0,716 kg dm^{-3}. Uspoređujući svoje rezultate s rezultatima dobivenim laboratoriju autorice Knezović iz 2014. godine (0,720 – 0,754 kg L^{-1}), vidljivo je da su njezine vrijednosti hektolitarske mase veće za svaki uzorak, dok u usporedbi s rezultatima autorice Smoković iz 2013. godine (0,655 – 0,698 kg dm^{-3}) većina analiziranih uzoraka ima veće vrijednosti hektolitarske mase. Iznimka su tri uzorka S3 (0,684 kg dm^{-3}), S4 (0,67 kg dm^{-3}) i S11 (0,698 kg dm^{-3}) čije vrijednosti ulaze u raspon dobivenih vrijednosti hektolitarske mase dobivenih na ispitivanim uzorcima u laboratoriju 2014. godine (Knezović). Rade i suradnici (2001) dobili su raspon vrijednosti hektolitarske mase od 0,60 do 0,77 kg dm^{-3} što odgovara rasponu vrijednosti hektolitarske mase dobivene u ovom istraživanju. Milaković i suradnici (2012) dobili su uži raspon vrijednosti od 0,70 do 0,716 kg dm^{-3}, što znači da u našem istraživanju 8 uzoraka ulazi u taj raspon vrijednosti (S3, S4 i S11 ne ulaze u taj raspon).

Kemijski sastav sjemena soje ovisi o mnogim čimbenicima, uključujući genotip, godinu uzgoja, geografski položaj, okolišne uvjete te agronomsku praksu (Boydak i sur., 2002). Udjel vode u sojinom sjemenu ovisi o vremenskim uvjetima tijekom sazrijevanja, stupnju zrelosti sjemena te relativnoj vlažnosti zraka. Povećani udio vode u sjemenu uzrokuje kemijske promjene koje dovode do razgradnje, pojave plijesni i drugih mikroorganizama, čime pada kvaliteta sjemena. Prosječan udjel vode u sojinom sjemenu iznosi 8 - 14 % (Rade i sur., 2001). Udjel vode u ispitivanim uzorcima iznosi 6,91 - 7,20 % što govori da je ispitivano sjeme dobre kvalitete. U prethodnim istraživanjima iz 2013. (Smoković) i 2014. (Knezović) godine dobiveni su slični rezultati udjela vode u ispitivanom sjemenu (6,2 – 7,5 %).

Udjel ulja jedan je od parametara za procjenu njegove kakvoće i u ispitivanim uzorcima kreće se od 12,33 do 14,65 % preračunato na suhu tvar sjemena. U prethodnim istraživanjima udio ulja bio je viši i za 2013. (Smoković) iznosi 16,3 – 19,2 %, dok je raspon vrijednosti za 2014. (Knezović) iznosio 17,7 – 20,9 %. Prema literaturnim navodima prosječni udio ulja iznosi oko 20 % (Fisk i Gray, 2011). Na udio ulja utječu klimatski faktori (posebno temperatura, koja negativno korelira sa sadržajem ulja, i kiša, koja pozitivno korelira sa sadržajem ulja), geografska širina, genotip (Kumar i sur., 2006) te vlažnost i temperatura

tijekom skladištenja i duljina skladištenja koji smanjuju udjel ulja u sojinom sjemenu za 2,19 % (Šimić i sur., 2007).

Tipične vrijednosti udjela proteina u sjemenu soje kreću se od 34 do 42 % (Fisk i Gray, 2011). Raspon vrijednosti za udjel proteina u analiziranim uzorcima sjemena soje iznosi 33,87 - 38,93 % preračunato na suhu tvar sjemena što je u skladu sa navedenim literaturnim izvorom. Slični rezultati za udjel proteina su dobiveni i u prijašnjim istraživanjima iz 2013. (Smoković) (32,5 – 37,0 %) i 2014. (Knezović) (32,8 – 37,1 %) godine. Postoji negativna korelacija između ukupnog sadržaja ulja i proteina u sjemenu tako da smanjenje od 1 % sadržaja ulja dovodi do dvopostotnog porasta ukupnih proteina u sjemenu (Clemente i Cahoon, 2009) što se u ovom radu može najbolje primijeniti na uzorcima S8 i S9. Ovisno o udjelu proteina i koracima upotrijebljenima u proizvodnji, proizvodi koji sadrže sojin protein klasificiraju se u tri kategorije: sojino brašno, koncentrirani sojin protein i izolirani sojin protein (Loman i sur., 2016). Sojin protein također se konzumira kao dio tradicionalne fermentirane i nefermentirane sojine hrane kao što je tofu, tempeh, miso, sojin sir, sojin jogurt, sojino mlijeko, sojini oraščići. Takvi proizvodi sadrže značajne količine proteina soje i drugih komponenata u soji ovisno o tehnološkom postupku (Erdman, 2000). Zbog nižeg sadržaja ulja i povećanog udjela proteina soja se svrstava u sporedne uljarice (Škevin, 2012).

Statističkom analizom utvrđeno je da kultivar ima značajan utjecaj na osnovne parametre kvalitete sjemena soje. Utjecaj je uočen kod mase 1000 sjemenki, udjela vode, udjela ulja i udjela proteina. Iznimka je hektolitarska masa gdje se pokazalo da kultivar nema značajni utjecaj.

Tablica 6. Sastav masnih kiselina u sojinom ulju (% od ukupnih masnih kiselina)

Uzorak	C16:0	C16:1	C17:0	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3	C20:0	C20:1	C22:0	n.i.*
S1	11,7	0,1	0,1	3,8	17,0	54,8	11,0	0,3	0,2	0,2	**1,0**
S2	12,0	0,1	0,1	3,5	15,9	56,4	11,3	0,2	0,0	0,2	**0,4**
S3	11,4	0,0	0,0	3,5	17,0	55,9	10,6	0,3	0,2	0,4	**0,7**
S4	11,9	0,1	0,0	3,2	16,8	57,1	10,3	0,2	0,2	0,3	**0,1**
S5	10,4	0,0	0,1	3,5	19,0	55,9	9,3	0,4	0,2	0,4	**0,7**
S6	11,6	0,1	0,2	4,0	18,0	55,2	8,2	0,4	0,2	0,4	**1,9**
S7	11,2	0,1	0,2	3,5	17,2	56,4	10,7	0,2	0,1	0,1	**0,2**
S8	10,1	0,0	0,0	3,9	17,7	57,1	10,3	0,4	0,1	0,4	**0,0**
S9	11,4	0,1	0,2	3,7	20,2	53,1	10,7	0,2	0,1	0,2	**0,1**
S10	10,6	0,1	0,1	3,3	15,3	58,4	11,1	0,3	0,2	0,3	**0,1**
S11	10,4	0,1	0,1	3,6	19,3	56,5	9,5	0,2	0,1	0,2	**0,1**

* n. i. – neindeficirane masne kiseline

Nakon analize osnovnih parametara kvaliteta sjemena soje provedene su analize sirovog ulja dobivenog iz svih 11 kultivara soje. Analizom je određen sastav masnih kiselina i tokoferola.

Fizičke i kemijske karakteristike značajno ovise o vrsti i udjelu masnih kiselina vezanih na triacilglicerol. Kod biljnih ulja svaka pozicija u molekuli glicerola može biti esterificirana s različitom masnom kiselinom. Masne kiseline dijele se na zasićene i nezasićene. Nezasićene masne kiseline još možemo podijeliti na mononezasićene ω - 9 te polinezasićene ω - 3 i ω - 6 masne kiseline (Zambiazi i sur., 2007). Sastav masnih kiselina u ulju znatno utječe na fizikalna svojstva, nutritivnu vrijednost ulja te oksidacijsku stabilnost ulja. Sojino ulje kompleksna je mješavina u kojoj dominira pet masnih kiselina (palmitinska, stearinska, oleinska, linolna i linolenska masna kiselina) koje se bitno razlikuju u točki tališta, oksidativnoj stabilnosti te kemijskoj funkcionalnosti (Coohan, 2003). Kompozicija masnih kiselina u sojinom ulju ovisi o raznolikosti vrsta i različitim uvjetima uzgoja. Udio nezasićenih masnih kiselina iznosi više od 80 %. Sojino ulje klasificirano je kao polusušivo ulje s obzirom na visok udjel linolne i α-linolenske masne kiseline. Prisutnost α-linolenske kiseline je u velikom dijelu odgovorna za tendenciju sojinog ulja oksidativnom propadanju, međutim, postupkom rafinacije moguće je smanjiti njen udjel (FAO, 1992).

U tablici 6. Prikazani su rezultati sastava masnih kiselina u sojinom ulju. Iz rezultata je vidljivo da je u svim uzorcima najzastupljenija linolna kiselina čiji se udjel kreće od 53,1 do 58,4 %. Druga po zastupljenosti je oleinska masna kiselina s rasponom vrijednosti od 15,3 do

20,2 %. Slijede je α-linolenska sa svojim udjelom od 8,2 do 11,1 % te palmitinska kojoj raspon vrijednosti iznosi 10,1 do 12 %. Zadnja od značajnih masnih kiselina identificiranih u analiziranim uzorcima je stearinska masna kiselina s udjelom od 3,2 do 4 %. Kao što je već spomenuto, Matthaus i Özcan (2014) u svom radu navode raspone vrijednosti za linolnu kiselinu od 49,0 do 53,5 %, za oleinsku 21,4 do 26,7 % te za palmitinsku masnu kiselinu 9,2 do 11,2 %. Navedene vrijednosti iz literature podudaraju se samo kod palmitinske kiseline, dok su vrijednosti za oleinsku kiselinu svih analiziranih uzoraka puno niže. Rasponu vrijednosti za linolnu kiselinu odgovara samo uzorak S9, dok su svi drugi uzorci viših vrijednosti. Prema Pravilniku (2012) usklađenim sa standardom CODEX STAN 210 iz 1999. godine (u daljnjem tekstu Codex, 1999), udio linolne kiseline iznosi 48 – 59 %, oleinske kiseline 17 – 30 %, palmitinske kiseline 8 – 13,3 %, α-linolenske kiseline iznosi 4,5 – 11 % te stearinske masne kiseline 2 – 5,4 %. Dobiveni rasponi vrijednosti za svaku masnu kiselinu analiziranih uzorka većinom se podudaraju s rasponima vrijednosti iz spomenutog Pravilnika. Iznimka su uzorci S2, S4 i S10 s nižim udjelom oleinske kiseline (15,9 %, 16,8 % te 15,3 %) te uzorak S10 (11,1 %) i S2 (11.3%) koji imaju višu vrijednost linolenske masne kiseline.

U istraživanju iz 2013. (Smoković) godine udio linolne kiseline iznosi 47,9 – 52,0 %, dok iz 2014. godine (Knezović) iznosi 50,5 – 54,5 %. U ovom radu udjeli svih analiziranih uzoraka za linolnu kiselinu veći su u odnosu na istraživanje iz 2013. godine (Smoković), dok veće vrijednosti u odnosu na rezultate iz 2014. godine (Knezović) imaju svi uzorci osim uzorka S9. Analizirajući oleinsku kiselinu, raspon vrijednosti za 2013. godinu (Smoković) iznosi 23,7 – 28,9 %, a za 2014. godinu (Knezović) iznosi 20,2 – 27,3 %. Rezultati za oleinsku kiselinu ovog istraživanja pokazuju niže vrijednosti za sve uzorke u odnosu na istraživanje iz 2013. godine (Smoković). Niže vrijednosti također su vidljive za većinu uzoraka ako ih uspoređujemo sa 2014. godinom (Knezović), gdje je iznimka uzorak S9 čija vrijednost (20,2 %) ulazi u navedeni raspon. Rezultati udjela α-linolenske kiseline iz 2013. godine (Smoković) iznose 5,6 – 6,9 %, a za 2014 god 5,6 – 6,9 % što jako odstupa od dobivenih vrijednosti u ovom radu koje su veće za svaki analizirani uzorak. Udjel palmitinske kiseline za 2013. godinu (Smoković) iznosi 10,3 – 14,9 %, dok se taj raspon kreće od 11,1 do 13,4 % za istraživanje iz 2014. godinu (Knezović). Nižu vrijednost u odnosu na 2013. godinu (Smoković) pokazuje uzorak S8 (10,1 %), u odnosu na 2014. (Knezović) niže vrijednosti pokazuju uzorci S5, S8, S10 i S11 (10,4; 10,1; 10,6; 10,4). Što se tiče stearinske masne kiseline udjel 4,1 – 6,1 % pripada istraživanju iz 2013. (Smoković), dok 3,5 – 5,1 % istraživanju iz 2014 godine (Knezović). Vrijednosti u ovom istraživanju niže su za svaki analizirani uzorak uspoređujući s rezultatima iz 2013. (Smoković), dok s obzirom na 2014.

godinu (Knezović) niže vrijednosti su vidljive za uzorke S4 (3,2 %) i S10 (3,3 %). Ostale masne kiseline (palmitoleinska, heptadekanska, arahidska, arahinska, behenska) sudjeluju s neznatnim postotkom u sastavu masnih kiselina proizvedenog ulja.

Statistička analiza pokazala je da kultivar nema značajan utjecaj na 16:1 masnu kiselinu (palmitoleinska) kod svih uzoraka i 17:0 masnu kiselinu (heptadekansku) za većinu uzoraka osim S6, S7 i S9 koji imaju udjel od 0,2 %. Kod navedenih masnih kiselina u svim analiziranim uzorcima vrijednost ne prelazi 0,1 % od ukupnih masnih kiselina. Za sve ostale identificirane kiseline vidljiv je značajan utjecaj kultivara. Udio neidentificiranih masnih kiselina kreće se od 0,0 do 1,9 %. Daljnjim analizama bilo bi moguće identificirati te masne kiseline.

Tablica 7. Sastav tokoferola u sojinom ulju

Uzorak*	**Tokoferol SOJA (mg kg^{-1} ulja) 2015.**				
	α-	**ß-**	**γ-**	**δ-**	**Ukupno**
S1	119	54	1459	991	2623
S2	82	25	1189	576	1872
S3	103	29	1450	673	2255
S4	90	36	1337	898	2360
S5	160	42	1471	776	2450
S6	118	37	1215	648	2018
S7	55	22	823	479	1380
S8	165	66	1854	1078	3164
S9	83	30	1252	708	2073
S10	101	36	1521	860	2518
S11	72	26	1080	610	1787

Tokokromanoli su grupa amfipatskih, u lipidima topljivih organskih molekula sastavljeni od polarnog dijela deriviranog iz tirozina i hidrofobnog poliprenilnog bočnog lanca dobivenog iz izoprenske biosinteze. Tokokromanoli s fitil bočnom lancem nazivaju se tokoferoli. Tokoferoli su identificirani u lišću, sjemenu, korijenu, lukovici, voću, stabljici, hipokotilu i kotiledonu većih biljaka, ali sastav i kompozicija tokoferola jako se razlikuje. Općenito je α-tokoferol dominantna forma fotosintetskih tkiva (Mene-Saffrane i DellaPenna, 2009). Prisutnost tokoferola u ulju važna je zbog oksidacijske stabilnosti, pozitivnih učinaka na zdravlje te nutritivne vrijednosti. Udjel tokoferola u ulju ovisi o genotipu biljke, klimatskim uvjetima tijekom žetve i rasta, udjelu polinezasićenih masnih kiselina, procesu

proizvodnje i uvjetima skladištenja (Tasan i Demirci, 2005). Sojino ulje jedno je od biljnih ulja s najvećem udjelom tokoferola. Međutim, tijekom rafinacije (primarno deodorizacije) dolazi do smanjenja količine tokoferola u uljima (udio ukupnih i individualnih tokoferola varira od 30 % do 70 %) što ovisi o načinu provođenja procesa, vremenu, temperaturi, pritisku i protoku pare (Hamm i Hamilton, 2000). Prema Hammondu i suradnicima (2005) u sojinom ulju prosječni udjeli su oko 7,6 % α -, 1,5 % β -, 67,8 % γ - i 23,6 % δ-tokoferola.

U tablici 7. Prikazan je udjel tokoferola analiziranih uzoraka. Udio ukupnih tokoferola u analiziranim uzorcima iznosi 1380 - 2623 mg kg^{-1} ulja što odgovara vrijednostima Codex-a (1999) gdje udio ukupnih tokoferola iznosi 600 – 3370 mg kg^{-1} ulja. Uspoređujući rezultate iz 2013. godine (Smoković), čiji raspon za ukupne tokoferole iznosi 1507 – 2161 mg kg^{-1} ulja, vidimo da uzorak S7 sa svojom manjom vrijednosti od 1380 mg kg^{-1} te uzorci S1 (2623 mg $kg^{-1)}$, S3 (2255 mg kg^{-1}), S4 (2360 mg kg^{-1}), S5 (2450 mg kg^{-1}), S8 (3164 mg kg^{-1}) i S10 (2518 mg kg^{-1}) sa svojim većim vrijednostima ne ulaze u navedeni raspon. Raspon vrijednosti za ukupne tokoferole u istraživanju iz 2014. godine (Knezović) iznosi 1212 – 1735 mg kg^{-1}. Navedeni raspon vrijednosti odgovara samo uzorku S7. Utvrđeno je da na udjel ukupnih tokoferola, kao i na udjel svakog pojedinačnog statistički značajno utječe izbor kultivara.

Najzastupljeniji tokoferol u analiziranim uzorcima je γ-tokoferol čiji raspon vrijednosti iznosi 824 - 1853 mg kg^{-1}. Codex (1999) za taj raspon navodi vrijednosti od 890 do 2307 mg kg^{-1} što odgovara rasponu vrijednosti analiziranih uzoraka. Raspon vrijednosti za 2013. godinu (Smoković) iznosi 822 - 1250 mg kg^{-1}, dok se vrijednosti za 2014. godinu (Knezović) kreću od 844 do 1156 mg kg^{-1} ulja. Vrijednosti uzorka S2 (1189 mg kg^{-1}), S6 (1215 mg kg^{-1}), S7 (823 mg kg^{-1}) i S11 (1080 mg kg^{-1}) ulaze u navedeni raspon za 2013. godinu (Smoković), dok navedeni raspon za 2014. godinu (Knezović) odgovara samo uzorku S11 (1080 mg kg^{-1}). Uzorak S8 sadrži najveći udio γ-tokoferola te je ujedno i uzorak s najvećim udjelom ukupnih tokoferola. Drugi po zastupljenosti u dobivenim uzorcima sirovog ulja je δ-tokoferol. Raspon mu se kreće od 479 do 1078 mg kg^{-1}. Prema Codex-u (1999) udio vrijednosti za δ-tokoferol kreće se od 154 do 932 mg kg^{-1}, gdje uzorci S1 (991 mg kg^{-1}) i S8 (1078 mg kg^{-1}) odstupaju od navedenih vrijednosti. Samo uzorci S2 (576 mg kg^{-1}) i S7 (479 mg kg^{-1}) ulaze u raspon vrijednosti za δ-tokoferol istraživanja iz 2013. godine (Smoković), dok su te vrijednosti za svaki analizirani uzorak veće u usporedbi s istraživanjem iz 2014. godine (Knezović) (111 – 282 mg kg^{-1}). Prema Codex-u (1999) raspon vrijednosti α-tokoferola u sojinom ulju iznosi 9 – 352 mg kg^{-1} čime raspon od 55 do 165 mg kg^{-1} zadovoljava navedeni standard. U ovom istraživanju dobivene su manje vrijednosti za svaki

analizirani uzorak u odnosu na istraživanje i 2013. godine (Smoković) (196 - 516 mg kg^{-1}), dok su samo uzorci S5 (160 mg kg^{-1}) i S8 (165 mg kg^{-1}) u skladu s rasponom vrijednosti iz 2014. godine (Knezović) (154-430 mg kg^{-1}). ß-tokoferol najmanje je zastupljen među tokoferolima u sojinom ulju i njegov udjel iznosi 22 do 66 mg kg^{-1} čije su vrijednosti za svaki analizirani uzorak veće u odnosu na istraživanje iz 2014. godine (Knezović) (2 - 18 mg kg^{-1}) , gdje je identificiran u samo tri uzorka: S6, S8 i S11. Prema Codex-u (1999) taj se udio kreće do 36 mg kg^{-1}, gdje uzorci S1, S5, S6, S8 prelaze tu vrijednost. Isti uzorci odstupaju od raspona vrijednosti za istraživanje provedeno 2013. godine (Smoković) (2 - 35 mg kg^{-1}).

Statističkom analizom pokazano je da kultivar ima značajan utjecaj na sva 4 izomera tokoferola. Također je uočen i statistički značajan utjecaj na udio ukupnih tokoferola.

5. ZAKLJUČCI

Na osnovi provedenog istraživanja te dobivenih i obrađenih rezultata mogu se izvesti sljedeći zaključci:

1. Praćenjem osnovnih prametara kvalitete sojinog sjemena, pokazalo se da su ispitivani uzorci dobre kvalitete. Prema masi 1000 sjemenki najbolji uzorak je S10. Uzorak S8 je uzorak s najmanjim sadržajem ulja i ujedno s najvišim sadržajem proteina. Statistička obrada podataka pokazala je da kultivar ima značajan utjecaj na osnovne parametre kvalitete sjemena. Iznimka je hektolitarska masa gdje utjecaj kultivara nije značajan.

2. Sojino ulje bogato je nezasićenim masnim kiselinama, posebno polinezasićenom linolnom kiselinom koja je najzastupljenija u svim ispitivanim uzorcima. Statističkom analizom utvrđeno je da kultivar ima značajan utjecaj na sve identificirane masne kiseline u ispitivanim uzorcima, osim na palmitoleinsku i heptadekansku (kod većine uzoraka).

3. Sojino ulje jedno je od biljnih ulja sa najvećim udjelom tokoferola. γ-tokoferol najzastupljeniji je kod svih ispitivanih uzoraka, a najvišu vrijednost ima uzorak S8. Najmanje zastupljen tokoferol kod svih uzoraka je ß-tokoferol. Uzorak S7 ima najmanju vrijednost.

4. Statističkom obradom podataka pokazalo se da kultivar značajno utječe na udio ukupnih i svih pojedinačnih tokoferola.

6. LITERATURA

AHA (American Heart Association). 2000. Heart and stroke statistical update. *American Heart Association.* Dallas, TX.

Anderson, D. (2003). Research done as part of the women's programme study: <http://www.hlth.qut.edu.au/nrs/research/wwps> 6th *Australasian Menopause Conference.* 24-26. Sydney, Australia.

Andrade, G. F., Dantas, M. I. S., Piovesan, N. D., Barros, E. G., Costa, N. M. B., Martino, H. S. D. (2010). Tratamento térmico adequa do proporciona melhoria da qualidade nutricional de farinhas de soja elaboradas a partir de novos cultivares destinados à alimentação humana. *Revista Instituto Adolfo Lutz*. **69**, 541-548.

Anonymous 1 (2016) <https://www.google.hr/search?q=slika+soje&client=firefox-b-ab&tbm=isch&tbo=u&source=univ&sa=X&ved=0ahUKEwjz3sv30fjOAhVC1hQKHdk8Dc4QsAQIGg&biw=1708&bih=821&dpr=0.8#imgrc=O_mib5eUnm2RbM%3A> Pristupljeno 03.07. 2016.

Anonymous 2 (2016) <https://www.google.hr/search?q=slika+soje&client=firefox-b-ab&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwjz3sv30fjOAhVC1hQKHdk8Dc4Q_AUICCgB&biw=1708&bih=821&dpr=0.8#tbm=isch&q=soja&imgrc=GhK2Qe-Icz0x5M%3A> Pristupljeno 03.07. 2016.

Astadi, I. R., Astuti, M., Santoso, U., Nugraheni, P. S. (2009) In vitro antioxidant activity of anthocyanins of black soybean seed coat in human low density lipoprotein (LDL). *Food Chem*. **112**, 659-663.

Ball, D., Hill, J., Scott, R. (n.d.) The basics of general, organic, and biological chemistry, 1 izd., Flat World Knowledge, Irvington, NY.

Baumgartner, R. M., Fehr, W. R., Wang, T., Wang, G. (2010) Tocopherol Content of Soybean Lines with Mid-oleate and 1%-Linolenate. *Crop Sci.* **50**, 770-774

Basić, S., Carović, K., Kolak, I., Gunjača, J., Šatović Z. (2006) Kretanje prinosa i sastavnica prinosa kultivara soje u različitim sklopovima. *Sjemenarstvo* **23**, 223-235

Berger, A., Jones, P.JH., Abumweis, S.S. (2004) Plant sterols: factors affecting their efficacy and safety as functional food ingredients. *BioMed Central.* **3**, 5.

Britz, S. J., Kremer, D. F. (2002) Warm temperatures or drought during seed maturation increase R-tocopherol. *J. Agric. Food Chem.* ***50***, 6058–6063.

Britz, S., Kremer, D., Kenworthy, W. (2008) Tocopherols in Soybean Seeds: Genetic Variation and Environmental Effects in Field-Grown Crops. *J. Am. Oil Chem. Soc***. 85**, 931-936.

Cahoon, E.B. (2003) Genetic Enhancement of Soybean Oil for Industrial Uses: Prospects and Challenges. *AgBioForum.* **6**, 11-13

Cert, A., Moreda, W., Perez-Camino, M.C. (2000) Chromatographic analysis of minor constituents in vegetable oils. *J. Chromatogr. A* **881**, 131-148.

Ciabotti, S., Barcellos, M. F. P., Mandarino, J. M. G., Tarone, A. G. (2006) Avaliações químicas e bioquímicas dos grãos, extratos e tofus de soja comum e de soja livre de lipoxigenase. *Ciência e Agrotecnologia* **30**, 920-929.

Clemente, T., Cahoon, E. (2009) Soybean Oil: Genetic Approaches for Modification of Functionality and Total Content. *Plant Physiol.* **151**, 1030-1040.

Codex stan 210-Codex standard for named vegetable oils (1999) *FAO/WHO*, Rim.

Desroches, S., Mauger, J.F., Ausman, L.M., Lichtenstein, A.H., Lamarche, B. (2004) Soy protein favourbly affects LDL size independently of isoflavones in hypercholesterolemic men and women. *J. Nutr.* **134**, 574-579.

DZS (2014) Republika Hrvatska. DZS-Hrvatski zavod za statistiku, <http://www.dzs.hr/>. Pristupljeno 10. srpnja 2016. Pristupljeno 02.09.2016.

Erickson, D. (1995) Practical Handbook of Soybean Processing and Utilization, 1 izd., AOCS Press, Champaign, Illinois, str. 11.

Erdman, J. (2000) Soy Protein and Cardiovascular Disease: A Statement for Healthcare Professionals From the Nutrition Committee of the AHA. *Circulation*. **102**, 2555-2559.

Esteves, E., Martino, H., Oliveira, F., Bressan, J., Costa, N. (2010) Chemical composition of a soybean cultivar lacking lipoxygenases (LOX2 and LOX3). *Food Chem*. **122**, 238-242.

Evans, J. C., Kodali, D. R., Addis, P. B. (2002) Optimal Tocopherol Concentrations to Inhibit Soybean Oil Oxidation. *J. Am. Oil Chem. Soc.***79**, 45-51.

Fabiyi, E.F (2006). Soyabean Processing, Utilization and Health Benefits. *Pakistan J. Nutr*. **5(5)**, 453-457.

FAO (1992) Food And Drug Administration <http://www.fao.org/home/en/> Pristupljeno 12.07. 2016.

Fisk, I., Gray, D. (2011) Soybean (Glycine max) Oil Bodies and Their Associated Phytochemicals. *J. Food Sci*. **76**, 1349-1354.

Friedman, M., Brandon, D. (2001) Nutritional and Health Benefits of Soy Proteins. *J. Agric. Food Chem*. **49(3)**, 1069-1086.

Grewal, R.B. (2000) Utilization and processing of soybean to prepare traditonal food of India. *The Thitd International Soyabean Processing and Utilization Conference (ISPUC-III).* Japan, Tokyo. 325-326.

Gunstone, F.D. (2000) Vegetable Oils In Food Technology: Composition, Properties and Uses. 1 izd., CRC Press, U.S i Kanada.

Hamm, W., Hamilton, R.J. (2000) Edible oil processing. Academic Press. Sheffield.

Hammond, E.G., Johnson, L.A., Su, C., Wang, T., White, P.J. (2005) Soybean Oil. U: Bailey's Industrial Oil and Fat Products (Shahidi, F., ured.), 6.izd., John Wiley & Sons, Hoboken, str. 577-653.

Hui, Y. H. (1996) Bailey's Industrial Oil and Fat Products, 5. izd., John Wiley & Sons, New York, str. 499-600.

Hunter, S., Cahoon, E. (2007). Enhancing Vitamin E in Oilseeds: Unraveling Tocopherol and Tocotrienol Biosynthesis. *Lipids* **42**, 97-108.

HRN EN ISO 502:2012, Žitarice-Određivanje mase 1000 zrna.

HRN EN ISO 659:2010, Uljarice - Određivanje udjela ulja (Referentna metoda).

HRN EN ISO 665:2004, Uljarice - Određivanje količine vode i hlapljivih tvari.

HRN EN ISO 937:1999, Meso i mesni proizvodi – Određivanje količine dušika (Referentna metoda).

HRN EN ISO 5509:2004, Životinjske i biljne masti i ulja - Priprava metilnih estera masnih kiselina.

HRN EN ISO 5508:1999, Životinjske i biljne masti i ulja - Analiza metilnih estera masnih kiselina plinskom kromatografijom.

HRN EN ISO 7971-1:2012, Žitarice - Određivanje nasipne gustoće nazvane „masa po hektolitru“. 1. Dio: Referentna metoda.

HRN EN ISO 9936:2007, Životinjske i biljne masti i ulja - Određivanje količine tokoferola i tokotrienola tekućinskom kromatografijom visokog učinka.

Kim, S. L., Kim, H. B., Chi, H. Y., Park, N. K., Son J. R., Yun, H. T., Kim, S. J. (2005) Variation of anthocyanins and isoflavones between yellow-cotyledon and green-cotyledon seeds of black soybean. *Food. Sci. Biotechnol.* **14**, 778–782.

Kinney, A., Clemente, T. (2005) Modifying soybean oil for enhanced performance in biodiesel blends. *Fuel Process. Technol*. **86**, 1137-1147.

Kumar, V., Rani, A., Dixit, A., Bhatnagar, D.,Chauhan, G. (2009) Relative Changes in Tocopherols, Isoflavones, Total Phenolic Content, and Antioxidative Activity in Soybean Seeds at Different Reproductive Stages. *J. Agric. Food Chem.* **57**, 2705-2710.

Kumar, V., Rani, A., Solanki, S., Hussain, S. (2006) Influence of growing environment on the biochemical composition and physical characteristics of soybean seed. *J. Food Compos. Anal.* **19**, 188-195.

Lai, J., Xin, C., Zhao, Y., Feng, B., He, C., Dong, Y., Fang, Y., Wei, S. (2012) Study of Active Ingredients in Black Soybean Sprouts and Their Safety in Cosmetic Use. *Molecules* **17**, 11669-11679.

Lee, J. H., Kang, N. S., Shin, S. O., Shin, S. H., Lim, S. G., Suh, D. Y., Baek, I. Y., Park, K. Y., Ha, T. J. (2008) Characterisation of anthocyanins in the black soybean (*Glycine max* L.) by HPLC-DAD-ESI/MS analysis. *Food Chem.* **112**, 226-231.

Loman, A., Islam, S., Li, Q., Ju, L. (2016) Soybean bio-refinery platform: enzymatic process for production of soy protein concentrate, soy protein isolate and fermentable sugar syrup. *Bioprocess Biosyst. Eng*. **39**, 1501-1514.

Manabe, T., Kubo, S., Kodama, M., Bessho, Y. (1965) Prevention of discoloration in red parts of white peach. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaish* **12**, 472.

Matthaus, B., Özcan, M.M. (2014) Fatty acid and tocopherol contents of several soybean oils. *Nat.Prod.Res.* **28**, 589-592.

McCord, K. L., Fehr, W. R., Wang, T., Welke, G. A., Cianzio,S. R., Schbebly, S. R. (2004) Tocopherol content of soybean lines withreduced linolenate in the seed oil. *Crop Sci.* **44**, 772–776.

Mène-Saffrané, L., DellaPenna, D. (2010) Biosynthesis, regulation and functions of tocochromanols in plants. *Plant Physiol. Bioch*. **48**, 301-309.

Milaković, Z., Šarić, G.K., Veselovac, I., Kalajžić, I.J. (2012) Djelotvornost adhezivnih sredstava upredsjetvenoj bakterizaciji sjemena soje. *Poljoprivreda.* **18,** 19-23.

O'Brien R.D. (2009) Fats and Oils: Formulating and Processing For Applications, 3 izd., Taylor & Francis, London.

Pascal, S.L., Segal, R. (2006) Phytosterols –biological active compounds in food. *J. Agroalimentary Process. Tehnol.* **1**, 149-158.

Paucar-Menacho, L. M., Amaya-Farfán, J., Berhow, M. A., Mandarino, J. M. G., Mejia, E. G. d., Chang, Y. K. (2010) A high-protein soybean cultivar contains lower isoflavones and saponins but higher minerals and bioactive peptides than a low-protein cultivar. *Food Chem*. **120**, 15-21.

Paulić, I., Carović, K., Kolak, I., Gunjača, J., Šatović, Z. (2006) Prinos i sastavnicekultivara i oplemenjivačkih linija soje. *Sjemenarstvo* **23**, 237-253

Pravilnik o jestivim uljima i mastima (2012) *Narodne novine* **41**, Zagreb.

Rac, M. (1964) Ulja i masti; Sirovine, kemija i tehnologija jestivih ulja i masti. 1. izd., Poslovno udruženje, Beograd.

Rade, D., Mokrovčak, Ž., Štrucelj, D. (2001) Priručnik za vježbe iz kemije i tehnologije lipida, Durieux, Zagreb.

Rani, A., Kumar, V., Verma, S., Shakya, A., Chauhan, G. S.(2007) Tocopherol content and profile of soybean: genotypic variability and correlation studies. *J. Am. Oil Chem. Soc.* ***84***, 377–383.

Romac, G., Belamarić, M., Šoštarec, D., Ivčić, I. (2012) Tehničko-tehnološko rješenje postojećeg postrojenja sojara d.d. (rev1). Zagreb.

Sauvant, D., Perez, J.-M., Tran, G. Ed. (2004). Tables of composition and nutritional value of feed materials, *2 izd., INRA*, France.

Sudarić, A., Vratarić, M., T. Duvnjak, T. (2002) Quantitative genetic analysis of yield components and grain yield for soybean cultivars. *Poljoprivreda* **8**, 11-15.

Sudarić, A., Vratarić, M., Sudar, R., Duvnjak, T., Jurković, Z. (2008) Breeding Soybean for Improved Oil Quantity and Quality, 1 izd.. *Proceedings of the 4th Central European Congress on Food and 6th Croatian Congress of Food technologists, biotechnologists and nutritionists,* Zagreb.

Symolon, H., Schmiz, E.M., Dillehay, D.L., Merill, A.H. (2004) Dietary soy sphinolipids suppress tumorigenesis and gene expression in 1,2-dimethylhydrazine-treated CFI mice and ApcMin/+ mice. *J. Nutr.* **134**, 1157-1161.

Šimić, B., Popović, R., Sudarić, A., Rozman, A., Kalinović, I., Ćosić, J. (2007) Influence of Storage Condition on Seed Oil Content of Maize, Soybean and Sunflower. *Agr. Conspectus Scientificus* **72**, 211-213

Škevin, D. (2013) Masti i ulja. Predavanja iz kolegija Tehnologije masti i ulja 2012.

Tasan, M., Demirci, M. (2004). Total and individual tocopherol contents of sunflower oil at different steps of refining. *Eur. Food Res. Technol*. **220**, 251-254.

Todd, J.J., Vodkin, L.O. (1993) Pigmented Soybean (Glycine max) Seed Coats Accumulate Proanthocyanidins during Development. *Plant Physiol.* **102,** 663–670.

Toivo, J., Phillips, K., Lampi, A., Piironen, V. (2001) Determination of Sterols in Foods: Recovery of Free, Esterified, and Glycosidic Sterols. *J. Food Compos. Anal*. **14**, 631-643.

USDA (2013) United States Department of Agriculture <http://www.fas.usda.gov/> Pristupljeno 02.09.2016.

Vratarić, M., Sudarić, A. (2000) Soja *Glycine max* (L.) Merr. Poljoprivredni institut Osijek.

Wang, T., Hammond, E.G., Cornette, J.L., Fehr, W.R. (1999) Fractionation of Soybean Phospholipids by High-Performace Cromatography with an Evaporative Light Scattering Detector. *J. Am. Oil Chem. Soc*. **76**, 1313–1321.

Xu, Y., Xu, P., Wang, X. (2009) Studies on extraction technology and stability of black soybeanpolysaccharides. *Food Res. Dev.* **30**, 49–52.

Zambiazi, R.C., Przybylski, R., Zambiazi, M.V., Mendonca, C.B. (2007) Fatty acid Composition of Vegetable Oils and Fats. *Curitiba.* **25**, 111-120.