

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Barbara PETROVIĆ

**RAZLIKE V KEMIJSKI IN IZOTOPSKI SESTAVI
KONVENCIONALNO IN EKOLOŠKO PRIDELANIH JABOLK**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**DIFFERENCES IN CHEMICAL AND ISOTOPIC COMPOSITION
BETWEEN CONVENTIONALLY AND ORGANICALLY PRODUCED
APPLES**

GRADUATION THESIS
University Studies

Ljubljana, 2011

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija živilske tehnologije. Opravljeno je bilo na Odseku za znanosti o okolju Instituta »Jožefa Stefana« v Podgorici in v laboratoriju Katedre za tehnologije, prehrano in vino Oddelka za živilstvo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Študijska komisija dodiplomskega študija živilstva je za mentorja diplomskega dela imenovala prof. dr. Rajka Vidriha, za mentorico prof. dr. Nives Ogrinc in za recenzentko prof. dr. Tatjano Košmerl.

Mentor: prof. dr. Rajko Vidrih

Somentorica: prof. dr. Nives Ogrinc

Recenzentka: prof. dr. Tatjano Košmerl

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:

Član:

Član:

Datum zagovora:

Diplomska naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Podpisana se strinjam z objavo svoje naloge v popolnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddala v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

Barbara Petrović

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dn
DK UDK 634.11:641.1:543.61(043)=163.6
KG jabolka / ekološka pridelava / konvencionalna pridelava / kemijska sestava / izotopi / izotopska sestava / antioksidacijski potencial / skupne fenolne spojine / askorbinska kislina / elementarna sestava / spektrofotometrične metode / HPLC / TXRF
AV PETROVIĆ, Barbara
SA VIDRIH, Rajko (mentor) / OGRINC, Nives (somentorica) / KOŠMERL, Tatjana (recenzentka)
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo
LI 2011
IN RAZLIKE V KEMIJSKI IN IZOTOPSKI SESTAVI KONVENCIONALNO IN EKOLOŠKO PRIDELANIH JABOLK
TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP XI, 98 str., 30 pregl., 15 sl., 117 vir.
IJ sl
JI sl/en
AI Namen naloge je bil ugotoviti, kakšne so razlike med ekološko in konvencionalno pridelanimi jabolki. V raziskavo je bilo vključenih 7 vzorcev ekološko in 12 vzorcev konvencionalno pridelanih jabolk. Analitični del je obsegal merjenje antioksidacijskega potenciala, določanje vsebnosti skupnih fenolnih spojin in askorbinske kisline ter mase jabolk. Določali smo tudi izotopsko sestavo dušika in ogljika z metodo IRMS (Isotope Ratio Mass Spectrometry), in sicer smo izmerili vrednosti $\delta^{15}\text{N}$ v pulpi in peškah jabolk ter vrednosti $\delta^{13}\text{C}$ v pulpi, sladkorjih in peškah jabolk. Poleg tega smo z metodo TXRF (Total Reflection X-Ray Spectroscopy) določili koncentracijo nekaterih elementov. Velik vpliv na merjene parametre ima sorta jabolk. Plodovi ekološko pridelanih jabolk so manjši od konvencionalno pridelanih. Ugotovili smo, da ekološka jabolka vsebujejo več fenolnih spojin in askorbinske kisline, posledično imajo višji tudi antioksidacijski potencial. Z metodo določanja izotopskega razmerja $\delta^{15}\text{N}$ in $\delta^{13}\text{C}$ v našem poskusu ne moremo razlikovati med obema načinoma pridelave, čeprav se je metoda določanja $\delta^{15}\text{N}$ na splošno izkazala za uspešno metodo razlikovanja. Ekološka jabolka vsebujejo nekoliko več mineralov (razen klora) kot konvencionalno pridelana.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
DC UDC 634.11:641.1:543.61(043)=163.6
CX Apples / organic production / conventional production / chemical composition / isotopes / isotopic composition / antioxidant activity / total phenolic compounds / ascorbic acid / elemental composition / spectrophotometric methods / HPLC / TXRF
AU PETROVIĆ, Barbara
AA VIDRIH, Rajko (supervisor) / OGRINC, Nives (co-advisor) / KOŠMERL, Tatjana (reviewer)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Food Science and technology
PY 2011
TI DIFFERENCES IN CHEMICAL AND ISOTOPIC COMPOSITION BETWEEN CONVENTIONALLY AND ORGANICALLY PRODUCED APPLES
DT Graduation thesis (University studies)
NO XI, 98 p., 30 tab., 15 fig., 117 ref.
LA sl
AL sl/en
AB The purpose of our research was to determine the differences between organically and conventionally produced apples. The investigation included 7 samples of organically and 12 samples of conventionally produced apples. Analytical part included determination of antioxidant activity, concentration of total phenolic compounds and ascorbic acid as well as mass of individual fruits. We also determined the isotopic composition of nitrogen and carbon by the method IRMS (Isotope Ratio Mass Spectrometry), namely $\delta^{15}\text{N}$ values were measured in the pulp and seeds of apples and $\delta^{13}\text{C}$ values in pulp, sugar and seeds. In addition, the concentration of some elements was determined by means of TXRF (Total Reflection X-Ray Spectroscopy). Apple cultivar influenced significantly on measured parameters. Ecologically produced apples had lower mass. We found out that organic apples contain more total phenolic compounds and ascorbic acid, and consequently had higher antioxidant potential. The method of determining the isotopic ratio $\delta^{15}\text{N}$ and $\delta^{13}\text{C}$ in our study can't distinguish between these two types of production, although the method of determining $\delta^{15}\text{N}$ generally proved to be a useful tool. Organic apples contain slightly more minerals (except chlorine) than conventional produced apples.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION.....	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VIII
KAZALO SLIK	X
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XI
1 UVOD	1
1.1 NAMEN DELA	1
1.2 DELOVNA HIPOTEZA.....	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 JABLANA	3
2.2 NAČINI PRIDELAVE SADJA.....	3
2.2.1 Ekološko pridelovanje sadja	3
2.2.2 Konvencionalno pridelovanje sadja	5
2.2.3 Kakovost ekološko in konvencionalno pridelanega sadja	6
2.3 RAZLIKE MED EKOLOŠKIM IN KONVENCIONALNIM KMETIJSTVOM.....	7
2.4 RAZLIKE MED EKOLOŠKIM IN KONVENCIONALNIM PRIDELOVANJEM JABOLK.....	8
2.4.1 Izbira podlage	8
2.4.1.1 Izbira podlag v konvencionalnem nasadu jablan.....	8
2.4.1.2 Izbira podlag v ekološkem sadnem nasadu	8
2.4.2 Izbira sorte.....	9
2.4.2.1 Visokorodne sorte v konvencionalnem sadjarstvu	9
2.4.2.2 Izbira sort v ekološkem sadjarstvu	9
2.4.3 Biološko aktivna tla in potrebe po hranilih	9
2.4.4 Gnojenje (fertilizacija).....	11
2.4.4.1 Gnojenje v konvencionalni pridelavi sadja	11
2.4.4.2 Gnojenje v ekološkem nasadu	13
2.4.5 Oskrba tal	16
2.4.5.1 Oskrba tal v konvencionalni pridelavi.....	16

2.4.5.2 Tla v ekološkem nasadu	16
2.4.6 Varstvo rastlin pred boleznimi in škodljivci.....	17
2.4.6.1 Intenzivni varstveni ukrepi v konvencionalnem sadjarstvu	17
2.4.6.2 Varstvo rastlin v ekološki pridelavi.....	18
2.5 IZOTOPI.....	19
2.5.1 Stabilni izotopi.....	19
2.5.2 Stabilni izotopi dušika in vplivi na njihovo porazdelitev	22
2.5.2.1 Uporaba $\delta^{15}\text{N}$ za razlikovanje med ekološko in konvencionalno pridelavo	24
2.5.3 Vplivi na porazdelitev stabilnih izotopov ^{12}C in ^{13}C	26
2.5.4 Določanje izotopskega razmerja z metodo IRMS	29
2.6 ANTIOKSIDANTI	30
2.6.1 Prosti radikali in oksidativni stres.....	30
2.6.2 Antioksidanti	30
2.6.3 Antioksidativni potencial.....	32
2.7 FENOLNE SNOVI	32
2.7.1 Funkcija fenolnih snovi.....	33
2.7.2 Delitev fenolnih snovi.....	33
2.7.3 Pomen fenolnih snovi za zdravje ljudi	34
2.7.4 Fenolne snovi v jabolkah	34
2.8 ASKORBINSKA KISLINA (VITAMIN C)	35
3 MATERIALI IN METODE	39
3.1 MATERIALI	39
3.1.1 Jabolka	39
3.1.2 Priprava vzorcev jabolčnega soka za nadaljnje meritve	39
3.1.3 Reagenti.....	40
3.2 METODE DELA	40
3.2.1 Določanje vsebnosti dušikovih in ogljikovih izotopov v iztisnjem jabolčnem soku.....	40
3.2.1.1 Določanje $\delta^{13}\text{C}$ in $\delta^{15}\text{N}$ vrednosti v pulpi jabolčnega soka z metodo IRMS ...	40
3.2.1.2 Določanje $\delta^{13}\text{C}$ vrednosti sladkorjev v jabolčnem soku z metodo IRMS	42
3.2.1.3 Določanje $\delta^{13}\text{C}$ in $\delta^{15}\text{N}$ vrednosti v peškah jabolk z metodo IRMS	43
3.2.2 Določanje antioksidacijskega potenciala v jabolčnem soku s prostim radikalom DPPH'	44

3.2.3 Določanje fenolnih spojin v jabolčnem soku - spektrofotometrična metoda....	46
3.2.4 Določanje vsebnosti askorbinske kisline na sistemu HPLC	48
3.2.5 Določanje elementarne sestave jabolk z metodo rentgenske fluorescenčne spektroskopije (TXRF)	51
3.3 STATISTIČNA OBDELAVA REZULTATOV	53
3.3.1 Aritmetična sredina	53
3.3.2 Varianca in standardni odklon	53
4 REZULTATI.....	55
4.1 REZULTATI ANALIZ GLEDE NA SORTO JABOLK	55
4.1.1 Rezultati določanja mase jabolk	55
4.1.2 Rezultati določanja antioksidacijskega potenciala v jabolčnem soku s prostim radikalom DPPH'	56
4.1.3 Rezultati določanja fenolnih spojin v jabolčnem soku s spektrofotometrično metodo	58
4.1.3.1 Umeritvena krivulja za skupne fenolne spojine s F.C. reagentom	58
4.1.3.2 Določene koncentracije skupnih fenolnih spojin v jabolčnem soku	59
4.1.4 Rezultati določanja vsebnosti askorbinske kisline na sistemu HPLC	61
4.1.5 Rezultati določanja vsebnosti dušikovih in ogljikovih izotopov v jabolčnem soku.....	62
4.1.6 Rezultati določanja elementarne sestave jabolk z metodo rentgenske fluorescenčne spektroskopije (TXRF).....	65
4.2 REZULTATI ANALIZ GLEDE NA NAČIN PRIDELAVE JABOLK.....	68
4.2.1 Rezultati določanja vsebnosti skupnih fenolnih spojin, askorbinske kisline, antioksidacijskega potenciala in mase jabolk.....	68
4.2.2 Rezultati določanja vsebnosti dušikovih in ogljikovih izotopov v jabolčnem soku.....	69
4.2.3 Rezultati določanja elementarne sestave jabolk z metodo TXRF	72
5 RAZPRAVA.....	75
5. 1 RAZPRAVA GLEDE NA SORTO JABOLK.....	75
5. 2 RAZPRAVA GLEDE NA NAČIN PRIDELAVE JABOLK.....	79
6 SKLEPI	83
7 POVZETEK.....	85
8 VIRI	88
ZAHVALA	

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Prednosti in pomanjkljivosti ekološkega kmetijstva (Bavec, 2001: 23)	4
Preglednica 2: Prednosti in pomanjkljivosti konvencionalnega kmetijstva (Bavec, 2001: 23) ..	6
Preglednica 3: Osnovne razlike med ekološkim in konvencionalnim kmetijstvom (Bavec, 2001: 22).....	7
Preglednica 4: Primerjalni pregled prehrane rastlin (Krišković, 1989: 57).....	10
Preglednica 5: Učinek fertilizacije na vsebnost elementov v jabolkah (Krišković, 1989: 150) 12	
Preglednica 6: Priporočene letne količine posameznih hranil za gnojenje (kg/ha) (Sancin, 1988: 62).....	13
Preglednica 7: Učinek fertilizacije na donosnost in kakovost jabolk (Krišković, 1989: 28)	15
Preglednica 8: Vsebnost fenolnih spojin v jabolku (izraženo v mg _{galne kisline} /100 g) (Štampar in sod., 2009: 217)	35
Preglednica 9: Oznaka vzorcev, sorta, geografsko poreklo in način pridelave jabolk.....	39
Preglednica 10: Standardne raztopine galne kisline	47
Preglednica 11: Priprava standardnih raztopin askorbinske kisline	51
Preglednica 12: Povprečna masa (g) vzorcev jabolk.....	55
Preglednica 13: Povprečje in standardni odklon mase (g) glede na sorto jabolk.....	56
Preglednica 14: Rezultati meritev antioksidacijskega potenciala (nmol DPPH/ml) glede na sorto jabolk	57
Preglednica 15: Povprečje in standardni odklon antioksidacijskega potenciala (nmol DPPH/ml) glede na sorto jabolk.....	57
Preglednica 16: Odvisnost absorbance od koncentracije galne kisline	58
Preglednica 17: Rezultati meritev koncentracije skupnih fenolnih spojin v mg/l glede na sorto jabolk	60
Preglednica 18: Povprečje in standardni odklon koncentracije skupnih fenolnih spojin (mg/l) glede na sorto jabolk.....	60
Preglednica 19: Rezultati meritev koncentracije askorbinske kisline v mg/100 ml glede na sorto jabolk	61
Preglednica 20: Povprečje in standardni odklon koncentracije askorbinske kisline (mg/100 ml) glede na sorto jabolk.....	62
Preglednica 21: Rezultati meritev $\delta^{13}\text{C}$ in $\delta^{15}\text{N}$ v pulpi in peškah ter $\delta^{13}\text{C}$ v sladkorjih (‰) glede na sorto jabolk.....	63
Preglednica 22: Povprečja in standardni odkloni $\delta^{13}\text{C}$ in $\delta^{15}\text{N}$ (‰) glede na sorto jabolk	64
Preglednica 23: Rezultati določanja koncentracij posameznih elementov (ppm) glede na sorto jabolk	66
Preglednica 24: Povprečja in standardni odkloni koncentracij posameznih elementov (ppm) glede na sorto jabolk.....	67

Preglednica 25: Rezultati povprečne mase (g), antioksidacijskega potenciala (nmol DPPH/ml), koncentracije skupnih fenolnih spojin (mg/l) in askorbinske kisline (mg/100 ml) glede na način pridelave jabolk.....	68
Preglednica 26: Povprečja in standardni odkloni mase (g), antioksidacijskega potenciala (nmol DPPH/ml), koncentracije skupnih fenolnih spojin (mg/l) in askorbinske kisline (mg/100 ml) glede na način pridelave jabolk	69
Preglednica 27: Rezultati meritev $\delta^{13}\text{C}$ in $\delta^{15}\text{N}$ v pulpi in peškah ter $\delta^{13}\text{C}$ v sladkorjih (‰) glede na način pridelave jabolk	70
Preglednica 28: Povprečja in standardni odkloni $\delta^{13}\text{C}$ in $\delta^{15}\text{N}$ (‰) glede na način pridelave jabolk	71
Preglednica 29: Rezultati določanja koncentracij posameznih elementov (ppm) glede na način pridelave jabolk	73
Preglednica 30: Povprečja in standardni odkloni koncentracij posameznih elementov (ppm) glede na način pridelave jabolk	74

KAZALO SLIK

Slika 1: Območje $\delta^{15}\text{N}$ (‰) v naravnih spojinah (Clark in Fritz, 1997)	22
Slika 2: Vrednosti $\delta^{15}\text{N}$ (‰) za različne vire dušika in vplivi bioloških procesov na izotopsko sestavo dušika (Heaton, 1986).....	23
Slika 3: Odvisnost $\delta^{13}\text{C}$ od $\delta^{15}\text{N}$ vrednosti (‰) različnih tipov zelenjave, zrasle konvencionalno (neorgansko) (●) in ekološko (organsko) (○) (Rogers, 2008)	26
Slika 4: Shema principa delovanja masnega spektrometra za analitiko stabilnih izotopov lahkih elementov (IRMS) (Dunn, 2007)	30
Slika 5: Struktura L-askorbinske kisline (Gordon, 2003).....	36
Slika 6: Vsebnost vitamina C v različnih sortah jabolk (Krišković, 1989: 149).....	38
Slika 7: Povprečje in standardni odklon mase (g) glede na sorto jabolk.....	56
Slika 8: Povprečje in standardni odklon antioksidacijskega potenciala (nmol DPPH/ml) glede na sorto jabolk	58
Slika 9: Umeritvena krivulja za določanje fenolnih spojin – odvisnost absorbanca od koncentracije galne kisline skupaj z enačbo premice.....	59
Slika 10: Povprečje in standardni odklon koncentracije skupnih fenolnih spojin (mg/l) glede na sorto jabolk	60
Slika 11: Povprečje in standardni odklon koncentracije askorbinske kisline (mg/100 ml) glede na sorto jabolk	62
Slika 12: Povprečne vrednosti $\delta^{13}\text{C}$ v pulpi, sladkorjih in peškah jabolk (‰) glede na sorto jabolk	64
Slika 13: Povprečne vrednosti $\delta^{15}\text{N}$ (‰) v pulpi in peškah jabolk glede na sorto jabolk	65
Slika 14: Povprečne $\delta^{13}\text{C}$ vrednosti (‰) v jabolčnem soku glede na način pridelave jabolk...	71
Slika 15: Povprečne $\delta^{15}\text{N}$ vrednosti (‰) v jabolčnem soku glede na način pridelave jabolk...	72

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

AA – askorbinska kislina

AOAC – Association of Official Analytical Chemists

AOP – antioksidacijski potencial

$\delta^{13}\text{C}$ – izotopska sestava ogljika izražena v ‰

$\delta^{15}\text{N}$ – izotopska sestava dušika izražena v ‰

C_3 rastline – skupina rastlin, ki za pridobivanje sladkorjev uporablja C_3 ali Calvinov cikel

C_4 rastline – skupina rastlin, ki za pridobivanje sladkorjev uporablja C_4 ali Hatch-Slackov cikel

CAM – skupina rastlin, ki za pridobivanje sladkorjev uporablja CAM (angl. Crassulacean Acid Metabolism)

DPPH \cdot – stabilni prosti radikal 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil

F.C. – Folin-Ciocalteujev reagent

HPLC – tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (angl. High Pressure Liquid Chromatography)

IRMS – masna spektrometrija za merjenje izotopskih razmerij lahkih izotopov (angl. Isotope Ratio Mass Spectrometry)

MFK – metafosforna kislina

SFS – skupne fenolne spojine

TXRF – rentgenska fluorescenčna spektroskopija s popolnim odbojem (angl. Total Reflection X-Ray Spectroscopy)

XRF – rentgenska fluorescenčna spektroskopija (angl. X-Ray Fluorescence Analysis)

1 UVOD

Spremembe v načinu življenja narekujejo spremenjen način prehranjevanja. Uživanje sadja in zelenjave lahko bistveno pripomore k boljšemu zdravju. Sadje in zelenjava vsebujeta bogat vir antioksidantov, ki so v današnjem času zelo pomembne sestavine v naši prehrani. Ljudje se zavedajo pomena čim bolj kakovostnega življenja v današnjem stresnem in hitrem tempu, s tem pa se povečuje skrb za zdravo prehrano. Vse bolj pomembna pa je tudi skrb za okolje in okolju prijaznejši način pridelave hrane. Hrano pridelujemo po načelih konvencionalne, integrirane in ekološke pridelave. Značilnosti konvencionalnega načina pridelave so intenzivna raba tal, velika poraba kemičnih sredstev s širokim spektrom delovanja, veliki vložki kapitala in energije ter agresivna uporaba kmetijske tehnike. Zaradi številnih negativnih vplivov na okolje se je v zadnjem času razširila ekološka pridelava, ki je okolju prijaznejša. Ta način pridelave ne dovoljuje uporabe sintetičnih sredstev za uničevanje škodljivcev in drugih kemičnih aditivov. Za gnojenje se uporabljajo le naravna, organska gnojila. Vendar pa je ekološka pridelava zahtevnejša od konvencionalne, potrebnega je veliko več znanja in delovnih izkušenj.

V Sloveniji je bolj razširjena konvencionalna pridelava, vendar pa v zadnjih letih vedno bolj pridobiva na pomenu tudi ekološka pridelava, saj se smernice prehranjevanja spreminjajo. Rast tržišča z ekološkimi pridelki je pogojena s povečanim povpraševanjem po zdravi hrani, z zahtevami po varstvu narave in s spodbujanjem biotske raznovrstnosti. Takšne težnje so najmočnejše predvsem v razvitih državah. Ekološka živila imajo višjo prehransko kot tudi zdravstveno vrednost. Vsebujejo več vitaminov, mineralov, encimov in ostalih mikro hranil kot konvencionalno pridelana živila ter ne vsebujejo strupenih kemikalij in ostankov pesticidov. Vendar pa so ta živila dražja.

1.1 NAMEN DELA

Glavni namen diplomskega dela je bil ugotoviti, kakšne so razlike med ekološko in konvencionalno pridelanimi jabolki. Poleg tega smo skušali ugotoviti ali obstajajo razlike med posameznimi sortami jabolok.

Primerjali smo nekatere kemijske lastnosti, in sicer smo izmerili vsebnost skupnih fenolnih spojin, vsebnost askorbinske kisline in antioksidacijski potencial jabolok. Primerjali smo tudi maso jabolok.

Z metodo IRMS smo določali vsebnost dušikovih in ogljikovih izotopov v iztisnjem jabolčnem soku. Izmerili smo vrednosti $\delta^{13}\text{C}$ v sladkorjih, pulpi in peškah jabolk ter vrednosti $\delta^{15}\text{N}$ v pulpi in peškah.

Z metodo TXRF smo določali elementarno sestavo jabolk. Določili smo koncentracije naslednjih elementov: fosfor, žveplo, klor, kalij, kalcij, mangan, cink in rubidij.

1.2 DELOVNA HIPOTEZA

Predvidevamo, da obstajajo razlike v kemijski in izotopski sestavi jabolk glede na način pridelave. Razlike obstajajo tudi med posameznimi sortami.

Ekološko pridelana jabolka naj bi vsebovala več fenolnih spojin in vitaminov v primerjavi s konvencionalno pridelanimi, posledično naj bi bil višji tudi antioksidacijski potencial. Ekološka jabolka so bistveno lažja in tudi manjša od konvencionalnih.

Z metodo določanja vsebnosti dušikovih in ogljikovih izotopov oziroma razmerja $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ in $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ lahko ločujemo med ekološkim in konvencionalnim načinom pridelave. Ekološka jabolka imajo bistveno višje vrednosti $\delta^{15}\text{N}$ ter nekoliko nižje $\delta^{13}\text{C}$ vrednosti kot konvencionalno pridelana jabolka.

Elementarna sestava je odvisna od načina pridelave. Konvencionalno pridelana jabolka vsebujejo več dušika, fosforja in kalija (zaradi uporabe NPK gnojil), medtem ko imajo jabolka iz ekološke pridelave večjo vsebnost ostalih mineralov.

2 PREGLED OBJAV

2.1 JABLANA

Po podatkih FAO (Food and Agriculture Organization) (2007) v svetu pridelamo 500 milijonov ton različnega sadja, kar predstavlja približno 75 kg na prebivalca. Med tradicionalnimi sadnimi vrstami, ki jih uspešno gojimo tudi pri nas, prevladuje jablana s 64,2 milijona ton (Štampar in sod., 2009).

V Sloveniji pridelamo 150.000 ton različnega sadja na 5276 ha, od tega je največ nasadov jablan. Pri sortah jablane prevladuje idared z 27,9 %, sledi sorta jonagold s 17,7 %. V Sloveniji imamo precej neugodno starost nasadov, saj je kar 25,6 % nasadov starih od 17 do 27 let, nekaj pa tudi več kot 27 let. V mladih nasadih jablan pa prevladujejo sorte gala, fuji in breaburn (Štampar in sod., 2009).

Jablana je sadna vrsta, ki ima zelo široko območje rasti. Najbolje uspeva na globokih, zračnih, peščeno-ilovnatih (srednje težkih) tleh, ki so dobro prepustna za viške vode. Jablane ne prenašajo visoke podtalnice. Najbolje uspevajo na zmerno kislih (pH 5,5-6,5) in zmerno vlažnih ter s hranili in humusom (2-4 %) bogatih tleh. Uspevajo pa tudi v tleh s pH 7,5 do 8,0, kar pomeni, da ta sadna vrsta ni občutljiva na pH. Jablani najbolj prija zmerno toplo podnebje z enakomerno razporejenimi padavinami čez vse leto. Brez večjih posledic prenese zimske temperature do -25 °C ter do 35 °C v poletnem času. Večina sort uspeva do višine 600 metrov. Za lepo obarvanje plodov je potrebno lepo vreme jeseni ter velike razlike med dnevnimi in nočnimi temperaturami. Jablane so zahtevne glede padavin. Dobro uspevajo, kjer je padavin vsaj 800 mm na leto. Če je padavin manj kot 800 mm na leto, je potrebno občasno dopolnilno namakanje, če pa jih je manj kot 500 mm na leto, je to nujno potrebno (Jazbec in sod., 1987; Štampar in sod., 2009).

2.2 NAČINI PRIDELAVE SADJA

Sadje pridelujemo v svetu na različne načine. V najbolj razvitih državah sveta prevladujeta integrirano in konvencionalno (klasično) pridelovanje, vedno bolj pa se uveljavlja tudi ekološko (biološko, organsko) pridelovanje.

2.2.1 Ekološko pridelovanje sadja

Ekološko pridelovanje sadja je najzahtevnejši način pridelovanja. Temelj ekološkega sadjarstva je dolgoročno ohranjanje zdravega okolja in s tem dobrih bivalnih razmer za živa

bitja (predvsem koristnih živali v nasadih) (Štampar in sod., 2009). Sicer pa ima ekološko sadjarstvo veliko prednosti, kot tudi pomanjkljivosti, kar vidimo v preglednici 1.

V ekološki pridelavi smo pri uporabi pomožnih snovi precej omejeni, saj ta način pridelave ne predvideva uporabe lahko topnih mineralnih gnojil, umetnih sredstev za zatiranje bolezni in škodljivcev ter herbicidov. Ta način pridelave zahteva zelo dobro poznavanje odnosov med organizmi (škodljivimi in koristnimi) ter vplive na okolje. Ker smo pri ekološki pridelavi omejeni z uporabo sredstev, moramo še natančneje upoštevati različne preprečevalne ukrepe, kot so izbira primerne lege za nasad, izbira sorte (odporne in manj občutljive sorte), obdelava tal, gnojenje (pretežno organsko) in rez (Štampar in sod., 2009).

Preglednica 1: Prednosti in pomanjkljivosti ekološkega kmetijstva (Bavec, 2001: 23)

Ekološko kmetijstvo	
Prednosti / možnosti / pozitivni učinki	Pomanjkljivosti / nevarnosti / šibke točke
ohranitev stika z naravo	manjši pridelki
varstvo okolja	višji pridelovalni stroški
pridelavo na kmetijah nadzirajo kontrolne službe	velik pritisk plevelov, bolezni in škodljivcev v prvih letih po preusmeritvi
zadovoljitev povpraševanja na trgu	ni še dovolj kupcev; nezaupanje kupcev
zdravo življenje na kmetiji	neozaveščenost kmetov in kupcev
boljša kakovost – višje cene	potrebna so nova / drugačna znanja o pridelavi
ni onesnaževanja okolja s pesticidi	potrebna je sprememba v načinu razmišljanja
ob primerni skrbi za organska gnojila ni onesnaževanja z nitrati	preusmeritveno obdobje traja dve leti ali dlje, da so izdelki priznani kot ekološki; v tem času obstaja problem prodaje
pridelki z najvišjo notranjo vrednostjo; zdrava živila brez ostankov pesticidov	treba je spremeniti način prodaje (več neposrednega trženja) in že na kmetiji doseči čim višjo dodano vrednost (pakiranje, dodelava)
je tudi način mišljenja in življenja	nujne investicije v stroje za mehanično zatiranje plevelov
zmanjšana odvisnost od industrije, gnojil in pesticidov	
višje podpore na hektar	

Kot začetek ekološke pridelave sadja v Sloveniji lahko označimo leto 1997, ko je sadjarska zadruga Posavja začela razmnoževati odporno sorto topaz. Z razvojem odpornih in robustnih sort jablan je ekološko sadjarstvo postalo tudi tržno bolj zanimivo. Odporne sorte imajo namreč naravno odpornost (pridobljeno s križanjem z divjimi sortami jablane) proti nekaterim boleznim, kot sta škrlup in pepelovka. Pri tovrstnih sortah zato delno ali v celoti odpade varstvo pred temi boleznimi. V zadnjem času so žlahtnitelji vzgojili odporne sorte, katerih plodovi po kakovosti bistveno ne zaostajajo za občutljivimi sortami. Posebno skrb v ekološkem nasadu namenjajo koristnim organizmom (žuželke, ptice, sesalci), ki v veliki meri uravnavajo številčnost škodljivcev. V nasadu poskrbimo za tako imenovane ekološke niše,

kamor se naselijo koristni organizmi (žive meje, skalnjaki, hišice za ptice) (Štampar in sod., 2009).

Ekološka pridelava, pri kateri želimo doseči normalne pridelke, je dosti bolj zahtevna kot konvencionalna pridelava sadja. Veliko več moramo vedeti o izbrani sadni vrsti, posameznih škodljivcih, njihovem razvojnem krogu in še drugih značilnostih, da lahko z omejenimi ukrepi preprečimo škodo, ki jo povzročajo škodljivci. Ekološke pridelave se lotijo tisti, ki so prepričani v ta način in imajo na voljo ustrezno tržišče za svoje pridelke (Štampar in sod., 2009).

Tehnološki cilji so vezani predvsem na gospodarno in racionalno pridelavo s poudarkom na varovanju okolja. Tako naj bi sčasoma izginila konvencionalna pridelava, katero bi nadomestila v večini primerov integrirana, v manjšem deležu pa ekološka pridelava sadja (Štampar in sod., 2009).

2.2.2 Konvencionalno pridelovanje sadja

Konvencionalna (intenzivna) kmetijska pridelava se je razvila vzporedno z napredkom življenja in hkrati s potrebo po večjih donosih in prihodkih. Pri konvencionalni pridelavi je potrebno spoštovati osnovno kmetijsko zakonodajo. Značilnosti tega načina pridelave so intenzivna raba tal, velika poraba kemičnih sredstev s širokim spektrom delovanja, veliki vložki kapitala in energije ter agresivna uporaba kmetijske tehnike (Vidrih, 2001). Konvencionalno kmetijstvo ima tako prednosti kot tudi pomankljivosti v primerjavi z ekološkim kmetijstvom (preglednica 2).

Intenzifikacija in specializacija sta v kmetijstvu prinesli določene prednosti (manjša poraba delovnega časa na enoto pridelka, lažje delo, cenejši pridelki ...) ob hkratnih številnih negativnih vplivih. V zadnjem času se vse bolj kažejo pomankljivosti intenzivnega kmetijstva, ki prevladuje v razvitem svetu. Gre predvsem za ekološke probleme, ki jih povzroča intenzivno kmetovanje.

Konvencionalno kmetijstvo je danes tehnološko specializirano ter kemično in kapitalsko zelo intenzivno. To se odraža v pritisku konvencionalnega načina pridelovanja hrane na okolje v smislu onesnaževanja voda in podtalnice, slabšanja strukture prsti in s tem slabšanja rodovitnosti tal, zmanjševanja biotske raznolikosti ter zmanjševanja zalog neobnovljivih fosilnih goriv, ki predstavljajo surovino za mineralna gnojila (Francis in sod., 1990). Tudi pri rastlinah in živalih se pojavlja vse več bolezni (Bavec in sod., 2001).

Prevelike količine umetnih gnojil in drugih kemikalij, ki jih uporabljajo v kmetijstvu onesnažujejo reke in morja. V telesih vseh živih bitij je čedalje več pesticidov in njihova proizvodnja se še vedno povečuje. Zaradi porušenega ravnotežja je škodljivcev vedno več. Tako pridelana hrana je biološko bolj osiromašena. V njej je manj vitaminov, mineralov in mikroelementov, kot jih človek potrebuje. V intenzivni živinoreji uporabljajo hormonske in kemične dodatke s katerimi poizkušajo pri živalih čim prej doseči čim večji prirast mesa. Vsi pa z mesno in mlečno prehrano preidejo tudi v človekovo telo.

S tehničnimi posegi se je intenzivno kmetovanje čedalje bolj poenostavljalo (npr. ozek kolobar, monokulture, množična reja živali ...), medtem ko ekološko kmetovanje upošteva naravne danosti, je do okolja prijazno in trajnostno usmerjeno (Bavec in sod., 2001).

Preglednica 2: Prednosti in pomanjkljivosti konvencionalnega kmetijstva (Bavec, 2001: 23)

Konvencionalno kmetijstvo	
Prednosti / možnosti / pozitivni učinki	Pomanjkljivosti / nevarnosti / šibke točke
veliki pridelki	sprememba krajine
pridelki prikupnega videza	osiromašenje narave
velika delovna storilnost	degeneracija tal
prihranek časa	ekološka nestabilnost
lažje delo	onesnaževanje okolja (pesticidi in nitrati v pitni vodi)
	razsipna poraba surovin
	obtoževanje kmetov zaradi odnosa do okolja
	zniževanje odkupnih cen kmetijskih pridelkov v svetovnem merilu

Temeljno načelo pri pridelovanju v sodobnih, klasičnih sadnih nasadih je: kar največja pridelava na enoto površine ob čim manjših izdatkih. V sodobnih sadnih nasadih so tri pglavitne stvari, ki omogočajo doseganje obilnih pridelkov (Krišković, 1989):

- visokorodne sorte,
- intenzivna fertilizacija (gnojenje) z industrijskimi gnojili,
- intenzivni ukrepi za varstvo sadnih dreves pred zajedavci – s pesticidi.

2.2.3 Kakovost ekološko in konvencionalno pridelanega sadja

Sodobna znanost še ni uspela ponuditi nedvoumnega odgovora na vprašanje, ali je sadje, pridelano s pomočjo sodobnih tehnologij (uporaba gnojil in kemičnih sredstev za varstvo rastlin) po kakovosti ter vplivih na telo (fiziološki učinki in učinki na zdravje) enakovredno sadju, ki je pridelano brez uporabe kemičnih pripomočkov, ali celo enakovredno divjim sadežem iz narave (Štampar in sod., 2009). Opravljenih je zelo malo znanstvenih raziskav, ki bi se ukvarjale s tem, da bi primerjale kakovost pridelkov intenzivnega konvencionalnega kmetijstva s pridelki ekološkega (Krišković, 1989).

Pravilno biološko kmetijstvo omogoča, da tako pridelano sadje in poljščine niso nič slabšega videza od tistih v konvencionalnem kmetijstvu. Poškodovana, kržljava in zmečkana sadje in zelenjava, ki jih kdaj predstavljajo pod nalepko ekološka, nikakor ni pridelek dobre biološke tehnike (Krišković, 1989).

Raziskave, opravljene v ZDA, kažejo prav nasprotno; da so pridelki, pridelani z biološko tehniko, boljši (gre za preučevanje učinkov različnih načinov fertilizacije na pridelovanje jabolk). Znanstveno dokazovanje kakovosti okusa ekoloških pridelkov je zelo težko izvedljivo, predvsem pa nekoristno. Največkrat je dovolj, če se vsakdo sam prepriča s primerjavo (Krišković, 1989).

2.3 RAZLIKE MED EKOLOŠKIM IN KONVENCIONALNIM KMETIJSTVOM

Ekološkega kmetijstva ne smemo razumeti kot korak nazaj, temveč kot možnost trajnostnega načina kmetovanja, ki je usmerjeno v prihodnost in zagotavlja človeku prijazno, perspektivno delovno mesto. To kmetijstvo ohranja primerno razmerje med velikostjo posestva in kmetijsko tehniko ter omogoča ohranitev stika z naravo (Bavec, 2001). V preglednici 3 so prikazane bistvene razlike med ekološkim in konvencionalnim načinom kmetovanja.

Preglednica 3: Osnovne razlike med ekološkim in konvencionalnim kmetijstvom (Bavec, 2001: 22)

	Ekološko kmetijstvo	Konvencionalno kmetijstvo
izboljšanje rodovitnosti tal	s pravilnimi postopki obdelave, organskim gnojenjem, kolobarjenjem, mulčenjem, zelenim gnojenjem ...	z uporabo sintetičnih, mineralnih gnojil
prehrana rastlin	posredna (sproščanje hranil iz tal)	direktna (z uporabo lahkotopnih mineralnih gnojil)
varstvo rastlin	odprava vzrokov, preprečevanje nastanka boleznih škodljivcev, rasti plevelov	odprava znamenj z uporabo sintetičnih fitofarmaceutskih sredstev
živinoreja	živalim primerna reja, optimalna kakovost doma pridelane krme	baterijska reja perutnine, privezana reja brez izpustov, optimalno dopolnilno krmljenje (beljakovinski in drugi dodatki)
prehrana živali	optimalna kakovost doma pridelane krme	optimalno dopolnilno krmljenje (beljakovinski in drugi dodatki)
zdravljenje živali	povečevanje odpornosti	zdravljenje bolezenskih znamenj

2.4 RAZLIKE MED EKOLOŠKIM IN KONVENCIONALNIM PRIDELOVANJEM JABOLK

2.4.1 Izbira podlage

2.4.1.1 Izbira podlag v konvencionalnem nasadu jablan

V današnjem času uporabljamo za podlage jablan skoraj izključno vegetativne podlage. Zmanjšana rast rastline, dobra ukoreninjenost, skladnost z žlahtnimi sortami, rodnost hitro po sajenju in redna rodnost v nadaljnjih letih so glavni pogoji, ki jim morajo danes ustrezati vegetativne podlage. Bujnost podlage pa je vsekakor lahko precej različna glede na sorto in zlasti na naravo tal. Poznamo veliko število vegetativnih podlag različne bujnosti, od teh pa so najpomembnejše:

- šibko rastoče podlage M 27, M 9 in M 26 (višina dreves na teh podlagah znaša 2 do 3 m),
- srednje bujno rastoče podlage MM 106, M 7, M 2, MM 111, MM 104 in M 4 (višina dreves je 3 do 4,5 m),
- bujno rastoče podlage M 1, M 25, M 11, H 35, A₂ in jablanov sejanec (višina dreves na teh podlagah znaša 4,5 do 6 m).

Za naše razmere, posebno za intenzivne goste nasade in vrtničkarje so najvažnejše podlage M 9, M 26 in MM 106 (Adamič in sod., 1975; Sancin 1988).

2.4.1.2 Izbira podlag v ekološkem sadnem nasadu

Pred petnajstimi do dvajsetimi leti so bile najbolj razširjene robustne in povečini bujno rastoče podlage, zdaj pa dajemo zaradi gospodarnosti prednost šibko rastočim podlagam, ki se razmnožujejo zgolj vegetativno. Za ekološko pridelavo so poleg znanih šibko rastočih podlag (M 9, M 26) zanimive tudi srednje bujno do bujno rastoče podlage (M 7, M 4, M 11). Ker je pas pod drevesi v nekaterih obdobjih vegetacije zatravljen, bujneje rastoče podlage po približno treh letih lažje prenašajo pomanjkanje vode in hranilnih snovi, zato postanejo sposobnejše. Slaba stran teh podlag pa je prebujna rast poganjkov in pozen začetek rodnosti (Lind in sod., 2001).

2.4.2 Izbira sorte

2.4.2.1 Visokorodne sorte v konvencionalnem sadjarstvu

Prej je pridelovanje sadja temeljilo na sortah, prilagojenih ožjim gojitvenim območjem. V sodobnih sadnih nasadih pa gojimo večinoma sorte, odbrane glede na veliko rodnost, lep videz in velikost plodov, deloma pa tudi glede na odpornost proti nekaterim boleznim in škodljivcem. Tako gojene sorte se morajo dobro prodajati na trgu in morajo doseči visoko ceno. Toda če si pogledamo stvar z druge plati – koliko vsebuje to sadje vitaminov – potem uspehi niso več tako bleščeči (Krišković, 1989).

2.4.2.2 Izbira sort v ekološkem sadjarstvu

V ekološkem sadjarstvu je izbira sort še posebno pomembna. Ker je sadni nasad trajen, je to za sadjarja predvsem gospodarsko vprašanje. Na izbiro sorte vplivajo rastne razmere, sestava sadjarskega obrata ali kmetije, način prodaje kot tudi usmeritev obratovodje ali kmeta. Za gospodarski uspeh se morajo potrebe sorte optimalno ujemati z rastnimi razmerami (izbira rastišču primernih sort). Izkoriščati je treba značilne lastnosti sort (odpornost proti škodljivcem in boleznim, proti fiziološkim motnjam in vremenskim vplivom) ter s tem omejiti uporabo pripomočkov (ekološko ustrezna izbira sort). V ekološkem sadjarstvu je zaradi omejenih možnosti uporabe pomožnih sredstev odločilna občutljivost sort za bolezni in škodljivce. Z modernimi tržnimi sortami imamo v ekološkem sadjarstvu malo izkušenj. Prav tako se sorte glede na rodnost, kakovost kot tudi na občutljivost na bolezni in škodljivce po pokrajinah različno obnesejo. Zato je za optimalni izbor sort zelo pomembno pridobivanje območnih podatkov o značilnih sortnih lastnostih s pomočjo intenzivne poskusne dejavnosti. To pomeni, da morajo območne poskusne ustanove nove sorte, preden jih začnejo saditi, preskusiti, kako primerne so za prakso. Pri izboru sort morajo paziti na to, da se ujemajo z rastnimi razmerami in sestavo obrata ali kmetije. Pomembno je tudi, da ima vsako gospodarstvo takšno sestavo sort, ki ustreza njegovemu rastišču (zgodnje, jesenske sorte in sorte za skladiščenje) (Lind in sod., 2001).

2.4.3 Biološko aktivna tla in potrebe po hranilih

Življenje se rojeva v tleh in se v njih tudi končuje. Glede na to spoznanje so nastale velike razlike med t.i. konvencionalnim in ekološkim pridelovanjem. Prehrana rastlin se pri obeh načinih pridelovanja močno razlikuje (preglednica 4).

Konvencionalno pridelovanje temelji na Liebigovih postavkah o prehrani rastlin. Liebig meni, da vsa živa bitja, predvsem pa rastline, ki odmirajo, razpadejo – mineralizirajo do svojih prvin. Tako mineralizirane organske snovi N, P, K, Ca, Mg in druge po teh postavkah znova absorbira koreninski sistem rastlin in so v lahko topni obliki uporabne za hrano (Krišković, 1989).

Ekološko pridelovanje se razlikuje od konvencionalnega po tem, da dokazuje, da rastline in živali, ki poginejo, v tleh ne razpadejo do popolne mineralizacije v prvinske elemente (N, P, K, Ca, Mg in druge). Ob njihovem razkrajanju ostanejo osnovni elementi življenja, pravzaprav njihovi deli žive snovi (molekule). V skladu s temi postavkami je prehrana rastlin v biološkem pridelovanju zasnovana na razkrajanju organskih snovi, ki jim po potrebi dodajamo rudninska gnojila (drobno mlete surove fosfate, vulkanske kamnine, alge, idr.) (Krišković, 1989).

Ekološko pridelovanje postavlja kot temelj prehrane rastlin biološko aktivna tla, v katerih je veliko mikroorganizmov. Prehranjevanje poteka posredno; mikroorganizmi hranijo tla, obenem pa s svojo dejavnostjo tudi biološko pripomorejo k razkrajanju organske snovi in, povezano s koreninskim sistemom, z izmenjavo snovi hranijo rastline (Krišković, 1989).

Preglednica 4: Primerjalni pregled prehrane rastlin (Krišković, 1989: 57)

Klasična prehrana s topnimi NPK gnojili	Prehrana rastlin po biološki metodi
Optimalno odmerjanje NPK gnojil ni mogoče.	Optimalno odmerjanje hranil opravljajo talni mikroorganizmi.
Prekomerno odmerjanje in nepravilna prehrana sta običajna.	Napačno odmerjanje hranil sploh ni mogoče.
Velike izgube zaradi izpiranja dušikovih gnojil.	Izgub zaradi izpiranja dušikovih hranil ni.
Postopno rušenje strukture tal je običajen pojav.	Gnojenje z organskimi gnojili strukturo tal nenehno izboljšuje.
Potreba po dodajanju NPK gnojil je vedno večja.	Potreba po organskih gnojilih se postopoma zmanjšuje.
Zadrževanje vlage v tleh je odvisno od količine padavin.	Rastline so optimalno preskrbljene z vlago.
Polagoma se vse bolj razmnožujejo škodljivci in bolezni.	Kolikor se v tleh povečuje količina humusa, toliko se zmanjšuje škoda zaradi bolezni in škodljivcev.
Postopno zmanjševanje biološke kakovosti tal.	Biološka kakovost tal se nenehno izboljšuje.
Polagoma se izgublja možnost shranjevanja plodov v skladišču.	Izgube zaradi skladiščenja plodov se gibljejo v dovoljenih mejah.
Zmanjševanje rodovitnosti tal je običajen pojav.	Rodovitnost tal se nenehno povečuje.
Zvišujejo se izdatki za varstvo rastlin.	Izdatki za varstvo rastlin se nenehno zmanjšujejo.

Pravilna prehrana odločilno vpliva na zdravje in odpornost rastlin pred napadom zajedavcev. S prehrano, kakršno mu omogočamo z biološko metodo, jemlje sadno drevo iz tal tista hranila in tolikšno količino, kolikor mu dovoljuje njegova biološka zmogljivost. Pod vplivom zunanjega

okolja postane odporno proti zajedavcem, kolikor mu dovoljujejo genske sposobnosti in ekološke razmere (Krišković, 1989).

Klasična prehrana rastlin ne le da ne upošteva mikrobiološke aktivnosti tal, s katero se ustvarjajo ugodne razmere za rast in pridelek rastlin, pač pa to aktivnost tudi uničuje. Z dodajanjem industrijskih gnojil se ruši biološko ravnotežje v tleh, obenem s tem pa poteka negativna selekcija, ki redno preprečuje delo koristnih mikroorganizmov na račun patogenih. Zaradi tega se patogeni mikroorganizmi prekomerno razmnožujejo. Porušeno biološko ravnotežje v tleh so ugotovili zlasti tedaj, ko so poleg industrijskih gnojil dodajali tlem tudi razna sredstva za varstvo rastlin – pesticide, herbicide in druga. To ravnotežje v tleh se toliko spremeni, da se začnejo razvijati neke nove do tedaj popolnoma neznane vrste patogenih mikroorganizmov. Da bi preprečili takšno razmnoževanje, je treba ukrepati – se pravi zmeraj z novimi in vse hujšimi strupi preprečevati razvoj patogenih mikroorganizmov. Tako nastane začarani krog, iz katerega je zelo težko najti izhod (Krišković, 1989).

2.4.4 Gnojenje (fertilizacija)

2.4.4.1 Gnojenje v konvencionalni pridelavi sadja

Z gnojenjem povečamo založenost tal z organskimi in mineralnimi snovmi ter izboljšamo strukturo tal; obenem so te snovi rastlinam tudi bolj dostopne. Med vsemi hranili igrajo najpomembnejšo vlogo zlasti dušik, fosfor, kalij, kalcij in magnezij (Sancin, 1988).

Da bi dobili velike pridelke sadja, v sodobnih, klasičnih nasadih vse več intenzivno gnojimo z industrijskimi gnojili (v fiziološko aktivni obliki, topni v vodi). Gnojenje izvajamo na podlagi analize tal in foliarne analize (analize listja), ki kažejo na prehranjenost jablan in založenost tal s hranili ter upoštevamo tudi zunanji videz rastline (rast, rodnost, barva listov, moč jablan). Po tako ugotovljenih potrebah po hranilih določamo količine dušikovih, fosforjevih in kalijevih (NPK) gnojil (Sancin, 1988; Krišković, 1989).

Pri določanju količin gnojil moramo upoštevati tudi količine organskih snovi v tleh. Ustrezna sestava tal ohranja v sebi kar največ vlage iz zraka in rastlinam omogoča ustrežnejše izrabljanje mineralnih snovi. V tleh, kjer rastejo jablane ali jih nameravamo saditi, naj bo 3 – 5 % organskih snovi (Sancin, 1988).

V novejšem času se vse več uporabljajo t.i. kombinirana gnojila, v katerih je določeno razmerje med posameznimi hranili (NPK v različnih kombinacijah). Da bi preprečili razvoj škodljivcev v tleh, dodajamo posameznim kombinacijam še različna sredstva za varstvo rastlin

– pesticide (Krišković, 1989). Zaradi enostranskega načina fertilizacije z dodajanjem zlasti NPK gnojila se je spremenila količina hranilnih elementov v sadju, kar je dobro razvidno iz preglednice 5 (Krišković, 1989).

Preglednica 5: Učinek fertilizacije na vsebnost elementov v jabolkah (Krišković, 1989: 150)

Rudninski elementi	Tla, gnojena samo z industrijskimi gnojili (mg)	Tla, gnojena samo z organskimi gnojili (mg)
dušik	1,380	0,211
fosfor	0,229	0,179
kalij	1,613	0,998
kalcij	0,172	0,060
magnezij	0,026	0,139

Podatki iz preglednice jasno kažejo, da se z enostranskim gnojenjem z industrijskimi gnojili (NPK) razmerje med posameznimi elementi glede vsebnosti hranilnih snovi v jabolkah spremeni v primerjavi z gnojenjem z organskimi gnojili. Tako se precej zviša vsebnost nitrata (dušika), zatem fosforja, kalija in kalcija, zmanjšuje pa se vsebnost magnezija (Krišković, 1989).

Pri napravi novih nasadov izpeljemo meliorativno gnojenje (gnojenje, ki se izvaja pred samim sajenjem), da izboljšamo splošno stanje tal, nato pa pred začetkom vegetacije dodamo začetne doze gnojila, med vegetacijo pa dognojujemo (Krišković, 1989).

GNOJENJE OD SAJENJA DO RODNOSTI

V prvih letih po sajenju ima umerjeno gnojenje poseben pomen. Jablanam moramo nuditi tak režim prehrane, ki omogoča najboljši razvoj glede na biološke lastnosti jablane (vegetativni razvoj, začetek rodnosti, odpornost proti nizkim temperaturam itd.). Najpomembnejše hranilo v tem obdobju je dušik. Dušična gnojila pospešijo rast, povečujejo listno površino, povečujejo fotosintezo, vendar tudi nevarno podaljšujejo vegetacijo in s tem rastlini zmanjšujejo odpornost proti nizkim temperaturam. Za hitro rast in oblikovanje krošnje pravočasno dodajamo ustrezne količine dušičnih gnojil. Ker gnojimo jablane pred in med sajenjem na zalogo, v času vzgoje krošnje dodajamo tlem le manjše količine fosfornih in kalijevih gnojil (Sancin, 1988).

GNOJENJE V ČASU RODNOSTI

Ob prehodu v rodnost potrebujejo jablane večje količine dušika, fosforja, kalcija in drugih mineralnih snovi. Pri gnojenju moramo paziti na določena sorazmerja med količinami dodanih

gnojil, da rastlinam ne bi porušili prehranskega fiziološkega razmerja in jih s tem prizadeli. Preobilica dušika v tleh oziroma v rastlini podaljšuje obdobje rasti, zavira razvoj in diferenciacijo cvetnega brsta, jablana pa ostane bolj občutljiva za bolezni in nizke temperature (Sancin, 1988). Priporočene letne količine posameznih hranil za gnojenje so prikazane v preglednici 6.

Preglednica 6: Priporočene letne količine posameznih hranil za gnojenje (kg/ha) (Sancin, 1988: 62)

Hranilo	Priporočene letne količine (kg/ha)	Čas gnojenja
N	100 – 180	1/3 približno 20 dni pred vegetacijo, 1/3 pred cvetenjem in 1/3 po cvetenju
P ₂ O ₅	50 – 100	v jeseni
K ₂ O	150 – 200	v jeseni
Mg	40 – 60	v jeseni
B	20 – 40	do meseca februarja

Pri uporabi mešanih gnojil moramo paziti, da so posamezna hranila v mešanici v ustreznem razmerju, ki znaša za jablano približno N : P : K = 1 : 0,3 : 1,5. Pri izbiri teh gnojil dajemo prednost tistim, ki vsebujejo poleg dušika, fosforja in kalija tudi magnezij in druge mikroelemente (Sancin, 1988).

V času rodnosti obvezno gnojimo tudi z organskimi gnojili, kot so hlevski in konjski gnoj, kompost in z organskimi koncentraty. Organska gnojila trosimo jeseni, istočasno s fosfornimi in kalijevimi gnojili. Količine so odvisne od založenosti tal s humusom. Gnojenje z organskimi gnojili lahko uspešno zamenjamo z negovano ledino in podorom (Sancin, 1988).

FOLIARNO GNOJENJE

Pri gnojenju lahko izvajamo tudi foliarno gnojenje – gnojenje na list. Jablana dobro reagira na gnojenje skozi listje, z mineralnimi snovmi, raztopljenimi v vodi. Na ta način rastlina zelo hitro sprejema in prenaša dušik in druge elemente, hitreje kakor skozi korenine. Foliarno gnojenje se priporoča za hitro intervencijo ali kot dopolnitev navadnemu gnojenju (Sancin, 1988).

2.4.4.2 Gnojenje v ekološkem nasadu

V ekološkem nasadu moramo najprej uporabiti vse ukrepe, ki izboljšujejo rodovitnost tal: pravilen kolobar, skrbna priprava tal, obdelava tal, ki ohranja strukturo, optimalna oskrba s humusom in gnojenje z domačimi gnojili. Cilj gnojenja je krepitev dejavnosti življenja v tleh. Organsko gnojenje izboljšuje strukturo tal, s čimer pospešuje nastajanje humusa. Prepovedana

je uporaba kemično-sintetičnih dušikovih gnojil, lahko topnih fosfatov ter vseh gnojil, ki niso na seznamu dovoljenih. Foliarna gnojila (gnojenje skozi list) je dovoljeno uporabiti le v primeru dokazanih pomanjkanj (Priporočila za ..., 1997). Komercialna gnojila, ki so dovoljena za ekološko pridelavo po uredbi EEC 2092/91, lahko uporabimo le ob dokazanem pomanjkanju, ne pa za obilnejši pridelek (Council Regulation ..., 1991; Lind in sod., 2001).

Poglavitne vrste organskih gnojil so hlevski gnoj (goveji, prašičji, perutninski), gnojnica in kompost (Leskošek, 1993). Med organska gnojila prištevamo poleg gnojil živalskega izvora (hlevski gnoj, gnojnica, gnojevka) še rastlinske ostanke (žetveni in koreninski ostanki, slama, podorine, kompost itd.) (Tajnšek, 2005). Kot organska dopolnilna gnojila (predvsem kot vir dušika) lahko uporabljamo tudi mleto roževino, krvno in kostno moko ter živalske dlake in ščetine (Priporočila za ..., 1997).

Za izboljšanje rodovitnosti tal in za izboljšanje nastalih neravnotežij v tleh in pri rastlinah (npr. zaradi neugodnih vremenskih razmer) je na voljo vrsta pomožnih sredstev in sredstev za oskrbo, ki jih uporabljamo v sadjarstvu. Med mineralna dopolnilna gnojila štejemo kamninske moke (predvsem bazaltne moke), minerali glin (glinene moke; npr. bentonit), apnenec iz morskih alg ter počasi učinkujoči gnojilni apnenci (npr. kalcijev karbonat, dolomitni apnenec) (Sattler in Wistinghausen, 1995).

Medtem ko rudninska gnojila vsebujejo rastlinska hranila v obliki neorganskih spojin (npr. kalijev klorid, amonijev nitrat), torej soli, ki predstavljajo tako rekoč že pripravljeno hrano za rastline, pa je glavna značilnost organskih gnojil, da so sestavljena iz organskih spojin, rastlinskih in živalskih odpadkov, ostankov in izločkov. V teh ostankih in izločkih je praviloma le malo ali nič rastlinam neposredno dostopne hrane. Organske snovi morajo najprej razpasti, da jih rastline lahko uporabijo za svojo prehrano (Leskošek, 1993).

Približno 70 – 90 % rastlinskih ostankov razkrojijo talni mikroorganizmi v procesu mineralizacije do preprostih kemičnih spojin (nitrati, fosfati, sulfati...). Ta hranila so enaka tistim iz mineralnih gnojil. 10 – 30 % organskih hranilnih ostankov ne razpadejo povsem, ampak se po delnem razkroju spremenijo v humus. Stopnja mineralizacije in nastajanja humusa je odvisna predvsem od klimatskih razmer, zemljišča in C:N razmerja. Čim nižje je razmerje, tem večja je mineralizacija. Mineralizacijo pospešuje tudi obdelava tal (Tajnšek, 2005).

Gnojila v ekološki pridelavi morajo biti uporabljena pravočasno in v optimalnih količinah. Drevesom, ki imajo pomanjkanje hranil, slabita asimilacija in vitalnost. To se kaže v zmanjšani odpornosti dreves na bolezni in diferencirajo se rodne zasnove slabše kakovosti, kar

vodi v nižji pridelek (Weibel in Häseli, 2003). Prav tako tudi prekomerno gnojenje z dušikom pospeši pojav bolezni in škodljivcev. Z uravnovešenim gnojenjem dobijo sadna drevesa hranilne snovi v harmoničnem razmerju, v zadostnih količinah in ob pravem času, obenem pa jih pomaga ohranjati v fiziološkem ravnotežju. Hranila, dodana z gnojili, niso v celoti dosegljiva rastlinam; izgubljajo se s spiranjem, nekatera pa so vezana v tleh tako, da rastlinam niso dostopna. Po drugi strani pa imajo rastline z mineralizacijo in s preperevanjem nenehno na voljo hranilne snovi iz tal (Lind in sod., 2001).

Iz fertilizacije z industrijskimi (sintetičnimi) in organskimi gnojili vidimo, da so nastale razlike v kakovosti jabolk, ki so bila gnojena z mulčenjem (biološka metoda) in različnimi odmerki dušikovih gnojil (preglednica 7).

Preglednica 7: Učinek fertilizacije na donosnost in kakovost jabolk (Krišković, 1989: 28)

Način fertilizacije (količina na sadno drevo)	Pridelek na deblo (v bušelih)	Pridelek plodov I. kvalitete (v %)	Pridelek plodov II. kvalitete (v %)
mulčenje (3-5 kg sena)	14,3	71,3	10,9
mulčenje (70 kg sena)	14,1	79,5	11,2
mulčenje (105 kg sena)	16,2	71,1	11,5
mulčenje (35 kg sena) + 1 kg am. nitrata	17,0	54,6	9,3
1 kg amonijevega nitrata	22,4	28,3	6,2
2 kg amonijevega nitrata	22,4	28,3	6,2
3 kg amonijevega nitrata	18,2	30,2	5,5
0,7 kg N v kompleksnem gnojilu	16,2	56,1	9,1
1 kg N v kompl. gnojilu + 1 kg am. nitrata	18,9	42,1	8,0
0,5 kg dušika v foliarnem gnojenju	15,2	55,8	8,5

To fertilizacijo so štiri leta uporabljali pri jabolkih sorte mcintosh. Mulčenje v sadovnjaku je bilo opravljeno po naslednjem postopku: površinsko plast tal okoli sadnih dreves pokrijemo z 2 do 3 cm debelo plastjo materiala za zastiranje. Takšna plast se nenehno obnavlja, ko razprostrta količina materiala strohni (Krišković, 1989).

Razlika med fertilizacijo sadnih dreves z industrijskimi gnojili in organskim gnojenjem je očitna. Fertilizacija tal z organskimi gnojili podpira delo mikroorganizmov tako, da se v medsebojni povezavi med talnimi mikroorganizmi in tlemi sadno drevo hrani po svojih potrebah, obenem pa se razvija plodnost tal kot temeljni nosilec njegove odpornosti proti zajedavcem. Fertilizacija tal z industrijskimi gnojili samo dozdevno povečuje pridelek sadja, po drugi strani pa trajno kvari plodnost; poleg tega, kar je tudi pomembno, zmanjšuje odpornost sadnih dreves proti zajedavcem. Zaradi tega je seveda potrebno več škropljenj, s tem pa se tudi povečajo pridelovalni stroški. Z drugimi besedami: fertilizacija sadnih dreves z industrijskimi gnojili spodbuja rast sadnih dreves in daje povečan pridelek ter večje plodove s povečano vsebnostjo vode, vsebnost suhe snovi pa se ne razlikuje veliko od suhe snovi v

organskih pridelkih. Precejšnje razlike pa so v kakovosti plodov in njihovem shranjevanju po obiranju. Plodovi sadnih dreves, gnojnih z organskimi gnojili, so precej bolj kakovostni glede vsebnosti sladkorja in rudninskih snovi, obenem pa jih je mogoče veliko bolje hraniti v skladišču, tako v normalnih razmerah kot v hladilnicah (Krišković, 1989).

2.4.5 Oskrba tal

2.4.5.1 Oskrba tal v konvencionalni pridelavi

Jablana je večletna rastlina in lahko raste ter rodi več deset let na istem mestu. Zaradi tega naj bi bila zemlja rahla, vlažna in založena s hranili. Zelo koristen podatek o prehranjenosti tal nam pove fizikalna in kemična analiza tal. Jablane najbolje uspevajo v tleh, ki vsebujejo okoli 2 do 3 % organske snovi, 10 do 15 mg P_2O_5 in 20 do 30 mg K_2O na 100 g zračno suhe zemlje. Da bi se korenine čim bolje razrastle, in da bi bile v vodi raztopljene hranilne snovi čim lažje dostopne rastlinam, je treba tla globinsko pognojiti in prerahljati oziroma prerigolati (rahljanje zemlje pred posaditvijo z globokim oranjem ali prekopavanjem). Pred rigolanjem je vsekakor priporočljivo opraviti založno gnojenje z organskimi (hlevski gnoj, kompost, šota ali zeleni podor) in z mineralnimi fosforinimi in kalijevimi gnojili, skladno s potrebami, ki jih narekuje talna analiza (Sancin, 1988).

V sadovnjaku moramo vzdrževati tla v najugodnejšem stanju, saj se bodo le tako dobro razvile bogato razraščene korenine. Od razvoja korenin so namreč odvisni prehranjenost, rast in razvoj jablan, količina in kakovost pridelka itd. Glede na podnebne razmere in na delovno silo lahko tla oskrbujemo na različne načine, in sicer: z rahljanjem, negovanjem ledine (površina pod drevesi, posejana s travno mešanico, ki jo redno kosimo oziroma mulčimo), z zastiranjem v kombinaciji z uporabo herbicidov, redkeje s podorom in zastiranjem (Sancin, 1988).

2.4.5.2 Tla v ekološkem nasadu

Tla morajo biti vsaj srednje globoka, dobre strukture in dobro zračna (za dobro prehodnost), z dobro vsebnostjo humusa, ki omogoča visoko biološko aktivnost tal in hitro mobilizacijo hranil spomladi. Potrebna je uravnotežena rodovitnost (zaradi izravnave omejenih možnosti foliarnega gnojenja ali uporabe sintetičnih gnojil) (Weibel in Häseli, 2003).

Cilj negovanja tal v ekološkem nasadu so večja proizvodna sposobnost (boljši pridelek), ohranjanje zdrave strukture in povečanje aktivnosti tal. Varstvo tal je lahko optimalno, če so tla porasla. Tla v trajnih ekoloških nasadih naj bi bila trajno zatravljena ali mehansko obdelana v pasu pod drevesi. Da bo prostor v vrsti zmeraj zatravljen, moramo preverjati, kako so tla

preskrbljena z vodo in z dušikom. Spomladi, ko sadno drevo potrebuje največ dušika, je ozelenitev v vrsti zelo konkurenčna, saj spremljajoče rastline jemljejo sadnemu drevju dušik. Podobno je tudi poleti, ko je suša, zato moramo v tem obdobju ohranjati pas pod drevesi čist in nezatravljen. Jeseni, ko pa sadne rastline potrebujejo malo dušika, pa ima ozelenitev pod drevesi vrsto koristnih učinkov, predvsem na kakovost plodov (Lind in sod., 2001):

- boljša obarvanost plodov,
- plodovi so bolj zdržljivi (v njih je manj dušika in kalija),
- manj je predebelih plodov,
- preprečuje izpiranje dušika.

Tla v vrstnem prostoru morajo biti čista in nezapleveljena. Za obvladovanje zapleveljenosti in omejevanje rasti trave se smejo uporabljati le mehanični in toplotni ukrepi (Robačar, 2009). Vsekakor košnja bolj prizanaša koristnim bitjem v tleh kot pa mulčenje (Lind in sod., 2001). Uporaba okopalnikov je nujna spomladi pred cvetenjem, ko drevo potrebuje veliko dušika. Z okopavanjem odstranimo plevele, ki so pri črpanju vode in hranil konkurenca drevesom in s tem, ko premešamo in prezračimo zemljo, pospešimo mineralizacijo in sproščanje dušika v tleh. Okopavanje je nujno izvesti tudi jeseni po obiranju. Da ne pospešujemo sproščanja dušika v poletnih mesecih, je tekom vegetacijske dobe plevel bolje odstraniti le površinsko (Caf in Brence, 2010).

2.4.6 Varstvo rastlin pred boleznimi in škodljivci

2.4.6.1 Intenzivni varstveni ukrepi v konvencionalnem sadjarstvu

Kolikor intenzivnejši so ukrepi fertilizacije sadnih dreves, zlasti z dušikovimi industrijskimi gnojili, toliko večja je potreba po izvajanju intenzivnih ukrepov za varstvo sadnih dreves pred zajedavci.

V praksi škropimo večinoma po vnaprej določenem načrtu, ki temelji na posameznih razvojnih fazah sadnih dreves. Škropimo pred cvetenjem, med njim in takoj po njem. Namen teh škropljenj je, da z njimi popolnoma zatremo zajedavce, četudi nam doslej ni nikoli povsem uspelo. S tem se število škropljenj iz leta v leto nenehno povečuje. Škropimo z različnimi sredstvi. Teh sredstev je toliko in so tako različna, da nam morajo biti pri tem v pomoč strokovnjaki. Škropljenje s pesticidi pa pušča zagotovo precejšnje posledice na človekovem zdravju. Intenzivna sredstva za zatiranje bolezni in škodljivcev puščajo na sadju ostanke strupov. S kemično analizo lahko deloma ugotovimo količino teh ostankov, zelo težko pa je določiti mejo strupenosti, torej mejo, ko postanejo ti strupi nevarni za človeka (Krišković, 1989).

2.4.6.2 Varstvo rastlin v ekološki pridelavi

V ekološkem sadjarstvu je prepovedana uporaba naravi tujih, kemično-sintetičnih sredstev za varstvo rastlin, regulatorjev rasti in sredstev za predčasno prekinitev rasti. Prav tako je prepovedana uporaba herbicidov in tudi kakršnihkoli sredstev, ki so bila izdelana s pomočjo genske tehnologije (Priporočila za ..., 1997).

V ekološki pridelavi je dovoljena le uporaba naravnih sredstev za varstvo rastlin. Delovanje teh sredstev ni vedno najbolj učinkovito, praviloma jih moramo uporabljati preventivno ali takoj, ko opazimo prve simptome bolezni ali škodljivca. Kurativno delovanje teh sredstev je manj učinkovito. Zato je pri ekološkem sadjarstvu še bolj pomembno, da poznamo razvojne kroge bolezni in škodljivcev ter predvidevamo, kdaj moramo aplicirati posamezno sredstvo, da bo njegovo delovanje kar najbolj učinkovito. Preventivno proti boleznim in škodljivcem v ekološkem sadovnjaku delujemo s temeljitim in pravočasnim izvajanjem vseh tehnoloških ukrepov, kot so rez jablan, redčenje plodičev, okopavanje – odstranjevanje plevelov in gnojenje (Caf in Brence, 2010).

Poleg neposrednih ukrepov izvajamo tudi takšne, ki napad bolezni ali škodljivcev preprečujejo. Tem ukrepom je treba posvetiti še posebno pozornost. Obsegajo primerno izbiro sort, krepitev zdravja tal, harmonično prehrano rastlin, ustrezne metode pridelovanja in kultiviranja, kot so kolobar, mešani posevki, podor, obdelovanje tal ter varovanje ptic in drugih koristnih živali z ohranjanjem in ustvarjanjem ustreznih življenjskih razmer (žive meje, gnezdišča ...) (Priporočila za ..., 1997).

Izkušnje bioloških sadjarjev dokazujejo, da se je mogoče rešiti večine škodljivcev, ki napadajo različne vrste sadnih dreves. Če se pojavijo škodljivci, zlasti ko preidemo na ekološko sadjarstvo, jih odstranjujemo s sredstvi, ki jih odganjajo. Ta sredstva imenujemo repelenti. Poleg tega uporabljamo tudi mehanska sredstva, kakršno je na primer lovljenje z lovilnimi pasovi. V tem je temeljna razlika v primerjavi s klasičnim varstvom sadnega drevja, pri katerem škodljivce zatirajo. Ko si prizadevamo, da bi popolnoma zatrli škodljivce, povzročamo neravnovesje med škodljivci in njihovimi sovražniki. S tem se pojavijo novi škodljivci, ki do tedaj niso bili posebno nevarni za sadna drevesa. Ko pa uporabljamo sredstva za odganjanje škodljivcev, ohranjamo antagonizem med posameznimi škodljivci in s tem precej zmanjšamo težave glede varstva sadnih dreves (Krišković, 1989).

Ekološka pridelava se smatra kot okolju prijazna, z uporabo zemlji prijaznih agrikolturnih metod in postopkov. V zadnjih letih se je povečalo povpraševanje po ekoloških pridelkih, saj jih potrošniki smatrajo za bolj varne in zdrave. Ti na trgu dosegajo višje cene v primerjavi s

tistimi, pridelanimi na konvencionalen način. Ker zaradi želje pridelovalcev po doseganju večjih dobičkov obstaja možnost goljufij oziroma nepravilnega označevanja pridelkov, se je povečal tudi nadzor nad pridelavo in zagotovitev, da je hrana, ki je označena pod »ekološko« res zrastle na ta način (Flores in sod., 2007). Tudi nekateri kmetje pri organski pridelavi lahko dodajajo razne neorganske dodatke za večji pridelek (Rogers, 2008).

Ekološki pridelki so bolj zdravi, saj vsebujejo več antioksidantov in fitokemičnih snovi, med katere uvrščamo fenolne spojine, vitamine in minerale, ki imajo pozitiven vpliv na zdravje. Sinteza fitokemičnih spojin je neposredno povezana s stresom, ki mu je izpostavljena rastlina. Tako rastline, vzgojene na naraven način brez sintetičnih pesticidov, ob izpostavljanju različnim nevarnostim, ustvarjajo večje količine teh molekul. Zato so mnoge raziskave usmerjene v ugotavljanje razlik v vsebnosti teh spojin med ekološko in konvencionalno pridelavo. Nadalje se je izkazalo, da obstaja razlika v izotopski sestavi dušika in ogljika v živilih, ki so bili pridelani ekološko, od živil z konvencionalno pridelavo, kar smo poskušali potrditi tudi v diplomski nalogi.

2.5 IZOTOPI

Izotopi so atomi kemijskega elementa z enakim vrstnim številom in različnim masnim številom (Lazarini in Brenčič, 1992). Grški izvor imena »izotop« se nanaša na dejstvo, da se v periodnem sistemu izotopi nahajajo na istem mestu (Kuščer in Moljk, 1960). Po navadi označujemo izotope s simboli elementov, ki jim dodamo atomsko in masno število.

Izotopi so lahko naravni ali umetno pripravljene ter stabilni ali nestabilni. Nestabilni izotopi razpadejo z enim od jedrskih razpadov, stabilni izotopi pa tekom procesov ne razpadejo (Ghidini in sod., 2006). Večina elementov ima več kot samo en stabilen izotop. Atomske mase, ki so navedene v periodnem sistemu, so povprečne vrednosti mas izotopov v naravi.

2.5.1 Stabilni izotopi

V literaturi zasledimo podatke o določanju različnih stabilnih izotopov v živilih. Najbolj pogosto omenjeno je določanje razmerja vsebnosti ogljikovih stabilnih izotopov ^{13}C in ^{12}C ($\delta^{13}\text{C}$), sledi razmerje dušikovih izotopov ^{15}N in ^{14}N ($\delta^{15}\text{N}$), razmerje med devterijem in vodikom ($^2\text{H}/^1\text{H} - \delta\text{D}$), razmerje med kisikovima izotopoma ^{18}O in ^{16}O ($\delta^{18}\text{O}$) in razmerje med izotopi žvepla ^{34}S in ^{32}S ($\delta^{34}\text{S}$) (Rapisarda in sod., 2010).

Izotopsko sestavo oziroma razmerje med težjim in lažjim izotopom v spojini vedno izražamo z vrednostjo, ki predstavlja relativno razliko izotopske sestave raziskovanega vzorca (vz) glede na izbrani standard (st), in jo izražamo v promilih (‰):

$$\delta A = \frac{R_{vz} - R_{st}}{R_{st}} \cdot 1000 \quad \dots (1)$$

V zgornji enačbi pomeni A težji izotop določenega elementa (^{13}C , ^{15}N), vrednost R pa je razmerje med izotopi ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$) in jo vedno podajamo kot razmerje redkejšega, težjega izotopa proti bolj pogostemu, lažjemu izotopu. Mednarodne standarde sta določila Mednarodna agencija za atomsko energijo na Dunaju (IAEA) in Nacionalni inštitut za standarde in tehnologijo iz ZDA (NIST). Ti standardi so točno določene homogenizirane naravne spojine (Craig, 1957). Izbrani so tako, da so izotopska razmerja čim bolj podobna povprečni razširjenosti določenega izotopa v naravi (Engel in Macko, 1993). Delta (δ) vrednost vsakega standarda je definirana z vrednostjo 0 ‰. Pozitivne vrednosti pomenijo, da vsebuje vzorec več težkega izotopa kot standard, negativne pa, da ga je manj. Za ogljik je privzet standard V-PDB (Vienna Pee Dee Belemnite – kalcijev karbonat iz fosiliziranih lupin organizma *Belemnitella americana*) z vrednostjo $R_{st} = 0,0112372$ (Craig, 1957). Za dušik pa je privzet standard atmosferski zrak (AIR) in ima vrednost $R_{st} = 0,0036765$ (Ghidini in sod., 2006).

Pogosto se pri izotopskih vrednostih substanc uporablja izraz »osiromašen« s ^{13}C ali ^{15}N . To pomeni, da določena (osiromašena) substanca vsebuje relativno manj težjega izotopa ^{13}C ali ^{15}N . Ekvivalenten izrazu osiromašen je tudi termin »lahek«. Nasprotno pa za substanco, ki vsebuje relativno več težjega izotopa, rečemo, da je obogatena (ali težja). Razumeti pa je treba, da noben od omenjenih izrazov (obogaten, osiromašen, lahek) ne daje podatkov o absolutni količini ^{13}C ali ^{15}N (Kukovec, 2006).

Vsebnost naravnih stabilnih izotopov je v principu konstantna (zato tudi njihova razmerja) in določena z nastankom elementov oziroma s sestavo Zemlje ob njenem nastanku. Vendar pa so v naravi opazna določena nihanja v vrednostih razmerij zaradi izotopske frakcionacije (Farquhar in sod., 1989). Pojem frakcionacija izraža različno porazdelitev izotopov med reaktante in produkte, ki med reakcijo nastanejo. Proces, ki vodi do frakcionacije, pa je izotopski efekt. Slednji je povezan z večino vseh bioloških, kemijskih in fizikalnih procesov, ki vključujejo stabilne izotope (Kukovec, 2006).

Obstajata dve vrsti izotopskega efekta, ki vodita k frakcionaciji: fizikalen in kemijski izotopski efekt. Slednjega lahko naprej delimo na efekt, ki se zgodi med ravnotežjem ali pa med ireverzibilno kemijsko reakcijo. Fizikalna frakcionacija, ki se dogaja na primer med difuzijo, je posledica dejstva, da se lažji izotop premika hitreje od težjega. Kemijska frakcionacija pa se zgodi zato, ker ima kemijska vez, ki vključuje težji izotop, nižjo vibracijsko frekvenco, oziroma je vez močnejša od ekvivalentne pri lažjem izotopu (Kukovec, 2006).

Do frakcionacije izotopov prihaja tako v atmosferi kot v tleh, najpomembnejše razlike pa nastanejo zaradi frakcionacije v samih organih rastline (Farquhar in sod., 1989). Veliko encimskih reakcij v fotosintezi in drugih biosintetskih poteh je povezanih z izotopskim efektom. Med potekom reakcij pride do različnega razporejanja izotopa oziroma do izotopske frakcionacije med substratom in produktom. Večina biokemijskih reakcij favorizira lažji izotop. Negativna izotopska frakcionacija se kaže kot osiromašenje s težjim izotopom v produktu v primerjavi s substratom (Kukovec, 2006).

Martin (1990) navaja, da pride v vsaki kemijski, fizikalni, fiziološki in biokemijski transformaciji do izotopske frakcionacije. Difuzija svetlobe in izotopov z različno težo v rastlino je odvisna od njene vrste in geoklimatskih razmer. Rastlina proizvaja sok z izotopsko sestavo, na katero vplivajo okolje in leto nastanka (klimatološka frakcionacija), raznolikost med posameznimi vrstami (fiziološka frakcionacija) in vrsta fotosinteze, ki jo rastlina uporablja za sintezo ogljikovih hidratov (biokemijska frakcionacija).

Razliko med izotopsko sestavo dveh snovi opišemo s faktorjem izotopske frakcionacije, α . V primeru ireverzibilne reakcije, kjer prehaja spojina A v spojino B ($A \rightarrow B$), faktor izotopske frakcionacije, α izrazimo z:

$$\alpha_{A-B} = \frac{R_A}{R_B} \quad \dots \quad (2)$$

kjer sta R_A in R_B koncentracijski razmerji med težjim in lažjim izotopom ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$) v spojini A in spojini B.

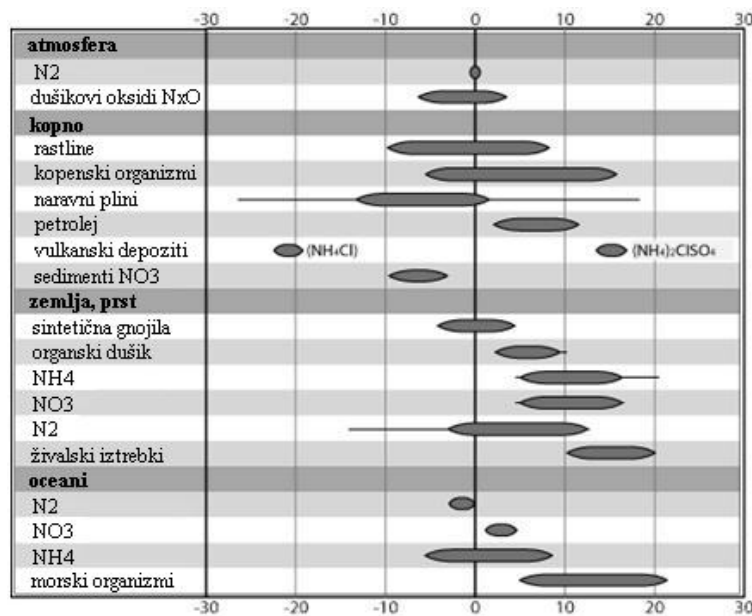
Ob upoštevanju enačbe 1 lahko izrazimo frakcionacijski faktor α z vrednostjo δ in dobimo:

$$\alpha_{A-B} = \frac{1000 + \delta_A}{1000 + \delta_B} \quad \dots \quad (3)$$

kjer sta vrednosti δA in δB izotopski sestavi spojin A in B.

2.5.2 Stabilni izotopi dušika in vplivi na njihovo porazdelitev

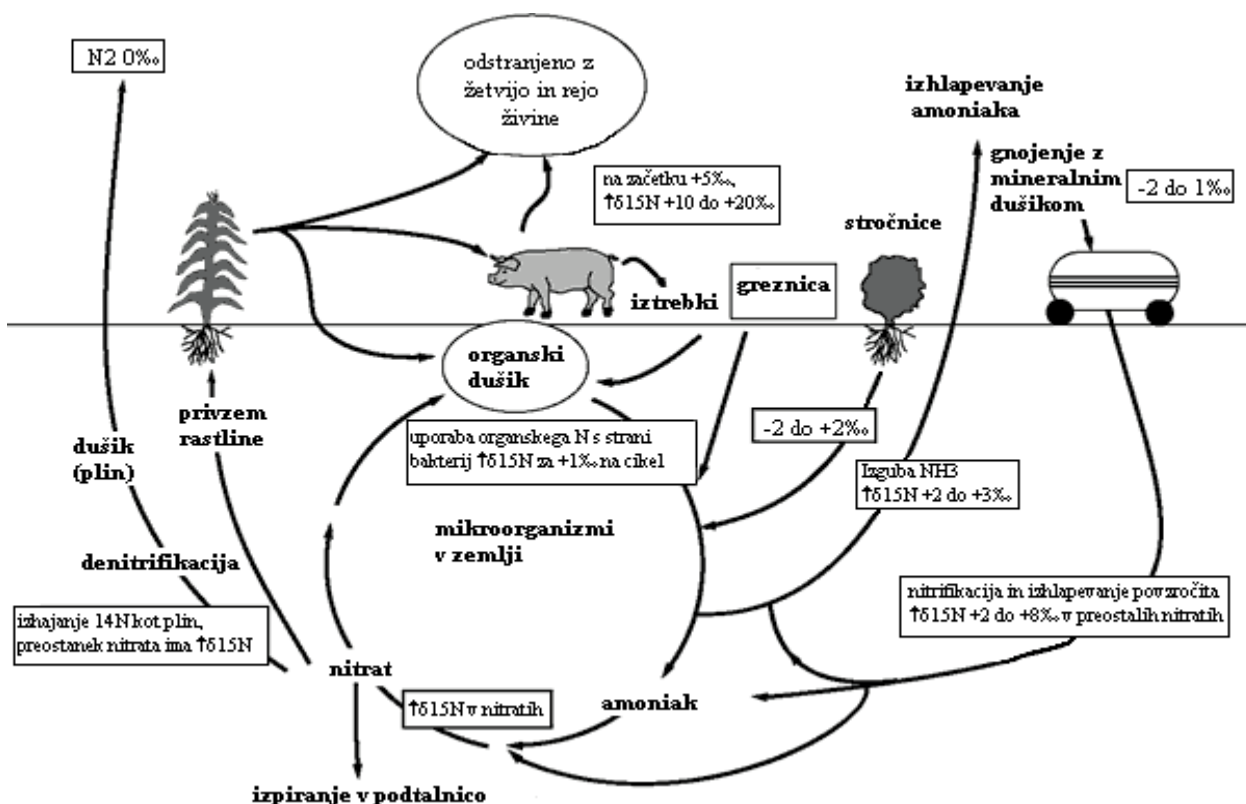
Obstajata dva stabilna izotopa dušika: ^{14}N in ^{15}N . Dušik ima oksidacijska števila v območju od +5 (NO_3^-) do -3 (NH_4^+), kar je vzrok za širok razpon izotopske sestave dušika. Ker je količina ^{15}N v zraku konstantna ($^{15}\text{N}/^{14}\text{N}=1/272$), se zrak uporablja kot standard za podajanje vrednosti $\delta^{15}\text{N}$ (Kendall, 1998). Na sliki 1 lahko vidimo široko območje vrednosti $\delta^{15}\text{N}$, ki jih najdemo v naravi.



Slika 1: Območje $\delta^{15}\text{N}$ (‰) v naravnih spojinah (Clark in Fritz, 1997)

Vse dušikove spojine vsebujejo oba izotopa, vendar sta zaradi izotopske frakcionacije vključena v spojinah v različnih razmerjih glede na naravo reakcije nastajanja teh spojin. Na primer, ko se dušikove spojine prenašajo v prehranjevalni verigi, se lažji izotopi izločajo v urin, težji izotopi pa se zadržijo. Dušik v živalskih odpadkih se hidrolizira v amoniak in nato pretvori v nitrat. Med tem procesom je v nastalih nitratih skoncentriranega več težjega izotopa (SAHRA, 2005). Na sliki 2 so prikazane vrednosti $\delta^{15}\text{N}$ za različne vire dušika in vpliv bioloških procesov na izotopsko sestavo dušika.

Biološke reakcije, kot so asimilacija, nitrifikacija in denitrifikacija, močno vplivajo na izotopsko sestavo dušika v zemlji in vodi. Nitrifikacija je kemični proces, kjer se proizvaja nitrat (NO_3^-) z oksidacijo amoniaka (NH_4^+). Nitrifikacija se pojavi v aerobnih razmerah, medtem ko do denitrifikacije pride v anaerobnih pogojih (SAHRA, 2005).



Slika 2: Vrednosti $\delta^{15}\text{N}$ (‰) za različne vire dušika in vplivi bioloških procesov na izotopsko sestavo dušika (Heaton, 1986)

Primaren rezervoar dušika v naravi je v atmosferi, kjer ima stalno izotopsko sestavo. Nekaj dušika je vezanega tudi v zemlji in tam so vrednosti $\delta^{15}\text{N}$ večinoma pozitivne, kar pomeni, da je v zemlji več težjega dušika kot ga je v zraku. Izotopsko razmerje dušika v rastlinah je povezano s tem, če rastline vežejo dušik iz zraka ali ga le črpajo iz zemlje. Rastline, ki nimajo sposobnosti vezave atmosferskega dušika, imajo večinoma pozitivne vrednosti $\delta^{15}\text{N}$, kar potrjuje dejstvo, da je v zemlji več izotopa ^{15}N kot v zraku (Virginia in Delwiche, 1982). Nekatero rastline, kot so stročnice, lahko asimilirajo atmosferski dušik, ki ima vrednost 0 ‰, zato imajo te rastline $\delta^{15}\text{N}$ vrednosti okoli 0 ‰. V tem primeru ni možno razlikovati med ekološko in konvencionalno pridelavo (Rogers, 2008). Na splošno ima večina rastlin vrednosti

$\delta^{15}\text{N}$ v območju od -5 do +2 ‰. $\delta^{15}\text{N}$ celotnega talnega dušika se giblje nekje od -10 do +15 ‰, pri čemer ima večina tal vrednosti med +2 in +5 ‰ (Kendall, 1998).

Uporaba stabilnih izotopov dušika v okoljskih in ekoloških študijah, v prehrani rastlin in preučevanju rodovitnosti tal se je občutno povečala v zadnjih tridesetih letih. Izotopi dušika so pogosto uporabljeni pri določanju virov nitratov v podtalnici in površinskih vodah (SAHRA, 2005). Uporabljamo jih tudi za razlikovanje med ekološko in konvencionalno pridelavo (Bateman in sod., 2007; Flores in sod., 2007; Rogers, 2008).

2.5.2.1 Uporaba $\delta^{15}\text{N}$ za razlikovanje med ekološko in konvencionalno pridelavo

Metoda določanja vsebnosti izotopa dušika ($\delta^{15}\text{N}$) se je izkazala za zelo učinkovito metodo za razlikovanje med ekološko in konvencionalno pridelavo. Študija temelji na predpostavki, da imajo konvencionalno pridelane rastline nižje $\delta^{15}\text{N}$ vrednosti v primerjavi z enakimi rastlinami, gnojenimi z organskim gnojilom, saj imajo zaradi različnih procesov izdelave gnojil sintetična gnojila nižje $\delta^{15}\text{N}$ vrednosti od organskih (Bateman in sod., 2007; Flores in sod., 2007; Rogers, 2008).

Uporaba dušik vsebujočih gnojil ima velik vpliv na pridelek, na vrednost $\delta^{15}\text{N}$ rastlin ter na vsebnost dušika in vrednost $\delta^{15}\text{N}$ v tleh. Prekomerna uporaba gnojil se odraža v visokih koncentracijah nitrata in velikih spremembah $\delta^{15}\text{N}$ nitrata v tleh.

$\delta^{15}\text{N}$ sintetičnih (anorganskih) gnojil so običajno blizu 0 ‰, po navadi med -2 in +2 ‰, saj so proizvedena iz atmosferskega dušika ($\delta^{15}\text{N}_{\text{atm}} = 0$ ‰) z različnimi industrijskimi procesi (npr. z ekstrakcijo dušika iz zraka) in med njihovo proizvodnjo prihaja do majhnih frakcionacij. Med sintetična gnojila spadajo urea, amonijev nitrat in kalijev nitrat (Bateman in sod., 2007; Flores in sod., 2007; Rogers, 2008).

$\delta^{15}\text{N}$ vrednosti komposti in ostalih naravnih gnojil so bistveno višje kot vrednosti $\delta^{15}\text{N}$ v sintetičnih gnojilih, saj v procesu nastajanja komposta amoniak hitreje izhlapeva pri lažjem izotopu ^{14}N (Flores in sod., 2007). V skladu s to hipotezo so Choi in sodelavci (2003) ugotovili značilno obogatitev zemlje in rastlin z ^{15}N po dolgoročni uporabi komposta kot gnojila. Tudi Nakano in sodelavci (2003) so našli dobro korelacijo med vrednostjo $\delta^{15}\text{N}$ in načinom gnojenja. Eksperiment so opravili na paradižniku. Podobne raziskave so bile opravljene tudi na pomarančah in na špinači in tudi tu so dobili podobne rezultate (Flores in sod., 2007). Organska gnojila imajo vrednosti $\delta^{15}\text{N}$ po navadi od +2 do +10 ‰ (Rogers, 2008).

Živalski izločki vsebujejo izotopsko lažji dušik v urinu. Naknadno so lahko obogateni z ^{15}N zaradi procesov frakcionacije, kot so izhlapevanje amoniaka, denitrifikacija ali pa bakterijska predelava dušika. Še posebno izhlapevanje amoniaka iz organskega živalskega gnoja povzroča izotopsko obogatitev (^{15}N) preostalih zalog dušika. Živalski izločki z običajno vrednostjo $\delta^{15}\text{N}$ okoli +5 ‰ imajo po oksidaciji vrednosti $\delta^{15}\text{N}$ običajno v območju od +10 do +20 ‰ (Kendall, 1998; Rogers, 2008).

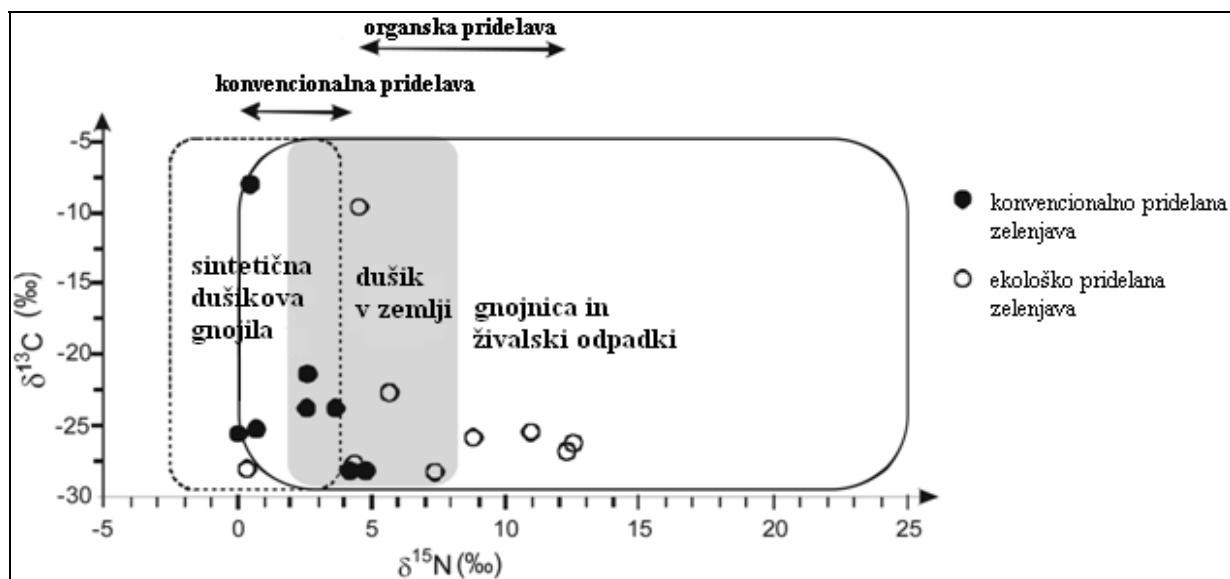
Relativna obogatitev nitratnega iona z lažjim izotopom (nižja vrednost $\delta^{15}\text{N}$) torej pomeni anorganski izvor dušika, več težjega pa prispevajo organske spojine (bolj pozitivna vrednost $\delta^{15}\text{N}$). Mineralizacija zmanjšuje razmerje dušikovih izotopov, pri denitrifikaciji pa se preostali nitrat obogati s težjim dušikovim izotopom. Tudi izhajanje amonijevega in plinskega dušika iz sistema obogati ostanek s težjim izotopom (Kaplan in Magaritz, 1986; Sutherland in sod., 1993). ^{14}N se prej mineralizira kot ^{15}N , zato ga rastline lažje sprejmejo in v tleh se relativno poveča vsebnost ^{15}N (Sutherland in sod., 1993). V tleh se izdatnosti teh procesov zaradi mnogih faktorjev spreminjajo, zato je kvantitativno določanje stopenj nezanesljivo.

Večina teh raziskav se je osredotočila na popolnoma organska oziroma popolnoma sintetična gnojila. Vendar pa se v procesu nastajanja humusa (naravnega gnojila) v gnojilu lahko pojavijo patogeni mikroorganizmi, ki se jih ne da odstraniti drugače, kot z dodatkom anorganskih dopolnil, ki pa ostanejo v pridelku in v takih primerih dobimo pri merjenju izotopa dušika napačne rezultate (Flores in sod., 2007).

Izotopska sestava dušika uporabljenega gnojila vpliva na izotopsko sestavo dušika v pridelku. Zato lahko to razliko v vrednostih $\delta^{15}\text{N}$ izrabimo za razlikovanje med ekološko in konvencionalno pridelavo. Največ raziskav je bilo narejenih na zelenjavi, in sicer na paradižniku, solati in korenju (Bateman in sod., 2005; Bateman in sod., 2007), papriki (Flores in sod., 2007), čebuli in zelju (Georgi in sod., 2005) ter na citronskem sadju (Rapisarda in sod., 2005; Rapisarda in sod., 2010), kjer so ugotovili povišane vrednosti $\delta^{15}\text{N}$ v organsko pridelanih živilih v primerjavi s konvencionalno pridelavo. Dokazano je, da čas uporabe gnojila in kemijska sestava oziroma kemijska oblika sintetičnega gnojila pomembno vplivata na $\delta^{15}\text{N}$ v pridelku. Tudi mnogo drugih faktorjev, kot so tip prsti, predhodna uporaba zemlje, variabilnost v akumulaciji atmosferskega dušika in variacije v posameznih agrikulturnih postopkih, vplivajo na $\delta^{15}\text{N}$ v pridelku. Choi in sodelavci (2003) so ugotovili, da vlažnost zemlje pomembno vpliva na $\delta^{15}\text{N}$ v zemeljskih nitratih, ki izvirajo iz različnih gnojil. Ugotovili so tudi, da stopnja zrelosti ne vpliva na izotopsko sestavo dušika in prav tako ne na izotopsko sestavo ogljika. Tudi okoljski dejavniki, kot so svetloba, temperatura in vlažnost

zraka vplivajo na izotopsko sestavo dušika v rastlini. Zato so potrebne še nadaljnje raziskave, ki bodo upoštevale te faktorje in tudi druge vplive na izotopsko sestavo dušika (Flores in sod., 2007).

Na sliki 3 so prikazani rezultati poskusa, ki ga je opravila Rogers (2008), kjer vidimo razlike v $\delta^{15}\text{N}$ in $\delta^{13}\text{C}$ vrednostih med obema načinoma pridelave. Ekološko pridelana zelenjava ima višje vrednosti $\delta^{15}\text{N}$ v primerjavi z konvencionalno pridelano, z izjemo ene vrste zelenjave, ki pa je stročnica in ima vrednost $\delta^{15}\text{N}$ okoli 0 ‰, zaradi fiksacije atmosferskega dušika.



Slika 3: Odvisnost $\delta^{13}\text{C}$ od $\delta^{15}\text{N}$ vrednosti (‰) različnih tipov zelenjave, zrasle konvencionalno (neorgansko) (●) in ekološko (organsko) (○) (Rogers, 2008)

2.5.3 Vplivi na porazdelitev stabilnih izotopov ^{12}C in ^{13}C

Primarna rezervoarja ogljika v naravi sta HCO_3^- v hidrosferi in CO_2 v atmosferi. Velika količina ogljika v morskih vodah omogoča nadzor izotopskega razmerja $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ v večini bioloških sistemov preko različnih ravnotežnih reakcij, v katerih je udeležen tudi atmosferski CO_2 . Rezultat te izotopske frakcionacije je, da je razmerje $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ v večini bioloških sistemov v primerjavi z morji vedno občutno nižje (Bréas in sod., 1994).

Prisotnost izotopa ^{13}C v naravi je 1,11 % skupnega ogljika (Ghidini in sod., 2006). Razmerje $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ pri ogljikovem dioksidu, ki nastane iz organskih materialov, pa je lahko precej drugačno od razmerja pri mineralnih karbonatih in atmosferskem CO_2 . Vzrok za to razliko je

izotopska frakcionacija med fotosintezo pri višjih rastlinah, kjer določeni encimi raje vežejo ^{13}C . Produkti iz rastlin s C_4 ciklom so praviloma znatno bogatejši s težjimi izotopi glede na produkte rastlin s C_3 ciklom (O'Leary, 1988). Te razlike so dovolj velike, da lahko na njihovi osnovi določimo botanično poreklo omenjenih spojin, kar omogoča potrjevanje avtentičnosti končnih izdelkov. Primarni encim, odgovoren za fiksacijo anorganskega ogljika, je ribuloza-1,5-bifosfat karboksilaza/oksigenaza (rubisco), ki močno diskriminira težji izotop ^{13}C , tako da so vrednosti izotopske frakcionacije do 27 ‰ v primerjavi z izotopsko vrednostjo izvornega ogljika. Obsegi dejanske frakcionacije so spreminjajoči, saj so odvisni od dostopnosti ogljika in transporta anorganskega ogljika v celico ter specifične karboksilatne poti (Falkowski, 2003).

Kopenske rastline uvrščamo v tri glavne skupine glede na tri različne poti fotosinteze. Na splošni lahko rečemo, da vse rastline vežejo CO_2 in H_2O v organsko snov na enak način, razlika je le v začetni fazi prevzema CO_2 iz zraka.

RASTLINE C_3

V Calvinovem ali C_3 ciklu se atmosferski CO_2 takoj po vstopu v kloroplast veže na akceptor (ribuloza-1,5-difosfat). Reakcijo katalizira encim ribuloza-1,5-difosfatkarboksilaza / oksigenaza, bolj poznan kot rubisco. V omenjeni reakciji nastane vmesni produkt s šestimi C-atomi, ki hitro razpade v dve molekuli 3-fosfoglicerata. Ta spojina ima tri C-atome, zato se ta pot imenuje C_3 cikel, in zato so rastline, ki uporabljajo to pot, C_3 rastline (Boyer, 2005). C_3 rastline so mnogo bolj razširjene kot C_4 rastline. Sem spada večina kmetijskih rastlin in sem uvrščamo tudi jablano. Med C_3 rastline uvrščamo tudi večino ostalih rastlin, dreves in trav, ki uspevajo v zmernih in hladnih podnebnih razmerah. Te rastline počasneje absorbirajo ^{13}C kot ^{12}C , zato je njihova izotopska sestava med -35 in -22 ‰ (Van der Merwe, 1982).

RASTLINE C_4

Druga fotosintetska pot je poznana pod imenom Hatch-Slackov cikel ali C_4 cikel. To je posebna oblika fotosinteze z drugačnim načinom fiksacije CO_2 , ki poteka v listih nekaterih tropskih rastlin, kot so sladkorni trs, koruza in sirek, značilna pa je tudi za družino amarantovk, mlečkovk in tolščakovk. Gre izključno za rastline, ki spadajo v družino kritosemenk. Rastline, ki uporabljajo to fotosintetsko pot, imajo posebne prilagoditve (Dermastia, 2007).

V tej poti atmosferski CO_2 pronica v list skozi reže in se veže v mezofilnih celicah, v katerih ni rubisca. CO_2 vstopa v cikel z vezavo na fosfoenolpiruvat (in ne na ribulozo-1,5-difosfat),

nastane oksalocetna kislina, ki ima štiri C-atome. Zaradi tega se rastline, ki uporabljajo to pot, imenujejo C₄ rastline, fotosintetska pot pa C₄ cikel. Encim, ki katalizira začetno vezavo atmosferskega CO₂, je fosfoenolpiruvat karboksilaza (PEP karboksilaza) in kaže preferenco k vezavi ¹³CO₂ (Boyer, 2005). Te rastline imajo veliko selekcijsko prednost, ki je izrednega pomena predvsem v suhem in vročem podnebju. C₄ cikel namreč izboljša celokupno vezavo CO₂, posebno v primerih kjer primanjkuje vode in/ali je močno sončno obsevanje rastlin, saj fotosinteza poteka kljub temu, da so listne reže zaprte in ni fotorespiracije. Rastline C₄ namreč kopičijo CO₂, preden le-ta vstopi v C₃ cikel. Tako lahko v močni sončni pripeki C₄ rastline vežejo dvakrat več CO₂ ter so tako občutno učinkovitejše kot C₃ rastline, ki v pripeki zaprejo listne reže zaradi zmanjšanja fotorespiracije, s tem pa se pri teh rastlinah ustavi fotosinteza (Uno in sod., 2001). C₄ rastline med fotosintezo absorbirajo ¹³C hitreje kot ¹²C, tako da je njihova izotopska sestava med -16 ‰ in -9 ‰ (Ehleringer in Epstein, 2001).

RASTLINE CAM

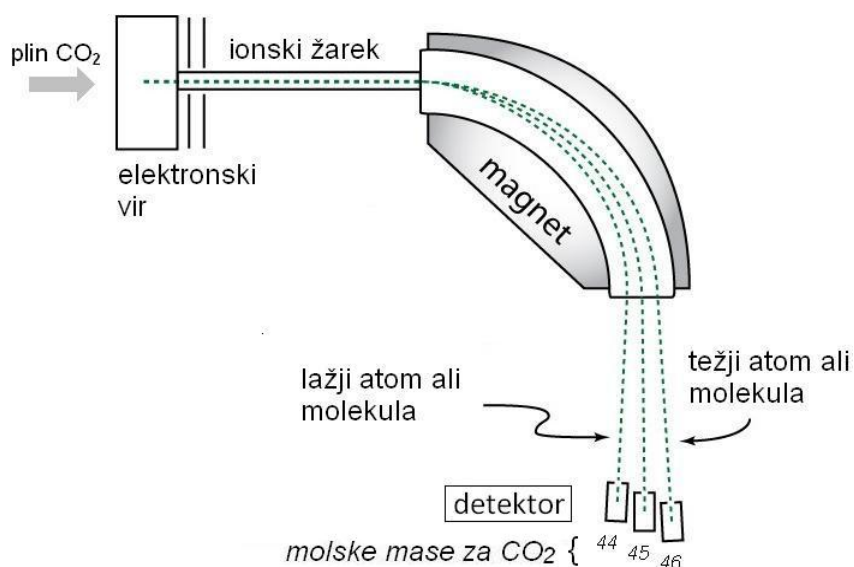
Najmanjša skupina rastlin so CAM rastline, ki so dobile ime po tako imenovani CAM poti (angl. Crassulacean Acid Metabolism). Ta redka oblika fotosinteze je bila namreč preučevana na družini *Crassulacean*. Poleg teh imajo CAM fotosintezo tudi kaktusi, orhideje, ananas in druge (Uno in sod., 2001). Te rastline so po navadi mesnate, polne soka in sočne, ali pa so to kaktusi v suhih regijah (Rogers, 2008). Razmerje med izgubo vode in vnosom CO₂ je v rastlinah CAM bistveno nižje kot v C₃ in C₄ rastlinah, ker imajo te rastline reže odprte le ponoči, ko so temperature nižje, zračna vlažnost pa višja. To pa prispeva k manjšemu izhlapevanju vode. Te rastline uporabljajo oba načina vezave CO₂, cikel C₃ in različico C₄ cikla, kar jim omogoča, da časovno ločijo pridobivanje in pretvarjanje CO₂ iz zraka in nadaljnjo porabo CO₂ v C₃ ciklu (Uno in sod., 2001). Ker CAM rastline lahko uporabljajo oba načina fotosinteze, imajo vrednosti $\delta^{13}\text{C}$, ki so značilne za C₃ oziroma C₄ rastline (Van der Merwe, 1982).

Tudi $\delta^{13}\text{C}$ vrednosti nam služijo kot pokazatelji, kako je bila določena kultura pridelana. To ni v povezavi z tipi uporabljenih gnojil, saj imajo mineralna in organska gnojila enake $\delta^{13}\text{C}$ vrednosti. Med fotosintezo se pojavi frakcionacija izotopa ¹³C zaradi delovanja encima rubisco. Faktorji, ki vplivajo na stomatalno prevodnost (hitrost, s katero vodne pare izhlapevajo iz listnih por), indirektno vplivajo na fotosintezo in s tem na vsebnost izotopa ¹³C v rastlini. Zlasti fertilizacija spreminja izotopsko sestavo ogljika v listih rastline, zaradi njegovega učinka na stomatalno prevodnost. Gnojenje s sintetičnimi gnojili zagotavlja večjo preskrbo rastline z dušikom, kot v primerih, kjer je gnojenje organsko, in zato lahko spremeni vsebnost izotopa ogljika. Raziskave so pokazale, da so v nekateri ekološko pridelani zelenjavi

nižje $\delta^{13}\text{C}$ vrednosti kot v konvencionalno pridelani (Flores in sod., 2007; Rapisarda in sod., 2010).

2.5.4 Določanje izotopskega razmerja z metodo IRMS

Nihanja v razmerju izotopov istega elementa so izredni majhna, zato je za merjenje odstopanj potrebno uporabiti zelo občutljiv instrument. Izotopsko sestavo lahkkih elementov merimo z masnim spektrometrom za analitiko stabilnih izotopov (IRMS – angl. Isotope Ratio Mass Spectrometry). To je naprava v kateri najprej ioniziramo delce (atome, molekule ali fragmente molekul), nato pa snop takih delcev v električnem polju pospešimo ter v magnetnem polju odklonimo. Odklon je odvisen od razmerja med maso delca in nabojem (m/z). Iz odklona, ki ga merimo, sklepamo na zvrst delca ali na masno število izotopa. Natančnost meritev se izboljša, ker vzorec primerjamo s standardom, ki ima natančno znano izotopsko sestavo. V masni spektrometer uvajamo vzorec vedno v obliki plina, zato imamo za določanje razmerja $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ in $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ v trdnih in tekočih vzorcih različne preparacijske sisteme. Masni spektrometer je povezan z elementnim analizatorjem, kjer vzorec v toku čistega kisika sežgemo, nastalo plinsko mešanico pa ločimo na kromatografski koloni in plin CO_2 ali N_2 uvajamo z metodo, ki se izogne kakršnikoli izotopski frakcionaciji in omogoča zbiranje plina brez vsakršnih izgub. Pri določanju vrednosti $\delta^{15}\text{N}$ moramo vse v procesu izgorevanja nastale produkte dušika (NO , NO_2 ...) reducirati do N_2 , saj samo to obliko dušika uvajamo v ionski izvor. Princip delovanja sistema IRMS je prikazan na sliki 4.



Slika 4: Shema principa delovanja masnega spektrometra za analitiko stabilnih izotopov lahkih elementov (IRMS) (Dunn, 2007)

2.6 ANTIOKSIDANTI

2.6.1 Prosti radikali in oksidativni stres

Celice organizma so stalno izpostavljene različnim spremembam eksogenega in endogenega izvora, ki povzročijo oksidativni stres. Ta se v bioloških sistemih pokaže, če je bil sistem dalj časa izpostavljen oksidantom ali če je prišlo do zmanjšanja antioksidativne sposobnosti organizma ali obeh (Abram, 2000).

V teh procesih kisikove molekule izgubljajo elektrone, kar povzroči nastanek prostih radikalov in s tem oksidativnega stresa. Prosti radikali so nestabilne in zelo reaktivne oblike spojin, ki vključujejo enega ali več neparnih elektronov. V organizmu napadajo zdrave celice, da bi našli prosti elektron za svojo stabilizacijo. Ta proces lahko povzroči okvare v zdravih celicah (Raspor in sod., 2000).

2.6.2 Antioksidanti

Antioksidanti so spojine, ki z lovljenjem prostih radikalov, s keliranjem kovinskih ionov ter z odstranjevanjem in popravljenjem oksidativno poškodovanih biomolekul preprečujejo oksidativni stres (Korošec, 2000). Glede na način delovanja jih razdelimo na tri skupine (Kovač in Raspor, 2000):

- primarni ali pravi antioksidanti, ki vežejo in pretvarjajo proste radikale, preden ti oksidirajo biološko pomembne molekule;
- sekundarni antioksidanti ali reducenti so donorji vodika prostim radikalom, s čimer jih spremenijo v bolj stabilne oblike;
- terciarni antioksidanti so snovi, ki popravljajo poškodbe, ki jih povzročijo prosti radikali v celici.

Glede na izvor delimo antioksidante na naravne in sintetične. Najpomembnejši naravni antioksidanti so fenolne spojine, askorbinska kislina, citronska kislina, tokoferoli, flavonoidi, karotenoidi, ekstrakti nekaterih živil (žajbelj, rožmarin) in drugi. Najpogostejši sintetični fenolni antioksidanti pa so butil-hidroksi-anisol (BHA), butil-hidroksi-toluen (BHT), propilgalat (PG), terc-butil hidrokinon (TBHQ) in drugi (Skvarča, 2000). V današnjem času prihajajo v ospredje naravni antioksidanti, predvsem zaradi zdravstvene oporečnosti in toksičnosti nekaterih sintetičnih antioksidantov.

Antioksidante delimo tudi na vodotopne (askorbinska kislina, glutation, bilirubin, sečna kislina, tioli) in topne v maščobah (ubikinol Q₁₀, vitamin E, likopen in β-karoten) (Korošec, 2000).

V zadnjem času se je zanimanje za antioksidante zelo povečalo, predvsem zaradi pozitivnega vpliva na preprečevanje kroničnih in degenerativnih bolezni, kot so rak, kap, bolezni srca in ožilja ter druge bolezni, ki so povezane z oksidativnim stresom v organizmu (Kreft in sod., 2000; Young in Woodside, 2001). Predvsem pa je bila ugotovljena povezava med uživanjem sadja in zelenjave ter zmanjšanjem obolenj za naštetimi boleznimi (Korošec, 2000).

Sadje in zelenjava so bogat vir naravnih antioksidantov. V rastlinskih živilih najdemo celo paleto antioksidantov, ki delujejo na različne načine in se sinergistično dopolnjujejo. V rastlinskem svetu so najpomembnejši antioksidanti vitamin C, vitamin E, karotenoidi, flavonoidi, katehini in terpeni. V omenjene skupine prištevamo nekaj tisoč aktivnih snovi, ki na različne načine prispevajo k skupnemu antioksidativnemu potencialu živila. Visoka vsebnost endogenih antioksidantov je osnovni pogoj za dobro skladiščno sposobnost in primerno kakovost surovine za nadaljnjo predelavo. Vsebnost antioksidantov predstavlja osnovni parameter kakovosti in vpliva na (Hribar in Simčič, 2000):

- skladiščno sposobnost in stabilnost izdelka,
- ohranjanje prehranske vrednosti,
- ohranjanje senzorične kakovosti,
- primeren videz in obstojnost barve živila,
- kakovost vhodne surovine – povečan potencial za predelavo živil,
- ohranjanje učinkovin, ki pozitivno vplivajo na zdravje ljudi.

Ob pomanjkanju antioksidantov se prosti radikali kopičijo v telesu in tako v verižnih reakcijah poslabšujejo naše zdravstveno stanje. Čeprav mnogo antioksidantov dobimo s hrano, so pri mnogih ljudeh potrebe po antioksidantih tako velike, da jih samo s hrano in lastno (naravno) proizvodnjo ne dobijo dovolj. To velja zlasti za starejše ljudi, pri katerih telo samo tvori manj naravnih antioksidantov in pa za športnike (Mindell, 2000). Zato je dandanes široko razširjena tudi raba antioksidantov v prehranskih dopolnilih (Walker in sod., 2008).

Tudi jabolka vsebujejo različne antioksidante, kot so vitamini A, C in E ter flavonoide in fenolne spojine. Na splošno pa se priporoča jesti dovolj sadja in zelenjave, ki vsebujejo še druge pomembne antioksidante v naravni obliki.

Največ antioksidantov zaužijemo s surovim sadjem in zelenjavo. Med postopkom predelave živil prihaja do kompleksnih reakcij, ki lahko bistveno spremenijo antioksidativni potencial živila. Do velikih sprememb pride tudi po zaužitju, saj med metabolično aktivnostjo v procesu prebave lahko nekatere snovi bistveno spremenijo svoje lastnosti. Nekatere snovi lahko iz antioksidantov postanejo prooksidanti in obratno. Neprimerna mehanska priprava in termična obdelava lahko bistveno zmanjšata prehransko vrednost živila. Do teh zaključkov pridemo, če kot parametre kakovosti upoštevamo samo najbolj znane antioksidante (obstojnost vitamina C). Z upoštevanjem novejših dogajanj in s primernimi tehnološkimi postopki lahko bistveno zmanjšamo negativne posledice predelave, v nekaterih primerih pa lahko prehransko vrednost bistveno povečamo (Hribar in Simčič, 2000).

2.6.3 Antioksidativni potencial

Antioksidativni potencial je predvsem posledica vsebnosti polifenolov, predvsem nekaterih flavonoidov (flavonov, izoflavonov, flavononov, antocianinov, katehina in izokatehina) in v manjši meri vitaminov (Vidrih in Kač, 2000). Velik problem pri določevanju antioksidativne aktivnosti v živilih predstavlja stabilnost antioksidantov. Izjemno nestabilen je vitamin C, ki se po homogenizaciji zelo hitro pretvarja v dehidroaskorbinsko kislino (oksidirana oblika). Vitamin C zato stabiliziramo z dodatkom reducenta ali metafosforne kisline med postopkom homogenizacije (Wechtersbach, 2005).

Antioksidativni potencial v živilu lahko določamo na dva načina, direktno ali indirektno. Pri indirektnih metodah merimo sposobnost antioksidantov za lovljenje tistih prostih radikalov, ki niso direktno povezani z oksidacijsko razgradnjo. Primer indirektnega določanja je uporaba obarvanih prostih radikalov, kjer določamo sposobnost antioksidanta, da odda vodikov atom. Direktno metode pa na splošno temeljijo na preučevanju vpliva dodanega antioksidanta na potek verižne oksidacije določenega substrata s prostimi radikali. Za substrate, ki oksidirajo, lahko izberemo posamezne lipide, proteine, DNK ali biološki material, ki vsebuje lipide (krvna plazma, LDL, biološke membrane, itd.) (Roginsky in Lissi, 2005).

2.7 FENOLNE SNOVI

Fenolne spojine so spojine z eno ali več (1-10) hidroksilnih (-OH) skupin, vezanih neposredno na aromatsko jedro. V naravi so običajno spojine z več -OH skupinami, in zato se je zanje uveljavilo tudi drugo ime polifenoli (Abram in Simčič, 1997). So tudi kemično zelo raznolika skupina (Taiz in Zeiger, 1998).

So relativno kisle spojine, ki rade tvorijo intra- in intermolekularne H-vezi. Vežejo se s peptidnimi vezmi v beljakovinah, vežejo kovinske ione v kelatne spojine in zelo rade oksidirajo (Abram in Simčič, 1997).

Fenolne snovi so sekundarni metaboliti, ki so prisotni v vseh rastlinah in imajo predvsem ekološko funkcijo. Vključene so v fiziološke procese rasti in razvoja sadnih rastlin, določajo pa tudi različne lastnosti plodov med zorenjem in skladiščenjem. Vsebnost fenolnih snovi se med rastjo rastlin in zorenjem značilno spreminja (Usenik in sod., 2004).

2.7.1 Funkcija fenolnih snovi

Fenolne spojine prispevajo k odpornosti rastlin proti mehanskim stresom, ki so posledica prisotnih insektov ali mehanskih poškodb, infekcij z glivami, bakterijami in virusi (Abram in Simčič, 1997). Nujne so za rast in razmnoževanje rastlin, imajo pa tudi varovalni učinek pri poškodbah rastlinskega tkiva (Petauer, 1993). Fenolne snovi privabljajo oprasovalce in raznašalce semen, ker dajejo plodovom in cvetovom barvo in okus (Taiz in Zeiger, 1998). So antioksidanti, inhibitorji encimov, pospeševalci ali zaviralci rasti, rastni regulatorji, itd. (Petauer, 1993). Med vsemi njihovimi funkcijami pa so za sadjarje in kupce še najbolj pomembni zaradi vpliva na obarvanost, aromo ter okus sadja (Veberič in Štampar, 2005).

Količina polifenolov se razlikuje ne samo med sortami, ampak tudi na različnih območjih pridelave (McGhie in sod., 2005). Njihova količina je odvisna tudi od svetlobe, temperature, vlage v tleh, mineralne prehrane in mehanskih poškodb (Petauer, 1993).

Vsebnost fenolov je lahko precej različna med tkivi in med organi. Ugotovljeno je bilo, da zunanja tkiva plodov ali semen vsebujejo bistveno večje vsebnosti fenolov v primerjavi z notranjostjo plodu. Kot primer navajajo, da lahko lupina jabolk vsebuje tudi do 100 krat večje vsebnosti nekaterih fenolov v primerjavi s pulpo (Veberič in sod., 2005).

2.7.2 Delitev fenolnih snovi

Delimo jih na (Abram in Simčič, 1997):

- fenolne kisline (hidroksi benzojska kislina, fenilacetna kislina, kumarini),
- flavonoidi (flavoni, flavonoli, dihidroflavonoli, katehini, flavanoni, antocijanidini, ...),
- tanini (hidrolizirajoči, kondenzirani, kompleksni).

Fenolne snovi v sadju so v glavnem brezbarvne fenolne kisline in flavonoidi. Vsebnost fenolnih snovi je v nezrelem sadju (izjema so antocijanidini) bistveno večja kot v zrelem sadju. Katehini in proantocijanidini so v sadju praviloma kot proste spojine, medtem ko se

antocianidini, flavonoli, flavoni in dihidrohalkoni vežejo s sladkorji v glikozide. Fenoli lahko bistveno prispevajo tudi k okusu sadja. Velike vsebnosti katehinov in predvsem procianidinov dajejo trpek in nekoliko grenak okus. Z encimsko oksidacijo fenolov prihaja do porjavenja mesa, delno se spremeni tudi okus. To nastopi kot posledica poškodb celic v plodu zaradi otiskov, mehanskih poškodb, mraza in kot posledica staranja (Štampar in sod., 2009).

2.7.3 Pomen fenolnih snovi za zdravje ljudi

Delujejo kot antioksidanti in zaradi tega pozitivno vplivajo na človeško telo. Raziskave so pokazale, da imajo nekateri flavonoidi do petdesetkrat večji antioksidativen učinek kot vitamina C in E ter da so flavonoidi v rdečem grozdju več kot tisočkrat učinkovitejši pri preprečevanju oksidacije človeškega LDL holesterola kot vitamin E. Katehini, ki sodijo v družino polifenolnih flavonoidov, zavirajo rast stafilokokov, ki lahko povzročijo smrtno nevarne okužbe. Pomagajo vzdrževati normalno količino holesterola v krvi, pomagajo pa tudi preprečevati zobno gnilobo in bolezni dlesni. Lahko pomagajo tudi zmanjševati pogostost želodčnega in pljučnega raka, preprečevati okvare DNK in zavirati razvoj ateroskleroze. Resveratrol, polifenolni flavonoid, zmanjšuje nevarnost srčnega infarkta in kapi, ker zavira nastajanje krvnih strdkov in škodljivega (LDL) holesterola. Ugotovljeno je bilo, da lahko pomaga zavirati nastajanje rakastih celic in pretvarjati maligne celice nazaj v normalne (Mindell, 2000). Tudi kvercetin dokazano zavira nastanek raka in rast tumorskih celic (McCandless, 1999).

2.7.4 Fenolne snovi v jabolkih

V jabolkih je bilo določenih mnogo fenolnih spojin. Najpomembnejše med njimi so (Veberič, 2010):

- hidroksicimetne kisline (klorogenska, kavina, *p*-kumarna, ferulna in 4-*p*-kumaroilkininska kislina),
- flavanoli (katehin, epikatehin, procianidini B1, B2),
- dihidrohalkoni (floridzin, floretin, floretin-2-ksilozilglukozid),
- flavonoli (kvercetin-rutinozid, kvercetin-galaktozid, kvercetin-glukozid, kvercetin-arabinopiranozid, kvercetin-arabinofuranozid, kvercetin-ramnozid, kvercetin-heksozid, kvercetin-ksilozid).

K skupni antioksidativni aktivnosti jabolk največ prispevajo polifenoli kvercetin glikozid, floretin glikozid, klorogenska kislina in epikatehin (McCandless, 1999; Van der Sluis in sod., 2004). Antioksidativni učinek se poveča med obiranjem in v času skladiščenja zaradi povišanja koncentracije katehinov in floridzina (Napolitano in sod., 2004). Prav flavonoidi in

polifenoli so najbolj zaslužni, da so jabolka tako cenjena v prehrani, saj imajo antialergijsko, antivirusno, antitumorno, protivnetno in antioksidativno delovanje. Vsebuje jih plod (meso sadeža), največ pa jih je v njegovi sveži lupini (Harborne in Williams, 2000; Veberič in sod., 2005). Lupina vsebuje dva do šestkrat več fenolnih spojin kot meso jabolk (Chinnici in sod., 2004).

Koncentracija fenolnih spojin se močno razlikuje v različnih delih jabolk. Kvercetin glikozidi in flavonoli so prisotni predvsem v koži. Dihidrohalkoni so prisotni v jedru in peškah. Fenolne kisline pa so prisotne predvsem v lupini (Markowski in Plochanski, 2006). Jabolka vsebujejo približno 2 g polifenolov/kg sveže mase, odvisno od sorte (Awad in sod., 2000). Štampar in sodelavci (2009) pa navajajo, da je vsebnost fenolnih snovi v jabolkih od 0,7 do 1,8 g/kg sveže mase.

Preglednica 8: Vsebnost fenolnih spojin v jabolku (izraženo v $\text{mg}_{\text{galne kisline}}/100 \text{ g}$) (Štampar in sod., 2009: 217)

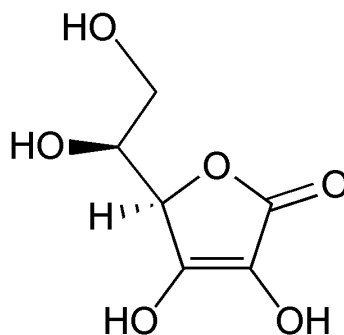
Del plodu	C_{SFS} ($\text{mg}_{\text{galne kisline}}/100 \text{ g}$)
Jabolko - celo	77,7-184,3
Jabolko - kožica	175,5
Jabolko - meso	41,6

Ne glede na sorto pa imajo ekološko pridelana jabolka višjo vsebnost antioksidantov v primerjavi s tradicionalno pridelanimi. Rezultati raziskav, kjer so ugotavljali razliko v vsebnosti fenolnih komponent v jabolkih pridelanih na ekološki in integriran način kažejo, da so ekološka jabolka vsebovala višje koncentracije fenolnih snovi v primerjavi z jabolki pridelanimi na integriran način. Razlog za višjo vsebnost fenolnih snovi lahko pripišemo stresnim dejavnikom, kot so okužbe s patogeni, napad škodljivcev in pomanjkanje hranil, saj se rastline na različne biotske in abiotske dejavnike odzovejo s povečano sintezo fenilpropanoidnih snovi. Glede na to, da je bil posledično višji tudi njihov antioksidativni potencial, lahko predpostavljamo, da imajo jabolka iz biološke pridelave višjo prehransko kot tudi zdravstveno vrednost (Stracke in sod., 2009; Veberič, 2010).

2.8 ASKORBINSKA KISLINA (VITAMIN C)

Askorbinska kislina (AA) ali vitamin C je vodotopen vitamin, brez vonja, s kemijsko formulo $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$. V reverzibilni reakciji se lahko oksidira in tvori dehidroaskorbinsko kislino (DHA) (Nojavan, 2008).

Askorbinska kislina je najmočnejši antioksidant med vodotopnimi vitamini (Medić in sod., 2000). Je zelo pogosto uporabljen antioksidant v živilstvu z namenom ohranjanja organoleptične kakovosti živil (Kitts, 1997). Kot antioksidant sodeluje v različnih reakcijah celičnega metabolizma. Pred oksidativnimi poškodbami lahko zaščiti komponente celične membrane in citosola. V citosolu deluje kot primarni antioksidant in tako pobira proste radikale, ki nastajajo kot produkti celičnega metabolizma (Chepda in sod., 2001). Askorbinska kislina ima poleg vitamina E tudi veliko vlogo pri fotozaščiti kožnih celic pred UV svetlobo (Offord in sod., 2002).



Slika 5: Struktura L-askorbinske kisline (Gordon, 2003)

Vitamin C je eden najbolj raziskanih vitaminov. Že vsaj leta 1742 so vedeli, da limonin sok preprečuje bolezen skorbut, ki je pogosto pestila mornarje na dolgih plovbah, vendar so šele leta 1928 odkrili, da je zdravilna komponenta v limoni vitamin C. Ime askorbinska kislina je izpeljano iz lastnosti, da je »antiskorbut«. Danes vitamin C ni več toliko pomemben zaradi preprečevanja skorbuta, temveč zaradi potenciala, da varuje celice (Walker in sod., 2008).

Priporočena količina vitamina C za odrasle je 100 mg na dan (150 mg za kadilce). Vendar celo bolj zadržani strokovnjaki za prehrano menijo, da je najboljša dnevna količina vsaj 200 mg, za zdravljenje določenih bolezni pa priporočajo še večje odmerke (Unger, 2007; Walker in sod., 2008).

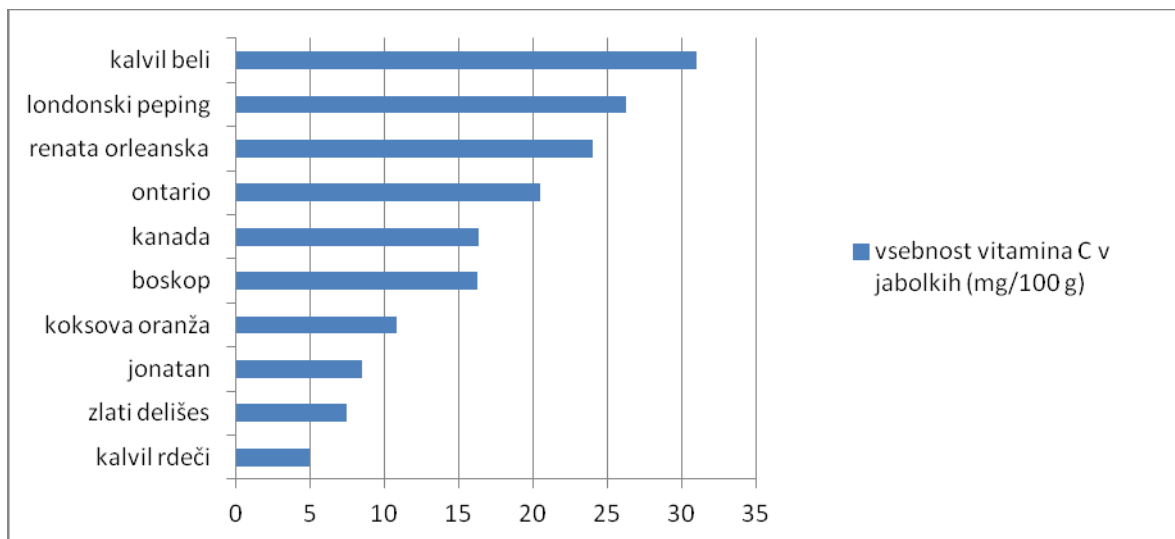
Vitamin C v telesu prevzema številne zaščitne funkcije. Pomaga krepiti kapilare in celične stene in je ključen pri tvorjenju kolagena (beljakovine v vezivnem tkivu), ki povezuje celice v koži, dlesnih in kitah. Vitamin C tako utrdi ožilje, spodbuja celjenje ran, izboljšuje absorpcijo železa iz živil in omogoča njegovo presnovo ter skrbi za močne kosti in zobe. Pomaga tudi belim krvnim celicam pri boju proti okužbam in spodbuja tvorjenje hemoglobina v rdečih krvničkah. Kot antioksidant varuje pred rakom in srčnimi obolenji; v več raziskavah se je izkazalo, da so nizke koncentracije tega vitamina v telesu povezane s srčnimi infarkti. Pomaga

krepiti imunski sistem in s tem omiliti znake prehlada in skrajšati njegovo trajanje. Pri starejših naj bi koristil pri premagovanju resnih okužb dihal. Zdi se tudi, da je naravni antihistaminik. Vitamin C učinkovito deluje tudi proti astmi. Zadostna preskrba z askorbinsko kislino varuje pred poapnenjem žil (aterosklerozo), ker sodeluje pri razgradnji holesterola (Ursell, 2003; Unger, 2007; Walker in sod., 2008).

Pomanjkanje vitamina C se odraža v pogostih prehladih, občutljivosti sluznic, večji nevarnosti nastanka krčnih žil in hemoroidov, prekomerni telesni teži, motnjah spanca in depresijah in celo bronhialni astmi (Unger, 2007).

Izbor živil, ki vsebujejo vitamin C, je zelo obsežen. Najboljši vir tega vitamina sta surova sadje in zelenjava. Največ tega vitamina najdemo v citrusih, kiviju, kakiju, papriki, peteršilju, brokoliju, brstičnem ohrovtu, cvetači, zelju, črnem ribezu, malinah, jagodah in šipku (Lee in Kader, 2000; Unger, 2007; Nojavan, 2008).

Tudi v jabolku najdemo vitamin C, vendar ne v tako velikih količinah. Jabolko vsebuje 8 – 12 mg vitamina C/100 g, lahko tudi več. Na vsebnost vitamina C lahko vplivajo različni dejavniki, med katere prištevamo sorto, genotipske razlike, klimatske pogoje ter način gojenja in obdelovanja (Lee in Kader, 2000). Jabolka, ki zorijo na bolj osvetljenih delih krošnje, vsebujejo več vitamina C in drugih sestavin kot tista, ki rastejo v senci (Sancin, 1988). Poznano je tudi, da je koncentracija vitamina C v sadju in zelenjavi obratno sorazmerna z razpoložljivostjo dušika. Razlago za ta fenomen še iščejo (Rapisarda in sod., 2010). 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 (Lee in Kader, 2000). Spodnja slika prikazuje velike razlike med posameznimi sortami (Krišković, 1989).



Slika 6: Vsebnost vitamina C v različnih sortah jabolk (Krišković, 1989: 149)

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 Jabolka

V okviru eksperimentalnega dela smo uporabili 19 vzorcev jabolk različnih sort, ki so bila pridelana na ekološki ali pa na konvencionalni način. 7 vzorcev jabolk je bilo ekološko, 12 pa konvencionalno pridelanih. Jabolka imajo različna geografska porekla, nabrana so bila v septembru in oktobru 2009.

Preglednica 9: Oznaka vzorcev, sorta, geografsko poreklo in način pridelave jabolk

Oznaka vzorca	Sorta jabolk	Način pridelave	Geografsko poreklo
GAE	gala	ekološko	Maribor
GAK	gala	konvencionalno	Maribor
GLE	gloster	ekološko	Brdo pri Lukovici
GLK	gloster	konvencionalno	Brdo pri Lukovici
GRE	gold rush	ekološko	Brdo pri Lukovici
GRK	gold rush	konvencionalno	Brdo pri Lukovici
ZDK1	zlati delišes	konvencionalno	Žilava, Sv. Jurij ob Ščavnici
ZDK2	zlati delišes	konvencionalno	Šentjur
ZDK3	zlati delišes	konvencionalno	Krško
ZDK4	zlati delišes	konvencionalno	Ljutomer-Ormož
TK	topaz	konvencionalno	okolica Krškega
TE1	topaz	ekološko	okolica Krškega
TE2	topaz	ekološko	Znojile, Ivančna Gorica
TE3	topaz	ekološko	Kog, blizu Ormoža
TE4	topaz	ekološko	Šentjanž, blizu Sevnice
IK1	idared	konvencionalno	Pregarje, Brkini
IK2	idared	konvencionalno	Gorenja vas, Ivančna Gorica
IK3	idared	konvencionalno	Kog, blizu Ormoža
IK4	idared	konvencionalno	Šentjanž, blizu Sevnice

3.1.2 Priprava vzorcev jabolčnega soka za nadaljnje meritve

Vzorci jabolk smo najprej stehali in jim določili maso. Neolupljena jabolka smo prerezali na četrtine, jim odstranili peške in peclje ter iz njih pripravili jabolčni sok s pomočjo sokovnika Philips HR 1861. Vzorce za merjenje izotopske sestave smo uporabili takoj, ostale vzorce pa smo zamrznili. Vzorcem za merjenje askorbinske kisline smo takoj dodali metafosforno kislino za stabilizacijo askorbinske kisline in jih prav tako zamrznili. Peške smo shranili za nadaljnje analize.

3.1.3 Reagenti

Pri delu smo uporabljali analitsko čiste reagente podjetij Merck, Europa Scientific in Sigma. Kemikalije, ki smo jih uporabljali pri posameznih eksperimentih, so navedene v opisu različnih eksperimentalnih metod.

3.2 METODE DELA

3.2.1 Določanje vsebnosti dušikovih in ogljikovih izotopov v iztisnjem jabolčnem soku

3.2.1.1 Določanje $\delta^{13}\text{C}$ in $\delta^{15}\text{N}$ vrednosti v pulpi jabolčnega soka z metodo IRMS

Princip:

Metoda temelji na merjenju izotopskega razmerja med deležem težjega in lažjega izotopa ogljika oz. dušika. Izotopsko razmerje je podano z vrednostjo $\delta^{13}\text{C}$ oz. $\delta^{15}\text{N}$ v ‰, ki je definirana z enačbo (1).

Reagenti:

- destilirana voda,
- aceton,
- interni, laboratorijski standard: ureaC in europaN ((NH₄)₂SO₄),
- referenčni standardi: IAEA-NBS (oil), IAEA-CH-7, IAEA-CH-6, IAEA-N-1, IAEA-N-2.

Aparatura in pribor:

- plastične centrifugirke (V = 50 ml),
- centrifuga (Centric 322A),
- sušilnik,
- kositrove kapsule dimenzije $\Phi = 4/6$ mm (PDZ Europa Ltd),
- pinceta za zatesnitev kositrovih kapsul,
- masni spektrometer Europa Scientific 20-20 z ANCA-SL modulom za trdne in tekoče vzorce.

Priprava vzorca:

- 50 ml vsakega vzorca nalijemo v plastične centrifugirke. Netopne sestavine ali pulpo ločimo od čistega soka z 10 minutnim centrifugiranjem pri 3400 obratov/min. Supernatant odlijemo. Pulpo uporabimo za določanje $\delta^{13}\text{C}$ in $\delta^{15}\text{N}$ vrednosti v pulpi, supernatant pa shranimo in ga uporabimo za izolacijo sladkorja v vzorcu (določanje $\delta^{13}\text{C}$ vrednosti sladkorjev).
- Pulpi dodamo vodo (25 ml) in dobro premešamo. Sledi centrifugiranje (5 min, 3400 obratov/min), nato supernatant odlijemo. Ponovimo spiranje z vodo in centrifugiranje. Sledi spiranje z acetonom in centrifugiranje (5 min, 3400 obratov/min). Tudi to spiranje in centrifugiranje ponovimo. Oborino posušimo v sušilniku na 50 °C.
- Pri tem postopku uporabimo vodo za odstranjevanje prostih sladkorjev in aceton za odstranjevanje lipidov iz pulpe. Po vsakem centrifugiranju je potrebno dobro premešati pulpo in topljence, da pripravimo čist vzorec pulpe. Sladkorje je treba z vodo popolnoma odstraniti, da se izognem težavam pri ekstrakciji lipidov z vodo in pri sušenju vzorcev. Nepopolna ekstrakcija lipidov povzroči precejšnje napake v vsebnosti $\delta^{13}\text{C}$ v pulpi. Postopek obdelave vzorca pulpe z vodo in acetonom lahko ponovimo še tretjič, če je prisotna večja količina sladkorjev in karotenov.

Izvedba analize – določanje $\delta^{13}\text{C}$:

- Tik pred merjenjem pripravimo kositrove kapsule ($\Phi = 4/6$ mm), v katere s pinceto prenesemo košček pulpe posameznega vzorca, kapsule zatisnemo s pinceto in vzorce izmerimo v masnem spektrometru.
- Pred merjenjem vzorcev je potrebno pripraviti tudi ustrezne standarde. Standarde pripravimo podobno kot vzorec. Za merjenje uporabljamo laboratorijski standard ureaC. Na absorbent v kapsulah nanesemo 3 μl standarda ureaC. Izotopsko sestavo standarda, ki znaša $-30,6 \pm 0,2$ ‰, je potrebno določiti na začetku in koncu merjenja ter na vsakih pet do deset izmerjenih vzorcev. Poleg laboratorijskega standarda je potrebno za spremljanje kvalitete pripraviti tudi referenčne standarde IAEA-NBS (oil), IAEA-CH-7 in IAEA-CH-6 s sledečimi $\delta^{13}\text{C}$ vrednostmi $-29,7 \pm 0,2$ ‰, $-31,8 \pm 0,2$ ‰ in $-10,4 \pm 0,2$ ‰.

Izvedba analize – določanje $\delta^{15}\text{N}$:

- Tik pred merjenjem pripravimo kositrove kapsule ($\Phi = 4/6$ mm), v katere s pinceto prenesemo košček pulpe posameznega vzorca, kapsule zatisnemo s pinceto in vzorce izmerimo v masnem spektrometru.
- Pred merjenjem vzorcev je potrebno pripraviti tudi ustrezne standarde. Standarde pripravimo podobno kot vzorec. Za merjenje uporabljamo laboratorijski standard europaN. Na absorbent v kapsulah nanesemo 3 μl standarda europaN. Izotopsko sestavo standarda, ki

znaša $+2,5 \pm 0,2 \text{ ‰}$, je potrebno določiti na začetku in koncu merjenja ter na vsakih pet do deset izmerjenih vzorcev. Poleg laboratorijskega standarda je potrebno za spremljanje kvalitete pripraviti tudi referenčna standarda IAEA-N-1 ($\delta^{15}\text{N} = 0,4 \pm 0,2 \text{ ‰}$) in IAEA-N-2 ($\delta^{15}\text{N} = 20,3 \pm 0,2 \text{ ‰}$).

3.2.1.2 Določanje $\delta^{13}\text{C}$ vrednosti sladkorjev v jabolčnem soku z metodo IRMS

Princip:

Metoda temelji na merjenju izotopskega razmerja med deležem težjega in lažjega izotopa ogljika v izoliranem sladkorju. Izotopsko razmerje je podano z vrednostjo $\delta^{13}\text{C}$ v ‰, ki je definirana z enačbo (1).

Reagenti:

- $\text{Ca}(\text{OH})_2$,
- 1 M H_2SO_4 ,
- interni, laboratorijski standard: ureaC,
- referenčni standardi: IAEA-NBS (oil), IAEA-CH-7, IAEA-CH-6.

Aparatura in pribor:

- termoblok (Termoproc TBGE),
- centrifuga (centric 322A),
- centrifugirke ($V = 50 \text{ ml}$),
- plastične posodice ($V = 10 \text{ ml}$),
- pH papirčki,
- kalibrirana brizgalka za tekoče vzorce,
- kositrove kapsule dimenzije $\Phi = 4/6 \text{ mm}$ (PDZ Europa Ltd),
- absorbent (Chromosorb W 30-60 mesh; PDZ Europa Ltd),
- pinceta za zatesnitev kositrovih kapsul,
- masni spektrometer Europa Scientific 20-20 z ANCA-SL modulom za trdne in tekoče vzorce.

Priprava vzorca – izolacija sladkorjev:

- Pod točko 3.2.1.1 (priprava vzorca) je opisan postopek za ločbo pulpe od čistega soka. Supernatant uporabimo za izolacijo sladkorja v vzorcu.

- Najprej iz vzorcev (supernatant) očistimo topne snovi z dodatkom približno 200 mg kalcijevega hidroksida ($\text{Ca}(\text{OH})_2$), dobro premešamo in nato 3 minute segrevamo v termobloku pri temperaturi 90 °C. V tej fazi postopka se organske kisline, aminokisliline in druge sestavine v vzorcu oborijo. Oborino s centrifugiranjem (5 min, 3400 obratov/min) ločimo od vroče raztopine.
- Nato odpipetiramo 4 ml čistega supernatanta v plastične posodice in dodajamo 1 M žvepleno kislino do $\text{pH} \approx 5$, ki ga preverimo s pH papirčki, oziroma do spremembe barve raztopine v rumeno. Ta raztopina vsebuje predvsem sladkorje in kalcijev sulfat ter majhno količino barvil. Preostali kalcijev sulfat, ki se obori, potem delno odstranimo tako, da raztopino shranimo čez noč v hladilniku pri približno 4 °C. Vzorec nad oborino vsebuje sladkorje in je tako pripravljen za analizo.

Izvedba analize:

- Pred merjenjem je v kositrove kapsule potrebno dodati absorbent (približno 1 mg). Nanj nanesemo 6 μl vzorca, ki vsebuje izolirane sladkorje iz jabolčnega soka. Kapsule previdno zatismo s pinceto. Sledi merjenje na masnem spektrometru.
- Postopek meritve in uporaba standardov je enaka kot pri določitvi $\delta^{13}\text{C}$ v pulpi jabolčnega soka in je opisana pod točko 3.2.1.1.

3.2.1.3 Določanje $\delta^{13}\text{C}$ in $\delta^{15}\text{N}$ vrednosti v peškah jabolk z metodo IRMS

Princip:

Princip meritve izotopske sestave je že opisan pod točko 3.2.1.1.

Reagenti:

- interni, laboratorijski standard: ureaC, europaN ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$),
- referenčni standardi: IAEA-NBS (oil), IAEA-CH-7, IAEA-CH-6, IAEA-N-1, IAEA-N-2, (IAEA, Avstrija).

Aparatura in pribor:

- mlinček za mletje,
- sušilnik,
- kositrove kapsule dimenzije $\Phi = 4/6$ mm (PDZ Europa Ltd),
- pinceta za zatesnitev kositrovih kapsul,

- masni spektrometer Europa Scientific 20-20 z ANCA-SL modulom za trdne in tekoče vzorce.

Priprava vzorca:

- Peške jabolk zmeljemo z mlinčkom za mletje in jih nato posušimo v sušilniku na 50 °C.

Izvedba analize:

- Tik pred merjenjem pripravimo kositrove kapsule ($\Phi = 4/6$ mm), v katere s pinceto prenesemo košček pulpe posameznega vzorca, kapsule zatisnemo s pinceto in vzorce izmerimo v masnem spektrometru.
- Postopek meritve in uporaba standardov je enaka kot pri določitvi $\delta^{13}\text{C}$ oziroma $\delta^{15}\text{N}$ vrednosti v pulpi jabolčnega soka in je opisana pod točko 3.2.1.1.

3.2.2 Določanje antioksidacijskega potenciala v jabolčnem soku s prostim radikalom DPPH^{*}

Opis metode:

Metoda s prostim radikalom DPPH^{*} je ena izmed najstarejših indirektnih metod za določanje antioksidacijskega potenciala. Temelji na reakciji med stabilnim prostim radikalom DPPH^{*} (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) in donorji vodika (npr. fenoli) (Brand-Williams in sod. 1995). DPPH^{*} ima velik molarni absorpcijski koeficient v vidnem delu spektra z maksimumom pri 517 nm, kar pomeni, da lahko koncentracijo radikala DPPH^{*} določamo spektrofotometrično, možno pa je tudi določanje z elektronsko spinsko resonanco (Roginsky in Lissi, 2005).

Pri spektrofotometrični metodi spremljamo spremembo barve alkoholne raztopine DPPH^{*}, ko reagira z antioksidantom in se tvori reducirana oblika DPPH₂, pri tem pa se spremeni barva iz vijolične v rumeno. Koncentracijo DPPH^{*} izberemo v območju med 50 in 100 μM , tako da so vrednosti absorbance referenčne raztopine manjše od 1. Merimo pri valovni dolžini 517 nm, reakcijski čas metode pa naj bi bil okoli 30 minut (Molyneux, 2004). Zmanjševanje absorbance je proporcionalno vsebnosti antioksidantov v vzorcu.

Rezultate lahko podamo z izračunom razmerja med številom molov DPPH^{*}, ki zreagira, s številom molov določenega antioksidanta. V praksi pa se zaradi kompleksnosti in nepoznavanja dejanske sestave in molarosti antioksidantov, podaja antioksidativno

učinkovitost vzorca kot razmerje med številom molov DPPH[•], ki reagirajo z antioksidanti v 1 g suhe snovi (Molyneux, 2004).

Porabljene mole DPPH[•] v vzorcu lahko enostavno izračunamo iz Beer-Lambertovega zakona:

$$\Delta A = \varepsilon \cdot \Delta c \cdot l; \quad \dots (4)$$

$$n_{DPPH_2} = c \cdot V_{reakcijske\ zmesi} \quad \dots (5)$$

ΔA ustreza razliki absorbance med referenčno raztopino, kateri je dodan samo DPPH[•] in raztopino, kjer je poleg DPPH[•] še antioksidant, ε je molarni absorpcijski koeficient DPPH[•] pri 517 nm, c je koncentracija nastalega DPPH₂, l pa je dolžina poti svetlobe skozi vzorec. Vrednost ε v metanolu ali etanolu pri 517 nm je v literaturi navedena med 11600 in 12500 l/(mol·cm) (Molyneux, 2004). V našem primeri je ta vrednost enaka 12000 l/(mol·cm).

Reagenti:

- DPPH[•] (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) (Sigma, Nemčija),
- metanol (Merck, Nemčija).

Aparatura in pribor:

- UV-VIS spektrofotometer,
- analitska tehtnica,
- avtomatska pipeta,
- ependorfke,
- centrifuga,
- plastične kivete (10 mm),
- deionizirana voda.

Izvedba analize:

- Vzorce jabolčnega soka centrifugiramo (4000 obratov/10 min) in nato supernatant prelijemo v ependorfke.
- DPPH[•] pripravimo vsakič svež: v 100 ml bučko zatehtamo 4 mg DPPH[•] v 20 ml metanola ter premešamo, da se popolnoma raztopi. Metanol dodajamo toliko časa, da je absorbanca raztopine 1.

- Najprej pripravimo referenčni vzorec (RF): v ependorfki zmešamo 60 μ l metanola in 1,5 ml raztopine DPPH \cdot . Vzorce pripravimo v treh paralelkah, in sicer v ependorfki zmešamo 60 μ l vzorca jabolčnega soka in 1,5 ml raztopine DPPH \cdot . Pripraviti moramo tudi slepo probo (SP) za vsak vzorec posebej, tako da v ependorfki zmešamo 60 μ l vzorca in 1,5 ml metanola. Vse vzorce dobro premešamo, prelijemo v kivete ter izmerimo absorbanco pri 517 nm takoj ter po 15 minutah.

Izračun:

$$\Delta A = A_{RF} - A_{VZ} + A_{SP} \quad \dots (6)$$

$$n \text{ (mol)} = \Delta A / \epsilon \cdot (V_{\text{reakcijske zmesi}} \cdot l) \quad \dots (7)$$

$$l = 0,4 \text{ cm}$$

$$\epsilon = 12000 \text{ l}\cdot\text{cm/mol}$$

$$V_{\text{reakcijske zmesi}} = 1,56 \text{ ml} = 0,00156 \text{ l}$$

3.2.3 Določanje fenolnih spojin v jabolčnem soku - spektrofotometrična metoda

Opis metode:

Fenolne spojine absorbirajo predvsem svetlobo UV spektra in vidnega spektra. Zato lahko odčitano vrednost absorbance pri primerni valovni dolžini uporabimo za oceni koncentracije skupnih fenolov.

Za določanje koncentracije skupnih fenolnih snovi dodamo v jabolčni sok Folin-Ciocalteujev reagent, ki v alkalni raztopini (dodatek natrijevega karbonata) oksidira fenolne snovi. Reagent Folin-Ciocalteu (F.C.) je vodna raztopina natrijevega volframata (VI), natrijevega molibdata (VI) in litijevega sulfata (VI); slednji prepreči obarjanje F.C. reagenta. Dodatek natrijevega karbonata je potreben za alkalnost reakcijske zmesi. Redukcija volframata (VI) in molibdata (VI) poteče le v prisotnosti fenolatnega aniona. Raztopina, ki vsebuje reducirani volframat (VI) in/ali molibdat (VI), je modro obarvana, medtem ko je raztopina nereducirane oblike rumene barve. Absorbanco reakcijske mešanice izmerimo pri valovni dolžini 765 nm. Masno koncentracijo skupnih fenolnih spojin odčitamo iz umeritvene krivulje in rezultat izrazimo kot mg galne kisline/l. Galno kislino uporabimo kot standardno referenčno spojino za določanje skupnih fenolnih spojin (Kač in Košmerl, 2004).

Reagenti:

- osnovna raztopina galne kisline: v 100 ml merilno bučko natehtamo 500 mg galne kisline, dodamo 10 ml absolutnega etanola, raztopimo in razredčimo do oznake z deionizirano vodo;
- Folin-Ciocalteujev reagent (F.C.), komercialni reagent: tik pred uporabo ga razredčimo po navodilih proizvajalca (uporabili smo Merckov reagent, ki smo ga redčili z deionizirano vodo v razmerju 1:2);
- 20 % raztopina natrijevega karbonata (Na_2CO_3);
- deionizirana voda.

Aparatura in pribor:

- UV-VIS spektrofotometer,
- kivete (10 mm),
- merilne bučke (100 ml),
- polnilne pipete (1 ml, 2 ml, 3 ml, 5 ml, 10 ml),
- puhalka z deionizirano vodo.

Izvedba analize:

a.) Priprava umeritvene krivulje:

Iz osnovne raztopine galne kisline pripravimo z ustreznim razredčevanjem različne koncentracije standardnih raztopin galne kisline: v 100 ml merilne bučke odpipetiramo od 0 do 10 ml osnovne raztopine galne kisline, dopolnimo do oznake z deionizirano vodo ter premešamo (preglednica 10).

Preglednica 10: Standardne raztopine galne kisline

Oznaka bučke	Volumen osnovne raztopine galne kisline (ml)	Končna koncentracija galne kisline v standardni raztopini (mg/l)
0	0	0 (slepi vzorec)
1	1	50
2	2	100
3	3	150
4	5	250
5	10	500

Iz vsake merilne bučke (preglednica 10) odpipetiramo po 1 ml standardne raztopine v 100 ml merilno bučko, dodamo približno 60 ml deionizirane vode, raztopino premešamo in dodamo 5 ml razredčenega F.C. reagenta. Raztopino ponovno dobro premešamo in po 30 sekundah

(najkasneje po 8 minutah) dodamo 15 ml 20 % raztopine natrijevega karbonata. Premešamo in dopolnimo z deionizirano vodo do oznake. Raztopino pustimo stati točno 2 uri pri temperaturi 20 °C. Po tem času vsebino merilne bučke še enkrat premešamo, prenesemo v 10 mm kivete in izmerimo absorbanco proti slepemu vzorcu pri valovni dolžini 765 nm.

Narišemo umeritveno krivuljo: odvisnost absorbance od masne koncentracije galne kisline (mg/l) in izračunamo enačbo premice. Beer-Lambertov zakon za to metodo velja za koncentracijsko območje 50-500 mg galne kisline/l.

b.) Določanje fenolnih spojin v vzorcu jabolčnega soka glede na umeritveno krivuljo:

Za določanje koncentracije skupnih fenolnih spojin v jabolčnem soku odpipetiramo 0,5 ml vzorca v 50 ml merilno bučko (po potrebi predhodno vzorce razredčimo v razmerju 1:2 z deionizirano vodo: 1 ml vzorca + 1 ml deionizirane vode). Nato vzorcu dodamo približno 30 ml deionizirane vode, raztopino premešamo in dodamo 2,5 ml razredčenega F.C. reagenta. Raztopino ponovno dobro premešamo in po 30 sekundah (najkasneje po 8 minutah) dodamo 7,5 ml 20 % raztopine natrijevega karbonata. Premešamo in dopolnimo z deionizirano vodo do oznake. Raztopino pustimo stati točno 2 uri pri temperaturi 20 °C. Po tem času vsebino merilne bučke še enkrat premešamo, prenesemo v 10 mm kivete in izmerimo absorbanco proti slepemu vzorcu pri valovni dolžini 765 nm.

Končno koncentracijo skupnih fenolnih spojin v vzorcu (mg galne kisline/l) izračunamo iz enačbe umeritvene krivulje (ob upoštevanju razredčitve).

3.2.4 Določanje vsebnosti askorbinske kisline na sistemu HPLC

Opis metode:

S tehniko HPLC (tekočinska kromatografija visoke ločljivosti) ločujemo snovi na osnovi adsorpcije, porazdelitve, ionske izmenjave, velikosti in biološke afinitete. V zadnjem času se je razvila v najbolj pogosto in najbolj široko uporabljeno kromatografsko tehniko. Je zelo učinkovita, ima visoko stopnjo ločljivosti, je hitra in primerna tudi za pikogramske in femtogramske količine materiala. Uporablja se tako za preparativno delo kot tudi za kvalitativne in kvantitativne analitske separacije. Za uspešno uveljavitev je bilo potrebno razviti in izdelati primerne kromatografske medije – stacionarne faze, fine in enakomerne granulacije, ki dajejo dobre ločitve in prenesejo visoke pritiske, s katerimi dosežemo zadovoljive pretočne hitrosti mobilne faze. Iz tega izvira tudi drugo ime, ki ga označuje ista okrajšava, to je visokotlačna tekočinska kromatografija (Kregar, 1996). Tehnika HPLC je

danes ena izmed najpogosteje uporabljenih metod za določanje askorbinske kisline v različnih vzorcih. Njena prednost je v kratkih časih ločitve, veliki ponovljivosti in visoki občutljivosti detekcije. Eluirane frakcije detektiramo s spektrofotometričnim UV-VIS detektorjem. AA ima absorpcijski maksimum pri 245 nm.

Reagenti:

- 0,004 M H₂SO₄,
- metafosforna kislina (2% MFK),
- L-askorbinska kislina (L-AA) (standard: 99,7%; Sigma, Nemčija).

2 % metafosforno kislino pripravimo tako, da 20 g MFK raztopimo v 1 litru destilirane vode.

Aparatura:

Sistem je sestavljen iz bistvenih in opcijskih komponent. Za mobilno fazo je potrebno uporabljati izredno čista topila (HPLC-kvalitete) in 2x destilirano vodo. Črpalke so zelo pomemben del sistema, saj morajo kontinuirano dovajati mobilno fazo ob čim manjšem nihanju pretoka, v širokem območju pretočnih hitrosti, z visoko natančnostjo pretoka in določene sestave zmesi. Tem zahtevam se najbolj približajo tribatne črpalke. Gradientni mešalec omogoča zvezno spreminjanje sestave mobilne faze. Vzorec nanašamo na kolono preko injektorjev. Najpomembnejši del HPLC sistema so kolone. Kovinske ali steklene cevi različnih dolžin (3-50 cm) so napolnjene z delci kromatografskega medija. Čim manjši so delci polnila, tem večja je ločljivost kolone, močno pa se poveča upor, ki se kaže kot povratni tlak kolone. V uporabi je več vrst nosilcev, katerim je skupna lastnost trdna struktura. Detektorji zaznajo in merijo količine snovi, ki se eluirajo iz kolone. Meritev poteka kontinuirno, ker je prav čas zadrževanja snovi na koloni karakterističen za snov. Signal iz detektorja se zapiše na rekorderju kot elucijski diagram – kromatogram. Za potrebe kvalitativne analize primerjamo retencijske čase eluiranih vrhov z retencijskimi časi standardov. Količine snovi določimo z merjenjem površine (ali višine) vrhov v kromatogramu, ki jo primerjamo s površino standarda znane množine (Kregar, 1996).

Pribor:

- analitska tehtnica,
- avtomatske pipete,
- merilne bučke (100 ml, 25 ml),
- ependorfke,

- kivete.

Kromatografski pogoji:

- mobilna faza: 0,004 M H₂SO₄,
- injiciran volumen vzorca: 20 μl,
- pretok mobilne faze: 0,6 ml/min,
- kolona: Bio-Rad Aminex HPX (87H, 300 x 7.8 mm),
- detektor: spektrofotometrični UV-VIS detektor KNAUER,
- valovna dolžina: 245 nm.

Izvedba analize:

a.) Merjenje askorbinske kisline:

Vzorcju sveže iztisnjenega jabolčnega soka dodamo 2 % metafosforno kislino (MFK) v razmerju 1:1. Le ta mora biti dodana takoj. Vloga metafosforne kisline je stabilizacija askorbinske kisline, saj preprečuje njeno oksidacijo. Zatehtamo 5 g jabolčnega soka in mu takoj dodamo 5 g MFK. Vzorce nato centrifugiramo (4000 obratov/10 min). Prelijemo v ependorfke in ponovno centrifugiramo (4000 obratov/5 min). Po centrifugiranju vzorce prelijemo v kivete. Vsebnost askorbinske kisline določimo z metodo HPLC. Koncentracijo askorbinske kisline določimo iz umeritvene krivulje.

b.) Priprava standarda za HPLC analizo:

V 100 ml bučko zatehtamo 0,05 g L-askorbinske kisline in dopolnimo do oznake z 2 % metafosforno kislino. Standarde nato pripravimo tako, da iz pripravljene standardne raztopine odpipetiramo različne količine raztopine v 25 ml bučke in dopolnimo do oznake z 2 % MFK. Tako dobimo različne koncentracije standarda, kar kaže preglednica 11. Koncentracijo askorbinske kisline v vzorcih določimo s pomočjo umeritvene krivulje standardnih raztopin askorbinske kisline.

Po končani kromatografski ločbi dobimo kromatogram. Iz znanih površin kromatografskega vrha askorbinske kisline za standardne raztopine askorbinske kisline, njihovih koncentracij in površin kromatografskih vrhov, ki jih dobimo pri analizi vzorcev, izračunamo koncentracijo askorbinske kisline v vzorcih.

Preglednica 11: Priprava standardnih raztopin askorbinske kisline

standard	V _{standarda} (ml/25 ml)	c _{standarda} (mg/l)
1	0,25	5
2	0,5	10
3	1	20
4	2	40
5	4	80
6	8	160

3.2.5 Določanje elementarne sestave jabolk z metodo rentgenske fluorescenčne spektroskopije (TXRF)

Opis metode:

Rentgensko sevanje je elektromagnetno valovanje, z valovno dolžino med 0,01 in 10 nm oziroma energijo med 0,1 keV in 124 keV. Pri prehodu rentgenske svetlobe skozi določeno snov pride do interakcije z atomi oziroma njihovimi elektroni (Doberšek, 2003). Rentgenska fluorescenčna spektroskopija (XRF - angl. X-Ray Fluorescence Analysis) je osnovana na vzbujanju vzorca z rentgenskim sevanjem in ionizaciji atomov v zunanjih orbitalah. Vzbujen atom oziroma ion se v procesu relaksacije vrne v osnovno stanje in pri tem lahko izseva fluorescenčno rentgensko svetlobo, karakteristično za vzbujen atom. Metoda omogoča na osnovi karakterističnega fluorescenčnega sevanja kvalitativno in kvantitativno določanje elementov. Občutljivost metode XRF se poveča pri vzbujanju s fokusirano rentgensko svetlobo v posebni geometriji, kar imenujemo tehnika rentgenske fluorescenčne spektroskopije s popolnim odbojem (TXRF - angl. Total Reflection X-Ray Spectroscopy) (Biziuk in Kuczynska, 2007). TXRF je izredno občutljiva metoda za analizo sledi elementov v majhnih vzorcih, ki se nanesejo na gladko ravno podlago iz primerne snovi (Kump, 1994). Glavne prednosti metode TXRF so preprostost in hitrost, možnost multielementarne analize, nedestruktivnost in majhna možnost kontaminacije (Golob in sod., 2005).

Pri naši kemijski analizi smo za vzbujanje fluorescence uporabili pristop s totalnim odbojem, to je tehnika rentgenske fluorescenčne spektroskopije s totalnim odbojem TXRF. Meritve so bile izvedene na Odseku za fiziko nizkih in srednjih energij Instituta »Jožef Stefan«.

Reagenti:

- Ga (vodna raztopina s koncentracijo 0,01 g Ga/l) (CentriPUR[®], Gallium ICP Standard) (Merck, Nemčija),
- HNO₃ (Merck, Nemčija).

Aparatura:

Eksperimentalni sistem je sestavljen iz rentgenske cevi kot izvora rentgenskega sevanja, totalno refleksijskega modula in energijsko disperzijskega rentgenskega spektrometra. Kot vir vzbujanja smo uporabili rentgensko cev z anodo iz molibdena in s finim fokusom. Totalno refleksijski modul nam omogoča pravilno oblikovanje rentgenskega sevanja, ki prihaja iz rentgenske cevi. Nastavek je sestavljen je iz kolimatorja, monokromatorja (izdelan iz več tankih plasti ogljika in volframa) in nosilca vzorca z možnostjo natančne nastavitve vpadnega kota glede na pripadajoče kolimirano vzbujevalno sevanje. Monokromator se nahaja takoj za kolimatorjem in služi za odstranitev vseh energij v spektru vpadnega rentgenskega sevanja, razen tistih z želeno energijo. Uporabljen rentgenski spektrometer temelji na visoko ločljivostnem polprevodniškem Si(Li) detektorju. Elektronski sistem detektorja sestavljajo: visokonapetostni vir, ojačevalnik, analogno digitalni pretvornik ter večkanalni analizator (Doberšek, 2003).

Pribor:

- avtomatske pipete,
- nosilna kvarčna stekla ($\Phi = 3$ cm, debelina 2 mm),
- infrardeča svetilka.

Delovni pogoji:

Merjenje spektra vsakega vzorca poteka 5 minut pri sobni temperaturi, pri napetosti 40 kV in električnem toku 30 mA na rentgenski cevi.

Priprava vzorcev za analizo:

a.) Vzorec: Odtehtamo 0,3 g vzorca jabolčnega soka v 25 ml stekleno čašo in dobro zmešamo z dvakrat destilirano vodo ter dopolnimo do oznake (10 ml). Dodamo interni standard, 1 ml standardne raztopine galija s koncentracijo 0,01 g/l. Raztopino homogeniziramo 1 uro v ultrazvočni kopeli. Nato odpipetiramo 10 μ l raztopine vzorca na nosilno kvarčno steklo in pustimo čez noč v eksikatorju, da se posuši. Do analize hranimo vzorec v eksikatorju, da ne pride do kontaminacije s prahom. Izmerimo spekter rentgenske fluorescenčne svetlobe z metodo TXRF.

b.) Slep vzorec: Izmerimo spekter čistega kvarčnega stekla.

Izračun rezultatov:

Elementno sestavo vzorca izračunamo s programom QAES, ki je bil razvit na Institutu »Jožef Stefan«. Na osnovi dodanega internega standarda izračunamo koncentracijo vseh ostalih prisotnih elementov vzorcu. Pri izračunu program upošteva faktor razredčitve, koncentracijo internega standarda glede na odtehtu vzorca in sipanje rentgenske fluorescenčne svetlobe. Rezultati za posamezne elemente se izpišejo v g/g vzorca.

3.3 STATISTIČNA OBDELAVA REZULTATOV

3.3.1 Aritmetična sredina

Vrednosti numeričnih statističnih spremenljivk variirajo okrog neke srednje vrednosti. V statistiki je pomembno ugotoviti, okrog katerega središča se nahajajo vrednosti spremenljivke posameznih enot, ker lahko s to vrednostjo, če je potrebno, predstavimo celotno populacijo ali vzorec. Meril za srednjo vrednost je več. Med njimi sta najpomembnejši aritmetična sredina in mediana, nekoliko manj pa modus (Adamič, 1980).

Od srednjih vrednosti najpogosteje uporabljamo aritmetično sredino ali povprečje. Dobimo jo tako, da seštejemo vrednosti spremenljivke vseh enot in vsoto delimo s številom enot; nanjo torej vpliva vrednost statističnega znaka vsake enote. Aritmetična sredina predstavlja nekakšno težišče podatkov, saj je vsota odklonov posameznih vrednosti spremenljivke od povprečja navzgor enaka vsoti odklonov navzdol. Zato je vsota vseh odklonov od aritmetične vedno enaka nič (Adamič, 1980).

Če zavzame neki statistični znak statističnih enot pojava v vzorcu zaporedoma numerične vrednosti $x_1, x_2, x_3, \dots, x_n$, je aritmetična sredina (povprečje) teh vrednosti:

$$\bar{x} = \frac{x_1 + x_2 + x_3 + \dots + x_n}{n} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n} \quad \dots (8)$$

3.3.2 Varianca in standardni odklon

Podatek o srednji vrednosti sam še ne zadošča za natančnejšo opredelitev mase. Potrebno je namreč vedeti tudi, koliko posamezni podatki odstopajo od te vrednosti in s tem oceniti, koliko srednja vrednost res predstavlja statistično maso (Adamič, 1980).

Varianca je osnovna mera variacije, podobno kot je aritmetična sredina osnovna mera za srednjo vrednost. Varianca je povprečje kvadratov odklonov posameznih vrednosti od aritmetične sredine. Za statistično analizo podatkov je zelo pomembna, kot opisni parameter pa manj, saj kvadrat merske enote spremenljivke pogosto nima pravega smisla. Poleg tega se varianca grafično ne da predstaviti. Zato se kot opisni parameter variacije bolj uporablja kvadratni koren variance, ki ga imenujemo standardna deviacija ali standardni odklon (Adamič, 1980). Varianco (σ^2) definira formula:

$$\sigma^2 = \frac{\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}{N} \quad \dots (9)$$

Standardni odklon je statistični kazalec, največkrat uporabljen za merjenje statistične razpršenosti enot. Z njim je moč izmeriti, kako razpršene so vrednosti, vsebovane v populaciji. Standardni odklon je lahko računano kot σ (sigma) in sicer kot odklon celotne populacije ali njene naključne spremenljivke, ali pa kot s in sicer kot odklon posameznega vzorca statistične populacije. Za ta različna odklona se formuli razlikujeta.

Standardni odklon vseh enot statistične populacije je definiran s formulo:

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}{N}} \quad \dots (10)$$

X_i je i -ta enota v statistični populaciji, \bar{x} je aritmetična sredina populacije, N pa je število vseh enot.

Standardni odklon vzorca statistične populacije je definiran s formulo:

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}{N - 1}} \quad \dots (11)$$

Velik standardni odklon σ kaže na veliko razpršenost enot v populaciji; enote so razporejene v velikem obsegu okoli aritmetične sredine. Majhen standardni odklon σ pa nasprotno predstavlja veliko koncentracijo statističnih enot okoli aritmetične sredine (Bajt in Štiblar, 2002).

4 REZULTATI

4.1 REZULTATI ANALIZ GLEDE NA SORTO JABOLK

4.1.1 Rezultati določanja mase jabolk

Vzorci jabolk smo tehtali in izračunali povprečno maso za posamezne vzorce, kar je razvidno iz preglednice 12. Masa je podana v gramih. Povprečje in standardni odklon mase glede na sorto jabolk sta podana v preglednici 13, grafično pa so rezultati predstavljeni na sliki 7.

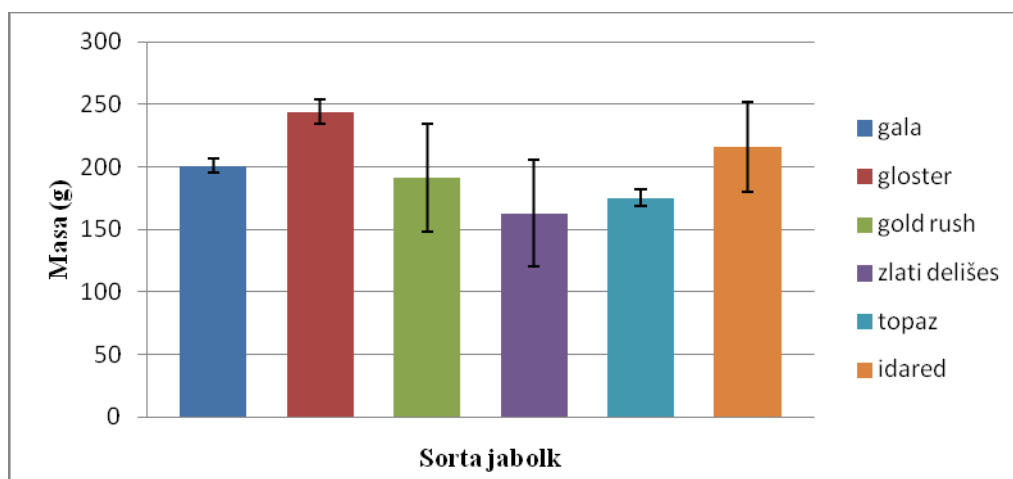
Preglednica 12: Povprečna masa (g) vzorcev jabolk

Oznaka vzorca	Povprečna masa (g)
GAE	197
GAK	205
GLE	237
GLK	251
GRE	160
GRK	222
ZDK1	146
ZDK2	136
ZDK3	143
ZDK4	227
TK	174
TE1	166
TE2	185
TE3	173
TE4	177
IK1	231
IK2	186
IK3	260
IK4	189

Jabolka tehtajo od 136 do 251 g. Najnižjo maso ima vzorec sorte zlati delišes ZDK2, prav tako pa ta sorta v povprečju tehta najmanj (163 g). Najvišjo maso ima vzorec sorte gloster GLK in prav tako je ta sorta v povprečju najtežja in tehta 244 g. Tudi znotraj posameznih sort masa variira, kar vidimo iz dokaj velikega standardnega odklona mase. Največji standardni odklon imata sorti gold rush in zlati delišes.

Preglednica 13: Povprečje in standardni odklon mase (g) glede na sorto jabolok

Sorta	Število vzorcev	Povprečna masa (g)	Standardni odklon mase (g)
gala	2	201	6
gloster	2	244	10
gold rush	2	191	43
zlata delišes	4	163	43
topaz	5	175	7
idared	4	216	35



Slika 7: Povprečje in standardni odklon mase (g) glede na sorto jabolok

4.1.2 Rezultati določanja antioksidacijskega potenciala v jabolčnem soku s prostim radikalom DPPH'

Antioksidacijski potencial (AOP) vzorcev jabolčnega soka smo določali z metodo, ki temelji na reakciji stabilnega radikala 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH') v 2 % raztopini MFK z antioksidanti iz vzorca.

Analizo vzorcev smo izvajali v treh paralelkah in za vsak vzorec smo naredili slepo probo. Izmerili smo absorbance (A) vzorcev in slepih prob, prav tako pa smo izmerili referenčno vrednost (RF). Iz enačbe (6) smo izračunali ΔA , ki smo jo vstavili v enačbo (7) in dobili antioksidacijski potencial AOP za vsak vzorec. V preglednici 14 je kot rezultat podano povprečje vseh treh paralelk. Enote so nmol DPPH/ml. Povprečje in standardni odklon AOP glede na sorto jabolok sta predstavljena v preglednici 15, grafično pa sta prikazana na sliki 8.

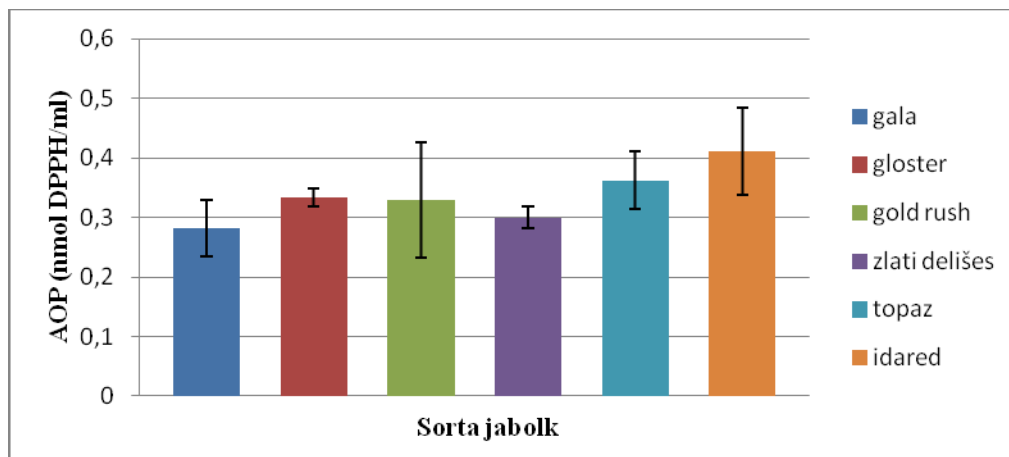
Preglednica 14: Rezultati meritev antioksidacijskega potenciala (nmol DPPH/ml) glede na sorto jabolk

Oznaka vzorca	AOP (nmol DPPH/ml)
GAE	0,316
GAK	0,248
GLE	0,344
GLK	0,323
GRE	0,398
GRK	0,260
ZDK1	0,285
ZDK2	0,285
ZDK3	0,323
ZDK4	0,307
TK	0,328
TE1	0,326
TE2	0,431
TE3	0,332
TE4	0,392
IK1	0,413
IK2	0,466
IK3	0,307
IK4	0,457

Antioksidacijski potencial je predvsem posledica vsebnosti polifenolov (še posebno flavonoidov) in v manjši meri vitaminov (Vidrih in Kač, 2000). Več kot jabolka vsebujejo fenolnih snovi in vitaminov, višji je AOP. Iz rezultatov vidimo, da je AOP med drugim odvisen tudi od sorte jabolk. Najvišjo vrednost AOP dosega sorta idared s povprečjem 0,411 nmol DPPH/ml, sledi ji sorta topaz, ostale sorte pa imajo podobne vrednosti AOP. Vzorec IK2 ima najvišji AOP, ki znaša 0,466 nmol DPPH/ml, najnižji AOP pa ima vzorec GAK z vrednostjo 0,248 nmol DPPH/ml, in tudi sicer ima sorta gala najnižje povprečje AOP, ki meri 0,282 nmol DPPH/ml.

Preglednica 15: Povprečje in standardni odklon antioksidacijskega potenciala (nmol DPPH/ml) glede na sorto jabolk

Sorta	Število vzorcev	Povprečje AOP (nmol DPPH/ml)	Standardni odklon AOP (nmol DPPH/ml)
gala	2	0,282	0,048
gloster	2	0,334	0,015
gold rush	2	0,329	0,097
zlati delišes	4	0,300	0,019
topaz	5	0,362	0,048
idared	4	0,411	0,073



Slika 8: Povprečje in standardni odklon antioksidacijskega potenciala (nmol DPPH/ml) glede na sorto jabolok

4.1.3 Rezultati določanja fenolnih spojin v jabolčnem soku s spektrofotometrično metodo

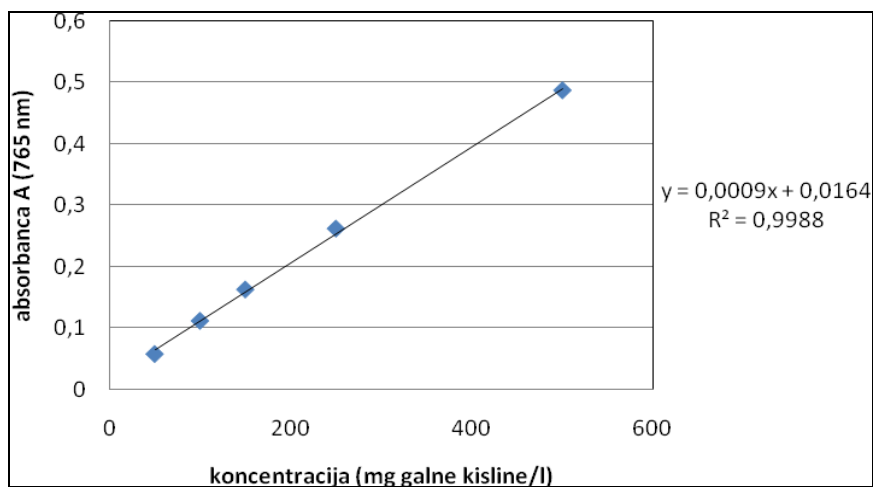
Fenolne spojine v vzorcih jabolčnega soka smo določali s Folin-Ciocalteujevim reagentom, pri čemer smo merili absorbanco pri valovni dolžini 765 nm. Izmerjena absorbanca je premo sorazmerna količini skupnih fenolov v vzorcu.

4.1.3.1 Umeritvena krivulja za skupne fenolne spojine s F.C. reagentom

Iz podatkov, ki so predstavljeni v preglednici 16, smo narisali umeritveno krivuljo (slika 9). Iz enačbe umeritvene krivulje (ob upoštevanju razredčitve) smo izračunali koncentracijo skupnih fenolnih spojin izraženo kot mg galne kisline/l.

Preglednica 16: Odvisnost absorbance od koncentracije galne kisline

Koncentracija galne kisline (mg/l)	Absorbanca ($A_{765 \text{ nm}}$)
50	0,057
100	0,111
150	0,162
250	0,261
500	0,486



Slika 9: Umeritvena krivulja za določanje fenolnih spojin – odvisnost absorbance od koncentracije galne kisline skupaj z enačbo premice

$$y = 0,0009x + 0,0164$$

$$x = \frac{y - 0,0164}{0,0009}$$

4.1.3.2 Določene koncentracije skupnih fenolnih spojin v jabolčnem soku

Vsebnost skupnih fenolnih spojin (SFS) v jabolčnem soku smo določali v treh paralelkah. V preglednici 17 so zbrani rezultati povprečne koncentracije skupnih fenolnih spojin po sortah. Povprečje in standardni odklon koncentracije skupnih fenolnih spojin glede na sorto jabolk sta predstavljena v preglednici 18, grafično pa sta prikazana na sliki 10. Enote so v mg/l.

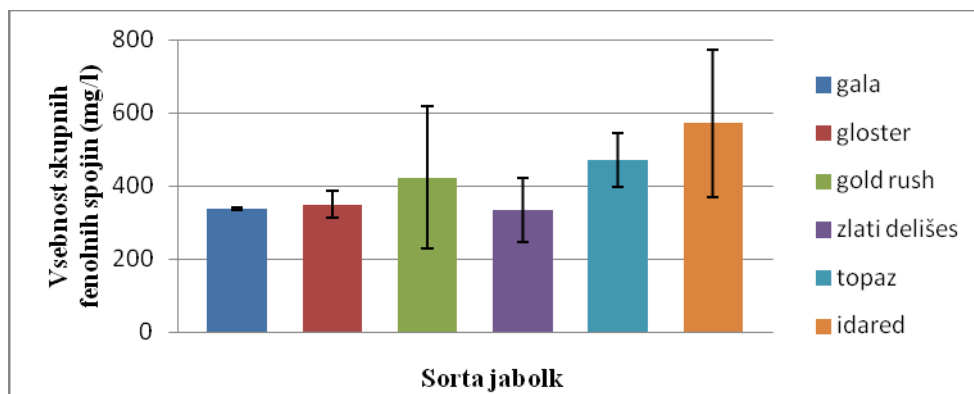
Iz rezultatov vidimo, da je vsebnost skupnih fenolnih spojin v jabolčnem soku v precej velikem razponu, in sicer se koncentracije gibljejo v mejah od 210 do 766 mg/l. Vsebnost fenolnih spojin je odvisna od mnogih dejavnikov, med drugim tudi od sorte jabolk. Najvišjo koncentracijo skupnih fenolnih spojin ima sorta idared (povprečno 571 mg/l), sledita ji sorti topaz s povprečno koncentracijo 472 mg/l in gold rush (423 mg/l). Nižje vrednosti pa so v sortah gala, gloster in zlati delišes, kjer ima zlati delišes najmanjšo koncentracijo skupnih fenolnih spojin in znaša 334 mg/l. Vsebnost skupnih fenolnih spojin se lahko razlikuje tudi znotraj posamezne sorte zaradi različnih zunanjih dejavnikov. Največja odstopanja najdemo pri sortah idared in gold rush, ki imata precej velik standardni odklon.

Preglednica 17: Rezultati meritev koncentracije skupnih fenolnih spojin v mg/l glede na sorto jabolok

Oznaka vzorca	Koncentracija SFS (mg/l)
GAE	340
GAK	334
GLE	375
GLK	322
GRE	560
GRK	287
ZDK1	210
ZDK2	332
ZDK3	387
ZDK4	407
TK	471
TE1	358
TE2	561
TE3	502
TE4	469
IK1	509
IK2	695
IK3	315
IK4	766

Preglednica 18: Povprečje in standardni odklon koncentracije skupnih fenolnih spojin (mg/l) glede na sorto jabolok

Sorta	Število vzorcev	Povprečna c_{SFS} (mg/l)	St. odklon c_{SFS} (mg/l)
gala	2	337	4
gloster	2	348	37
gold rush	2	423	193
zlati delišes	4	334	89
topaz	5	472	74
idared	4	571	202



Slika 10: Povprečje in standardni odklon koncentracije skupnih fenolnih spojin (mg/l) glede na sorto jabolok

4.1.4 Rezultati določanja vsebnosti askorbinske kisline na sistemu HPLC

Askorbinsko kislino (AA) smo določali z metodo HPLC s spektrofotometričnim UV-VIS detektorjem. Absorbanco smo merili pri valovni dolžini 245 nm. Rezultati meritev koncentracije askorbinske kisline so prikazani v preglednici 19. Povprečje in standardni odkloni koncentracije AA glede na sorto jabolok so zbrani v preglednici 20, grafično pa so prikazani na sliki 11. Vse enote so v mg/100 ml.

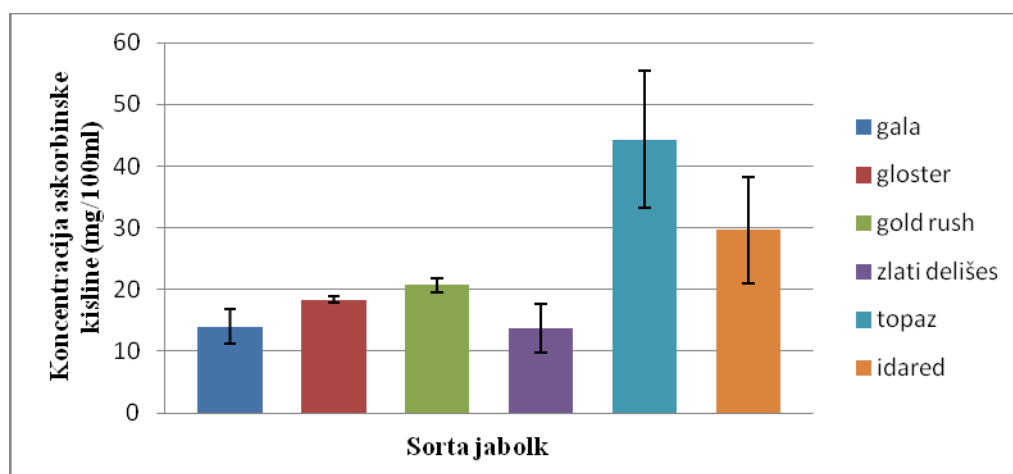
Preglednica 19: Rezultati meritev koncentracije askorbinske kisline v mg/100 ml glede na sorto jabolok

Oznaka vzorca	Koncentracija AA (mg/100 ml)
GAE	12,0
GAK	16,0
GLE	18,0
GLK	18,8
GRE	21,5
GRK	19,9
ZDK1	16,4
ZDK2	15,8
ZDK3	7,8
ZDK4	14,6
TK	51,7
TE1	46,1
TE2	50,9
TE3	24,9
TE4	47,9
IK1	31,5
IK2	25,7
IK3	20,7
IK4	40,8

Vsebnost askorbinske kisline je precej odvisna od sorte jabolok. Najvišjo povprečno koncentracijo AA ima sorta topaz, ki znaša 44,3 mg/100 ml. Vzorec TK (topaz) ima tudi maksimalno vsebnost 51,7 mg/100 ml. Kot vidimo imajo vsi vzorci sorte topaz z izjemo vzorca TE3 zelo visoko koncentracijo AA. Na drugem mestu po povprečni koncentraciji AA je sorta idared in znaša 29,6 mg/100 ml. Najnižjo povprečno koncentracijo AA ima sorta zlati delišes, 13,7 mg/100 ml, absolutno najnižjo koncentracijo pa ima vzorec ZDK3 in znaša 7,8 mg/100 ml. Iz rezultatov vidimo, da se vsebnost AA razlikuje tudi znotraj posamezne vrste, sorti topaz in idared imata precej velik standardni odklon.

Preglednica 20: Povprečje in standardni odklon koncentracije askorbinske kisline (mg/100 ml) glede na sorto jabolk

Sorta	Število vzorcev	Povprečna c_{AA} (mg/100 ml)	Standardni odklon c_{AA} (mg/100 ml)
gala	2	14,0	2,9
gloster	2	18,4	0,5
gold rush	2	20,7	1,1
zlati delišes	4	13,7	4,0
topaz	5	44,3	11,1
idared	4	29,6	8,6



Slika 11: Povprečje in standardni odklon koncentracije askorbinske kisline (mg/100 ml) glede na sorto jabolk

4.1.5 Rezultati določanja vsebnosti dušikovih in ogljikovih izotopov v jabolčnem soku

Z metodo IRMS smo določali vsebnost dušikovih in ogljikovih izotopov v vzorcih jabolčnega soka. Metoda temelji na merjenju izotopskega razmerja med deležem težjega in lažjega izotopa, ki ga označimo z δ . Rezultati so izraženi v promilih (‰). Določili smo vrednosti $\delta^{13}C$ in $\delta^{15}N$ v pulpi jabolčnega soka in v peškah ter $\delta^{13}C$ v izoliranih sladkorjih. Rezultati vseh meritev so prikazani v preglednici 21, povprečja in standardni odkloni glede na sorto jabolk pa so prikazani v preglednici 22.

Najnižje vrednosti $\delta^{13}C$ glede na sorto jabolk smo določili v pulpi jabolčnega soka. Najnižjo $\delta^{13}C$ vrednost v pulpi smo določili pri sorti zlati delišes in je -30,2 ‰, najvišjo pa smo določili pri idaredu in znaša -24,6 ‰. V povprečju ima najnižjo vrednost $\delta^{13}C$ v pulpi zlati delišes (-29,9 ‰), najvišjo pa gold rush (-26,2 ‰).

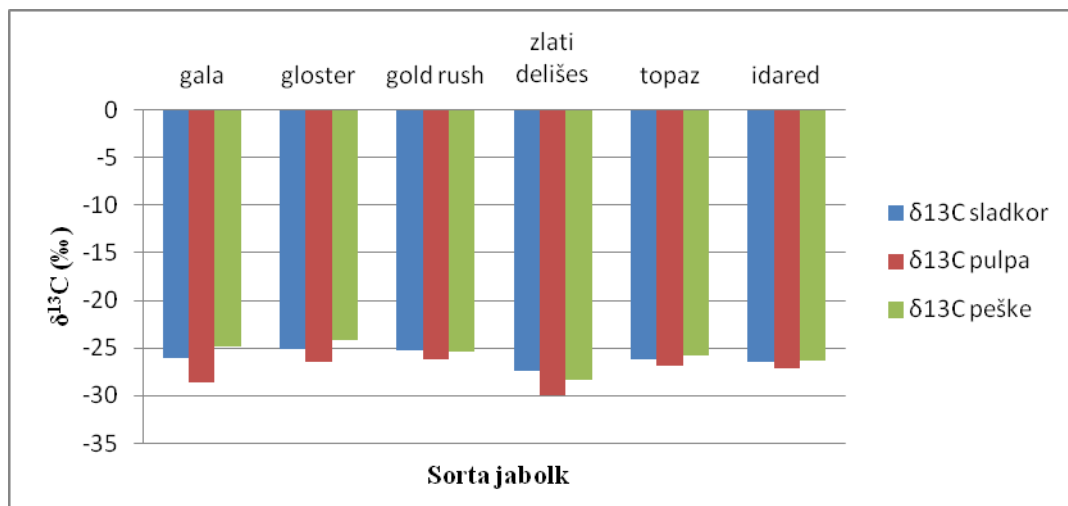
Preglednica 21: Rezultati meritev $\delta^{13}\text{C}$ in $\delta^{15}\text{N}$ v pulpi in peškah ter $\delta^{13}\text{C}$ v sladkorjih (‰) glede na sorto jabolčk

Oznaka vzorca	$\delta^{13}\text{C}$ sladkor (‰)	$\delta^{13}\text{C}$ pulpa (‰)	$\delta^{15}\text{N}$ pulpa (‰)	$\delta^{13}\text{C}$ peške (‰)	$\delta^{15}\text{N}$ peške (‰)
GAE	-25,8	-28,2	3,9	-24,7	4,4
GAK	-26,4	-29,1	3,8	-25,0	4,7
GLE	-24,8	-25,2	3,6	-24,1	3,8
GLK	-25,4	-27,8	3,2	-24,1	3,8
GRE	-25,8	-25,9	3,2	-25,3	4,9
GRK	-24,8	-26,6	3,4	-25,3	-
ZDK1	-25,3	-29,6	1,2	-27,6	2,8
ZDK2	-28,6	-30,2	4,7	-28,5	5,8
ZDK3	-28,6	-29,8	0,2	-28,5	-
ZDK4	-27,3	-30,1	1,7	-28,5	-
TK	-25,8	-26,5	3,4	-25,5	5,0
TE1	-26,0	-26,4	2,2	-25,5	3,0
TE2	-25,1	-26,4	3,2	-24,7	5,0
TE3	-27,0	-27,3	1,3	-26,8	2,1
TE4	-27,2	-27,9	2,4	-26,1	3,5
IK1	-24,4	-24,6	4,1	-25,2	2,2
IK2	-25,5	-25,8	3,2	-25,2	-
IK3	-27,9	-28,5	0,7	-27,4	2,3
IK4	-28,0	-29,4	-0,03	-27,6	1,8

Vrednosti $\delta^{13}\text{C}$ v sladkorjih so nekoliko višje od vrednosti $\delta^{13}\text{C}$ v pulpi jabolčnega soka. Najnižjo povprečno vrednost ima sorta zlati delišes (-27,5 ‰), absolutno najnižjo vrednost pa smo določili pri vzorcih ZDK2 in ZDK3, ki je v obeh primerih znašala -28,6 ‰. Najvišja povprečna vrednost $\delta^{13}\text{C}$ v sladkorjih je pri sorti gloster (-25,1 ‰), najvišji posamezni rezultat pa smo zabeležili pri vzorcu idareda IK1 in znaša -24,4 ‰.

Tudi vrednosti $\delta^{13}\text{C}$ v peškah so nekoliko višje od vrednosti $\delta^{13}\text{C}$ v pulpi, v večini vzorcev pa so tudi višje od vrednosti $\delta^{13}\text{C}$ v sladkorjih. $\delta^{13}\text{C}$ v peškah zavzemajo vrednosti od -28,9 do -24,1 ‰. Najnižjo povprečno $\delta^{13}\text{C}$ vrednost v peškah smo zabeležili pri sorti zlati delišes (-28,3 ‰), prav tako pa so vsi vzorci te sorte imeli najnižje posamezne vrednosti. Najvišjo povprečno in prav tako posamezne $\delta^{13}\text{C}$ vrednosti v peškah pa smo določili pri sorti gloster (vse znašajo -24,1 ‰).

Za lažjo primerjavo $\delta^{13}\text{C}$ vrednosti smo izrisali tudi stolpčni diagram, kjer so prikazane povprečne $\delta^{13}\text{C}$ vrednosti v pulpi, sladkorju in v peškah glede na sorto jabolčk (slika 12).



Slika 12: Povprečne vrednosti $\delta^{13}\text{C}$ v pulpi, sladkorjih in peškah jabolk (‰) glede na sorto jabolk

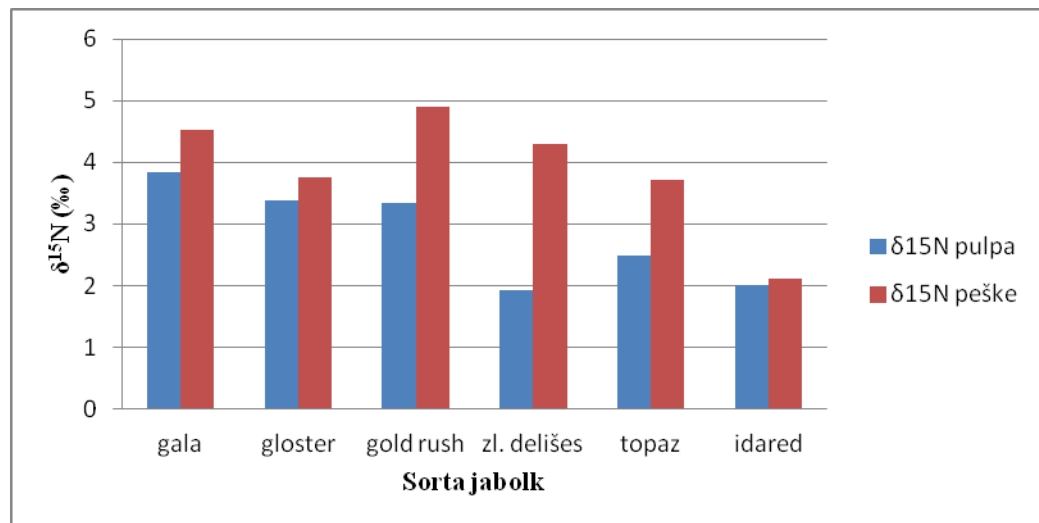
Preglednica 22: Povprečja in standardni odkloni $\delta^{13}\text{C}$ in $\delta^{15}\text{N}$ (‰) glede na sorto jabolk

		gala	gloster	gold rush	zl. delišes	topaz	idared
$\delta^{13}\text{C}$ sladkor (‰)	povprečje	-26,1	-25,1	-25,3	-27,5	-26,2	-26,5
	st. odklon	0,4	0,4	0,7	1,6	0,9	1,8
$\delta^{13}\text{C}$ pulpa (‰)	povprečje	-28,7	-26,5	-26,2	-29,9	-26,9	-27,1
	st. odklon	0,7	1,8	0,5	0,3	0,7	2,2
$\delta^{15}\text{N}$ pulpa (‰)	povprečje	3,8	3,4	3,3	1,9	2,5	2,0
	st. odklon	0,07	0,3	0,1	1,9	0,9	2,0
$\delta^{13}\text{C}$ peške (‰)	povprečje	-24,8	-24,1	-25,3	-28,3	-25,7	-26,4
	st. odklon	0,2	0,0	0,0	0,4	0,8	1,3
$\delta^{15}\text{N}$ peške (‰)	povprečje	4,5	3,8	4,9	4,3	3,7	2,1
	st. odklon	0,2	0,0	0,0	1,5	1,3	0,2

Najvišjo vrednost $\delta^{15}\text{N}$ v pulpi ima vzorec zlati delišes ZDK2 in znaša 4,7 ‰. Hkrati je zlati delišes sorta, ki ima v povprečju najnižjo vrednost $\delta^{15}\text{N}$ v pulpi (1,9 ‰) in vzorec ZDK2 precej odstopa od ostalih vzorcev te sorte. Najvišjo povprečno vrednost $\delta^{15}\text{N}$ v pulpi ima sorta gala in znaša 3,8 ‰. Najnižjo vrednost -0,03 ‰ smo izmerili v pulpi idareda z oznako IK4.

$\delta^{15}\text{N}$ smo izmerili tudi v peškah. Povprečne vrednosti pri vseh sortah so malo višje kot vrednosti $\delta^{15}\text{N}$ v pulpi. Najvišjo povprečno vrednost $\delta^{15}\text{N}$ v peškah ima sorta gold rush in znaša 4,9 ‰, najnižjo pa ima idared, ki je 2,1 ‰. Vse vrednosti se gibljejo v območju med 1,8 (idared) in 5,8 ‰ (zlati delišes).

Za lažje primerjanje določenih $\delta^{15}\text{N}$ vrednosti v pulpi in peškah smo izrisali diagram, kjer so prikazane povprečne $\delta^{15}\text{N}$ vrednosti (slika 13).



Slika 13: Povprečne vrednosti $\delta^{15}\text{N}$ (‰) v pulpi in peškah jabolok glede na sorto jabolok

4.1.6 Rezultati določanja elementarne sestave jabolok z metodo rentgenske fluorescenčne spektroskopije (TXRF)

Z metodo rentgenske fluorescenčne spektroskopije (TXRF) smo v vzorcih jabolok določali posamezne elemente. Določili smo koncentracije naslednjih elementov: fosfor (P), žveplo (S), klor (Cl), kalij (K), kalcij (Ca), mangan (Mn), cink (Zn) in rubidij (Rb). Rezultati so izraženi z enoto ppm (parts per million), ki je definirana kot število masnih delov izbrane snovi v milijonu delov raztopine ali zmesi. Rezultati so prikazani v preglednici 23. Povprečne vsebnosti posameznih elementov in standardni odkloni glede na sorto jabolok pa so prikazani v preglednici 24.

V zelo visokih koncentracijah je prisoten kalij, ki zavzema vrednosti od 617 do 954 ppm. Sorta gala vsebuje v povprečju največ kalija (895 ppm), najmanj pa ga vsebuje gold rush (povprečno 786 ppm).

Fosfor je na drugem mestu pri vseh sortah po povprečni vsebnosti. Najnižjo povprečno vsebnost fosforja smo določili pri sorti idared, ki znaša 31,5 ppm, najvišjo pa pri sorti gala z vrednostjo 42,7 ppm. Koncentracija fosforja zavzema vrednosti od 17,2 do 50,0 ppm.

Na tretjem mestu po vsebnosti je kalcij, ki se giblje v območju med 7,5 in 28,5 ppm. Največ

ga vsebujejo jabolka topaz s povprečno koncentracijo 14,5 ppm, najmanj pa gloster, ki ima povprečno 7,8 ppm kalcija.

Preglednica 23: Rezultati določanja koncentracij posameznih elementov (ppm) glede na sorto jabolk

Oznaka vzorca	P (ppm)	S (ppm)	Cl (ppm)	K (ppm)	Ca (ppm)	Mn (ppm)	Zn (ppm)	Rb (ppm)
GAE	35,4	3,53	3,62	835	14,7	0,182	0,275	0,437
GAK	50,0	5,68	2,28	954	11,4	0,138	0,288	0,436
GLE	40,2	10,9	1,54	805	7,5	0,554	0,458	0,520
GLK	26,2	3,23	2,65	844	8,1	0,137	0,512	0,615
GRE	46,7	10,50	7,60	748	18,1	0,217	0,532	0,687
GRK	33,6	7,70	5,35	824	1,9	0,142	0,547	0,905
ZDK1	49,0	11,00	2,74	837	9,3	0,312	0,232	0,628
ZDK2	28,8	8,56	3,80	901	10,6	0,059	0,308	0,349
ZDK3	33,6	7,35	3,51	792	10,1	0,214	0,293	0,501
ZDK4	28,3	4,67	1,44	637	10,4	0,193	0,326	0,417
TK	40,1	4,01	3,07	813	11,6	0,167	0,331	0,740
TE1	43,9	12,8	1,15	887	10,5	0,195	0,387	1,390
TE2	30,3	4,20	1,52	663	9,5	0,255	0,517	1,710
TE3	37,4	4,41	2,03	872	12,3	0,206	0,577	1,150
TE4	31,0	3,31	1,80	802	28,5	0,172	0,342	1,050
IK1	17,2	4,55	1,82	617	8,1	0,366	0,397	0,837
IK2	40,4	4,60	2,16	859	8,2	0,485	0,244	1,010
IK3	27,1	3,32	2,08	890	14,2	0,224	0,354	2,130
IK4	41,3	5,15	2,39	829	8,5	0,194	0,302	1,570

Žveplo, ki je na četrtem mestu pri vseh sortah po povprečni vsebnosti, zavzema vrednosti od 3,23 (pri sorti gloster) do 12,8 ppm (pri topazu). Najvišjo povprečno koncentracijo dosega sorta gold rush (9,10 ppm), najnižjo pa idared (4,41 ppm).

Na petem mestu po vsebnosti je klor. Najnižjo povprečno koncentracijo ima sorta topaz z vrednostjo 1,91 ppm, najvišjo pa gold rush z vrednostjo 6,48 ppm. Koncentracija klora se giblje med 1,15 in 7,60 ppm.

V precej nižji koncentraciji je prisoten rubidij, ki se nahaja v razponu od 0,349 do 1,71 ppm. Povprečno ga najmanj vsebuje sorta gala z vrednostjo 0,437 ppm, največ pa sorta idared s povprečjem 1,39 ppm.

Še v nižjih koncentracijah je zastopan element cink, ki se nahaja med vrednostma 0,232 (pri zlatem delišesu) in 0,577 (pri topazu) ppm. V povprečju največ cinka najdemo v sorti gold

rush (0,540 ppm), najmanj pa ga je v sorti gala (0,282 ppm).

Mangan, ki je prisoten v najnižji koncentraciji pri vseh sortah po povprečni vrednosti, zavzema vrednosti od 0,059 (zlata delišes) do 0,554 ppm (gloster). Najvišjo povprečno koncentracijo dosega sorta gloster (0,346 ppm), najnižjo pa gala (0,160 ppm).

Preglednica 24: Povprečja in standardni odkloni koncentracij posameznih elementov (ppm) glede na sorto jabolk

		gala	gloster	gold rush	zl. delišes	topaz	idared
P (ppm)	povprečje	42,7	33,2	40,2	34,9	36,5	31,5
	st. odklon	10,3	9,9	9,3	9,7	5,9	11,5
S (ppm)	povprečje	4,61	7,07	9,10	7,90	5,75	4,41
	st. odklon	1,52	5,42	1,98	2,63	3,97	0,77
Cl (ppm)	povprečje	2,95	2,10	6,48	2,87	1,91	2,11
	st. odklon	0,95	0,79	1,59	1,06	0,73	0,24
K (ppm)	povprečje	895	825	786	792	807	799
	st. odklon	84	28	54	112	89	124
Ca (ppm)	povprečje	13,1	7,8	10,0	10,1	14,5	9,7
	st. odklon	2,3	0,4	11,5	0,6	7,9	3,0
Mn (ppm)	povprečje	0,160	0,346	0,180	0,195	0,199	0,317
	st. odklon	0,031	0,295	0,053	0,104	0,035	0,135
Zn (ppm)	povprečje	0,282	0,485	0,540	0,290	0,431	0,324
	st. odklon	0,009	0,038	0,011	0,041	0,110	0,066
Rb (ppm)	povprečje	0,437	0,568	0,796	0,474	1,208	1,387
	st. odklon	0,001	0,067	0,154	0,120	0,365	0,586

4.2 REZULTATI ANALIZ GLEDE NA NAČIN PRIDELAVE JABOLK

Ker nas je zanimalo, kakšna je razlika med ekološko in konvencionalno pridelanimi jabolki, smo naše rezultate obravnavali tudi glede na način pridelave jabolk. Imeli smo 7 vzorcev ekološko in 12 vzorcev konvencionalno pridelanih jabolk.

4.2.1 Rezultati določanja vsebnosti skupnih fenolnih spojin, askorbinske kisline, antioksidacijskega potenciala in mase jabolk

V preglednici 25 so skupaj prikazani rezultati povprečne mase, vsebnosti skupnih fenolnih spojin, antioksidacijskega potenciala in vsebnosti askorbinske kisline v naših vzorcih glede na način pridelave jabolk. V preglednici 26 pa so prikazane povprečne vrednosti in standardni odkloni teh parametrov.

Preglednica 25: Rezultati povprečne mase (g), antioksidacijskega potenciala (nmol DPPH/ml), koncentracije skupnih fenolnih spojin (mg/l) in askorbinske kisline (mg/100 ml) glede na način pridelave jabolk

Način pridelave	Oznaka vzorca	Povprečna masa (g)	C _{SFS} (mg/l)	AOP (nmol DPPH/ml)	C _{AA} (mg/100 ml)
Ekološki	GAE	197	340	0,316	12,0
	GLE	237	375	0,344	18,0
	GRE	160	560	0,398	21,5
	TE1	166	358	0,326	46,1
	TE2	185	561	0,431	50,9
	TE3	173	502	0,332	24,9
	TE4	177	469	0,392	47,9
Konvenc.	GAK	205	334	0,248	16,0
	GLK	251	322	0,323	18,8
	GRK	222	287	0,260	19,9
	ZDK1	146	210	0,285	16,4
	ZDK2	136	332	0,285	15,8
	ZDK3	143	387	0,323	7,8
	ZDK4	227	407	0,307	14,6
	TK	174	471	0,328	51,7
	IK1	231	509	0,413	31,5
	IK2	186	695	0,466	25,7
	IK3	260	317	0,307	20,7
	IK4	189	766	0,457	40,8

Ekološko pridelana jabolka tehtajo od 160 do 237 g. Njihova povprečna masa je 186 g, standardni odklon pa je 27 g. Konvencionalno pridelana jabolka imajo večji razpon mase, in

sicer tehtajo od 136 do 260 g. Njihova povprečna masa je 197 g, standardni odklon pa je nekoliko večji in znaša 42 g.

Koncentracija skupnih fenolnih spojin v ekološko pridelanih jabolkih se giblje v območju od 340 do 561 mg/l. Povprečna koncentracija pa meri 451 mg/l. Nižjo povprečno koncentracijo skupnih fenolnih spojin imajo konvencionalno pridelana jabolka in znaša 420 mg/l. Koncentracije posameznih vzorcev pri temu načinu pridelave so v precej večjem območju, kar se vidi tudi po visokem standardnem odklonu (166 mg/l) in zavzemajo vrednosti od 210 do 766 mg/l.

Tudi povprečni antioksidacijski potencial je pri ekološko pridelanih jabolkih rahlo višji kot pri konvencionalno pridelanih in znaša 0,353 nmol DPPH/ml, medtem ko pri slednjih znaša 0,339 nmol DPPH/ml. Posamezni vzorci pri ekološki pridelavi zavzemajo vrednosti AOP od 0,316 do 0,431 nmol DPPH/ml, pri konvencionalni pridelavi pa zavzemajo vrednosti od 0,248 do 0,466 nmol DPPH/ml. Standardni odkloni pri obeh načinih pridelave so dokaj majhni.

Koncentracija askorbinske kisline (AA) je pri obeh načinih pridelave v precej velikem razponu, kar kaže tudi velik standardni odklon. Pri ekološko pridelanih jabolkih se koncentracija giblje v razponu od 12,0 do 50,9 mg/100 ml, pri konvencionalno pridelanih jabolkih pa zavzema vrednosti od 7,8 do 51,7 mg/100 ml. Povprečna koncentracija AA pri ekološko pridelanih jabolkih znaša 32,2 mg/100 ml, medtem ko je koncentracija AA pri konvencionalno pridelanih jabolkih nižja in znaša 23,0 mg/100 ml.

Preglednica 26: Povprečja in standardni odkloni mase (g), antioksidacijskega potenciala (nmol DPPH/ml), koncentracije skupnih fenolnih spojin (mg/l) in askorbinske kisline (mg/100 ml) glede na način pridelave jabolok

Način pridelave	Število vzorcev	Statističen parameter	Povp. masa (g)	C _{SFS} (mg/l)	AOP (nmol DPPH/ml)	C _{AA} (mg/100 ml)
Ekološko	7	povprečje	186	451	0,353	32,2
		st. odklon	27	96	0,060	15,4
Konvenc.	12	povprečje	197	420	0,339	23,0
		st. odklon	42	166	0,068	12,7

4.2.2 Rezultati določanja vsebnosti dušikovih in ogljikovih izotopov v jabolčnem soku

Rezultati določanja izotopske sestave glede na način pridelave jabolok so prikazani v preglednici 27, povprečja in standardni odkloni $\delta^{13}\text{C}$ in $\delta^{15}\text{N}$ vrednosti pa so prikazani v preglednici 28.

Najnižje vrednosti $\delta^{13}\text{C}$ smo določili v pulpi jabolčnega soka. Ekološko pridelana jabolka

imajo vrednosti $\delta^{13}\text{C}$ od -28,2 do -25,2 ‰, konvencionalno pridelana pa imajo večji razpon, in sicer zavzemajo vrednosti od -30,2 do -24,6 ‰ in imajo tudi večji standardni odklon, ki znaša 1,9 ‰. V povprečju imajo jabolka iz konvencionalne pridelave nižjo vrednost $\delta^{13}\text{C}$ in je -28,1 ‰, pri ekoloških jabolkih pa ta znaša -26,9 ‰.

Preglednica 27: Rezultati meritev $\delta^{13}\text{C}$ in $\delta^{15}\text{N}$ v pulpi in peškah ter $\delta^{13}\text{C}$ v sladkorjih (‰) glede na način pridelave jabolk

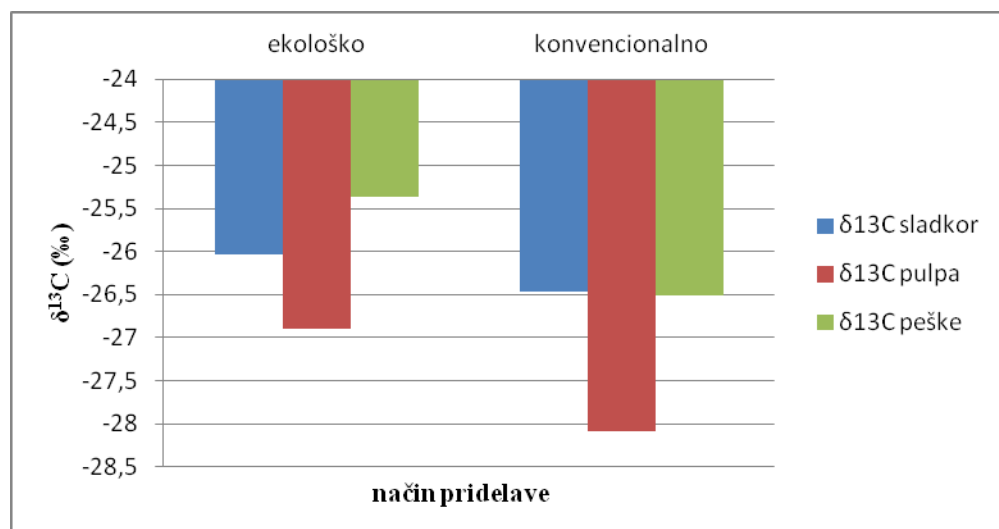
Način pridelave	Oznaka vzorca	$\delta^{13}\text{C}$ sladkor (‰)	$\delta^{13}\text{C}$ pulpa (‰)	$\delta^{15}\text{N}$ pulpa (‰)	$\delta^{13}\text{C}$ peške (‰)	$\delta^{15}\text{N}$ peške (‰)
Ekološki	GAE	-25,8	-28,2	3,9	-24,7	4,4
	GLE	-24,8	-25,2	3,6	-24,1	3,8
	GRE	-25,8	-25,9	3,2	-25,3	4,9
	TE1	-26,0	-26,4	2,2	-25,5	3,0
	TE2	-25,1	-26,4	3,2	-24,7	5,0
	TE3	-27,0	-27,3	1,3	-26,8	2,1
	TE4	-27,2	-27,9	2,4	-26,1	3,5
Konvenc.	GAK	-26,4	-29,1	3,8	-25,0	4,7
	GLK	-25,4	-27,8	3,2	-24,1	3,8
	GRK	-24,8	-26,6	3,4	-25,3	-
	ZDK1	-25,3	-29,6	1,2	-27,6	2,8
	ZDK2	-28,6	-30,2	4,7	-28,5	5,8
	ZDK3	-28,6	-29,8	0,2	-28,5	-
	ZDK4	-27,3	-30,1	1,7	-28,5	-
	TK	-25,8	-26,5	3,4	-25,5	5,0
	IK1	-24,4	-24,6	4,1	-25,2	2,2
	IK2	-25,5	-25,8	3,2	-25,2	-
	IK3	-27,9	-28,5	0,7	-27,4	2,3
	IK4	-28,0	-29,4	-0,03	-27,6	1,8

Nekoliko višje $\delta^{13}\text{C}$ vrednosti smo določili v izoliranih sladkorjih. Ekološko pridelana jabolka imajo povprečno $\delta^{13}\text{C}$ vrednost v sladkorju -26,0 ‰, sicer pa se vrednosti posameznih vzorcev gibajo med -27,2 in -24,8 ‰. Nekoliko nižjo povprečno $\delta^{13}\text{C}$ vrednost v sladkorju imajo konvencionalno pridelana jabolka in znaša -26,5 ‰. Njihove posamezne vrednosti pa se nahajajo med -28,6 in -24,4 ‰. Tudi standardni odklon je pri teh vzorcih večji in meri 1,5 ‰.

Tudi vrednosti $\delta^{13}\text{C}$ v peškah so nekoliko višje od vrednosti $\delta^{13}\text{C}$ v pulpi, v večini vzorcev pa so tudi višje od vrednosti $\delta^{13}\text{C}$ v sladkorjih. $\delta^{13}\text{C}$ v peškah ekološko pridelanih jabolk zavzemajo vrednosti od -26,8 do -24,1 ‰. Povprečna $\delta^{13}\text{C}$ znaša -25,4 ‰. Pri konvencionalno

pridelanih jabolkih se vrednosti $\delta^{13}\text{C}$ v peškah gibajo med -28,5 in -24,1 ‰, njihova povprečna $\delta^{13}\text{C}$ pa je nekoliko nižja in je -26,5 ‰. Standardni odklon je tudi v tem primeru večji pri jabolkih konvencionalne pridelave in znaša 1,6 ‰.

Za lažje primerjanje določenih $\delta^{13}\text{C}$ vrednosti v pulpi, sladkorjih in peškah smo izrisali stolpčni diagram, kjer so izrisane povprečne $\delta^{13}\text{C}$ vrednosti glede na način pridelave jabolk (slika 14).



Slika 14: Povprečne $\delta^{13}\text{C}$ vrednosti (‰) v jabolčnem soku glede na način pridelave jabolk

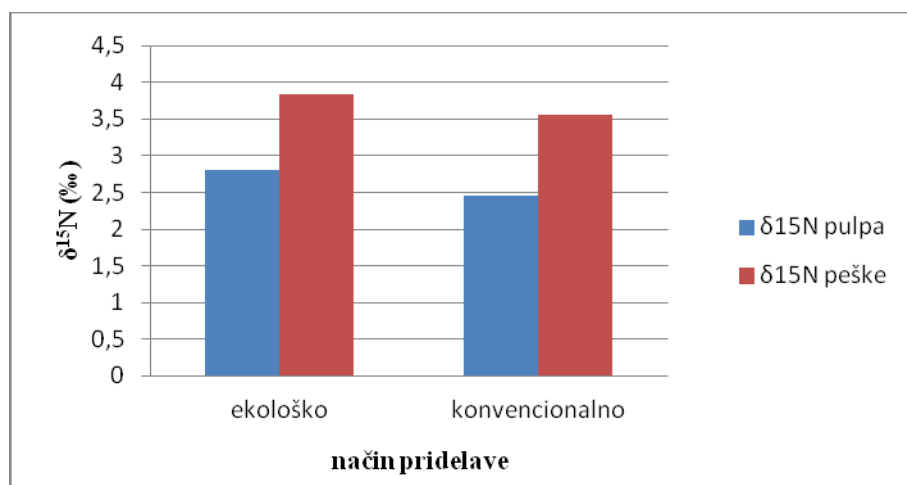
Preglednica 28: Povprečja in standardni odkloni $\delta^{13}\text{C}$ in $\delta^{15}\text{N}$ (‰) glede na način pridelave jabolk

Način pridelave	Število vzorcev	Statističen parameter	$\delta^{13}\text{C}$ sladkor (‰)	$\delta^{13}\text{C}$ pulpa (‰)	$\delta^{15}\text{N}$ pulpa (‰)	$\delta^{13}\text{C}$ peške (‰)	$\delta^{15}\text{N}$ peške (‰)
Ekološko	7	povprečje	-26,0	-26,9	2,8	-25,4	3,8
		st. odklon	0,9	1,3	0,9	0,9	1,0
Konvenc.	12	povprečje	-26,5	-28,1	2,5	-26,5	3,6
		st. odklon	1,5	1,9	1,6	1,6	1,4

$\delta^{15}\text{N}$ vrednosti v pulpi zavzemajo vrednosti od 1,3 do 3,9 ‰. Povprečna vrednost $\delta^{15}\text{N}$ v pulpi znaša 2,8 ‰, standardni odklon pa je 0,9 ‰. Pri jabolkih, pridelanih na konvencionalen način, je ena vrednost $\delta^{15}\text{N}$ negativna, ostale pa so pozitivne. $\delta^{15}\text{N}$ v pulpi zavzemajo vrednosti med -0,03 in 4,7 ‰, njihova povprečna vrednost pa je malo nižja kot pri ekoloških jabolkih in znaša 2,5 ‰. Standardni odklon pa je večji in znaša 1,6 ‰.

Izmerili smo tudi vrednosti $\delta^{15}\text{N}$ v peškah. Ekološko pridelana jabolka zavzemajo vrednosti od 2,1 do 5,0 ‰, njihovo povprečje pa znaša 3,8 ‰. Konvencionalno pridelana jabolka imajo nekoliko večji razpon, in sicer zavzemajo vrednosti $\delta^{15}\text{N}$ od 1,8 do 5,8 ‰, njihovo povprečje pa znaša 3,6 ‰.

Na sliki 15 so grafično prikazane povprečne vrednosti $\delta^{15}\text{N}$ v pulpi in peškah, kjer vidimo, da so vrednosti $\delta^{15}\text{N}$ precej višje v peškah, kakor v pulpi jabolčnega soka.



Slika 15: Povprečne $\delta^{15}\text{N}$ vrednosti (‰) v jabolčnem soku glede na način pridelave jabolk

4.2.3 Rezultati določanja elementarne sestave jabolk z metodo TXRF

Rezultati glede na način pridelave jabolk so predstavljeni v tabeli 29, povprečja in standardni odkloni koncentracij posameznih elementov pa so predstavljeni v preglednici 30. Vse enote so v ppm.

V zelo visokih koncentracijah (v primerjavi z drugimi elementi) je prisoten kalij. Ekološko pridelana jabolka ga vsebujejo od 663 do 887 ppm. Povprečna vsebnost kalija je 819 ppm. Konvencionalno pridelana jabolka vsebujejo od 617 do 954 ppm kalija, njegova povprečna vsebnost pa je rahlo nižja in znaša 807 ppm. Standardna odklona se med seboj bistveno ne razlikujeta.

Fosfor je zastopan v dosti manjši koncentraciji kot kalij. V jabolkih ekološke pridelave ga je od 30,3 do 46,7 ppm. Njegova povprečna vsebnost pri tem načinu pridelave je 39,9 ppm. Konvencionalno pridelana jabolka zavzemajo dosti širše koncentracijsko območje, in sicer so vrednosti od 17,2 do 50 ppm, povprečna vsebnost fosforja pa je nižja in znaša 33,4 ppm.

Standardna odklona se med sabo bistveno ne razlikujeta.

Kalcij, ki je na tretjem mestu po vsebnosti, zavzema pri ekoloških jabolkih vrednosti od 7,5 do 28,5 ppm, povprečno pa ga vsebujejo 14,0 ppm. Konvencionalno pridelana jabolka vsebujejo dosti manj kalcija, in sicer so vrednosti v območju med 1,9 in 11,4 ppm. Povprečna vsebnost kalcija pri tem načinu pridelave je 9,6 ppm. Standardni odklon je večji pri ekoloških jabolkih in znaša 7,2 ppm.

Preglednica 29: Rezultati določanja koncentracij posameznih elementov (ppm) glede na način pridelave jabolk

Način pridelave	Oznaka vzorca	P (ppm)	S (ppm)	Cl (ppm)	K (ppm)	Ca (ppm)	Mn (ppm)	Zn (ppm)	Rb (ppm)
Ekološki	GAE	35,4	3,53	3,62	835	14,7	0,182	0,275	0,437
	GLE	40,2	10,90	1,54	805	7,5	0,554	0,458	0,520
	GRE	46,7	10,50	7,60	748	18,1	0,217	0,532	0,687
	TE1	43,9	12,80	1,15	887	10,5	0,195	0,387	1,390
	TE2	30,3	4,20	1,52	663	9,5	0,255	0,517	1,710
	TE3	37,4	4,41	2,03	872	12,3	0,206	0,577	1,150
	TE4	31,0	3,31	1,80	802	28,5	0,172	0,342	1,050
Konvenc.	GAK	50,0	5,68	2,28	954	11,4	0,138	0,288	0,436
	GLK	26,2	3,23	2,65	844	8,1	0,137	0,512	0,615
	GRK	33,6	7,70	5,35	824	1,9	0,142	0,547	0,905
	ZDK1	49,0	11,00	2,74	837	9,3	0,312	0,232	0,628
	ZDK2	28,8	8,56	3,80	901	10,6	0,059	0,308	0,349
	ZDK3	33,6	7,35	3,51	792	10,1	0,214	0,293	0,501
	ZDK4	28,3	4,67	1,44	637	10,4	0,193	0,326	0,417
	TK	40,1	4,01	3,07	813	11,6	0,167	0,331	0,740
	IK1	17,2	4,55	1,82	617	8,1	0,366	0,397	0,837
	IK2	40,4	4,60	2,16	859	8,2	0,485	0,244	1,010
	IK3	27,1	3,32	2,08	890	14,2	0,224	0,354	2,130
	IK4	41,3	5,15	2,39	829	8,5	0,194	0,302	1,570

Naslednji element po zastopanosti je žveplo. Pri ekoloških jabolkih se giblje v koncentracijskem območju med 3,31 in 10,90 ppm, podobno kot pri konvencionalno pridelanih jabolkih. Povprečji se med seboj razlikujeta, in sicer imajo ekološka jabolka 7,40 ppm, konvencionalna pa 5,64 ppm žvepla.

Sledi vsebnost klora. Njegova koncentracija pri ekološko pridelanih jabolkih se giblje med 1,15 in 7,60 ppm, povprečna koncentracija pa znaša 2,56 ppm. V konvencionalno pridelanih jabolkih se koncentracija klora giblje med 1,44 in 5,35 ppm, povprečna koncentracija pa je

nekoliko višja in znaša 2,89 ppm. Ekološka jabolka imajo večji standardni odklon z vrednostjo 2,25 ppm.

Rubidij je prisoten v nižjih koncentracijah. Ekološko pridelana jabolka ga vsebujejo od 0,437 do 1,710 ppm, njegova povprečna koncentracija je 0,992 ppm. Vsebnost rubidija v konvencionalno pridelanih jabolkah se giblje v območju med 0,349 in 2,130 ppm, njegova povprečna koncentracija pa je nekoliko nižja in znaša 0,845 ppm.

Nižje koncentracije so opazne tudi pri cinku, ki se pri obeh načinih pridelave nahaja v zelo podobnem koncentracijskem območju. Ekološko pridelana jabolka ga vsebujejo od 0,275 do 0,577 ppm, konvencionalno pridelana pa od 0,232 do 0,547 ppm. V povprečju imajo ekološka jabolka višjo koncentracijo cinka, ki znaša 0,443 ppm, pri konvencionalno pridelanih jabolkah pa ta znaša 0,343 ppm. Standardna odklona sta si podobna.

Koncentracije mangana so v povprečju najnižje. Povprečje za ekološko pridelana jabolka znaša 0,248 ppm, za konvencionalno pridelana pa 0,223 ppm. Posamezni vzorci ekološko pridelanih jabolk se nahajajo v koncentracijskem območju od 0,172 do 0,554 ppm, vzorci konvencionalno pridelanih pa v območju od 0,059 do 0,485 ppm. Večji standardni odklon imajo vzorci ekološke pridelave in znaša 0,140 ppm.

Preglednica 30: Povprečja in standardni odkloni koncentracij posameznih elementov (ppm) glede na način pridelave jabolk

Način pridelave	Število vzorcev	Statističen parameter	P (ppm)	S (ppm)	Cl (ppm)	K (ppm)	Ca (ppm)	Mn (ppm)	Zn (ppm)	Rb (ppm)
Ekološko	7	povprečje	39,9	7,40	2,56	819	14,0	0,248	0,443	0,992
		st. odklon	7,5	3,87	2,25	96	7,2	0,140	0,107	0,470
Konvenc.	12	povprečje	33,4	5,64	2,89	807	9,6	0,223	0,343	0,845
		st. odklon	8,6	2,45	1,07	89	3,3	0,115	0,098	0,525

5 RAZPRAVA

Naš namen raziskave je bil ugotoviti, ali obstajajo razlike med ekološko in konvencionalno pridelanimi jabolki. Ugotavljali smo, kakšne so razlike v kemijski in izotopski sestavi jabolk. Primerjali smo tudi razlike med posameznimi sortami jabolk.

V raziskavi smo uporabili 19 vzorcev jabolk različnih sort, ki so bila pridelana na ekološki ali pa na konvencionalni način. 7 vzorcev jabolk je bilo ekološko, 12 pa konvencionalno pridelanih. Jabolka imajo različna geografska porekla, nabrana so bila v septembru in oktobru 2009.

Med kemijskimi lastnostmi smo primerjali antioksidacijski potencial, koncentracijo skupnih fenolnih spojin in koncentracijo askorbinske kisline (vitamina C), izmerili smo maso jabolk, določili pa smo tudi koncentracije posameznih elementov (fosfor, žveplo, klor, kalij, kalcij, mangan, cink in rubidij) v jabolkih.

Določili smo tudi vsebnost dušikovih in ogljikovih izotopov v vzorcih jabolčnega soka, in sicer smo izmerili vrednosti $\delta^{13}\text{C}$ in $\delta^{15}\text{N}$ v pulpi jabolčnega soka in v peškah ter $\delta^{13}\text{C}$ v izoliranih sladkorjih.

Rezultate smo predstavili na dva načina, in sicer imamo rezultate glede na način pridelave in rezultate glede na sorto jabolk. Nas je bolj zanimalo, kako način pridelave vpliva na lastnosti jabolk, vendar pa obstajajo tudi velike razlike med posameznimi sortami jabolk, zato smo rezultate predstavili tudi glede na sorto.

5.1 RAZPRAVA GLEDE NA SORTO JABOLK

Na maso jabolk med drugim vpliva sorta. Najtežja jabolka v našem poskusu so gloster in tehtajo povprečno 244 g, najlažja pa so jabolka sorte zlati delišes in tehtajo povprečno 163 g. Masa variira tudi znotraj posameznih sort.

V času rasti in zorenja prihaja v lupini plodov do nenehnega spreminjanja profila fenolnih snovi (Mayr in sod., 1995). Vsebnost skupnih fenolnih spojin je lahko precej različna med tkivi in med organi. Ugotovljeno je bilo, da zunanja tkiva plodov ali semen vsebujejo bistveno večje vsebnosti skupnih fenolnih spojin v primerjavi z notranjostjo plodu. Kot primer navajajo, da lahko lupina jabolk vsebuje tudi do 100 krat večje vsebnosti nekaterih fenolov v primerjavi s pulpo (Veberič in sod., 2005). Iz naših rezultatov vidimo, da je vsebnost skupnih

fenolnih spojin v jabolčnem soku v precej velikem razponu, in sicer se vrednosti gibljejo od 210 do 766 mg/l.

Med drugim je vsebnost skupnih fenolnih spojin odvisna tudi od sorte jabolk. Ugotovitev Lancastera (1992) je zelo kompleksna, saj navaja, da je količina flavonoidnih snovi pri jablani specifična za določene celice ter gensko, razvojno in okoljsko determinirana. Najvišjo vsebnost skupnih fenolnih spojin ima v našem primeru sorta idared (povprečno 571 mg/l), sledita ji sorti topaz in gold rush. Nižje vrednosti pa so v sortah gala, gloster in zlati delišes, kjer ima zlati delišes najmanjšo povprečno vsebnost skupnih fenolnih spojin, ki znaša 334 mg/l.

Pri ugotavljanju koncentracije polifenolov v različnih sortah jabolk so Kahle in sodelavci (2005) ugotovili, da spada sorta boskop med sorte z največ polifenoli (970 mg/l), sorta granny smith pa med tiste z najmanj polifenoli (154 mg/l). Tsao s sodelavci (2003) navaja najvišje koncentracije polifenolov pri sortah rdeči delišes in northern spy, najnižje pa pri sorti empire. V naših poskusih ni bilo nobene od omenjenih sort, zato rezultatov ni mogoče primerjati.

Ker je vsebnost skupnih fenolnih spojin povezana z antioksidacijskim potencialom (AOP) v sadju, so rezultati po pričakovanju podobni, kot pri merjenju AOP. AOP je predvsem posledica vsebnosti polifenolov in v manjši meri vitaminov (Vidrih in Kač, 2000). Stracke in sodelavci (2009) so ugotovili, da so flavanoli in flavonoli glavne komponente, ki določajo AOP. Za polifenole v jabolkih se je izkazalo, da imajo za dva do štirikrat večji antioksidativen učinek kot vitamin C (Chennan in Streif, 2002). Več kot jabolka vsebujejo fenolnih snovi in vitaminov, višji je AOP. Na AOP vpliva tudi sorta jabolk (Napolitano in sod., 2004), kar vidimo tudi iz naših rezultatov. Najvišjo vrednost AOP dosega sorta idared s povprečjem 0,411 nmol DPPH/ml, sledi ji sorta topaz, najnižji AOP ima sorta gala in v povprečju meri 0,282 nmol DPPH/ml.

Tudi v jabolku najdemo askorbinsko kislino (AA), vendar v nižjih koncentracijah kot pri drugem koščičastem sadju. Jabolko vsebuje 8-12 AA/100 g, lahko tudi več. Koncentracija AA ne variira samo med različnimi sortami sadja, ampak tudi znotraj posamezne sorte (Favell, 1998). Na njeno vsebnost 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). Koncentracije AA so različne glede na notranjo delitev ploda in glede na mesto merjenja (senčna/sončna stran ploda). Tako je največ AA v lupini plodov, ki so izpostavljeni soncu, kjer je tudi odstotek

krovne barve večji. Bolj kot zunanji dejavniki pa so za koncentracijo AA pomembne genetske lastnosti sorte (Lee in Kader, 2000; Chennan in Streif, 2002).

Različni avtorji so podali vsebnosti AA v različnih sortah. Chennan in Streif (2002) sta določila pri sorti gala le 8 mg AA/100 g mase plodov, medtem ko je bila ta vrednost pri sorti braeburn 30 mg/100 g mase. V lupinah plodov so bile glede na ostale dele plodov zabeležene 3 do 4-kratne vrednosti AA. Tudi v našem primeru ima gala zelo nizko vsebnost AA. Slika 6 prav tako prikazuje velike razlike med posameznimi sortami, kjer se koncentracije AA gibajo med 5 in 31 mg/100 mg mase plodov (Krišković, 1989). Naši rezultati so podani v drugačnih enotah, zato ne moremo primerjati vrednosti z podatki iz literature.

Najvišjo povprečno koncentracijo askorbinske kisline smo določili pri sorti topaz, ki znaša 44,3 mg/100 ml, na drugem mestu pa je sorta idared in znaša 29,6 mg/100 ml. Najmanjšo povprečno koncentracijo ima sorta zlati delišes, 13,7 mg/100 ml. Iz rezultatov vidimo, da se vsebnost askorbinske kisline razlikuje tudi znotraj posamezne vrste, kar kaže na to, da na njeno vsebnost vplivajo tudi drugi dejavniki.

Vsebnost skupnih fenolnih spojin in askorbinske kisline je odvisna od mnogih dejavnikov (stopnja zrelosti, klima, območje pridelave, način pridelave, sorta, svetloba, mehanske poškodbe in bolezni jablan...), zato so vrednosti v naših vzorcih tako raznolike. Naši vzorci jabolok so različnega geografskega porekla, kar pomeni da so tudi ostali dejavniki, kot so temperatura, količina padavin in svetloba različno vplivali na vsebnost skupnih fenolnih spojin, askorbinske kisline in AOP. Sorti topaz in idared imata tudi najvišji AOP in vsebnost skupnih fenolnih spojin in tako iz rezultatov vidimo korelacijo med temi tremi parametri. Več kot jabolka vsebujejo fenolnih snovi in vitaminov, višji je AOP. Sorti gala in zlati delišes pa imata najnižjo vsebnost skupnih fenolnih spojin in askorbinske kisline in tudi njun AOP je najmanjši.

Jabolka spadajo med rastline, ki za nastanek sladkorjev uporabljajo Calvinov ali C₃ cikel in torej spadajo med C₃ rastline. Van der Merwe (1982) navaja, da so pričakovane $\delta^{13}\text{C}$ vrednosti v sladkorjih C₃ rastlin med -35 in -22 ‰, s povprečjem -26,5 ‰. V literaturi pa najdemo tudi podatke za jabolčni sok. V AOAC metodah je navedeno, da je povprečna $\delta^{13}\text{C}$ vrednost v jabolčnih sokovih -25,3 ‰. V jabolčnih sokovih so tako Doner in sodelavci (1980), kot tudi Jamin in sodelavci (1997) določili povprečno $\delta^{13}\text{C}$ vrednost, ki je znašala -25,4 ‰. Po podatkih prvega se vrednosti gibljejo med -27,9 in -22,5 ‰, vrednost pri drugem pa med -26,8 in -23,6 ‰. Po drugi strani pa Brause in Raterman (1982) podajata nekoliko širše območje gibanja $\delta^{13}\text{C}$ vrednosti v jabolčnih sokovih, in sicer med -28 in -22 ‰.

Naša jabolka zavzemajo $\delta^{13}\text{C}$ vrednosti sladkorja od -30,2 do -24,1 ‰, kar dokazuje, da jabolka spadajo med C_3 rastline, vendar pa so te vrednosti nekoliko nižje, kot navajajo avtorji v svojih rezultatih $\delta^{13}\text{C}$ v jabolčnem soku.

Najnižje povprečne vrednosti $\delta^{13}\text{C}$ glede na sorto jabolk smo določili v pulpi jabolčnega soka. Vrednosti $\delta^{13}\text{C}$ v sladkorjih so nekoliko višje od vrednosti $\delta^{13}\text{C}$ v pulpi, kar je verjetno posledica izotopske frakcionacije različnih metabolitov. Lipidi imajo nižjo izotopsko sestavo v primerjavi z ogljikovodiki. Glede na sorto ima v povprečju najnižjo vrednost $\delta^{13}\text{C}$ v pulpi zlati delišes (-29,9 ‰), najvišjo pa gold rush (-26,2 ‰). Najnižjo povprečno vrednost $\delta^{13}\text{C}$ v sladkorjih smo določili pri sorti zlati delišes (-27,5 ‰), najvišjo pa pri sorti gloster (-25,1 ‰). Tudi vrednosti $\delta^{13}\text{C}$ v peškah so nekoliko višje od vrednosti $\delta^{13}\text{C}$ v pulpi. Najnižjo povprečno $\delta^{13}\text{C}$ vrednost v peškah smo zabeležili pri sorti zlati delišes (-28,3 ‰), najvišjo pa smo določili pri sorti gloster (-24,1 ‰).

Lee in Wrolstad (1988) sta v svoji raziskavi ugotovila, da so vrednosti $\delta^{13}\text{C}$ v pulpi skoraj enake vrednostim v soku, vrednosti v sladkorjih pa so podobno kot pri nas manj negativne. Za $\delta^{13}\text{C}$ v peškah pa nismo našli nobenih podatkov.

Najnižjo povprečno vrednost $\delta^{15}\text{N}$ v pulpi ima sorta zlati delišes in znaša 1,9 ‰, najvišjo pa ima sorta gala in znaša 3,8 ‰. Povprečne vrednosti $\delta^{15}\text{N}$ v peškah so pri vseh sortah nekoliko višje kot vrednosti $\delta^{15}\text{N}$ v pulpi. Najnižjo povprečno vrednost $\delta^{15}\text{N}$ v peškah smo zabeležili pri sorti idared in znaša 2,1 ‰, najvišjo pa ima sorta gold rush in znaša 4,9 ‰.

Kornexl in sodelavci (1996) so ugotovili, da je izotopska sestava pulpe bolj odvisna od geografskih pogojev kot od sorte jabolk. Iz odvisnosti med $\delta^{13}\text{C}$ in $\delta^{15}\text{N}$ v pulpi so lahko ločili italijanska jabolka od nemških. Povprečne vrednosti $\delta^{15}\text{N}$ v pulpi italijanskega jabolčnega soka so bile 2.4 ± 1.8 ‰, medtem ko so bile v soku iz Nemčije vrednosti višje 5.0 ± 3.3 ‰, kar se dobro ujema tudi z našimi meritvami. Dobro ločitev med posameznimi geografskimi področji so dobili tudi pri pomarančnem soku.

Izkazalo se je, da je tudi elementna sestava jabolk bolj odvisna od geografskih pogojev in vrste tal kot pa same sorte jabolk. Povprečne koncentracije posameznih elementov si sledijo v naslednjem vrstnem redu: $\text{K} > \text{P} > \text{Ca} > \text{S} > \text{Cl} > \text{Rb} > \text{Zn} > \text{Mn}$.

5. 2 RAZPRAVA GLEDE NA NAČIN PRIDELAVE JABOLK

Rezultati različnih raziskav so pokazali, da so konvencionalno pridelana jabolka na splošno težja od ekoloških. Valavanidis in sodelavci (2009) poročajo o 20 do 30 % večji teži konvencionalno pridelanih jabolk. Tudi Roussos in Gasparatos (2009) sta ugotovila, da so konvencionalno pridelana jabolka bistveno težja in večja od ekoloških. Tudi celoten pridelek je večji. Pri ekološki pridelavi pa sta zabeležila več sadežev na drevo, vendar so ti manjši. Konvencionalno pridelana jabolka so tehtala povprečno 186 g, medtem ko so bila ekološka jabolka težka povprečno 168 g. Naša jabolka iz konvencionalne pridelave so prav tako težja in povprečno tehtajo 197 g, medtem ko ekološka jabolka tehtajo povprečno 186 g. Teža je večja v povprečju le za 6 %.

Ne glede na sorto lahko pričakujemo, da imajo ekološko pridelana jabolka višjo vsebnost antioksidantov, fenolnih spojin in askorbinske kisline v primerjavi s konvencionalno pridelanimi.

Rezultati raziskav, kjer so ugotavljali razliko v vsebnosti fenolnih komponent v jabolkih pridelanih na ekološki in integriran način kažejo, da so ekološka jabolka vsebovala višje koncentracije skupnih fenolnih spojin v primerjavi z jabolki pridelanimi na integriran način. Razlog za višjo vsebnost skupnih fenolnih spojin pri ekološko pridelanih jabolkih lahko pripišemo stresnim dejavnikom, kot so okužbe s patogeni, napad škodljivcev in pomanjkanje hranil, saj se rastline na različne biotske in abiotske dejavnike odzovejo s povečano sintezo fenolnih spojin. Glede na to, da je bil posledično višji tudi njihov AOP, lahko predpostavljamo, da imajo jabolka iz ekološke pridelave višjo prehransko kot tudi zdravstveno vrednost (Veberič, 2010).

Tudi Hecke in sodelavci (2006) so pri ugotavljanju koncentracije fenolnih spojin v jabolkih različnih sort, pridelanih po smernicah ekološke in integrirane pridelave, prišli do zaključka, da imajo plodovi ekološke pridelave mnogo več fenolnih spojin od plodov integrirane pridelave.

Podatki različnih raziskav kažejo, da vpliv metode pridelovanja na vsebnost skupnih fenolnih spojin in AOP v jabolkih ni skladen. V letu 2000 so Weibel in sodelavci poročali o 18-23 % večji vsebnosti skupnih fenolnih spojin v ekološko pridelanih jabolkih (zlati delišes). Nasprotno pa sta dve drugi študiji pokazali, da ni razlik med ekološko in konvencionalno pridelavo. Ti podatki kažejo na to, da biosinteza fenolnih spojin ni odvisna le od načina pridelovanja, ampak tudi od drugih, manj karakteriziranih in kontroliranih dejavnikov, kot je

na primer vpliv podnebja. Klimatski dejavniki imajo zelo močan vpliv na vsebnost polifenolov v plodovih (Stracke in sod., 2009).

Naši rezultati so pokazali, da sta vsebnosti skupnih fenolnih spojin in prav tako AOP v ekološko pridelanih jabolkih višji kot v konvencionalno pridelanih. Vsebnost skupnih fenolnih spojin v ekoloških jabolkih je v povprečju 451 mg/l, v konvencionalno pridelanih pa povprečje znaša 420 mg/l. Povprečen AOP pri jabolkih ekološke pridelave znaša 0,353 nmol DPPH/ml, pri konvencionalno pridelanih pa je 0,339 nmol DPPH/ml. Ugotovili smo, da ima sorta idared v našem primeru najvišjo vsebnost fenolnih spojin in AOP. Idared je na splošno sorta z visoko vsebnostjo polifenolov. To so ugotovili tudi Wolfe in sodelavci (2003). Ker imamo v našem poskusu konvencionalno pridelan idared, nam njegove vrednosti precej zvišajo povprečje pri konvencionalni pridelavi. Če iz naših rezultatov izvzamemo sorto idared, se povprečji AOP in koncentracije skupnih fenolnih spojin pri konvencionalno pridelanih jabolkih precej znižata in znašata za fenole 344 mg/l in za AOP 0,295 nmol DPPH/ml. Iz teh rezultatov pa lahko zaključimo, da imajo ekološko pridelana jabolka večjo vsebnost antioksidantov in skupnih fenolnih spojin kot konvencionalno pridelana.

Mnogi avtorji navajajo, da je vsebnost askorbinske kisline višja pri ekološko pridelanem sadju in zelenjavi, le nekateri navajajo, da v njihovih poskusih ni bilo bistvenih razlik. Le malo raziskav je bilo opravljenih na jabolkih. Bertazza in sodelavci (2010), ki so ugotavljali razliko v sestavi in kvaliteti različnega sadja (jabolka, hruške in marelice), ki je bilo pridelano na ekološki in konvencionalni način, so med drugim ugotovili, da je bila vsebnost askorbinske kisline pri vseh treh vrstah sadja višja pri ekološkem načinu pridelovanja. Do podobnih ugotovitev je prišla tudi Worthington (2001), ki je delala primerjavo pri različnem sadju, zelenjavi in žitaricah in prišla do rezultatov, da ekološki pridelki v povprečju vsebujejo 27 % več askorbinske kisline kot pa konvencionalni pridelki.

Tudi naši rezultati kažejo, da je vsebnost askorbinske kisline višja pri ekološko pridelanih jabolkih in v povprečju znaša 32,2 mg/100 ml, medtem ko je koncentracija v konvencionalno pridelanih jabolkih 23,0 mg/100 ml, kar je skoraj 30 % manj.

Določanje izotopskega razmerja $\delta^{15}\text{N}$ se je izkazalo za dobro metodo razlikovanja med ekološkim in konvencionalnim načinom pridelave (Flores in sod., 2007; Rogers, 2008). Večina raziskav je bila usmerjena na zelenjavo (Bateman in sod., 2005; Georgi in sod., 2005; Bateman in sod., 2007; Flores in sod., 2007), manj raziskav pa je bilo narejenih na sadju (Rapisarda in sod., 2005; Rapisarda in sod., 2010). Rezultati omenjenih študij kažejo na to, da so vrednosti $\delta^{15}\text{N}$ v organsko pridelanih živilih višje v primerjavi z vrednostmi $\delta^{15}\text{N}$ v živilih s konvencionalno pridelavo.

V našem poskusu smo merili $\delta^{15}\text{N}$ v pulpi in peškah. V peškah smo določili višje vrednosti $\delta^{15}\text{N}$ kot v pulpi. Pri ekološko pridelanih jabolkih je povprečna $\delta^{15}\text{N}$ vrednost v peškah nekoliko višja in znaša 3,8 ‰, v konvencionalno pridelanih pa znaša 3,6 ‰. $\delta^{15}\text{N}$ v pulpi je prav tako višja v ekološko pridelanih jabolkih, in sicer povprečna vrednost znaša 2,8 ‰, medtem ko pri konvencionalno pridelanih jabolkih znaša 2,5 ‰.

Ali lahko iz naših rezultatov z metodo določanja vrednosti $\delta^{15}\text{N}$ razlikujemo med obema načinoma pridelave, pa ugotovimo iz izotopske razlike med organsko in ustrezno neorgansko vrsto pridelka, ki je definirana z enačbo (Rogers, 2008):

$$\Delta^{15}\text{N}_{(\text{org-neorg})} \text{‰} = \delta^{15}\text{N}_{\text{organsko}} - \delta^{15}\text{N}_{\text{neorgansko}} \quad (12)$$

Rogers (2008) navaja, da se vrednosti $\Delta^{15}\text{N}_{(\text{org-neorg})}$ gibljejo v območju od 2,2 do 4,0 ‰. V našem primeru je ta razlika zelo majhna in znaša 0,35 ‰.

Čeprav imajo ekološka jabolka višjo vrednost $\delta^{15}\text{N}$, pa je izotopska razlika med ekološko in konvencionalno pridelanimi jabolki premajhna, da bi lahko s to metodo ločevali med obema načinoma pridelave. Razlog za to je mogoče ta, da smo imeli premajhno število vzorcev in nismo dobili reprezentativnih rezultatov. Drugi razlog pa bi bil lahko ta, da je možno, da kmetje pri konvencionalnem načinu pridelave uporabljajo tudi organska gnojila kot dopolnilo. Sancin (1988) namreč priporoča, da naj bi pri konvencionalni pridelavi v času rodnosti jablane gnojili tudi z organskimi gnojili, kot so hlevski in konjski gnoj, kompost in z organskimi koncentraty.

Iz naših rezultatov merjenja $\delta^{15}\text{N}$ v peškah in pulpi ne moremo ugotoviti, na kakšen način so bila jabolka pridelana, čeprav se je ta metoda na splošno izkazala za dobro metodo razlikovanja med obema načinoma pridelave.

Tudi $\delta^{13}\text{C}$ vrednosti nam služijo kot pokazatelji, kako je bila določena kultura pridelana. Gnojenje s sintetičnimi gnojili zagotavlja večjo preskrbo rastline z dušikom, kot v primerih, kjer je gnojenje organsko, in zato lahko spremeni vsebnost izotopa ogljika. Raziskave so pokazale, da so v nekateri ekološko pridelani zelenjavi nižje $\delta^{13}\text{C}$ vrednosti kot v konvencionalno pridelani (Flores in sod., 2007; Rapisarda in sod., 2010). V našem primeru je bila najnižja povprečna $\delta^{13}\text{C}$ vrednost -28,1 ‰ določena v pulpi konvencionalno pridelanih jabolk, medtem ko je povprečna vrednost $\delta^{13}\text{C}$ v ekoloških jabolkih višja in znaša -26,9 ‰, kar je v nasprotju s prejšnjo trditvijo.

Kljub temu tako Flores s sodelavci (2007) kot tudi Rapisarda s sodelavci (2010) v svojih poskusih niso našli povezave med načinom gnojenja in vrednostjo $\delta^{13}\text{C}$ in tako prišli do zaključka, da s pomočjo izotopske sestave ogljika ne moremo razlikovati med ekološkim in konvencionalnim načinom pridelave. Bolj kot način pridelave pridelka na $\delta^{13}\text{C}$ v pulpi, sladkorjih in peškah vpliva geografsko poreklo jabolka.

Worthington (2001) je analizirala rezultate 41 različnih študij, ki so primerjali kvaliteto in vsebnost hranil v ekoloških in konvencionalnih pridelkih. V svojih raziskavah je ugotovila, da ekološko pridelane rastline vsebujejo več prehransko pomembnih mineralov in manj nekaterih težkih kovin kot klasično pridelane rastline. Vsebujejo bistveno več železa, magnezija in fosforja ter precej manj nitratov (ki so toksični). Ekološki pridelki so imeli v povprečju večjo vsebnost vseh mineralnih snovi, upoštevanih pri tej analizi.

Le malo raziskav je bilo opravljenih na jabolkih. Roussos in Gasparatos (2009) sta v svoji raziskavi ugotovila, da so ekološko pridelana jabolka vsebovala več kalija, natrija, kalcija in mangana, medtem ko so konvencionalno pridelana jabolka vsebovala več dušika in bakra.

V našem poskusu smo prišli do ugotovitve, da ekološka jabolka vsebujejo v povprečju več mineralov kot konvencionalno pridelana, le klora je več pri slednjih.

V največji koncentraciji je zastopan kalij, nato mu sledijo fosfor, kalcij, žveplo in klor. V precej nižji koncentraciji pa so prisotni rubidij, cink in mangan.

Največje razlike med obema načinoma pridelave so pri vsebnosti žvepla, kalcija in rubidija, kjer imajo ekološka jabolka precej višjo koncentracijo teh elementov, manjše razlike pa so pri vsebnosti fosforja, kalija, mangana in cinka. Le koncentracija klora je rahlo višja pri konvencionalno pridelanih jabolkih. Glede na to, da je malo literarnih podatkov o jabolkih je težko razložiti trend, ki smo ga dobili v naši raziskavi. Ena od možnih razlag za višje vsebnosti kalcija, je njegova sposobnost kopičenja v sadju (Roussos in Gasparatos, 2009).

6 SKLEPI

Iz rezultatov analiz za ugotavljanje razlik med ekološko in konvencionalno pridelanimi jabolki lahko povzamemo naslednje sklepe:

- Jabolka iz konvencionalne pridelave so težja in povprečno tehtajo 197 g, medtem ko ekološka jabolka tehtajo 186 g.
- Več kot jabolka vsebujejo skupnih fenolnih spojin in vitaminov, višji je antioksidacijski potencial (AOP). Sorti idared in topaz imata najvišji AOP (0,411 in 0,362 nmol DPPH/ml), prav tako pa vsebujeta največ skupnih fenolnih spojin in askorbinske kisline. Sorti gala in zlati delišes pa imata najnižjo vsebnost skupnih fenolov in askorbinske kisline in tudi njun AOP je najnižji.
- Koncentracija skupnih fenolnih spojin in AOP v ekološko pridelanih jabolkih se ne razlikujeta od konvencionalno pridelanih. Glede na to, da je vsebnost odvisna tudi od sorte jabolk smo višje vsebnosti fenolov in AOP pri ekološki pridelavi dobili šele takrat, ko smo izločili jabolka sorte idared. Takrat so povprečne vrednosti koncentracij skupnih fenolnih spojin (344 mg/l) in AOP (0,295 nmol DPPH/ml) nižje pri konvencionalni pridelavi v primerjavi z organsko, kjer so povprečne vrednosti 451 mg/l za koncentracijo skupnih fenolnih spojin in 0,353 nmol DPPH/ml za AOP.
- Vsebnost askorbinske kisline je precej višja pri ekološko pridelanih jabolkih in v povprečju znaša 32,2 mg/100 ml, medtem ko je koncentracija v konvencionalno pridelanih jabolkih 23,0 mg/100 ml.
- Vsebnost fenolnih spojin in askorbinske kisline je med drugim odvisna tudi od sorte jabolk. Najvišjo koncentracijo skupnih fenolnih spojin ima sorta idared (571 mg/l), najnižjo pa zlati delišes (334 mg/l). Najvišjo koncentracijo askorbinske kisline ima sorta topaz in znaša 44,3 mg/100 ml, najnižjo koncentracijo pa ima zlati delišes s koncentracijo 13,7 mg/100 ml.
- $\delta^{15}\text{N}$ vrednosti v pulpi ekološko pridelanih jabolk zavzemajo vrednosti od 1,3 do 3,9 ‰, povprečna vrednost pa znaša 2,8 ‰. Pri jabolkih, pridelanih na konvencionalen način, $\delta^{15}\text{N}$ v pulpi zavzemajo vrednosti med -0,03 in 4,7 ‰, njihova povprečna vrednost pa je malo nižja kot pri ekoloških jabolkih in znaša 2,5 ‰.

- V peškah smo določili višje vrednosti $\delta^{15}\text{N}$ kot v pulpi. Pri ekološko pridelanih jabolkih je povprečna $\delta^{15}\text{N}$ vrednost v peškah nekoliko višja in znaša 3,8 ‰, v konvencionalno pridelanih pa znaša 3,6 ‰.
- Z metodo določanja izotopskega razmerja $\delta^{15}\text{N}$ v našem poskusu ne moremo razlikovati med ekološko in konvencionalno pridelavo, saj so bile razlike med obema načinoma pridelave premajhne.
- Najnižje vrednosti $\delta^{13}\text{C}$ smo določili v pulpi jabolčnega soka. V povprečju imajo jabolka iz konvencionalne pridelave nižjo vrednost $\delta^{13}\text{C}$ in je -28,1 ‰, pri ekoloških jabolkih pa ta vrednost znaša -26,9 ‰. Nekoliko višje $\delta^{13}\text{C}$ vrednosti smo določili v izoliranih sladkorjih in v peškah jabolok. Ekološko pridelana jabolka imajo povprečno $\delta^{13}\text{C}$ vrednost -26,0 ‰ v izoliranih sladkorjih in -25,4 ‰ v peškah, nekoliko nižjo povprečno $\delta^{13}\text{C}$ vrednost pa imajo konvencionalno pridelana jabolka in znaša -26,5 ‰ tako v sladkorjih kot tudi v peškah.
- S pomočjo izotopske sestave ogljika v našem primeru ne moremo razlikovati med ekološko in konvencionalno pridelavo.
- Ekološka jabolka vsebujejo v povprečju več mineralov kot konvencionalno pridelana, le klora je več pri slednjih. Največje razlike med obema načinoma pridelave so pri vsebnosti žvepla, kalcija in rubidija, kjer imajo ekološka jabolka precej višjo koncentracijo teh elementov.

7 POVZETEK

Jabolko je eno izmed najbolj dostopnih in najbolj zdravih sadežev. Je dober vir energije in zdravilnih snovi. Pomaga pri izboljšanju odpornosti telesa, pomembno vlogo pa igra tudi pri preprečevanju številnih obolenj. Na trgu imamo pestro ponudbo jabolk najrazličnejših sort, ki so pridelana na različne načine. Pri nas je bolj razširjena konvencionalna pridelava jabolk, vendar pa v zadnjih letih vedno bolj pridobiva na pomenu tudi ekološka pridelava, saj se smernice prehranjevanja spreminjajo. Rast tržišča z ekološkimi pridelki je pogojena s povečanim povpraševanjem po zdravi hrani, z zahtevami po varstvu narave in s spodbujanjem biotske raznovrstnosti. Ekološka živila imajo višjo prehransko kot tudi zdravstveno vrednost. Vsebujejo več vitaminov, mineralov, encimov in ostalih mikro hranil kot konvencionalno pridelana živila ter ne vsebujejo strupenih kemikalij in ostankov pesticidov. Vendar pa so ta živila dražja, saj je njihova pridelava precej bolj zahtevna.

Namen naše raziskave je bil ugotoviti, ali obstajajo razlike med ekološko in konvencionalno pridelanimi jabolki. Ugotavljali smo, kakšne so razlike v kemijski in izotopski sestavi jabolk. V raziskavi smo uporabili 19 vzorcev jabolk različnih sort in različnega geografskega porekla, 7 vzorcev je bilo ekološko, 12 pa konvencionalno pridelanih. Primerjali smo tudi razlike med posameznimi sortami jabolk, in sicer smo imeli naslednje sorte: gala, gloster, gold rush, zlati delišes, topaz in idared.

Med kemijskimi lastnostmi smo primerjali antioksidacijski potencial, koncentracijo skupnih fenolnih spojin in koncentracijo askorbinske kisline (vitamina C), izmerili smo maso jabolk, določili pa smo tudi koncentracije posameznih elementov (fosfor, žveplo, klor, kalij, kalcij, mangan, cink in rubidij) v jabolkih. Določili smo tudi vsebnost dušikovih in ogljikovih izotopov v vzorcih jabolčnega soka, in sicer smo izmerili vrednosti $\delta^{13}\text{C}$ in $\delta^{15}\text{N}$ v pulpi jabolčnega soka in v peškah ter $\delta^{13}\text{C}$ v izoliranih sladkorjih.

Vzorci jabolk smo stehali in izračunali povprečno maso za posamezne vzorce. Na maso jabolk vpliva tudi sorta. Najtežja jabolka v našem poskusu so gloster, najlažja pa so jabolka sorte zlati delišes. Masa variira tudi znotraj posameznih sort. Konvencionalno pridelana jabolka so težja in v povprečju tehtajo 197 g, medtem ko ekološko pridelana tehtajo 186 g.

Antioksidacijski potencial je predvsem posledica vsebnosti polifenolov (še posebno flavonoidov) in v manjši meri vitaminov. Antioksidacijski potencial smo določili spektrofotometrično z metodo DPPH[•], ki temelji na reakciji stabilnega radikala DPPH[•] (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) v 2 % raztopini metafosforjeve kisline (MFK) z antioksidanti iz vzorca (donorji vodika).

Fenolne spojine v jabolkih so pomembne, saj prispevajo k okusu in oksidacijski stabilnosti jabolk. Najpomembnejše fenolne spojine v jabolkih so hidrokscimetne kisline, flavanoli, dihidroalkoni in flavonoli. Fenolne spojine v vzorcih jabolčnega soka smo določali s Folin-Ciocalteu jevim reagentom, pri čemer smo merili absorbanco pri valovni dolžini 765 nm. Vsebnost skupnih fenolnih spojin je odvisna od mnogih dejavnikov, zato so vrednosti v naših vzorcih tako raznolike, in sicer se koncentracije gibljejo v mejah od 210 do 766 mg/l. Med drugim je vsebnost skupnih fenolnih spojin odvisna tudi od sorte jabolk. Najvišjo koncentracijo skupnih fenolnih spojin ima sorta idared (571 mg/l), najnižjo pa zlati delišes (334 mg/l).

Koncentracijo askorbinske kisline (AA) smo določali z metodo HPLC s spektrofotometričnim UV-VIS detektorjem. Absorbanco smo merili pri valovni dolžini 245 nm. Na koncentracijo AA v jabolkih vplivajo različni dejavniki pred, med in po obiranju. Vsebnost AA je precej odvisna od sorte jabolk, prav tako pa koncentracija variira tudi znotraj posameznih sort. Najvišjo povprečno koncentracijo AA ima sorta topaz in meri 44,3 mg/100 ml, najnižjo pa zlati delišes in meri 13,7 mg/100 ml. Tudi način pridelave vpliva na vsebnost askorbinske kisline. Koncentracija AA je precej višja pri ekološko pridelanih jabolkih, kjer v povprečju znaša 32,2 mg/100 ml, medtem ko je koncentracija v konvencionalno pridelanih jabolkih 23,0 mg/100 ml, kar je skoraj 30 % manj.

Sorti idared in topaz imata najvišji AOP, prav tako pa vsebujeta največ skupnih fenolnih spojin in askorbinske kisline. Tako iz rezultatov vidimo korelacijo med temi tremi parametri. Več kot jabolka vsebujejo fenolnih snovi in vitaminov, višji je AOP. Sorti gala in zlati delišes pa imata najnižjo vsebnost skupnih fenolnih spojin in askorbinske kisline in tudi njun AOP je najmanjši.

Z metodo IRMS (Isotope Ratio Mass Spectrometry) smo določali vsebnost dušikovih in ogljikovih izotopov v vzorcih jabolčnega soka. Metoda temelji na merjenju izotopskega razmerja med deležem težjega in lažjega izotopa. Določili smo vrednosti $\delta^{13}\text{C}$ in $\delta^{15}\text{N}$ v pulpi jabolčnega soka in v peškah ter $\delta^{13}\text{C}$ v izoliranih sladkorjih.

Metoda določanja izotopskega razmerja $\delta^{15}\text{N}$ se uporablja za razlikovanje med ekološkim in konvencionalnim načinom pridelave, saj ima uporaba dušik vsebujočih gnojil velik vpliv na vrednosti $\delta^{15}\text{N}$ v pridelkih. Vrednosti $\delta^{15}\text{N}$ pri konvencionalnih pridelkih so običajno blizu 0 ‰, po navadi med -2 in +2 ‰, medtem ko so te vrednosti bistveno višje pri ekoloških pridelkih in so po navadi od +2 do +10 ‰. V peškah smo določili višje vrednosti $\delta^{15}\text{N}$ kot v pulpi. Pri ekološko pridelanih jabolkih je povprečna $\delta^{15}\text{N}$ vrednost v peškah nekoliko višja in

znaša 3,8 ‰, v konvencionalno pridelanih pa znaša 3,6 ‰. $\delta^{15}\text{N}$ v pulpi je prav tako višja v ekološko pridelanih jabolkih, kjer znaša 2,8 ‰, medtem ko pri konvencionalno pridelanih jabolkih znaša 2,5 ‰. Čeprav imajo ekološka jabolka višjo vrednost $\delta^{15}\text{N}$, pa je izotopska razlika med ekološko in konvencionalno pridelanimi jabolki premajhna, da bi lahko v naši raziskavi s to metodo ločili med obema načinoma pridelave.

Tudi $\delta^{13}\text{C}$ vrednosti nam služijo kot pokazatelji, kako je bila določena kultura pridelana, in sicer so v ekoloških pridelkih nižje $\delta^{13}\text{C}$ vrednosti kot v konvencionalnih. Vendar pa se ta metoda na splošno ni izkazala za tako uporabno kot določanje $\delta^{15}\text{N}$. Najnižje vrednosti $\delta^{13}\text{C}$ smo določili v pulpi jabolčnega soka. V povprečju imajo jabolka iz konvencionalne pridelave nižjo vrednost $\delta^{13}\text{C}$ in je -28,1 ‰, pri ekoloških jabolkih pa ta vrednost znaša -26,9 ‰. Nekoliko višje $\delta^{13}\text{C}$ vrednosti smo določili v izoliranih sladkorjih in v peškah jabolk. $\delta^{13}\text{C}$ vrednosti ne moremo uporabiti pri ločevanju ekološke pridelave s konvencionalno, so nam pa v pomoč pri določanju geografskega porekla živil.

Z metodo rentgenske fluorescenčne spektroskopije (TXRF) smo v vzorcih jabolk določali koncentracije posameznih elementov. V največji koncentraciji je zastopan kalij, nato mu sledijo fosfor, kalcij, žveplo in klor. V precej nižjih koncentracijah pa so prisotni rubidij, cink in mangan. Ekološko pridelane rastline na splošno vsebujejo več prehransko pomembnih mineralov in manj nekaterih težkih kovin in nitratov kot konvencionalno pridelane rastline. V našem poskusu smo prišli do ugotovitve, da ekološka jabolka vsebujejo v povprečju več mineralov kot konvencionalno pridelana, le klora je več pri slednjih. Največje razlike med obema načinoma pridelave so pri vsebnosti žvepla, kalcija in rubidija, kjer imajo ekološka jabolka precej višjo koncentracijo teh elementov, manjše razlike pa so pri vsebnosti fosforja, kalija, mangana in cinka.

Na podlagi rezultatov predstavljenih v diplomski nalogi lahko vidimo, da obstajajo razlike med ekološko in konvencionalno pridelanimi jabolki. Ekološka jabolka vsebujejo več fenolnih spojin in askorbinske kisline, posledično je višji tudi antioksidacijski potencial. So tudi lažja od konvencionalnih. Z metodo določanja izotopskega razmerja $\delta^{15}\text{N}$ in $\delta^{13}\text{C}$ v našem primeru ne moremo razlikovati med obema načinoma pridelave, čeprav se je metoda določanja $\delta^{15}\text{N}$ na splošno izkazala za uspešno metodo razlikovanja. Razlog za to je mogoče ta, da smo imeli premajhno število vzorcev in nismo dobili reprezentativnih rezultatov. Drugi razlog pa bi bil lahko ta, da je možno, da kmetje pri konvencionalnem načinu pridelave uporabljajo tudi organska gnojila kot dopolnilo. Ekološka jabolka vsebujejo nekoliko več mineralov (razen klora) kot konvencionalno pridelana. Zato lahko predpostavljamo, da imajo jabolka iz ekološke pridelave višjo prehransko kot tudi zdravstveno vrednost.

8 VIRI

Abram V. 2000. Antioksidativno delovanje flavonoidov. V: Antioksidanti v živilstvu. 20. Bitenčevi živilski dnevi, Portorož, 26. in 27. oktober 2000. Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 23-32

Abram V., Simčič M. 1997. Fenolne spojine kot antioksidanti. Farmaceutski vestnik, 48: 573-578

Adamič F. 1975. Naše sadje. Ljubljana, ČZD Kmečki glas: 25-25

Adamič Š. 1980. Temelji biostatistike. Ljubljana, Medicinska fakulteta, Inštitut za biomedicinsko informatiko: 161 str.

AOAC official method 981.09. Carbon stable isotope ratio of apple juice. 1997. V: Official methods of analysis of AOAC International. Cunniff P. (ed.). 16th ed. Gainthersburg, AOAC International, 2, 37: 19-20

Awad M.A., de Jager A., van Westing L.M. 2000. Flavonoid and chlorogenic acid levels in apple fruit: Characterization of variation. Scientia Horticulturae, 83: 249-263

Bajt A., Štiblar F. 2002. Statistika za družboslovce. Ljubljana, GV Založba: 213 str.

Bateman A.S., Kelly S.D., Jickells T.D. 2005. Nitrogen isotope relationship between crops and fertilizer: Implication for using nitrogen isotope analysis as an indicator of agricultural regim. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53, 14: 5760-5765

Bateman A.S., Kelly S.D., Woolfe M. 2007. Nitrogen isotope composition of organically and conventionally grown crops. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 55, 7: 2664-2670

Bavec M. 2001. Ekološko kmetijstvo. Ljubljana, ČZD Kmečki glas: 21-23

Bertazza G., Bignami C., Cristoferi G. 2010. Fruit composition and quality of apple, apricot and pear cultivars organically and conventionally grown in the Veneto region (Northern Italy). ISHS Acta Horticulturae 873: 309-316

Biziuk M., Kuczynska J. 2007. Mineral components in food – analytical implications. V: Mineral components in foods. Szefer P., Nriagu J.O. (eds.). Boca Raton, CRC Press/Taylor & Francis Group: 1-31

Boyer R.F. 2005. Temelji biokemije. Ljubljana, Študentska založba: 634 str.

Brand-Williams W., Cuvelier M.E., Berset C. 1995. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. LWT - Food Science and Technology, 28: 25-30

Brause A.R., Raterman J.M. 1982. Verification of authenticity of apple juice. Journal of the Association of Official Analytical Chemists, 65, 4: 846-849

Bréas O., Renieri F., Serrini G. 1994. Isotope ratio mass spectrometry: Analysis of wines from different European countries. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 8, 12: 967-970

Caf A., Brence A. 2010. Ekološko sadjarstvo – zakaj pa ne? Novo Mesto, Kmetijsko gozdarska zbornica Slovenije, Kmetijsko gozdarski zavod Novo Mesto: 2 str.
www.kmetijskizavod-nm.si/file/967/download/1131 (21.01.2011)

Chennan M., Streif J. 2002. Verteilung von ascorbinsäure and dehydroascorbinsäure in früchten von vier apfelsorten. Erwerbsobstbau, 44: 13-17

Chinnici F., Bendini A., Gaiani A., Riponi C. 2004. Radical scavenging activities of peels and pulps from cv. Golden Delicious apples as related to their phenolic composition. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 52, 15: 4684-4689

Chepda T., Cadau M., Lassabliere F., Reynaud E., Perier C., Frey J., Chamson A. 2001. Synergy between ascorbate and alpha-tocopherol on fibroblasts in culture. Life Science, 69, 14: 1587-1596

Choi W.J., Ro H.M., Hobbie E.A. 2003. Patterns of natural ¹⁵N in soils and plants from chemically and organically fertilized uplands. Soil Biology & Biochemistry, 35: 1493-1500

Clark I., Fritz P. 1997. Environmental isotopes in hydrogeology. New York, Lewis Publishers: 328 str.

Council Regulation (EEC) No 2092/91 of 24 June 1991 on organic production of agricultural products and indications referring thereto on agricultural products and foodstuffs. 1991. Official Journal of the European Communities, 34, L198: 1-15

Craig H. 1957. Isotopic standards for carbon and oxygen and correction factors for mass spectrometric analysis of carbon dioxide. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 12: 133-149

Dermastia M. 2007. Pogled v rastline. Ljubljana, Nacionalni inštitut za biologijo: 130 str.

Doberšek U. 2003. Določanje mineralov v medu z rentgensko fluorescenčno spektroskopijo. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 92 str.

Doner L.W., Krueger H.W., Reesman R.H. 1980. Isotopic composition of carbon in apple juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 28, 2: 362-364

Dunn S. 2007. Gas source mass spectrometry: Stable isotope geochemistry. Northfield, The Science Education Resource Center: 5 str.

http://serc.carleton.edu/research_education/geochemsheets/techniques/gassourcemassspec.html (14.01.2011)

Ehleringer J.R., Epstein S. 2001. C₃ and C₄ photosynthesis. V: *Encyclopedia of global environmental change*. Mooney H.A., Canadell J. (eds.). New York, Wiley: 186-190

Engel M.H., Macko S.A. 1993. *Organic geochemistry: Principles and applications*. New York, London, Plenum Press: 861 str.

Falkowski P.G. 2003. Biogeochemistry of primary production in the sea. V: *Biogeochemistry: Treatise on geochemistry*. Vol. 8. Schlesinger W.H., Holland H.D. Turekian K.K. (eds.). Oxford, Elsevier, Pergamon Oxford: 185-213

Farquhar G. D., Ehleringer J.R., Hubick K.T. 1989. Carbon isotope discrimination. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 40: 503-537

Favell D.J. 1998. A comparison of the vitamin C content of fresh and frozen vegetables. *Food Chemistry*, 62, 1: 59-64

Flores P., Fenoll J., Hellin P. 2007. The feasibility of using $\delta^{15}\text{N}$ and $\delta^{13}\text{C}$ values for discriminating between conventionally and organically fertilized pepper (*Capsicum annuum* L.). Journal of Agricultural and Food Chemistry, 55, 14: 5740-5745

Francis A.C., Flora C.B., King L.D. 1990. Sustainable agriculture in temperate zones. New York, Wiley-Interscience Publication: 483 str.

Georgi M., Voerkeliu S., Rossmann A., Graßmann J., Schnitzler W.H. 2005. Multielement isotope ratios of vegetables from integrated and organic production. Plant and Soil, 275: 93-100

Ghidini S., Ianieri A., Zanardi E., Conter M., Boschetti T., Iacumin P., Bracchi P.G. 2006. Stable isotopes determination in food authentication: A review. Annali della Facoltà di Medicina Veterinaria di Parma, 26: 193-204

Golob T., Doberšek U., Kump P., Nečemer M. 2005. Determination of trace and minor elements in Slovenian honey by total reflection X-ray fluorescence spectroscopy. Food Chemistry, 91: 593-600

Gordon M.H. 2003. Natural antioxidants. V: Encyclopedia of food sciences and nutrition. Vol. 1. 2nd ed. Caballero B., Trugo L., Fingals M.P. (eds.). Amsterdam, Academic Press: 261-289

Harborne J.B., Williams C.A. 2000. Advances in flavonoid researches since 1992. Phytochemistry, 55, 6: 481-504

Heaton T.H.E. 1986. Isotopic studies of nitrogen pollution in the hydrosphere and atmosphere: A review. Chemical Geology, 59: 87-102

Hecke K., Herbinger K., Veberič R., Trobec M., Toplak H., Štampar F., Keppel H., Grill D. 2006. Sugar-, acid- and phenol contents in apple cultivars from organic and integrated fruit cultivation. European Journal of Clinical Nutrition, 60: 1136-1140

Hribar J., Simčič M. 2000. Antioksidanti v sadju in vrtinah. V: Antioksidanti v živilstvu. 20. Bitenčevi živilski dnevi, Portorož, 26. in 27. oktober 2000. Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 151-157

Jamin E., Gonzales J., Remaud G., Naulet N., Martin G.G., Weber D., Rossmann A., Schmidt H.-L. 1997. Improved detection of sugar addition to apple juices and concentrates using internal standard ^{13}C IRMS. *Analytica Chimica Acta*, 347, 3: 359-368

Jazbec M., Vrabl S., Juvanc J., Honzak D. 1987. V sadnem vrtu. Ljubljana, ČZD Kmečki glas: 389 str.

Kahle K., Kraus M., Richling E. 2005. Polyphenol profiles of apple juices. *Molecular Nutrition & Food Research*, 49, 8: 797-806

Kaplan N., Margaritz M. 1986. A nitrogen-isotope study of the sources of nitrate contamination in groundwater of the Pleistocene coastal plain aquifer, Israel. *Water Research*, 20, 2: 131-135

Kendall C. 1998. Tracing nitrogen sources and cycling in catchments. V: *Isotope tracers in catchment hydrology*. Kendall C., McDonnell J.J. (eds.). Amsterdam, Elsevier Science Publishers B.V.: 519-576

Kitts D.D. 1997. An evaluation of the multiple effects of the antioxidant vitamins. *Trends in Food Science & Technology*, 8: 198-203

Kornexl B.E., Rossmann A., Schmidt H.-L. 1996. Improving fruit juice origin assignment by combined carbon and nitrogen isotope ratio determination in pulps. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung*, 202, 1: 55-59

Korošec L. 2000. Prosti radikali in vloga antioksidantov v bioloških sistemih. V: *Antioksidanti v živilstvu*. 20. Bitenčevi živilski dnevi, Portorož, 26. in 27. oktober 2000. Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 11-21

Košmerl T., Kač M. 2004. Osnovne kemijske analize mošta in vina: laboratorijske vaje za predmet Tehnologija vina. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 97-101

Kovač B., Raspor P. 2000. Določanje antioksidativnega potenciala biomase filamentoznih gliv. V: *Antioksidanti v živilstvu*. 20. Bitenčevi živilski dnevi, Portorož, 26. in 27. oktober 2000. Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 93-100

Kreft I., Škrabanja V., Bonafaccia G. 2000. Temelji prehranskih in biotskih vplivov antioksidantov. V: Antioksidanti v živilstvu. 20. Bitenčevi živilski dnevi, Portorož, 26. in 27. oktober 2000. Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 33-38

Kregar I. 1996. Kromatografske metode. V: Biotehnologija. Osnovna znanja. Raspor P. (ur.). Ljubljana, Bia: 609-632

Krišković P. 1989. Biološko pridelovanje hrane. Ljubljana, ČZD Kmečki glas: 217 str.

Kukovec K. 2006. Frakcionacija stabilnih izotopov dušika v fitoplanktonu. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije: 57 str.

Kump P. 1994. Rentgenska fluorescenčna spektroskopija s totalnim odbojem (TXRF). Vakuumist, 14, 4: 15-19

Kuščer I., Moljk A. 1960. Fizika (atomika). Ljubljana, Univerzitetna založba: 132-138

Lancaster J.E. 1992. Regulation of skin color in apples. Critical Reviews in Plant Sciences, 10, 6: 487-502

Lazarini F., Brenčič J. 1992. Splošna in anorganska kemija. Ljubljana, Državna založba Slovenije: 55-55

Lee H.S., Wrolstad R.E. 1988. Stable isotopic carbon composition of apples and their subfractions-juice, seeds, sugars and nonvolatile acids. Journal of the Association of Official Analytical Chemists, 71, 4: 795-797

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, ČZD Kmečki glas: 45-46

Lind K., Lafer G., Schloffer K., Innerhofer G., Meister H. 2001. Ekološko sadjarstvo. Ljubljana, ČZD Kmečki glas: 314 str.

Markowski J., Plochanski W. 2006. Determination of phenolic compounds in apples. Journal of Fruit and Ornamental Plant Research, 14, 2: 133-142

Martin G.J. 1990. The chemistry of chaptalization. *Endeavour*, 14, 3: 137-143

Mayr U., Treutter D., Santos-Buelga C., Bauer H. 1995. Developmental changes in the phenol concentrations of 'Golden Delicious' apple fruits and leaves. *Phytochemistry*, 38, 5: 1151-1151

McCandless L. 1999. Antioxidant activity of apples is high. New York, Cornell University: 1-2

<http://132.236.1.24/pubs/press/1999/leehealth.html> (05.12.2010)

McGhie T.K., Hunt M., Barnett L.E. 2005. Cultivar and growing region determine the antioxidant polyphenolic concentration and composition of apples grown in New Zealand. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 8: 3065-3070

Medić-Šarić M., Buhač I., Bradamante V. 2000. Vitamini i minerali: istine i predrasude. Zagreb, Hoffman-La Roche: 359 str.

Mindell E. 2000. Vitaminska biblija za novo tisočletje. Ljubljana, Mladinska knjiga: 422 str.

Molyneux P. 2004. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarinn Journal of Science and Technology*, 26, 2: 211-219

Nakano A., Uehara Y., Yamauchi A. 2003. Effect of organic and inorganic fertigation on yields, $\delta^{15}\text{N}$ values and $\delta^{13}\text{C}$ values of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill. cv. Saturn). *Plant Soil*, 255, 1: 343-349

Napolitano A., Cascone A., Graziani G., Ferracane R., Scalfi L., Di Vaio C., Ritieni A, Fogliano V. 2004. Influence of variety and storage on the polyphenol composition of apple flesh. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 21: 6526-6531

Nojavan S., Khalilian F., Kiaie F.M., Rahimi A., Arabanian A., Chalavi S. 2008. Extraction and quantitative determination of ascorbic acid during different maturity stages of *Rosa canina* L. fruit. *Journal of Food Composition and Analysis*, 21, 4: 300-305

Offord E.A., Gautier J.C., Avanti O., Scaletta C., Runge F., Kramer K., Applegate L.A. 2002. Photoprotective potential of lycopene, β -carotene, vitamin E, vitamin C and carnosic acid in UVA-irradiated human skin fibroblasts. *Free Radical Biology and Medicine*, 32, 12: 1293-1303

- O'Leary M.H. 1988. Carbon isotopes in photosynthesis. *BioScience*, 38, 5: 328-326
- Petauer T. 1993. Leksikon rastlinskih bogastev. 1. izd. Ljubljana, Tehniška založba Slovenije: 684 str.
- Priporočila za ekološko kmetovanje v Sloveniji. 1997. Ljubljana, Ministrstvo za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano Republike Slovenije, Uprava RS za pospeševanje kmetijstva: 47 str.
- Raspor P., Kovač B., Batič M., Berglez D. 2000. Bioprocesi pridobivanja antioksidantov. V: Antioksidanti v živilstvu. 20. Bitenčevi živilski dnevi, Portorož, 26. in 27. oktober 2000. Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 53-66
- Rapisarda P., Calabretta M.L., Romano G., Intrigliolo F. 2005. Nitrogen metabolism components as a tool to discriminate between organic and conventional citrus fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 7: 2664-2669
- Rapisarda P., Camin F., Fabroni S., Perini M., Torrisi B., Intrigliolo F. 2010. Influence of different organic fertilizers on quality parameters and the $\delta^{15}\text{N}$, $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^2\text{H}$, $\delta^{34}\text{S}$, and $\delta^{18}\text{O}$ values of orange fruit (*Citrus sinensis* L. Osbeck). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 6: 3502-3506
- Robačar M. 2009. Vpliv gnojenja z organskimi gnojili in obdelave tal na vsebnost mineralnega dušika v tleh v ekološki pridelavi jabolk sorte topaz. Magistrsko delo. Maribor, Fakulteta za kmetijstvo in biosistemske vede, Agronomija: 63 str.
- Rogers K.M. 2008. Nitrogen isotopes as a screening tool to determine the growing regimen of some organic and nonorganic supermarket produce from New Zealand. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 11: 4078-4083
- Roginsky V., Lissi E.A. 2005. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. *Food Chemistry*, 92: 235-254
- Roussos P.A., Gasparatos D. 2009. Apple tree growth and overall fruit quality under organic and conventional orchard management. *Scientia Horticulturae*, 123, 2: 247-252
- SAHRA. 2005. Isotopes and Hydrology: Nitrogen. Tucson, SAHRA – Sustainability of semi-Arid Hydrology and Riparian Areas: 1-5
<http://cierzo.sahra.arizona.edu/programs/isotopes/nitrogen.html> (15.11.2010)

Sancin V. 1988. Sadje z našega vrta. Trst, Založništvo tržaškega tiska: 376 str.

Sattler F., Wistinghausen E. 1995. Kmetovanje po biološko-dinamični metodi. Vrzenec, Društvo za biološko-dinamično gospodarjenje Ajda: 75-77

Skvarča M. 2000. Učinek antioksidantov na kakovost maščob. V: Antioksidanti v živilstvu. 20. Bitenčevi živilski dnevi, Portorož, 26. in 27. oktober 2000. Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 179-190

Stracke B.A., Rüfer C.E., Weibel F.P., Bub A., Watzl B. 2009. Three-year comparison of the polyphenol contents and antioxidant capacities in organically and conventionally produced apples (*Malus domestica* Bork. Cultivar 'Golden Delicious'). Journal of Agricultural and Food Chemistry, 57, 11: 4598-4605

Sutherland R.A., Van Kessel C., Farrell R.E., Pennock D.J. 1993. Landscape-scale variations in plant and soil nitrogen-15 natural abundance. Soil Science Society of America Journal, 57, 1: 169-178

Štampar F., Lešnik M., Veberič R., Solar A., Koron D., Usenik V., Hudina M., Osterc G. 2009. Sadjarstvo. 2 dop. izd. Ljubljana, ČZD Kmečki glas: 416 str.

Taiz L., Zeiger E. 1998. Plant physiology. 2nd ed. Sunderland (Massachussets), Sinaur Associates: 792 str.

Tajnšek A. 2005. Splošno poljedelstvo: slikovno gradivo za slušatelje 1. letnika. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo: 272 str.

Tsao R., Yang R., Young J.C., Zhu H. 2003. Polyphenolic profiles in eight apple cultivars using high-performance liquid chromatography (HPLC). Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51, 21: 6347-6353

Unger U. 2007. Vitamini. Ljubljana, Mladinska knjiga: 45-48

Uno G., Storey R., Moore R. 2001. Principles of botany. New York, The McGraw-Hill Companies: 240-249

Ursell A. 2003. Vitamini in minerali. Tržič, Učila International: 42-43

Usenik V., Osterc G., Mikulič Petkovšek M., Trobec M., Veberič R., Colarič M., Solar A., Štampar F. 2004. The involvement of phenolic compounds in the metabolism of fruit trees. V: Razprave IV. Razreda SAZU. Ljubljana, SAZU: 187-204

Valavanidis A., Vlachogianni T., Psomas A., Zovoili A., Siatis A. 2009. Polyphenolic profile and antioxidant activity of five apple cultivars grown under organic and conventional agricultural practices. *International Journal of Food Science & Technology*, 44: 1167-1175

Van der Merwe N. 1982. Carbon isotopes, photosynthesis and archaeology. *American Scientist*, 70: 596-606

Van der Sluis A. A., Dekker M., Skrede G., Jongen W.M.F. 2004. Activity and concentration of polyphenolic antioxidants in apple juice. 2. Effect of novel production methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 10: 2840-2848

Veberič R. 2010. Flavonoidi in njihova sinteza kot mehanizem odpornosti jablan na jablanov škrlup. Zaključno poročilo o rezultatih raziskovalnega projekta. Ljubljana, Biotehniška fakulteta: 17 str.

<http://www.dlib.si/v2/Details.aspx?query=%27keywords%3Dflavonoidi%27&pageSize=20&URN=URN%3ANBN%3ASI%3ADOC-BR27OXDM> (23.01.2011)

Veberič R., Štampar F. 2005. Selected polyphenols in fruit of different cultivars of genus *prunus*. *Phyton*, 45: 375-383

Veberič R., Trobec M., Herbinger K., Hofer M., Grill D., Štampar F. 2005. Phenolic compounds in some apple (*Malus domestica* Borkh.) cultivars of organic and integrated production. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85, 10: 1687-1694

Vidrih R., Kač M. 2000. Analitika antioksidantov. V: Antioksidanti v živilstvu. 20. Bitenčevi živilski dnevi, Portorož, 26. in 27. oktober 2000. Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 101-114

Vidrih T. 2001. Sodobna raba travinja. V: Mednarodni posvet za kmetijske svetovalce. 11.10.2001. Maribor, KGZ Maribor: 7 str.

<http://www2.arnes.si/~surtvidr/clanki/clanek21.htm> (12.01.2011)

Virginia R.A., Delwiche C.C. 1982. Natural ¹⁵N abundance of presumed N₂-fixing and non-N₂-fixing plants from selected ecosystems. *Oecologia*, 54: 317-325

Walker A., Lakin A., Cormack J. 2008. Vitamini, minerali in druga prehranska dopolnila. Reader's Digest. Ljubljana, Mladinska knjiga: 415 str.

Wechtersbach L. 2005. Stabilnost polarnih in nepolarnih antioksidantov v kompleksnem matriksu. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 74 str.

Weibel F.P., Bickel R., Leuthold S., Alföldi T. 2000. Are organically grown apples tastier and healthier? A comparative field study using conventional and alternative methods to measure fruit quality. *ISHS Acta Horticulturae* 517, 7:417-427

Weibel F.P., Häseli A. 2003. Organic apple production – with emphasis on European experiences. V: Apples: Botany, production and uses. Ferree D.C., Warrington I.J. (eds.). Cambridge, CABI Publishing: 551-583

Wolfe K., Wu X., Liu R.H. 2003. Antioxidant activity of apple peels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 3: 609-614

Worthington V. 2001. Nutritional quality of organic versus conventional fruits, vegetables, and grains. *Journal of Alternative and Complementary Medicine*, 7, 2: 161-173

Young I.S., Woodside J.V. 2001. Antioxidants in health and disease. *Journal of Clinical Pathology*, 54, 3: 176-186

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorju prof. dr. Rajku Vidrihu za vodenje in pomoč pri izdelavi diplomskega dela.

Hvala tudi somentorici prof. dr. Nives Ogrinc za strokovno pomoč in dajanja koristnih informacij in napotkov.

Za opravljeno recenzentsko delo se zahvaljujem prof. dr. Tatjani Košmerl.

Zahvaljujem se tudi celotnemu osebju Odseka za znanosti o okolju Instituta »Jožefa Stefana« v Podgorici za pomoč pri mojem delu.

Za tehnično pomoč v laboratoriju Katedre za tehnologije, prehrano in vino Oddelka za živilstvo se zahvaljujem Sonji Čerpič.

Hvala Lini Burkan Makivić, univ dipl. inž. živ. tehnol., za pomoč pri urejanju literature.

Zahvaljujem se tudi vsem ostalim, ki ste mi kadarkoli pomagali pri nastanku diplomskega dela in tudi pri samem študiju.