

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Mitja MOČNIK

**DOLOČANJE VSEBNOSTI L-ASKORBINSKE KISLINE IN  
NITRATA V ZELJU CV. DELPHI IN CV. HINOVA**

DIPLOMSKO DELO  
Univerzitetni študij

**DETERMINATION OF L-ASCORBIC ACID AND NITRATE IN  
CABBAGE CV. DELPHI AND CV. HINOVA**

GRADUATION THESIS  
University studies

Ljubljana, 2009

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija živilske tehnologije. Opravljeno je bilo na Katedri za tehnologije, prehrano in vino, Oddelka za živilstvo na Biotehniški fakulteti, Univerze v Ljubljani. Analize vsebnosti nitrata so bile opravljene v laboratoriju Katedre za mikrobiologijo na Biotehniški fakulteti, Oddelka za živilstvo. Sorte zelja so bile sajene na poskusnem polju Biotehniške fakultete, Oddelka za agronomijo, Univerze v Ljubljani.

Študijska komisija Oddelka za živilstvo je za mentorja diplomskega dela imenovala prof. dr. Marjana Simčiča, za somentorja dr. Tomaža Polaka in za recenzenta prof. dr. Rajka Vidriha.

Mentor: prof. dr. Marjan Simčič

Somentor: dr. Tomaž Polak

Recenzent: prof. dr. Rajko Vidrih

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:

Član: prof. dr. Marjan Simčič

Član: dr. Tomaž Polak

Član: prof. dr. Rajko Vidrih

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela. Podpisani Mitja Močnik se strinjam z objavo svoje naloge v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddal v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

Mitja Močnik

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dn

DK UDK 664.8.037:635.34:577.164.2 + 546.17 (043) = 163.6

KG skladiščenje zelenjave/zelje/cv. Delphi/cv. Hinova/vitamini/vitamin C/nitrati/

AV MOČNIK, Mitja

SA SIMČIČ, Marjan (mentor)/POLAK, Tomaž (somentor)/VIDRIH, Rajko  
(recenzent)

KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101

ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

LI 2009

IN DOLOČANJE VSEBNOSTI L-ASKORBINSKE KISLINE IN NITRATA V ZELJU  
CV. DELPHI IN CV. HINOVA

TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)

OP XI, 57 str., 7 pregl., 19 sl., 83 vir.

IJ sl

JI sl/en

AI Namen našega diplomskega dela je bil določiti vsebnost nitrata in L-askorbinske kisline (L-AK) v različnih delih zelja (zgornji in spodnji del) cv. Delphi in cv. Hinova. Takoj po obiranju in štirimesečnem skladiščenju (pri 1 °C in 80 % relativni vlažnosti) smo analizirali vsebnost nitrata in L-AK v zelju ter izgubo mase zelja med skladiščenjem. Skušali smo poiskati tudi morebitno povezavo med vsebnostjo L-AK in nitrata v posameznih kultivarjih zelja. Analizo vsebnosti L-AK smo izvedli z metodo HPLC, medtem ko smo vsebnost nitrata določili spektrofotometrično. Raziskava je pokazala, da se v posameznih delih zelja (zgornji, spodnji del) kakor tudi v različnih kultivarjih vsebnosti L-AK in nitrata razlikujejo. V obeh kultivarjih zelja je bila vsebnost L-AK in nitrata na splošno višja v spodnjem delu. V zelju cv. Delphi se je med skladiščenjem povečala povprečna vsebnost L-AK in nitrata tako v zgornjem kakor tudi v spodnjem delu, medtem ko je pri zelju cv. Hinova ravno obratno. V zelju cv. Hinova se je med skladiščenjem zmanjšala povprečna vsebnost L-AK in nitrata. Povprečna izguba mase je po štirimesečnem skladiščenju pri zelju cv. Delphi znašala 34,5 %, pri zelju cv. Hinova pa 35,6 %. Našo hipotezo, da je vsebnost nitrata obratno sorazmerna z vsebnostjo L-AK v določenem kultivarju oz. določenem delu zelja, lahko ovržemo.

## KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn

DC UDC 664.8.037:635.34:577.164.2 + 546.17 (043) = 163.6

CX storage vegetables/cabbage/cv. Delphi/cv. Hinova/vitamins/vitamin C/nitrates/

AU MOČNIK, Mitja

AA SIMČIČ, Marjan (supervisor)/POLAK, Tomaž (co-advisor)/VIDRIH, Rajko (reviewer)

PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101

PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Food Science and Technology

PY 2009

TI DETERMINATION OF L-ASCORBIC ACID AND NITRATE IN CABBAGE CV. DELPHI AND CV. HINOVA

DT Graduation Thesis (University studies)

NO XI, 57 p., 7 tab., 19 fig., 83 ref.

LA sl

AL sl/en

AB The purpose of the thesis was to determine the concentration of nitrates and L-ascorbic acid (L-AK) in different parts of cabbage (inner and outer parts) cv. Delphi and cv. Hinova. The weight loss and concentration of nitrates and L-AK was analysed at harvest and after storage time of 4 months (at 1 °C and 80 % of relative humidity). The eventual connection between level of nitrates and L-AK in individual plants was tried to establish. The content of L-AK was carried out by means of HPLC, while nitrate content was determined spectrophotometrically. The research showed that L-AK and nitrate contents in individual parts of cabbage (inner and outer parts) as well as in different cultivars differed. In both cultivars, L-AK and nitrate contents were generally higher in inner parts. The average L-AK and nitrate contents in cv. Delphi during storage period fairly increased in inner as well as in outer parts, while in cv. Hinova it is just the opposite. In cv. Hinova average L-AK and average nitrate content during storage period fairly decreased. In cv. Delphi cabbage average weight loss after four month long storage was 34,5 %, while at cv. Hinova there was a 35,6 % weight loss. Our hypothesis that there is an inverse proportionality relation between nitrate contents and L-AK contents in specific cultivar or certain part of cabbage, can be disproved.

## KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOKUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VIII
KAZALO SLIK	IX
KAZALO PRILOG	X
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XI

## KAZALO VSEBINE

<b>1 UVOD</b> .....	<b>1</b>
1.1 NAMEN DIPLOMSKE NALOGE.....	1
1.2 DELOVNE HIPOTEZE.....	1
<b>2 PREGLED OBJAV</b> .....	<b>2</b>
2.1 ZELJE.....	2
<b>2.1.1 Izvor in razširjenost</b> .....	<b>2</b>
<b>2.1.2 Prehranska vrednost in kemijska sestava zelja</b> .....	<b>2</b>
<b>2.1.3 Sorte zelja</b> .....	<b>3</b>
2.1.3.1 Kultivar zelja Delphi F1.....	4
2.1.3.2 Kultivar zelja Hinova F1.....	4
<b>2.1.4 Pridelovanje zelja</b> .....	<b>4</b>
<b>2.1.5 Skladiščenje zelja</b> .....	<b>4</b>
<b>2.1.6 Pomen zelja v prehrani</b> .....	<b>5</b>
2.2 VITAMIN C.....	5
<b>2.2.1 Nomenklatura</b> .....	<b>5</b>
<b>2.2.2 Struktura L-askorbinske kisline</b> .....	<b>5</b>
<b>2.2.3 Struktura dehidro-L-askorbinske kisline</b> .....	<b>6</b>
<b>2.2.4 Fizikalne lastnosti L-askorbinske kisline in dehidro-L-askorbinske kisline</b> .....	<b>7</b>
<b>2.2.5 Biosinteza L-askorbinske kisline</b> .....	<b>7</b>
<b>2.2.6 Razgradnja L-askorbinske kisline</b> .....	<b>10</b>
2.2.6.1 Oksidativna razgradnja L-askorbinske kisline.....	10
2.2.6.2 Razgradnja L-askorbinske kisline v vodni raztopini.....	10
2.2.6.3 Oksidacija L-askorbinske kisline v prisotnosti nitrata.....	11
<b>2.2.7 Fiziološki pomen L-askorbinske kisline</b> .....	<b>12</b>
2.2.7.1 Vloga L-askorbinske kisline v rastlinah.....	12
2.2.7.2 Vloga L-askorbinske kisline v organizmu.....	12
<b>2.2.8 Vitamin C v živilih</b> .....	<b>15</b>
2.2.8.1 Viri in vsebnost vitamina C v živilih.....	15
2.2.8.2 Izgube vitamina C v živilih.....	17
2.2.8.3 Antioksidativna vloga L-askorbinske kisline v živilih.....	18
<b>2.2.9 Analiza vitamina C</b> .....	<b>19</b>
2.2.9.1 Odvzem vzorca, začetna priprava vzorca in ekstrakcija.....	19

2.2.9.2 Metode določanja vitamina C .....	19
2.3 NITRATI.....	20
<b>2.3.1 Nitrati v rastlinah.....</b>	<b>21</b>
2.3.1.1 Akumulacija nitrata v rastlinah.....	22
2.3.1.2 Asimilacija nitrata .....	23
<b>2.3.2 Kroženje dušika .....</b>	<b>23</b>
2.3.2.1 Gnojenje rastlin z gnojili .....	23
2.3.2.2 Mineralizacija dušika v tleh.....	24
<b>2.3.3 Zmanjšanje količine nitrata.....</b>	<b>25</b>
<b>2.3.4 N-nitrozo spojine.....</b>	<b>26</b>
2.3.4.1 N-nitrozo spojine v živilih.....	27
2.3.4.2 N-nitrozo spojine v organizmu .....	27
<b>2.3.5 Škodljivost in toksičnost nitrata, nitrita in N-nitrozo spojin .....</b>	<b>27</b>
<b>2.3.6 Metode določevanja nitrata in nitrita .....</b>	<b>28</b>
<b>3 MATERIAL IN METODE .....</b>	<b>29</b>
3.1 MATERIAL .....	29
<b>3.1.1 Priprava vzorcev .....</b>	<b>29</b>
<b>3.1.2 Priprava reagentov za HPLC analizo .....</b>	<b>30</b>
3.1.2.1 Priprava standarda .....	30
3.1.2.2 Priprava 2 % metafosforne kisline.....	31
3.1.2.3 Priprava fosfatnega puфра (pH 2,9).....	31
3.3 METODE DELA .....	31
<b>3.3.1 Določanje izgube mase med skladiščenjem zelja .....</b>	<b>31</b>
<b>3.3.2 Določanje vsebnosti nitrata v različnih delih zelja .....</b>	<b>31</b>
<b>3.3.3 HPLC metoda določanja L-askorbinske kisline .....</b>	<b>32</b>
3.3.3.1 Priprava vzorca.....	32
<b>4 REZULTATI.....</b>	<b>33</b>
4.1 IZGUBA MASE ZELJA MED SKLADIŠČENJEM.....	33
4.2 POVPREČNA VSEBNOST L-ASKORBINSKE KISLINE IN NITRATA V ZELJU CV. DELPHI IN CV. HINOVA V ODVISNOSTI OD ČASA SKLADIŠČENJA.....	35
<b>4.2.1 L-askorbinska kislina .....</b>	<b>35</b>
<b>4.2.2 Nitrat.....</b>	<b>36</b>
4.3 PRIMERJAVA POVPREČNIH VSEBNOSTI L-ASKORBINSKE KISLINE IN NITRATA V ZGORNJEM IN SPODNJEM DELU POSAMEZNIH KULTIVARJEV ZELJA V ODVISNOSTI OD ČASA SKLADIŠČENJA .....	36
<b>4.3.1 Cv. Delphi .....</b>	<b>37</b>
<b>4.3.2 Cv. Hinova .....</b>	<b>38</b>
4.4 PRIMERJAVA ZGORNJEGA IN SPODNJEGA DELA ZELJA CV. DELPHI IN CV. HINOVA GLEDE NA POVPREČNE VSEBNOSTI L-ASKORBINSKE KISLINE IN NITRATA V ODVISNOSTI OD ČASA SKLADIŠČENJA .....	39
<b>4.4.1 Vsebnost L-askorbinske kisline .....</b>	<b>39</b>

<b>4.4.2 Vsebnost nitrata .....</b>	<b>40</b>
<b>5 RAZPRAVA IN SKLEPI.....</b>	<b>41</b>
5.1 RAZPRAVA .....	41
<b>5.1.1 Izguba mase med skladiščenjem zelja cv. Delphi in cv. Hinova .....</b>	<b>41</b>
<b>5.1.2 Povprečna vsebnost L-askorbinske kisline in nitrata v zelju cv. Delphi in cv. Hinova glede na čas skladiščenja .....</b>	<b>41</b>
5.1.2.1 L-askorbinska kislina.....	41
5.1.2.2 Nitrat.....	43
<b>5.1.3 Primerjava povprečnih vsebnosti L-askorbinske kisline in nitrata v zgornjem in spodnjem delu posameznih kultivarjev zelja v odvisnosti od časa skladiščenja .....</b>	<b>44</b>
5.1.3.1 Cv. Delphi.....	44
5.1.3.2 Cv. Hinova.....	44
<b>5.1.4 Primerjava zgornjega in spodnjega dela zelja cv. Delphi in cv. Hinova glede na povprečne vsebnosti L-askorbinske kisline in nitrata v odvisnosti od časa skladiščenja</b>	<b>44</b>
5.1.4.1 Vsebnost L-askorbinske kisline.....	44
5.1.4.2 Vsebnost nitrata .....	45
<b>5.1.5 Povezava med nitratom in L-askorbinsko kislino v obeh kultivarjih zelja .....</b>	<b>46</b>
<b>5.1.6 Prehranski vidik rezultatov .....</b>	<b>46</b>
5.2 SKLEPI .....	47
<b>6 POVZETEK .....</b>	<b>48</b>
<b>7 VIRI.....</b>	<b>50</b>
<b>ZAHVALA</b>	

## KAZALO PREGLEDNIC

<b>Preglednica 1:</b> Nekatera za prehrano pomembna makrohranila v g/100 g belega, rdečega in kislega zelja (Černe, 1998).....	3
<b>Preglednica 2:</b> Fizikalne lastnosti L-askorbinske kisline in dehidro-L-askorbinske kisline (Bender, 1993; Golob, 1987).....	7
<b>Preglednica 3:</b> Vsebnost vitamina C nekaterega sadja in zelenjave (Lee in Kader, 2000)..	16
<b>Preglednica 4:</b> Povprečne vsebnosti nitrata in nitrita v sveži zelenjavi (Walker, 1990).....	21
<b>Preglednica 5:</b> Masa pred skladiščenjem, masa po skladiščenju in izguba mase za 6 glav zelja posameznega kultivarja (cv. Delphi in cv. Hinova) .....	33
<b>Preglednica 6:</b> Povprečna vsebnost L-AK in nitrata v zelju cv. Delphi in cv. Hinova v odvisnosti od časa skladiščenja .....	35
<b>Preglednica 7:</b> Primerjava povprečnih vsebnosti L-AK in nitrata v zgornjem in spodnjem delu zelja (cv. Delphi in cv. Hinova) v odvisnosti od časa skladiščenja.....	36



## KAZALO SLIK

<b>Slika 1:</b> Strukturne formule L-askorbinske kisline in njene stereoizomere (Seib, 1985) .....	6
<b>Slika 2:</b> Struktura dehidro-L-askorbinske kisline (Basu in Dickerson, 1996).....	6
<b>Slika 3:</b> Biosinteza L-askorbinske kisline v živalih (Naidu, 2003) .....	8
<b>Slika 4:</b> Biosinteza L-askorbinske kisline v rastlinah (Viola, 2002) .....	9
<b>Slika 5:</b> Oksidacija L-askorbinske kisline (Yuan in Chen, 1998).....	10
<b>Slika 6:</b> Mehanizem reakcije L-askorbinske kisline z NO <sup>·</sup> v kislem mediju (Myshkin in sod., 1996) .....	11
<b>Slika 7:</b> Faktorji, ki vplivajo na vsebnost nitrata v rastlini (Scharpf, 1991).....	22
<b>Slika 8:</b> Krog dušika v tleh (Gnojenje koruze z dušikom, fosforjem in kalijem, 2003) .....	25
<b>Slika 9:</b> N-nitrozamini in N-nitrozamidi (Hotchkiss in Cassens, 1987).....	26
<b>Slika 10:</b> Deli zelja (1A, 1B, 2A ,2B), ki smo jih vzeli za analizo vsebnosti L-AK in nitrat	29
<b>Slika 11:</b> Shema priprave vzorca za nadaljnje analize.....	30
<b>Slika 12:</b> Izguba mase (%) posamezne glave zelja cv. Delphi in cv. Hinova po skladiščenju 120 dni.....	34
<b>Slika 13:</b> Povprečna izguba mase zelja cv. Delphi in cv. Hinova po skladiščenju 120 dni..	34
<b>Slika 14:</b> Povprečna vsebnost L-AK v zelju cv. Delphi in cv. Hinova v odvisnosti od časa skladiščenja .....	35
<b>Slika 15:</b> Povprečna vsebnost nitrata v zelju cv. Delphi in cv. Hinova v odvisnosti od časa skladiščenja .....	36
<b>Slika 16:</b> Primerjava povprečnih vsebnosti L-AK in nitrata v zgornjem in spodnjem delu zelja cv. Delphi v odvisnosti od časa skladiščenja.....	37
<b>Slika 17:</b> Primerjava povprečnih vsebnosti L-AK in nitrata v zgornjem in spodnjem delu zelja cv. Hinova v odvisnosti od časa skladiščenja.....	38
<b>Slika 18:</b> Primerjava povprečnih vsebnosti L-AK v zgornjem in spodnjem delu zelja cv. Delphi in cv. Hinova v odvisnosti od časa skladiščenja.....	39
<b>Slika 19:</b> Primerjava povprečnih vsebnosti nitrata v zgornjem in spodnjem delu zelja cv. Delphi in cv. Hinova v odvisnosti od časa skladiščenja.....	40

## KAZALO PRILOG

**Priloga A:** Dve možni poti biosinteze L-askorbinske kisline v rastlinah (Smirnoff, 1996)...2

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

A, B	oznake za paralelki zunanjega oz. notranjega dela posamezne glave
AOAC	angl. Association of Analytical Communities
cv.	kultivar
DHAK	dehidro-L-askorbinska kislina
HPLC	tekočinska kromatografija visoke ločljivosti
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	fosforjeva kislina
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	kalijev hidrogen fosfat
L-AK	L-askorbinska kislina
M	molarnost
NH <sub>4</sub>	amonijev ion
NO <sub>x</sub>	dušikovi oksidi
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	nitratni ion
SD	standardna deviacija
1, 3, 5, 7, 9, 11	oznake za zunanji del posamezne glave zelja
2, 4, 6, 8, 10, 12	oznake za notranji del posamezne glave zelja

## 1 UVOD

Strategija za varovanje zdravja, ne samo srca in ožilja, temveč tudi pred rakom, boleznimi prebavil, zob, gibal in drugimi civilizacijskimi boleznimi, temelji na zdravem slogu življenja. Ta je odvisen od telesne aktivnosti, izogibanja stresu, izogibanja nevarnim, strupenim ter karcinogenim snovem, odsotnosti zdravju škodljivih razvad, npr. kajenja, pretiranega pitja alkoholnih pijač in še česa, in od pravilne prehrane, kjer imata sadje in zelenjava zelo pomembno vlogo (Turk, 1997).

Ustrezen vnos vitaminov v telo zagotavlja pogosto uživanje sadja in zelenjave. Ker so vitamini nestabilne snovi, ki se pod vplivom zunanjih dejavnikov (npr. toplote, svetlobe) izgubljajo, je pomembno, da sadje in zelenjavo uživamo tudi surovo in sveže (Koch, 1997). Še posebej nestabilen je vitamin C, ki se pod vplivom svetlobe, kisika in povišane T zelo hitro izgublja. Nahaja se predvsem v sadju in zelenjavi, največ pa v aceroli, citrusih, papriki, kiviju, jagodah, paradižniku, šipku in zeleni listnati zelenjavi. Zelenjava poleg telesu koristnih snovi vsebuje tudi nekoristne, med katere uvrščamo tudi nitrat. Izmed vseh živil je prav zelenjava glavni vir nitrata, ki ga vnesemo v naše telo, in sicer predstavlja med 75-80 % celotnega dnevnega vnosa. V manjših količinah nitrat vsebujejo tudi sadje, žitarice, ribe, mleko in mlečni izdelki, najdemo pa ga tudi v pitni vodi kot posledica kmetijstva (Dennis in Wilson, 2003).

V večjih koncentracijah sta nitrat in nitrit za človeka lahko nevarna. Nitrat se reducira do nitrita, ki nato reagira s sekundarnimi amini in na tak način se tvorijo N-nitrozo spojine, ki so karcinogene. Nastajanje karcinogenih N-nitrozo spojin pa poleg drugih inhibitorjev, kot je npr.  $\alpha$ -tokoferol, zavira tudi vitamin C. Nitrat in nitrit se uporabljata tudi kot prehranska dodatka, predvsem za zagotovitev mikrobiološke varnosti hrane, poleg tega pa tudi koristno prispevata h karakteristikam barve in arome mesa (Dennis in Wilson, 2003).

Tradicionalno slovensko prehranjevalno kulturo si težko predstavljamo brez zelja, ki je imelo vedno pomembno mesto na naših jedilnikih, še posebno v zimskem in jesenskem času. Ljudje so ga že od nekdaj cenili predvsem zaradi vitaminov in drugih pozitivnih učinkov (Morato, 2004). Zelje in druga zelenjava niso pomembne le zaradi energijske vrednosti, ampak predvsem zaradi vsebnosti antioksidantnih snovi (vitamina C,  $\beta$ -karotena), folne kisline, kalija, magnezija, železa, mikroelementov, prehranske vlaknine, različnih eteričnih olj in snovi, ki jim pripisujejo antikarcinogeni učinek (Pavčič, 1997).

### 1.1 NAMEN DIPLOMSKE NALOGE

Raziskali smo razporeditev nitrata in L-AK v glavi zelja (zgornji in spodnji del) ter vpliv različnih kultivarjev zelja na vsebnost nitrata in L-AK v zelju takoj po obiranju in po štirimesečnem skladiščenju. Poiskali smo morebitno povezavo med vsebnostjo L-AK in nitrata v različnih sortah zelja.

### 1.2 DELOVNE HIPOTEZE

Različni kultivarji zelja imajo različno vsebnost L-AK in nitrata. V posameznih delih zelja se vsebnosti L-AK in nitrata razlikujejo. Predpostavili smo, da je vsebnost nitrata obratno sorazmerna z vsebnostjo L-AK v določeni vrsti oz. določenem delu zelja.

## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 ZELJE

#### 2.1.1 Izvor in razširjenost

Zelje spada med najstarejše vrtnine, poleg tega pa je tudi najbolj razširjena vrsta zelenjave (Mihajlovič, 1997). Izvira iz zahodne Evrope iz obalnih področij Mediterana, kjer se še vedno nahajajo divje oblike te rastline. Rastlina ima dolgo zgodovino kulture, saj so jo že starodavni Grki primarno gojili za medicinske namene. Čez čas so razvili številne kultivarje, ki so primerni za različna okolja, različni letni čas in različna tržišča. Produkcija zelja je razširjena po vsem svetu. Bolje uspeva v hladnih razmerah, raste pa tudi v tropskih regijah (Fordham in Hadley, 2003).

Zelje spada po botanični razvrstitvi v vrsto *Brassica oleracea* L. (kapusnice), medtem ko vse kapusnice uvrščamo v družino *Brassicaceae* (*Cruciferae* – križnice). Po novjšem botaničnem izrazju je naziv kapusnice predpisan za družine, vendar se je zaradi dolgoletne rabe tako udomačil, da z njim poimenujemo podvrste v vrsti kapusa (Černe, 1999a).

Kapusnice so obsežna skupina, katere predstavnike zelje, ohrovt, brstični ohrovt, listnati ohrovt, cvetačo, brokoli, kitajski kapus, listnato kitajsko zelje, kolerabico in druge sejemo na vrtovih za prehrano ljudi. Med kapusnicami je najbolj razširjeno zelje, in sicer poznamo belo in rdečo podvrsto. Uporabljamo jih v presni ali predelani-konzervirani obliki. Zelje je dvoletna vrtnina, katere pridelek je v prvem letu uporaben za prehrano, v drugem pa za pridelavo semena. Znanih je več vrst zelja, ki se razlikujejo po odpornosti proti nizkim temperaturam, zgodnosti, kakovosti, sposobnosti za skladiščenje in primernosti za kisanje (Osvald in Kogoj-Osvald, 1994).

#### 2.1.2 Prehranska vrednost in kemijska sestava zelja

Prehranska vrednost zelja je odvisna od vsebnosti mineralov in vitaminov ter variira med posameznimi kultivarji in z načini priprave. Na vsebnost karotena vpliva količina klorofila. Zunanji zeleni listi ga lahko vsebujejo do 50-krat več kot notranji beli listi. Tudi tretiranje s toploto povzroči spremembe v kemijski sestavi, kar dokazuje dejstvo, da vsebnost vitamina C v živilih po kuhanju drastično upade (Fordham in Hadley, 2003).

Med vsemi kapusnicami je v zelju največ mineralnih snovi. Izmed kapusnic je skupnih mineralov največ v kislem zelju. Le ta vsebuje veliko natrija zaradi soljenja, medtem ko najmanj mineralov vsebujeta prav belo in rdeče zelje (Černe, 1998). Belo zelje kljub nižji vsebnosti mineralov vsebuje vse pomembne minerale, in sicer kalij, kalcij, magnezij, žveplo, fosfor, natrij, klor, mangan, jod, kobalt. V primerjavi z ostalimi kapusnicami pa vsebuje večje količine železa, cinka in fluorja (Mihajlovič, 1997).

Številne kapusnice in med njimi tudi belo zelje vsebujejo precejšnje količine žvepla, ki je sestavni del gorčičnih olj, ta daje kapusnicam značilen vonj in okus. Zelje vsebuje visoke količine antioksidantov in vitaminov, kot so  $\beta$ -karoten, prekurzor vitamina A, vitamine B kompleksa, vitamin C in vitamin K. Belo zelje v primerjavi z drugimi kapusnicami vsebuje precej folne kisline ali vitamina Bc in biotina ali vitamina H. V presnem in kislem zelju so

ugotovili vitamin U, katerega je Chaney po odkritju leta 1950 poimenoval protiulkusni faktor (Černe, 1998). Vitamin U močno varuje sluznico prebavil (Mihajlovič, 1997). Zelje in kapusnice vsebujejo vse pomembne aminokisliline, in sicer je v njih veliko arginina, izolevcina, levcina, valina, lizina, histidina in treonina. V zelju najdemo veliko balastnih snovi, ki se slabo prebavljajo, zato nekatere preobčutljive ljudi napenja. Vsebnost makrohranil v belem, rdečem in kislem zelju prikazuje Preglednica 1 (Černe, 1998).

Preglednica 1: Nekatera za prehrano pomembna makrohranila v g/100 g belega, rdečega in kislega zelja (Černe, 1998)

<b>Makrohranilo</b>	<b>Belo zelje (g/100 g)</b>	<b>Rdeče zelje (g/100 g)</b>	<b>Kislo zelje (g/100 g)</b>
Voda	91,0-95,0	89,5-93,5	88,0-92,0
Surove beljakovine	0,4-2,2	0,4-2,3	1,0-2,0
Surove maščobe	0,1-0,2	0,10-0,21	0,20-0,54
Ogljikovi hidrati	3,3-4,3	3,5-5,2	0,8-4,0
Prehranske vlaknine	1,0-2,5	1,0-2,5	0,8-1,7
Minerali	0,37-0,80	0,5-0,8	1,4-4,0
Energ. vrednost (kJ)	96-113	93-121	63-92

Kapusnice vsebujejo tudi organske kisline, predvsem jabolčno in citronsko. Pri belem in rdečem zelju je razmerje med jabolčno in citronsko kislino sorazmerno majhno. Zanimivo je, da zunanji listi zelja vsebujejo več jabolčne, notranji pa več citronske kisline. Kapusnicam dajejo okus žveplo vsebujoče snovi, predvsem glukozinolati, med katere prištevamo 2-propenil-, 3-metilsulfinilpropil-, 4-metilsulfinilbutil- in indol-glukozinolat, katerih skupna količina je večja v belem kot pa v rdečem zelju. Količina glukozinolatov je odvisna od sorte, vrste tal, vremenskih razmer med rastjo in od načina pridelovanja. Zelje vsebuje tudi S-metilcistein, ki med kuhanjem razpade v dimetilsulfid in daje jedi značilen vonj. S-metilcistein zmanjšuje količino holesterola v krvi, zato preprečuje aterosklerozo. Kislo zelje vsebuje mlečno kislino, ki preprečuje gnilobne procese v želodcu in črevesju. Acetilholin iz kislega zelja je odgovoren za gibanje črevesja ali peristaltiko, zato ga priporočajo pri urejanju prebave, poleg tega pa širi ožilje, zmanjšuje poapnenje žil in znižuje krvni tlak (Černe, 1998).

### 2.1.3 Sorte zelja

V Sloveniji imamo avtohtone sorte, ki so jih naši predniki gojili, odkar se je zelje razširilo v pridelovanje. Za seme so odbirali najboljše glave, jih semenili in tako izboljševali kakovost zelja. Avtohtone sorte je bilo mogoče dobiti po drugi svetovni vojni v vseh slovenskih območjih, predvsem pa v ljubljanskem, kjer so gojili sorti Ljubljansko in Kašeljško zelje. V Škofjeloškem pogorju so gojili Zaloško zelje, na Bloški planoti pa Bloško zelje. Domače avtohtone sorte so po drugi svetovni vojni zbirali in iz njih vzgojili sorti Emona in Kranjsko okroglo zelje (Černe, 1998).

V sedemdesetih in osemdesetih letih smo v pridelovanje začeli uvajati hibride, kateri imajo številne prednosti pred običajnimi sortami, in sicer (Černe, 1998):

- večja izenačenost in s tem možnost sočasnega pobiranja
- večji pridelki, zato večja učinkovitost pri pobiranju

- boljša trpežnost v skladišču
- odpornost proti boleznim
- odpornost proti pokanju, zato glave lahko dalj časa ostanejo na polju

#### 2.1.3.1 Kultivar zelja Delphi F1

Delphi F1 je zgođen hibrid, odporen na cvetenje. Glave zelja so okrogle, izenačene, kompaktne ter odlične kvalitete. Dozori približno 65 dni po presajanju. Hibrid je prilagojen pridelovanju v različnih agroekoloških razmerah.

#### 2.1.3.2 Kultivar zelja Hinova F1

Hinova F1 oblikuje ploščate okrogle glave, težke v povprečju 3,6 kg. Glava je srednje globoko položena med listne vehe, listi jo dobro pokrivajo. Vreteno je kratko, saj dosega le 45 % premera glave. Barva glave je modrikasto zelena. Listna rebra so tanka in neizrazita. Dozori približno 140 dni po presajanju. Hibrid je odporen na pokanje in primeren za kisanje in skladiščenje.

### 2.1.4 Pridelovanje zelja

Zelje sadimo ali sejemo na dobro pripravljena tla na primeren razmik. Setvene in sadilne razdalje so povezane z bujnostjo gojenih rastlin. Običajno so zgodnje sorte manj bujne in imajo rozete z manjšim premerom kot pozne sorte. Dobro oskrbovane zeljne rastline hitro zrastejo, zasencijo tla in oblikujejo za sorto značilno glavo (Osvald in Kogoj-Osvald, 1994).

Velike pridelke dobimo pri gnojenju z organskimi gnojili. Običajno dajemo na hektar od 20 do 60 t hlevskega gnoja, odvisno od vsebnosti humusa v tleh. Količine gnojil določamo na podlagi preskrbljenosti tal s posameznimi rastlinskimi hranili, zato je treba prej analizirati tla. Preveč dušika zmanjša sušino, vsebnost sladkorjev in vitamina C, glave pa niso čvrste (Černe, 1999b).

### 2.1.5 Skladiščenje zelja

Obstojnost pridelkov lahko vzdržujemo tako s skladiščenjem v hladnem okolju kakor tudi v kontrolirani atmosferi, in sicer z nižjo vsebnostjo kisika in z višjo vsebnostjo CO<sub>2</sub> v primerjavi z ambientnimi pogoji (Fordham in Hadley, 2003).

Pri izbiri optimalnih razmer za skladiščenje kapusnic je treba upoštevati fiziološko stanje ob obiranju, njihovo zrelost in predvideni čas skladiščenja (Hribar, 1999). Premalo dozorelo zelje v skladišču izgubi precej mase, preveč dozorelo pa gnije. Mesečne izgube mase so v kontrolirani atmosferi od 0,6 do 1 %, pri skladiščenju v normalni atmosferi pri isti temperaturi pa od 1,8 do 2 % (Černe, 1999b).

Uspešnejše skladiščenje vrtnin lahko dosežemo s hitrim ohlajanjem, saj so zato bolj čvrste in to je pogoj za transport hitro pokvarljivih živil. V tehnologiji skladiščenja uporabljamo več načinov hitrega hlajenja, in sicer predhlajenje s hladnim zrakom, predhlajenje v ledeni vodi in predhlajenje v vakuumu. Najpomembnejše prednosti hitrega ohlajanja so boljša

kakovost in podaljšanje uporabe vrtnin, možnost daljšega skladiščenja zaradi hitro upočasnenih procesov zorenja in staranja, počasnejša sprememba barve, manjša uvelost in lepši videz (Hribar, 1999).

Zelja ne smemo skladiščiti skupaj z jabolki, ker se sprošča etilen, ki pospešuje dozorevanje in zmanjšuje kakovost. V tem primeru glave porumenijo in začnejo jim odpadati listi (Černe, 1999b).

### **2.1.6 Pomen zelja v prehrani**

Ljudje so zelje že od nekdaj cenili predvsem zaradi vitaminov in drugih pozitivnih učinkov. Zelje je bogat vir provitamina A in vitamina C, ki ga je v zelju skoraj toliko kot v limoni in pomaranči, vsebuje pa tudi vitamin B (tiamin in riboflavin). V svežem zelju je veliko vode in prehranskih vlaknin, zato nam hitro da občutek sitosti, po drugi strani pa vsebuje izredno malo kalorij, namreč po hranilni vrednosti zelje uvrščamo med vrtnine z nižjo energijsko vrednostjo (Morato, 2004).

Zelje in druge kapusnice na splošno vsebujejo zelo veliko antioksidantov in antikarcinogenih sestavin. Fenolne komponente in vitamin C so pomembnejši antioksidanti v zelju in ostalih kapusnicah prav zaradi njihove visoke vsebnosti in visokega antioksidativnega učinka (Podsedeck, 2007). Različni fenoli v zelju preprečujejo tvorbo karcinogenov in povečajo delovanje detoksifikacijskih encimov. Glukozinolati povečajo antioksidativne in detoksifikacijske učinke v telesu. Izotiocianati preprečujejo rast tumorjev. Kumarini blokirajo sestavine, ki povzročajo raka (Černe, 1998).

Biološko kisanje zelja poveča njegovo prebavljivost in obstojnost, ohranijo pa se vse bistvene prehranske sestavine, tudi vitamin C. Pozitivni učinki uživanja zelja so krepitev organizma, izločanje nakopičene sluzi iz dihal, preprečuje tudi prezgodnje staranje. Dobro prežvečeno sveže zelje spodbuja prebavo in ohranja normalno črevesno floro. Paziti moramo, da ga ne prekuhamo preveč, saj s tem uničimo aromo in večino hranilnih snovi, predvsem vitaminov. Da bi kar najbolje izkoristili njegove koristi, je potrebno jesti zelje surovo, in sicer v obliki različnih solat. O pozitivnih učinkih zelja torej ni dvoma, vendar pa se moramo zavedati, do bodo njegove koristi prišle do izraza šele, ko bo del splošnega zdravega jedilnika (Morato, 2004).

## **2.2 VITAMIN C**

### **2.2.1 Nomenklatura**

V literaturi najdemo vitamin C pod različnimi imeni, in sicer L-askorbinska kislina, antiskorbutni vitamin, heksuronska kislina, skorbutamin, cevitaminska kislina. L-askorbinska kislina je kemijsko (+) 1,4-lakton 2,3-dihidrolukonske kisline (Golob, 1987).

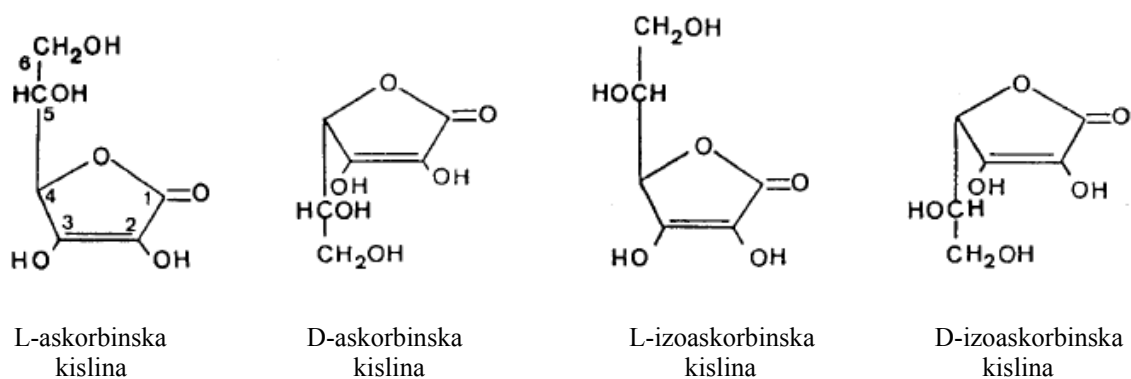
### **2.2.2 Struktura L-askorbinske kisline**

Vitamin C je definiran kot splošni termin za vse komponente, ki kažejo biološko aktivnost L-askorbinske kisline. L-AK je glavna biološko aktivna oblika. Tudi njen oksidacijski produkt, dehidro-L-askorbinska kislina (DHAK), kaže 75 % biološko aktivnost L-AK. Za



merjenje aktivnosti vitamina C v sadju in zelenjavi sta pomembni tako L-AK kot tudi DHAK, saj se DHAK v človeškem telesu zlahka preoblikuje v L-AK (Lee in Kader, 2000; Kall in Ball, 2003).

L-AK je dvobazna šibka kislina z enoldiolno skupino, ki je vgrajena v petčlenski heterociklični laktonski obroč. Med C2 ( $\alpha$ ) in C3 ( $\beta$ ) je namreč dvojna vez, ki ima vezani dve -OH skupini. Molekula L-AK vsebuje na četrtem in petem ogljikovem atomu dva kiralna ogljikova atoma in prav zaradi tega teoretično obstajajo 3 stereoisomere L-AK (Kall in Ball, 2003). Enantiomera L-AK je D-askorbinska kislina. Ostali dve stereoisomeri, D- in L-eritro-2-heksenono-1,4 laktona, lahko imenujemo z enim od njunih štirih trivialnih imen, in sicer D- in L-araboaskorbinska, D- in L-izoaskorbinska ali eritorbična kislina. Strukturne formule L-askorbinske kisline in njene stereoisomere prikazuje Slika 1 (Seib, 1985).

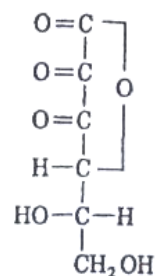


Slika 1: Strukturne formule L-askorbinske kisline in njene stereoisomere (Seib, 1985)

### 2.2.3 Struktura dehidro-L-askorbinske kisline

DHAK je oksidacijski produkt L-AK. Nestabilna je pri fiziološkem pH in se spontano preoblikuje v 2,3-diketo-gulonsko kislino (Podsedeck, 2007). DHAK je naravni lakton, ki je v vodni hidrolizi podvržen počasni hidrolizi do karboksilne kisline. Proces spremlja padec pH (Klun, 2000).

Vodna raztopina DHAK reagira nevtralno in je slabše obstojna kot vodna raztopina L-AK. V naravnem materialu (rastlinskem tkivu) se DHAK s HS-glutationatom in drugimi HS-spojninami reducira do L-AK. Pri analitskem določanju pa izvedemo redukcijo običajno z vodikovim sulfidom (Golob, 1987). Strukturno formulo DHAK prikazuje Slika 2 (Basu in Dickerson, 1996).



Slika 2: Struktura dehidro-L-askorbinske kisline (Basu in Dickerson, 1996)

## 2.2.4 Fizikalne lastnosti L-askorbinske kisline in dehidro-L-askorbinske kisline

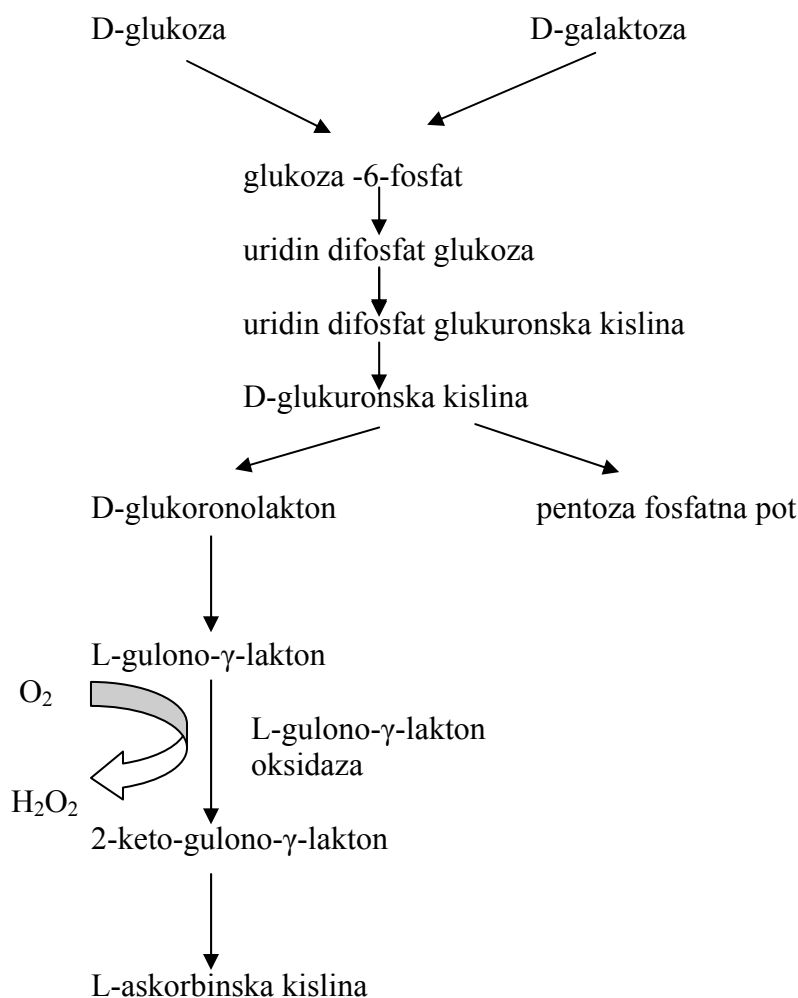
V Preglednici 2 so prikazane fizikalne lastnosti L-askorbinske kisline in dehidro-L-askorbinske kisline (Bender, 1993; Golob, 1987)

Preglednica 2: Fizikalne lastnosti L-askorbinske kisline in dehidro-L-askorbinske kisline (Bender, 1993; Golob, 1987)

Lastnost	L-AK	DHAK
formula	$C_6H_8O_6$	$C_6H_6O_6$
relativna molekulska masa	176,12 g/mol	174,119 g/mol
videz	bela kristalinična snov, brez vonja	bela kristalinična snov, brez vonja
oblika kristala	monoklinski, navadno v obliki ploščic, včasih iglic	v obliki drobnih iglic
temperatura tališča	190-192 °C	225 °C
gostota	1,65 g/cm <sup>3</sup>	ni podatka
redoks potencial ( $E_0'$ )	+ 0,127 (pH = 5)	ni podatka
stabilnost	najbolj stabilna v kislem pH (< 4), v mediju brez ionov, pri nizki temperaturi in v suhi obliki	pri pH < 5 je relativno stabilna, pri pH > 5 razpade že v nekaj urah
topnost (v 1g)	<u>topna</u> v 3 ml vode, v 30 ml alkohola, v 100 ml glicerola, v 20 ml propilenglikola; <u>netopna</u> v etru, kloroformu, benzenu, petroletru, oljih, maščobah in maščobnih raztopinah	ni podatka

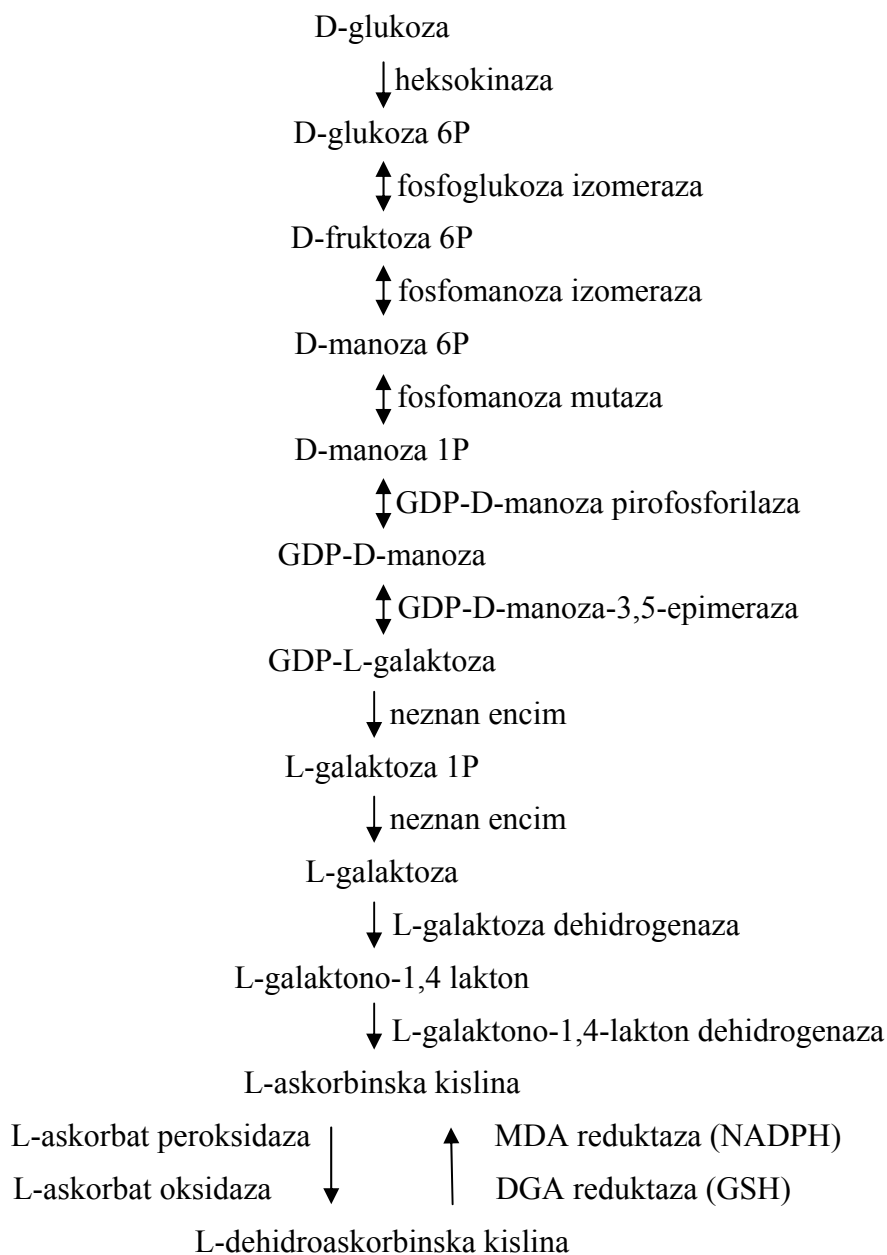
## 2.2.5 Biosinteza L-askorbinske kisline

Večina rastlin in živali sintetizira L-AK iz D-glukoze in D-galaktoze. V nasprotju z večino rastlin in živali, ki L-AK sintetizirajo same, morajo primati, vključujoč človeka in opice, morski prašički, rastlinojedi netopirji in nekatere ribe slednjo dobiti s hrano (Naidu, 2003). Ti organizmi namreč nimajo ključnega encima L-gulonolakton oksidaze, ki je potreben za pretvorbo L-gulonolaktona preko 2-keto-gulonolaktona v L-AK. Večina živali, razen tistih, ki so omenjene v zgornjem odstavku, v jetrih iz glukoze proizvajajo relativno velike količine L-AK. Biosinteza L-AK v živalih je prikazana na Sliki 3 (Naidu, 2003).



Slika 3: Biosinteza L-askorbinske kisline v živalih (Naidu, 2003)

Pomembno vlogo pri metabolizmu rastlin ima nova pot biosinteze L-AK v rastlinah s ključnima intermediatoma D-manozo in L-galaktozo, kjer ne pride do inverzije ogljikovega skeleta glukoze. Iz L-galaktoze se z encimom L-galaktoza dehidrogenaze producira L-galaktono-1,4-lakton. Le ta se lahko nato konvertira v L-AK s pomočjo encima L-galaktono-1,4 dehidrogenaze. Poleg tega da ta pot služi za biosintezo L-AK, so njeni številni intermedii udeleženi pri biosintezi celične stene in glikozilaciji proteinov (Conklin in sod., 1999). Biosinteza L-askorbinske kisline v rastlinah, ki poteka iz D-glukoze preko poti desetih korakov in vključuje tudi sladkorne nukleotide, in sicer GDP-D-manozo in GDP-L-galaktozo, je prikazana na Sliki 4 (Viola, 2002).



Slika 4: Biosinteza L-askorbinske kisline v rastlinah (Viola, 2002)

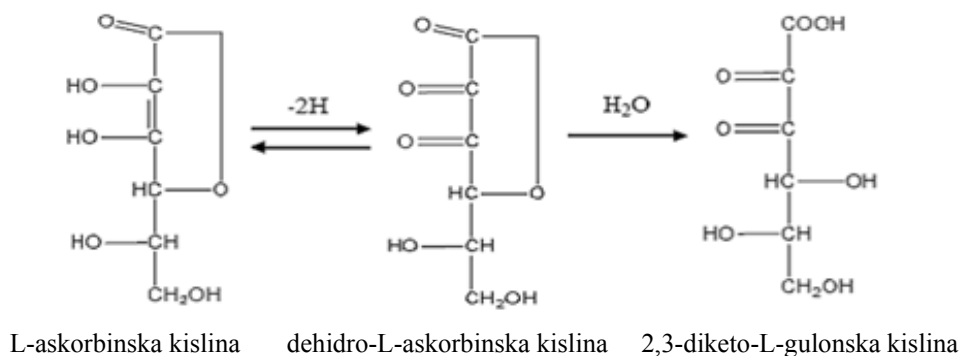
Smirnoff in sod. (1996) so predlagali dve možni poti biosinteze L-AK v rastlinah, ki sta prikazani v Prilogi A. Prva pot biosinteze L-AK v rastlinah je analogna živalski poti, pri kateri pride do inverzije ogljikovega obroča glukoze kot prekursorja. Pri tej poti sta ključna dva intermedijata, in sicer D-galakturonat in L-galaktono-1,4-lakton, pri čemer se slednji z encimom L-galaktono-1,4-lakton oksidaza oksidira do L-AK. Druga pot, pri kateri pa ne pride do inverzije ogljikovega obroča, vključuje oksidacijo glukoze na drugem ogljikovem atomu, pri čemer pride do produkcije neobičajnega ozona D-glukozona. Nato sledi konverzija D glukozona do L-sorbosona z epimerizacijo na petem ogljikovem atomu, po oksidaciji na tretjem ogljikovem atomu in laktonizaciji pa pride do tvorbe L-AK (Smirnoff, 1996).

## 2.2.6 Razgradnja L-askorbinske kisline

### 2.2.6.1 Oksidativna razgradnja L-askorbinske kisline

Najvažnejša fizikalna kemijska lastnost vitamina C je reverzibilni oksidacijsko-redukcijski proces med L-AK in DHAK. Ugotovljeno je, da je prav ta redoksn sistem osnova primarne fiziološke aktivnosti vitamina C ter odgovoren za mnoge biokemične reakcije v človeškem in živalskem organizmu. DHAK je akceptor, medtem ko je L-AK donor vodika (Golob, 1987).

To reakcijo lahko katalizirajo številne oksidativne sestavine, kot so molekularni kisik, težko kovinski ioni, halogeni in encimi, med katerimi je najpomembnejša askorbat oksidaza (Kall in Ball 2003). Askorbat oksidaza, ki vsebuje baker, je odgovorna za encimsko razgradnjo L-AK. V prisotnosti molekularnega kisika oksidira L-AK v DHAK. V nasprotni smeri pa deluje encim glutation dehidrogenaza, ki reducira DHAK v L-AK (Saari in sod., 1995; Lee in Kader, 2000).



Slika 5: Oksidacija L-askorbinske kisline (Yuan in Chen, 1998)

Oksidacija L-AK poteka reverzibilno in brez težav v DHAK, namreč pri prenosu enega elektrona iz L-AK nastane nestabilen prosti radikal, in sicer intermediat semidehidroaskorbinska kislina. Medtem ko pri prenosu drugega elektrona nastane DHAK (Levine in sod., 1993). DHAK je nestabilna v vodni raztopini in oksidira v 2,3-diketo-L-gulonsko kislino in nadaljnje produkte razgradnje, kot sta treonična in oksalna kislina (Smirnoff, 1996). Oksidacijo L-AK do 2,3-diketo-L-gulonske kisline prikazuje Slika 5 (Yuan in Chen, 1998). V kislih raztopinah pa gre proces še dalje do L - (+) - vinske kisline, furfurala, furfuralnega alkohola, 2-furonske kisline, 3-hidroksifurfurala in drugih (Golob, 1987). Ko je obroč pretrgan, se diketogulonska kislina ne more več pretvoriti nazaj v DHAK. Posledica je ireverzibilna izguba aktivnosti vitamina C in tudi antioksidativnih lastnosti (Levine in sod., 1993; Kall in Ball, 2003).

### 2.2.6.2 Razgradnja L-askorbinske kisline v vodni raztopini

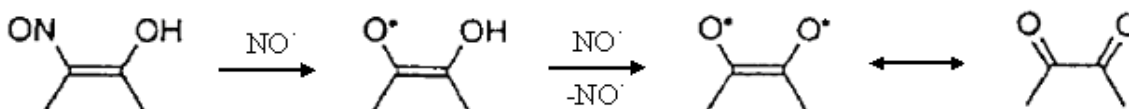
DHAK, oksidirana oblika L-AK, je v vodni raztopini zelo nestabilna in se lahko spremeni v številne razgradne produkte, ki so odvisni od pogojev razgradne reakcije (Kimoto in sod., 1993). Pri izpostavljanju kisiku, svetlobi, povišani temperaturi in reducirajočim dejavnikom, kot je baker, se njena stabilnost zmanjša (Burge in sod., 1994).

- Oksidanti, kot sta npr. baker in železo, znatno povečajo stopnjo oksidacije L-AK do njene neaktivne oblike, diketogulonske kisline (Burge in sod., 1994).
- L-AK je bolj stabilna v kislem okolju. Nestabilna postane, ko se pH dvigne nad 4,0. Pri nizkem pH nastane furfural, 2-furojska kislina in 3-hidroksi-2-piron, medtem ko pri ekstremno nizkem pH (npr. pH 1) nastane predvsem furfural. V bazični vodni raztopini (pH > 7) je glavni razgradni produkt nepoznana sestavina. Pri pH 10 so prisotne samo še zelo majhne količine furfurala in 3-hidroksi-2-pirona brez 2-furojske kisline (Yuan in Chen, 1998; Kimoto in sod., 1993).
- Tudi temperatura je pomemben faktor, ki vpliva na razgradno stopnjo L-AK. Nižje temperature lahko inhibirajo razgradnjo L-AK in tako omejijo akumulacijo različnih razgradnih produktov (Rodriguez in sod., 1991; Yuan in Chen, 1998).

Razgradnja L-AK se smatra za enega največjih vzrokov za spremembo kvalitete in barve med proizvodnjo in skladiščenjem prehrabnih izdelkov. To je lepo opazno pri sadnih sokovih, kjer degradacija L-AK povzroči porjavenje. Furfural, ki je eden izmed glavnih razgradnih produktov L-AK, se lahko podvrže polimerizaciji ali pa se poveže z aminokislinami in tvorijo se rjava melanoidna barvila (Rodriguez in sod., 1991; Solomon in sod., 1995; Yuan in Chen, 1998).

#### 2.2.6.3 Oksidacija L-askorbinske kisline v prisotnosti nitrita

Eden največjih problemov pri ekologiji hrane je interakcija toksičnih snovi z vitamini. Visoka vsebnost nitrita v nekateri zelenjavi poveča možnost problema negativnega vpliva nitritnega iona na vitamine, predvsem na vitamin C. Če je kislost raztopine dovolj visoka (pH raztopine < 7) in je koncentracija nitrita vsaj 0,05 M ali več, potem je edini mehanizem, ki poteka pod aerobnimi pogoji, reakcija prve stopnje. Poteče reakcija L-AK z  $\text{NO}^\cdot$ . Za kinetično reakcijo drugega reda lahko označimo tisto, pri kateri pride do močne pospešitve konverzije L-AK, kar je posledica zvišanja kislosti medija (Myshkin in sod., 1996). L-AK v kislem mediju hitro reagira z  $\text{NO}^\cdot$  in tvori se O-nitrozil askorbinske kisline. Nato se kot rezultat nekaj kasnejših in hitrih korakov konverzije tvori nestabilna DHAK (Dahn in sod., 1960; Myshkin in sod., 1996). Mehanizem reakcije L-AK z  $\text{NO}^\cdot$  v kislem mediju je prikazan na sliki 6 (Myshkin in sod., 1996).



Slika 6: Mehanizem reakcije L-askorbinske kisline z  $\text{NO}^\cdot$  v kislem mediju (Myshkin in sod., 1996)

Reakcija je odvisna od pH. To kaže eksperiment z uporabo 0,05 M Tris pufru in dodatkom 0,2 M  $\text{NaNO}_2$  pri mejnem pH 7,3. Pri pH < 7,3 je askorbinsko-kislinska reakcija z  $\text{NO}^\cdot$  dominantna, medtem ko pri višjih pH postane ta mehanizem nepomemben. Prisotnost nitrita pri kislem skladiščenju zelenjave torej močno poveča razpad vitamina C (Myshkin in sod., 1996).

## 2.2.7 Fiziološki pomen L-askorbinske kisline

Vitamin C je esencialna hranilna mikrospojina, ki je vpletena v mnoge biološke in biokemične funkcije (Levine in sod., 1999). Fiziološke funkcije L-AK so močno odvisne od oksidacijsko redukcijskih lastnosti tega vitamina (Naidu, 2003).

### 2.2.7.1 Vloga L-askorbinske kisline v rastlinah

Vitamin C je eden izmed najbolj znanih rastlinskih metabolitov, ki se nahaja v mM koncentracijah v večini rastlinskih tkiv in ima veliko pomembnih funkcij v rasti in metabolizmu rastlin (Conklin in sod., 1999). L-AK ima to zmožnost, da v rastlinah detoksificira peroksid, ozon in proste radikale. Poleg tega igra pomembno vlogo tudi pri fotosintezi, kjer v kloroplastih detoksificira superoksidne anione in vodikov peroksid ter regenerira v membrani topne antioksidante ( $\alpha$ -tokoferol) in zeaksantin (Hancock in Viola, 2002). Deluje tudi kot substrat za askorbat peroksidazo in varuje aktivnost številnih različnih encimov na tak način, da vzdržuje prostetične skupine kovinskih ionov v reduciranem stanju (Conklin in sod., 1999).

### 2.2.7.2 Vloga L-askorbinske kisline v organizmu

#### Biokemična vloga

L-AK je lahko ko-substrat ali ko-faktor za osem različnih intracelularnih encimskih reakcij. Ti encimi imajo lahko maksimalno aktivnost le takrat, ko je L-AK specifičen donor elektronov brez drugih reducirajočih agensov (Levine, 1993).

L-AK pospešuje reakcije hidroksilacije z vzdrževanjem aktivnega centra kovinskih ionov v reduciranem stanju, in sicer z namenom optimalne aktivnosti encimov hidroksilaz in oksigenaz (Naidu, 2003). Najpomembnejše reakcije hidroksiliranja so pri sintezi kateholaminov, hidrosiprolina in kortikosteroidov (Malešič in Meško, 1999). Vloga teh encimov je torej pomembna v številnih biokemijskih procesih, kot so biosinteza kolagena, biosinteza karnitina, biosinteza adrenalina in noradrenalina, amidacija peptidov do hormonov in faktorjev, ki sproščajo hormone (Kall in Ball, 2003).

L-AK je potrebna tudi za transformacijo holesterola v žolčne kisline in modulacijo  $\alpha$ -hidroksilacije, ki je stopenjsko omejujoča reakcija katabolizma holesterola v jetrih. Pri pomanjkanju vitamina C se ta reakcija upočasni, pri čemer pride do akumulacije holesterola v jetrih in posledično do hiperholesterolemije in formacije žolčnih kamnov (Naidu, 2003).

#### Antioksidativna vloga

L-AK je v vodi topen antioksidant, ki lahko odstranjuje reaktivne vrste kisika, in sicer hidroksilne, alkoksilne, peroksilne, hidroperoksilne radikale, superoksidne anione in reaktivne vrste dušika, kot so dušikov dioksid, dušikov monoksid in peroksininitrit v zelo nizkih koncentracijah. Vsi ti prosti radikali lahko povzročajo oksidativne poškodbe makromolekulam, kot so lipidi, DNA (dezoksiribonukleinska kislina) in proteini. Prav te

potem povzročajo kronične bolezni, vključno s kardiovaskularnimi boleznimi, kapjo, rakom, nevrodegenerativnimi boleznimi in očesno mrežo (Naidu, 2003).

Na pro-oksidativne in antioksidativne lastnosti L-AK vpliva njena koncentracija. Nizke koncentracije L-AK delujejo pro-oksidativno, medtem ko višje koncentracije L-AK delujejo antioksidativno (Naidu, 2003). Delovanje antioksidanta je potencirano v prisotnosti drugih reducentov, kot sta glutation in NADH, ki pomagata pri regeneraciji L-AK iz njene oksidirane oblike (Basu in Dickerson, 1996).

#### Inhibicija tvorbe rakotvornih nitrozaminov

V prebavilih pri posebnih pogojih nastajajo nitrozamini, ki so lahko škodljivi. Vitamin C v želodcu in dvanajstniku preprečuje nastajanje mutagenih N-nitroso spojin, zato v želodčnem soku lahko deluje kot zaščita pred želodčnim rakom. Uživanje velike količine vitamina C je torej povezano z manjšim tveganjem za nastanek želodčnega raka. Ni pa jasno, ali nudi zaščito sam vitamin C ali druge sestavine hrane, ki vsebujejo vitamin C (Levine in sod., 1999).

#### Imunska funkcija

Vitamin C ima funkcijo antihistaminske aktivnosti. Udeležen je tudi v številnih drugih imunskih funkcijah, vključno s kemotakso nevtrofilov, proliferiranjem T limfocitov, prirodno aktivnostjo celic ubijalk in aktivacijo komplementne komponente C1q. Nevtrofili in limfociti koncentrirajo vitamin C do stopenj, ki so do 100-krat višje kot v plazmi (Kall in Ball, 2003). Pri vnetnih procesih je L-AK potrebna za normalno delovanje levkocitov (Malešič in Meško, 1999).

#### Pomen pri absorpciji železa

Vitamin C vpliva na absorpcijo železa v tankem črevesu. Pospešuje absorpcijo topnega železa, nevezanega na hemoglobin, tako da ga reducira ali preprečuje njegovo vezavo s fitati ali drugimi ligandi v hrani (Levine in sod., 1999). Fitati, oksalati, fosfati in tanin namreč zmanjšujejo absorpcijo železa iz rastlinske hrane, saj dajejo z železom netopne soli (Kamarič, 1991).

L-AK poveča absorpcijo železa za 1,5- do 10-krat, odvisno od količine železa v telesu, testnega obroka in odmerka L-AK. Pri 25 do 50 mg L-AK v obroku se absorpcija železa podvoji (Levine in sod., 1999).

Kljub slabi absorpciji pa je vnos nehemskega železa večji od hemskega. Vzrok je v tem, da je v rastlinski hrani več železa kot v mesu in da vnašamo povprečno več rastlinske hrane kot mesa (Kamarič, 1991). V nasprotju s hemskega železa, ki se nahaja predvsem v hemoglobinu in mioglobinu mesa, rib in perutnine, je absorpcija trovalentnega železa, ki je prisoten predvsem v rastlinski prehrani, odvisna od prisotnosti vitamina C in drugih sestavin prehrane (Kall in Ball, 2003). Vitamin C ne olajša le absorpcije železa, temveč tudi drugih zdravju ugodnih hranil, kot so bioflavonoidi in karoteni (Hancock in Viola, 2002).



### Katabolizem

L-AK, ki jo zlahka dobimo s hrano, se v črevesju absorbira s pomočjo aktivnega transporta. Pri zaužitju do 100 mg/dan se jo večina (80-90 %) absorbira, medtem ko pri višjih stopnjah (500 mg/dan) zaužitja učinek absorpcije L-AK strmo pada. Navadno se pri zdravih ljudeh nahaja v telesu 1,5 g ostanka vitamina C (Kristl, 1991).

Pomembnejši metaboliti L-AK v človeškem telesu so DHAK, 2,3-diketogulonska kislina in oksalna kislina. Glavna pot izločanja L-AK in njenih metabolitov je preko urina (Naidu, 2003).

### Predoziranje vitamina C ali hipervitaminoza

L-AK na splošno ni toksična. Vendar uživanje preveč vitamina C (več kot 1 g na dan) lahko povzroča slabost, želodčne krče, drisko in tudi ledvične kamne (Ihan, 2001). Prevelik vnos L-AK lahko privede do motenj pri presnovi vitamina B12, znižuje pa tudi delovanje nekaterih učinkovin, kot so aminosalicilna kislina, triciklični antidepresivi in antikoagulantni (Malešič in Meško, 1999). Stranski učinki običajno niso resni in jih lahko zlahka odpravimo z manjšim zaužitjem L-AK (Naidu, 2003).

### Pomanjkanje vitamina C

Kadar prehrana vsebuje predvsem žita, stročnice, meso in mesne izdelke in zelo malo sadja in zelenjave ali pa sta zelenjava in sadje kuhana, lahko pride do hipovitaminoze (delno pomanjkanje vitamina) ali avitaminoze vitamina C, ki ji pravimo skorbut (Pokorn, 1991). Pri človeku se kaže z oteklimi, krvavečimi dlesnimi, suho kožo, odprtimi, nezaceljenimi ranami na koži, utrujenostjo, slabšim celjenjem ran in depresijo. V današnjih časih se skorbut redko pojavlja prav zaradi zadostnega vnosa L-AK preko svežega sadja in zelenjave in različnih dodatkov kot so tablete (Naidu, 2003). Količina vitamina C, ki prepreči nastanek skorbuta, je samo 10 mg na dan (Pokorn, 1991).

Potrebe po vitaminu C se povečajo pri vseh stresnih situacijah, pri kadilcih, pri pivcih alkoholnih pijač, v starosti, pri športnikih, operiranih, pri nalezljivih boleznih, poškodovanih, kirurških posegih v ustih, bolnikih na umetni prehrani, pri razjedi želodca in dvanajstnika, pri diabetikih in pri jemanju aspirina, kontracepcijskih tablet, tetraciklinov, barbituratov ter kortikosteroidov (Pokorn, 1991).

### Dnevne potrebe po vitaminu C

Dnevne potrebe po vitaminih pri ljudeh se razlikujejo. Odvisne so od stanja metabolizma posameznika, starosti in spola. Človek po količini od vseh vitaminov potrebuje največ vitamina C (Malešič in Meško, 1999).

Priporočena dnevna količina vitamina C za večino ljudi, starih nad 15 let, je 60 mg na dan. Več vitamina C potrebujejo nosečnice (70 mg), doječe ženske (90 do 95 mg) in kadilci (vsaj 100 mg). Ker se vitamin C v telesu ne more skladiščiti, je pomembno, da redno obnavljamo zaloge z uživanjem priporočene dnevne količine vitamina C (Ihan, 2001).

Stres je v modernem življenju povečal potrebo po vitaminu C, zato je priporočljiv vnos 100-200 mg/dan (Lee in Kader, 2000).

## **2.2.8 Vitamin C v živilih**

### **2.2.8.1 Viri in vsebnost vitamina C v živilih**

Vitamin C je zelo razširjen vitamin, tako v rastlinskih, kot tudi v živalskih vrstah, ki ga same sintetizirajo. Največ ga je v zelenjavi, sadju oziroma kot navajajo nekateri avtorji v svežih in hitro rastočih delih rastlin, medtem ko ga plodovi orehov, lešnikov, razna semena in žita praktično nimajo. Pri živalskih vrstah najdemo vitamin C v nekaterih organih, kot so jetra in ledvica, v mesu pa le v majhnih količinah (Golob, 1987).

Na vsebnost vitamina C v sadju in zelenjavi lahko vplivajo različni faktorji pred, med in po obiranju. Med te faktorje prištevamo sorto, genotipske razlike, klimatske pogoje pred obiranjem, način gojenja in obdelovanja, zrelost pri obiranju, način obiranja, postopki tretiranja po obiranju in pogoji skladiščenja (Lee in Kader, 2000; Podsdek, 2007).

Klimatski pogoji, kot sta svetloba in temperatura, imajo močan vpliv na kemijsko sestavo vrtnin (Klein in Perry, 1982). Čeprav svetloba ni bistvena za sintezo L-AK v rastlinah, ima količina in intenzivnost svetlobe med rastno sezono določen vpliv na količino formirane L-AK. Le ta se sintetizira iz sladkorjev, ki v rastlinah nastanejo s fotosintezo. Zunanost sadja, ki je izpostavljena maksimalni sončni svetlobi, vsebuje večje količine vitamina C kot notranost in zunanja senčna stran sadja na isti rastlini. Na splošno lahko rečemo, da nižja kot je intenzivnost svetlobe med rastjo, nižja je tudi vsebnost L-AK v rastlinskih tkivih (Lee in Kader, 2000).

Tudi temperatura vpliva na sestavo rastlinskih tkiv med rastjo in razvojem. Vsa razpoložljiva toplota in razpon med nizkimi in visokimi temperaturami so najpomembnejši faktorji, ki določajo stopnjo rasti in kemično sestavo vrtnin. Dušikova gnojila, še posebej v večjih količinah, zmanjšajo koncentracijo vitamina C v sadju in zelenjavi. Dušikova gnojila povečajo tudi listje rastlin in tako zmanjšajo intenzivnost svetlobe in akumulacijo L-AK v senčnih delih. Pri prekomerni uporabi dušikovih gnojil pride do povečanja koncentracije nitrata in hkrati do zmanjšanja L-AK. Torej ima dvojni negativni učinek na kakovost rastlinske hrane (Lee in Kader, 2000).

Koncentracija vitamina C v solati z mehkejšo glavo je v pozitivni korelaciji z vsebnostjo dušika, medtem ko je v zelju in solati s tršo glavo ravno obratno. Koncentracija vitamina C je v tem primeru v obratni korelaciji z vsebnostjo dušika. Če gledamo iz prehranskega stališča, imajo vrtnine, ki imajo pri rasti nižjo oskrbo z dušikom in ki jih manj pogosto namakamo, prednost zaradi višje koncentracije vitamina C in nižje koncentracije nitrata (Lee in Kader, 2000).

Vsebnost vitamina C v sadju in zelenjavi variira med kultivarji in tkivi. Preglednica 3 prikazuje vsebnost vitamina C v sadju in zelenjavi (Lee in Kader, 2000). Za produkcijo visokih količin vitamina C v pridelkih je izbira genotipa z najvišjo vsebnostjo vitamina C veliko bolj pomemben faktor kot klimatski pogoji in način gojenja. Nekaterne vrtnine akumulirajo zelo velike količine vitamina C, npr. acerola, znana tudi kot Barbadoška

češnja ali Zahodnoindijska češnja. Vsebuje tudi preko 1 % njene sveže teže (Loewus in Loewus, 1987).

Vsebnost vitamina C ne variira samo med različnimi vrstami zelenjave (kapsnice običajno vsebujejo visoke količine (50-100 mg/100 g), medtem ko koreni vsebujejo relativno malo vitamina C (< 10 mg/100 g)), ampak lahko variira tudi znotraj posamezne sorte zelenjave (Favell, 1998).

Preglednica 3: Vsebnost vitamina C nekaterega sadja in zelenjave (Lee in Kader, 2000)

<b>PRIDELEK</b>	<b>L-AK (mg/100g)</b>	<b>DHAK (mg/100g)</b>	<b>CELOTNI VITAMIN C (mg/100g)</b>
Kivi (svež)	59.6	5.3	64.9
Limona (sveža)	50.4	23.9	74.3
Pomaranča (Kalifornija)	75.0	8.2	83.2
Kaki (svež)	110.0	100.0	210.0
Brokoli (svež)	89.0	7.7	96.7
Brokoli (kuhan)	37.0	2.6	39.6
Zelje (svež)	42.3	-	42.3
Zelje (kuhan)	24.4	-	24.4
Cvetača (sveža)	54.0	8.7	62.7
Paprika (rdeča)	151.0	4.0	155.0
Paprika (zelena)	129.0	5.0	134.0
Krompir (svež)	8.0	3.0	11.0
Krompir (kuhan)	7.0	1.3	8.3
Špinača (sveža)	62.0	13.0	75.0
Špinača (kuhana)	12.0	18.0	30.0
Paradižnik (svež)	10.6	3.0	13.6

Več kot 85 % vitamina C v prehrani ljudi dobimo z uživanjem sadja in zelenjave (Podsdek, 2007). Največ vitamina C se nahaja predvsem v aceroli, črnem ribezu, šipku, citrusih, rdeči in zeleni papriki, kiviju, jagodah, brokoliju in zeleni listnati zelenjavi (zelje, kitajsko zelje...). Med kapsnicami je belo zelje najbolj reven vir vitamina C. Na Zahodu so citrusi in krompir najpomembnejši vir vitamina C, saj jih zaužijemo kar velike količine (Ball, 1998; Podsdek, 2007).

Vitamin C je na voljo kot vitaminski dodatek v obliki tablet in praška. Prav tako je del mnogih multivitaminskih pripravkov in je v pripravkih izbranih vitaminov, ki jih prodajajo kot antioksidantne pripravke. Absorpcija vitamina C iz vitaminskih dodatkov je odvisna od vezalcev tablet in odmerka. Ni znano, kako na absorpcijo vpliva hrana in pripravki s počasnim sproščanjem (Levine in sod., 1999).

Še vedno niso razjasnjena nasprotujoča si mnenja o tem, da je naravni vitamin bolj učinkovit od sintetičnega oz. vitamina C v čisti obliki. Domnevajo, in nekatere ugotovitve to potrjujejo, da je ta vitamin v limoni ali pomaranči bolj učinkovit kot enaka količina samega vitamina, kar razlagajo s prisotnostjo spojin, ki delujejo podobno kot sam vitamin

(npr. flavonoidi). Drugi menijo, da spremljajoče spojine ščitijo vitamin C pred oksidacijo in upočasnijo njegovo hitro izločanje iz telesa (Umek, 1991).

V industrializiranih državah je v hrani obilo vitamina C. Uživanje je odvisno od izbire hrane. Smernice Ministrstva za kmetijstvo (angl. Department of Agriculture) ZDA in Nacionalnega onkološkega inštituta (angl. National Cancer Institut) ZDA so podobne, in sicer priporočajo uživanje vsaj 5 kosov sadja in zelenjave dnevno. Če sledimo tem priporočilom, bomo dnevno zaužili 210 do 280 mg vitamina C, odvisno od sestavin hrane (Levine in sod., 1999).

#### 2.2.8.2 Izgube vitamina C v živilih

Vitamin C je občutljiv in ustrezen marker za opazovanje sprememb kakovosti med transportom, predelavo in skladiščenjem, saj je zelo dovzeten na kemijske in encimske oksidacije in dobro topen v vodi (Favell, 1998). L-AK je zelo občutljiva na pogoje skladiščenja, kot so čas, temperatura, vlaga, količina kisika in ogljikovega dioksida (Hounscome in sod., 2009).

Med različnimi vrstami zelenjave lahko pride do razlik v izgubi vitamina C, kar je posledica mehanskih poškodb (otolčenje, površinske odrgnine in ureznine), izpostavljenih površin, vsebnosti sulfhidrilnih komponent kot tudi njihovih različnih encimskih aktivnosti. Do največjih izgub vitamina C pa najverjetneje pride zaradi encimske oksidacije (Favell, 1998).

Zrelost je ena od pomembnejših faktorjev, ki določajo kvaliteto sestavin v sadju in zelenjavi. Tudi način obiranja lahko povzroči fizične poškodbe in določa razlike v stopnji zrelosti ter posledično vpliva na prehransko sestavo v sadju in zelenjavi (Lee in Kader, 2000).

V pridelkih, občutljivih na mraz, pride pri poškodbah zaradi mraza do pospešenih izgub vitamina C. Razpad L-AK se lahko zgodi še preden se pokažejo vidni znaki poškodb zaradi mraza (Miller in Heilman, 1952).

Spremembe v vsebnosti vitamina C, ki so jih opazovali med svežo in zamrznjeno zelenjavo (skladiščene 3, 7 in 12 mesecev pri  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), so bile minimalne (Favell, 1998).

Na splošno prihaja v sadju in zelenjavi do postopnega zniževanja vsebnosti L-AK, če trajanje ali temperatura skladiščenja naraščata. Zato je upravljanje s temperaturo najpomembnejše orodje za podaljšanje življenjske dobe na polici in vzdrževanje kvalitete svežega sadja in zelenjave. Daljši čas med obiranjem in hlajenjem ali predelavo lahko privede do neposrednih izgub vitamina C zaradi izgube vode in gnitja in posrednih izgub npr. v aromi in prehranski kvaliteti. Pri pogojih, ki so po obiranju ugodni za izgubljanje vode, pride do hitrih izgub vitamina C, še posebej v listnati zelenjavi (Lee in Kader, 2000).

Sprememba atmosfere zmanjša fiziološke in kemične spremembe sadja in zelenjave med skladiščenjem. Učinek povečanega  $\text{CO}_2$  na vsebnost L-AK variira med pridelki in je odvisen od stopnje  $\text{CO}_2$  ter od temperature in trajanja skladiščenja (Weichmann, 1986).

Križnice, med katere spada tudi zelje, med skladiščenjem ohranijo največ L-AK v primerjavi z drugo zelenjavo (Hounsoume in sod., 2009). Domnevna teorija, da so za to odgovorne predvsem žveplo ali sulfhidrilne komponente, ni bila dokazana. Vendar lahko rečemo, da te komponente igrajo pri tem določeno vlogo (Favell, 1998). Pri tritedenskem skladiščenju zelenjave (2 °C in 95 % relativna vlaga) se je pri križnicah ohranilo 75-98 % L-AK, pri drugi zelenjavi pa le 16-75 %. Križnice so bogate z žveplom in glutationom. Le ta je lahko vpleten v mehanizem, ki je v križnicah odgovoren za redukcijo DHAK v L-AK (Albrecht in sod., 1990).

Bolj kot zelenjavo režemo, več vitamina C se izgubi, kot npr. v primeru zelja, solat in druge zelenjave, katere prodajajo kot solatne mešanice. Kuhanje je pogosto odgovorno za največje izgube vitamina C. Koliko vitamina C se uniči, je odvisno od razlik v načinih in časih kuhanja (Lee in Kader, 2000). Izguba se zmanjša, če kuhamo zelenjavo z najmanjšo možno količino vode ali v mikrovalovni pečici (Levine in sod., 1999). Postopka blanširanja in pasterizacije zmanjšata vsebnost vitamina C, vendar omejitata nadaljnje izgube med samim zamrzovanjem vrtnin in njihovih izdelkov, saj preprečujeta delovanje oksidaze askorbinske kisline. Tudi drugi rastlinski encimi, vključno s fenolazo, citohrom oksidazo in peroksidazo so posredno odgovorni za izgubo L-AK (Lee in Kader, 2000).

#### 2.2.8.3 Antioksidativna vloga L-askorbinske kisline v živilih

L-AK je najpomembnejši topni antioksidant v tkivih višjih rastlin in prav zato rastlinska hrana za človeka predstavlja glavni vir te esencialne komponente. L-AK skupaj s flavonoidi, polifenoli in v vodi netopnimi komponentami (kot npr.  $\alpha$ -tokoferol) veliko prispeva k celotnemu zaužitju odstranjevalcev prostih radikalov ali antioksidativnih metabolitov v človeški prehrani. Obstajajo trdni dokazi, da takšni metaboliti, sami ali v kombinaciji, koristijo zdravju in dobremu počutju. Delujejo namreč antikarcinogeno in ščitijo pred srčno-žilnimi boleznimi (Hancock in Viola, 2002).

Antioksidativne lastnosti L-AK pogosto izkoriščajo v prehranski industriji. L-AK se v veliki meri uporablja kot prehranski aditiv z namenom izboljšanja okusa in barve, poleg tega pa tudi kot nadomestek izgubljenega vitamina C med predelovanjem in skladiščenjem (Kall in Ball, 2003). L-AK torej deluje kot konzervans, ki ohranja barvo, aromo in teksturo proizvodov, poleg tega pa izboljša tudi splošno obstojnost prehrabnih izdelkov (Bender, 1993).

Vitamin C se kot antioksidacijsko sredstvo dodaja pri proizvodnji piva, sadnih sokov, vina, konzerviranega sadja in zelenjave, v industriji moka za povečanje pecilne kvalitete in videza kruha (Bender, 1993). L-AK kot dodatek npr. mesno-prekajevalnemu sistemu močno zmanjša in preprečuje nastanek nitrozaminov, ki so karcinogene spojine v živilih (Rudan-Tasič, 2000, cit. po Linder, 1991).

L-AK je močan inhibitor encimske vrste porjavenja (pigmenti ne nastanejo), ker reducira o-kinone (nastale iz o-fenolov v prisotnosti kisika in polifenoloksidaz) nazaj v fenolno obliko, sama pa se pri tem oksidira v DHAK (Rudan-Tasič, 2000).

## 2.2.9 Analiza vitamina C

### 2.2.9.1 Odvzem vzorca, začetna priprava vzorca in ekstrakcija

Pri pripravi vzorca je pomembno, da pripravimo čim bolj reprezentativen vzorec, katerega je v večini primerov težko doseči, saj se navadno vsebnost vitamina C v posameznih delih živila zelo spreminja (Bender, 1993).

Na splošno tekočine v primerjavi s trdnimi vzorci ne povzročajo težav pri pripravi reprezentativnega vzorca. Pri trdih živilih pa je glavna težava neenakomerna razporeditev sestavin (v našem primeru vit. C) po posameznih delih živila. Zato naj bi bili koščki posameznega vzorca, če je le možno, čim večji, tako da je zraku izpostavljen čim manjši del površine. Homogenizacije trdnega vzorca ne smemo opraviti prej, dokler mu ne dodamo ekstrakcijskega sredstva. Homogenizacija pred dodatkom ekstrakcijskega sredstva namreč vodi do visokih vrednosti DHAK, kar je posledica oksidacije vitamina. Po pripravi vzorca moramo vzorec čim prej analizirati, če to ni mogoče, moramo očiščen ekstrakt pred analizo zamrzniti pri  $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Kljub temu pa lahko pri nekaterih vzorcih še vedno pride do približno 5 % izgube vitamina C (Bender, 1993).

Največja izguba vitaminov ali največja konverzija iz ene v drugo obliko se navadno zgodi med ekstrakcijo in fazami čiščenja. Te faze operacije morajo biti končane v čim krajšem času, da ne pride do hitre razgradnje vitamina zaradi delovanja kisika, ki se v prisotnosti kovinskih ionov še pospeši (Bender, 1993).

Za ekstrakcijo vitamina C iz rastlinskih in živalskih materialov se uporabljajo vodna in nevodna ekstrakcijska sredstva:

Vodni ekstrakt: Pri vzorčenju moramo preprečiti hidrolizo in oksidacijo vitamina C v vzorcu. Uporabljamo naslednja ekstrakcijska sredstva:

- 2-6 % raztopino metafosforne kisline  $(\text{HPO}_3)_n$
- 8 % raztopino očetne kisline in
- 0,5-2 % raztopino oksalne kisline

Najučinkovitejša je uporaba 5 % raztopine  $(\text{HPO}_3)_n$  in trikloroocetne kisline, ker istočasno obarjata proteine in za določen čas stabilizirata L-AK pred kovinskimi ioni ter zmanjšata hitrost oksidacije (Golob, 1987).

Nevodni ekstrakti: Uporabljamo etanol in metanol ob prisotnosti metafosforne in oksalne kisline ali antioksidanta, npr.  $\text{SiCl}_2$ . Včasih se uporablja mešanica benzena in formaldehida (Golob, 1987).

### 2.2.9.2 Metode določanja vitamina C

Za določitev vitamina C v vzorcih obstajajo različne metode, ki jih lahko razdelimo v tri glavne skupine, in sicer biološke, kemijske (titrimetrične, fluorometrične,

mikrofluorometrične, kolorimetrične metode) in kromatografske, med katerimi se najbolj uporablja metoda HPLC (Iqbal, 1995).

Klasične metode so znane že kar nekaj časa, zato so številne že doživele veliko izboljšav. HPLC je novejša metoda in se uspešno uporablja za veliko število vzorcev (Bender, 1993). V zadnjem času se pri analitiki vitaminov v živilih, tudi vitamina C, uveljavljajo encimske metode. Prednost le teh je, da so razmeroma preproste, hitro izvedljive, zahtevajo malo vzorca in imajo nizko mejo dokazljivosti (Golob, 1987).

Vsebnost vitamina C so najprej določali z biološkimi metodami, ki temeljijo na preprečevalnih in profilaktičnih testih in na zdravljenju – kurativni testi na morskih prašičkih. Te metode so drage, dolgotrajne in zapletene, zato so jih zamenjali s kemijskimi, fizikalno-kemijskimi, kromatografskimi in encimskimi metodami, ki omogočajo natančnejšo, hitrejšo in cenejšo analizo (Golob, 1987).

Večina metod meri ali samo L-AK ali pa totalni vitamin C in ne morejo obvladovati izoaskorbinske kisline, v primeru da je prisotna skupaj z L-AK. Celotno vsebnost vitamina C dobimo tako, da L-AK konvertiramo v DHAK ali obratno (Bender, 1993).

Za analizo L-AK je razpoložljivih veliko metod, in sicer titrimetrična metoda z 2,6-dikloroindofenolom, jodometrična titracija, mikrofluorometrična metoda, določanje z 2,4-dinitrofenilhidrazinom, HPLC in druge. V nadaljnje bomo nekaj besed namenili le metodi HPLC, katero smo sami uporabili za analizo vitamina C v zelju.

#### HPLC metoda

Med sodobnimi metodami dajejo kromatografske metode najbolj zanesljive rezultate, saj omogočajo popolno ločbo L-AK od vseh ostalih spojin, ki motijo reakcijo. V tej smeri so razvili postopke s papirno kromatografijo, tankoplastno, tekočinsko in tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti – HPLC (Golob, 1987).

Metodo HPLC so razvili številni avtorji. Ta metoda je primerna za hitro determinacijo tako L-AK kakor tudi DHAK. Macrae (1982) je razvil metodo z elektrokemijskim detektorjem, ki pa je uporaben le za analizo L-AK. Osnova HPLC metode z UV in fluorescentnim detektorjem je reakcija DHAK z o-fenildiaminom. Izmed teh dveh je fluorescentni detektor bolj občutljiv in zahteva manj vzorca (Golob, 1987).

S HPLC metodo dobimo nekoliko nižje rezultate prav zaradi večje selektivnosti metode. HPLC metoda je hitra, selektivna, visoko občutljiva in zahteva le malo vzorca. Primerna je za rutinske analize, vendar je njena pomanjkljivost v dragi aparaturi (Golob, 1987).

### 2.3 NITRATI

Nitrat je naravno prisotna sestavina v hrani kot je zelenjava, sadje, žitarice, ribe, mleko in mlečni izdelki, prav tako ga najdemo tudi v vodi kot posledica kmetijstva, kot je npr. uporaba dušikovih gnojil in živalskih iztrebkov. Na splošno ga v teh virih najdemo v manjših koncentracijah, razen v nekateri zelenjavi, kjer je lahko prisoten v večjih

koncentracijah. Nitrat in nitrit sta tudi dovoljena prehranska dodatka v nekateri hrani, predvsem za zaščito pred botulizmom (Dennis in Wilson, 2003).

### 2.3.1 Nitrati v rastlinah

Listnata zelenjava je odličen vir vitaminov, mineralov in biološko aktivnih spojin. Poleg koristnih lastnosti listnata zelenjava vsebuje za prehrano ljudi tudi neugodne sestavine, med katere spadajo predvsem nitrati in nitriti (Kmiecik in sod., 2004). Zelenjava predstavlja velik vir nitrata in nitrita v človeški prehrani (Amr in Hadidi, 2001). Okrog 75-80 % celotnega dnevnega zaužitja nitrata dobimo prav iz zelenjave, medtem ko s pitno vodo dobimo le okrog 5-10 % (Dennis in Wilson, 2003).

Koncentracija nitrita v sadju in zelenjavi je nizka, običajno pod 2 mg/kg, razen tam, kjer je prišlo do poškodbe ali pri nepravilnem skladiščenju, kar vodi do mikrobiološke redukcije nitrata v nitrit (Walker, 1990).

Razliko v koncentraciji nitrata lahko razložimo s spremenljivo intenzivnostjo metabolnih procesov v različnih organih rastline. Rastline iz tal črpajo nitrat in ga uporabljajo kot vir dušika za formacijo proteinov. Produkcija proteinov se zgodi kot rezultat fotosinteze, vendar ko intenziteta svetlobe pade, se zniža tudi stopnja fotosinteze in v tem primeru se nitrat akumulira v celičnih tekočinah in rastlinskem soku. Te reakcije potekajo predvsem v listnih delih rastlin in prav zato je koncentracija nitrata večja v steblih, kocenih in pecljih, srednja v listih, v sadju in cvetovih pa najnižja (Kmiecik in sod., 2004). Zelenjava, ki raste tik nad zemljo, vsebuje več nitrata kot ostala zelenjava (Gierschner in Hammes, 1991).

Nitrat je naravno prisoten v zelenjavi in njegova koncentracija v različni zelenjavi variira v širokih mejah vrednosti, in sicer od 1 do 10000 mg/kg sveže teže (Andrade in sod., 2002). V Preglednici 4 so prikazane povprečne vsebnosti nitrata in nitrita v sveži zelenjavi (Walker, 1990).

Preglednica 4: Povprečne vsebnosti nitrata in nitrita v sveži zelenjavi (Walker, 1990)

<b>ZELENJAVA</b>	<b>NITRAT (mg/kg)</b>	<b>NITRIT (mg/kg)</b>
artičoke	16	0,6
pesa	3288	6,0
brokoli	1014	1,5
zelje	712	0,8
korenje	274	1,2
cvetača	658	1,7
zelena	3151	0,8
koruza	62	3,0
kumare	151	0,8
solata	2330	0,6
melone	4932	-
špinača	2470	3,8
paradižnik	80	-



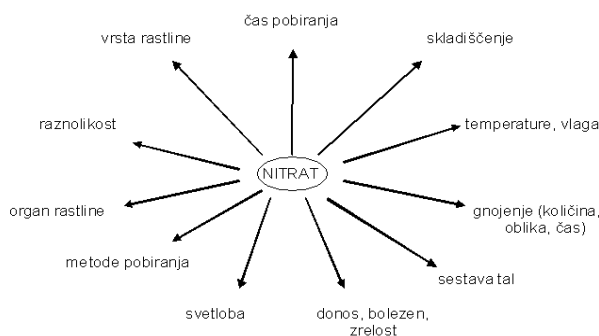
### 2.3.1.1 Akumulacija nitrata v rastlinah

Oskrba z dušikom je pomemben dejavnik za omejitev vsebnosti nitrata v zelenjavi. V rastlinah prihaja v času prekinjene oskrbe z nitrarnim dušikom do izrabe akumuliranega dušika, ki ga rastlina veže v organske spojine (Demšar, 2003). Če je dušika več kot ga rastlina potrebuje za produkcijo proteinov, se presežek akumulira v obliki nitrata, ki se kopiči predvsem v zelenih listnatih delih rastline (Worthington, 2001).

Vse tisto, kar zmanjšuje stopnjo fotosinteze ali biosinteze proteinov v rastlini, povzroča večjo akumulacijo nitrata (Amr in Hadidi, 2001, cit. po Lorenz, 1978). Večje koncentracije nitrata torej vsebujejo rastline, ki rastejo na senčnih legah. Vzrok za to je majhna sinteza ogljikovih spojin in kopičenje aminokislin (rastlina jih zaradi počasne rasti ne porabi), ki s povišano koncentracijo prvotno zavirajo redukcijske procese (Demšar, 2003). Vrtnine, ki jih gojimo v zimskem času ali zgodaj spomladi, vsebujejo veliko nitrata zaradi pomanjkanja svetlobe (Černe in Vrhovnik, 1992). To je nekoliko odvisno tudi od nitrarnih reduktaz, ki je najbolj aktivna pri močni svetlobi (Amr in Hadidi, 2001, cit. po Lorenz, 1978).

Temperature, ki zavirajo oz. upočasnjujejo rast, tudi pospešujejo akumulacijo nitrata (Habben, 1973). Veliko organskih snovi v zemlji prav tako spodbujajo akumulacijo nitrata v rastlini, medtem ko ima povečano namakanje na rast rastline lahko nasproten učinek (Carter in Bosma, 1974). Vsebnost nitrata je tesno povezana z ostanki dušika v zemlji v času pobiranja pridelka (Scharpf, 1991).

Skozi obdobja suše rastlina prav tako porablja nitrat iz zemlje, vendar stres zaradi vlage v rastlini zmanjša konverzijo nitrata v proteine. Za večjo porabo nitrata iz tal je potrebna vlaga, zato pride do največje akumulacije nitrata med obdobjem suše takoj po dežju. Takrat ko se to zgodi, ni priporočljivo pobirati in uživati zelenjave, tudi za živali ni priporočljivo, da se pasejo. Na vsebnost nitrata in nitrata v zelju poleg zgoraj naštetih dejavnikov (svetloba, temperatura, talna vlaga, oskrba z dušikom in drugimi hranili), vplivajo še struktura tal (zračnost, premajhna biološka aktivnost tal), kislost tal, napad boleznin in škodljivcev kot tudi mehanske poškodbe vrtnin, uporaba sredstev za varstvo rastlin (na primer motnje v rasti zaradi uporabe herbicidov), čas setve in pobiranja ter skladiščenje (Černe in sod., 1997). Faktorji, ki vplivajo na vsebnost nitrata v rastlini, so prikazani na sliki 7 (Scharpf, 1991).



Slika 7: Faktorji, ki vplivajo na vsebnost nitrata v rastlini (Scharpf, 1991)

Ker je količina nitrata odvisna od številnih dejavnikov, lahko za kultivar, ki zadržuje malo nitrata, štejemo samo tistega, ki bo v več letih na več lokacijah vedno imel najmanjše količine nitrata. To je treba ugotavljati v večletnih analizah ob upoštevanju različnih rastnih razmer (Černe in sod., 1997).

#### 2.3.1.2 Asimilacija nitrata

Asimilacija nitrata je zelo reguliran in energetsko visoko intenziven proces. Produkti redukcije nitrata (nitrit, amonijevi ioni) so za celice toksični, tako da se reducirani nitrat lahko takoj vgradi v aminokislino. Nitrit reduktaza ima namreč zelo visoko afiniteto do nitrata in ves razpoložljiv nitrit spremeni v amonijeve ione, kar je zaradi velike toksičnosti nitrata zelo pomembno. Poleg tega tudi ne pride do čezmerne produkcije aminokislin, saj le to regulira encim nitrat reduktaza.

#### 2.3.2 Kroženje dušika

Dušik je količinsko najbolj zastopan plin v zemeljski atmosferi, vendar ga večina organizmov direktno ne more uporabljati. Le nekatere bakterije in cianobakterije lahko vežejo elementarni dušik direktno iz atmosfere. Te imenujemo fiksatorji dušika ali nitrifikatorji, sam proces pa fiksacija dušika ali nitrifikacija. Dušik lahko vežejo tako aerobni kot anaerobni organizmi, ki so pomemben člen v kroženju dušika (Turk, 1996).

Dušik se v tleh nahaja v različnih oblikah, ki prehajajo druga v drugo, vendar se med njimi nenehno vzpostavlja ravnotežje. Na to ravnotežje bistveno vplivajo zunanje spremembe, in sicer vlažnost, temperatura in zračnost tal, predvsem pa odzvem rastlin in gnojenje (Kuharič, 2003). Rastline ga sprejemajo v amonijski in nitratni obliki in je pomemben gradnik beljakovin in pomemben dejavnik pri ostalih pomembnih življenjskih procesih rastline (Leskošek, 1993).

##### 2.3.2.1 Gnojenje rastlin z gnojili

V večini primerov je dušik odločilen tako za količino pridelkov kot za njihovo kakovost. Brez gnojenja, torej brez uporabe gnojil, ni zadovoljivih pridelkov. Gnojenje je treba količinsko in časovno uravnati tako, da rastline izkoristijo čim več uporabljenih rastlinskih hranil in da so obenem izgube hranil čim manjše (Leskošek, 1993).

Gnojenje z dušikom pospešuje nastajanje listnega zelenila (klorofila) in prav zato se listje močno razvije in postane temnozeleno. Ena izmed možnih negativnih posledic pretiranega gnojenja z dušikom je tudi čezmerno kopičenje nitrata v svežih rastlinah. Rastline lahko uporabljajo za svojo prehrano le mineralne oblike dušika, in sicer v amonijski  $\text{NH}_4^+$  in nitratni  $\text{NO}_3^-$  obliki. Čim več dušika se z mineralizacijo organskih spojin sprosti za rastline, tem manj je treba, glede na potrebe posevka, gnojiti z dušikom. Dolgoročno pa je treba na različne načine iz tal izgubljeni dušik tako ali drugače vrniti (Leskošek, 1993).

Pretirane količine dušika povzročajo bujen, pogosto nesložen razvoj (velike, toda rahle in mehke zeljnate glave, ki rade pokajo, debele listne žile, slaba odpornost, netrpežnost, encimatično gnitje, neodpornost proti okužbam). Rastline, ki so pretirano oskrbljene z

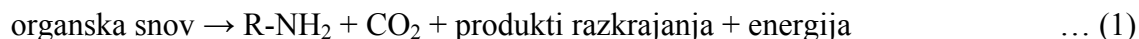
dušikom, sprejemajo mnogo preveč vode, so zelo težke, vendar manj hranilne in trpežne (Vardjan, 1987).

Pomanjkanje dušika v tleh povzroči neugodne posledice. Rast močno zastane, listje ostane majhno in bledozeleno. Dušik se v tem primeru uporabi za mlade dele rastline (liste), zato se na starejših takoj vidi pomanjkanje v obliki rumenice listov, kar na koncu privede do odmiranja. Sčasoma namreč začnejo odpadati posamezni listi. Rastline, katerim primanjkuje dušika, tudi pozneje dozorevajo in v skladišču niso obstojne (Vardjan, 1987).

### 2.3.2.2 Mineralizacija dušika v tleh

Organski ostanki rastlin in živali v tleh podležejo procesu mineralizacije, katere intenziteta je v glavnem odvisna od mikrobiološke aktivnosti ali biogenosti tal. Različne organske snovi se ne razkrojijo z isto intenziteto, kar zavisi od njihovih kemijskih lastnosti, pogojev, ki so prisotni v tleh, in prisotnosti potrebnih skupin mikroorganizmov (Vukadinović in Lončarić, 1998).

Proces razgradnje proteinov je odvisen od prisotnosti in aktivnosti encima peptidaze, kateri jih najprej razkrojijo do peptidov in nato do aminokislin. Prav zaradi tega se ta del procesa imenuje aminizacija in se lahko na kratko prikaže z naslednjo formulo:



Razkrajanje proteinov je hitrejše v dobro prezračenih tleh z dovolj vlage in prisotnostjo kalcija. Pri pomanjkanju razpoložljivega mineralnega dušika tal proste aminokislino porabljajo mikroorganizmi ali pa se v nasprotnem primeru proces mineralizacije nadaljuje (Vukadinović in Lončarić, 1998).

Naslednja faza pri mineralizaciji dušika je amonifikacija, ki je občutljiva na pomanjkanje vlage v tleh. Ta del procesa mineralizacije predstavlja odcepitev amoniaka iz prostih aminokislin tekom dezaminizacije pod vplivom encima dezaminaze (Vukadinović in Lončarić, 1998):



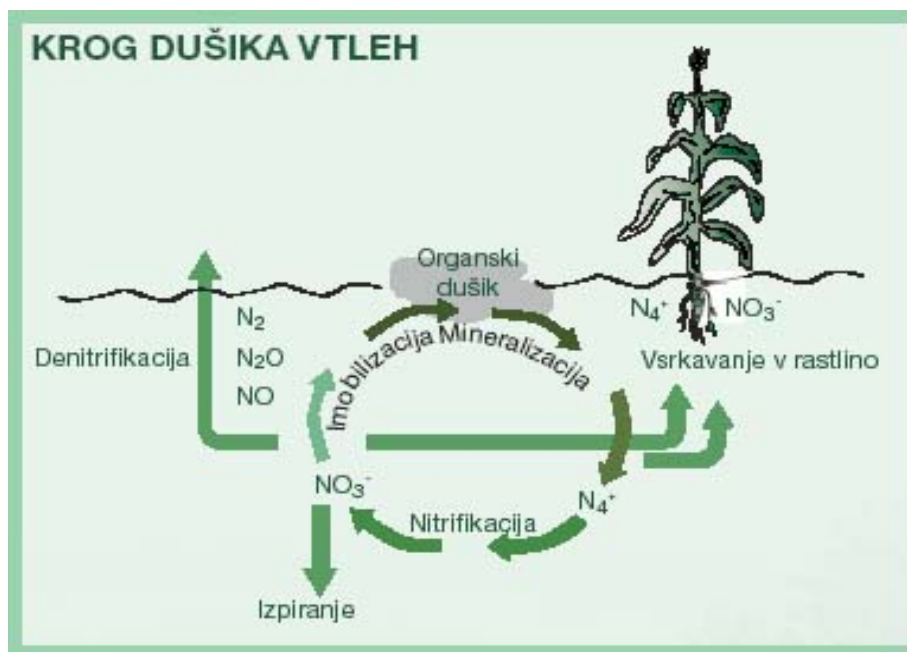
Z razpadanjem rastlinskih ostankov in mikrobnih tkiv se torej sprošča dušik v obliki  $\text{NH}_3$ . Večji del amoniaka nato preide v  $\text{NH}_4^+$ , ki je pristopen za rastline in mikrobe in se neposredno vrača v biosfero. Del amoniaka se lahko oksidira do nitrata, in sicer z mikrobiološkim procesom nitrifikacije (Ćirić, 1986).

Nitrifikacija, katero povzročajo specifične avtotrofne bakterije – nitrifikacijske bakterije, je proces fermentativne oksidacije amoniaka in je naslednja faza pri mineralizaciji dušika. V prvi fazi mikrobiološkega procesa nitrifikacije pod vplivom nitritnih bakterij nastanejo nitriti, neposredno zatem pa pod vplivom nitratnih bakterij sledi faza oksidacije nitrita do nitrata (Vukadinović in Lončarić, 1998).





Za nitrifikacijo je potrebna dobra prezračenost tal, optimalni temperatura (med 26,5-32 °C) in vlažnost (50 %), ustrezna pH vrednost (5,5-7,0), prisotnost Ca, dobra oskrbljenost z drugimi hranili in primerno razmerje C/N (Vukadinović in Lončarić, 1998).



Slika 8: Krog dušika v tleh (Gnojenje koruze z dušikom, fosforjem in kalijem, 2003)

Tudi nitriti niso vselej obstojni, namreč posebne bakterije jih lahko oksidirajo v nekoristne nitrata (Vardjan, 1987). Torej je vzrok negativne bilance dušika v tleh lahko pojav denitrifikacije, katero povzročajo nekatere heterotrofne bakterije v anaerobnih pogojih (Vukadinović in Lončarić, 1998). Denitrifikacija je mikrobiološka redukcija nitrata do plinskih substanc, kot sta dušik in didušikov monoksid (Gierschner in Hammes, 1991). Proces denitrifikacije je lahko v pogojih nizkega pH, slabe prezračenosti tal, velike vlažnosti in na splošno v redukcijskih pogojih zelo hiter (Vukadinović in Lončarić, 1998). Krog dušika v tleh, vključno z mineralizacijo, nitrifikacijo in denitrifikacijo je prikazan na Sliki 8 (Gnojenje koruze z dušikom, fosforjem in kalijem, 2003).

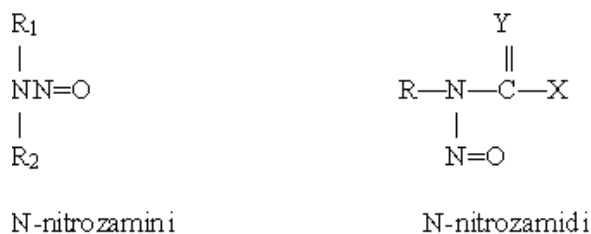
### 2.3.3 Zmanjšanje količine nitrata

Rastline niso zmožne aktivno omejiti absorpcije nitrata iz zemlje. Zmanjšanje mineralnih dušikovih gnojil, uporabe inhibitorjev nitrifikacije in organskih gnojil reducira vsebnost nitrata v zelenjavnih izdelkih. V večini primerih ti ukrepi vodijo do zmanjšanja pridelkov (Gierschner in Hammes, 1991). Organska zelenjava, ki zraste brez dodanih pesticidov in kemičnih gnojil, vsebuje nižje količine nitrata. Na absorpcijo nitrata torej vplivajo ti kakor tudi drugi rastni pogoji (Schuster in Lee, 1987).

Količino nitrata lahko zmanjšamo s postopki predelave (z odstranjevanjem delov rastlin, ki vsebujejo visoko količino nitrata, kot npr. korenin ali poškodovanih zunanjih listov v primeru zelja in solate). Ni pa znano, koliko se ga izgubi pri posameznem koraku predelave. Pogoji predelave in kuhanja lahko znižajo zaužitje nitrata iz zelenjave in jih je lažje kontrolirati kot pogoje, ki vplivajo na vsebnost nitrata v zelenjavi (Schuster in Lee, 1987). Del nitrata in nitrita se iz rastline izpere tudi med postopkom blanširanja, katerega se ponavadi poslužujemo pred zamrzovanjem (Kmieciak in sod., 2004). Pri tem pride do znatnih izgub koristnih komponent iz zelenjave (Gierschner in Hammes, 1991).

### 2.3.4 N-nitrozo spojine

N-nitrozo spojine se delijo na dve glavni skupini, in sicer na N-nitrozamine in N-nitrozamide (Kakuda in Gray, 1980). Splošni strukturni formuli za N-nitrozamine in N-nitrozamide sta prikazani na Sliki 9. N-nitrozamini so N-nitrozo derivati sekundarnih aminov, medtem ko so N-nitrozamidi derivati substituiranih amidov in podobnih spojin. Nitrozo spojine lahko vsebujejo tudi druge funkcionalne skupine in prav to jim daje različne kemične in fizikalne lastnosti (Hotchkiss in Cassens, 1987).



Slika 9: N-nitrozamini in N-nitrozamidi (Hotchkiss in Cassens, 1987)

Tvorbo N-nitrozaminov povzroči kemijska reakcija med nitrozirnimi sredstvi in sekundarnimi ali terciarnimi amini. Primarni amini reagirajo z nitrozirnimi sredstvi, pri čemer nastanejo nestabilni N-nitrozo derivati, ki razpadejo v olefine in alkohole. Dušikovi oksidi ( $NO_x$ ), pri katerih je dušik v +3 ali +4 oksidacijskem stanju, lahko služijo kot nitrozirna sredstva. Dobro preučeno nitrozirno sredstvo, ki je udeleženo pri tvorbi nitrozaminov v hrani, je dušikov (III) oksid ( $N_2O_3$ ). Le ta se brez težav oblikuje iz nitrita v kisli vodni raztopini, kar je prikazano v naslednji enačbi:



Dušikov (III) oksid se združi s prostim parom elektronov iz sekundarnih aminov preko reakcije nukleofilne substitucije, pri čemer se tvorijo N-nitrozamini:



Stopnja nitrozacije je odvisna od pH, nanjo pa vpliva tudi koncentracija amina in nitrita. Optimalni pH za nitrozacijo večine sekundarnih aminov se giblje med 2,5 in 3,5. Tudi terciarni amini reagirajo z nitrozirnimi sredstvi v kisli vodni raztopini. Ta mehanizem vključuje konverzijo terciarnih v sekundarne amine, kateri nato reagirajo z nitrozirnimi sredstvi in posledica tega je tvorba nitrozaminov (Scanlan, 2003).

#### 2.3.4.1 N-nitrozo spojine v živilih

Ljudje so izpostavljeni majhnim količinam nitrozo spojin iz različnih virov, med katerimi je tudi hrana, in prav to je vodilo k raziskavam njihovih nahajanj, formacije in biološke aktivnosti. Nitrozo spojine se lahko tvorijo znotraj telesa, zato na količino in tip nastalega nitrozamina v veliki meri vpliva prehrana. Že dolgo časa je znano, da nitrit v kombinaciji z drugimi amini tvori N-nitrozamine (Hotchkiss in Cassens, 1987).

N-nitrozamini se nahajajo v različnih živilih, in sicer predvsem v mesnih in ribjih izdelkih, v žitnih izdelkih, gobah, alkoholnih pijačah, rženem kruhu, siru, mleku in sojinem olju (Kakuda in Gray, 1980). Nitrozamine vsebujejo tudi drugi izdelki poleg hrane, in sicer kozmetični in tobačni produkti ter pesticidi. Tobačni produkti so zaradi vsebnosti nitrozaminov še posebej pomembni za človeka in njegovo izpostavljanje karcinogenim snovem (Scanlan, 2003).

Določene spojine hrane katalizirajo nitrozacijo, medtem ko jo druge inhibirajo (Hotchkiss in Cassens, 1987). Za inhibicijo tvorbe nitrozaminov v hrani se uporablja askorbinska kislina,  $\alpha$ -tokoferol in žveplov dioksid (Scanlan, 2003).

Nitrozamini se tvorijo v prekajenem in sušenem mesu zaradi dodajanja nitrata in nitrita med predelavo. Nitrat in nitrit se namerno dodajata med procesom razsoljevanja določenim mesnim izdelkom prav zaradi njune zmožnosti inhibicije rasti spor *Clostridium botulinum*, poleg tega pa dajeta tem vrstam živil tudi karakteristično barvo in aromo (Andrade in sod., 2002). Namreč nitrit reagira s pigmenti v mesu in mu tako daje relativno stabilno rožnato barvo, njegova funkcija pa je tudi preprečitev razvoja neprijetnih arom (Scanlan, 2003).

#### 2.3.4.2 N-nitrozo spojine v organizmu

Nitrozamini se ne nahajajo samo v nekaterih živilih in okoljih, ampak so jim izpostavljeni tudi ljudje preko normalnih fizioloških procesov. Nitrozamini (in verjetno tudi nitrozamidi), se lahko tvorijo v želodcu ljudi, in sicer z reakcijo med amini (ali amidi) in nitritom (Hotchkiss in Cassens, 1987). Koncentracije nitrata, katerim je izpostavljen človeški organizem, so dosti višje kot koncentracije nitrita. Kot posledica njegove bakterijske redukcije v določenih predelih telesa, je nitrat posredno glavni vir endogenega nitrita in tako prekursor N-nitrozo spojin (Leach, 1988).

Postaja pa tudi jasno, da prehrana lahko vpliva na tip in količino endogeno formiranih nitrozo spojin. Prehransko ravnotežje med nitratom in L-AK je lahko pomembno, saj je L-AK zmožna inhibiranja formacije endogenih nitrozaminov (Hotchkiss in Cassens, 1987).

### 2.3.5 Škodljivost in toksičnost nitrata, nitrita in N-nitrozo spojin

Prevelike količine nitrata, nitrita in nitrozaminov škodljivo vplivajo na spremembe v organizmu človeka. Še bolj od nitrata pa so toksični nitrozamini in nitrit (Markelc, 2002). Nekateri avtorji označujejo nitrit kot strup v prehrani človeka. Pri človeku povzroči spremembe motorične aktivnosti, komo, zmanjšan krvni tlak, širjenje arterij in ven, želodčne slabosti in bruhanje, povečano tveganje za raka in mutagene učinke (Sofos in

Raharjo, 1995). Interakcija nitrata s krvnim pigmentom lahko povzroči methemoglobinemijo (Andrade in sod., 2002). Absorbirani nitritni ion se namreč hitro oksidira v nitrat. Pri tem nastane methemoglobin, ki ne more prenašati kisika po telesu (Dennis in Wilson, 2003).

Večina znanstvenikov verjame, da so nitrozamini in druge N-nitrozo spojine v človeku sposobne povzročiti raka. Vendar v današnjem času še ni znano, koliko izpostavljanja različnim nitrozaminom je potrebno, da v človeški populaciji pride do nastanka raka (Scanlan, 2003). Bakterijska nitrozacija se lahko zgodi v kateremkoli delu telesa, kjer pride do infekcije, in prav to je lahko povezano z nastankom raka v teh delih telesa (Dennis in Wilson, 2003).

Rezultati mnogih raziskav so pokazali, da nitrat sam po sebi ni direktno povezan z razvojem želodčnega raka. Po drugi strani pa posredni dokazi prehranskih in epidemioloških študij kažejo na to, da prehrana z veliko solate in zelenjave ter posledično visoko vsebnostjo nitrata preprečuje nekatere vrste raka, še posebej želodčnega. Direktne dokazila o karcinogenosti nitrata ni, razen preko formacije nitrozaminov (McKnight in sod., 1999).

### **2.3.6 Metode določevanja nitrata in nitrita**

Nitrat in nitrit se v hrani lahko določata s pomočjo različnih metod. Večina jih izhaja iz metod, ki se uporabljajo za analizo vode. V večini primerih se nitrat konvertira do nitrita z ustrežno redukcijo in nato se določi slednji (Bender, 1993). Za kvantitativno determinacijo nitrata in nitrita je znanih nekaj metod, in sicer kinetične, potenciometrične, kromatografske, amperometrične, polarografske, kapilarna elektroforeza in spektrofotometrične metode (Andrade in sod., 2002).

Za uradno analitsko AOAC (angl. Association of Analytical Communities) metodo so sprejeli prav spektrofotometrično metodo, ki temelji na redukciji nitrata v nitrit, čemur sledi kolorimetrična določitev nitrita z Griessovo reakcijo. Ta metoda je primerna za kontrolo kvalitete hrane, in sicer za simultano določitev nitrata in nitrita v zelenjavi, mesu in njenih izdelkih (Andrade in sod., 2002).

Metoda HPLC zagotavlja občutljivo, direktno in simultano določitev nitrata in nitrita in ima številne prednosti pred tradicionalnimi kolorimetričnimi metodami. Za razliko od Cd-Griessove metode je HPLC metoda bolj točna in hitrejša, namreč čas analize pri HPLC je približno 10 minut, medtem ko je pri Cd-Griessovi metodi čas redukcije nitrata s kadmijem in razvitjem barve okrog 70 minut. Poleg tega HPLC metoda ne potrebuje toksičnih ali karcinogenih reduktantov ali kolorimetričnih reagentov (Schuster in Lee, 1987).

### 3 MATERIAL IN METODE

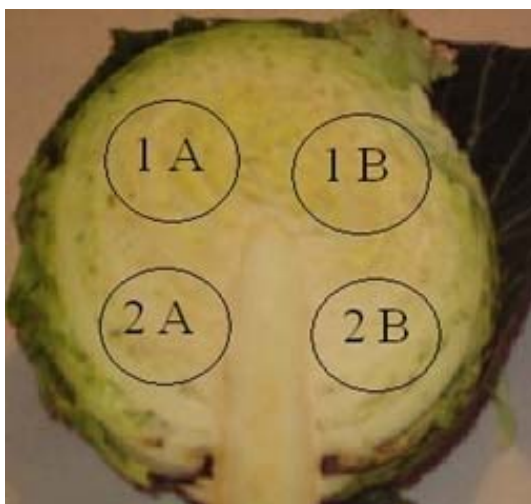
#### 3.1 MATERIAL

Kot vzorčni material smo izbrali zelje cv. Delphi in cv. Hinova iz polja Biotehniške fakultete, Oddelka za agronomijo. Nekaj zelja cv. Delphi je bilo razpokanega in tudi poškodovanega od škodljivcev, medtem ko je bilo zelje cv. Hinova po večini zdravo, vendar smo za analizo jemali le najbolj zdrave glave. Zelje je bilo pognojeno pred setvijo s 350,0 kg NPK na hektar. Potem pa še enkrat dognojevano s 30 kg dušika (N) na hektar.

##### 3.1.1 Priprava vzorcev

Na tri gredice smo posadili cv. Delphi, na druge tri gredice pa cv. Hinova. Na vsaki gredici je bilo po 18 glav zelja. Obeh sort nismo mogli analizirati istočasno, ker smo za vsak kultivar počakali, da je dosegel tehnološko zrelost, ki je nastopila v različnem časovnem obdobju. Pri vsakem kultivarju smo iz polja obrali le najlepše in najbolj zdrave glave za analizo in nadaljnje skladiščenje.

Da bi ugotovili vpliv skladiščenja na količino in razporeditev L-AK in nitrata v zelju, smo vzorce analizirali takoj po obiranju in po 120-ih dnevih skladiščenja pri 1 °C in 80 % relativni vlažnosti. Za vsak časovni interval smo uporabili 6 glav zelja določenega kultivarja. V določenih časovnih intervalih (0 in 120 dni) smo posamezne glave kultivarja očistili ter jih razdelili na zgornji in spodnji del zelja. Na Sliki 10 je razvidno, da smo pri posamezni glavi vedno vzeli po štiri vzorce, in sicer sta 1A in 1B paralelki zgornjega dela, medtem ko sta 2A in 2B paralelki spodnjega dela zelja. Glave določenega kultivarja smo tako označevali naprej po vrstnem redu. Lihe številke so pomenile zgornji del, medtem ko so sode številke pomenile spodnji del. Črki A in B pa sta pomenili paralelki zgornjega oz. spodnjega dela posamezne glave zelja.



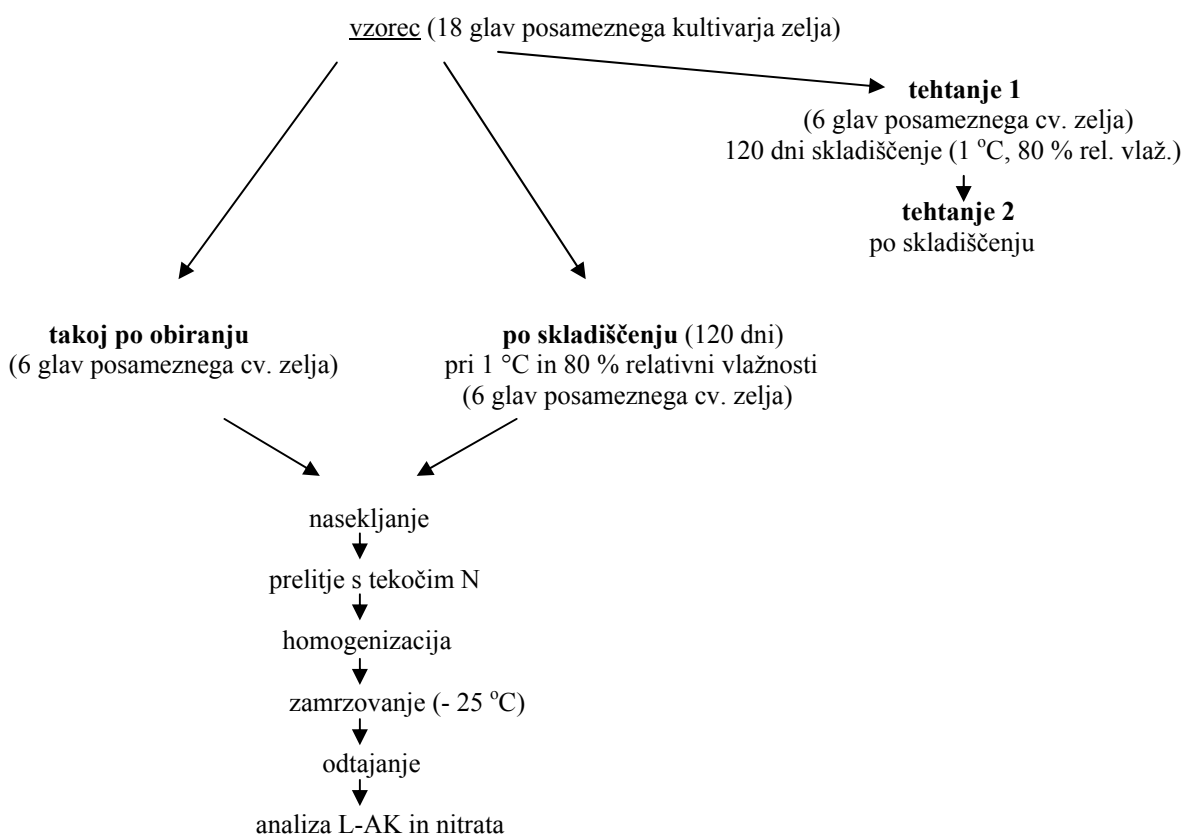
Slika 10: Deli zelja (1A, 1B, 2A, 2B), ki smo jih vzeli za analizo vsebnosti L-AK in nitrata

Posamezne glave določenega kultivarja zelja, ki smo ga imeli namen skladiščiti, smo prej stehtali, označili težo in dali na skladiščenje v hladilnico, kjer so bili pogoji normalne atmosfere (1 °C in 80 % relativna vlažnost). Po štirimesečnem skladiščenju smo



posamezne glave ponovno tehtali ter iz začetne in končne teže po skladiščenju izračunali procent izgube mase.

Vsak del smo nasekljali na majhne koščke in jih prelili s tekočim dušikom. Vzorce tega na hitro zamrznjenega nasekljanega zelja smo homogenizirali 3 min v prah z gospodinjskim sekljalnikom. Da bi analiza L-AK in nitrata vseh vzorcev potekala v enakih pogojih, smo vzorce dali v PE vrečke, jih označili z ustreznimi oznakami ter jih zamrznili (- 25 °C) do nadaljnje analize. Ko so bili vsi vzorci obeh kultivarjev zelja pripravljeni, smo jih odtalili na sobno temperaturo in začeli s postopkoma določanja L-AK in nitrata. Slika 11 prikazuje shemo priprave vzorca za nadaljnje analize.



Slika 11: Shema priprave vzorca za nadaljnje analize

### 3.1.2 Priprava reagentov za HPLC analizo

#### 3.1.2.1 Priprava standarda

V 100 ml bučko smo zatehtali 7 mg L-AK in dopolnili z 2 % metafosforno kislino do oznake. Drugi standard smo pripravili na ta način, da smo iz prvega standarda odvzeli 50 ml raztopine in mu dodali še 50 ml 2 % metafosforne kisline. Za pripravo tretjega standarda pa smo iz prvega standarda odvzeli 25 ml raztopine, kateri smo dodali še 75 ml

2 % metafosforne kisline. Na ta način smo dobili tri standarde, in sicer S<sub>3</sub> (1:1), S<sub>2</sub> (1:2) in S<sub>1</sub> (1:4).

### 3.1.2.2 Priprava 2 % metafosforne kisline

20 g metafosforne kisline (HPO<sub>3</sub>) smo zdrobili v tarilnici in dali v 1000 ml bučko ter jo z destilirano vodo dopolnili do oznake. Preden smo jo lahko začeli uporabljati, smo morali dobro premešati, da so se raztopili vsi kristali.

### 3.1.2.3 Priprava fosfatnega pufru (pH 2,9)

Za mobilno fazo smo uporabili fosfatni pufer s pH 2,9. Pripravili smo ga tako, da smo zatehtali 3,4836 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> in ga raztopili v destilirani vodi ter v 1 literski bučki dopolnili do oznake. To raztopino smo zlili v litrsko čašo in s H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> pripravili do pH 2,9.

## 3.3 METODE DELA

Analize za vsebnost L-AK smo opravili v laboratoriju Katedre za tehnologije, prehrano in vino, Biotehniške fakultete, Oddelka za živilstvo. Analize za vsebnost nitrata v zelju pa so bile narejene v laboratoriju Katedre za mikrobiologijo, Biotehniške fakultete, Oddelka za živilstvo.

### 3.3.1 Določanje izgube mase med skladiščenjem zelja

Primerno očiščeno in označeno zelje smo takoj po obiranju stehali in skladiščili (pri 1 °C in 80 % relativni vlažnosti). Po 120-ih dneh skladiščenja smo ga ponovno stehali. Z razliko v teži smo izračunali odstotek izgubljene mase med skladiščenjem.

$$\% \text{ izgubljene mase} = \left( \frac{\text{začetna masa} - \text{končna masa}}{\text{začetna masa}} \right) \times 100 \quad \dots (7)$$

### 3.3.2 Določanje vsebnosti nitrata v različnih delih zelja

V 100 ml časo smo zatehtali 5 g homogeniziranega vzorca in dodali še 50 ml destilirane vode, segrete na 70 °C. Vzorec smo premešali, čašo postavili v vodno kopel in inkubirali 15 minut pri 60-70 °C. Nato smo ohlajeno filtrirali in filtrat zlili v plastično epruveto z zamaškom in do končne analize zamrznili. Ko smo imeli zbrane vse vzorce, smo jih odotali na sobno temperaturo in po metodi številka G-016-91 določili količino nitrata v vzorcih. Dobljene rezultate smo preračunali na mg nitratnega iona na kg zelja.

Princip metode G-016-91: Nitrat reduciramo s hidrazinijevim sulfatom v nitrit. Nitrit določamo fotometrično s tvorbo rdečega azo-barvila. V prisotnosti nitritnega iona v kislem mediju poteče diazotiranje aminske skupine (-NH<sub>2</sub>) na sulfanilamidu. Nastala diazonijeva sol se veže na *N*-naftiletilen diamin diklorid, pri čemer nastane rdeče azo-barva, katere intenziteto merimo na aparatu TECHNICON AUTOANALYSER II pri 520 nm. Rezultat je vsota nitratnega in nitritnega dušika. Če želimo izraziti samo nitratni dušik, moramo odšteti predhodno določeni nitritni dušik (Kmecl in sod., 2005).

Preračunanje nitrata iz 55 g vzorca [ $\mu\text{g/ml}$ ] na 5 g vzorca zelja [ $\text{mg/kg}$ ]:

Izračun nitrata v 55 g vzorca (5 g zelja + 50 ml destilirane vode):

$$Y [\mu\text{g/ml}] = \frac{\text{Izmerjena vrednost} + 55\text{g}}{1000\text{g}} \quad \dots (8)$$

Izračun nitrata v 5 g vzorca zelja:

$$\text{nitrata v 5 g vzorca } [\text{mg/kg}] = \frac{Y + 1000\text{ g}}{5\text{g}} \quad \dots (9)$$

### 3.3.3 HPLC metoda določanja L-askorbinske kisline

#### 3.3.3.1 Priprava vzorca

V čašo smo zatehtali 10 g homogeniziranega vzorca, dodali še 30 g 2 % metafosforne kisline, premešali in inkubirali eno uro na sobni temperaturi. Vloga metafosforne kisline je stabilizacija L-AK, saj preprečuje njeno oksidacijo. Po eni uri smo filtrirali skozi filtrirni papir in del filtrata prelili v plastično epruveto z zamaškom in vzorec nato zamrznili (- 25 °C) do nadaljnje analize.

Odtaljene vzorce smo prelili v 1 ml epruvetke in jih centrifugirali 15 minut pri 14000 obratih. Supernatant smo nato filtrirali (prve mililitre filtrata zavržemo) skozi 0,45  $\mu\text{m}$  celulozacetatni filter Millipore v vialo. Tako pripravljene vzorce smo analizirali na HPLC.

#### 3.3.3.2 Kromatografski pogoji

Gradientna črpalka: Maxi Star, Knauer  
Kolona: Aminex HPX – 87 H, 300 x 7,8 mm; Bio-Rad  
Mobilna faza: 20 mM fosfatni pufer pH 2,9  
Pretek mobilne faze: 0,6 ml/min  
Volumen injiciranja: 20  $\mu\text{l}$   
Detektor: UV-VIS, 245 nm, Knauer

#### 3.3.3.4 Izračun koncentracije L-AK

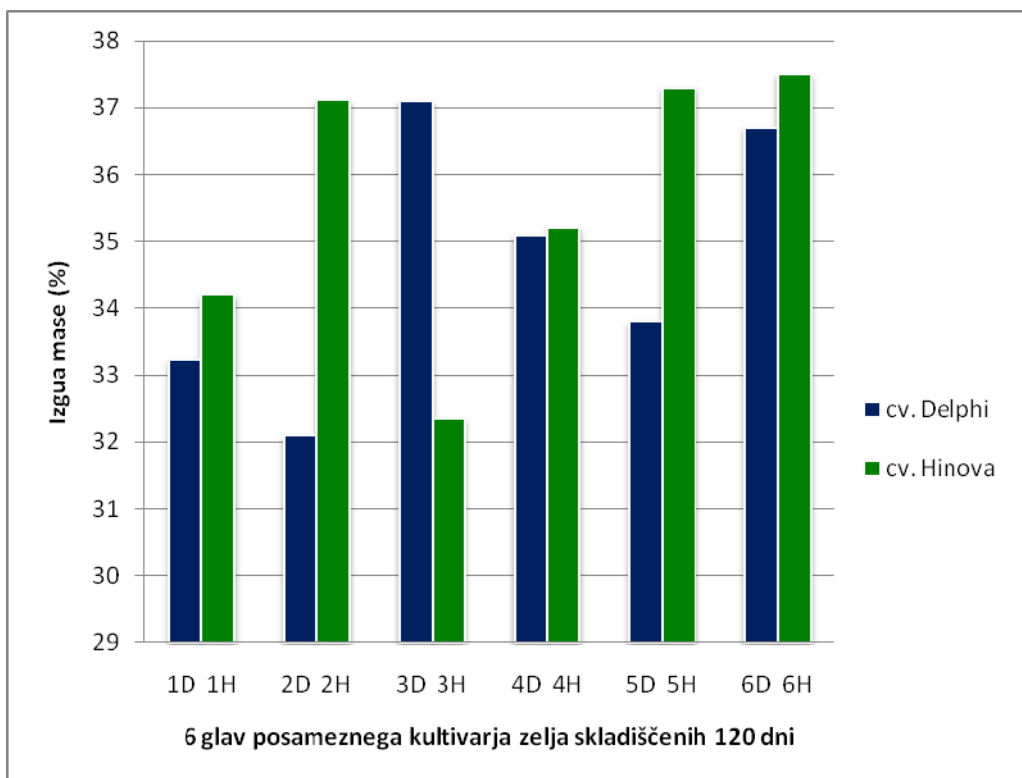
$$\text{Konc. L-AK v razt. } [\text{mg/l}] = \left( \frac{\text{površina vzorca}}{\text{površina standarda}} \right) \times \text{konc. standarda} \quad \dots (10)$$

## 4 REZULTATI

### 4.1 IZGUBA MASE ZELJA MED SKLADIŠČENJEM

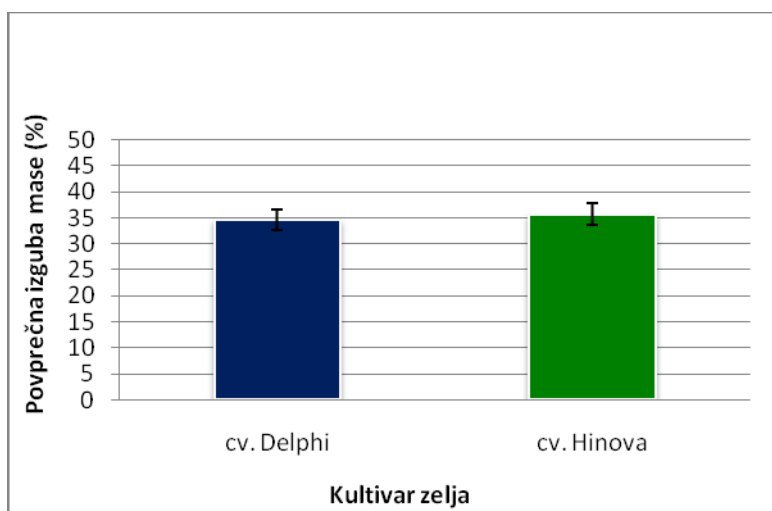
Preglednica 5: Masa pred skladiščenjem, masa po skladiščenju in izguba mase za 6 glav zelja posameznega kultivarja (cv. Delphi in cv. Hinova)

Vrsta kultivarja zelja (6 glav posameznega cv.)	Masa pred skladiščenjem (g)	Masa po skladiščenju (g)	Izgube mase (%)
<b>cv. DELPHI</b>			
1D	1020,0	681,0	33,2
2D	1060,0	720,0	32,1
3D	1190,0	749,0	37,1
4D	1110,0	721,0	35,1
5D	910,0	602,0	33,8
6D	1080,0	684,0	36,7
Povprečje	1061,7	692,6	34,7
Standardni odklon (SD)			± 1,9
<b>cv. HINOVA</b>			
1H	1700,0	1119,0	34,2
2H	1700,0	1069,0	37,1
3H	1550,0	1049,0	32,3
4H	2300,0	1490,0	35,2
5H	1600,0	1003,0	37,3
6H	2200,0	1375,0	37,5
Povprečje	1841,7	1184,2	35,6
Standardni odklon (SD)			± 2,1



Slika 12: Izguba mase (%) posamezne glave zelja cv. Delphi in cv. Hinova po skladiščenju 120 dni

Iz Slike 12 je razvidno, da je izguba mase pri zelju cv. Delphi po 120 dneh skladiščenja v razponu med 32,1 in 36,7 %, medtem ko pri zelju cv. Hinova izguba mase po 120 dneh skladiščenja niha med 32,3 in 37,5 %.



Slika 13: Povprečna izguba mase zelja cv. Delphi in cv. Hinova po skladiščenju 120 dni

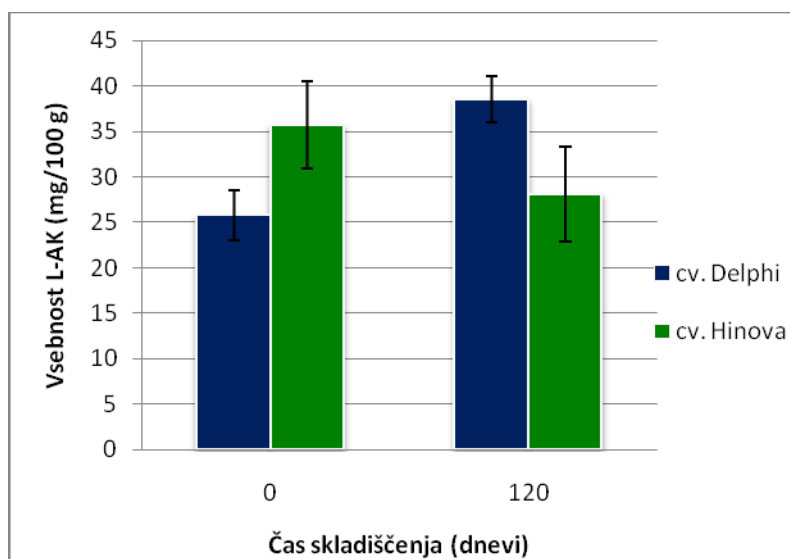
Iz Slike 13 razberemo, da je povprečna izguba mase pri zelju cv. Delphi po 120 dneh skladiščenja 34,7 % (SD  $\pm$  1,9), pri zelju cv. Hinova pa 35,6 % (SD  $\pm$  2,1).

## 4.2 POVPREČNA VSEBNOST L-ASKORBINSKE KISLINE IN NITRATA V ZELJU CV. DELPHI IN CV. HINOVA V ODVISNOSTI OD ČASA SKLADIŠČENJA

Preglednica 6: Povprečna vsebnost L-AK in nitrata v zelju cv. Delphi in cv. Hinova v odvisnosti od časa skladiščenja

Čas skladiščenja (dnevi)	Kultivar zelja	
	cv. Delphi ( $\pm$ SD)	cv. Hinova ( $\pm$ SD)
	<b>L-AK (mg/100 g)</b>	
0	25,8 ( $\pm$ 2,8)	35,7 ( $\pm$ 4,8)
120	38,5 ( $\pm$ 2,6)	28,1 ( $\pm$ 5,2)
	<b>NITRATI (mg/kg)</b>	
0	127,5 ( $\pm$ 44,3)	36,73 ( $\pm$ 26,9)
120	161,9 ( $\pm$ 50,0)	2,55 ( $\pm$ 3,9)

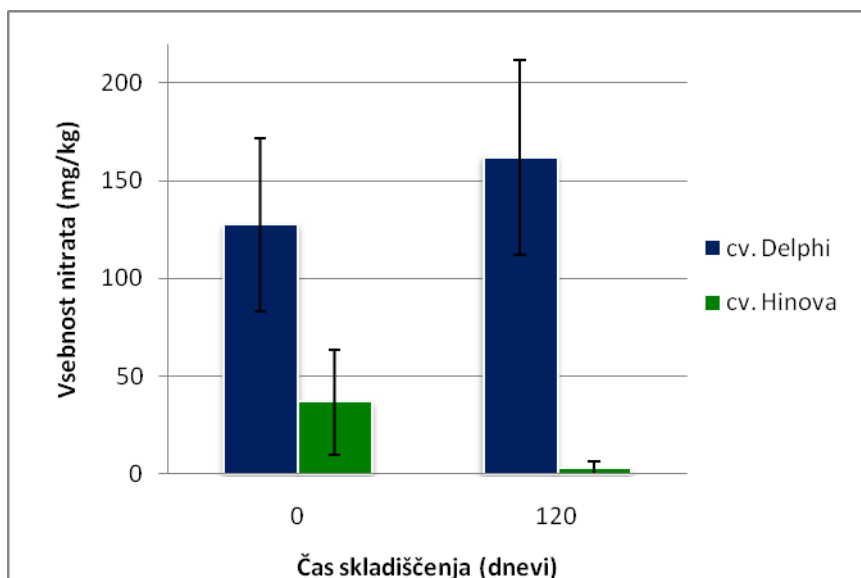
### 4.2.1 L-askorbinska kislina



Slika 14: Povprečna vsebnost L-AK v zelju cv. Delphi in cv. Hinova v odvisnosti od časa skladiščenja

Iz Slike 14 je razvidno, da je vsebnost L-AK takoj po obiranju in skladiščenju odvisna tudi od kultivarja zelja. Pri izračunu povprečne vsebnosti L-AK smo upoštevali povprečne vsebnosti L-AK zgornjega in spodnjega dela posameznega kultivarja zelja. Povprečna vsebnost L-AK v zelju cv. Delphi takoj po obiranju znaša 25,7 mg/100 g, medtem ko je v zelju cv. Hinova povprečna vsebnost L-AK za 28 % višja, in sicer znaša 35,7 mg/100 g. Po štirimesečnem skladiščenju se povprečna vsebnost L-AK v zelju cv. Delphi poveča za 33 %, medtem ko se v zelju cv. Hinova zmanjša za 21 %. Povprečna vsebnost L-AK v zelju cv. Delphi po štirimesečnem skladiščenju znaša 38,5 mg/100 g, v zelju cv. Hinova pa je nižja za 27 %, in sicer znaša 28,1 mg/100 g.

#### 4.2.2 Nitrat



Slika 15: Povprečna vsebnost nitrata v zelju cv. Delphi in cv. Hinova v odvisnosti od časa skladiščenja

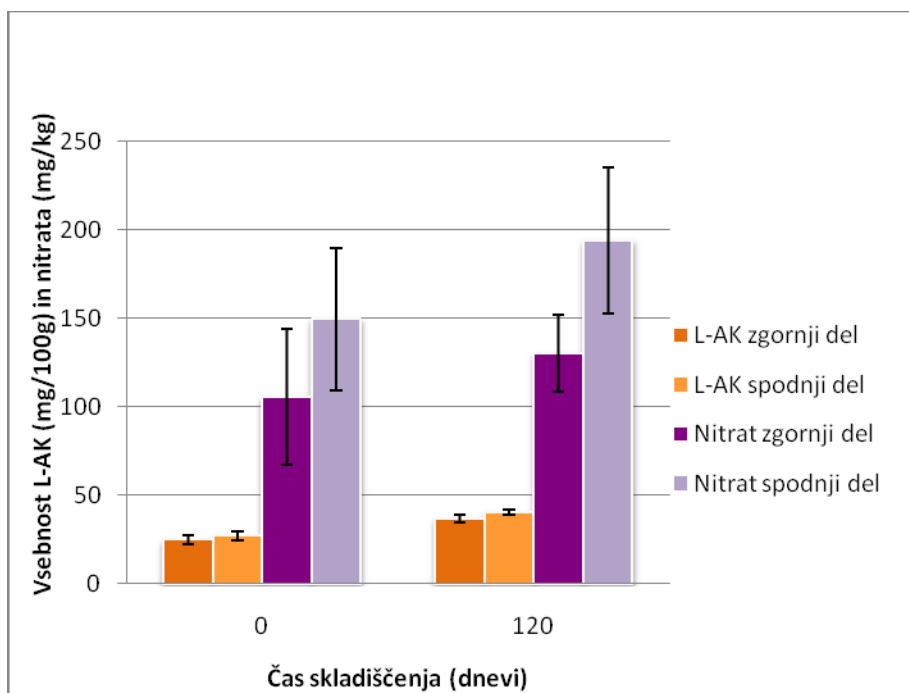
Iz Slike 15 razberemo, da je vsebnost nitrata takoj po obiranju in skladiščenju odvisna tudi od kultivarja zelja. Pri izračunu povprečne vsebnosti nitrata smo upoštevali povprečne vsebnosti nitrata zgornjega in spodnjega dela nitrata posameznega kultivarja. Povprečna vsebnost nitrata v zelju cv. Delphi takoj po obiranju znaša 127,5 mg/kg, medtem ko je v zelju cv. Hinova povprečna vsebnost nitrata nižja, in sicer znaša 36,7 mg/kg. Po štirimesečnem skladiščenju se povprečna vsebnost nitrata v zelju cv. Delphi poveča za 21 %, medtem ko se v zelju cv. Hinova zmanjša kar za 93 %. Povprečna vsebnost nitrata v zelju cv. Delphi po štirimesečnem skladiščenju znaša 161,9 mg/kg, v zelju cv. Hinova pa le 2,5 mg/kg.

#### 4.3 PRIMERJAVA POVPREČNIH VSEBNOSTI L-ASKORBINSKE KISLINE IN NITRATA V ZGORNJEM IN SPODNJEM DELU POSAMEZNIH KULTIVARJEV ZELJA V ODVISNOSTI OD ČASA SKLADIŠČENJA

Preglednica 7: Primerjava povprečnih vsebnosti L-AK in nitrata v zgornjem in spodnjem delu zelja (cv. Delphi in cv. Hinova) v odvisnosti od časa skladiščenja

Čas skladiščenja (dnevi)	Kultivar zelja			
	cv. Delphi (± SD)		cv. Hinova (± SD)	
	zgornji del	spodnji del	zgornji del	spodnji del
<b>L-AK (mg/100 g)</b>				
0	24,6 (± 2,5)	26,9 (± 2,7)	34,2 (± 5,4)	37,2 (± 3,7)
120	36,8 (± 2,2)	40,3 (± 1,5)	24,5 (± 3,3)	31,6 (± 4,3)
<b>NITRATI (mg/kg)</b>				
0	105,6 (± 38,1)	149,4 (± 40,4)	25,1 (± 10,6)	48,4 (± 33,3)
120	129,9 (± 21,7)	193,9 (± 41,4)	1,6 (± 3,2)	3,5 (± 4,6)

### 4.3.1 Cv. Delphi

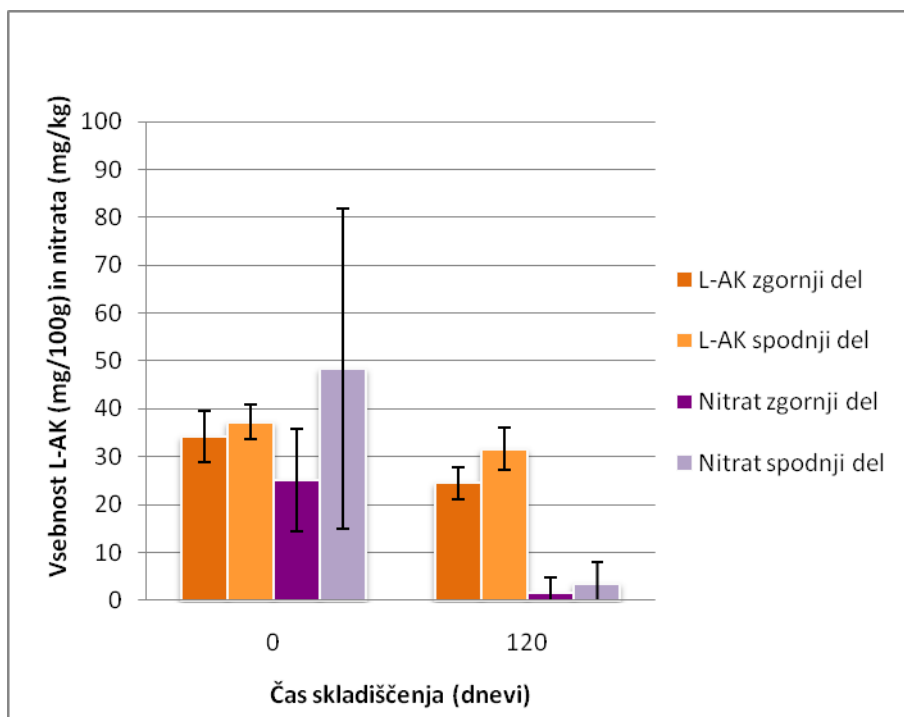


Slika 16: Primerjava povprečnih vsebnosti L-AK in nitrata v zgornjem in spodnjem delu zelja cv. Delphi v odvisnosti od časa skladiščenja

Iz Slike 16 razberemo, da L-AK in nitrat v zelju cv. Delphi po skladiščenju 120 dni narasteta tako v zgornjem kakor tudi v spodnjem delu zelja. Vsebnost L-AK v zgornjem delu zelja takoj po obiranju znaša 24,6 mg/100 g, medtem ko po 120 dneh skladiščenja naraste na 36,7 mg/100 g. V spodnjem delu zelja cv. Delphi vsebnost L-AK po 120 dneh skladiščenja naraste od 26,9 mg/100 g (takoj po obiranju) na 40,3 mg/100 g. Zgornji del zelja tega kultivarja vsebuje manjše količine L-AK in nitrata za razliko od spodnjega dela zelja, čeprav v vsebnosti L-AK v zgornjem in spodnjem delu zelja ni očitne razlike. Vsebnost nitrata v zgornjem delu zelja cv. Delphi takoj po obiranju znaša 105,6 mg/kg, medtem ko po 120 dneh skladiščenja naraste na 130,0 mg/kg. V spodnjem delu zelja cv. Delphi vsebnost nitrata po 120 dneh skladiščenja naraste od 149,4 mg/kg (takoj po obiranju) na 193,9 mg/kg.



### 4.3.2 Cv. Hinova

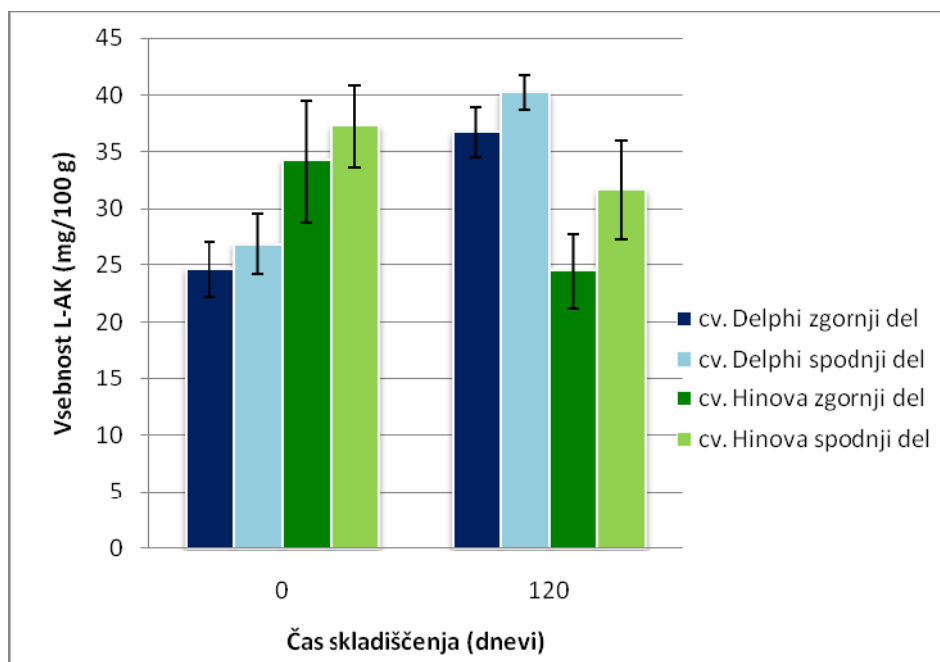


Slika 17: Primerjava povprečnih vsebnosti L-AK in nitrata v zgornjem in spodnjem delu zelja cv. Hinova v odvisnosti od časa skladiščenja

Iz Slike 17 razberemo, da se L-AK in nitrat v zelju cv. Hinova po skladiščenju 120 dni znižata tako v zgornjem kakor tudi v spodnjem delu zelja. Vsebnost L-AK v zgornjem delu zelja takoj po obiranju znaša 34,2 mg/100g, medtem ko po 120 dneh skladiščenja pade na 24,5 mg/100g. V spodnjem delu zelja cv. Hinova se vsebnost L-AK po 120 dneh skladiščenja zmanjša iz 37,2 mg/100g (takoj po obiranju) na 31,6 mg/100g. Tudi zgornji del zelja cv. Hinova vsebuje manjše količine L-AK in nitrata za razliko od spodnjega dela zelja. Vsebnost nitrata v zgornjem delu zelja cv. Hinova takoj po obiranju znaša 25,1 mg/kg, medtem ko po 120 dneh skladiščenja pade na le 1,6 mg/kg. V spodnjem delu zelja cv. Hinova se vsebnost nitrata po 120 dneh skladiščenja zmanjša iz 48,4 mg/kg (takoj po obiranju) na 3,5 mg/kg.

#### 4.4 PRIMERJAVA ZGORNJEGA IN SPODNJEGA DELA ZELJA CV. DELPHI IN CV. HINOVA GLEDE NA POVPREČNE VSEBNOSTI L-ASKORBINSKE KISLINE IN NITRATA V ODVISNOSTI OD ČASA SKLADIŠČENJA

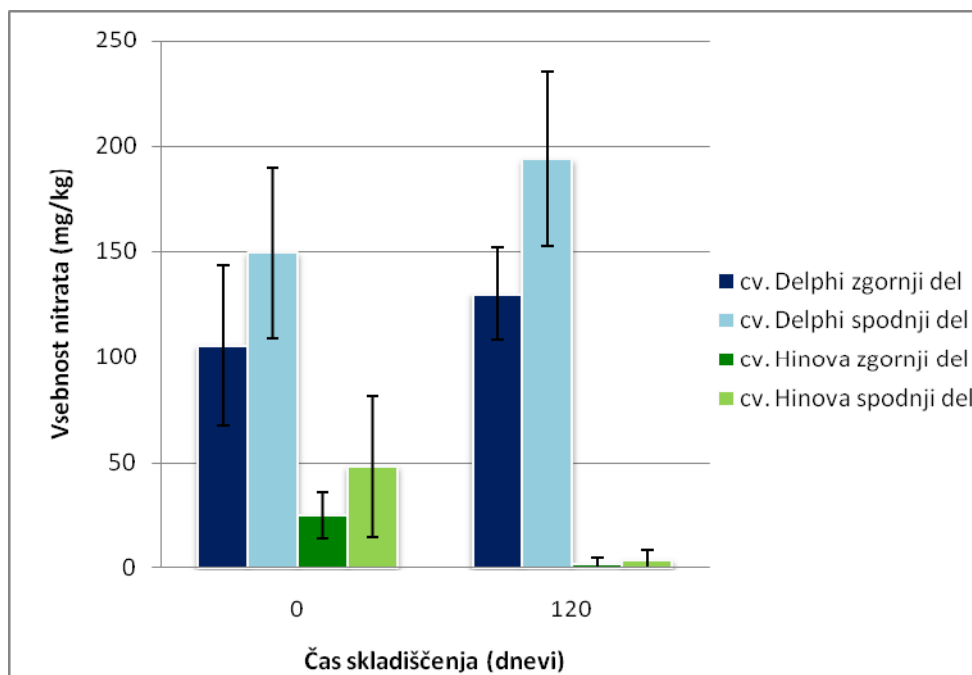
##### 4.4.1 Vsebnost L-askorbinske kisline



Slika 18: Primerjava povprečnih vsebnosti L-AK v zgornjem in spodnjem delu zelja cv. Delphi in cv. Hinova v odvisnosti od časa skladiščenja

Slika 18 nam kaže, da ima zelje cv. Hinova tako v zgornjem kakor tudi v spodnjem delu takoj po obiranju višjo vsebnost L-AK kot zelje cv. Delphi, medtem ko je po skladiščenju 120 dni ravno obratno. Takoj po obiranju zgornji del zelja cv. Delphi vsebuje 9,55 mg/100 g manj L-AK od zgornjega dela zelja cv. Hinova. Podobna razlika v vsebnosti L-AK takoj po obiranju je tudi med kultivarjema v spodnjem delu zelja, in sicer zelje cv. Hinova vsebuje za 10,4 mg/100 g več L-AK od zelja cv. Delphi. Po skladiščenju 120 dni se v zgornjem delu zelja cv. Delphi vsebnost L-AK zviša za 12,1 mg/100 g, v spodnjem delu pa za 13,4 mg/100 g. Pri zelju cv. Hinova pride po skladiščenju 120 dni do padca vsebnosti L-AK v obeh delih zelja, in sicer se v zgornjem delu zniža za 9,7mg/100 g, v spodnjem delu pa za 5,6 mg/100 g. Zelje cv. Delphi v primerjavi z zeljem cv. Hinova tako po skladiščenju 120 dni v zgornjem delu vsebuje za 12,3 mg/100 g, v spodnjem delu pa za 8,7 mg/100 g več L-AK.

#### 4.4.2 Vsebnost nitrata



Slika 19: Primerjava povprečnih vsebnosti nitrata v zgornjem in spodnjem delu zelja cv. Delphi in cv. Hinova v odvisnosti od časa skladiščenja

Iz Slike 19 razberemo, da ima zelje cv. Delphi tako v zgornjem kakor tudi v spodnjem delu takoj po obiranju in tudi po skladiščenju 120 dni višjo vsebnost nitrata v primerjavi z zeljem cv. Hinova. Enako kot z L-AK se pri obeh kultivarjih po skladiščenju 120 dni zgodi tudi z nitratom, in sicer se v obeh delih zelja cv. Delphi zviša, medtem ko se v zelju cv. Hinova zniža. Zelje cv. Delphi v primerjavi z zeljem cv. Hinova takoj po obiranju v zgornjem delu vsebuje za 80,5 mg/kg, v spodnjem delu pa za 101 mg/kg več nitrata. Po skladiščenju 120 dni se v zgornjem delu zelja cv. Delphi vsebnost nitrata zviša za 24,4 mg/kg, v spodnjem delu pa za 44,5 mg/kg. Pri zelju cv. Hinova pride po skladiščenju 120 dni do padca vsebnosti nitrata v obeh delih zelja, in sicer se v zgornjem delu zniža za 23,5 mg/kg, v spodnjem delu pa za 44,8 mg/kg. Še večja razlika v vsebnosti nitrata v obeh delih zelja pa nastane po skladiščenju 120 dni, in sicer zgornji del zelja cv. Delphi vsebuje za 128,4 mg/kg, spodnji del pa kar za 190,4 mg/kg nitrata več v primerjavi z zeljem cv. Hinova.

## 5 RAZPRAVA IN SKLEPI

### 5.1 RAZPRAVA

#### 5.1.1 Izguba mase med skladiščenjem zelja cv. Delphi in cv. Hinova

Pri ugotavljanju izgube mase med skladiščenjem obeh kultivarjev zelja smo ugotovili podobnosti, saj so bile izgube mase v enakem času skladiščenja zelo podobne. Pri zelju cv. Delphi je bila povprečna izguba mase po štirimesečnem skladiščenju 34,7 %, pri zelju cv. Hinova pa le malo večja, in sicer 35,6 %. Tudi Baloh (2002) poroča, da so neembalirani vzorci kitajskega kapusa v treh mesecih skladiščenja izgubili okrog 30 % mase, medtem ko so bile pri embaliranih vzorcih (krčljiva folija, PE vrečka) izgube mase minimalne (Baloh, 2002).

Izgube mase so precejšnje, saj skladiščenje brez embalažnega materiala privede do velikih izgub mase različnih kultivarjev zelja (Markelc, 2002). Na izgubo mase zelo vpliva tudi čas skladiščenja. Daljši ko je čas skladiščenja, večja je izguba mase. Poleg tega na izgubo mase vplivajo tudi pogoji skladiščenja, in sicer najbolj temperatura in relativna vlaga. V našem primeru je bila temperatura skladiščenja 1 °C, relativna vlaga pa 80 %.

V glavnem do izgub mase prihaja zaradi izgube vode, nekaj izgub pa nastane tudi zaradi mikrobiološkega kvara med skladiščenjem.

#### 5.1.2 Povprečna vsebnost L-askorbinske kisline in nitrata v zelju cv. Delphi in cv. Hinova glede na čas skladiščenja

##### 5.1.2.1 L-askorbinska kislina

V obeh kultivarjih, katera smo raziskovali, je prisotna različna vsebnost L-AK. Vsebnost L-AK v zelju cv. Delphi takoj po obiranju znaša 25,7 mg/100 g, v zelju cv. Hinova pa je višja za 10 mg/kg, in sicer znaša 35,7 mg/kg. Zanimivo je, da med štirimesečnem skladiščenjem v zelju cv. Delphi vsebnost L-AK naraste za 33 %, v zelju cv. Hinova pa se vsebnost L-AK zniža za 21 %. V zelju cv. Delphi namreč vsebnost L-AK po štirimesečnem skladiščenjem znaša 38,5 mg/100 g, v zelju cv. Hinova pa 28,1 mg/100 g. Na podlagi tega lahko zatrdimo, da je vsebnost L-AK po obiranju kakor tudi po skladiščenju odvisna tudi od kultivarja zelja.

Avtorja Černe in Vrhovnik (1992) navajata podatke za vsebnost vitamina C v belem zelju v intervalih od 20-100 mg/100 g. Vsebnost vitamina C smo primerjali tudi s hrvaškimi prehranskimi tablicami (Kulier, 1996), ki navajajo, da je povprečna vsebnost vitamina C za belo zelje 45,8 mg/100 g. Rezultati analiz vsebnosti vitamina C v diplomskem delu Kobovc (2000) so bili v intervalu 30,91-54,71 mg/100 g zelja. Iz vseh teh primerjav lahko sklepamo, da je v obeh naših kultivarjih vsebnost L-AK podobna, seveda če ne upoštevamo DHAK, ki je nismo določali.

Na naše rezultate za vsebnost L-AK v obeh raziskanih kultivarjih zelja takoj po obiranju in tudi po skladiščenju vplivajo številni dejavniki, o katerih razpravljajo tudi številni drugi avtorji.

Vsebnost vitamina C ne variira samo med različnimi vrstami zelenjave, ampak lahko variira tudi znotraj posamezne sorte zelenjave (Favell, 1998). Na vsebnost vitamina C v sadju in zelenjavi lahko vplivajo različni faktorji pred, med in po obiranju. Med te faktorje prištevamo sorto, genotipske razlike, klimatske pogoje pred obiranjem, način gojenja in obdelovanja, zrelost pri obiranju, način obiranja, postopki tretiranja po obiranju in pogoji skladiščenja (Lee in Kader, 2000; Podsedek, 2007).

Največ vitamina C je v zelenjavi in sadju, oziroma kot navajajo nekateri avtorji, v svežih in hitro rastočih delih rastlin. Tako je bilo tudi v obeh naših raziskanih kultivarjih zelja, saj je bila vsebnost L-AK večja v spodnjem delu zelja.

Tudi temperatura je pomemben faktor, ki vpliva na razgradno stopnjo L-AK. Nižje temperature lahko inhibirajo razgradnjo L-AK in tako omejijo akumulacijo različnih razgradnih produktov (Rodriguez in sod., 1991; Yuan in Chen, 1998). Skladiščenje zelja malo nad 0 °C vodi k pomladitvi in posledično ponovne rasti in brstenja. Med pripravo na novo rast pride do translokacije metabolitov iz zunanjih listov v sredino zelja. Dolgotrajno skladiščenje pa je pogosto povezano z boleznimi, ki jih povzročajo plesni (Hounscome in sod., 2009).

Na splošno lahko rečemo, da nižja kot je intenzivnost svetlobe med rastjo, nižja je tudi vsebnost L-AK v rastlinskih tkivih (Lee in Kader, 2000).

V zelju cv. Hinova je prišlo po štirimesečnem skladiščenju do padca vsebnosti L-AK. To lahko razlagamo s trditvijo, da nasplošno prihaja v sadju in zelenjavi do postopnega zniževanja vsebnosti L-AK, če trajanje ali temperatura skladiščenja naraščata. Vsebnost antioksidantov, med njimi tudi vitamina C, je med daljšim skladiščenjem belega zelja odvisna od staranja po obiranju, življenjskega kroga (zelje je dvoletna rastlina) in odgovora na infekcijo s plesnijo. Staranje po obiranju povzroči stres zaradi poškodb pri obiranju kakor tudi prekinitev oskrbe z energijo, hranili in hormoni. To povzroči produkcijo etilena in prostih radikalov. Funkcija antioksidantov je odstranjevanje prostih radikalov, ki nastajajo med staranjem. Prav zato se je vsebnost antioksidantov (tudi L-AK) v zelju cv. Hinova med prvimi meseci skladiščenja znižala. V zelju cv. Delphi pa se zgodi ravno obratno, in sicer se je vsebnost L-AK po štirimesečnem skladiščenju povečala. Pri skladiščenju malo nad 0 °C in ustrezni relativni vlažnosti (80 %) lahko ob določenem času (ko zelje preneha rasti in vstopi v speče stanje z zmanjšano stopnjo metabolizma) skladiščenja pride do pomladitve rastline, ponovne rasti in brstenja, saj je zelje dvoletna rastlina. Vsebnost L-AK v zelju se torej lahko med daljšim skladiščenjem zaradi priprave na novo rast poveča. Sklepamo, da se je to zgodilo tudi pri skladiščenju zelja cv. Delphi.

### 5.1.2.2 Nitrat

Tudi v tem primeru smo prišli do zaključka, da se vsebnosti nitrata v zelju razlikujejo tudi glede na kultivar zelja, saj je v zelju cv. Delphi in cv. Hinova prisotna različna vsebnost nitrata. Ugotovili smo namreč, da je povprečna vsebnost nitrata v zelju cv. Hinova takoj po obiranju kakor tudi po štirimesečnem skladiščenju manjša kot v zelju cv. Delphi.

Vsebnost nitrata v zelju cv. Delphi takoj po obiranju znaša 127,5 mg/kg, v zelju cv. Hinova pa je nižja za 90,8 mg/kg, in sicer znaša 36,7 mg/kg. Med štirimesečnem skladiščenjem v zelju cv. Delphi vsebnost nitrata naraste za 21%, v zelju cv. Hinova pa se vsebnost nitrata zniža kar za 93 %. V zelju cv. Delphi namreč vsebnost nitrata po štirimesečnem skladiščenjem znaša 161,9 mg/kg, v zelju cv. Hinova pa le 2,5 mg/kg.

Različni avtorji navajajo, da posamezne sorte zelja lahko vsebujejo do 2500 mg/kg nitrata (Gierschner in Hammes, 1991). Literaturni vir (Scharpf, 1991) navaja maksimalno dovoljeno vsebnost nitrata 875 mg/kg zelja. Po podatkih Kmetijskega inštituta Slovenije so posamezne meritve nitrata v 15 vzorcih glavnatega zelja nihale od 55,8 do 1090 mg/kg svežega vzorca, povprečna vsebnost nitrata v zelju pa je bila 498mg/kg (Gregorčič in sod., 2005). Medtem ko Walker (1990) navaja, da je povprečna vsebnost nitrata v zelju 712 mg/kg. Iz vseh teh literaturnih podatkov lahko sklepamo, da ima zelje cv. Delphi nizko povprečno vsebnost nitrata (127 mg/kg), medtem ko ima zelje cv. Hinova zelo nizko povprečno vsebnost nitrata (le 36,7 mg/kg), kar je mnogo pod povprečjem vsebnosti nitrata v zelju.

Nizka vsebnost nitrata tako v zelju cv. Delphi kakor tudi v zelju cv. Hinova je lahko posledica večih dejavnikov, in sicer so na tak rezultat najbolj vplivale ustrezne kultivacijske tehnike in ugodni klimatski pogoji. Naša dva kultivarja sta imela na razpolago dovolj svetlobe, saj sta rasla v obdobju, ko so bili dnevi zelo dolgi. Tudi temperature so bile ugodne za rast (marec-avgust), zato je bila akumulacija nitrata nizka. Oskrba z dušikom za oba kultivarja je bila ustrezna, saj ni prišlo do velike akumulacije nitrata, ampak so se iz večjega dela dušika, ki ga je zelje sprejelo, producirali proteini. Pomemben dejavnik za nizko vsebnost nitrata v obeh kultivarjih je bil tudi čas pobiranja, ki je bil pri obeh kultivarjih v obdobjih sončnega in suhega vremena.

Da vsebnost nitrata med posameznimi sortami in tudi med istimi sortami zelenjave zelo niha, lahko potrdimo tudi z navedbami nekaterih avtorjev. Razlika v akumulaciji nitrata med posameznimi sortami je lahko povezana z morfologijo glav zelja ali posredno s sprejemom in asimilacijo dušika v rastlino (Demšar, 2003). Tudi med vzorci iste sorte zelenjave obstaja velika variabilnost v vsebnosti nitrata, ki je odvisna od kultivacijske tehnike in klimatskih pogojev (Consalter in sod., 1992). Namreč preveč vlage, premalo svetlobe in previsoke temperature povzročijo, da se dušik, ki ga rastlina sprejme, ne vgrajuje v beljakovine, ampak ostaja v celičnem soku kot nitratni ion (Černe in Vrhovnik, 1992). Na vsebnost nitrata pa vpliva tudi starost rastline, saj imajo mlade rastline znatno več nitrata kot starejše (Consalter in sod., 1992).

Vseh dejavnikov, ki vplivajo na akumulacijo nitrata, pri pridelovanju ni mogoče predvideti, zato vsakoletne količine nitrata in nitrata izredno nihajo, manjše so v letih, ko imajo vrtnine izredno dobre razmere za razvoj (Černe in sod., 1997).

### **5.1.3 Primerjava povprečnih vsebnosti L-askorbinske kisline in nitrata v zgornjem in spodnjem delu posameznih kultivarjev zelja v odvisnosti od časa skladiščenja**

#### 5.1.3.1 Cv. Delphi

V posameznih delih (zgornji, spodnji del) zelja cv. Delphi so prisotne različne vsebnosti L-AK in nitrata. Ugotovili smo, da zelje cv. Delphi vsebuje takoj po obiranju in tudi po štirimesečnem skladiščenju v spodnjem delu večjo vsebnost tako L-AK kakor tudi nitrata. Med štirimesečnim skladiščenjem se poveča vsebnost L-AK in nitrata tako v zgornjem kakor tudi v spodnjem delu zelja.

#### 5.1.3.2 Cv. Hinova

V posameznih delih (zgornji, spodnji del) zelja cv. Hinova so prisotne različne vsebnosti L-AK in nitrata. Ugotovili smo, da tudi zelje cv. Hinova vsebuje takoj po obiranju in tudi po štirimesečnem skladiščenju v spodnjem delu večjo vsebnost tako L-AK kakor tudi nitrata. Med štirimesečnim skladiščenjem se zmanjša vsebnost L-AK in nitrata tako v zgornjem kakor tudi v spodnjem delu zelja.

### **5.1.4 Primerjava zgornjega in spodnjega dela zelja cv. Delphi in cv. Hinova glede na povprečne vsebnosti L-askorbinske kisline in nitrata v odvisnosti od časa skladiščenja**

#### 5.1.4.1 Vsebnost L-askorbinske kisline

V obeh kultivarjih kakor tudi v posameznih delih zelja (zgornji, spodnji del) je prisotna različna vsebnost L-AK. Ugotovili smo, da vsebuje zgornji kakor tudi spodnji del zelja cv. Delphi takoj po obiranju nižjo vsebnost L-AK kot zelje cv. Hinova. Obema kultivarjema je skupno to, da imata takoj po obiranju kakor tudi po štirimesečnem skladiščenju v spodnjem delu večjo vsebnost L-AK kot v zgornjem delu. Zgornji del zelja cv. Delphi je takoj po obiranju vseboval v povprečju 24,7 mg/100 g L-AK, spodnji del pa 26,9 mg/100 g. Za razliko od zelja cv. Delphi je bila takoj po obiranju v povprečju vsebnost L-AK v zgornjem delu zelja cv. Hinova 34,2 mg/100 g, v spodnjem delu pa 37,2 mg/100 g. Po štirimesečnem skladiščenju je imel zgornji in spodnji del zelja cv. Delphi višjo vsebnost L-AK kot zelje cv. Hinova, saj se med skladiščenjem vsebnost L-AK v posameznih delih (zgornji, spodnji del) zelja cv. Delphi zviša, medtem ko se pri zelju cv. Hinova zniža. Zgornji del zelja cv. Delphi je po štirimesečnem skladiščenju vseboval v povprečju 36,8 mg/100g, spodnji del pa 40,3 mg/100 g L-AK. V zgornjem delu zelja cv. Hinova je po štirimesečnem skladiščenju vsebnost L-AK padla na 24,5 mg/100 g, v spodnjem delu zelja pa na 31,6 mg/100 g.

V diplomski nalogi Baloh (2002) je ugotovljeno, da je v zelju cv. Caid in cv. Guard takoj po obiranju kakor tudi po skladiščenju 55 dni večja vsebnost L-AK v notranjosti. Po skladiščenju 55 dni L-AK malo naraste v obeh zgoraj omenjenih sortah zelja. V primerjavi z ugotovitvami iz Balohove diplomske naloge (2002) smo tudi mi prišli do zaključka, da je v zelju cv. Delphi in cv. Hinova takoj po obiranju kakor tudi po skladiščenju v spodnjem delu več L-AK kot v zgornjem. Razlika pa je v tem, da L-AK po skladiščenju naraste le v zelju cv. Delphi, medtem ko se v zelju cv. Hinova zniža.

#### 5.1.4.2 Vsebnost nitrata

V obeh kultivarjih pa niso prisotne le različne vsebnosti L-AK, ampak tudi nitrata, in sicer tako v posameznih glavah kot tudi v posameznih delih zelja (zgornji, spodnji del). Ugotovili smo, da vsebuje zelje cv. Delphi v zgornjem in spodnjem delu takoj po obiranju precej več nitrata kot zelje cv. Hinova. Za oba kultivarja velja, da imata takoj po obiranju kot tudi po štirimesečnem skladiščenju v spodnjem delu večjo vsebnost nitrata kot v zgornjem delu. Zgornji del zelja cv. Delphi je takoj po obiranju vseboval v povprečju 105,6 mg/kg nitrata, spodnji del pa 149,4 mg/kg. Na drugi strani pa je bila v zgornjem delu zelja cv. Hinova takoj po obiranju vsebnost nitrata v povprečju 25,1 mg/kg, v spodnjem delu pa 48,4 mg/kg. Tudi po štirimesečnem skladiščenju je imel zgornji in spodnji del zelja cv. Delphi še višjo vsebnost nitrata kot zelje cv. Hinova, saj se med skladiščenjem vsebnost nitrata v posameznih delih (zgornji, spodnji del) zelja cv. Delphi zviša, medtem ko se pri zelju cv. Hinova zniža. Zgornji del zelja cv. Delphi je po štirimesečnem skladiščenju vseboval v povprečju 130 mg/kg nitrata, spodnji del pa 193,9 mg/kg. V zgornjem delu zelja cv. Hinova je po štirimesečnem skladiščenju vsebnost nitrata padla kar na 1,6 mg/kg, v spodnjem delu zelja pa na 3,6 mg/kg.

V diplomski nalogi Markelc (2002) je navedeno, da je vsebnost nitrata v zelju zelo odvisna od kultivarja zelja. Namreč zelje cv. Caid vsebuje vsaj dvakrat več nitrata v vretenu in tudi v zunanjih listih v primerjavi z zeljem cv. Guard. Poleg tega je v obeh zgoraj navedenih kultivarjih vsebnost nitrata v vretenu večja kot v zunanjih listih. Po skladiščenju 53 dni se tako v zelju cv. Caid kot tudi cv. Guard vsebnost nitrata v vretenu zniža, medtem ko se v zunanjih listih zviša. Če primerjamo naše ugotovitve z diplomsko nalogo Markelc (2002), ugotovimo, da je tudi v zelju cv. Delphi precej več nitrata kot v zelju cv. Hinova in lahko potrdimo, da je vsebnost nitrata v zelju odvisna tudi od kultivarja zelja. Tudi mi smo ugotovili, da imata oba naša kultivarja večjo vsebnost nitrata v spodnjem kot v zgornjem delu zelja. Razlika je v spremembi vsebnosti nitrata v zgornjem in spodnjem delu zelja po skladiščenju. V zelju cv. Delphi po skladiščenju vsebnost nitrata tako v zgornjem kot tudi v spodnjem delu naraste, medtem ko pri zelju cv. Hinova pade.

Razliko v vsebnosti nitrata lahko razložimo s spremenljivo intenzivnostjo metabolnih procesov v različnih organih rastline (Kmieciak in sod., 2004). Vsebnost nitrata je v zelju cv. Delphi in zelju cv. Hinova večja v spodnjem delu (pri kocenu), manjša pa v zgornjem delu (zunanji listi). To lahko razložimo z večjo intenzivnostjo svetlobe v zgornjem delu zelja, kjer se producira več proteinov kot rezultat fotosinteze. V spodnjem delu zelja (pri kocenu) se zniža stopnja fotosinteze (pri kocenu) in v tem primeru se precej dušika, ki ga rastlina sprejme, ne vgrajuje v beljakovine, ampak ostaja v celičnih tekočinah in rastlinskem soku kot nitratni ion. Med skladiščenjem zelenjave vsebnost nitrata variira in



ne moremo osnovati nobenega pravila v povezavi s katerikoli uporabnim delom rastline, predhodnim tretiranjem pred zamrzovanjem ali temperaturo skladiščenja (Kmieciak in sod., 2004).

### **5.1.5 Povezava med nitratom in L-askorbinsko kislino v obeh kultivarjih zelja**

V naših raziskavah smo skušali ugotoviti tudi morebitno povezavo med vsebnostjo nitrata in L-AK v zelju. Predpostavili smo, da je vsebnost nitrata obratno sorazmerna z vsebnostjo L-AK v določeni vrsti oz. določenem delu zelja.

Našo hipotezo, da je vsebnost nitrata obratno sorazmerna z vsebnostjo L-AK v določeni sorti oz. določenem delu zelja, lahko ovržemo. Za določene dele zelja (zgornji, spodnji del) cv. Delphi smo namreč ugotovili, da kjer je več nitrata je tudi več L-AK in obratno. Na splošno enako velja tudi za zelje cv. Hinova, kjer pa je v treh vzorcih minimalno višja vsebnost L-AK v delih zelja, kjer je manjša vsebnost nitrata, kljub temu pa o obratni sorazmernosti še ne moremo govoriti. Za oba kultivarja velja, da imata v spodnjem delu zelja na splošno večjo vsebnost L-AK kakor tudi nitrata. S skladiščenjem v zelju cv. Delphi L-AK in nitrat narasteta, medtem ko se v zelju cv. Hinova znižata. Imeli smo dokaj majhno število preiskovanih vzorcev določenega kultivarja, zato menimo, da bi bilo za potrditev hipoteze oz. večjo zanesljivost rezultatov potrebno večje število analiziranih vzorcev.

### **5.1.6 Prehranski vidik rezultatov**

Iz naših rezultatov je razvidno, da imata hibrida cv. Delphi in cv. Hinova na splošno zelo nizko vsebnost nitrata, in sicer precej pod povprečjem vsebnosti nitrata v zelju iz literature, poleg tega pa vsebujeta tudi precej L-AK. Prav zaradi tega lahko rečemo, da sta iz zdravstvenega stališča zanimiva kultivarja.

Če gledamo iz prehranskega stališča, imajo vrtnine, ki imajo pri rasti nižjo oskrbo z dušikom in ki jih manj pogosto namakamo, prednost zaradi višje vsebnosti vitamina C in nižje vsebnosti nitrata (Lee in Kader, 2000).

Različni postopki predelave zelenjave, kot so kuhanje, blanširanje, konzerviranje, zamrzovanje, povzročijo znižanje vsebnosti vitamina C, drugih antioksidantov in njihovega učinka (Podsdek, 2007). Po drugi strani pa so pogoji predelave in kuhanja zelenjave tudi koristni, saj lahko znižajo zaužitje nitrata in jih je lažje kontrolirati kot pogoje, ki vplivajo na vsebnost nitrata v zelenjavi (Schuster in Lee, 1987). Priporočljivo je, da predvsem pri presni uporabi notranji del zelja (kocen) izrežemo, da ne zaužijemo prevelikih količin nitrata.

Nitrat sam po sebi zdravju ni škodljiv. Lahko pa se reducira do N-nitrozo spojin, ki za zdravje ljudi niso dobri, saj je večina N-nitrozo spojin karcinogenih. Zelje pa vsebuje tudi precejšnje količine vitamina C, ki inhibira nastanek N-nitrozo spojin tako v organizmu ljudi kot tudi v samih rastlinah (Hotchkiss in Cassens, 1987). Po higienskih priporočilih naj 70 kg težka oseba ne bi zaužila več kot 250-300 mg nitrata na dan (Gierschner in Hammes, 1991).

## 5.2 SKLEPI

- Povprečna izguba mase po štirimesečnem skladiščenju pri zelju cv. Delphi znaša 34,5 %, medtem ko pri zelju cv. Hinova 35,6 %.
- V posameznih delih zelja se vsebnosti L-AK in nitrata razlikujejo. Različni kultivarji zelja imajo različno vsebnost L-AK in nitrata. Povprečna vsebnost L-AK v zelju cv. Delphi takoj po obiranju znaša 25,7 mg/100 g, medtem ko povprečna vsebnost L-AK pri zelju cv. Hinova znaša 35,7 mg/100 g.
- Po štirimesečnem skladiščenju se povprečna vsebnost L-AK v zelju cv. Delphi poveča za 12,8 mg/100 g, in sicer znaša 38,5 mg/100 g, medtem ko se v zelju cv. Hinova povprečna vsebnost L-AK zniža za slabih 8 mg/100 g, in sicer na 28,1 mg/100 g.
- Oba kultivarja zelja vsebujeta nizko vsebnost nitrata, mnogo pod povprečno vsebnostjo nitrata v zelju. Povprečna vsebnost nitrata v zelju cv. Delphi znaša takoj po obiranju 127,5 mg/kg, pri zelju cv. Hinova pa 36,7 mg/kg.
- Pri obeh kultivarjih je tako vsebnost nitrata kakor tudi L-AK takoj po obiranju kot tudi po štirimesečnem skladiščenju v spodnjem delu zelja večja kot v zgornjem delu. V zelju cv. Delphi se med štirimesečnim skladiščenjem poveča vsebnost L-AK in nitrata tako v zgornjem kakor tudi v spodnjem delu. Pri zelju cv. Hinova se obe vsebnosti po štirimesečnem skladiščenju znižata.
- Našo hipotezo, da je vsebnost nitrata obratno sorazmerna z vsebnostjo L-AK v določeni sorti oz. določenem delu zelja, lahko ovržemo.
- Z izbiro primernih kultivarjev in primernih pridelovalnih postopkov lahko bistveno vplivamo na vsebnost nitrata in L-AK in tako povečamo prehransko vrednost raziskovanih vzorcev.

## 6 POVZETEK

Zelenjava poleg koristnih snovi za telo vsebuje tudi nekoristne, med katerimi so tudi nitrati in prav zelenjava je glavni vir nitratov. Namreč večja koncentracija nitrata v zelenjavi je običajno posledica uporabe prevelikih količin dušičnih gnojil. Nitrat se tako začne akumulirati v rastlini, saj rastline ne morejo porabiti vsega nitrata in ga pretvoriti v beljakovine, zato pribitek nitrata zaužijemo sami. V večjih koncentracijah sta nitrat in nitrit za človeka lahko nevarna, saj se lahko nitrat reducira do nitrita, ki nato lahko reagira s sekundarnimi amini in na tak način se tvorijo nitrozamini, ki so toksični, mutageni in karcinogeni. Prehrana torej lahko vpliva na tip in količino endogeno formiranih N- nitroso spojin. Prav zato je uživanje vitamina C in prehransko ravnotežje med nitratom in askorbinsko kislino pomembno, saj askorbinska kislina lahko inhibira nastajanje toksičnih nitrozaminov.

V nalogi smo raziskovali razporeditev nitrata in L-AK v različnih delih zelja (zgornji del, spodnji del), vpliv različnih kultivarjev na vsebnost nitrata in L-AK v zelju takoj po obiranju in štirimesečnem skladiščenju ter izgubo mase v posameznih rastlinah po štirimesečnem skladiščenju. Poleg tega smo skušali poiskati tudi morebitno povezavo med vsebnostjo L-AK in nitrata v posameznih rastlinah.

V vzorcih zelja cv. Delphi in cv. Hinova, ki smo jih vzgojili na poskusnem polju Biotehniške fakultete, smo analizirali vsebnost nitrata in L-AK takoj po obiranju in štirimesečnem skladiščenju (1°C in 80 % relativna vlažnost). Posamezne rastline obeh kultivarjev smo pred skladiščenjem stehali in jih zopet stehali po štirimesečnem skladiščenju ter iz tega izračunali izgubo mase. Analize smo opravili v posameznih delih rastline, in sicer v zgornjem in spodnjem delu zelja. Vsebnost nitrata v vzorcih smo določevali spektrofotometrično po metodi številka G-016-91 (redukcija nitrata do nitrita s hidrazin/bakrovim sulfatom, sledi tvorba diazo spojin in obarvanje z N-naftiletilen diamin dikloridom), medtem ko smo vsebnost L-AK v vzorcih določevali z metodo HPLC.

Večje razlike med kultivarjema v izgubi mase po štirimesečnem skladiščenju ni opaziti. Povprečna izguba mase po štirimesečnem skladiščenju pri zelju cv. Delphi znaša 34.5 %, medtem ko pri zelju cv. Hinova 35.6 %.

Povprečna vsebnost L-AK v zelju cv. Delphi takoj po obiranju znaša 25,7 mg /100 g, medtem ko je povprečna vsebnost L-AK pri zelju cv. Hinova za 10 mg/100 g višja, in sicer znaša 35,7 mg/100 g. Za oba kultivarja je značilna tudi nizka vsebnost nitrata, in sicer povprečna vsebnost nitrata v zelju cv. Delphi znaša 127,5 mg/kg, v zelju cv. Hinova pa 36,7 mg/kg, kar je sploh zelo nizka vrednost za vsebnost nitrata v zelju v primerjavi s podatki iz literature.

Po štirimesečnem skladiščenju se povprečna vsebnost L-AK v zelju cv. Delphi dvigne na 38,5 mg/100 g, v zelju cv. Hinova pa na 28,1 mg/100 g. Po štirimesečnem skladiščenju se povprečna vsebnost nitrata v zelju cv. Delphi poveča, in sicer na 161,9 mg/kg, medtem ko se v zelju cv. Hinova povprečna vsebnost nitrata kar precej zniža, in sicer na 2,6 mg/kg.

Pri obeh kultivarjih je takoj po obiranju kot tudi štirimesečnem skladiščenju vsebnost nitrata kakor tudi L-AK v spodnjem delu zelja večja kot v zgornjem delu. V zelju cv. Delphi se med štirimesečnim skladiščenjem poveča vsebnost L-AK in nitrata tako v zgornjem kakor tudi v spodnjem delu, medtem ko se pri zelju cv. Hinova obe vsebnosti med štirimesečnim skladiščenjem znižata.

V zelju cv. Delphi takoj po obiranju povprečna vsebnost L-AK v spodnjem delu znaša 26,9 mg/100 g, v zgornjem delu pa 24,7 mg/100 g, medtem ko povprečna vsebnost nitrata v notranjem delu znaša 149,4 mg/kg, v zgornjem delu pa 105,6 mg/kg. Po štirimesečnem skladiščenju povprečna vsebnost L-AK in nitrata v zelju cv. Delphi naraste, in sicer znaša povprečna vsebnost L-AK v spodnjem delu zelja 40,3 mg/100 g, v zgornjem delu pa 36,8 mg/100 g, medtem ko povprečna vsebnost nitrata v spodnjem delu zelja znaša 193,9 mg/kg, v zunanjem delu pa 130,0 mg/kg.

V zelju cv. Hinova takoj po obiranju povprečna vsebnost L-AK v spodnjem delu znaša 37,2 mg/100 g, v zgornjem delu pa 34,2 mg/100 g, medtem ko povprečna vsebnost nitrata v spodnjem delu znaša 48,4 mg/kg, v zgornjem delu pa 25,1 mg/kg. Po štirimesečnem skladiščenju povprečna vsebnost L-AK malo naraste, in sicer na 31,6 mg/100g v spodnjem delu in na 24,5 mg/100 g v zgornjem delu zelja, medtem ko povprečna vsebnost nitrata v spodnjem delu pade na 3,6 mg/kg in v zgornjem delu le na 1,6 mg/kg.

Na koncu lahko potrdimo, da imajo različni kultivarji različno vsebnost nitrata in L-AK in da se v posameznih delih zelja (zgornji, spodnji del) vsebnosti L-AK in nitrata razlikujejo. V našem primeru lahko hipotezo, da je vsebnost nitrata obratno sorazmerna z vsebnostjo L-AK v določenem kultivarju zelja oz. določenem delu rastline, ovržemo, kar pa še ne pomeni, da to za nekatere druge kultivarje zelja ne velja.

## 7 VIRI

- Albrecht J.A., Schafer H.W., Zottola E.A. 1990. Relationship of total sulfur to initial and retained ascorbic acid in selected cruciferous and noncruciferous vegetables. *Journal of Food Science*, 55, 1: 181-183
- Amr A., Hadidi N. 2001. Effect of cultivar and harvest date on nitrat and nitrite content of selected vegetables grown under open field and greenhouse conditions in Jordan. *Journal of Food Composition and Analysis*, 14: 59-67
- Andrade R., Viana C.O., Guadagnin S.G., Reyes F.G.R., Rath S. 2002. A flow-injection spectrophotometric method for nitrate and nitrite determination through nitric oxide generation. *Food Chemistry*, 80: 597-602
- Baloh N. 2002. Vsebnost vitamina C v kitajskem kapusu in zelju. Diplomsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 50 str.
- Ball G.F.M. 1998. Bioavailability and analysis of vitamins in foods. London, Chapman and Hall: 517-560
- Basu T.K., Dickerson J.W.T. 1996. Vitamins in human health and disease. Wallingford, CAB International: 125-146
- Bender D.A. 1993. Ascorbic acid. V: *Encyclopaedia of food science, food technology and nutrition*. Vol. 1. Macrae R., Robinson R.K., Sadler M.J. (eds.). London, Academic Press: 269-280
- Burge J.C., Flancbaum L., Holcombe B. 1994. Copper decreases ascorbic acid stability in total parenteral nutrition solutions. *Journal of the American Dietetic Association*, 94, 7: 777-779
- Carter J., Bosma S. 1974. Effect of fertilizer and irrigation on nitrate-nitrogen and total nitrogen in potato tubers. *Agronomy Journal*, 66, 2: 263-266
- Conklin P.L., Norris S.R., Wheeler G.L., Williams E.H., Smirnoff N., Last R.L., 1999. Genetic evidence for the role of GDP-mannose in plant ascorbic acid (vitamin C) biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96, 7: 4198-4203
- Consalter A., Rigato A., Clamor L., Giandon P., 1992. Determination of nitrate in vegetables using an ion-selective electrode. *Journal of Food Composition and Analysis*, 5: 252-256
- Černe M., Vrhovnik I. 1992. Vrtnine: vir zdravja in naša hrana. Ljubljana, Kmečki glas: 219 str.
- Černe M. 1998. Kapusnice. Ljubljana, ČZD Kmečki glas: 173 str.

- Černe M. 1999a. Kapusnice. *Sodobno kmetijstvo*, 32, 11: 507-511
- Černe M. 1999b. Pridelovanje zelja in ohrovta. *Sodobno kmetijstvo*, 32, 11: 523-524
- Černe M., Žnidaršič-Pongrac V., Kmecl V., Pezdirc A., Flisar-Novak Z., Belec D., Kos-Zidar S. 1997. Nitrati, nitriti in NH<sub>4</sub> v vrtninah. V: *Tehnologija-Hrana-Zdravje*. Knjiga del: 1. slovenski kongres o hrani in prehrani z mednarodno udeležbo, Bled, 21-25. april 1996. Raspor P., Pitako D., Hočevar I. (ur.). Ljubljana, Društvo živilskih in prehranskih strokovnih delavcev Slovenije: 555-562
- Čirić M. 1986. Pedologija. Sarajevo, SOUR Svjetlost: 57-57, 77-80
- Dahn H., Loewe L., Bunton C.A. 1960. Über die Oxidation von Ascorbinsäure durch salpetrige Säure. VI. Übersicht und Diskussion der Ergebnisse. *Helvetica Chimica Acta*, 43: 320-333
- Demšar J. 2003. Zmanjševanje vsebnosti nitrata v aeroponsko gojeni solati (*Latuca sativa* Varsity) s prilagajanjem koncentracije hranilne raztopine svetlobnim razmeram. Doktorska disertacija. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo: 6-28
- Dennis M.J., Wilson L.A. 2003. Nitrates and nitrites. V: *Encyclopedia of food sciences and nutrition*. Vol. 4. 2<sup>nd</sup> ed. Caballero B., Trugo L.C., Finglas P.M. (eds.). London, Academic Press: 4136-4141
- Favell D.J. 1998. A comparison of the vitamin C content of fresh and frozen vegetables. *Food Chemistry*, 62, 1: 59-64
- Fordham R., Hadley P. 2003. Cabbage and related vegetables. V: *Encyclopedia of food sciences and nutrition*. Vol. 9. 2<sup>nd</sup> ed. Caballero B., Trugo L.C., Finglas P.M. (eds.). London, Academic Press: 5932-5936
- Gierschner K., Hammes W.P. 1991. Microbial reduction of nitrate from vegetable juices and other liquid vegetable products. *Fruit Processing*, 1, 5: 65-68
- Golob T. 1987. Določevanje vitamina C v krompirju – primerjava encimske metode s klasičnimi. Magistrsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 3-4, 7-13, 15, 17, 24-29, 39
- Gregorčič A., Baša Česnik H., Kmecl V., Velikonja Bolta Š., Sušin J. 2005. Poročilo o strokovnih nalogah s področja fitofarmaceutskih sredstev za leto 2004. Ljubljana, Kmetijski inštitut Slovenije.  
<http://www.furs.si/svn/ffs/files/PorociloFFSza2004.pdf> (oktober 2009): 48 str.
- Habben J. 1973. Quality constituents of carrots *Daucus carota* L., as influenced by nitrogen and potassium fertilization. *Acta Horticulturae*, 29: 295-304

- Hancock R.D., Viola R. 2002. Ascorbic acid biosynthesis in higher plants and mikro-organisms. SCRI Annual Report 2001/2002. Dundee, Scottish Crop Research Institute. <http://www.scri.sari.ac.uk/SCRI/upload/annualreportdocuments/02Indiv/20Ascorb.pdf> (11. jan. 2005): 135-139
- Hounscome N., Hounscome B., Tomos D., Edwards-Jones G. 2009. Changes in antioxidant compounds in white cabbage during winter storage. *Postharvest Biology and Technology*, 52: 173-179
- Hotchkiss J.H., Cassens R.G. 1987. Nitrate, nitrite, and nitroso compounds in foods. *Food Technology*, 41, 4: 127-134
- Hribar J. 1999. Skladiščenje kapusnic. *Sodobno kmetijstvo*, 32, 11: 546-547
- Ihan A. 2001. Imunski sistem in odpornost: kako se ubranimo boleznim. Ljubljana, Založba Mladinska knjiga: 122-122, 128-130
- Iqbal Z. 1995. Methods for the analysis of ascorbic acid. *Science International (Lahore)*, 7, 3: 357-360
- Kakuda Y., Gray J.I. 1980. N-nitrosamides and their precursors in food systems. 1. formation of N-substituted amides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 28: 580-584
- Kall M.A., Ball G.F.M., 2003. Ascorbic acid. V: *Encyclopedia of food sciences and nutrition*. Vol. 1. 2<sup>nd</sup> ed. Caballero B., Trugo L.C., Finglas P.M. (eds.). London, Academic Press: 316-332
- Kamarič L. 1991. Minerali in Vitamini. V: *Vitamini in minerali*. Činč M. (ur.). Ljubljana, Zavod za farmacijo in preizkušnjo zdravil: 83-83
- Kimoto E., Tanaka H., Ohmoto T., Choami M. 1993. Analysis of the transformation products of dehydro-L-ascorbic acid by ion-pairing high-performance liquid chromatography. *Analytical Biochemistry*, 240: 38-44
- Klein B.P., Perry A.K. 1982. Ascorbic acid and vitamin A activity in selected vegetables from different geographical areas of the United States. *Journal of Food Science*, 47, 3: 941-945
- Klun I. 2000. Vpliv aditivov na razgradnjo C - vitamina. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 61 str.
- Kmecl V., Sušin J., Zupančič-Kralj L. 2005. Validation of analytical methods used for determination of nitrate in soil. *Accreditation and Quality Assurance*, 10: 172-176

- Kmiecik W., Lisiewska Z., Slupski J. 2004. Effects of freezing and storing of frozen products on the content of nitrates, nitrites, and oxalates in dill (*Anethum graveolens* L.). Food Chemistry 86: 105-111
- Kobovc T. 2000. Določanje vsebnosti vitamina C v različnih vrstah zelenjave. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 63 str.
- Koch V. 1997. Vitamini. V: Prehrana - vir zdravja. Lajovic J. (ur.). Ljubljana, Društvo za zdravje srca in ožilja Slovenije: 43-43
- Kulier I. 1996. Tablice kemijskog sastava namirnica. Zagreb, Hrvatski farmer d.d.: 21-24
- Kristl A. 1991. Vitamini: Farmakologija. V: Vitamini in minerali. Činč M. (ur.). Ljubljana, Zavod za farmacijo in preizkušnjo zdravil: 135-135
- Kuharič S. 2003. Kroženje dušika. Sladkorna pesa, 3, 5: 7-7  
<http://www.csp-ormoz.si/revije/marec2003/krozenje.pdf> (11. jan. 2005)
- Leach S. 1988. Mechanisms of endogenous N-nitrosation. V: Nitrosamines. Toxicology and microbiology. Hill M.J. (ed.). Chichester, Ellis Horwood Lth.: 69-87
- Lee S.K., Kader A.A. 2000. Preharvest and postharvest factors influencing vitamin C content of horticultural crops. Postharvest Biology and Technology, 20, 3: 207-220
- Leskošek M. 1993. Gnojenje. Ljubljana, ČZP Kmečki glas: 197 str.
- Levine M., Dhariwal K.R., Washko P.W., Welch R.W., Wang Y. 1993. Cellular functions of ascorbic acid: a means to determine vitamin C requirements. Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition, 2, 1: 5-13
- Levine M., Rumsey S.C., Daruwala R., Park J.B., Wang Y. 1999. Criteria and recommendations for vitamin C intake. Journal of the American Medical Association, 281, 15: 1415-1423
- Loewus F.A., Loewus M.W. 1987. Biosynthesis and metabolism of ascorbic acid in plants. Critical Reviews in Plant Sciences, 5: 101-119
- Malešič I., Meško M. 1999. Vrednosti askorbinske kisline v krvnem serumu zdravih ljudi in bolnikov. Farmaceutski vestnik, 50: 409-416
- Markelc M. 2002. Vsebnost nitrata v kitajskem kapusu in zelju. Diplomsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 49 str.
- McKnight G.M., Duncan C.W., Leifert C., Golden M.H. 1999. Dietary nitrate in man: friend or foe? British Journal of Nutrition, 81: 349-358



- Mihajlović B.M. 1997. Zdravljenje s sadjem in zelenjavo. Ljubljana, ČZP Kmečki glas: 3-5, 168-179
- Miller E.V., Heilman A.S. 1952. Ascorbic acid and physiological breakdown in the fruits of the pineapple (*Ananas comosus* L. Merr.). *Science*, 116: 505-506
- Morato N. 2004. Zelje in repa redno na jedilniku. *Dnevnik*, 29. november 2004: 10-10
- Myshkin A.E., Konyeaeva V.S., Gumargalieva K.Z., Moiseev Y.V. 1996. Oxidation of ascorbic acid in the presence of nitrites. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 10: 2948-2950
- Naidu K.A. 2003. Vitamin C in human health and disease is still a mystery? An overview. *Nutrition Journal*, 2: 1-7
- Osvald J., Kogoj-Osvald M. 1994. Pridelovanje zelenjave na vrtu. Ljubljana, ČZP Kmečki glas: 295 str.
- Pioneer Hi-bred Services. 2003. Gnojenje koruze z dušikom, fosforjem in kalijem. Parndorf, Pioneer Hi-bred Services GmbH, Podružnica za Slovenijo.  
<http://www.pioneer-si.com/agro-nasveti-002.html> (11. jan. 2005): 2str.
- Podsdek A. 2007. Natural antioxidants and antioxidant capacity of *Brassica* vegetables: A review. *LWT-Food Science and Technology*, 40: 1-11
- Pokorn D. 1991. Nekatere epidemiološke značilnosti vitaminov in mineralov. V: Vitamini in minerali. Činč M. (ur.). Ljubljana, Zavod za farmacijo in preizkušnjo zdravil: 21-22
- Rodriguez M., Sadler G.D., Sims C.A., Braddock R.J. 1991. Chemical changes during storage of an alcoholic orange juice beverage. *Journal of Food Science*, 56, 2: 475-479
- Rudan-Tasič D. 2000. Vitamin C, vitamin E in koencim Q10. V: Antioksidanti v živilstvu. 20. Bitenčevi živilski dnevi, Portorož, 26-27. oktober 2000. Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 40-48
- Saari N.B., Fujita S., Miyazoe R., Okugawa M. 1995. Distribution of ascorbate oxidase activities in the fruits of family *Cucurbitaceae* and some of their properties. *Journal of Food Biochemistry*, 19: 321-327
- Scanlan R.A. 2003. Nitrosamines. V: *Encyclopedia of food sciences and nutrition*. Vol. 4. 2<sup>nd</sup> ed. Caballero B., Trugo L.C., Finglas P.M. (eds.). London, Academic Press: 4142-4147
- Scharpf H.C. 1991. Nutrient influences on the nitrate content of vegetables. Peterborough, The Fertiliser Society: 3-24

- Schuster E.B., Lee K. 1987. Nitrate and nitrite methods of analysis and levels in raw carrots, processed carrots and in selected vegetables and grain products. *Journal of Food Science*, 52, 6: 1632-1641
- Seib P.A. 1985. Oxidation, monosubstitution and industrial synthesis of ascorbic acid. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*, 27: 259-306
- Smirnoff N. 1996. The function and metabolism of ascorbic acid in plants. *Annals of Botany*, 78: 661-669
- Sofos J.N., Raharjo S. 1995. Curing agents. V: *Food additive toxicology*. Maga J.A., Tu A.T. (eds). New York, Marcel Decker, Inc.: 235-267
- Solomon O., Svanberg U., Sahlstrom A. 1995. Effect of oxygen and fluorescent light on the quality of orange juice during storage at 8 °C. *Food Chemistry*, 53:363-368
- Turk T. 1996. Teze predavanj iz mikrobne biokemije. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo.  
<http://www.bf.uni-lj.si/bi/biokemija/studenti/Teze/mikteze.htm> (12. jun. 2005): 82 str.
- Turk J. 1997. Predgovor. V: *Prehrana - vir zdravja*. Lajovic J. (ur.). Ljubljana, Društvo za zdravje srca in ožilja Slovenije: 5-5
- Umek A. 1991. Rastline z vitamini in minerali. V: *Vitamini in minerali*. Činč M. (ur.). Ljubljana, Zavod za farmacijo in preizkušnjo zdravil: 121-123
- Vardjan F. 1987. Vrtno zelenjadarstvo. Ljubljana, ČZP Kmečki glas: 285 str.
- Viola R. 2002. Approaches to regulate the L-ascorbic acid content of commercially important plants. SCRI Research programme: SCR/584/02. Dundee, Scottish Crop Research Institute.  
<http://www.scri.sari.ac.uk/SCRI/web/site/home/ResearchAreas/Theme2~GenestoProducts/QHN/AscorbicAcid.asp> (11. jan. 2005)
- Vukadinović V., Lončarić Z., 1998. Ishrana bilja. Osijek, Poljoprivredni fakultet: 294 str.  
<http://suncokret.pfos.hr/~vladimir/IB/isbilja.html> (12. jun. 2005): 294 str.
- Walker R. 1990. Nitrates, nitrites and N-nitrosocompounds: a review of the occurrence in food and diet and the toxicological implications. *Food Additives and Contaminants*, 7, 6: 717-768
- Weichmann J. 1986. The effect of controlled-atmosphere storage on the sensory and nutritional quality of fruits and vegetables. *Horticultural Reviews*, 8: 101-127
- Worthington V. 2001. Nutritional quality of organic versus conventional fruits, vegetables, and grains. *Journal of Alternative and Complementary Medicine*, 7, 2: 161-173

Yuan J.P., Chen F. 1998. Degradation of ascorbic acid in aqueous solution. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46: 5078-5082

## ZAHVALA

Najlepše se zahvaljujem mentorju dr. Marjanu Simčiču, ki mi je omogočil pripravo in izvedbo diplomskega dela ter za vodenje in strokovne nasvete.

Hvala tudi somentorju dr. Tomažu Polaku za vse strokovne nasvete, poprave in izboljšave, ki so pripomogle k bolj transparentnemu diplomskemu delu.

Zahvalil bi se tudi recenzentu prof. dr. Rajku Vidrihu za strokovni pregled diplomske naloge in tudi za pomoč in napotke pri analizah na HPLC sistemu.

Zahvala gre tudi Sonji Čerpič za prijaznost in neprecenljivo pomoč v laboratoriju.

Prav tako se zahvaljujem dipl. inž. Ivici Hočevar za prijaznost, različne nasvete, iskanje literature in za oblikovni pregled diplomske naloge.

Za prijaznost, različne informacije, oblikovanje bibliografskih virov in pregled diplomske naloge se zahvaljujem univ. dipl. inž. Lini Burkan.

Za pregled diplomske naloge in popravke se zahvaljujem tudi univ. dipl. inž. Anji Janeš.

Za vzorce zelja se zahvaljujem Draganu Žnidarčiču, univ. dipl. inž. agr. z Oddelka za agronomijo Biotehniške fakultete.

Hvala tudi Poloni iz katedre za Mikrobiologijo za opravljene analize nitrata.

Zahvala gre tudi vsem ostalim, ki ste mi kakorkoli pomagali pri nastajanju in oblikovanju diplomskega dela ali pa mi stali ob strani v času študija.

Posebna zahvala gre tudi staršem za vsestransko pomoč, bratu Petru, še posebej pa puncu Ksenji za njeno potrpežljivost, moralno podporo in pomoč pri izdelavi diplomskega dela.

## PRILOGA

Priloga A: Dve možni poti biosinteze L-askorbinske kisline v rastlinah (Smirnov, 1996)

