

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

JELENA BRCKAN, MIHAELA KATIĆ

**UTJECAJ PARAMETARA PROIZVODNJE NA KEMIJSKI  
SASTAV NERAFINIRANIH ULJA KONOPLJE**

Zagreb, 2013.

Ovaj rad izrađen je u Laboratoriju za tehnologiju ulja i masti Zavoda za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo, Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod stručnim vodstvom dr.sc. Dubravke Škevin, docent i dipl.ing. Marka Obranovića, asistent i predan je na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2012./2013.

**Tumačenje kratica i akronima:**

CoA = koenzim A

DHA = dokosaheksaenska masna kiselina

EPA = eikosapentaenska masna kiselina

GC = plinska kromatografija

HMG-CoA = 3-hidroksi-3-metil-glutaril-CoA reduktaza

HPLC = tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti

LDL kolesterol = kolesterol niske gustoće

PC-8 = plastokromanol-8

THC = tetrahidrokanabinol

ω-3 = omega-3 masna kiselina

ω-6 = omega-6 masna kiselina

## SADRŽAJ

1	UVOD .....	1
2	TEORIJSKI DIO.....	2
2.1	ULJE KONOPLJE.....	2
2.2	PROIZVODNJA NERAFINIRANIH ULJA KONOPLJE .....	5
2.3	KEMIJSKI SASTAV ULJA KONOPLJE .....	6
2.3.1	Omega-3 i omega-6 masne kiseline .....	6
2.3.2	Tokoferoli i tokotrienoli .....	7
2.3.3	Pigmenti .....	11
3	EKSPERIMENTALNI DIO .....	12
3.1	MATERIJALI.....	12
3.1.1	Sjeme i ulje konoplje.....	12
3.1.2	Reagensi .....	12
3.2	METODE RADA .....	13
3.2.1	Proizvodnja ulja.....	13
3.2.1.1	Hladno prešanje prethodno samljevenog sjemena.....	14
3.2.1.2	Prešanje prethodno samljevenog sjemena uz kondicioniranje i zagrijavanje glave preše.....	14
3.2.1.3	Filtriranje ulja .....	15
3.2.2	Određivanje peroksidnog broja .....	15
3.2.3	Određivanje sastava masnih kiselina.....	16
3.2.3.1	Priprema metilnih estera masnih kiselina .....	16
3.2.4	Određivanje tokoferola.....	17
3.2.5	Određivanje ukupnih karotenoida .....	19
3.2.6	Određivanje klorofila .....	20
3.2.7	Fotometrijski indeks boje .....	20
3.3	STATISTIČKA OBRADA.....	21
4	REZULTATI I RASPRAVA .....	22
5	ZAKLJUČCI.....	28
6	LITERATURA .....	30
	SAŽETAK.....	35
	SUMMARY .....	36
	ŽIVOTOPISI.....	38

## **1 UVOD**

Kontroverze vezane uz preporuku količine i vrste ulja i masti u prehrani traju još od prvih dokumenata stručnih agencija u SAD-u 1916., a posebno nakon II. svjetskog rata i usavršavanja kemijskih analitičkih metoda, prije svega plinske i tekućinske kromatografije. Posebnu zbrku u javnosti izazvali su „Diatry Goals for US“ iz 1977. gdje se, između brojnih smjernica, savjetuje smanjenje unosa masti u prehrani na 30%. Ovakav službeni stav vodeće ekonomije u svijetu otvorio je prostor za pojavu velikog broja „low fat“ i „no fat“ proizvoda, a brojni nutricionisti i liječnici i danas smatraju da je „masna hrana“ nešto štetno.

Današnje znanstvene spoznaje nas uče kako iz ulja i masti naše tijelo, osim energetsko-kalorijske vrijednosti, dobiva esencijalne nutrijente kao što su linolna i linolenska masna kiselina i brojne bioaktivne komponente od kojih su najpoznatiji tokoferoli, tj. vitamini E skupine. Raznovrsnost biljnih ulja najbolje se vidi po različitosti njihovog sastava masnih kiselina i bioaktivnih komponenti.

U zadnjih nekoliko godina na svjetskom i hrvatskom tržištu pojavilo se jedno vrlo specifično ulje, ulje industrijske konoplje koje primarno odskače od drugih sličnih proizvoda po svom kemijskom sastavu, prvenstveno po sastavu masnih kiselina. Odlikuje ga visok udjel linolenske masne kiseline i optimalan omjer linolna/linolenska masna kiselina.

Cilj ovog rada bio je odrediti utjecaj parametara proizvodnje ulja na sastav masnih kiselina, sastav i udjel tokoferola, pigmenata kao i na oksidacijsku stabilnost nerafiniranih ulja konoplje.

## **2 TEORIJSKI DIO**

### **2.1 ULJE KONOPLJE**

Konoplja (*Cannabis sativa L.*) je jednogodišnja biljka koja se stoljećima uzgaja za proizvodnju vlakana i ulja. Postoje 3 tipa konoplje: konoplja s visokim udjelom THC-a (2-6% THC-a), konoplja s manjim udjelom THC-a te konoplja za uzgoj vlakana (manje od 0,25% THC-a). Konoplja s udjelom THC-a manjim od 1% predstavlja industrijsku konoplju, koja se prema podacima FAO iz 2011. uzgaja u 14 zemalja svijeta. Sjeme i ulje konoplje se danas koristi u Francuskoj, Kini, Mađarskoj, Rumunjskoj, Ukrajini, Čileu te je sve veći porast uzgoja i korištenja u Sjevernoj Americi, Turskoj i Španjolskoj (FAO, 2013; Chen i sur., 2012; Oomah i sur., 2002; Sacilik i sur., 2003). Uzgoj konoplje bio je zabranjen u europskim zemljama do 1996. kada je dozvoljen uzgoj kultivara konoplje s udjelom THC-a nižim od 0,3%. Danas je na području Europske unije dozvoljen uzgoj kultivara s udjelom THC-a nižim od 0,2% (Kriese i sur., 2004).

Dok se u zemljama EU uzgoj industrijske konoplje potpomaže različitim poticajima, u Hrvatskoj blagodati ove biljke još uvijek nisu dovoljno prepoznate. No unatoč tome, proizvodnja je i kod nas svakim danom sve veća, te raste broj malih OPG-ova koji se odlučuju na uzgoj ove visokovrijedne biljke. U Republici Hrvatskoj konoplju je dopušteno uzgajati u svrhu proizvodnje hrane i hrane za životinje, a uzgoj je reguliran Pravilnikom o uvjetima za uzgoj konoplje, načinu prijave uzgoja maka te uvjetima za posjedovanje opojnih droga u veterinarstvu (Pravilnik, 2012a) .



Slika 1. Sjeme konoplje (Anon., 2013a)

Sjemenke konoplje (Slika 1.) sadrže 20-25% proteina, 20-30% ugljikohidrata, te 10-15% netopljivih vlakana, što ih čini izrazito nutritivno vrijednom hranom (Sacilik i sur., 2003). Sadrže antioksidanse, proteine, karotene, fitosterole, fosfolipide te značajan udjel minerala, uključujući kalcij, magnezij, sumpor, kalij, cink i fosfor. Izvor su ukupnih proteina koji sadrže svih 20 poznatih aminokiselina, uključujući i 9 esencijalnih aminokiselina. Također sadrže vitamin A ( $\beta$ -karoten), vitamine B-skupine (osim B12), D i E u probavljivom obliku. Odlikuje ih visoki udjel ulja, 30-35% po masi sjemenke, a kod nekih vrsta i do 50% ulja (Wilkerson, 2008).

Ulje proizvedeno iz sjemenki konoplje (Slika 2.) koristi se u ljudskoj prehrani, te pojedine komponente ulja imaju povoljan utjecaj na ljudsko zdravlje (Kriese i sur., 2004).



Slika 2. Ulje konoplje (Anon., 2013b)

Ulje konoplje sadrži pretežno esencijalne masne kiseline i to  $\omega$ -6, linolnu masnu kiselinu oko 50% i  $\omega$ -3,  $\alpha$ -linolensku masnu kiselinu oko 20% (Tablica 1.) (Callaway i Pate, 2009). Ima uravnotežen omjer linolne i  $\alpha$ -linolenske kiseline koji je gotovo idealan i iznosi 3:1. Utvrđeno je da se takav omjer masnih kiselina nalazi u mediteranskoj i japanskoj prehrani, za koje se smatra da imaju jedan od najpovoljnijih učinaka na krvožilni sustav ljudi (Teh i Birch, 2013). Svojim sastavom ulje konoplje osigurava sve potrebe za esencijalnim masnim kiselinama, uključujući i  $\gamma$ -linolensku masnu kiselinu, dok 10%-tni sadržaj zasićenih masnih kiselina osigurava energiju (Wilkerson, 2008). Prisutstvo  $\gamma$ -linolenske kiseline također ga čini idealnim sastojkom za kozmetiku (Da Porto i sur., 2012).

Tablica 1. Sastav masnih kiselina u ulju konoplje prema nekim autorima

MASNE KISELINE	ULJE KONOPLJE (% od ukupnih)		
	Callaway i Pate (2009)	Leizer i sur.(2000)	Wilkerson (2008)
Palmitinska (C16:0)	5,00	5,00-7,00	6,00
Stearinska (C18:0)	2,00	1,00-2,00	2,00
Oleinska (C18:1)	9,00	8,00-13,00	12,00
Linolna (C18:2ω6)	56,00	52,00-62,00	58,00
α-linolenska (C18:3ω3)	22,00	15,00-25,00	20,00
γ-linolenska (C18:4ω6)	4,00	3,00-4,00	1,80
Arahinska (C20:0)	-	0,39-0,79	-
Eikosenoinska (C20:1)	-	0,51	-
Polinezasičene masne kiseline	84,00	-	-
Omjer ω-3/ω-6	1:2,55	1:2,85	1:2,90

- nije određivano

Osim povoljnog sastava masnih kiselina, ulje iz sjemenki odličan je izvor bioaktivnih komponenata poput tokoferola, tokotrienola i plastokromanola-8 (PC-8). Tokoferoli su prirodni antioksidansi koji sprječavaju oksidaciju nezasićenih masnih kiselina te smanjuju rizik od kardiovaskularnih bolesti i tumora (Kriese i sur., 2004). Ulje konoplje sadrži oko 800 mg kg<sup>-1</sup> ukupnih tokoferola, od kojih je dominantan γ-tokoferol (Tablica 2.) (Matthäus i Brühl, 2008).

Tablica 2. Udio tokoferola u ulju konoplje prema nekim autorima

Autor rada	Tokoferoli (mg kg <sup>-1</sup> )					
	α-	β-	PC-8	γ-	δ-	Ukupno
Teh i Birch (2013)	27,80	0,00	n.d.**	564,11	13,00	604,91
Kriese (2006)	tr*	0,00	n.d.**	468,00	0,00	468,00
Oomah i sur. (2002)	34,00	6,00	-	733,00	25,00	798,00
Uluata i Özdemir (2012)	25,58	5,96	-	597,91	39,71	669,16
Gruszka i Kruk (2007)	52,70	0,00	1,60	304,60	10,70	369,60

\* u tragovima; \*\*nije identificiran; -nije određivano

Nutritivnoj vrijednosti ulja doprinose i drugi sastojci ulja, kao npr.  $\beta$ -sitosterol i metilsalicilati, koji povećavaju njegovu efikasnost kao funkcionalna hrana. Istraživanjima je dokazano da  $\beta$ -sitosterol smanjuje udjel kolesterola u krvi, djeluje antivirusno i antiupalno (Leizer i sur., 2000).

Ulje konoplje ima dobre senzorske karakteristike i dobru oksidacijsku stabilnost kojoj pridonosi povoljan sastav bioaktivnih komponenata u odnosu na sastav masnih kiselina. Hladno prešano ulje konoplje je tamnozelene do svjetlozelene boje i ugodnog orašastog okusa. Što je ulje tamnije, to okus više podsjeća na zelenu travu. Zelena boja ulja potječe od visokog udjela klorofila, koji je prirodno prisutan u sjemenkama konoplje. Osim klorofila u značajnom udjelu prisutni su i karotenoidi, a oni zajedno određuju boju ulja. Osim toga, posjeduju i antioksidacijska svojstva te time doprinose nutritivnoj vrijednosti ulja (Wilkerson, 2008).

Osim u prehrani, ulje konoplje također se koristi i u kozmetici jer djeluje antimikrobnog, antiupalno, sprečava starenja kože, uravnovezuje pH i vlažnost kože, te djeluje antioksidacijski (Wilkerson, 2008). Zbog svog visokog udjela nezasićenih masnih kiselina ulje konoplje se koristi i kao sirovina pri proizvodnji boja za printere, detergenata i sapuna (Oomah i sur., 2002).

## 2.2 PROIZVODNJA NERAFINIRANIH ULJA KONOPLJE

Najčešći načini proizvodnje ulja su mehanička ekstrakcija tj. prešanje te ekstrakcija organskim otapalima. Koji postupak će se koristiti za izdvajanje ulja iz neke sirovine ponajprije ovisi o udjelu ulja u sirovini. Kao što je već spomenuto, sjeme konoplje sadrži 30-35% ulja, a to ekonomski opravdava odabir procesa proizvodnje ulja metodom prešanja na pužnim prešama. Na taj način moguće je ekstrahirati 60-80% ulja iz sjemena, što je u usporedbi s proizvodnjom drugih prešanih ulja (djevičansko maslinovo ulje, repičino ulje) izuzetno dobro iskorištenje (Matthäus i Brühl, 2008).

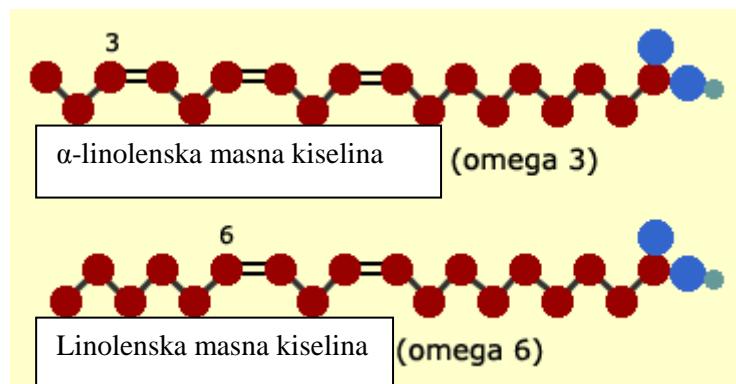
Da bi se iz sirovine moglo proizvesti ulje ključna je priprema same sirovine. Ona uključuje uklanjanje nečistoća te mljevenje sjemena kako bi se razbila stanična struktura što omogućuje bolje izdvajanje ulja te postizanje većeg iskorištenja procesa.

Danas se za proizvodnju hladno prešanih ulja većinom koriste kontinuirane pužne preše čiji su glavni elementi vodoravni puž na glavnoj osovini, koš oko puža koji služi za hlađenje, uređaj za punjenje i pražnjenje materijala te uređaj za reguliranje debljine isprešane pogače, zupčani prenosnik i kućište preše. Prešanje se postiže uz pomoć pužnice koja gura sjeme u manji prostor pri čemu dolazi do porasta tlaka te na kraju do izdvajanja ulja iz sjemena. Tlak je moguće regulirati izmjenom izlaznog otvora za pogaču, jer što je manji otvor postiže se veći tlak, a time i bolje iskorištenje procesa. Ulje se cijedi kroz otvor cilindra i hvata u odgovarajuću posudu. Pogača se nakon prvog prešanja usitni i ponovo preša kako bi se postiglo što bolje iskorištenje.

## 2.3 KEMIJSKI SASTAV ULJA KONOPLJE

### 2.3.1 Omega-3 i omega-6 masne kiseline

Višestruko nezasićene masne kiseline,  $\omega$ -3 i  $\omega$ -6, strukturno se razlikuju po mjestu prve dvostrukе veze od metilnog kraja molekule masne kiseline (Slika 3.). Kod  $\omega$ -6 kiselina, prva dvostruka veza se nalazi između 6. i 7. ugljikovog atoma, dok se kod  $\omega$ -3 nalazi između 3. i 4. ugljikovog atoma.



Slika 3. Strukturne formule  $\omega$ -3 i  $\omega$ -6 masnih kiselina (Anon., 2013c)

Esencijalne masne kiseline ljudski organizam ne može sam sintetizirati, već se moraju unijeti hranom. Esencijalna  $\omega$ -6 masna kiselina je linolna kiselina (18:2 $\omega$ 6) koja se nalazi u sjemenkama većine biljaka. Esencijalna  $\omega$ -3 masna kiselina je  $\alpha$ -linolenska kiselina, a

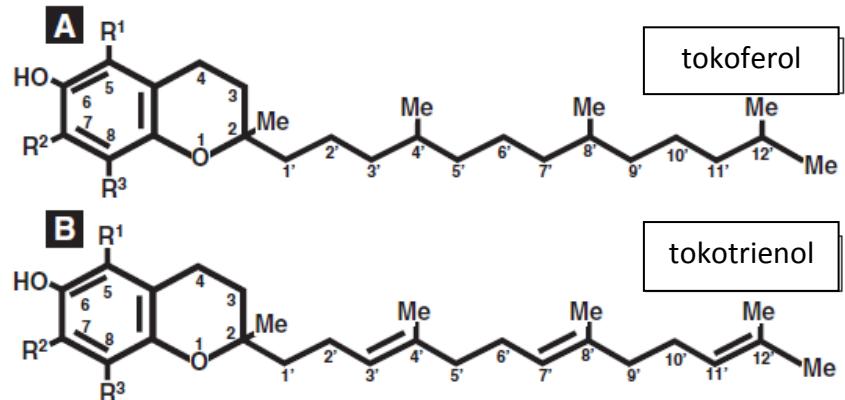
pronađena je u značajnijoj količini u kloroplastima zelenog lisnatog povrća te sjemenkama lana, repice, chie te u orasima. Obje esencijalne masne kiseline u organizmu se metaboliziraju u dugolančane masne kiseline s 20 i 22 ugljikova atoma. Linolna kiselina se metabolizira u arahidonsku (20:4 $\omega$ 6), a  $\alpha$ -linolenska kiselina u EPA (20:5 $\omega$ 3) i DHA (22:6 $\omega$ 3) (Simopoulos, 2008).

Blagotvorni zdravstveni utjecaji  $\omega$ -3 masnih kiselina, eikosapentaenske (EPA) i dokosaheksaenske (DHA) kiseline prvotno su opisani na Eskimima sa Grenlanda. Oni su se prehranjivali isključivo morskim plodovima, što je rezultiralo malim brojem srčanih oboljenja, astme, dijabetesa i multiple skleroze. Povoljni utjecaji  $\omega$ -3 masnih kiselina vidljivi su i u prevenciji tumora, reumatoidnog artritisa te psorijaze. Upravo zbog tih svih utvrđenih činjenica, vrlo je važno voditi računa u omjeru  $\omega$ -6 i  $\omega$ -3 masne kiseline u prehrani. Taj bi omjer u prehrani trebao biti 3:1 ili 4:1, jer povoljno utječe na prevenciju i tretman kod krvožilnih bolesti, osteoporoze, dijabetesa, artritisa, tumora, mentalnih bolesti te različitih upalnih i imunoloških poremećaja (Simopoulos, 2008).

### 2.3.2 Tokoferoli i tokotrienoli

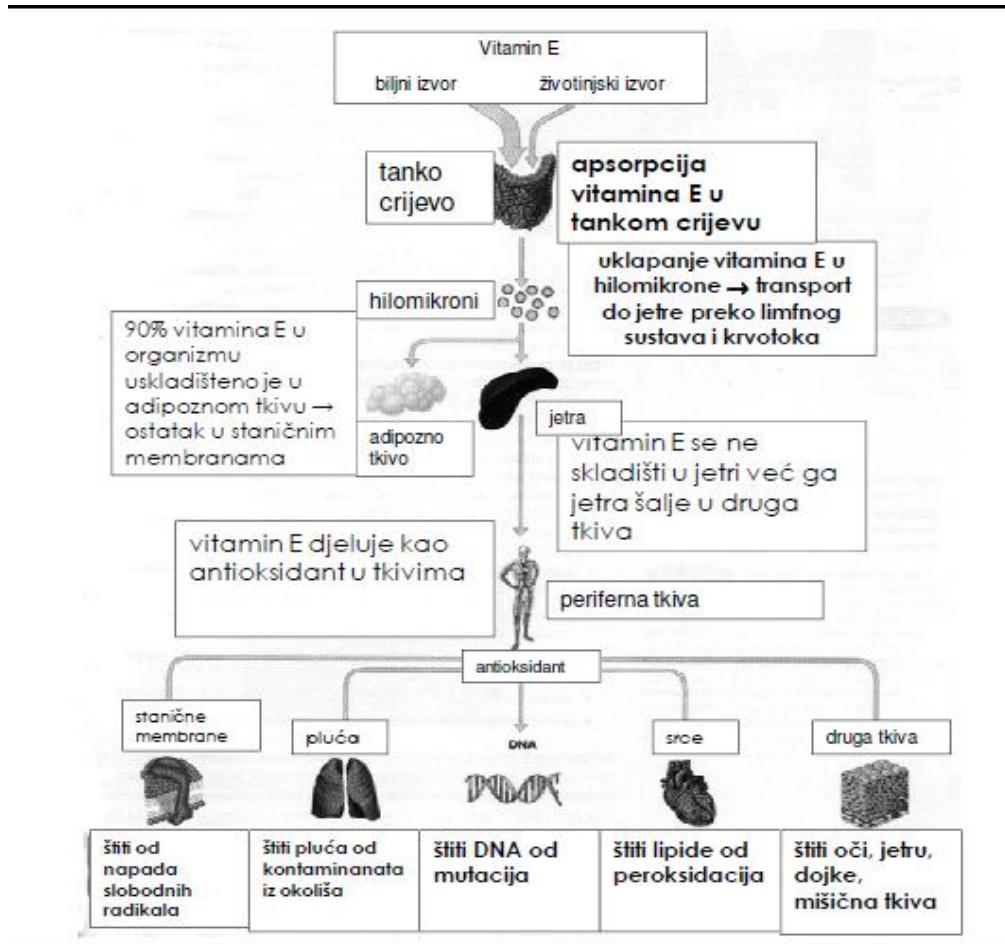
Tokoferoli i tokotrienoli, zajedničkog naziva tokoli, su lipofilni antioksidansi poznati još i pod nazivom vitamin E, sintetizirani u fotosintetskim organizmima. Njihovu strukturu čini prsten kroman-6-ol s 1 do 3 metilne skupine na aromatskom prstenu i izoprenoidni bočni lanac sa 16 ugljikovih atoma koji je kod tokoferola zasićen (fitil), a kod tokotrienola nezasićen (izoprenil) (Schwartz i sur., 2008). Naziv tokoferol potječe od grčkih riječi *tokos* što znači potomci te *phero* što znači porođaj dok *-ol* ukazuje na alkohol prisutan u molekuli, a taj je naziv dodijeljen zahvaljujući činjenici da vitamin E doprinosi fertilitetu. Danas se vitamin E koristi kao termin za sve tokoferole i njihove derivate koji imaju biološku aktivnost RRR- $\alpha$ -tokoferola, prirodno prisutnog stereoizomera koji posjeduje vitaminsku aktivnost. Često je vitamin E sinonim za  $\alpha$ -tokoferol. S jedne strane taj je izraz točan, ali je nepotpun te može dovesti u zabluđu. Naime,  $\alpha$ -tokoferol ima najjaču biološku aktivnost te se koristi kao standard prema kojem se određuje biološka aktivnost drugih tokoferola. Međutim, treba imati na umu da je  $\alpha$ -tokoferol samo jedan od 8 prirodno prisutnih oblika vitamina E (Sen i sur., 2006). Osim  $\alpha$ -tokoferola, vitamin E prisutan je u obliku  $\beta$ ,  $\gamma$  i  $\delta$ -tokoferola te u njihove četiri

nezasićene forme,  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  i  $\delta$ -tokotrienola (Panfili i sur., 2003). Slika 4. prikazuje strukturne formule tokoferola i tokotrienola.



Slika 4. Struktura tokoferola i tokotrienola (Sen i sur., 2006)

Vitamin E je esencijalan, lipofilan nutrijent koji u organizmu ima važnu antioksidacijsku ulogu (Slika 5) (Sen i sur, 2006). Svaki od navedenih oblika vitamina E ima određenu ulogu kako u biljnim sustavima tako i u organizmu. Pri tom najjaču biološku aktivnost ima  $\alpha$ -tokoferol, iza njega slijede  $\beta$ ,  $\gamma$  te  $\delta$ -tokoferol, dok najjače antioksidacijsko djelovanje ima  $\delta$ -tokoferol iza kojeg slijede  $\gamma$ ,  $\beta$  te  $\alpha$ -tokoferol (Lampi i sur., 2002). Glavna uloga  $\alpha$ -tokoferola je „hvatanje“ slobodnih radikala u membranama i lipoproteinima te u namirnicama. S obzirom na njegov visok antioksidacijski potencijal i različite uloge na molekularnoj razini smatra se da smanjuje rizik od krvožilnih bolesti te određenih tipova raka. S druge strane, istraživanja su pokazala da  $\gamma$ -tokoferol ima značajnu ulogu kod snižavanja razine LDL kolesterola te sprječavanju stvaranja tromba u arterijama, dok tokotrienoli inhibiraju biosintezu kolesterola te smanjuju rizik od raka dojke (Schwartz i sur., 2008).



Slika 5. Važnost vitamina E u organizmu (Vorkapić-Furač, 2013)

Tokoli su prisutni u lišću i sjemenkama. Sjemenke uljarica predstavljaju bogat izvor važnih bioaktivnih komponenti poput tokoferola i tokotrienola. Prisutnost tih visokovrijednih sastojaka izravno utječe na oksidacijsku stabilnost sjemenki te nutritivnu vrijednost proizvedenog ulja. Njihova antioksidacijska funkcija uglavnom se pripisuje inhibiciji lipidne peroksidacije i hvatanju reaktivnog kisika (Witulska-Gawrysiak i sur., 2009; Gruszka i Kruk, 2007).

Udjel tokoferola u uljima sjemenki uljarica kreće se od  $2000 \text{ mg kg}^{-1}$  ulja, dok je u lišću njihov udjel puno manji ( $10\text{-}50 \text{ mg kg}^{-1}$  svježeg lišća) (Witulska-Gawrysiak i sur., 2009; Gruszka i Kruk, 2007). U sjemenkama dominantan tokoferol je  $\gamma$ -tokoferol, dok u lišću ima najviše  $\alpha$ -tokoferola (Szymańska i Kruk, 2008). Brojni čimbenici utječu na udio tokoferola i tokotrienola, kao što su varijitet, područje uzgoja, način proizvodnje ulja, skladištenje ulja i sl. (Witulska-Gawrysiak i sur., 2009).

Antioksidacijska svojstva tokoferola su izrazito kompleksna. Oni su efektivni pri niskim koncentracijama, dok postupno gube djelotvornost kad im koncentracija u uljima poraste. Takvo ponašanje najviše pokazuje  $\alpha$ -tokoferol, ali je uočen i kod drugih tokoferola. Razine tokoferola u biljnim uljima su u optimalnim količinama za njihovu oksidacijsku stabilnost. Tokoferoli ispoljavaju antioksidacijska svojstva većinom zbog svoje lipofilnosti. Vrlo je teško obogatiti biljna ulja tokoferolima, jer postoje optimalne granice koje osiguravaju maksimalnu zaštitu ulja (Kamal-Eldin, 2006).

Tokotrienoli su prisutni u nefotosintetskim organizma (sjemenke) određenih biljnih vrsta, uglavnom jednosupnica. Najbogatiji izvori tokotrienola su palmino ulje i ulje mekinja riže, ulje pšeničnih klica, kokosovo ulje, ulje sjemenki amaranta i lychee-a (Gruszka i Kruk, 2007).

Veliki interes za tokotrienole pokrenula su nedavna istraživanja o njihovim pozitivnim učincima gdje je dokazano da imaju širok terapeutski učinak na organizam koji se manifestira kroz antioksidacijska svojstva koja im omogućuju antikancerogeno, neuroprotektivno te antisklerozno djelovanje (Gruszka i Kruk, 2007). Naime, već mikrokoličine tokotrienola smanjuju aktivnost 3-hidroksi-3-metil-glutaril-CoA reduktaze (HMG-CoA), enzima jetre odgovornog za sintezu kolesterola (Sen i sur, 2006). Također, dokazano je da sudjeluju u staničnoj signalizaciji. Iako se ne zadržavaju u krvnoj plazmi, ovi spojevi selektivno prodiru do kože pa kad se primjenjuju lokalno učinkovito suzbijaju oksidacijski stres izazvan UV zračenjem i ozonom. Također, dokazano je da tokotrienoli djeluju sinergistički s  $\alpha$ -tokoferolom (Szymańska i Kruk, 2008; Gruszka i sur., 2008).

Uz tokoferole i tokotrienole u pojedinim uljima prirodno je prisutan derivat tokotrienola, PC-8. Najviše ga ima u lanenom i repičinom ulju, dok je u manjim udjelima prisutan u ulju konoplje te u ulju sjemenki crnog bora. Smatra se da je njegova uloga u sjemenkama i lišću slična onoj tokoferola, tj. posjeduje antioksidacijska svojstva, međutim značajniji literaturni podatci koji bi potkrijepili tu tvrdnju nisu dostupni (Szymańska i Kruk, 2008; Gruszka i Kruk, 2007). PC-8 je snažniji antioksidans od  $\alpha$ -tokoferola, dok tokotrienoli slabije utječu na inhibiciju autooksidacije od tokoferola (Matthäus i Özcan, 2009).

Autooksidacija lipida se najčešće odvija u 3 reakcije, inicijacija, propagacija i terminacija. Inicijacija je vrlo spora reakcija u kojoj dolazi do nastanka slobodnih radikala, najčešće alkil radikala iz nezasićenih masnih kiselina. U fazi propagacije nastali alkil radikali su vrlo reaktivni te reagiraju s kisikom i dolazi do nastanka peroksil radikala. Peroksil radikali

povećavaju stvaranje lipidnih hidroperoksida. U terminaciji dolazi do završetka lančane reakcije (Kamal-Eldin i Appelqvist, 1996). Tokoferoli i tokotrienoli imaju važnu ulogu u sprječavanju oksidacije u stanicama. Njihova glavna uloga je sprječavanje membranske lipidne peroksidacije, tj. „skupljanje“ tzv. singlet kisika, visokoreaktivnog, energetski pobuđenog molekularnog oblika kisika koji je najodgovorniji za oštećenje ciljne stanice (Szymańska i Kruk, 2008; Gruszka i sur., 2008).

### **2.3.3 Pigmenti**

Pigmenti zajednički mnogim biljnim uljima su crveni i žuti karotenoidi te zeleni klorofili. Vrsta i količina pigmenata u ulju ovisi o vrsti uljarice, uvjetima uzgoja itd. (Cert i sur., 2000).

Karotenoidi su polinezasićeni ugljikovodici sastavljeni iz izoprenskih ostataka te su zaslužni za intenzivno žutu, narančastu ili crvenu boju ulja. Najvažniji karotenoidi su  $\alpha$ -,  $\beta$ - i  $\gamma$ -karoten.  $\alpha$ - i  $\beta$ -karoten su posebno značajni jer imaju provitaminsko djelovanje (Kamal-Eldin, 2005).

Osim karotenoida značajni pigmenti u ulju su klorofili (klorofil *a* i *b* te feofitin *a* i *b*) koji su odgovorni za zelenu boju ulja. I karotenoidi i klorofili utječu i na autooksidacijske i fotooksidacijske procese u ulju (kao prooksidansi ili kao antioksidansi) tako da se u proizvodnji jestivog ulja ovi pigmenti uklanjam tijekom rafinacije u fazi bijeljenja. Kod nerafiniranih ulja klorofilni pigmenti, i to najčešće u ulju topiv feofitin *a*, koriste se kao jedan od indikatora kvalitete ulja (Pokorný i sur., 1995).

Jestiva nerafinirana ulja bogata pigmentima imaju prednost u odnosu na rafinirana, gdje su pigmenti najvećim djelom uklonjeni ili razgrađeni (Cert i sur., 2000).

### **3 EKSPERIMENTALNI DIO**

#### **3.1 MATERIJALI**

##### **3.1.1 Sjeme i ulje konoplje**

Kao materijal u ovom radu korišteno je sjeme konoplje uzgojeno u Republici Hrvatskoj u 2012.Godini. Iz sjemena proizvedeno je ulje laboratorijskim postupkom hladnog prešanja samljevenog sjemena, te postupkom prešanja mljevenog sjemena uz kondicioniranje i zagrijavanje glave preše.

##### **3.1.2 Reagensi**

Svi reagensi i otapala koji su se koristili u ovom radu bili su najmanje p.a. stupnja čistoće. Standardi koji su se koristili bili su *pro chromatography* stupnja čistoće.

- kalij-jodid
- izooktan
- octena kiselina
- škrob
- metanol
- kalij-hidroksid
- heksan
- cikloheksan
- izopropanol
- natrij-hidrogensulfat monohidrat
- standardi tokoferola ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - i  $\delta$ -), Merck KGaA (Darmstadt, Njemačka)
- smjesa metilnih estera masnih kiselina (F.A.M.E., C4-C24), Supelco (Bellefonte, SAD)

Standard PC-8 za HPLC analize nije moguće kupiti na tržištu nego je dobiven ljubaznošću Dr.sc. Jerzy Kruka s Department of Plant Physiology and Biochemistry, Faculty of Biotechnology, Jagiellonian University u Krakowu, Poljska.

## 3.2 METODE RADA

### 3.2.1 Proizvodnja ulja

Iz sjemena konoplje laboratorijskim postupkom proizvedeno je ulje na dva različita načina, hladnim prešanjem te prešanjem kondicioniranog sjemena uz zagrijavanje glave preše, kako bi se utvrdio utjecaj parametara proizvodnje ulja na kemijski sastav i oksidacijsku stabilnost nerafiniranih ulja konoplje. Prije prešanja sjeme konoplje samljeveno je na električnom mlincu.

Preša koju smo koristili u laboratoriju sadržavala je lijevak u koji se dodavalо sjeme. Sjeme se dodaje postupno i konstantno da bi se izbjegao prazan hod preše te začepljenje glave preše. Sadržavala je i komoru za prešanje koja se sastoji od glave preše, te otvora za pogaču (promjera od 4, 5, 6 i 8 mm), puža preše, prijenosnih mehanizama te elektromotora za pokretanje preše. Kapacitet preše iznosi, ovisno o vrsti materijala koji se preša, te o stanju i udjelu vode u materijalu koji se preša, između 8 i 15 kg/h, prema navodima proizvođača.

Postupak proizvodnje ulja iz sjemena prešanjem na pužnoj preši odvijao se u dva stupnja, tj. nakon prvog prešanja pogača (ostatak nakon prešanja) je usitnjena i ponovno isprešana da bi se postiglo što bolje iskorištenje. Preša koju smo koristili u laboratoriju je pužna preša „Komet“, tvrtke „Monforts & Reiners“, Rheydt, model CA/53 (Slika 6).



Slika 6. Pužna preša (IBG Monforts & Reiners, 1972)

### *3.2.1.1 Hladno prešanje prethodno samljevenog sjemena*

Sjeme konoplje usitnili smo na mlinu na odgovarajuću veličinu čestica, nakon čega smo ga ručno usipavali kroz lijevak preše. Uz pomoć puža preše došlo je do prešanja te izdvajanja ulja iz sjemena. Ulje smo hvatali u za to odgovarajuću prethodno pripremljenu posudu. Pogaču smo usitnili i ponovo prešali. Ulje smo zatim ostavili da odleži 24 sata u mraku, čime smo ga zaštitili od svjetlosti dok smo koristeći parafinski poklopac spriječili negativan utjecaj zraka na ulje. Nakon 24 sata na dnu su se istaložile sve zaostale čestice pogače. Temperatura ovog ulja tijekom proizvodnje nije bila viša od 50°C.

### *3.2.1.2 Prešanje prethodno samljevenog sjemena uz kondicioniranje i zagrijavanje glave preše*

Postupak prešanja isti je kao i prethodno navedeni, samo što se nakon mljevenja sjemena provodi postupak kondicioniranja. Kondicioniranje podrazumijeva zagrijavanje sjemena uz podešavanje udjela vode, a svrha tog postupka je omogućiti lakše izdvajanje ulja iz sjemena. Tijekom ovog načina prešanja koristili smo grijач glave preše podešen na stupanj grijanja 1. Temperatura kondicioniranja je bila 60° i 80° C i kondicioniranje je trajalo 30 minuta uz konstantno miješanje i dodavanje određene količine vode.

Opis ispitanih uzoraka ulja konoplje prikazan je u Tablici 3.

Tablica 3 . Uzorci ulja konoplje proizvedeni u laboratoriju

OZNAKA UZORAKA ULJA	OPIS
<b>HP</b>	Ulje konoplje proizvedeno postupkom hladnog prešanja mljevenog sjemena.
<b>PK 60</b>	Ulje konoplje proizvedeno postupkom prešanja mljevenog sjemena uz kondicioniranje pri 60° C i zagrijavanje glave preše.
<b>PK 80</b>	Ulje konoplje proizvedeno postupkom prešanja mljevenog sjemena uz kondicioniranje pri 80° C i zagrijavanje glave preše.

### 3.2.1.3 Filtriranje ulja

Nakon proizvodnje ulja ono se ostavlja 24 sata zatvoreno u mraku kao što je prethodno navedeno. Pritom dolazi do taloženja krutih čestica pogače zaostale u ulju. Te se čestice moraju ukloniti iz ulja da ne bi pospešile njegovo kvarenje. Upravo zbog toga ulje se nakon prešanja treba filtrirati. Uzorci ulja filtriraju se dva puta, prvo se filtrira kroz Büchnerov lijevak i filter papir Whatman filter papers (Cat No 1004 125) 125 mm da bi se uklonile veće čestice, a za tim kroz sinter lijevak sa filter papirom Whatman filter papers (Cat No 1001 125) 125 mm kako bi se uklonile i one najmanje čestice. Nakon filtriranja ulje se prelijeva u tamne staklene boce, nakon čega se iz ulja uklanja kisik propuhivanjem s dušikom te se tako pripremljeno ulje čuva u mraku do dalnjih analiza.

## 3.2.2 Određivanje peroksidnog broja

Određivanje peroksidnog broja definirano je HRN EN ISO metodom (3960:2010), a određuje stupanj oksidacijskog kvarenja ulja. Za određivanje peroksidnog broja se koristi jodometrijska metoda kojom se određuje količina joda kojeg iz kalij-jodida oslobode peroksići prisutni u ulju. Rezultat se izražava u milimolima aktivnog kisika po kg ulja (mmol O<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup>).

Oko 1 g ulja odvaže se u Erlenmayer-ovu tikvicu od 300 mL. Uzorak se otopi u 20 ml izootktana i 30 mL octene kiseline. Doda se 0,5 mL zasićene otopine kalij-jodida. Smjesa se miješa 1 min ± 1 s, razrijedi sa 30 mL vode, te se doda 0,5 mL 1%-tne otopine škruba i odmah titrira s otopinom natrij-tiosulfata c (Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) = 0,01 mol L<sup>-1</sup>.

Peroksidni broj se izračunava prema jednadžbi:

$$PB \text{ (mmol O}_2 \text{ kg}^{-1}) = \frac{(V_1 - V_0)}{m} \times 5 \quad [1]$$

gdje je:

V<sub>1</sub> = volumen (mL) otopine natrij-tiosulfata, c (Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) = 0,01 mol/L utrošen za titraciju uzorka

V<sub>0</sub> = volumen (mL) otopine natrij-tiosulfata utrošen za titraciju slijepo probe

$m$  = masa uzorka (g)

### 3.2.3 Određivanje sastava masnih kiselina

Za određivanje sastava masnih kiselina u uzorcima ulja plinskom kromatografijom potrebno je prevesti masne kiseline u njihove metilne estere. Metilni esteri pripremljeni su metodom po Bannonu, ISO 5509:2000.

#### 3.2.3.1 Priprema metilnih estera masnih kiselina

Odvaže se 60 mg uzorka masti i otopi u 4 mL izooktana u epruveti volumena oko 10 mL sa staklenim čepom. Zatim se u epruvetu doda 200  $\mu$ L metanolne otopine KOH ( $c = 2$  mol L<sup>-1</sup>) i snažno protrese oko 30 sekundi. Ostavi se na sobnoj temperaturi da reagira. Nakon što se reakcijska smjesa izbistri i odvoji se glicerolni sloj na dnu epruvete, u nju se doda 1 g natrijeva hidrogensulfata monohidrata kako bi se smjesa neutralizirala. Bistra otopina se prebaci u vijalicu.

#### Analiza metilnih estera masnih kiselina plinskom kromatografijom

Metilni esteri masnih kiselina određeni su metodom ISO 5508:1990.

Pripremljen uzorak analizira na plinskom kromatografu Agilent Technologies 6890N Network GC System (Santa Clara, SAD) opremljenom sa masenim detektorom (FID) tipa Agilent Technologies 5973 inert Mass Selective Detector koji je preko kanala spojen na računalo.

U kompjuterskom sustavu zadani su uvjeti analize koji su postavljeni nakon provedenih preliminarnih ispitivanja po kojima su odabrani optimalni uvjeti (temperatura injektora, kolone i detektora, protok plina i količina injektiranog uzorka).

Uvjeti rada:

- Kolona: kapilarna DB-23 (Agilent),  
60m x 0,25 mm, debljina filma 0,25 $\mu$ m  
stacionarna faza: cijanopropil-silikon
- Temperatura kolone: programirana  
60°C do 220°C – 7°C min<sup>-1</sup>

		zadržava se 17 min
• Plin nosioc:		Helij
• Protok plina nosioca:		1,5 mL min <sup>-1</sup>
• Temperatura		injektora: 250°C
• Split:		1 : 30
• Temperatura detektora:		280°C
• Količina injektiranog uzorka:		1 µL

Identifikacija pojedinih masnih kiselina provedena je usporedbom vremena zadržavanja metilnih estera pojedine masne kiseline s vremenima zadržavanja metilnih estera standardne smjese 37 masnih kiselina (F.A.M.E. C4 - C24) poznatog sastava.

### 3.2.4 Određivanje tokoferola

Određivanje tokoferola provedeno je prema HRN EN ISO metodi (9936:2007).

Izvaje se  $0,1 \text{ g} \pm 0,1 \text{ mg}$  uzorka ulja u tikvicu od 10 mL i doda heksan kako bi se uzorak otopio. Važno je da otopina uzorka bude zaštićena od svjetla i da se analiza provede isti dan kad i priprema. Individualni tokoferoli se izdvoje pomoću tekućinske kromatografije visoke učinkovitosti (HPLC). Koristi se izokratska kromatografija normalnih faza.

Uvjeti rada:

• Kolona:		LiChroCART , Silica 60, 250mm x 4,6 mm, 5 µm, Merck
• Temperatura kolone:		Sobna
• Mobilna faza:		A: heksan/izopropanol= (99,3/0,7)
• Protok:		0,9 mL min <sup>-1</sup> 100% A
• Vrijeme analize:		25 min
• Detektor		Fluorescentni detektor (FD)
○ Valna duljina ekstinkcije		295 nm
○ Valna duljina emisije		330 nm
• Osjetljivost detektora		Medium
• Volumen injektiranog uzorka:		20 µL

Prije samog početka određivanja udjela tokoferola u uzorcima ulja izrađene su kalibracijske krivulje pojedinačnih tokoferola koje se koriste za njihovu kvalifikaciju i kvantifikaciju u ulju uljane repice. Standardi koji su bili injektirani u koncentracijama od 0,2 do 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$  bili su:  $\alpha$  -,  $\beta$  -,  $\gamma$ -,  $\delta$  - tokoferol. Metodom linearne regresije dobivene su iz baždarnih krivulja matematičke formule [2] – [6] koje se koriste za izračunavanje udjela pojedinačnih tokoferola u otopini ulja za analizu izražene u  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Za kvantifikaciju plastokromanola-8 korištena je baždarna krivulja  $\alpha$ -tokoferola. Za određivanje udjela pojedinačnih tokoferola u ulju ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) koristi se formula [6].

Udio  $\alpha$  - tokoferola ( $\mu\text{gmL}^{-1}$ ) računasepremajednadžbidobivenojizbaždarnekrvilje:

$$y = 1930222,29x + 91448,31 \quad [2]$$

gdjeje:

$y$  = površinaispodpika

$x$  = koncentracija  $\alpha$  - tokoferola( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )

Udio  $\beta$  - tokoferola ( $\mu\text{gmL}^{-1}$ ) računasepremajednadžbidobivenojizbaždarnekrvilje:

$$y = 2099486,35x + 50715,47 \quad [3]$$

gdjeje:

$y$  = površinaispodpika

$x$  = koncentracija  $\beta$  -tokoferola( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )

Udio  $\gamma$  - tokoferola ( $\mu\text{gmL}^{-1}$ ) računasepremajednadžbidobivenojizbaždarnekrvilje:

$$y = 2608249,70x + 170610,88 \quad [4]$$

gdjeje:

$y$  = površinaispodpika

$x$  = koncentracijay -tokoferola( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )

Udio  $\delta$  - tokoferola ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) računase prema jednadžbi dobivenoj izbaždarne krivulje:

$$y = 3816372,43x + 143769,40 \quad [5]$$

gdje je:

$y$  = površina ispod pika

$x$  = koncentracija  $\delta$  -tokoferola ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )

Udio pojedinačnih tokoferola u ulju ( $\text{mg kg}^{-1}$ ):

$$c (\text{tokoferol}_i) = \frac{x_i \times 10}{m} \quad [6]$$

gdje je:

$x_i$  = koncentracija ( $\alpha$  -,  $\beta$  -,  $\gamma$ -,  $\delta$  -)tokoferola ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )

$m$  = masa uzorka uzetog za analizu

### 3.2.5 Određivanje ukupnih karotenoida

Za određivanje udjela ukupnih karotenoida u ulju uljane repice, provodi se spektrofotometrijsko mjerjenje apsorbancije (Helios  $\beta$ , ATI Unicam,) uzorka otopljenog u cikloheksanu na 445 nm (BS 684-2.20:1977). Udio ukupnih karotenoida izražava se kao mg  $\beta$ -karotena po kg ulja.

U odmjernu tikvicu od 10 mL stavi se 0,5-1 g ulja i tikvica se nadopuni do oznake sa cikloheksanom. Otopini se izmjeri apsorbancija na 445 nm uz cikloheksan kao slijepu probu, a udio se izračunava pomoću formule [7]:

$$\text{Ukupni karotenoid i } (\text{mg kg}^{-1}) = \frac{383 \times A}{I \times C} \quad [7]$$

gdje je:

A = apsorbancija pri 445 nm

I = debljina kivete (cm)

C = koncentracija ulja u otopini uzetoj za mjerjenje

### 3.2.6 Određivanje klorofila

Određivanje klorofila provedeno je prema IUPAC metodi (Pokorný i sur. 1995).

Apsorbancija se mjeri spektrofotometrom (ATI Unicam, tip Helios  $\beta$ ) pri valnim duljinama 630, 670 i 710 nm. Udio ukupnih klorofila izražava se kao feofitin  $a$ , a količina klorofila računa se prema izrazu:

$$\text{Ukupni klorofili } (\text{mg feofitina a kg}^{-1}) = 345.3 \frac{A_{670} - \frac{A_{630} + A_{710}}{2}}{L} \quad [8]$$

gdje je:

A = apsorbancija pri 630, 670 i 710 nm

L=debljina kivete (mm)

### 3.2.7 Fotometrijski indeks boje

Fotometrijski indeks boje (FIB) određen je mjeranjem apsorbancije ulja na valnim duljinama 460, 550, 620 i 670 nm (AOCS Method Cc 13c-50, 1998). FIB je izračunat prema formuli [9].

$$FIB = 1,29 \cdot A_{460} + 69,7 \cdot A_{550} + 41,2 \cdot A_{620} - 56,4 \cdot A_{670} \quad [9]$$

gdje je

A očitana apsorbancija ulja pri naznačenoj valnoj duljini.

### **3.3 STATISTIČKA OBRADA**

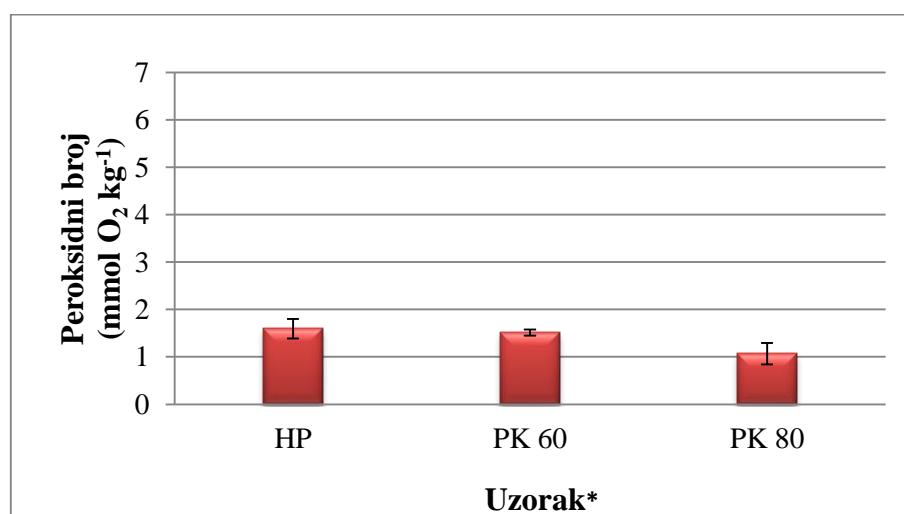
Provedena je statistička analiza varijance kako bi se utvrdio utjecaj načina proizvodnje na određivane parametre. (ANOVA) (Microsoft Inc. 2007).

## 4 REZULTATI I RASPRAVA

U ovom radu provedene su analize na ulju konoplje proizvedenom hladnim prešanjem i prešanjem uz kondicioniranje iz sjemena uzgojenog 2012. na području Republike Hrvatske. Cilj ovog rada bio je utvrditi utjecaj parametara proizvodnje na sastav masnih kiselina, udjel i sastav tokoferola, udjel pigmenata te na oksidacijsku stabilnost ulja konoplje.

Postoji vrlo malo literaturnih podataka s tom tematikom, a i kod postojećih dolazi do znatnih odstupanja u rezultatima, prije svega zbog ovisnosti sastava bioaktivnih komponenti o uvjetima uzgoja – klimi, temperaturama, sastavu tla, primjeni pesticida i sorti (Kriese i sur., 2004; Herchi i sur., 2011).

Uzorak HP proizведен je hladnim prešanjem. Hladno prešana ulja su proizvodi koji se dobivaju iz odgovarajućih sirovina, prešanjem na temperaturi do 50 °C. Može se provesti i postupak čišćenja odnosno bistrenja pranjem vodom, dekantiranjem, filtriranjem i centrifugiranjem (Pravilnik 2012b). Kod proizvodnje uzorka PK60 i PK80 temperatura je prelazila 50°C, pa se ti uzorci ne mogu svrstati u kategoriju hladno prešana već u nerafinirana jestiva ulja. Kod ovih uzorka samljeveno sjeme kondicionirano je prije prešanja na temperaturama 60 i 80°C u trajanju od 30 minuta. Prema Pravilniku (2012b) nerafinirana ulja su proizvodi koji se dobivaju iz odgovarajućih sirovina, mehaničkim postupcima, primjerice prešanjem, uz upotrebu topline. Može se provesti i postupak čišćenja odnosno bistrenja pranjem vodom, dekantiranjem, filtriranjem i centrifugiranjem.



Slika 7. Peroxisidni broj u uzorcima ulja konoplje

\*opis uzorka prikazan je u Tablici 3.

Peroksidni broj (PB) označava stupanj oksidacijskog kvarenja ulja/masti i u direktnoj je korelaciji s oksidacijskom stabilnošću ulja/masti, koja ovisi o sastavu ulja i to prvenstveno o sastavu masnih kiselina te sastavu i udjelu bioaktivnih komponenti. Brojni su faktori koji utječu na stabilnost ulja, a najznačajniji su način proizvodnje te način skladištenja ulja/masti. Prema Pravilniku (2012b) definiran je PB za nerafinirana ulja te njegova maksimalna granična vrijednost iznosi  $7 \text{ mmol O}_2\text{kg}^{-1}$ . Na Slici 7. vidi se da su sva ispitivana ulja imala PB daleko niži od maksimalne dozvoljene vrijednosti, što znači da su uvjeti proizvodnje ulja bili blagi i da nisu narušili antioksidacijsko djelovanje bioaktivnih komponenti koje su očuvale prvenstveno višestruko nezasićene masne kiseline od oksidacijskog kvarenja.

Tablica 4. Sastav masnih kiselina u uzorcima ulja konoplje

Uzorak*	Masna kiselina (% od ukupnih)											
	C14:0	C16:0 <sup>f</sup>	C16:1	C17:0	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3n6	C18:3n3	C20:0	C20:1	n.i.**
HP	0,1±0,0	6,4±0,0	tr***	0,1±0,0	2,9±0,0	17,2±0,1	54,1±0,1	2,2±0,0	14,3±0,2	0,9±0,0	0,4±0,1	1,4±0,2
PK 60	0,1±0,0	6,2±0,0	tr	0,1±0,0	3,0±0,1	17,0±0,1	54,2±0,1	2,3±0,0	14,1±0,1	1,0±0,0	0,5±0,0	1,5±0,2
PK 80	0,1±0,0	6,1±0,1	tr	0,1±0,0	3,1±0,1	17,1±0,0	54,3±0,0	2,4±0,1	14,0±0,1	1,0±0,1	0,5±0,0	1,5±0,1

\*opis uzorka nalazi se u Tablici 3.; \*\*n.i. - neidentificirane masne kiseline; \*\*\*tr - tragovi (<0,05); <sup>f</sup>način proizvodnje ima značajan utjecaj (p<0,05)

Sastav masnih kiselina ulja konoplje je specifičan jer sadrži masne kiseline koje se rijetko nalaze u ostalim biljnim uljima, a brojna klinička ispitivanja pokazala su da imaju izuzetno povoljan učinak na ljudsko zdravlje.  $\alpha$ -linolenska masna kiselina (18:3) i stearidonska masna kiselina (18:4) ubrajaju se u skupinu  $\omega$ -3 masnih kiselina koje odlikuje protuupalna aktivnost i značajna uloga u prevenciji kroničnih bolesti.  $\gamma$ -linolenska masna kiselina također je značajna za zdravlje jer djeluje kao prekursor prostaglandina te pomaže u reguliranju metaboličkih funkcija. Iako se ne ubraja u esencijalne masne kiseline, organizam  $\gamma$ -linolensku masnu kiselinu često zbog nedostatne učinkovitosti enzima delta-6-desaturaze ne može sintetizirati konverzijom iz linolenske kiseline, pa ju je potrebno unositi hranom. Zbog toga su ulja koja sadrže ovu masnu kiselinu od izuzetne nutritivne vrijednosti (Callaway i Pate, 2009., Simopolous, 2008.).

U Tablici 4. nalazi se sastav masnih kiselina u ispitivanim uzorcima ulja konoplje. Dominantna je linolna masna kiselina (54%), a slijede je oleinska (17%) i  $\alpha$ -linolenska (14%).  $\gamma$ -linolenska je zastupljena s oko 2,3%, dok stearidonska masna kiselina u ovom radu nije identificirana. Omjer  $\omega$ -6: $\omega$ -3 masnih kiselina iznosi 4:1 i predstavlja optimalan omjer višestruko nezasićenih masnih kiselina, što je jedan od zahtjeva uravnovežene prehrane. Parametri proizvodnje ulja imali su statistički značajan utjecaj na udjel palmitinske masne kiseline ( $p<0,05$ ).

Iako ovakav sastav masnih kiselina čini ulje konoplje nutritivno visoko vrijednim, može predstavljati i potencijalnu opasnost za potrošača. Ulja bogata višestruko nezasićenim masnim kiselinama vrlo su nestabilna jer su podložna oksidacijskom kvarenju u mnogo većoj mjeri u odnosu na ulja koja imaju manji udjel tih masnih kiselina. Iako se u literaturi navodi da zbog svojih bioaktivnih komponenti sa snažnim antioksidacijskim djelovanjem ulje konoplje nije toliko nestabilno kao npr. laneno, ipak valja osobitu pažnju usmjeriti na skladištenje. Ulje konoplje čuva se u bocama od tamnog stakla manjeg volumena, a potrošaču je potrebno naznačiti da se ovo ulje koristi samo kao salatno, nikako nije predviđeno za zagrijavanje i za kuhanje.

Tablica 5. Sastav i udjel tokoferola proizvedenih ulja konoplje

Uzorak*	Tokoferol (mg kg <sup>-1</sup> )					
	$\alpha$ -	$\beta$ - <sup>f</sup>	$\gamma$ - <sup>f</sup>	$\delta$ -	PC-8	ukupno <sup>f</sup>
HP	135±0	40±0	532±16	25±3	tr**	732±16
PK 60	134±11	40±2	474±0	24±3	tr	673±16
PK 80	144±10	36±0	729±0	30±0	2±1	941±12

\*opis uzorka nalazi se u Tablici 3.; \*\*tr - tragovi (<0,05); <sup>f</sup>način proizvodnje ima značajan utjecaj (p<0,05)

Najznačajniji antioksidansi biljnih ulja svakako su tokoferoli. Poznata su četiri derivata tokoferola od kojih  $\alpha$ -tokoferol ima najznačajnije biološko, a  $\gamma$ -tokoferol najznačajnije antioksidacijsko djelovanje u hrani (Przybylski i sur., 2005). Smatra se da tokoferol djeluje preventivno na rak debelog crijeva jer se ne apsorbira u krv nego se putem žući izlučuje u probavni trakt gdje djeluje kao antioksidans (Saldeen i Saldeen, 2005).

Iz Tablice 5. vidljivo je da u svim ispitivanim uzorcima ulja konoplje dominantan tokoferol  $\gamma$ -tokoferol, a slijedi ga  $\alpha$ -tokoferol, zatim  $\beta$ - i  $\delta$ -tokoferol što je u skladu s istraživanjem kojeg su proveli Oomah i sur. (2002) osim malih odstupanja u udjelima  $\delta$ - i  $\beta$ -tokoferola. Osim navedenih derivata tokoferola, u jednom ulju konoplje (PK 80) identificiran je i PC-8. PC-8 je prirodno prisutan homolog  $\gamma$ -tokotrienola koji nastaje iz reduciranog plastokinona djelovanjem enzima tokoferol ciklaze tijekom biosinteze tokoferola. Smatra se da je njegova funkcija u sjemenkama i lišću slična onoj tokoferola, tj. posjeduje antioksidacijska svojstva, međutim značajniji literurni podatci koji bi potkrijepili tu tvrdnju nisu dostupni (Szymańska i Kruk, 2008; Gruszka i Kruk, 2007).

Rezultati u Tablici 5. pokazuju da je najveći udjel ukupnih tokoferola, te  $\alpha$ -,  $\gamma$ - i  $\delta$ -tokoferola imalo ulje koje je proizvedeno iz prethodno samljevenog sjemena koje je bilo kondicionirano pri 80 °C. Uvjeti proizvodnje pokazali su značajan utjecaj na udjel ukupnih te  $\gamma$ - i  $\beta$ -tokoferola. Povećanje udjela tokoferola Vaidya i Choe (2011) pripisali su oštećenju stanične membrane pri povišenim temperaturama, a time i olakšanoj ekstrakciji tokoferola u ulje. To ulje imalo je i najbolju oksidacijsku stabilnost (Slika 7.). Tijekom rafinacije ulja dolazi do značajnih gubitaka ovih visokovrijednih sastojaka pa se ulje konoplje najčešće konzumira nerafinirano. Upravo zbog toga, sjeme mora biti visoke kvalitete.

Tablica 6. Udjel pigmenata i fotometrijski indeks boje (FIB) proizvedenih ulja konoplje

Uzorak*	Kartotenoidi <sup>f</sup> (mg β-karotena kg <sup>-1</sup> )	Klorofili <sup>f</sup> (mg feofitina a kg <sup>-1</sup> )	FIB <sup>f</sup>
HP	277,00±0,99	9,48±0,11	-6,9±0,1
PK 60	231,14±0,34	9,55±0,11	-7,9±0,1
PK 80	188,44±0,64	10,21±0,13	-9,7±0,1

\*opis uzorka nalazi se u Tablici 3.;<sup>f</sup> način proizvodnje ima značajan utjecaj (p<0,05)

Karotenoidi i klorofili su pigmenti biljnih ulja. Imaju značajan utjecaj na oksidaciju, odnosno, fotooksidaciju. Iz Tablice 6. vidi se da uvjeti proizvodnje imaju značajan utjecaj na udjel pigmenata, a posljedično i na boju ulja konoplje. Povećanjem temperature smanjio se udjel karotenoida, čime je potvrđena njihova termolabilnost. S druge strane, povećanje temperature pokazalo je povećanje udjela klorofila (kao i fotometrijskog indeksa boje), što ne mora nužno biti rezultat povećanja udjela tih pigmenata, nego se može objasniti činjenicom da se pri povišenim temperaturama formiraju brojni produkti Maillard-ovih reakcija koji apsorbiraju svjetlo u istoj valnom području kao i klorofili. Ova istraživanja bi svakako trebalo nastaviti i proširiti određivanjem sastava i udjela pigmenata nekom osjetljivijom analitičkom metodom (npr. HPLC).

## **5 ZAKLJUČCI**

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

1. Svi ispitivani uzorci ulja konoplje sadrže visoko vrijedne masne kiseline,  $\gamma$ -linolensku, oleinsku te dvije esencijalne – linolnu i  $\alpha$ -linolensku. Omjer  $\omega$ -6: $\omega$ -3 masnih kiselina iznosi 4:1 i predstavlja optimalan omjer višestruko nezasićenih masnih kiselina koji se preporuča kao jedna od stavki uravnotežene prehrane. Uvjeti proizvodnje imali su značajan utjecaj samo na udjel palmitinske masne kiseline.
2. Najveći udjel ukupnih, te  $\alpha$ -,  $\gamma$ - i  $\delta$ -tokoferola imalo je ulje proizvedeno iz prethodno samljevenog i kondicioniranog sjemena konoplje pri 80 °C.
3. Povišenje temperature kondicioniranja rezultira smanjenjem udjela karotenoida i smanjenjem fotometrijskog indeksa boje.
4. Odabrani uvjeti proizvodnje ulja bili su blagi i nisu narušili antioksidacijsko djelovanje bioaktivnih komponenti koje su očuvale prvenstveno višestruko nezasićene masne kiseline od oksidacijskog kvarenja.
5. Rezultati ovog rada mogli bi otvoriti novo poglavlje u poimanju nutritivne vrijednosti hladno prešanih u odnosu na nerafinirana biljna ulja. Ulje proizvedeno iz sjemena prethodno kondicioniranog pri povišenoj temperaturi imalo je najbolju oksidacijsku stabilnost i najveći udjel tokoferola, dok se sastav masnih kiselina nije uopće promijenio u odnosu na ulje proizvedeno hladnim prešanjem.

## ZAHVALA

Veliko hvala našoj mentorici, dr.sc. Dubravki Škevin, koja je unatoč mnogobrojnim obavezama kao Prodekan za nastavu na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu, pristala na sudjelovanje u izradi ovog rada i njegovo prijavljivanje za Rektorovu nagradu. Takoder hvala asistentu dipl.ing. Marku Obračanoviću na velikoj pomoći u realizaciji ovog rada te hvala asistentici dipl.ing. Klari Kraljić koja nam je bila na raspolaganju uvijek kad je trebalo.

Posebno hvala profesoru dr.sc. Jerzy Kruk s Department of Plant Physiology and Biochemistry, Faculty of Biotechnology, Jagiellonian University u Krakowu, Poljska, čijom smo velikom ljubaznošću dobili standard plastokomanola-8 za HPLC analizu.

## 6 LITERATURA

- Anonymous (2013a) <<http://www.wellandgoodnyc.com/2011/08/03/hemp-seeds-why-healthy-celebs-and-mds-want-you-to-love-them/>>, Pristupljeno 12. ožujka 2013.
- Anonymous (2013b) <<http://ecofibre.com.au/hemp-seed-oil/>>, Pristupljeno 12. ožujka 2013.
- Anonymous (2013c) <[http://www.supplementquality.com/news/fatty\\_acid\\_structure.html](http://www.supplementquality.com/news/fatty_acid_structure.html)>, Pristupljeno 30.travnja 2013.
- AOCS Method Cc 13c-50 (1998) Official methods recommended practices of the American Oil Chemists' Society, 6 izd. (Firestone, D., ured.) AOCS Press, Champaign.
- BS 684-2.20:1977, BSI-British Standard Illustrations Methods of analysis of fat and oils. Other methods. Determination of carotene in vegetable oils.
- Callaway, J. C., Pate, D. W. (2009) Hempseed oil. U: *Gourmet and Health-Promoting Specialty Oils* (Moreau, R. A., Kamal-Eldin, A., ured.), American Oil Chemists Society Press, Kuopio, str. 185-213, <<http://www.finola.com/Hempseed%20oil%20chapter%20April%202010.pdf>>. Pristupljeno 11. ožujka 2013.
- Cert, A., Moreda, W., Perez-Camino, M. C. (2000) Chromatographic analysis of minor constituents in vegetable oils. *J. Chromatogr. A.* **881**, 131-148.
- Chen, T., He, J., Zhang, J., Li, X., Zhang, H., Hao, J., Li, L. (2012) The isolation and identification of two compounds with predominant radical scavenging activity in hempseed (seed of *Cannabis sativa L.*). *Food Chem.* **134**, 1030-1037.
- Da Porto, C., Decorti, D., Tubaro, F. (2012) Fatty acid composition and oxidation stability of hemp (*Cannabis sativa L.*) seed oil extracted by supercritical carbon dioxide. *Ind. Crop. Prod.* **36**, 401–404.

- FAOSTAT Top production- Hempseed – 2011<<http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor>> Pristupljeno 21. travnja 2013.
- Gruszka, J., Kruk, J. (2007) RP-LC for Determination of Plastochromanol, Tocotrienols and Tocopherols in Plant Oils. *Chromatografia***66**, 909-913.
- Gruszka, J., Pawlak, A., Kruk, J. (2008) Tocochromanols, plastoquinol, and other biological prenyllipids as singlet oxygen quenchers-determination of singlet oxygen quenching rate constants and oxidation products. *Free Radical Bio. Med.***45**, 920-928.
- Herchi, W., Sakouhi, F., Boukhchina, S., Kallel, H., Pepe, C. (2011) Changes in Fatty Acids, Tocochromanols, Carotenoids and Chlorophylls Content During Flaxseed Development. *J. Am. Oil Chem. Soc.***88**, 1011–1017.
- HRN EN ISO 3960:2010, Životinjske i biljne masti i ulja - Određivanje peroksidnog broja - Jodometrijsko određivanje točke završetka.
- HRN EN ISO 9936:2007, Životinjske i biljne masti i ulja - Određivanje količine tokoferola i tokotrienola tekućinskom kromatografijom visokog učinka.
- IBG Monforts & Reiners (1972) Prospekt preše „Komet“.
- ISO 5508:1990, Animal and vegetable fats and oils - Analysis by gas chromatography of methyl esters of fatty acids.
- ISO 5509:2000, Animal and vegetable fats and oils- Preparation of methyl esters of fatty acids.
- Kamal-Eldin, A., Appelqvist, L. - Å. (1996) The Chemistry and Antioxidant Properties of Tocopherols and Tocotrienols. *Lipids* **31**, 671-701.
- Kamal-Eldin, A. (2005) Minor Components of Fats and Oils. U: Bailey's Industrial Oil and Fat Products, (Shahidi, F., ured.), 6. izd., John Wiley & Sons, Inc., New York, str. 319-359.

- Kamal-Eldin, A. (2006) Effect of fatty acids and tocopherols on the oxidative stability of vegetable oils. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.***58**, 1051-1061.
- Kriese, U., Schumann E., Weber, W. E., Beyer, M., Brühl, L., Matthäus, B. (2004) Oil content, tocopherol composition and fatty acid patterns of the seeds of 51 *Cannabis sativa* L. genotypes. *Euphytica* **137**, 339–351.
- Lampi, A. M., Kamal-Eldin, A., Piironen, V. (2002) Tocopherols and Tocotrienols from Oil and Cereal Grains. U: Functional foods, Biochemical and Processing Aspects, [online], (Shi, J., Mazza, G., Le Maguer, M., ured.), CRC PRESS, Boca Raton/ London/ New York/ Washington, str. 1-38, < [http://uqu.edu.sa/files2/tiny\\_mce/plugins/filemanager/files/4300301/Functional\\_Foods\\_-Processing\\_&\\_Biochemicals\\_Aspects.pdf](http://uqu.edu.sa/files2/tiny_mce/plugins/filemanager/files/4300301/Functional_Foods_-Processing_&_Biochemicals_Aspects.pdf)>. Pristupljeno 5. ožujka 2013.
- Leizer, C., Ribnicky, D., Poulev, A., Dushenkov, S., Raskin, I. (2000) The Composition of Hemp Seed Oil and Its Potential as an Important Source of Nutrition. *J. Nutra.Funct. Med. Foods* **4**, 35-53.
- Matthäus, B., Brühl, L. (2008), Virgin hemp seed oil: An interesting niche product. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **110**, 655–661.
- Matthäus, B., Özcan, M. M. (2009) Fatty acids and tocopherol contents of some *Prunus* spp. Kernel oils. *J. Food Lipids.* **16**, 187-199.
- Microsoft Inc. (2007) Microsoft Excel, verzija 2007 <<http://www.microsoft.com/>>. Pristupljeno 15. travnja 2013.
- Oomah, B. D., Busson, M., Godfrey, D. V., Drover, J. C. G. (2002) Characteristics of hemp (*Cannabis sativa L.*) seed oil. *Food Chem.* **76**, 33-43.

- Panfili, G., Fratianni, A., Irano, M. (2003) Normal Phase High-Performance Liquid Chromatography Method for the Determination of Tocopherols and Tocotrienols in Cereals. *J. Agric. Food Chem.***51**, 3940-3944.
- Pokorný, J., Kalinová, L., Dysseler, P. (1995) Determination of chlorophyll pigments in crude vegetable oils. *Pure Appl. Chem.* **67**, 1781-1787.
- Pravilnik o uvjetima za uzgoj konoplje, načinu prijave uzgoja maka te uvjetima za posjedovanje opojnih droga u veterinarstvu (2012a) *Narodne novine***18**, Zagreb.
- Pravilnik o jestivim uljima i mastima (2012b) *Narodne novine***41**, Zagreb.
- Przybylski, R., Mag, T., Eskin, N.A.M., McDonald, B.E. (2005) Canola Oil. U: Bailey's Industrial Oil and Fat Products, Vol 2., Edible Oil and Fat Products: Edible Oils, (Shahidi, F., ured.), 6. izd., Wiley, Hoboken, str. 1-61.
- Saldeen, K., Saldeen, T. (2005) Importance of tocopherols beyond  $\alpha$ -tocopherol: evidence from animal and human studies. *Nutr. Res.* **25**, 877-889.
- Sacilik, K., Ōztürk, R., Keskin, R. (2003) Some Physical Properties of Hemp Seed. *Biosyst. Eng.* **86**, 191–198.
- Schwartz, H., Ollilainen, V., Piironen, V., Lampi, A. M. (2008) Tocopherol, tocotrienol and plant sterol contents of vegetable oils and industrial fats. *J. Food Compos. Anal.* **21**, 152-161.
- Sen, C. K., Khanna, S., Roy, S. (2006) Tocotrienols: Vitamin E beyond tocopherols. *Life Sci.* **78**, 2088-2098.
- Simopoulos, A. P. (2008) The Importance of the Omega-6/Omega-3 Fatty Acid Ratio in Cardiovascular Disease and Other Chronic Diseases [online]. <<http://ebm.rsmjournals.com/content/233/6/674.full.pdf>>. Pristupljeno 12. ožujka 2013.

- Szymanska, R., Kruk, J. (2008) Plastochromanol, a‘New’ Lipophilic Antioxidant Is Synthesized by Tocopherol Cyclase in *Arabidopsis* Leaves: The Effect of High-Light Stress on the Level of Prenyllipid Antioxidants. Photosynthesis. Energy from the Sun: 14th International Congress on Photosynthesis. (Allen, J.F., Gantt, E:, Golbeck, J.H., Osmond, B., ured.), Springer, str. 1581-1584.
- Teh, S. S., Birch, J. (2013) Physicochemical and quality characteristics of cold-pressed hemp, flax and canola seed oils. *J. Food Compos. Anal.* **30**, 26-31.
- Uluata, S., Özdemir, N. (2012) Antioxidant Activities and Oxidative Stabilities of Some Unconventional Oilseeds. *J. Am. Oil. Chem. Soc.* **89**, 551-559.
- Vaidya, B., Choe, E. (2011) Effects of seed roasting on tocopherols, carotenoids and oxidation in mustard seed oil during heating. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **88**, 83-90.
- Vorkapić-Furač, J. (2012) Vitamini topljivi u mastima [online].  
[http://pbf.unizg.hr/hr/zavodi/zavod\\_za\\_bioteknologiju\\_i\\_primenju\\_stanica\\_i\\_biotransformacije/tehnologija\\_vitamina\\_i\\_hormona](http://pbf.unizg.hr/hr/zavodi/zavod_za_bioteknologiju_i_primenju_stanica_i_biotransformacije/tehnologija_vitamina_i_hormona).  
Pristupljeno 11. ožujka 2013.
- Wilkerson, S. (2008) Hemp, the world's miracle crop [online].  
[http://www.nexusmagazine.com/index.php?page=shop.product\\_details&flypage=shop.flypage&product\\_id=1768&category\\_id=193&option=com\\_virtuemart&Itemid=44](http://www.nexusmagazine.com/index.php?page=shop.product_details&flypage=shop.flypage&product_id=1768&category_id=193&option=com_virtuemart&Itemid=44).  
Pristupljeno 11. ožujka 2013.
- Witulska-Gawrysiak, M., Siger, A., Nogala-Kalucka, M. (2009) Degradation of tocopherols during near-ambient rapeseed drying. *J. Food Lipids.* **16**, 524–539.

## **Utjecaj parametara proizvodnje na kemijski sastav nerafiniranih ulja konoplje**

*Jelena Brckan*

*Mihaela Katić*

### **SAŽETAK**

Cilj ovog rada bio je odrediti utjecaj parametara proizvodnje ulja na sastav masnih kiselina, udjel i sastav tokoferola, pigmenata kao i na oksidacijsku stabilnost nerafiniranih ulja konoplje. U radu su provedena ispitivanja na uzorcima ulja konoplje proizvedenih laboratorijskim postupkom na dva različita načina. U proizvedenim uzorcima ulja određena je oksidacijska stabilnost, tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (HPLC) određen je udio tokoferola i PC-8, dok je sastav masnih kiselina određen plinskom kromatografijom (GC). Analize su pokazale da primjenjeni postupci proizvodnje ne narušavaju oksidacijsku stabilnost proizvedenih uzoraka ulja, a nerafinirana ulja imaju veći udjel visokovrijednih bioaktivnih komponenti u odnosu na hladno prešana ulja.

**Ključne riječi:** ulje konoplje, sastav masnih kiselina, tokoferoli, oksidacijska stabilnost

# **Influence of production parameters on the chemical composition of unrefined hempseed oil**

*Jelena Brckan*

*Mihaela Katić*

## **SUMMARY**

The aim of this paper was to determine the influence of oil production parameters on fatty acid composition, content and composition of tocopherols, pigments, as on the oxidative stability of unrefined hempseed oil. Hempseed oil samples, analyzed in this study, were produced by laboratory pressing using two different procedures. In produced oil samples we determined oxidative stability, content and composition of tocopherols using high performance liquid chromatography (HPLC), and composition of fatty acids by gas chromatography (GC). Results showed that the applied production parameters did not decrease oxidative stability, and produced unrefined hempseed oils have higher amounts of high-value bioactive components in relation to cold-pressed oils.

**Keywords:** hempseed oil, fatty acid composition, tocopherol, oxidative stability

## ZAHVALA

Veliko hvala našoj mentorici, dr.sc. Dubravki Škevin, koja je unatoč mnogobrojnim obavezama kao Prodekan za nastavu na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu, pristala na sudjelovanje u izradi ovog rada i njegovo prijavljivanje za Rektorovu nagradu. Takoder hvala asistentu dipl.ing. Marku Obračanoviću na velikoj pomoći u realizaciji ovog rada te hvala asistentici dipl.ing. Klari Kraljić koja nam je bila na raspolaganju uvijek kad je trebalo.

Posebno hvala profesoru dr.sc. Jerzy Kruk s Department of Plant Physiology and Biochemistry, Faculty of Biotechnology, Jagiellonian University u Krakowu, Poljska, čijom smo velikom ljubaznošću dobili standard plastokomanola-8 za HPLC analizu.

## **ŽIVOTOPISI**

### **Jelena Brckan**

Rođena sam 25.veljače 1989.godine. u Koprivnici. Osnovnu školu pohađala sam u Koprivnici.

Godine 2004. upisujem opću gimnaziju Fran Galović u Koprivnici.

Nakon završene gimnazije 2008. godine upisujem preddiplomski studij na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu u Zagrebu, smjer Prehrambena tehnologija gdje sam aktivni član Fakultetskog vijeća te sudjelujem u brojnim aktivnostima fakulteta. Nakon završenog preddiplomskog studija u zadanom roku s prosjekom 4,13 te položenih 183 ECTS bodova stječem zvanje sveučilišna prvostupnica inženjerka prehrambene tehnologije.

Godine 2011. upisujem diplomski studij Prehrambeno inženjerstvo na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu u Zagrebu. Trenutno sam studentica druge godine navedenog diplomskog studija sa položenih 66 ECTS bodova i prosjekom ocjena 4,71.

### **Mihaela Katić**

Rođena sam 11. srpnja 1989. godine u Bjelovaru. Osnovnu školu pohađala sam u Čazmi.

Godine 2004. upisujem se u opću gimnaziju u Srednja škola Čazma.

Godine 2008. upisujem Prehrambeno-biotehnološki fakultet u Zagrebu, smjer Prehrambena tehnologija. Prve tri godine završila sam u zadanom roku i stekla zvanje sveučilišna prvostupnica inženjerka prehrambene tehnologije. Ispite sam položila s prosjekom 4.34 uz osvojenih 183 ECTS bodova.

Dana 26. travnja, 2011. godine dobila sam Povelju dekana za ostvarene rezultate u svojoj generaciji na drugoj godini preddiplomskog studija Prehrambene tehnologije u akademskoj godini 2009./2010.

Godine 2011. upisujem diplomski studij Prehrambeno inženjerstvo na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu u Zagrebu. Trenutno sam studentica druge godine diplomskog studija Prehrambeno inženjerstvo sa stečena 66 ECTS te prosjekom ocjena 4.79.